

Aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin

Direktor: Univ.- Prof. Dr. med R.E. Scharf

**Die prothrombotische Variante von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in
Plättchen (HPA-1b) korreliert mit einem erhöhten
Rezeptor-assoziierten Outside-in Signaling**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

**vorgelegt von
Markus Hasse**

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf
Korreferent: Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

Inhaltsverzeichnis

<u>Einleitung</u>	4-14
<i>Interaktion zwischen Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und seinen Liganden</i>	6-7
<i>Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$-assoziiertes bidirektionales Signaling</i>	8-11
<i>Bedeutung der Tyrosinkinase Src für die Plättchenfunktion</i>	12-13
<i>Leu³³/Pro-Polymorphismus (HPA-1) von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$</i>	14
<u>Zielsetzung</u>	15
<u>Methoden und Materialien</u>	16-24
<i>Chemikalien und Lösungen</i>	16-18
<i>Plättchenpräparation</i>	19
<i>Plättchenadhäsion</i>	20
<i>Gelelektrophorese und Western Blotting</i>	21-22
<i>Densitometrie und statistische Methoden</i>	23
<i>Src-Aktivierung mit Thrombin</i>	23
<i>FACS-Analysen und Thromboxan B₂-ELISA</i>	24
<i>Epifluoreszenzmikroskopie</i>	24

<u>Ergebnisse</u>	25-42
<i>Thrombozytencharakterisierung</i>	25-26
<i>Src-Aktivität in Thrombin-stimulierten Plättchen</i>	27-28
<i>Src-Aktivität in statisch adhärenen Plättchen an Fibrinogen in Relation zum HPA-1 Polymorphismus</i>	29-31
<i>Wirkung von MnCl₂ auf die Src-Aktivität bei Fibrinogen-adhärenen Plättchen in Relation zum HPA-1 Polymorphismus</i>	32-36
<i>Wirkung von sCD40L auf die Src-Aktivität in Plättchen beider Genotypen</i>	37-40
<i>Co-Lokalisation von Src418 und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in Fibrinogen-adhärenen Plättchen</i>	41-42
<u>Diskussion</u>	43-50
<i>HPA-1b/1b-Plättchen zeigen eine vorzeitige Src-Aktivierung unter statischer Adhäsion an Fibrinogen</i>	44-45
<i>Synergetischer Effekt von Fibrinogen und MnCl₂ auf die Src-Aktivität in Relation zum HPA-1 Polymorphismus</i>	46-48
<i>sCD40L moduliert die Src-Aktivität in Plättchen</i>	49-50
<u>Zusammenfassung</u>	51-52

Literaturverzeichnis, Quellenangabe.....53-55

Abkürzungsverzeichnis.....56

Danksagung.....57

Lebenslauf.....58

Einleitung

Blutplättchen sind kernlose Zellelemente, die maßgeblich an der Blutstillung (Hämostase) beteiligt sind. Sie stellen zelluläre Abschnürungen megakaryozytärer Zellen im Knochenmark dar und sind an ihrer Oberfläche mit einer Reihe adhäsiver Rezeptormoleküle ausgestattet (Gawaz 2002, Scharf 2008). Im Rahmen der primären Hämostase können Plättchen an Strukturen der Extrazellulärmatrix (EZM) adhären, die bei Gefäßläsionen freigelegt werden. Über ihre Rezeptormoleküle können Plättchen Strukturproteine der Extrazellulärmatrix wie Kollagen oder adsorbierte Plasmaproteine binden (Gawaz 2002, Scharf 2008). Dadurch wird eine Plättchenaktivierung hervorgerufen, welche durch die Freisetzung vasoaktiver Stoffe (unter anderem Thromboxan A_2) und Plättchenaktivatoren (zum Beispiel ADP oder Serotonin) aus Speichergranula zur Rekrutierung weiterer Plättchen führt (Gawaz 2002, Scharf 2008, Shattil et al. 1999). Dies wird zum einen durch eine Formveränderung der Plättchen (sogenannter Shape change) gefördert, welche zu einer Oberflächenvergrößerung führt, so dass die Kontaktfläche für weitere im Blut zirkulierende Plättchen erhöht wird (Gawaz 2002). Zum anderen kommt es in stimulierten Plättchen zur Aktivierung des Integrinrezeptors $\alpha_{IIb}\beta_3$, welche die Quervernetzung der Plättchen über Adhäsivproteine im Plasma (Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor) ermöglicht (Gawaz 2002, Scharf 2008). Dies stellt einen entscheidenden Schritt der Aggregation bzw. arteriellen Thrombogenese dar (Gawaz 2002, Scharf 2008).

Das Plasmaprotein Fibrinogen besitzt hierbei eine zentrale Rolle, da es zum einen die Interaktion der Plättchen mit der EZM, zum anderen auch die Zell-Zell-Kontakte zwischen den Plättchen vermittelt (Gawaz 2002, Scharf 2008). Weitere im Blut zirkulierende Plättchen adhären so über die Bindung an Fibrinogen an bereits adhären Plättchen (sogenannte Koadhäsion, Gawaz 2002). Durch die sekundäre Hämostase (Gerinnungskaskade) kommt es zur Bildung von Fibrin, was die Bildung eines stabilen Plättchen-Fibrin-Thrombus unterstützt (Gawaz 2002, Scharf 2008).

Bei der Plättchenadhäsion und -aggregation spielen Integrinrezeptoren in der Zellmembran der Plättchen eine wichtige Rolle, da sie diese physiologischen Prozesse regulieren (Shattil et al. 1999, Oberfell et al. 2002, Arias-Salgado et al. 2003, Gawaz 2002). Integrine sind Membran-Glykoproteine, welche nicht nur auf der Oberfläche von Plättchen, sondern auf beinahe allen Körperzellen exprimiert werden (Gawaz 2002). Bei der Plättchenadhäsion binden Integrine über ihre extrazelluläre Domäne unter anderem Moleküle der EZM (Gawaz 2002). Außerdem dienen Integrine auch der Zell-Zell-Interaktion zwischen Plättchen bzw. der Zell-Zell-Vernetzung über Plasmaproteine bzw. Adhäsivproteine wie Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor, Fibronectin, Thrombospondin oder Vitronectin (Grawaz 2002, Shattil et al. 2004).

Auf der anderen Seite übermitteln Integrine intrazelluläre Signale über ihre zytoplasmatische Domäne. Dies geschieht durch die Interaktion mit einer Vielzahl von Signalmolekülen wie Kinasen und Phosphatasen, welche die Plättchenfunktion steuern und somit entscheidend an der Regulierung der Thrombozytenfunktion im Hämostasemechanismus bzw. der arteriellen Thrombogenese beteiligt sind (Gawaz 2002; Shattil et al. 1999 und 2004). Eine intakte Plättchenfunktion bzw. Thrombogenese ist demnach maßgeblich an funktionstüchtige Rezeptor- und Signalmoleküle gekoppelt.

Aus klinischer Sicht spielen Plättchen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarktes, indem sie unter anderem zur Entstehung der Atherosklerose durch die Sekretion endothelialer Wachstumsfaktoren beitragen (Gawaz 2002). Als entscheidender Faktor bei der Thrombogenese kann eine überschießende Plättchenfunktion auch zu einer gesteigerten Thrombusbildung führen, welche das Gleichgewicht zwischen Hämostase und Fibrinolyse pathologisch beeinflusst und zur Förderung thromboembolischer Komplikationen (nicht nur beim Myokardinfarkt) beiträgt (Gawaz 2002). Diese pathologischen Prozesse werden maßgeblich über molekulare und biochemische Prozesse gesteuert, welche vor allem durch Integrine und intrazelluläre Signalmoleküle vermittelt werden (Shattil et al. 1999). Es ist evident, dass Fehlfunktionen bzw. Fehlregulationen dieser Moleküle in Plättchen, wie sie zum Beispiel durch Mutationen entstehen, auch zur Manifestation krankhafter Ereignisse wie thromboembolischer Komplikationen beitragen.

Interaktion zwischen Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und seinen Liganden

Unter den Integrinrezeptoren besitzt der Integrinrezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit ca. 60.000 bis 100.000 Kopien auf Plättchen mit Abstand die größte Bedeutung (Gawaz 2002). Er macht 1-2% des Gesamtproteins in Plättchen aus (Gawaz 2002). Neben Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ existieren noch weitere Integrine wie zum Beispiel $\alpha_2\beta_1$ (Gawaz 2002). Über die Bindung von Fibrinogen trägt Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ zur Plättchenadhäsion und -aggregation bei. Neben Fibrinogen können auch andere Moleküle wie zum Beispiel von-Willebrand-Faktor (vWF) oder Fibronectin als Liganden von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ fungieren (Grawaz 2002, Shattil et al. 1999). Als typisches Integrin besteht der Rezeptor besteht aus einer α - sowie einer β -Untereinheit, deren Strukturen genau charakterisiert sind. Die β_3 -Untereinheit besitzt ein Molekulargewicht von 90 kDa und besteht aus 762 Aminosäuren. Die α_{IIb} -Kette hat ein Molekulargewicht von 145 kDa bei 1008 Aminosäuren (Phillips et al. 2001). Dabei bestehen die Untereinheiten jeweils aus einer langen extrazellulären Domäne sowie kurzen transmembranären und zytoplasmatischen Domänen (je ca. 20 Aminosäuren) (Phillips et al. 2001). Die β A-Domäne auf der extrazellulären Seite der β_3 -Untereinheit und die sogenannte Propeller-Domäne der α_{IIb} -Untereinheit sind für die Interaktion mit Fibrinogen von entscheidender Bedeutung (Xiao et al. 2004).

Fibrinogen ist ein Hexamer und besteht aus je zwei α -, β - und γ -Ketten, wobei die α -Ketten je zwei RGD-Motive (Arginin-Glycin-Asparagin) und die γ -Ketten eine Dodekapeptidsequenz aufweisen (Gawaz 2002). Diese werden von der β A-Domäne des Integrinrezeptors erkannt und gebunden, was eine Phosphorylierung der β_3 -Untereinheit und eine Konformationsänderung des Rezeptors bewirkt (Phillips et al. 2001, Arias-Salgado et al. 2003, Xiao et al. 2004). Dies wiederum führt zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden und wird als Outside-in Signaling bezeichnet (s. u.).

Experimentell kann eine alternative Rezeptoraktivierung auch durch divalente Kationen wie Mangan erreicht werden (Craig et al. 2004, Litvinov et al. 2004). Mangan-Kationen haben verschiedene Einflüsse auf Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Zum einen führen sie zur direkten Aktivierung des Rezeptors über die Interaktion mit der sogenannten ADMIDAS-Sequenz auf der β_3 -Untereinheit, zum anderen stabilisieren sie die Bindung des Fibrinogens zur RGD-bindenden Sequenz (Litvinov et al. 2004).

Dies geschieht durch die Bindung der Mangan-Kationen an weitere Domänen der β_3 -Untereinheit, der sogenannten MIDAS und LIMBS- Region, was zu einer stärkeren Rezeptor-Ligandenbindung beiträgt (Litvinov et al. 2004). Des Weiteren triggert Mangan in Anwesenheit von Fibrinogen das Rezeptor-Clustering (Litvinov et al. 2004), welches ein elementarer Prozess für die Aktivierung intrazellulärer Kinasen, unter anderem der Src-Kinase, ist (Arias-Salgado et al. 2003, Shattil et al. 2004). In diesem Sinne kann man sowohl von einer direkten Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ durch Mangan-Kationen als auch von einer additiven Wirkung des Mangans im Sinne einer Affinitätssteigerung des Rezeptors zu seinem Liganden sprechen.

Neben den bereits genannten Liganden des Integrinrezeptors $\alpha_{IIb}\beta_3$ kann auch durch sCD40L (lösliche Form) eine Rezeptor-Ligand-Bindung induziert werden (Shattil et al. 2004, Andre et al. 2002). Abgesehen von seiner primären physiologischen Funktion bei der Modulation des Immunsystems spielt CD40L auch in der primären Hämostase eine wichtige Rolle (Andre et al. 2002). CD40L ist ein entscheidender Faktor für die Thrombusstabilität und das Thrombuswachstum und wird mit etwa 600-1000 Kopien auf Plättchen exprimiert (Andre et al. 2002). In seiner löslichen Form (sCD40L) bindet es über seine KGD-Sequenz (abweichend zur RGD-Sequenz des Fibrinogens) an die β_3 -Untereinheit von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und bewirkt eine Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors. Hierdurch kommt es zur Aktivierung des Outside-in Signalings (Andre et al. 2002, Prasad et al. 2003). Zudem zeigt sich in vitro bei gleichzeitiger Inkubation von Plättchen mit Fibrinogen und sCD40L eine Verstärkung der β_3 -Phosphorylierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Prasad et al. 2003) im Sinne einer additiven Wirkung von sCD40L und Fibrinogen.

Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziiertes bidirektionales Signaling

Eine Besonderheit von Integrinen ist das bidirektionale Signaling. Im inaktiven Zustand besitzt Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ nur eine sehr geringe Affinität zu löslichen Liganden wie plasmatischem Fibrinogen (Shattil et al. 1999). Es kommt in diesem Zustand nicht zur Bindung von löslichem Fibrinogen, wohl aber zur Bindung an immobilisiertes Fibrinogen. Es handelt sich dabei um bereits strukturell gebundenes (sprich immobilisiertes), nicht frei im Plasma zirkulierendes Fibrinogen (Shattil et al. 1999). Für die Bindung von löslichem Liganden (Plasma-Fibrinogen) bedarf es eines vorgelagerten Aktivierungsschrittes von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, dem sogenannten Inside-out Signaling (Shattil et al. 1999, Takagi et al. 2002). Hierbei kommt es zur intrazellulären Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ durch Plättchenagonisten wie ADP, Thrombin oder Kollagen. Diese triggern intrazelluläre Signale über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (zum Beispiel P2Y1 und PAR4), welche eine Konformationsänderung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ bewirken. Durch diese Konformationsänderung des Integrins wird die Affinität des Rezeptors gegenüber Liganden im Plasma deutlich erhöht (Shattil et al. 1999, Takagi et al. 2002). Die Ligandenbindung an den Integrinrezeptor bewirkt eine Konformationsänderung vom sog. „clamped state“ zum „unclamped state“ (Shattil 2004).

Neben Fibrinogen spielen in vivo auch andere Moleküle als alternative Liganden von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ wie von-Willebrand-Faktor, Fibronectin und auch sCD40L im Rahmen der primären Adhäsion eine wichtige Rolle (Gawaz 2002; Shattil et al. 1999). Die Konformationsänderung bzw. Aktivierung des Integrins geht unter anderem mit einer Phosphorylierung des Tyrosins 747 und 759 der β_3 -Kette einher (Shattil et al. 2004, Prasad et al. 2003, Phillips et al. 2001). Zugleich setzt die Aktivierung des Integrins seinerseits eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden in Gang, bei denen unter anderem Tyrosinkinasen eine wichtige Rolle spielen. Dieser Prozess wird als Outside-in Signaling bezeichnet (Shattil et al. 1999, 2004). Ein wichtiger Schritt bei der Aktivierung dieser Signalkaskade ist das sogenannte Rezeptor-Clustering von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Shattil et al. 2004). Dabei kommt es zur fokalen Zusammenlagerung von aktivierten, Liganden-bindenden Rezeptormolekülen, was durch laterale Bewegung innerhalb der Plasmamembran erreicht wird (Shattil et al. 2004).

Die Vernetzung der Integrinmoleküle verstärkt die Avidität des Rezeptor-Ligand-Komplexes und ist für die Aktivierung des Outside-in Signalings von Bedeutung (Shattil et al. 2004, Buensuceso et al. 2003).

Eine entscheidende Position innerhalb der Signalkaskade des Outside-in Signalings besitzt die Tyrosinkinase Src (Oberfell et al. 2002). Src ist einer Reihe von Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen vorgeschaltet, welche das Outside-in Signaling von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ vermitteln (Shattil et al. 2004, Oberfell et al. 2002). Wichtige Kinasen innerhalb dieser Signalkaskade sind das Src-Substrat Syk sowie RhoA-GTPasen, welche durch Syk-Substrate wie Vav-1, Vav-3 und SLP-76 aktiviert werden (Oberfell et al. 2002). Diese vermitteln die Signalübertragung auf das Zytoskelett, indem sie die Aktinpolymerisation fördern (Oberfell et al. 2002).

Die schematischen Zusammenhänge von Inside-out Signaling, Outside-in Signaling und Clustering, sowie der Interaktion mit dem Zytoskelett sind in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt. Das Outside-in Signaling von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ beeinflusst somit maßgeblich die essentiellen Plättchenfunktionen wie Spreading, „Shape change“, Plättchenadhäsion und -retraktion oder die Sekretion von Speichergranula, welche über Aktin-vermittelte Prozesse reguliert werden (Shattil et al. 1999, Oberfell et al. 2002). Spreading bezeichnet hierbei eine Formveränderung der Plättchen durch Abflachung und Ausbildung von Filopodien, welche durch zytoskelettale Reorganisation erreicht wird. In dieser Form bilden die Plättchen eine große Oberfläche aus und können dadurch besser miteinander oder mit der Extrazellulärmatrix in Kontakt treten (Gawaz 2002). Die Plättchenretraktion bezeichnet das Zusammenziehen der Plättchen, was maßgeblich zur Stabilität des Plättchenthrombus beiträgt (Gawaz 2002).

