

Aus dem Institut für Hämostaseologie, Hämotherapie und
Transfusionsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. E. Scharf F.A.H.A.

Charakterisierung der Adhäsionsstabilität $\alpha_{IIb}\beta_3$ -exprimierender
HEK293 Zellen an immobilisierte Adhäsivproteine
(Fibrinogen und von-Willebrand-Faktor)

Dissertation

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

vorgelegt von
Marina Kunstreich
2013

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. Scharf

Korreferent: Prof. Dr. Hohlfeld

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

In Arbeit

Zusammenfassung

$\alpha_{IIb}\beta_3$, ein polymorpher thrombozytärer Integrinrezeptor, spielt eine zentrale Rolle bei der Plättchenadhäsion, Plättchenaggregation, Plättchenthrombusbildung und Thrombusstabilität. Der HPA-1-Polymorphismus ist durch eine Punktmutation mit einem Aminosäureaustausch in Position 33 der β_3 -Untereinheit des Integrins gekennzeichnet. Die resultierenden Isoformen tragen entweder Leucin (HPA-1a, Leu33) oder Prolin (HPA-1b, Pro33). Klinische Assoziationsstudien lassen darauf schließen, dass das HPA-1b-Allel eine kritische Rezeptorvariante darstellt. So konnte von unserer Arbeitsgruppe belegt werden, dass Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK), die Träger des HPA-1b-Allels sind, im Median 5 Jahre früher einen Myokardinfarkt erleiden als HPA-1b-negative KHK-Patienten (Zotz et al, 2005). Dieses Ergebnis hat zu der Hypothese geführt, dass die HPA-1b (Pro33)-Variante des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ eine erhöhte Plättchenthrombogenität bedingt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss des HPA-1b-Allels auf die Adhäsionsaktivität und -stabilität des Integrinrezeptors $\alpha_{IIb}\beta_3$ gegenüber immobilisiertem Fibrinogen (Fg) oder von-Willebrand-Faktor (vWF) unter flussdynamischen Bedingungen an einem Zellmodell zu untersuchen.

Hierzu wurden $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfizierte und fluoreszenzmarkierte HEK293-Zellen eingesetzt, die stabil entweder die HPA-1a (Leu33)- oder die HPA-1b (Pro33)-Isoform des Integrins exprimierten. Die Versuche wurden in einer Flusskammer durchgeführt. Die Deckgläser wurden mit Fg (Konzentration: 50 oder 100 $\mu\text{g/ml}$), vWF (Aktivität vWF:RCo 50 oder 100%) oder 1% BSA (Kontrolle) beschichtet. Für nachfolgende Experimente dienten sog. „Displacement“-Bedingungen. Hierzu wurden die transfizierten HEK293-Zellen zunächst bei venösen wandnahen Scherraten (30 s^{-1}) zur Adhäsion an Fg oder vWF gebracht, nachfolgend stufenweise steigenden Scherraten (bis maximal 2000 s^{-1}) exponiert und schließlich die Raten residueller, also noch adhärenter HEK-Zellen mittels digitaler Bildgebung fortlaufend bestimmt. Die HPA-1b-Isoform $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfizierter HEK-Zellen wies bei Exposition arterieller Scherraten (2000 s^{-1}) eine signifikant höhere Adhäsionsstabilität an immobilisiertes Fg als die HPA-1a-Isoform auf ($p < 0.05$). So betrug die Rate residueller adhärenter HPA-1b-Zellen bei einer Fg-Konzentration von 50 bzw. 100 μg $87 \pm 8\%$ (MW + SD) bzw. $95 \pm 6\%$, die residueller adhärenter HPA-1a-Zellen hingegen $62 \pm 15\%$ bzw. $57 \pm 15\%$. In dem getesteten Bereich hatte die Höhe der Fg-Konzentration also keinen Einfluss auf die Adhäsionsaktivität der transfizierten HEK-Zellen. Ein grundsätzlich anderes Adhäsionsprofil der Transfizierten zeigte sich gegenüber immobilisiertem vWF. Bereits bei Applikation venöser Scherraten (bis 500 s^{-1}) fiel die Rate noch adhärenter HEK293-Zellen beider Isotypen signifikant ab ($p < 0.05$). Wurden die Scherraten stufenweise weiter erhöht (bis 2000 s^{-1}) lag der Prozentsatz residueller adhärenter HPA-1a-Zellen mit $45 \pm 9\%$ über dem der HPA-1b-Zellen ($32 \pm 5\%$) ($p < 0.05$). Die Konzentration bzw. Aktivität des immobilisierten vWF war in den getesteten Bereichen wiederum ohne Einfluss.

Die Ergebnisse demonstrieren, 1) dass die Art des Adhäsivproteins die Adhäsionsstabilität transfizierter $\alpha_{IIb}\beta_3$ -HEK-Zellen an immobilisierte Liganden maßgeblich beeinflusst und 2) dass die HPA-1b (Pro33)-Variante von $\alpha_{IIb}\beta_3$ bei der Interaktion mit immobilisiertem Fg tatsächlich prothrombotische Eigenschaften besitzt. Hingegen zeigt die HPA-1a (Leu33)-Variante von $\alpha_{IIb}\beta_3$ bei immobilisiertem vWF eine höhere Adhäsionsstabilität als die HPA-1b (Pro33)-Variante.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
°C	Celsius
Å	Ångström
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CAS	<i>chemical abstracts service</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CO ₂	Kohlendioxid
Csk	c-Src Kinase
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithioreitol
Ex	Exzitation
F-12	<i>Ham's F12-Medium</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
Fg	Fibrinogen
Fg immob.	immobilisiertes Fibrinogen
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
g	Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
GP	Glycoprotein
GPIIb-IIIa	Fibrinogenrezeptor, Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$
H ₂ O	Wasser

HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HPA	<i>Human Platelet Alloantigen</i>
HPA-1a	Polymorphismus des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins (Position 33 Leu)
HPA-1b	Polymorphismus des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins (Position 33 Pro)
IgG	Immunglobulin G
KHK	Koronare Herzkrankheit
KQAGDV	Dodekapeptidsequenz des Fibrinogenmoleküls
Leu	Leucin
LSM	<i>Laser-Scanning-Microscop</i>
MEPE	<i>molecule of equivalent phycoerythrin values</i>
MM	Molekularer Gewichtsmarker
Mn²⁺	Mangan-Ion
N	Anzahl
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin, rotes Pigment
PI^{A1}	Alternative Bezeichnung für HPA-1a (veraltet)
PI^{A2}	Alternative Bezeichnung für HPA-1b (veraltet)
Pro	Prolin
PSI	Plexin-Semaphorin-Integrin Domäne
Px	Pixel
RGD	Arginin–Glycin–Asparaginsäure Sequenz
RT	Raumtemperatur
s⁻¹	reziproke Sekunde (Einheit der Scherrate)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Src	Akronym aus <i>cellular sarcoma</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Unit
vWF	von-Willebrand-Faktor
vWF:RCo	Ristocetin-Kofaktoraktivität (auch vWF:RCoF, vWF:RiCoF)
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogenrezeptor, auch GPIIb-IIIa genannt
γ	Scherrate

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
INHALTSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Hämostase	1
1.1.1 Die Rolle von Fibrinogen als Adhäsiv-Protein	2
1.1.2 Die Rolle von vWF als Adhäsiv-Protein	4
1.2 Integrine	7
1.2.1 Integrinaktivität	7
1.2.2 $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin	8
1.2.3 Leu33Pro-Varianten des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins	9
2 ZIELE DER ARBEIT	10
3 MATERIAL UND METHODEN	12
3.1 Materialien	12
3.1.1 Materialien	12
3.1.2 Chemikalien und Biochemikalien	12
3.1.3 Zelllinien, Vektoren und Plasmide	14
3.1.4 Antikörper	14
3.1.5 Geräte	15
3.1.6 Hard- und Softwareprodukte	15
3.2 Methoden	16
3.2.1 6% SDS-Page	16
3.2.2 Zellkultur	16
3.2.3 Durchflusszytometrie	16
3.2.4 Versuchsaufbau	19
3.2.5 Versuchsdurchführung	24
3.2.6 Datenauswertung	25
4 ERGEBNISSE	27
4.1 Fluoreszierende HPA-1 Fusionsproteine	27
4.1.1 Quantifizierung der Expression des HPA-1 Fusionsgenes	27
4.1.2 Differenzierung der HPA-1-Varianten	28
4.1.3 Messung des Fluoreszenzsignals der doppelt-transfektierten HEK293-Zellen	29

4.2	„Displacement“-Versuche der HPA-1-Varianten in der Flusskammer	31
4.2.1	Kontrollversuche	31
4.2.2	Konzentration der immobilisierten Liganden	32
4.2.3	Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von dem HPA-1-Polymorphismus	34
4.2.4	Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von der Art des immobilisierten Liganden	37
4.2.5	Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von der Konzentration des immobilisierten Liganden	38
4.2.6	Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von der Höhe der Scherrate	40
5	DISKUSSION	42
5.1	Expression des HPA-1 Fusionsgenes	42
5.2	Adhäsionsstabilität	43
5.2.1	Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von HPA-1 Polymorphismus	43
5.2.2	Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von der Art des immobilisierten Liganden	46
5.2.3	Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von der Konzentration des immobilisierten Liganden	47
5.2.4	Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von der Höhe der Scherrate	48
5.3	Modell HEK-Zellen versus Thrombozyten	49
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN	51
7	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	53
8	ANHANG	61
8.1	Rohdaten	61
8.2	Makro zur Bildverarbeitung:	61

DANKSAGUNG

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

1 Einleitung

Um in das Thema einzusteigen zu können, ist es wichtig, die Hämostase und die beteiligten „Mitspieler“ zu kennen. Unter den folgenden Punkten (1.1 und 1.2) werden die für die Dissertation wichtigsten „Mitspieler“ beleuchtet.

1.1 Hämostase

Der physiologische Schutz gegen Blutung, die Hämostase, ist eine lebenswichtige Funktion des menschlichen Organismus. Sie wird in primäre (zelluläre) und sekundäre (plasmatische) Hämostase unterteilt. Die zelluläre Phase wiederum teilt sich in Adhäsion und Aggregation auf.

Die Adhäsion beginnt mit der sogenannten Initiierung, in der Thrombozyten über den Rezeptor GP1b-IX-V in einer rollenden Bewegung Kontakt zu subendothelial freiliegendem vWF aufnehmen. Es folgt die Aktivierung der Thrombozyten über verschiedene Signalwege. Vor allem der Kontakt des GP VI-Rezeptors zu Kollagen spielt eine entscheidende Rolle ^{1,2}.

Die angestoßenen Signaltransduktionswege (*Inside-Out-Signal*) führen zu einer wichtigen Konformationsänderung von $\alpha_{IIb}\beta_3$, die für die Hämostase obligatorisch ist ³. So kann $\alpha_{IIb}\beta_3$ nun Fibrinogen und vWF binden und die Aggregation der Thrombozyten vermitteln ^{4,5}. Die Stabilisierung des Thrombus erfolgt über das *Outside-In-Signal*. Eine entscheidende Rolle dafür spielt die Phosphorylierung der β_3 -Untereinheit über Kinasen ⁶. Ein Modell der zu Grunde liegenden Mechanotransduktion ist in Abb. 1 zu sehen. Vervollständigt wird der Gerinnungsmechanismus durch die sekundäre/plasmatische Hämostase mit der Aktivierungs-, Koagulations- und Retraktionsphase ⁷.

Das komplexe System der Hämostase kann durch verschiedene Pathologien in ein Ungleichgewicht gebracht werden und somit Krankheiten verursachen. Bereits 1918 beschrieb der Schweizer Kinderarzt Eduard Glanzmann eine Störung der Hämostase, bei der die Thrombozyten nicht aktiviert werden können. Sie wird nach ihrem Entdecker Morbus Glanzmann-Naegeli oder Glanzmann Thrombasthenie genannt. Die zu Grunde liegende Pathophysiologie entspricht einem dysfunktionalen $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin, entweder in der α_{IIb} -Untereinheit oder in der β_3 -Untereinheit. Beide Untereinheiten sind essentiell für die Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche ⁸⁻¹⁰.

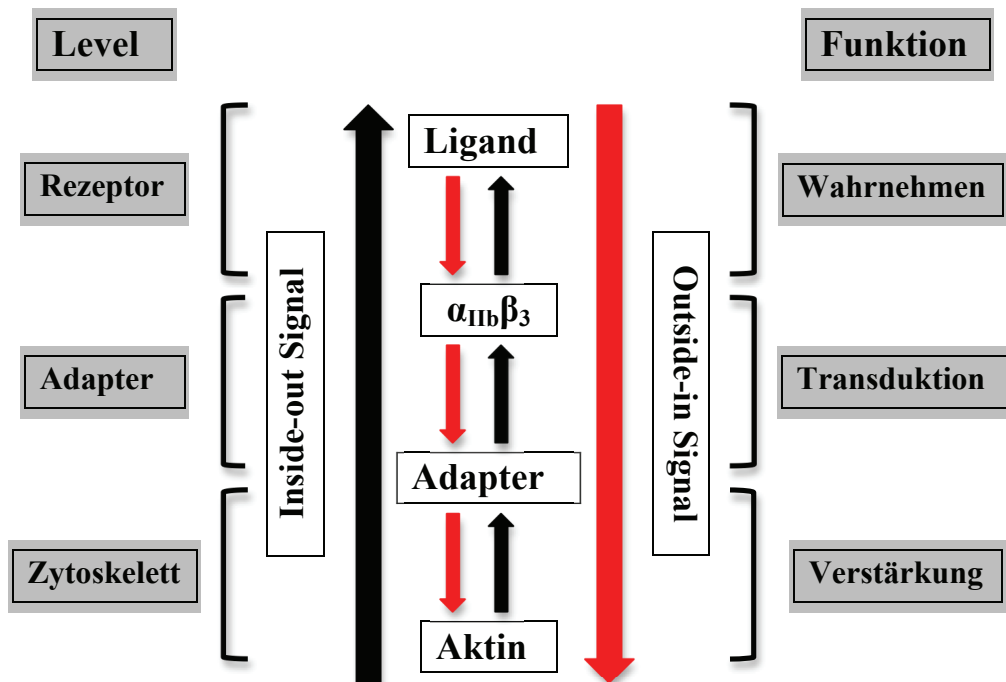


Abb. 1: Modell der Mechanotransduktion Ligand, Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, Adapter und Aktin stellen die Schaltstellen der Mechanotransduktion dar. Die Signalwege sind mit schwarzen und roten Pfeilen dargestellt. Grau hinterlegt sind links im Bild das Level der verschiedenen Schaltstellen und rechts im Bild die jeweiligen Funktionen.

1.1.1 Die Rolle von Fibrinogen als Adhäsiv-Protein

Fibrinogen ist ein multivalentes Adhäsionsprotein, das im Blut in der Plasmakonzentration 150-350 mg/dl vorliegt¹¹. Es wird hauptsächlich von der Leber¹², aber auch von Lungenepithelzellen produziert¹³.

1.1.1.1 Struktur

Fibrinogen ist ein Hexamer $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, das in seiner molekularen Masse bei 340 kDa liegt. Wie in Abb. 2 zu sehen, sind die sechs Ketten als Heterodimer (α - β - γ - γ - β - α), über 29 intra- und inter-Ketten-Disulfidbrücken verbunden, aufgebaut. Das Glykoprotein besteht aus zwei D-Domänen und einer E-Domäne und bildet als Quartärstruktur eine trinoduläre Form^{14,15}.

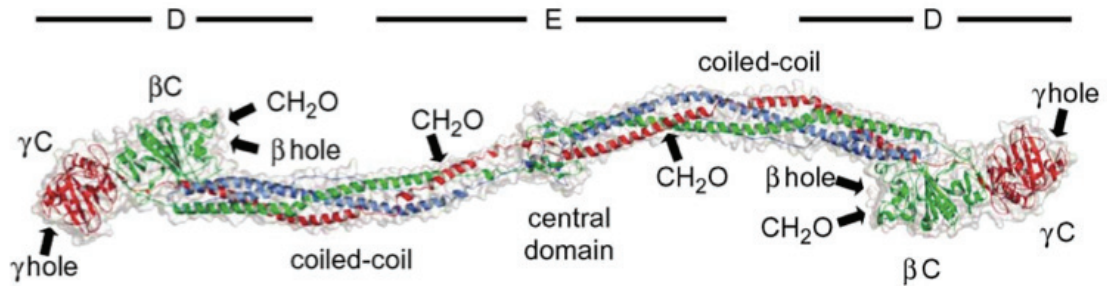


Abb. 2: Die röntgen-kristallographische Struktur von Fibrinogen Die A α -Ketten sind blau, die B β -Ketten sind grün und die γ -Ketten sind rot. Die Größe der D- und E-Domänen ist mittels dreier Linien über dem Protein dargestellt. Modifiziert nach Weisel, 2005.¹¹

1.1.1.2 Funktion

Fibrinogen hat viele Funktionen. In der Blutgerinnungskaskade spielt Fibrinogen als Faktor I eine entscheidende Rolle in der Initiation der Hämostase. Fibrinogen bindet mit einer hohen Affinität an den Integrinrezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ ¹⁶ und fungiert als Brücke, um die Blutplättchen miteinander zu verbinden¹¹.

Es gibt für das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ drei Bindungsstellen innerhalb des Glykoproteins. Diese sind das carboxyterminale Ende der γ -Kette, an der Stelle γ 400–411 (Dodekapeptidsequenz, HHLGGAKQAGDV kurz KQAGDV) und zwei Positionen der α -Kette, an der Stelle A α 572–575 (Arg–Gly–Asp–Ser (RGDS)) und an der Stelle A α 95–98 (Arg–Gly–Asp–Phe (RGDF))^{11,16–18}. Liu et al. beschreibt, dass der Bindungsplatz der γ -Kette für den Fibrinogenrezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ der Wichtigste ist. Demnach spielen beide Positionen der α -Kette nur eine untergeordnete Rolle und sind nicht notwendig für die Bindung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins^{16,19–21}.

Der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor bindet mit verschiedenen Bindungsstellen Fibrinogen. Die β_3 -Untereinheit bindet die RGD-Domäne, die α_{IIb} -Untereinheit die KQAGDV Domäne^{22–26}.

1.1.1.3 Konformation

Fibrinogen liegt gelöst im Blut vor. Da Fibrinogen ein polyvalenter Ligand ist, kann er mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellen und Proteinen interagieren. Im immobilisierten Zustand spielt es eine wichtige Rolle für die Einwanderung von Endothelzellen, glatter Muskelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten zur

Reorganisation des Gerinnsels ²⁷. Fibrinogen kann einfach auf einer Glasoberfläche immobilisiert werden.

1.1.2 Die Rolle von vWF als Adhäsiv-Protein

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein Adhäsiv-Protein. Er wird in Endothelzellen ²⁸ und Megakaryozyten ²⁹ synthetisiert. Im menschlichen Körper liegt er in drei Formen vor, erstens im Plasma gelöst, zweitens in der extrazellulären Matrix gebunden und drittens als Speicherform in Endothelzellen und Megakaryozyten ^{29–32}.

1.1.2.1 Struktur

vWF besitzt eine große molekulare Heterogenität. Er ist aufgebaut aus Monomeren (Abb. 3), die sich zu Multimeren zusammenlagern können. Die Masse der Moleküle variiert zwischen $0,5$ und 800×10^6 Da ^{33,34}. Die Länge eines Moleküls kann sogar bis zu einem Millimeter betragen ³⁵.

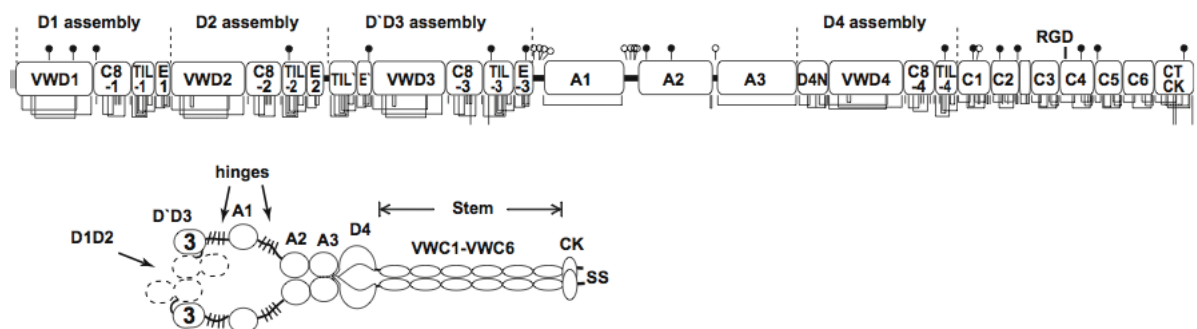


Abb. 3: Struktur des vWF-Monomers Oben sieht man die gestreckte Struktur, wie sie sich aus Proteindatenbanken und elektronenmikroskopischen Studien ergeben hat. Unten ist die dreidimensionale Struktur, wie sie im sauren Milieu vorliegt, abgebildet. Mit Großbuchstaben (A,C,D, E, TIL) sind die verschiedenen Domänen des Monomers beschrieben. Modifiziert nach Zhou et al., 2012. ³⁶

1.1.2.2 Funktion

Der von-Willebrand-Faktor, der im Blut an Faktor VIII gebunden ist, spielt eine entscheidende Rolle in der Hämostase. Nach Verletzung der Gefäßwand bindet im Plasma gelöster vWF an freigelegte Kollagenfibrillen. Durch Konformationsänderung (siehe Abb. 5) des vWF-Moleküls werden Bindungsstellen für GP1b-V-IX-Rezeptoren frei. Der GP1b-V-IX-Rezeptor ist ein leucinreicher Rezeptor und am zweihäufigsten nach dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf der Thrombozytenoberfläche vertreten. Es entsteht eine

zeitlich begrenzte Bindung von wenigen Sekunden zwischen dem GP 1b-V-IX-Rezeptor und der A1-Domäne des vWFs. Dieser Vorgang wird „*tethering*“ genannt. Mittels der C4- Domäne des vWF-Moleküls und der darin enthaltenen RGD-Sequenz kann über das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit dem β_3 eine dauerhafte Bindung erzeugt werden (Abb. 4). Außerdem wurde beschrieben, dass vWF im Rahmen der Plättchenaggregation die Funktion von Fibrinogen unter hohen Scherraten als Ligand von $\alpha_{IIb}\beta_3$ übernehmen kann³⁷. Die Bindung des vWF an den Rezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist weniger affin als diejenige mit Fibrinogen^{27,36,38,39}.



