

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

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

Auswirkungen des HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta 3$ auf die
Thrombozytenadhäsion unter flussdynamischen Bedingungen

Dissertation

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

vorgelegt von

Saskia Christina Schlesinger

2012

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

Zusammenfassung

Auswirkungen des HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta 3$ auf die Thrombozytenadhäsion unter flussdynamischen Bedingungen

Saskia Christina Schlesinger

Thema der vorliegenden Arbeit ist es, die Auswirkungen des HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta 3$ auf die Thrombozytenadhäsion unter flussdynamischen Bedingungen zu charakterisieren. Der HPA-1-Polymorphismus beinhaltet einen Aminosäureaustausch, wodurch die HPA-1a- (Leu33) sowie die HPA-1b- (Pro33) -Varianten des Fibrinogenrezeptors entstehen. Ziel der Arbeit war es, die Zusammenhänge zwischen dem HPA-1-Polymorphismus, den Liganden Fibrinogen und Fibronectin, verschiedener Konzentrationen dieser Liganden sowie unterschiedlicher Scherraten systematisch zu erfassen.

Dazu wurde das Vollblut gesunder, homozygoter Spender (HPA-1a/1a, HPA-1b/1b) durch eine rechteckige, mit den Liganden Fibrinogen beziehungsweise Fibronectin beschichtete Flusskammer geleitet. Die Liganden lagen jeweils in Konzentrationen von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sowie 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vor. Scherraten von 1000 s^{-1} und 100 s^{-1} simulierten dabei arterielle beziehungsweise venöse Strömungsbedingungen. Um die Bindung der Liganden an den Fibrinogenrezeptor quantifizieren zu können, wurden im Vorfeld die den Fibrinogenrezeptor tragenden Thrombozyten mit einem Fluorophor markiert. Während des Versuchs konnten diese dann mithilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops über ihre Fluoreszenz sichtbar gemacht und schließlich mit einer Software quantifiziert werden.

Die Flussexperimente konnten signifikante Unterschiede bezüglich der Thrombozytenadhäsion zwischen der HPA-1a/1a- und der HPA-1b/1b-Variante zugunsten der HPA-1b/1b-Variante aufzeigen.

Des Weiteren wurde eine Ligandenabhängigkeit der Thrombozytenadhäsion deutlich. Es ergaben sich signifikante Unterschiede in der Adhäsion zwischen Fibrinogen und Fibronectin unter hohen Scherraten, wobei die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen stärker war als an Fibronectin. Im Gegensatz dazu zeigten die Versuche unter niedrigen Scherraten eine signifikant stärkere Adhäsion an Fibronectin. Zudem ließen sich unterschiedliche Adhäsionskinetiken der beiden Liganden feststellen.

Die Versuche zeigten stets eine stärkere Thrombozytenadhäsion an hohen Ligandenkonzentrationen im Vergleich zu niedrigen Ligandenkonzentrationen. Bezüglich der HPA-1a/1a-Variante ließen sich ausschließlich signifikante Ergebnisse ableiten. Bei der HPA-1b/1b-Variante zeigte sich eine insgesamt wesentlich geringere Konzentrationsabhängigkeit.

Es zeigte sich ausschließlich unter Verwendung von Fibrinogen eine Scherratenabhängigkeit der Thrombozytenadhäsion. Bei Scherraten von 1000 s^{-1} wurden signifikant mehr Thrombozyten adhärent als bei 100 s^{-1} . Fibronectin ließ keine Scherratenabhängigkeit erkennen.

Durch die systematische Erfassung der Zusammenhänge zwischen dem HPA-1-Polymorphismus, den Liganden Fibrinogen und Fibronectin, verschiedener Konzentrationen dieser Liganden sowie unterschiedlicher Scherraten können die bereits in der Literatur vorliegenden Studienergebnisse besser eingeordnet und ergänzt werden. Darüber hinaus sind die Flusskammerversuche dazu in der Lage, die epidemiologischen Beobachtungen einer prothrombotischen Eigenschaft der HPA-1b/1b-Variante experimentell zu bestätigen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Integrine	1
1.1.1	Integrinaktivität	3
1.1.2	Das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$	3
1.1.3	Der HPA-1-Polymorphismus	5
1.2	Vorarbeiten	6
1.2.1	Literaturübersicht	6
1.2.2	Ziel der Arbeit	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Geräte	9
2.1.1	Flusskammermodell	9
2.1.2	Auflistung der verwendeten Geräte und Software	11
2.2	Verwendete Chemikalien und Gebrauchslösungen	12
2.2.1	Beschichtung mit Liganden	12
2.2.2	Auflistung der verwendeten Chemikalien	13
2.3	Probandenblut	13
2.4	Methode	15
2.4.1	Flussexperiment	15
2.5	Auswertung	17
2.5.1	Quantitative Analyse der Thrombozytenadhäsion	17
2.5.2	Tethering	19
3	Ergebnisse	22
3.1	Thrombozytenadhäsion	22
3.1.1	Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit vom HPA-1-Polymorphismus	22
3.1.2	Ligandenabhängigkeit	25
3.1.3	Konzentrationsabhängigkeit	28

3.1.4	Scherratenabhängigkeit	29
3.2	Tethering	31
3.3	Kontrollversuche	31
4	Diskussion	33
4.1	Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit vom HPA-1-Polymorphismus . . .	33
4.2	Ligandenabhängigkeit	35
4.3	Konzentrationsabhängigkeit	36
4.4	Scherratenabhängigkeit	38
4.5	Tethering	38
4.6	Konklusion	39
	 Literaturverzeichnis	 40
	 Abbildungsverzeichnis	 45
	 Tabellenverzeichnis	 46
	 Abkürzungsverzeichnis	 47
	 Anhang	 48
	 Danksagung	 52
	 Lebenslauf	 53
	 Eidesstattliche Versicherung	 54

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit sollen die Auswirkungen des HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta 3$ auf die Thrombozytenadhäsion unter flussdynamischen Bedingungen untersucht werden. Bei dem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ handelt es sich um den auf Thrombozyten lokalisierten Fibrinogenrezeptor (siehe 1.1 Integrine und 1.1.2 Das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$). Dieser wiederum weist einen Polymorphismus auf, der die Funktion des Rezeptors beeinflusst (siehe 1.1.3 Der HPA-1-Polymorphismus).

Um diese Beeinflussung zu spezifizieren, sollen Flusskammerversuche durchgeführt werden. Dazu werden Deckgläser, die in die Flusskammer eingesetzt werden können, mit einem bestimmten Liganden des Fibrinogenrezeptors beschichtet. Anschließend wird Vollblut durch die Flusskammer beziehungsweise über den entsprechenden Liganden geleitet. Um die Bindung der Liganden an den Fibrinogenrezeptor quantifizieren zu können, werden im Vorfeld die den Fibrinogenrezeptor tragenden Thrombozyten mit einem Fluorophor inkubiert. Während des Versuchs können die markierten Thrombozyten dann mithilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops über ihre Fluoreszenz sichtbar gemacht und schließlich mit einer Software quantifiziert werden. Anschließend soll ausgewertet werden, welchen Einfluss die verschiedenen Mutanten des Fibrinogenrezeptors auf die Thrombozytenadhäsion an Liganden haben (siehe 2.5 Auswertung).

1.1 Integrine

Integrine sind heterodimere Transmembranproteine und dienen der Signaltransduktion zwischen Zellen und der sie umgebenden Matrix. Sie bestehen immer aus einer α - und einer β -Untereinheit, die nichtkovalent miteinander verbunden sind und jeweils ein Molekulargewicht zwischen 100 kDA und 200 kDA aufweisen [4, 21]. Bisher konnten 18 α - und 8 β -Ketten identifiziert und 24 der theoretisch 144 möglichen Kombinationen zu Heterodimeren nachgewiesen werden [4]. Der Großteil der α -Untereinheiten setzt sich aus einer leichten und einer schweren Kette zusammen, die wiederum über eine Disulfidbrücke

miteinander verbunden sind (siehe Abb. 1.1). Im Gegensatz dazu besteht die β -Untereinheit meist aus einer Kette.

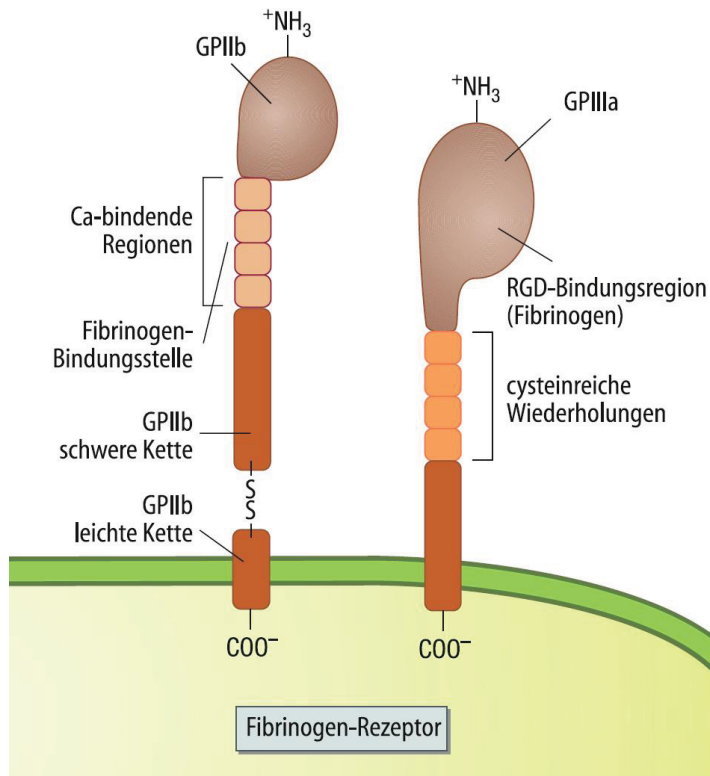


Abb. 1.1: Integrinstruktur am Beispiel des Fibrinogenrezeptors (links α - und rechts β -Untereinheit).

(Modifiziert nach Löffler)

Um eine bidirektionale Signalübertragung gewährleisten zu können, stehen Integrine beispielsweise mit extrazellulären Matrixmolekülen (ECM-Moleküle) und intrazellulären Aktinfasern des Zytoskeletts in Verbindung. Dabei sind einige Integrine in der Lage, Bindungen mit verschiedenen ECM-Molekülen einzugehen, und auch einige ECM-Moleküle haben Bindungsstellen für verschiedene Integrine [21]. Außerdem gibt es Transmembranproteine wie das in dieser Arbeit thematisierte Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$, das kein Rezeptor für ECM-Moleküle ist, sondern den entscheidenden Rezeptor auf Thrombozyten für Fibrinogen darstellt und für die Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation benötigt wird [4] (siehe 1.1.2 Das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$).

Weiterhin sind die Integrine an der Gewebedifferenzierung, der Vermittlung von Interaktionen zwischen Lymphozyten und Endothelzellen und auch an der Metastasierung beteiligt [14].

1.1.1 Integrinaktivität

Die Integrinaktivität wird sowohl intrazellulär als auch extrazellulär durch Änderungen der Affinität und der Avidität reguliert. Dabei kommt es zum Beispiel durch Ionen wie Mg^{2+} oder Ca^{2+} zu Konformationsänderungen des Rezeptors, die dazu führen, dass die Bindungsstellen des Rezeptors entweder aktiv oder inaktiv vorliegen [4, 17, 18]. So bildet die α -Untereinheit an ihrem N-terminalen Ende einen aus repetitiven Elementen bestehenden β -Propeller aus (Abb. 1.2). Dieser dient zum einen als Bindungsstelle für zweiwertige Kationen, andererseits aber auch als direkte Bindungsstelle für Liganden [4, 13, 26]. Bei der I-Domäne, die in allen β - und in einem Teil der α -Untereinheiten vorhanden ist, handelt es sich um eine weitere für die Integrinaktivität wichtige Struktur, die ebenfalls in aktiver oder inaktiver Form vorliegen kann [33, 34].

Des Weiteren wird das Inside-Out-Signaling vom Outside-In-Signaling unterschieden [8]. Dabei wirken sich beim Inside-Out-Signaling intrazelluläre Interaktionen modifizierend auf die Rezeptoraktivität und somit auf die Ligandenbindung aus. Bei diesen Modifikationen handelt es sich sowohl um eine Beeinflussung der Affinität durch Konformationsänderungen des Rezeptors als auch um Änderungen der Rezeptoravidität, die durch ein Rezeptor-Clustering, also das Zusammenlagern mehrerer Rezeptoren, vermittelt werden. Als Outside-In-Signaling wird das durch Ligandenbindung induzierte Vermitteln von Signalen in das Zellinnere bezeichnet. Auch hierbei kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors [9, 10].

1.1.2 Das Integrin $\alpha IIb\beta 3$

Der Fibrinogenrezeptor ist ein ausschließlich im megakaryozytären beziehungsweise thrombozytären System vorkommendes Glykoprotein (GP-IIb/IIIa) und gehört zur Familie der Integrine ($\alpha IIb\beta 3$). Zusätzlich zu den auf der Plasmamembran nicht aktivierter Thrombozyten lokalisierten ca. 80 000 Molekülen des Rezeptors ist dieser auch Bestandteil des innerhalb der Thrombozyten gelegenen offenen kanalikulären Systems und der α -Granula [4]. Damit stellt er quantitativ den wichtigsten thrombozytären Rezeptor dar [5].

Der molekulare Aufbau des Fibrinogenrezeptors ergibt sich aus seiner Zugehörigkeit zu den Integrinen (siehe 1.1 Integrine). Darüber hinaus bestehen die α - und die β -Untereinheit aus vier beziehungsweise acht Domänen, die wiederum zum Teil an der Bindung von Integrinliganden beteiligt sind [25].

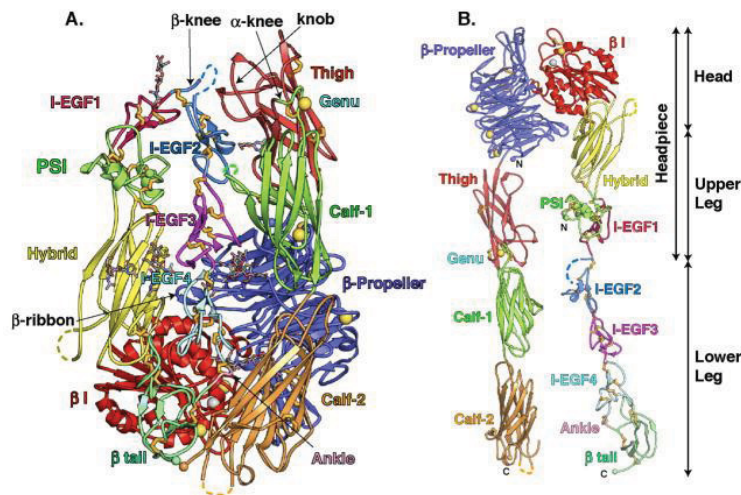


Abb. 1.2: Dreidimensionale Struktur der extrazellulären Domäne von $\alpha\text{IIb}\beta 3$. A. Kristallgitterstruktur von $\alpha\text{IIb}\beta 3$. B. Modell der extrazellulären Domäne von $\alpha\text{IIb}\beta 3$ in gestreckter Form.

(Modifiziert nach Zhu et al., 2008.)

