

Aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf

**Validierung eines Flusskammer-Systems
zur Messung der Plättchenadhäsion an
thrombogenen Oberflächen
in Abhängigkeit variabler Scherkräfte**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von
Tobias Willy Niesen

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referent:

Univ.-Prof. Dr. Scharf

Korreferent:

Prof. Dr. Gödecke

Für
Carolina und Rebecca

1	Einleitung	4
1.1	Der Thrombozyt	4
1.2	Adhäsion, Aktivierung und Aggregation	6
1.3	Fibrinogen	7
1.4	Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	9
1.4.1	HPA-1: Polymorphe Varianten des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	10
1.5	Ziel der Arbeit	11
1.5.1	Vorarbeiten	11
1.5.2	Hauptarbeit	12
2	Materialien	14
2.1	Reagenzien	14
2.2	Verwendete Geräte	15
2.3	Einwegmaterialien	16
3	Methoden	17
3.1	Blutproben	17
3.1.1	PPACK	17
3.1.2	Gewinnung und Vorbereitung der Vollblutproben	17
3.1.3	Blutanalysen	18
3.1.4	Präparation von Thrombozyten aus „buffy coat“ -Präparaten	18
3.2	PBS- Ca^{2+} -BSA Spülpufferansatz	19
3.3	Beschichtung der Deckgläser mit Adhäsivproteinen	19
3.4	Endothelzellen und extrazelluläre Matrix als Deckglasbeschichtung	20
3.4.1	Zellkultur von HUVECs	21
3.4.2	Entwicklung einer zell- und mediumsparenden Methode zur Beschichtung von Deckgläsern mit Endothelzellen	21
3.4.3	Entwicklung einer Methode zur Erzeugung einer kontrollierten Zellläsion auf mit Endothelzellen beschichteten Deckgläsern	23
3.4.4	Gewinnung extrazellulärer Matrix	24
3.5	Fluoreszenzmarkierung der Plättchen	25
3.5.1	Mepacrin	25
3.5.2	Färbung der Plättchen mit Mepacrin und CMFDA	26

3.5.3	Färbung der Zellen mit Propidiumiodid	26
3.6	Funktionsanalyse fluoreszenzmarkierter Thrombozyten	27
3.7	Proteinauftrennung mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	27
3.8	Laserscanmikroskop, Einstellungen und Bildakquisition	28
3.9	Strömungskammer und Versuchsablauf	29
3.9.1	Zusammensetzung der Strömungskammer	29
3.9.2	Fokussierung	30
3.9.3	Versuchsablauf mit proteinbeschichteten Deckgläsern	30
3.9.4	Strömungsversuche mit isolierten fluoreszenzmarkierten Thrombozyten über Endothelzellen mit künstlich erzeugtem Defekt	32
3.10	Imaging und Bildauswertung	32
3.10.1	Software (ImageJ)	32
3.10.2	Bildverarbeitung	33
3.11	Statistische Auswertung	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Ermittlung der optimalen Plättchenmarkierung	35
4.2	Mikroskopische Differenzierung fluoreszenzmarkierter Plättchen	37
4.3	Gerätebedingte Einflussgrößen bei der Bildakquisition und Bildauswertung	39
4.3.1	Einfluss der Laserscanning-Mikroskopie und der Fokusebene	39
4.3.2	Vergrößerung	41
4.3.3	Bildstapel und Bewegungserfassung	42
4.3.4	Strömungsgeschwindigkeit und Scherrate	43
4.3.5	Gesamtfluoreszenz als Maßeinheit für Plättchenadhäsion	44
4.4	Fibrinogen	45
4.4.1	Ergebnisse der Strömungsexperimente	45
4.4.2	Bedeutung der Dodeka- und RGD-Peptidsequenzen in der Plättchenadhäsion	49
4.4.3	Homologe Fibrinogenvarianten von Humanfibrinogen und Rinderfibrinogen	55
4.4.4	Der Integrinpolymorphismus HPA-1	61
4.4.5	Extrazelluläre Matrixproteine	62
4.5	Kollagen	63
4.6	Adhäsion im Bereich einer Endothelläsion	64
5	Diskussion	66

5.1	Das Blutflussmodell	66
5.2	Bildgebung, Bildverarbeitung und Bildauswertung	69
5.3	Kritische Einflußgrößen	70
5.3.1	Fokusebene	70
5.3.2	Scherrate	70
5.3.3	Auswertung der Versuchsergebnisse	71
5.4	Phänomenologie der thrombozytären Integrine und ihrer Liganden im Flussmodell	71
5.4.1	Fibrinogen als Ligand für $\alpha\text{IIb}\beta_3$	72
5.4.2	Vergleich zwischen bovinem und humanem Fibrinogen	75
5.4.3	HPA-1 und Plättchenadhäsion	76
5.5	Kollagen als Ligand für $\alpha_2\beta_1$	78
5.6	Extrazelluläre Matrix und Endothelschaden	79
5.7	Fazit	80
5.8	Aussichten	80
5.9	Vergleiche mit bereits publizierter Literatur	81
6	Zusammenfassung	82
7	Abkürzungsverzeichnis	84
8	Abbildungsverzeichnis	85
9	Tabellenverzeichnis	86
10	Literatur	87

1 Einleitung

1.1 Der Thrombozyt

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind Zytoplasmafragmente ihrer Vorläuferzellen im blutbildenden Knochenmark, der Megakaryozyten. Die Lebensdauer zirkulierender Thrombozyten im peripheren Blut beträgt etwa 7-9 Tage. Plättchen weisen im ruhenden, nicht aktivierten Zustand eine diskoide Form mit einem Durchmesser von ca. 2–4 μm auf. Die Oberfläche eines einzelnen Plättchens beträgt ca. 8 μm^2 (Abb1.1).

Morphologisch kann man Thrombozyten in vier Zonen, die periphere Zone, die strukturelle Zone, die Zone der Organellen und die Membransysteme, aufteilen. Die periphere Zone wird von der Zytoplasmamembran mit der Glykokalix und den in der Plasmamembran verankerten funktionellen Proteinen gebildet. Hierzu zählen vor allem die Glycoproteinrezeptoren auf der Plättchenoberfläche. Die strukturelle Zone besteht aus submembranös gelegenen Mikrotubuli, Aktin- und Myosinfilamenten. Diese strukturgebenden Filamente gewährleisten die Aufrechterhaltung der diskoiden Form und sind am raschen Gestaltwandel der Thrombozyten bei der Aktivierung beteiligt („rapid shape change“) [1].

Die Zone der Organellen befindet sich im Zytoplasma und besteht aus Mitochondrien, Glycogenspeichern und drei verschiedenen Typen von Granula, dichten Granula, α -Granula und Lysosomen [1].

Die elektronendichte Granula („dense bodies“) enthält unter anderem ATP, ADP und Ca^{2+} . Die α -Granula ist Speicherort von Enzymen, adhäsiven Proteinen, Wachstumsfaktoren, zytokinähnlichen Proteinen und bestimmten Gerinnungsfaktoren. Die Lysosomen enthalten verschiedene mehrfachzucker-, kollagen- und elastinspaltende Enzyme. Die Membransysteme bilden die vierte Zone. Das „surface-connected canalicular system“ stellt

ein Membransystem dar, das eine Oberflächenvergrößerung durch weit in das Plättcheninnere reichende, gewundene Kanäle bedingt. Es ist über Poren mit dem Extrazellularraum verbunden. Das innere Membransystem ist Speicherort für Ca^{2+} -Ionen. Kommt es bei Ausschüttung dieser Speicher in das Zytoplasma zur Überschreitung einer bestimmten Schwelle an freien Ca^{2+} -Ionen, resultiert eine Aktivierung des Thrombozyten [1]. Thrombozyten sind nur beschränkt zur Proteinsynthese befähigt. Sie besitzen Mitochondrien, Ribosomen und residuelle mRNA aus dem Pool des Megakaryozyten, dem sie entstammen. Resynthese irreversibel gehemmter oder inaktivierter thrombozytärer Proteine ist daher nicht oder allenfalls beschränkt möglich.

Funktionsbeeinträchtigte und überalterte Plättchen binden an ihrer Oberfläche spezielle IgG-Autoantikörper, werden deshalb von Monozyten erkannt, phagozytiert und abgebaut [2]. Dies geschieht im retikuloendothelialen System von Leber und Milz [1].

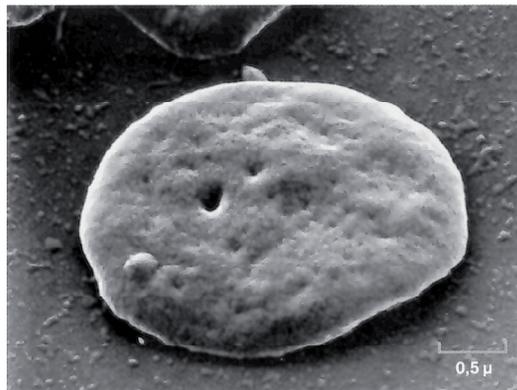


Abbildung 1.1: Ruhender Thrombozyt (REM). Die glatte Oberfläche des Thrombozyten wird durch hier dunkle Poren unterbrochen, die zum internen Kanalsystem des Thrombozyten gehören [3].

1.2 Adhäsion, Aktivierung und Aggregation

Auf der Oberfläche der Plättchen befinden sich unter anderem Rezeptoren für Kollagen, Fibrinogen und von-Willebrand-Faktor. Ein Ligand-Rezeptor-Kontakt z.B. bei einem Endotheldefekt mit freigelegter subendothelialer Matrix, die unter anderem Kollagen, immobilisiertes Fibrinogen und von-Willebrand-Faktor enthält, vermittelt innerhalb von Millisekunden eine primäre Adhäsion des Plättchens. Zugleich kommt es zu einem nach innen gerichteten rezeptorspezifischen Aktivierungssignal („outside-in-signaling“).

Dieses Aktivierungssignal führt zur Formveränderung („shape change“) des Plättchens. Der Formwandel resultiert insbesondere aus der Polymerisierung von G-Aktin (globuläre Form) zu F-Aktin (Filamentform), welche mit membranständigen strukturbildenden Proteinen zur Pseudopodienbildung führt. Die Bildung von Pseudopodien vergrößert die Oberfläche des nunmehr aktivierten Thrombozyten bis auf etwa das Doppelte seines Ruhezustands.

Das Outside-in-Signal führt außerdem zur Konformationsänderung des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, eines Rezeptorkomplexes, der nun hochaffine Bindungseigenschaften gegenüber löslichem Fibrinogen („high affinity binding sites“) erlangt. Diese Konformationsänderung ist Voraussetzung für die Plättchenaggregation. Schreitet die Thrombozytenaktivierung fort, kommt es zur Exozytose und damit zur Sekretion der α -Granula und der dichten Granula (Degranulation). Die Sekretion aggregationsfördernder Inhaltsstoffe aus den Speichergranula (z.B. ADP, aber auch Fibrinogen und von-Willebrand-Faktor) führt zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Plättchen aus der Zirkulation. Die aktivierten $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Rezeptorkomplexe können über Fibrinogenbrücken aktivierte Plättchen miteinander verbinden. Dies führt zu Thrombozytenaggregaten, die den Endotheldefekt primär verschließen. Die zugleich einsetzende Thrombinbildung auf der Oberfläche aktivierter Plättchen fördert die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin und stabilisiert den sich bildenden Plättchenpfropf bzw. führt zu einem Plättchen-Fibrin-Thrombus [4, 5].

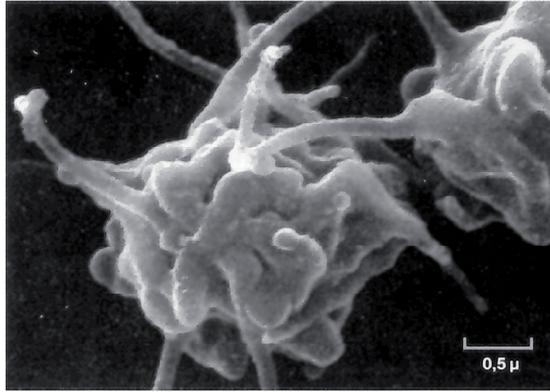


Abbildung 1.2: Aktivierter Thrombozyt (REM). Der aktivierte Thrombozyt vergrößert seine Oberfläche durch Ausbildung von Pseudopodien. Die gleichzeitig stattfindende Sekretion von Granula erhöht sowohl die Dichte der adhäsions- und aggregationsfördernden Proteine auf der Oberfläche als auch die Konzentration hämostasefördernder Stoffe in der Umgebung des Thrombozyten. Durch die Ausbildung von Pseudopodien wird ein intensiver Kontakt zwischen einzelnen aktivierten Thrombozyten ermöglicht [6].

1.3 Fibrinogen

Fibrinogen wird in Leberparenchymzellen [7] schrittweise aus Heterodimer und -trimer-Vorstufen der α , β und γ -Ketten synthetisiert und als kompletter über 29 intra- und inter-Ketten-Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer (α - β - γ - β - α) sezerniert. In Zellkultur gebrachte Leberkarzinomzellen vom Typ Hep-G2 [8] sezernieren unter anderem neben intaktem Fibrinogen auch α - β - γ -Trimere, α - γ -Dimere und einzelne α -Ketten und γ -Ketten. β - γ -Dimere oder β -Ketten werden nicht sezerniert [9].

Die quartäre Struktur des Fibrinogens hat elektronenmikroskopisch eine trinoduläre Form [10]. Im Zentrum befindet sich die E-Domäne und an den Seiten die D-Domäne. An den Enden der D-Domänen liegen die Erkennungssequenzen (Bindungsdomänen) für aktiviertes Integrin α IIb β 3: das carboxyterminale Ende der γ -Kette (Dodekapeptidsequenz HHLGGAKQAGDV kurz: KQAGDV) und die in der α -Kette liegenden zwei RGD-Sequenzen.

Die RGD bindende Domäne des thrombozytären Fibrinogen-Rezeptors befindet sich auf dem α IIb-Untereinheit (AS 109-171 und 211-222) [11, 12]. Die Bindungsstelle der Dodekasequenz der γ -Kette befindet sich auf der β 3-Untereinheit (AS 296-306) des Rezeptors [13,14]. Sowohl RGD-enthaltende Peptide als auch das γ -Dodekapeptid können die Aggregation und die Bindung von α IIb β 3 an Fibrinogen inhibieren. Mutiertes Fibrinogen mit einer RGE Sequenz, anstelle zweier RGD Sequenzen ist inaktiv [15, 16, 17, 18]. In welchem relativen Verhältnis jedoch die beiden RGD Sequenzen (Position α 95-97 und α 572-574) der α -Kette und das Dodekapeptid (Position γ 400-411) der γ -Kette die Bindungsfähigkeit an α IIb β 3 beeinflussen, ist unklar. Es wurde ein Modell entworfen, in dem alle drei Bindungsstellen mit mehreren α IIb β 3-Integrin Molekülen gleichzeitig interagieren [19].

Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass die RGD Sequenz an der Position α 572-574 nur einen geringen Einfluß bei der Plättchenadhäsion an Fibrinogen spielt. Das plasmininduzierte Fibrinogen-Fragment X (γ -Kette), das keine RGD Sequenz enthält, kann jedoch an Plättchen binden und ihre Aggregation vermitteln [20, 21].

Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass keine der beiden RGD Sequenzen für die Bindung der Plättchen an Fibrinogen notwendig ist [22], weil spezifische monoklonale Antikörper gegen die RGD Sequenz eine Adhäsion nicht vollständig hemmen. Aggregationsversuche mit aufgereinigten α , β und γ -Ketten zeigen, dass sowohl die α - als auch die γ -Kette die Aggregation unterstützen, wobei α -Ketten nur etwa 20-25% so effektiv waren wie die γ -Kette [23]. Die β -Kette besitzt keine receptorspezifischen Domänen oder Sequenzen. Die Bedeutung der RGD-Sequenz im Vergleich mit der Dodekapeptid-Sequenz der γ -Kette in intaktem Fibrinogen ist noch nicht vollständig geklärt .

Aufgrund des symmetrischen Molekülaufbaus kann ein Fibrinogenmolekül zwei Thrombozyten über Ligation des Fibrinogenrezeptors verbinden. Diese Bindung ist zunächst für die Dauer von etwa 30 Minuten reversibel. Da sich im intakten Fibrinogenmolekül vier potentielle Bindungsstellen für Integrin α IIb β 3 befinden, kann theoretisch ein Molekül Fibrinogen mit vier Integrin α IIb β 3-Rezeptormolekülen gleichzeitig eine Bindung eingehen. (Abb. 1.3) [1].

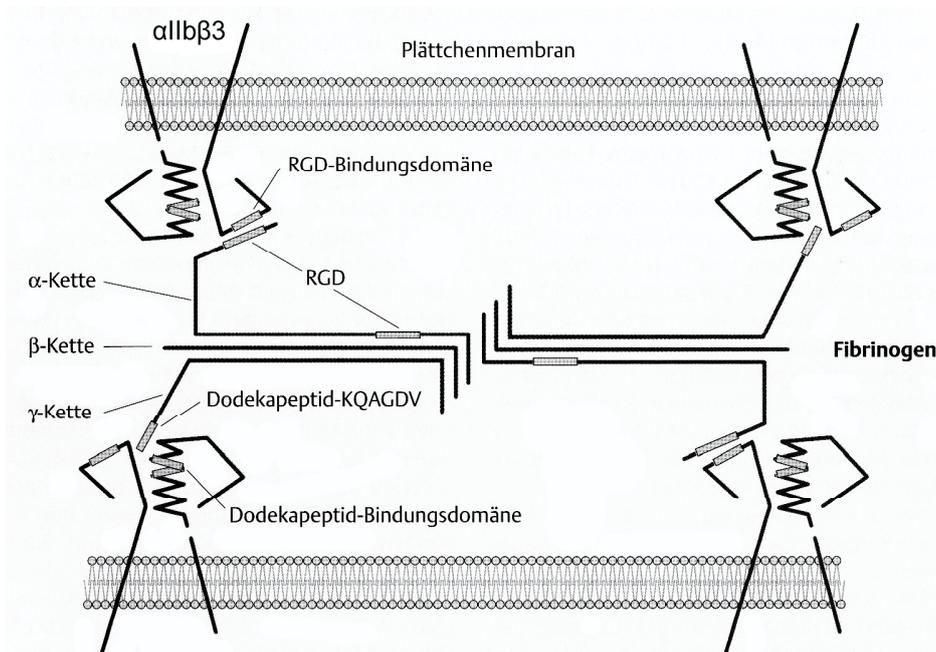


Abbildung 1.3: Aggregation – Fibrinogenbrücke zwischen zwei Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Molekülen. Die Abbildung zeigt die theoretische Möglichkeit, dass ein Fibrinogenmolekül zwei Thrombozyten mit insgesamt vier Rezeptoren verbindet. Möglich ist dies durch zwei verschiedene Bindungsstellen: RGD und Dodekapeptid-KQAGDV (Einzelheiten siehe Text) [1].

1.4 Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

Das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ist ein spezifischer Zytomembran-durchspannender Rezeptor der maßgeblich Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor und Fibronectin bindet. Er ist ein Heterodimer, gebildet aus einer α - und einer β -Untereinheit. In seiner Ruheform auf zirkulierenden Plättchen besitzt das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ gegenüber Fibrinogen im Plasma nur eine geringe Affinität („low affining binding sites“).

Das Heterodimer trägt an der nach außen gewandten Seite (N-Terminus) die RGD und KQAGDV spezifischen Erkennungssequenzen. Diese erlangen jedoch erst nach einer Konformationsänderung in Folge der Thrombozytenaktivierung ihre hochaffinen Bindungseigenschaften.

Über die RGD-affine Domäne der α -Untereinheit kann der Rezeptor neben Fibrinogen auch an den von-Willebrand-Faktor und Fibronectin [1] binden. Diese finden sich in immobilisierter Form in der subendothelialen extrazellulären Matrix. Bindung an diese Matrixproteine löst ebenfalls eine Thrombozytenaktivierung aus [1].

1.4.1 HPA-1: Polymorphe Varianten des Integrins α IIb β 3

Die Leucin 33 Prolin Substitution des HPA-1 Polymorphismus wurde zuerst in Zusammenhang mit alloimmunen Thrombozytopenien [24] beschrieben. Newman et al. identifizierten die genetische Grundlage des Polymorphismus, welche durch eine Leucin-Prolin-Substitution an Position 33 der β 3-Untereinheit bedingt ist und zu einer veränderten Antigenität führt [25]. Der Polymorphismus war auch der erste, der in Zusammenhang mit dem Myokardinfarkt gebracht wurde und Ausgangspunkt für eine Reihe epidemiologischer genetischer Studien war. 1996 berichteten Weiss et al. [26] das erste Mal, dass die Genhäufigkeit für das HPA-1b Allel des Integrins α IIb β 3 signifikant häufiger bei jungen Patienten mit Myokardinfarkt und KHK im Vergleich mit altersbezogenen Kontrollen vorkommt, die zwar eine KHK hatten, aber HPA-1b negativ waren. Metaanalysen einiger Studien führten zu dem Schluß, dass die Prolin33-Variante des α IIb β 3 das Herzinfarkttrisiko (jedoch nicht das Schlaganfallrisiko) insbesondere bei jüngeren Patienten erhöht [38, 39].

In vivo Studien zur Plättchenfunktion berichteten bei HPA-1b positiven Probanden über eine kürzere Blutungszeit sowie verstärkte Thrombingenerierung als bei HPA-1b negativen Probanden [27, 28, 29]. Die größte Studie in diesem Zusammenhang war die Framingham Offspring Study [30]. Die Studie konnte zeigen, dass HPA-1b positive Plättchen signifikant weniger Adrenalin zur Aktivierung benötigen als HPA-1b negative Plättchen. Ein ähnlicher Trend fand sich bei der Stimulierung mit Adenosindiphosphat (ADP). Es fand sich eine verstärkte Degranulierung als Antwort auf eine Stimulation mit ADP oder Thrombin bei Prolin33-positiven Plättchen [27, 31].

Andere Studien kamen vermutlich wegen abweichendem Design oder abweichendem Probandenrecruitment zu unterschiedlichen, teils widersprüchlichen Ergebnissen [32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41]. Die derzeitige Datenlage lässt jedoch die Aussage zu, dass der HPA-1b-Genotyp zu einer Zunahme von Adhäsion, Plättchenaggregation und Sekretion prothrombotischer Substanzen aus dem Plättchen und damit zu einer Zunahme der Plättchenthromogenität führt.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Etablierung eines Strömungskammersystems zur Untersuchung des Verhaltens von Blutplättchen an thrombogenen Oberflächen.

Um die Interaktionen immobilisierter Matrixproteine mit den thrombozytären Oberflächenrezeptoren experimentell zu untersuchen, musste das Verhalten der Plättchen möglichst im fließenden Blut beobachtet werden. Da Fibrinogen für die Vernetzung von Plättchen bei der primären Hämostase essentiell ist, war es ein idealer Kandidat für experimentelle Untersuchungen in einem derartigen Strömungsmodell, das physiologische und pathologische rheologische Bedingungen simuliert. Zusätzlich bestand die Möglichkeit, Varianten des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta_3$ in Hinblick auf die fibrinogenvermittelte Adhäsion zu untersuchen.

1.5.1 Vorarbeiten

Um Plättchen mit dem konfokalen Fluoreszenz-Laserscanningmikroskop in Vollblut und adhärent auf thrombogenen Oberflächen visualisieren zu können, sollte eine Methode standardisiert werden, die die Plättchen ohne Einfluß auf ihre physiologische Funktion intern markiert. Dazu sollten verschiedene Farbstoffe in auf Ihre Eigenschaften und ihren Einfluß auf die Plättchenaggregation phänomenologisch untersucht werden.

Anschließend sollten die gerätebedingten Einflußgrößen identifiziert werden. Dazu gehörten vor allem die Fokusfindung bei kontrastarmen biogenen Beschichtungen (Fibrinogen, BSA, Kollagen, Extrazelluläre Matrix) und die Bestimmung des optimalen Vergrößerungsfaktors des Mikroskops.

Das Strömungsmodell sollte so modifiziert werden, dass je nach gewünschter Strömungsgeschwindigkeit reproduzierbare Scherkräfte auftraten.