Abb. 4: Repräsentatives Bindungsmodell des Komplexes D4-CK mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$
 Links: Elektronenmikroskopische Aufnahmen; Rechts: Schema der Integrinbindung mit vWF. D4-CK beschreibt den Abschnitt von der D4-Domäne bis zum c-terminalen *cystein knot* des vWF-Moleküls (siehe Abb. 3). Die weiße Skala links im Bild entspricht 10nm. Modifiziert nach Zhou et al., 2012.³⁶

1.1.2.3 Konformation

vWF kann in zwei Konformationszuständen vorliegen, bei niedrigen Scherraten in einer geknäuelten Form und bei hohen Scherraten ab 1000 s^{-1} bzw. ca. 3000 s^{-1} in einer gestreckten „fadenförmigen“ Form (Abb. 5). In der gestreckten Form exponiert vWF vorher verborgene Bindungsstellen und kann so auch besser Thrombozyten binden⁴⁰. Wie sich die Konformation des vWF als immobilisiertes Substrat auf einer Glasoberfläche ohne Kollagenbeschichtung darstellt, ist in der Literatur bisher noch nicht dokumentiert. In der Arbeit von Siediecki et al., 1996 sowie Savage et al., 2002 und J.E. Sadler et al., 1998 sind weitere dreidimensionale Darstellungen von vWF zu sehen (Abb. 6)^{41–43}.

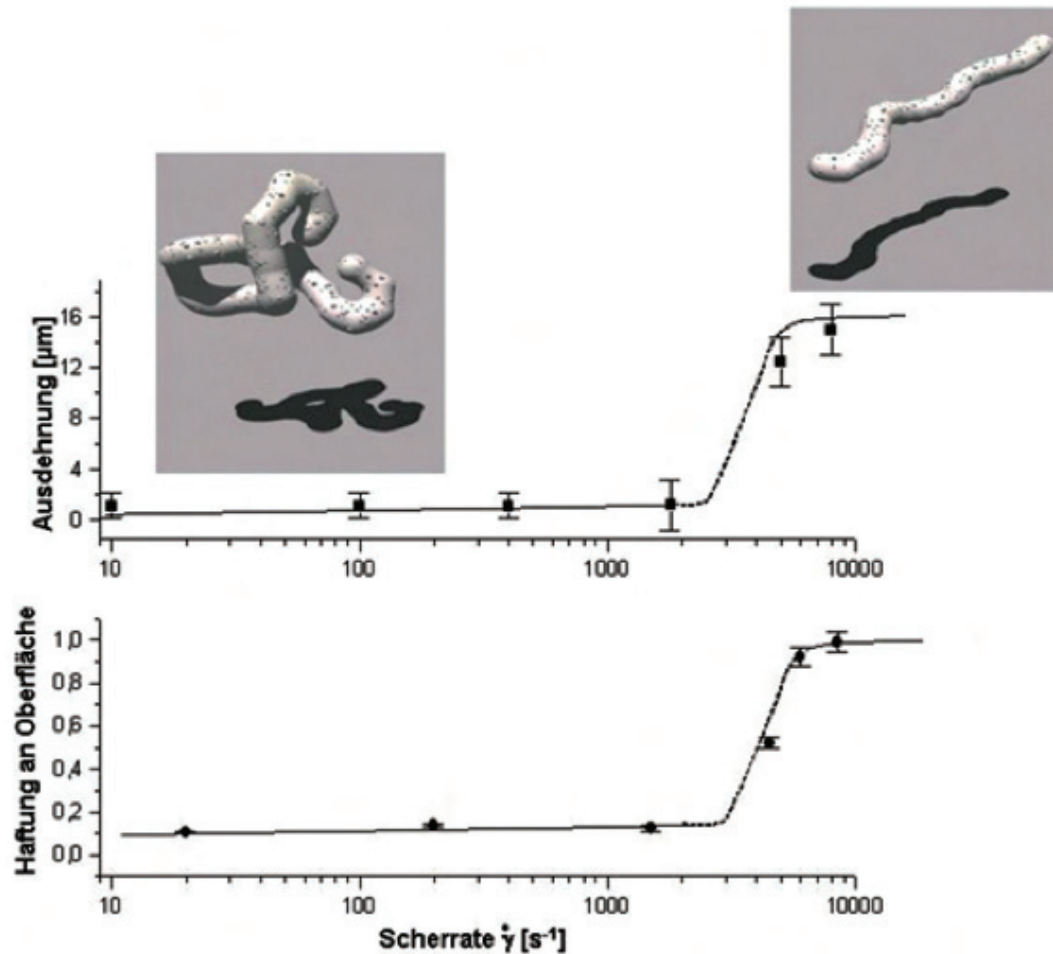


Abb. 5: Selbstorganisierte Haftung Unterhalb einer kritischen Scherrate liegt der vWF in seiner geknäuelten Form vor. Erst oberhalb 1.000 s^{-1} kommt es zur Streckung. In diesem Zustand ist die Tendenz für vWF, an ein Substrat zu binden, um ein Vielfaches erhöht. Es ist deutlich zu erkennen, dass die mittlere Ausdehnung (Länge) sowie die Tendenz zur Adhäsion korreliert ansteigen. Aus Schneider und Schneider, 2008.⁴⁰

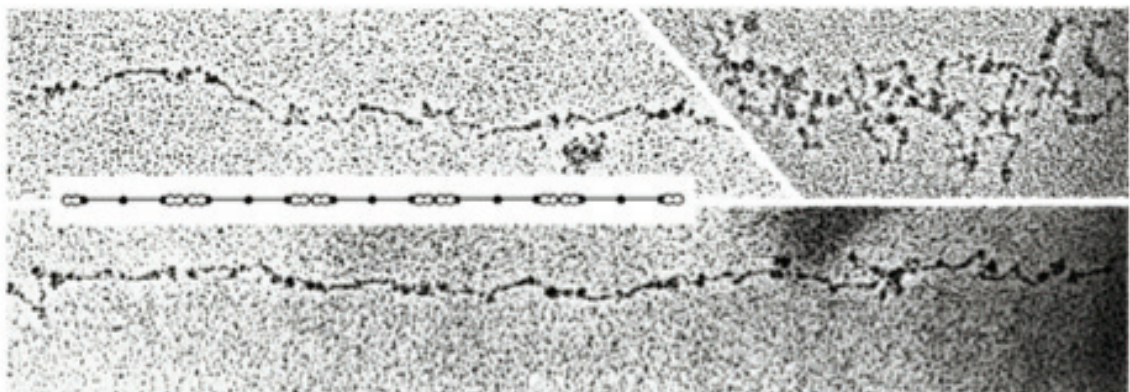


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des vWF-Moleküls Die langen gestreckten Moleküle mit einer Wiederholung von 120nm, wie in der schematischen Darstellung mittig im Bild, repräsentieren die vWF-Multimerstruktur. Die geknäuelte Form (rechts oben) zeigt wahrscheinlich die Konformation von vWF in Lösung. Vergrößerung 150 000-fach. Modifiziert nach J. Evan Sadler, 1998.⁴³

1.2 Integrine

Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, bestehend aus einer nicht kovalent verbundenen α - und β -Untereinheit. Ihre Aufgabe ist es, Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix oder Glykoproteinen zu verbinden. Sie werden als bidirektionale, allosterische Signalmaschinen beschrieben ⁴⁴.

1.2.1 Integrinaktivität

Die Aktivität eines Integrins wird durch verschiedene Einflüsse gesteuert. Eine entscheidende Grundlage im Verständnis dieser Einflüsse spielt das Modell des *Inside-Out*- und *Outside-In-Signalings* (s.Kap.1.1). In Abb. 7 ist eine schematische Darstellung der komplexen Hintergründe dieses Modells zu sehen. Adapterproteine (wie z.B. Talin, Kindlin, Paxillin, Vinculin) und verschiedene Tyrosinkinasen und -phosphatasen (wie z.B. Src, FAK und Csk) und weitere Bestandteile spielen eine wichtige Rolle im Bereich der zytoplasmatischen Domäne ^{45,46}.

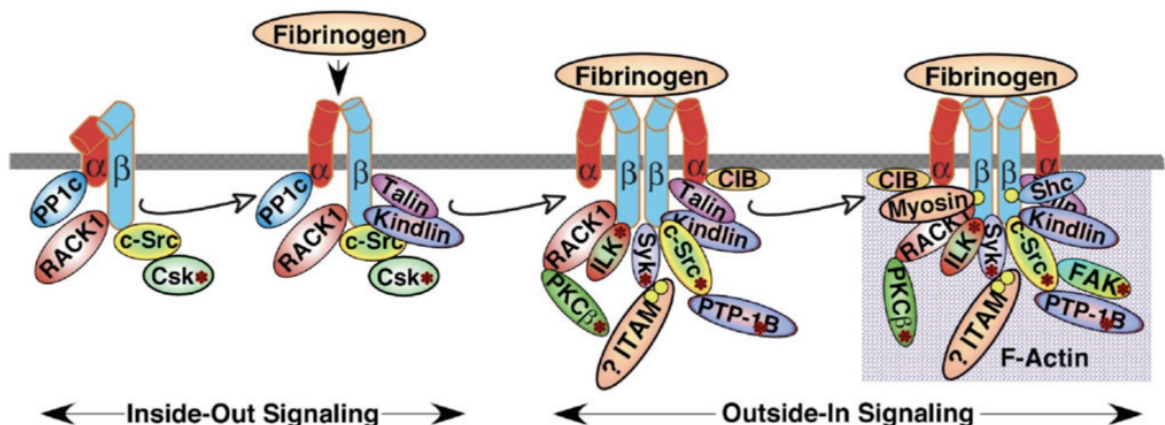


Abb. 7: Proteininteraktionen zwischen der zytoplasmatischen Domäne von α_{IIb} und β_3 regulieren das Integrin-Signaling Abkürzungen: PP1c, *protein phosphatase 1c*; RACK1, *receptor for activated C kinase 1*; Csk, *c-Src tyrosine kinase*; PKC β , *protein kinase C β* ; ILK, *integrin-linked kinase*; ITAM, ein noch nicht identifiziertes Protein, mit *immunoreceptor tyrosine activation motifs*; CIB, *calcium and integrin-binding 1*; Syk, *spleen tyrosine kinase*. Modifiziert nach Collier & Shattil, 2008. ⁴⁵

Über diesen bidirektionalen Signalweg findet eine Konformationsänderung des Integrin-Rezeptors statt ^{47,48}. Xiao et al., 2004 stellt verschiedene Konformationen des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Abb. 8) dar, die unter zur Hilfenahme verschiedener Liganden und Antagonisten beobachtet wurden ^{48,49}. Sie folgerten, dass Integrine sich im ständigen Gleichgewicht zwischen verschiedenen Konformationen befinden.

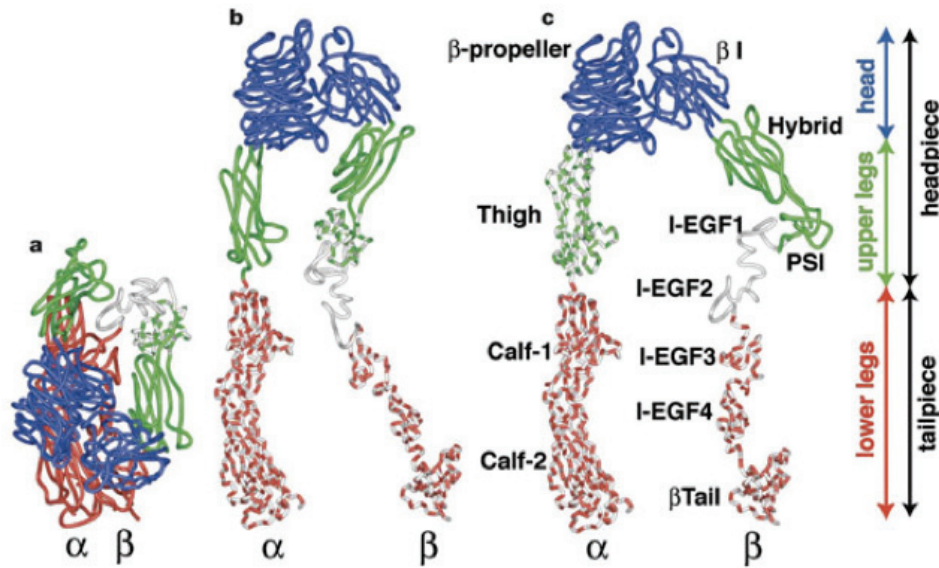


Abb. 8: Drei distinkte Integrin-Konformationen dargestellt in ihrer Kristallstruktur: Mittels Röntgen-Kristallographie nachgewiesene Konformation des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins. a: niedrig affine, gekrümmte Konformation; b: mittel affine, gestreckte Konformation mit geschlossenem Kopfteil; c: hoch affine, gestreckte Konformation des Kopfteils. Modifiziert nach Xiao et al., 2004. ⁴⁸

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

Das Heterodimer, bestehend aus α_{IIb} (143 kDa) und β_3 (88 kDa), ist das häufigste Protein auf der Plättchenoberfläche und liegt in 60–100.000 Kopien vor ⁵⁰. Es kommt ausschließlich auf Zellen der megakaryozytären Linie vor ⁵. Die α_{IIb} -Untereinheit besteht aus zwei Ketten, einer großen („heavy chain“) und einer kleinen Kette („light chain“), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die β_3 -Untereinheit hingegen besteht nur aus einer Kette ⁵¹. Es sind 70% der Gesamtrezeptorzahl eines Thrombozyten konstitutiv an der Oberfläche exprimiert. Die restlichen 30% werden erst nach der Thrombozytenaktivierung aus den intrazellulären Speichern freigesetzt ⁵². Durch die Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einem sogenannten Rezeptor-Clustering. Dadurch werden die Rezeptoren zusammengruppiert und das Zytoskelett neu angeordnet ⁵³.

Die Aktivierung kann durch Agonisten wie Mn^{2+} , ADP und Thrombin, aber auch durch intrazelluläre Signale oder Ligandenbindung erzeugt werden ^{49,54,55}. Im aktivierten Zustand kann das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin Fibrinogen, Fibronectin, von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin und Vitronectin ^{56,57}, im inaktivierten Zustand immobilisiertes Fibrinogen binden ⁵⁸. Dieser Adhäsionsmechanismus ist von großer Bedeutung für die Plättchen-Plättchen-Aggregation ⁵⁹. Die Bindung von Fibrinogen an $\alpha_{IIb}\beta_3$ bedingt

Konformationsänderung und Clustering des Rezeptors im Sinne einer direkten Aktivierung⁴. Aber auch andere kleine Peptide vom RGD- und KQAGDV-Typ oder synthetische Fibrinogenrezeptorantagonisten mit gleichen sterischen Eigenschaften können an den nicht aktivierten Rezeptor binden und seine Konformation ändern (Intrinsische Aktivität)⁵⁶. Durch die Bindung dieser Peptide werden ligandeninduzierte Bindungsstellen (LIBS) freigelegt.

Kiefer et al., 1991 beschreibt, dass $\alpha_{IIb}\beta_3$ sich erstens auf kernreichen Zellen ähnlich verhält wie auf Thrombozyten und zweitens auf kernreichen Zellen nicht durch „Thrombozytenagonisten“ aktivieren lässt⁶⁰.

1.2.3 Leu33Pro-Varianten des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins

1988 konnten Newman und Mitarbeiter mittels der modifizierten PCR-Methode einen Basenaustausch in Position 1565 (Thymin→Cytosin) auf der β_3 -cDNA entdecken. Diese Mutation führt zum Aminosäureaustausch an Position 33 (Leucin→Prolin) in der β -Untereinheit⁵⁹. Die Substitution von Leucin (HPA-1a, PI^{A1}) durch Prolin (HPA-1b, PI^{A2}) verursacht die Bildung mehrerer Neoepitope und damit eine Änderung der Konformation und der Funktion von $\alpha_{IIb}\beta_3$ ⁶¹. 25% der nordeuropäischen Population tragen das HPA-1b Allel heterozygot, 2% homozygot⁶². E. J. Weiss et al., 1996 fanden eine Korrelation zwischen akutem Koronarsyndrom und dem homozygoten Trägerstatus für HPA-1b⁶³. Wir konnten 2005 diese Ergebnisse bestätigen und noch weiter zeigen, dass HPA-1b-positive Patienten mit koronarer Herzkrankheit im Median 5,2 Jahre früher einen Herzinfarkt erleiden als HPA-1b-negative Patienten⁶⁴. In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich sagen, dass der HPA-1b Genotyp mit einer gesteigerten Reagibilität im Sinne eines effizienteren *Outside-In-Signalings* und einer erhöhten Sensitivität gegenüber der Inhibition mit Aspirin und Abciximab assoziiert ist⁸. Dieses prothrombotische Verhalten ist unter Flussbedingungen vor allem bei arteriellen Scherraten noch verstärkt⁶⁵.

2009 fand Nesbitt heraus, dass die löslichen Agonisten nicht entscheidend sind für die Initiierung einer neuen Thrombusformation. Er konnte zeigen, dass eine veränderte Rheologie, wie z.B. sehr hohe Scherraten oder poststenotisch niedrige Scherraten, zur Ausbildung eines Thrombus ausreichend ist⁶⁶.

2 Ziele der Arbeit

Allgemeines Ziel der Arbeit ist, die Adhäsionsstabilität bzw. das Funktionsverhalten der HPA-1 $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Varianten zu untersuchen. Der Begriff Adhäsion leitet sich von dem lateinischen Wort „*adhaerere*“ ab und bedeutet anhaften. In dieser Arbeit soll das Anhaften der $\alpha_{IIb}\beta_3$ transfektierten HEK293-Zellen in der Flusskammer auf verschiedenen Substraten ermittelt werden. Dazu werden die Zellen zunehmenden Scherkräften ausgesetzt. Die Widerstandsfähigkeit bzw. die Stabilität der Zellen gegen die Scherbelastung wird als Adhäsionsstabilität bezeichnet. Die Dissoziationsrate verhält sich umgekehrt proportional zur Adhäsion. Die der Adhäsion nachgeschalteten Prozesse der Mechanotransduktion wie etwa das *Outside-In-* (z.B. Verstärkung/*Reinforcement*) und *Inside-Out-Signaling* (z.B. *receptorclustering*) können nicht einzeln beurteilt werden. Es handelt sich bei diesem Versuchsaufbau um eine rein phänomenologische Untersuchung des gesamten Prozesses.

Anhand der Flusskammerexperimente soll qualitativ und quantitativ geprüft werden, ob und wie die RGD-haltigen Adhäsivproteine (Fibrinogen und vWF) die Rezeptorfunktion in Relation zu seinem Polymorphismus beeinflussen.

Im Fokus unserer Beobachtungen stehen vier verschiedene Punkte.

Als erstes interessiert uns, welches Funktionsverhalten die Varianten des Rezeptors $\alpha_{IIb}\beta_3$ zeigen. Wie also beeinflusst der HPA-1-Polymorphismus die Adhäsionsstabilität bzw. seine Resistenz auf flussdynamische Bedingungen. Unter dem Punkt 1.2.3 wurden bereits erforschte Charakterzüge des Pro33 (HPA-1b)-Polymorphismus dargestellt. Wie aber wird sich sein Verhalten bestätigen oder erweitern lassen? In diesem experimentellen Setting werden $\alpha_{IIb}\beta_3$ stabil transfektierte HEK293-Zellen verwendet, die auf den immobilisierten Substraten vWF und Fibrinogen getestet werden. In einer Flusskammer werden die Zellen steigenden Scherraten ausgesetzt. Mit Hilfe eines LSM werden nach jeder Steigerung der Scherraten die verbleibenden Zellen detektiert. Diesem Ziel geben wir eine übergeordnete Rolle. Die folgenden drei Punkte sollen nun in Abhängigkeit zur Frage der Adhäsionsstabilität der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Polymorphismen untersucht werden.

Zweitens stellen wir uns die Frage, wie die beiden RGD-haltigen Substrate Fibrinogen und vWF, die beide im Blut physiologisch vorliegen, das Verhalten des $\alpha_{IIb}\beta_3$ - Rezeptors modulieren können. Dabei rückt das *Outside-In-Signaling* in den Fokus der Aufmerksamkeit, da die Substrate des Rezeptors einen wesentlichen Aktivator dieses

Signalweges darstellen. Wir beschränken uns hierbei allerdings wie bereits gesagt auf die phänomenologische Untersuchung dieser Signalkaskade.

Hat drittens die Konzentration der Substrate einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilität der Bindung des Integrins?

Als vierte und letzte Frage wollen wir die Bedeutung von zunehmenden Scherraten untersuchen. Dies ist gerade deswegen interessant, da im menschlichen Körper ein ständiges Wechselspiel zwischen sehr hohen und sehr niedrigen Scherraten herrscht. Wie jedoch der Einfluss der Scherraten auf den Thrombozyt bzw. auf das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist, ist immer noch Gegenstand der Forschung.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Die Experimente wurden mit folgenden Bestandteilen durchgeführt:

3.1.1 Materialien

Produkt	Hersteller
Blue Caps (15ml, 50 ml), polypropylene conical tubes	Falcon BD (Becton Dickinson), USA
Deckgläschen (24x50mm)	Engelbrecht Medizin und Labortechnik, Edermünde
Perfusorspritzen 50 ml, OPS, Luer Lock	B.BRAUN, Melsungen
6 Wellplatten, Cellstar®	Greiner Bio-one Labortechnik, Frickenhausen
Falcontubes, polystyrene round-bottom tubes	Falcon BD (Becton Dickinson), USA
Silikonnäpfe	Unbekannt

3.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Produkt	Hersteller	CAS Nummer
Abciximab (Reopro®)	Lilly, Bad Homburg	143653-53-6
Albumin from bovine serum, BSA 1%	Sigma-Aldrich®, Seelze	9048-46-8
Comassie-Blau Färbung	Sigma-Aldrich®, Seelze	6104-59-2
DMEM-Medium (Dulbecco's mod. Eagle-Medium)High Glucose 4,5 g/l	PAA Laboratories GmbH, Pasching	---
F-12 Medium, GlutaMAX®	Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt	---
FACS Flow	Becton Dickinson, USA	---

FCS (fetal calf serum)	Gibco®,Life Technologies GmbH, Darmstad	---
Fibrinogen-human	Sigma-Aldrich®, Seelze	9001-32-5
G418 Sulfate	InvivoGen,USA	108321-42-2
Gentamycin	Gibco®,Life Technologies GmbH, Darmstad	1403-66-3
Paraformaldehyd 4%	Roth, Karlsruhe	30525-89-4
PBS (Phosphate buffered saline)	Serag-Wiessner GmbH&Co. KG	---
Precision Plus Protein Standard, Dual Color	BioRad, München	---
Protogel/Acrylamid	National Diagnostics, USA	---
Rainbow Calibration Particles	Becton Dickinson, USA	---
vWF, Wilate	Octapharma Pharmazeutika Produktionsges.m.b.H.	---

3.1.2.1 Qualität der verschiedenen vWF-Präparate

Verglichen wurden zwei verschiedene Produkte der vWF-Präparate, nämlich Haemate® von der Firma CSL Behring und das Produkt Wilate von der Firma Octapharma. In Vorversuchen konnte mit dem Produkt Haemate® als immobilisierten Liganden nur eine geringe bis keine Zelladhäsion unter dem LSM beobachtet werden. Mit dem Produkt Wilate hingegen konnten stabile Ergebnisse produziert werden. Um die Ursache für diese Beobachtung zu finden, führte M. Gyenes (Mitarbeiterin des IHTM) eine 6% SDS-Page durch (Abb. 9a und b). Laut der Beschreibung der Inhaltsstoffe der Produkte sind die synonymen Bestandteile der Substrate vWF, Faktor VIII, Glycin, Natriumchlorid, Natriumcitrat und das Lösungsmittel Wasser für Injektionszwecke. Haemate® beinhaltet zusätzlich den Inhaltsstoff Human-Albumin. Wilate enthält als weitere Bestandteile Saccharose, Calciumchlorid und das Lösungsmittel Wasser für Injektionszwecke mit 0,1% Polysorbat 80.