Die zentrale Bedeutung des Fibrinogenrezeptors liegt in der Bindung von löslichem Fibrinogen an die Oberfläche aktivierter Thrombozyten [4,6]. Dies geschieht nach Konformationsänderung des Rezeptors entweder an der Fibrinogenbindungsstelle oder an der RGD-Bindungsregion (siehe Abb. 1.1 und Abb. 1.3). Bei der RGD-Bindungsregion handelt es sich um die bereits angesprochene β -Propeller-Domäne (Abb. 1.2), die die spezifische RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Aspartat) in Proteinen wie zum Beispiel Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin oder dem von Willebrand-Faktor erkennt [2,4]. Demzufolge ist der Rezeptor in der Lage, außer seinem Hauptsubstrat Fibrinogen auch noch andere Liganden zu binden. Die Fibrinogenbindungsstelle selbst besteht aus beiden Untereinheiten und erkennt außer der RGD-Sequenz die KQAGDV-Sequenz des Fibrinogenmoleküls [6].

Im Rahmen der zellulären Hämostase kommt es durch Kontakt von Thrombozyten zu subendothelialen Strukturen der Gefäßwand (zum Beispiel Kollagen), die bei einem

Gefäßschaden freiliegen, zu einer Aktivierung der Thrombozyten. Die dadurch induzierte Thrombozytenaggregation führt zusammen mit der plasmatischen Gerinnung schließlich zum Sistieren der Blutung [21].

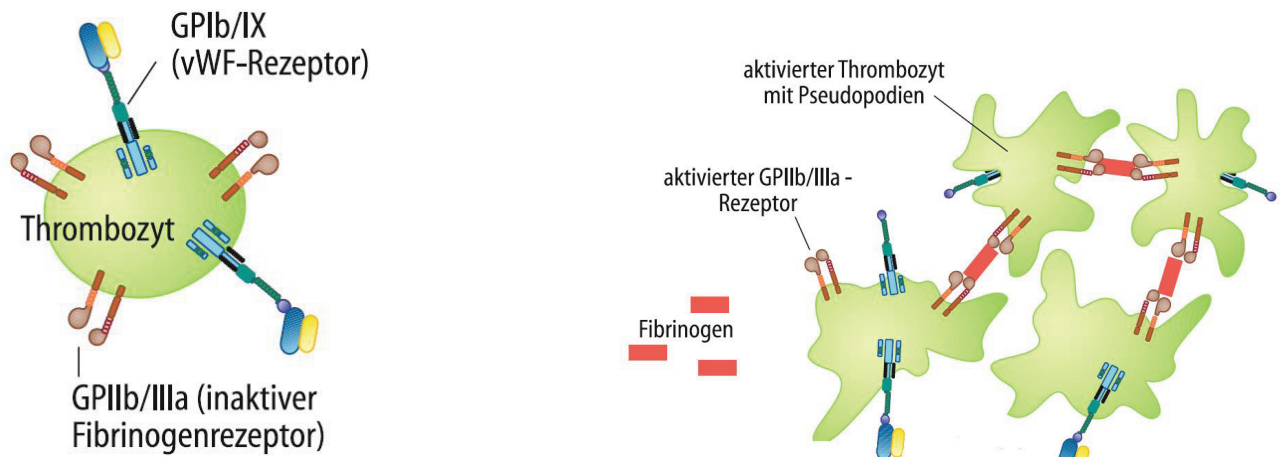


Abb. 1.3: Links: Inaktiver Fibrinogenrezeptor. Rechts: Aktivierter Fibrinogenrezeptor, der nun in der Lage ist, Fibrinogen zu binden, und somit die Thrombozytenaggregation ermöglicht.

(Modifiziert nach Löffler)

Die aktivierten Thrombozyten setzen verschiedene Substanzen wie zum Beispiel Thromboxan A_2 , ADP oder Serotonin frei, die alle die primäre Hämostase fördern und wiederum über einen positiven Feedback-Mechanismus die Thrombozytenaktivierung verstärken. Dies führt schließlich zu einer Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors mit konsekutiv höherer Affinität gegenüber Fibrinogen und wird als Inside-Out-Signaling bezeichnet (siehe 1.1.1 Integrinaktivität und Abb. 1.3). Die anschließend starke Bindung an Fibrinogen ist die Basis für eine starke Quervernetzung und führt somit zur als Aggregation bezeichneten Zusammenlagerung von Thrombozyten. Außerdem kommt es zu einer erneuten Aktivierungsverstärkung in das Zellinnere (Outside-In-Signaling) [21, 22].

1.1.3 Der HPA-1-Polymorphismus

Der Fibrinogenrezeptor weist einen Einzelnukleotid-Polymorphismus auf. Dieser wirkt sich auf die β -Kette an Aminosäureposition 33 aus und ist mit einer Substitution der Aminosäure Leucin gegen Prolin verbunden [11]. Die Leucin-Variante wird als HPA-1a-

(Human Platelet Alloantigen), die Prolin-Variante als HPA-1b-Variante des Polymorphismus bezeichnet. Außerdem finden die Begriffe Pro33- sowie Leu33-Thrombozyten Verwendung. In der kaukasischen Bevölkerung weisen nur 2 % der Menschen die homozygote HPA-1b-Variante (HPA-1b/1b) auf. Daraus konnte wiederum berechnet werden, dass die Genfrequenzen für HPA-1a 85 % und für HPA-1b 15 % betragen [20].

Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass die homozygote HPA-1b-Variante des Fibrinogenrezeptors mit einer Frühzeitigkeit des Myokardinfarktes assoziiert ist, und auch experimentelle Studien waren in der Lage, diese Hypothese zu bestätigen (siehe 1.2.1 Literaturübersicht).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ebenfalls auf experimenteller Ebene damit, die thrombotischen Eigenschaften der homozygoten HPA-1-Varianten (HPA-1a/1a und HPA-1b/1b) miteinander zu vergleichen (siehe 1.2.2 Ziel der Arbeit).

1.2 Vorarbeiten

1.2.1 Literaturübersicht

In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurden fortlaufend Arbeiten zum HPA-1-Polymorphismus veröffentlicht, die sich mit der mittlerweile bekannten prothrombotischen Eigenschaft der HPA-1b/1b-Variante [1, 19, 27] beschäftigen.

Schon 1996 berichteten Weiss et al. über eine enge Assoziation zwischen der HPA-1b/1b-Variante und dem akuten Koronarsyndrom, die bei Patienten, die ein Koronareignis vor ihrem 60. Lebensjahr erlitten hatten, am stärksten ausgeprägt war [32]. Zotz et al. beschrieben einen vorzeitigen Myokardinfarkt bei Trägern HPA-1b/1b-positiver Rezeptoren, konnten jedoch keine direkte Assoziation zur koronaren Herzkrankheit nachweisen [37]. Auch Rosenberg et al. konnten den HPA-1-Polymorphismus nicht als unabhängigen Risikofaktor für koronare Prozesse identifizieren [23]. 2009 untersuchten Sucker et al. den Zusammenhang zwischen Thrombotischen Mikroangiopathien wie zum Beispiel dem Hämolytisch urämischem Syndrom und der HPA-1b/1b-Variante des HPA-1-Polymorphismus und konnten eine wenn auch nicht signifikant höhere Prävalenz der HPA-1b/1b-Variante bei Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe feststellen [27].

Die Arbeitsgruppe um Vijayan und Bray führte in den letzten Jahren zahlreiche Studien durch, die sich mit den Adhäsionscharakteristika von $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -transfektierten CHO-Zellen (Chinese hamster ovary cells) an Liganden beschäftigten. Dazu arbeiteten sie sowohl mit der Methode der Durchflusszytometrie als auch mit Flusskammern (siehe 2.1.1 Flusskammermodell). Die Experimente mit den Liganden Fibrinogen und Fibronectin fanden in Konzentrationen zwischen $2,5 \mu\text{g/ml}$ und $100 \mu\text{g/ml}$ statt. Die erzeugten Scherraten bewegten sich im Bereich zwischen 25 s^{-1} und 100 s^{-1} . Dabei konnten sie zeigen, dass die HPA-1b/1b-Variante im Vergleich zur HPA-1a/1a-Variante des HPA-1-Polymorphismus prothrombotische Eigenschaften in Form von verstärkter Aggregation und Sekretion, erhöhter Adhäsion, Migration und Thrombusbildung besitzt. Vor allem die Unterschiede bezüglich der Adhäsion konnten durch hohe Scherraten zusätzlich verstärkt werden. Außerdem wiesen weitere Experimente auf ein verstärktes Spreading sowie auf ein ausgeprägteres Outside-In-Signaling der HPA-1b/1b-Variante hin [28–30].

Loncar et al. beobachteten bei ähnlichen Flussversuchen, dass Thrombozyten der HPA-1a/1a-Variante zwar initial besser adhärent wurden, jedoch im Gegensatz zu Thrombozyten der HPA-1b/1b-Variante besonders unter arteriellen Strömungsbedingungen den Scherkräften nicht standhalten konnten [19]. Im Vergleich zu den Experimenten von Vijayan et al. arbeiteten Loncar et al. mit sehr viel höheren Fibrinogenkonzentrationen ($2,5 \text{ mg/ml}$) und Scherraten (50 s^{-1} bis 1500 s^{-1}).

1.2.2 Ziel der Arbeit

Sicherlich beinhaltet die HPA-1b/1b-Variante des HPA-1-Polymorphismus prothrombotische Eigenschaften. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun, die Zusammenhänge zwischen dem HPA-1-Polymorphismus, den Liganden Fibrinogen und Fibronectin, verschiedener Konzentrationen dieser Liganden sowie unterschiedlicher Scherraten systematisch zu erfassen. Die klinisch-epidemiologische Beobachtung prothrombotischer Eigenschaften der HPA-1b/1b-Variante (siehe 1.2.1 Literaturübersicht) soll systematisch im Flussexperiment nachvollzogen und somit bestätigt beziehungsweise widerlegt werden. Dabei kann es nicht darum gehen, die komplexen, in vivo stattfindenden Gerinnungsprozesse mit jeglichen Einflussfaktoren experimentell zu simulieren. Vielmehr soll untersucht werden, ob sich im Experiment ein ähnlicher Einfluss der HPA-1b/1b-Variante auf die Gerinnung zeigt.

Dazu soll mit antikoaguliertem Vollblut gesunder, zuvor genotypisierter Spender gearbeitet und mithilfe einer Flusskammer die Thrombozytenadhäsion unter flussdynamischen Bedingungen untersucht werden.

Auf diese Weise sollen die bereits in der Literatur zu findenden Studienergebnisse besser eingeordnet und ergänzt werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

2.1.1 Flusskammermodell

Alle Experimente wurden in einem Flusskammermodell durchgeführt, das aus der Flusskammer selbst, einem Perfusor sowie einem Mikroskop mit zugehöriger Software besteht. Dieses Modell ermöglicht es, Strömungsexperimente durchzuführen, Bilder zu generieren und diese auszuwerten. Die Flusskammer setzt sich aus zwei Teilen, einer metallischen Grundlage und einem Acrylglasblock, zusammen. Die metallische Grundlage ist 7,3 cm mal 4,5 cm groß und hat eine Dicke von 0,3 cm. Die auf der Oberfläche vorhandenen Fräsungen ermöglichen es,

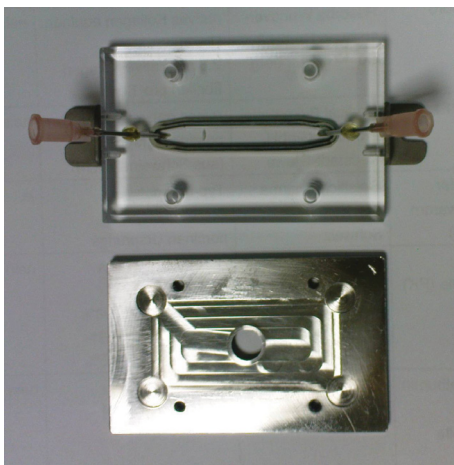


Abb. 2.1: Metallische Grundlage und Acrylglasblock der Flusskammer.

ein Deckglas mit den Maßen 24 mm mal 50 mm einzusetzen. Dieses kann wiederum mit zu untersuchenden Substanzen beschichtet und über eine Aussparung im Metall von unten mikroskopiert werden. Der Acrylglasblock hat die gleiche Grundfläche wie das Metallteil und ist ungefähr 0,7 cm dick. An den beiden Längsenden ist jeweils eine 1,20 mm starke Kanüle eingelassen, deren Spitze plan mit der Unterseite des Acrylglasblocks endet. Beide Teile der Kammer haben an äquivalenten Stellen Bohrungen, über die sie mit vier Schrauben fest miteinander verbunden werden. Das Deckglas befindet sich zwischen Metallplatte und Acrylglasblock. Zusätzlich

zu den beiden Kanülen besitzt der Acrylglasblock an beiden Enden kleine Halterungen, mit denen die gesamte Flusskammer in den Objektstisch des Mikroskops eingesetzt werden kann (siehe Abb. 2.1 und Abb. 2.2).

Außerdem gehört zum Flusskammermodell ein Unterdrucksystem, mithilfe dessen eine Strömung in der Kammer erzeugt werden kann. Hierzu wird ein besonderer Perfusor ge-

nutzt, der den Stempel einer Spritze aus dieser herauszieht. Eine Kanüle der Flusskammer wird über einen ca. 20 cm langen Schlauch mit der Spritze verbunden, während über die andere Flüssigkeiten eingeleitet werden können. Letztendlich lassen sich am Perfusor beliebige Geschwindigkeiten vorgeben, die dann zu unterschiedlichen Strömungsbedingungen in der Flusskammer führen (Abb. 2.3).

Bei dem Mikroskop handelt es sich um ein Laser-Scanning-Mikroskop der Firma Zeiss, das dem Benutzer erlaubt, nicht ausschließlich mithilfe des Durchlichtkanals zu mikroskopieren, sondern zusätzlich die Möglichkeit bietet, die Bilder zu scannen und zu digitalisieren. Hierzu wird die Software des LSM 510 benötigt, über die sich zudem sämtliche Funktionen des Mikroskops steuern lassen.

Das LSM 510 wird genutzt, um mit dem Fluorophor Mepacrin inkubierte Thrombozyten durch einen Laserstrahl zur Fluoreszenz anzuregen und diese indirekt im Mikroskop darzustellen. Bei dem Laser handelt es sich um einen Argonlaser, der auf 100 % Leistung eingestellt ist und eine Wellenlänge von 458 nm emittiert. Sowohl für das Fokussieren mithilfe des Durchlichtkanals als auch für das Scannen der Bilder mittels Fluoreszenzkanal wurde mit einem 40er Objektiv (Plan Neofluar 40 x / 1,3 Oil) gearbeitet. Der Fluoreszenzkanal des Mikroskops war wie folgt eingestellt: Pinhole 1000 μm , Filter: BP 505-550, Detector Gain: 750.

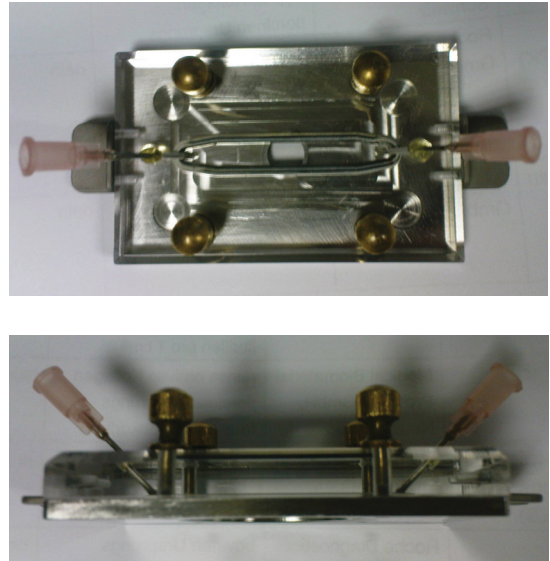


Abb. 2.2: Zusammengebaute Flusskammer; Auf- und Seitansicht.



