HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT
DÜSSELDORF

Allosterie der HPA-1 Varianten des thrombozytären Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Abdelouahid El-Khattouti
aus Beni Touzine Nador/Marokko

Düsseldorf, 2010

aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Referent: Herr Prof. Dr. William Martin

Korreferent: Herr Prof. Dr. Rüdiger E. Scharf

Tag der mündlichen Prüfung:

Eidesstattliche Erklärung
Die hier vorgelegte Arbeit habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die aus anderen Quellen übernommenen Daten sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form in keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

(Abdelouahid El-Khattouti)

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei allen, die diese Arbeit möglich gemacht haben.
Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rüdiger E. Scharf für das interessante Thema und den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz. Diese Arbeit wurde von Professor Dr. Rüdiger E. Scharf in allen Phasen sehr professionell und mit viel Hingabe begleitet. Ihm war kein Weg zu weit, keine Hürde zu hoch, um den Doktoranden komplexe, aber auch nicht so komplexe Fragestellungen zu erläutern. Die lebhaften konstruktiven Diskussionen waren maßgeblich an dem Gelingen dieser Arbeit beteiligt. Danke noch mal für alles.
Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bill Martin in der Naturwissenschaftlichen Fakultät danke ich für die unkomplizierte und zuvorkommende Art und Weise, für seine Herzlichkeit und seine Liebe zu den Studenten, an deren Weiterkommen er stets großes Interesse hat.
Dank gilt vor allem meinen Kolleginnen und Kollegen, die Zusammenarbeit mit euch war mir eine Ehre und ein Vergnügen. Ich durfte teilhaben an eurem fundierten Fachwissen, das zu Anregungen in meiner wissenschaftlichen Arbeit führte. Meine Arbeit existiert aufgrund eures Wissens sowie eurer Kritik und euren Ideen.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Volker Stoldt, der mir von der ersten Begegnung an mit viel Sympathie begegnet ist. Er unterstützte mich bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit. Herr Dr. Volker Stoldt hatte stets ein offenes Ohr für die Belange und Probleme der Doktoranden und stand uns bei fachlichen Problemen zur Seite.
Für die sachkundige und professionelle Unterstützung bei den Western-Blot-Analysen bedanke ich mich bei Frau Dr. Marianna Gyenes. Sie war stets ein Fels in der Brandung und steht als Synonym für Motivation und Zuverlässigkeit und war dementsprechend eine große Unterstützung für mich.
Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Bianka Maßen-Weingardt, die mich in das Labor einführte. Sie brachte mich der Durchflusszytometrie näher und auch bei kniffligen Fragestellungen wusste sie stets Rat. Sie verlor nie die Übersicht und konnte der Problematik sofort folgen.
Bei Frau Elisabeth Kirchhof bedanke ich mich für die vielen methodischen Ratschläge und für die andauernden Motivationen und die Begeisterung, wenn es einem nicht so gut ging.
Für die administrative Unterstützung möchte ich mich bei Frau Uta Vandercappelle herzlich bedanken.
Für die freundschaftliche, familiäre und herzliche Zeit, die ich während der drei spannenden Doktoranden-Jahre erleben durfte, möchte ich mich hiermit bei dem gesamten Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin herzlich bedanken.

Vor allem bei meinen Freunden möchte ich mich herzlich bedanken, die mir den Rücken frei gehalten haben, die mich tatkräftig unterstützt haben, mich stets motiviert haben und für die nötige Abwechslung gesorgt haben. Ihr seid die Besten! Auf euch kann ich mein Haus bauen.
Last but not least möchte ich meinen Eltern, meinen Brüdern und Schwestern danken, denen ich diese Arbeit widme. Sie zeigten stets großes Interesse an meiner Arbeit und unterstützten mich so gut es ging.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	**IV**
1	**Einleitung**	**1**
1.1	**Thrombozyten**	**1**
1.1.1	**Funktion der Thrombozyten in der Hämostase**	**2**
1.2	**Integrine**	**3**
1.2.1	**Integrinkonformation und Aktivierung**	**3**
1.2.2	**$\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin**	**5**
1.2.3	**$\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-abhängige Thrombozytenaktivierung**	**6**
1.2.4	**$\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin wirkt auf die Src-Tyrosinkinase**	**8**
1.2.5	**$\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin und dessen Leu33Pro-Varianten**	**9**
1.3	**Liganden**	**10**
1.4	**Dysfunktionales $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin**	**10**
1.5	**Zielsetzung**	**11**
2	**Material und Methoden**	**12**
2.1	**Material**	**12**
2.1.1	**Chemikalien und Enzyme**	**12**
2.1.2	**Stämme, Vektoren, Zelllinien und Liganden**	**12**
2.1.3	**Primäre Antikörper**	**12**
2.1.4	**Sekundäre Antikörper**	**13**
2.1.5	**Oligonukleotide**	**13**
2.1.6	**Geräte, Kits und sonstiges Zubehör**	**13**
2.1.7	**Zusammensetzung der verschiedenen Medien**	**13**
2.1.8	**Gelrezepturen und Detergenzien für SDS-PAGE**	**13**
2.2	**Methoden**	**14**
2.2.1	**Umgang mit der HEK293-Zellmodelllinie**	**14**
2.2.1.1	**HEK293-Zellen**	**14**
2.2.1.2	**Zellkultur der HEK293-Zellen**	**14**
2.2.1.3	**Passagieren von Zellen**	**14**
2.2.1.4	**Zellzahlbestimmung**	**15**
2.2.1.5	**Kryokonservierung der Zellen**	**15**
2.2.1.6	**Auftauen und Revitalisierung von Zellen**	**15**
2.3	**Präparation von Plasmid-DNA**	**16**
2.3.1	**Plasmide**	**16**

2.3.2	**Transformation**	**16**
2.3.3	**Restriktionsendonukleasenverdau**	**17**
2.3.4	**Agarose-Gelelektrophorese**	**17**
2.3.5	**Plasmidreinigung**	**18**
2.3.6	**DNA-Konzentrationsbestimmung**	**18**
2.4	**Funktionale Integrität beider HPA-1-Rezeptorvarianten**	**18**
2.4.1	**Transfektion**	**18**
2.4.2	**MACS-Aufreinigung**	**18**
2.4.3	**Expression der transfektierten HEK293-Zellen**	**19**
2.4.4	**Durchflusszytometrie**	**19**
2.5	**Nachweis der richtigen Klone**	**20**
2.5.1	**Isolierung und Konzentrationsbestimmung der DNA**	**20**
2.5.2	**PCR**	**21**
2.5.3	**Oligonukleotide**	**21**
2.5.4	**RFLP**	**21**
2.6	**Nachweis der Proteinexpression**	**21**
2.6.1	**Proteinbestimmung**	**21**
2.6.2	**SDS-PAGE**	**22**
2.6.3	**Western-Blot-Analysen**	**22**
2.7	**Funktionelle Untersuchungen zur HPA-1-Rezeptoraktivierung**	**23**
2.7.1	**FRET-Analysen**	**23**
2.7.2	**Basale FRET-Effizienz über Akzeptor-Bleaching**	**24**
2.7.3	**FRET-Analysen am Fluorimeter**	**25**
2.7.4	**FRET-Analysen am Mikroskop**	**26**
3	**Ergebnisse**	**27**
3.1	**Expression der HPA-1-Rezeptorvarianten**	**27**
3.1.1	**Linearisierung der Plasmide**	**27**
3.1.2	**Spezifische $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Expression auf der Zellmembran**	**28**
3.1.3	**$\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Expressionsnachweis mittels Western-Blot-Analysen**	**29**
3.1.4	**Funktionelle $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Expression auf HEK293-Zellen**	**30**
3.2	**Quantifizierung des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins auf der Zelloberfläche**	**32**
3.3	**$\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Charakterisierung in die HPA-1-Varianten**	**33**
3.4	**FRET-Analysen**	**34**
3.4.1	**Basale FRET-Effizienz**	**34**

3.4.2	**FRET-Analysen unter statischen Bedingungen**	**36**
3.4.3	**FRET-Analysen unter Strömungsbedingungen**	**37**
3.5	**Essenzielle Proteine der $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrinaktivierung**	**38**
3.6	**Src-Aktivierung in HPA-1-Rezeptorvarianten**	**39**
4	**Diskussion**	**40**
4.1	**Expression der Rezeptorvarianten**	**40**
4.1.1	**Funktionalität des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins**	**41**
4.2	**Validierung der HPA-1a- und HPA-1b-Rezeptorvarianten**	**42**
4.3	**Validierung der FRET-Analysemethode**	**42**
4.3.1	**Charakterisierung der Rezeptorvarianten unter statischen Bedingungen**	**43**
4.3.2	**Charakterisierung der Rezeptorvarianten unter Strömungsbedingungen**	**44**
4.4	**Quantifizierung der Src418-Kinase unter statischen Bedingungen**	**45**
4.5	**Schlussfolgerung**	**46**
4.6	**Implikationen**	**47**
	Zusammenfassung	**48**
	Summary	**49**
	Literatur	**50**
	Anhang	**63**

Abkürzungsverzeichnis

$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogenrezeptor, auch GPIIb-IIIa genannt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
Å	Ångström
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovin Serum Albumin
°C	Celsius
Ca^{2+}	Kalzium
CD	Cluster of Differentiation
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CMV	Cytomegalovirus-Promoter
CO_2	Kohlendioxid
DH5α	E.coli-Bakterienstamm
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
Em	Emission
EtBr	Ethidiumbromid
Ex	Exzitation
F-12	Ham's F12-Medium
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
Fg	Fibrinogen
Fg_{immob}	immobilisiertes Fibrinogen

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
g	Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
GFFKR-Sequenz	Gly-Phe-Phe-Lys-Arg
GFP	Green Fluorescent Protein
GP	Glycoprotein
GPIIb-IIIa	Fibrinogenrezeptor, auch $\alpha_{IIb}\beta_3$ genannt
H_2O	Wasser
HEK	Human Embryonic Kidney
HPA	Human Platelet Alloantigen
HPA-1a	$\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Rezeptor (an Stelle 33 Leu)
HPA-1b	$\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Rezeptor (an Stelle 33 Pro)
HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilo-Dalton
KGD-Sequenz	Lys-Gly-Asp-Sequenz
KQAGDV-Sequenz	Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-Sequenz
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Leu	Leucin
LIBS	Ligand Induced Binding Site
lin	linearisiert
M	Molar
MACS	Magnetic Cell Separation
MCS	Multiple Cloning Site
Mg^{2+}	Magnesium
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
MIDS-Domäne	Metal Ion Dependent Adhesion Site
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mn^{2+}	Mangan
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
ng	nanogramm

nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ori	Origin of Replication
P	Abkürzung für ein Plasmid mit einer bestimmten Nummer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
pmol	Pikomol
Pro	Prolin
PSI-Domäne	Plexin/Semaphorin/Integrin-Domäne
PTX	Pertussis-Toxin
pUC	Plasmid University of California
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RGD-Sequenz	Arg-Gly-Asp-Sequenz
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
s^{-1}	Reziproke Sekunde
SAG	1-Stearoyl-2-Arachidonoyl-sn-Glycerol
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SOB-Medium	Super Optimal Broth-Medium
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N`,N´-Tetramethyl-ethylendiamin
TM-Strukturen	Transmembran-Strukturen
Tris-HCL	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Unit
UV	Ultraviolett
vWF	von-Willebrand-Faktor
YFP	Yellow Fluorescent Protein

1 Einleitung

1.1 Thrombozyten

Thrombozyten sind scheibenförmige, korpuskuläre, 0,5-0,75 µm dicke und im Durchmesser 1-4 µm große, kernlose Zellen. Sie werden im Knochenmark durch Zytoplasmaabschnürung aus Megakaryozyten gebildet. Die Zahl der Thrombozyten im Blut beträgt zwischen 150.000 und 300.000 Zellen pro µl, die circa sieben Tage im Blut zirkulieren, bis sie im retikulären System von Leber, Milz und Lunge abgebaut werden. Zudem dient die Milz als Thrombozytenspeicherort, sie speichert circa ⅓ der Thrombozyten, die mit den zirkulierenden Thrombozyten im Austausch stehen (Gawaz, 1999).

Im Blut zirkulieren ruhende diskoide Thrombozyten (Abb. 1 A), welche durch Interaktionen mit verletzten Gefäßen oder durch das Zusammenspiel mit bestimmten Faktoren (z. B. ADP, Thrombin, Kollagen) aktiviert werden können. Durch ihre Aktivierung können diese ihre Form verändern, wobei sich die Oberfläche auf 13 μm^2 vergrößert. Es erfolgt die Ausstülpung von Pseudopodien, die mit einer mehrfachen Oberflächenvergrößerung einhergeht (Abb. 1 B). Die Pseudopodien spreizen sich, um eine effektive Abdichtung der Gefäßwandläsion zu erzielen (Abb. 1 C). Anschließend sezernieren die thrombozytären Granula ihre Inhaltsstoffe (z. B. Thromboxan A2, ADP), welche den Aktivierungsvorgang verstärken und die noch ruhenden Thrombozyten stimulieren (Siess, 1989). Thrombozyten nehmen eine Schlüsselfunktion bei der Auslösung arterieller Thrombosen ein. Sie sind das zelluläre Element der primären Hämostase und können so Aggregate bilden, die an einer Verletzungsstelle einen Gefäßdefekt wirkungsvoll verschließen. Sie besitzen eine Lipiddoppelmembran, in der verschiedene Glykoproteine (GP) eingebaut sind, wie $\alpha_{IIb}\beta_3$- und GPIb, wobei bis heute nur ein Teil ihrer Funktion bekannt ist.

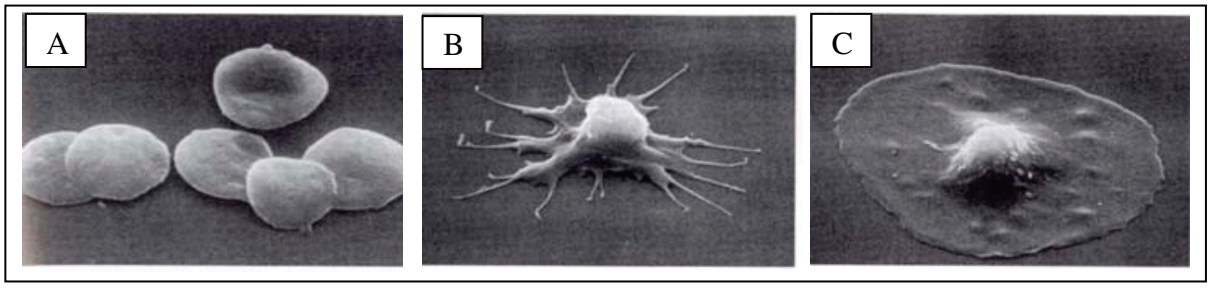


Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von ruhenden und aktivierten Thrombozyten
Dargestellt sind ruhende Thrombozyten, die im Blut zirkulieren und eine bikonvexe scheibenähnliche Form besitzen (A), wobei sie nach Stimulierung reversible Pseudopodien ausbilden (B). Nach Aktivierung (C) stülpen die Thrombozyten lange Fortsätze aus und es kommt zu einer stabilen Adhäsion. (entnommen aus www.platelet-research.org)

1.1.1 Funktion der Thrombozyten in der Hämostase

Hämostase ist ein Prozess, der vorwiegend nach einer Blutgefäßverletzung auftritt und die Gerinnung des Blutes hervorruft, wobei ein Gefäßwandthrombus gebildet wird. Die Reaktionsschritte beinhalten die Adhäsion, Bildung von Pseudopodien, Freisetzung der Thrombozytengranula und Aggregation.

Kommt es zur Verletzung eines Blutgefäßes, verbindet sich das austretende Blut mit dem umliegenden kollagenhaltigen Bindegewebe. Im ersten Schritt lagern sich die Thrombozyten an die Kollagenfasern an (Thrombozytenadhäsion) und decken den Bereich der Wunde ab. Die Adhäsion der Thrombozyten führt zu deren Aktivierung, die durch Kontakt mit von-Willebrand-Faktor (vWF) oder Kollagen vermittelt wird. vWF ist ein Blutprotein, das von Megakaryozyten und Endothelzellen gebildet wird.

Zusätzlich sind Thrombozyten während der Adhäsion Scherkräften ausgesetzt, die eine schwache $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrinaktivierung verursachen (Ozaki, 2005; Ruggeri, 2007). Scherkräfte verstärken die integrinbasierende Adhäsion durch das Induzieren einer Konformationsänderung des Zytoskelettproteins Talin. Talin formt daraufhin mit einem weiteren Zytoskelettprotein, genannt Vinculin, einen Komplex (Lee, 2007; del Rio, 2009). Dieser Komplex wiederum wirkt wie eine molekulare Kupplung zwischen dem Zytoskelett und den Integrinen (Hu, 2007). Dieser Mechansimus ist hauptsächlich verantwortlich für die initiale Bildung der Thrombozytenaggregate (Nesbitt, 2009).

Die Thrombozyten verknüpfen sich untereinander über aktiviertes $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin und Fibrinogen. Es bildet sich ein weißer Thrombozytenpfropf (weißer Thrombus), der mit der Vasokonstriktion, ausgelöst durch Thromboxan A_2, das Ergebnis der primären Hämostase bildet. Anschließend setzen die aktivierten Thrombozyten Substanzen frei (Kalzium-Ionen, ADP, Serotonin, Thromboxan A_2), die die Gerinnungskaskaden in Gang setzen und schließlich Fibrinogen in unlösliches Fibrin umwandeln. Es entsteht ein als roter Thrombus bezeichnetes Netz aus stabilem Fibrin, Thrombozyten und Erythrozyten. Über $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin, das die Thrombozyten mit Fibrinogen zusammen quervernetzt, kommt es zur Kontraktion, wobei das Wasser aus dem Gerinnsel herausgepresst wird, sodass sich ein fester Pfropf bilden kann.

Kardiovaskuläre Erkrankungen mit thrombotischem Charakter, wie zum Beispiel Myokardinfarkten (Bhatt, 2003) und Schlaganfällen (Stoll, 2008), gelten in den Industriestaaten als Haupttodesursache (Bougie, 2002; Braunwald, 1997).

1.2 Integrine

Integrine sind heterodimere Adhäsionsrezeptoren, die aus einer α- und einer β-Untereinheit bestehen. Es handelt sich um Glykoproteine, die dauerhaft in der Zellmembran eingebettet sind und die eine wichtige Rolle in der Zell-Zell- und Zell-Oberflächen-Adhäsion einnehmen. Sie verbinden unter anderem die Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix (Hynes, 1992). Integrine können sich auf Zelloberflächen durch Clustering und Recycling neu anordnen (Cluzel, 2005). Die Untereinheiten durchdringen die Zellmembran und haben folglich einen intrazellulären, einen transmembranen und einen extrazellulären Anteil (Hynes, 1992). Bekannt sind 18 verschiedene α- und acht verschiedene β-Untereinheiten, die sich zu 24 verschiedenen Heterodimeren kombinieren und spezifische bzw. überlappende Funktionen aufweisen (Humphries, 2006).

Ein extrazellulär gelegener globulärer Kopf ist über die α- und β-Untereinheit mit der Zellmembran verbunden (Carrell, 1985). Alle α-Untereinheiten haben im N-terminalen Bereich spezielle Bindungsstellen für divalente Kationen. Für die Funktionalität des Rezeptors sind diese Bindungsstellen essenziell, da sie die Affinität und die Spezifität für die Liganden beeinflussen (Plow, 2000). Die Erkennung der Liganden erfolgt meist über die Tripeptidsequenz Arg-Gly-Asp (RGD) (Plow, 2000), deren Sequenz ebenfalls in die für die Zelladhäsion verantwortlichen Proteine wie Fibrinogen, Fibronektin, Vitronektin, exprimiert wird.

Die Integrine sind Gegenstand intensiver Forschung, vor allem auf dem Gebiet der $\alpha_v\beta_3$-selektiven Verbindungen, die in Zusammenhang mit Arthritis, Retinopathie, Osteoporose und Tumorerkrankung stehen (Miller, 2000), sowie der $\alpha_{IIb}\beta_3$-selektiven Verbindungen, die eine wichtige Rolle in der Blutgerinnung spielen (Weller, 1996; Goodman, 2002). Die Modifizierung der Bindung zwischen Integrinen und Liganden ist für die Forschung von großem Interesse, um neue Arzneistoffe zu entwickeln.

1.2.1 Integrinkonformationen und Aktivierung

Rezeptoraktivierung bezeichnet den Übergang des ruhenden, inaktiven Rezeptors in eine aktivierte Form, die eine deutlich höhere Neigung zur Interaktion mit Liganden aufweist. Diese Art der Konformationsänderung ermöglicht der Zelle, schnell auf ihre Umgebung zu reagieren. Das Prinzip des veränderlichen Rezeptors liegt vielen Prozessen zu Grunde, wie zum Beispiel der Blutstillung, Thrombose, Zellmigration und Metastasierung (Hynes, 1992; Dedhar, 1996; Humphries, 1996; Tozer, 1996; Hughes, 1998). Integrine sind keine starren Moleküle, sondern befinden sich in einem ständigen Gleichgewicht zwischen verschiedenen

Formen (Xiao, 2004). Für Integrine können drei distinkte Konformationen nachgewiesen werden (Abb. 2). Bei der niedrig affinen, gekrümmten Konformation ist der Rezeptorkopf in Richtung der Zelloberfläche abgeknickt (Abb. 2 A). In der mittel affinen Konformation mit geschlossenem Kopfteil sind die Schenkel gestreckt (Abb. 2 B). Die Bindung von Liganden an den Rezeptor induziert den Wechsel zur hoch affinen gestreckten Konformation mit geöffneter Kopfregion, in der der Winkel zwischen β_3I-Domäne und Plexin/ Semaphorin/Integrin(PSI)-Domäne von spitzwinklig zu stumpfwinklig wechselt (Abb. 2 C).

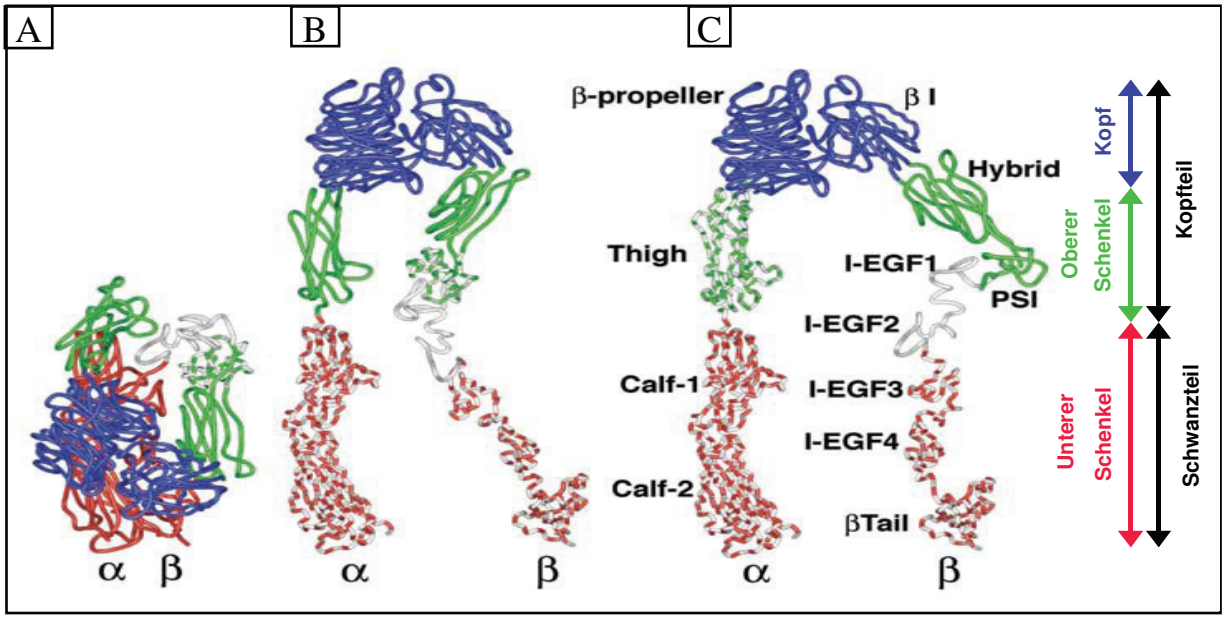


Abbildung 2: Drei distinkte Konformationen der Integrine
Drei mittels Röntgen-Kristallographie nachgewiesene Konformationen eines Integrins mit Kennzeichnung der verschiedenen Domänen (Xiao, 2004). A: niedrig affine, gekrümmte Konformation; B: mittel affine, gestreckte Konformation mit geschlossenem Kopfteil; C: hoch affine, gestreckte Konformation mit geöffnetem Kopfteil.

Allosterische Effekte in der β_3I-Domäne verändern die Struktur von drei metallischen Bindungsstellen, assoziierten Schleifenstrukturen und zwei α-Helices. Dies bewirkt eine 62°-Reorientierung zwischen der β_3I-Domäne und der Hybrid-Domäne. Die Übertragung der Strukturänderung über die starr verbundene PSI-Domäne im oberen Teil des β_3-Schenkels führt zu einer Separation der α- und β-Schenkel um 70 Å (Xiao, 2004). Intrazelluläre Signale bewirken also eine Verschiebung des Gleichgewichts der verschiedenen Integrinkonformationen hin zur hoch affinen gestreckten Form. Aktivierte $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrine stimulieren Signalkaskaden im Zellinneren, die unter anderem zu Veränderungen der Zytoskelettstruktur führen (Vijayan, 2006). Integrine sind in der Lage, Informationen bidirektional zu übertragen, wobei die Signale entlang eines allosterischen Pfads weitergeleitet werden (Arnaout, 2005) und sich dabei die Transmembran-Domänen räumlich voneinander trennen (Kim, 2003).