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zusammenhangs der Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ durch verschiedene Liganden und primärer Plättchenfunktionen, vermittelt durch die Integrin- assoziierte Outside-in Signaling-Kaskade

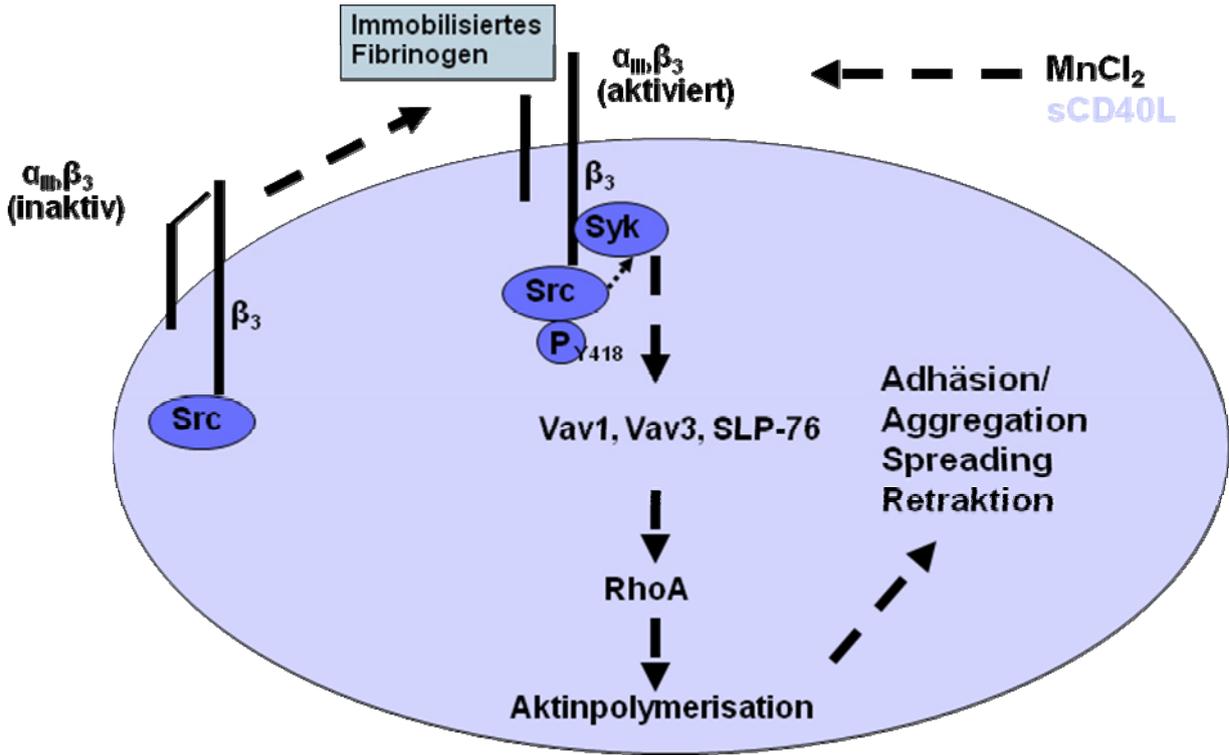
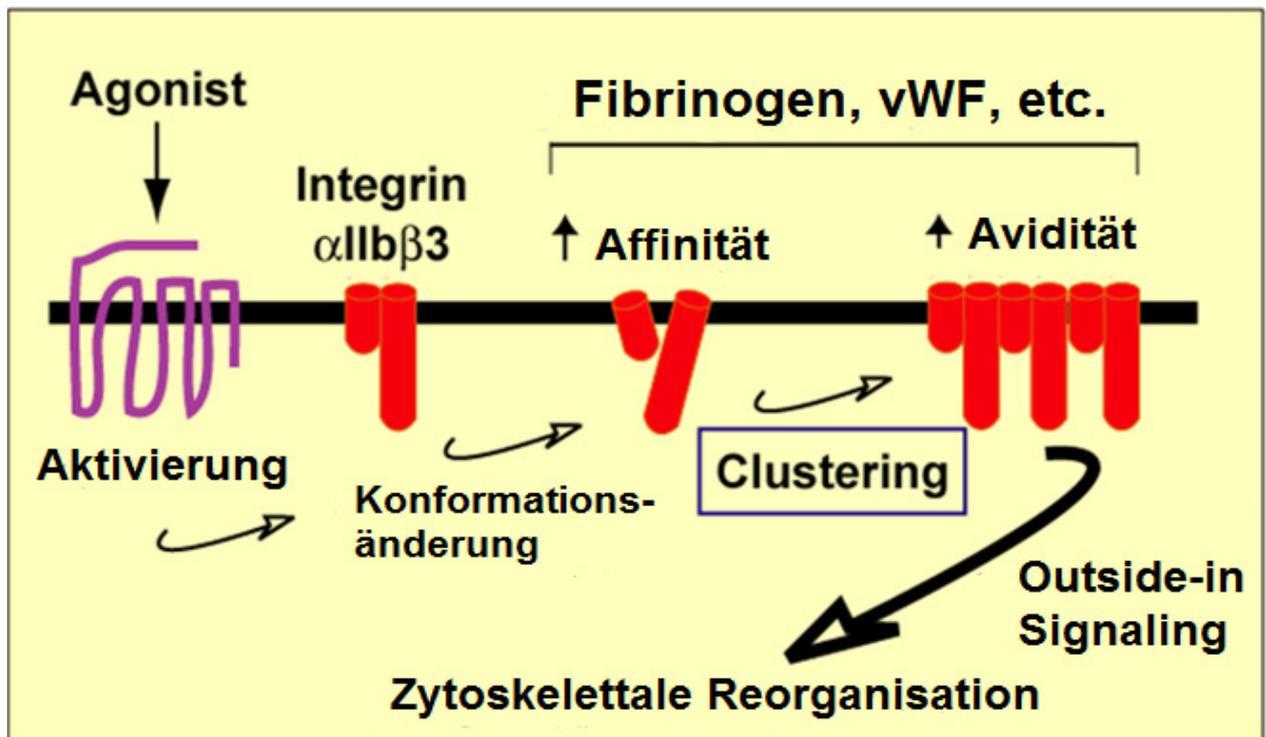


Abbildung 2: Zusammenspiel von Inside-out Signaling, Ligandenbindung, Outside-in Signaling und Clustering bei der Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (bearbeitet aus: Vielreicher 2008, Dissertation)

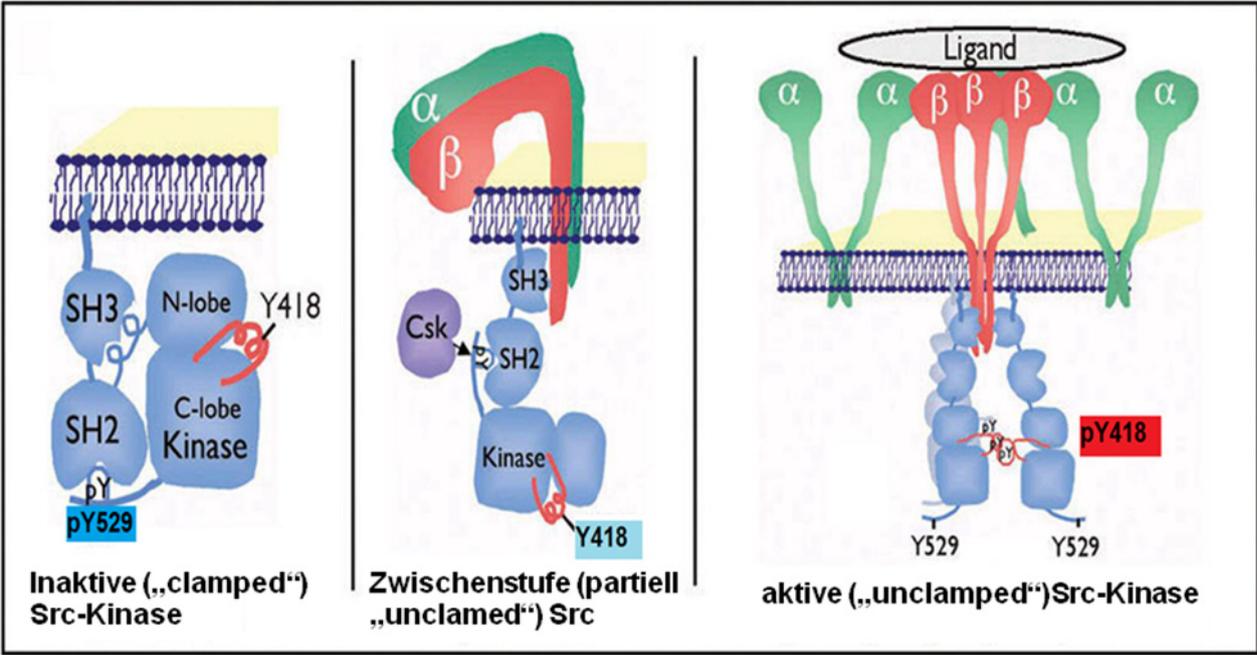


Bedeutung der Tyrosinkinase Src für die Plättchenfunktion

Die Tyrosinkinase Src besitzt eine zentrale Position für die Signalübertragung beim Outside-in Signaling von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Src ist eine der ersten Kinasen, die nach Integrin-Aktivierung spezifisch phosphoryliert werden (Shattil et al. 2004, Obergfell et al. 2002). Src ist konstitutiv mit der β_3 -Untereinheit assoziiert, unabhängig vom Aktivierungszustand des Integrins. Ferner ist ihre Aktivierung unabhängig von der Aktinpolymerisation (Obergfell et al. 2002). Src gehört zur Familie der Tyrosinkinasen, der zum Beispiel auch Fyn, Yes oder Lck angehören. Sie sind ubiquitäre Signalmoleküle, die auch für andere Signalwege und Zellfunktionen Bedeutung haben (Obergfell et al. 2002). Der strukturelle Aufbau der Src Kinase ist in Abbildung 3 dargestellt. Src besteht aus 3 Domänen, wobei die SH3-Domäne in der Plasmamembran verankert ist. Die Kinase-Domäne hat funktionelle Bedeutung (Shattil et al. 2004, Vielreicher et al. 2007). Über die SH3-Domäne steht Src mit der C-terminalen Region der β_3 -Untereinheit des Integrin-Rezeptors in Verbindung (Arias-Salgado et al. 2003). Bei inaktivem Rezeptor liegt Src in einer Konformation vor, bei der der Tyrosinrest an Position 529 phosphoryliert ist (Obergfell et al. 2002). Dieser Phosphorylierungszustand hält die Kinase in einer inaktiven Form, wobei die Tyrosin-529-Phosphorylierung durch Csk-Kinase stabilisiert wird (Obergfell et al. 2002). Die Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ führt dazu, dass Csk von der β_3 -Untereinheit dissoziiert, wodurch es zur Dephosphorylierung des Tyrosins 529 der Src-Kinase kommt. Dies bewirkt eine Konformationsänderung des Src-Moleküls, was eine Auto-Phosphorylierung des Tyrosins 418 und damit die Aktivierung von Src induziert (Obergfell et al. 2002, Vielreicher et al. 2007). Der Tyrosinrest 418 liegt dabei im sogenannten „activation loop“ von Src, welche in direkten Kontakt zur Syk-Kinase tritt (Arias-Salgado et al. 2003). Somit führt dieser Prozess zur Aktivierung einer Reihe von Signalmolekülen und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Modulation der Aktinpolymerisation, welche für die zytoskelettale Reorganisation verantwortlich ist. Diese wiederum bewirkt das „Shape-change“ der Thrombozyten, das Spreading sowie die Plättchenadhäsion und -retraktion (Shattil et al. 1999). Damit ist die Aktivität der Src-Kinase ein wichtiger biochemischer bzw. molekularer Marker der Plättchenfunktion, die über Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ vermittelt wird.

Mittels Western Blot und anschließender Immunreaktion mit Hilfe phosphorylierungs-spezifischer Antikörper kann der Aktivierungsgrad der Src-Kinase nachgewiesen und somit eine Aussage über den Funktionszustand bzw. die Aktivität des Integrin-assoziierten Outside-in Signalings getroffen werden.

Abbildung 3: Änderung des Phosphorylierungszustandes und der Konformation von Src in Abhängigkeit des Aktivierungszustandes von $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin (bearbeitet aus: Shattil et al., Blood 2004)



Leu³³/Pro³³-Polymorphismus (HPA-1) von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Von klinischer Bedeutung sind mehrere bekannte genetische Polymorphismen von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, der wichtigste hierbei ist das humane Plättchen-Antigen-1 (HPA-1) (Zotz et al. 1998). Dabei handelt es sich um einen Leucin/Prolin-Austausch an Position 33 der β_3 -Untereinheit des Rezeptors (Vijayan et al. 2005, 2003, Zotz et al. 1998, Loncar et al. 2007). Ca. 1-2% der kaukasischen Bevölkerung besitzt einen homozygoten HPA-1b-Genotyp, bei dem an Position 33 der extrazellulären Domäne der β_3 -Untereinheit Leucin gegen Prolin ausgetauscht ist (Zotz et al. 1998). Die große Mehrheit der Bevölkerung weist dagegen einen homozygoten HPA-1a-Genotyp (Leu³³) auf, 5-10% sind heterozygot (Zotz et al. 1998). Dieser Aminosäureaustausch hat Auswirkungen auf die Plättchenfunktion und die Thrombogenese. So konnten Zotz et al. (1998, 2005) in klinischen Assoziationsstudien nachweisen, dass bei einem Patientenkollektiv von Patienten mit bekannter koronarer Herzkrankheit (KHK) die Träger eines HPA-1b-Allels (HPA-1b/1b bzw. HPA-1a/1b) im Median 5,2 Jahre früher einen Myokardinfarkt erlitten als Träger des homozygoten HPA-1a-Genotyps. Experimentelle Studien zeigten weiterhin, dass Plättchen vom HPA-1b-Genotyp im Vergleich zu HPA-1a eine höhere Resistenz gegenüber Scherraten unter flusss dynamischen Bedingungen aufweisen (Loncar et al. 2007). Vijayan et al. (2000) postulierten eine höhere Affinität der HPA-1b/1b-Plättchen zu immobilisiertem Fibrinogen. Außerdem wurde im Rahmen der Framingham Offspring Studie gezeigt, dass HPA-1b positive Plättchen eine höhere Aggregabilität in Bezug auf ADP und Noradrenalin aufweisen (Feng et al. 1999).

In dieser Arbeit sollte in statischen Adhäsionsexperimenten mit humanen Plättchen an Fibrinogen und anschließenden Western Blot-Untersuchungen ermittelt werden, inwiefern der HPA-1-Polymorphismus Auswirkungen auf die Src-Kinase-Aktivität und damit das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte Outside-in Signaling hat.

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war das Outside-in Signaling des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ anhand der Src-Kinase-Aktivität in humanen Plättchen zu untersuchen. Dabei stand der Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf das Outside-in Signaling bzw. die Src-Kinase-Aktivität im Mittelpunkt.

Dazu sollten Adhäsionsexperimente mit gewaschenen Plättchen beider Genotypen an immobilisiertem Fibrinogen dienen und anschließend der Aktivitätszustand (d. h. die spezifische Src418-Phosphorylierung) der Src-Kinase durch Western Blot-Analyse ermittelt werden.

Ferner sollte das Outside-in Signaling unter dem Einfluss von Mangan-Kationen und sCD40L in Relation zum HPA-1 Polymorphismus (Pro³³ vs. Leu³³) geprüft werden.