Abb. 2.3: Übersichtsaufnahme mit Mikroskop und Perfusor (links) sowie Detailansicht mit eingesetzter Flusskammer (rechts).

Die einzelnen Versuche dauerten zehn Minuten, in denen zu Beginn jeder Minute eine Bilderserie angefertigt wurde. Diese bestand aus zehn separaten Aufnahmen, die im zeitlichen Abstand von 900 ms gemacht wurden. Das Bildformat betrug 512 mal 512 und wurde in 8 bit Graustufen angefertigt.

2.1.2 Auflistung der verwendeten Geräte und Software

Geräte:

Flusskammer (siehe 2.1.1 Flusskammermodell)

Deckgläser 24 x 50 mm: 0,13 - 0,17 mm, Engelbrecht, Edermünde

Perfusor® Secura, B. Braun, Melsungen

Mikroskop, Axiovert 100M, Carl Zeiss AG, Oberkochen

CLSM 510, Argonlaser, Carl Zeiss AG, Oberkochen

Inkubator, Heraeus CO₂-Auto-Zero, Heraeus Kulzer GmbH & Co.KG, Hanau

Rolling Mixer, Sysmex RM-810, Sysmex Digitana AG, Horgen, Schweiz

Software:

Bildakquisition:

LSM 510 Release 2.8 Service Pack 1

Bildverarbeitung:

ImageJ Version 1.39, Wayne Rasband am Massachusetts Institute of Technology (MIT)

Tabellenkalkulation:

Microsoft Office Excel 2003

Statistik:

GraphPad InStat 3.06

2.2 Verwendete Chemikalien und Gebrauchslösungen

2.2.1 Beschichtung mit Liganden

Im Experiment wurde das Deckglas, welches in die Flusskammer eingelegt werden kann, mit den Liganden Fibrinogen und Fibronectin beschichtet. Das Fibrinogen entstammte bovinem Plasma und wurde über die Firma Sigma bezogen. Das Fibronectin der Firma Chemicon war aus humanem Plasma isoliert worden. Beide Liganden lagen gelöst in einer Konzentration von 1 mg/ml vor. Für Konzentrationsreihen wurden sie mit PBS-Puffer verdünnt, und schließlich sowohl für Fibronectin als auch für Fibrinogen die Konzentrationen 100 $\mu\text{g/ml}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$ für die Experimente gewählt.

Um zu verhindern, dass die relativ geringen Mengen, mit denen beschichtet wurde, auf den Gläsern eintrocknen, erfolgte die Beschichtung der Deckgläser 30 Minuten vor Versuchsbeginn für jeden Versuch separat. Außerdem wurden die beschichteten Deckgläser bis zum Beginn des Versuchs in geschlossenen Petrischalen bei 37° C und 0,5 % CO₂ in einem Feuchtinkubator aufbewahrt. Die Beschichtung beider Liganden erfolgte jeweils mit 30 μl , die in die Mitte eines Deckglases pipettiert wurden.

Nach der Inkubationszeit wurde das beschichtete Deckglas aus dem Inkubatorschrank geholt, um es mit der zuvor gereinigten sowie getrockneten Flusskammer zusammenzusetzen. Dazu wurde das Glas mithilfe eines Skalpells aus der Petrischale gehoben und in die Fräsungen der Metallgrundlage der Kammer gelegt, um schließlich den Acrylglasblock möglichst senkrecht auf beides aufzubringen und die Flusskammer mittels der vier dafür vorgesehenen Schrauben zu fixieren. Nachdem das Objektiv des Mikroskops mit einem Tropfen Immersionsöl versehen wurde, konnte die Kammer mithilfe ihrer Halterungen

in den Objekttrisch eingesetzt und wiederum mit kleinen Schrauben am Objekttrisch befestigt werden. Um unspezifische Bindungen der Thrombozyten, beispielsweise am Glas, zu verhindern, wurde das System schließlich mit 1 %ig in PBS-Puffer gelöstem bovinem Serumalbumin gespült.

Nach jeder in 2.4.1 beschriebenen Versuchsdurchführung wurden die Kanülen der Flusskammer mit dem proteindenaturierenden Reiniger Edisonite gespült und nach einem Versuchstag die gesamte Kammer inklusive des Schlauches gründlich gewaschen.

2.2.2 Auflistung der verwendeten Chemikalien

Fibrinogen from bovine plasma, Sigma

Human plasma Fibronectin purified protein, Chemicon International

ReoPro® (Abciximab), Eli Lilly

Albumin from bovine serum, Sigma

Quinacrine Dihydrochloride (Mepacrin), Fa. Sigma, Taufkirchen

PBS-Puffer pH 7,3; Serag Wiessner

Edisonite Classic (Pulver), Merz

BD Vacutainer® Röhrchen für die Gerinnungsanalyse (Citrat)

2.3 Probandenblut

Für die durchgeführten Experimente wurde Blut HPA-1-genotypisierter Spender verwendet. Diese waren homozygot für HPA-1a oder HPA-1b. Um Probanden für die Experimente zu gewinnen, wurden unter Nutzung der Datenbanken des Instituts für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin Blutspender mit bekanntem Genotyp kontaktiert und um die Studienteilnahme gebeten. Diese Versuche wurden im Rahmen des SFB612 durchgeführt, für welchen die Ethikkommission folgendes Aktenzeichen vergab: Studien-Nr:1864 (Modulation der Plättchenthrombogenität durch genetisch determinierte Varianten thombozytärer Integrine).

Aus der Versuchsreihe ausgeschlossen wurden jene Spender, die die Thrombozytenadhäsion beeinflussende Medikamente wie zum Beispiel ASS genommen hatten oder deren Thrombozytenzahl am Versuchstag nicht im Rahmen von $150.000/\mu\text{l}$ und $350.000/\mu\text{l}$ lag (Tab. 2.1). Schließlich nahmen insgesamt 20 Probanden an der Studie teil, nachdem sie sich mittels Einverständniserklärung schriftlich dazu bereit erklärt hatten, ca. 60 ml venöses Vollblut zu spenden. Davon waren elf Studienteilnehmer Träger der homozygoten HPA-1a/1a-Variante (zehn weiblich, einer männlich; durchschnittliches Alter: 27 Jahre) und neun Studienteilnehmer Träger der homozygoten HPA-1b/1b-Variante (zwei weiblich, sieben männlich; durchschnittliches Alter: 48 Jahre).

Am Versuchstag wurde den Probanden Citratblut abgenommen, wobei das erste Röhrchen stets verworfen wurde, um eine vorzeitige Aktivierung der Gerinnung durch Gewebsthromboplastin zu verhindern. Danach konnte das Blut für die geplanten Versuche auf einzelne Polypropylen-Röhrchen verteilt und die Blutprobe für den ersten Versuch mit dem Fluoreszenzmarker Mepacrin (10 mM) für 60 Minuten auf einer Rollbank inkubiert werden. Dabei wurde im Verhältnis 1 : 1000 (Mepacrin : Blut) verdünnt. Wie auch unter anderem in eigenen Vorversuchen gesehen, besitzt das Mepacrin die Eigenschaft, sich kontinuierlich abzubauen. Deswegen war es nicht möglich, direkt die gesamte Blutprobe zu färben. Stattdessen wurde, um systematische Messfehler zu vermeiden, das Blut für jeden einzelnen Versuch inkubiert.

Proband	Thrombozytenzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$	Leukozytenzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$	Erythrozytenzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$	Hämoglobin g/dl
1	274	8,0	3,77	8,9
2	212	4,7	4,16	12,7
3	208	4,7	3,45	10,6
4	155	6,3	3,93	11,8
5	226	3,8	3,95	11,8
6	203	5,7	4,26	13,2
7	187	6,1	4,12	12,5
8	222	6,5	4,84	14,4
9	324	4,3	4,49	13,6
10	209	4,8	3,82	11,5
11	194	5,6	4,03	12,4

Proband	Thrombozytenzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$	Leukozytenzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$	Erythrozytenzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$	Hämoglobin g/dl
1	252	5,3	3,86	11,9
2	288	4,1	4,85	14,2
3	186	4,6	4,91	15,1
4	260	4,7	4,50	13,4
5	299	8,4	4,61	13,9
6	245	4,5	4,53	12,7
7	201	5,9	4,18	13,3
8	206	4,9	4,46	14,3
9	172	5,7	4,12	12,5

Tabelle 2.1: Blutwerte der HPA-1a/1a-positiven Probanden (oben) sowie der HPA-1b/1b-positiven Probanden (unten).

2.4 Methode

2.4.1 Flussexperiment

Durchführungsvarianten des Flussexperiments

Es sollten Experimente mit den beiden Liganden Fibrinogen und Fibronectin in jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt werden. Bei der Wahl der Konzentrationen wurde darauf geachtet, dass sich möglichst große Unterschiede in der Thrombozytenadhäsion zeigten. Aus diesem Grund wurden in Vorversuchen Konzentrationsreihen angefertigt. Schließlich wurde zum einen mit $100 \mu\text{g/ml}$ und zum anderen mit $20 \mu\text{g/ml}$ gearbeitet. Außerdem sollten mithilfe des Perfusors unterschiedliche Scherraten in der Flusskammer erzeugt werden, die auf der einen Seite venöse und auf der anderen Seite arterielle Strömungsbedingungen simulierten. Dazu wurden die Scherraten 100 s^{-1} und 1000 s^{-1} gewählt, was einer Strömungsgeschwindigkeit von ca. $1,92 \text{ ml/h}$ beziehungsweise $19,2 \text{ ml/h}$ entspricht. Da die einzelnen Versuche 10 Minuten dauerten, wurden beispielsweise für einen Versuch mit hoher Scherrate ca. 5 ml Blut benötigt.

Um die in der Flusskammer herrschende Scherrate (γ) berechnen zu können, wird folgende Formel herangezogen:

$$\gamma = \frac{6 \cdot Q}{w \cdot h^2}$$

Q = Flussrate in ml/s

w = Länge des Feldes der Flusskammer

h = Höhe der Flusskammer

Somit erreicht man durch Umformung die Formel für die Flussrate (Q):

$$Q = \frac{\gamma \cdot w \cdot h^2}{6}$$

Schließlich ergaben sich aus den zwei Liganden in jeweils zwei Konzentrationen und den beiden Strömungsgeschwindigkeiten acht Versuchskombinationen, die jeweils mit dem Blut eines Probanden durchgeführt wurden (siehe Tab. 2.2).

Versuch 1:	Fibrinogen	100 μ g/ml	1000s ⁻¹
Versuch 2:	Fibrinogen	20 μ g/ml	1000s ⁻¹
Versuch 3:	Fibronectin	100 μ g/ml	1000s ⁻¹
Versuch 4:	Fibronectin	20 μ g/ml	1000s ⁻¹
Versuch 5:	Fibrinogen	100 μ g/ml	100s ⁻¹
Versuch 6:	Fibrinogen	20 μ g/ml	100s ⁻¹
Versuch 7:	Fibronectin	100 μ g/ml	100s ⁻¹
Versuch 8:	Fibronectin	20 μ g/ml	100s ⁻¹

Tabelle 2.2: Versuchskombinationen

Experimentelle Durchführung

Um überschüssige Liganden aus der eingesetzten Flusskammer zu entfernen und unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde vor Beginn des Versuchs über die Kanüle der

Einflussseite mit ca. 1 ml 1 %igem BSA-Puffer gespült. Dabei war darauf zu achten, dass sämtliche Luftblasen aus dem System entfernt wurden. Anschließend konnte der mit der Perfusorspritze verbundene Schlauch an die Kanüle der Ausflussseite angeschlossen und eine 2 ml-Spritze ohne Stempel auf die Einflusskanüle gesteckt werden. Diese sollte als Trichter für das später einzuleitende Blut dienen.

Als Nächstes musste die zu mikroskopierende beziehungsweise zu scannende Ebene fokussiert werden. Dazu wurde mit dem Durchlichtkanal des Mikroskops gearbeitet und das Objektiv zunächst so nah wie möglich an die Unterseite des Deckglases gefahren, damit bestimmte Orientierungspunkte wie zum Beispiel Kratzer im Acrylblock scharf gestellt werden konnten. Anhand dieser wurde über die Funktion "Stage and Focus Control" ein fiktiver Nullpunkt bestimmt und anschließend von diesem aus ein ca. 160 μm niedriger liegender Bereich eingestellt. Dieser entsprach ungefähr der beschichteten Ebene auf dem Glas, an dem im Versuch die adhärennten Thrombozyten zu sehen sein sollten. Um die exakte Fokusebene zu treffen, wurde diese erst kurz vor den Aufnahmen anhand der ersten den gescannten Bereich passierenden Blutplättchen eingestellt.

Nach diesen Vorbereitungen wurde das mit Mepacrin inkubierte Blut in die 2 ml Spritze an der Einflusskanüle pipettiert und der vorher eingestellte Perfusor angeschaltet. Durch den so erzeugten Unterdruck floss das Blut über die Kanüle in die Flusskammer, woraufhin gewartet wurde, bis die Blutfront den gescannten Bereich erreichte. Nun wurde innerhalb der nächsten Sekunden die mit Liganden beschichtete Ebene eingestellt und nach exakt einer halben Minute die Aufnahme des ersten Bildstapels mit der Software des LSM 510 begonnen. Im weiteren Verlauf wurden alle 60 Sekunden Bilderserien à zehn Bilder gescannt, woraufhin während des zehnminütigen Versuchs insgesamt 100 Aufnahmen entstanden. Nachdem die letzte Bilderserie aufgenommen und der Versuch damit beendet war, wurde stets nachfokussiert, um sicherzustellen, in der richtigen Bildebene gescannt zu haben.

2.5 Auswertung

2.5.1 Quantitative Analyse der Thrombozytenadhäsion

Die aquirierten Versuchsbilder (siehe 2.4.1 Experimentelle Durchführung) wurden zur Auswertung in das Bildverarbeitungsprogramm ImageJ importiert. Dieses bietet die Möglichkeit, die optische Information der Bilder in numerischen Werten darzustellen. Um die

Auswertroutine zu automatisieren, wurde ein Macro (siehe Anhang) für das Programm geschrieben.

Die Bearbeitung der Bilder hatte zum Ziel, darstellen zu können, wie viele Thrombozyten nach einer bestimmten Zeiteinheit (1, 2, 3,...10 min) an den untersuchten Liganden adhärirt waren. Es sollten also nicht die mobilen, sondern ausschließlich die adhärennten Thrombozyten in die spätere statistische Analyse einbezogen werden. Hierzu wurden repräsentativ für einen Zeitpunkt die zwei ersten Bilder eines Bildstapels mittels digitaler Bildsubtraktion miteinander verrechnet. Diese unterschieden sich aufgrund der geringen Zeitdifferenz der Aufnahmen (900 ms) ausschließlich in den bewegten Blutplättchen, die im Versuch an den Liganden vorbeigeströmt waren, ohne zu adhäririeren.

Zunächst wurden nacheinander das erste und das zweite Bild eines Bildstapels im Programm ImageJ geöffnet und, um Fluoreszenzunterschiede auszugleichen, mithilfe der Funktion Threshold die Grauwerte reduziert.

```
open("F:\\080723-01\\0000.png");
setAutoThreshold(); //run("Threshold...");
setThreshold(1, 255); run("Convert to Mask");
open("F:\\080723-01\\0001.png"); setAutoThreshold();
//run("Threshold..."); setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
```

Im Kasten ist der entsprechende Abschnitt aus dem Macro zu sehen. Im Anhang findet sich das komplette Macro.