1.2.2 $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin

Der Rezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin, auch GPIIb-IIIa genannt, besteht aus einer α_{IIb}- und einer β_3-Untereinheit, die beide in der Plasmamembran verankert sind (McEver, 1983). Die α_{IIb}-Untereinheit ist zusammengesetzt aus einer schweren (105 kDa) und einer leichten Proteinkette (25 kDa), die durch eine Disulfidbrücke zusammen gehalten werden. Bei der β_3-Untereinheit handelt es sich um eine 105 kDa schwere durchgehende Proteinkette (Phillips, 1987; Calvete, 1999). Die β_3-Expression wird auf Transkriptionsebene kontrolliert (Zutter, 1992). Die α_{IIb}-Vorstufe wird in Megakaryozyten als einzelne Polypeptidkette synthetisiert, mit der β_3-Untereinheit zum pro-$\alpha_{IIb}\beta_3$-Komplex assoziiert und anschließend in den Golgi-Apparat transportiert. Im Golgi-Apparat wird die pro-α_{IIb}-Untereinheit des Komplexes in die schwere und die leichte Kette gespalten. Anschließend wird der reife $\alpha_{IIb}\beta_3$-Komplex an die Zelloberfläche transportiert (O´Toole, 1989).

Die Gene sind auf Chromosom 17 in der Region q21-22 lokalisiert (Sosnoski, 1988). Es ist eines der ersten Integrine, das identifiziert (Nurden, 1974), aufgereinigt (Jennings, 1982), kloniert und sequenziert (Fitzgerald, 1987; Loftus, 1987, Poncz, 1987) wurde. Zentrale Aufgabe des Rezeptors ist die Bindung von löslichem Fibrinogen an die Oberfläche aktivierter Thrombozyten, dem ersten Schritt der Thrombozytenaggregation.

Der Rezeptor ist ein für Thrombozyten spezifisches heterodimeres Integrin und mit 1-2 % des Gesamtproteingehalts und einer Oberflächenbesetzung von 60.000-100.000 Rezeptoren pro Thrombozyt das am häufigsten vorkommende Glykoprotein (Yee, 2004; Jennings, 1982; Wagner, 1996). 70 % dieser Rezeptoren liegen konstitutiv auf der Thrombozytenoberfläche vor. Die übrigen 30 % werden erst nach Aktivierung der Thrombozyten aus intrazellulären Speichern (offenes kanalikuläres System und α-Granula) zur Oberfläche transportiert und dort präsentiert (Topol, 1999; Wencel-Drake, 1986, Woods, 1986).

Eine Aktivierung der Thrombozyten führt zu einer Konformationsänderung des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins und damit zur Freilegung von hoch affinen Fibrinogenbindungsstellen, wodurch eine Bindung von Agonisten wie löslichem Fibrinogen ermöglicht wird. Nicht aktivierte Rezeptoren können nur immobilisiertes Fibrinogen binden. Die Konformationsänderung des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins ist mehrstufig (Abb. 2). So gibt es den niedrig affinen, ruhenden Zustand, bei dem Liganden kaum vom Rezeptor gebunden werden (Phillips, 1991), den hoch affinen, aktivierten Zustand (ausgelöst durch Mn^{2+}, Ca^{2+}, RGD-Liganden), in dem der Rezeptor Liganden binden kann (Takagi, 2002) und den geöffneten Zustand nach Ligandenbindung (Hantgan, 1999; Gottschalk, 2002). Die Bindung von Fibrinogen an den aktivierten $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin erfolgt stöchiometrisch im Verhältnis 1:1 und induziert eine zweite

Konformationsänderung des Rezeptors mit Freilegung von kryptischen Epitopen. Diese Konformationsänderung ist wesentlich für die irreversible Fibrinogenbindung sowie die transmembranäre Signaltransduktion verantwortlich. So können Mutationen in einer der beiden Untereinheiten eine veränderte Rezeptorfunktion mit schwerwiegenden Folgen für die Betroffenen verursachen. Die Anwendung von $\alpha_{IIb}\beta_3$-Antagonisten, wie der Antikörper Abciximab, ist in der klinischen Anwendung durch Nebeneffekte wie unerwünschte Blutungen begrenzt (Adams, 2008; Kleinschnitz, 2009; Quinn, 2003).

1.2.3 $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-abhängige Thrombozytenaktivierung

Eine Konformationsänderung des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins führt zu einer Bindung von Liganden, vermittelt über die Tripeptidsequenz RGD. Die α-Untereinheit des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins hat N-terminal eine Bindungsstelle für RGD-Liganden und Kalzium, C-terminal verfügt sie über ein GFFKR-Motiv. Das GFFKR-Motiv hält den Rezeptor in seiner ruhenden Konformation. Kommt es zu einer Deletion dieses Motives, so liegt der Rezeptor konstitutiv in der aktiven Konformation vor (O´Toole, 1994; Peter, 1996). Die Aufrechterhaltung der heterodimeren Struktur wird unter anderem durch Kalzium-Ionen gewährleistet (Kunicki, 1981; Fujimura, 1983). Die beiden Integrin-Untereinheiten formen eine dreidimensionale Liganden-Bindungstasche (Plow, 2000). Die β-Untereinheit besitzt eine MIDS-Domäne (Metal Ion Dependent Adhesion Site), die ebenfalls für ein RGD-Motiv verantwortlich ist (Plow, 2000). Liganden, die eine RGD-Sequenz aufweisen, binden reversibel und im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 am $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin (Phillips, 1991).

Der zytoplasmatischen Schwanzdomäne des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins wird keine intrinsische enzymatische Aktivität zugesprochen (van der Flier, 2001). Dementsprechend müssen zytoplasmatische Proteine, welche an diese Domäne binden, eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Weiterleitung des bidirektionalen Signalings spielen. Mehr als 20 zytoplasmatische Proteine wurden als Bindungspartner der zytoplasmatischen $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Schwanzdomäne identifiziert (Liu, 2000), die hauptsächlich mit dem Outside-in-Signaling verlinkt sind. Eine der essenziellsten zytosolischen Proteine sind Talin und Kindlin, welche in der Lage sind, Integrine mit dem Aktin-Zytoskelett zu verknüpfen. Die β-Untereinheit bildet mit Talin und Kindlin einen Komplex, worauf die α-Untereinheit verdrängt wird, die Transmembran-Domänen getrennt werden und es zur Integrinaktivierung kommt (Tadokoro, 2003; Wegener, 2007; Wegener, 2008; Moser, 2008; Anthis, 2009; Nieswandt, 2007; Petrich, 2007; Ma, 2008; Montanez, 2008; Moser, 2008). Ein Beweis für die Notwendigkeit von Talin und Kindlin in der Thrombozytenaktivierung wurde in Studien

mit Talin-1- und Kindlin-3- defizienten Mäusen gezeigt (Nieswandt, 2007; Petrich, 2007; Moser, 2008; Meves, 2009). Die Thrombozyten der Talin-1- und Kindlin-3-defizienten Mäusen konnten nicht aktiviert werden.

Der Rezeptor ist während der Thrombozytenaggregation mit dem Zytoskelett assoziiert (Phillips, 1983) und in die Ligandenerkennung, transmembrane Signalübertragung, Konformationsänderung und Thrombozytenvernetzung involviert (Newman, 1991). Die Rezeptoraffinität ist in ruhenden Thrombozyten für lösliche Liganden niedrig (Shattil, 1995), während sie für immobilisiertes Fibrinogen hoch ist (Savage, 1992). Die Thrombozytenaktivierung kann *in-vitro* unter anderem durch ADP oder Epinephrin induziert werden (Bennett, 1979; McEver, 1983). Bei einer Aktivierung kommt es zur Freilegung neuer Epitope an der Zelloberfläche, den so genannten LIBS (Ligand induced binding site) (Frelinger, 1988; Frelinger, 1991). Während die $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrine im Ruhezustand gleichmäßig über die Thrombozytenoberfläche verteilt sind, kommt es nach einer Aktivierung zur Zusammengruppierung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Dieses so genannte Rezeptor-Clustering bedingt auch eine Neuanordnung des mit den Rezeptoren verbundenen Zytoskeletts (Cluzel, 2005). Die erhöhte Ligandenbindungsstärke und -geschwindigkeit sind auf das Integrin-Clustering zurückzuführen (Kasemo, 1999; Puleo, 1999). Durch das Clustern werden die Integrine mit den Aktin-Fasern über α-Actinin, Talin und Vinculin (Strukturproteine) unter anderem mit Paxillin und Tensin verknüpft, welche über Rho-GTPasen Rho, Rac und Cdc42 organisiert werden (Friedlander, 1995; Clover, 1992; Rezania, 1999).

Das $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin ist unter anderem für die Signaltransduktion zuständig, die man sich nicht wie einen linearen Weg biochemischer Interaktionen vorstellen darf. Es handelt sich vielmehr um ein interagierendes kompliziertes Netzwerk (Arnout, 2005). Bei der Signaltransduktion wird zwischen Outside-in-Signaling und Inside-out-Signaling differenziert (Abb. 3). Beim Outside-in-Signaling kommt es zur Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor, wobei der Rezeptor in die aktive Konformation übergeht und ein Signal in das Zellinnere übermittelt. Durch das Outside-in-Signaling wird eine Serie intrazellulärer Ereignisse induziert, die eine Hydrolyse von Membranlipiden und die Aktivierung intrazellulärer Proteinkinasen nach sich zieht (Du, 1997). Aufgrund der Ligandenbindung kommt es bei Tyrosinkinasen zur Phosphorylierung (Ferrell, 1989). Mechanische Kräfte, die auf die Integrine wirken, wie bei der Adhäsion oder der Migration, verstärken diesen Effekt (Alon, 2007). 1996 konnten Law et al. zeigen, dass auch die zytoplasmatische Domäne der β_3-Untereinheit nach Aktivierung an ihren Tyrosinrest phosphoryliert wird. Beim Inside-out-

Signaling dagegen führt ein Signal aus dem Zellinneren zu einer Konformationsänderung und somit zu einer Aktivierung des Integrins (Shattil, 2004). Das Agonisten-induzierte Inside-out-Signaling des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins wird als genereller Thrombozyten-Aktivierungssignalweg angesehen und ist für die primäre Hämostase und die Thrombusbildung obligatorisch (Varga-Szabo, 2008).

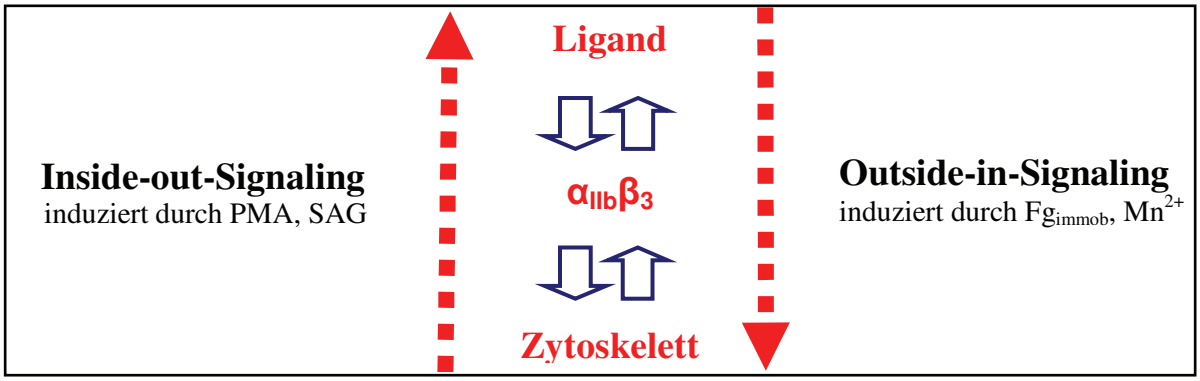


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Inside-out- und Outside-in-Signaling
Zu erkennen ist das Zusammenspiel zwischen dem Zytoskelett und dem $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin sowie dessen Liganden. Signalwege können von mehreren Stimulantien induziert werden wie PMA, SAG, Mn^{2+} und immobilisiertes Fibrinogen. (Modifiziert nach SFB612-Antrag)

1.2.4 $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin wirkt auf die Src-Tyrosinkinase

Die „sarcoma"(Src)-Tyrosinkinase ist an der Signaltransduktion vieler biologischer Systeme beteiligt. Sie spielt zum Beispiel eine entscheidende Rolle in der Tumorentwicklung. Bindet ein Ligand am Integrin, so wird das intrazelluläre, ubiquitär exprimierte Protein Src aktiviert, was infolgedessen die Integrin-Zytoskelett-Interaktion vermittelt (Felsenfeld, 1999).

Der Src-Aktivierungszustand ist abhängig vom Phosphorylierungszustand seines Tyrosinrestes. Es gibt zwei kritische Phosphorylierungsstellen der Src-Tyrosinreste, Tyrosinrest 418 und Tyrosinrest 529 (Abb. 4). Der stimulierende Tyrosinrest (Y418) ist in der katalytischen Domäne lokalisiert und zur Autophosphorylierung fähig. Die volle katalytische Aktivität der Src-Kinase erfordert die Phosphorylierung des aktivierenden Tyrosinrests (Y418). Der inhibitorische Tyrosinrest (Y529) ist in der Nähe des C-Terminus lokalisiert und fungiert als ein negativer Regulator, der die Src-Tyrosinkinase in der inaktiven Form hält. Nach der Dephosphorylierung des Tyrosinrests (Y529) kann der Tyrosinrest (Y418) phosphoryliert und die Src-Tyrosinkinase aktiviert werden.

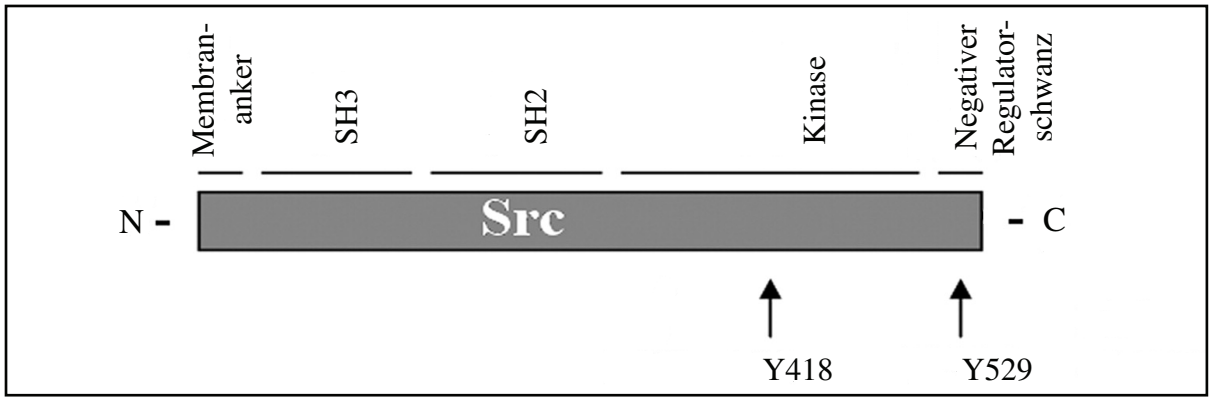


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Src-Tyrosinkinase
Die Src-Tyrosinkinase wird N-Terminal an die Plasmamembran gebunden. Durch die Phosphorylierung des inhibitorischen Tyrosinrests (Y529) kommt es zu einer geschlossenen, inaktiven Konformation. Die Dephosphorylierung des inhibitorischen Tyrosinrests (Y529) und Phosphorylierung des aktivierenden Tyrosinrests (Y418) führt zu einer aktiven, geöffneten Konformation. (modifiziert nach Vielreicher, 2007)

1.2.5 $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin und dessen Leu33Pro-Varianten

$\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin ist polymorph, wobei die polymorphen Varianten unterschiedliche Aktivitäten aufweisen. Die Erforschung dieser Varianten ist deshalb von großem Interesse. Ein entscheidender Fortschritt wurde 1989 durch die modifizierte PCR-Technologie von Newman und Mitarbeitern erzielt. Mithilfe dieser Technik konnte man den Basenaustausch auf der β_3-cDNA entdecken, der mit der phänotypischen Ausprägung des thrombozytären Alloantigensystems Human Platelet Antigen 1a/b (HPA-1a/b) korreliert (Newman, 1989). Eine der am häufigsten untersuchten Varianten ist der Leucin-zu-Prolin-Austausch an Position 33 der β_3-Untereinheit des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins, der in der PSI-Domäne lokalisiert ist und eine Strukturveränderung des Rezeptors bewirkt (Yee, 2004). Die „unkritische“ Variante (HPA-1a) enthält an der Aminosäure 33 ein Leucin, wogegen die „kritische“ Variante (HPA-1b) ein Prolin aufweist. 25 % der nordeuropäischen Population sind für dieses HPA-1b-Allel heterozygot und weitere 2 % homozygot (von dem Bome, 1990). Es wird vermutet, dass HPA-1b zu mehr Stabilität der offenen Konformation führt und damit die Signalweiterleitung vom Zelläußeren ins Zellinnere fördert. Thrombozyten, die HPA-1b exprimieren, weisen eine erhöhte Affinität für Fibrinogen auf, aggregieren schneller und zeigen verstärkte Migration, Ausbreitung sowie ein verstärktes Outside-in-Signaling (Vijayan, 2000). Daher ist es sinnvoll, die Mechanismen dieser gesteigerten Thrombozytenaktivität zu verstehen und in Verbindung mit intra- und extrazellulären Signalkaskaden zu bringen. Nur so können Ansatzpunkte für Therapeutika gefunden werden, mit denen ein erhöhtes Thromboserisiko gesenkt werden kann.

1.3 Liganden

Liganden spielen eine zentrale Rolle bei der Adhäsion von Zellen. Neben extrazellulären Matrixproteinen (z. B. Kollagen) und Membranproteinen (z. B. VCAM) sind auch Serumproteine (z. B. Fibrinogen) Integrinliganden. In der Regel erkennen mehrere Liganden ein Integrin (Hynes, 1992). Die Bindung der Liganden erfolgt in Abhängigkeit von divalenten Kationen in der N-terminalen Domäne beider Untereinheiten. Für die Hämostase ist der $\alpha_{IIb}\beta_3$-Ligand Fibrinogen von besonderem Interesse. Fibrinogen ist aus zwei miteinander verbundenen identischen Untereinheiten (Homodimere) aufgebaut. Diese setzen sich ihrerseits aus drei miteinander verbundenen Einzelketten (α-, β- und γ-Kette) zusammen (Löffler, 1997). Dabei binden C-terminal die γ- und α-Kette über die drei charakteristischen N-terminalen Aminosäuresequenzen RGD, KGD und KQAGDV an $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin (Cierniewski, 1999). Die Konformation des Fibrinogens spielt bei der Bindung an $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin eine entscheidende Rolle, da immobilisiertes Fibrinogen sowohl an den aktivierten als auch an den ruhenden $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin gebunden werden kann, während lösliches Fibrinogen nur an den aktivierten Rezeptor bindet (Coller, 1986).

1.4 Dysfunktionales $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin

Im Jahre 1918 entdeckte der Schweizer Arzt Eduard Glanzmann eine Bluterkrankheit, die autosomal rezessiv vererbt wird und bei der die Thrombozyten nicht aktiviert werden können. Die nach dem Mediziner benannte Glanzmann Thrombasthenie trug erheblich zur Aufklärung der Rolle des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins bei der Fibrinogenbindung bei (George, 1990). Die Patienten weisen eine verlängerte Blutungszeit und erhöhte Blutungstendenz der Schleimhäute, sowie Nasen- und Zahnfleischbluten auf (George, 1990). Dies beruht nicht auf einer erniedrigten Thrombozytenzahl sondern auf einer verminderten Aggregation bei Anwesenheit von stimulierenden Agonisten. Es konnte gezeigt werden, dass bei dieser Krankheit eine Veränderung des normalen Musters der Thrombozytenglykoproteine vorliegt (Nurden, 1974). Der Grad des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Defekts wird in drei Kategorien unterteilt: Bei Typ I fehlt das $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin vollständig, bei Typ II liegt er zwischen 10-20 % und bei Typ III liegt er nur leicht reduziert (50-100 %), aber mit qualitativen Defekten vor (Caen, 1995). 27 genetische Defekte wurden bei der α_{IIb}-Untereinheit und 23 bei der β_3-Untereinheit nachgewiesen (Morel-Kopp, 1997; Grimaldi, 1998). Die genetischen Defekte beeinflussen das Pre-mRNA-Spleißen, wodurch es zu instabilen mRNA-Transkripten oder zu anormalen Proteinprodukten kommt. Es konnte gezeigt werden, dass beide Untereinheiten essenziell sind, um eine effiziente Oberflächenexpression des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins zu gewährleisten (O´Toole, 1989). Beim Fehlen eines Polypeptids kommt es zur Instabilität und Degradation des anderen Polypeptids, da kein vollständiger Rezeptor gebildet werden kann.

1.5 Zielsetzungen

Die HPA-1b-Variante der β_3-Untereinheit des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins zeigt durch eine Verschiebung des Konformationsgleichgewichts des Rezeptors in Richtung der höher affinen, gestreckten Form eine gesteigerte Aktivierbarkeit und erhöhte Reaktivität der Thrombozyten. Dabei kommt es beim HPA-1b-Genotyp zur phenotypischen Ausrichtung einer erhöhten Thrombogenität (Vijayan, 2000; Loncar, 2007), welche sich durch eine erhöhte Inzidenz und verfrühtes Auftreten von Myokardinfarkten äußert (Zotz, 2005; Ghosh, 2002).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, beide Varianten des Rezeptors (HPA-1a und HPA-1b) miteinander zu vergleichen und auf ihre Aktivierbarkeit hin zu analysieren. Es sollen mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) die zytoplasmatische Konformationsänderung beziehungsweise der Abstand der Schenkel von α- und β-Untereinheit an lebenden Zellen untersucht werden, wodurch Rückschlüsse auf die Rezeptoraktivierung gezogen werden können. Um die beiden Varianten des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins untersuchen zu können, wird ein heterologes Expressionssystem verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Abciximab (Reopro, Lilly), Acrylamid/Bisacrylamid (National Diagnostics), Agarose (Biozym), Alfazyme (PAA), Ampicillin-Salz (Sigma), APS (Sigma), Ase I (Bio Labs), Bacto-Trypton (BD), Bromphenolblau (Sigma), BSA (Sigma), DH5α-Zellen (Invitrogen), Difco Bacto Agar (BD), Dimethylsulfoxid (Sigma), DMEM-Medium (PAA), ECL-Western Blotting Detektionsreagenz (GE Healthcare), EDTA (Merck), Essigsäure (Merck), Ethidiumbromid (Inno-Train), F-12 Medium (Gibco), FCS (Gibco), Fibrinogen-human (Sigma), Fugene-HD-Transfektionsreagenz (Roche), Gentamycin (Gibco), Geneticin (Invitrogen), Glycerin (Roth), 1 Kb DNA-Leiter (Invitrogen), Magnesiumsulfat (Merck), Manganchlorid (Sigma), Methanol (Merck), Natriumcarbonat (Merck), Natriumchlorid (Merck), Natriumthiosulfat (Merck), Paraformaldehyd (Roth), PBS (Serag Wiessner), Pertussistoxin (Sigma), Phorbol-12-myristat-13-acetat (Sigma), Probenpuffer (Qiagen), Protein-Assay (Biorad), PVDF-Membran (Amersham Biosciences), PvuI (Bio Labs), ScrFI (Bio Labs), SDS (Biorad), Silbernitrat (Merck), 1-Stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol (Sigma), TEMED (Sigma), Titriplex III (Merck), Tris (Sigma), Trypanblau (Gibco), Tween20 (Merck), Yeast (BD). Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen Sigma oder Merck bezogen.

2.1.2 Stämme, Vektoren, Zelllinien und Liganden

E. coli-Stamm: DH5α	F^- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k^-, m_k^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ^-
pcDNA3.1(+)	(Invitrogen) Expressionsvektor mit Zytomegalievirus(CMV)-Promoter (Anhang)
HEK 293 (CRL 1573)	humane embryonale Nierenepithelzelllinie, transformiert mit Adenovirus 5
Fibrinogen	Alexa Fluor 647 human Fibrinogen (Molecular Probes)

2.1.3 Primäre Antikörper

Antikörper	**Spezies**	**Hersteller**
Anti-GFP	Rabbit (polyclonal)	Genetex
Anti-CD41 (PM6/248)	Mouse (monoclonal)	Biosource
Anti-αIIb	Rabbit (polyclonal)	Santa Cruz
Anti-β3	Goat (polyclonal)	Santa Cruz
Anti-Src (184Q20)	Mouse (monoclonal)	Invitrogen
Anti-Src [pY^{418}]	Rabbit (polyclonal)	Invitrogen
Anti-Talin (8d4)	Mouse (monoclonal)	Sigma-Aldrich
Anti-CD61-PE (SZ21)	Mouse (monoclonal)	Beckmann Coulter
Anti-CD41-FITC	Mouse (monoclonal)	Beckmann Coulter
Anti-γ1 (IgG1)-PE	Mouse (monoclonal)	Becton Dickinson

2.1.4 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-Mouse IgG, HRP-gekoppelt	Sheep (polyclonal)	GE Healthcare
Anti-Rabbit IgG, HRP-gekoppelt	Donkey (polyclonal)	GE Healthcare
Anti-Goat IgG, HRP-gekoppelt	Donkey (polyclonal)	Santa Cruz
Anti-Mouse IgG, PE-gekoppelt	Goat (polyclonal)	Genetex

2.1.5 Oligonukleotide

Integrin β_3 human (221 bp) 5`Primer: GACTGTGCTGGCGCTGG
3`Primer: CACTCACTGGGAACTCGATGG

2.1.6 Geräte, Kits und sonstiges Zubehör

Anti-FITC Micro Beads (Miltenyi Biotec), CemiDoc-Geldokumentationssystem (Biorad), CO_2-Feuchtbrutschrank (Heraeus), DNeasy-Kit (Qiagen), Durchflusszytometer-FACSCalibur (Becton Dickinson), ECL-Western-Blotting-Analysis-System (GE Healthcare), Elektrophoreseapparatur (Biorad), Elektrotransformationsapparatur (Biorad), Fluorimeter - Fluoroskan Acent (Thermo), Harvard-Pumpe (Harvard Apparatus), Laser-Scanning-Mikroskop - Axiovert 100M (Zeiss), Lichtmikroskop (Carl Zeiss), Photometer (Eppendorf), Plasmid Maxi Kit (Qiagen), Precision Plus Protein Standards (Biorad), Rainbow Calibration Particles (Becton Dickinson), Sterilwerkbank (Gelaire), Thermocycler (Biozym), Thermoschüttler (Eppendorf), UV-Transilluminator (Herolab), Wasserbad (Julabo), Western-Blot-Gerätschaft (Biorad), Zentrifugen (Eppendorf/Hettich).