3.1.3 Zelllinien, Vektoren und Plasmide

Es wurden zwei verschiedene doppelt transfektierte HEK (*Human embryonic kidney*) 293 Zellen (CRL 1573) verwendet. Sie werden als Isotyp HPA-1a und HPA-1b bezeichnet.

Beide Isotypen trugen die α IIb-Integrin Untereinheit, die mit einem *cyan fluorescent protein* (CFP) Fluorophor fusioniert war und außerdem die β 3 Untereinheit, die mit einem *yellow fluorescent protein* (YFP) Fluorophor fusioniert war. Die β 3 Untereinheit trug bei der HPA-1a Variante an Position 33 ein Leucin, bei der HPA-1b Variante an Position 33 ein Prolin. Für die Transfektion wurden folgende Plasmide verwendet:

Name	Vektor	Integrin-Untereinheit	Fluorophor	Hersteller
P71	pcDNA3.1(-)	---	---	Invitrogen, Darmstadt
P92	pcDNA3.1(-)	β 3 (HPA-1a, Leu33)	YFP	Invitrogen, Darmstadt
P96	pcDNA3.1(-)	β 3 (HPA-1a, Pro33)	YFP	Invitrogen, Darmstadt
P101	pcDNA3.1(-)	α IIb	CFP	Invitrogen, Darmstadt

3.1.4 Antikörper

Antikörper (Klon)	Antigen	Spezies	Hersteller
Anti-CD41 (PM6/248)	α IIb	Mouse (monoclonal)	Sigma-Aldrich®, Seelze
Anti-CD61-PE (SZ21)	β 3	Mouse (monoclonal)	Beckmann Coulter, Krefeld
Anti- γ 1/IgG1 kappa (MOPC-21)	Fab-Region des IgG	Mouse (monoclonal)	Becton Dickinson, USA
Anti- γ 1(IgG1)-PE (X40)	Fab-Region des IgG	Mouse (monoclonal)	Becton Dickinson, USA
Anti-Mouse IgG-PE	Mouse IgG	Goat (polyclonal)	Genetex, USA

3.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller	Typ
Argonlaser	Carl Zeiss, Oberkochen	CLSM 510
CO2-Inkubator	Binder, Tuttlingen	C150
Flow-cytometer	Becton Dickinson, USA	FACSCalibur 4 Colour
Flusskammer	Eigenkonstruktion	Modifikation der Hele-Shaw flow chamber ⁶⁷
Harvard-Pumpe	Harvard Apparatus, March-Hugstetten	---
Laser-Scanning-Mikroskop-Axiovert	Carl Zeiss, Oberkochen	100M
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen	---
Sterilwerkbank	Gelaire	BSB 4
Vortex VF2	Cenco Instrumenten MU N.V., Niederlande	---
Zentrifuge	Hettich	Universal 30 RF
Imager	Bio Rad, München	ChemiDoc XRS

3.1.6 Hard- und Softwareprodukte

Hard-/Softwareprodukt	Hersteller
Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (Version 1.39h)	Wayne Rasband, National Institutes of health, USA
Computer Siemens Celsius	Fujitsu Siemens, Augsburg
Excel 2011 für Mac	Microsoft Office
Facscalibur Flow cytometry acquisition and analysis software: Cell quest	Becton Dickinson, European HQ
Laser Scanning Microscope LSM 510, Version 3.2 SP2	Carl Zeiss, Oberkochen
Makro zur Auswertung (im Anhang), Manual Tracking, modifiziert nach	Fabrice Cordeli, Institut Curie, Orsay (France) (von eb.nih.gov/ij/plugins/track/track.html am

Eigenbedarf	14.09.12 um 10:17h)
Statistikprogramm: GraphPad, QuickCals	GraphPad Software, Inc. 2236 Avenida de la Playa, La Jolla, CA 92037 USA
Winmd Flow Cytometry Software, Version 2.9	J. Trotter, The Scripps Research Institute

3.2 Methoden

3.2.1 6% SDS-Page

Die diskontinuierliche *SDS-PAGE* ist eine Methode zur Auftrennung denaturierter Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts ⁶⁸. Das Gel ist denaturierend und reduzierend. Es beinhaltet 0,65 ml Acrylamide, 1,25 ml Tris-HCl-Puffer, 3,05 ml H₂O (gefiltriert), 50 µl APS und 5 µl TEMED. Es wird den Proteinen 0,93 g DTT und 1 g SDS im Überschuss, sowie 7ml Tris-HCl, 3 ml Glycerol und 1,2 mg Comassie-Blau zugegeben und diese dann 5 Minuten bei 95°C thermisch denaturiert. Das Gel wurde jeweils mit einem Probenvolumen von 60 µl beladen. Die Volumina beinhalteten Wilate und Haemate® aus einer aufsteigenden Verdünnungsreihe. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 150 Volt während eines Zeitraumes von 90 Minuten. Das Gel wurde densitometrisch mit dem Imager der Firma BioRad ausgewertet.

3.2.2 Zellkultur

In einem Inkubator wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ Sättigung kultiviert. In 6 Well-Platten wurden die Zellen in einem Medium bestehend aus einer 1:1 Mischung aus DMEM und F12, sowie 10% FCS, 1000 µg/ml G418 und 100 µg/ml Gentamycin angezüchtet.

Exponentiell wachsende Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-80% erneut passagiert oder für Flussexperimente verwendet. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS mechanisch durch wiederholtes Resuspendieren abgelöst.

3.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde zur Bestimmung des Expressionslevels des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins durchgeführt. Folgendes Schema lag zu Grunde:

Vorbereitend wurden die Zellen von den Petrischalen abgelöst und mit PBS gewaschen (300 g, 4 °C, 4 min). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen. Es folgte die Resuspendierung der Zellen in 50 µl PBS sowie die Verteilung in verschiedene Falcon Tubes.

Die erste Inkubationsphase erfolgte in zwei verschiedenen Tubes mit dem spezifischen Anti-CD41-AK (PM6/248) und mit Anti-γ1 AK (IgG1 kappa) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Für die zweite Inkubationsphase wurden die Zellen nach der Primärantikörper-Inkubation mit 1 ml PBS gewaschen (300 g, 4 °C, 4 min), das Pellet in 50 µl resuspendiert mit 1 µl PE-markiertem Sekundärantikörper inkubiert. Außerdem fügten wir zwei weiteren Teströhrchen Anti-CD61-PE (SZ21), Anti-γ1 (IgG1)-PE zu.

Das Mitführen der Proben mit Anti-γ1 AK (IgG1 kappa) und Anti-γ1 (IgG1)-PE diente der Erfassung der unspezifischen Bindung/Isotypkontrolle. Jeder Antikörper wurde gesättigt verwendet. Nach abgeschlossener Inkubation wurden alle Ansätze mit 1 ml PBS gewaschen (300 g, 4 °C, 4 min), die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert, mit 2% Paraformaldehyd in PBS fixiert und im Durchflusszytometer analysiert.

Um die Zelllinien HPA-1a und HPA-1b vergleichen zu können, mussten beide Linien die gleiche Höhe der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Expression auf der Zelloberfläche zeigen. Unter Zuhilfenahme der *rainbow-calibration-particles*, die unter gleichen Bedingungen wie die HEK-Zellen gemessen wurden, konnte eine Ausgleichsgerade erstellt werden. Die Ausgleichsgerade wurde mit Hilfe von Excel erstellt. Die Funktionsgleichung lässt sich folgendermaßen beschreiben:

$$y = b \times x + a$$

$$b \triangleq \text{Steigung}$$

$$a \triangleq y - \text{Abschnitt}$$

Außerdem wird R^2 berechnet. R^2 dient als Maß für die Stärke der Abweichung. Es wird auch Bestimmtheitsmaß genannt. Der Wert 1 spiegelt das größte Reinheitsmaß wieder. Diese Ausgleichsgeraden (Beispiel siehe Abb. 9) wurden durch vier bis fünf Mittelwerte der Kalibrationspartikel berechnet. Die verschiedenen PE-Mittelwerte der Proben konnten anhand der Ausgleichsgeraden in Fluoreszenz-Äquivalenten (*MEPE-values*) wiedergegeben werden.

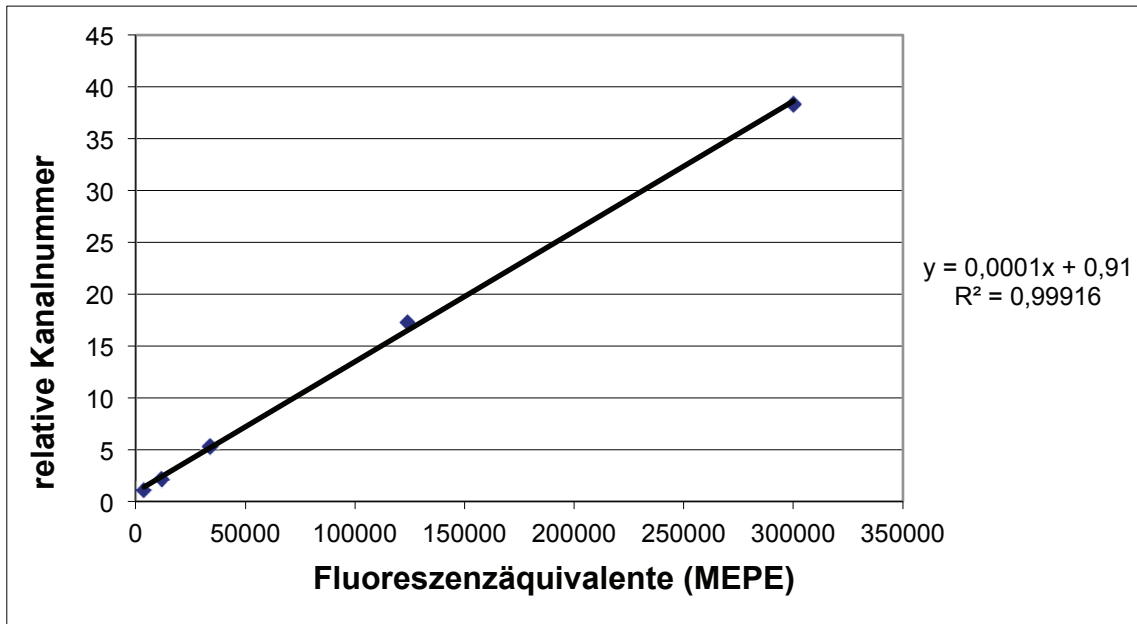


Abb. 9: Ausgleichsgerade mit Kalibrationspartikeln Aufgetragen sind die Fluoreszenz-äquivalente gemessen in *molecule of equivalent phycoerythrin values* (5 unterschiedliche Phycoerythrinpartikelpeaks) gegen die relative Kanalnummer. Der Wert der Kalibrationspartikel-Events bzw. ihrer Mittelwerte wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Das Reinheitsmaß entspricht $R^2=0,999$.

3.2.4 Versuchsaufbau

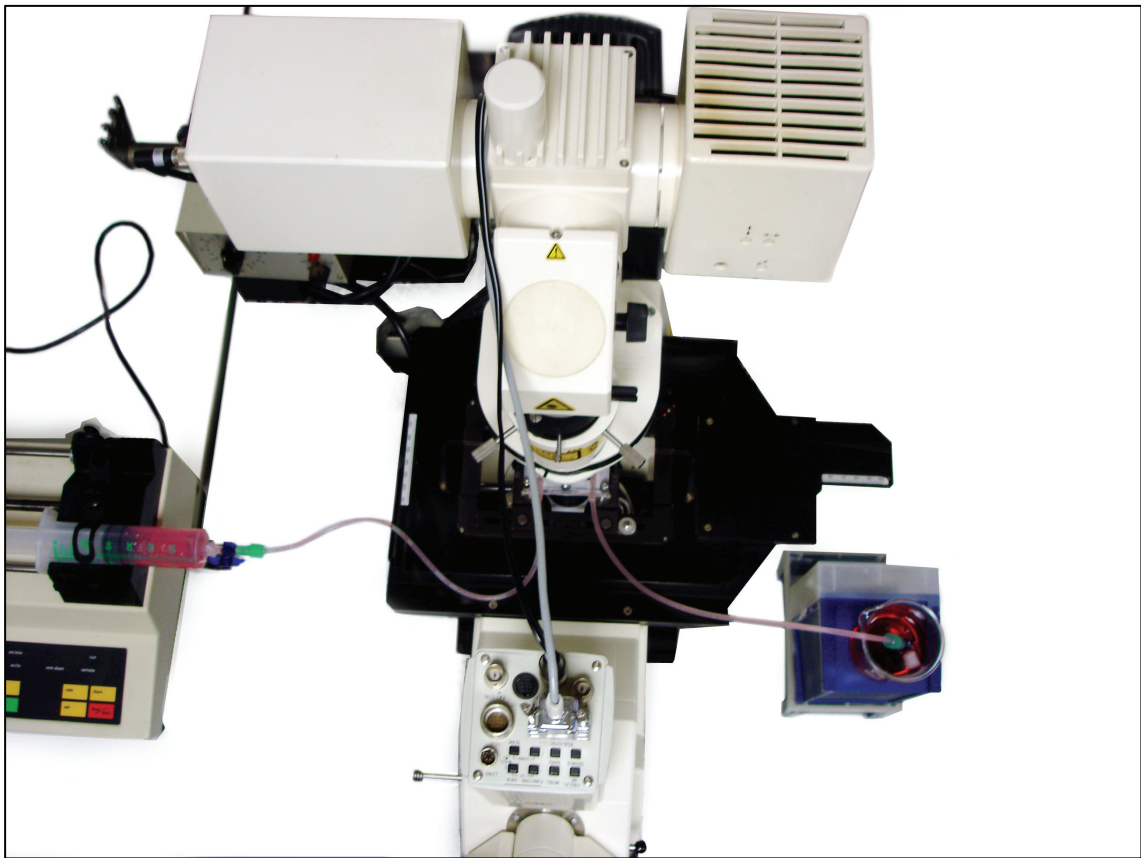


Abb. 10: Übersichtsaufnahme des Aufbaus des Versuchs mit Mikroskop (Mitte), Perfusor (links) und Flusskammer (Mitte)

Der Versuchsaufbau (Abb. 10) beinhaltet verschiedene Elemente. Das Kernstück ist die Flusskammer. Sie wurde mittig unter dem Laser-Scanning-Mikroskop-Axiovert 100M (Zeiss) platziert. Rechter Hand daneben im Bild ist der zuführende Schenkel der Flusskammer zu sehen. Er endet in einem Becherglas, das mit 60 ml Medium (DMEM/F12) gefüllt ist. Dieses diente als Reservoir. Linker Hand im Bild ist der abführende Schenkel der Flusskammer zu sehen. Er ist mit der Havardpumpe, in die eine 50 ml Perfusorspritze eingespannt war, verbunden.

3.2.4.1 Laser-Scanning-Mikroskop-Axiovert 100M (Zeiss)

Das konfokale Mikroskop, das hier verwendet wurde, ist eine Variante des Lichtmikroskops. Es hat als besondere Eigenschaft, dass optische Schnitte eines Präparates beleuchtet und somit erfasst werden. Mit einem Computer können diese zu

einer dreidimensionalen Struktur zusammengefügt werden. Das LSM arbeitet mit Laserlicht. Durch das Laserlicht lassen sich Fluoreszenzfarbstoffe anregen ⁶⁹.

Die Einstellungen für die durchgeführten Versuche wurden im Programm LSM 510 Expert Mode folgendermaßen gewählt:

Laserart	Argonlaser
Vergrößerung	10 fach (Plan-Neofluar 10x0,3 Objektiv)
Laseroutput	75%
Wellenlänge	488nm
Excitation	100%
Durchlichtkanal und Fluoreszenzkanal mit Filter	BP 505-550, MBS: HFT 488, DBS1: Mirror
Pinhole	CH 2: 1000 μm
Detector Gain	601
Amplifier Offset	-2
Amplifier Gain	1
Scan-Geschwindigkeit pro Pixel	1,60 μs
Scan-Geschwindigkeit pro Bild	983,04 ms
Stapelscan	4,915 s
Bilder	512 x 512 x 5 Pixel, 8 bit Graustufen, Linienscann, Datentiefe 8 bit
Stack-Size	921,4 μm x 921,4 μm x 7,2 μm
Scaling	1,80 μm x 1,80 μm x 1,80 μm

3.2.4.2 Flusskammer

Die Bestandteile der Flusskammer (Abb. 11) wurden vor jedem Versuch neu zusammengesetzt. In eine Metallträgerplatte wurde an der Oberseite eine Fräsung von (B x L x T) 24 x 50 x 1 mm zur bündigen Einpassung des Deckgläschens vorgenommen, das in diese Fräsung eingelegt wurde. Das Deckgläschen war mit einem immobilisierten Substrat beschichtet. Eine Menge von 230 µl Zellsuspension wurde mit Hilfe eines Silikonnapfes darüber-geschichtet. Der Silikonnapf hatte einen Innendurchmesser von 0,7 x 1,1 cm. Auf das Deckgläschen wurde eine Dichtung (Teflon) mit 0,25 mm Höhe gelegt.

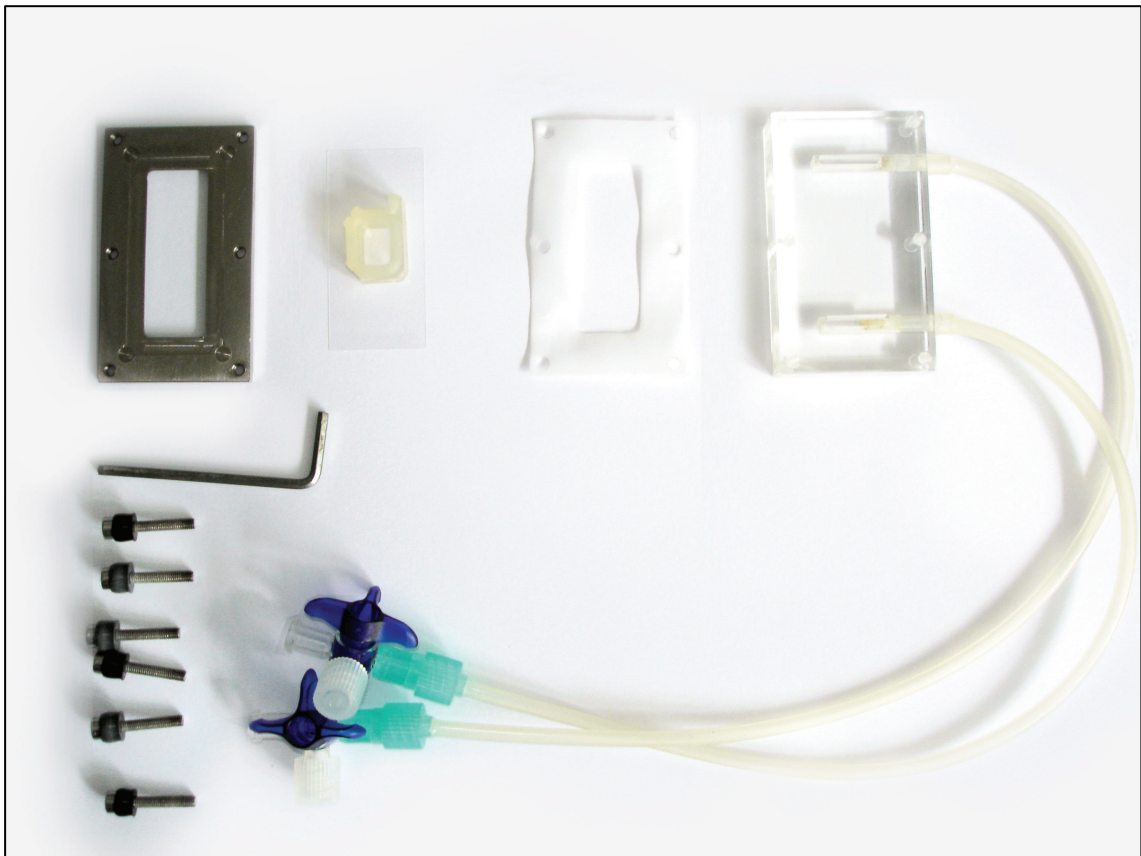


Abb. 11: Bestandteile der Flusskammer: links oben beginnend: Metallträgerplatte, Deckgläschen mit Silikonnapf, Teflon Dichtung, Acrylblock mit Schläuchen sowie 6 Schrauben.

Dadurch wurde die innere Höhe des Strömungsbereiches bestimmt. Zuoberst wurde der Acrylblock der Größe 3,8 x 6,5 cm angebracht (Abb. 12), der die zu- und abführenden Schläuche aus Kunststoff (Länge 28 und 31cm) der Flusskammer beinhaltet. Die Schenkel/Schläuche der Kammer wurden mit Medium (DMEM/F12) gefüllt. So konnte die Kammer über 6 Schrauben luftdicht bzw. blasenfrei verschlossen werden.