Anschließend konnte die Bildsubtraktion mithilfe des Image Calculators durchgeführt, also die beiden bearbeiteten Bilder so miteinander verrechnet werden, dass das Ergebnisbild ausschließlich die Pixel zeigte, die an äquivalenten Stellen in beiden Quellbildern vorhanden waren.

```
imageCalculator("AND create", "0000.png", "0001.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0000.png operation=AND
image2=0001.png create");
```

Im Kasten ist der entsprechende Abschnitt aus dem Macro zu sehen.



Abb. 2.4: Bildverarbeitung zur Thrombozytenadhäsion

Schließlich wurden alle Pixel eines Ergebnisbildes analysiert und die gesamte Fläche errechnet, die von ihnen eingenommen wurde. Dies entsprach der Menge der adhärenen Blutplättchen (siehe Abb. 2.4).

```
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00  
show=Nothing summarize");
```

Im Kasten ist der entsprechende Abschnitt aus dem Macro zu sehen.

Diese Auswertroutine wurde für jeden der zehn Bildstapel eines Versuchs durchgeführt, wodurch am Ende repräsentativ für die Anzahl der Thrombozyten, die nach einer bestimmten Zeit (1, 2, 3,...10 min) im Versuch adhärert waren, numerische Werte entstanden. Diese konnten daraufhin direkt in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel exportiert und dort verwaltet werden. Um zu vermeiden, dass die unterschiedlichen Thrombozytenzahlen der einzelnen Probanden die Ergebnisse verfälschen, wurde die absolute Zahl an adhären gewordenen Blutplättchen durch die jeweilige Thrombozytenzahl des Spenderblutes dividiert.

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Student's t-Test, wobei das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ ermittelt wurde.

2.5.2 Tethering

Der Begriff Tethering beschreibt das durch Scherkräfte verursachte Vorantreiben von Thrombozyten auf Liganden, das schließlich zur Adhäsion oder zum Abreißen der Thrombozyten führt. Um dieses Verhalten der Blutplättchen später statistisch analysieren zu können, wurde ein zweiter Auswertmechanismus im Programm ImageJ entwickelt, mithilfe dessen berechnet werden konnte, welche Strecke die einzelnen Thrombozyten auf den

Liganden zurückgelegt hatten, bevor sie, wie eben beschrieben, abrissen oder adhären wurden.

Da die Bilder eines Bildstapels in sehr geringem zeitlichen Abstand zueinander gemacht worden waren, zeigte das jeweils nächste Bild den Aufenthaltsort der Thrombozyten einen Moment später. Durch Addition aller Bilder ergaben sich also Striche, die die Mikrobewegung der Thrombozyten zeigten.

Zunächst wurden alle zehn Bilder eines Bildstapels geöffnet und, wie bereits beschrieben, die Grauwerte reduziert.

```
run("Image Sequence...", "open=F:\\Tethering
\\080910-01\\0000.png
number=10 starting=1 increment=1 scale=100 file=[] or=[]");
setAutoThreshold(); //run("Threshold...");
run("Convert to Mask", "calculate");
run("Stack to Images");
```

Im Kasten ist der entsprechende Abschnitt aus dem Macro zu sehen.

Anschließend konnte die Addition der Bilder mithilfe des Image Calculators durchgeführt, also die Bilder so miteinander verrechnet werden, dass das Ergebnisbild alle Pixel zeigte, die in den zehn Quellbildern vorhanden waren. Der entsprechende Abschnitt des Macros ist im Anhang dargestellt.

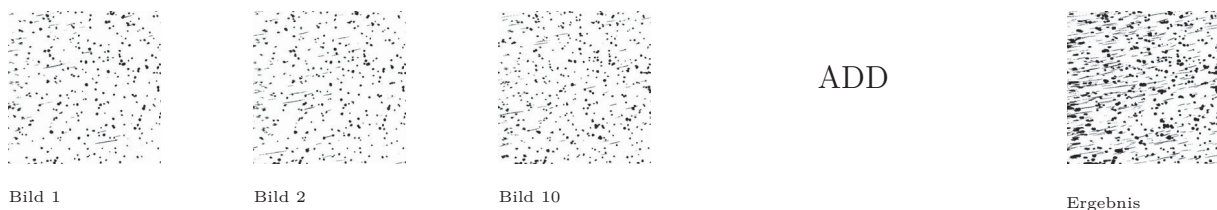


Abb. 2.5: Bildverarbeitung zum Tethering

Schließlich wurde das Ergebnisbild in Hinblick auf die entstandenen Striche analysiert und das Ergebnis numerisch dargestellt (siehe Abb. 2.5).

```
run("Set Measurements...", "bounding redirect=None decimal=0");  
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00  
show=Nothing display"); run("Summarize");
```

Im Kasten ist der entsprechende Abschnitt aus dem Macro zu sehen.

Da innerhalb der ersten zwei Versuchsminuten die Anzahl adhärenter Thrombozyten deutlich anstieg, konnte diese Auswertroutine ausschließlich für den ersten Bildstapel eines Versuchs durchgeführt werden. Die errechneten Werte für die von den Thrombozyten innerhalb von neun Sekunden zurückgelegten Strecke wurden ebenfalls in Excel exportiert.

3 Ergebnisse

3.1 Thrombozytenadhäsion

Im Folgenden sollen zunächst die Ergebnisse in Hinblick auf die Thrombozytenadhäsion und im Anschluss in Abschnitt 3.2 die Ergebnisse bezüglich des Tetherings besprochen werden (siehe auch 2.5 Auswertung).

Die Thrombozytenadhäsion wird nacheinander in Abhängigkeit von den Faktoren HPA-1-Polymorphismus, Liganden, Ligandenkonzentrationen sowie Scherraten dargestellt und jeweils anhand eines Säulendiagramms erklärt. Dieses wiederholt sich in jedem Abschnitt und wird, um den einzelnen Schwerpunkt zu unterstreichen, farblich modifiziert.

3.1.1 Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit vom HPA-1-Polymorphismus

Abbildung 3.1 zeigt ein Säulendiagramm, in dem auf der Ordinate die Fluoreszenzeinheiten als Äquivalent der Menge der adhärenen Thrombozyten und auf der Abszisse die acht durchgeführten Versuchskombinationen aufgetragen sind. Dementsprechend repräsentieren die Säulen, wie viele Thrombozyten nach zehn Minuten bei den einzelnen Versuchskombinationen adhären geworden sind, wobei die HPA-1a/1a- sowie die HPA-1b/1b-Variante stets getrennt dargestellt werden.

Wie in Abbildung 3.1 zu sehen, konnten die Flussexperimente quantitative Unterschiede bezüglich der Thrombozytenadhäsion zwischen der HPA-1a/1a- und der HPA-1b/1b-Variante zugunsten der HPA-1b/1b-Variante aufzeigen. Die beiden Polymorphismen ließen zwar eine ähnliche Thrombozytenadhäsion unter hohen Ligandenkonzentrationen erkennen, es zeigte sich aber unter niedrigen Ligandenkonzentrationen eine stärkere Adhäsion bei der HPA-1b/1b-Variante. Diese war in den Versuchen "Fibrinogen 20 μ g/ml 1000s⁻¹" ($p < 0,0001$), "Fibrinogen 20 μ g/ml 100s⁻¹" ($p < 0,0093$) und "Fibronectin 20 μ g/ml 100s⁻¹"

($p < 0,001$) signifikant, in Versuch "Fibronectin 20 μ g/ml 1000s $^{-1}$ " zwar auch zu sehen, erreichte aber aufgrund großer Standardabweichungen nicht das Signifikanzniveau.

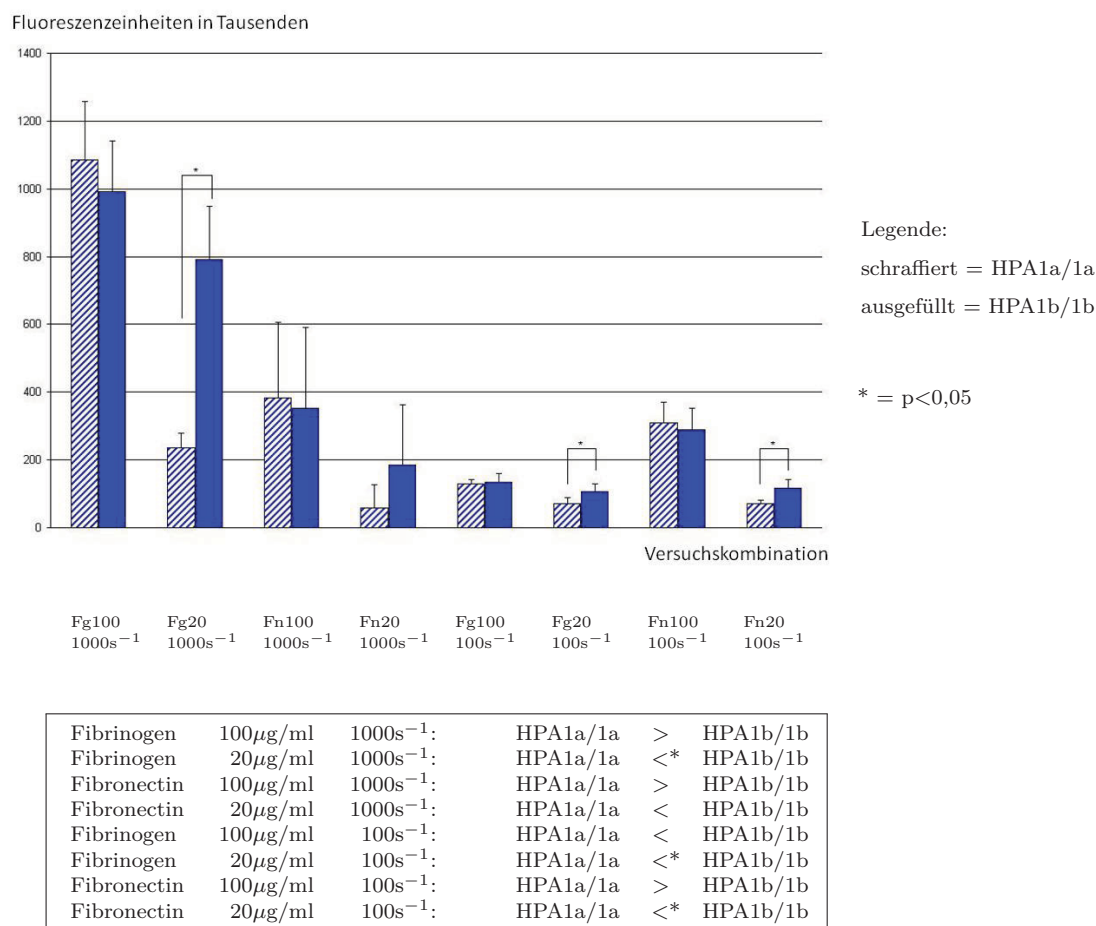
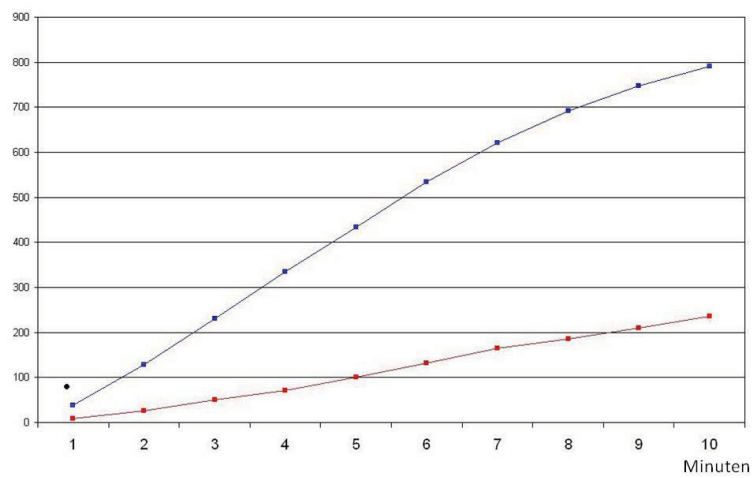


Abb. 3.1: Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit vom HPA-1-Polymorphismus.

Abbildung 3.2 zeigt die eben genannten Versuche mit signifikantem Unterschied der Thrombozytenadhäsion im Vergleich der HPA-1-Polymorphismen. Im Gegensatz zu Abbildung 3.1 wird nicht die absolute Thrombozytenadhäsion nach zehn Minuten, sondern der zeitliche Verlauf der Thrombozytenadhäsion dargestellt.

Fluoreszenzeinheiten in Tausenden



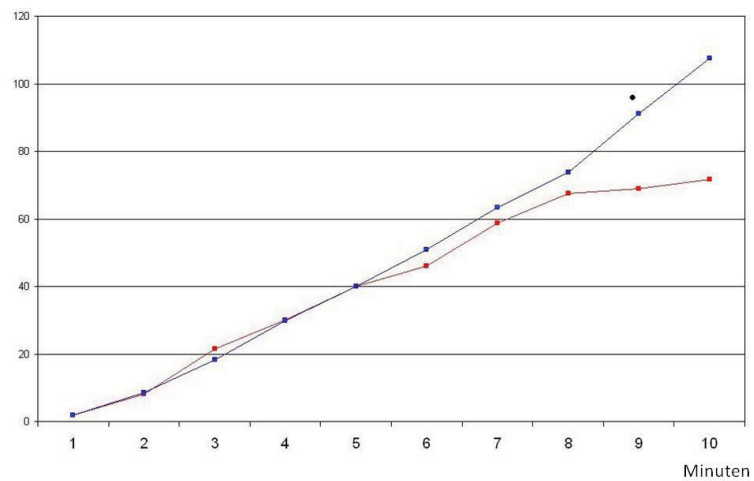
Legende:

blau = HPA1b/1b

rot = HPA1a/1a

* = $p < 0,05$ a. Fibrinogen $20\mu\text{g/ml}$ 1000s^{-1} .

Fluoreszenzeinheiten in Tausenden

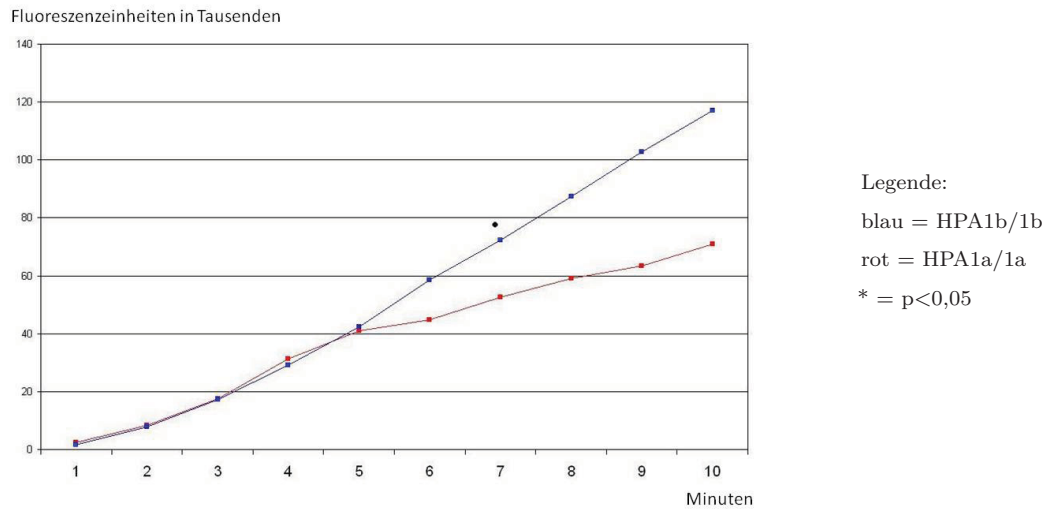


Legende:

blau = HPA1b/1b

rot = HPA1a/1a

* = $p < 0,05$ b. Fibrinogen $20\mu\text{g/ml}$ 100s^{-1} .



c. Fibronectin 20µg/ml 100s⁻¹.