Zur Beschreibung der Plättchenadhäsion sollte die „Gesamtfluoreszenz“ des gewählten Untersuchungsbereichs innerhalb der Strömungskammer als methodenspezifische Maßeinheit für Plättchenadhäsion quantifiziert werden. Dazu gehörte auch die Optimierung der rechnergestützten Bildauswertung (u.a. bewegte versus statische Fluoreszenz).

Zusätzlich sollten die Möglichkeit der Simulation von in vivo-näheren Strömungssituationen, wie zum Beispiel der Plättchenadhäsion an einer Endothelläsion oder an extrazellulären Matrices an auf Glasoberflächen gezüchteten Endothelien geprüft werden.

1.5.2 Hauptarbeit

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines In-vitro-Modellsystems mit dem physiologische und pathologische Strömungsverhältnisse simuliert werden können. Die Plättchenadhäsion an thrombogenen Oberflächen sollte visualisiert und quantifiziert werden. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit die Plättchenadhäsion an Fibrinogen als thrombogener Substanz untersucht.

Im Einzelnen sollte die Spezifität der fibrinogenvermittelten Plättchenadhäsion, der Einfluß der Scherkraft und der Einfluß der Konzentration adhäsiver Proteine bei der Deckglasbeschichtung geprüft werden. Nach der Etablierung eines stabilen Strömungsmodells (d.h. nachdem die Methode validiert worden war), sollte der Einfluß des Fibrinogens an sich im Vergleich von humanem Fibrinogen unterschiedlicher Hersteller und im Vergleich von humanem Fibrinogen mit bovinem Fibrinogen untersucht werden. Dabei sollte die Charakteristik der fibrinogenvermittelten Plättchenadhäsion durch Sondierung des

Einflusses der Fibrinogen-Kettenkonzentration und der bindungsrelevanten Sequenzen im Fibrinogenmolekül auf das Adhäsionsverhalten der Plättchen untersucht werden. Vergleichend sollte anschließend der Einfluß des Fibrinogenrezeptors (α IIb β 3) in seiner prothrombotischen HPA-1b-Variante im Vergleich mit der Wildtyp-HPA-1a-Variante sondiert werden. Des Weiteren sollte das Plättchenadhäsionsverhalten an Kollagen und subendothelialer Matrix als Vergleich zur Adhäsion an Fibrinogen phänomenologisch untersucht werden.

2 Materialien

2.1 Reagenzien

Reagenz	Hersteller, Ort
Acrylamid und Bisacrylamid	National Diagnostics, Großbritannien
Aminoblack	ZYF Pharm Chemical Shanghai China
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Deutschland
Apyrase	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bovines Fibrinogen	Sigma-Aldrich, Deutschland
BSA (bovines Serumalbumin)	Serva, Deutschland
CMFDA (Chloromethylfluoresceindiacetat)	Molecular Probes, USA
CMTMR (Chloromethyltetramethylrhodamin)	Molecular Probes, USA
Coomassie	Sigma-Aldrich, Deutschland
DTT	Sigma-Aldrich, Deutschland
EBM-2 Medium EGM-2 Singlequots	BioWhittaker, USA
Glycerol	Merck, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Deutschland
Humanes Fibrinogen	Sigma-Aldrich, Deutschland
Humanes Fibrinogen	Calbiochem, Deutschland
Kollagen	Chrono-Log, USA
Kollagen Typ S	Roche-Possay, Frankreich
Mepacrine	Sigma-Aldrich, Deutschland
NaCl	Merck, Deutschland
PBS pH 7,3 500ml Glasflasche steril	Serag-Wiesner, Deutschland
PPACK	Bachem (Calbiochem), Deutschland

Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Deutschland
ReoPro (Abciximab)	Lilly Pharma, Deutschland
SDS	Bio-Rad, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, Deutschland
Thrombin	Chrono-Log, USA
Tris Base	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tris-HCl und Trisbase	Sigma-Aldrich, Deutschland
Triton X	Sigma-Alrich, Deutschland

2.2 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller ,Ort
Axiovert 100 M mit Laser Scanning Mikroskop 510 mit Software Version 2.02	Zeiss, Deutschland
Perfusor Sura	Braun, Deutschland
Orbital Schüttler	Röhm Pharma, Deutschland
Reference Pipetten 0,1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Deutschland
Strömungskammer und Plexiglasblock zur Induktion kontrollierter Zellschäden	Feinmechanik der Heinrich Heine Universität Düsseldorf/Biologie, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Deutschland
VF2 Vortex	Janke&Kunkel, Deutschland
Whole Blood Lumi-Aggrigometer	Chrono-Log Corporation, USA
Lumocolor permanent Stärke M rot,	Staedler, Deutschland
Biometra Minigel	Biometra, Deutschland
Sharp JX 330 Scanner	Sharp, Japan

2.3 Einwegmaterialien

Material	Hersteller, Ort
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Deutschland
Vakutainer (neutral (rot) 9 ml , hellblau (Na-Citrat) 4,5 ml, orange (Serum) 9 ml, violett (Na-EDTA) 4,5 ml)	Becton Dickinson, USA
Monovette neutral 9 ml,	Sarstedt, Deutschland
Perfusorspritzen 50 ml, Einmalinfusionskanüle ("Butterfly") grün (Ø0,8 mm),	Braun, Deutschland
Falcon 50 ml Einmalzentrifugenröhrchen Falcon 25 ml Einmalzentrifugenröhrchen	BD Biosciences, USA
Flexiperm reusable cell 2x4 culture chamber	Vivascience, Deutschland
15 cm *15 cm Petrischalen mit Nocken	Greiner ,Deutschland
Einwegaggrigometerglasröhrchen,	Chrono-Log Corporation, USA

3 Methoden

3.1 Blutproben

3.1.1 PPACK

Um das Verhalten der Thrombozyten in Vollblut so wenig wie möglich zu beeinflussen, wurde zur Antikoagulation anstelle der Chelat-bildenden-Stoffe Trinatriumcitrat oder Dinatrium-EDTA der Thrombininhibitor PPACK (D-Phenylalanin-Prolin-Arginin-Chloromethylketon) benutzt.

PPACK vermindert in vitro hochselektiv die thrombinvermittelte Plättchenaktivierung und die Spaltung von Fibrinogen in Fibrin fast vollständig. Die Blutgerinnung in vitro ist somit gehemmt [11]. Der Vorteil gegenüber Trinatriumcitrat oder Dinatrium-EDTA ist, dass die Ca^{2+} -Konzentration im zu untersuchenden Blut unverändert bleibt. Da die Thrombozytenfunktion essentiell von Ca^{2+} abhängig ist, bleibt sie unter der Verwendung von PPACK unbeeinflusst. Im Strömungsexperiment bilden sich daher auch nur primäre Plättchenthromben, die unter Verwendung von Zitratblut sonst im Verlauf auch mit Fibrin durchsetzt würden. Die verwendete Endkonzentration von PPACK im Blut war $40\mu\text{M}$.

3.1.2 Gewinnung und Vorbereitung der Vollblutproben

Zufällig ausgewählten Spendern beiderlei Geschlechts im Alter von 18-65 Jahren, die zur freiwilligen Blutspende in die Blutspendezentrale kamen, wurde das Versuchskonzept im Sinne der Helsinki-Deklaration zur Rekrutierung von wissenschaftlichen Versuchspersonen erläutert. Anschließend wurde mit ihrer schriftlichen Einwilligung Blut aus einer Kubitalvene entnommen. Dieses wurde sofort mit PPACK versetzt. Anschließend wurde dem Blut Mepacrin in einer Endkonzentration von $10\mu\text{M}$ ($0,5\mu\text{l}$ 20mM Mepacrin/ml Blut) hinzugefügt und für 1 Stunde auf einem Orbitalschüttler agitiert (200/min bei Raumtemperatur). Danach wurde es in eine 50 ml Perfusor-Spritze mit einem 4 mm kleinen Magnetrührfisch umgefüllt und sofort für den Versuch eingesetzt. Der Rührfisch diente der späteren berührungsfreien

Durchmischung des Blutes in der Perfusorspritze, um im Verlauf des Versuchs eine Blutsenkung zu verhindern.

Spendern, denen nach schriftlicher Einwilligung direkt im Labor Blut entnommen wurde, wurde je nach Versuchskonzeption, Blut aus einer Kubitalvene direkt in eine mit Rührfisch und gleicher PPACK- und Mepacrinkonzentration wie oben vorbereiteten 50 ml Perfusorspritze entnommen. Die weitere Vorbereitung des Blutes war analog.

3.1.3 Blutanalysen

Das Blut der jeweiligen Spender wurde im Gerinnungslabor des Institutes nach Standardverfahren analysiert:

- Kleines Blutbild (Erythrozytenzahl und -indices, Leukozyten- und Plättchenkonzentration)
- Protrombinzeit nach Quick und INR
- Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
- Faktor I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, XIII
- Antithrombin Aktivität
- Protein C u. S
- Thrombozytenaggregationstests
- Genotypisierung $\beta 3$ T1565C (HPA) Polymorphismus

3.1.4 Präparation von Thrombozyten aus „buffy coat“ -Präparaten

Ein „buffy coat“ ist ein thrombozyten- und leukozytenreicher Blutbestandteil, der nach einer Fraktionierung einer Vollblutspende von 500 ml in Erythrozyten und Plasma vorliegt. Das „buffy coat“-Volumen betrug ca. 50 ml aus einer Vollblutspende. Dieses Volumen wurde bei 640 g für 15 min zentrifugiert, der Überstand an Plättchen und Plasma abgenommen, mit PBS-EDTA pH 6,5 wieder auf 50 ml aufgefüllt und bei 970 g (15 min) zentrifugiert. Dann wurden die Plättchen in PBS pH 6,5 resuspendiert, bei 970 g (15 min) zentrifugiert, in einer

Neubauer Zählkammer gezählt, mit Mepacrin oder CMFDA gefärbt und in Tyrode-Puffer pH 7,4 (20mM MgCl₂, 1370mM NaCl, 2,9mM KCl, 4,2mM NaH₂PO₄ · 1H₂O, 119 mM NaHCO₃, 100 mM HEPES, 55 mM Glucose, 1,22 mM CaCl₂) aufgenommen [42]. Mit dieser Methode gewonnene Plättchen konnten sowohl auf ihre Aggregationsfähigkeit als auch für Strömungs- und Adhäsionsversuche verwendet werden.

3.2 PBS-Ca²⁺-BSA Spülpufferansatz

Um die entsprechenden Proteinbeschichtungen vor einem Versuch in möglichst physiologischen Zustand zu bringen, wurde die fertig montierte Kammer mit einer PBS-Ca²⁺-1% BSA vorbefüllt. Dazu wurden 43,75 ml PBS mit 5 ml 20 mM CaCl₂-Lösung und mit 1,25ml einer 40% BSA-Lösung versetzt und in eine 50 ml Perfusorspritze gefüllt. Die resultierende einfach konzentrierte phosphatgepufferte 2 mM Calciumchloridlösung konnte nun verwendet werden.

3.3 Beschichtung der Deckgläser mit Adhäsivproteinen

Die Deckgläser wurden vor der Beschichtung mit einem wasserfestem Stift auf der zu später lumenseitigen Seite markiert (stromabwärts des für den Versuch später relevanten Bereich). Dies erleichterte die initiale grobe Fokusfindung vor dem Strömungsversuch, da das Pigment des Stiftes nahe der Oberfläche fluoresziert. Der Untersuchungsbereich konnte dann durch horizontale und sagittale Verschiebung der Probe festgelegt werden. Dort wurde dann fein fokussiert (s.u.).

Bei -20°C aufbewahrtes humanes Fibrinogen (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 2,5 mg/ml und bovines Serum-Albumin (BSA) in einer 40%-igen Konzentration in PBS (Phosphate Buffered Saline; Zusammensetzung: NaCl 8 g/l Aqua bidest, KCl 0,2 g/l Aqua bidest, Na₂HPO₄ 1,15 g/l Aqua bidest, KH₂PO₄ 0,2 g/l Aqua bidest) wurde bei 30°C im

Wärmeblock unter Schütteln aufgetaut und gut durchmischt. Das BSA wurde anschließend mit PBS auf eine Konzentration von 10% verdünnt. Anschließend wurden jeweils 50 µl (2,5 mg/ml Fibrinogen, 10% BSA) oder 10 µl (Kollagen S ein Gemisch aus ca. 95% Kollagen I und ca. 5% Kollagen III mit einer Proteinreinheit von >98% als wässrige Lösung nach Herstellerangaben, Sigma-Aldrich, Deutschland) auf einem Deckglas mit einem Zellschaber mit weicher Lippe in Längsrichtung (spätere Strömungsrichtung) verteilt. Der o.g. Markierungsstrich wurde zur Vermeidung von Verunreinigung der Beschichtung durch die Farbpigmente und in Hinblick auf die Dichtigkeit Handhabung nicht in die Beschichtung mit einbezogen. Der Rand, auf dem später die Teflondichtung aufliegt, wurde ebenfalls nicht beschichtet. Insgesamt wurde eine Fläche von ca. 6,3 cm² beschichtet. Die Deckgläser (Fibrinogen und BSA) wurden dann in einer eckigen Petrischale mit Nocken (Greiner) unverzüglich im 37 °C Inkubator mit wassergesättigter 5% CO₂-haltiger Atmosphäre für mindestens 2 Stunden inkubiert. Die mit Kollagen S beschichteten Deckgläser verblieben in einer Petrischale zum Trocknen bei Raumtemperatur.

3.4 Endothelzellen und extrazelluläre Matrix als Deckglasbeschichtung

Mit Beschichtungen, die jeweils nur ein Adhäsionsprotein enthalten, ließen sich gezielt spezifische Rezeptor-Ligand-Interaktionen untersuchen.

Um dem komplexen Charakter der bei Endothelläsionen vorherrschenden Situation eines Proteingemisches näher zu kommen, wurden Deckgläser mit Endothel beschichtet. Nach vollständiger Ablösung der Zellen von der extrazellulären Matrixschicht auf dem Deckglas oder nach Erzeugung einer Läsion in der auf dem Deckglas gezüchteten Endothelschicht konnten auch Interaktionen mit der extrazellulären Matrix untersucht werden.

Dazu mussten zunächst ausreichend Endothelzellen gezüchtet werden. Diese konnten dann auf Deckgläser umgesetzt und dort manipuliert werden. Besonders geeignet waren human umbilical vaneos endothelial cells (HUVEC), die sehr teilungsaktiv sind.[43]

3.4.1 Zellkultur von HUVECs

Zur Kultivierung von HUVECs wurden 125 cm² Zellkulturflaschen von Greiner verwendet. Als Nährmedium diente EBM-2 (Endothelial Cell Basal Medium) ergänzt mit EGM-2 Aliquots bestehend aus:

- 0,5 ml hEGF (human recombinant Epidermal Growth Factor)
- 0,2 ml Hydrocortison
- 2,0 ml hFGF-B (human Fibroblast Growth Factor with heparin)
- 0,5 ml VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)
- 0,5 ml R3-IGF-1 (Human Recombinant Insulin-like Growth Factor)
- 0,5 ml Ascorbic Acid (Vitamin C)
- 0,5 ml Gentamicin, Amphotericin-B
- 0,5 ml Heparin (CC-4396)
- 10,0 ml FBS (fetal bovine serum) 2% (Konzentrationen nach Herstellerangaben)

Dies ist ein für HUVECs optimiertes Medium der Firma BioWhittaker San Diego Kalifornien, von der auch die HUVECs stammten. Die Zellen wurden nach Aussaat (ein Drittel bis ein Viertel Konfluenz) bei 37 °C in wassergesättigter 5%iger CO₂ Atmosphäre bis zur Konfluenz (ca. 70-80%) der Zellen (nach 3–4 Tagen) in den Flaschen zur Proliferation gebracht, dann mit 10% Trypsin-EDTA (Sigma) vom Flaschenboden gelöst, zweimal mit PBS pH7,3 gewaschen und dann je nach Ausgangszelldichte auf zwei oder mehr Flaschen verteilt.

3.4.2 Entwicklung einer zell- und mediumsparenden Methode zur Beschichtung von Deckgläsern mit Endothelzellen

Um Versuche mit Endothelzellbeschichtungen oder extrazellulärer Matrixbeschichtung durchführen zu können, musste eine Methode zur zell- und mediumsparenden Züchtung von Endothelzellen auf Deckgläsern entwickelt werden.

Da Endothelzellen auf Glas nicht adhärent werden, mussten die Deckgläser vor Aufbringung

der Zellen mit einer möglichst physiologischen Matrix beschichtet werden. Hierzu erwies sich Kollagen S als besonders geeignet.

Ein weiteres Problem bestand darin, dass sich das aufgebrauchte endothelzellhaltige Medium auf dem ganzen Deckglas verteilte und somit das gesamte Deckglas mit einer viel zu geringen Dichte von Zellen beschichtet wurde. Da für die Strömungsversuche jeweils nur ca. 1 cm² an konfluenten Endothelzellen benötigt wurde, wären ca. 80% der Zellen ungenutzt verworfen worden. Zusätzlich konnte das auf dem ganzen Deckglas verteilte Medium nicht, wie es für eine optimale Zellzucht notwendig war, vollständig ausgetauscht werden.

Die Lösung des Problems war die Nutzung von selbst haftenden Siliconäpfeln, die zu diesem Zweck aus den ursprünglich 8 Zusammenhängenden in 4 Einzelnapfe zerschnitten wurden. Diese Näpfe boten die Möglichkeit, ca. 1 cm² mit Zellen zu beschichten und mit 700 µl EBM-2 Medium auswechselbar zu versorgen (Abb. 3.1).

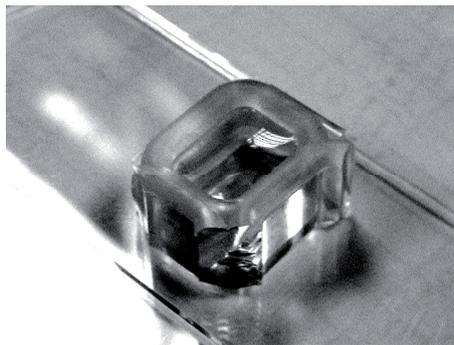


Abbildung 3.1: Mit dem Endothelzell-Nährmedium EBM-2 befüllter Endothelzuchtnapf. Ein autoklavierter Napf wird mittig auf ein steriles, großes, mit Kollagen S beschichtetes Deckgläschen gesetzt und mittels einer sterilen Pinzette festgedrückt. Anschließend wurden 700 µl des mit Endothelzellen angereicherten Mediums eingefüllt.

3.4.3 Entwicklung einer Methode zur Erzeugung einer kontrollierten Zellläsion auf mit Endothelzellen beschichteten Deckgläsern

Eine intakte Endothelschicht vermittelt keine Plättchenaktivierung oder Adhäsion. Daher musste eine Methode entwickelt werden, die die intakte Zellschicht (in ihrem Ausmaß reproduzierbar) verletzt, ohne jedoch die darunter liegende extrazelluläre Matrixschicht zu entfernen.

Zur Erzeugung dieser Läsionen in der Endothelschicht wurde ein speziell zu diesem Zweck entwickelter Plexiglasblock (Abb. 3.2) verwendet, der so beschaffen war, dass man ein Deckglas einlegen konnte. Mit einem Stempel, in dessen Mitte quer zum Deckglas drei 100 µm starke Platindrähte im Abstand von 2 mm eingelassen waren, konnte man die Oberfläche des Deckglases berühren und somit die Endothelschicht durch geringfügig mögliche Längsbewegungen reproduzierbar schädigen. Die Breite des Spaltes betrug nur ca. 30 µm, da es sich um runde Platindrähte handelte, die die Endothelschicht nur tangierten. An der Stelle des Schadens lag nun die extrazelluläre Matrix frei.



Abbildung 3.2: Plexiglasblock zur Erzeugung eines Endothelschadens. Oben der Stempel mit drei mittigen Drähten, unten der Plexiglasblock mit aufgelegtem Deckglas. Unmittelbar vor dem Strömungsversuch am Endothelschaden, wurde der Zuchtnapf vom Deckgläschen entfernt und das Deckgläschen in die vorgefräste Vertiefung des Plexiglasblocks eingelegt.

Anschließend wurde der Stempel aufgesetzt und mit sanftem Druck und minimaler Längsbewegung ein Endothelschaden der auf den Deckgläschen adhärenen Zellen verursacht.

3.4.4 Gewinnung extrazellulärer Matrix

Um auf einem Deckglas extrazelluläre Matrix zu erhalten, wurden zunächst Endothelzellen nach dem obigen Schema auf dem Deckglas gezüchtet. Nach Erreichen 100%iger Konfluenz der Endothelzellen wurden diese noch 24 h weiter inkubiert. Danach wurde der Napf entfernt und die Zellschicht durch Applikation von 350 µl NH₄OH + 500µl 10% Triton X in 500 ml PBS (entspricht 10 mM NH₄OH und 0,1% Triton X) als Detergens von der unter ihr befindlichen Schicht extrazellulärer Matrix durch leichtes Klopfen für ca. 30 Sek. abgelöst. Anschließend wurde 3 mal mit PBS pH 7,3 gespült. Zum Nachweis der Proteinschicht wurde bei einer Probe nach Ablösen der Zellen mit einem Tropfen Aminoblack, (ein Farbstoff der nach Herstellerangaben mit Aminogruppen reagiert), die Schicht angefärbt und mikroskopiert.

3.5 Fluoreszenzmarkierung der Plättchen

3.5.1 Mepacrin

Mepacrin, auch Quinacrine (6-Chloro-9-(4-diethylamino-1-methylbutylamino)-2-methoxyacridin Dihydrochlorid, Chemische Formel: $C_{23}H_{30}ClN_3O \cdot 2HCl$) genannt, ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der Thrombozyten intrazellulär anfärbt (Abb. 3.3).

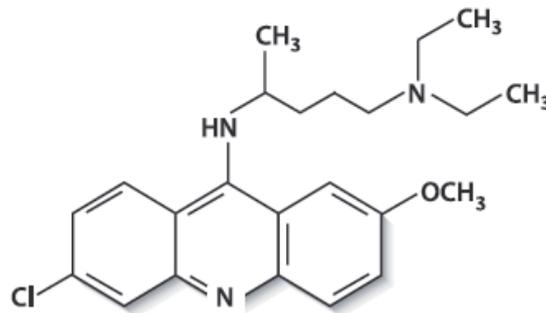


Abbildung 3.3: Mepacrinmolekül. Die konjugierten Doppelbindungen des stickstoffhaltigen Dreifachringssystems sind hauptsächlich für die Fluoreszenzwirkung des Mepacrins verantwortlich. Bei Rückfall der dislozierten (angeregten) Elektronen des Ringsystems in ihren unangeregten Zustand kommt es zur Emission von Photonen.

Vom intrazellulären Mepacrin befinden sich 61% in den dense bodies (Granula) und 14% in den Lysosomen. Der Rest ist vermutlich im Zytoplasma verteilt [44]. Die Exzitationsoptima des Farbstoffs liegen bei Licht der Wellenlängen 360 nm (Emission bei 530 nm) und Licht der Wellenlänge 420 nm (Emission bei 500 nm). Bei den nachfolgenden Versuchen wurde Laserlicht von 458 nm zur Exzitation benutzt und das emittierte Licht, durch einen Breitpassfilter auf 505 nm bis 550 nm beschränkt, ausgelesen.

3.5.2 Färbung der Plättchen mit Mepacrin und CMFDA

Mepacrin färbt Plättchen und Kernstrukturen kernhaltiger (Blut-)Zellen, beeinflusst die Plättchenadhäsion und -aggregation aber nicht [44].

Im Strömungsversuch unter Einsatz von Endothelzellen färbte es jedoch diese und verhinderte die Möglichkeit, zwischen den an Endothelzellen haftenden Plättchen und nachträglich durch Mepacrin gefärbten Endothelzellen zu unterscheiden. Eine andere Möglichkeit, Plättchen intern mit einem Fluoreszenzfarbstoff anzufärben, ist CMFDA (=„Celltracker Green“, 5-chloromethylfluoresceindiacetat). Hierbei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der erst durch Abspaltung der Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 492 nm im Bereich 517 nm fluoresziert [45]. Die konzentrierte plasmafreie Plättchensuspension wurde entweder mit 10 μM Mepacrin oder mit 2 μM CMFDA für 2 h bei Raumtemperatur (21 °C) unter Agitation gefärbt.