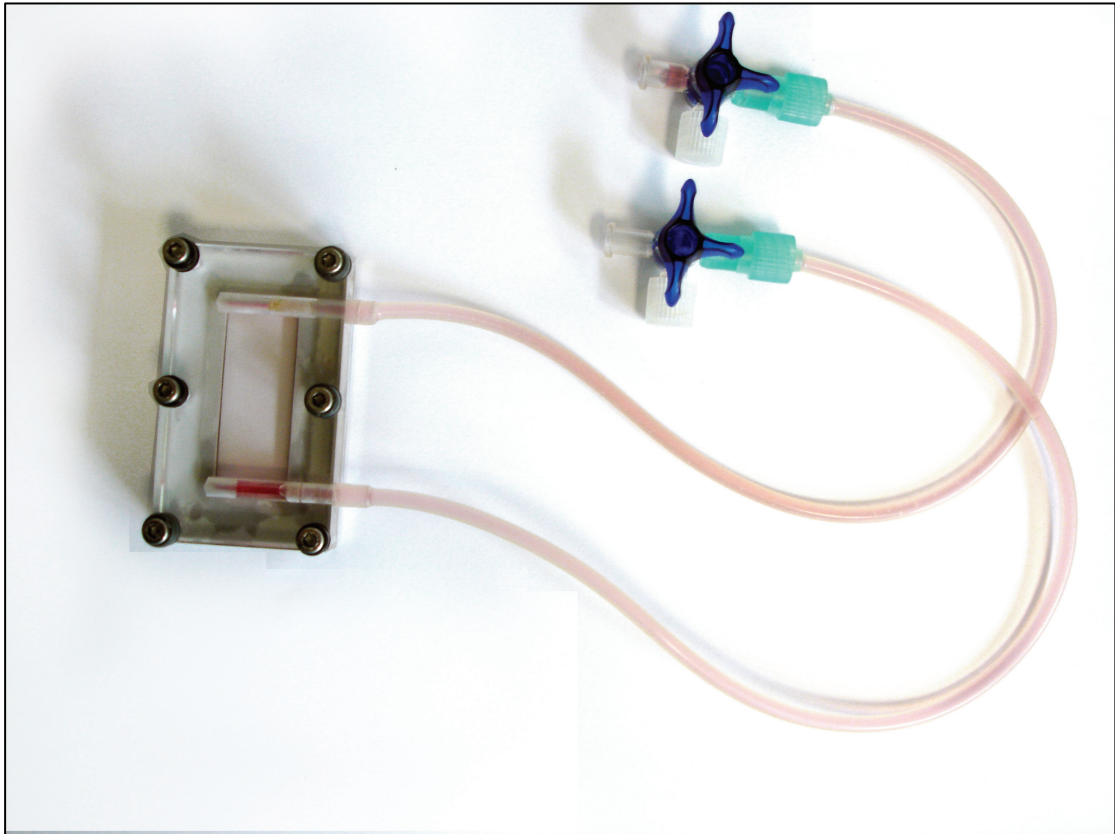


Abb. 12: Zusammengebaute Flusskammer in der Aufsicht

3.2.4.3 Zellzahlbestimmung

Um eine konstante Zellzahl von 300.000 HEK Zellen in der Flusskammer gewährleisten zu können, wurden vor jedem Versuch die Zellen in einer Zellsuspension ausgezählt. Dazu wurden ein Lichtmikroskop und eine Neubauerkammer verwendet. Die Neubauer-Zählkammer wurde mit ca. 20 µl Zellsuspension befüllt. Dies geschah durch Ansetzen der Pipettenspitze an der Kante der Zählkammer, wobei die Suspension durch Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Kammer gesaugt wird. Die verwendete Berechnung ergab sich aus folgender Formel:

$$GZ = \left(\frac{EZ}{4} \right) \times A \times 10^4 \times V$$

GZ = Gesamtzahl

EZ = ermittelte Zellzahl (in 4 großen Quadranten = 62 Kästchen)

A = Verdünnungsfaktor

V = Gesamtvolumen in ml

3.2.4.4 Deckglasbeschichtung

Die in die Flusskammer eingebrachten Deckgläser wurden vorher entweder mit Fibrinogen oder vWF beschichtet. Beide Liganden wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Die Konzentrationen der Liganden wurden in Vorversuchen ermittelt. Dabei wählten wir als höhere Dosierung diejenige aus, bei der bereits eine Ablösung der Zellen sichtbar wurde. Als niedrigere Dosierung wurde diejenige ausgewählt, bei der bei 2000s^{-1} noch Zellen adhären waren. Zur Reinigung der Deckgläser wurden die Oberflächen abgeflammt. Danach wurden die vorher in Ethanol gereinigten Silikonnapfe mittels einer Schablone mittig auf die Deckgläser aufgedrückt. In jeden Napf wurde eine Menge von $250\text{ }\mu\text{l}$ pipettiert. Es folgte eine Inkubation von 60 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 -Sättigung im Brutschrank. Die Proteine adhärten nach diesem Vorgang an der Glasoberfläche. Die Deckgläser wurden mit 1%iger BSA-Puffer-Lösung (in PBS) gespült, um überschüssige Liganden zu entfernen.

3.2.4.5 Havardpumpe



Abb. 13: Übersichtsaufnahme der Havardpumpe mit Perfusorspritze in Aufsicht

Die Havardpumpe (Abb. 13) erlaubte eine genaue Einstellung der Flussgeschwindigkeit. Die Flussgeschwindigkeiten wurden über den Durchmesser (28mm) der 50 ml Luer Lock Perfusorspritze berechnet. Die Geschwindigkeit wurde manuell über das Bedienfeld eingestellt.

3.2.5 Versuchsdurchführung

Die vorbereiteten beschichteten Deckgläser wurden eine Minute mit 230 μ l Zellsuspension im Brutschrank inkubiert und danach in den Metallträger eingelegt. Der Silikonnapf wurde vorsichtig entfernt, so dass die Zellsuspension nicht verlief. Die Dichtung wurde aufgelegt und der mit F12/DMEM-Medium befüllte Acrylblock mit 6 Schrauben blasenfrei verschlossen. Dann wurde die Flusskammer in den Mikroskop-Tisch eingespannt, mit der Havardpumpe und dem Medium-Reservoir verbunden und die Bildebene manuell scharfgestellt. Für diesen Arbeitsschritt blieben vier Minuten. Nach fünf Minuten wurde die Initial-Scherrate von 30 s^{-1} gestartet. So konnten nichtadhärente Zellen weggespült werden. Nach insgesamt sechs Minuten wurde die Bildaufnahme gestartet. Mit Hilfe der Time-Series-Funktion des Programmes Laser Scanning Microscope LSM 510, Version 3.2 SP2 wurden siebenmal alle 60 Sekunden fünf Bilder mit den ansteigenden Scherraten aufgenommen. Die fünf Bilder wurden in unterschiedlichen Positionen der z-Achse aufgenommen. Jeweils kurz vor der Aufnahme wurde die Scherrate gesteigert. Es erfolgte die Messung des YFP-Signals. Nach 13 Minuten war der Versuch beendet. Es folgte der Abbau des Versuchs sowie die Reinigung der verschiedenen Bestandteile mit Aqua dest. und Ethanol.

3.2.5.1 Berechnung der Scherraten

Für die Berechnung der Scherraten wurde folgende Formel verwendet:

$$\gamma = \frac{6 \times Q}{b \times h^2}$$

$$\gamma = \text{Scherrate (s}^{-1}\text{)}$$

$$Q = \text{Flussrate (} \frac{\text{ml}}{\text{s}} \text{)}$$

$$b = \text{Breite der Flusskammer (16 mm)}$$

$$h = \text{Höhe der Flusskammer (Dichtungshöhe 250 } \mu\text{m)}$$

Daraus ergaben sich folgende Scherraten:

Flussrate in (ml/min)	Flussrate in (ml/h)	Scherrate in (s ⁻¹)
	18,75	30
	37,5	60
	75	125
2,5	150	250
5	300	500
10	600	1000
20	1200	2000

Da das Verhältnis $\frac{b}{h} > 20$ war, wurden mehr als 85% der Deckglasoberfläche einer gleichen Scherrate ausgesetzt⁷⁰. Die Scherraten simulierten sowohl venöse (30-500 s⁻¹) als auch arterielle (1000-2000s⁻¹) Strömungsgeschwindigkeiten.

3.2.6 Datenauswertung

3.2.6.1 Bildverarbeitung

Nach Abschluss des Versuchs mussten die Bilder als .png-Dateien gespeichert werden. Danach wurden sie als „raw data series“ auf ein anderes Speichermedium exportiert. Nichtadhärente Zellen, die sich durch die Bildebene bewegten, wurden bei der Bildaufnahme miterfasst. Daher erfolgte eine digitale Subtraktion dieser Zellen, bevor die Analyse der Daten durchgeführt wurde. Dazu wurde die Software ImageJ

(Version 1.39h) verwendet. Diese Software konvertierte die Bilder in Graustufen, verglich die verschiedenen Bildstapel miteinander und subtrahierte jeden sich bewegenden Bildpunkt. Als Ergebnis wurden die noch adhärenen Zellen bei den verschiedenen Scherraten als schwarze Bildpunkte dargestellt. Die Gesamtanzahl der schwarzen Bildpunkte je Scherrate wurde berechnet und zur weiteren Verarbeitung der Daten genutzt.

3.2.6.2 Statistische Auswertung

Je Versuch ergaben sich somit sieben verschiedene Werte, die die noch adhärenen Zellen der verschiedenen Scherraten repräsentierten. Der erste Wert wurde einer Adhäsion von 100% gleichgesetzt. Die folgenden Werte wurden in prozentualer Relation zu diesem ersten Wert gesetzt.

Je Versuchsreihe, die eine bestimmte Konzentration eines immobilisierten Substrates und einen bestimmten HPA-Polymorphismus beinhaltete, wurden fünf bis acht Wiederholungen eines Experimentes durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung je Versuchsreihe wurden berechnet. Die graphische Darstellung des Versuches erfolgte in Excel. Für die Berechnung der statischen Signifikanz wurde das Programm GraphPad QuickCalcs benutzt. Der verwendete Test war ein ungepaarter T-Test. Diesen Test darf man anwenden, wenn erstens die Werte dieser Variablen annähernd einer Normalverteilung folgen und zweitens die Standardabweichungen beider Gruppen etwa gleich groß sind ⁷¹. Beides sahen wir bei unserer Stichprobe als gegeben an. Unter Angabe der Mittelwerte, der Standardabweichung und der Anzahl der Versuche wurde die Signifikanz (p) errechnet. Falls eine Signifikanz $p < 0,05$ vorlag, wurde diese in den Diagrammen mit Sternchen * über den jeweiligen Werten markiert.

4 Ergebnisse

4.1 Fluoreszierende HPA-1 Fusionsproteine

Im folgenden Unterkapitel wird die Quantifizierung der Expression des HPA-1 Fusionsgenes, die Differenzierung der HPA-1 Varianten und die Messung des Fluoreszenzsignals dargestellt. Diese Ergebnisse sind wichtig, um die Adhäsionsversuche richtig interpretieren zu können.

4.1.1 Quantifizierung der Expression des HPA-1 Fusionsgenes

Um die Expressionshöhe des HPA-1 Fusionsgens quantifizieren zu können, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Wie die genaue methodische Untersuchung erfolgte, ist im Material- und Methodenteil beschrieben. Die Höhe des Signals, welches durch den Antikörper CD-41-PE erzeugt wurde, wurde verwendet, um eine genaue Aussage über die Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche treffen zu können (Abb. 14). Da der komplexspezifische anti-CD41-Antikörper (PM6/248) an die α_{IIb} -Untereinheit bindet, konnte auf die komplette Expression des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins auf der Zelloberfläche rückgeschlossen werden⁹. Der Mittelwert der Höhe des anti-CD41-Signals wurde berechnet und mittels der *Rainbow Calibration Particels* in Fluoreszenz-Äquivalente umgerechnet. Mittels der Fluoreszenz-Äquivalente und der PE-Ratio des Anti-Mouse-IgG-PE (2,8) konnte die Rezeptorzahl pro Zelle berechnet werden. Der Unterschied der Rezeptorzahl zwischen beiden Zelllinien war kleiner als 10%. In nachfolgender Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Polymorphismus	HPA-1a	HPA-1b
n= Anzahl	5	3
Fluoreszenzäquivalente	1.565.810	1.456.343
Rezeptorzahl/Zelle	~ 560.000	~ 520.000

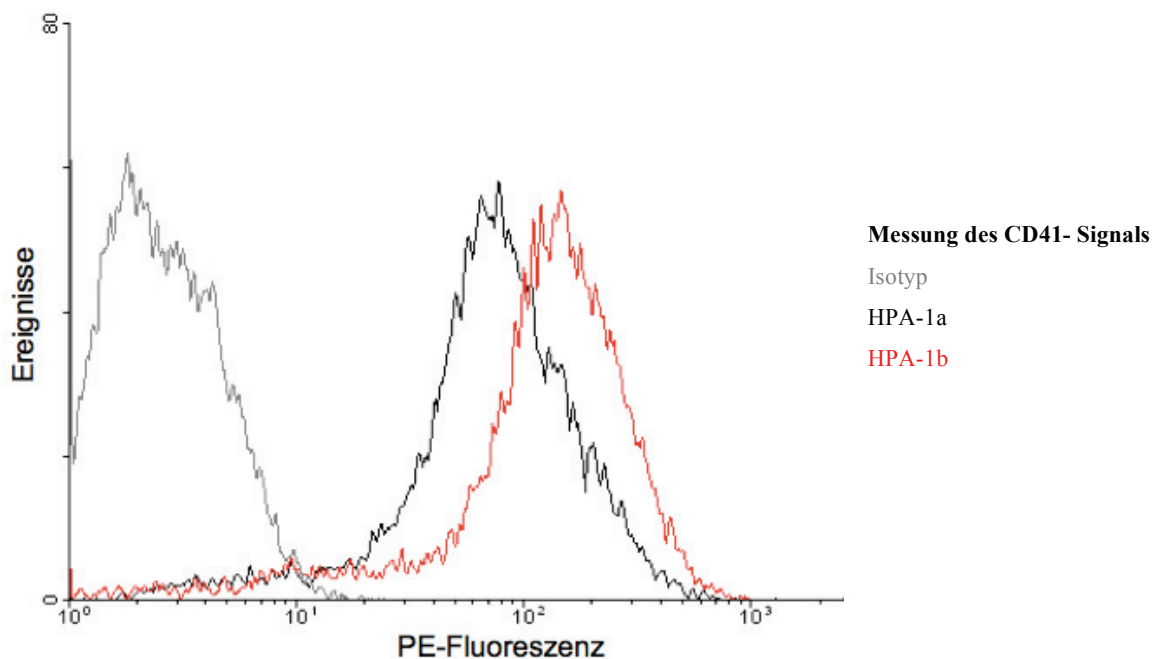


Abb. 14: Quantifizierung der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Expression auf HEK293-Zellen mittels Messung der Höhe des CD41-Signals. Das durchflusszytometrische Diagramm zeigt HPA-1a-(schwarz) und HPA-1b-Zellen (rot), die antiCD41-PE-markiert sind. Die Isotypenkontrolle (grau) wurde mit IgG1-PE inkubierten Zellen durchgeführt.

4.1.2 Differenzierung der HPA-1-Varianten

Der Anti-CD61-Antikörper (SZ21) bindet an die β_3 -Untereinheit von HPA-1a-Zellen mit einer höheren Affinität als HPA-1b-Zellen⁷². Die Anti- γ_1 -Antikörper wurden zur Isotypkontrolle verwendet. In Abb. 15 sind nun die Resultate der durchflusszytometrischen Untersuchungen der jeweiligen Hauptpopulationen zu sehen. Der Isotyp zeigt sich innerhalb der ersten Dekade. Die Hauptpopulationen der HPA-1a und HPA-1b-Variante sind ein spezifisches Signal in der zweiten und dritten Dekade. Im Gegensatz zu Abb. 14 sind die Graphen nicht annähernd kongruent, sondern zwei deutlich voneinander unterscheidbare Kurven mit unterschiedlichen Scheitelpunkten.

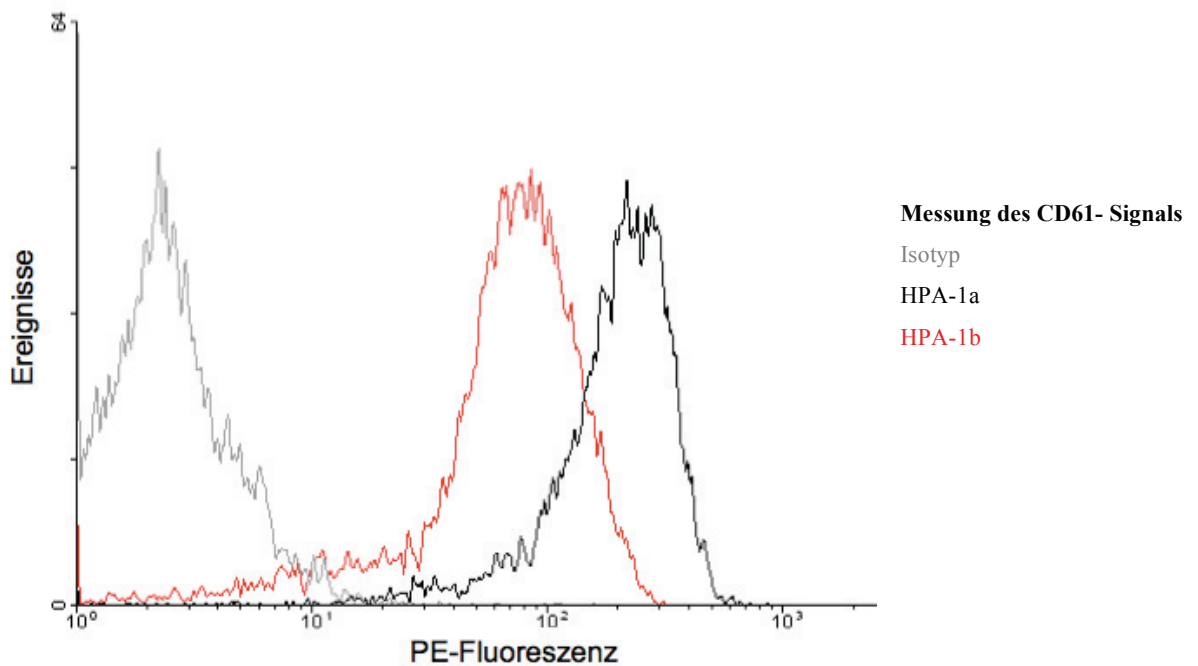


Abb. 15: Charakterisierung der HPA-1 exprimierender HEK293-Zellen. Das durchflusszytometrische Diagramm zeigt HPA-1a- (schwarz) und HPA1-b-Zellen (rot), die CD61-PE markiert sind. Die Isotypenkontrolle (grau) wurde mit IgG1-PE inkubierten Zellen durchgeführt.

4.1.3 Messung des Fluoreszenzsignals der doppelt-transfektionierten HEK293-Zellen

Mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) -Analysen wurde bestimmt, ob das Integrin mit den Bestandteilen $\beta 3$ und dem Fluorophor YFP und α_{IIb} mit dem Fluorophor CFP membranständig exprimiert wurde. Dazu wurden die Zellen im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop mit einer Wellenlänge von 458 nm angeregt und auf blaue und gelbe Fluoreszenz untersucht. In Abb. 16 kann man sehen, dass die dargestellten Zellen sowohl blaue (485 nm) als auch gelbe (538 nm) Fluoreszenz emittieren. Die Fluoreszenz ist in der Zellmembran stärker sichtbar als im Zytoplasma. Dies weist darauf hin, dass der Rezeptor membranständig vorliegt. Die Emissionen der beiden Wellenlängen sind deckungsgleich⁷³.

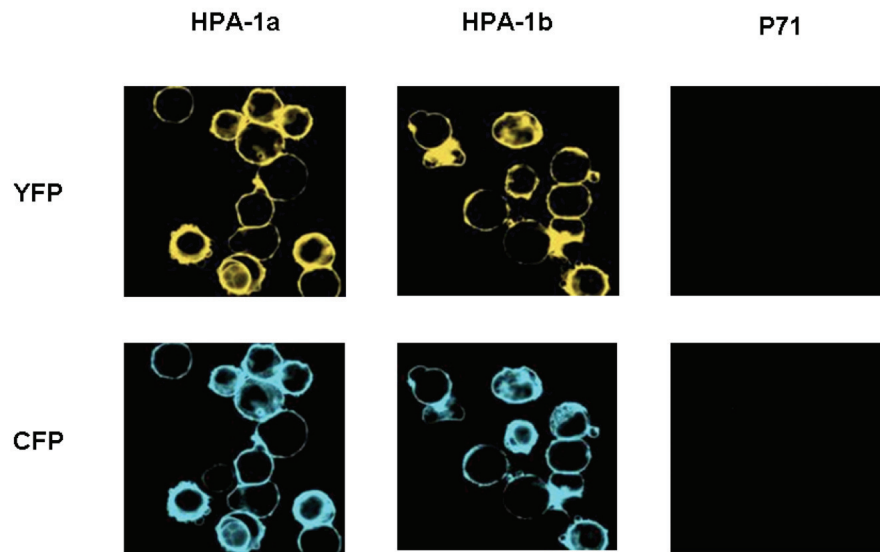


Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen doppelt-transfektierte HEK293-Zellen mit dem konfokalen LSM Das Signal YFP wurde durch emittiertes Licht der Wellenlänge 538nm und CFP durch Licht der Wellenlänge 485nm gemessen. Vergrößerung 40-fach. Aus El-Khattouti, 2011.⁷³

Spezifität wurde durch Messung der Zellen gezeigt, die allein mit p71 transfektiert waren. Sie zeigten keine Emission.

4.2 „Displacement“-Versuche der HPA-1-Varianten in der Flusskammer

4.2.1 Kontrollversuche

Die Spezifität der HPA-1-Ligandenbindung konnte einerseits durch BSA1% und andererseits mit Abciximab (4 $\mu\text{g/ml}$) gezeigt werden. Dazu wurde 1% BSA anstelle der immobilisierten Substrate zur Beschichtung der Deckgläser verwendet. Es lässt sich zeigen, dass kaum bzw. spätestens nach zweimaliger Steigerung der Scherraten keine Zellen mehr nachweisbar waren (Abb. 17).

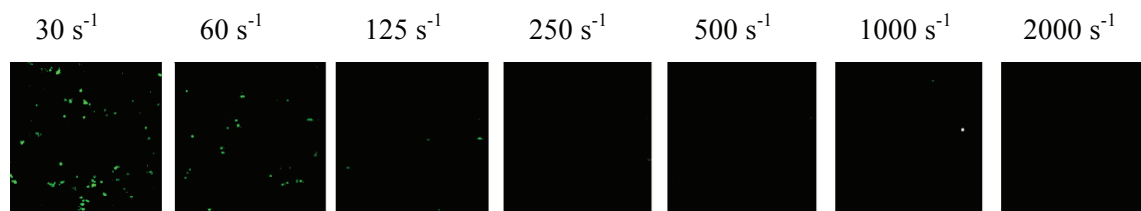


Abb. 17: Kontrollversuch mit 1% BSA Beschichtung des Deckglases Vergrößerung 10-fach.

Außerdem wurde eine kompetitive Hemmung des $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Integrins mit Abciximab 4 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Auch hier zeigten sich lediglich bei geringen Scherraten wenige Zellen im konfokalen LSM. Nach Steigerung der Scherrate auf 125 s⁻¹ waren keine Zellen mehr nachweisbar (Abb. 18).

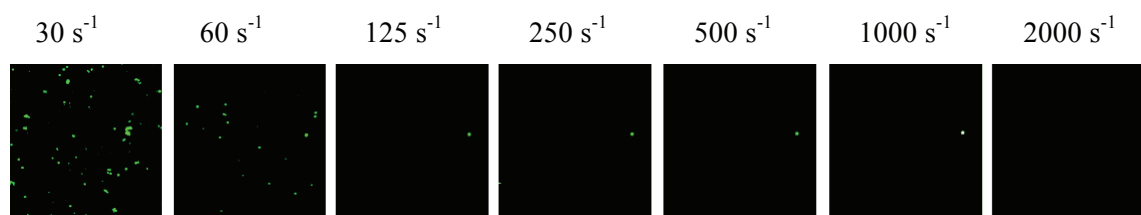


Abb. 18: Kontrollversuch mit Blockade des $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Integrins mit Abciximab 4 $\mu\text{g/ml}$ Vergrößerung 10-fach.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Kontrollversuche erfolgreich die Zelladhäsion verhindern konnten. Somit konnten wir beweisen, dass die Ergebnisse der nachfolgend aufgeführten Experimente nur durch eine spezifische Bindung zwischen immobilisiertem Liganden und dem $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Integrin als Rezeptor erzielt wurden.