Abb. 3.2: Adhäsionskinetik in Abhängigkeit vom HPA-1-Genotyp über die Zeit; a. Adhäsion auf 20µg/ml Fibrinogen bei 1000s⁻¹ Scherrate b. Adhäsion auf 20µg/ml Fibrinogen bei 100s⁻¹ Scherrate c. Adhäsion auf 20µg/ml Fibronectin bei 100s⁻¹ Scherrate.

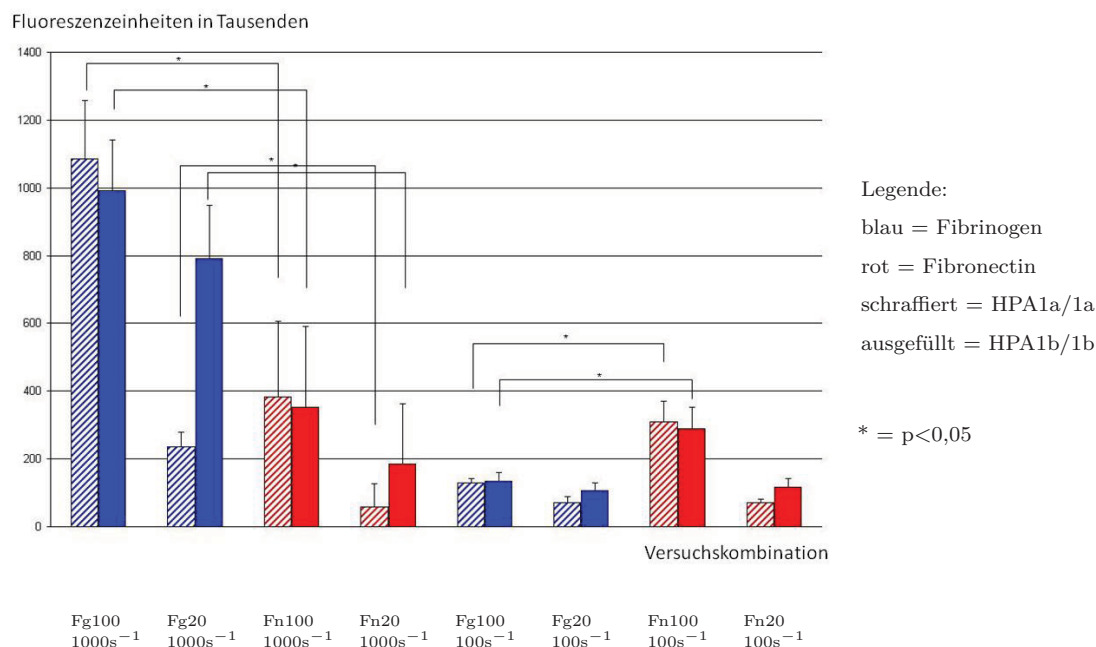
In Versuch "Fibrinogen 20µg/ml 1000s⁻¹" waren die Unterschiede in der Thrombozytenadhäsion über die gesamte Versuchsdauer signifikant. Nach zehn Minuten erreichte die HPA-1b/1b-Variante das Dreifache an Adhäsion der HPA-1a/1a-Variante. Im Gegensatz dazu zeigte Versuch "Fibrinogen 20µg/ml 100s⁻¹" erst in den letzten beiden und Versuch "Fibronectin 20µg/ml 100s⁻¹" über die letzten vier Versuchsminuten signifikante Adhäsionsunterschiede.

3.1.2 Ligandenabhängigkeit

Das Säulendiagramm in Abbildung 3.3 entspricht weitgehend dem aus Abbildung 3.1. Die blau gefärbten Säulen zeigen Versuche mit dem Liganden Fibrinogen, bei den rot gefärbten Säulen handelt es sich um Versuche mit dem Liganden Fibronectin.

Die Auswertung der Versuche zeigte eine Ligandenabhängigkeit der Thrombozytenadhäsion, die bei beiden Polymorphismen ähnlich war. Wie in Abb. 3.3 zu sehen, ergaben sich signifikante Unterschiede in der Adhäsion zwischen Fibrinogen und Fibronectin unter hohen Scherraten (Versuch "Fibrinogen 100µg/ml 1000s⁻¹" und "Fibronectin 100µg/ml 1000s⁻¹" (p<0,0001), sowie Versuch "Fibrinogen 20µg/ml 1000s⁻¹" und "Fibronectin

$20\mu\text{g/ml } 1000\text{s}^{-1}$ ($p < 0,0001$)), wobei die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen drei- beziehungsweise viermal stärker war als an Fibronectin.



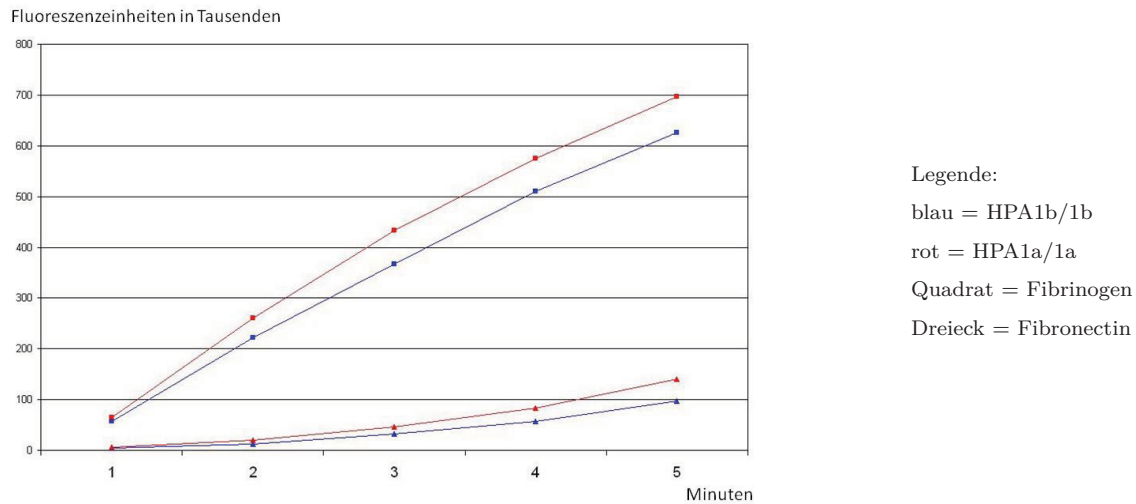
HPA1a/1a						
Fibrinogen	$100\mu\text{g/ml}$	1000s^{-1}	>*	Fibronectin	$100\mu\text{g/ml}$	1000s^{-1}
Fibrinogen	$20\mu\text{g/ml}$	1000s^{-1}	>*	Fibronectin	$20\mu\text{g/ml}$	1000s^{-1}
Fibrinogen	$100\mu\text{g/ml}$	100s^{-1}	<*	Fibronectin	$100\mu\text{g/ml}$	100s^{-1}
Fibrinogen	$20\mu\text{g/ml}$	100s^{-1}	>	Fibronectin	$20\mu\text{g/ml}$	100s^{-1}
HPA1b/1b						
Fibrinogen	$100\mu\text{g/ml}$	1000s^{-1}	>*	Fibronectin	$100\mu\text{g/ml}$	1000s^{-1}
Fibrinogen	$20\mu\text{g/ml}$	1000s^{-1}	>*	Fibronectin	$20\mu\text{g/ml}$	1000s^{-1}
Fibrinogen	$100\mu\text{g/ml}$	100s^{-1}	<*	Fibronectin	$100\mu\text{g/ml}$	100s^{-1}
Fibrinogen	$20\mu\text{g/ml}$	100s^{-1}	<	Fibronectin	$20\mu\text{g/ml}$	100s^{-1}

Abb. 3.3: Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit vom Liganden.

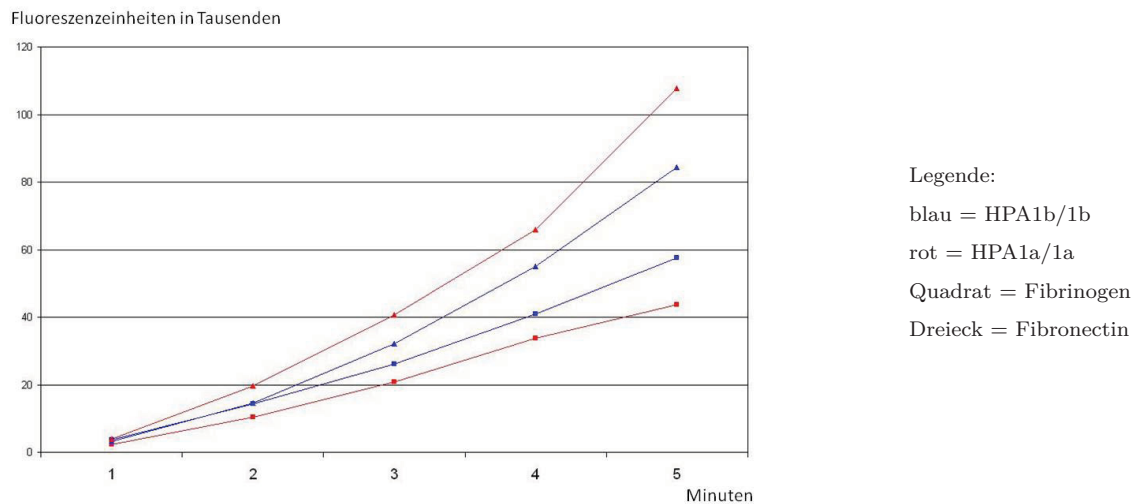
Im Gegensatz dazu zeigten die Versuche unter niedrigen Scherraten eine signifikant stärkere Adhäsion an Fibronectin (Versuch "Fibrinogen $100\mu\text{g/ml } 100\text{s}^{-1}$ " und "Fibronectin $100\mu\text{g/ml } 100\text{s}^{-1}$ " ($p < 0,0001$)).

Wie in Abbildung 3.4 dargestellt, zeigten beide Liganden in hoher Konzentration unter niedrigen Scherraten, als auch Fibronectin unter hohen Scherraten einen Kurvenverlauf der

Thrombozytenadhäsion, der sich dadurch auszeichnet, dass am Beginn des Versuchs die Steigung der Kurve gering ist, diese am Ende des Versuchs jedoch zunimmt. Im Gegensatz dazu zeigte Fibrinogen unter hohen Scherraten einen völlig anderen Kurvenverlauf mit großer Steigung im Anfangsbereich.



a. Fibrinogen $100\mu\text{g/ml}$ 1000s^{-1} (oben) und Fibronectin $100\mu\text{g/ml}$ 1000s^{-1} (unten).

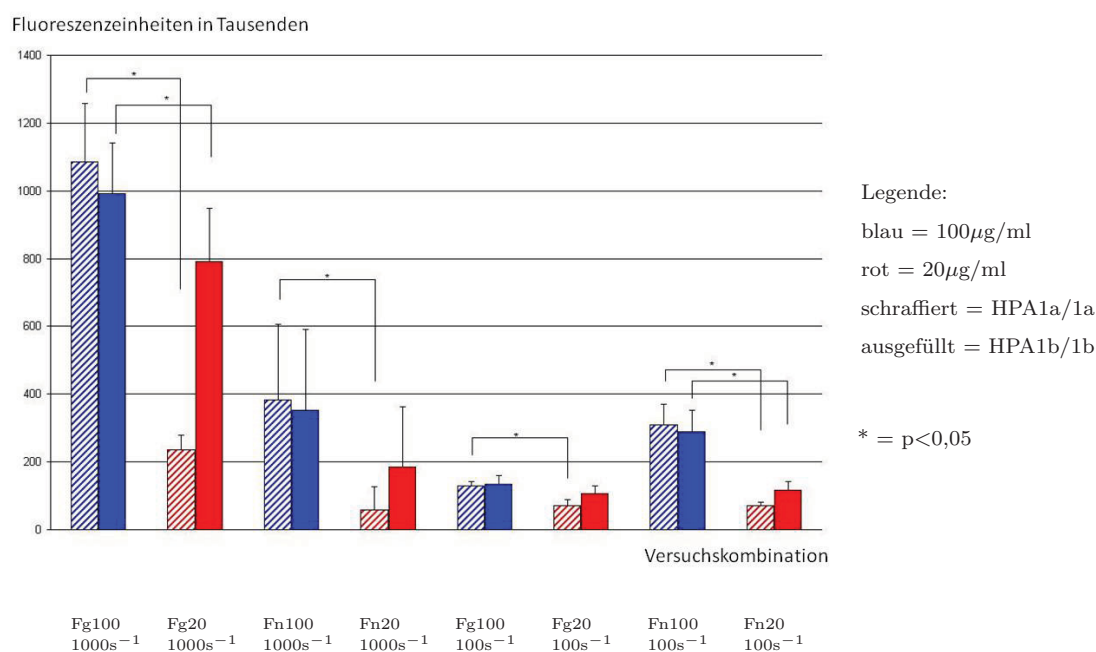


b. Fibrinogen $100\mu\text{g/ml}$ 100s^{-1} (unten) und Fibronectin $100\mu\text{g/ml}$ 100s^{-1} (oben).

Abb. 3.4: Adhäsionskinetik in Abhängigkeit von der Scherrate sowie vom Liganden über die Zeit bei a. hohen und bei b. niedrigen Scherraten.

3.1.3 Konzentrationsabhängigkeit

Im Säulendiagramm aus Abbildung 3.5 sind die Versuche unter hohen Konzentrationen blau, die unter niedrigen Konzentrationen rot dargestellt.



HPA1a/1a						
Fibrinogen	100µg/ml	1000s ⁻¹	>*	Fibrinogen	20µg/ml	1000s ⁻¹
Fibronectin	100µg/ml	1000s ⁻¹	>*	Fibronectin	20µg/ml	1000s ⁻¹
Fibrinogen	100µg/ml	100s ⁻¹	>*	Fibrinogen	20µg/ml	100s ⁻¹
Fibronectin	100µg/ml	100s ⁻¹	>*	Fibronectin	20µg/ml	100s ⁻¹
HPA1b/1b						
Fibrinogen	100µg/ml	1000s ⁻¹	>*	Fibrinogen	20µg/ml	1000s ⁻¹
Fibronectin	100µg/ml	1000s ⁻¹	>	Fibronectin	20µg/ml	1000s ⁻¹
Fibrinogen	100µg/ml	100s ⁻¹	>	Fibrinogen	20µg/ml	100s ⁻¹
Fibronectin	100µg/ml	100s ⁻¹	>*	Fibronectin	20µg/ml	100s ⁻¹

Abb. 3.5: Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit von der Konzentration.