2.1.7 Zusammensetzung der verschiedenen Medien

	LB-Medium pH 7,5	Agar-Medium	SOB-Medium
Bacto-Trypton	10 g	10 g	20 g
NaCl	10 g	10 g	0,5 g
Yeast	5 g	5 g	5 g
Mg SO_4	-	-	1 M
Difco Bacto Agar	-	15 g	-
Aqua bidest.	ad 1Liter	ad 1 Liter	ad 1 Liter

2.1.8 Gelrezepturen und Detergenzien für SDS-PAGE

Substanz	Sammelgel (3,9 %)	Trenngel (8 %)
30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	1,3 ml	8 ml
4 x Tris-HCl/SDS (pH 6,8)	2,5 ml	---
4 x Tris-HCl/SDS (pH 8,8)	---	7,5 ml
Aqua bidest.	6,1 ml	14,5 ml
10 % APS	0,1 ml	0,2 ml
TEMED	0,01 ml	0,02 ml

Substanz	4 x Tris-HCl/SDS (pH 8,8)	4 x Tris-HCl/SDS (pH 6,8)	5 x Elektrophorese-puffer	1 x Transfer-puffer
Tris	91 g	6,05 g	30,3 g	3,03 g
SDS	2 g	0,4 g	10 g	---
Glycin	---	---	144 g	14,4 g
Methanol	---	---	---	200 ml
Aqua bidest ad	500 ml	100 ml	1000 ml	1000 ml

2.2 Methoden

2.2.1 Umgang mit der HEK293-Zellmodelllinie

2.2.1.1 HEK293-Zellen

Bei den HEK293-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie menschlicher embryonaler Nierenzellen (Human Embryonic Kidney; Abb. 5), die adhärent wachsen und leicht zu kultivieren sind (Graham, 1977). Die Zelllinie ist das Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit menschlichem Adenovirus 5.

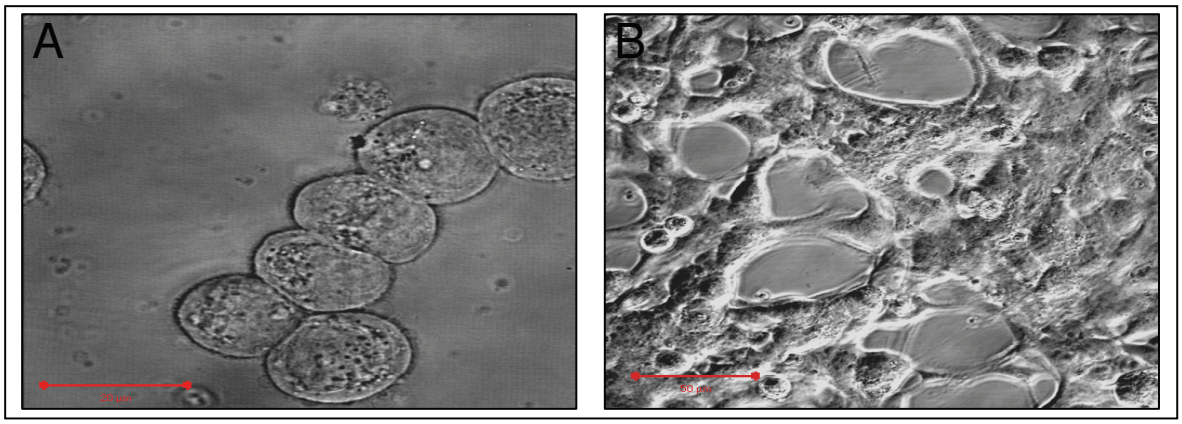


Abbildung 5: Licht-mikroskopische Aufnahmen von HEK293-Zellen
Die HEK293-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. A: Nach 6 Stunden sind die Zellen noch abgerundet und nicht adhärent. *Balken: 20 µm; Aufnahme: 100 x /1,35 Öl-Objektiv*. B: Nach 24 Stunden haben die Zellen eine zelltypische Morphologie eingenommen. *Balken: 50 µm; Aufnahme: 40 x/1,30 Öl-Objektiv*.

2.2.1.2 Zellkultur der HEK293-Zellen

Zellkultur bedeutet im Rahmen dieser Untersuchungen das Kultivieren von Zellen höherer eukaryotischer Lebewesen mit dem Ziel, diese Zellen unter einfachen Bedingungen außerhalb des intakten Organismus zu studieren.

Alle Arbeiten im Zusammenhang mit der Kultivierung der HEK293-Zellen wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einem CO_2-Feuchtbrutschrank in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxidgehalt bei 37 °C kultiviert. Das Zellkulturmedium bestand aus einer 1:1-Mischung aus DMEM- und F-12-Medium mit 10 % FCS und 100 µg/ml Gentamycin. Nach Erreichen von 70-80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Als Selektionsmarker für transfektierte Zellen diente Geneticin (G418), das dem Transfektanten mit einer Konzentration von 600 µg/ml zugegeben wurde.

2.2.1.3 Passagieren von Zellen

Bei Erreichen der Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen passagiert. Das Ablösen der Zellen geschah mithilfe des Enzyms Alfazyme. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen acht Minuten mit Alfazyme bei 37 °C bis zur Abrundung der Zellen inkubiert. Das Ablösen

der Zellen wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt, danach wurden die Zellen in Röhrchen aufgenommen und zentrifugiert (300 g, 4 °C, 7 min). Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS gelöst und die Zellzahl mithilfe der Neubauerkammer bestimmt.

2.2.1.4 Zellzahlbestimmung

Das Wachstum der Zellen ist unter anderem abhängig von der ausgesetzten Zellzahl. Daher sollte die Zellzahl bestimmt werden. Die einfachste Methode dafür ist die Auszählung unter dem Lichtmikroskop mittels einer Neubauerkammer. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl werden die Zellen mit Trypanblau behandelt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der sich an Proteine anlagern kann und selektiv in Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringt.
Die Zellen wurden im Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau-Lösung verdünnt und dann in einer Neubauerkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Bei einer Auszählung aller vier großen Felder (62 Kästchen) ergab sich folgende Beziehung.

$$\mathbf{GZ = (EZ / 4) \times A \times 10^4 \times V}$$

GZ = Gesamtzellzahl
EZ = ermittelte Zellzahl (in 4 großen Quadraten)
A = Verdünnungsfaktor
V = Gesamtvolumen in ml

2.2.1.5 Kryokonservierung der Zellen

Langzeitversuche machen es unerlässlich, Zellen zu konservieren, damit auf Reserven zurückgegriffen werden kann.
Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden für einen längeren Zeitraum bei -196 °C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dabei wurden die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst, in PBS aufgenommen und zentrifugiert (300 g, 4 °C, 7 min). Die Ausgangszellzahl betrug 1 x 10^6. Die einzufrierenden Zellen wurden zunächst in 4 °C kaltem, 80%igem FCS (80 % FCS + 20 % DMEM) aufgenommen, nach Zugabe von 10%igem Dimethylsulfoxid (DMSO) (10 % DMSO + 90 % DMEM) zügig resuspendiert und in einem Kryo-Röhrchen bei -196 °C eingefroren.

2.2.1.6 Auftauen und Revitalisierung von Zellen

Die eingefrorenen Kryo-Röhrchen wurden dem flüssigen Stickstoff entnommen und zügig in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Sobald nur noch ein kleiner Eiskristall zu sehen war, wurde die Zellsuspension rasch in 2 ml kaltes 50%iges FCS überführt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (300 g, 4 °C, 7 min). Der DMSO-haltige Überstand wurde abgenommen, danach konnte das Pellet im Zellkulturmedium aufgenommen und zur weiteren Kultivierung

verwendet werden. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um das restliche DMSO, tote Zellen und zelluläre Bestandteile zu entfernen.

2.3 Präparation von Plasmid-DNA

2.3.1 Plasmide

Eine genaue Karte des verwendeten Plasmids ist im Anhang zu finden. In Tabelle 1 werden die Bestandteile der einzelnen Plasmide aufgeführt. Durch Kombination der Plasmide können Doppeltransfektanten hergestellt werden. Die HEK293-Zellen können beide Varianten des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins (Leu33Pro) exprimieren.

Name	Vektor	Integrin-Untereinheit	Fluorophor	Promoter	Größe	Größe des Fusionsproteins
P71	pcDNA3.1(-) (Invitrogen)	---	---	CMV-Promoter	5,4 kb	---
P92	pcDNA3.1(-) (Invitrogen)	β_3 (HPA-1a, Leu33)	YFP	CMV-Promoter	7,1 kb	132 kDa
P96	pcDNA3.1(-) (Invitrogen)	β_3 (HPA-1b, Pro33)	YFP	CMV-Promoter	7,1 kb	132 kDa
P101	pcDNA3.1(-) (Invitrogen)	α_{IIb}	CFP	CMV-Promoter	7,9 kb	167 kDa

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Plasmide und ihrer wichtigsten Eigenschaften
CFP: Cyan Fluorescent Protein (blau); YFP: Yellow Fluorescent Protein (gelb).

2.3.2 Transformation

Um das Rezeptor-Gen unter Kontrolle eines konstitutiven Promoters in Säugerzellen einzuschleusen, wurden verschiedene Plasmide eingesetzt (Tabelle 1). Die Plasmide besitzen für die Vermehrung und Selektion in Escherichia coli (kompetente Zellen) einen bakteriellen Replikationsursprung (ori) und einen Selektionsmarker, der die unter Kontrolle eines bakteriellen Promoters stehende Antibiotikaresistenz gegen Neomycin (Neo^R) und Ampicillin (Amp^R) kodiert. Die Plasmide besitzen außerdem eine so genannte Multiple Cloning Site (MCS), die mehrere Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthält, sodass fremde DNA eingefügt werden kann.

Für die Transformation selbst wurden hoch kompetente DH5α-Zellen (E.coli) verwendet. LB-Medium und Agar-Medium wurden autoklaviert und nach dem Abkühlen mit Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin) versetzt. Zur Plasmidvervielfältigung wurden die kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA transformiert und unter Selektionsdruck kultiviert. Dazu wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 100 µl kompetente Zellen in 15-ml-Röhrchen, welche auf Eis gekühlt wurden, gegeben. Zu den kompetenten Zellen wurden 4 ng Plasmid-DNA hinzupipettiert. Als Negativkontrolle diente ein 15-ml-Röhrchen mit kompetenten Zellen ohne DNA und als Kompetenzkontrolle diente ein drittes 15-ml-Röhrchen mit dem pUC-Plasmid in einer Konzentration von 50 pg/µl. Die drei 15-ml-Röhrchen wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 45 Sekunden in einem

42-°C-Wasserbad. Nach dem Hitzeschock wurden die Röhrchen erneut auf Eis gegeben. Zu den Röhrchen wurden jeweils 900 µl SOB-Medium zugegeben. Die drei Ansätze inkubierten dann 60 Minuten bei 37 °C unter Schütteln und wurden anschließend 5 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet resuspendiert und auf entsprechende Agarplatten ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht invers im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die entstandenen Kolonien gezählt.

2.3.3 Restriktionsendonukleasenverdau

Die Restriktionsenzyme wurden nach Protokoll des Herstellers (Bio Labs) mit den jeweiligen Puffern eingesetzt. Die Plasmid-DNA wurde aus den Maxipräparationen nach Qiagen gewonnen, die DNA-Konzentration anschließend photometrisch bestimmt und qualitativ anhand einer Gelelektrophorese nachgewiesen. Die Restriktion der Plasmid-DNA wurde nach Tabelle 2 zusammengesetzt und je nach Enzym bei Raumtemperatur (RT) oder bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde 1 µg Plasmid-DNA auf das Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die Plasmid-DNA wurde über eine UV-Lampe qualitativ beurteilt und je nach Ergebnis weiter für die Transfektion verwendet.

Aqua bidest.	ad. 20 µl
10 x Puffer	2 µl
Acetyliertes BSA (10 µg/µl)	1 µg
DNA	1 µg
Restriktionsenzym (20.000 U/ml)	1 µl

Tabelle 2: Ansatz des Restriktionsverdaus

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, um Nukleinsäuren nach ihrer Größe zu trennen und diese durch Vergleich mit Nukleinsäure-Stücken bekannter Größe zu identifizieren. Dazu wurde 1 % (w/v) Agarose durch Erhitzen in 0,5 x Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer (40 mM Tris-HCl, pH 8,0; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst. Der warmen Agarose-Lösung wurde 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die Nukleinsäure-Proben (1 µg) wurden mit $^1/_5$ Volumen Probenpuffer gemischt und in die Taschen aufgetragen. Unter dem Einfluss eines elektrischen Felds wanderten die Moleküle durch das Gel. Qualität und Länge der Nukleinsäuren wurden nach der Elektrophorese im CemiDoc-Geldokumentationssystem über UV-Licht kontrolliert und dokumentiert.

2.3.5 Plasmidreinigung

Nach Transformation der DH5α-Zellen mit den Plasmiden wurden Maxipräparationen hergestellt. Die Maxipräparation wurde nach Protokoll des Herstellers (Qiagen) durchgeführt. Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mit einem optischen Verfahren bestimmt. Es wurde die optische Dichte (OD) des Plasmids in einer 1:50 Verdünnung in TE-Puffer bei 260 nm gemessen, da die DNA ihr Absorptionsmaximum bei dieser Wellenlänge hat. Man geht davon aus, dass 1 OD_{260nm} 50 µg/ml DNA entspricht. Proben, die einen OD_{260nm}/OD_{280nm}-Quotienten (R½) von > 1,8 aufwiesen, wurden für die weiteren Experimente verwendet.

2.4 Funktionale Integrität beider HPA-1-Rezeptorvarianten

2.4.1 Transfektion

Bei der Transfektion handelt es sich um das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Unterschieden wird zwischen dem temporären Einbringen des Plasmids in die Zelle (transiente Transfektion) und dem ständigen Einbau in das Genom (stabile Transfektion). Für die stabile Transfektion wurde linearisierte Plasmid-DNA mit FUGENE-HD-Transfektionsreagenz versetzt.

Die HEK293-Zellen wurden in 24 Well-Platten ausgesät, sodass sie zur Transfektion 70-80 % konfluent waren. Für die Transfektion wurden 2 µg Plasmid-DNA in 100 µl DMEM-Medium und 6 µl FUGENE-HD-Transfektionsreagenz zusammengegeben und 15 Minuten bei RT inkubiert. Das Zellmedium wurde von den Zellen entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 500 µl pro Well FCS-freies DMEM-Medium zugegeben. Nach Inkubation des Transfektionsgemisches wurden 25 µl pro Well zu den Zellen zugegeben und anschließend für 18-72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die transfektierten Zellen aufgenommen, zentrifugiert (300 g, 4 °C, 7 min) und in frischem Selektionsmedium (mit 600 µg/ml G418) aufgenommen.

2.4.2 MACS-Aufreinigung

Um die $\alpha_{IIb}\beta_3$-positiv transfektierten Zellen aus einer Zellsuspension zu isolieren, wurde das „Magnetic-Activated Cell Sorting“ (MACS)-System verwendet. Dabei wird die Zellsuspension, in der sich die zu isolierenden Zellen befinden, mit Magnet-Beads inkubiert. Diese Magnet-Beads sind an Antikörper gebunden, die spezifische Strukturen auf der Oberfläche der zu isolierenden Zellen erkennen.

Das Zellkulturmedium wurde abgenommen, die Zellen in PBS aufgenommen und zentrifugiert (300 g, 4 °C, 7 min). Die Konzentration des Zellpellets von maximal $5x10^7$ Zellen in 100 µl PBS wurde resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 10 µl FITC-markiertem $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-spezifischen CD41-Antikörper und eine Inkubation von 10 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen (300 g, 4 °C, 7 min), der Überstand verworfen und in 90 µl PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 µl Magnet-Beads, die gegen die FITC-Markierung des Primärantikörpers gerichtet waren, versetzt und die Lösung für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Erneut wurden 2 ml PBS zugegeben, die Lösung gewaschen (300 g, 4 °C, 7 min) und in 500 µl PBS resuspendiert. Zur Separation der Zellen wurden die LS-Säulen in einer Magnetvorrichtung befestigt und mit 2 ml PBS äquilibriert. Die resuspendierte Zelllösung wurde auf die Säule gegeben und mit PBS mehrfach gewaschen. Zur Gewinnung der $\alpha_{IIb}\beta_3$-transfektierten HEK293-Zellen wurde die Säule vom Magnet entfernt, mit 500 µl PBS versetzt und das Eluat anschließend mithilfe eines Stempels gewonnen.

2.4.3 Expression der transfektierten HEK293-Zellen

Das aus der MACS-Aufreinigung gewonnene Zelleluat wurde gut resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit der Neubauerkammer bestimmt und anschließend so verdünnt, dass sich in 100 µl Zellkulturmedium lediglich eine Zelle befand. Jeweils 100 µl der Zellkultursuspension wurden pro Well einer 96-Well-Platte zugegeben. Nach einigen Tagen wurde mikroskopisch kontrolliert, ob einzelne Kolonien vorhanden waren, und nur solche Wells weiter kultiviert, die lediglich einen Zellklon aufwiesen. Die gesuchten Einzelklone wurden in der Durchflusszytometrie mit dem $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-spezifischen Antikörper (Anti-CD41) bestätigt.

2.4.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen und qualitativen Bestimmung physikalischer und molekularer Eigenschaften von Zellen oder Partikeln (z. B. Polystyrolkugeln) in einem laminaren Flüssigkeitsstrom, welche einen Laserstrahl einzeln passieren. Das dabei zerstreute Licht wird mithilfe verschiedener Detektoren analysiert.
In den hier durchgeführten Experimenten wurden die HEK293-Zellen auf die $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Expression und deren Aktivierung untersucht. Die Detektion des Rezeptors erfolgte über R-Phycoerythrin(PE)-fluoreszenzmarkierte Antikörper. Die Analyse der Rezeptoren hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit geschah mit Alexa-647-Fluoreszenz-markiertem Fibrinogen. Vorbereitend wurden die Zellen von den Petrischalen abgelöst und mit PBS gewaschen (300 g, 4 °C, 7 min). Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen

und die Zellzahl bestimmt. Es folgte die Resuspendierung der Zellen ($8x10^5$) in 50 µl PBS sowie die Inkubation mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern (Anti-CD41; Anti-CD61-PE). Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei RT im Dunkeln. Zur Erfassung der unspezifischen Bindung wurde eine Zellprobe mit PE-markierter Isotypkontrolle mitgeführt. Die Inkubation mit Alexa-647-gekoppeltem Fibrinogen erfolgte ebenfalls für 30 min bei RT, abgedunkelt. Da der CD41-Primärantikörper unmarkiert ist, wurden die Zellen nach der Primärantikörper-Inkubation mit PBS gewaschen (300 g, 4 °C, 7 min), das Pellet in 50 µl resuspendiert und für 30 Minuten bei RT im Dunkeln mit 1 µl PE-markiertem Sekundärantikörper inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurden alle Ansätze mit PBS gewaschen (300 g, 4 °C, 7 min), die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert. Für die Aktivierungsversuche wurden die Zellen entweder für 20 min bei 37 °C mit 30 nM 1-Stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol (SAG) oder unter den gleichen Bedingungen mit 1 µM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) inkubiert. Nach der Aktivierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, fixiert (2 % Paraformaldehyd) und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Als Negativkontrolle wurden nicht aktivierte Zellen durchflusszytometrisch untersucht sowie einige Zellen vor der Aktivierung mit Abciximab (blockiert $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin) oder Pertussistoxin (blockiert G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) inkubiert. Zur Berechnung der Rezeptorzellzahl wurden Rainbow-Kalibrationspartikel bei gleicher Geräteeinstellung gemessen. Mit den Rainbow-Partikeln können maximal acht Meanwerte einer definierten Anzahl von PE-Molekülen zugeordnet und jeweils eine Ausgleichsgerade berechnet werden. Der ermittelte PE-Meanwert der Probe kann anhand der Geradengleichung als Fluoreszenz-Äquivalente wiedergegeben werden. Über die Fluoreszenz-Äquivalente und die PE-Ratio (PE-Ratio von Anti-Mouse IgG PE beträgt 2,8) konnte die Rezeptorzahl pro Zelle berechnet werden. Die PE-Ratio ist der Quotient OD 566 nm/OD 280 nm. OD 566 nm bezieht sich dabei auf das Konjugat R-Phycoerythrin und die OD 280 nm entspricht dem generellen Proteingehalt.

2.5 Nachweis der richtigen Klone

2.5.1 Isolierung und Konzentrationsbestimmung der DNA

Zur Isolierung der DNA aus den Zellen wurde das DNeasy Mini Kit nach Protokoll des Herstellers (Qiagen) verwendet. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Photometer bestimmt, gebrauchsfertig aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.5.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR stellt eine Technik zur Vermehrung eines spezifischen Genomfragments mit bekannter Nukleotidsequenz dar (Mullis, 1986).

Die aus den Zellen gewonnene DNA wurde über die im Thermocycler stattfindende PCR vervielfältigt. Die Primer wurden für eine Annealing-Temperatur von 60 °C designed. Die in diesem Fall verwendete Taq-Polymerase hat eine optimale Arbeitstemperatur von 72 °C, die zu amplifizierenden DNA-Fragmente haben eine Länge von 221 bp. Die Schritte Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation wurden in der Regel 35 mal durchgeführt. Das PCR-Produkt kann in der Gelelektrophorese anhand seiner Größe identifiziert werden. Die PCR wurde nach Angaben des Herstellers (Qiagen) durchgeführt.

2.5.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurde mithilfe des Programms „Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench“ (MACAW) designed. Die Primer (Integrin β_3 human) wurden von der Firma MWG synthetisiert. Die Lyophilisate wurden mit dest. Wasser gelöst und in einer Stocklösung von 100 pmol bei -20 °C eingefroren.

2.5.4 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

RFLP bezeichnet Unterschiede von DNA-Sequenzen homologer Chromosomen, welche als verschiedene Restriktionsfragmentmuster im Gel sichtbar gemacht werden.

Die PCR-Produkte wurden mit einer spezifischen Restriktionsendonuklease (SrcFI) über Nacht nach Herstellerangaben (Bio Labs) verdaut. Die verdauten PCR-Produkte wurden in einem 12%igen Polyacrylamidgel entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und über die Silberfärbung nach Bassam dargestellt (Bassam, 2007).

2.6 Nachweis der Proteinexpression

2.6.1 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden mithilfe des Biorad-Protein-Assays mit BSA als Standard photometrisch bestimmt. In Küvetten wurden sechs Verdünnungen vom BSA-

Standard mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml bis zu 1,5 mg/ml zur Erstellung einer Kalibrierkurve gemessen. 8 µl des Standards sowie 400 µl des 1:5 verdünnten Biorad-Protein-Assays wurden gemischt und im Photometer bei 750 nm bestimmt. Anschließend wurden die Proben gemessen und die Proteinkonzentration mithilfe der Eichkurve ermittelt.

2.6.2 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Elektrophoresis) ist eine Methode zur Auftrennung denaturierter Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Den Proteinen wird SDS im Überschuss zugegeben und diese dann 5 Minuten bei 95 °C thermisch denaturiert. Das Gel wird mit 25 µg Gesamtprotein beladen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 150 Volt während eines Zeitraumes von 90 Minuten. Anschließend erfolgte die Western-Blot-Analyse.

2.6.3 Western-Blot-Analysen

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische wurden über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert (Towbin, 1979). Die Proteine bleiben aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an der Membranoberfläche haften.

Nach dem Transfer der Proteine wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran mit einer 5%igen Trockenmilchpulverlösung blockiert. Anschließend wurden die primären Antikörper (Anti-GFP; Anti-β_3; Anti-α_{IIb}; Anti-Src; Anti-Src(pY^{418}); Anti-Talin) in einer 5%igen Trockenmilchpulverlösung gegen die zu untersuchenden Proteine zugegeben und mindestens eine Stunde unter ständigem Schütteln bei RT inkubiert (Burnette, 1981). Die unspezifisch gebundenen Antikörper wurden durch mehrere Waschschritte mit detergenzhaltigem Puffer (PBS + 1 % Tween20) entfernt. Um die spezifische Bindung der Antikörper an die Epitope des Antigens nachzuweisen, wurde die Membran mit einem sekundären Antikörper (Anti-Mouse IgG; Anti-Rabbit IgG; Anti-Goat IgG) in einer 5%igen Trockenmilchpulverlösung eine Stunde bei RT inkubiert. Dieser ist an „Horse Radish Peroxidase“ (HRP) gekoppelt und gegen den Primärantikörper gerichtet. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper folgen drei weitere Waschschritte. Auf die Membran wurde eine Substratlösung zugegeben und diese 5 Minuten inkubiert. Durch die an den Sekundärantikörper gebundene HRP wurde die Substratlösung umgesetzt und eine licht-emittierende Reaktion hervorgerufen. Als Substrat wurde das ECL-Western-Blotting-Analysis-System verwendet. Die Produkte bildeten ein fluoreszierendes Spaltprodukt um den Antigen-Antikörper-Komplex, welches mit dem ChemiDoc XRS detektiert werden konnte.

2.7 Funktionelle Untersuchungen zur HPA-1-Rezeptoraktivierung

2.7.1 FRET-Analysen

Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) ist ein physikalischer Prozess, bei dem Photonenenergie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor-Fluorophor) strahlungsfrei über Dipol-Dipol-Wechselwirkung auf einen zweiten, sich in der Nähe befindlichen Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor-Fluorophor) kontaktfrei transferiert wird (Heim, 1996; Pollok, 1999). Anschließend können zwei Emissionswellenlängen wahrgenommen werden: die des Donors und die des Akzeptors. FRET wurde für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt, um den Aktivierungszustand des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins in Abhängigkeit von Konformationen der Rezeptoruntereinheiten zu analysieren.

Das CFP (Cyan Fluorescent Protein) hat ein Absorptionsspektrum von 380-475 nm und ein Emissionsspektrum von 470-530 nm. Das Absorptionsspektrum von YFP (Yellow Fluorescent Protein) liegt bei 470-515 nm und das Emissionsspektrum bei 520-600 nm.

Mit dieser Methode können Abstände zwischen den beiden Fluorophoren gemessen werden. Beträgt dieser Abstand mehr als 10 nm, so ist kein FRET-Signal nach Anregung des Donors zu detektieren (Abb. 6 A). Befinden sich die Fluorophore näher als 10 nm, kann ein Energietransfer vom Donor (CFP) auf den Akzeptor (YFP) stattfinden, worauf Donor wie auch Akzeptor fluoreszieren (Abb. 6 B). Wird jedoch der Akzeptor mit einem Laser bei 514 nm temporär inaktiviert, so kann dieser keine Energie mehr vom Donor aufnehmen (Abb. 6 C), wodurch die Emissions-Intensität des Donors wieder auf das Niveau von Abb. 6 A steigt.

Die α-Untereinheit ist C-terminal mit einem Donorfluorophor und die β-Untereinheit mit einem Akzeptorfluorophor versehen. Die FRET-Effizienz korreliert mit dem Abstand der beiden Fluorophore zueinander. Je geringer der Abstand, desto höher die FRET-Effizienz.

Die HEK293-Zellen wurden mit α_{IIb}-CFP und β_3-YFP stabil doppeltransfektiert und mit einem Argon-Laser bei 458 nm angeregt. Die Wellenlänge wurde so gewählt, dass sie den Donor anregt. Da jedoch die Anregungswellenlänge des Donors teilweise in den Anregungswellenlängenbereich des Akzeptors hineinreicht, könnte der Argon-Laser sowohl Donor als auch Akzeptor anregen. Dementsprechend musste ein Photomultiplier-Abgleich mit einer Reihe von Akzeptor-Einzeltransfektanten vorgenommen werden. Zum Abgleich der Zellen wurden die Akzeptor-Einzeltransfektanten mit einer Wellenlänge von 458 nm angeregt, die im Mikroskop sichtbare gelbe Fluoreszenz kompensiert und die Mikroskop-Einstellung beibehalten, sodass bei den nachfolgenden FRET-Messungen nur die durch FRET entstandene zusätzliche Gelbfluoreszenz detektiert werden konnte. Des Weiteren ragte der Emissionsbereich des Donors in den des Akzeptors hinein, weshalb es zum so genannten Einbluten der blauen Emission in den gelben Kanal kommt (Wallrabe, 2005).

Dementsprechend ist auch ein Photomultiplier-Abgleich mit einer Reihe von Donor-Einzeltransfektanten bei 488 nm notwendig. Es wurden Einzeltransfektanten ausgewählt, bei denen die Fluoreszenz-Intensitäten mit denen der Doppeltransfektanten vergleichbar sind. Nach dem Abgleich mit dem Akzeptor und dem Donor kann davon ausgegangen werden, dass die in den FRET-Analysen detektierten Fluoreszenzemissionen tatsächlich durch FRET hervorgerufen werden und nicht durch die Eigenfluoreszenz von CFP und YFP. Die FRET-Analysen können in einem Fluoreszenzmikroskop oder Fluorimeter erfolgen. Für die FRET-Analysen wurden Zellen verwendet, die in den Durchflusszytometrie-Untersuchungen gleiche Rezeptor-Expressionslevel der HPA-1a- und HPA-1b-Varianten aufwiesen.

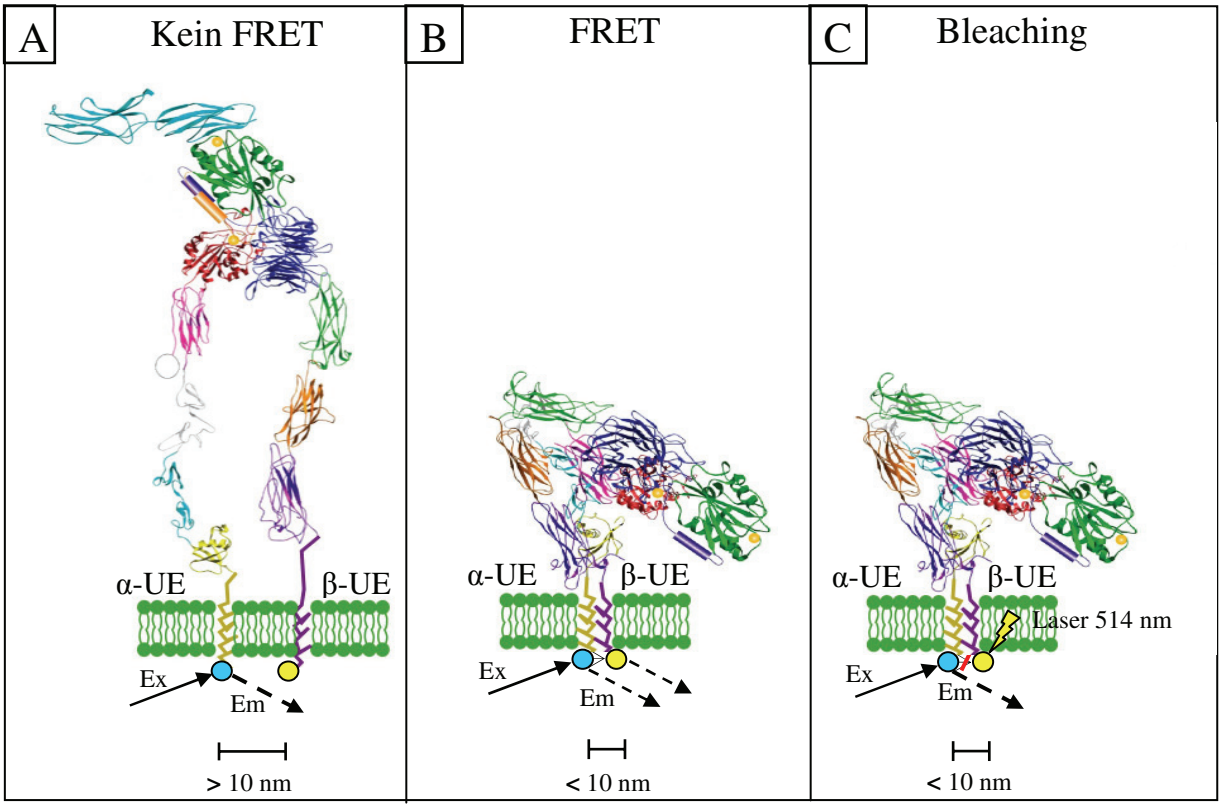


Abbildung 6 : Interaktionen zwischen dem Fluorophorenpaar CFP und YFP bzw. α_{IIb} und β_3
A: Ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor größer 10 nm, überträgt der Donor keine Energie auf den Akzeptor. B: Liegt der Akzeptor in unmittelbare Nähe zum Donor (näher 10 nm), kommt es zum Energietransfer auf den Akzeptor, wobei die Emission des Akzeptors und die des Donors wahrgenommen wird. C: Beim Akzeptor-Bleaching ist der Akzeptor nicht mehr in der Lage, Energie vom Donor aufzunehmen, sodass lediglich die Emission des Donors wahrgenommen wird. (entnommen und modifiziert nach Nature 2005)

2.7.2 Basale FRET-Effizienz über Akzeptor-Bleaching

Die FRET-Analyse bedient sich des so genannten Akzeptor-Bleaching (Karpova, 2003). Der Akzeptor (YFP) wird mit einem Laser bei 514 nm temporär inaktiviert, sodass dieser keine Energie mehr vom Donor (CFP) aufnehmen kann. Durch das Unterbinden des Energietransfers nimmt die Fluoreszenzemission des Akzeptors ab und die des Donors entsprechend dem zuvor an den Akzeptor abgegebenen Energieanteil zu (Abb. 6 C).

Die mit α_{IIb}-CFP/β_3-YFP transfektierten und zu untersuchenden Zellen (HPA-1a und HPA-1b) wurden isoliert, zentrifugiert (300 g, 4 °C, 7 min), in PBS aufgenommen und in der Neubauerkammer gezählt. Die Zellen wurden auf mit 1 % BSA beschichtete Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen versehen. Zusätzlich wurde bei einigen Zellen der $\alpha_{IIb}\beta_3$-Rezeptor aktiviert, indem die Zellen 20 Minuten mit 1 µM PMA stimuliert und auf mit Fibrinogen (50 µg/ml) beschichtete Objektträger gegeben wurden. Anschließend wurden die Zellen in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop mithilfe eines Argon-Lasers bei 514 nm gebleicht und mittels der LSM-Software dokumentiert. Für die Anregung der Fluorophore wurde der Argonlaser bei 458 nm verwendet. Die Analyse und Quantifizierung der Aufnahmen erfolgte mit der von Rasband Wayne am National Institutes of Health (NIH) entwickelten Software „ImageJ 1.42q“. Es wurden Aufnahmen vor und nach dem Akzeptor-Bleaching miteinander verglichen. Ein Aufnahmezyklus bestand aus vier deckungsgleichen Bildern (CFP vor und nach dem Bleichen sowie YFP vor und nach dem Bleichen), die in Graustufen umgewandelt wurden. Die Intensitätsverteilung der Graustufen (0-255) wurde gemittelt und mit den anderen Bildern verglichen. Die detaillierte Auswertung befindet sich im Anhang.

2.7.3 FRET-Analysen am Fluorimeter

Um das $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Adhäsionsverhalten zwischen HPA-1a und HPA-1b unter statischen Bedingungen zu untersuchen, wurden Adhäsionsversuche unter Inside-out- und Outside-in-Bedingungen vorgenommen. Die Zellen wurden aus den Petrischalen isoliert, zentrifugiert (300 g, 4 °C, 7 min) und in einer Neubauerkammer gezählt. Die Zellen wurden in PBS verdünnt, sodass je Well 200 µl mit je 200.000 Zellen in einer 96-Well-Platte eingesetzt wurden. Die Zellen wurden auf immobilisiertem Fibrinogen (100 µg/ml) oder mit Mn^{2+} (0,5 mM) behandelt, um ein so genanntes Outside-in-Signaling zu induzieren. Zusätzlich wurden die Zellen mit PMA (1 µM) oder SAG (30 nM) behandelt und das Inside-out-Signaling induziert. Zur Kontrolle wurden einige Zellen nicht behandelt. Die FRET-Analysen wurden am Fluorimeter gemessen. CFP wurde bei 430 nm und YFP bei 485 nm angeregt. Die Fluoreszenzemission von CFP wurde bei 485 nm und die von YFP bei 538 nm gemessen. Die FRET-Effizienz wurde durch Anregung des CFP und Messung der YFP-Emission ermittelt. Das FRET-Signal wurde quantifiziert, um den Effekt von Agonisten auf HPA-1a- und HPA-1b-Varianten zu untersuchen. Über einen Zeitraum von vier Stunden wurden FRET-Signale analysiert. Nach der ersten Messung erfolgte die Zugabe der Agonisten. Die FRET-Signale wurden analysiert und die Veränderung der relativen FRET-Signale (Endpunkte) im Diagramm dargestellt.

2.7.4 FRET-Analysen am Mikroskop

Das In-vitro-Adhäsionsverhalten von HPA-1a- und HPA-1b-exprimierenden HEK293-Zellen wurde in einer Flusskammer mittels Phasenkontrastmikroskop untersucht. Die Deckgläschen wurden mit Fibrinogen (50 µg/ml) beschichtet und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das überflüssige Fibrinogen mit 1%iger BSA-Lösung abgewaschen. 300.000 Zellen wurden auf das immobilisierte Fibrinogen gegeben und bei 37 °C 1 Minute inkubiert. Die Deckgläschen wurden in die Fräsung der metallenen Untereinheit der Strömungskammer positioniert und die einzelnen Elemente der Kammer dicht verschraubt. Die Strömungskammer wurde in den Mikroskoptisch gesetzt und die Ausströmkanüle mit der 50-ml-Perfusorspritze sowie die Einströmkanüle mit dem FCS-freien Reservoir am Kulturmedium verbunden. Die 50-ml-Perfusorspritze mit einem Durchmesser von 18 mm war in einer Harvard-Pumpe befestigt. Über den Durchmesser der 50-ml-Perfusorspritze berechnet die Harvard-Pumpe die Flussrate in ml/s. Über die Flussrate berechnet sich die Scherrate nach folgender Formel:

$$\gamma = 6 * Q/w*h^2$$

γ = Scherrate in s^{-1}
Q = Flussrate in ml/s
w = Länge des Feldes der Flusskammer (20 mm)
h = Höhe der Flusskammer (Dicke der Dichtung: 250 µm)

Die Zellen wurden mit einer Wellenlänge von 458 nm angeregt und deren Fluoreszenzemission bei einer Wellenlänge von 485 nm und 538 nm detektiert. Um nicht am Fibrinogen haftende Zellen zu entfernen, wurde eine Minute lang eine Initialströmung von 25 s^{-1} angelegt. Die Messung erfolgte eine Minute lang bei 25 s^{-1}, 50 s^{-1}, 100 s^{-1}, 200 s^{-1}, 400 s^{-1}, 800 s^{-1} und 1600 s^{-1} im Stacking-Verfahren mit einem 40x1,3-Öl-Objektiv. Das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop ist in der Lage, optische Schnitte in räumlich ausgedehnten Objekten zu erzeugen, welche schichtweise zu einer räumlichen Darstellung zusammengesetzt werden. Ein Aufnahmezyklus bestand aus zwei deckungsgleichen Bildern (CFP sowie YFP) über 20 Schnitte, die zu einem Bildstapel vereinigt und in Graustufen umgewandelt wurden. Die Stapel-Technik garantiert eine Intensitätsmessung in einem gleichbleibenden Messfeld. Es wurde die Intensitätsverteilung der Graustufen (0-255) für beide Kanäle gegenübergestellt und mit ImageJ ausgewertet. Das dazugehörige Macro und das Auswerteprozedere sind im Anhang zu finden.

Zur Validierung des Systems wurden fünf Zellen mit 20 aufeinanderfolgenden Laserimpulsen (Photobleaching) auf mit 1 % BSA beschichteten Objektträgern gebleicht. Das BSA dient als nicht aktivierende Trägersubstanz. Die Zellen wurden zweimal im Abstand von 30 Sekunden jeweils 20 Laserimpulsen ausgesetzt. Als Negativkontrolle wurde die Fluoreszenz von drei Zellen ohne Photobleaching über den gleichen Zeitraum gemessen.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es beide HPA-1-Varianten miteinander zu vergleichen und auf ihre Aktivierbarkeit hin zu analysieren. Bei der HPA-1a-Variante des Rezeptors kommt an Position 33 ein Leucin (Leu33) und bei der HPA-1b-Variante ein Prolin (Pro33) vor. Für die Etablierung einer Zelllinie, die diese $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Varianten exprimiert, wurden die entsprechenden Konstrukte in HEK293-Zellen transfektiert, amplifiziert und charakterisiert.
In den durchgeführten Experimenten wurden HEK293-Zellen verwendet, die die HPA-1-Rezeptorvarianten des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins exprimieren und für die Untersuchung der kinetischen und signalgebenden Eigenschaften des Rezeptors geeignet sind. Die Funktionalität und die biologischen Eigenschaften des Rezeptors wurden im Durchflusszytometer, in der Flusskammer, im Western-Blot und im Fluorimeter durch spezifische Aktivierung untersucht. Alle Messungen wurden an HPA-1a- und HPA-1b-exprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt, die eine gleich starke $\alpha_{IIb}\beta_3$-Expression zeigten. Dementsprechend ist die Rezeptorzahl pro Zelle nicht für den beobachteten Unterschied im FRET-Signal verantwortlich sondern die HPA-1-Varianten selbst.

3.1 Expression der HPA-1-Rezeptorvarianten

3.1.1 Linearisierung der Plasmide

Um die Aktivierung sowie die damit verbundenen Interaktionen zwischen den Rezeptoruntereinheiten α_{IIb} und β_3 mittels FRET im Mikroskop und im Fluorimeter nachzuweisen und einen Vergleich zwischen HPA-1a- und HPA-1b-Varianten durchzuführen, mussten beide Rezeptoruntereinheiten fluoreszenzmarkiert werden. Dazu wurden die Plasmide (P101: α_{IIb}-CFP; P92: β_3-YFP (Leu33); P96: β_3-YFP (Pro33)) über Nacht enzymatisch linearisiert (P92 und P96 mit AseI; P101 mit PvuI), um sie anschließend in HEK293-Zellen transfektieren zu können. Die qualitative Kontrolle erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese (Abb. 7). Der Vergleich der linearisierten mit den nicht linearisierten Plasmiden im Agarosegel zeigte deutliche Unterschiede. Die nicht linearisierte Form von P101 lässt Banden bei weit über 10 kb und bei etwa 5,5 kb erkennen. Die linearisierte Form von P101 dagegen lief bei knapp 9 kb. Die Spur des nicht linearisierten P92 und P96 zeigte Banden bei weit über 10 kb und bei 4 kb auf, die Spur des linearisierten P92 und P96 wies jeweils nur eine Bande bei etwa 8 kb auf.

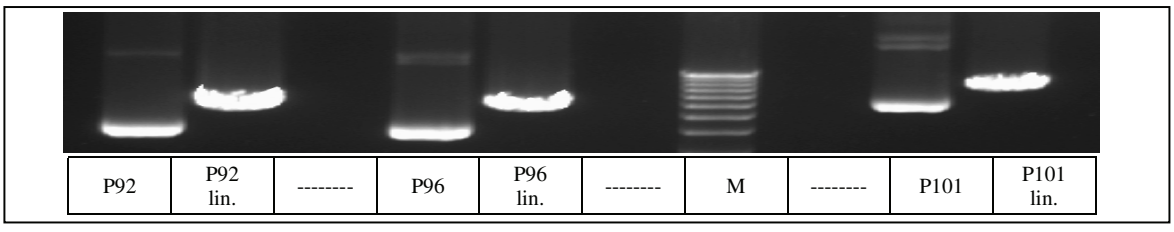


Abbildung 7: Gelelektrophoretische Analyse der linearisierten Plasmide
Proben der nicht linearisierten und linearisierten Plasmide wurden zur Qualitätskontrolle im 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt. *lin.: Plasmide nach der Linearisierung; Marker: 1 Kb Leiter.*

3.1.2 Spezifische $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Expression auf der Zellmembran

Für die Transfektion der HEK293-Zellen wurden die linearisierten Plasmide verwendet. Für die Doppeltransfektion wurden die Zellen mit je einer α- und einer β-Untereinheit des Rezeptorgens transfektiert und selektiv amplifiziert. Durch „Magnetic-Activated Cell Sorting“ (MACS) wurden doppelt transfektierte Zellen angereichert, die daraufhin vereinzelt und kultiviert wurden. Mittels FRET-Analysen wurde bestimmt, ob das Protein synthetisiert wurde. Die Zellen wurden dazu im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop mit einer Wellenlänge von 458 nm angeregt und auf blaue und gelbe Fluoreszenz untersucht (Abb. 8). Die in Abb. 8 dargestellten Zellen emittieren sowohl blaue (485 nm) als auch gelbe (538 nm) Fluoreszenz. Die Fluoreszenz ist in der Zellmembran stärker sichtbar als im Zytoplasma, wobei die Emissionen der beiden Wellenlängen deckungsgleich sind. Die $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Expression wurde anschließend durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen bestätigt.

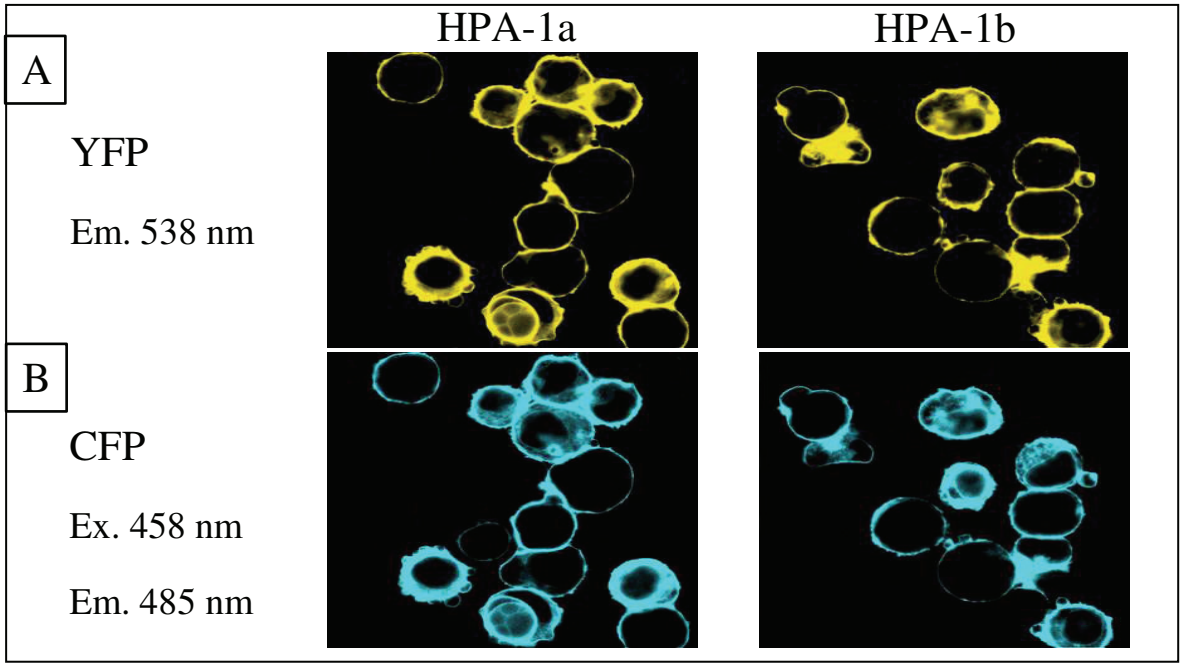


Abbildung. 8: Lokalisation der α_{IIb}-CFP/β_3-YFP-Interaktionen mittels FRET
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen doppelt transfektierter HEK293-Zellen: Exemplarisch sind Zellen dargestellt, die α_{IIb}-CFP/β_3-YFP exprimieren. A: emittiertes Licht der Wellenlänge 538 nm; B: emittiertes Licht der Wellenlänge 485 nm, angeregt durch 458 nm.

3.1.3 $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Expressionsnachweis mittels Western-Blot-Analysen

SDS-PAGE und anschließende Western-Blot-Analysen (Abb. 9) von Zelllysaten aus transfektierten HEK293-Zellen sollen die fluoreszenzmikroskopischen Analysen (Abb. 8) bestätigen. Die Detektion der transfektierten Zellmembranproteine wurde mit Anti-α_{IIb}-, Anti-β_3- sowie Anti-GFP-Antikörper, welcher mit CFP und YFP kreuzreagiert, durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten Zelllysate, die mit dem Ausgangsvektor (pcDNA3.1) transfektiert wurden. Durch die am C-Terminus fusionierten Fluoreszenzproteine hat die α_{IIb}-Untereinheit ein Molekulargewicht von 167 kDa anstatt von 140 kDa und die β_3-Untereinheit ein Molekulargewicht von 132 kDa anstatt von 105 kDa (Abb. 9 A und 9 B). Die mit Anti-GFP-Antikörper detektierte Membran zeigt bei den Einzeltransfektanten jeweils eine Bande bei 167 kDa (α_{IIb}-CFP) oder bei 132 kDa (β_3-YFP) auf. Lediglich bei den Doppeltransfektanten, welche den intakten Rezeptor exprimieren, war eine Doppelbande bei 167 kDa und bei 132 kDa zu erkennen.

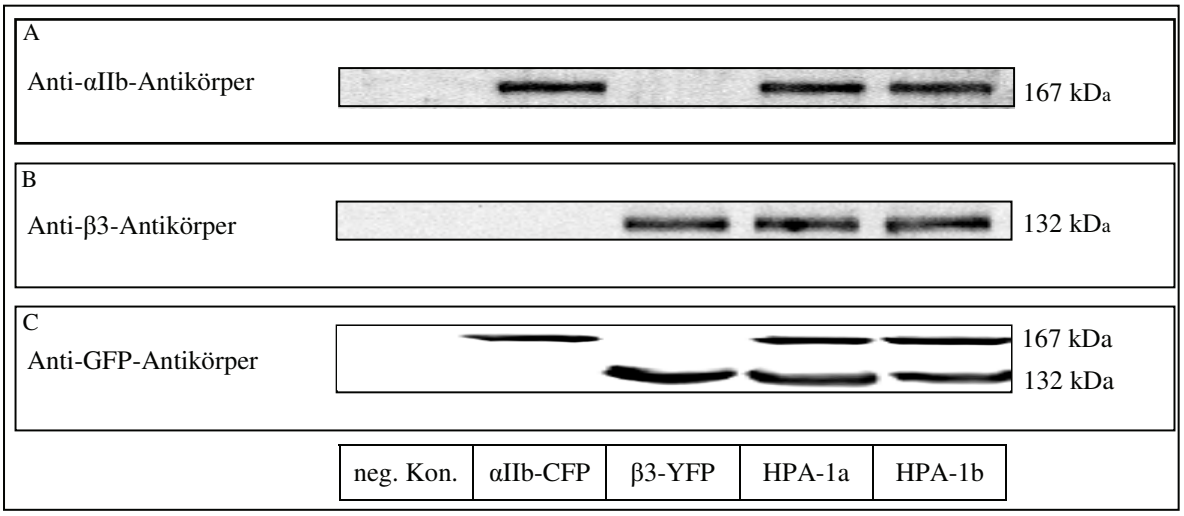


Abbildung 9: Western-Blot zur Darstellung der $\alpha_{IIb}\beta_3$-Expression in HEK293-Zellen
Die HEK293-Zellen wurden mit den unterschiedlichen Rezeptoruntereinheiten transfektiert, durch nicht reduzierende SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit Anti-α_{IIb}-AK (α_{IIb}-spezifisch) (A), Anti-β_3-AK (β_3-spezifisch) (B) oder Anit-GFP-AK (CFP- und YFP-spezifisch) (C) detektiert.

Anhand der Western-Blot-Analysen war ersichtlich, dass Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit den jeweiligen fusionierten Fluoreszenzproteinen (CFP an die α-Untereinheit; YFP an die β-Untereinheit) in HEK293-Zellen erfolgreich transfektiert und exprimiert wurde. Dementsprechend konnten die Fluoreszenzmikroskopischen-Analysen bestätigt werden (Abb. 8).

3.1.4 Funktionelle $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Expression auf HEK293-Zellen

Zellen, die eine gleich starke $\alpha_{IIb}\beta_3$-(HPA-1a bzw. HPA-1b) Zelloberflächen-Expression aufwiesen, wurden selektiert und die Fusionskonstrukte daraufhin auf ihre Funktionalität untersucht. Mit den durchgeführten Experimenten in der Durchflusszytometrie wurde die funktionale Rezeptorintegrität des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins nachgewiesen. Hierzu wurden die Rezeptorvarianten mit Agonisten wie Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) oder 1-Stearoyl-2-Arachidonoyl-sn-Glycerol (SAG) behandelt. PMA aktiviert die Proteinkinase C, was zur Stimulation des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins führt. SAG dagegen bindet zunächst an G-Protein gekoppelte Rezeptoren und aktiviert über diese die Proteinkinase C. Danach wurde Alexa-647-gekoppeltes Fibrinogen hinzugegeben, welches von aktivierten Rezeptoren gebunden und im Durchflusszytometer detektiert werden konnte (Abb. 10). Zu erkennen ist, dass nach Zugabe von PMA eine verstärkte Bindung zu Fibrinogen vorhanden ist (Abb. 10 A). Um den Effekt der G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Signalwege auf die Konformation der zytoplasmatischen Integrin-Domänen zu untersuchen, wurden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit SAG behandelt und eine verstärkte Bindung zu Fibrinogen detekiert (Abb. 10 B). PMA und SAG stimulieren die physiologische Inside-out-Aktivierung der Integrine, die mit einer räumlichen Trennung der zytoplasmatischen α- und β-Domänen von HPA-1a- und HPA-1b-Varianten einhergeht. Die Fibrinogenbindung bzw. der Rezeptor lässt sich mit dem $\alpha_{IIb}\beta_3$-Antagonisten Abciximab blockieren. Zusätzlich ist die Bindung von Fibrinogen nach Zugabe von SAG durch Pertussis-Toxin (PTX) blockierbar (Abb. 10 B). Die PTX-Zellbehandlung blockiert die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und verhindert dadurch die Wirkung von Agonisten. Sowohl nach PTX- als auch nach Abciximab-Zellbehandlung war keine Fibrinogenbindung zu erkennen. Wie in Abb. 10 zu erkennen ist, wiesen die unstimulierten Zellen eine niedrige Fluoreszenz auf. Die Alexa-647-Fluoreszenz von Zellen, die mit PMA und SAG behandelt wurden, war nahezu identisch. Die Fluoreszenzintensitäten der mit Antagonisten behandelten Rezeptoren waren fast deckungsgleich mit denen der unbehandelten Rezeptoren.

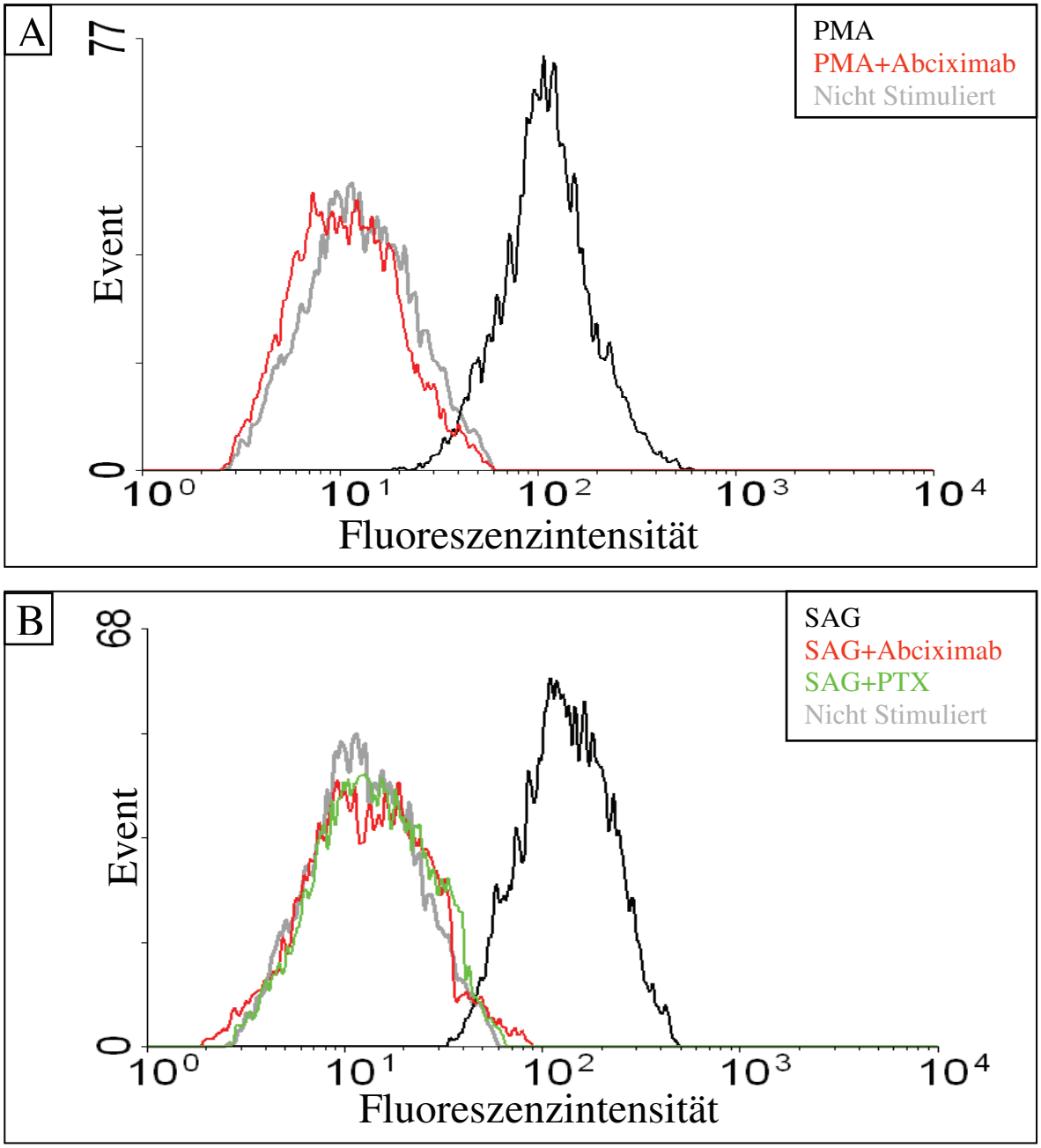


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Funktionalitätsanalyse der aktivierten $\alpha_{IIb}\beta_3$-Zellen
Die Zellen wurden mit Fibrinogen Alexa-647 inkubiert und zuvor mit PMA (A) oder SAG (B) stimuliert (schwarz). Parallel dazu wurden die Zellen mit Abciximab (rot) bzw. PTX (grün) blockiert. Als Kontrolle wurden nicht stimulierte Zellen (grau) durchflusszytometrisch untersucht.

Die durchgeführten Untersuchungen der Funktionalität und Bindungsfähigkeit der Rezeptorvarianten an Fibrinogen mit Agonisten und Antagonisten zeigte: Sowohl die HPA-1a- als auch die HPA-1b-Variante lassen sich spezifisch aktivieren und blockieren.

3.2 Quantifizierung des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins auf der Zelloberfläche

Die mit α_{IIb}-CFP/β_3-YFP transfektierten HEK293-Zellen wurden mit dem komplexspezifischen CD41-Antikörper (PM6/248), der gegen die α_{IIb}-Untereinheit gerichtet ist, inkubiert. Ein Anti-Maus-PE-markierter Antikörper diente als Sekundärantikörper. Abb. 11 zeigt die durchflusszytometrische Detektion des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins auf der Zelloberfläche exemplarisch an einer Rezeptor-Variante in der Durchflusszytometrie. Es ist zu erkennen, dass das $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin auf den HEK293-Zellen exprimiert wird.

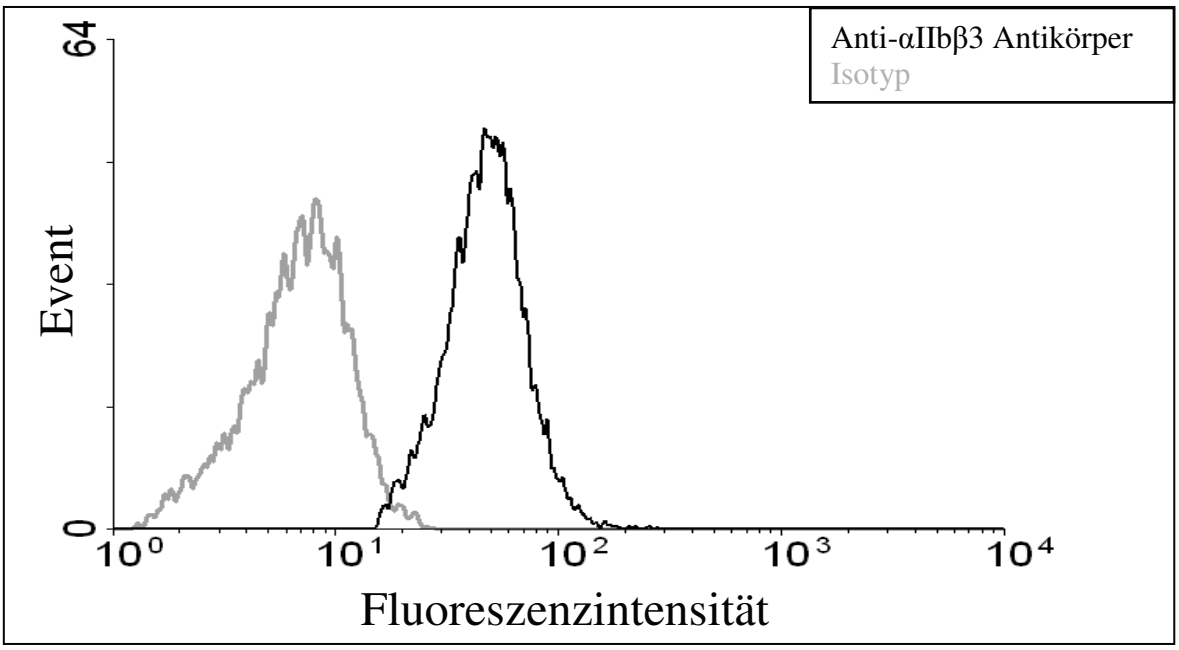


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse zur Darstellung der $\alpha_{IIb}\beta_3$-Expression
Exemplarische PE-Fluoreszenz für einen Zellklon, der mit dem CD41-PE-Antikörper behandelt wurde (schwarz). Als Kontrolle wurde der Klon mit anti-Maus IgG1-PE inkubiert (grau).

Beide Varianten wurden, wie in Abb. 11 gezeigt, gemessen und die $\alpha_{IIb}\beta_3$-Expression mithilfe der Rainbow-Kalibrationspartikel ermittelt (Tabelle 3). Über die Fluoreszenzäquivalente und die PE-Ratio des Sekundärantikörpers ließ sich die Rezeptorzahl berechnen.

	HPA-1a	**HPA-1b**
n	9	9
Isotyp (Mittelwert)	8,58	8,51
αIIbβ3-Expression (Mittelwert)	116,18	117,64
Fluoreszenzäquivalent	1630975	1657383
Rezeptorzahl	≈ 600.000	≈ 600.000

Tabelle 3: Bestimmung der $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrinzahl auf der Zelloberfläche

Beide HPA-1-Rezeptorvarianten des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins zeigten im Durchflusszytometer eine ähnliche Rezeptorzahl von 600.000. Ausschließlich diese wurden selektiert und in den anschließenden Experimenten verwendet.

3.3 $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Charakterisierung in HPA-1-Varianten

Der CD-61-PE-Antikörper (Klon: SZ21) wurde verwendet, um zwischen HPA-1a- und HPA-1b-exprimierenden HEK293-Zellen zu unterscheiden, da der Antikörper mit einer viel niedrigeren Affinität an die HPA-1b-Isoform bindet (Weiss, 1995). Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, denn die durchflusszytometrischen Analysen an $\alpha_{IIb}\beta_3$-exprimierenden Zellen zeigten eine deutlich reduzierte Bindung von CD61-PE bei HPA-1b-exprimierenden Zellen (Abb. 12).

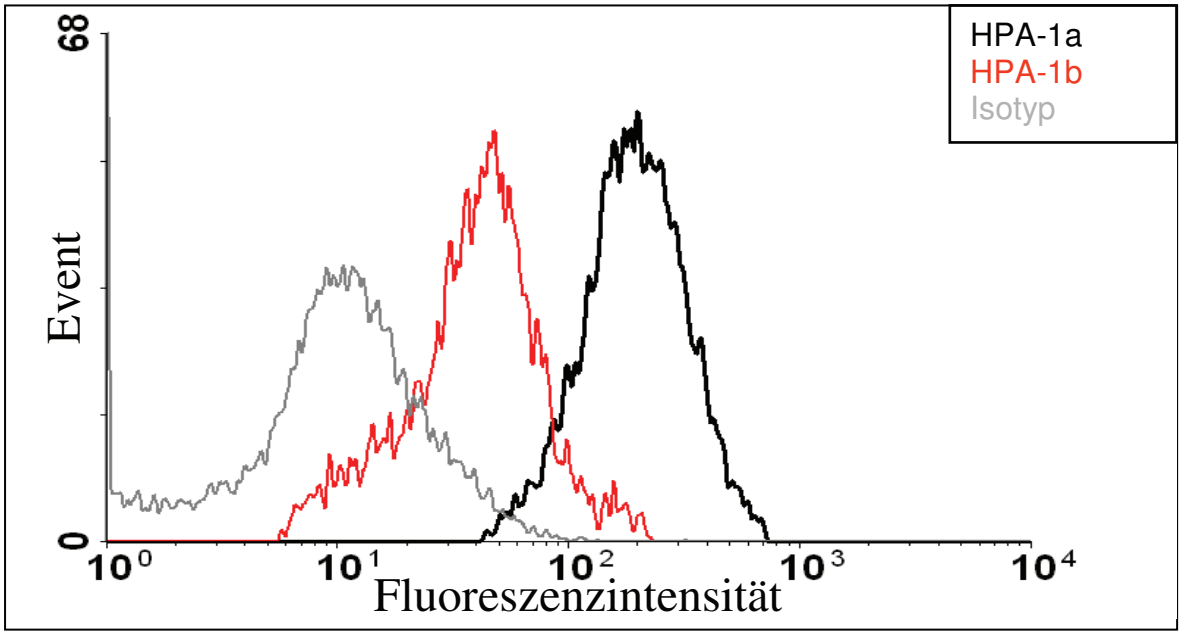


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Charakterisierung der HPA-1-Varianten
Das durchflusszytometrische Diagramm zeigt die Charakterisierung der HPA-1a- (schwarz) bzw. HPA-1b- (rot) exprimierenden Zellen mit einem HPA-1a-spezifischen Antikörper. Als Kontrolle wurde der Klon mit anti-Maus IgG1-PE inkubiert (grau).

Zusätzlich wurde das Vorhandensein der HPA-1a- bzw. der HPA-1b-Variante mittels cDNA basierender RFLP validiert (Abb. 13). Durch den Basenaustausch an Position 1565 von Thymin zu Cytosin beim HPA-1b-Genotyp ergibt sich eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle für ScrFI. Die DNA der HPA-1a-exprimierenden Zellen weisen zwei Schnittstellen bzw. drei Banden auf (106 bp, 92 bp und 23 bp), während die DNA der HPA-1b-exprimierenden Zellen über drei Schnittstellen bzw. vier Banden verfügen (92 bp, 80 bp, 26 bp und 23 bp). Die spezifischen Restriktionsprodukte von HPA-1a und HPA-1b konnten im Polyacrylamidgel positiv nachgewiesen werden.

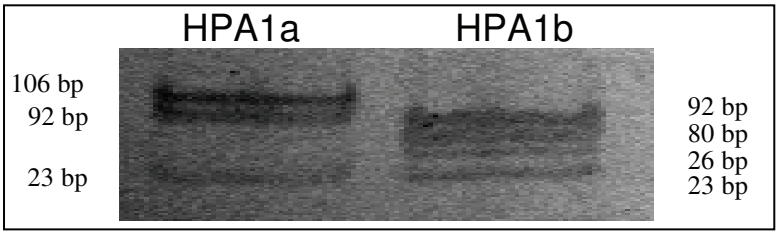


Abbildung 13: Restriktionsanalysen der HPA-1-exprimierenden HEK293-Zellen mit ScrFI
Restriktionsprodukte von HPA-1a und HPA-1b wurden auf einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetragen und nach ihrer Größe getrennt.

3.4 FRET-Analysen

Die Analysemethode FRET dient zur Untersuchung der räumlichen Nähe zwischen den zytoplasmatischen Domänen *in-vivo*, um so Rückschluss auf den Aktivierungszustand des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins zu erhalten. Befindet sich das $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin im Ruhezustand, so besteht eine räumliche Nähe zwischen der α- und der β-Transmembran-Domäne. Der Abstand zwischen der zytoplasmatischen α- und β-Untereinheit ist essenziell für die Integrinaktivierung (Kim, 2003). Beim bidirektionalen Integrin-Signaling kommt es zu einer extrazellulären Konfomationsänderung, bei der sich die Rezeptorarme öffnen und sich eine Trennung der zytoplasmatischen α- und β-Domäne anschließt. Dies ist ein wichtiger Mechanismus für die Vermittlung von Informationen durch die Zellmembran (Kim, 2003).

3.4.1 Basale FRET-Effizienz

Um FRET als Messsystem zu validieren und die basale FRET-Effizienz zu messen, wurde die Akzeptor-Photobleach-Methode angewandt. Bei dieser Methode wird die Donor (CFP)-Fluoreszenz-Intensität vor und nach der akzeptorspezifischen Photodestruktion verglichen (Abb. 14). Dabei kommt es zu einer kompletten Akzeptor (YFP)-Ausbleichung. Bei der anschließenden Donor-Fluoreszenzmessung kommt es zu einem Anstieg der CFP-Intensität, abhängig von der zuvor auf den Akzeptor transferierten Energie. Es ist zu erkennen, dass nach dem Akzeptor-Bleaching die Akzeptoremission erlischt und die Donoremission stark zunimmt. Je stärker die Donor-Intensitätszunahme ist, desto kleiner ist der Abstand zwischen den zytoplasmatischen Domänen, was mit einer inaktiven Konformation des Rezeptors einhergeht (Kim, 2003).

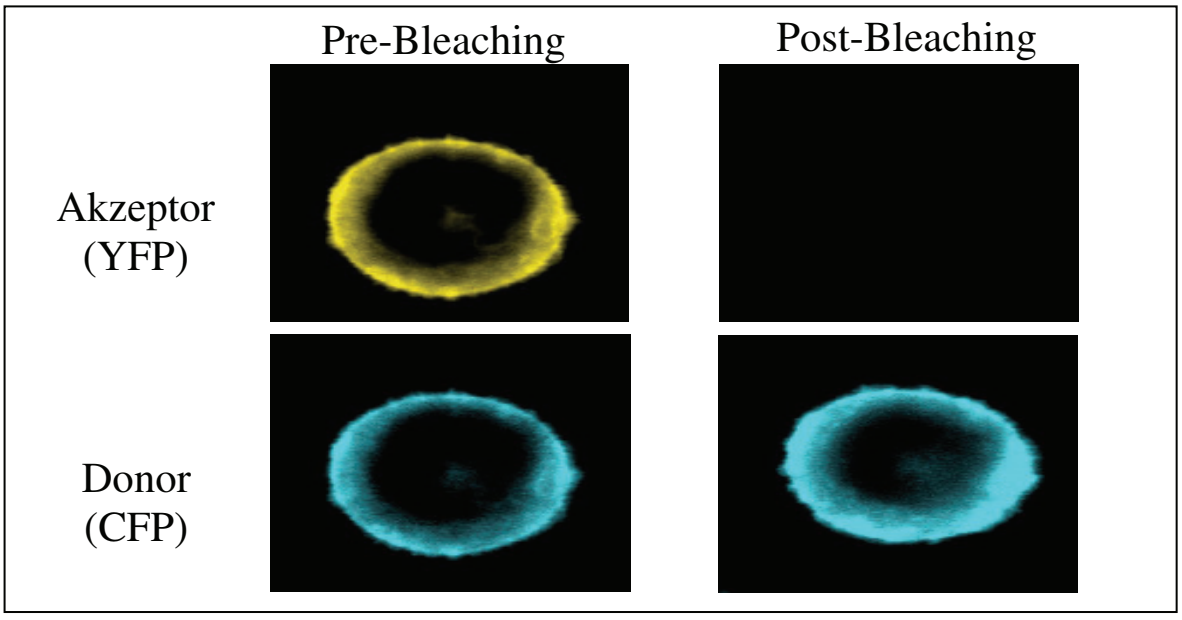


Abbildung 14: Akzeptor-Bleaching zur Darstellung der FRET-Effizienz
Es wurde exemplarisch an einer Zelle die Fluoreszenz des Donors und des Akzeptors vor und nach dem Akzeptor-Bleaching bei 514 nm gemessen.

Nach Auswertung der Akzeptor-Bleaching-Experimente ist zu erkennen (Abb. 15), dass die FRET-Signale der HPA-1a- und der HPA-1b-Rezeptorvarianten im Ruhezustand einen signifikanten Unterschied aufweisen (HPA-1a: 197,63 ±56,07 %; HPA-1b: 146,95 ±28,84 %; p=0,0001). Daraus ist zu schließen, dass die Distanz zwischen den zytoplasmatischen Domänen bei der HPA-1b-Rezeptorvariante größer ist als bei der HPA-1a-Rezeptorvariante. Nach Stimulation des Rezeptors mit PMA (induziert Inside-out-Signaling) ist ein größerer Unterschied in der Donorintensität zwischen dem aktivierten und dem ruhenden Zustand bei der HPA-1a-Rezeptorvariante zu beobachten (HPA-1a: 175,73 ±50,08 %; 197,63 ±56,07 %; p=0,0327), (HPA-1b: 141,15 ±25,42 %; 146,95 ±28,84 %; p=0,2458).

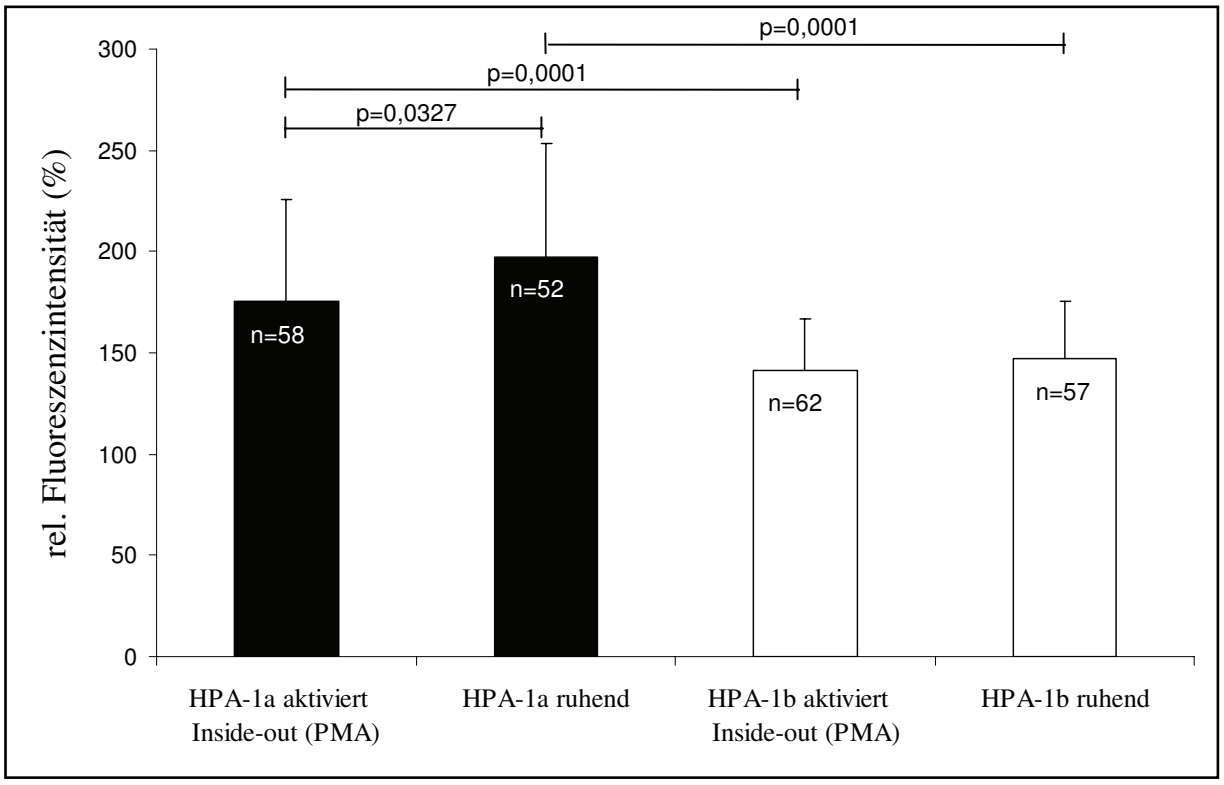


Abbildung 15: Donoremissionszunahme nach dem Akzeptor-Bleaching
Dargestellt ist die Donoremission nach dem Akzeptor-Bleaching. Der Akzeptor der Rezeptorvarianten wurde im nicht aktivierten Zustand und im aktivierten Zustand gebleicht und die Donoremissionszunahme im Anschluss daran prozentual gemessen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Aktivierungszustände, die durch PMA induziert werden, unterschiedlich auf die Rezeptorvarianten auswirken.

3.4.2 FRET-Analysen unter statischen Bedingungen

Um den Effekt der Ligandenbindung auf die Orientierung der zytoplasmatischen Domänen zu untersuchen, wurden die HPA-1-Rezeptorvarianten (HPA-1a bzw. HPA-1b) mit PMA, SAG sowie Mn^{2+} bzw. auf immobilisiertem Fibrinogen inkubiert. Die Konformationsänderung des αIIb-CFP/β_3-YFP (HPA-1a und HPA-1b) in Anwesenheit der Agonisten PMA, SAG, Mn^{2+} und immobilisiertem Fibrinogen verursacht eine Abnahme des FRET-Signals verglichen mit Zellen, die nicht mit den Agonisten behandelt wurden (Abb. 16). Die durch PMA und SAG induzierte Konformationsänderung des α_{IIb}-CFP/β_3-YFP-Integrins wirkt über das Inside-out-Signaling stärker auf die HPA-1a-Rezeptorvariante als auf die HPA-1b-Rezeptorvariante (PMA (1 µM); HPA-1a: 59,26 ±4,5 %; HPA-1b: 64,3 ±8 %; p=0,0001), (SAG (30 nM); HPA-1a: 69,82 ±3,8 %; HPA-1b: 70,59 ±4,6 %; p=0,3562). Einen gegenteiligen Effekt haben outside-in-induzierende Agonisten wie Mn^{2+} und immobilisiertes Fibrinogen (Mn^{2+} (0,5 mM); HPA-1a: 72,85 ±5,7 %; HPA-1b: 66,9 ±5,7 %; p=0,0053), (Fg (100 µg/ml); HPA-1a: 78,29 ±7,1 %; HPA-1b: 73,53 ±5,6 %; p=0,0447).

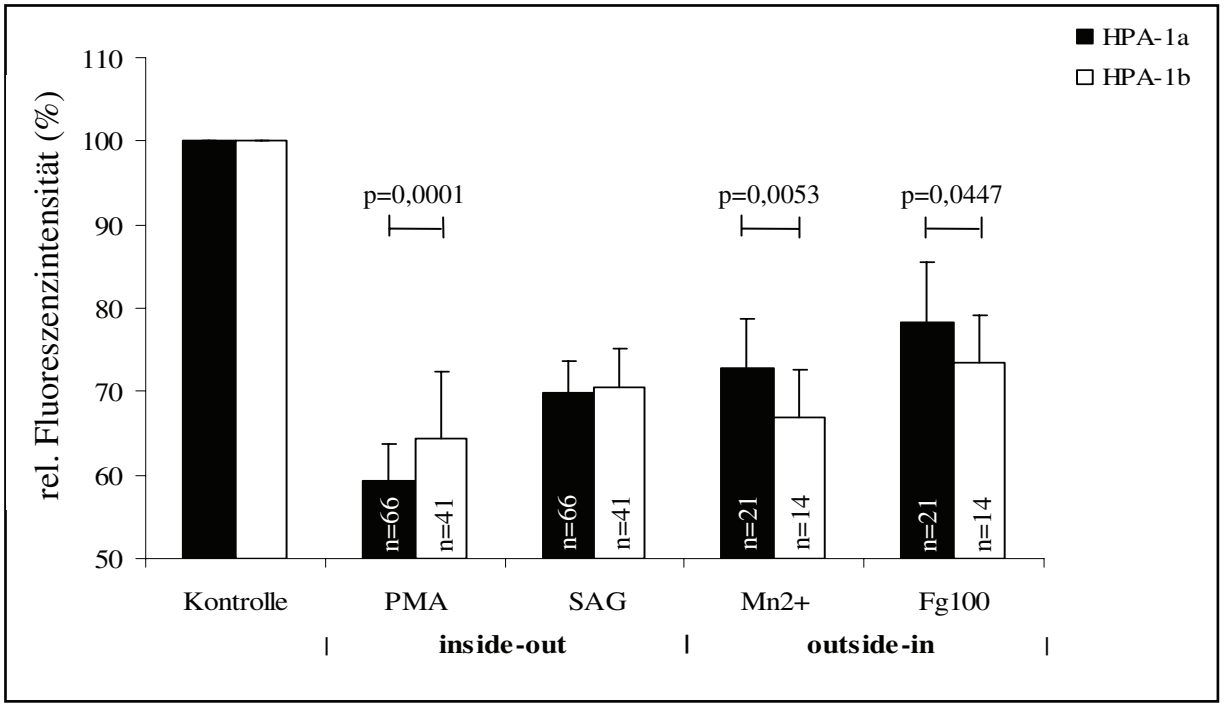


Abbildung 16: Relative FRET-Abnahme von HPA-1-exprimierenden Zellen unter statischer Adhäsion
HPA-1a- und HPA-1b-exprimierende Zellen wurden mit verschiedenen Agonisten, welche Inside-out- bzw. Outside-in-Signaling induzieren, stimuliert und die FRET-Signalabnahme gemessen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch bidirektionales Signaling vermittelte Aktivierung des Rezeptors mit einer räumlichen Trennung der zytoplasmatischen α_{IIb}- und β_3-Domänen assoziiert ist. Außerdem wird deutlich, dass die Aktivierungszustände, die durch die verschiedenen Agonisten induziert werden, unterschiedlich auf die Rezeptorvarianten wirken.

3.4.3 FRET-Analysen unter Strömungsbedingungen

Die Adhäsion von Thrombozyten an extrazelluläre Matrixproteine infolge von Gefäßverletzungen wird unter anderem durch lokale Scherkräfte reguliert (Nesbitt, 2009). Um die Adhäsion unter flussdynamischen Bedingungen zu untersuchen, wurde der Effekt der Ligandenbindung auf die Orientierung der zytoplasmatischen Domänen untersucht. Dabei wurden die Zellen auf immobilisiertem Fibrinogen (50 µg/ml) inkubiert und anschließend immer stärker werdenden Scherraten ausgesetzt. Im Vergleich zu statischen Bedingungen erhöht sich die Affinität des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins unter Strömungsbedingungen und erreicht eine verbesserte Bindung zum immobilisierten Fibrinogen, was zu einer signifikanten FRET-Abnahme in Richtung HPA-1b-Rezeptorvariante führt (Abb.17). Ab 400 s^{-1} konnte bei der Akzeptoremission ein stärker werdender Unterschied zwischen der HPA-1a- und der HPA-1b-Rezeptorvariante beobachtet werden, der ab 800 s^{-1} signifikant wurde (800 s^{-1}: HPA-1a: 79,63 ±14,49 %; HPA-1b: 67,33 ±14,04 %; p=0,0014; 1600 s^{-1}: HPA-1a: 73,62 ±13,17 %; HPA-1b: 63,21 ±13,01 %; p=0,0029). Die Donoremissionszunahme ist für die FRET-Analysen charakteristisch und dient zusätzlich als interne Kontrolle. Ein signifikanter Unterschied bei der Zelladhäsionsaktivität im Hinblick auf die HPA-1-Rezeptorvarianten wurde nur unter stärker werdenden Strömungsbedingungen zwischen HPA-1a und HPA-1b beobachtet.

In drei Experimenten wurden die Zellen zusätzlich zehn Minuten lang mit dem Antagonisten Abciximab (4 µg/ml) inkubiert. Eine Perfusion der vorinkubierten Zellen auf Fibrinogen-beschichtetem Objektträger zeigte keine Adhäsion. Ähnlich verhielten sich die Zellen in drei Experimenten auf BSA-beschichtetem Objektträger.

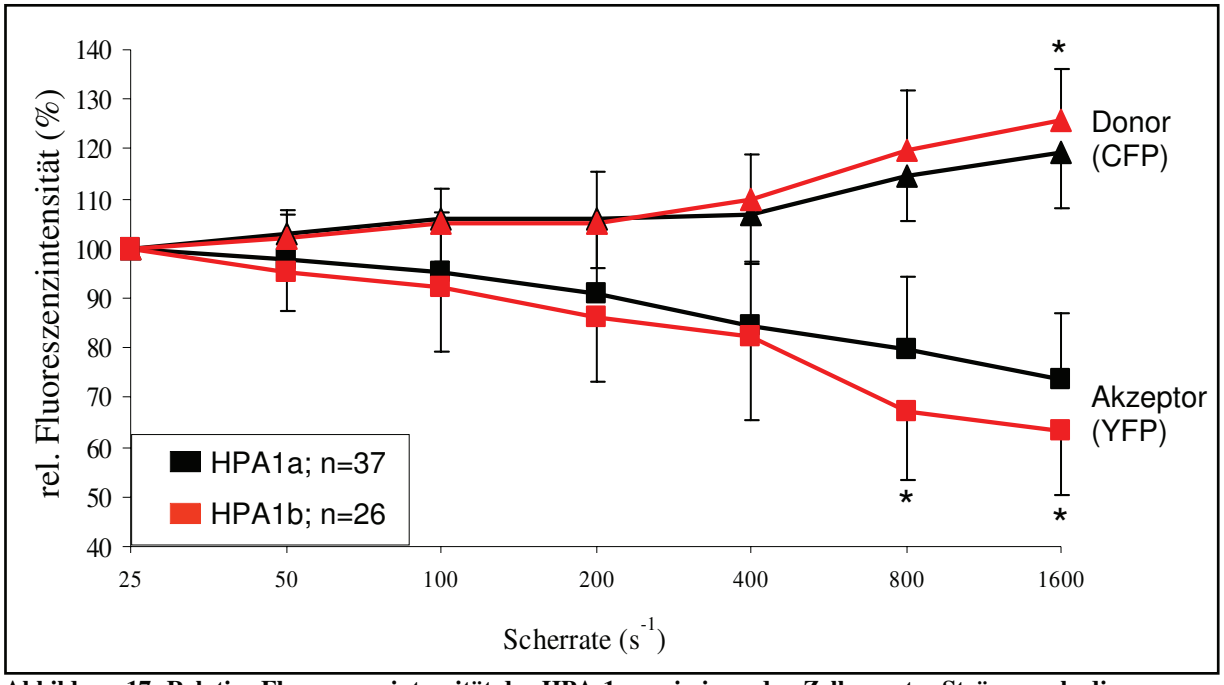


Abbildung 17: Relative Fluoreszenzintensität der HPA-1-exprimierenden Zellen unter Strömungsbedingungen
Es wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten der mit CFP bzw. YFP gekoppelten HPA-1a (schwarz) und HPA-1b (rot) -Rezeptorvarianten in Abhängigkeit zunehmender Scherraten gemessen.

Zur Validierung des Systems wurden die CFP- und die YFP-Fluoreszenz der zu untersuchenden Zellen nach wiederholtem Akzeptor-Bleaching gemessen. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht gebleicht wurden. In der Abbildung 18 ist zu erkennen, dass nach dem Akzeptor-Bleaching die Donor-Emission zunimmt und im Gegensatz dazu die Akzeptoremission abnimmt. Bei den nicht gebleichten Zellen verändern sich die Emissionen über die Zeit nur marginal.

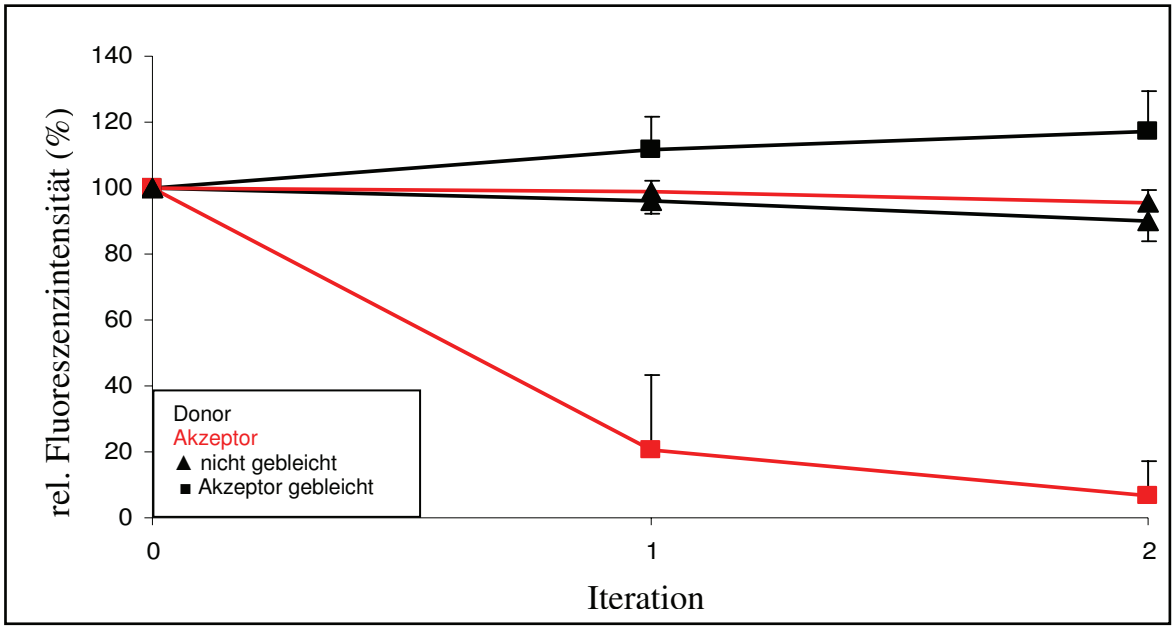


Abbildung 18: Validierung der FRET-Analysen unter Strömungsbedingungen
Es wurden die Emissionseigenschaften der Fluorophore auf 1 % BSA mit und ohne Akzeptor-Bleaching gemessen.

3.5 Essenzielle Proteine der $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrinaktivierung

SDS-PAGE und anschließende Western-Blot-Analysen (Abb. 19) von Zelllysaten aus Thrombozyten, HEK293-Zellen und HPA-1a- bzw. HPA-1b-exprimierenden Zellen wurden auf Talin-Expression untersucht, welche eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Weiterleitung des bidirektionalen Signalings hat.

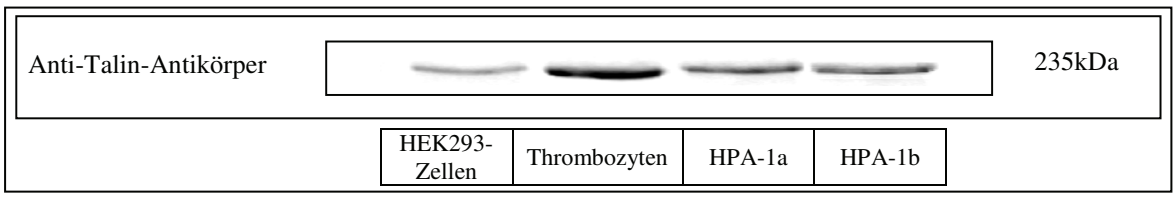


Abbildung 19: Western-Blot-Analysen zur Darstellung des essenziellen Adapterproteins Talin
25 µg Zelllysate wurden durch nicht reduzierende SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mithilfe des monoklonalen Anti-Talin-Antikörpers detektiert.

Sowohl in HEK293-Zellen, Thrombozyten als auch in HPA-1-exprimierenden HEK293-Zellen konnte die Expression von Talin (235 kDa) mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 19).

3.6 Src-Aktivierung in HPA-1-Rezeptorvarianten

Die Messung der intrazellulären Src-Kinase-Phosphorylierung in HPA-1a- und HPA-1b-Zelllysaten gibt einen Aufschluss über den Grad der Rezeptoraktivierung.

Die HPA-1a- und die HPA-1b-Rezeptorvarianten wurden mit verschiedenen Agonisten stimuliert: das Inside-out-Signaling erfolgte über PMA, während für das Outside-in-Signaling Mn^{2+} und immobilisiertes Fibrinogen verwendet wurden. Als Kontrolle wurden Zellen auf BSA inkubiert. In einem vierten Ansatz wurden die Rezeptorvarianten zunächst mit dem Antagonisten Abciximab und anschließend mit den outside-in-stimulierenden Agonisten behandelt. Die absolute Src-Kinase-Menge (Gesamt-Src) und die phosphorylierte Src-Kinase-Menge Src p418 wurde mittels Western-Blot detektiert und densitometrisch quantifiziert (Abb. 20). Die Inkubation der Zellen mit dem $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Antagonisten Abciximab verursachte eine stärkere Blockierung der HPA-1a-Aktivierung (ca. 33 %). Des Weiteren war ein signifikanter Unterschied zwischen inside-out- und outside-in-induzierender Src-Kinase-Phosphorylierung zu erkennen (HPA-1a: p=0,007; HPA-1b p=0,0299). Eine Erhöhung der Src-Kinase-Phosphorylierung wurde in den HPA-1b-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den HPA-1a-exprimierenden Zellen (HPA-1a: 178,24 ±25,07 %; HPA-1b: 200,44 ±36,39; p=0,24), die an Fibrinogen adhärieren, beobachtet.

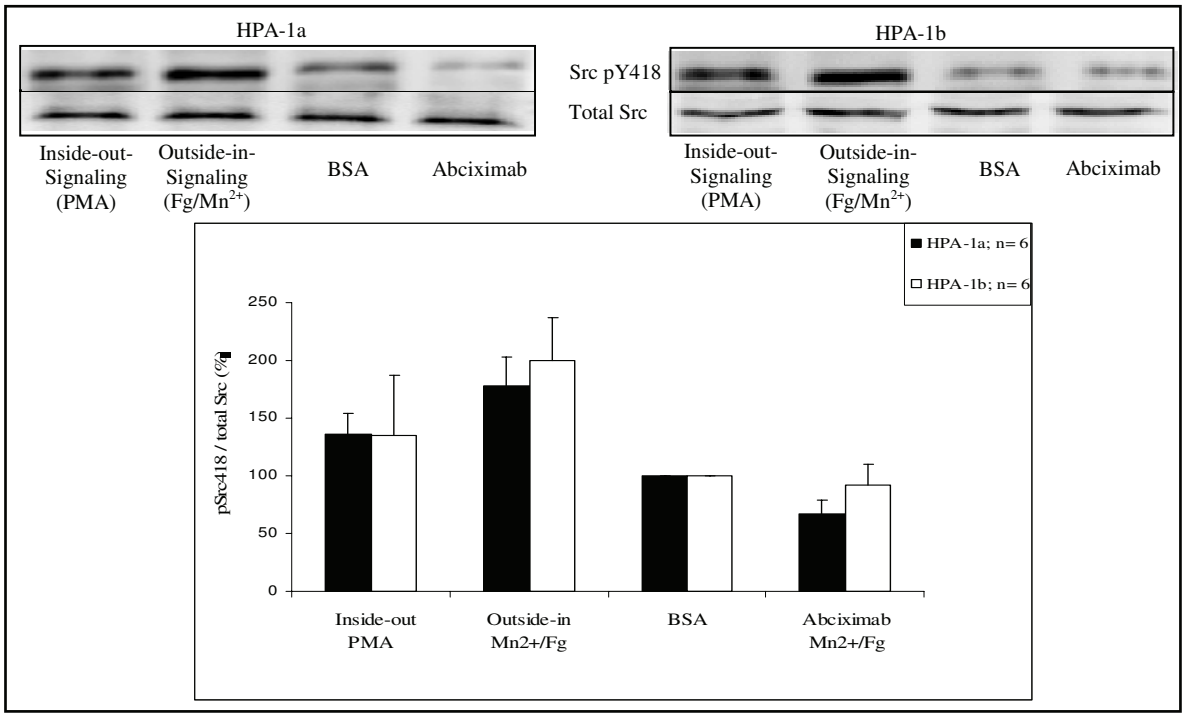


Abbildung 20: Densitometrische Quantifizierung der Src-Kinase-Phosphorylierung in HPA-1-Varianten
Die Rezeptorliganden-abhängige Src-Phosphorylierung in den unterschiedlich stimulierten Zelllysaten wurde mit phosphorspezifischen Antikörpern gegen Src pY418 und Total Src im Western-Blot detektiert und mithilfe von Densitometrie quantifiziert.

Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass das postrezeptorische $\alpha_{IIb}\beta_3$-Signaling in HPA-1-Zellen unterschiedlich verläuft und belegen die funktionellen Unterschiede in HPA-1a und HPA-1b nach der Rezeptoraktivierung.

4 Diskussion

Integrine sind essenziell für die Entwicklung, Immunität und Wundheilung wie auch für Metastasierung von Krebszellen und die Zytoskelett-Reorganisation. Sie gehören zu den Plasmamembran-Rezeptoren, bei denen die grundlegenden Signalmechanismen und Aktivierungsvorgänge noch nicht vollständig verstanden sind. Vor allem die Mechanismen, bei denen Informationen bidirektional übertragen werden, sind noch unklar.

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ findet sich vor allem auf der Oberfläche von Thrombozyten und ist entscheidend für deren durch Fibrinogen vermittelte Vernetzung. Wie alle anderen Integrine ist auch $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin zu bidirektionalem Signaling fähig, d. h. $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin ist in der Lage, sowohl intrazelluläre Signale nach außen als auch extrazelluläre Signale nach innen weiterzuleiten. Die Erforschung dieses Integrin-Typs hat sich als Ziel gesetzt, zum einen ein besseres Verständnis der grundlegenden molekularen Mechanismen der Signaltransduktion zu erreichen. Zum anderen soll $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin ein potenzieller Ansatzpunkt für die pharmakotherapeutische Behandlung von Krankheiten sein, die in einem Zusammenhang mit der Blutgerinnung stehen.

Das Ziel dieser Arbeit war der Vergleich der zytoplasmatischen Konformationsänderungen und damit des Aktivierungszustandes zwischen den $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Varianten HPA-1a und HPA-1b. Bei der HPA-1a-Variante der β_3-Untereinheit befindet sich die Aminosäure Leucin an Position 33, während bei der seltener auftretenden HPA-1b-Variante aufgrund eines „Single Nucleotid Polymorphismus“ an selbiger Stelle ein Prolin vorkommt.

4.1 Expression der Rezeptorvarianten

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, beide Rezeptorvarianten in HEK293-Zellen zu exprimieren. Die Western-Blot-Analyse mit Antikörpern, die spezifisch an die α_{IIb}- bzw. die β_3-Untereinheit des Integrins binden, zeigten Banden auf der Höhe von 167 kDa (β_3-Untereinheit) bzw. 132 kDa (α_{IIb}-Untereinheit) (Abb. 9 A/B). Dies entspricht dem theoretischen Molekulargewicht der jeweiligen Untereinheit gekoppelt mit dem fusionierten Fluoreszenzprotein. Zum anderen konnte die Präsenz der an Untereinheiten gekoppelten Fluoreszenzproteine YFP und CFP direkt durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 9 C). Die dabei aufgetretenen Banden entsprachen dem Molekulargewicht der Fusionsproteine. Einzeltransfektanten wiesen dagegen jeweils nur eine Bande auf. Daraus lässt sich schließen, dass die Zellen die Integrin-Fusionsproteine exprimieren.

Mittels durchflusszytometrischer Analyse mit einem CD41-Antikörper, der den $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Komplex spezifisch erkennt, wurde ersichtlich, dass der Rezeptor auf der

Zellmembran lokalisiert ist (Abb. 11). Dies spricht für die Insertion des Rezeptors in die Plasmamembran. Bei YFP- bzw. CFP-Einzeltransfektanten war die Fluoreszenz im Golgi-Apparat verteilt (Daten nicht gezeigt), dementsprechend ist eine einzelne Rezeptoruntereinheit nicht in der Lage, auf der extrazellulären Seite der Membran exprimiert zu werden (O`Toole, 1989). Bei den mit dem intakten Rezeptor transfektierten Zellen war die blaue und die gelbe Fluoreszenz deckungsgleich (Abb. 8). Die Untereinheiten sind demnach auf der Membran kolokalisiert. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Fluoreszenzmarkierung an den Rezeptoruntereinheiten (CFP an der α-Untereinheit und YFP an der β-Untereinheit) keinen Einfluss auf deren Lokalisation haben.

Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse der HPA-1a- und HPA-1b-Varianten direkt miteinander verglichen werden können, wurde jeweils die Rezeptorzahl auf den Zelloberflächen mit dem komplexspezifischen $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Antikörper bestimmt und daraufhin lediglich Klone mit vergleichbarer Rezeptorzahl für nachfolgende Experimente verwendet (Tabelle 3).

4.1.1 Funktionalität des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins

Die als HPA-1a und als HPA-1b identifizierten Zellklone sollten nicht nur den intakten Rezeptor in seinen verschiedenen Formen synthetisieren, sondern auch die funktionelle Integrität des Rezeptors gewährleisten. Die biologischen Eigenschaften sowie Funktionen und damit auch die Aktivierbarkeit der Rezeptorvarianten sollten durch die Transfektion nicht beeinträchtigt werden, um später Vergleiche zwischen HPA-1a- und HPA-1b-Varianten zu ziehen und deren Bindung an verschiedenen Liganden analysieren zu können. Hierzu wurden die Rezeptoren mit PMA oder SAG aktiviert (Inside-out-Signaling) und anschließend die Bindung von fluoreszenzmarkiertem Fibrinogen gemessen (Abb. 10). Die Bindung von fluoreszenzmarkiertem Fibrinogen nach Stimulation mit SAG war nahezu identisch mit dem Signal der PMA-aktivierten $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrine, während nicht aktivierte Rezeptoren keine Bindung aufwiesen. Der untersuchte Klon synthetisiert demnach intaktes $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin, welches sich durch Agonisten spezifisch aktivieren lässt. Die leicht erhöhte Fluoreszenz der PMA-aktivierten Rezeptoren resultiert möglicherweise daraus, dass PMA den Rezeptor direkt über die Proteinkinase C aktiviert (Morii, 1992), wohingegen SAG indirekt über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wirkt (Alderton, 2001). Es ist denkbar, dass die direkte Aktivierung eine andere Konformationsänderung im Vergleich zu der Aktivierung auf indirektem Weg hervorruft. Wurde der Rezeptor zuvor mit dem Antagonisten Abciximab behandelt, so konnte $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin Fibrinogen weder nach Stimulierung mit PMA noch mit

SAG binden, was auf eine spezifische Blockierung des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins mit Abciximab zurückzuführen ist. Nach Blockierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit dem Antagonisten Pertussis-Toxin hat SAG keine Wirkung auf die $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrinaktivierung.
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Zellen den intakten Rezeptor exprimieren. Der vorhandene Rezeptor ist mittels Agonisten aktivierbar und in der Lage Fibrinogen zu binden. Nach Behandlung mit Antagonisten lässt sich der Rezeptor nicht mehr aktivieren.

4.2 Validierung der HPA-1a- und HPA-1b-Rezeptorvarianten

Im nächsten Schritt war es wichtig zu zeigen, dass die verwendeten Zellklone die HPA-1a- bzw. die HPA-1b-Variante des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins exprimieren.
Hierzu wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse die Bindungssaffinität der Zellen für einen β_3-Untereinheit-spezifischen Antikörper untersucht (Abb. 12). Der verwendete CD61(Klon SZ21)-Antikörper bindet deutlich stärker an die HPA-1a-Variante des Rezeptors. Die HPA-1a-exprimierenden Zellen zeigten wie erwartet eine stärkere Bindung des Antikörpers als die HPA-1b-exprimierenden Zellen.
Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde eine „Restriction Fragment Length Polymorphism“ (RFLP)-Analyse an den HPA-1-Varianten durchgeführt (Abb. 13). Während die HPA-1a-Variante zwei Restriktionsschnittstellen für ScrFI aufweist und sich damit bei einer RFLP-Analyse in drei Banden auftrennt, verfügt die HPA-1b-Variante über drei solcher Schnittstellen und führt damit zu vier unterschiedlichen Banden. Dieses Verhalten konnte bei den Zellklonen nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass die transfektierten HEK293-Zellen die jeweiligen Rezeptorvarianten exprimieren.

4.3 Validierung der FRET-Analysemethode

Für die weiteren Messungen war es nötig, die auf dem Förster-Transfer beruhende Analysemethode zu validieren. Über das Akzeptor-Bleaching vor und nach Aktivierung des Rezeptors können dann Aussagen über die Abstandsverhältnisse der zytoplasmatischen Domänen während der verschiedenen Aktivierungszustände getroffen werden (Kim, 2003).
Mittels Ausbleichen des Akzeptors (YFP) wurde nachgewiesen, dass es sich bei der sichtbaren Fluoreszenz um ein FRET-Signal handelt (Abb 14). In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass das an die α_{IIb}-Untereinheit gebundene Donormolekül CFP durch ein Bleichen des an die β_3-Untereinheit gebundenen Akzeptormoleküls YFP eine deutlich höhere blaue Fluoreszenz aufwies, während die Fluoreszenz von YFP völlig verschwand.

Aufgrund der Ergebnisse lässt sich schließen, dass es möglich ist, die HPA-1a- und die HPA-1b-exprimierenden Zellen mittels FRET-Analyse funktionell zu charakterisieren.

4.3.1 Charakterisierung der Rezeptorvarianten unter statischen Bedingungen

Bei den FRET-Analysen im Fluorimeter sollte das Verhalten der Rezeptorvarianten sowie ihrer zytoplasmatischen Domänen in Gegenwart von verschiedenen Agonisten getestet werden (Abb. 16).

Im inaktiven Zustand befinden sich die Rezeptoruntereinheiten in unmittelbarer Nähe zueinander. Nach Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einer räumlichen Trennung der Rezeptoruntereinheiten. Die Integrinaktivierung kann durch Inside-out- bzw. Outside-in-Signaling erfolgen. In einer früheren Arbeit wurde bereits gezeigt, dass beim Signaling durch die Plasmamembran beim strukturell ähnlichen $\alpha_V\beta_3$-Rezeptor die extrazelluläre Konformationsänderung mit einer räumlichen Separierung der zytoplasmatischen Domänen gekoppelt ist (Kim, 2003). Diese Vorgänge sind bei Integrinen sowohl beim Inside-out- als auch beim Outside-in-Signaling vorhanden (Arnaout, 2005).

Die Experimente zeigten, dass der direkt an der Proteinkinase C angreifende Inside-out-Aktivator PMA zu einem signifikant geringeren Fluoreszenz-Transfer von HPA-1a-Zellen im Vergleich zu HPA-1b-Zellen führte. Dies kann als eine geringere Aktivierung der HPA1b-Variante interpretiert werden. Im Gegensatz dazu führte die Präsenz des über ein G-Protein wirkenden Aktivators SAG zu keiner unterschiedlichen Intensität des Fluoreszenz-Transfers bei den beiden Rezeptorvarianten. Die Outside-in-Agonisten Mn^{2+} und immobilisiertes Fibrinogen führten bei der HPA-1b-Variante zu einer signifikant stärkeren Abnahme des FRET-Signals.

Die stärkere FRET-Signalabnahme der HPA-1a-Variante im Vergleich zur HPA-1b-Variante nach Stimulation mit dem Inside-out-Agonisten PMA scheint auf den ersten Blick den theoretischen Erwartungen zu widersprechen. Allerdings konnte in einem weiteren Experiment gezeigt werden, dass bei der HPA-1b-Variante die Rezeptoruntereinheiten ursprünglich bereits weiter voneinander entfernt sind und sie zudem bei Behandlung mit PMA geringer aktiviert werden (Abb. 15). Eine mögliche, wenn auch eher spekulative Erklärung wäre, dass die HPA-1b-Variante im Ruhezustand in einer voraktivierten Form vorliegt und deshalb durch PMA nur noch bedingt stimuliert werden kann. Die Outside-in-Agonisten Mn^{2+} und Fibrinogen könnten ihrerseits so stark wirken, dass sie diesen schwachen Effekt überlagern.

Bemerkenswert ist, dass die HPA-1a- bzw. HPA-1b-Rezeptorvarianten unterschiedlich auf die Outside-in- und auf die Inside-out-Agonisten reagieren, wobei die Fluoreszenzabnahme

der HPA-1b-Variante nach Stimulation mit einem Outside-in-Agonisten der stärkeren Aktivierung des Rezeptors zugesprochen wird.

4.3.2 Charakterisierung der Rezeptorvarianten unter Strömungsbedingungen

Im menschlichen Körper sind die Thrombozyten starken Scherkräften ausgesetzt. In früheren Publikationen konnte gezeigt werden, dass diese Scherkräfte selbst einen aktivierenden Effekt auf $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin haben (Ozaki, 2005; Ruggeri, 2007; Nesbitt, 2009).

Um festzustellen, ob Scherkräfte die Adhäsion von $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrinen modulieren können, wurde die Adhäsion von HPA-1a- und HPA-1b-exprimierenden HEK293-Zellen an immobilisiertem Fibrinogen in Gegenwart von Scherkräften untersucht (Abb. 17).

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass ab einer Scherrate von 800 s^{-1} HPA-1b-exprimierende Zellen signifikant häufiger an immobilisiertem Fibrinogen adhärieren als HPA-1a-exprimierende Zellen und dass ab 1600 s^{-1} 80 % der HPA-1a-Zellen abreißen, während es im Falle von HPA-1b nur 20 % sind (Doktorarbeit am Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin: Chahem et al., noch nicht publizierte Daten).

Dieser Befund konnte in dieser Arbeit unterstützt werden. Bei der FRET-Analyse zeigte sich ab einer Scherrate von 800 s^{-1} eine signifikante Signalabnahme bei den HPA-1b-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den HPA-1a-exprimierenden Zellen (Abb. 17). Obwohl die Experimente in Zellkulturmedium und nicht im Blut, mit HEK293-Zellen und nicht mit Thrombozyten, welche eine andere Oberflächenbeschaffenheit als die HEK293-Zellen aufweisen, durchgeführt wurden, kann man sagen, dass die höheren Scherraten (ab 800 s^{-1}) den arteriellen Strömungsverhältnissen in den Gefäßen nahe kommen. Unter den schwächeren venösen Strömungsverhältnissen war hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen HPA-1a- und HPA-1b-exprimierenden Zellen zu erkennen.

Basierend auf dieser Beobachtung kann daraus geschlossen werden, dass die HPA-1b-exprimierenden Zellen stärker adhärieren als die HPA-1a-exprimierenden Zellen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Arbeiten (Vijayan, 2003), die eine höhere Affinität für $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin zu Gunsten der HPA-1b-Variante in Verbindung mit genannten Scherraten bringen (Tzima, 2001).

Die Befunde stimmen mit einer in vielen klinisch-epidemiologischen Studien gefundenen Assoziation überein, die die HPA-1b-Rezeptorvariante mit arteriellen, nicht aber mit venösen Thrombosen in Einklang bringen (Ridker, 1997; Zotz, 1998; Hooper, 1999; Larsson, 1999; Renner, 2001; Zotz, 2000; Zotz, 2005). So ist denkbar, dass durch HPA-1b-exprimierende Thrombozyten gebildete Thromben eine höhere Stabilität aufweisen. Dies stimmt überein mit den

Beobachtungen aus früheren Arbeiten, die zeigten, dass die Blutgerinnsel-Retraktion durch die Beteiligung von HPA-1b-Thrombozyten verstärkt wird (Cadroy, 2001).
Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnten Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie-Studien liefern, die zeigten, dass die $\alpha_{IIb}\beta_3$-Fibrinogenbindung aus zwei aufeinanderfolgenden Prozessen besteht, nämlich aus einer schnellen Reaktion mit einem reversiblen niedrigen Affinitätskomplex und einer anschließend langsameren Reaktion mit einem hohen Affinitätskomplex (Huber, 1995). Es ist möglich, dass durch die gemeinsame Präsenz von Scherkräften und einer veränderten Aminosäure (HPA-1a (Leu33) und HPA-1b (Pro33)) die Bindungskinetik des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins an Fibrinogen beeinflusst wird.

4.4 Quantifizierung der Src418-Kinase unter statischen Bedingungen

Die Aktivierung des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins führt zur einer Reihe intrazellulärer Prozesse wie der Freisetzung von Kalzium-Ionen, der Initiierung des Phosphoinositid-Metabolismus, der Zytoskelett-Reorganisation und der Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen. Beim letztgenannten Prozess spielen Protein-Kinasen wie die Tyrosin-Kinasen der Src-Familie eine entscheidende Rolle. Diese Src-Kinasen können von vielen thrombozytären Rezeptor-Agonisten aktiviert werden, wobei eine kleine Menge von Src-Kinasen (ca. 5 %) konstitutiv an die zytoplasmatische β_3-Schwanz-Domäne gebunden vorkommt und nach Fibrinogenbindung schnell aktiviert wird (Arias-Salgado, 2003; Obergfell, 2002). Daraus resultiert eine lokale Src-Kinase-Konzentrationserhöhung, es kommt zu einer trans-Autophosphorylierung des Aktivierungsloops und dadurch zu einem stabilen $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Aktivierungsstadium (Harrison, 2003). Während dieses Prozesses wird eine weitere Kinase, die Spleen-Tyrosin-Kinase (Syk), an die β_3-Schwanz-Domäne rekrutiert und durch Src aktiviert (Obergfell, 2002), wobei Syk-Kinase und Src-Kinase verschiedene Substrate phosphorylieren, welche beim Signaling an das Aktin-Zytoskelett beteiligt sind (Obergfell, 2001). Ein Beispiel hierfür ist Talin, das an die zytoplasmatische Schwanz-Domäne des Integrins bindet (Calderwood, 2004; Moser, 2008; Nieswandt, 2007; Petrich, 2007) und in den zu untersuchenden Zellen exprimiert wird.
In der hier vorliegenden Arbeit wurde mittels Western-Blot und anschließender Densitometrie die aktivierte Form der Src418-Kinase (Src pY418) quantifiziert (Abb. 20). Die Stimulierung mit PMA führte zu keinem detektierbaren Unterschied zwischen den beiden Rezeptorvarianten. Die Stimulierung mit Mn^{2+} und immobilisiertem Fibrinogen führte hingegen zu einer stärkeren Phosphorylierung der Src418-Kinase bei HPA-1b- exprimierenden Zellen. Die vorherige Behandlung mit dem $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Antagonist Abciximab blockierte diesen Effekt. Die hier

erhaltenen Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Vijayan, 2000).

Die Src pY418-Kinase-Aktivität der beiden Rezeptorvarianten scheint sich demnach nur unter dem Einfluss von Outside-in-Agonisten zu unterscheiden. Die dabei gemessene höhere Aktivität in den HPA-1b-exprimierenden Zellen könnte als ein weiterer Hinweis auf einen höheren Aktivierungsstatus dieser Zellen nach Outside-in-Signaling interpretiert werden.

4.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse, die hier dargestellt werden, zeigen Konformationsänderungen in den zytoplasmatischen Integrin-Domänen, die mit der Aktivierung in lebenden Zellen assoziiert sind (Takagi, 2002; Lu, 2001; Takagi, 2001).

In dieser Arbeit ist es gelungen, die $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-abhängigen Signalprozesse zu untersuchen und diese zwischen HPA-1a und HPA-1b zu vergleichen, um Aktivierungsunterschiede zwischen diesen aufzudecken. Der Pro→Leu-Aminosäureaustausch an Position 33 in der β_3-Untereinheit ist extrazellulär und befindet sich in der PSI-Domäne, nahe der Ligandenbindungsdomäne. Es konnte gezeigt werden, dass der Aminosäureaustausch bei Rezeptoraktivierung zu unterschiedlich starken Konformationsänderungen führt. Die Ergebnisse zeigen, dass HPA-1b-exprimierende Zellen im Vergleich zu HPA-1a-Zellen eine stärker Konformationsänderung erfahren. Dieses Ergebnis beruht auf einer unterschiedlichen Verarbeitung des Outside-in-Signaling. Die funktionellen Unterschiede unterstützen die epidemiologischen Assoziationsstudien zwischen der genetischen und der thrombozytären Komponente koronarer Herzkrankheiten. Genotypisierungsstudien von an Myokardinfarkten verstorbenen Patienten zeigen, dass der HPA-1b-Genotyp stark mit der Bildung von Thromben in den Koronararterien der Patienten assoziiert ist (Mikkelsson, 1999; Mikkelsson, 2000).

Des Weiteren liefert diese Arbeit experimentelle Beweise dafür, dass die Adhäsion an Fibrinogen durch die thrombozytäre HPA-1b-Rezeptorvariante moduliert wird. Diese Modulation wird durch die spezifischen Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen und Schergeschwindigkeiten bestimmt. In Experimenten, welche unter flussdynamischen Bedingungen mit exprimierenden HPA-1a- und HPA-1b-Zellen durchgeführt wurden, konnten signifikante Unterschiede in der Zelladhäsion auf immobilisiertem Fibrinogen detektiert werden. Der Vergleich mit statischen Bedingungen lässt den Rückschluss zu, dass ein erhöhtes thrombotisches Potenzial von HPA-1b-exprimierenden Thrombozyten ausgeht.

Weitere Studien sind jedoch notwendig, um die an der $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrinaktivierung beteiligten Mechanismen besser zu verstehen.

4.6 Implikationen

Thrombozyten sind maßgeblich an der Entstehung arterieller Thrombosen beteiligt, denn sie sind das zelluläre Element der primären Hämostase. Die Thrombozyten bilden Aggregate, die eine Gefäßläsion verschließen können. Vermittelt wird dieser Vorgang überwiegend vom thrombozytären $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin. Die Liganden binden an den Rezeptor, wodurch es zu einer Rezeptorkonformationsänderung mit anschließender Aktivierung der Thrombozyten mit einer Aktin-Zytoskelett-Reorganisation kommt. Bei der Rezeptorkonformation werden hochaffine Bindungsstellen freigelegt, die nun in der Lage sind, lösliches Fibrinogen irreversibel zu binden. Die transmembranäre Signaltransduktion ist damit für die Blutstillung bei vaskulären Verletzungen und für pathologische Thrombosen mitverantwortlich, die zu Myokardinfarkten führen können (Xiao, 2004).

So werden Risikopatienten $\alpha_{IIb}\beta_3$-Antagonisten präventiv verabreicht, um kardiale Komplikationen zu vermeiden. Thrombosefunktionshemmer kommen zum Therapieeinsatz bei Thrombosen, Infarkten und Blutgerinnseln. Vor allem helfen die Medikamente zur Vorbeugung und Behandlung von Infarkten und Schlaganfällen.

Zusammenfassung

Integrine sind Zelladhäsionsmoleküle mit wichtigen Funktionen z. B. in der Immunität und Hämostase. Beim $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin handelt es sich um einen thrombozytenspezifischen Rezeptor, dessen zentrale Aufgabe die Bindung von löslichem Fibrinogen an der Oberfläche aktivierter Thrombozyten ist, wodurch es zur Vernetzung bzw. Aggregation der Thrombozyten kommt. Eine der am häufigsten untersuchten polymorphen Varianten des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrins ist der Leucin (HPA-1a)- zu Prolin (HPA-1b)-Austausch an Position 33 der β_3-Untereinheit. Dieser ist in der PSI-Domäne, nahe der Ligandenbindungsdomäne lokalisiert und bewirkt eine Allosterie des Rezeptors. Bei der Mechanotransduktion sollte eine gegenseitige Wechselbeziehung zwischen Allosterie und Outside-in- bzw. Inside-out-Signaling messbar in Erscheinung treten.

Epidemiologische Assoziationsstudien zwischen der genetischen und der thrombozytären Komponente koronarer Herzkrankheiten werden durch experimentell funktionelle Unterschiede der polymorphen $\alpha_{IIb}\beta_3$-Integrin-Varianten unterstützt. Genotypisierungsstudien von an Myokardinfarkten verstorbenen Patienten zeigen, dass der HPA-1b-Genotyp stark mit der Bildung von Thromben in den Koronararterien der Patienten assoziiert ist. Die Erforschung der Rezeptor-Varianten und ihre allosterischen Veränderungen, die zu diesem Pathomechanismus führen ist von großem Interesse, nicht zuletzt weil sie die Thrombozytenaktivität modulieren.

Mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) wurde der Abstand zwischen den zytoplasmatischen Domänen der α- und β-Untereinheit in lebenden Zellen untersucht. Es sollten Rückschlüsse auf Rezeptoraktivierung bzw. auf die Konformation gezogen werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Aminosäureaustausch bei Rezeptoraktivierung zu unterschiedlich starken Konformationsänderungen führt. Die Experimente zeigten, dass HPA-1b-exprimierende Zellen im Vergleich zu HPA-1a-Zellen stärker adhärieren. Diese gesteigerte Adhäsion korreliert mit einer Verstärkung des Outside-in-Signaling. Des Weiteren liefert diese Arbeit experimentelle Beweise dafür, dass die Adhäsion an Fibrinogen durch die thrombozytäre HPA-1b-Rezeptorvariante moduliert wird. Diese Modulation wird durch die spezifischen Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen und Schergeschwindigkeiten bestimmt. In Experimenten, welche sowohl unter flussdynamischen Bedingungen als auch unter statischen Bedingungen mit exprimierenden HPA-1a- und HPA-1b-Zellen durchgeführt wurden, konnten signifikante Unterschiede in der Zelladhäsion auf immobilisiertem Fibrinogen detektiert werden. Die unter dem Einfluss von Ouside-in-Agonisten gemessene höhere Src pY418-Kinase-Aktivität in den HPA-1b-exprimierenden Zellen könnte als ein weiterer Hinweis auf einen höheren Aktivierungsstatus dieser Zellen in Bezug auf das Outside-in-Signaling interpretiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen zusammenfassend den Rückschluss zu, dass die Konformation der HPA-1b-Variante ursächlich für das thrombotische Potential verantwortlich ist. Damit konnte diese Arbeit die Hypothese bestätigen, dass die HPA-1b-Variante mit einem prothrombotischen Phänotyp assoziiert sind.

Summary

Integrins are cell adhesion molecules with important functions in immunity and hemostasis. αIIbβ3 integrin is a platelet-specific receptor with the central task of binding soluble fibrinogen to the surface of activated platelets. This process results in cross-linking and aggregation of platelets. One of the most widely studied polymorphic variants of the αIIbβ3 integrin is the leucine (HPA-1a) - to proline (HPA-1b) exchange at position 33 of the β3 subunit. This is located in the PSI domain near the ligand binding domain of the receptor and causes an allostery.

Epidemiological association studies between the genetic and the platelet component of coronary heart disease are supported by experimental functional differences in polymorphic αIIbβ3 integrin variants. Genotyping of patients who died of myocardial infarction show that the HPA-1b genotype is strongly associated with the formation of thrombi in the coronary arteries of patients. The study of the receptor variants and their allosteric changes leading to pathogenic mechanism is of great interest, because the receptor modulates platelet activity. The distance between the cytoplasmic domains of the α-and β-subunit in living cells was examined by fluorescence resonance energy transfer (FRET). The aim was to investigate the receptor activation and allostery, respectively. In this study it was shown that the amino acid replacement results in receptor activation to different degrees of conformational changes. The experiments showed that HPA-1b-expressing cells adhere stronger compared to HPA-1a cells. This increased adhesion is correlated with a reinforcement of the outside-in signaling. Furthermore, this work provides experimental evidence that the adhesion to fibrinogen is modulated by the platelet HPA-1b receptor variant. This modulation is determined by the specific receptor-ligand interactions and shear rates. Experiments were performed under dynamic flow and static conditions using HPA-1a and HPA-1b expressing cells. Significant differences were detected in cell adhesion on immobilized fibrinogen. Under the influence of outside-agonists we measured a higher pY418 Src kinase activity in HPA-1b-expressing cells. This could be interpreted as a further indication of a higher activation status of these cells in relation to the outside-in signaling. The results conclude that the conformation of HPA-1b variant is originally responsible for the thrombotic potential. This could confirm the hypothesis that the HPA-1b variant associated with a prothrombotic phenotype.

Literatur

Adams HP Jr, Effron MB, Torner J, Dávalos A, Frayne J, Teal P, Leclerc J, Oemar B, Padgett L, Barnathan ES, Hacke W; AbESTT-II Investigators
Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II).
Stroke. 2008; 39: 87-99.

Alderton F, Sambi B, Tate R, Pyne NJ, Pyne S
Assessment of agonism at G-protein coupled receptors by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid in human embryonic kidney 293 cells.
Br J Pharmacol. 2001; 134: 6-9.

Alon R, Dustin ML
Force as a facilitator of integrin conformational changes during leukocyte arrest on blood vessels and antigen-presenting cells.
Immunity. 2007; 26: 17-27.

Anthis NJ, Wegener KL, Ye F, Kim C, Goult BT, Lowe ED, Vakonakis I, Bate N, Critchley DR, Ginsberg MH, Campbell ID
The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction.
EMBO J. 2009; 28: 3623-32.

Arias-Salgado EG, Lizano S, Sarkar S, Brugge JS, Ginsberg MH, Shattil SJ
Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain.
Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100: 13298-302.

Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong JP
Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling.
Annu Rev Cell Dev Biol. 2005; 21: 381-410.

Bassam BJ, Gresshoff PM
Silver staining DNA in polyacrylamide gels.
Nat Protoc. 2007; 2: 2649-54.

Bennett JS, Vilaire G
Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine.
J Clin Invest. 1979; 64: 1393-401.

Bhatt DL, Topol EJ
Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy.
Nat Rev Drug Discov. 2003; 2: 15-28.

Bougie DW, Wilker PR, Wuitschick ED, Curtis BR, Malik M, Levine S, Lind RN, Pereira J, Aster RH
Acute thrombocytopenia after treatment with tirofiban ar eptifibatide is associated with antibodies specific for ligand-occupied GPIIb/IIIa.
Blood. 2002; 100: 2071-6.

Braunwald E
Shattuck lecture-cardiovascular medicine at the turn of the millennium : triumphs, concerns, and opportunities.
N England J Med. 1997; 337: 1360-9.

Burnette WN
“Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.
Anal Biochem. 1981; 112: 195-203.

Cadroy Y, Sakariassen K, Grandjean H, Thalamas C, Boneu B, Sié P
The effect of platelet PlA polymorphism on experimental thrombus formation in man depends on blood flow and thrombogenic substrate.
Thromb Haemost. 2001; 85: 1097-103.

Caen JP, Rosa JP
Platelet-Vessel wall interaction: from the bebside to molecules.
Thromb Haemost. 1995; 74: 18-24.

Calderwood DA
Integrin activation.
J Cell Sci. 2004; 117: 657-66.

Calvete JJ
Platelet integrin GPIIb/IIIa: structure-function correlations. An update and lessons from other integrins.
Proc Soc Exp Biol Med. 1999; 222: 29-38.

Carrell NA, Fitzgerald LA, Steiner B, Erickson HP, Phillipps DR
Structure of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa as determined by electron microscopy.
J Biol Chem. 1985; 260: 1743-1749.

Cierniewski CS, Byzova T, Papierak M, Haas TA, Niewiarowska J, Zhang L, Cieslak M, Plow EF
Peptide ligands can bind to distinct sites in integrin alphaIIbbeta3 and elicit different functional responses.
J Biol Chem. 1999; 274: 16923-32.

Clover J, Dodds RA, Gowen M
Integrin subunit expression by human osteoblasts and osteoclasts in situ and in culture.
J Cell Sci. 1992; 103: 267-71.

Cluzel C, Saltel F, Lussi J, Paulhe F, Imhof BA, Wehrle-Haller B
The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells.
J Cell Biol. 2005; 171: 383-92.

Coller BS
Activation affects access to the platelet receptor for adhesive glycoproteins.
J Cell Biol. 1986; 103: 451-6.

Dedhar S, Hannigan GE
Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signaling.
Curr Opin Cell Biol. 1996; 8: 657-69.

del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, Roca-Cusachs P, Fernandez JM, Sheetz MP
Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding.
Science. 2009; 323: 638-41.

Du X, Ginsberg MH
Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function.
Thromb Haemost. 1997; 78: 96-100.

Felsenfeld DP, Schwartzberg PL, Venegas A, Tse R, Sheetz M P
Selective regulation of integrin-cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src. Nat Cell Biol. 1999; 1: 200-206.

Ferrell JE Jr, Martin GS
Thrombin stimulates the activities of multiple previously unidentified protein kinases in platelets.
J Biol Chem. 1989; 264: 20723-9.

Fitzgerald LA, Poncz M, Steiner B, Rall SC Jr, Bennett JS, Phillips DR
Comparison of cDNA-derived protein sequences of the human fibronectin and vitronectin receptor alpha-subunits and platelet glycoprotein IIb.
Biochemistry. 1987; 26: 8158-65.

Frelinger Al 3rd, Lam SC, Plow EF, Smith MA, Loftus JC, Ginsberg MH
Occupancy of an adhesive glycoprotein receptor modulates expression of an antigenic site involved in cell adhesion.
J Biol Chem. 1988; 263: 12397-402.

Frelinger AL 3rd, Du XP, Plow EF, Ginsberg MH
Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and function.
J Biol Chem. 1991; 266: 17106-11.

Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA
Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins.
Science. 1995; 270: 1500-2.

Fujimura K, Phillips DR
Calcium cation regulation of glycoprotein IIb/IIIa complex formation in platelet plasma membranes.
J Biol Chem. 1983; 258: 10247-52.