4.2.2 Konzentration der immobilisierten Liganden

4.2.2.1 Qualität der vWF-Produkte

Die Masse der wichtigsten Bestandteile, die bei der Beurteilung der SDS-PAGE von Bedeutung waren, sind vWF (220 kDa) nach Reduzierung der Disulfidbrücken, Faktor VIII (265 kDa) und Human-Albumin (66 kDa). In Abbildung 19 a ist in der Höhe von 65-70 kDa eine intensive Färbung zu erkennen. Dieser Bande konnte humanes Albumin zugeordnet werden. Da diese Bande in Abbildung 19 b nicht zu sehen ist, kann geschlussfolgert werden, dass das humane Albumin im Produkt Haemate® der Grund für die geringe Adhäsion im Flussextperiment sein könnte. Die Färbungen im Bereich von 250 kDa stellen vWF und Faktor VIII dar.

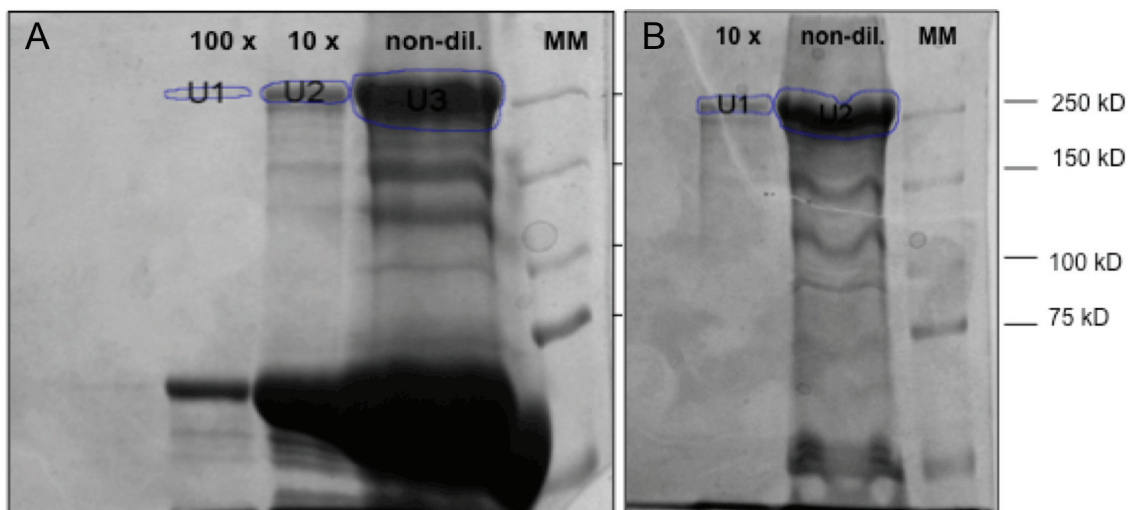


Abb. 19 a und b: A Haemate und B Wilate auf 6% SDS-Page Von rechts nach links sind jeweils aufsteigende Verdünnungen der Präparate aufgetragen. Non-dil. steht für nicht verdünnt. MM ist der Molekulare Gewichtsmarker. Am rechten Bildrand sind 4 Banden des MMs mit ihrer Größe in kD (kilo Dalton) angegeben. **(durchgeführt von M. Gyenes)**

Die Messung der verschiedenen Banden, in Abb. 19 a und b mit U1-U3 dargestellt, ergab die im Imager (BioRad) in Abb. 20 illustrierten Ergebnisse.

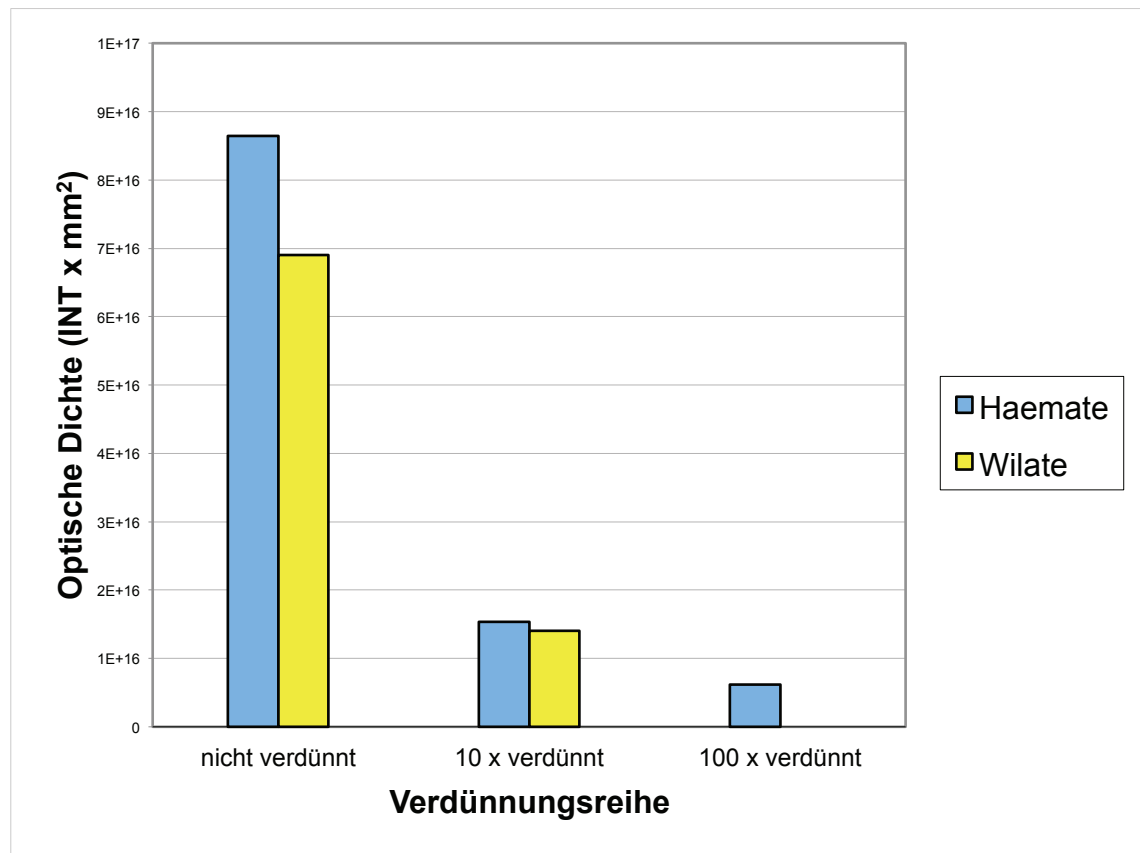


Abb. 20: Quantifizierung der vWF-Präparate mittels Gelelektrophorese Es sind drei verschiedene Verdünnungen dargestellt. Gemessen wird die optische Dichte. Diese wird in Intensität (INT), multipliziert mit der Oberfläche (U1-3) der jeweiligen Bande (mm²), angegeben.

Die Messung durch das Gerät Imager der Firma BioRad erfolgte mit Hilfe eines Transilluminators. Es wurde in jeder SDS-PAGE eine Fläche (INT x mm²) ausgewählt, die von dem Transilluminator mit der passenden Lichtquelle bezüglich ihrer optischen Dichte gemessen wurde. In Abb. 19a und b sind diese Flächen mit U1-3 gekennzeichnet. In Abb. 20 ist an der Höhe der jeweiligen Balken zu erkennen, dass die Konzentrationen des Gemisches aus Faktor VIII und vWF in beiden Produkten vergleichbar sind.

4.2.2.2 Beschreibung der Konzentration von vWF

Es wurde festgelegt, die Ristocetin-Kofaktor-Aktivität (vWF:RCo) des vWF als Vergleichsgröße heranzuziehen. Der Test beruht auf der Tatsache, dass Ristocetin Thrombozyten vWF-konzentrationsabhängig agglutiniert. Dazu werden gewaschene Thrombozyten mit unterschiedlichen Verdünnungen von Wilate inkubiert ^{74,75}. Die Ristocetin-Kofaktor-Aktivität wurde mit der Agglutinationsmethode mittels

Aggregometer gemessen. Dazu wurde BC vWF Reagent verwendet. Die entsprechenden Werte der vWF-Antigenkonzentrationen und der Verdünnungsverhältnisse von Wilate sind in der nachfolgenden Übersicht dargestellt.

Verdünnungsverhältnis von Wilate	vWF:RCo	vWF-Antigen
1:60	50%	138%
1:120	100%	275%

4.2.3 Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von dem HPA-1-Polymorphismus

Um das Adhäsionsverhalten der HPA-1-Varianten des Integrinrezeptors auf den Substraten Fg und vWF zu untersuchen, führten wir acht verschiedene Experimente durch. Dabei wurde die Dosierung der zwei immobilisierten Liganden variiert. Jeder Versuch wurde sowohl mit HPA-1a- als auch HPA-1b-positiven Zellen durchgeführt.

4.2.3.1 Fibrinogen

Wie in Abbildung 21 zu sehen, zeigt sich auf immobilisierten Fibrinogen 50 µg/ml bei venösen Scherraten ($30 - 500 \text{ s}^{-1}$) kein signifikanter Unterschied zwischen dem Verhalten der HPA-1a- und der HPA-1b-Variante. Indem wir die Scherraten bis hin zu arteriellen Bedingungen ($1000 - 2000 \text{ s}^{-1}$) steigerten, konnten wir signifikante Unterschiede nachweisen. Bei einer Scherrate von 2000 s^{-1} waren bei der HPA-1b-Variante $86,75 \pm 7,8\%$ (Mittelwert $\pm$ SD) adhärent. Die HPA-1a-Variante hingegen wies einen Anteil von $61,49 \pm 15,31\%$ adhärenter Zellen auf.

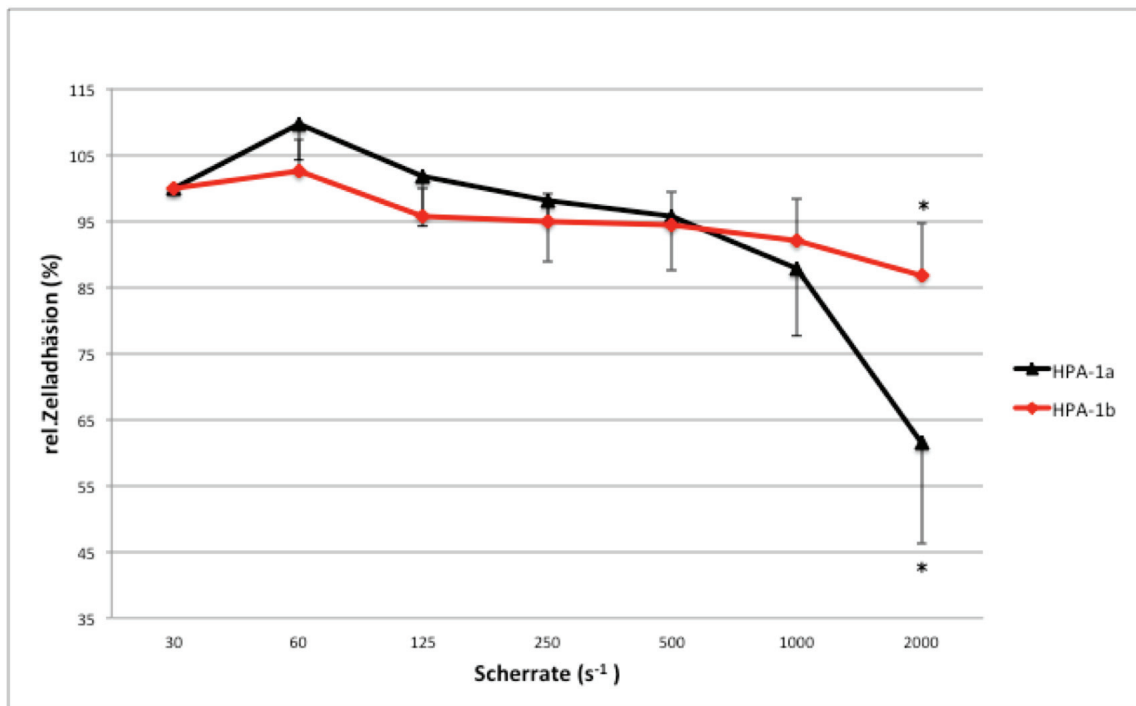


Abb. 21: Adhäsionsversuche mit transfektierten HEK-Zellen auf immobilisiertem Fibrinogen 50 µg/ml, HPA-1a n=8, HPA-1b n=6, * = p<0,05

In Abb. 22 ist der immobilisierte Ligand in seiner Dosierung auf 100 µg/ml verdoppelt worden. Die Menge der noch adhärenen Zellen ist sowohl unter venösen als auch unter arteriellen Bedingungen vergleichbar mit denen bei einer Dosierung von 50 µg/ml.

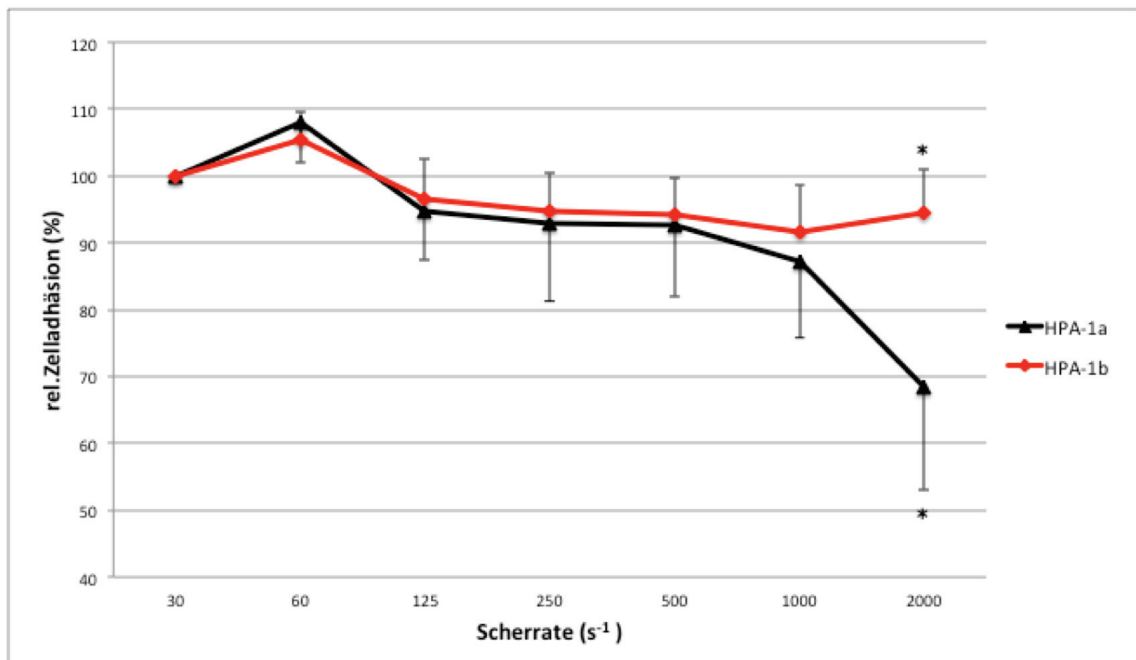


Abb. 22: Adhäsionsversuche mit transfektierten HEK-Zellen auf immobilisiertem Fibrinogen 100 µg/ml, HPA-1a n=6, HPA-1b n=7, * = p<0,05

4.2.3.2 vWF

Die Experimente, die auf dem immobilisierten Substrat vWF durchgeführt wurden, wiesen zwei wesentliche Unterschiede auf (Abb. 23). Erstens konnte eine stark veränderte Adhäsionskinetik beobachtet werden. Die Kinetik stellt sich als fast lineare Abnahme der Adhäsion bei steigenden Scherraten dar. Im Gegensatz dazu steht das Ergebnis mit Fibrinogen, welches eine nahezu gleichbleibende Anzahl adhärenter Zellen bei Scherraten bis 1000 s^{-1} ergibt. Zweitens zeigt sich unerwarteterweise eine signifikant stärkere Adhäsion der HPA-1a Zellen. Im starken Kontrast dazu steht die signifikant schwächere Adhäsion der HPA-1a Zellen auf dem immobilisierten Substrat Fibrinogen. Bereits ab Scherraten von 60 s^{-1} konnten signifikante Unterschiede in der Zelladhäsion nachgewiesen werden. Es verblieben bei 2000 s^{-1} $42,51 \pm 13,3$ HPA-1a-Varianten und $25,23 \pm 8,47$ HPA-1b-Varianten adhären.

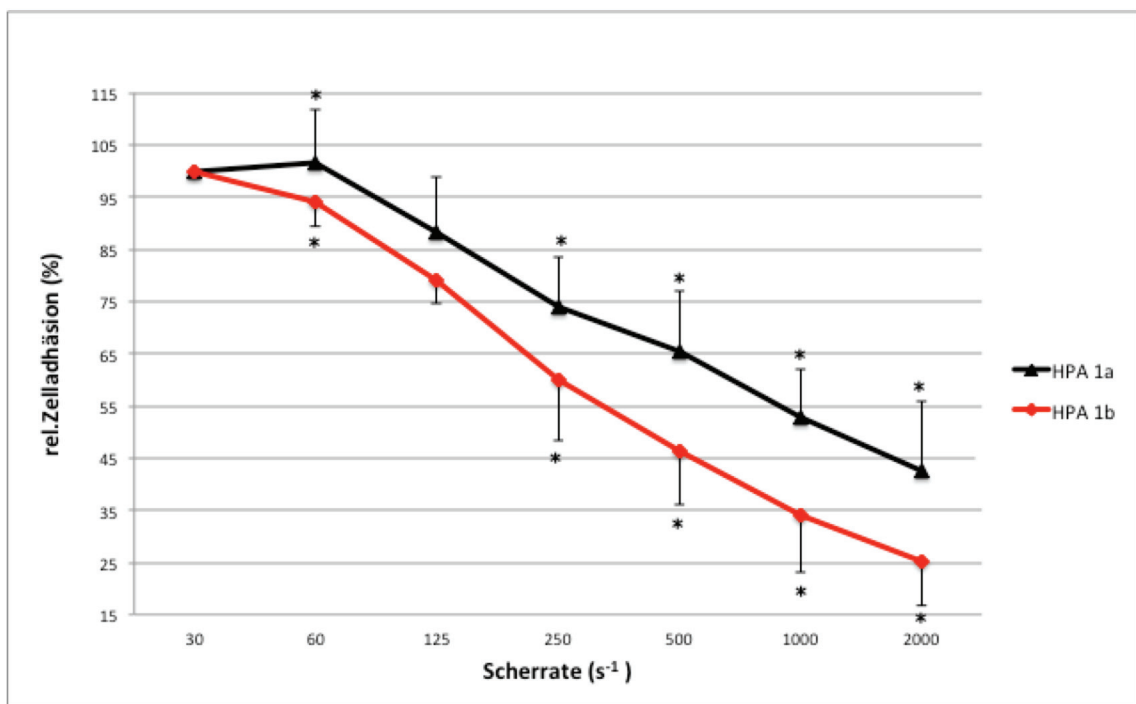


Abb. 23: Adhäsionsversuche mit transfektierten HEK-Zellen auf immobilisiertem vWF in der Konzentration vWF:Rco 50%, HPA-1a n=6, HPA-1b n=6, * = $p < 0,05$

Die Ergebnisse mit verdoppelter vWF-Aktivität von vWF:Rco 100% (Abb. 24) weisen sehr große Ähnlichkeiten auf. Sowohl die lineare Adhäsionskinetik als auch die stärkere Adhärenz von HPA-1a lassen sich durch die Experimente wiederholen. Es liegt somit eine Bestätigung der vorher beschriebenen Ergebnisse vor (Abb. 23). Die HPA-1a-

Variante weist bei 2000 s^{-1} einen Anteil von $45,22 \pm 8,88$ und die HPA-1b-Variante einen Anteil von $32,08 \pm 5,11$ verbleibenden Zellen auf.

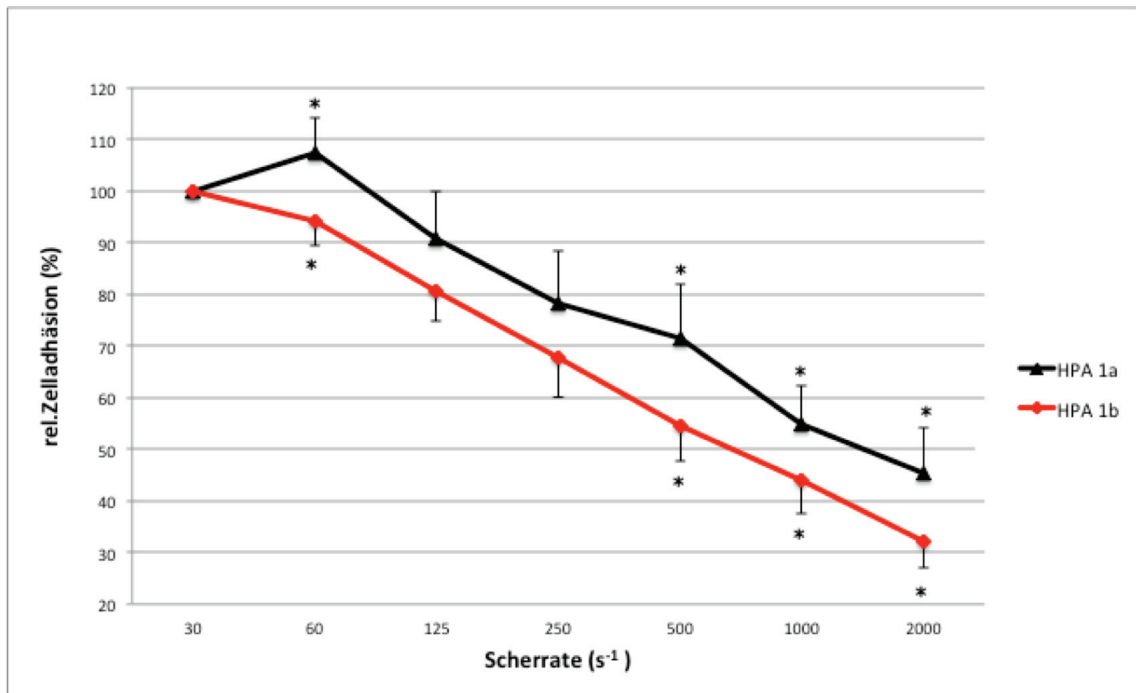


Abb. 24: Adhäsionsversuche mit transfektierten HEK-Zellen auf immobilisiertem vWF in der Konzentration vWF:Rco 100%, HPA-1a n=5, HPA-1b n=6, * = $p < 0,05$

Es lässt sich also beobachten, dass HPA-1a auf immobilisiertem vWF sowohl in der Dosierung vWF:Rco 100% als auch mit vWF:Rco 50% signifikant adhärenter als HPA-1b ist. Das ist eine überraschende Beobachtung, die im Teil Diskussion noch näher beleuchtet wird.