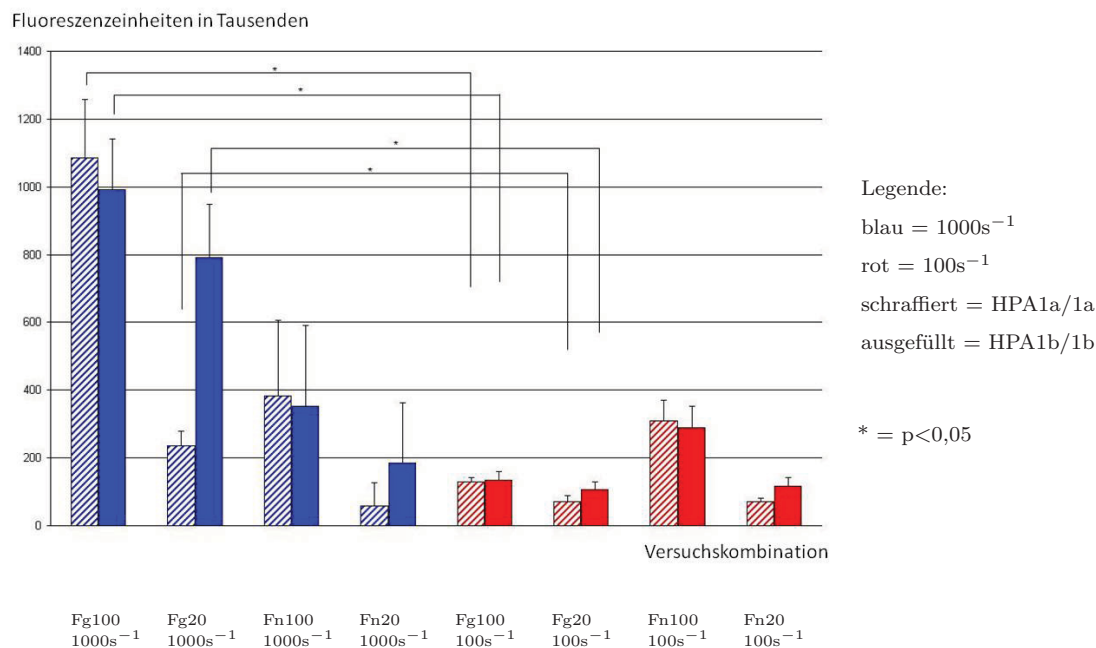
Die Versuche zeigten stets eine stärkere Thrombozytenadhäsion an hohen Ligandenkonzentrationen im Vergleich zu niedrigen Ligandenkonzentrationen. Die Unterschiede in der Adhäsion waren bei der HPA-1a/1a-Variante besonders ausgeprägt. Es ließen sich ausschließlich signifikante Ergebnisse ableiten, wobei sich die Adhäsionsendwerte von Versuch eins und zwei fünffach, die der Versuche drei und vier siebenfach, die der Versuche

fünf und sechs zweifach und die der Versuche sieben und acht vierfach unterschieden (jedes $p < 0,0015$). Da die Unterschiede in der Adhäsion unter hohen Scherraten im Vergleich zu niedrigen Scherraten noch größer waren, ließ sich bei der HPA-1a/1a-Variante wiederum eine zusätzliche Abhängigkeit von der Scherrate ableiten.

Die HPA-1b/1b-Variante zeigte insgesamt wesentlich geringere Unterschiede in der Adhäsion, wobei sich ausschließlich die Endwerte aus den Versuchen eins und zwei ($p < 0,0397$) wie auch den Versuchen sieben und acht ($p < 0,0001$) signifikant unterschieden.

3.1.4 Scherratenabhängigkeit

Im Säulendiagramm aus Abbildung 3.6 sind die Versuche unter hohen Scherraten blau, die unter niedrigen Scherraten rot dargestellt.



HPA1a/1a						
Fibrinogen	100µg/ml	1000s ⁻¹	>*	Fibrinogen	100µg/ml	100s ⁻¹
Fibrinogen	20µg/ml	1000s ⁻¹	>*	Fibrinogen	20µg/ml	100s ⁻¹
Fibronectin	100µg/ml	1000s ⁻¹	>	Fibronectin	100µg/ml	100s ⁻¹
Fibronectin	20µg/ml	1000s ⁻¹	<	Fibronectin	20µg/ml	100s ⁻¹
HPA1b/1b						
Fibrinogen	100µg/ml	1000s ⁻¹	>*	Fibrinogen	100µg/ml	100s ⁻¹
Fibrinogen	20µg/ml	1000s ⁻¹	>*	Fibrinogen	20µg/ml	100s ⁻¹
Fibronectin	100µg/ml	1000s ⁻¹	>	Fibronectin	100µg/ml	100s ⁻¹
Fibronectin	20µg/ml	1000s ⁻¹	>	Fibronectin	20µg/ml	100s ⁻¹

Abb. 3.6: Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit von der Scherrate.

Die Versuchsergebnisse zeigten ausschließlich unter Verwendung von Fibrinogen eine Scherratenabhängigkeit der Thrombozytenadhäsion. Unter Scherraten von 1000 s^{-1} wurden signifikant mehr Thrombozyten adhären als unter 100 s^{-1} ($p < 0,0001$).

Fibronectin ließ keine Abhängigkeit erkennen, sondern zeigte quantitativ ähnliche Adhäsionsergebnisse unter hohen wie unter niedrigen Scherraten.

Die beschriebenen Ergebnisse fanden sich in ähnlicher Form bei der HPA-1a/1a- wie bei der HPA-1b/1b-Variante.

In der folgenden Tabelle sind die Rohdaten der Versuchsergebnisse zusammengefasst.

HPA1a/1a					HPA1b/1b				
	Mean	SD	SD in %	Min		Mean	SD	SD in %	Min
Fg100 1000 s^{-1}	64.846	15.641	24	1	Fg100 1000 s^{-1}	56.651	13.616	24	1
	260.450	62.291	24	2		222.251	36.056	16	2
	432.755	87.822	20	3		367.507	68.316	19	3
	575.265	103.785	18	4		510.595	106.970	21	4
	696.394	119.351	17	5		625.710	115.212	18	5
	803.892	131.866	16	6		744.666	120.655	16	6
	900.934	139.067	15	7		840.696	125.778	15	7
	975.024	148.145	15	8		911.371	136.963	15	8
	1.031.988	162.635	16	9		961.934	143.621	15	9
	1.084.747	172.608	16	10		992.699	149.125	15	10
Fg20 1000 s^{-1}	Mean	SD	SD in %	Min	Fg20 1000 s^{-1}	Mean	SD	SD in %	Min
	8.498	4.133	49	1		37.461	21.063	56	1
	25.775	7.332	28	2		128.261	67.105	52	2
	49.447	19.142	39	3		231.347	111.191	48	3
	70.980	28.314	40	4		335.146	149.880	45	4
	99.967	35.682	36	5		433.044	164.135	38	5
	131.501	34.006	26	6		534.097	180.410	34	6
	164.812	32.459	20	7		620.744	186.091	30	7
	186.046	30.798	17	8		692.577	179.150	26	8
	209.249	36.893	18	9		748.204	171.481	23	9
Fn100 1000 s^{-1}	Mean	SD	SD in %	Min	Fn100 1000 s^{-1}	Mean	SD	SD in %	Min
	5.715	3.981	70	1		4.064	2.522	62	1
	20.067	9.378	47	2		12.793	9.488	74	2
	46.662	24.534	53	3		32.333	25.776	80	3
	84.004	40.928	49	4		56.804	46.111	81	4
	140.377	86.866	62	5		96.759	72.339	75	5
	195.320	122.510	63	6		151.615	111.965	74	6
	243.038	145.635	60	7		210.350	151.601	72	7
	289.780	169.977	59	8		265.782	187.203	70	8
	334.016	201.957	60	9		309.064	211.052	68	9
Fn20 1000 s^{-1}	Mean	SD	SD in %	Min	Fn20 1000 s^{-1}	Mean	SD	SD in %	Min
	4.667	1.361	29	1		2.859	3.244	113	1
	6.794	1.861	27	2		8.051	6.864	85	2
	9.986	6.814	68	3		20.636	22.661	110	3
	12.779	11.045	86	4		38.722	43.848	113	4
	21.381	22.269	104	5		55.762	65.286	117	5
	31.001	32.926	106	6		86.703	109.666	126	6
	37.933	40.219	106	7		114.443	131.105	115	7
	43.648	50.072	115	8		137.645	150.444	109	8
	52.760	60.399	114	9		159.812	165.710	104	9
Fg100 100 s^{-1}	Mean	SD	SD in %	Min	Fg100 100 s^{-1}	Mean	SD	SD in %	Min
	2.360	2.987	127	1		3.632	3.806	105	1
	10.420	2.792	27	2		14.323	6.543	46	2
	20.907	3.496	17	3		26.138	8.353	32	3
	33.842	8.938	26	4		40.818	11.893	29	4
	43.769	12.053	28	5		57.466	11.447	20	5
	56.491	9.514	17	6		72.545	14.649	20	6
	73.384	8.250	11	7		88.843	17.427	20	7
	92.050	5.372	6	8		104.555	21.914	21	8
	103.737	13.031	13	9		118.417	26.546	22	9
	129.025	12.913	10	10		133.749	26.126	20	10

HPA1a/1a					HPA1b/1b				
	Mean	SD	SD in %	Min		Mean	SD	SD in %	Min
Fg20 100s ⁻¹	1.962	1.676	85	1	Fg20 100s ⁻¹	1.937	735	38	1
	8.204	3.429	42	2		8.561	3.322	39	2
	21.463	9.781	46	3		18.340	3.678	20	3
	30.089	11.216	37	4		29.831	6.126	21	4
	39.911	13.734	34	5		40.049	9.240	23	5
	46.039	15.864	34	6		50.951	10.725	21	6
	58.646	15.885	27	7		63.317	11.618	18	7
	67.424	22.389	33	8		73.788	12.966	18	8
	68.859	17.038	25	9		91.026	15.560	17	9
	71.564	16.060	22	10		107.421	20.821	19	10
Fn100 100s ⁻¹	Mean	SD	SD in %	Min	Fn100 100s ⁻¹	Mean	SD	SD in %	Min
	3.935	2.513	64	1		3.272	2.669	82	1
	19.563	14.697	75	2		14.626	6.113	42	2
	40.637	17.572	43	3		32.121	16.413	51	3
	65.786	31.183	47	4		54.957	25.054	46	4
	107.813	42.195	39	5		84.280	29.839	35	5
	150.482	44.860	30	6		121.501	35.690	29	6
	183.439	52.331	29	7		157.793	38.209	24	7
	224.568	56.651	25	8		203.314	56.120	28	8
	269.657	61.687	23	9		241.082	57.616	24	9
Fn20 100s ⁻¹	Mean	SD	SD in %	Min	Fn20 100s ⁻¹	Mean	SD	SD in %	Min
	2.299	2.432	106	1		1.561	2.057	132	1
	8.469	5.853	69	2		7.873	3.486	44	2
	17.637	8.925	51	3		17.361	6.080	35	3
	31.243	14.322	46	4		29.248	8.046	28	4
	41.135	16.893	41	5		42.461	9.985	24	5
	44.746	12.872	29	6		58.424	11.730	20	6
	52.478	13.250	25	7		72.348	13.069	18	7
	58.998	12.890	22	8		87.327	15.652	18	8
	63.356	8.935	14	9		102.795	20.751	20	9
	70.847	10.569	15	10		117.151	23.616	20	10

Tabelle 3.1: Rohdaten. Mean (Mittelwert), SD (absolute Standardabweichung), SD in % (prozentuale Standardabweichung vom Mittelwert), Min (Minuten).

3.2 Tethering

Die erhobenen Daten konnten hinsichtlich des Tetherings keine Abgrenzung zwischen den Liganden, den Konzentrationen, den Scherraten sowie den HPA-1-Polymorphismen aufzeigen. Die Strecke, die die einzelnen Thrombozyten vor dem Abreißen oder Adhäreren auf den Liganden zurücklegten, unterschied sich nicht.

3.3 Kontrollversuche

Um zu zeigen, dass die Interaktion zwischen Fibrinogen beziehungsweise Fibronectin und dem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ spezifisch ist, wurden verschiedene Kontrollversuche bei 500 s⁻¹ durchgeführt. Zum einen wurde nicht mit den bekannten Liganden, sondern mit BSA beschichtet. Hier zeigte sich im Vergleich zu Versuchen mit Fibrinogen eine Thrombozytenadhäsion von weniger als 5 %. Zum anderen wurde die zu untersuchende Blutprobe mit dem monoklonalen Antikörper Abciximab inkubiert, welcher kompetitiv den Fibrinogenrezeptor hemmt. Hier betrug die Inhibition der Thrombozytenadhäsion im Versuch mit Fibrinogen 99 % und im Versuch mit Fibronectin 95 % (siehe Abb. 3.7).

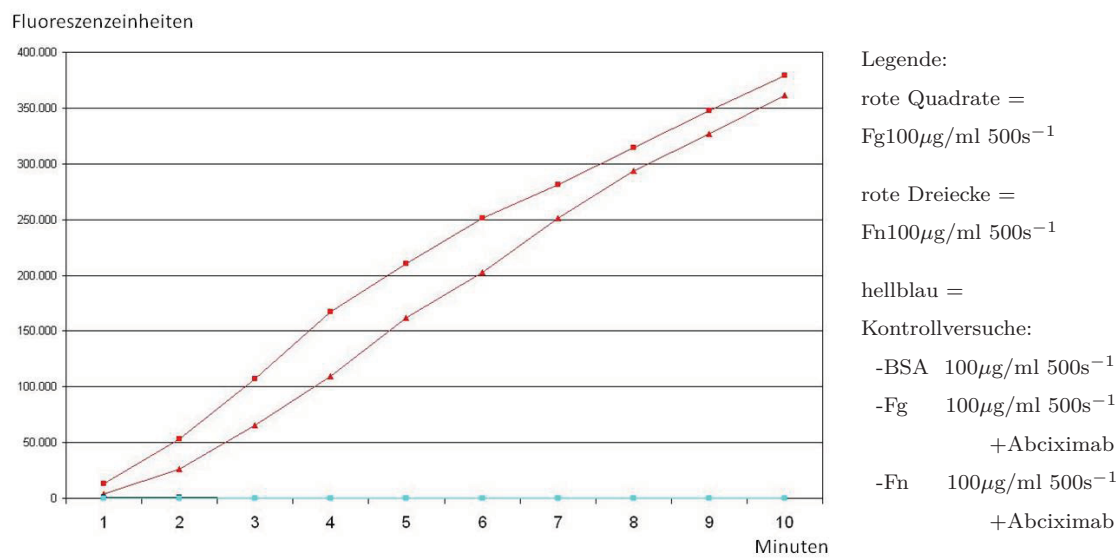


Abb. 3.7: Kontrollversuche mit BSA und Abciximab

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie werden die Auswirkungen des HPA-1-Polymorphismus auf die Thrombozytenadhäsion unter flussdynamischen Bedingungen beleuchtet und darüber hinaus mögliche Unterschiede zwischen den zwei Liganden Fibrinogen und Fibronectin aufgezeigt und der Einfluss verschiedener Konzentrationen dieser Liganden sowie unterschiedlicher Scherraten erfasst. Dazu wurde mit Vollblut gesunder, genotypisierter Spender gearbeitet, das durch eine rechteckige, mit Liganden beschichtete Flusskammer geleitet und die Thrombozytenadhäsion zweidimensional mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops festgehalten wurde. Die mit der Software ImageJ ausgewerteten Daten wurden im Ergebnisteil dieser Arbeit detailliert dargestellt und sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.1 Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit vom HPA-1-Polymorphismus

Bei der Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse fällt zunächst auf, dass quantitative Unterschiede bezüglich der Thrombozytenadhäsion zwischen der HPA-1a/1a- und der HPA-1b/1b-Variante zugunsten der HPA-1b/1b-Variante bestehen. Diese Beobachtung, die auf eine prothrombotische Eigenschaft der HPA-1b/1b-Variante hinweist, deckt sich mit denen anderer Studien [1, 7, 19, 27, 29].

In den eigenen Versuchen lassen die beiden Polymorphismen eine vergleichbare Thrombozytenadhäsion unter hohen Ligandenkonzentrationen erkennen, es zeigt sich aber unter niedrigen Ligandenkonzentrationen eine stärkere Adhäsion bei der HPA-1b/1b-Variante. So sind die Unterschiede in der Adhäsion in den Versuchen "Fibrinogen 20 μ g/ml 1000s⁻¹" ($p < 0,0001$), "Fibrinogen 20 μ g/ml 100s⁻¹" ($p < 0,0093$) und "Fibronectin 20 μ g/ml 100s⁻¹" ($p < 0,001$) signifikant, in Versuch "Fibronectin 20 μ g/ml 1000s⁻¹" zwar auch zu sehen, erreichen aber aufgrund großer Standardabweichungen nicht das Signifikanzniveau.

In Versuch "Fibrinogen $20\mu\text{g/ml}$ 1000s^{-1} " sind die Unterschiede in der Thrombozytenadhäsion über die gesamte Versuchsdauer signifikant. Nach zehn Minuten erreicht die HPA-1b/1b-Variante das Dreifache an Adhäsion der HPA-1a/1a-Variante. Im Gegensatz dazu zeigt Versuch "Fibrinogen $20\mu\text{g/ml}$ 100s^{-1} " erst in den letzten beiden und Versuch "Fibronectin $20\mu\text{g/ml}$ 100s^{-1} " über die letzten vier Versuchsminuten signifikante Adhäsionsunterschiede (siehe 3.1.1 Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit vom HPA-1-Polymorphismus). Auch dieser Sachverhalt deutet auf eine höhere Affinität der HPA-1b/1b-Variante zum Liganden hin. Denn die Unterschiede zwischen den Polymorphismen sind unter hohen Scherraten ("Fibrinogen $20\mu\text{g/ml}$ 1000s^{-1} "), die im Vergleich zu niedrigeren Scherraten eine stabilere Bindung erfordern [35], am stärksten ausgeprägt.

Somit liegen Unterschiede in der Thrombozytenadhäsion sowohl bei Fibrinogen als auch bei Fibronectin vor, wohingegen Vijayan et al. äquivalente Adhäsionsergebnisse der beiden Polymorphismen auf Fibronectin gesehen haben, die sich auch unter höheren Scherraten im Verhältnis zueinander nicht verändern [29, 30].

Dass die Unterschiede in der Adhäsion unter niedrigen Ligandenkonzentrationen zu sehen sind, könnte im Vergleich der Polymorphismen auf eine höhere Affinität der HPA-1b/1b-Variante zum Liganden hinweisen, die unter niedrigen Ligandenkonzentrationen sichtbar wird, jedoch unter hohen Ligandenkonzentrationen durch eine stärkere Sättigung der Rezeptoren verborgen bleibt. Auch Loncar et al. gehen im Vergleich zur HPA-1a/1a-Variante von einer stärkeren Bindung der HPA-1b/1b-Variante an Fibrinogen aus [19] und auch Vijayan et al. zeigten, dass signifikant mehr HPA-1b/1b-positive Zellen an Fibrinogen adhären werden [29, 30].

Jedoch waren im Vergleich zur vorliegenden Arbeit die Unterschiede in der Adhäsion sowohl unter hohen ($100\mu\text{g/ml}$) wie auch unter niedrigen ($12,5\mu\text{g/ml}$) Fibrinogenkonzentrationen signifikant erhöht und darüber hinaus unter hohen Konzentrationen stärker ausgeprägt als unter niedrigen. Außerdem wurde in der Arbeit von Vijayan [29] insgesamt eine höhere Anzahl von Pro33-CHO-Zellen bei niedrigen und nicht wie in dieser Arbeit bei hohen Ligandenkonzentrationen adhären. Die Diskrepanz der Ergebnisse liegt vermutlich zum einen daran, dass mit im Vergleich zu Thrombozyten wesentlich größeren CHO-Zellen gearbeitet wurde [1, 29], was Unterschiede in der Adhäsion erklären könnte. Außerdem lagen die Zellen in Pufferlösungen wie HBSS oder Tyrode-Lösung vor, was aufgrund der nicht vorhandenen Erythrozyten grundsätzlich im Vergleich zu Vollblut zu weniger stabi-

len Thrombozytenaggregationen führt [3, 16, 36]. Zum anderen stellen die sehr niedrigen Scherraten (25s^{-1} , 50s^{-1} , 100s^{-1}), unter denen die Versuche durchgeführt wurden, einen weiteren Aspekt dar, der die Vergleichbarkeit der Studien einschränkt.

Vijayan et al. konnten zunächst eine verglichen mit Leu33-CHO-Zellen moderat stärkere Adhäsion von Pro33-CHO-Zellen an Fibrinogen unter statischen Bedingungen zeigen und wiesen später nach, dass höhere Scherraten die Unterschiede zwischen den Polymorphismen in Hinblick auf die Adhäsion verstärken. Als Ursache nahmen sie an, dass sich die Kombination aus höheren Scherraten und der veränderten molekularen Struktur der Pro33-Variante auf die Kinetik des Fibrinogenrezeptors auswirkt [12, 29]. Schon 2000 führten Vijayan et al. die Adhäsionsunterschiede zwischen der HPA-1a/1a- und der HPA-1b/1b-Variante auf das Signaling zurück. Dabei sahen sie den Haupteffekt der Polymorphismen eher beim Outside-In-Signaling als beim Inside-Out-Signaling und konnten dies 2006 in einer eigenen Studie bestätigen [28, 30] (siehe 1.1.1 Integrinaktivität). Wang et al. fanden später, dass das am Signaling beteiligte Enzym PP2A die Kontrolle des Fibrinogenrezeptors auf die Proteinkinase ERK bei den HPA-1-Varianten uneinheitlich steuert, was wiederum bei der HPA-1b/1b-Variante zu stärkerer Thrombozytenadhäsion führt [31].

4.2 Ligandenabhängigkeit

Die Ergebnisse zeigen eine Ligandenabhängigkeit der Thrombozytenadhäsion, die bei beiden Polymorphismen ähnlich ist.

Signifikante Unterschiede in der Adhäsion zwischen Fibrinogen und Fibronectin sind unter hohen Scherraten (Versuch "Fibrinogen $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 1000s^{-1} " und "Fibronectin $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 1000s^{-1} " ($p < 0,0001$), sowie Versuch "Fibrinogen $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 1000s^{-1} " und "Fibronectin $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 1000s^{-1} " ($p < 0,0001$)) zu sehen, wobei die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen drei- beziehungsweise viermal stärker ist als an Fibronectin.

Im Gegensatz dazu zeigen die Versuche unter niedrigen Scherraten eine signifikant stärkere Adhäsion an Fibronectin (Versuch "Fibrinogen $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 100s^{-1} " und "Fibronectin $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 100s^{-1} " ($p < 0,0001$)). Dieser Sachverhalt liegt wahrscheinlich größtenteils in der sehr ausgeprägten Scherratenabhängigkeit (siehe 4.4 Scherratenabhängigkeit) des Fibrinogens begründet, denn die absolute Thrombozytenadhäsion an Fibronectin befindet sich unter hohen und niedrigen Scherraten in einem Bereich.

Darüber hinaus zeigen beide Liganden in hoher Konzentration unter niedrigen Scherraten als auch Fibronectin unter hohen Scherraten einen Kurvenverlauf der Thrombozytenadhäsion, der sich dadurch auszeichnet, dass am Beginn des Versuchs die Steigung der Kurve gering ist, diese am Ende des Versuchs jedoch zunimmt. Im Gegensatz dazu zeigt Fibrinogen unter hohen Scherraten einen völlig anderen Kurvenverlauf mit großer Steigung im Anfangsbereich (siehe Abb. 3.4 in 3.1.2 Ligandenabhängigkeit). Es scheint sich bei Fibrinogen also die Scherrate nicht nur auf die Quantität der Thrombozytenadhäsion, sondern außerdem auf die Adhäsionskinetik auszuwirken.

Durch die Bindung eines Fibrinogenmoleküls kommt es über die Mechanismen des Outside-In- sowie des Inside-Out-Signalings sowohl zu einer stärkeren Affinität mit Konformationsänderung des Rezeptors als auch zu Rezeptor-Clustering als Zeichen erhöhter Rezeptoravidität (siehe 1.1.1 Integrinaktivität). Durch Ausstülpung des offenen kanalikulären Systems vergrößert der Thrombozyt seine Oberfläche und ermöglicht auf diese Weise eine Erhöhung der Rezeptordichte. Diese Vorgänge müssen nicht zwingend einer Beeinflussung durch Scherraten unterliegen, um die erhobenen Ergebnisse erklären zu können. Denn alleine dadurch, dass im Experiment unter hohen Scherraten eine höhere Gesamtzahl an Thrombozyten am Liganden vorbeiströmt, können die zusätzlichen Bindungsstellen überhaupt besetzt werden, was wiederum unter niedrigeren Scherraten nicht möglich ist. Der beschriebene Kurvenverlauf mit stärkerer Steigung im Anfangsbereich und Abflachung im mittleren Bereich könnte ursächlich in einer Sättigung der Rezeptoren begründet sein. Wie bereits beschrieben (siehe 1.1.2 Das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$), bindet der Fibrinogenrezeptor Fibrinogen sowohl über die RGD- als auch über die KQAGDV-Sequenz. Im Gegensatz dazu kann Fibronectin ausschließlich über die RGD-Sequenz gebunden werden, was eine Erklärung dafür sein könnte, dass sich keine Unterschiede in der Adhäsionskinetik zeigen.

4.3 Konzentrationsabhängigkeit

Die Ergebnisse aller Versuche zeigen, dass es unter hohen Ligandenkonzentrationen im Vergleich zu niedrigen Ligandenkonzentrationen zu einer stärkeren Thrombozytenadhäsion kommt.

Die Unterschiede in der Adhäsion sind bei der HPA-1a/1a-Variante besonders ausgeprägt. Es lassen sich ausschließlich signifikante Ergebnisse ableiten (jedes $p < 0,0015$). Da die Unterschiede in der Adhäsion bei der HPA-1a/1a-Variante unter hohen Scherraten im

Vergleich zu niedrigen Scherraten noch größer sind, lässt sich hier wiederum eine zusätzliche Abhängigkeit von der Scherrate ableiten.

Die HPA-1b/1b-Variante zeigt insgesamt wesentlich geringere Unterschiede in der Adhäsion bei unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen, wobei sich ausschließlich die Endwerte aus den Versuchen "Fibrinogen 100 μ g/ml 1000s⁻¹" und "Fibrinogen 20 μ g/ml 1000s⁻¹" ($p < 0,0397$) wie auch den Versuchen "Fibronectin 100 μ g/ml 100s⁻¹" und "Fibronectin 20 μ g/ml 100s⁻¹" ($p < 0,0001$) signifikant voneinander unterscheiden. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die HPA-1b/1b-Variante im Vergleich eine höhere Affinität zum Liganden aufweist als die HPA-1a/1a-Variante (siehe 4.1) und aus diesem Grund schon bei niedrigen Ligandenkonzentrationen eine prozentual größere Anzahl von Thrombozyten adhärent wird.

Dass höhere Ligandenkonzentrationen zu ausgeprägterer Adhäsion führen, scheint unter der Annahme, dass im Flussexperiment ständig ein Überschuss an Thrombozyten vorliegt, nachvollziehbar. Allerdings gibt es, wie bereits zuvor (siehe 4.1) angesprochen, eine Studie von Vijayan et al. [29], die zeigt, dass eine höhere Anzahl von Leu33- und Pro33-CHO-Zellen bei niedrigen (12,5 μ g/ml) und nicht wie in dieser Arbeit bei hohen (100 μ g/ml) Fibrinogenkonzentrationen adhärent wird. Dies könnte durch die bereits in 4.1 diskutierten Unterschiede im Studiendesign (CHO-Zellen in Pufferlösungen anstelle von Vollblut, niedrige Scherraten) begründet sein.

4.4 Scherratenabhängigkeit

Sowohl Zaidi et al. als auch Savage et al. beschrieben, dass der Fibrinogenrezeptor nur bei Scherraten unter 800 s^{-1} effizient arbeitet und bei höheren Scherraten weniger Thrombozyten adhärieren [24, 35]. Am ausgeprägtesten war die Thrombozytenadhäsion in Zaidis Flussexperimenten bei 250 s^{-1} , wohingegen bei 1500 s^{-1} weniger als 50 % und bei 2000 s^{-1} weniger als 10 % der maximalen Adhäsion zu sehen war [35]. Savage et al. beobachteten eine Abnahme der Thrombozytenadhäsion von 50 s^{-1} über 400 s^{-1} zu 1500 s^{-1} [24] und stellten die Vermutung auf, dass die Ursache hierfür entweder schon in der relativ niedrigen Anzahl von Adhäsionen oder in der geringen Widerstandskraft gegenüber hohen Scherkräften zu suchen sei [24]. Auch Jen et al. konnten eine signifikant stärkere Thrombozytenadhäsion bei 70 s^{-1} im Vergleich zu 445 s^{-1} zeigen [15]. Die genannten Studien beschreiben also nicht nur eine verminderte Thrombozytenadhäsion bei Scherraten über 800 s^{-1} , sondern generell eine abnehmende Adhäsion mit zunehmender Scherrate.

Im Gegensatz dazu beschrieben Loncar et al. 2007 eine stärkere Thrombozytenadhäsion mit zunehmenden Scherraten von 50 s^{-1} über 500 s^{-1} bis zu 1500 s^{-1} [19], und auch die eigenen Ergebnisse konnten eine Zunahme von adhärenenten Thrombozyten bis 1000 s^{-1} und damit ein signifikant höheres Adhäsionsergebnis im Vergleich zu 100 s^{-1} zeigen. Dies könnte in der wesentlich größeren Anzahl Thrombozyten begründet sein, die unter hohen Scherraten pro Zeiteinheit an den Liganden vorbeiströmen.

Vijayan et al. [29] führten Flusskammerversuche mit transfektierten CHO-Zellen unter wesentlich niedrigeren Scherraten durch. Sie untersuchten die Adhäsion der CHO-Zellen an $100 \mu\text{g/ml}$ Fibrinogen bei 25 s^{-1} , 50 s^{-1} und 100 s^{-1} . Dabei zeigte sich sowohl bei den Leu33- als auch bei den Pro33-CHO-Zellen eine Zunahme der adhärenenten Zellen bei 50 s^{-1} im Vergleich zu 25 s^{-1} , jedoch bei 100 s^{-1} schon wieder eine leichte Abnahme. Außerdem konnten sie in ähnlichen Versuchen mit Fibronectin zeigen, dass eine Scherratenabhängigkeit dieses Liganden besteht, wohingegen sich in der vorliegenden Arbeit quantitativ ähnliche Adhäsionsergebnisse an Fibronectin unter hohen wie unter niedrigen Scherraten zeigten.

4.5 Tethering

Die erhobenen Daten konnten hinsichtlich des Tetherings keine Unterschiede zwischen den Liganden, den Konzentrationen, den Scherraten sowie den HPA-1-Polymorphismen

aufzeigen. Somit ist es nicht möglich, die in Hinblick auf die Thrombozytenadhäsion erhobenen Ergebnisse mit Daten zum Tethering zu untermauern. Da zunächst die Thrombozytenadhäsion unter flussdynamischen Bedingungen den alleinigen Gegenstand dieser Arbeit darstellen sollte, wurden die Einstellungen am Laser dahingehend optimiert. Später wurde eine zusätzliche Auswertroutine zum Tethering erstellt, um die bereits vorhandenen Bilder dahingehend auswerten zu können (siehe 2.5.2 Tethering). Die für die Untersuchung der Thrombozytenadhäsion zuvor getroffenen Einstellungen zeigten sich schließlich als nicht kompatibel.