Methoden und Materialien

Chemikalien und Lösungen

a) verwendete Chemikalien

Apyrase; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München

BSA; Sigma-Aldrich

Citrat; Eifelfango, D- Bad Neuenahr

ECL Western Blotting Detection Reagents 1+2; ECL Kit, Amersham GE Healthcare,
D- Freiburg

DMSO; Sigma-Aldrich

HRP-markierte Anti-Kaninchen- und Anti-Maus-Antikörper; ECL Kit s. o.

humanes Fibrinogen; Sigma-Aldrich

isotone NaCl-Lösung; Braun, D- Melsungen

Manganchlorid; Sigma-Aldrich

Lösliches CD40L; PeproTechInc., D- Offenbach

PBS-Pufferlösung, pH 7.1;

PP1; Biomol, D- Hamburg

Prostaglandin E₁; Sigma-Aldrich

Protein-Assay-Dye-Reagent-Concentrate;

Bio-Rad Laboratories GmbH, D- München

SDS; Bio-Rad

Src418-Antikörper; Biosource, Cat-# 44-660G, Be- Nivelles

Thrombin; Nobis, D- Endingen

Tris-HCl; Sigma-Aldrich

Tween-20; Sigma-Aldrich

vSrc-Antikörper (gesamt-Src); Calbiochem, Cat-# OP07, D-Darmstadt

b) Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

Tyrode-Puffer (pH 7.3) enthielt folgende Zusammensetzung:

- 137 mM NaCl [Merck Chemicals, D-Darmstadt]
- 2,8 mM KCl
- 0,4 mM NaH₂PO₄
- 12 mM NaHCO₃ [alle von Merck Chemicals]
- 5,5 mM D-Glucose [Sigma]
- H₂O

Lysepuffer (pH 7.4) enthielt folgende Zusammensetzung:

- 0,5% (v/v) Triton-X [Sigma]
- 50 mM NaCl
- 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 [Sigma]
- 1 mM Na₃VO₄ [Merck]
- 0,5 mM NaF [Merck]
- 2 mg/ml Pepstatin
- 50 mg/ml AEBSF
- 5 mg/ml Chymostatin
- 5 mg/ml Antipain
- 5 mg/ml Leupeptin
- 1% (v/v) Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2 [alle von Sigma]
- H₂O

6x Sample Buffer (pH 6.8):

- 350 mM Tris-HCl/ 0,25% SDS [Bio-Rad], pH 6.8
- 30% (v/v) Glycerol [Sigma]
- 10% (w/v) SDS
- 500 mM DTT [Sigma]
- 0,002% (w/v) Bromphenol-blau [Sigma]

Gele:

a) Separating-Gel: 8% Polyacrylamid

- 8% Acrylamid/ 2% Bisacrylamid [National Diagnostics, UK-Hessle Hull]
- 375 mM Tris-HCl/ 0,4% SDS, pH 8.8
- 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat [Sigma]
- 0,1% (v/v) TEMED [Sigma]
- H₂O

b) Stacking-Gel: 3,9% Polyacrylamid

- 3,9% Acrylamid/ 1 % Bisacrylamid
- 125 mM Tris-HCl/ 0,4% SDS, pH 6.8
- 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,1% (v/v) TEMED
- H₂O

Folgender Laufpuffer (pH~ 8.3) wurde verwendet:

- 120 mM Tris Base [Sigma]
- 950 mM Glycin [Carl Roth GmbH, D- Karlsruhe]
- 0,5% (w/v) SDS
- H₂O

Folgender Transferpuffer (pH~ 8.3) wurde verwendet:

- 10x Tourbin buffer (120mM Tris Base, 960 mM Glycin, H₂O)
- 20% (v/v) Methanol [Merck]
- 0,06% (w/v) SDS
- H₂O

TBS-T (pH 7.6): 10x TBS Stamm-Lösung

- 200 mM Trisbase
- 1,37 M NaCl
- H₂O
- pH eingestellt auf 7.6 mit 25%igem HCl [Merck]
- working-solution: 10% TBS-stock + 0,1% Tween-20 [Sigma], H₂O

Plättchenpräparation

Für die Studie wurden Probanden mit bekanntem HPA-1-Genotyp ausgewählt, die entweder homozygot für HPA-1a oder homozygot für HPA-1b waren. Ausschlusskriterium für die Studie war ein heterozygoter Genotyp (HPA-1a/1b). Die Probanden wurden zuvor über die Studie und bezüglich ihres HPA-1 Genotyps aufgeklärt und stimmten der Verwendung ihrer Blutproben für experimentelle Zwecke schriftlich zu („informed consent“ gemäß Helsinki-Deklaration). Alle Probanden waren körperlich gesund und hatten mindestens 10 Tage vor der Blutentnahme keine thrombozytenfunktionshemmenden Substanzen wie ASS oder Thienopyridine (Clopidogrel, Ticlopidin) eingenommen. Zur Kontrolle einer ASS-Einnahme wurde die Thromboxan B2-Aktivität im Serum mittels ELISA ermittelt (s. u.). Die Fibrinogenrezeptordichte auf den Spenderthrombozyten wurde im Durchflusszytometer bestimmt (s. u.).

Jedem Probanden wurde zunächst am jeweiligen Versuchstag ca. 45 ml Blut aus der V. mediana cubiti entnommen. In die 7,5 ml-Monovetten wurde 0,5 μM PGE₁ (in H₂O gelöst) und 0,129 M Citrat vorgelegt. Um Tissue Factor aus den Blutproben zu entfernen, wurden die ersten ml Blut verworfen. Tissue Factor entsteht bei Gefäßläsionen (Einstich) und besitzt über seinen Thrombin-induzierenden Effekt eine plättchenaktivierende Wirkung. Nach der Blutentnahme wurden die Proben zunächst bei Raumtemperatur und 750 x g für 3 min zentrifugiert, um plättchenreiches Plasma (PRP) zu gewinnen [Hettich Zentrifuge Universal 30 RF, $\emptyset = 24,4$ cm, Soft-Modus]. Das PRP wurde dann 1:1 mit PBS, pH 6.5 (jew. 2 ml PRP + 2 ml PBS) verdünnt und mit 40 μl 500 U/ml Apyrase zu einer Endkonzentration von 5 U/ml versetzt. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur und 850 x g für 6 min zentrifugiert und in Tyrode-Puffer, pH 7.3 resuspendiert. Zur Bestimmung der Plättchenkonzentration der Suspension dienten Sysmex-Messungen [Sysmex K-4500, Sysmex Deutschland, Norderstedt]. Um Präparationsfehler zu minimieren, wurden zusätzliche Sysmex-Messungen mit Citrat (3,1%)-antikoaguliertem Vollblut und PRP durchgeführt. Die so ermittelte Plättchenkonzentration im Resuspendat wurde zuletzt auf die gewünschte Zielkonzentration von 1×10^9 Plättchen/ ml mit Tyrode-Puffer eingestellt. Schließlich wurden die gewaschenen und ruhenden Plättchen für 30 min bei 31°C im Wasserbad inkubiert.

Plättchenadhäsion

Die Adhäsion wurde auf 24-Well-Platten [Greiner Labortechnik, D-Frickenhausen] durchgeführt. Dabei betrug die Adhäsionsfläche pro Well ca. 2,3 cm². Die 24-Well-Platten wurden zunächst mit 100 µg/ml bzw. 10 µg/ml (in PBS, pH 7.3) Fibrinogen bzw. 1% Hitze-inaktiviertem BSA (in PBS, pH 7.3) durch Inkubation für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ beschichtet. Dadurch erfolgte die Immobilisation des Fibrinogens. Pro Well wurden 100 µl Fibrinogen bzw. BSA aufgetragen. Nach der Immobilisation wurden die Wells dann mit 200 µl 1% Hitze-inaktiviertem BSA für 2x 5 min saturiert und zuletzt mit 400 µl PBS, pH 7.3 gewaschen. Auf die so beschichteten Wells wurde dann jeweils 60 µl Plättchen-Suspension aufgetragen. Dies entsprach einer Plättchenzahl von 6x 10⁷ pro Well. Ein Teil des Resuspendats wurde mit 0,5 mM MnCl₂ bzw. mit 1µg/ml CD40L für 3 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und diese so „voraktivierten“ Plättchen auf die beschichteten Wells aufgetragen. Die Adhäsion wurde für 2,5 min bzw. 5 min, 10 min, 20 min und 40 min bei 37°C und 5% CO₂ durchgeführt. Danach wurde der Überstand abgenommen und die anhaftenden Plättchen mit 100 µl eiskaltem 1x-Lysepuffer lysiert. Zur vollständigen Lyse wurden die Proben in den Wells ca. 30 min auf Eis inkubiert, anschließend in Eppendorf-Tubes überführt und durch Zentrifugation bei 16.000 x g für 30 min bei 4°C gereinigt [Eppendorf Zentrifuge 5415 R]. Die Überstände aus den BSA-beschichteten Wells wurden zuvor aufgefangen und jeweils mit 400 µl eiskaltem Lysepuffer in gleicher Form, wie oben beschrieben, lysiert und gereinigt. Zusätzlich wurden 50 µl der Plättchen-Suspension als ruhende Plättchen ebenfalls mit 400 µl Lysepuffer lysiert und gereinigt. Neben diesen statischen Adhäsionsversuchen wurde eine Versuchsserie mit Plättchensuspension (HPA-1a/1a-Plättchen) durchgeführt. Dazu wurde das oben beschriebene Plättchenresuspendat verwendet und mit 250 µg/ml Fibrinogen und/oder 5 µg/ml sCD40L für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Plättchensuspension zuvor 10 µg/ml ReoPro für 30 min bei Raumtemperatur zugefügt. Die anschließende Lyse erfolgte analog zum Vorgehen bei ruhenden Plättchen (s. o.).

Gelelektrophorese und Western Blotting

Für die Western Blot Immun-Analyse wurden die Proben auf 8% SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 25 µg. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden dazu zunächst mittels Bradford-Methode photometrisch [Eppendorf BioPhotometer; 8,5 mm Küvettenlänge] bestimmt.

Dazu wurde zunächst mit dem jeweiligen Lysepuffer eine Verdünnungsreihe als BSA-Standard angefertigt:

- 100 µg/ml BSA
- 250 µg/ml BSA
- 500 µg/ml BSA
- 750 µg/ml BSA
- 1000 µg/ml BSA
- 1500 µg/ml BSA

Je 5 µl Blank (Lysepuffer), BSA-Standard oder Probe wurden zu 250 µl 1:4-verdünntem (in H₂O; 2x filtriert mit Filterpapier) Protein-Assay-Dye-Reagent-Concentrate (Bio-Rad) zugefügt, für ca. 8 min inkubiert und anschließend die Proteinkonzentration bei 595 nm Wellenlänge im Photometer gemessen. Die Proben wurden mit Lysepuffer stets auf das gleiche Volumen (85 µl) aufgefüllt, mit 17 µl 6x Sample-Buffer ergänzt, bei 100°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Proteine wurden dann bei 120 V Spannung in der Gelelektrophoresekammer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) für ca. 60 min auf dem Gel aufgetrennt. Bio-Rad Precision Plus Protein Standards wurden als Molekularmarker verwendet.

Das Western Blotting wurde mit dem sogenannten nassen Blotverfahren durchgeführt. Zunächst wurden die Gele nach der Elektrophorese für 10 min in Transfer-Puffer (s. o.) inkubiert. Für das Blotten wurden PVDF- Membranen (0,2 µm, Bio-Rad) verwendet, welche zunächst mit Methanol angefeuchtet und dann ebenfalls 10 min in Transfer-Puffer inkubiert wurden. Bei 50 V wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran in einer Blotting Kammer [Novel Experimental Technologie, San Diego, CA, USA] für 70 min (300 bis 350 mA) geblottet. Die so geblotteten Membranen wurden im Anschluss für ca. 10 min in PBS-T (PBS, pH 7.3 + 0,1% Tween-20) gewaschen und über Nacht in 4%igem BSA (in PBS-T) bei 4°C geblockt.

Anschließend erfolgte die Immunreaktion zunächst mit Src-418-Antikörper und anschließend auf derselben Membran mit vSrc-Antikörper (gesamt Src). Die unterschiedliche Speziesquelle der Antikörper (Maus bzw. Kaninchen) machte es möglich, ohne sogenanntes „Strippen“ (Entfernen der Antikörper mittels Waschpuffer) Src418 und gesamt-Src auf derselben Membran zu detektieren.

Die Immunreaktionen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Die Inkubation mit Src418 erfolgte in einer 1:1000-Verdünnung (15 µl Src418-Antikörper auf 15 ml PST-T) für 2 Stunden (Erstantikörper-Inkubation). Anschließend wurden je 2 Waschvorgänge mit PBS-T für jeweils 10 min durchgeführt. Danach folgte die Inkubation mit HRP-markiertem Anti-Kaninchen-Antikörper (ECL-Kit) als Zweitantikörper in einer 1:5000-Verdünnung (3 µl auf 15 ml PBS-T) für 1,5 Stunden. Im Anschluss daran wurden die Membranen zunächst 2x 10 min und danach nochmals 3x 5 min in TBS-T gewaschen. Für vSrc-Antikörper galt das gleiche Procedere, allerdings war hier die Verdünnung 1:100 (150 µl auf 15 ml PBS-T) für den Erstantikörper. Der Zweitantikörper war hierbei HRP-markierter Anti-Maus-Antikörper, ebenfalls in einer 1:5000-Verdünnung. Die gewaschenen Membranen wurden dann mit ECL Western Blotting Detection Reagents 1+2 (Mischverhältnis 1:1; pro Membran 2 ml) für 1 min inkubiert und dann bei unterschiedlichen Expositionszeiten auf CL-Xposure Film 18x24cm [Pierce/Perbio] belichtet.

Densitometrie und statistische Methoden

Für die densitometrische Auswertung der Banden auf den Röntgenfilmen wurde ein Biorad VersaDoc Imaging System verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels QuantityOne Imaging Software (Bio-Rad). Zur Beschreibung der jeweiligen Src-Kinase Aktivität wurde der Quotient gebildet bestehend aus den ermittelten Werten der Src418-Banden und den entsprechenden vSrc-Banden. Zudem wurden die jeweils zugehörigen BSA-Werte, welche nach gleichem Muster berechnet wurden, als Standard von diesen Werten abgezogen.

Bsp.: Src-Kinase Aktivität für 10 min Adhäsion an 100 µg/ml Fibrinogen

$$A_{\text{Fg 100, 10 min}} = [\text{Src418/vSrc}]_{\text{Fg 100, 10 min}} - [\text{Src418/vSrc}]_{\text{BSA, 10 min}}$$

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz zwischen zwei Stichproben erfolgte mittels unpaired t- test (GraphPadInstat Data Analyzing Software). Es lag ein Signifikanzniveau von 95% bzw. $\alpha \leq 0,05$ zugrunde.

Src-Aktivierung mit Thrombin

Um die Spezifität der detektierten Signale zu überprüfen, wurden die gewaschenen Plättchen mit Thrombin mit oder ohne den Tyrosinkinaseinhibitor PP1 aktiviert und die Src-Kinase-Aktivität untersucht. Die Plättchenkonzentration in der Plättchen-Suspension betrug ebenfalls 1×10^9 . Nach der Präparation wurden 40 µl Plättchensuspension (4×10^6 Plättchen/ml) in Anwesenheit von PP1 (10 µM bzw. 20 µM) oder dem Lösungsmittel DMSO (in gleichem Volumen) bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Aktivierung mit 1 U/ml Thrombin erfolgte für 10 min bei 37°C. Im Anschluss wurden die Plättchen dann mit 400 µl 1x-Lysepuffer (s. o.) für 30 min auf Eis lysiert und für 30 min in der Zentrifuge gereinigt (s. o., Plättchenpräparation). Die Proben wurden dann nach dem oben beschriebenen Schema im Western Blot auf Src detektiert. Es wurden dazu 50 µg Protein je Probe aufgetragen.

FACS-Analysen und ThromboxanA₂-ELISA

Die Bestimmung der Thromboxankonzentration im 2 Stunden bei 37°C geronnen Serum der einzelnen Probanden wurde im Rahmen der Routinediagnostik dankenswerterweise von Frau Bluma übernommen. Dabei wurde Thromboxan B₂ mittels ELISA bestimmt (Enzyme Immunoassay Kit, assay designs Inc., Michigan, USA). Dies diente der Kontrolle bzw. dem Ausschluss einer ASS-Einnahme der Probanden. Zudem wurde im Rahmen der Routinediagnostik dankenswerterweise von Frau Kirchhoff durchflusszytometrisch die Rezeptordichte (mittels P2-Antikörpern) auf der Plättchenoberfläche der jeweiligen Spender bestimmt. Außerdem wurde der Aktivierungszustand von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ mittels PAC-1, einem monoklonalen Antikörper, der nur die aktive Konformation von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ erkennt, bei ruhenden bzw. stimulierten Plättchen (durch 20 μ M ADP und 2×10^{-6} M PMA) bestimmt und somit die funktionelle Integrität von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ nachgewiesen.

Epifluoreszenzmikroskopie

Mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Axiovert 100M, Carl Zeiss) wurden adhärente Plättchen auf einer Fibrinogenmatrix dargestellt. Auch die qualitative Src-Aktivität und die Co-Lokalisation von Src418 und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ konnten mit diesem Verfahren beurteilt werden. Dazu wurden gewaschene ruhende Plättchen auf Fibrinogenbeschichteten Coverslips (100 μ g/ml, siehe oben) 5 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abpipettiert und die anhaftenden Plättchen mit 4% PFA für 10 min fixiert, gewaschen und für eine Stunde mit PE-markiertem Src418-Antikörper (1:1000) bzw. FITC-markiertem vSrc (1:100) inkubiert. Die Inkubationszeit der jeweiligen Zweitantikörper betrug 90 min. Diese Versuche wurden dankenswerterweise von Frau Weingart durchgeführt.