4.2.4 Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von der Art des immobilisierten Liganden

In der Durchführung der Versuche konnte gezeigt werden, dass im konfokalen LSM ein deutlicher Unterschied in der Menge der adhärierenden Zellen je nach Ligand zu beobachten war. Auf vWF war ein deutlich geringerer Anteil an Zellen sichtbar. Die beiden Abbildungen 25 und 26 zeigen den optischen Unterschied. Es wurde jeweils die HPA-1a-Variante verwendet. Abbildung 26 hat vWF als immobilisiertes Substrat in der Dosierung vWF:RCo 100% zur Grundlage. In Abb. 27 wurde Fibrinogen $50\text{ }\mu\text{g/ml}$

verwendet. Hier nun zur Verdeutlichung der Unterschiede jeweils unterhalb des Bildes die passende Darstellung der Total Area (gezählte Pixel (px)/Bildpunkte):

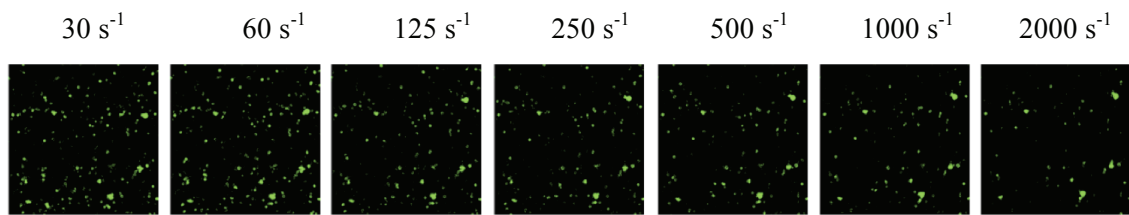


Abb. 25: HPA-1a auf vWF:RCo 100% (Versuch 110222-06) Vergrößerung 10-fach

11999px	12541px	9370px	7909px	7730px	6729px	4910px
---------	---------	--------	--------	--------	--------	--------

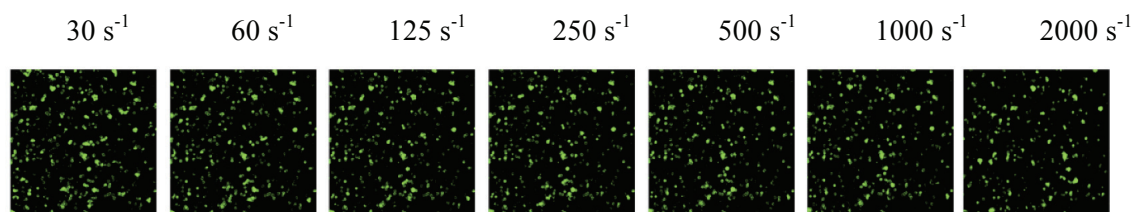


Abb. 26: HPA-1a auf Fibrinogen 50 µg/ml (Versuch 110217-02) Vergrößerung 10-fach

24562px	25368px	23864px	24127px	23304px	22001px	21977px
---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

Auf vWF blieben je nach Scherrate 48,85% bis 22,7% der Menge an Zellen, die auf Fibrinogen haften. Dieser Unterschied fällt in den sonstigen Graphiken nicht auf, da jeweils mit Adhäsion in Prozenten gerechnet wurde.

4.2.5 Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von der Konzentration des immobilisierten Liganden

Ebenso wurde die Frage untersucht, welchen Einfluss die Konzentration der Liganden Fibrinogen und vWF auf die Zelladhäsion hat. Dabei fiel auf, dass die Adhäsionsstabilitätscharakteristika eine große Ähnlichkeit aufzeigen. Der Kurvenverlauf ist bei gleicher HPA-1-Variante und gleichem Substrat fast deckungsgleich. Bei niedrigeren Konzentrationen der immobilisierten Substrate ist die Adhäsionsrate um wenige Prozente reduziert. In Abbildung 27 und 28 kann man dieses beschriebene Verhalten sowohl für die Variante HPA-1a als auch für die Variante HPA-1b erkennen.

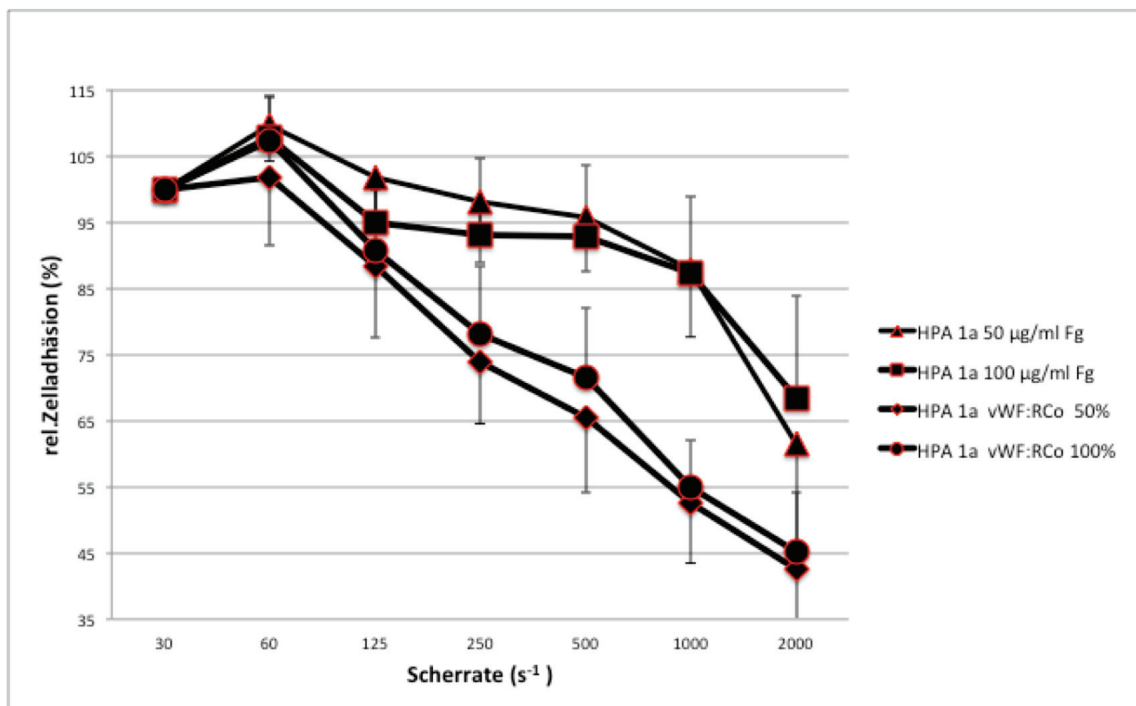


Abb. 27: Adhäsionsversuche mit HPA-1a-Zellen auf immob. Fibrinogen in der Konzentration 50 und 100 µg/ml und auf vWF in der Konzentration vWF:RCo 50% und 100%

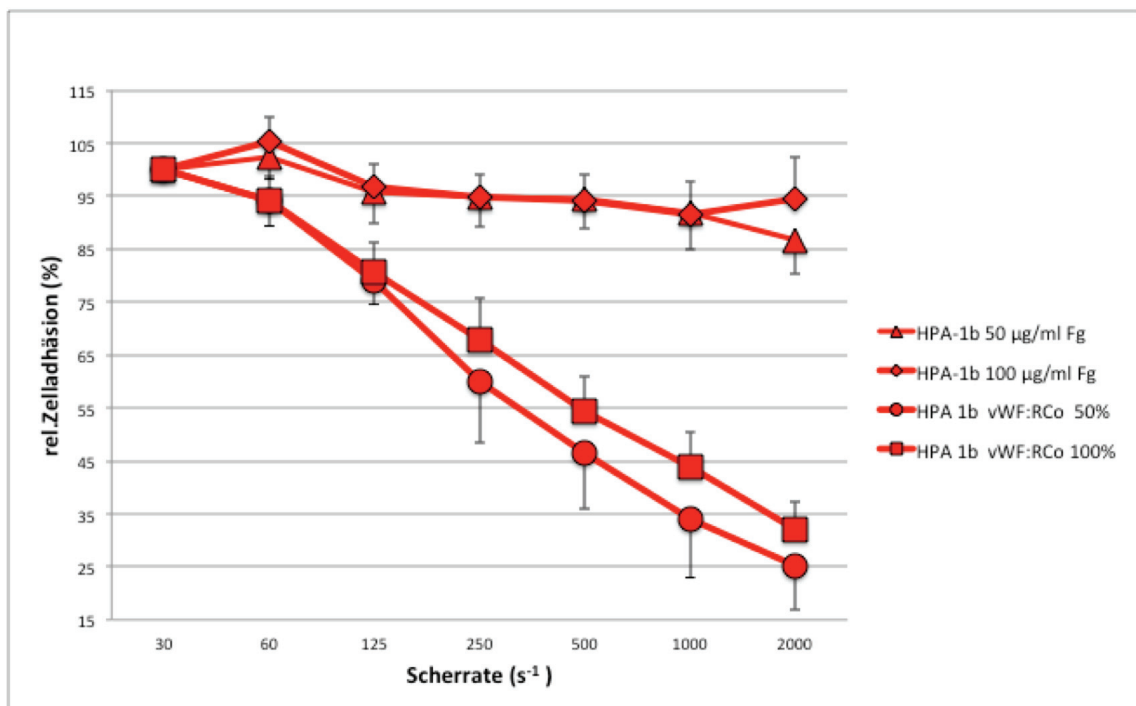


Abb. 28: Adhäsionsversuche mit HPA-1b-Zellen auf immob. Fibrinogen in der Konzentration 50 und 100 µg/ml und auf vWF in der Konzentration vWF:RCo 50 und 100%

Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei verschiedenen Konzentrationen eines Substrates und der jeweiligen HPA-1-Variante nachweisen.

4.2.6 Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von der Höhe der Scherrate

Außerdem wurde die Frage untersucht, welche Bedeutung zunehmende Scherraten für das Adhäsionsverhalten haben. In der Flusskammer wurden Scherraten γ zwischen 30 und 2000 s^{-1} erzeugt. Goldsmith und Turitto beschreiben in ihrem Paper, dass die erzeugten Scherraten γ in Gefäßen von verschiedenen Faktoren abhängen. Dazu zählen die Viskosität des Blutes, der Durchmesser des Gefäßes und das Flussprofil ⁷⁶. Da im menschlichen Körper biologische Materialien unterschiedlicher Art, ein pulsatiler Fluss und Erythrozyten mit einer bikonkaven Form vorliegen, sind die Scherraten γ nur schwer zu bestimmen. Fest steht allerdings, dass die erreichten Scherrate γ in kleinen Gefäßen (Arteriolen) am höchsten sind, da die Scherrate γ eine Funktion des relativen radialen Abstandes ist. Außerdem sind die Scherraten im Niederdrucksystem/venösen System wesentlich niedriger als im Hochdrucksystem/arteriellen System. Scherraten bis 500 s^{-1} wurden als venöse Scherraten festgelegt. Scherraten von 1000 – 2000 s^{-1} wurden als arterielle Bedingungen betrachtet.

Fibrinogen zeigte erst bei 2000 s^{-1} (arterielle Bedingungen) signifikante Unterschiede in der Stabilität der Bindung. Bei vWF hingegen konnten wir bereits ab 250 bzw. 500 s^{-1} (venöse Bedingungen) signifikante Unterschiede zwischen HPA-1a und HPA-1b in der Stabilität der Bindung zeigen.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse kann man in Abb. 29 sehen. Anhand der Darstellung der Daten in einem gepaarten Säulendiagramm lässt sich farblich erkennen, dass die HPA-1a-Variante auf vWF stabil adhären ist im Gegensatz zu der HPA-1b-Variante, welche auf Fibrinogen stabiler adhären ist. Unabhängig von dem HPA-1-Polymorphismus lässt sich zeigen, dass auf vWF scherraten-unabhängige Signifikanz, auf Fibrinogen hingegen scherraten-abhängige Signifikanz erzielt wurde. Anhand der Höhe der Balken bei 500 und 2000 s^{-1} lässt sich eine unterschiedliche Displacementkinetik beschreiben. Es liegen stabilere Verbindungen auf Fibrinogen vor. Die Höhe der Konzentration der Liganden zeigt keinen wesentlichen Einfluss.

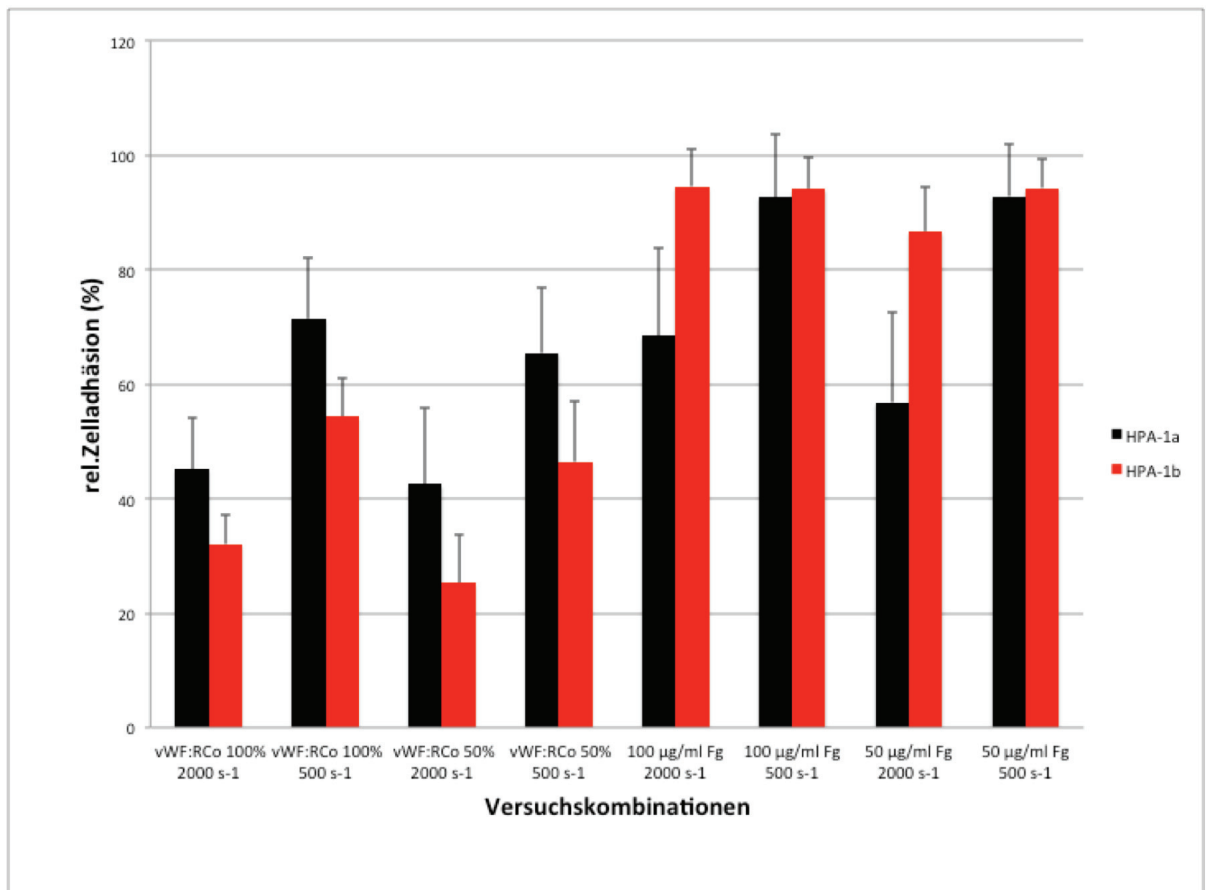


Abb. 29 „Displacement“ der Varianten HPA-1a (schwarz) und HPA-1b (rot) unter venösen und arteriellen Bedingungen auf vWF (vWF:RCo 50% und 100%) und Fibrinogen (50 µg/ml und 100 µg/ml)

5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte experimentell gezeigt werden, dass der HPA-1-Polymorphismus wesentlichen Einfluss auf die Stabilität der Adhäsion $\alpha_{IIb}\beta_3$ -tragender Zellen hat. Dazu wurden flussdynamische Untersuchungen in der Strömungskammer durchgeführt. Die eingesetzten Zellen waren $\alpha_{IIb}\beta_3$ stabil transfektierte HEK293-Zellen, die den HPA-1a und HPA-1b-Polymorphismus trugen. Die Adhäsivproteine Fibrinogen und vWF stellten die immobilisierten Liganden dar. Dazu wurden beschichtete Deckgläser, die mit immobilisierten Liganden in verschiedenen Konzentrationen beschichtet waren, verwendet. Diese Deckgläser wurden in eine rechteckige Flusskammer eingebaut und ansteigenden Scherraten ausgesetzt. Die Stabilität adhärrierender Zellen wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop über die Anregung CFP- und YFP-markierter HEK-Zellen festgehalten. Die Höhe der Rezeptorexpression beider HPA-1-Polymorphismen der $\alpha_{IIb}\beta_3$ transfektierten HEK293-Zellen war vergleichbar. Der Unterschied blieb immer kleiner 10%. Mit der Software ImageJ wurden die Daten ausgewertet. Die im Ergebnisteil dargestellten Daten sollen nun im Folgenden diskutiert werden.

5.1 Expression des HPA-1 Fusionsgenes

Um die verwendeten Zellklone, nämlich die HPA-1a bzw. HPA-1b-Variante des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins, sicher identifizieren zu können und sicherzustellen, dass sie die gleiche Anzahl an Rezeptoren auf der Zelloberfläche aufweisen, führten wir durchflusszytometrische Analysen durch.

Da der anti-CD61 Antikörper (SZ21) an die β_3 -Untereinheit von HPA-1a-Zellen mit einer höheren Affinität als HPA-1b-Zellen bindet, waren die HPA-1a- und HPA-1b-Zellen (Abb. 15) eindeutig voneinander differenzierbar⁷².

Mit dem Ziel, eine sichere Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den jeweiligen HPA-1-Varianten sicherstellen zu können, wurde die Expression der Rezeptoren mittels anti-CD41 untersucht. CD41 ist ein Antikörper gegen die α_{IIb} -Untereinheit. Unter Kapitel 4.1.1 sind die Ergebnisse der Messung zu sehen. Eine Abweichung kleiner 10% zwischen den Varianten konnte darlegt werden.

5.2 Adhäsionsstabilität

In dem gewählten Versuchsaufbau, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, wird in erster Linie die Stabilität der Bindung zwischen den unterschiedlichen immobilisierten Liganden und dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ getestet. Diese Widerstandsfähigkeit der Bindung wurde in Abhängigkeit von stufenweise gesteigerten flussdynamischen Bedingungen untersucht. Man bezeichnet diese Experimente als „Displacement“-Versuch. Zu Beginn der Hämostase wird die Adhäsion zur Zellwand, sogenanntes Tethering, vor allem über den GP 1b-IX-V Rezeptor gesteuert. Das Tethering wurde nicht untersucht, sondern es wurde die Interaktion zwischen Liganden und dem $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin beleuchtet. Sie ist in der Hämostase in erster Linie für die Adhäsion und die Stabilisierung des Thrombus wichtig. Ein besonderes Augenmerk legen wir auf die Effekte der Mechanotransduktion.

5.2.1 Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von HPA-1 Polymorphismus

Auch Vijayan und Bray fanden verschiedene wichtige Fakten über den Pro33/ HPA-1b Polymorphismus. Sie beschrieben, dass der Phänotyp prothrombotisch ist und mit einem stärkeren *Outside-in-Signaling* verbunden ist. Diese Ergebnisse werden durch andere Flusskammerstudien bestärkt ^{55,65,77,78}. Durch zytoskelettale Änderungen und „postactivation events“ sind die Plättchen-Plättchen-Interaktion oder die Interaktion mit der Extrazellulärmatrix verstärkt. Diese Untersuchungen wurden wie in anderen Studien mit dem wichtigsten Substrat des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins Fibrinogen durchgeführt ⁴. Die systematische Untersuchung eines anderen wichtigen Substrates, nämlich vWF, ist bisher kaum durchgeführt worden. Z.M. Ruggeri schreibt, dass die Bezeichnung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins als Fibrinogenrezeptor eine fehlleitender Begriff ist, der zu der falschen Annahme führt, dass Fibrinogen für $\alpha_{IIb}\beta_3$ der einzig wichtige Ligand ist ⁷⁹. 1999 beschrieben Ruggeri et al. bereits, dass vWF gerade bei hohen Scherraten eine wichtige Rolle spielt ⁸⁰. Allerdings sind die Thrombusaggregate in alleiniger Anwesenheit von vWF instabil. Es sind wenige Untersuchungen bezüglich der unterschiedlichen HPA-Polymorphismen und der Interaktion zwischen dem $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin und vWF in der Literatur vorhanden. Allerdings liegen Daten über transfektierte CHO-Zellen vor, die bei Scherraten zwischen 25 s^{-1} und 125 s^{-1} , also nur bei niedrigsten Scherraten,

signifikant stärkere Adhäsion der HPA-1b-Zellen zeigen. Die Versuche wurden in einer Flusskammer mit Deckgläschen durchgeführt, die mit 100% der normalen Plasma-vWF-Konzentration beschichtet waren⁷⁸. In der von uns verwendeten Flusskammer untersuchten wir weitaus höhere Scherraten.

5.2.1.1 Fibrinogen

Die vier Versuchsreihen mit den Fibrinogen-Dosierungen 50 µg/ml und 100 µg/ml und jeweils beiden HPA-1-Polymorphismen bestätigen die in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse. Unter arteriellen Bedingungen (1000 – 2000 s⁻¹) konnten wir sowohl mit Fibrinogen 50 µg/ml als auch mit Fibrinogen 100 µg/ml signifikante Unterschiede zwischen den Leu33Pro-Varianten nachweisen.

Dabei ist die HPA-1b-Variante deutlich stabiler im Adhäsionsverhalten und zeigt kaum oder nur geringen Abriss. Das prothrombotische Verhalten auf Fibrinogen, in den Abb. 22 und 23 zu sehen, ist klar erkennbar^{4,55,65,81}. Die Ergebnisse sind deckungsgleich mit den klinisch epidemiologischen Studien, die eine Verbindung von Pro33-Polymorphismus und arterieller aber nicht venöser Thrombose feststellen konnten^{82–85}.

5.2.1.2 vWF

Die Ergebnisse mit dem Substrat vWF in der Dosierung vWF:RCo 100% und 50% sind überraschend und nicht mit den Beobachtungen auf Fibrinogen vergleichbar. Die Leu33Pro-Variante zeigte ein entgegengesetztes Verhalten im Vergleich zu Fibrinogen. In Abb. 24 und 25 konnte bereits ab Scherraten von 60 s⁻¹ in beiden Dosierungen von vWF eine signifikant stärkere Adhäsionsstabilität der HPA-1a-Variante nachgewiesen werden. Außerdem entsprach die Adhäsionsstabilitätskinetik einer linearen Abnahme.