4.6 Konklusion

Die durchgeführten Experimente konnten die Ergebnisse anderer Studien dahingehend bestätigen, dass quantitative Unterschiede bezüglich der Thrombozytenadhäsion zwischen der HPA-1a/1a- und der HPA-1b/1b-Variante zugunsten der HPA-1b/1b-Variante bestehen. Dies betrifft die Versuche unter niedrigen Ligandenkonzentrationen und könnte darin begründet sein, dass die HPA-1b/1b-Variante eine höhere Affinität zum Liganden aufweist, die erst unter niedrigen Ligandenkonzentrationen demaskiert wird (siehe 4.1 Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit vom HPA-1-Polymorphismus).

Weiterhin besteht eine Ligandenabhängigkeit beider Polymorphismen mit stärkerer Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen unter hohen Scherraten sowie geringerer Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen unter niedrigen Scherraten. Dies liegt an der ausgeprägten Scherratenabhängigkeit des Fibrinogens, denn die absolute Thrombozytenadhäsion an Fibronectin befindet sich unter hohen und niedrigen Scherraten in einem Bereich. Dadurch, dass Fibrinogen im Gegensatz zu Fibronectin sowohl über die RGD- als auch die KQAGDV-Sequenz gebunden werden kann, ergeben sich im Experiment Unterschiede bezüglich der Kinetik der Thrombozytenadhäsion (siehe 4.2 Ligandenabhängigkeit).

Die Ergebnisse aller Versuche zeigen, dass es unter hohen Ligandenkonzentrationen im Vergleich zu niedrigen Ligandenkonzentrationen zu einer stärkeren Thrombozytenadhäsion kommt. Obwohl dies zu erwarten war, gibt es andere Studien, die Gegenteiliges zeigen konnten (siehe 4.3 Konzentrationsabhängigkeit).

Die eigenen Ergebnisse konnten eine Zunahme von adhärenenten Thrombozyten bis 1000 s^{-1} zeigen. Dies könnte in der wesentlich größeren Anzahl von Thrombozyten begrün-

det sein, die unter hohen Scherraten pro Zeiteinheit an den Liganden vorbeiströmen, und wurde auch von Loncar et al. beobachtet. Andere Studien beschrieben eine abnehmende Adhäsion mit zunehmender Scherrate (siehe 4.4 Scherratenabhängigkeit).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass durch die systematische Erfassung der Zusammenhänge zwischen dem HPA-1-Polymorphismus, den Liganden Fibrinogen und Fibronectin, verschiedener Konzentrationen dieser Liganden sowie unterschiedlicher Scherraten die bereits in der Literatur vorliegenden Studienergebnisse besser eingeordnet und ergänzt werden können. Darüber hinaus sind die Flusskammerversuche dazu in der Lage, die epidemiologischen Beobachtungen einer prothrombotischen Eigenschaft der HPA-1b/1b-Variante experimentell zu bestätigen.

Literaturverzeichnis

- [1] Ball C, Vijayan KV, Nguyen T, Anthony K, Bray PF, Essex DW, Dong JF: Glutathione regulates integrin alphaIIb beta3-mediated cell adhesion under flow conditions. *Thromb Haemost.* 2008;100:857–863.
- [2] Basani RB, Zhu H, Thornton MA, Soto CS, Degrado WF, Kowalska MA, Bennett JS, Poncz M: Species differences in small molecule binding to alphaIIb beta3 are the result of sequence differences in 2 loops of the alpha IIb beta propeller. *Blood.* 2009;113:902–910.
- [3] Bell DN, Spain S, Goldsmith HL: The effect of red blood cells on the ADP-induced aggregation of human platelets in flow through tubes. *Thromb Haemost.* 1990;63:112–121.
- [4] Bennett JS: Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3. *J Clin Invest.* 2005;115:3363–3369.
- [5] Bennett JS, Berger BW, Billings PC: The structure and function of platelet integrins. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:200–205.
- [6] Calvete JJ, Schäfer W, Mann K, Henschen A, González-Rodríguez J: Localization of the cross-linking sites of RGD and KQAGDV peptides to the isolated fibrinogen receptor, the human platelet integrin glycoprotein IIb/IIIa. Influence of peptide length. *Eur J Biochem.* 1992;206:759–765.
- [7] Carter AM, Ossei-Gerning N, Wilson IJ, Grant PJ: Association of the platelet Pl(A) polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen Bbeta 448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Circulation.* 1997;96:1424–1431.
- [8] Collier BS, Shattil SJ: The GPIIb/IIIa (integrin alphaIIb beta3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood.* 2008;112:3011–3025.

- [9] Giancotti FG, Ruoslahti E: Integrin signaling. *Science*. 1999;285:1028–1032.
- [10] Ginsberg MH, Partridge A, Shattil SJ: Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17:509–516.
- [11] Goodall AH: A radical explanation for the effect of the HPA-1b polymorphism in platelet alphaIIb beta3-integrin? *Thromb Haemost*. 2008;100:731–732.
- [12] Huber W, Hurst J, Schlatter D, Barner R, Hübscher J, Kouns WC, Steiner B: Determination of kinetic constants for the interaction between the platelet glycoprotein IIb-IIIa and fibrinogen by means of surface plasmon resonance. *Eur J Biochem*. 1995;227:647–656.
- [13] Humphries MJ: Integrin structure. *Biochem Soc Trans*. 2000;28:311–339.
- [14] Hynes RO: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110:673–687.
- [15] Jen CJ, Lin JS: Direct observation of platelet adhesion to fibrinogen- and fibrin-coated surfaces. *Am J Physiol*. 1991;261:H1457–H1463.
- [16] Jen CJ, McIntire LV: Characteristics of shear-induced aggregation in whole blood. *J Lab Clin Med*. 1984;103:115–124.
- [17] Kirchhofer D, Grzesiak J, Pierschbacher MD: Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem*. 1991;266:4471–4477.
- [18] Kirchhofer D, Gailit J, Ruoslahti E, Grzesiak J, Pierschbacher MD: Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor GPIIb/IIIa. *J Biol Chem*. 1990;265:18525–18530.
- [19] Loncar R, Stoldt V, Hellmig S, Zotz RB, Mihalj M, Scharf RE: HPA-1 polymorphism of alphaIIb beta3 modulates platelet adhesion onto immobilized fibrinogen in an in-vitro flow system. *Thromb J*. 2007;5:2.
- [20] Newman PJ, Derbes RS, Aster RH: The human platelet alloantigens, PLA1 and PLA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest*. 1989;83:1778–1781.

- [21] Petrides PE: *Biochemie und Pathobiochemie*. Georg Löffler, Petro E. Petrides, Peter C. Heinrich, Berlin: Springer 2006.
- [22] Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V: Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*. 2009;94:700–711.
- [23] Rosenberg N, Zivelin A, Chetrit A, Dardik R, Kornbrot N, Freimark D, Inbal A: Effects of platelet membrane glycoprotein polymorphisms on the risk of myocardial infarction in young males. *Isr Med Assoc J*. 2002;4:411–414.
- [24] Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM: Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. 1996;84:289–297.
- [25] Shimaoka M, Springer TA: Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2:703–716.
- [26] Springer TA: Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:65–72.
- [27] Sucker C, Schmitz M, Hetzel GR, Grabensee B, Maruhn-Debowski B, Ostojic L, Scharf RE, Zotz RB: Are prothrombotic variants of platelet glycoprotein receptor polymorphisms involved in the pathogenesis of thrombotic microangiopathies? *Clin Appl Thromb Hemost*. 2009;15:402–407.
- [28] Vijayan KV, Bray PF: Molecular mechanisms of prothrombotic risk due to genetic variations in platelet genes: Enhanced outside-in signaling through the Pro33 variant of integrin beta3. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231:505–513.
- [29] Vijayan KV, Huang TC, Liu Y, Bernardo A, Dong JF, Goldschmidt-Clermont PJ, Alevriadou BR, Bray PF: Shear stress augments the enhanced adhesive phenotype of cells expressing the Pro33 isoform of integrin beta3. *FEBS Lett*. 2003;540:41–46.
- [30] Vijayan KV, Goldschmidt-Clermont PJ, Roos C, Bray PF: The Pl(A2) polymorphism of integrin beta(3) enhances outside-in signaling and adhesive functions. *J Clin Invest*. 2000;105:793–802.
- [31] Wang H, Yan B, Satterwhite LL, Ma Q, Goldschmidt-Clermont PJ: Increased activity of phosphatase PP2A in the presence of the PlA2 polymorphism of alphaIIb beta3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;367:72–77.

- [32] 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.
- [33] Xiao T, Takagi J, Collier BS, Wang JH, Springer TA: Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature.* 2004;432:59–67.
- [34] Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA: Crystal structure of the extracellular segment of integrin α V β 3. *Science.* 2001;294:339–345.
- [35] Zaidi TN, McIntire LV, Farrell DH, Thiagarajan P: Adhesion of platelets to surface-bound fibrinogen under flow. *Blood.* 1996;88:2967–72.
- [36] Zhang JN, Bergeron AL, Yu Q, Sun C, McBride L, Bray PF, Dong JF: Duration of exposure to high fluid shear stress is critical in shear-induced platelet activation-aggregation. *Thromb Haemost.* 2003;90:672–678.
- [37] Zotz RB, Winkelmann BR, Müller C, Boehm BO, März W, Scharf RE: Association of polymorphisms of platelet membrane integrins α IIb β 3 (HPA-1b/Pl) and α 2 β 1 (α 807TT) with premature myocardial infarction. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1522–1529.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Integrinstruktur am Beispiel des Fibrinogenrezeptors	2
1.2	Dreidimensionale Struktur der extrazellulären Domäne von $\alpha\text{IIb}\beta 3$	4
1.3	Thrombozytenaggregation	5
2.1	Metallische Grundlage und Acrylglasblock der Flusskammer	9
2.2	Zusammengebaute Flusskammer	10
2.3	Versuchsaufbau	11
2.4	Bildverarbeitung zur Thrombozytenadhäsion	19
2.5	Bildverarbeitung zum Tethering	20
3.1	Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit vom HPA-1-Polymorphismus	23
3.2	Adhäsionskinetik in Abhängigkeit vom HPA-1-Genotyp über die Zeit . . .	25
3.3	Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit vom Liganden	26
3.4	Adhäsionskinetik in Abhängigkeit von der Scherrate sowie vom Liganden über die Zeit	27
3.5	Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit von der Konzentration	28
3.6	Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit von der Scherrate	29
3.7	Kontrollversuche	32

Tabellenverzeichnis

2.1	Blutwerte	15
2.2	Versuchskombinationen	16
3.1	Rohdaten	31

Abkürzungsverzeichnis

HPA	Human Platelet Alloantigen
α IIb β 3	Bezeichnung des Fibrinogenrezeptors innerhalb der Integrine
GP-IIb/IIIa	Bezeichnung des Fibrinogenrezeptors innerhalb der Glykoproteine
GP-Ib/IX	Von-Willebrand-Rezeptor (vWF-Rezeptor)
Leu33	Mit Leucin besetzte Aminosäureposition 33 des Fibrinogenrezeptors (HPA-1a)
Pro33	Mit Prolin besetzte Aminosäureposition 33 des Fibrinogenrezeptors (HPA-1b)
CHO-Zellen	Chinese hamster ovary cells
Fg	Fibrinogen
Fn	Fibronectin
BSA	Bovines Serumalbumin
PBS	Pufferlösung (Phosphate Buffered Saline)
HBSS	Pufferlösung (Hanks' Balanced Salt Solution)
ADP	Adenosindiphosphat
ERK	Proteinkinase (Extracellular related signal protein kinase)
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
s ⁻¹	Reziproke Sekunden (Einheit der Scherrate)

Anhang

Macro Thrombozytenadhäsion

```
open("F:\\080723-01\\0000.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\080723-01\\0001.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0000.png", "0001.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0000.png operation=AND image2=0001.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("F:\\080723-01\\0010.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\080723-01\\0011.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0010.png", "0011.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0010.png operation=AND image2=0011.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("F:\\080723-01\\0020.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\080723-01\\0021.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0020.png", "0021.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0020.png operation=AND image2=0021.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("F:\\080723-01\\0030.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
```

```
open("F:\\080723-01\\0031.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0030.png","0031.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0030.png operation=AND image2=0031.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("F:\\080723-01\\0040.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\080723-01\\0041.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0040.png","0041.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0040.png operation=AND image2=0041.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("F:\\080723-01\\0050.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\080723-01\\0051.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0050.png","0051.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0050.png operation=AND image2=0051.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("F:\\080723-01\\0060.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\080723-01\\0061.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0060.png","0061.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0060.png operation=AND image2=0061.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("F:\\080723-01\\0070.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\080723-01\\0071.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0070.png","0071.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0070.png operation=AND image2=0071.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
```

```

open("F:\\080723-01\\0080.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\080723-01\\0081.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0080.png", "0081.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0080.png operation=AND image2=0081.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("F:\\080723-01\\0090.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\080723-01\\0091.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0090.png", "0091.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0090.png operation=AND image2=0091.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");

```

Macro Tethering

```

run("Image Sequence...",
"open=F:\\Tethering\\080910-01\\0000.png number=10
starting=1 increment=1 scale=100 file=[] or=[]");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
run("Convert to Mask", "calculate");
run("Stack to Images");
imageCalculator("Add create", "0000","0001");
//run("Image Calculator...", "image1=0000 operation=Add image2=0001 create");
rename("01");
imageCalculator("Add create", "01","0002");
//run("Image Calculator...", "image1=01 operation=Add image2=0002 create");
rename("012");
imageCalculator("Add create", "012","0003");
//run("Image Calculator...", "image1=012 operation=Add image2=0003 create");
rename("0123");
imageCalculator("Add create", "0123","0004");
//run("Image Calculator...", "image1=0123 operation=Add image2=0004 create");
rename("01234");
imageCalculator("Add create", "01234","0005");
//run("Image Calculator...", "image1=01234 operation=Add image2=0005 create");
rename("012345");
imageCalculator("Add create", "012345","0006");
//run("Image Calculator...", "image1=012345 operation=Add image2=0006 create");
rename("0123456");
imageCalculator("Add create", "0123456","0007");
//run("Image Calculator...", "image1=0123456 operation=Add image2=0007 create");
rename("01234567");
imageCalculator("Add create", "01234567","0008");
//run("Image Calculator...", "image1=01234567 operation=Add image2=0008 create");
rename("012345678");
imageCalculator("Add create", "012345678","0009");
//run("Image Calculator...", "image1=012345678 operation=Add image2=0009 create");
rename("0123456789");
run("Set Measurements...", " bounding redirect=None decimal=0");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing display");
run("Summarize");

```

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf für die Überlassung des Themas, wodurch ich die Möglichkeit bekam, erste Einblicke in die experimentelle Forschung zu erhalten.

Als Betreuer hat mich dabei Herr Dr. Volker Stoldt über Jahre begleitet, dem ich hiermit für seine stetige Bereitschaft Tipps zu geben, Fragen zu beantworten sowie mich zu ermuntern, danken möchte. Außerdem danken möchte ich Frau Kirchhoff und Frau Weingart, die mir bei der praktischen Umsetzung der Experimente sehr geholfen haben.

Ich möchte mich bedanken bei den Blutspendern, ohne deren Bereitschaft, an der Studie teilzunehmen, die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei zahlreichen Kommilitonen, die bereit waren, für viele Vorversuche Blut zu spenden.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder dafür bedanken, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben und mich immer in allen Belangen unterstützen. Meinem Freund Lukas Weiser danke ich für die jahrelange Bereitschaft, den Tücken dieser Arbeit gemeinsam auf den Grund zu gehen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Saskia Christina Schlesinger
Geburtsdatum: 16.01.1986
Geburtsort: Wilhelmshaven

Ausbildung:

1998 bis 2005 Mariengymnasium Jever

Oktober 2005 bis November 2011 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berufserfahrung:

seit März 2012 Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Hamburg, den 20.03.2013

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

20.03.2013, Saskia Christina Schlesinger