Ergebnisse

Thrombozytencharakterisierung

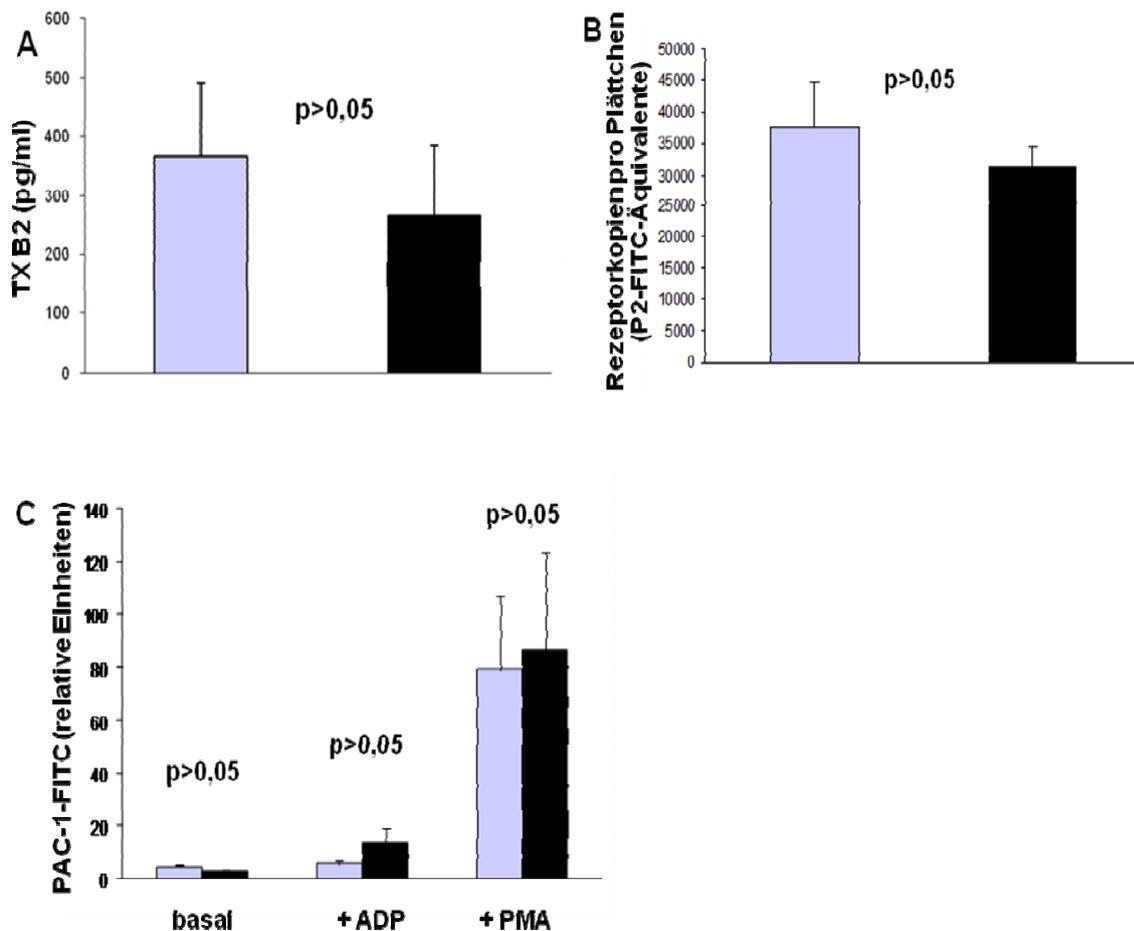
In Kontrollexperimenten wurde zunächst durchflusszytometrisch die Rezeptordichte von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf der Thrombozytenoberfläche der jeweiligen Spender bestimmt. Zudem wurden ebenfalls durchflusszytometrisch die basale Aktivität des Rezeptors in ruhenden Plättchen sowie seine Aktivierbarkeit durch Plättchenagonisten bestimmt. Damit sollte die funktionelle Integrität der Integrinrezeptoren auf Plättchen der jeweiligen Spender bewiesen werden.

Die Rezeptordichte der Spenderthrombozyten lag innerhalb einer statistischen Schwankungsbreite von 30.000 bis 40.000 Rezeptorkopien in der Plasmamembran (s. Abbildung 4B); die Unterschiede zwischen den HPA-1a/1a und -1b/1b-Spendern waren nicht signifikant ($p > 0,05$, je $n=3$, s. Abbildung 4B). Die basale Aktivität von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (mittels PAC-1 gemessen) zeigte in ruhenden Plättchen der jeweiligen Spender sowohl bei der HPA-1a/1a- als auch der HPA-1b/1b-Gruppe eine sehr geringe Aktivität des Rezeptors. Nach Stimulation mit 20 μM ADP, vor allem aber mit 2×10^{-6} M PMA konnte eine deutliche Aktivierung nachgewiesen werden. Diese fiel insgesamt bei den HPA-1b-homozygoten Plättchen marginal stärker aus (s. Abbildung 4C); es zeigten sich dabei aber wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten ($p > 0,05$, s. Abbildung 4C). Des Weiteren wurde im ELISA die Thromboxan B2-Konzentration im Serum der Probanden bestimmt. Thromboxan B2 ist ein inaktiver, stabiler Metaboliten von Thromboxan A2, welches nur eine Halbwertszeit von 30 sek besitzt (Van Kraaij et al. 2002). Abbildung 4A zeigt, dass der Thromboxan B2-Spiegel sowohl bei den HPA-1a/1a-, als auch -1b/1b-Spendern im Normbereich lag (200-400 pg/ml, je $n=3$) (van Kraaij et al. 2002). Eine Einnahme von ASS (Acetylsalicylsäure) innerhalb der letzten 1-2 Wochen konnte somit bei den jeweiligen Probanden ausgeschlossen werden.

Abbildung 4: durchflusszytometrische Kontrolluntersuchungen der Spenderblutproben

- A:** Thromboxan B2-Konzentration (TXB2) im Serum von HPA-1a/1a- bzw. HPA- 1b/1b-Spendern (Mittelwerte \pm SEM), je n=3
- B:** Rezeptordichte von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (P2-Antikörper) auf Plättchen von HPA-1a/1a- bzw. HPA- 1b/1b-Spendern (Mittelwerte \pm SEM), je n=3
- C:** Darstellung der funktionellen Integrität von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ durch Bestimmung von PAC-1 in ruhenden und aktivierten Spenderplättchen (durch ADP und PMA) (Mittelwerte \pm SEM), je n=3

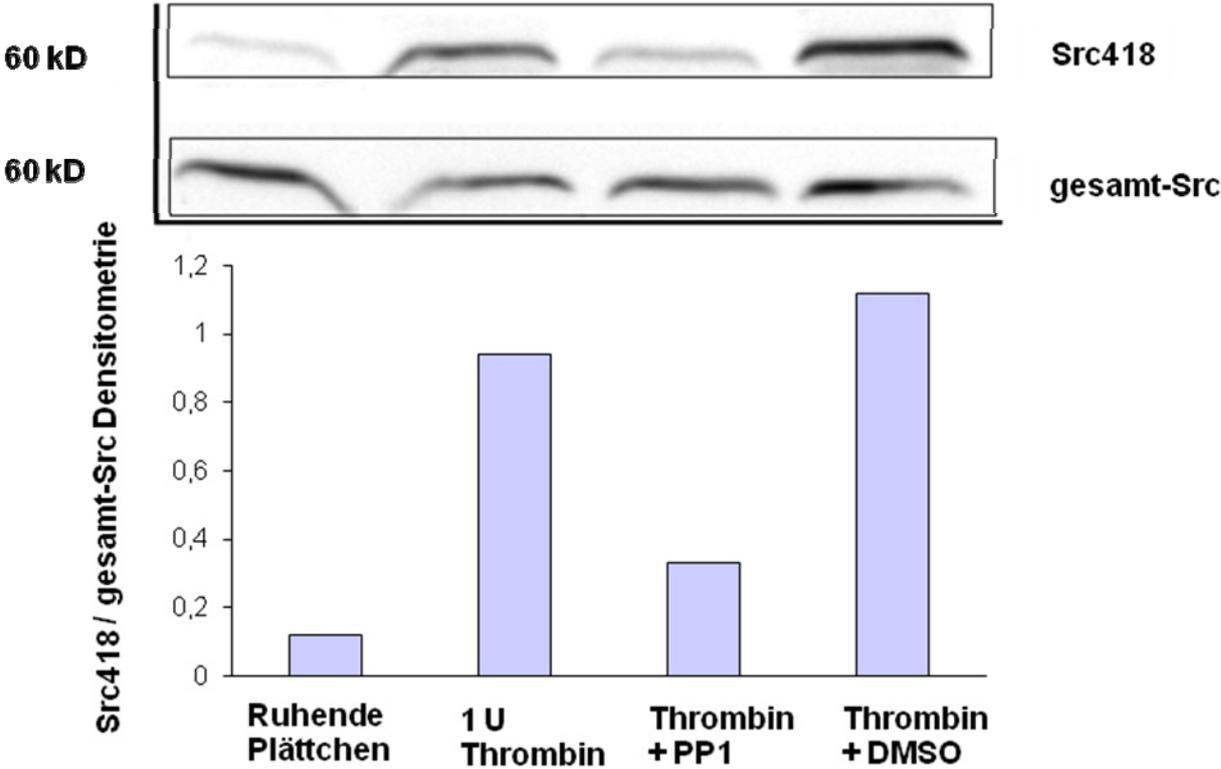
HPA-1a/1a
 HPA-1b/1b



Src-Aktivierung in Thrombin-stimulierten Plättchen

Weitere Kontrollexperimente wurden durchgeführt, um die Banden im Western Blot eindeutig der Src-Kinase zuzuordnen. Dazu diente eine Positivkontrolle mit Thrombin, einem plasmatischen Plättchenaktivator (Gawaz 2002), und eine Negativkontrolle mit PP1, einem Tyrosinkinaseinhibitor. Thrombin ist ein physiologischer Plättchenagonist, der durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Thrombinrezeptoren an der Plättchenoberfläche ein Inside-out Signaling in Gang setzt, welches zur Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ führt (Shattil et al. 1999). Dadurch wird die Outside-in Signalkaskade und damit auch Src aktiviert, wodurch die zytoskelettale Reorganisation und das Spreading reguliert werden (Shattil et al. 1999). Abbildung 5 illustriert die Src spezifische Bande im Western Blot, die durch diese Kontrollexperimente eindeutig zugeordnet werden konnte. Lysate von ruhenden Plättchen zeigten im Immunoblot nur eine geringe Src418-Aktivität, während Thrombin-stimulierte Plättchen einen 10-fachen Anstieg der Src-Aktivität in der Densitometrie (s. Abbildung 5) aufwiesen. Dazu wurde quantitativ die Signalstärke der Src418- und gesamt-Src-Banden bestimmt und der Quotient gebildet (s. Methoden). Expositionszeiten auf dem Röntgenfilm waren hierbei 1 min für Src418 und 30 sek für gesamt-Src. Bei Präinkubation Thrombin-stimulierter Plättchen mit PP1, einem Tyrosinkinaseinhibitor, zeigte sich im Immunoblot eine deutlich schwächere Src418-Bande. Densitometrisch war die Src-Aktivität im Vergleich zu Thrombin 3-fach reduziert, im Vergleich zur Kontrolle mit Thrombin unter Zugabe von DMSO sogar um das 3,4-Fache. Es lag also eine deutliche Hemmung von Src durch PP1 vor. Dabei war der Effekt von DMSO als PP1-Lösungsmittel auf die Src-Kinase-Aktivität zu beachten, welches bei Konzentrationen bis 10 μM zu einer stärkeren Aktivierung von Src führte, während höhere Konzentrationen (zum Beispiel 20 μM) eine Aktivitätsminderung, wohl aufgrund der Zytotoxizität der Substanz, bewirkten (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 5: Src-Aktivierung in HPA-1a/1a-Plättchen durch den Plättchenagonisten Thrombin und spezifische Inhibition der Src418-Phosphorylierung durch den Tyrosinkinaseinhibitor PP1 im Immunoblot (oben); Densitometrie-Daten (unten) zeigen Ergebnisse aus einem Experiment



Src-Aktivität in statisch adhärenen Plättchen an Fibrinogen in Relation zum HPA-1 Polymorphismus

Die Wirkung von Fibrinogen auf das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte Outside-in Signaling und damit die Aktivierung von Src-Kinase wurden in statischen Adhäsionsversuchen an immobilisiertes Fibrinogen untersucht. Diese wurden unter Berücksichtigung verschiedener Adhäsionszeiten von 2,5 bis 40 min durchgeführt. Um die Rolle der Fibrinogenkonzentration bei der Src-Aktivierung zu analysieren, wurden zwei Fibrinogenkonzentrationen gewählt, welche aus der Literatur bekannt waren (Oberfell et al. 2002 bzw. Vijayan et al. 2005): 100 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen (12,5 $\mu\text{g/ml}$ in der Literatur). Bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ immobilisiertem Fibrinogen zeigten beide Isoformen erst nach 40 min Inkubationszeit eine Src-Aktivierung. Während die HPA-1a/1a-Plättchen hier nur eine sehr geringe Src-Aktivierung aufwiesen, sah man bei HPA-1b/1b-Plättchen unter gleichen Bedingungen eine signifikante, etwa 8-fach höhere Src-Aktivität ($p < 0,01$, s. Abbildung 6a). Bei kürzeren Adhäsionszeiten an Fibrinogen dieser Konzentration konnte man allerdings bei beiden Genotypen keine signifikante Src-Aktivierung beobachten (Daten nicht gezeigt).

Anders verhielt es sich bei statischer Plättchenadhäsion an 100 $\mu\text{g/ml}$ immobilisiertes Fibrinogen. Hier zeigten beide Genotypen bereits nach 2,5 min Adhäsion eine Src-Aktivierung. Abbildung 6b illustriert die Src-Aktivierung in Plättchen durch statische Adhäsion an 100 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen bei HPA-1a/1a und -1b/1b in Abhängigkeit der Adhäsionszeit. Dabei zeigten HPA-1b/1b-Plättchen schon nach 2,5 min Adhäsionszeit eine starke Src-Kinase-Aktivität, welche 5-fach höher lag als bei HPA-1a/1a-Plättchen. Längere Adhäsionszeiten bewirkten beim HPA-1b/1b-Genotyp keinen Anstieg der Src-Kinase-Aktivität, hingegen wies der HPA-1a/1a-Genotyp einen kontinuierlichen Anstieg der Src-Aktivität mit zunehmenden Adhäsionszeiten auf. Während der ersten 20 min der Adhäsion war die Src-Kinase-Aktivität bei HPA-1a/1a-Plättchen etwa 3-fach niedriger im Vergleich zu HPA-1b/1b, nach 40 min Adhäsion hingegen erreichten HPA-1a/1a-Plättchen eine ähnlich hohe Src-Aktivität wie HPA-1b/1b-Plättchen.

Abbildung 6a: Src-Aktivität in HPA-1 varianten Plättchen nach 40 min statischer Adhäsion an 10 µg/ml immobilisiertes Fibrinogen. Die Densitometriedaten sind Mittelwerte ± SEM, n=3

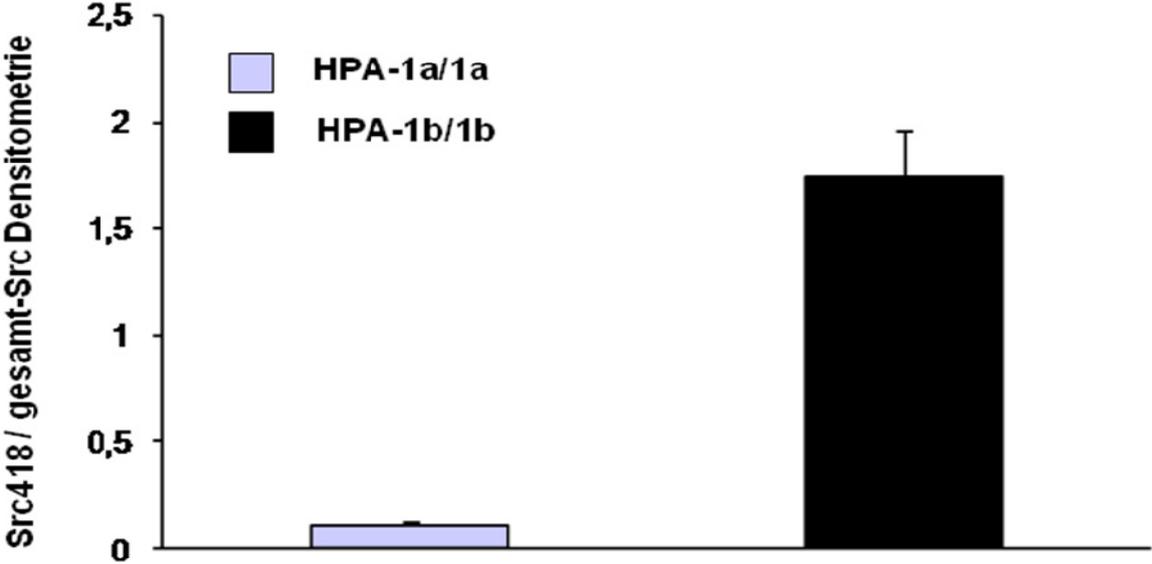
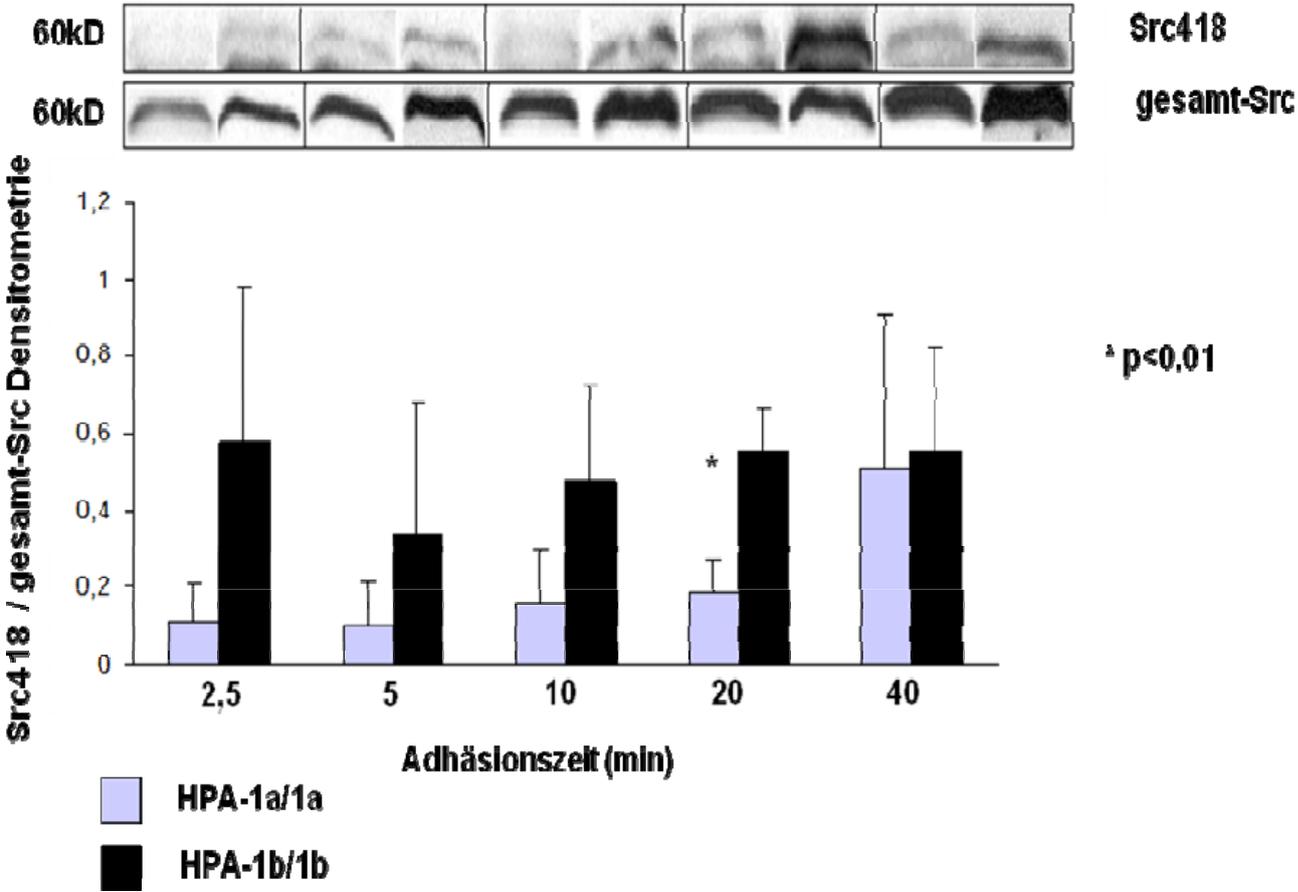


Abbildung 6b: Src-Kinase-Aktivität in Plättchen im Zeitverlauf unter statischer Adhäsion an 100 µg/ml immobilisiertes Fibrinogen in Relation zum HPA-1 Polymorphismus. Die Blot-Bilder sind repräsentativ für je 3 Experimente; die Densitometrie-Daten sind Mittelwerte ± SEM, n=3



Wirkung von $MnCl_2$ auf die Src-Aktivität bei Fibrinogen-adhärenenten Plättchen in Relation zum HPA-1 Polymorphismus

Als nächstes wurde die Wirkung von $MnCl_2$ auf die Src-Aktivierung in Plättchen untersucht. Die Anwesenheit von 0,5 mM $MnCl_2$ in Plättchensuspension über einer 1%igen BSA-Matrix führte zu einer signifikanten Src-Aktivierung, welche vergleichbar mit der Src-Aktivität in Fibrinogen-adhärenenten Plättchen war (s. Abbildung 7). Durch Zugabe von 0,5 mM $MnCl_2$ und anschließender Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen wurde die Src-Kinase-Aktivität deutlich gesteigert und zeigte eine 5-fache Erhöhung im Vergleich zur Adhäsion an Fibrinogen ohne Zusatz von $MnCl_2$. Während die Zugabe von 1 mM $MnCl_2$ zu Fibrinogen-adhärenenten Plättchen ein ähnliches Src-Aktivitätsniveau wie unter Zugabe von 0,5 mM ergab, führte eine Erhöhung der $MnCl_2$ -Konzentration auf 2 mM zu einer weiteren Steigerung der Src-Aktivität in adhärenenten Plättchen (s. Abbildung 7). Dieser Effekt war nicht nur bei HPA-1a/1a-Plättchen, sondern auch bei HPA-1b/1b-Plättchen zu beobachten (Daten nicht gezeigt). In Anwesenheit von 1 mM und 2 mM $MnCl_2$ beobachtete man nach längeren Adhäsionszeiten allerdings eine Abnahme der Src-Aktivität (Daten nicht gezeigt), die auf eine toxische Wirkung des bivalenten Kations zurückzuführen seien dürfte. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Adhäsionsversuche an immobilisiertem Fibrinogen in Kombination mit $MnCl_2$ in einer Konzentration von 0,5 mM durchgeführt. In Abbildung 8 ist die Src-Aktivität in Plättchen beider Genotypen in Abhängigkeit von der Adhäsionszeit auf 100 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen in Anwesenheit von 0,5 mM $MnCl_2$ dargestellt. Dabei wiesen die HPA-1b/1b-Plättchen bei allen gemessenen Adhäsionszeiten eine höhere Src-Kinase-Aktivität im Vergleich zu HPA-1a/1a-Plättchen auf. Während der Unterschied nach 2,5 min Adhäsion noch sehr gering war, stieg die Src Aktivität in HPA-1b/1b-Plättchen nach 5 min deutlich an. Hingegen fiel der Anstieg bei HPA-1a/1a-Plättchen über die gesamte Adhäsionszeit geringer aus. HPA-1a/1a-Plättchen zeigten nach 40 min Adhäsion einen kontinuierlichen Anstieg auf etwa das 3-Fache der Src-Aktivität gegenüber den nach 2,5 min gemessenen Werten; bei HPA-1b/1b-Plättchen hingegen stieg die Src-Aktivität nach 40 min um mehr als das 20-Fache an. Dabei war der größte Src-Aktivitätsanstieg (bei HPA-1b/1b) zwischen 20 und 40 min Adhäsionszeit zu verzeichnen.

Hier zeigte die Src-Aktivierung eine 3- bis 4-fache Erhöhung. Im direkten Vergleich zwischen beiden Genotypen wiesen HPA-1b/1b-Plättchen eine circa 3-fach höhere Src-Aktivität nach 5 und 10 min Adhäsion auf, eine etwa doppelt so hohe Aktivität nach 20 min Adhäsion und sogar eine 6-fach höhere Src-Kinase-Aktivität nach 40 min Adhäsion im Vergleich zu HPA-1a/1a-Plättchen.

Um zu untersuchen, inwiefern die Fibrinogenkonzentration unter diesen experimentellen Bedingungen (Adhäsion an Fibrinogen in Anwesenheit von 0,5 mM MnCl_2) eine Rolle spielt, wurden Versuche unter gleichem Zeitablauf mit 10 $\mu\text{g/ml}$ immobilisiertem Fibrinogen durchgeführt. Abbildung 9 illustriert, dass der HPA-1a/1a Genotyp eine fast identische Src-Aktivität bei beiden Fibrinogenkonzentrationen aufwies, während bei HPA-1b/1b nur geringe Abweichungen auftraten. Bei Analyse der gegebenen Standardabweichungen waren diese Abweichungen aber nicht signifikant ($p > 0,05$).

Abbildung 7: Effekt von $MnCl_2$ auf die Src-Kinase-Aktivität in HPA-1a/1a-Plättchen. Die Blot-Bilder sind repräsentativ für 2 Experimente; die Densitometrie-Daten sind gemittelt \pm SEM, n=2. (100 μ g/ml Fibrinogen, 1 % BSA, 10 min Adhäsion)

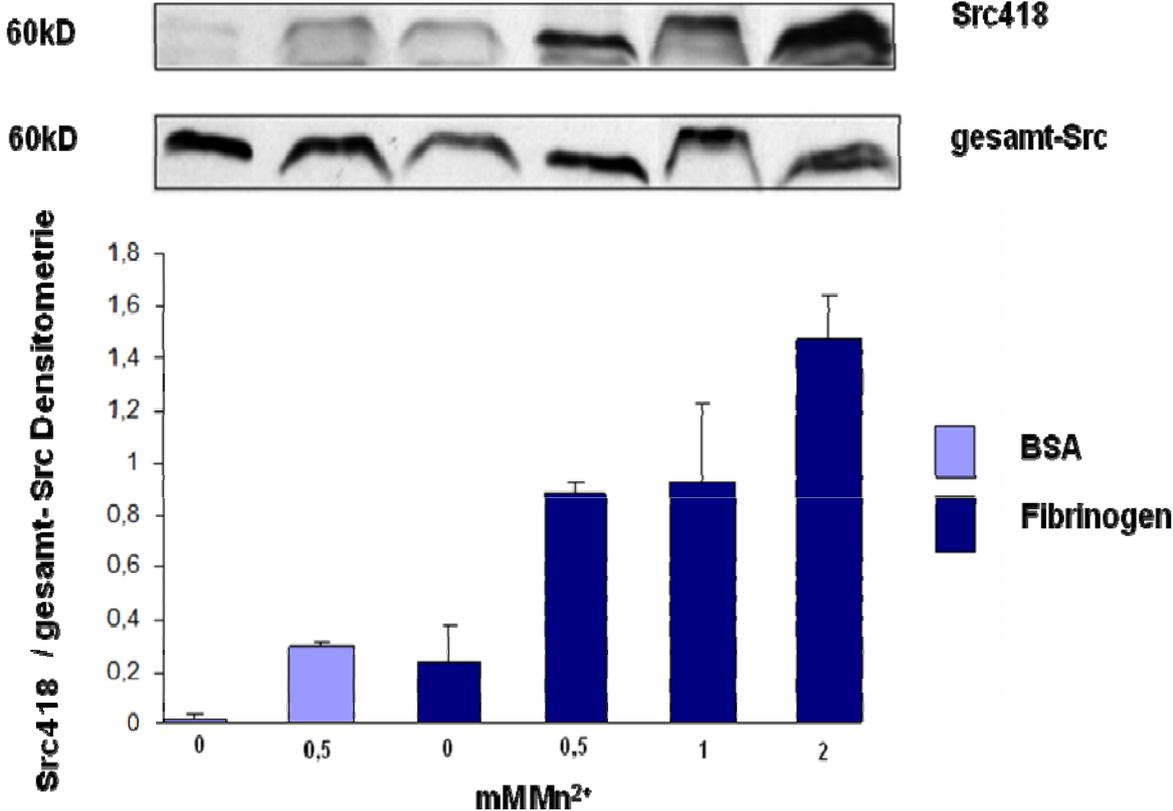


Abbildung 8: Src-Kinase-Aktivität in statisch adhärennten HPA-1 varianten Plättchen. Die Blot-Bilder sind repräsentativ für je 3 Experimente; Densitometrie-Daten sind Mittelwerte \pm SEM, n=3. (100 μ g/ml immobilisiertes Fibrinogen, 0,5 mM MnCl₂)

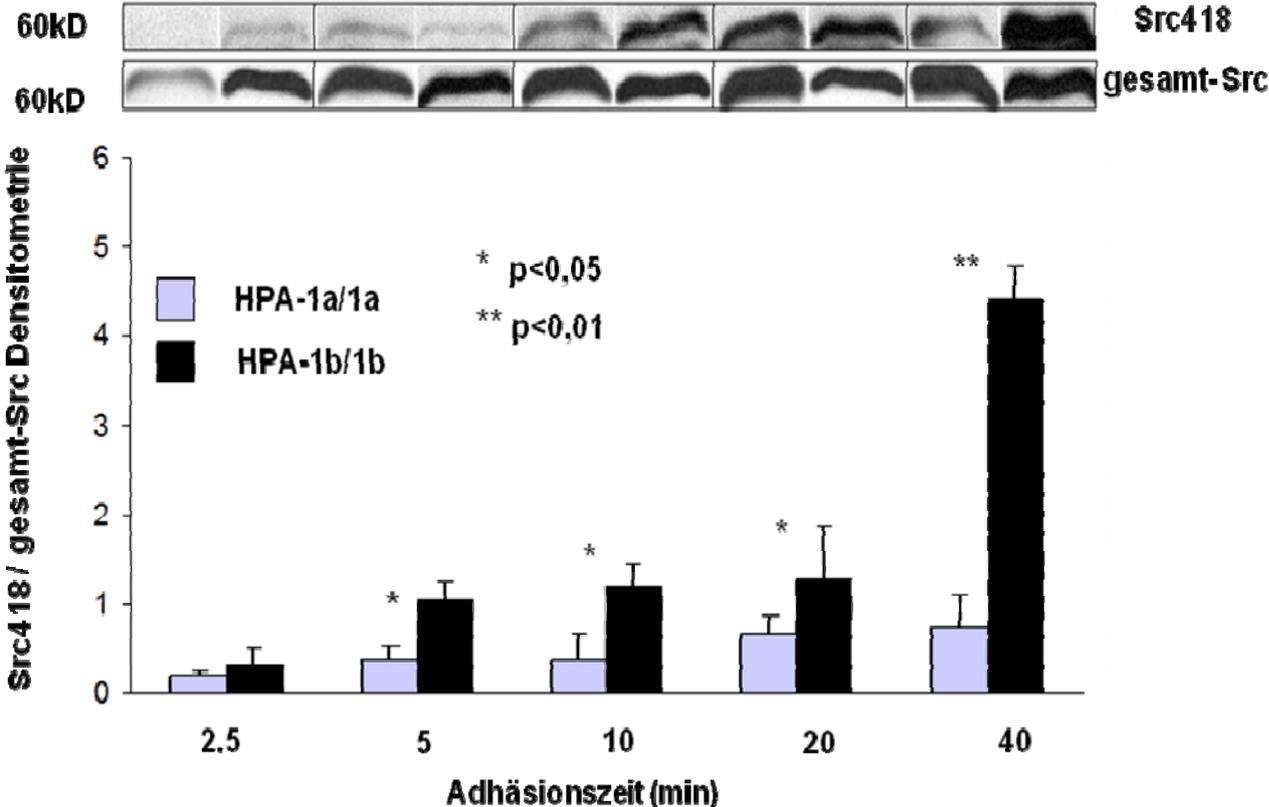
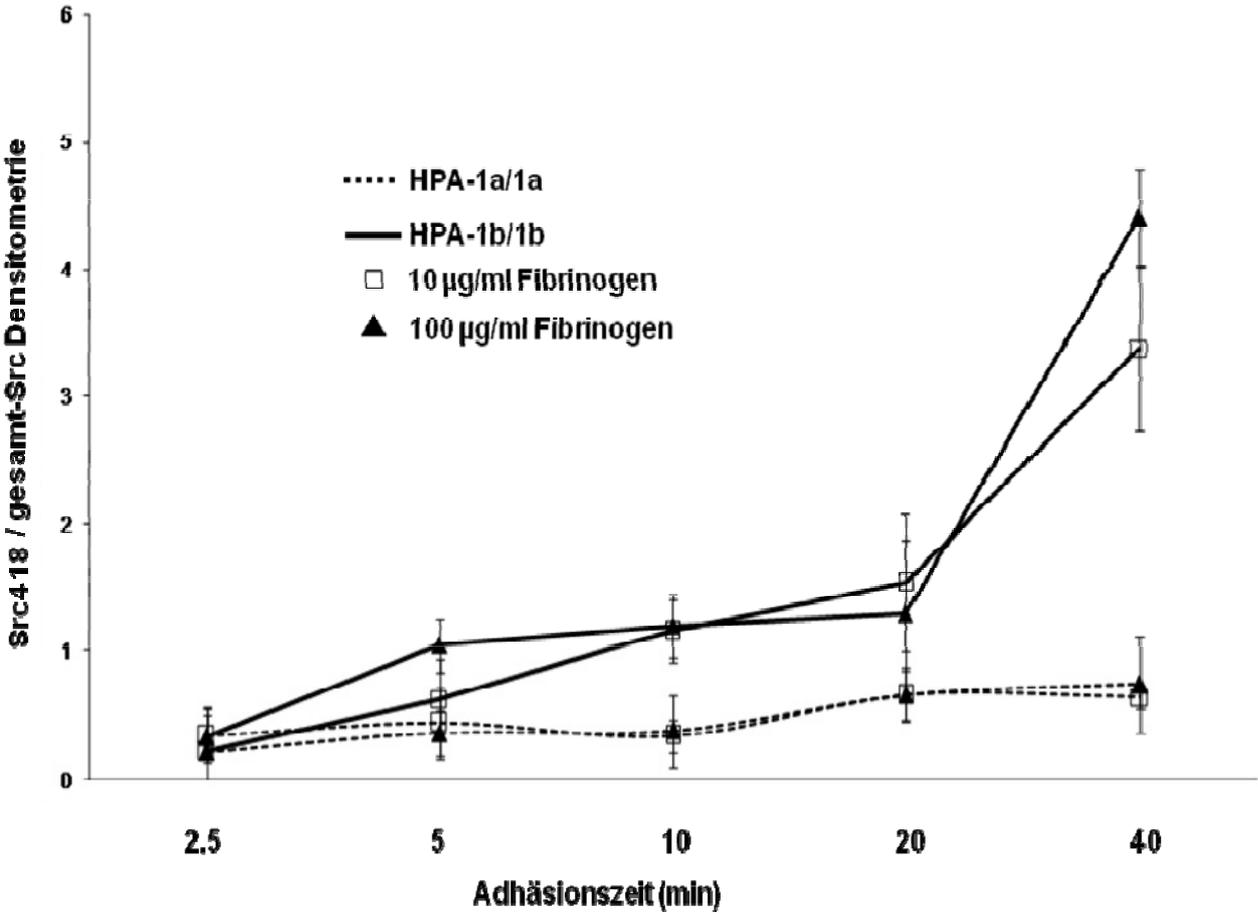