Gawaz, M
Das Blutplättchen.
Georg Thieme Verlag (1999).

George JN, Caen JP, Nurden AT
Glanzmann's thrombasthenia: The spectrum of clinical disease.
Blood. 1990; 75: 1383-1395.

Ghosh K, Kulkarni B, Nair S, Shetty S, Mohanty D
Human platelet alloantigen polymorphism in Glanzmann's thrombasthenia and its impact on the severity of the disease.
Br J Haematol. 2002; 119: 348-53.

Glanzmann WE
Hereditäre hämorrhägische Thrombasthenie. Ein Beitrag zur Pathologie der Blutplättchen.
Jahrbuch für Kinderheilkunde. 1918; 88: 113-141.

Goodman SL, Hölzemann G, Sulyok GA, Kessler H
Nanomolar small molecule inhibitors for alphav(beta)6, alphav(beta)5, and alphav(beta)3 integrins.
J Med Chem. 2002; 45: 1045-51.

Gottschalk KE, Adams PD, Brunger AT, Kessler H
Transmembrane signal transduction of the alpha(IIb)beta(3) integrin.
Protein Sci. 2002; 11: 1800-12.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R
Characteristics of human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.
J Gen Virol. 1977; 36: 59-74.

Grimaldi CM, Chen F, Wu C, Weiss HJ, Coller BS, French DL
Glycoprotein IIb Leu214Pro mutation produces glanzmann thrombasthenia with both quantitative and qualitative abnormalities in GPIIb/IIIa.
Blood. 1998; 91: 1562-71.

Hantgan RR, Paumi C, Rocco M, Weisel JW
Effects of ligand-mimetic peptides Arg-Gly-Asp-X (X = Phe, Trp, Ser) on alphaIIbbeta3 integrin conformation and oligomerization.
Biochemistry. 1999; 38: 14461-74

Harrison SC
Variation on an Src-like theme.
Cell. 2003; 112: 737-40.

Heim R, Tsien RY
Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer.
Curr Biol. 1996; 6: 178-82.

Hooper WC, Lally C, Austin H, Benson J, Dilley A, Wenger NK, Whitsett C, Rawlins P, Evatt BL
The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans.
Chest. 1999; 116: 880-6.

Hu K, Ji L, Applegate KT, Danuser G, Waterman-Storer CM
Differential transmission of actin motion within focal adhesions.
Science. 2007; 315: 111-5.

Huber W, Hurst J, Schlatter D, Barner R, Hübscher J, Kouns WC, Steiner B
Determination of kinetic constants for the interaction between the platelet glycoprotein IIb-IIIa and fibrinogen by means of surface plasmon resonance.
Eur J Biochem. 1995; 227: 647-56.

Hughes PE, Pfaff M
Integrin affinity modulation.
Trends Cell Biol. 1998; 8: 359-64.

Humphries MJ
Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction.
Curr Opin Cell Biol. 1996; 8: 632-640.

Humphries JD, Byron A, Humphries MJ
Integrin ligands at a glance.
J Cell Sci. 2006; 119: 3901-3.

Hynes RO
Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.
Cell. 1992; 69: 11-25.

Jennings LK, Phillips DR
Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex.
J Biol Chem. 1982; 257: 10458-66.

Karpova TS, Baumann CT, He L, Wu X, Grammer A, Lipsky P, Hager GL, McNally
Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser.
J Microsc. 2003; 209: 56-70.

Kasemo B, Gold J
Implant surfaces and interface processes.
Adv Dent Res. 1999; 13: 8-20.

Kim M, Carman CV, Springer TA
Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins.
Science. 2003; 301: 1720-5.

Kleinschnitz C, De Meyer SF, Schwarz T, Austinat M, Vanhoorelbeke K, Nieswandt B, Deckmyn H, Stoll G
Deficiency of von Willebrand factor protects mice from ischemic stroke.
Blood. 2009; 113: 3600-3.

Kunicki TJ, Pidard D, Rosa JP, Nurden AT
The formation of Ca++-dependent complexes of platelet membrane glycoprotein IIb and IIIa in solution as determined by crossed immunoelectophoresis.
Blood. 1981; 58: 268-278.

Laemmli UK
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature. 1970; 15: 680-5.

Larsson J, Hillarp A
The prothrombin gene G20210A mutation and the platelet glycoprotein IIIa polymorphism PlA2 in patients with central retinal vein occlusion.
Thromb Res. 1999; 96: 323-7.

Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Phillips DR
Outside-in integrin signal transduction. αIIbβ3-(GPIIb/IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation.
J Biol Chem. 1996; 271: 10811-5.

Lee SE, Kamm RD, Mofrad MR
Force-induced activation of talin and its possible role in focal adhesion mechanotransduction.
J Biomech. 2007; 40: 2096-106.

Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH
Integrin cytoplasmic domain-binding proteins.
J Cell Sci. 2000; 113: 3563-71.

Löffler G, Petrides P
Biochemie und Pathobiochemie.
Springer Verlag (1997).

Loftus JC, Plow EF, Frelinger AL 3rd, D'Souza SE, Dixon D, Lacy J, Sorge J, Ginsberg MH
Molecular cloning and chemical synthesis of a region of platelet glycoprotein IIb involved in adhesive function.
Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84: 7114-8.

Loncar R, Stoldt V, Hellmig S, Zotz RB, Mihalj M, Scharf RE
HPA-1 polymorphism of alphaIIbbeta3 modulates platelet adhesion onto immobilized fibrinogen in an in-vitro flow system.
Thromb J. 2007; 19: 5-2.

Lu C, Takagi J, Springer TA
Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state.
J Biol Chem. 2001; 276: 14642-8.

Ma YQ, Qin J, Wu C, Plow EF
Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins.
J Cell Biol. 2008; 181: 439-46.

McEver RP, Bennett EM, Martin MN
Identification of two structurally and functionally distinct sites on human platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa using monoclonal antibodies.
J Biol Chem. 1983; 258: 5269-75.

Meves A, Stremmel C, Gottschalk K, Fässler R
The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins.
Trends Cell Biol. 2009; 19: 504-13.

Mikkelsson J, Perola M, Laippala P, Savolainen V, Pajarinen J, Penttil A, Karhunen PJ
Glycoprotein IIIa Pl(A) polymorphism associates with progression of coronary artery disease and with myocardial infarction in an autopsy series of middle-aged men who died suddenly.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999; 19: 2573-8.

Mikkelsson J, Perola M, Laippala P, Penttilä A, Karhunen PJ
Glycoprotein IIIa Pl(A1/A2) polymorphism and sudden cardiac death.
J Am Coll Cardiol. 2000; 36: 1317-23.

Miller WH, Keenan RM, Willette RN, Lark MW
Identification and in vivo efficacy of small-molecule antagonists of integrin alphavbeta3 (the vitronectin receptor).
Drug Discov Today. 2000; 5: 397-408.

Montanez E, Ussar S, Schifferer M, Bösl M, Zent R, Moser M, Fässler R
Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins.
Genes Dev. 2008; 22: 1325-30.

Morel-Kopp MC, Kaplan C, Proulle V, Melchior C, Peyruchaud , Aurousseau MH, Kieffer N
A three amino acid deletion in glycoprotein IIIa is responsible for type I Glanzmann's thrombasthenia: importance of residues Ile 325 Pro 326 Gly 327 for β3-integrin subunit association.
Blood. 1997; 90: 669-77.

Morii N, Teru-uchi T, Tominaga T, Kumagai N, Kozaki S, Ushikubi F, Narumiya S
A rho gene product in human blood platelets. II. Effects of the ADP-ribosylation by botulinum C3 ADP-ribosyltransferase on platelet aggregation.
J Biol Chem. 1992; 15;267: 20921-6.

Moser M, Nieswandt B, Ussar S, Pozgajova M, Fässler R
Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation.
Nat Med. 2008; 14: 325-30.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986; 51: 263-73.

Nesbitt WS, Westein E, Tovar-Lopez FJ, Tolouei E, Mitchell A, Fu J, Carberry J, Fouras A, Jackson SP
A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation.
Nat Med. 2009; 15: 665-73.

Newman PJ, Derbes RS, Aster RH
The human platelet alloantigens, PlA1 and PlA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing.
J Clin Invest. 1989; 83: 1778-1781.

Newman PJ
Platelet GPIIb/IIIa: molecular variations and alloantigens.
Thromb Haemost 1991; 66: 111-118.

Nieswandt B, Moser M, Pleines I, Varga-Szabo D, Monkley S, Critchley D, Fässler R
Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo.
J Exp Med. 2007; 204: 3113-8.

Nurden AT, Caen JP
An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann's thrombasthenia.
Br J Haematol. 1974; 28: 253-60.

Obergfell A, Judd BA, del Pozo MA, Schwartz MA, Koretzky GA, Shattil SJ
The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin alphaIIbbeta3 to the actin cytoskeleton.
J Biol Chem. 2001; 276: 5916-23.

Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA, Shattil SJ
Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with [alpha]IIb[beta]3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton.
J Cell Biol. 2002; 157: 265-75.

O'Toole TE, Loftus JC, Plow EF, Glass AA, Harper JR, Ginsberg MH
Efficient surface expression of platelet GPIIb/IIIa requires both subunits.
Blood. 1989; 74: 14-8.

O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH
Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction.
J Cell Biol. 1994; 124: 1047-59.

Ozaki Y, Asazuma N, Suzuki-Inoue K, Berndt MC
Platelet GPIb-IX-V-dependent signaling.
J Thromb Haemost. 2005; 3: 1745-51.

Peter K, Bode C
A deletion in the alpha subunit locks platelet integrin alpha IIb beta 3 into a high affinity state.
Blood Coagul Fibrinolysis. 1996; 7: 233-6.

Petrich BG, Marchese P, Ruggeri ZM, Spiess S, Weichert RA, Ye F, Tiedt R, Skoda RC, Monkley SJ, Critchley DR, Ginsberg MH
Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis.
J Exp Med. 2007; 204: 3103-11.

Phillips DR, Baughan AK
Fibrinogen binding to human platelet plasma membranes. Identification of two steps requiring divalent cations.
J Biol Chem. 1983; 258: 10240-10246.

Phillips DR, Fitzgerald LA, Charo IF, Parise LV
The platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex, Structure, function, and relationship to adhesive protein receptors in nucleated cells.
Ann N Y Acad Sci. 1987; 509: 177-87.

Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM
GPIIb/IIIa: the responsive integrin.
Cell. 1991; 65: 359-62.

Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW
Ligand binding to integrins.
J Biol Chem. 2000; 275: 21785-8.

Pollok BA, Heim R
Using GFP in FRET-based applications.
Trends Cell Biol. 1999; 9: 57-60.

Poncz M, Eisman R, Heidenreich R, Silver SM, Vilaire G, Surrey S, Schwartz E, Bennett JS
Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors.
J Biol Chem. 1987; 262: 8476-82.

Puleo DA, Nanci A
Understanding and controlling the bone-implant interface.
Biomaterials. 1999; 20: 2311-21.

Quinn MJ, Byzova TV, Qin J, Topol EJ, Plow EF
Integrin alphaIIbbeta3 and its antagonism.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003; 23: 945-52.

Renner W, Winkler M, Hoffmann C, Köppel H, Seinost G, Brodmann M, Pilger E
The PlA1/A2 polymorphism of platelet gp IIIa is not associated with deep venous thrombosis.
Int Angiol. 2001; 20: 148-51.

Rezania A, Healy KE
Integrin subunits responsible for adhesion of human osteoblast-like cells to biomimetic peptide surfaces.
J Orthop Res. 1999; 17: 615-23.

Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K
PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis.
Lancet. 1997; 349: 385-8.

Ruggeri ZM, Mendolicchio GL
Adhesion mechanisms in platelet function.
Circ Res. 2007; 100: 1673-85.

Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM
Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb/IIIa (integrin-αIIbβ3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor.
J Biol Chem. 1992; 267: 11300-6.

Shattil SJ
Function and regulation of the beta 3 integrins in hemostasis and vascular biology.
Thromb Haemost. 1995; 74: 149-55.

Shattil SJ, Newman PJ
Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets.
Blood. 2004; 104: 1606-15.

Siess, W
Molecular mechanisms of platelet activation.
Physiol Rev. 1989; 69: 58-178.

Sosnoski DM, Emanuel BS, Hawkins AL, van Tuinen P, Ledbetter DH, Nussbaum RL, Kaos FT, Schwartz E, Phillips D, Bennett JS
Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors alpha subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa.
J Clin Invest. 1988; 81: 1993-8.

Stoll G, Kleinschnitz C, Nieswandt B
Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment.
Blood. 2008; 112: 3555-62.

Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood DA
Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation.
Science. 2003; 302: 103-6.

Takagi J, Erickson HP, Springer TA
C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin alpha5beta1.
Nat Struct Biol. 2001; 8: 412-6.

Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA
Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling.
Cell. 2002; 110: 599-11.

Topol EJ, Byzova TV, Plow EF
Platelet GPIIb-IIIa blockers.
Lancet. 1999; 353: 227-231.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc Natl Acad Sci USA. 1979; 76: 4350-4.

Tozer EC, Hughes PE, Loftus JC
Ligand binding and affinity modulation of integrins.
Biochem Cell Biol. 1996; 74: 785-98.

Tzima E, del Pozo MA, Shattil SJ, Chien S, Schwartz MA
Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment.
EMBO J. 2001; 20: 4639-47.

van der Flier A, Sonnenberg A.
Function and interactions of integrins.
Cell Tissue Res. 2001; 305: 285-98.

Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B
Cell adhesion mechanisms in platelets.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 ; 28: 403-12.

Vielreicher M, Harms G, Butt E, Walter U, Obergfell A
Dynamic interaction between Src and C-terminal Src kinase in integrin alphaIIbbeta3-mediated signaling to the cytoskeleton.
J Biol Chem. 2007; 282: 33623-31.

Vijayan KV, Goldschmidt-Clermont PJ, Roos C, Bray PF
The Pl(A2) polymorphism of integrin beta 3 enhances outside-in signaling and adhesive functions.
J Clin Invest. 2000; 105: 793-802.

Vijayan KV, Huang TC, Liu Y, Bernardo A, Dong JF, Goldschmidt-Clermont PJ, Alevriadou BR, Bray PF
Shear stress augments the enhanced adhesive phenotype of cells expressing the Pro33 isoform of integrin beta3.
FEBS Lett. 2003; 540: 41-6.

Vijayan KV, Bray PF
Molecular mechanisms of prothrombotic risk due to genetic variations in platelet genes: Enhanced outside-in signaling through the Pro33 variant of integrin beta3. Exp Biol Med. 2006; 231: 505-13.

von dem Borne AE, Décary F
Nomenclature of platelet-specific antigens.
Transfusion. 1990; 30: 477.

Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Coller BS, Jordan RE
Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets.
Blood. 1996; 88: 907-14.

Wallrabe H, Periasamy A
Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy
Curr Opin Biotechnol. 2005; 16: 19-27.

Wegener KL, Partridge AW, Han J, Pickford AR, Liddington R, Ginsberg MH, Campbell ID
Structural basis of integrin activation by talin.
Cell. 2007; 128: 171-82.

Wegener KL, Campbell ID
Transmembrane and cytoplasmic domains in integrin activation and protein-protein interactions.
Mol Membr Biol. 2008; 25: 376-87.

Weiss EJ, Goldschmidt-Clermont PJ, Grigoryev D, Jin Y, Kickler TS, Bray PF
A monoclonal antibody (SZ21) specific for platelet GPIIIa distinguishes P1A1 from P1A2.
Tissue Antigens. 1995; 46: 374-81.

Weller T, Alig L, Beresini M, Blackburn B, Bunting S, Hadváry P, Müller MH, Knopp D, Levet-Trafit B, Lipari MT, Modi NB, Müller M, Refino CJ, Schmitt M, Schönholzer P, Weiss S, Steiner B
Orally active fibrinogen receptor antagonists. 2. Amidoximes as prodrugs of amidines.
J Med Chem. 1996; 39: 3139-47.

Wencel-Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, Woods VL, Keller DM, Ginsberg MH
Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses.
Am J Pathol. 1986; 124: 324-34.

Woods VL Jr, Wolff LE, Keller DM
Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins.
J Biol Chem. 1986; 261: 15242-51.

Xiao T, Takagi J, Coller BS, Wang JH, Springer TA
Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics.
Nature. 2004; 432: 59-67.

Yee DL, Bray PF
Clinical and functional consequences of platelet membrane glycoprotein polymorphisms.
Semin Thromb Hemost. 2004; 30: 591-600.

Zotz RB, Winkelmann BR, Nauck M, Giers G, Maruhn-Debowski B, März W, Scharf RE
Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: human platelet antigen 1b (HPA-1b/PlA2) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease.
Thromb Haemost. 1998; 79: 731-5.

Zotz RB, Klein M, Dauben HP, Moser C, Gams E, Scharf RE
Prospective analysis after coronary-artery bypass grafting: platelet GP IIIa polymorphism (HPA-1b/PIA2) is a risk factor for bypass occlusion, myocardial infarction, and death.
Thromb Haemost. 2000; 83: 404-7.

Zotz RB, Winkelmann BR, Müller C, Boehm BO, März W, Scharf RE
Association of polymorphisms of platelet membrane integrins alpha IIb(beta)3 (HPA-1b/Pl) and alpha2(beta)1 (alpha807TT) with premature myocardial infarction.
J Thromb Haemost. 2005; 3: 1522-9.

Zutter MM, Fong AM, Krigman HR, Santoro SA
Differential regulation of the α2β1 and αIIbβ3-integrin genes during megakaryocytic differentiation of pluripotent K562 cells.
J Biol Chem. 1992; 267: 20233-20238.

Anhang

Auswertung zur 2.7.4 FRET-Analysen am Mikroskop

1. ImageJ starten.
2. Plugins→Macros→Install→convertimagetostack→
3. Plugins→Macros→converimagetostack→Choose a Directory→Ordner wählen
4. File prefix: „ „→OK→#Stacks: „7“→OK→#Slices per Stack: „20“→OK→First frame:“Dateiname“
5. Programm fügt Slices zu Stack und berechnet diese.
6. File→open→Stack→Stack 1 auswählen→Image→Color→Split Channels
7. Zellen auswählen:
   Analyze→Tools→ROI Manager→Zelle markieren→ROI Manager add
8. Kanäle auswählen:
   Kanal green (CFP-fluoreszenz) auswerten: Plugins→Stacks→MeasureStack→
   Daten in Exel-Tabelle kopieren.
   Kanal red (YFP-fluoreszenz) auswerten: Plugins→Stacks→MeasureStack→
   Daten in Exel-Tabelle kopieren.

Macro: converimagetostack (erstellt in Zusammenarbeit mit Dalli Deniz; Informatik Master Studiengang)

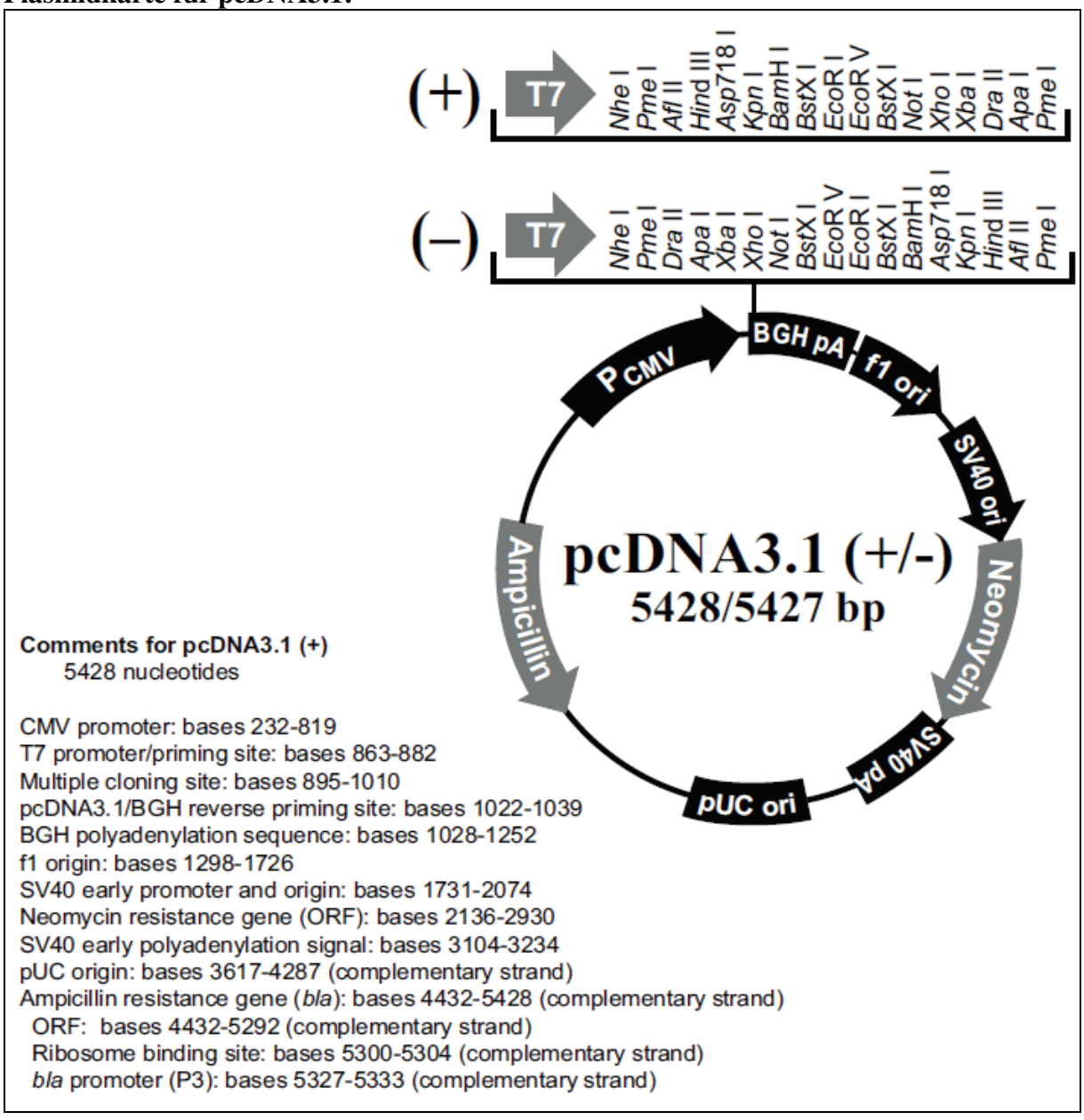
```
// "ConvertImageToStack"
//
// Opens a sample of laser images
// creates a stack
// split channels
// Measures intensity of red and green channel


// parameters (images/stack,file params)
  path = getDirectory("Choose a Directory");
  prefix = getString("File prefix", "default");
  stacks = getNumber("# Stacks:",0);
  slices = getNumber("# Slices per stack:",0);
  start  = getNumber("First frame:",0);

  File.makeDirectory(path+"/stacks")

// setup "globals"
  size = stacks * slices;
  mean_red   = newArray(size);
  area_red   = newArray(size);
  mean_green = newArray(size);
  area_green = newArray(size);

  for (j=0; j < stacks;j++) {

    for (i=start + (j*slices); i < (start + ((j+1)*slices)) ; i++) {
          open(path+"/"+ prefix + i + ".png");
    }

    // transforms open images to stack
    run("Images to Stack");
    // save stack
```

```
    save(path+"/stacks/stack"+(j+1)+".tif");
    run("Split Channels");

    // close unused channel
    selectWindow("stack"+(j+1)+".tif (blue)");
    close();

    // measure red channel
    selectWindow("stack"+(j+1)+".tif (red)");
    //run("Measure Stack");

    for (n = 1; n <= nSlices; n++) {
     setSlice(n);
     List.setMeasurements;
     area_red[(j*slices) + n-1] = List.getValue("Area");
     mean_red[(j*slices) + n-1] = List.getValue("Mean");
    }
     close();


    // measure green channel
    selectWindow("stack"+(j+1)+".tif (green)");
    for (n = 1; n <= nSlices; n++) {
      setSlice(n);
      List.setMeasurements;
      area_green[(j*slices) + n-1] = List.getValue("Area");
      mean_green[(j*slices) + n-1] = List.getValue("Mean");
    }
    close();
  }


  // write measurements to file

  f = File.open(path+"stacks/Measurement.csv"); // display file open dialog
  print(f,"Measurement|Red channel - Area/Size[px]|Red Channel intensity (0-255)|Green channel -
Area/Size[px]|Green Channel  intensity (0-255)");
  for (i=0; i<stacks; i++) {
    for (j=0; j<slices; j++) {
      n = slices * i + j;
      print(f,(i+1) + "-" + (j+1) +"|" + area_red[n] + "|" + mean_red[n] + "|" + area_green[n] + "|" +
mean_green[n]);
    }
  }

  File.close(f)
```

Auswertung zur 2.7.2 Basale FRET-Effizienz über Akzeptor-Bleaching

1. ImageJ starten.
2. File→Open→Image vor dem Bleaching auswählen.
3. Image→Color→Split Channels
4. Zellen auswählen:
   Analyze→Tools→ROI Manager→Zelle markieren→ROI Manager add
5. Kanäle auswählen:
   Kanal green (CFP-fluoreszenz) auswerten: Analyze→Measure→Daten in Exel-Tabelle kopieren.
   Kanal red (YFP-fluoreszenz) auswerten: Analyze→Measure→Daten in Exel-Tabelle kopieren.
6. File→Open→Image nach dem Bleaching auswählen.
7. Image→Clolor→Split Channels
8. Zellen auswählen:
   Analyze→Tools→ROI Manager→Zelle markieren→ROI Manager add
9. Kanäle auswählen:
   Kanal green (CFP-fluoreszenz) auswerten: Analyze→Measure→Daten in Exel-Tabelle kopieren.
   Kanal red (YFP-fluoreszenz) auswerten: Analyze→Measure→Daten in Exel-Tabelle kopieren.

Plasmidkarte für pcDNA3.1:



Comments for pcDNA3.1 (+)
5428 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819
T7 promoter/priming site: bases 863-882
Multiple cloning site: bases 895-1010
pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039
BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252
f1 origin: bases 1298-1726
SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074
Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930
SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234
pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)
Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)
ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)
Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)
bla promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)