Es könnten vier verschiedene Ursachen dieses Verhalten bedingen:

Erstens ist es essentiell wichtig zu beachten, dass die Substrate vWF und Fibrinogen unterschiedliche Bindungsplätze für das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ aufweisen. Wie unter 1.1.1 und 1.1.2 bereits genauer erläutert, dienen im Fibrinogenmolekül (340 kDa) vier RGD-Sequenzen und zwei KQAGDV-Sequenzen als mögliche Bindungspartner. Die zwei KQAGDV-Sequenzen werden von der GPIIb(α_{IIb})-Untereinheit gebunden. Sie spielen die wichtigste Rolle in der Interaktion mit $\alpha_{IIb}\beta_3$ ^{23–26}. vWF hingegen weist je Monomer eine RGD-Sequenz in der C1-Domäne auf. Ein vWF-Molekül kann bis zu 800x10⁶ Da

schwer und bis zu einem Millimeter lang sein. Demzufolge liegen in einem vWF-Polymer repetitiv viele RGD-Domänen vor. Sie werden im Gegensatz zu der KQAGDV-Domäne des Fibrinogenmoleküls von der GPIIIa (β_3)-Untereinheit gebunden^{27,38,39}. Allerdings ist zu beachten, dass Fibronectin (440 kDa) auch nur über zwei RGD-Sequenzen gebunden wird. Bei dem gleichen Versuchsaufbau wie unter 3.2 beschrieben, stellte B. Chahem (Doktorand/ bisher unveröffentlichte Daten des IHTM) allerdings ebenso wie auf Fibrinogen eine stärkere Adhäsionsstabilität von HPA-1b fest. Interessant ist noch zu bemerken, dass die HPA-1a-Variante auf Fibronectin eine ähnliche Adhäsionsstabilitätskinetik wie auf vWF zeigt. Sie entspricht einer linearen Abnahme.

So könnte zweitens die dreidimensionale Struktur des Rezeptors von größerer Bedeutung sein. In Abb. 8 sind die von Xiao et al. nachgewiesenen Konformationen des Rezeptors zu sehen. Unter c sieht man die hochaffine, gestreckte Form des Kopfteiles. Das Kopfteil besteht aus der β_1 -Hybridomäne und der Plexin-Semaphorin-Integrin(PSI)-Domäne. Der Leu33Pro-Polymorphismus ist in der PSI-Domäne des Kopfteils lokalisiert. Xiao et al. erörtern, ob nach Liganden-Bindung durch die starre Form der PSI-Domäne das Auseinanderweichen der α_{IIb} -Untereinheit und der β_3 -Untereinheit stattfinden könnte. Die PSI-Domäne mit dem Pro33-Polymorphismus könnte starrer sein und somit das Auseinanderweichen der Untereinheiten oder die größere Stabilität in der offenen Kopfteil-Konformation nach Liganden-Bindung bedingen. Diese Veränderungen könnten auch das *Outside-In-Signaling* beeinflussen^{48,55}.

Von Interesse ist zusätzlich drittens, dass die HPA1b-Variante im nicht aktivierten Zustand weiter voneinander entfernt stehende Untereinheiten zeigt. El-Khattouti diskutierte, dass HPA-1b in einer grundaktivierten Form vorliegen könnte, da durch die Behandlung mit PMA nur noch eine geringere Aktivierung als bei HPA-1a erzielt werden kann⁷³. Die Mutation in der PSI-Domäne und die mögliche Voraktivierung des HPA-1b-Polymorphismus könnte ein möglicher Erklärungsansatz für die beobachteten Ergebnisse auf vWF sein, da die Modulation der Adhäsionsstabilität durch beide beschriebenen Ansätze veränderbar sein könnte.

Viertens kann man das unterschiedliche *Outside-In-Signaling* der Varianten erörtern. In verschiedenen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass das *Outside-In* und das *Inside-Out-Signaling* der HPA-1-Polymorphismus tragenden Zellen sich je nach Variante unterschiedlich verhält^{8,55,81}. El-Khattouti postuliert, dass HPA-1a ein stärkeres *Inside-*

Out- und HPA-1b ein stärkeres *Outside-In-Signaling* besitzt ⁷³. Diese Erklärungsansätze unterstützen die erzielten Ergebnisse auf Fibrinogen. Es bleibt jedoch offen, warum sich die Adhäsionsstabilität, und damit höchstwahrscheinlich verbunden auch das *Outside-In-Signaling*, im Experiment mit vWF ändert.

5.2.2 Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von der Art des immobilisierten Liganden

In den Aufnahmen des konfokalen Lasermikroskops (Abb. 26 und 27) sind die Unterschiede der adhärenen Zellen mit Angabe der Total Area (gezählte Bildpunkte) zu sehen. Auf dem Substrat vWF sind quantitativ wesentlich weniger Zellen adhären und sie zeigen weniger stabiles Adhäsionsverhalten.

Wenn man diesen Punkt diskutiert, ist es essentiell, die Funktion der Substrate unter physiologischen Bedingungen zu berücksichtigen.

Liu et al. beschrieben, dass Fibrinogen ein absolut notwendiger Ligand für die Adhäsion der Plättchen ist und außerdem das Schlüsselereignis für die Ausbildung einer Thrombusformation auf künstlichen Oberflächen darstellt. Sie erläuterten weiterhin, dass vWF dafür nicht notwendig ist.

Feng et al. untersuchten die Rolle von vWF genauer. Sie ordneten die Rolle des vWFs rezeptorabhängig zu ⁸⁷. vWF bildet mit dem GPIIb α eine sogenannte „*catch-bond*“, deren Dissoziationsrate mit zunehmender Scherrate abnimmt ⁸⁸. Gegenteilig stellt sich die Bindung von vWF mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ dar. Wahrscheinlich lässt sie sich am ehesten als „*slip-bond*“ beschreiben, deren Dissoziationsrate mit zunehmender Scherrate zunimmt. Die Beobachtungen, die zu diesem Ergebnis führen, wurden mit dem nahe verwandten Rezeptor $\alpha_v\beta_3$ und dem Liganden Fibronektin durchgeführt.

Huber et al. erläuterten 1995, dass durch Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie-Studien deutlich geworden ist, dass der Bindungsvorgang des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit Fibrinogen kein monophasischer Vorgang ist. Er besteht vielmehr aus einer schnellen Reaktion mit einem niedrigen Affinitätskomplex und einer langsamen Reaktion mit hohem Affinitätskomplex ⁸⁹.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse stützen die Beobachtung von Liu et al. in dem Punkt, dass stabile Adhäsion der transfektierten HEK-Zellen auf Fibrinogen beschichteten Deckgläsern hergestellt werden kann. Erst bei hohen Scherraten (2000 s⁻¹)

kam es zu vermehrtem Abriss. Allerdings kann mit dem Substrat vWF allein auch eine stabile Adhäsion erzeugt werden.

Aufgrund unserer Untersuchung erscheint die Möglichkeit der Ausbildung einer „*slip-bond*“ mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ wahrscheinlich. In den Abbildungen 24/25/26 ist mit zunehmender Scherrate ein steigender Abriss adhärenter Zellen zu sehen. Auch kann man durch die geringere Anzahl an Pixelpunkten (Total Area) spekulieren, dass die vermittelte Adhäsion weniger stabil ist, als die mit Fibrinogen. Man muss aber beachten, dass die eingesetzten Mengen an Liganden nur schwer zu vergleichen sind. Fibrinogen haben wir in Protein pro ml und vWF in Aktivität gemessen. Außerdem hat Fibrinogen sechs verschiedene mögliche Bindungsplätze, vWF je Monomer einen Bindungsplatz, je Polymer aber wesentlich mehr als sechs. Die Zugänglichkeit der Bindungsstellen für den Rezeptor ist zusätzlich von der Konformation der Substrate abhängig.

Die von Huber beschriebene Reaktionskinetik des Integrins mit den Liganden spielt möglicherweise auch eine wichtige Rolle. Es müssten weitere Studien angeschlossen werden, um einen Zusammenhang näher bestimmen zu können.

5.2.3 Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von der Konzentration des immobilisierten Liganden

Es ist gezeigt worden, dass die zwei unterschiedlichen Konzentrationen beider Liganden keinen wesentlichen Einfluss auf die Adhäsionsstabilität der zwei HPA-1-Varianten haben. Dies kann verschiedene Ursachen haben.

Erstens haben Salim et al. beobachtet, dass bei der Untersuchung der Adsorption von Fibrinogen an Glasoberflächen eine Sättigung der Oberfläche bei einer Konzentration der Fibrinogenlösung von 50 $\mu\text{g/ml}$ erreicht werden kann ⁹⁰. Somit wäre eine Steigerung der Konzentration von Fibrinogen auf 100 $\mu\text{g/ml}$ wie erwartet nicht mit einer Steigerung der Adhäsion verbunden, da ja bereits Oberflächensättigung vorliegt. Diese Überlegungen werden durch das Ergebnis unserer Untersuchungen bestätigt (Abb. 22/23).

Im Gegenteil beschreibt Vijayan in seinem Versuch mit transfektierten CHO-Zellen, dass eine höhere Anzahl an Zellen sowohl bei niedrigen (12,5 $\mu\text{g/ml}$) als auch bei hohen (100 $\mu\text{g/ml}$) Fibrinogenkonzentrationen in der Flusskammer adhärent wird ⁷⁸. Man könnte die Ergebnisse (Abb. 28), die mit der HPA-1a-Variante auf Fibrinogen bei

Scherraten zwischen 60 s^{-1} und 1000 s^{-1} durchgeführt wurden, in dieser Hinsicht interpretieren. Allerdings muss man beachten, dass Vijayan seinen Versuch mit CHO-Zellen bei niedrigen Scherraten durchgeführt hat und das experimentelle Setting die Adhäsion und nicht die Stabilität der Bindung adhärierender Zellen testete.

Zweitens konnte durch verschiedene Studien gezeigt werden, dass die Konzentration von Liganden die Verteilung und die Ausrichtung der Molekülschicht wesentlich beeinflusst. Dies wiederum könnte einen wichtigen Effekt auf die Präsentation bzw. das Freilegen von Bindungsstellen wie RGD-Sequenzen haben ^{3,91,92}. Da aber keine signifikanten Unterschiede bei den unterschiedlichen Substratdosierungen auftraten, ist davon auszugehen, dass die Ausrichtung der Molekülschicht relativ unbeeinflusst blieb. Drittens haben Jirousková et al. einen dramatischen Effekt der Ligandendichte für die Plättchen-Reaktion demonstriert ⁹³. Sie folgern, dass je nach Dichte des Liganden unterschiedliche Signalmechanismen betätigt werden können. Sie verwendeten allerdings Fibrinogen in der Dosierung von 3 µg/ml und 100 µg/ml . In Vorversuchen konnten in der niedrigeren Fibrinogendosierung keine adhären Zellen in unseren Flusskammer-Experimenten nachgewiesen werden. Die von uns gewählten Dosierungen liegen nicht im Niedrig-Dosis-Bereich von Jirousková.

5.2.4 Adhäsionsstabilität in Abhängigkeit von der Höhe der Scherrate

In dem verwendeten Versuchsaufbau spielt das Anlegen und die Steigerung der Scherraten eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Fibrinogen erst bei 2000 s^{-1} (arterielle Bedingungen), vWF hingegen bereits ab 250 bzw. 500 s^{-1} (venöse Bedingungen) signifikante Unterschiede zwischen HPA-1a und HPA-1b in der Stabilität der Bindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ zeigt.

Was kann nun das Verhalten der verschiedenen Transfektanten, außer der bereits dargestellten Ursachen, noch modulieren? Unter physiologischen Bedingungen im Blutgefäß spielt die Scherrate und ihre Veränderung eine wichtige Rolle. Ruggeri und Mendolicchio konnten zeigen, dass die wirkenden Scherkräfte allein einen aktivierenden Einfluss auf das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ haben. Nesbitt und Mitarbeiter stellen außerdem dar, dass die alleinige Veränderung der Gefäßgeometrie und folglich auch der Scherraten die Ausbildung einer Thrombusformation bedingen kann ^{66,94,95}.

Dieser Punkt ist von Interesse gerade wegen des experimentellen Aufbaus, der in dieser Arbeit dargestellt wird. Da wesentliche Aktivatoren wie Kollagen, ADP, Thrombin und auch wesentliche Rezeptoren wie der GP 1b-IX-V und der GP VI-Rezeptor fehlen, sind wichtige Signalwege über das *Outside-In-Signaling* ausgeschaltet. Wir können also die Wichtigkeit der Scherratenaktivierung, die durch obige Arbeiten demonstriert wurde, im vollen Umfang bestätigen.

Weiter kann man in Betracht ziehen, dass die Scherraten das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ direkt regulieren. Durch die Publikation von Feng et al. wird ein Bild von der veränderten Mechanotransduktion und dem veränderten zytoskelettalen Signaling gezeichnet, welches direkt von pathologischem Scherstress abhängig ist⁸⁷. Sie zeigen auf, dass α -Actinin, Myosin (*heavy chain*) und Syk im ruhenden Zustand mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in Plättchen gemeinsam immunpräzipitiert werden können. Bei steigenden Scherraten allerdings kann bereits ab 3000 s^{-1} und bei 6000 s^{-1} ein vollständiges Dissoziieren des Syk von dem Plättchenintegrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ festgestellt werden. Sie kommen zu der Hypothese, dass pathologische Scherraten erstens direkt das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ modulieren und zweitens über die Veränderung zytoskelettaler Elemente die Plättchenaggregation beeinflussen.

Da das Verhalten des Integrins nur phänomenologisch untersucht wurde und die zytoskelettalen Bestandteile unberücksichtigt blieben, kann die Hypothese nicht bewiesen werden. Allerdings wäre dies ein möglicher Ansatzpunkt für weitergehende Untersuchungen.

5.3 Modell HEK-Zellen versus Thrombozyten

R. Whited (Doktorandin/ Studie aus IHTM, bisher noch nicht veröffentlicht) führte eine Studie mit Vollblut/Thrombozyten, die jeweils den HPA-1a- oder HPA-1b-Polymorphismus trugen, simultan zu vorliegender Studie auf den Substraten vWF und Fibrinogen durch. Von besonderem Interesse sind die Parallelen, die in diesen Experimenten gefunden wurden. In den Abb. 29 und 30 sind die Daten in vergleichbaren Diagrammen dargestellt. Es fällt auf, dass auf der linken Diagrammfläche (vWF) sowohl im Versuchsaufbau mit Thrombozyten als auch mit den doppelt-transfektierten HEK-Zellen die HPA-1a-Variante eine stärkere Adhäsion oder Adhäsionsstabilität aufweist, wohingegen rechts im Bild (Fibrinogen) die HPA-1b-Variante dieses Verhalten zeigt.

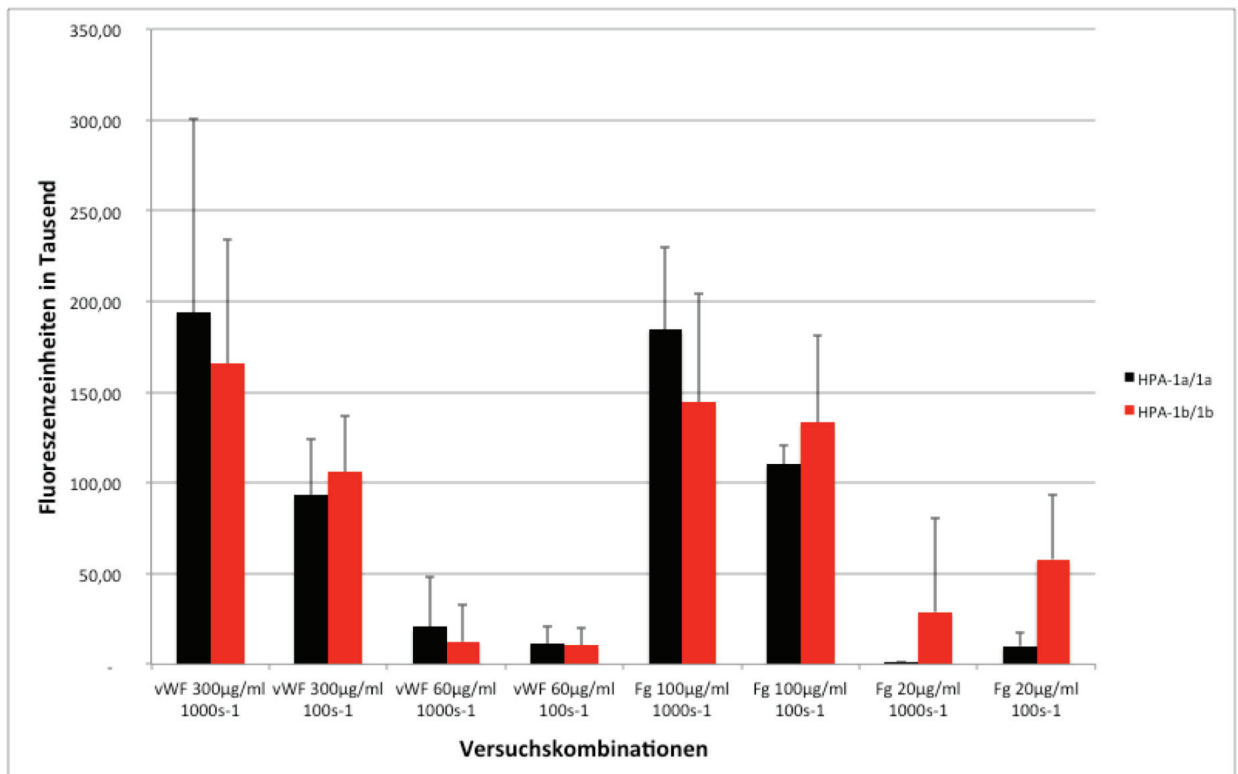


Abb. 30: „Adhäsion“ der Varianten HPA-1a (schwarz) und HPA-1b (rot) unter venösen und arteriellen Bedingungen auf vWF (60µg/ml und 300µg/ml) und Fibrinogen (20 µg/ml und 100 µg/ml). Daten mit Genehmigung von R.White/Doktorandin des IHTM.

Es kann beobachtet werden, dass der Polymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ nicht nur im Modell mit transfektierten HEK-Zellen, sondern auch auf Thrombozyten im Vollblut eine starke Scherraten-, Liganden-, und Substratdosisabhängigkeit zeigt. Der Einfluss des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf Thrombozyten ist trotz weiterer vorhandener Rezeptoren, wie z.B. dem GP1b-IX-V und dem GP VI-Rezeptor, und somit auch unter Beteiligung anderer Signalwege, so groß, dass seine Effekte sich trotzdem relevant auf sein Verhalten in der Hämostase auswirken. Es kann spekuliert werden, dass die von dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ genutzten Signalwege eine vorrangige Stellung in der „intrazellulären Zellkommunikation“ einnehmen. Außerdem konnte R. White auch das unerwartete Verhalten von HPA-1a auf vWF in der ersten und dritten Versuchskombination zeigen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die HPA-1-Variante auch unter physiologischen Bedingungen im Blutkreislauf Substratabhängigkeit aufweist.

6 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit erweitert unser Verständnis des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ in seiner Funktion als bidirektionale, allosterische Signalmaschine. Es kann eine Änderung der Mechanotransduktion beobachtet werden, die von mindestens drei verschiedenen Faktoren abhängig ist. Der Rezeptorpolymorphismus, die Liganden und die angelegte Scherrate spielen eine wesentliche Rolle in der Signalübertragung. Phänomenologisch zeigt das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ kein „Kippschalter-Verhalten“. Vielmehr präsentiert sich das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit seinem HPA-1-Polymorphismus als „intelligenter Rezeptor“, der je nach Substrat und anliegender Scherrate seine Adhäsionsstabilität moduliert. Diese Ergebnisse gründen sich einerseits auf Flussexperimenten mit transfektierten HEK-Zellen, als auch andererseits mit Vollblut.

Das tiefergehende Verständnis der Signalmechanismen des bidirektionalen Transmembran-Signalings durch das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ sind von entscheidender klinischer Bedeutung. Die bisher klinisch eingesetzten $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten Abciximab, Tirofiban und Eptifibatid führen zu einer direkten und kompletten Hemmung der Aggregation der Thrombozyten ⁹⁶. Dies hat zur Folge, dass als unerwünschte Nebenwirkung Blutungen auftreten können. Die Leitlinien der Gesellschaft für Kardiologie geben eine IIa Empfehlung für den Einsatz dieser Medikamente bei myokardialer Revaskularisierung. Das bedeutet, dass Evidenz und Expertenmeinung zwar widersprüchlich sind, aber die Sachlage eher für Nutzen und Wirksamkeit spricht ⁹⁷. Um für Patienten, die von der koronaren Herzkrankheit betroffen sind, bessere medikamentöse Alternativen entwickeln zu können, können phänomenologische Untersuchungen des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ einen entscheidenden Wissenszugewinn bedeuten. So könnte mit diesem Ansatzpunkt in der Medikamentenentwicklung eher die Modulation als die komplette Blockade des Integrins anvisiert werden. Diese Modulation der Rezeptorfunktion könnte sich an den unterschiedlichen Liganden und ihrer Konformation sowie den vorhandenen Bindungsstellen orientieren. Eine interessante Studie zeigte kürzlich, dass mit Hilfe eines Antikörperfragmentes (scFv), das sich gegen die β_3 -Untereinheit (GPIIIa₄₉₋₆₆) richtet, eine spezifische Bindung und eine Auflösung von Plättchenaggregaten in vitro und in vivo möglich ist. Dabei ist die Funktion des Integrins nicht betroffen ⁹⁸.

Es ließ sich zeigen, dass die HPA-1a-Variante auf vWF, die HPA-1b-Variante im Gegensatz dazu auf Fibrinogen stabiler adhären ist. Da die physiologische Funktion des vWFs auch eine Thrombusstabilisierung beinhaltet, wurde die Frage aufgeworfen, ob HPA-1b wegen der geringeren Stabilität auf dem Adhäsivprotein vWF einen Beitrag zu Embolien leisten könnte. Dies bleibt Gegenstand der Spekulation, gerade weil vWF nur einer von vielen beteiligten Mitspielern der Hämostase ist. In der Literatur wurde ein Zusammenhang zwischen dem HPA-1b-Polymorphismus, Rauchen und dem Risiko für einen lakunären Infarkt beobachtet ⁹⁹. Weiter wurde eine erhöhte Rate von Plaque-Embolien bei HPA-1b/1b beobachtet ¹⁰⁰. Andere Studien hingegen fanden keinen Zusammenhang zwischen einem embolischen Ereignis wie Schlaganfall und dem HPA-1b-Polymorphismus ¹⁰¹.

Um die Bedeutung der HPA-1b-Instabilität auf vWF im klinischen Zusammenhang beurteilen zu können, müssten weitergehende Studien angelegt werden.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Nieswandt, B. & Watson, S. P. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* **102**, 449–461 (2003).
2. Watson, S. P., Auger, J. M., McCARTY, O. J. T. & Pearce, A. C. GPVI and integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **3**, 1752–1762 (2005).
3. Varga-Szabo, D., Pleines, I. & Nieswandt, B. Cell Adhesion Mechanisms in Platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 403–412 (2008).
4. Shattil, S. J. & Newman, P. J. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* **104**, 1606–1615 (2004).
5. Bennett, J. S. Structure and function of the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. *J Clin Invest* **115**, 3363–3369 (2005).
6. Law, D. A., Nannizzi-Alaimo, L. & Phillips, D. R. Outside-in Integrin Signal Transduction $\alpha\beta$ -(GP IIb-IIIa) TYROSINE PHOSPHORYLATION INDUCED BY PLATELET AGGREGATION. *J. Biol. Chem.* **271**, 10811–10815 (1996).
7. Nieswandt, B., Pleines, I. & Bender, M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **9**, 92–104 (2011).
8. Vijayan, K. V., Goldschmidt-Clermont, P. J., Roos, C. & Bray, P. F. The PLA2 polymorphism of integrin $\beta 3$ enhances outside-in signaling and adhesive functions. *J Clin Invest* **105**, 793–802 (2000).
9. O’Toole, T. E. *et al.* Efficient surface expression of platelet GPIIb-IIIa requires both subunits. *Blood* **74**, 14–18 (1989).
10. George, J. N., Caen, J. P. & Nurden, A. T. Glanzmann’s thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood* **75**, 1383–1395 (1990).
11. Weisel, J. W. in *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers* **Volume 70**, 247–299 (Academic Press, 2005).
12. Forman, W. B. Cellular Site for Fibrinogen Synthesis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **187**, 128 (1964).
13. Nguyen, M. D. & Simpson-Haidaris, P. J. Cell type-specific regulation of fibrinogen expression in lung epithelial cells by dexamethasone and interleukin-1 β . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 209–217 (2000).