Abbildung 9: Src-Kinase-Aktivität in Fibrinogen-adhärenenten Plättchen in Anwesenheit von 0,5 mM MnCl₂ in Abhängigkeit von Adhäsionszeit und Fibrinogenkonzentration bei beiden HPA-1 Genotypen, Mittelwerte ± SEM, n=3



Wirkung von sCD40L auf die Src-Aktivität in Plättchen beider Genotypen

sCD40L (löslicher CD40 Ligand) wurde kürzlich als physiologischer Modulator der Plättchenfunktion und Thrombusstabilität identifiziert (Andre et al. 2002). Neben seiner immunologischen Funktion bindet sCD40L spezifisch Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ über die Interaktion seiner KGD-Sequenz mit der β -Untereinheit (Prasad et al. 2003). Dass lösliches CD40L auch einen Einfluss auf die Src-Kinase-Aktivität in Plättchen besitzt, ist in Abbildung 10 exemplarisch an HPA-1a/1a-Plättchen gezeigt. Plättchen in Suspension unter Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ sCD40L wiesen kaum Src-Aktivität auf, ähnlich wie man es bei Zugabe von löslichem Fibrinogen zur Plättchensuspension beobachtet (Daten nicht gezeigt; Literaturverweis: Shattil et al. 1999). Fügte man der Suspension allerdings 250 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen und 5 $\mu\text{g/ml}$ sCD40L hinzu, konnte man einen deutlichen Anstieg der Src-Aktivität um mehr als das 3-Fache beobachten. Die Src-Aktivität konnte dabei durch den spezifischen $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antikörper ReoPro (Abciximab, 10 $\mu\text{g/ml}$) gehemmt werden.

Als nächstes wurde der Effekt von löslichem CD40L auf die Src-Kinase in Fibrinogen-adhärenenten Plättchen untersucht (Abbildung 11a und 11b). Sowohl bei Adhäsion an 10 $\mu\text{g/ml}$ als auch an 100 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen wiesen HPA-1a/1a-Plättchen keinen Anstieg der Src-Kinase-Aktivität in Anwesenheit von 1 $\mu\text{g/ml}$ sCD40L im Vergleich zur Adhäsion an Fibrinogen (in entsprechenden Konzentrationen) in Abwesenheit von sCD40L auf. Anders verhielt es sich bei HPA-1b/1b-Plättchen. Diese zeigten bei Adhäsion an 10 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen unter Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ sCD40L eine 1,3-fach höhere Src-Aktivität und bei Adhäsion an 100 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen sogar eine Aktivitätszunahme um etwa das 4-Fache. Zu beachten ist hierbei allerdings die außerordentlich hohe Src-Aktivität in adhärenenten HPA-1b/1b-Plättchen an 10 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen gegenüber der niedrigen Src-Aktivität in HPA-1a/1a-Plättchen unter sonst gleichen experimentellen Bedingungen (zum Vgl. s. Abbildung 6a).

Abbildung 10: Synergistische Src-Aktivierung in HPA-1a/1a-Plättchensuspension durch Zugabe von 5 µg/ml sCD40L bzw. 250 µg/ml Fibrinogen bzw. 10 µg/ml ReoPro bei Raumtemperatur für 20 min (1 Experiment)

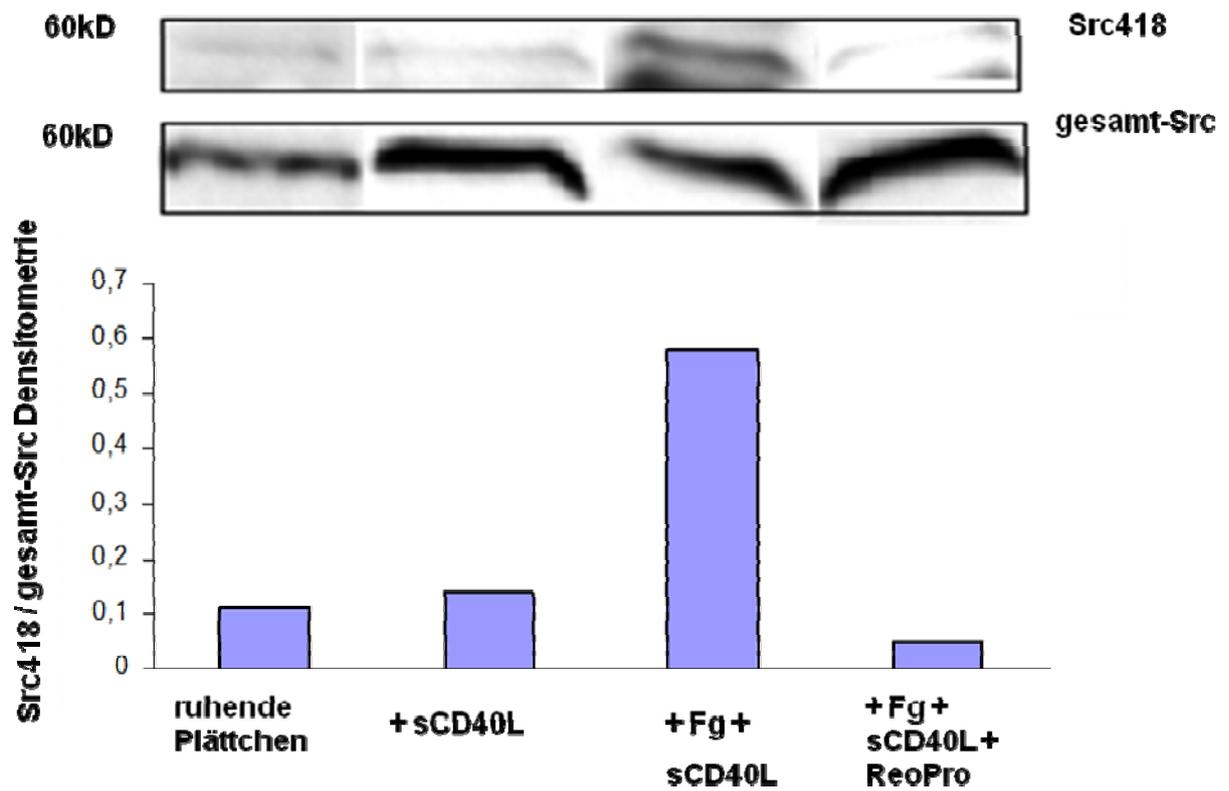


Abbildung 11a: Src-Aktivität in adhärenenten Plättchen beider Genotypen mit und ohne Zugabe von 1 µg/ml sCD40L (100µg/ml immobilisiertes Fibrinogen, 40 min Adhäsion). Die Blot-Bilder sind repräsentativ für je 3 Experimente, die Densitometrie-Daten sind Mittelwerte ± SEM, n=3

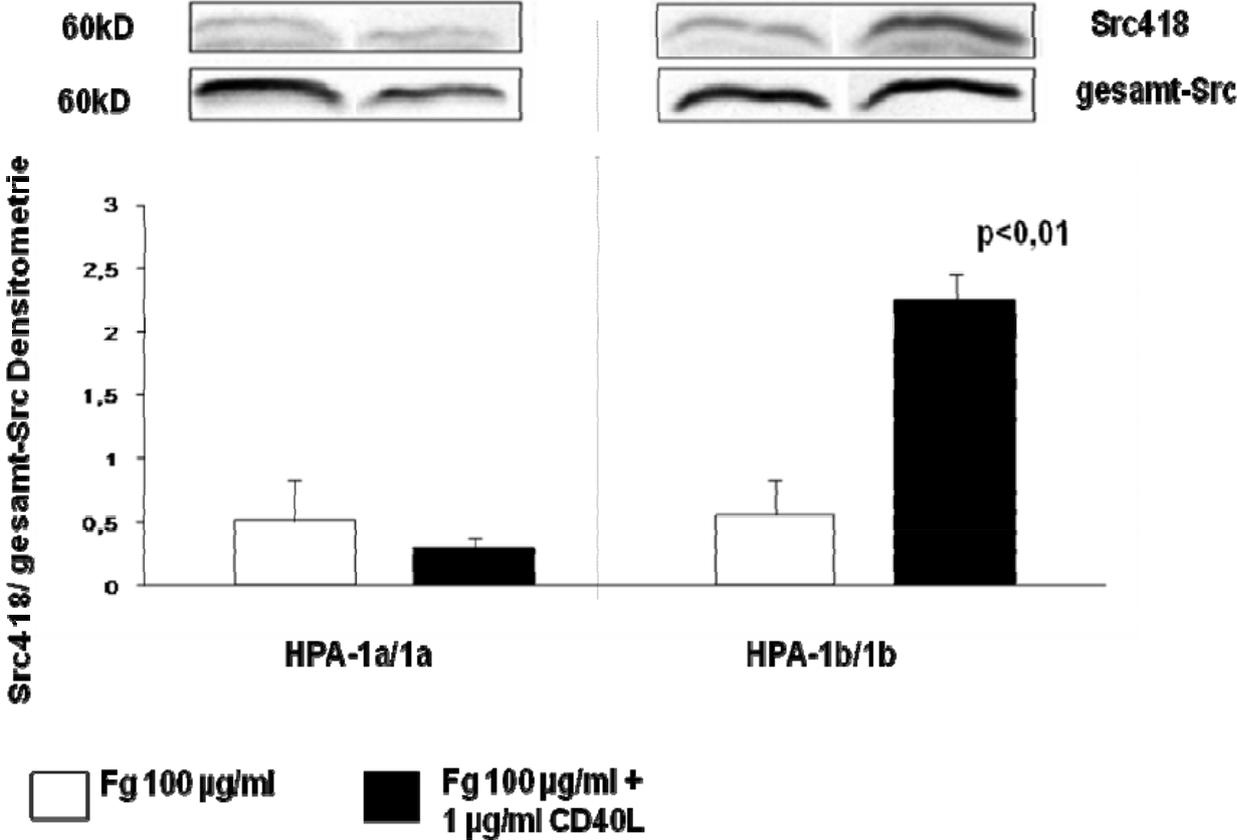
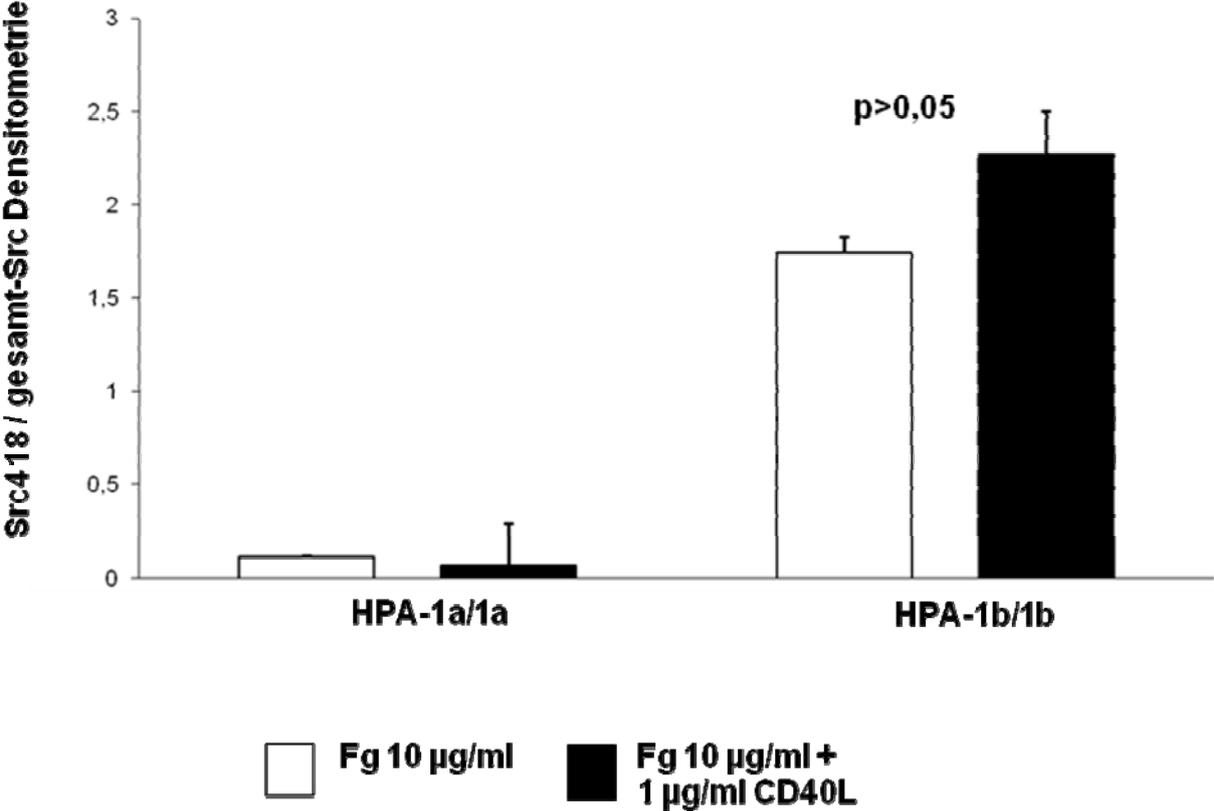


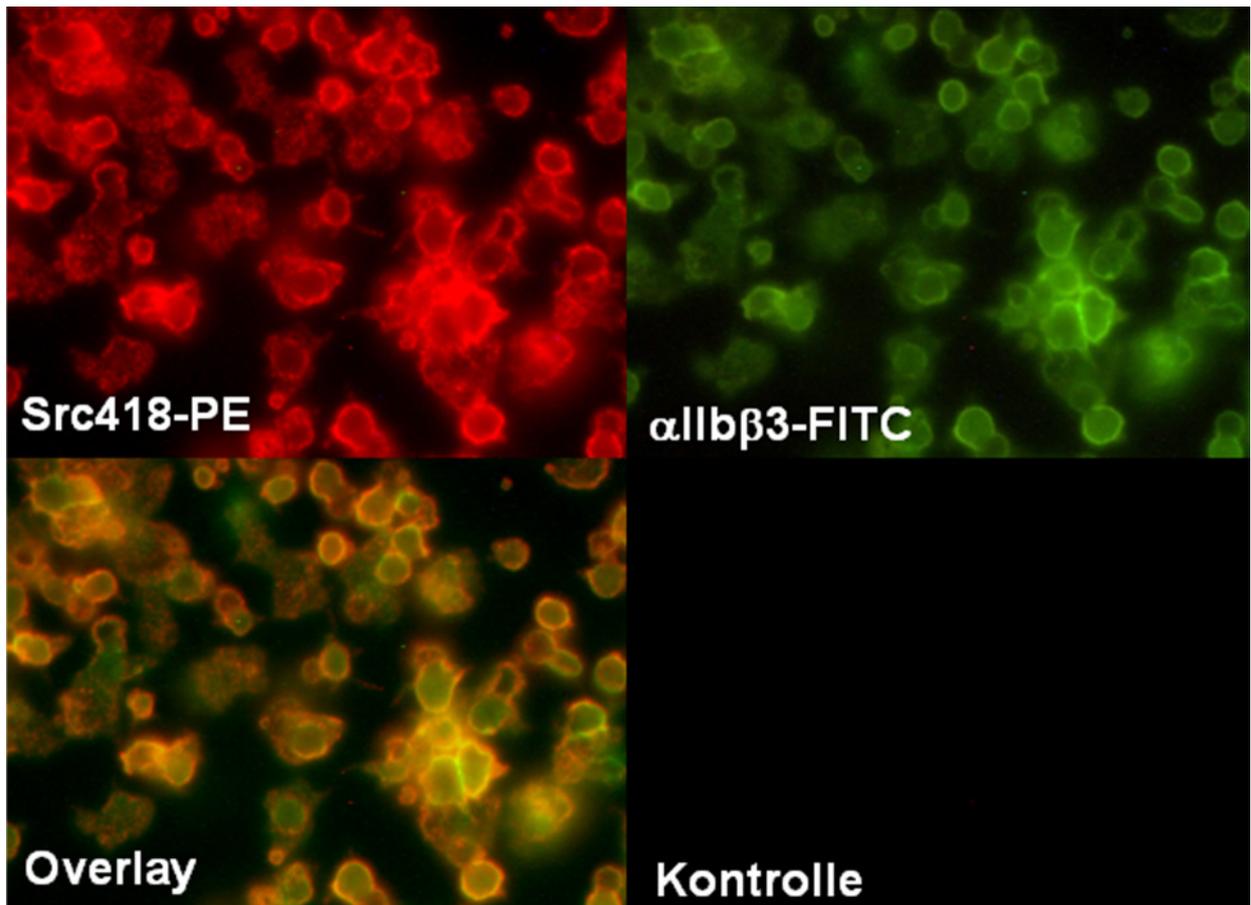
Abbildung 11b: Src-Aktivität in adhärenen Plättchen beider Genotypen mit und ohne Zugabe von 1 µg/ml sCD40L (10 µg/ml immobilisiertes Fibrinogen, 40 min Adhäsion). Die Densitometrie-Daten sind Mittelwerte ± SEM, n=3



Co-Lokalisation von Src418 und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in Fibrinogen-adhärenenten Plättchen

Die Tyrosin418-Phosphorylierung von Src ist abhängig von der Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Allerdings sind nur ca. 3% aller Src-Moleküle in Plättchen mit der β -Untereinheit von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ assoziiert, während sich die große Mehrheit im Zytoplasma oder anderen Zellkomponenten befindet (Oberfell et al. 2002). Mittels PE-markierten Antikörpern gegen Src418 (rot) wurde die Verteilung der aktiven Src-Kinase epifluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht (Abbildung 12). Dabei zeigte sich eine deutliche Konzentrierung der aktiven Src-Kinase im Bereich der Plasmamembran und kleiner Zellausläufer (Filopodien), während sich im Zytoplasma kaum Src418 darstellte. Der Großteil von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptoren befand sich ebenfalls in der Plasmamembran, was durch FITC-markierte Antikörper gegen Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (grün) gezeigt werden konnte. Somit stellte sich ein deutliches Overlay zwischen Integrinrezeptor und aktiver Src-Kinase dar (gelb).

Abbildung 12: Co-Lokalisation von Src418 und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in HPA-1b/1b-Plättchen, dargestellt mittels Epifluoreszenzmikroskopie (Axiovert 100M, Carl Zeiss). Src418 ist in rot, $\alpha_{IIb}\beta_3$ in grün dargestellt. Die Bilder sind repräsentativ für 2 Experimente (20 min Adhäsion auf 100 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen, 0,5 mM MnCl_2 , anti-Src-Antikörper PE-konjugiert, anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antikörper FITC-konjugiert)



Diskussion

Zentrale Fragestellung dieser Arbeit war die Bedeutung des HPA-1 Polymorphismus für das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte Outside-in Signaling. Dabei sollte geprüft werden, ob der prothrombotische Phänotyp des HPA-1b/1b-Genotyps möglicherweise durch ein gesteigertes Src-Signaling bedingt ist. Vijayan et al. (2005) konnten zeigen, dass HPA-1b-Plättchen ein gesteigertes Outside-in Signaling im Hinblick auf die Regulation der Serin/Threonin Phosphatase ERK (MAP-Kinase) aufweisen.

Aufgrund dieser Datenlage haben wir das Outside-in Signaling von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in den Fokus unserer Untersuchungen gerückt. Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte Outside-in Signaling ist maßgeblich an der Modulation der Plättchenthrombusstabilität beteiligt, indem die Signalkaskaden über Src-, Syk-, RhoA- und MLC-Aktivierung die Aktinpolymerisation und damit die zytoskelettale Reorganisation regulieren (Phillips et al. 2001, Arias-Salgado et al. 2003, Oberfell et al. 2001).

Entscheidende Prozesse der Thrombogenese wie Spreading oder Plättchenadhäsion bzw. -retraktion werden somit durch das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte Signaling organisiert (Phillips et al. 2001, Oberfell et al. 2001).

Src-Kinase hat hierbei eine zentrale Rolle innerhalb der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierten Signalkaskade. Src ist deswegen auch besonders interessant, weil es direkt mit der β -Untereinheit des Rezeptors assoziiert ist, auf welcher zugleich auch der HPA-1-Polymorphismus lokalisiert ist (Oberfell et al. 2001, Vielreicher et al. 2007).

Neben Fibrinogen als hauptsächlichem Liganden von $\alpha_{IIb}\beta_3$ sind als weitere Liganden des Integrins bzw. spezifische Interaktionspartner auch Fibronektin, vWF, Vitronektin, Thrombospondin und sCD40L bekannt, die eine modulative Wirkung auf die Plättchenadhäsion haben können (Gawaz 2002, Prasad et al. 2003, Shattil et al. 1999). sCD40L hat dabei in den letzten Jahren an Bedeutung und Interesse gewonnen, da es besonders bei vaskulären Ereignissen wie thromboembolischen Komplikationen eine wichtige Rolle spielt (Prasad et al. 2003, Andre et al. 2002). Seine Wirkung und die des Fibrinogens auf das Outside-in Signaling in Relation zum HPA-1-Polymorphismus sollte untersucht werden.

Ferner sollte die Rolle von divalenten Kationen wie $MnCl_2$ für die Rezeptoraktivierung und die Aktivierung des Outside-in Signalings von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ analysiert werden.

HPA-1b/1b-Plättchen zeigen eine vorzeitige Src-Aktivierung unter statischer Adhäsion an Fibrinogen

Die Aktivierung des Outside-in Signalings in Plättchen kann durch die Bindung des Integrinrezeptors $\alpha_{IIb}\beta_3$ an immobilisiertes Fibrinogen initiiert werden (Oberfell et al. 2001, Vijayan et al. 2005). Nach der Literatur werden dazu Fibrinogenkonzentrationen zwischen 10 bis 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (Vijayan et al. 2005) und 100 $\mu\text{g/ml}$ (Oberfell et al. 2002) eingesetzt.

In unseren Adhäsionsexperimenten an 10 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen konnten wir keine zuverlässige Src-Aktivierung bei kürzeren Adhäsionszeiten (bis 10 Minuten) zeigen; bei beiden HPA-1-Genotypen beobachtete man bei dieser Konzentration keine konstante Src-Aktivierung bei kurzen Adhäsionszeiten in den Vorexperimenten. Diese Ergebnisse korrespondieren mit den Erkenntnissen von Jirouskova et al. (2007). Diese Autoren konnten zeigen, dass die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen deutlich früher bei höheren Fibrinogenkonzentrationen stattfindet als bei niedrigen. So beobachtete die Gruppe, dass Plättchen an 100 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen bereits nach weniger als 5 min adhärten, während die Plättchenadhäsion an 3 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen erst nach 10 min erfolgte.

Anders verhielt es sich nach längeren Adhäsionszeiten (40 min). Hier zeigte sich in unseren Adhäsionsexperimenten an 10 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen bei HPA-1b homozygoten Plättchen sogar eine signifikant, ca. 3-fach höhere Src-Aktivität im Vergleich zu 100 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen. Auch dieser Befund steht im Einklang mit den Arbeiten von Jirouskova et al. (2007). So stellte die Gruppe heraus, dass bei Plättchenadhäsion an niedrigen Fibrinogenkonzentrationen (3 $\mu\text{g/ml}$) eine stärkere Phosphorylierung der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierten Tyrosinkinasen stattfand als bei höheren.

Die Adhäsionsexperimente im Zeitverlauf ohne Zugabe von MnCl_2 wurden aufgrund dieser Datenlage an 100 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen durchgeführt; bei 40 min Adhäsion wurden beide Konzentrationen verwendet. Mit einer Fibrinogenkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen konnte bereits nach 2,5 min Adhäsionszeit eine Src-Aktivierung in beiden Genotypen gezeigt werden. Dies untermauert die schnelle Phosphorylierungsreaktion von Src, welche bereits von Shattil et al. (2004) beschrieben wurde.

Dabei zeigte der HPA-1b/1b-Genotyp in unseren Experimenten bereits nach kurzen Adhäsionszeiten eine hohe Src-Aktivität, welche sich über den Verlauf von 40 min Adhäsion nicht weiter steigerte. HPA-1a/1a hingegen wies in den ersten 20 min der Adhäsion ein deutlich geringeres Src-Aktivitätsniveau auf, erreichte aber nach 40 min auch etwa das Aktivitätsniveau von HPA-1b/1b. Diesen Ergebnissen dürfte eine höhere Sensitivität des HPA-1b/1b-Genotyps in Bezug auf die Src-Aktivierung zugrunde liegen, so dass man von einer früheren Aktivierung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierten Outside-in Signaling in HPA-1b/1b-Plättchen durch Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen ausgehen könnte. Nach längerer Adhäsionszeit verringerte sich diese Differenz deutlich. Es zeigte sich eine Angleichung des Aktivitätsniveaus. Betrachtet man also den beobachteten Endpunkt der Adhäsion, ergab sich keine signifikant stärkere Aktivierung des Outside-in Signalings bei HPA-1b/1b im Vergleich zu HPA-1a/1a. Eine stärkere Aktivierbarkeit der HPA-1b-Isoform schlägt sich demnach in einer frühzeitigen Src-Aktivierung in Fibrinogen-adhärenenten Plättchen nieder.

In vivo sind Plättchenadhäsion und Thrombogenese sehr kurzzeitige, schnell ablaufende Prozesse (Gawaz 2002). Kommt es zum Beispiel zur Plaqueruptur einer atherosklerotischen Läsion, erfolgt innerhalb von Millisekunden Plättchenadhäsion und Thrombogenese (Gawaz 2002). Betrachtet man diesen Aspekt und überträgt ihn auf diese in vitro gewonnen Erkenntnisse, so stellt gerade dieser Befund ein Charakteristikum für den prothrombotischen Phänotyp von HPA-1b/1b dar. Beachten muss man allerdings auch bei den gezeigten Ergebnissen die hohe individuelle Variabilität unter diesen Bedingungen, welche sich in den teils hohen Standardabweichungen widerspiegelt.

Synergetischer Effekt von Fibrinogen und MnCl₂ auf die Src-Aktivität in Relation zum HPA-1 Polymorphismus

MnCl₂ ist ein bekannter Aktivator des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Craig et al. 2004, Litvinov et al. 2004). Die Bindung des Moleküls an die ADMIDAS-Sequenz der β -Untereinheit führt zu einer direkten Konformationsänderung mit Aktivierung des Rezeptors, auch in Abwesenheit eines Rezeptorliganden (Litvinov et al. 2004). In den hier durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch Behandlung der Plättchen mit MnCl₂ auch eine Src-Aktivierung ausgelöst wird. Nach Inkubation der Plättchen mit 0,5 mM MnCl₂ beobachtete man nahezu die gleiche Src-Kinase-Aktivität wie in Fibrinogen-adhärenenten Plättchen bei jeweils gleichen Inkubationszeiten und experimentellen Bedingungen. Die Kombination von Ligandenbindung und MnCl₂ durch Zugabe von 0,5 mM MnCl₂ zu Fibrinogen-adhärenenten Plättchen steigerte die Src-Kinase-Aktivität um etwa das 5-Fache im Vergleich zu Fibrinogen-adhärenenten oder MnCl₂-behandelten Plättchen. Dieser von uns beobachtete Synergismus stimmt mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein. Litvinov et al. (2004) konnten zeigen, dass MnCl₂ in Anwesenheit von Fibrinogen weitere Interaktionen mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ eingeht. So wurde demonstriert, dass es hierbei nicht nur zu einer Interaktion mit der ADMIDAS-Sequenz der β_3 -Untereinheit kommt, sondern auch zu einer Bindung an zwei weitere Metall-Ionen-bindende Stellen, die MIDAS- und LIMBS-Sequenz. Beide Domänen sind ebenfalls auf der β -Untereinheit lokalisiert. Zudem stabilisiert MnCl₂ die Bindung von Fibrinogen an die RGD-Sequenz und erhöht das Fibrinogen-assoziierte Rezeptor-Clustering (Litvinov et al. 2004). Als Folge dieser zusätzlichen Effekte unter Anwesenheit des Liganden Fibrinogen kann es somit auch zu einem verstärkten Outside-in Signaling kommen, welches sich in der beobachteten Steigerung der Src-Kinase-Aktivität widerspiegelt.

Vergleicht man die beiden Genotypen unter Adhäsionsbedingungen gegenüber Fibrinogen in Konzentrationen von 100 bzw. 10 μ g/ml in Anwesenheit von 0,5 mM MnCl₂, zeigt sich eine deutliche Affinität des HPA-1b/1b-Genotyps im Sinne einer gesteigerten Src418-Phosphorylierung.

Somit dürfte der Polymorphismus eine Modulationsfunktion auf das Outside-in Signaling des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ besitzen, wobei der HPA-1b/1b-Genotyp dabei besonders ausgeprägt auf die Behandlung mit Mangan-Kationen im Sinne eine sehr starken Rezeptor- und Signaling-Aktivierung reagiert. Ein deutlicher Anstieg der Src-Aktivität nach wenigen Minuten insbesondere beim HPA-1b/1b-Genotyp deutet wieder auf eine frühe biochemische Antwort durch Src-Kinase nach Ligandenbindung hin. Wie bei der Adhäsion an Fibrinogen alleine zeigt sich auch unter Zugabe von $MnCl_2$ eine Vor- bzw. Frühzeitigkeit der Src-Aktivierung beim HPA-1b/1b-Genotyp. Hierbei ergeben sich allerdings erst nach 5 min Adhäsion signifikante Unterschiede. Warum es nach 40 min Adhäsion bei den HPA-1b/1b-Plättchen zu einem so massiven Anstieg des Src-Kinase Aktivität kommt und warum dieser bei den HPA-1a/1a-Plättchen ausbleibt, ist hingegen bisher unklar. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass es bei den HPA-1b/1b-Plättchen durch die stärkere Affinität zu $MnCl_2$ und Fibrinogen und der damit initial bereits hohen Aktivität des Outside-in Signaling nach längerer Adhäsionszeit zu einer gesteigerten Freisetzung von Fibrinogen und ADP aus Speichergranula kommt, wie von Salsmann et al. (2005) beschrieben. Dies könnte dann wiederum zu einer Steigerung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierten Signalings führen.

Wichtig zu erwähnen bleibt, dass sich die Src-Aktivität in Fibrinogen-adhärenten Plättchen in Anwesenheit von $MnCl_2$ unabhängig von der Fibrinogenkonzentration zeigte. Unter Zugabe von 0,5 mM $MnCl_2$ beobachtete man sowohl bei einer Konzentration von 10 $\mu g/ml$ als auch 100 $\mu g/ml$ Fibrinogen nahezu identische Src-Aktivitäten, so dass man von einem vordergründigen Effekt von $MnCl_2$ auf die Src-Aktivierung unter diesen experimentellen Bedingungen ausgehen muss. Betrachtet man auch die Src-Aktivitäten in Plättchensuspension nach Inkubation mit höheren Mangan-Konzentrationen (s. Abbildung 7), sprich 1 mM oder 2 mM, unterstreicht dies zudem die Vermutung eines starken Effektes von Mangan auf die Src-Aktivierung in vitro. Die diversen Effekte von $MnCl_2$ auf das Integrin in Anwesenheit des Liganden Fibrinogen spielen sich überwiegend auf der extrazellulären Domäne der β_3 -Untereinheit ab. Es kommt hier zur Bindung an die ADMIDAS-, MIDAS- und LIMBS-Sequenz (Litvinov et al. 2004).

Bedenkt man, dass sich der Aminosäureaustausch ebenfalls in diesem Bereich der extrazellulären Domäne von β_3 befindet, könnte dies eine mögliche Erklärung für die erhöhte Aktivität des Outside-in Signaling beim HPA-1b/1b-Genotyp sein.

Der Aminosäureaustausch beim HPA-1b/1b-Genotyp von der unpolaren Aminosäure Leucin zur leicht polaren Aminosäure Prolin könnte durch Änderungen der Konformation zur einer erhöhten Affinität für divalente Kationen beim HPA-1b/1b-Genotyp führen. Man betrachte hierbei auch folgenden Aspekt:

Divalente Kationen wie Mangan bewirken ein gesteigertes Rezeptor-Clustering, wie es von Litvinov et al. beschreiben wurde (2004). Dieses Clustering bezeichnet die Eigenschaft von aktivierten Rezeptormolekülen, welche einen Ligand-Rezeptor-Komplex ausbilden, sich in der Plasmamembran durch horizontale Bewegung lokal zu gruppieren (Shattil et al. 2004). Das Clustering ist essentiell für die intrazelluläre Aktivierung von Signalmolekülen wie der Src-Kinase (Arias-Salgado et al. 2003, Shattil et al. 2004). Nimmt man also eine erhöhte Affinität von HPA-1b/1b-Plättchen zu divalenten Kationen an, würde dies auch ein gesteigertes Clustering und damit eine gesteigerte Src-Aktivität erklären.

sCD40L moduliert die Src-Aktivität in Plättchen

CD40L ist ein Transmembranprotein, das hauptsächlich in Immunzellen (T-Lymphozyten, Mastzellen, Basophilen) exprimiert wird (Andre et al. 2002). Es gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren und bindet an den CD40-Rezeptor (CD 154) (Andre et al. 2002). Das CD40/CD40L-System spielt eine Rolle in der Modulation des Immunsystems, indem es die Expression von Chemokinen induziert oder zum Isotyp-Switching von Plasmazellen beiträgt (Andre et al. 2002). Neben dieser Funktion in der Modulation des Immunsystems wird CD40L in kleinen Mengen auch in Plättchen exprimiert (Andre et al. 2002). Es befinden sich durchschnittlich 600 bis 1000 Kopien auf der thrombozytären Plasmamembran (Andre et al. 2002).

Aktivierte Plättchen setzen zudem in geringen Mengen lösliches CD40L frei (Andre et al. 2002, Henn et al. 2001). Dies findet bei Manifestation eines akuten Myokardinfarkts statt, wobei sCD40L zur Thrombusstabilisierung beiträgt (Andre et al. 2002, Aukrust et al. 1999).

sCD40L bindet über seine KGD-Sequenz an die β_3 -Untereinheit von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und bewirkt eine Phosphorylierung an Tyr 759 (Prasad et al. 2003).

Wie andere Liganden von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ bindet sCD40L nur an den aktivierten Rezeptor bzw. in immobilisierter Form auch an die inaktive Form von $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Prasad et al. 2003). Die Inkubation von Plättchen mit löslichem CD40L hat demnach auch kaum Auswirkungen auf die Src-Aktivität, ähnlich wie man es auch bei löslichem Fibrinogen erwarten würde (beide binden nicht an den inaktiven Integrinrezeptor, s. Abbildung 10). Prasad et al. (2003) konnten allerdings zeigen, dass eine Aktivierung des Integrinrezeptors durch sCD40L in Anwesenheit von löslichem Fibrinogen erreicht werden kann, welche durch Integrilin, ein kleines inhibitorisches Hexapeptid gegen Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, hemmbar ist. Gleiche Ergebnisse konnten in dieser Arbeit für die Src-Aktivierung gezeigt werden (Abbildung 10). Demnach haben sCD40L und Fibrinogen eine synergistische Wirkung auf die Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Während jeweils die Anwesenheit nur eines Liganden in löslicher Form in ruhenden Plättchen keine Integrin- und Signaling-Aktivierung bewirkt, führt die gleichzeitige Anwesenheit beider Liganden zu einer signifikanten Aktivierung des Rezeptors bzw. seines Outside-in Signalings.

Anders verhält es sich bei Fibrinogen-adhärenenten Plättchen. Hier konnte dieser Synergismus bezüglich der Src-Aktivität lediglich bei HPA-1b-positiven Plättchen gezeigt werden, wohingegen dieser Effekt bei den HPA-1a/1a-Plättchen ausblieb. Dies suggeriert wiederum eine stärkere Affinität der HPA-1b/1b-Plättchen zu sCD40L bzw. Fibrinogen. Damit zeigt sich ein ähnliches Verhalten wie bei $MnCl_2$. Beide Moleküle, sCD40L und Mangan, interagieren mit der β_3 -Untereinheit von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, so dass auch hier eine Assoziation mit dem Pro³³-Polymorphismus vermutet werden kann.

Da es sich allerdings bei sCD40L um einen physiologisch wichtigen alternativen Liganden von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ handelt, kommt diesen Ergebnissen eine besondere Bedeutung zu. Wie anfangs berichtet, hat sCD40L besonders im Rahmen von akuten koronaren Ereignissen eine wichtige Rolle bei der Thrombusstabilisierung (Andre et al. 2002). Wenn HPA-1b/1b-Plättchen bezüglich der Aktivierung des Outside-in Signalings eine gesteigerte Affinität zu sCD40L aufweisen, könnte dies ein Faktor sein, der dazu beiträgt, dass Träger eines HPA-1b-Allels im Median 5,2 Jahre früher einen Myokardinfarkt erleiden (bei bestehender KHK, Zotz et al., 1998), da, wie eingangs erwähnt, sCD40L vor allem im Rahmen akuter koronarer Ereignisse vermehrt ins Blut freigesetzt wird. sCD40L könnte somit unter anderem zu einer höheren Thrombusstabilität beim HPA-1b/1b-Genotyp im Vergleich zur HPA-1a/1a-Form beitragen.

Zusammenfassung

Thrombozytäre Integrine sind wichtige Werkzeuge der primären Hämostase, da sie Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Kollagen und adhäsive Plasmaproteine wie Fibrinogen, Vitronektin, Fibronektin, von-Willebrand-Faktor oder Thrombospondin binden können. Durch ihre Interaktion mit diesen Liganden steuern sie ein intrazelluläres Signaling, welches maßgeblich für die zentralen Plättchenfunktionen wie Adhäsion, Spreading, Retraktion, Sekretion etc. verantwortlich ist. Eines der wichtigsten Integrine in Plättchen ist $\alpha_{11b}\beta_3$. Das Signaling von Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ ist, wie für Integrine typisch, gekennzeichnet durch eine Bidirektionalität, wobei das Outside-in Signaling die Plättchenfunktion modulieren kann. Eine zentrale Stellung innerhalb dieser Signalkaskade besitzt Src, eine Tyrosinkinase. Die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 418 von Src bewirkt eine Aktivierung der Kinase; dieser Phosphorylierungszustand kann durch spezifische Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden.

Für die β_3 -Untereinheit von Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ gibt es beim Menschen einen genetischen Polymorphismus, welcher mit einem Aminosäureaustausch an Position 33 von Leucin (HPA-1a) nach Prolin (HPA-1b) einhergeht. In klinischen und experimentellen Studien konnte ein prothrombotischer Phänotyp des HPA-1b-Genotyps nachgewiesen werden. Einige Autoren postulierten bereits ein gesteigertes Outside-in Signaling (ERK 1/2, Vijayan et al. 2005) der HPA-1b-Variante.

Unter der Fragestellung eines gesteigerten Outside-in Signalings des HPA-1b/1b-Genotyps wurde in dieser Arbeit die Src-Kinase-Aktivität mittels Western-Blot-Analysen von Lysaten Fibrinogen-adhärenter Plättchen untersucht. In Adhäsionsversuchen über die Zeit zeigte die HPA-1b/1b-Variante eine erhöhte Src-Aktivität bei frühen Adhäsionszeiten im Vergleich zum HPA-1a/1a-Genotyp. Die Endpunktmessung nach 40 min hingegen ergab ein etwa vergleichbares Aktivitätsniveau der Src-Kinase bei beiden Varianten.

Divalente Kationen wie Mangan bewirkten eine Src-Kinase-Phosphorylierung über die Aktivierung von Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$. Zugabe von 0,5 mM $MnCl_2$ zu Fibrinogen-adhärenten Plättchen bewirkte eine signifikante Erhöhung der Src-Kinase.

Diese zeigte sich vor allem beim HPA-1b/1b-Genotyp, bei dem nach 40 min Adhäsion eine 6-fach höhere Src-Aktivität im Vergleich zu HPA-1a/1a zu verzeichnen war. Bei Adhäsion an Fibrinogen in Konzentrationen von 10 µg/ml und 100 µg/ml unter Zugabe von 0,5 mM MnCl₂ fanden sich bei HPA-1a/1a- bzw. HPA-1b/1b-Plättchen jeweils vergleichbare Src-Aktivitäten. Dies ließ auf einen überwiegenden Effekt von MnCl₂ auf die Src-Aktivität unter diesen experimentellen Bedingungen schließen.

CD40L ist neben seiner Funktion in der Modulation des Immunsystems auch als ein physiologischer Aktivator von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ bekannt. Die Zugabe von löslichem CD40L (sCD40L) zu Fibrinogen-adhärenenten Plättchen zeigte lediglich beim HPA-1b/1b-Genotyp eine Steigerung der Src-Kinase-Aktivität. Insgesamt weisen diese Ergebnisse auf eine erhöhte Liganden-vermittelte Aktivierung der HPA-1b/1b-Variante hin. Auch eine frühere bzw. vorzeitige Aktivierung des Outside-in Signalings durch Fibrinogen wurde in HPA-1b/1b-Plättchen beobachtet. Für andere Aktivatoren wie divalente Kationen oder sCD40L demonstrierte die HPA-1b/1b-Variante eine erhöhte Aktivierbarkeit.

Diese Ergebnisse fügen sich somit als ein Baustein des prothrombotischen Phänotyps von HPA-1b/1b ein. Welche molekularen Mechanismen tatsächlich diesem gesteigerten Outside-in Signaling der HPA-1b/1b-Variante zugrundeliegen, muss im Rahmen weiterer experimenteller Untersuchungen geprüft werden.

Literaturverzeichnis, Quellenangabe

Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagne DD. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism. *Nat Med* 2002; 8, 247-52

Arias-Salgado EG, Lizano S, Sarker S, Brugge JS, Ginsberg MH, Shattil SJ. Src kinase activation by a novel and direct interaction with the integrin b cytoplasmic domain. *PNAS USA* 2003; 100, 13298-13302

Aukrust P. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 1999; 100, 614-620

Buensuceso CS, de Virgilio M, Shattil SJ. Detection of integrin alpha IIb beta 3 clustering in living cells. *J Biol Chem* 2002; 278, 15217-24

Craig D, Gao M, Schulten K, Vogel V. Structural Insights into How the MIDAS Ion Stabilizes Integrin Binding to an RGD Peptide, *Structure* 2004; 12, 2049-2058

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

Grawaz Meinrad, *Das Blutplättchen*, Thieme Verlag 2002

Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* 2001; 98, 1047-1054

Jirouskova M, Jaiswal JK, Collier BS. Ligand density dramatically affects integrin alpha IIb beta 3-mediated platelet signaling and spreading. *Blood* 2007; 109, 5260-9

Litvinov RI, Nagaswami C, Vilaire G, Shuman H, Bennett JS, Weisel JW. Functional and structural correlations of individual $\alpha_{IIb}\beta_3$ molecules. *Blood* 2004; 104, 3979-3985

Loncar R, Stoldt V, Hellmig S, Zotz RB, Mihalj M, Scharf RE. HPA-1 polymorphism of alpha IIb beta 3 modulates platelet adhesion onto immobilizes fibrinogen in an in-vitro flow system. *Thromb J* 2007; 5, 2-9

Obergfell A, Eto K, Moscai A, Buensuceso C, Moores SI, Brugge JS, Lowell CA, Shattil SJ. Coordinate interactions of Csk, Src and Syk kinase with alpha IIb beta 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *Cell Biol* 2002; 157, 265-275

Phillips DR, Nannizzi-Alaimo L, Prasad, KS. α IIb β 3 Tyrosine Phosphorylation in α IIb β 3 (Platelet Membrane GP IIb-IIIa) Outside-in Integrin Signaling. *Thromb Haemost* 2001; 86, 246-58

Prasad KS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR. Soluble CD40 ligand induces β 3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in-signaling. *PNAS USA* 2003; 100, 12367-71

Salsmann A, Schaffner-Reckinger E, Kabile F, Plancon S, Kieffer N. A new functional role of the fibrinogen RGD motif as the molecular switch that selectively triggers integrin α IIb β 3-dependent RhoA activation during cell spreading. *J Biol Chem* 2005; 280, 33610-33619

Scharf RE. Erworbene Plättchenfunktionsstörungen. Pathogenese, Klassifikation, Häufigkeit, Diagnostik und Behandlung. *Schattauer Hämostaseologie* 2008; 299-311

Shattil SJ, Newmann PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004; 104, 1606-1615

Shattil SJ. Signaling through platelet integrin α IIb β 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82, 318-325

Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. Global Conformational Rearrangements in Integrin Extracellular Domains in Outside-In and Inside-Out Signaling. *Cell* 2002; 110, 599-611

Van Kraaij DJ, Hovestad-Witterland AH, De Metz M, Vollaard EJ. A comparison of the effect of nabumetone vs meloxicam on serum thromboxane B2 and platelet function in healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2002; 6, 644-647

Vielreicher M, Harms G, Butt E, Walter U, Oberfell A. Dynamic Interaction between Src and C-terminal Src kinase in integrin α IIb β 3-mediated signalling to the cytoskeleton. *J Biol Chem* 2007; 282, 33623-33631

Vijayan KV, Liu Y, Sun W, Ito M, Bray PF. The Pro33 isoform of integrin α IIb β 3 enhances outside-in-signaling in human platelets by regulating the activation of serine/threonine phosphatases. *J Biol Chem* 2005; 280, 21756-21762

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

Vijayan KV, Goldschmidt-Clermont PJ, Ross C, Bray PF. The PI(A2) polymorphism of integrin β 3 enhances outside-in signaling and adhesive functions. *J Clin Invest* 2000; 105, 793-799

Xiao T, Takagi J, Collier BS, Wang JH, Springer TA. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 2004; 432, 27-8

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

Zotz RB, Stockschräder M, Teodoritis A, Müller C, Maruhn BD, Winkelmann BR, Scharf RE. Platelet receptor polymorphisms of glycoprotein (GP) Iba VNTR, GPIIb-IIIa (HPA-1), and GPIa-IIIa (C807T) and the risk of premature myocardial infarction. *Blood* 2003; 102, 293a

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ADP	Adenosindiphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD154	Cluster of differentiation 154
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dichlordiphenyltrichlorethan
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EZM	Extrazellulärmatrix
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GP	Glycoprotein
HPA-1	Humanes Plättchenantigen 1
HRP	Horse-raddish peroxidase
KGD	Lysin-Glycin-Asparaginsäure
KHK	Koronare Herzkrankheit
L (l)	Liter
PBS-T	phosphate buffered saline-Tween
PFA	Perfluoralkoxylalkan
PGE1	Prostaglandin E1
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PP1	Protein Phosphatase 1
PRP	platelet rich plasma
PVDF	Polyvinylidenfluorid
m	milli
μ	mikro
min	Minute
mM	Millimol
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
sCD40L	soluble Cluster of differentiation 40 ligand
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sek	Sekunde
TBS-T	tris buffered saline- Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tyr	Tyrosin
V	Volt
vWF	Von-Willebrand-Faktor

Danksagung

Für die Möglichkeit an seinem Institut und im Rahmen des SFB 612 zu arbeiten, danke ich rechts herzlich meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Marianna Gyenes für ihr Engagement und die sowohl auf fachlicher als auch auf menschlicher Ebene hervorragende Betreuung, sei es in der experimentellen Periode meiner Arbeit als auch in dem darauffolgendem Schreibprozess.

Des gleichen gilt mein Dank unserem Projektleiter Dr. Volker Stoldt, der stets ein kompetenter und ehrlicher Ansprechpartner war.

Ferner danke ich Weingart, Frau Kirchhoff und Frau Bluma, welche unter anderem die ELISA- und FACS-Analysen durchgeführt haben

Lebenslauf

Persönliche Daten

Nachname: Hasse
Vorname: Markus
Geburtsdatum: 06.05.1984
Geburtsort: Dortmund

Berufliche Tätigkeit

Seit August 2010 Assistenzarzt im St. Johanneshospital Dortmund zur
Facharztausbildung für Innere Medizin

Hochschulausbildung

2003 - 2010 Studium der Humanmedizin in Düsseldorf, Bochum und
Heidelberg
Frühjahr 2010 Staatsexamen und Abschluss des Medizinstudiums
Febr. 2009 - Jan. 2010 Praktisches Jahr am Knappschafts Krankenhaus
Dortmund, akademisches Lehrkrankenhaus der Ruhr-
Universität Bochum
Okt. 2005 - Febr. 2009 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf
Okt. 2003 - Aug. 2005 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Schulische Ausbildung

1994 - 2003 Käthe-Kollwitz-Gymnasium Dortmund
1990 - 1994 Hohwart-Grundschule Dortmund