3.5.3 Färbung der Zellen mit Propidiumiodid

Zusätzlich zur Färbung der Plättchen mit Mepacrin wurden die Blutproben mit Propidiumjodid (PI) zum Nachweis kernhaltiger Blutzellen wie folgt gefärbt:

Zunächst wurden die Zellmembranen der Blutzellen in einer Probe von 5 ml mit Saponin (100 μl einer 0,1 % Lösung in PBS) permeabilisiert und anschließend mit 1 ml 3 μM PI-Lösung in Färbepuffer (1,5 mM PI Stammlösung 1:500 in 100 mM Tris, pH7,4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , 0,1 % Nonidet P-40) versetzt und für 15 min inkubiert. Anschließend wurde ein Tropfen dieser Probe auf einem Objektträger ausgestrichen und bei 400facher Vergrößerung mit dem Laserscanmikroskop untersucht.

3.6 Funktionsanalyse fluoreszenzmarkierter Thrombozyten

Um die Farbstoffe hinsichtlich ihres Einflusses auf die Plättchenaggregation zu testen, wurden die Plättchen nach oben genannter Methode isoliert, in Tyrodepuffer aufgenommen und wie oben gefärbt.

Das Aggregometer ist dem Prinzip nach ein Lichttransmissionsmessgerät. Es registriert die Transmissionsveränderung einer zu untersuchenden Thrombozytensuspension nach Zugabe von Plättchenagonisten. Zunächst wurden mehrere runde Glasküvetten (für 450 µl Probenvolumen) in einem geräteeigenen Thermoblock auf 37 °C vorgewärmt. Dann wurde in zwei der vier Messkanäle jeweils eine mit einem Rührfisch versehene 0,5 ml Küvette eingeführt und mit zu messender Plättchensuspension befüllt.

Die registrierte optische Dichte dieser Plättchensuspension zeigte nach ca. 1 min einen konstanten horizontalen Verlauf. Mit Thrombin 0,05 U und Kollagen 5 µg/mlJ wurde im Abgleich mit der unbehandelten Probe der Verlauf der optischen Transmissionsveränderung (entspricht dem Grad der Aggregation der Plättchen) für ca. 8 min verfolgt.

3.7 Proteinauftrennung mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Auftrennung der Fibrinogen-Präparate in ihre Untereinheiten wurden jeweils 10 µg der reduzierten Fibrinogenproben auf ein 1 mm dickes, 8 % Mini-PAGE aufgetragen [46]. Die Auftrennung erfolgte in einer Biometra Minigel Apparatur bei 230 V und 25 mA. Anschließend wurde das Mini-PAGE nach Coomassie gefärbt, getrocknet, gescannt (Sharp JX 330 Scanner und Imagemaster Version 2.0, Pharmacia Biotech) und mit der Software ImageJ ausgewertet [47].

3.8 Laserscanmikroskop, Einstellungen und Bildakquisition

Das Zeiss Axiovert 100 Laserscanmikroskop (Abb. 3.4) wurde wie folgt eingestellt:

- Argonlaser (auf 50 % Leistung, Wellenlänge 458 nm)
- Vergrößerung 100-fach (Zeiss Plan-Neofluar 10/0,3 Objektiv, ohne digitalen Zoom)
- 2 Kanäle: Durchlicht (zum Fokussieren) und Fluoreszenz (CH2): Pinhole max. geöffnet, Detector Gain 1000, Ampl. Offset -1,995; 100 % Excitation bei 458 nm
- Filter für CH2: BP 505-550
- Stapelscan 5 Bilder (512 · 512 Pixel 8bit Graustufen), Abstand 100 nm, Framescan

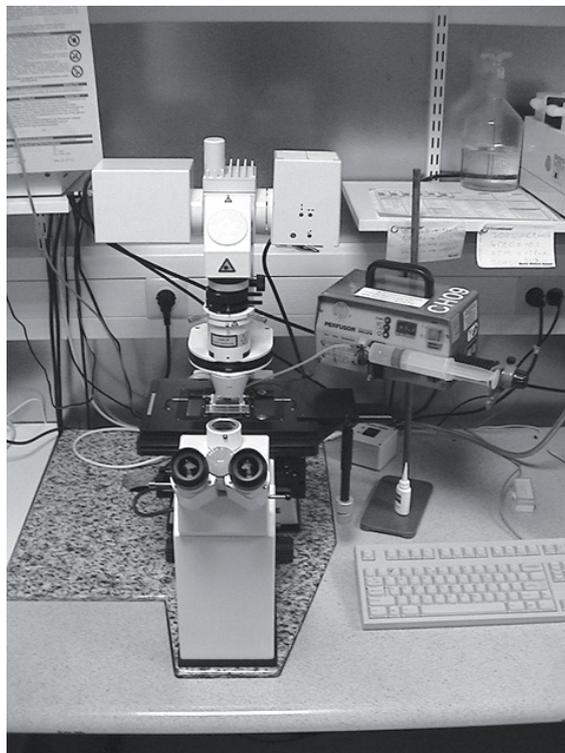


Abbildung 3.4: Mikroskop-Arbeitsplatz. Mikroskop mit eingelegter Strömungskammer links, Perfusor mit eingespannter Spritze rechts. Das Mikroskop ist auf einer erschütterungsabsorbierenden stoßgedämpften Granitplatte montiert. Die rechts unten sichtbare Tastatur gehört zum Steuerungscomputer des Mikroskops (nicht sichtbar).

3.9 Strömungskammer und Versuchsablauf

3.9.1 Zusammensetzung der Strömungskammer

Ein beschichtetes Deckglas wurde in die Metallführung der Kammer eingelegt, eine Dichtung und der trockene Acrylglasblock aufgelegt und die 6 Schrauben nach dem Zylinderkopfprinzip fest angezogen und gleichmäßig fixiert. Die Höhe des durchströmten Volumens konnte durch entsprechende Wahl der Dichtungsdicke gewählt werden. Die restlichen Deckgläser lagerten weiter im Inkubator. Anschließend wurde die Kammer luftblasenfrei mit dem PBS-BSA-Ca²⁺-Puffer befüllt und in einer speziellen Haltevorrichtung (Abb. 3.5) in das Mikroskop eingesetzt. Durch Abklemmen des abführenden Schlauchs wurde erreicht, dass der Puffer nicht wieder aus der Kammer herauslief. Die mit Blut befüllte Perfusorspritze wurde in den Perfusor eingespannt und die gewählte Strömungsgeschwindigkeit eingestellt. Der abführende Schlauch wurde durch Drehen an der Einstellschraube vollständig mit Blut gefüllt. Um Luftbläschen am Ende des Schlauches zu vermeiden, wurde der Schlauch so gedreht, dass sich das Blut am Ende des Schlauches leicht vorwölbte. Dieses Schlauchende wurde dann mit der Zuführungsöffnung der Strömungskammer blasenfrei verbunden. Dann erfolgte die Fokussierung des Mikroskops.

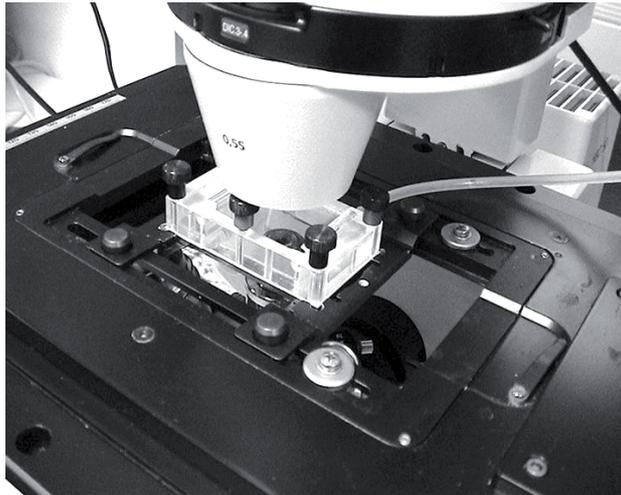


Abbildung 3.5: Kammer in Mikroskophalterung. Der zuführende Schlauch ist rechts im Bild zu sehen. Die fertig montierte und befüllte Strömungskammer wurde zunächst mit der blutgefüllten Perfusorspritze verbunden und diese in den Perfusor eingespannt. Anschließend konnte die Strömungskammer in die speziell vorgefräste Mikroskophalterung eingesetzt werden. Der abführende Schlauch drainierte in ein Auffanggefäß (nicht sichtbar).

3.9.2 Fokussierung

Zur Fokussierung wurde zunächst der Markierungsstrich (außerhalb des zu messenden Bereiches) im Mikroskopmodus "Fastscan" scharf eingestellt. Nachdem dies geschehen war, suchte man eine von Eigenfluoreszenzen möglichst freie Stelle in der Mitte des Deckglases bzw. der Flußkammer und stellte auf die kleinsten sichtbaren Partikel auf der Beschichtungsoberfläche scharf. Somit lag der Fokus unmittelbar über der Beschichtung.

3.9.3 Versuchsablauf mit proteinbeschichteten Deckgläsern

Je nach Fragestellung wurden pro Versuch mehrere Messungen von 3-Schicht Stapelscans durchgeführt. Der erste Schichtscan erfolgte in der Fokusebene und die beiden folgenden jeweils 10µm darüber, weiter in das Kammervolumen hinein. Bei jedem einzelnen Probanden

wurden neben den speziellen Messungen mit z.B. Fibrinogen oder Kollagen jeweils eine Messung mit BSA beschichteten Deckgläsern durchgeführt, um unspezifische Adhäsionsphänomene an adhäsionsneutraler Oberfläche zu erfassen und auszuwerten.

Zu Beginn eines Strömungsversuchs wurde das Blut in der Spritze berührungsfrei mit Hilfe eines Magneten von außen, der einen Rührfisch innerhalb der Spritze bewegte, gut durchmischt. Dann wurde mit einem kurzen Dreh an der Perfusorschraube die Kammer ganz mit Blut befüllt, so dass das Deckglas vollständig mit Blut überschichtet war. Nun wurde der Perfusor eingeschaltet. Zu Beginn der laminaren geradlinigen Strömung (Akustisches Signal des Perfusors nach ca. 3 s) wurde die Aufzeichnung des ersten Stapelscans am Steuerungscomputer gestartet. Weitere Stapelscans folgten jeweils nach 1 und 5 min.

Folgt am Ende des Versuchs weitere Versuche mit derselben Blutprobe wurde der Perfusor abgestellt, die Kammer und der abführende Schlauch unter fließendem Leitungswasser gereinigt und mit zweifach destilliertem Wasser abgespült. Alle Teile wurden anschließend mit Hilfe von nicht fasernden Tüchern getrocknet. Ein neues beschichtetes Deckglas wurde dann in die Kammer eingespannt und die Kammer mit PBS-Ca²⁺-BSA-Spülpuffer durch das Zuführungsloch blasenfrei wie oben gefüllt. Es folgten die Fokussierung und die Füllung der Kammer mit Blut nach erneuter Durchmischung, wie oben beschrieben.

Nach Abschluss einer Versuchsreihe wurde das restliche Blut im zuführenden Schlauch für eventuelle nachträgliche Analysen (ca. 1 ml z.B. für nachträgliche Genotypisierung o. ä.) in einem sterilen Eppendorf 1,5 ml Reaktionsgefäß (Safe-Lock) bei -20°C eingefroren.

Die Strömungskammer und alle anderen Komponenten (zuführender Schlauch mit Luer-Drei-Wege-Hahn, abführender Schlauch und eventuell wieder verwendete Perfusor-Spritzen) wurden jeweils mindestens 2 h in Edisonite-Lösung gereinigt. Alle Komponenten wurden anschließend mit Leitungswasser und zweifach destilliertem Wasser von jeglichen Reinigungsmittelresten befreit.

3.9.4 Strömungsversuche mit isolierten fluoreszenzmarkierten Thrombozyten über Endothelzellen mit künstlich erzeugtem Defekt

Außer den Versuchen mit markierten Plättchen in Vollblut wurden auch Strömungsversuche mit präparierten, gewaschenen und gefärbten Plättchen durchgeführt. Dazu wurde eine Endothelläsion an konfluentem Zellrasen durchgeführt. Die Endothelzellen wurden zur Differenzierung von den Plättchen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CMTMR (absorbiert Licht der Wellenlänge 541 nm und emittiert Licht der Wellenlänge 565nm) 1 h vor dem Versuch gefärbt [45]. Dazu wurde EBM-2 Medium mit Farbstoff versetzt (Konzentration des Farbstoffes im Medium 10 μ M). Die Vorbereitung der Strömungskammer wurde wie bei den Vollblutversuchen durchgeführt (siehe oben). Der zu untersuchende Bereich mit Endothelläsion wurde zunächst aufgesucht. Sowohl im Durchlichtbild als auch im Fluoreszenzlicht war die Läsion sichtbar. Durchgeführt wurden die Versuche in Analogie zu dem beschriebenen Versuchsablauf mit Vollblut (siehe oben).

3.10 Imaging und Bildauswertung

3.10.1 Software (ImageJ)

Aus den zahlreichen Versuchen resultierte eine große Anzahl von Datensätzen, die digital gespeichert und ausgewertet wurden. Zur Auswertung dieser Rohdaten im unkomprimierten "Tagged Image File Format" (TIFF, 512 · 512 Pixel, 8 Bit Graustufen, das entspricht 256 Graustufen) wurde das von Wayne Rasband am Massachusetts Institute of Technology (MIT) entwickelte Programm ImageJ benutzt [48]. Während der Arbeit mit dem Programm bestand ein reger E-Mail-Kontakt zum Entwickler, der nach Anregungen und Fehlerreports das Programm immer weiter verbessern konnte. So konnten sowohl systematische Fehler, die bei verschiedenen Verarbeitungsschritten aufgetreten waren, vermieden als auch die Arbeitsvorgänge bei der Bildverarbeitung beschleunigt und optimiert werden.

3.10.2 Bildverarbeitung

Zunächst wurden jeweils die ersten zwei Schichtbilder eines Bildstapels mit der Funktion logisches UND im programmeigenen "Image Calculator" verrechnet (Abb.3.6). Diese Funktion verrechnet zwei Bilder und gibt als Resultat ein Bild, welches nur die Grafikinformatoren enthält, die in beiden Quellbildern jeweils identisch sind. So konnten die bewegten Teilchen eliminiert werden, und es blieben nur noch die statischen Teilchen übrig. Das resultierende Bild wurde mit der "Threshold" (Schwellen)-Funktion Grauwert-reduziert, um Fluoreszenzunterschiede der beiden Ebenen und geringe Fokusvarianzen auszugleichen. Durch Setzen der oberen und unteren Grenze mit dem SET-Befehl auf die Werte 0 bzw. 1 konnte das Bild völlig von Grauwerten (= Fluoreszenzintensitätsunterschiede) befreit werden. Es entstand ein reines Monochrombild, das zur weiteren Analyse noch invertiert wurde.

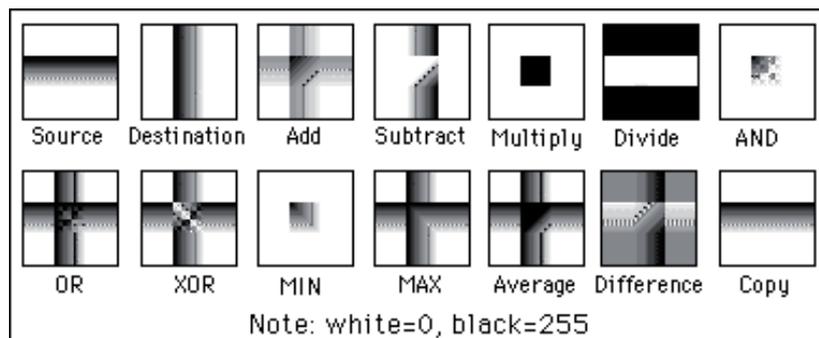


Abbildung 3.6: Verknüpfungsergebnisse. In Abhängigkeit von der verwendeten Verknüpfung erzeugt der „Imagecalculator“ des Programms ImageJ aus der logischen Verknüpfung von „Source“-Bild und „Destination“-Bild ein neues Bild. [49].

In dem so veränderten Bild konnten nun die Teilchen mit der "Analyze Particles"-Funktion in Anzahl und Größe gemessen werden. Diese Funktion geht das Bild Zeile für Zeile durch. Wenn der Algorithmus dabei auf ein schwarzes Pixel trifft, wird dieses in kompletter Ausdehnung erfasst, d.h. mit allen direkt benachbarten schwarzen Pixeln ausgewählt und je nach Größe in einem so genannten "Bin" als Teilchen gezählt. Die Größe der "Bins" kann frei eingestellt werden. Da die "Bins" von Null ab nummeriert sind, die Teilchengröße aber bei

eins anfängt, muss die Größe eines "Bins" um eins kleiner gewählt werden als das größte im zu analysierenden Bild vorhandene Teilchen. Daher wird bei jedem Bild zweimal die Funktion "Analyse Particles" benutzt, beim ersten Mal zur Bestimmung der Größe des größten Teilchens im Bild und beim zweiten Mal zur tatsächlichen Zählung und korrekten Einordnung der Teilchengröße in die "Bins". Die so erhaltenen Daten konnten dann in eine Tabellenkalkulation übernommen und dort weiter verarbeitet werden.

Hier wurde dann anhand der Bin-Zählung sowohl die Gesamtteilchenmenge unabhängig von ihrer Größe durch Addition aller Teilchen als auch nach Multiplikation der jeweiligen Teilchenanzahl mit ihrer Bin-Nummer und Addition dieser Zahlen die Gesamtfluoreszenz auf der gemessenen Fläche berechnet.

3.11 Statistische Auswertung

Es wurden jeweils der Mittelwert (mean) und die Standardabweichung (SD) vom Mittelwert von n-Strömungsversuchen ermittelt und in den Graphiken visualisiert.

Im Vergleich zwischen HPA-1a zu HPA-1b wurde zusätzlich der gepaarte t-Test angewendet, um die Signifikanz der Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zu ermitteln, ebenso beim Vergleich von bovinem und humanem Fibrinogen und den verschiedenen Fibrinogenpräparationen.

4 Ergebnisse

4.1 Ermittlung der optimalen Plättchenmarkierung

Plättchen haben in ruhendem Zustand eine durchschnittliche Größe von 2–4 μm . Sie sind bis auf die Granula transparent und farblos. Um die Plättchen im Vollblut für die Untersuchung sichtbar zu machen, wurde eine Markierung benötigt, die eine Differenzierung der Plättchen im Vollblut eindeutig von den anderen korpuskulären Teilchen und Plasmaproteinen ermöglichte. Da die optischen Eigenschaften des Blutes überwiegend durch das Hämoglobin der Erythrozyten bestimmt werden, war es in der untersuchten Schichtdicke (50 μm) unmöglich, mit klassischer Durchlichtmikroskopie native Plättchen bzw. Plättchenaggregate zu erkennen.

Die zwei Fluoreszenzfarbstoffe Mepacrin und CMFDA waren geeignet, die Plättchen intrazellulär zu markieren und durch gezielte Argonlaseranregung mittels Laserscanning-Mikroskopie zu detektieren. Neben den Thrombozyten wurden auch kernhaltige Zellen (Leukozyten) angefärbt. Die Erythrozyten hingegen blieben ungefärbt.

Die Eigenschaften und die funktionelle Integrität der Plättchen sollte durch die Färbung mit Mepacrin und CMFDA unbeeinträchtigt bleiben. Mit aggregometergestützten Untersuchungen konnte dies phänomenologisch unter Einsatz verschiedener Agonisten der Thrombozytenaggregation (5 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen und 0,05 U/l Thrombin) gezeigt werden. Sowohl Mepacrin- als auch CMFDA-gefärbte, gewaschene und in Tyrode (pH7,3) resuspendierte Plättchen zeigten im Vergleich zu ungefärbten, nativen aber gleich vorbehandelten Plättchen keinen Unterschied in ihrem Aggregationsverhalten. (Abb. 4.1).

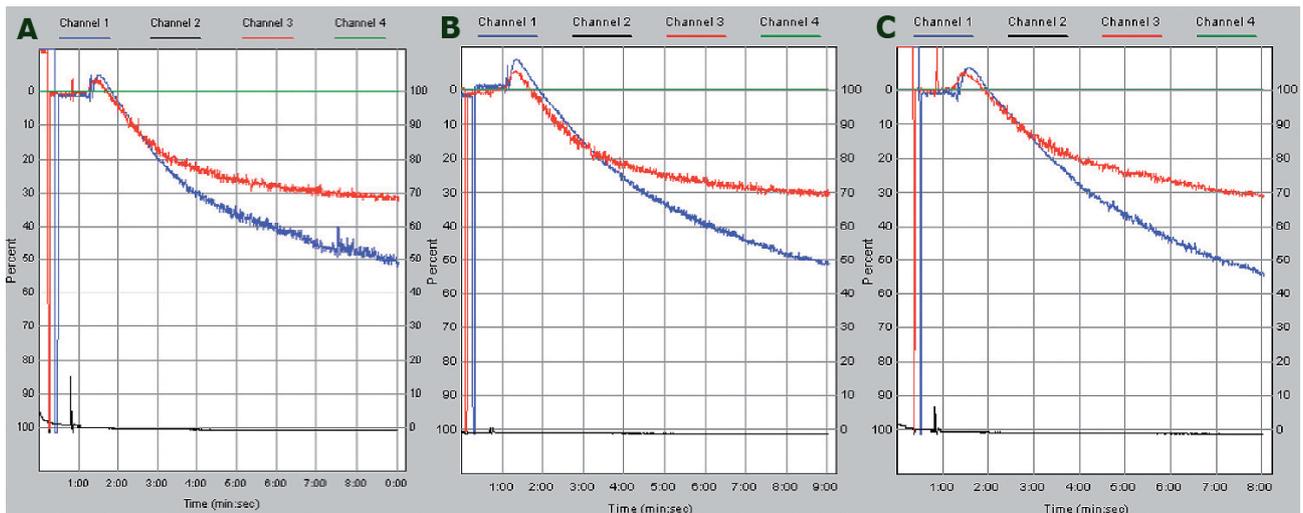


Abbildung 4.1: Aggregation gefärbter und ungefärbter Plättchen. A) ungefärbte Plättchen B) Mepacrin-markierte Plättchen C) CMFDA-markierte Plättchen. Thrombin (0,05 U) (blaue Kurve) und Kollagen(5 µg/ml rote Kurve).

Die Abbildung 4.1 A) zeigt den Aggregationsverlauf gewaschener in Tyrode resuspendierter Plättchen bei Stimulation mit Thrombin (blaue Kurve) und Kollagen (rote Kurve). Nach 8 min ergibt sich bei Thrombin eine Transmissionszunahme von 50% und bei Kollagen von 30% als Zeichen für die Bildung von Thrombozytenaggregaten. Annähernd gleiche Ergebnisse fanden sich bei der Untersuchung von fluoreszenzmarkierten Thrombozyten: B) Mepacrin: 50% und 30%, C) CMFDA 55% und 30%. Mepacrin färbt Plättchen und Leukozyten intrazellulär direkt im Vollblut, während CMFDA durch Plasmaeinfluß auch extrazellulär fluoresziert (Abb. 4.2). Beide Farbstoffe haben die Eigenschaft, auch Endothelzellen anzufärben, Mepacrin färbt dort Weibel-Palade-Körperchen und CMFDA das Zytoplasma. Der präparative und damit verbundene zeitliche Aufwand zur Plättchenfärbung ist bei Mepacrin geringer. Weder der eine, noch der andere Farbstoff beeinflussen die Aggregationseigenschaften der Plättchen (Tab. 4.1).

	Mepacrin	CMFDA
Färbung kernhaltiger Zellen	ja	ja
Färbung der Plättchen in Vollblut	möglich	gewaschene Plättchen
Färbung von Endothelzellen	ja	ja
Farbstoffverlust durch Degranulation	ja	nein
Zeit für Färbung	45 min	ca. 120 min
Aggregation	unbeeinflusst	unbeeinflusst

Tabelle 4.1: Vergleich der Fluoreszenzfarbstoffe Mepacrin und CMFDA.

4.2 Mikroskopische Differenzierung fluoreszenzmarkierter Plättchen

In allen Strömungsexperimenten mit mepacrinmarkiertem Vollblut fielen neben den punktförmigen Fluoreszenzen der Plättchen stets auch große, nicht adhärente Fluoreszenzmuster im fließenden Blut auf. Abb. 4.2 zeigt sowohl die Mepacrinfärbung der Plättchengranula (grün) als auch die Anfärbung der leukozytären DNA mit Propidiumjodid (rot). Mepacrin-gefärbte Strukturen co-lokalisieren mit der kernhaltigen Zelle im Blutausschlag.

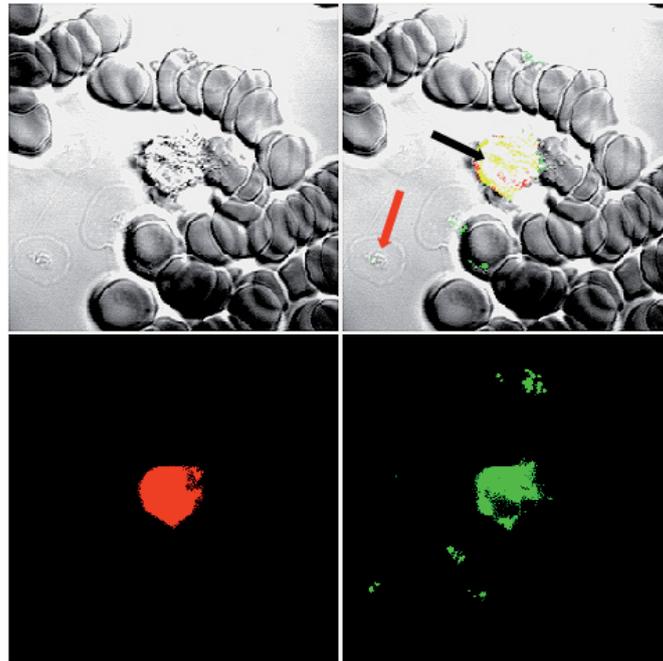


Abbildung 4.2: Blutausstrich mit Mepacrin- und Propidiumjodid-gefärbte Plättchen und Leukozyten. Links oben: Durchlichtbild mit nativen Erythrozytenstapeln. Links unten: Propidiumjodid-Fluoreszenz. Rechts unten: Mepacrin-Fluoreszenz. Rechts oben: Kombination der drei Bilder, wobei eine gelbe Anfärbung der Überlagerung beider Fluoreszenzen entspricht. In der Mitte des Bildes ist eine kernhaltige Zelle (schwarzer Pfeil) zu sehen, in der die Zellkernstruktur durch Propidiumjodid sichtbar wird. Weitere Zellstrukturen werden zusätzlich durch Mepacrin gefärbt. Der rote Pfeil zeigt die mepacrin-fluoreszierende Granula eines adhärenen Plättchens. Die mitochondriale DNA der Plättchen ist aufgrund der geringen Konzentration nicht zu erkennen.

4.3 Gerätebedingte Einflussgrößen bei der Bildakquisition und Bildauswertung

4.3.1 Einfluss der Laserscanning-Mikroskopie und der Fokusebene

Die geringe Lichttransmission von Vollblut ließ die Verwendung der konventionellen Mikroskopie nicht zu. Die konfokale Laserscanningmikroskopie bot die Möglichkeit der gezielten Anregung und Detektion von Fluoreszenz in einer Ebene. Dabei war die Erfassung jeglicher statischer Fluoreszenz im Bereich weniger μm oberhalb der Deckglasbeschichtung durch eine optimierte Geräteeinstellung entscheidend. Zwei Geräteeinstellungen waren dabei von zentraler Bedeutung:

1) Die Scangeschwindigkeit, mit der der Laser das Objekt zeilenweise anregt. Die Scangeschwindigkeit wurde feinabgestimmt, damit bei einem minimal zeitversetzten Scan zweier nah übereinander liegenden Ebenen durch die spätere Verrechnung der Ebenen statische und mobile Fluoreszenzen voneinander unterschieden werden konnten (siehe digitale Bildauswertung).

2) Die richtige Bestimmung und Optimierung der Fokusebene in den Strömungsexperimenten ermöglichte erst die Quantifizierung adhärenter Plättchen an thrombogenen Oberflächen. Da adhärenente Thrombozyten nur wenige μm an vertikaler Ausdehnung besitzen, musste die Fokusebene unmittelbar über der Deckglasoberfläche gewählt werden. Hierzu wurden unterschiedliche Verfahren geprüft:

1. Fluoreszenz einer Markierung auf dem Deckglas
2. Zinkpulver mit einer Teilchengröße von $< 10 \mu\text{m}$
3. Partikel in der Fibrinogenbeschichtung

Verfahren 1) wurde für die orientierende Fokusfindung eingesetzt, weil die Fluoreszenz der Markierung präzise die Oberseite des Deckglases markierte und von da aus mit Verfahren 3) genauer fokussiert werden konnte. Für die Feinfokussierung fiel die Wahl auf das dritte Verfahren, da Partikel in der Fibrinogenbeschichtung homogen verteilt, fest mit der

Beschichtung verbunden waren und unmittelbar die Oberfläche der Beschichtung anzeigten (Abb. 4.3).

Verfahren 2) hingegen erwies sich als unpraktikabel, weil die Partikel selbst thrombogene Eigenschaften besaßen und sich nach der Fokussierung nicht entfernen ließen.

Bei der Festlegung des optimalen Fokus fiel auf, dass sich in diesem Modell die Plättchen zum größten Teil am Rande der laminaren Hauptströmung der Strömungskammer aufhielten. Dies war vergleichbar mit der Eigenschaft der Plättchen, sich vor allem bei hohen Scherraten im Randbereich der zentralen Strömung, also in Nachbarschaft zur Gefäßwand fortzubewegen[50]



Abbildung 4.3: Mikroskopischer Bildausschnitt mit korrektem Fokus. In der Fibrinogenbeschichtung fanden sich regelmäßig wenige μm große Partikel, die spülfest direkt an der Oberfläche des Glases lokalisiert waren. Auf die kleinsten Partikel wurde fokussiert. Bei der Auswahl des zu untersuchenden Bereichs wurde darauf geachtet, dass dieser möglichst wenig Eigenfluoreszenz enthielt.

4.3.2 Vergrößerung

Die optische Auflösung des Laserscan-Mikroskops ist begrenzt. Da die Fluoreszenz Mepacrin-gefärbter, adhärenter Thrombozyten nur eine Ausdehnung von ca. $2 \mu\text{m}^2$ besitzt (nur die Granula sind gefärbt), musste die Vergrößerung in Hinblick auf die spätere Auswertung der Daten so gewählt werden, dass die gesamte Fluoreszenz eines Thrombozyten annähernd einem Pixel im digitalen Bild entsprach. So konnte man bei der Zählung davon ausgehen, dass die gezählten schwarzen Pixel der Anzahl adhärenter Plättchen entsprachen. Diese Voraussetzung war bei der rein optischen 100-fachen Vergrößerung ohne digitalen Zoom annähernd erfüllt. In der gewählten Scanauflösung von 512×512 Pixel entsprach ein Pixel einer Fläche von $1,8 \mu\text{m} \cdot 1,8 \mu\text{m}$ ($3,24 \mu\text{m}^2$). Bei dieser Vergrößerung brauchte der Laserstrahl 758 ms zur zeilenweisen Erfassung eines Bildes. Eine geringere Vergrößerung hätte die Thrombozyten nicht erfasst und eine stärkere Vergrößerung hätte die Thrombozyten zu groß abgebildet, so dass die Zählung der Thrombozyten nur manuell und nicht mehr digital möglich gewesen wäre. Die stärkere Vergrößerung hatte zusätzlich zur Folge, dass die Scanzeit kürzer wurde, da lediglich ein kleinerer Ausschnitt gescannt werden musste. Kleinere Scanzeiten jedoch führten bei geringen Strömungsgeschwindigkeiten dazu, dass sich die unterschiedlichen Bilder eines Stapels zeitlich zu wenig unterschieden und somit keine Aussage zur Differenzierung zwischen statischen und bewegten Fluoreszenzen gemacht werden konnte.

Weiterhin war bei stärkeren Vergrößerungen die korrekte Fokusfindung erschwert, da die Tiefenschärfe mit zunehmender Vergrößerung abnahm. Bei einem kleineren untersuchten Ausschnitt ergab sich häufiger das Problem, dass eine teilweise inhomogene Verteilung der adhärenen Plättchen das Ergebnis unabhängig von anderen Variablen stark beeinflusste.

4.3.3 Bildstapel und Bewegungserfassung

Zur Differenzierung zwischen adhärennten und bewegten Plättchen war es notwendig, die Bewegung der Thrombozyten zu erfassen. Dies kann durch kontinuierliche Videoaufzeichnung geschehen. Wenn man jedoch mit Bildstapeln in geringem (technisch bedingt minimal 100 nm) vertikalen Abstand arbeitet, hat man einen Vorteil: Durch die technisch bedingte Zeitverzögerung von 758 ms zwischen zwei Scans hatten sich im zweiten Scan die bewegten Teilchen dann je nach Strömungsgeschwindigkeit im Bild weiter bewegt. Durch den Vergleich der beiden resultierenden Bilder ließen sich die adhärennten Teilchen mit genauem Zeitabstand eindeutig identifiziert.

Um jegliche Plättchen-bedingte Fluoreszenz zu erfassen und digital zu erfassen, wurde im mit 255 Graustufen erfassten Originalbild alle Graustufen die ungleich 0 (entspricht weiß = keine Fluoreszenz) waren auf 255 (entspricht Schwarz = maximale Fluoreszenz) gesetzt. Der Kontrast im Bild wurde somit optimiert. Der Unterschied der Fluoreszenzintensität, der sich technisch bedingt durch den Abstand der zwei gescannten Ebenen in Hinblick auf die statischen Teilchen ergeben hatte, konnte derart auf digitalem Weg eliminiert werden. So wurde ermöglicht, dass die bearbeiteten Bilder aus zwei verschiedenen Ebenen zur Entdeckung der statischen Fluoreszenzen direkt digital verglichen werden konnten.

4.3.4 Strömungsgeschwindigkeit und Scherrate

Für die Untersuchung von Thrombozyten unter flussdynamischen Bedingungen galten zunächst (unabhängig von den biologischen/biochemischen Eigenschaften der Plättchen und des Blutes selbst) die physikalischen Gesetze, die die Abhängigkeit von Widerstand, Strömungsgeschwindigkeit und Durchmesser (Form) von flüssigkeitsdurchströmten Hohlkörpern bestimmen. Davon abgeleitet wurde die verwendete Formel zur Bestimmung der Wandscherrate (shear rate) unter Berücksichtigung der Strömungskammergeometrie sowie der Flussgeschwindigkeit. Die beiden folgenden Tabellen geben einen Überblick über Flussgeschwindigkeiten und entsprechende Scherraten bei verschiedenen Kammerhöhen (Tab. 4.2), bzw. die Wahl der Perfusionsgeschwindigkeit und Kammerhöhe zum Erreichen der gewünschten Scherrate. Die in der Tabelle fehlenden Perfusionsgeschwindigkeiten waren mit dem zur Perfusion verwendeten Perfusor nicht einstell- oder erreichbar (zu niedrig bzw. zu hoch) und wurden daher nicht angegeben (Tab. 4.3).

Perfusionsrate [ml/h]	Kammerhöhe [μm]			
	25	50	100	250
1	178 s^{-1}	43	10	2
5	889	221	56	9
10	1778	443	110	18
25	4443	1110	278	45
50	8889	2221	556	89
75	13332	3332	832	132
100	17760	4400	1110	178

Tabelle 4.2: Scherraten in s^{-1} bei gegebener Flussrate in ml/h in Abhängigkeit der Höhe der Strömungskammer in μm . Die Breite der Kammer ist 15 mm. Die Werte sind auf ganze Zahlen gerundet.

Scherrate [s ⁻¹]	Kammerhöhe [µm]			
	25	50	100	250
10	-	-	-	5,7
25	-	-	2,3	14,1
50	-	-	4,5	28,2
100	-	2,3	9	56,3
250	-	5,7	22,5	-
500	2,9 ml/h	11,3	45	-
1000	5,7	22,5	-	-
2500	14,1	56,3	-	-
5000	28,2	-	-	-
10000	56,3	-	-	-
15000	84,4	-	-	-

Tabelle 4.3: Perfusionsrate in ml/h bei gegebener Scherrate in s⁻¹ in Abhängigkeit der Höhe der Strömungskammer in µm. Die Breite der Kammer beträgt 15 mm. Die Werte wurden hier auf eine dezimale Stelle auf- bzw. abgerundet.

4.3.5 Gesamtfluoreszenz als Maßeinheit für Plättchenadhäsion

Bei allen Experimenten unter flussdynamischen Bedingungen wurde jeweils die Gesamtfluoreszenz aller statischen Teilchen als Maß für die Plättchen-Adhäsion gewählt. Dieser Zusammenhang ergibt sich aus der Art und Weise des Versuchs und Messablaufs (siehe 3.8, 3.9, 3.10).

4.4 Fibrinogen

Fibrinogen vermittelt eine Adhäsion der Plättchen, jedoch keineswegs jedes Mal eine Thrombusbildung. Unter flussdynamischen Bedingungen binden daher nur einzelne Plättchen an Fibrinogen. Diese spezifische Adhäsion kann mit kommerziellen Antikörpern gehemmt werden. Dies macht Fibrinogen zum idealen Kandidaten für die Validierung des Adhäsionsmodells unter flussdynamischen Bedingungen. Weiterhin erlaubt ein validiertes Fibrinogen-Strömungskammermodell erste inhaltliche Fragen zur Liganden- bzw. Rezeptorfunktion, wenn auch nur mit vorläufigem Charakter.

4.4.1 Ergebnisse der Strömungsexperimente

4.4.1.1 Fibrinogen-konzentrationsabhängige Plättchenadhäsion

Der Einfluss der Fibrinogenkonzentration auf die Adhäsion der Plättchen wurde mittels einer Verdünnungsreihe untersucht. Bei einer Scherrate von 1.500 s^{-1} wurde die Adhäsion an der Standardkonzentration von $2,5 \text{ mg/ml}$ in der humanen Fibrinogenbeschichtung mit der bei $1,25 \text{ mg/ml}$, der bei $0,625 \text{ mg/ml}$ und der bei BSA-Beschichtung verglichen. Es ergab sich nach 5 min eine mit der Konzentration an Fibrinogen zunehmende Adhäsion der Plättchen (Abb. 4.4). Nach 5 min. war bei $2,5 \text{ mg/ml}$ Fibrinogen ca. 50% der beschichteten Oberfläche mit Plättchen bedeckt.

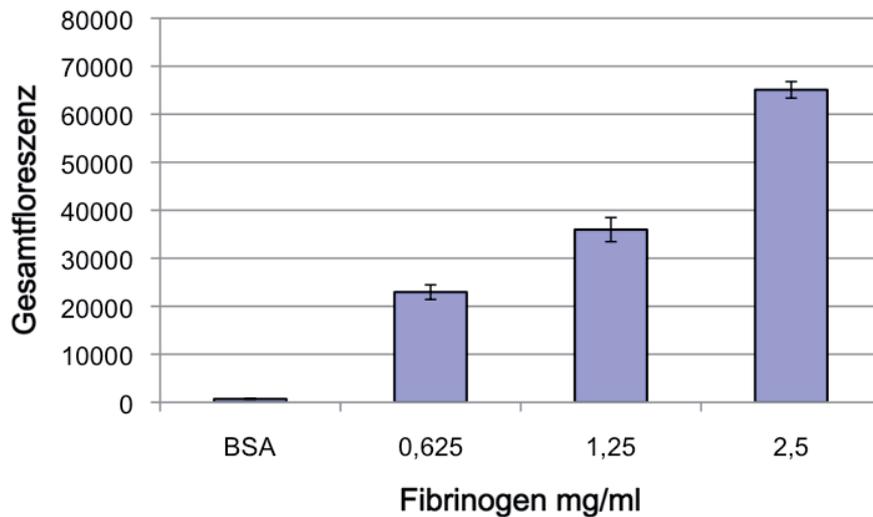


Abbildung 4.4: Plättchenadhäsion in Abhängigkeit von der Fibrinogenkonzentration bei einer Scherrate von 1.500 s^{-1} nach 5 Minuten (Mittelwert aus 3 Experimenten).

4.4.1.2 Scherraten-abhängige Plättchenadhäsion an Fibrinogen

Bei den Experimenten mit humanem Fibrinogen (Sigma) ergab sich nach 5 min Perfusion zunächst ein Anstieg der Adhäsion bis zu einer Scherrate von ca. 1.800 s^{-1} . Diese fiel dann asymptotisch ab, um schließlich bei ca. 7.000 s^{-1} unter die Nachweisgrenze abzusinken. Bei einer Regressionsauswertung konnte eine Regressionskurve 3. Grades an diesen Werteverlauf angepasst werden. (Abb. 4.5).

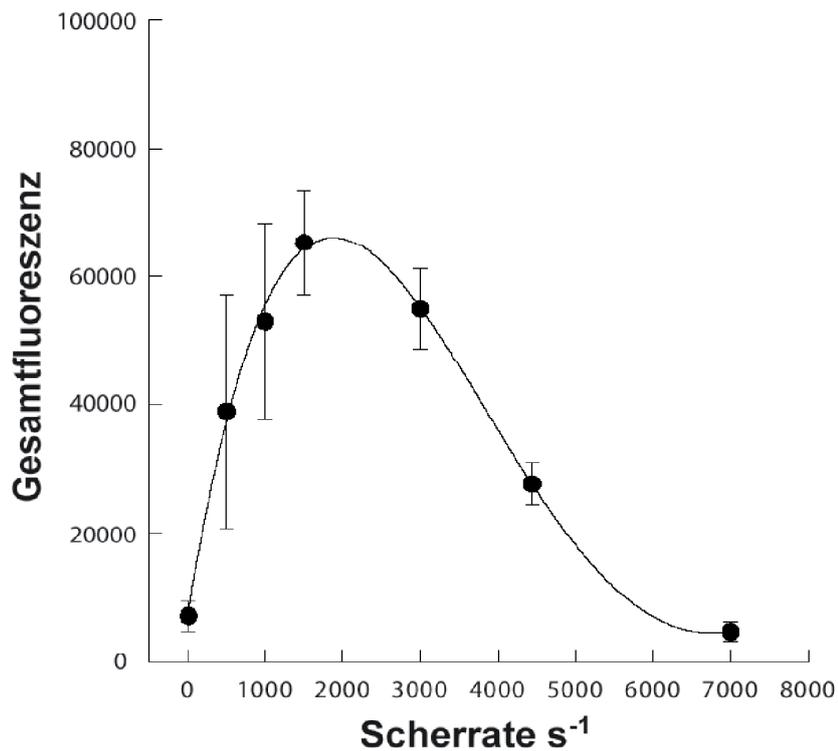


Abbildung 4.5: Plättchenadhäsion an humanem Fibrinogen (2,5 mg/ml) bei zunehmenden Scherraten (Gesamtergebnis aus insgesamt 70 Strömungsexperimenten an Fibrinogen nach 5 min).

4.4.1.3 Kontrollversuche mit Abciximab und bovinem Serumalbumin

Die Spezifität der Plättchenadhäsion an Fibrinogen wurde mit Hilfe des chimären murinen/humanen Antikörperfragment Abciximab dokumentiert. Abciximab hemmt den Fibrinogenrezeptor hochspezifisch kompetitiv. In Experimenten, bei denen das Blut gleichzeitig mit Mepacrin und Abciximab in einer Konzentration von 4,0 $\mu\text{g/ml}$ (entspricht der therapeutisch eingesetzten Blutkonzentration) inkubiert wurde, wurde die Plättchenadhäsion im Vergleich zur Adhäsion nach 5 min an immobilisiertem Fibrinogen bei 1500 s^{-1} nahezu zu vollständig gehemmt. Die gemessene residuelle Plättchenadhäsion entsprach dabei der

unspezifischen Adhäsion an bovinem Serumalbumin (Abb. 4.6).

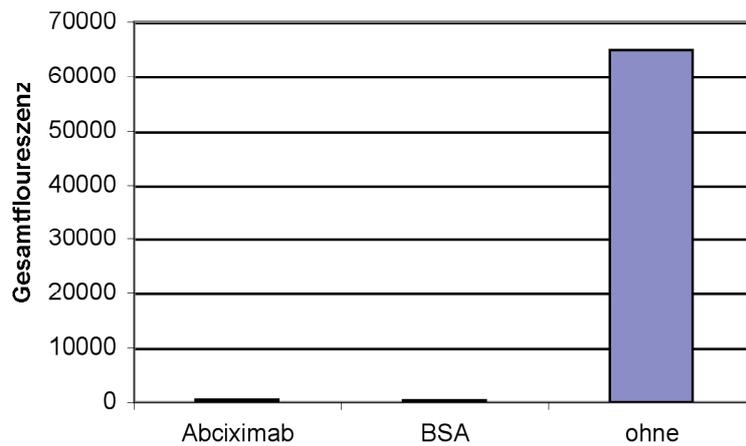


Abbildung 4.6: Spezifität der Plättchenadhäsion bei $1500s^{-1}$ an Fibrinogen. $4,0 \mu g/ml$ Abciximab hemmt die Adhäsion vollständig. Bovines Serumalbumin vermittelt keine spezifische Adhäsion.

4.4.1.4 Validierung

Bei Vergleich unterschiedlicher Spender untereinander (interindividuell) sowie beim Vergleich der Ergebnisse innerhalb eines Spenders (intraindividuell) ergab sich (hier beispielhaft gezeigt bei $1500 s^{-1}$ nach 5min) nur geringe Abweichungen von 7,1% bzw. 4,7% (Abb. 4.7).

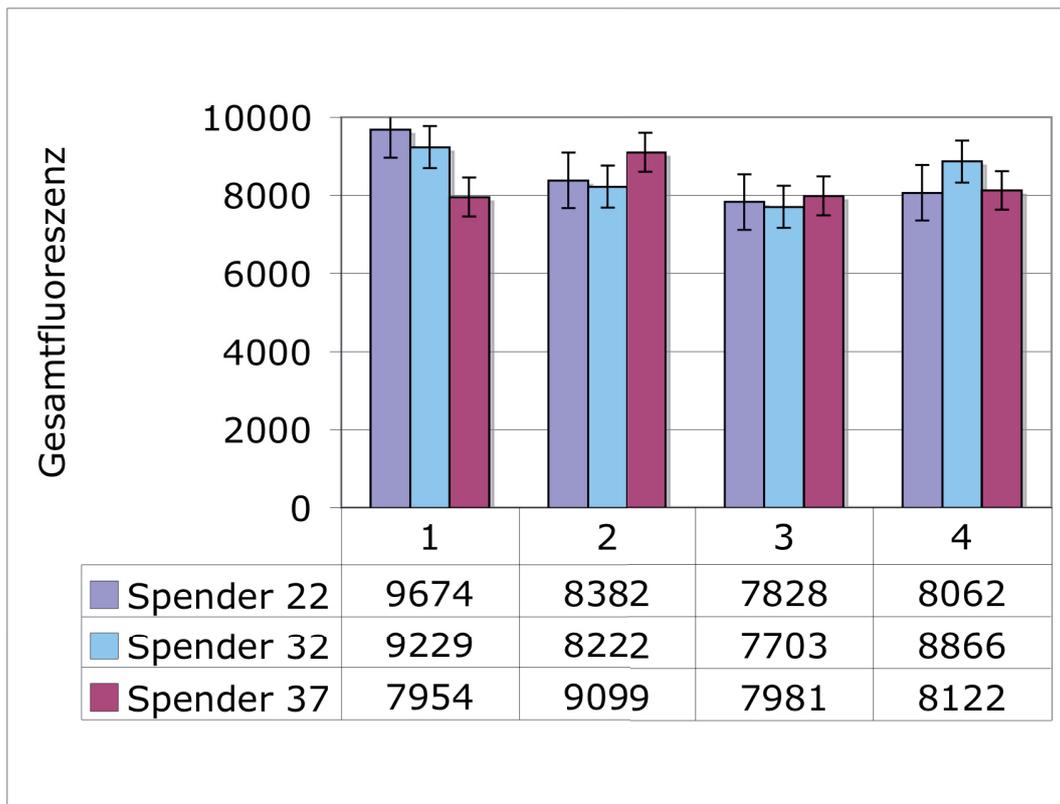


Abbildung 4.7 Inter- und intraindividuelle Vergleich von Versuchsergebnissen dreier Spender (HPA-1a): Gezeigt ist die Gesamtfluoreszenz von 4 Strömungsversuchen bei 1500 s^{-1} . Der intraindividuelle Mittelwert und Standardabweichung betragen: Spender 22: 8486 ± 731 Spender 32: 8505 ± 586 , Spender 37: 8426 ± 471 . Interindividuell findet sich ein Mittelwert und eine Standardabweichung über alle Versuche von 8426 ± 606 . Dies entspricht einer mittleren prozentualen Abweichung von 7,1%.

4.4.2 Bedeutung der Dodeka- und RGD-Peptidsequenzen in der Plättchenadhäsion

Die unterschiedliche funktionelle Bedeutung der Dodeka- und der RGD-Peptidsequenzen im Fibrinogenmolekül für die Plättchenadhäsion unter flußdynamischen Bedingungen ist nicht vollständig aufgeklärt. Dabei könnten die einzelnen Peptidsequenzen von einander variierende Funktionen und damit verbunden unterschiedliche Aktivitäten am Rezeptor entfalten, die wiederum Einflüsse auf die Rezeptor-Ligand-Interaktion unter physiologischen und pathologischen Bedingungen haben dürften.

4.4.2.1 Dodeka- und RGD-Peptidsequenzen in der primären Adhäsion

Eine funktionelle Differenzierung zwischen Dodeka- und der RGD-Peptidsequenzen ist möglich, wenn die Mengenverhältnisse der Fibrinogenketten gezielt separiert oder präparativ modifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden Präparationen der Firmen Sigma, Calbiochem, zweier Präparationen aus Vollblut von Ruggeri (The Scripps Research Institute, La Jolla, Kalifornien, USA) mit einander verglichen.

Das Gemisch der drei Ketten, deren Molekulargewicht ca. 61000 D, 58000 D and 51000 D für α -, β - und γ -Kette beträgt, konnte mittels PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt werden. Dabei zeigte sich, dass die quantitative Ketten-Zusammensetzung der jeweiligen Fibrinogenpräparation deutliche variierte. In der Präparation von Ruggeri Spur 3 konnte die α -Kette vollständig aus dem Fibrinogenkettengemisch entfernt werden. Alle anderen Präparation variierten in der Menge der α -Kette (Abb. 4.8).

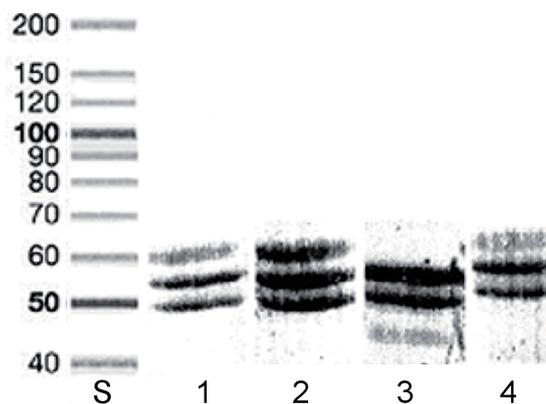


Abbildung 4.8: Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) verschiedener Fibrinogenpräparationen. (je 10 μ g Protein). S) Molekulargewichtsstandard, 1) von Calbiochem, 2) von Ruggeri, 3) γ - und β -Ketten-Präparation von Ruggeri (γ -Präparation), 4) von Sigma-Aldrich. Die erste Bande (v.o.) entspricht der α -Kette (61 kD), die zweite der β -Kette (58 kD) und die dritte Bande der γ -Kette (61 kD). Schneller im elektrischen Feld wandernde Fragmente stellen Degradationsprodukte mit geringerem Molekulargewicht dar.

Die Mengenverhältnisse wurden nachfolgend densitometrisch bestimmt (Abb. 4.8). Dabei war zunächst auffällig, dass obwohl gleiche Mengen zur Analyse verwendet wurden, sich rechnerisch Unterschiede (Summe der einzelnen optischen Dichten je Präparation) im Gesamtprotein ergaben. Die Verhältnisse der einzelnen Ketten in den verschiedenen Präparationen differierten stark voneinander und bestätigten den visuellen Eindruck in der Abbildung 4.9. Gemeinsam war, dass in allen Präparationen jeweils der β -Kette-Anteil am höchsten war. Die Fibrinogene von Calbiochem und Sigma-Aldrich hatten einen niedrigeren Anteil an α -Ketten im Verhältnis zu γ -Ketten. Im Fibrinogen von Ruggeri fand sich ein umgekehrtes Verhältnis und der höchste rechnerische Gesamtproteingehalt. Die γ -Präparation enthielt wie zu erwarten keine α -Kette jedoch den höchsten Anteil an γ -Ketten. Diese unterschiedlichen Verhältnisse ließen die Vermutung zu, dass auch funktionelle Unterschiede der verschiedenen Fibrinogen-Präparationen zu erwarten sind.

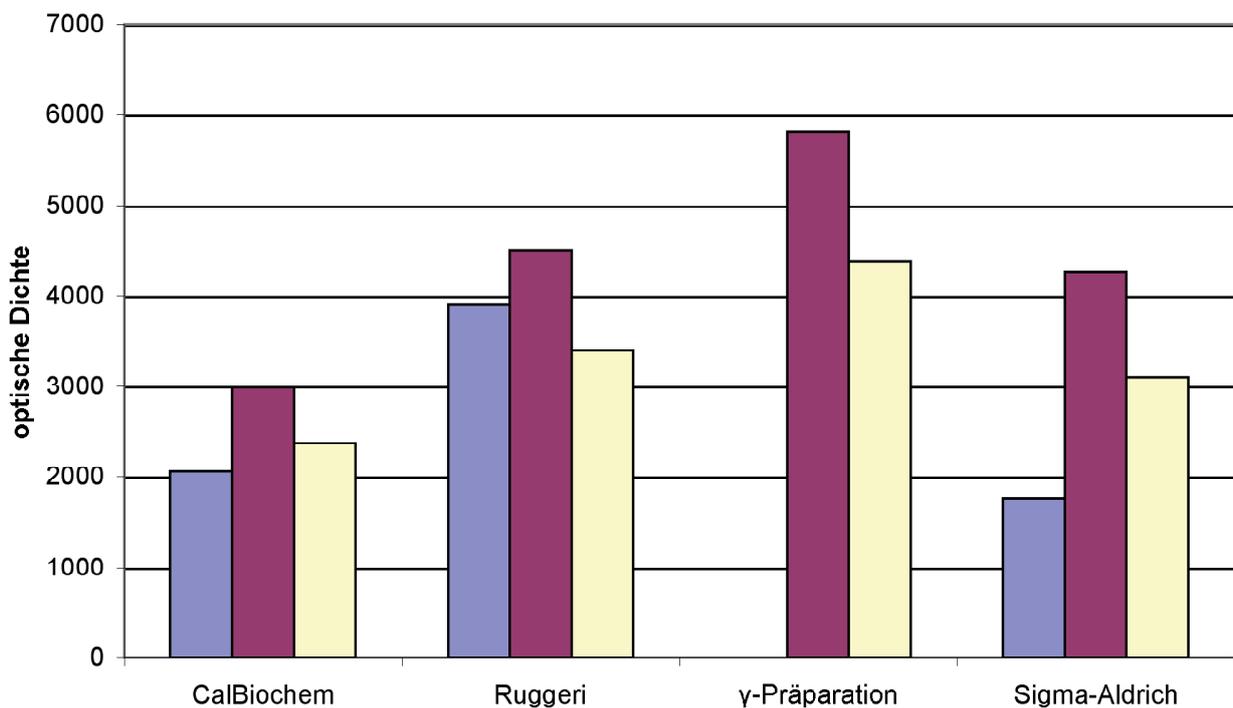


Abbildung 4.9: Densitometrie der PAGE. Die einzelnen Fibrinogen-Präparationen weisen eine unterschiedliche Verteilung der Molekülketten des Fibrinogens auf. Vor allem der Anteil der α -Kette zeigte deutliche Unterschiede. Blau: α -Kette, Magenta: β -Kette, gelb: γ -Kette.

4.4.2.2 Plättchenadhäsion verschiedener Fibrinogen-Präparationen unter flusssdynamischen Bedingungen

Während die PAGE die molekulare Zusammensetzung der Fibrinogen-Präparationen genau darstellt, erlaubt erst die Plättchenadhäsion unter flusssdynamischen Bedingungen eine funktionelle Analyse der einzelnen Fibrinogen-Präparationen. Hierzu wurde in Anlehnung an die densitometrische Auswertung normierte Fibrinogenmengen zur Beschichtung eingesetzt. Um einen möglichen Unterschied im Adhäsionsverhalten der Thrombozyten an den verschiedenen Fibrinogen zu untersuchen, wurde eine Scherrate gewählt, die in den Versuchen mit dem Fibrinogenpräparat von Sigma annähernd zu maximaler Adhäsion führte, nämlich 1500 s^{-1} . In weiteren Strömungsexperimenten zeigten sich nach 5 min Unterschiede in der Plättchenadhäsion bei den einzelnen Fibrinogenpräparationen. Die zum Vergleich herangezogene Adhäsion wurde zum Zeitpunkt 5 min nach Beginn des Strömungsexperimentes gemessen. Die Plättchenadhäsion an Fibrinogen war bei den Präparaten von Calbiochem und Sigma ausgeprägt und obwohl der γ -Präparation die α -Kette fehlt, vermittelt auch dieses Fibrinogen-Kettengemisch eine Adhäsion. Somit scheint die α -Kette nicht essentiell für eine Adhäsion von Plättchen an immobilisiertem Fibrinogen zu sein. Die Ruggeri-Präparation vermittelte die geringste Adhäsion (Abb. 4.10)

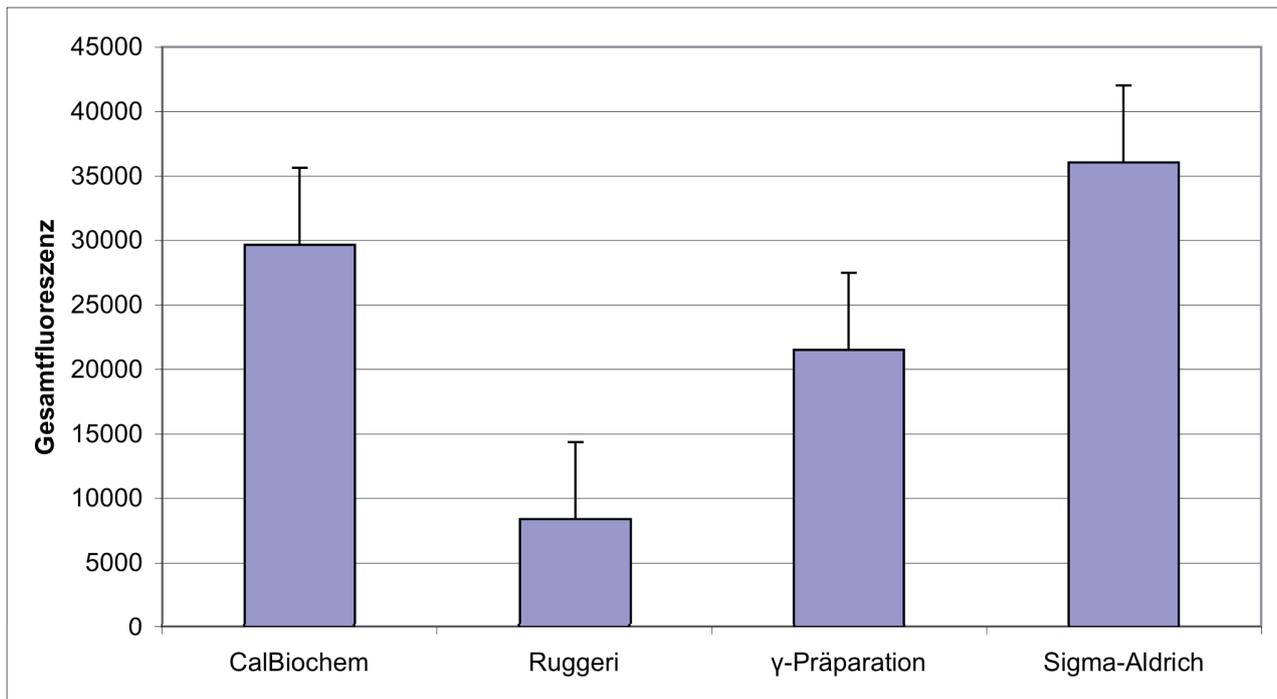


Abbildung 4.10: Plättchenadhäsion an verschiedene Fibrinogentypen bei 1.500 s^{-1} . (Mittelwert aus je 3 Experimenten unter flussdynamischen Bedingungen, p -Werte im gepaarten t -Test siehe Tab. 4.4)

	gepaarter Unterschied der Mittelwerte				
	Mittelwert	Std. Abweichung	Std. Fehler des Mittelwerts	95% Konfidenzintervall	
				unteres	oberes
CALBIOCHEM - RUGGERI	21650	9524	6734	-63919	10722
CALBIOCHEM - SIGMA	-6408	70	50	-7043	-5772
CALBIOCHEM - GAMMA	14818	22372	15820	-186194	215830
GAMMA - SIGMA	-21226	22443	15870	-222873	180421
RUGGERI - GAMMA	-6822	9085	5245	-29392	15747

	Ruggeri	γ -Präparation	Sigma
Calbiochem	0,159	0,147	0,005
Ruggeri	-	0,310	0,126
γ -Präparation	-	-	0,81

Tabelle 4.4: Ergebnisse des gepaarten t-Test (unten die Signifikanz der Übereinstimmung der Mittelwerte bei einem Konfidenzintervall von 95%). Die Fibrinogen-Präparationen von Calbiochem und Sigma zeigen die höchste Übereinstimmung. Umgekehrt weichen die Ergebnisse der sonstigen unterschiedlichen Präparationen im direkten Vergleich signifikant voneinander ab.

4.4.2.3 RGD-Sequenzen in Plättchenadhäsion

Das Vorhandensein der α -Kette im Fibrinogenmolekül ist keine notwendige Voraussetzung für die Plättchenadhäsion unter flußdynamischen Bedingungen. Das β_3 -Integrin verfügt über eine Erkennungs- /Bindungsdomäne für die RGD Sequenz. Die α -Kette besitzt 2 RGD Sequenzen, die aufgrund ihrer Orientierung im Molekül in unterschiedlichem Maße die Fibrinogenbindung beeinflussen können [51]. Die funktionelle Bedeutung der zweiten RGD-Sequenz wurde exemplarisch untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine natürliche Variante des Fibrinogen untersucht, die sich nur hinsichtlich ihrer Orientierung der RGD-Sequenz unterscheiden.

4.4.3 Homologe Fibrinogenvarianten von Humanfibrinogen und Rinderfibrinogen

Der Sequenzvergleich zwischen dem Humanfibrinogen und dem Rinderfibrinogen zeigte, dass die N-terminal gelegene RGD-Sequenz (Humanfibrinogen 114-116 AS und Rinderfibrinogen 116-118 AS) im Kontext mit den flankierenden Sequenzen hoch homolog ist. Die Orientierung und Homologie der zweiten RGD-Sequenz hingegen variiert deutlich zwischen den beiden Varianten. Im Humanfibrinogen befindet sich die RGD-Sequenz in Position 591-593 und im Rinderfibrinogen liegt sie bei 271-273. Im bovinen Fibrinogen liegen demnach die beiden RGD-Sequenzen dichter zusammen als im humanen Fibrinogen. Zwischen beiden Varianten der α -Ketten nimmt die Homologie C-terminal ab (Abb. 4.11).

Homo sapiens [52]

Definition: Fibrinogen, alpha Polypeptid Isoform alpha-E preproprotein und Bos taurus

```
H.SAPIENS 1 MFSMRIVCLVLSVVGTAWTADSGE---GDFLAEGGGVVRGPRVVERHQ SACKDSDWPFCS D 57
      MFS+R +CLVLS+VG T D + GDFL EGGGVVRGPR+VER QSACK++ WPFCS D
B.TAURUS 1 MFSVRDLCLVLSLVGAIKTEDGSDPPSGDFLTEGGGVVRGPRLVERQQ SACKETGWPFCS D 60

H.SAPIENS 58 EDWNYKCPSGCRMKGLIDEVNQDFTNRINKLKNSLFEYQKNNKDSHSLTTNIMEILRGDF 117
      EDWN KCPSGCRMKGLIDEV+QDFT+RINKL++SLF YQKN+KDS++LT NI+E++RGDF
B.TAURUS 61 EDWNTKCPSGCRMKGLIDEVDQDFTSRINKLRDSL FNYQKNSKDSNTLTKNIVELMRGDF 120

H.SAPIENS 118 SSANNRDNTYNRVSEDLRSRIEVLKRKVIEKVQHIQQLLQKNVRAQLVDMKRLEVDIDIKI 177
      + ANN DNT+ ++SEDLRSRIE+L+RKVIE+VQ I++LQKNVR QLVDMKRLEVDIDIKI
B.TAURUS 121 AKANNNDNTFKQISEDLRSRIEILRRKVIEQVQRIKVLQKNVRDQLVDMKRLEVDIDIKI 180

H.SAPIENS 178 RSCRGSCSRALAREVDLKDYEDQQKQLEQVIAKDLLPSRDRQH LPLIKMKPVPDLVPGNF 237
      RSC+GSCSRAL +VDL+DY++QQKQLEQVIA +LLPSRD Q+LPLIKM + VP F
B.TAURUS 181 RSCKGSCSRAL EHKVDLEDYKNNQKQLEQVIAINLLPSRDIQYLPLIKMSTITGPVPREF 240

H.SAPIENS 238 KSQLQKVPPEWKALTDMPQMRMELERPGGNEITRGGSTSYGTGSETESPRNPSSAGSWNS 297
      KSQLQ+ P EWKAL +M Q +M LE GG+ RG S S GTG SPR
B.TAURUS 241 KSQLQEAPLEWKALLEMQQTKMVLETFGGDGH ARGDSVSQGTGLAPGSPRK----- 291

H.SAPIENS 298 GSSGPGSTGNRNPGSSGTGGTATWKPGSSGPGSTGSWNSGSSGTGSTGNQNP GS PRPGST 357
      G S GN NPGS G G + TW PG PGS G+WN G GS G NPG P PGS
B.TAURUS 292 --PGTSSIGNVNPGSYGPGSSGTWNPGRPEPGSAGTWNPGRPEPGSAGTWNPGRPEPGSA 349

H.SAPIENS 358 GTWNP GS SERGSAGHWTSESSVSGSTGQWH---SESGSFRPDSPGSGNARPN NP DWGTFE 414
      GTWNP G E GSAG W GS G W+ S S SFRPDS G GN RP++PDWGTF
B.TAURUS 350 GTWNPGRPEPGSAGTWNPGRPEPGSAGTWN TGSSGSSSFRPDSSGHGNIRPSSPDWGTFR 409

H.SAPIENS 415 EVSGNVSPGTRREYHTEKLVTSKGDKELRTGKEKVTSGSTTTTTRRSCSKTVTKTVIGPDG 474
      E G+VS GT++E+HT KLV T+KGDKEL EKVTSG TTTTRRSCSK +TKTV DG
B.TAURUS 410 E-EGSVSSGTKQEFHTGKLVTTKGDKELLIDNEKVTSGHTTTTTRRSCSKVITKTVTNADG 468

H.SAPIENS 475 HKEVTKEVVTSE DGSDCPEAMD LG---T LSGIGTLDGFRHRHPDEAAFFD TASTGKTFPG 531
      E TKEVV SEDGSDC +A D T G LD F HR D+ FF +S F G
B.TAURUS 469 RTETTKEVVKSE DGSDCGDA-DFDWHHTFPSRGNLDDFFHRDKDD--FFTRSS--HEFDG 523
```

```

H.SAPIENS 532 FFSPMLGEFVSETESRGSESGIFNTKESSSHHPGIAEFPSRGKSSSYSKQFTSSTSYNR 591
      + + EF + ES S S T++K+ S + NR
B.TAURUS 524 -RTGLAPEFAALGESGSSSSKTSTHSHKQFVSSSTTV-----NR 560

H.SAPIENS 592 GDSTFESKSYKMADEAGSEAD--HEGTHSTKRGHAKSRPVRDCDDVLQTHPSGTQS 645
      G S ESK +KM DEA S D +G H T++GH K+RP R + T P G S
B.taurus 561 GGSAIESKHFKMEDEAESLEDLGFKGAHGTQKGHTKARPARG----IHTSPLGEPS 612

```

*Abbildung 4.11: Homologievergleich der α -Ketten (FGA) des humanen Fibrinogens mit dem aus *Bos taurus* (*Homo sapiens*, NCBI: Accession NP_000499.1 GI:4503689, Definition: Fibrinogen, alpha Polypeptid Isoform alpha-E preproprotein und *Bos taurus*, NCBI Accession NP_001028798 GI:75812954, Definition: Fibrinogen, alpha Polypeptid).*

Die α -Kette zeigt Abweichungen in der Homologie zwischen dem Human- und dem Rinderfibrinogen, die Übereinstimmung beträgt 59%, zusätzlich gibt es 7% Gaps. Die Homologie der β - und γ -Ketten zwischen beiden Spezies ist deutlich größer (s. Tab. 4.5), sie beträgt für FGG 83% bzw. FGB 88 %. Die für die Integrinbindung wichtige Dodekapeptidsequenz der γ -Ketten ist in ihrer Orientierung innerhalb des Proteins und hinsichtlich ihrer Homologie hoch konserviert (Abb. 4.12).

Untereinheit	Identities (Übereinstimmungen)	Positives	Gaps (Lücken)
FGA (α -Kette)	390/655 (59%)	458/655 (69%)	51/655 (7%)
FGG (γ -Kette)	363/437 (83%)	401/437 (91%)	2/437 (0%)
FGB (β -Kette)	291/330 (88%)	311/330 (94 %)	0/437 (0%)

Tabelle 4.5 Ergebnisse des Homologievergleichs zwischen humanem und bovinem Fibrinogen [53]

H.sapiens 400 TIGEGQQHHLGGAKQAGDV
 IGEGQQH LGGAKQ G C-term. Konsensus-homologie der γ -Kette
 B.taurus 418 AIGEGQQHQLGGAKQVGVE

Abbildung 4.12: C-terminale integrinbindende Konsensussequenz der γ -Kette

Demnach werden die beiden Fibrinogen-Varianten maßgeblich durch ihre Homologien aber ebenso auch über die voneinander abweichende Orientierung der zweiten RGD-Sequenz in der α -Kette definiert. Diese Unterschiede können auf der Basis phänomenologisch differenzierbarer Eigenschaften die Funktion der α -Kette bzw. der zweiten RGD-Sequenz aufzuklären helfen.

4.4.3.1 Vergleich von bovinem Fibrinogen mit humanem Fibrinogen in der Plättchenadhäsion bei zunehmenden Scherraten

Die variierende Orientierung der zweiten RGD-Sequenz kann funktionelle Konsequenzen z.B. in der Plättchenadhäsion verursachen. Zur Klärung dieser Möglichkeit wurde das hier entwickelte Imagingverfahren genutzt, um die Plättchenadhäsion an den Fibrinogenvarianten unter flusssdynamischen Bedingungen zu charakterisieren. Unter venösen, also geringen Scherraten wurde zwischen den Human- und Rinderfibrinogen kein Unterschied gemessen. Erst eine kontinuierliche Zunahme der Scherraten ließ ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten der Plättchen, in Relation zu beiden Fibrinogenvarianten erkennen. Strömungsexperimente mit bovinem Fibrinogen ergaben nach 5 min eine deutlich stärkere Zunahme der Adhäsion bei steigender Scherrate mit einem Maximalwert bei 3.000 s⁻¹. Scherraten >3000 s⁻¹ führen ähnlich dem Humanfibrinogen zu einer asymptotisch fallenden Abnahme der Adhäsion (Abb. 4.13).

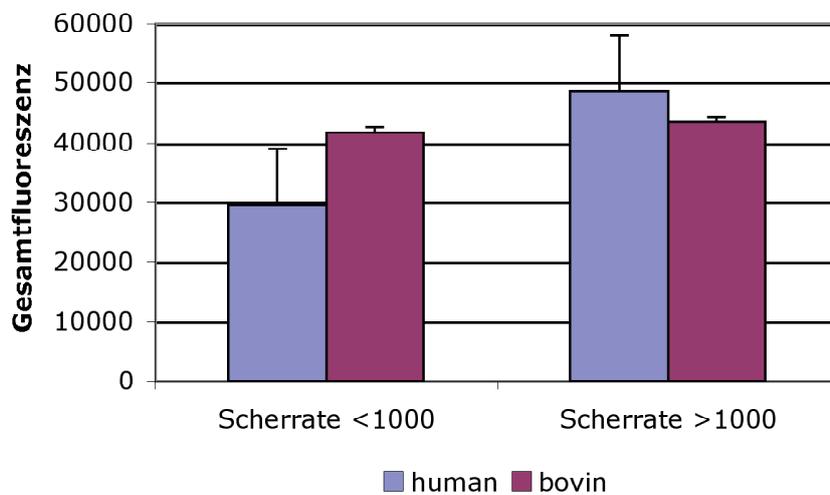
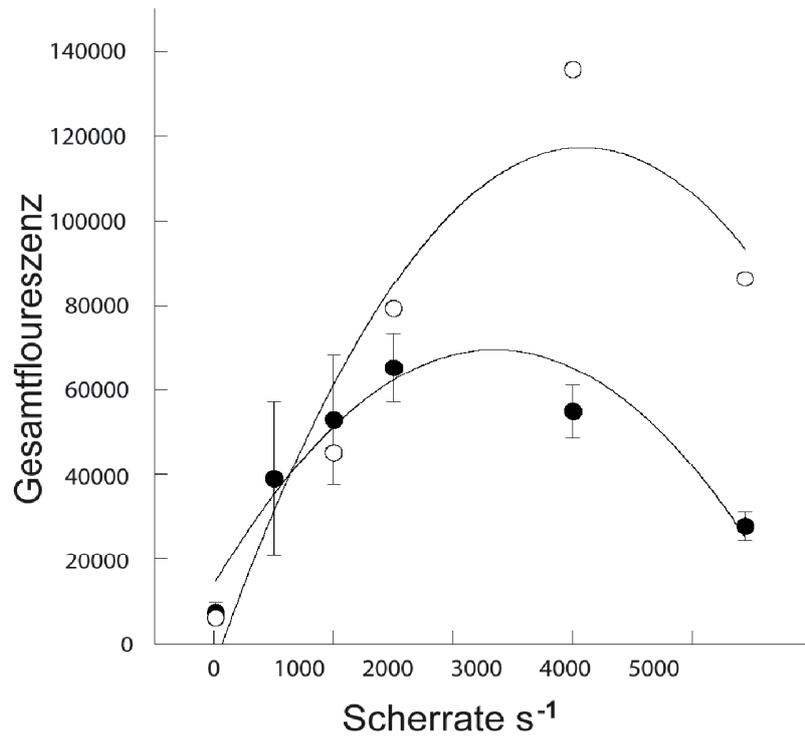


Abbildung 4.13: Einfluss von humanem und bovinem Fibrinogen auf das Adhäsionsverhalten der Plättchen. Im Vergleich von humanem mit bovinem Fibrinogen zeigte sich mit steigender Scherrate bei bovinem Fibrinogen eine deutlich höhere Steigung als auch ein höheres Maximum der Adhäsion der Plättchen (ausgefüllte Kreise: humanes Fibrinogen, offene Kreise: bovines Fibrinogen). Zur Verdeutlichung der Steigungsverhältnisse wurde über die

Abbildung zwei den Messwerten entsprechende Regressionskurven 2. Grades gelegt.) (95% Konfidenzintervall 539-83588, im gepaarten t-Test $p=0,04$).

Fluoreszenzverteilung und Morphologie der Plättchenadhäsion in den unbearbeiteten Bildern ließen auch auf ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten der humanen Thrombozyten auf humaner bzw. boviner Fibrinogenoberfläche schließen. (Abb. 4.14).

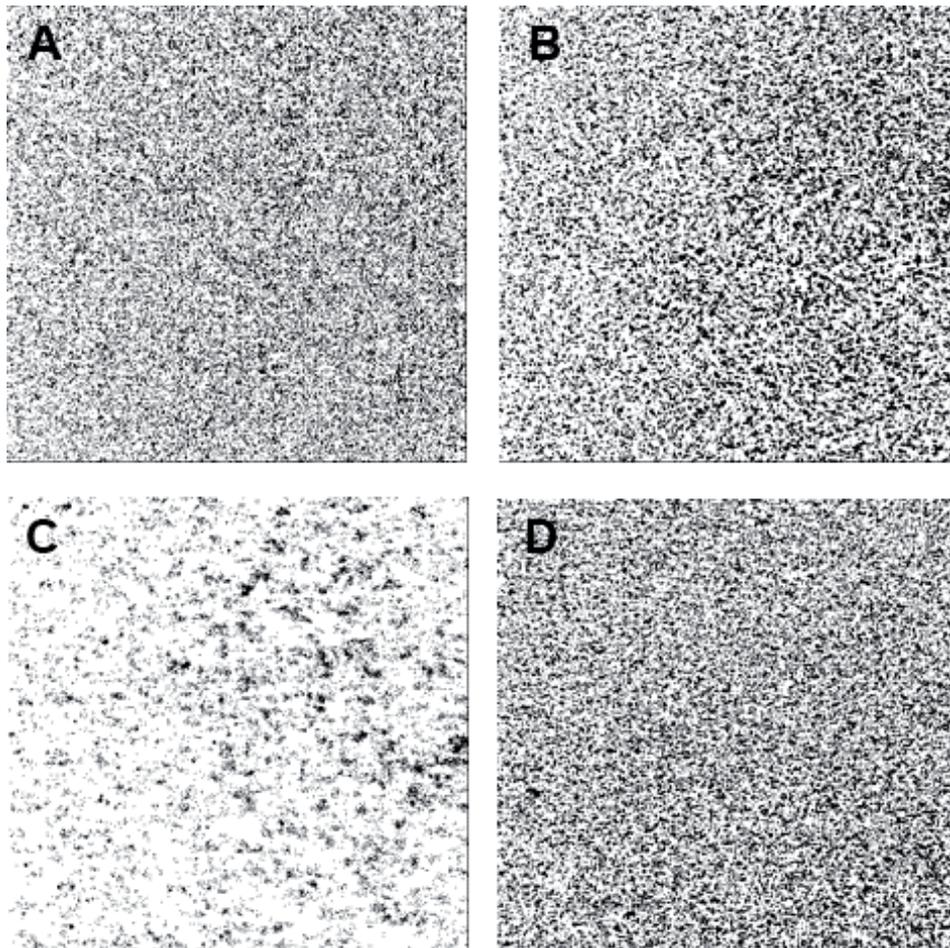


Abbildung 4.14: Mikroskopisches Übersichtsfluoreszenzbild: Vergleich der Plättchenadhäsion an humanem Fibrinogen (A/C) und bovinem Fibrinogen (B/D) bei einer Scherrate von 1.500 s^{-1} (A/B) und bei einer Scherrate von 4.400 s^{-1} (C/D)

Verglichen mit den Ergebnissen an humanem Fibrinogen wurden in den mikroskopischen Präparaten deutliche Unterschiede im Verteilungsmuster sichtbar. Humanes Fibrinogen zeigte eine viel feinere Verteilung einzelner Fluoreszenzen, wohingegen bovines Fibrinogen ein gröberes und flächigeres Fluoreszenzmuster ergab.

4.4.4 Der Integrinpolymorphismus HPA-1

Von der Annahme ausgehend, dass nicht nur Modifikationen der Liganden z.B. Fibrinogen-Präparationen, sondern auch Varianten des Integrin-Rezeptors das Adhäsionsverhalten modulieren können, wurde der HPA1-Polymorphismus des Fibrinogenrezeptors näher untersucht.

Der maßgebliche Rezeptor für Fibrinogen ist das humane Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Eine Variante dieses Rezeptors stellt der HPA-1-Polymorphismus, mit seiner Ausprägung HPA-1a/1a, HPA-1a/1b und HPA-1b/1b dar. Adhäsionsversuche unter niedriger Scherrate von 13 s^{-1} belegen den Einfluß des Polymorphismus auf die Adhäsion der Plättchen. An immobilisiertem Fibrinogen kam es zu vermehrter Plättchenadhäsion bei Verwendung von Blut HPA-1b positiver Blutspender im Vergleich zu HPA-1b negativen Individuen (Abb. 4.15).

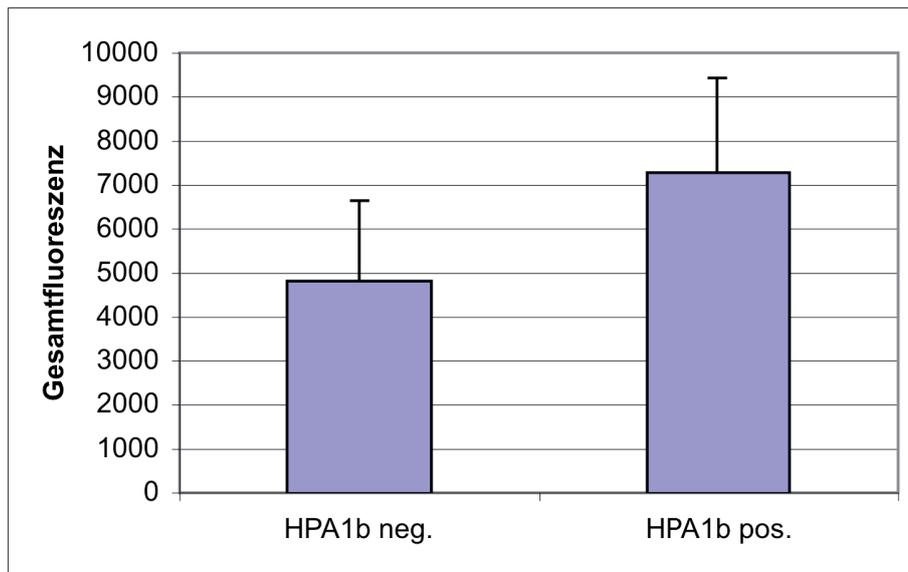


Abbildung 4.15: Plättchenadhäsion bei einer Scherrate von 13 s^{-1} in Relation zum HPA-1-Genotyp. HPA-1b positive Plättchen zeigten bei geringer Scherrate eine absolut höhere Adhäsionsrate an immobilisiertes Fibrinogen im Vergleich zu HPA-1b negativen Plättchen (Mittel aus je 5 Experimenten, $p=0,02$).

4.4.5 Extrazelluläre Matrixproteine

Die hier entwickelte Untersuchungsmethode zur Plättchenadhäsion unter flusss dynamischen Bedingungen wurde als valides Instrument zur Differenzierung verschiedener Fibrinogentypen und verschiedener Fibrinogenrezeptorvarianten etabliert. Abweichend von der Einzelplättchenadhäsion am Fibrinogen kann der primäre Kontakt der Plättchen mit den Proteinen der extrazellulären Matrix auch zur Thrombusbildung führen. In konsequenter Fortsetzung der Experimente mit Fibrinogen wurden daher Kollagen und subendotheliale Matrix als thrombogene Oberfläche eingesetzt, um dieses Meßsystem für weitere Fragestellungen (z.B. Polymorphismen der Kollagenrezeptoren oder Endothelläsionen) einsetzen zu können.

4.5 Kollagen

Nachdem gezeigt wurde, dass mit der hier eingeführten Untersuchungsmethode Differenzierungen zwischen verschiedenen Fibrinogentypen und verschiedener Fibrinogenrezeptorvarianten möglich sind, wurde die Thrombusbildung auf Kollagen phänomenologisch untersucht.

Bei Flusseexperimenten an Kollagen ergab sich ein Fluoreszenzbild, das sich in seiner Struktur stark von der an Fibrinogenoberflächen unterschied (Abb. 4.16 vgl. Abb. 4.13). Es kam zu Beginn des Perfusionsexperiments zur Adhäsion von einzelnen Plättchen (weniger als bei Fibrinogenoberfläche) und schließlich zur Bildung von größeren Thromben nach 5 min.

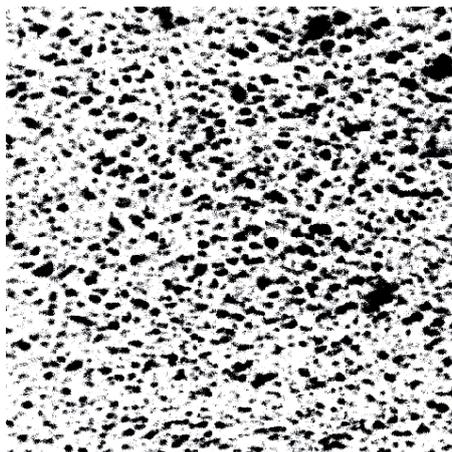


Abbildung 4.16: Fluoreszenzmuster der Thrombusbildung an Kollagen bei 1.500 s⁻¹.

Steigende Scherraten führten im Bereich von 13 s⁻¹ bis 4.440 s⁻¹ nach 5 min Perfusion zu einer annähernd proportional zur Scherrate ansteigenden Gesamtfluoreszenz (Abb. 4.17).

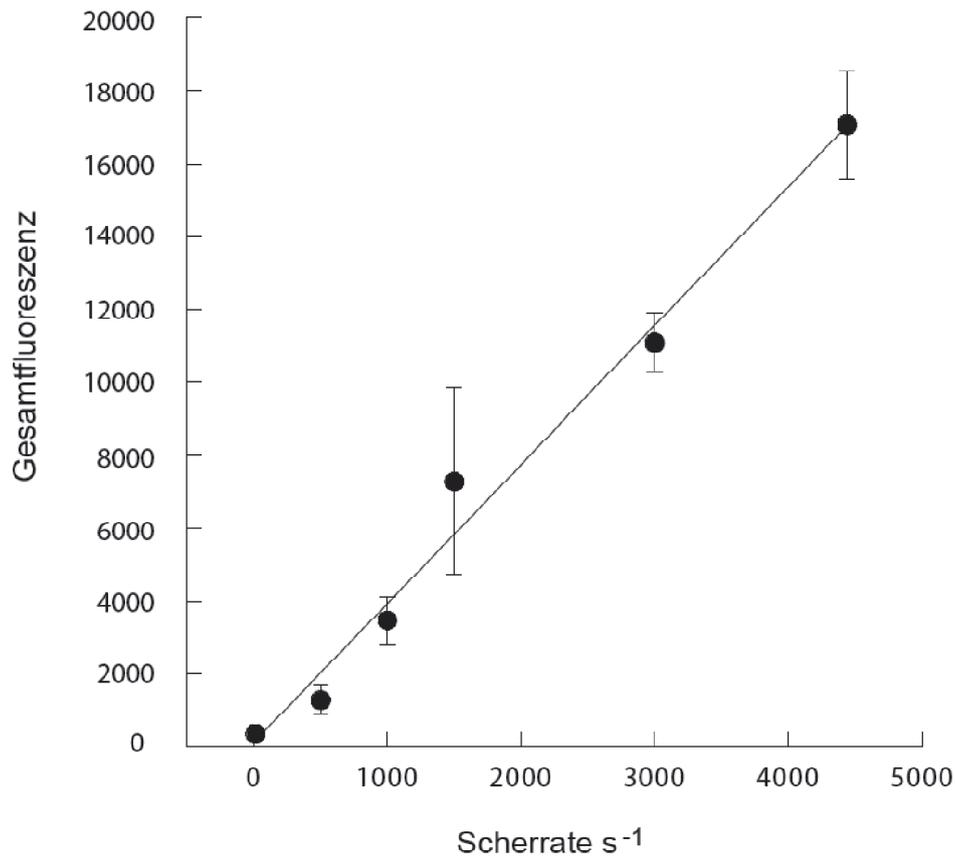


Abbildung 4.17: Adhäsion der Plättchen an Kollagen unter steigenden Scherraten.

4.6 Adhäsion im Bereich einer Endothelläsion

Die Simulation einer Gefäßwandläsion und resultierenden Plättchenadhäsion unter flussdynamischen Bedingungen mit dem in dieser Arbeit entwickeltem Flusskammermodell sollte abschließend geprüft werden. Dazu wurden konfluente humane embryonale Gefäßendothelzellen mit CMTMR (Excitation/Emmission 540nm/566nm) gefärbt und mittels eines Platindrahts die subendothelial Matrix freigelegt. Die Perfusion mit CMFDA (Excitation/Emmission 492nm/516nm) gefärbten, gewaschenen Plättchen in Tyrodelösung ergab nach 5 min bei einer Scherrate von $13 s^{-1}$ eine Ansammlung von adhärenenten Thrombozyten an der freigelegten extrazellulären Matrix. Nach dem Versuch wurde die Thrombozytensuspension vorsichtig mit $PBS+Ca^{2+}+BSA$ aus dem System herausgespült, um

eventuelle unspezifische Fluoreszenzen von nicht adhärenen Plättchen zu entfernen. Die an der subepithelialen Matrix adhärenen Plättchen waren stabil und ließen sich nicht durch die Waschschrirte ablösen (Abb. 4.18)

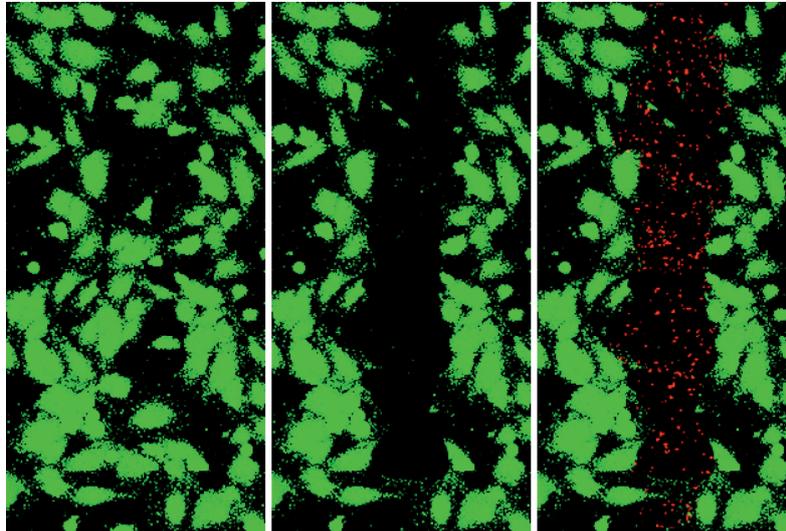


Abbildung 4.18. Plättchenadhäsion im Bereich einer Endothelläsion. Links die konfluent gezüchtete Endothelschicht (Fluoreszenz von CMTMR: grün). Die „schwarzen Flecken“ in der Darstellung sind dünn ausgezogene Zytoplasmasäume der angrenzenden Endothelzellen. In der Mitte sieht man die gleiche Stelle im Endothel mit einem künstlichen vertikal verlaufenden Endothelschaden vor Versuchsbeginn mit in der Mitte freiliegender subendothelialer Matrix. Das rechte Bild zeigt diesen Bereich nach dem Experiment bei 13 s⁻¹ nach 5 min. Es finden sich vereinzelte relativ gleichmäßig verteilte adhärenente Plättchen (Fluoreszenz von Mepacrin: rot).

5 Diskussion

Die Validität einer Methode, die über einen Sachverhalt spezifische, reproduzierbare Aussagen machen soll, ist grundsätzlich zu prüfen. Dazu müssen alle möglichen Einflussgrößen identifiziert werden, die die Ergebnisse grundlegend variieren können. Weiterhin ist von Bedeutung, Verfahren zu entwickeln, die möglichst ohne Einschränkung Messparameter liefern, die in vivo Verhältnisse ausreichend gut simulieren. Das Ziel dieser Arbeit war einerseits, ein valides Strömungsmodell zur Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung zu entwickeln, andererseits erste phänomenologische Charakteristika thrombozytärer Integrine und ihrer Liganden mit diesem Modell zu beschreiben.

5.1 Das Blutflussmodell

Zur Untersuchung der Plättchenadhäsion unter Flussbedingungen musste eine Simulation eines Blutgefäßes entwickelt werden. Sie bestand aus einem Perfusor, der eine voreinstellbar konstante Strömungsgeschwindigkeit lieferte und einer transparenten Strömungskammer, die durch Variation von Höhe und Breite des durchflossenen Volumens in Verbindung mit der Perfusionsgeschwindigkeit definierte, variierbare, wandnahe Scherraten generierte. Um die physikalischen Bedingungen der Strömung unabhängig von der Konstruktion der Strömungskammer und der verwendeten Flüssigkeit physikalisch zu beschreiben, wurde die vereinfachte Formel für die Scherrate eingesetzt. Durch Variation der Scherrate bzw. Art und Zusatz von Inhibitoren der Hämostase konnte dann ein Spektrum physiologischer und pathologischer flusssdynamischer Bedingungen untersucht werden.

Unabhängig von dieser künstlichen Umgebung sollte das Blut möglichst in seinen biologisch, biochemischen und rheologischen Eigenschaften unbeeinflusst bleiben. Da das Adhäsionsverhalten der Blutplättchen untersucht werden sollte, musste deren Integrität und Funktion durch die Vorgänge während der Präparation und Versuchsvorbereitung ebenso

nicht beeinflusst werden.

Eine Funktion von Plättchen ist die primäre Hämostase. Bei einer Verletzung des Endothels kommen als erstes Thrombozyten mit der extrazellulären Matrix in Kontakt, da die Thrombozyten unter laminaren Strömungsbedingungen hauptsächlich wandnah im Blutstrom zirkulieren [50].

Stoffwechsel und Funktionsäußerungen der Blutplättchen sowie ihre Rolle bei der Thrombusbildung werden maßgeblich durch die Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen im Thrombozyten und seiner Umgebung bestimmt. An Stelle von Chelatbildnern wie Zitrat oder EDTA erlaubte der Einsatz von D-Phenylalanyl-L-Prolyl-Arginin-Chlormethylketon (PPACK), eines Thrombininhibitors, eine Gerinnungshemmung ohne Beeinflussung der Kalziumkonzentration im Blut. Bei einer Hemmung der plasmatischen Hämostase wird mit PPACK die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin und damit die sekundäre Hämostase unterdrückt. Folglich lässt sich unter Einsatz von PPACK als Thrombininhibitor eine reine primäre plättchenabhängige Thrombenbildung unter experimentellen Bedingungen simulieren.

Beim ersten Kontakt mit subendothelialen Matrixproteinen spielen unter anderem Kollagenrezeptoren eine zentrale Rolle. Nach Kontakt und Bindung der Plättchen an Kollagen bzw. an den immobilisierten von-Willebrand-Faktor tritt eine Aktivierung der Thrombozyten auf. Unter Vergrößerung ihrer Oberfläche durch Pseudopodienbildung, Ausstülpfen von rezeptorreichen Vesikeln und Sekretion von Gerinnungsfaktoren beginnt die Bildung eines primären Thrombus durch Rekrutierung weiterer zirkulierender Thrombozyten [54].

Native Thrombozyten sind annähernd transparent. Um sie im Blutstrom erkennbar zu machen, mussten sie für Untersuchungen mittels Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden

Mepacrin ist ein weit verbreiteter und hinreichend untersuchter Farbstoff zur Markierung von Plättchen. Der Farbstoff beeinflusst die Funktion der Plättchen nicht und ist bei physiologischem pH-Wert membrangängig. Bei der Aufnahme in den Thrombozyten reicht

sich Mepacrin in den „dense bodies“ an, in denen ein deutlich niedrigerer pH-Wert als 7,4 vorliegt [44]. Durch diese pH-Wert Verschiebung kommt es zur Umverteilung von Elektronen im Mepacrinmolekül, das dann nach entsprechender Anregung fluoresziert. Neben den „dense bodies“ der Thrombozyten werden auch kernhaltige Zellen im Blut angefärbt. Dies zeigte sich im mit Propidiumjodid- und Mepacrin-markiertem Blutaussstrich. Beide Fluoreszenzfarbstoffe kolokalisieren zellkernnah.

Die Verwendung von CMFDA (Celltracker Green) zur Fluoreszenzmarkierung gewaschener Plättchen stellt eine alternative Fluoreszenzmarkierung dar. CMFDA ist ebenfalls membrangängig. Nach Abspaltung der Acetatgruppe durch zytoplasmatische Esterasen wird der Farbstoff impermeabel im Zytoplasma angereichert. Die Färbung kann nur in einem Puffersystem erfolgen, dem die Plasmaesterasen fehlen [45]. In vergleichenden aggregometrischen Untersuchungen gewaschener Plättchen, die ungefärbt waren oder mit Mepacrin bzw. CMFDA markiert wurden, konnte gezeigt werden, dass zwischen fluoreszenzmarkierten und nativen Plättchen kein Unterschied im Aggregationsverhalten bestand. Folglich konnte angenommen werden, dass Adhäsion und Aggregation der Plättchen durch Markierung mit Mepacrin nicht beeinflusst wird.

Bei der Blutentnahme aus den Kubitalvenen der Blutspender mit Stahlkanülen und Polyethylenschläuchen können Thrombozyten teilweise aktiviert werden. Hier tritt unter anderem ein „Shape change“ auf. Um die Plättchen wieder in die diskoide Form (charakteristisch für ihre ruhende Form) zu bringen, wurde es ausgenutzt, dass zur Färbung der Thrombozyten ein gewisser Zeitraum (ca. 1h) und eine gute Durchmischung des Blutes mit dem Farbstoff notwendig waren. Sanfte Agitation vermag nämlich den Aktivierungsvorgang wieder umzukehren und die Thrombozyten in ihren Ruhezustand zurückzusetzen [55].

5.2 Bildgebung, Bildverarbeitung und Bildauswertung

Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie ist Methode der Wahl zur Untersuchung der Interaktion zwischen zirkulierenden fluoreszenzmarkierten Blutzellen und künstlichen Oberflächen. Der Laser in seiner Eigenschaft als eindeutig bestimmtes paralleles Licht einer definierten Wellenlänge ist geeignet, farbstoffabhängig die gewünschten fluoreszenzmarkierten Zellelemente zu identifizieren. Kamerasysteme (analog und digital) sind wegen der geringen Fluoreszenzintensität und der damit verbundenen langen Belichtungszeit ungeeignet (Streifenbildung bei bewegten Objekten). Weiterhin besteht in der Lasermikroskopie die Möglichkeit, zeilenweise in einer Ebene gleichzeitig Fluoreszenz zu erzeugen und auszulesen; dies erlaubt eine zeitliche Differenzierung zwischen zwei Bildaufnahmen in unmittelbar übereinander liegenden Fokusebenen und somit die Unterscheidung zwischen statischen und bewegten Fluoreszenzpartikel bzw. Thrombozyten. Somit ist dieses Verfahren vergleichbar mit schnell hintereinander akquirierten Fotos. Man kann also erkennen, ob sich im untersuchten Bereich anhaftende Plättchen befinden oder nicht. Dazu sind eine geeignete Vergrößerung und eine korrekte Fokussierung notwendig.

Die geeignete Vergrößerung ergab sich aus der durchschnittlichen Größe der Thrombozyten und ihrer Fluoreszenz, die sich nach Adhäsion zum größten Teil im Zentrum der Thrombozyten befand, weil sich adhärenente Plättchen auf der thrombogenen Matrix flach ausbreiten und sich die fluoreszierenden „dense bodies“ im Zentrum des Thrombozyten sammeln. Durch die Begrenzung der digitalen Auflösung von 512 x 512 Pixeln wurde bei 100-facher optischer Vergrößerung erreicht, dass diese zentrale Fluoreszenz annähernd einem Pixel entsprach und somit durch Zählung der Pixel im Fluoreszenzbild Rückschlüsse auf die Anzahl adhärenenter Thrombozyten gezogen werden konnten. Mit diesem Aufbau war es möglich, Untersuchungen der Plättchenadhäsion unter Flussbedingungen durchzuführen. Hierzu wurden verschiedene Oberflächenbeschichtungen (Kollagen, BSA, Fibrinogenvarianten, verschiedene Fibrinogenkonzentrationen mit und ohne Fibrinogenrezeptorblocker (Abciximab), gezüchtete subendotheliale Matrix) untersucht.

5.3 Kritische Einflußgrößen

5.3.1 Fokusebene

Die Fokusebene ist die wichtigste unspezifische Einfluss-/ Störgröße überhaupt. Die auf ein Deckgläschen aufgebraute thrombogene Matrix ist wie das Glas selbst transparent. Die untersuchten Interaktionen finden auf der lumenseitigen Oberfläche dieser Matrix statt. Es musste also ein Weg gefunden werden, genau diese Interaktionsebene zu ermitteln.

In den verwendeten Fibrinogenlösungen finden sich im Mikrometerbereich mikroskopisch sichtbare, ungelöste Partikel, die in der Matrix fest integriert sind. Ein Fokussieren auf diese mikroskopisch sichtbaren Partikel in schnellem Zeilenscan (Fastscan) führte zu einem optimalen Fokus auf die Interaktionsebene.

Stellt man während eines Versuchs mit sicher zu erwartender Adhäsion von fluoreszierenden Teilchen fest, dass nur bewegte Teilchen in den Scans sichtbar werden, gibt es zwei fokusspezifische Möglichkeiten, warum dies so sein könnte:

1. Die Fokusebene ist nach unten unterhalb der thrombogenen Matrix verschoben (nur noch wenige rasch bewegliche Teilchen sichtbar).
2. Die Fokusebene ist nach oben in die Kammer oder sogar über das Lumen in den Plexiglasblock verschoben (man sieht viele relativ schnell bewegliche große und kleine Fluoreszenzen innerhalb des Blutstromes oder nur wenige oder gar keine Fluoreszenzen).

5.3.2 Scherrate

Variiert man die Scherrate, so kann eine scherratenabhängige Adhäsion der Thrombozyten beobachtet werden. Die Scherrate ist abhängig vom durchströmten Profil und der Perfusionsgeschwindigkeit. Das Profil wurde nicht variiert. Um die Scherrate zu verändern, wurde nur die Perfusionsgeschwindigkeit angepasst. Innerhalb der Versuchsreihen mit

gleichbleibender Beschichtung war somit die Scherrate die Haupteinflussgröße auf die Adhäsion. Um die bei Scherraten über 10000 s^{-1} druckbedingt entstehende Auslenkung des Deckgläschens zu reduzieren, wurden in späteren Untersuchungsreihen nicht Deckgläser, sondern Objektträger benutzt.

5.3.3 Auswertung der Versuchsergebnisse

Die Messungen während der Strömungsversuche lieferten Bildstapel von 3 Bildern von je 512×512 Pixeln im räumlichen Abstand von $0,1\ \mu\text{m}$, die im zeitlichen Abstand von 758 ms aufgezeichnet wurden. Durch Vergleich der ersten beiden Bilder dieser Stapel konnte zwischen adhärennten und bewegten Teilchen unterschieden werden. Eine computergestützte systematische Auswertung erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm „ImageJ“ von Wayne Rasband [56], das frei im Internet verfügbar war. Mit dieser Software ließen sich die registrierten Bilder mathematisch und logisch verknüpfen und anschließend analysieren. Durch Quantifizierung der Fluoreszenzpartikel konnte dann eine für die jeweilige Fragestellung qualitative Auswertung vorgenommen werden.

5.4 Phänomenologie der thrombozytären Integrine und ihrer Liganden im Flussmodell

Die thrombozytären Integrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ und $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ spielen eine wichtige Rolle bei der Thrombusbildung. Neben Fibrinogen kann Fibrin, von-Willebrand-Faktor, Vitronectin, Thrombospondin und CD40L an $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ binden. Hauptliganden für $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ ist Kollagen und Laminin [1,57].

5.4.1 Fibrinogen als Ligand für $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

5.4.1.1 Kontrollexperimente mit BSA und Abciximab

Zur Untersuchung der Spezifität der vermittelten Plättchenadhäsion wurde in einer frühen Versuchsreihe mit Fibrinogen in der thrombogenen Deckglasbeschichtung ein für den Fibrinogenrezeptor spezifischer, $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -blockierender Antikörper (der chimäre Maus-Menschantikörper Abciximab, ReoPro) in pharmakologisch relevanter Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ der sonst analog zu den anderen behandelten Blutprobe zugesetzt. Eine Probe mit bovinem Serumalbumin (BSA) als Deckglasbeschichtung wurde hierbei zum Vergleich hinzugezogen. Es zeigten sich sowohl für die Negativprobe (BSA) als auch für die Probe mit blockiertem Fibrinogenrezeptor keine Plättchenadhäsion. Somit konnte gezeigt werden, dass die Plättchenadhäsion auf fibrinogenbeschichteten Deckgläsern tatsächlich durch den Fibrinogenrezeptor vermittelt wird.

5.4.1.2 Fibrinogen-konzentrationsabhängige Plättchenadhäsion

Versuche basierend auf einer Verdünnungsreihe beginnend mit einer Konzentration von 2,5mg/ml Fibrinogen ergaben eine Abhängigkeit der Fibrinogenkonzentration in der Beschichtung der thrombogenen Oberfläche zur Gesamtzahl der Fluoreszenzpartikel und somit zur Adhäsion der Plättchen unter Flussbedingungen. Im Vergleich zur Gruppe um Ruggeri 1996, die eine Fibrinogen Konzentration von 2,0 mg/ml verwendeten (eine Konzentration, die die Glasoberfläche deutlich mit Fibrinogen sättigte) [61], konnte in den vorliegenden Experimenten unter arteriellen Flussbedingungen keine komplette Bedeckung der beschichteten Oberfläche mit Plättchen beobachtet werden. Somit stellt die verwendete Konzentration von 2,5 mg/ml Fibrinogen eine geeignete Konzentration dar, um die Dynamik der Plättchenadhäsion innerhalb der ersten 5 min zu untersuchen.

5.4.1.3 Scherraten-abhängige Plättchenadhäsion an Fibrinogen

In den Versuchen mit Fibrinogen der Firma Sigma-Aldrich, bei denen nur die Strömungsgeschwindigkeit variiert wurde, ergab sich ein Adhäsionsmaximum bei einer Scherrate von 1.800 s^{-1} bei der Betrachtung des Zustands nach 5 min Versuchszeit. Ab ca. 7.000 s^{-1} waren kaum noch adhärenente Plättchen zu erkennen. Dieser Messwertverlauf lässt sich mit einer zunächst scherratenabhängiger Voraktivierung erklären [58,59], bei der das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ seine Affinität gegenüber Fibrinogen durch eine Konformationsänderung erhöht [60]. Dies führt zu stabilerer Rezeptor-Ligand-Bildung und somit zu einer verstärkten Plättchenadhäsion an immobilisiertem Fibrinogen. Ab Scherraten von $>1.800\text{ s}^{-1}$ überstiegen dann die Scherkräfte die biomechanische Bindungskraft der Fibrinogenrezeptoren an der Plättchenoberfläche gegenüber immobilisiertem Fibrinogen der Deckglasbeschichtung, was zu einem „Abriss“ oder zu keiner primären Adhäsion der Plättchen führte. Die Fähigkeit zur primären Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen war demnach bei Scherraten $>7.000\text{ s}^{-1}$ überschritten.

5.4.1.4 Validierung

Der intra- und interindividuelle Vergleich (3 Spender, je 4 Versuche, Scherrate 1500 s^{-1} bei 5 min Perfusionsdauer) zeigte eine durchschnittliche Abweichung von 7,1%. Diese nur geringfügige Abweichung kann als Hinweis herangezogen werden, dass das Strömungsmodell valide Daten liefern kann.

5.4.1.5 Vergleich verschiedener Fibrinogenpräparationen

Im Fibrinogenmolekül existieren drei mögliche Peptidsequenzen, die als Bindungsstelle für $\alpha\text{IIb}\beta_3$ fungieren. Dies sind die Dodekapeptidsequenz der γ -Kette und zwei RGD-Peptidsequenzen der α -Kette. Ihren Einfluss in verschiedenen Präparationen konnte in dieser Arbeit dargestellt werden. Dazu wurden die Konzentrationsverhältnisse der einzelnen Ketten der verschiedenen Fibrinogenpräparationen nach Reduktion der 29 Disulfid-Brücken im

Fibrinogenmolekül durch die Auftrennung im PAGE erkenn- und quantifizierbar gemacht. Den größten Anteil hatte in allen Präparationen die β -Kette. Diese Kette ist im intakten Fibrinogenmolekül massgeblich strukturgebend und vermittelt keine Adhäsion [61]. In den jeweiligen Präparationen variieren die α - und die γ -Kette in ihren Konzentrationsverhältnissen. Die Bedeutung dieser variierenden Konzentrationsverhältnisse konnte in Adhäsionsexperimenten gezeigt werden:

In intaktem nativen Fibrinogen ist das Verhältnis zwischen den einzelnen Ketten 2:2:2. (α - β - $\gamma\gamma$ - β - α) Die densitometrisch unter reduzierenden Bedingungen gefundenen Konzentrationsverhältnisse der verschiedenen Ketten in den Präparationen wich von diesem Verhältnis ab. Daher mußten in den nativen Präparationen neben dem Anteil an intaktem Fibrinogen in jeder Präparation auch Anteile von freien Ketten (α, β, γ) bzw. unvollständigem Fibrinogen vorliegen.

Unabhängig von der Verteilung der Fibrinogenfragmente limitiert die unter reduzierenden Bedingungen im PAGE gefundene geringste Menge einer Kette rein rechnerisch die maximal mögliche Molekülanzahl an intaktem Fibrinogen (α -Kette Sigma-Aldrich, CalBiochem, γ -Kette Ruggeri-Präparation). Dass trotz geringerem maximal möglichen Anteil an intaktem Fibrinogen bei Sigma-Aldrich (geringerer absoluter Anteil von α -Kette) eine höhere Plättchenadhäsion im Vergleich mit CalBiochem-Fibrinogen messbar war, könnte mit dem Einfluss des absolut höheren Anteil γ -Ketten begründet werden. In der Ruggeri-Präparation korreliert im Gegensatz dazu ein unter reduzierenden Bedingungen gefundener α -Ketten-Überschuss mit einer geringeren Plättchenadhäsion. Wird hingegen die α -Kette aus der Ruggeri-Präparation entfernt, kann das Gemisch aus freier β -Kette und freier γ -Kette allein eine Plättchenadhäsion in dieser Präparation über die Dodekapeptidsequenz der γ -Kette vermitteln. Die beobachtete Adhäsion ist jedoch geringer als die in den kommerziellen Präparationen, die die α -Kette enthalten.

Entscheidend für die Plättchenadhäsion ist demnach das tatsächliche Konzentrationsverhältnis der α - und γ -Kette in den einzelnen nativen Präparationen, das unter reduzierenden Bedingungen gefunden wurde. Ein α -Ketten-Überschuss scheint

hemmende Wirkung auf die Plättchenadhäsion zu haben. Dies unterstreicht die Bedeutung der RGD-Sequenzen für die Modulation der Plättchenadhäsion, die über $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ vermittelt wird. Hinweise darauf finden sich bei Mohri et al. [51].

In Anbetracht dieser Ergebnisse muss daher bei zukünftigen standardisierten Strömungsversuchen an Fibrinogen (analog auch bei Verwendung anderer geeigneter Matrixproteine als Oberflächenbeschichtung) in Hinblick auf das hier zu validierende Verfahren auch stets auf den Hersteller und/oder die Präparationsmethode hingewiesen werden, weil signifikante Einflüsse auf das Adhäsionsverhalten der Plättchen resultieren können.

5.4.2 Vergleich zwischen bovinem und humanem Fibrinogen

5.4.2.1 Homologievergleich

Der Homologievergleich zwischen bovinem und humanem Fibrinogen zeigte, dass die N-terminal gelegene RGD-Sequenz zusammen mit den flankierenden Aminosäuresequenzen hoch homolog sind. Hingegen variieren die Sequenzen im Bereich der zweiten RGD-Sequenz deutlich zwischen beiden Varianten. Im bovinen Fibrinogen liegen demnach die beiden RGD-Sequenzen dichter zusammen als im humanen Fibrinogen. Im bovinen Fibrinogen liegt die zweite RGD-Sequenz 320 Aminosäuren näher am N-terminalen Ende. Die C-terminalen Sequenzen der α -Ketten variieren deutlich. In Gegensatz zur α -Kette unterscheiden sich die β - und γ -Ketten beider Spezies nur geringfügig (s. Tab. 4.1). Die Dodekapeptidsequenz der γ -Ketten sind hochkonserviert.

5.4.2.2 Plättchenadhäsion

Die maximale Anzahl adhärenter Plättchen auf bovinem Fibrinogen fand sich bei einer Scherrate von 3000 s^{-1} und unterscheidet sich damit deutlich vom Maximum bei Humanfibrinogen (Adhäsionsmaximum: 1800 s^{-1}). Zusätzlich zeigt sich in der

mikroskopischen Übersicht ein unterschiedliches Verteilungsmuster fluoreszierender (adhärenter) Plättchen.

Ein Erklärungsansatz liefert die unterschiedliche Distanz der zweiten RGD-Sequenz von der ersten im Proteingerüst beider Fibrinogen-Varianten. Sie scheint Plättchenadhäsionsmodulierende Eigenschaften zu besitzen.

5.4.3 HPA-1 und Plättchenadhäsion

Das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ kommt beim Menschen in verschiedenen Varianten vor. Zwei dieser Varianten resultieren aus einem Polymorphismus des Gens der β3 -Untereinheit des Rezeptors. In diesem Fall besteht ein Basenaustausch an Position 1565 von Thymin nach Cytosin. Dieser Basenaustausch bedingt auf Proteinebene einen Einbau von Prolin (HPA-1b) anstelle von Leucin (HPA-1a) an Position 33 [32]. Dies führt zu einer veränderten räumlichen Struktur in der β3 -Untereinheit des Rezeptors. In einer Multi-Center-Studie (LURIC) mit 3261 Patienten davon 1175 mit Myocardinfarkt, 1211 mit KHK und bisher ohne Myocardinfarkt, 571 Kontrollpatienten und 793 Gesunden (Blutspender) konnte in einer spezifischen Untergruppe (Patienten mit Myokardinfarkt) ein Einfluss des HPA-1b gefunden werden. Im gruppeninternen Vergleich („case-only design“) fand sich das HPA-1b-Allel häufiger und das Alter der HPA-1b-träger war geringer. Der Herzinfarkt trat bei diesen Patienten im Median 5,2 Jahre früher auf, wenn sie HPA1b positiv waren. Dieser Unterschied war signifikant.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich von gesunden Probanden und KHK-Patienten in Hinblick auf den HPA-1-Polymorphismus bei Manifestation des Myokardinfarkts („case-control design“). Die Autoren dieser Studie folgern, dass eine erhöhte Plättchentrombogenität bei HPA-1b-Trägern in Verbindung mit dem Vorliegen arteriosklerotischer Läsionen die Erklärung für dieses Phänomen sein dürfte (Abb. 5.1) [32,34].

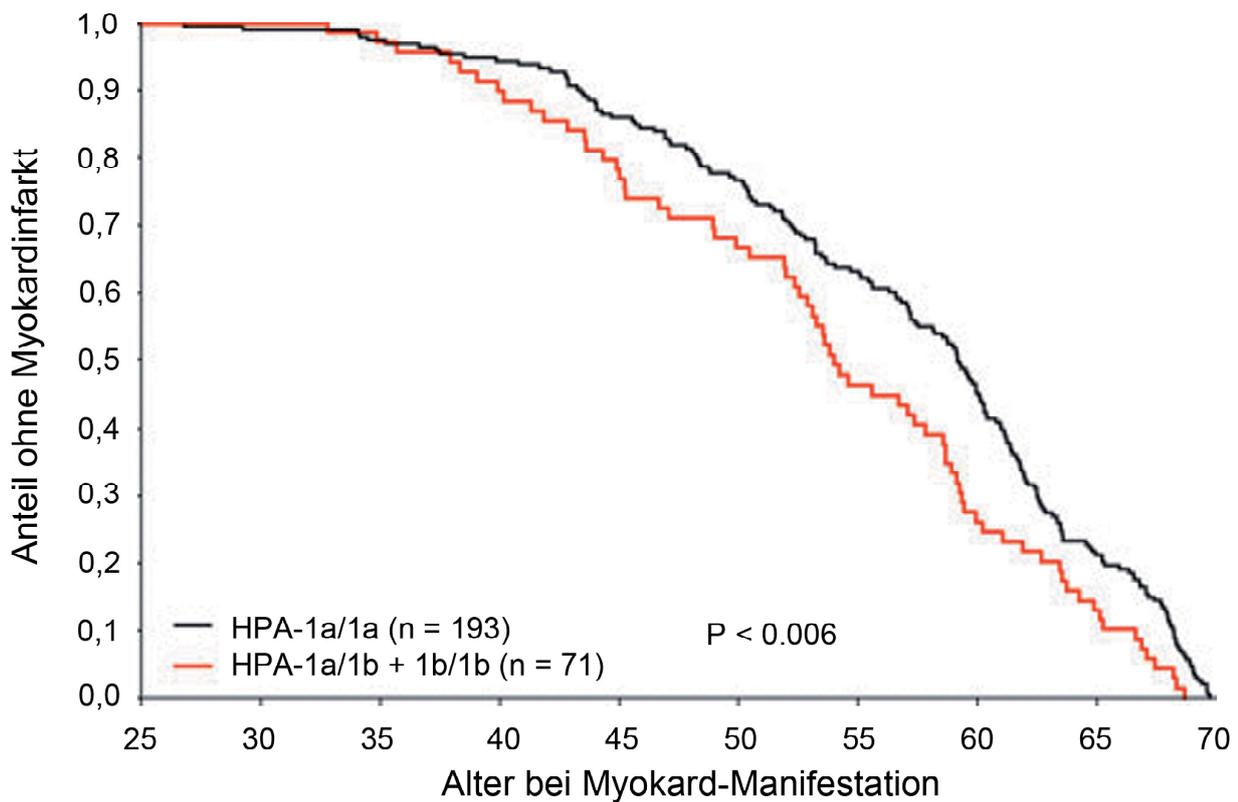


Abbildung 5.1: Der Plot zeigt das Alter der Patienten, in dem sie ihren Herzinfarkt erlitten. Verglichen wurden dabei HPA-1b-positive (rot) KHK-Patienten mit HPA-1b-negativen KHK Patienten (schwarz). Bei KHK-Patienten, welche Träger des HPA-1b-Genotyps sind, tritt ein Myokardinfarkt im Median 5,2 Jahre früher auf. (Rel.Risiko 1.47, 95% Konfidenzintervall 1.1–2.0, $p=0.006$)

Die wenigen zum Vergleich der beiden Polymorphismen durchgeführten Experimente ließen bei einer niedrigen Scherrate (13 s^{-1}) einen signifikanten Unterschied erkennen. Es kam zu ca. 30% mehr Adhäsion im Vergleich mit dem von Plättchen HPA-1b negativen Individuen. Sollte sich dieser Effekt in einer systematischen Untersuchung als tatsächlich gegeben herausstellen, ließe sich daraus ein Hinweis für den Grund eines früheren Auftretens eines Herzinfarkts bei HPA1b positiven Individuen mit KHK ableiten.

5.5 Kollagen als Ligand für $\alpha_2\beta_1$

Kollagen S ist eine definierte Mischung aus 95 % Kollagen Typ I und 5 % Kollagen Typ III. Es diente für die Beschichtung in Strömungsexperimenten auf Kollagen als thrombogene Matrix. Die Deckgläschen für die Züchtung von Endothelzellen wurden ebenfalls mit Kollagen S beschichtet.

Das Verhalten der Plättchen gegenüber diesem Kollagen unterschied sich im untersuchten Scherratenbereich deutlich von der gegenüber Fibrinogen. Es zeigte sich über den gesamten Bereich von 0 bis 4400 s^{-1} eine annähernd proportionale Zunahme der Fluoreszenz als Parameter der Adhäsion bei steigender Scherrate. Selbst bei Scherraten, in der bei Fibrinogen schon wieder eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz erkennbar war, konnte bei den Versuchen mit Kollagen noch keine Abnahmetendenz beobachtet werden. Das statische mikroskopische Übersichtsbild zeigte im Falle von Kollagen als thrombogene Matrix mehrere lokal gehäufte große Fluoreszenzen welche primären Thromben entsprechen könnten. Im dynamischen Bild unter Strömung waren diese Fluoreszenzen zwar ortstabil, jedoch in geringem Maße mobil ("wie Algen in einem Bach").

Fibrinogen als thrombogene Matrix hingegen führte zu einem homogenen unbeweglichen Fluoreszenzmuster.

Tritt Kollagen mit Integrin $\alpha_2\beta_1$ in Kontakt, kommt es zu einer vollständigen Aktivierung des Plättchens, mit Aktivierung des Integrins $\alpha IIb\beta_3$ und zu einer Entleerung der prothrombotischen Stoffe der α -Granula des Thrombozyten. Im Gegensatz zu Fibrinogen kommt es zu einem inside-out-Signaling, welches zur Bildung eines primären Plättchenthrombus führen kann. Dies ist vor allem deshalb möglich, weil der aktivierte Fibrinogenrezeptor auch frei gelöstes Fibrinogen an sich binden kann. In vivo würde sich im Verlauf ein Plättchen-Fibrin-Thrombus bilden. In den hier durchgeführten Versuchen mit PPACK antikoaguliertem Blut kommt es jedoch nicht dazu, da Thrombin, das zur Fibrinogenspaltung notwendig ist, gehemmt wird. Es bilden sich daher nur primäre Plättchenthromben über Fibrinogenbrücken.

Bei fehlender Aktivierung des Plättchens kommt es zu keiner aktivierenden Konfigurationsänderung am Fibrinogenrezeptor. Eine Adhäsion einzelner Plättchen an der Fibrinogenbeschichtung kann nur am niedrigaffinen ruhenden Fibrinogenrezeptor erfolgen.

5.6 Extrazelluläre Matrix und Endothelschaden

Zur weiteren Annäherung der Simulation an das tatsächliche komplexe Interaktionsverhalten von Blutplättchen innerhalb eines Gefäßes *in vivo*, musste eine „*In-vivo-nahe*“ Situation konstruiert werden. Zu diesem Ziel wurden, wie im Methodenteil beschrieben, Endothelzellen direkt auf den zu untersuchenden Deckgläschen bis zur vollständigen Bedeckung des zu untersuchenden Bereichs (Konfluenz) kultiviert und anschließend noch für 48 h inkubiert. Der gewünschte Effekt dieser längeren Inkubation sollte zur Ausbildung einer geschlossenen Schicht von extrazellulären Matrix-Proteinen dienen, wie sie in der Gefäßwand subendothelial vorkommen.

Zu Beginn des Versuchs wurde mittels Platindrähten in der geschlossenen Zellschicht eine in ihrer Ausdehnung reproduzierbare Endothelzellläsion gesetzt. In diesem von Zellen befreiten Bereich lagen nun neben dem Kollagen S, welches für die Kultivierung der Endothelzellschicht auf Glas notwendig ist, die von den Endothelzellen produzierten Matrixproteine frei.

Die Versuche wurden bei einer niedrigen Scherrate durchgeführt, um nicht zu riskieren, daß sich die Endothelzellschicht ablöst. Da Mepacrin auch Endothelzellstrukturen anfärben kann, wurden diese Versuche nicht mit mepacringefärbten Plättchen in Vollblut durchgeführt. Stattdessen wurden gewaschene, mit CMFDA gefärbte Plättchen resuspendiert in Tyrode-Puffer eingesetzt. Gegen Ende des Versuchs zeigten sich, einzelne adhärente Plättchen im Spalt zwischen den noch intakten Zellen auf der extrazellulären Matrixschicht.

Um Versuche mit mepacringefärbten Plättchen in Vollblut durchführen zu können, wurde die gesamte Endothelzellschicht abgelöst, so daß die extrazelluläre Matrix freilag.

5.7 Fazit

Nach eingehender Prüfung des Systems „Strömungskammer“ wurde erkannt, dass durch kleine Manipulationen an den Versuchsbedingungen sehr feine Details der Plättchenadhäsion messbar wurden. Im Laufe der Validierung konnten durch Optimierung aller Arbeitsvorgänge und Einstellungen der Einfluss von Störgrößen minimiert werden.

Basierend auf der Anwendung der Strömungskammer für hämostaseologische Fragestellungen können daher weitere experimentelle Ansätze verfolgt werden.

5.8 Aussichten

Die Strömungskammer in ihrer jetzigen Form bietet noch viele weitere Einsatzmöglichkeiten. Einige, wie der Einfluss des HPA-1-Polymorphismus, quantitative Untersuchungen der Adhäsion und die primäre Thrombusbildung an Kollagen und gegebenenfalls an extrazellulärer Matrix in 2D und 3D sind aktuell am Institut Gegenstand intensiver Untersuchungen.

Die bisher erfasste Menge von einigen tausend Fluoreszenzbildern können außerdem Basis für weitere Untersuchungen sein. So lässt sich aus den Bildstapeln nicht nur zwischen adhärennten und dynamischen Teilchen unterscheiden, sondern ließe sich z.B. auch das Phänomen des Tethering, also das erste Anhaften des Plättchens, und das Spreading, das Ausbreitens des Plättchens infolge des Kontaktes mit der adhäsiven Oberfläche, durch genauen Vergleich der Bildstapel untersuchen. Plättchen mit gestörter Funktion könnten schon in diesen Vorgängen von der Norm abweichen. Diese Art von Untersuchungen könnte dazu beitragen, den Einfluss einer Plättchenstörung auf die Hämostase näher zu analysieren.

5.9 Vergleiche mit bereits publizierter Literatur

Das Ziel dieser Arbeit war, die Grundlage für systematische Untersuchungen der Hämostase unter Flußbedingungen legen.

Dies setzte voraus, dass die gefundenen Ergebnisse vergleichbar mit denen anderer Forschungsgruppen zu diesem Thema sind. Dass dies der Fall ist, läßt sich beim Studium zweier Arbeiten von unterschiedlichen Gruppen erkennen.

Die Gruppe um Ruggeri und Savage am The Scipps Research Institute in La Jolla veröffentlichte 1996 in Cell eine grundlegende Arbeit zu diesem Thema [61]. Sie zeigt das Adhäsionsverhalten von Plättchen unter Flussbedingungen an Fibrinogen als thrombogene Matrix. Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse decken sich grundlegend mit den Ergebnissen unter vergleichbaren Bedingungen, die in den Experimenten dieser Arbeit gefunden wurden. Die Arbeit von Savage und Ruggeri beschreibt, dass bei niedrigen Scherraten nur wenig Plättchen adhären sind. Zunehmende Scherkräfte führen bei der gleichen Scherrate wie in dieser Arbeit beschrieben zu einem Adhäsionsmaximum. Bei einer Scherrate von 10000s^{-1} konnte keine Adhäsion mehr nachgewiesen werden.

Eine andere Arbeitsgruppe um Jan J. Sixma an der UMC Utrecht veröffentlichte ebenfalls 1996 eine Arbeit in Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology die annähernd die gleiche Scherrate erwähnt, bei der ein Adhäsionsmaximum von Thrombozyten unter Fluß zu finden ist nämlich 1600s^{-1} [62].

Die hier erwähnten publizierten Daten bestätigen unsere Befunde und damit die Validität des von uns aufgebauten Modellsystems.

6 Zusammenfassung

In der experimentellen Arbeitsgruppe am Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin wurde ein Modellsystem aufgebaut, das physiologische und pathologische Flussverhältnisse simuliert und Untersuchungen zur Reaktion von Thrombozyten und ihren Oberflächenrezeptoren mit Plasmaproteinen im strömenden antikoagulierten Vollblut erlaubt. In diesem Modell können unterschiedliche Scherkräfte erzeugt werden, wie sie in verschiedenen Kreislaufabschnitten herrschen. Um eine Freilegung des Subendothels bei einer Gefäßwandschädigung nachzuahmen, wurden Deckgläschen in die Flusskammer eingesetzt, die zuvor mit Fibrinogen, Kollagen, extrazellulären Matrixproteinen oder BSA beschichtet und dabei immobilisiert worden waren. Nach Markierung mit Mepacrin oder CMFDA wurde die Adhäsionsaktivität der Thrombozyten gegenüber Adhäsivproteinen mikroskopisch erfasst und digital ausgewertet. Auf gerätebedingte Einflüsse bei der Bildakquisition und -auswertung wurde besonders geachtet. Untersucht wurden verschiedene humane Fibrinogenpräparationen und bovines Fibrinogen. Je nach Herkunft des Fibrinogens zeigte sich ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten der Thrombozyten bei Scherraten von $< 1000 \text{ s}^{-1}$ oder $> 1000 \text{ s}^{-1}$. Steigende Fibrinogenkonzentrationen (bis 2,5 mg) führten bei 1.500 s^{-1} zu einer Zunahme der Thrombozytenadhäsion. Unter schrittweiser Erhöhung der Scherraten bis 8000 s^{-1} wurde ein Maximum der Adhäsion bei 1.800 s^{-1} , danach ein Abfall mit asymptotischem Verlauf gefunden. Abciximab, ein monoklonaler Antikörper, der die Bindung von Fibrinogen an den Integrinrezeptor $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa) auf der Plättchenoberfläche blockiert, hemmte die Thrombozytenadhäsion nahezu vollständig. Untersuchungen zum HPA-1-Polymorphismus von $\alpha\text{IIb}\beta_3$ zeigten, dass die HPA-1b-Variante des Rezeptors zu einer signifikant höheren Adhäsion führt als HPA-1a. Wurden die Versuche mit extrazellulären Matrixproteinen oder Kollagen durchgeführt, so ergab sich im Vergleich zu Fibrinogen ein völlig anderes Adhäsionsverhalten. Bei Scherraten von $> 4.000 \text{ s}^{-1}$ war die Thrombozytenadhäsion an Kollagen immer noch stabil. Diese Reaktion wird nicht durch $\alpha\text{IIb}\beta_3$, sondern durch thrombozytäre Kollagenrezeptoren vermittelt. Die Ergebnisse der Arbeit belegen, dass Modelluntersuchungen mit den hier

beschriebenen Techniken ein geeignetes und vielversprechendes Verfahren sind, um die Wechselwirkung von Thrombozytenrezeptoren mit immobilisierten Adhäsivproteinen unter Strömungsbedingungen zu charakterisieren.

Tobias Niesen

April 2011

7 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäuresequenz
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CMFDA	<u>C</u> hloro <u>m</u> ethy <u>f</u> luorescein <u>d</u> i <u>a</u> acetat
CMTMR	(<u>C</u> hloro <u>m</u> ethy <u>t</u> etra <u>m</u> ethyl <u>r</u> hodamin)
EDTA	Etyldiamintetraessigsäure
FBS	(fetal bovine serum)
hEGF	(human recombinant Epidermal Growth Factor)
hFGF-B	(human Fibroblast Growth Factor with heparin)
HPA	humanes Plättchenantigen
HUVEC	human umbilical venous cell
IgG	Immunglobulin G
INR	International Ratio
KHK	koronare Herkrankheit
MIT	Massachusetts Institute of Technology
mRNA	messenger-Ribonucleinacid
PAGE	Poly-acrylamid-gel-elektrophorese
PBS	bufferd saline solution
PPACK	D- <u>P</u> henylalanin- <u>P</u> roline- <u>A</u> rginin- <u>C</u> hloromethyl <u>k</u> eton
R3-IGF-1	(Human Recombinant Insulin-like Growth Factor)
REM	Rasterelektronenmikroskop
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIFF	tagged image file format
VEGF	(Vascular Endothelial Growth Factor)

8 Abbildungsverzeichnis

Einleitung:

- 1.1: Ruhender Thrombozyt (REM)
- 1.2: Aktivierter Thrombozyt (REM)
- 1.3: Aggregation – Fibrinogenbrücke zwischen zwei Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Molekülen

Methoden:

- 3.1: Mit dem Endothelzell-Zuchtmedium EBM-2 befüllter Endothelzuchtnapf
- 3.2: Plexiglasblock zur Erzeugung eines Endothelschaden
- 3.3: Mepacrinmolekül
- 3.4: Mikroskop-Arbeitsplatz
- 3.5: Kammer in Mikroskophalterung
- 3.6: Verknüpfungsergebnisse

Ergebnisse:

- 4.1: Aggregation nativer, gewaschener gefärbter bzw. ungefärbter Plättchen
- 4.2: Blutausstrich mit Mepacrin- und Propidiumjodid-gefärbte Plättchen und Leukozyten
- 4.3: Mikroskopischer Bildausschnitt mit korrektem Fokus
- 4.4: Plättchenadhäsion in Abhängigkeit von der Fibrinogenkonzentration
- 4.5: Plättchenadhäsion an humanem Fibrinogen (2,5 mg/ml) bei zunehmenden Scherraten.
- 4.6: Spezifität der Plättchenadhäsion bei 1500s^{-1} an Fibrinogen.
- 4.7: Inter- und intraindividuellem Vergleich von Versuchsergebnissen dreier Spender (HPA-1 negativ)
- 4.8: Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) verschiedener der Fibrinogenpräparationen
- 4.9: Densitometrie der PAGE.
- 4.10: Plättchenadhäsion an verschiedene Fibrinogentypen bei 1.500 s^{-1}
- 4.11: Homologievergleich der α -Ketten (FGA) des humanen Fibrinogens mit dem aus Bos Taurus

- 4.12: C-terminale integrinbindende Konsensussequenz der g-Kette
- 4.13: Einfluss von humanem und bovinem Fibrinogen auf das Adhäsionsverhalten der Plättchen
- 4.14: Mikroskopisches Übersichtsfluoreszenzbild
- 4.15: Plättchenadhäsion bei einer Scherrate von 13 s^{-1} in Abhängigkeit von der jeweiligen Polymorphismusausprägung.
- 4.16: Fluoreszenzmuster der Trombusbildung an Kollagen bei 1.500 s^{-1} .
- 4.17: Adhäsion der Plättchen an Kollagen unter zunehmender Scherrate.
- 4.18: Adhäsion im Bereich einer Endothelläsion.

Diskussion

- 5.1: Der Plot zeigt das Alter der Patienten, in dem sie den ersten Herzinfarkt erlitten.

9 Tabellenverzeichnis

Ergebnisse

- 4.1: *Vergleich der Fluoreszenzfarbstoffe Mepacrin und CMFDA.*
- 4.2: *Scherraten in s^{-1} bei gegebener Flussrate in ml/h in Abhängigkeit der Höhe der Strömungskammer in μm .*
- 4.3: *Flussrate in ml/h bei gegebener Scherrate in s^{-1} in Abhängigkeit der Höhe der Strömungskammer in μm .*
- 4.4: *P-Werte im gepaarten T-Test bei Vergleich der Mittelwerte untereinander*
- 4.5: *Ergebnisse des Homologievergleichs zwischen humanem und bovinem Fibrinogen*

10 Literatur

- 1 Gawaz M. Das Blutplättchen Thiemeverlag Stuttgart 1999
- 2 Khansari N, Fudenberg HH. Immune elimination of aging platelets by autologous monocytes: role of membrane-specific autoantibody. Eur J Immunol. 1983 Dec;13(12):990-4. Retraction in: Khansari N. Eur J Immunol. 1985 Apr;15(4):416.
- 3 REM Aufnahme P.Groscurth, Zürich, aus Klinke/Silbernagel Lehrbuch der Physiologie Thiemeverlag Stuttgart 1996
- 4 Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC, Molecular Mechanisms of Platelet adhesion and activation. Int J Biochem Cell Biol 1997; 29; 91-105
- 5 Siess W. Molecular Mechanisms of platelet activation Physiol Rev 1989; 69: 58-178
- 6 Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC, Molecular Mechanisms of Platelet adhesion and activation. Int J Biochem Cell Biol 1997; 29; 91-105
- 7 Forman WB, Barnhart MI. Cellular site for fibrinogen synthesis. JAMA. 1964 Jan 11;187:128-32.
- 8 Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science 1980 Jul 25;209(4455):497-9
- 9 Huang S, Mulvihill ER, Farrell DH, Chung DW, Davie EW. Biosynthesis of human fibrinogen. Subunit interactions and potential intermediates in the assembly J. Biol. Chem., 1993 Apr. 268 (12):8919-8926

10 Hall CS, Slayter HS. The fibrinogen molecule: its size, shape, and mode of polymerization. *J Biophys Biochem Cytol.* 1959 Jan 25;5(1):11-6.

11 D'Souza SE, Ginsberg MH, Burke TA, Lam SC-T, Plow EF. Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. *Science* 1988; 242, 91-93.

12 Charo IF, Nannizzi L, Phillips DR, Hsu MA, Scarborough RM. Inhibition of fibrinogen binding to GP IIb-IIIa by a GP IIIa peptide. *J. Biol. Chem.* 1991; 266, 1415-1421.

13 Santoro SA, Lawing WJ Jr. Competition for related but nonidentical binding sites on the glycoprotein IIb-IIIa complex by peptides derived from platelet adhesive proteins. *Cell* 1987; 48, 867-873.

14 D'Souza SE, Ginsberg MH, Matsueda GR, Plow EF. A discrete sequence in a platelet integrin is involved in ligand recognition. *Nature (London)* 1991; 350, 66-68.

15 Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48, 549-554.

16 Haverstick DM, Cowan JF, Yamada KM, Santoro SA. Inhibition of platelet adhesion to fibronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor substrates by a synthetic tetrapeptide derived from the cell-binding domain of fibronectin. *Blood* 1985; 66, 946-952.

17 Gartner TK, Bennett JS. The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets. *J. Biol.*

Chem. 1985; 260, 11891-11894.

18 Plow EF, Pierschbacher MD, Ruoslahti E, Marguerie GA, Ginsberg MH. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. Proc. Natd. Acad. Sci. USA 1985; 82, 8057-8061.

19 Hawiger J, Kloczewiak M, Bednarek MA, Timmons, S. Platelet receptor recognition domains on the alpha chain of human fibrinogen: structure-function analysis. Biochemistry 1989; 28, 2909-2914.

20 Peerschke EIB, Galankis DK. The synthetic RGDS peptide inhibits the binding of fibrinogen lacking intact alpha chain carboxyterminal sequences to human blood platelets. Blood 1987; 69, 950-952.

21 Plow EF., Pierschbacher MD, Ruoslahti E, Marguerie G, Ginsberg MH. Arginyl-glycyl-aspartic acid sequences and fibrinogen binding to platelets. Blood 1987; 70, 110-115.

22 Cheresh DA., Berliner SA., Vicente V, Ruggeri ZM. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. Cell 1989; 58, 945-953.

23 Hawiger J, Timmons S Kloczewiak M, Strong DD & Doolittle RF. Gamma and alpha chains of human fibrinogen possess sites reactive with human platelet receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982; 79, 2068-2071

24 Roberts IAG, Murray NA. Thrombocytopenia in the newborn. In: Michelson AD, Ed. Platelets. San Diego: Academic Press 2002; 635-658.

25 Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, 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.

26 Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ: A Polymorphism of a Platelet Glycoprotein Receptor as an Inherited Risk Factor for Coronary Thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334:1090-1094.

27 Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendrix C, Coleman L, Hamlington J, Barnard MR, Kickler T, Christie DJ, Kundu S, Bray PF. Platelet GP IIIa PIA polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 2000; 101:1013–1018

28 Szczeklik A, Undas A, Sanak M, Frolow M, Wegrzyn W. Short report: relationship between bleeding time, aspirin and the PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa. *Br J Haematol* 2000; 110:965–967

29 Undas A, Brummel K, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. PI(A2) polymorphism of b3 integrins is associated with enhanced thrombin generation and impaired antithrombotic action of aspirin at the site of microvascular injury. *Circulation* 2000; 104:2666–2672

30 Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, Schmitz C, Sutherland PA, Silbershatz H, D'Agostino RB, Muller JE, Myers RH, Levy D, Tofler GH. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PIA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1142–1147

31 Vijayan KV, Liu Y, Dong JF, Bray PF. Enhanced activation of mitogen-activated protein kinase and myosin light chain kinase by the Pro33 polymorphism of integrin β 3. *J Biol Chem* 2003; 278:3860–3867

32 Zotz RB, Winkelmann BR, Nauck M, Giers G, Maruhn-Debowski B, Marz W, Scharf RE: Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: human platelet antigen 1b (HPA-1b/PIA2) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1998; 79:731-735.

33 Streifler JY, Rosenberg N, Chetrit A, Eskaraev R, Sela A, Dardik R, Zivelin A, Ravid B, Davidson J, Seligsohn U, Inbal A: Cerebrovascular events in patients with significant stenosis of the carotid artery are associated with hyperhomocysteinemia and platelet antigen-1(Leu33Pro) polymorphism. *Stroke* 2001; 32:2753-2758.

34 Zotz RB, Winkelmann BR, Muller C, Boehm BO, Marz W, Scharf RE: Association of polymorphisms of platelet membrane integrins α IIb(β)3 (HPA-1b/PI) and α 2(β)1 (α 807TT) with premature myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1522-1529.

35 Cole VJ, Staton JM, Eikelboom JW, Hankey GJ, Yi Q, Shen Y, Berndt MC, Baker RI: Collagen platelet receptor polymorphisms integrin α 2 β 1 C807T and GPVI Q317L and risk of ischemic stroke. *J Thromb Haemost* 2003; 1:963-70.

36 Andrioli G, Minuz P, Solero P, Pincelli S, Ortolani R, Lussignoli S, Bellavite P. Defective platelet response to arachidonic acid and thromboxane A₂ in subjects with PIA2

polymorphism of b3 subunit (glycoprotein IIIa). Br J Haematol 2000; 110:911–918

37 Lasne D, Krenn M, Pingault V, Arnaud E, Fiessinger JN, Aiach M, Rendu F. Interdonor variability of platelet response to thrombin receptor activation: influence of PIA2 polymorphism. Br J Haematol 1997; 99: 801–807

38 Goodall AH, Curzen N, Panesar M, Hurd C, Knight CJ, Ouwehand WH, Fox KM. Increased binding of fibrinogen to glycoprotein IIIa (HPA-1b, PIA2, Zwb) positive platelets in patients with cardiovascular disease. Eur Heart J 1999; 20:742–747,

39 Meiklejohn DJ, Urbaniak SJ, Greaves M. Platelet glycoprotein IIIa polymorphism HPA 1b (PIA2): no association with platelet fibrinogen binding. Br J Haematol 1999; 105:664–666

40 Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, O'Donnell CJ, Lipinska I, Sutherland PA, Mittleman M, Muller JE, D'Agostino RB, Levy D, Tofler GH. Platelet glycoprotein IIIa PI(A) polymorphism, fibrinogen, and platelet aggregability: the Framingham Heart Study. Circulation 2001; 104:140–144

41 Bennett JS, Catella-Lawson F, Rut AR, Vilaire G, Qi W, Kapoor SC, Murphy S, FitzGerald GA. Effect of the PIA2 alloantigen on the function of b3- integrins in platelets. Blood 2001; 97:3093–3099

42 Tyrode MV, Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 1910;20:2025

43 Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest. 1973 Nov;52(11):2745-2756.

44 Skaer RJ, Flemans RJ, McQuilkan S. Mepacrine stains the dense bodies of human platelets and not platelet lysosomes. Br J Haematol. 1981;49(3):435-8.

45 Baker GR, Sullam PM, Levin J. A simple, fluorescent method to internally label platelets suitable for physiological measurements. Am J Hematol. 1997;56(1):17-25.

46 Current Protocols in Immunology One-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins 8.4.1ff
1991

47 Current Protocols in Immunology Staining Proteins in Gels / Coomassie Blue Staining Basic
Protocol 8.9.1ff 1991

48 <http://rsb.info.nih.gov/ij>

49 Bild aus: <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/menus/process.html>

50 Coratti V, Eckstein EC. Regional platelet concentration in blood flow through capillary tubes. Microvasc Res. 1986;32(2):261-70.

51 Mohri H, Ohkubo T. The role of the RGD peptides and the gamma chain peptide of fibrinogen on fibrinogen binding to activated platelets. Peptides. 1993 Mar-Apr;14(2):353-7.

52 NCBI: Accession NP_000499.1 GI:4503689

53 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

54 Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. Thromb Haemost. 1997 Jul;78(1):611-6

55 Aursnes I. Preactivation and deactivation of blood platelets Thromb Haemost. 1982 Feb 26;47(1): 3-4

56 <http://rsb.info.nih.gov/ij>

57 André P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagner DD. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. Nat Med. 2002 Mar;8(3):247-52.

58. Brown CH 3rd, Leverett LB, Lewis CW, Alfrey CP Jr, Hellums JD. Morphological, biochemical, and functional changes in human platelets subjected to shear stress. J Lab Clin Med. 1975 Sep;86(3):462-71

59 Brown CH 3rd, Leverett LB, Lewis CW, Alfrey CP Jr, Hellums JD., Blood Cells. 1978;4(3):499-511. Platelet lysis and aggregation in shear fields.

60 Shimaoka M, Springer TA Therapeutic antagonists and conformational regulation of

integrin function. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2:703-716

61 Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* 1996 Jan 26;84(2):289-97.

62 Endenburg SC, Lindeboom-Blokzijl L, Zwaginga JJ, Sixma JJ, de Groot PG. Plasma fibrinogen inhibits platelets adhesion in flowing blood to immobilized fibrinogen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 May; 16(5):633-8.