14. Yang, Z., Kollman, J. M., Pandi, L. & Doolittle, R. F. Crystal Structure of Native Chicken Fibrinogen at 2.7 Å Resolution^{†,‡}. *Biochemistry* **40**, 12515–12523 (2001).
15. Hall, C. E. & Slayter, H. S. The Fibrinogen Molecule: Its Size, Shape, and Mode of Polymerization. *J Biophys Biochem Cytol* **5**, 11–27 (1959).
16. Cheresh, D. A., Berliner, S. A., Vicente, V. & Ruggeri, Z. M. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell* **58**, 945–953 (1989).
17. Kloczewiak, M., Timmons, S. & Hawiger, J. Recognition site for the platelet receptor is present on the 15-residue carboxy-terminal fragment of the γ chain of human fibrinogen and is not involved in the fibrin polymerization reaction. *Thrombosis Research* **29**, 249–254 (1983).
18. Bennett, J. S. Platelet-Fibrinogen Interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **936**, 340–354 (2001).
19. Liu, Q. *et al.* Role of the γ chain Ala–Gly–Asp–Val and A α chain Arg–Gly–Asp–Ser sites of fibrinogen in coaggregation of platelets and fibrinogen-coated beads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1385**, 33–42 (1998).
20. Kloczewiak, M., Timmons, S., Bednarek, M. A., Sakon, M. & Hawiger, J. Platelet receptor recognition domain on the .gamma. chain of human fibrinogen and its synthetic peptide analogues. *Biochemistry* **28**, 2915–2919 (1989).
21. Farrell, D. H., Thiagarajan, P., Chung, D. W. & Davie, E. W. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *PNAS* **89**, 10729–10732 (1992).
22. Santoro, S. A. & Lawing Jr., W. J. Competition for related but nonidentical binding sites on the glycoprotein IIb-IIIa complex by peptides derived from platelet adhesive proteins. *Cell* **48**, 867–873 (1987).
23. D'Souza, S. E., Ginsberg, M. H., Burke, T. A. & Plow, E. F. The ligand binding site of the platelet integrin receptor GPIIb-IIIa is proximal to the second calcium binding domain of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.* **265**, 3440–3446 (1990).
24. D'Souza, S. E., Ginsberg, M. H., Matsueda, G. R. & Plow, E. F. A discrete sequence in a platelet integrin is involved in ligand recognition. , *Published online: 07 March 1991*; | doi:10.1038/350066a0 **350**, 66–68 (1991).
25. Smith, J. W. & Cheresh, D. A. The Arg-Gly-Asp binding domain of the vitronectin receptor. Photoaffinity cross-linking implicates amino acid residues 61-203 of the beta subunit. *J. Biol. Chem.* **263**, 18726–18731 (1988).

26. Charo, I. F., Nannizzi, L., Phillips, D. R., Hsu, M. A. & Scarborough, R. M. Inhibition of fibrinogen binding to GP IIb-IIIa by a GP IIIa peptide. *J. Biol. Chem.* **266**, 1415–1421 (1991).
27. Pötzsch, B. & Madlener, K. *Hämostaseologie*. (Springer-Verlag, 2010). at <<http://public.eblib.com/EBLPublic/PublicView.do?ptiID=510722>>
28. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. & Minick, C. R. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. IDENTIFICATION BY MORPHOLOGIC AND IMMUNOLOGIC CRITERIA. *J Clin Invest* **52**, 2745–2756 (1973).
29. Nachman, R., Levine, R. & Jaffe, E. A. Synthesis of Factor VIII Antigen by Cultured Guinea Pig Megakaryocytes. *J Clin Invest* **60**, 914–921 (1977).
30. Tschopp, T. B., Weiss, H. J. & Baumgartner, H. R. Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von Willebrand's disease. *J. Lab. Clin. Med.* **83**, 296–300 (1974).
31. Turitto, V. T., Weiss, H. J., Zimmerman, T. S. & Sussman, I. I. Factor VIII/von Willebrand factor in subendothelium mediates platelet adhesion. *Blood* **65**, 823–831 (1985).
32. Gralnick, H. R. *et al.* Platelet von Willebrand factor: an important determinant of the bleeding time in type I von Willebrand's disease. *Blood* **68**, 58–61 (1986).
33. Chopek, M. W., Girma, J. P., Fujikawa, K., Davie, E. W. & Titani, K. Human von Willebrand factor: a multivalent protein composed of identical subunits. *Biochemistry* **25**, 3146–3155 (1986).
34. Shankaran, H. & Neelamegham, S. Hydrodynamic Forces Applied on Intercellular Bonds, Soluble Molecules, and Cell-Surface Receptors. *Biophysical Journal* **86**, 576–588 (2004).
35. Dong, J. *et al.* ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* **100**, 4033–4039 (2002).
36. Zhou, Y.-F. *et al.* Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood* **120**, 449–458 (2012).
37. Goto, S., Ikeda, Y., Saldívar, E. & Ruggeri, Z. M. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest* **101**, 479–486 (1998).
38. Berliner, S., Niiya, K., Roberts, J. R., Houghten, R. A. & Ruggeri, Z. M. Generation and characterization of peptide-specific antibodies that inhibit von Willebrand factor

- binding to glycoprotein IIb-IIIa without interacting with other adhesive molecules. Selectivity is conferred by Pro1743 and other amino acid residues adjacent to the sequence Arg1744-Gly1745-Asp1746. *J. Biol. Chem.* **263**, 7500–7505 (1988).
39. Reiniger, A. J. & Spannagl, M. Interaktion des von Willebrand Faktors mit Thrombozyten und... (2004). at <<http://bibnet.org/vufind/Record/ccmed757917>>
 40. Schneider, M. F. & Schneider, S. W. Microcirculation - The von Willebrand factor: An intelligent vascular sealant. *BioSpektrum* **14**, 134–139 (2008).
 41. Siediecki, C. A. *et al.* Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* **88**, 2939–2950 (1996).
 42. Savage, B., Sixma, J. J. & Ruggeri, Z. M. Functional self-association of von Willebrand factor during platelet adhesion under flow. *PNAS* **99**, 425–430 (2002).
 43. Sadler, J. E. Biochemistry and Genetics of Von Willebrand Factor. *Annual Review of Biochemistry* **67**, 395–424 (1998).
 44. Hynes, R. O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).
 45. Collier, B. S. & Shattil, S. J. The GPIIb/IIIa (integrin α IIb β 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood* **112**, 3011–3025 (2008).
 46. Shattil, S. J., Kim, C. & Ginsberg, M. H. The final steps of integrin activation: the end game. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 288–300 (2010).
 47. Sims, P. J., Ginsberg, M. H., Plow, E. F. & Shattil, S. J. Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* **266**, 7345–7352 (1991).
 48. Xiao, T., Takagi, J., Collier, B. S., Wang, J.-H. & Springer, T. A. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* **432**, 59–67 (2004).
 49. Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T. & Springer, T. A. Global Conformational Rearrangements in Integrin Extracellular Domains in Outside-In and Inside-Out Signaling. *Cell* **110**, 599–611 (2002).
 50. Wagner, C. L. *et al.* Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* **88**, 907–914 (1996).
 51. Phillips, D. R., Fitzgerald, L. A., Chard, I. F. & Parise, L. V. The Platelet Membrane Glycoprotein IIb/IIIa Complex. *Annals of the New York Academy of Sciences* **509**, 177–187 (1987).

52. Gawaz, M. *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*. (Springer DE, 2010).
53. Cluzel, C. *et al.* The mechanisms and dynamics of $\alpha v\beta 3$ integrin clustering in living cells. *J Cell Biol* **171**, 383–392 (2005).
54. Ma, Y.-Q., Qin, J. & Plow, E. F. Platelet integrin $\alpha IIb\beta 3$: activation mechanisms. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **5**, 1345–1352 (2007).
55. Vijayan, K. V. & Bray, P. F. Molecular Mechanisms of Prothrombotic Risk Due to Genetic Variations in Platelet Genes: Enhanced Outside-In Signaling Through the Pro33 Variant of Integrin $\beta 3$. *Experimental Biology and Medicine* **231**, 505–513 (2006).
56. Peter, K., Schwarz, M., Nordt, T. & Bode, C. Intrinsic Activating Properties of GP IIb/IIIa Blockers. *Thrombosis Research* **103**, Supplement 1, S21–S27 (2001).
57. Cierniewski, C. S. *et al.* Peptide Ligands Can Bind to Distinct Sites in Integrin $\alpha IIb\beta 3$ and Elicit Different Functional Responses. *J. Biol. Chem.* **274**, 16923–16932 (1999).
58. Lindon, J. N., McManama, G., Kushner, L., Merrill, E. W. & Salzman, E. W. Does the conformation of adsorbed fibrinogen dictate platelet interactions with artificial surfaces? *Blood* **68**, 355–362 (1986).
59. Phillips, D. R., Charo, I. F. & Scarborough, R. M. GPIIb-IIIa: The responsive integrin. *Cell* **65**, 359–362 (1991).
60. Kieffer, N., Fitzgerald, L. A., Wolf, D., Cheresh, D. A. & Phillips, D. R. Adhesive properties of the beta 3 integrins: comparison of GP IIb-IIIa and the vitronectin receptor individually expressed in human melanoma cells. *J Cell Biol* **113**, 451–461 (1991).
61. Yee, D. L. & Bray, P. F. Clinical and Functional Consequences of Platelet Membrane Glycoprotein Polymorphisms. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **30**, 591–600 (2004).
62. Borne, A. E. G. von dem & Decary, F. Nomenclature of platelet-specific antigens. *Transfusion* **30**, 477–477 (1990).
63. Weiss, E. J. *et al.* A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N. Engl. J. Med.* **334**, 1090–1094 (1996).
64. Zotz, R. B. *et al.* Association of polymorphisms of platelet membrane integrins $\alpha IIb(\beta)3$ (HPA-1b/PI) and $\alpha 2(\beta)1$ ($\alpha 807TT$) with premature myocardial infarction. *J. Thromb. Haemost* **3**, 1522–1529 (2005).
65. Loncar, R. *et al.* HPA-1 polymorphism of $\alpha IIb\beta 3$ modulates platelet adhesion onto immobilized fibrinogen in an in-vitro flow system. *Thromb J* **5**, 2 (2007).
66. Nesbitt, W. S. *et al.* A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives

- thrombus formation. *Nature Medicine* **15**, 665–673 (2009).
67. Sadler, J. E. A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb. Haemost.* **71**, 520–525 (1994).
 68. Hantgan, R. R., Stahle, M. C. & Lord, S. T. Dynamic Regulation of Fibrinogen: Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ Binding. *Biochemistry* **49**, 9217–9225 (2010).
 69. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. , *Published online: 15 August 1970; | doi:10.1038/227680a0* **227**, 680–685 (1970).
 70. Bacabac, R. G. *et al.* Dynamic shear stress in parallel-plate flow chambers. *J Biomech* **38**, 159–167 (2005).
 71. Müllner, M. in *Erfolgreich wissenschaftlich arbeiten in der Klinik* 173–180 (Springer Vienna, 2005). at <<http://www.springerlink.com/content/h78g69nmrv038147/abstract/>>
 72. Weiss, E. J. *et al.* A monoclonal antibody (SZ21) specific for platelet GPIIIa distinguishes P1A1 from P1A2. *Tissue Antigens* **46**, 374–381 (1995).
 73. El-Khattouti, A. Allosterie der HPA-1 Varianten des thrombozytären Integrins $\alpha\text{IIb}\beta 3$. (2011). at <<http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=17177>>
 74. Macfarlane, D. E. *et al.* Letter: A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). *Thromb Diath Haemorrh* **34**, 306–308 (1975).
 75. Preston, F. E. Assays for von Willebrand factor functional activity: A UK NEQAS survey [5]. *Thrombosis and Haemostasis* **80**, 863 (1998).
 76. Goldsmith, H. L. & Turitto, V. T. Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report--Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis & Haemostasis* **55**, 415–35 (1986).
 77. Cadroy, Y. *et al.* The effect of platelet P1A polymorphism on experimental thrombus formation in man depends on blood flow and thrombogenic substrate. *Thromb. Haemost.* **85**, 1097–1103 (2001).
 78. Vijayan, K. V. *et al.* Shear stress augments the enhanced adhesive phenotype of cells expressing the Pro33 isoform of integrin $[\beta]3$. *FEBS Letters* **540**, 41–46 (2003).
 79. Ruggeri, Z. M. Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Practice & Research Clinical Haematology* **14**, 257–279 (2001).

80. Ruggeri, Z. M., Dent, J. A. & Saldívar, E. Contribution of Distinct Adhesive Interactions to Platelet Aggregation in Flowing Blood. *Blood* **94**, 172–178 (1999).
81. Vijayan, K. V., Liu, Y., Sun, W., Ito, M. & Bray, P. F. The Pro33 Isoform of Integrin $\beta 3$ Enhances Outside-in Signaling in Human Platelets by Regulating the Activation of Serine/Threonine Phosphatases. *J. Biol. Chem.* **280**, 21756–21762 (2005).
82. Renner, W. *et al.* The P1A1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa is not associated with deep venous thrombosis. *Int Angiol* **20**, 148–151 (2001).
83. Ridker, P. M. P1A1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of cardiovascular disease. *The Lancet* **349**, 1100 (1997).
84. Hooper, W. C. *et al.* The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans. *Chest* **116**, 880–886 (1999).
85. Larsson, J. & Hillarp, A. The Prothrombin Gene G20210A Mutation and the Platelet Glycoprotein IIIa Polymorphism P1A2 in Patients with Central Retinal Vein Occlusion. *Thrombosis Research* **96**, 323–327 (1999).
86. Ruggeri, Z. M., De Marco, L., Gatti, L., Bader, R. & Montgomery, R. R. Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor. *Journal of Clinical Investigation* **72**, 1–12 (1983).
87. Feng, S., Lu, X., Reséndiz, J. C. & Kroll, M. H. Pathological shear stress directly regulates platelet α IIB β 3 signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**, C1346–C1354 (2006).
88. Doggett, T. A. *et al.* Selectin-Like Kinetics and Biomechanics Promote Rapid Platelet Adhesion in Flow: The GPIIb α -vWF Tether Bond. *Biophysical Journal* **83**, 194–205 (2002).
89. Huber, W. *et al.* Determination of Kinetic Constants for the Interaction Between the Platelet Glycoprotein IIb-IIIa and Fibrinogen by Means of Surface Plasmon Resonance. *European Journal of Biochemistry* **227**, 647–656 (1995).
90. Salim, M., O’Sullivan, B., McArthur, S. L. & Wright, P. C. Characterization of fibrinogen adsorption onto glass microcapillary surfaces by ELISA. *Lab on a Chip* **7**, 64 (2007).
91. Moskowitz, K. A., Kudryk, B. & Collier, B. S. Fibrinogen coating density affects the conformation of immobilized fibrinogen: implications for platelet adhesion and spreading. *Thromb. Haemost.* **79**, 824–831 (1998).
92. Kim, J. & Somorjai, G. A. Molecular Packing of Lysozyme, Fibrinogen, and Bovine

- Serum Albumin on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces Studied by Infrared–Visible Sum Frequency Generation and Fluorescence Microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3150–3158 (2003).
93. Jirousková, M., Jaiswal, J. K. & Collier, B. S. Ligand density dramatically affects integrin α IIb β 3-mediated platelet signaling and spreading. *Blood* **109**, 5260–5269 (2007).
 94. Ruggeri, Z. M. & Mendolicchio, G. L. Adhesion Mechanisms in Platelet Function. *Circulation Research* **100**, 1673–1685 (2007).
 95. Ozaki, Y., Asazuma, N., Suzuki-Inoue, K. & Berndt, M. c. Platelet GPIb-IX-V-dependent signaling. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **3**, 1745–1751 (2005).
 96. Jastrow, H. & Weber, A.-A. [Physiology and pathophysiology. Fundamentals of platelet pharmacology]. *Pharm Unserer Zeit* **38**, 302–304 (2009).
 97. Neumann, F.-J. *et al.* Kommentar zu den gemeinsamen „Guidelines on myocardial revascularization“ der European Society of Cardiology (ESC) und der European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Der Kardiologe* **6**, 94–104 (2012).
 98. Zhang, W. *et al.* Dissolution of arterial platelet thrombi in vivo with a bifunctional platelet GPIIIa49-66 ligand which specifically targets the platelet thrombus. *Blood* **116**, 2336–2344 (2010).
 99. Oksala, N. K. J. *et al.* Smoking and the Platelet Fibrinogen Receptor Glycoprotein IIb/IIIa PLA1/A2 Polymorphism Interact in the Risk of Lacunar Stroke and Midterm Survival. *Stroke* **38**, 50–55 (2007).
 100. Mathew, J. P. *et al.* Platelet PLA2 polymorphism enhances risk of neurocognitive decline after cardiopulmonary bypass. Multicenter Study of Perioperative Ischemia (McSPI) Research Group. *Ann. Thorac. Surg.* **71**, 663–666 (2001).
 101. Van Goor, M.-L. P. J. *et al.* PLA1/A2 polymorphism of the platelet glycoprotein receptor IIb/IIIa in young patients with cryptogenic TIA or ischemic stroke. *Thrombosis Research* **108**, 63–65 (2002).

8 Anhang

8.1 Datenübersicht

Scherrate in (s ⁻¹)	HPA 1a Fg 50 µg/ml			HPA 1a Fg 100 µg/ml			HPA 1a vWF:RCo 50%			HPA 1a vWF:RCo 100%		
	rel. Zellad. in %	SD		rel. Zellad. in %	SD		rel. Zellad. in %	SD		rel. Zellad. in %	SD	
30	100,00	0,00		100,00	0,00		100,00	0,00		100,00	0,00	
60	108,34	5,63		109,72	5,51		101,67	10,17		107,36	6,65	
125	99,50	8,90		101,82	7,60		88,27	10,72		90,58	9,29	
250	95,14	10,28		98,13	9,38		73,92	9,40		78,07	10,23	
500	92,90	9,05		95,78	8,33		65,48	11,39		71,48	10,52	
1000	84,94	11,81		87,69	10,05		52,70	9,23		54,95	7,17	
2000	56,85	15,80		61,49	15,31		42,51	13,31		45,22	8,88	
Scherrate in (s ⁻¹)	HPA-1b Fg 50 µg/ml			HPA-1b Fg 100 µg/ml			HPA 1b vWF:RCo 50%			HPA 1b vWF:RCo 100%		
	rel. Zellad. in %	SD		rel. Zellad. in %	SD		rel. Zellad. in %	SD		rel. Zellad. in %	SD	
30	100,00	0,00		100,00	0,00		100,00	0,00		100,00	0,00	
60	102,50	4,71		105,37	4,28		94,02	4,64		94,03	4,62	
125	95,75	4,22		96,69	5,96		79,02	4,44		80,61	5,81	
250	94,89	4,17		94,86	5,65		60,01	11,68		67,84	7,77	
500	94,34	5,00		94,23	5,49		46,48	10,52		54,36	6,65	
1000	91,95	6,30		91,57	7,09		33,91	10,92		44,00	6,45	
2000	86,75	7,87		94,61	6,44		25,23	8,48		32,08	5,12	

Tabelle 1: Übersicht über alle Daten der durchgeführten Experimente (Rel. Zellad. = relative Zelladhäsion; SD= Standardabweichung)

8.2 Makro zur Bildverarbeitung:

```

open("H:\100202-03\0000.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("H:\100202-03\0004.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0000.png", "0004.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0000.png operation=AND image2=0004.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("H:\100202-03\0005.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("H:\100202-03\0009.png");
setAutoThreshold();

```

```

//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0005.png", "0009.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0005.png operation=AND image2=0009.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("H:\\100202-03\\0013.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("H:\\100202-03\\0014.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0013.png", "0014.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0013.png operation=AND image2=0014.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("H:\\100202-03\\0015.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("H:\\100202-03\\0019.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0015.png", "0019.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0015.png operation=AND image2=0019.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("H:\\100202-03\\0020.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("H:\\100202-03\\0024.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0020.png", "0024.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0020.png operation=AND image2=0024.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("H:\\100202-03\\0028.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("H:\\100202-03\\0029.png");

```

```

setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0028.png", "0029.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0028.png operation=AND image2=0029.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("H:\\100202-03\\0030.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("H:\\100202-03\\0034.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0030.png", "0034.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0030.png operation=AND image2=0034.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("H:\\100202-03\\0070.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("H:\\100202-03\\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("H:\\100202-03\\0080.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("H:\\100202-03\\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("H:\\100202-03\\0090.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");

```

```
open("H:\\100202-03\\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");
```

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei all denjenigen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass ich das Projekt „Promotion“ in Angriff genommen, durchgeführt und nun auch zu Ende gebracht habe.

Mein besonderer Dank gilt:

Univ.-Prof. Dr. med. Scharf

für die Bereitstellung des Themas, eines äußerst hilfsbereiten wissenschaftlichen Teams, der Gerätschaften und für die ausführlichen Korrekturen.

Dr. rer. nat. Stoldt

für seine motivierende Unterstützung und die stets vorhandene Bereitschaft, bei anstehenden Fragen zu möglichen und unmöglichen Zeiten zu helfen und zu diskutieren. Er bereicherte mich mit wertvollen Denkanstößen.

Dr. rer. nat. M. Gyenes

für die Unterstützung bei vielen theoretischen und praktischen wissenschaftlichen Fragen und Umsetzungen.

Elisabeth Kirchhoff und Bianca Maaßen-Weingart

dafür, dass sie mich immer gerne beraten haben, meine methodischen Kenntnisse erweitert und mir das FACS-Gerät näher gebracht haben.

Meinen Mitdokotoranden Benjamin Chahem, Robin Whited, Karoline Wissmann, für viele große und kleine Hilfestellungen.

Antje Terschüren, Dr. med. M. Kubin und Dr. med. B. Kallert

meinen lieben Korrekturlesern, die den notwendigen sprachlichen Schliff beigetragen haben.

Meinem Mann Kolja Kunstreich

für all seine Liebe und seine unermüdliche Unterstützung, sowie seine Geduld und seinen Einsatz.

Eidesstattliche Versicherung

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

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift