

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

Modulation der Src p418-Phosphorylierung in Relation zum HPA-1-Polymorphismus von α IIb β 3 bei der Plättchenadhäsion an Fibrinogen und Fibronektin

Dissertation

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

vorgelegt von

Una Lee

2016

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Schelzig

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hohlfeld

Diese Arbeit wurde unabhängig vom wissenschaftlichen Betreuer der Dissertation
(Prof. Scharf) begutachtet.

Zusammenfassung

Die homozygote HPA-1b/1b (Pro33) Rezeptorvariante des thrombozytären Integrins α IIb β 3 ist vergesellschaftet mit einer gesteigerten Thrombogenität, die sich klinisch durch eine verfrühte Inzidenz für Myokardinfarkte und erhöhte Frühabortrate bemerkbar macht. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des HPA-1-Polymorphismus in Bezug auf das rezeptorassoziierte Outside-in-Signaling mit Fokus auf die spezifische Phosphorylierung der Src Tyrosinkinase an Position 418 in Relation zu verschiedenen Liganden von α IIb β 3. Die Spezifität der Src-Aktivierung wurde mittels Abciximab (ReoPro), einem α IIb β 3-Rezeptorantagonisten, untersucht. Die in dieser Arbeit angewandte Methodik umfasste die venöse Blutentnahme an ausgesuchten Probanden beider Genotypen, die HPA-1a/1a -und HPA-1b/1b-Plättchenpräparation, Adhäsionsversuche auf Fibronectin (Fn) -und Fibrinogen (Fg)-Matrizes in An -bzw. Abwesenheit von Mn^{2+} , Proteinextraktion, Proteinbestimmung und Westernblotanalyse. Die Quantifizierung der Src-Aktivierung erfolgte, indem der Quotient von Src pY418/ α IIb aus den densitometrischen Werten der spezifischen Src pY418 und α IIb-Westernblotbanden gebildet wurde. Die durch Fibrinogen und Fibronectin in Kombination mit Mn^{2+} jeweils induzierte spezifische Src-Aktivierung liess sich durch den α IIb β 3-Rezeptorantagonisten Abciximab im Mittel um 50% reduzieren. Die Src-Aktivierung in Bezug auf beide Liganden war bei der Pro33-Variante im Vergleich zur Leu33-Variante stets ausgeprägter, aber nicht signifikant unterschiedlich. Ferner wurden bei beiden HPA-1-Genotypen durch Fibrinogen stets eine höhere Src-Aktivierung als nach Fibronectinadhäsion erzielt. Vor allem in Anwesenheit von Mn^{2+} und Ligand konnte bei der HPA-1b/1b-Variante sowohl eine verstärkte als auch verfrühte Src-Aktivierung beobachtet werden. Mn^{2+} selbst besitzt eine rezeptormodulierende Wirkung und ist in der Lage, auf die Ligandenbindungskinetik einzuwirken und die Clusterbildung von Integrinen zu fördern. Möglicherweise begünstigen allosterische Mechanismen der strukturveränderten Pro33- β 3-PSI-Domäne ein verstärktes Outside-in-Signaling. Die Besetzung der verschiedenen Bindungsstellen der Integrinectodomänen MIDAS, ADMIDAS und syMBS mit Fibrinogen bzw. Fibronectin und Mn^{2+} resultiert in einer unterschiedlichen Src-Aktivierung, welche bei der HPA-1b/1b-Variante in Verbindung mit Fibrinogen und Mn^{2+} von signifikanter Ausprägung war. Der Fibronectinrezeptor α 5 β 1 beeinflusst aufgrund seiner geringen Anzahl auf der Plättchenoberfläche sowie seiner untergeordneten Rolle beim Outside-in-Signaling dieses Ergebnis kaum. Zusammengefasst sprechen unsere Ergebnisse dafür, dass die prothrombogenen Eigenschaften der Pro33-Variante von α IIb β 3 durch eine frühzeitige und verstärkte Rezeptoraktivierung sowie einer erhöhten Sensibilität auch gegenüber anderen Liganden wie z. B. Fibronectin geprägt ist, wobei eine Substratspezifität für Fibrinogen überwiegt. Die Frühzeitigkeit der α IIb β 3-Rezeptoraktivierung wird durch Mn^{2+} synergistisch potenziert.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abmab	Abciximab (Reo Pro)
ADP	Adenosintriphosphat
ADMIDAS	adjecent to Metal Ion Adhesive Site
AK	Antikörper
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	divalentes Calciumion
ca.	circa
CHO	Chinese Hamster Ovary Zellen
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diacylglycerol
ERK	Extracellular Signal Related Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
Fg	Fibrinogen
Fn	Fibronektin
GP	Glykoprotein
GPCR	G-Protein Coupled Receptors
HEK	Human Embryonic Kidney
HPA	Human Platelet Antigen
IP3	Inositoltriphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
LIMBS	Ligand-Induced Metal-Binding Site
LIBS	Ligand-Induced Binding Site
Mg ²⁺	divalentes Magnesiumion
MIDAS	Metal Ion Adhesive Site
MnCl ₂	Manganchlorid
min	Minuten
mind.	mindestens
MLCK	Myosin Light Chain Kinase
NMR	nuclear magnetic resonance
PBS-T	Phosphate Buffered Saline mit Tween
PCI	Percutane Coronar Intervention
PGE2	Prostaglandin E2
PI3	Phosphatidyinositoltriphosphat
PKC	Proteinkinase C
PL C _γ	Phospholipase C _γ
Plts	Plättchen
PLC	Phospholipase C
PRP	Plättchenreiches Plasma
RPM	Revolution Per Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
s.	siehe
Std.	Stunden
SFK	Src Family Kinase
syMBS	synergistic Metal ion-Binding Site (chem. LIMBS)
v Src	konstitutiv-aktive Form der Src Kinase (cellular and sarcoma Kinase)
Src [pY ⁴¹⁸]	phosphorylierte, aktivierte Form von vSrc
SH2	Domäne Src Homolgy Domäne
TBS-T	TRIS-buffered Saline mit 0,1% Tween20
TXA2	Throboxan A2
Tyr	Tyrosinrest
vWF	von Willebrand Faktor

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	I
	Abkürzungsverzeichnis	II
1	Einleitung	1
1.1	Die Plättchenaggregation	1
1.2	Struktur des α IIb β 3 Rezeptors	2
1.3	α IIb β 3-Integrin relevante Liganden bei der Hämostase	5
1.4	Liganden induzierte Konformationsänderung, bidirektionales Signaling	7
1.5	Die Rolle von Src beim Signaling Prozess	9
1.6	Die Bedeutung des HPA-1 Rezeptorpolymorphismus	10
2	Zielsetzung	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Chemikalien und Enzyme	13
3.1.1	Puffer und Lösungen	14
3.1.2	Westernblotgele	15
3.1.3	Primäre Antikörper	15
3.1.4	Sekundäre Antikörper	15
3.2	Methoden	15
3.2.1	Plättchenpräparation	15
3.2.2	Plättchenadhäsion	16
3.2.3	Photometrische Proteinbestimmung (Bradford Methode)	17
3.2.4	Alternative Proteinbestimmung durch Quantifizierung von Elektrophorese Gelen, die mit Coomassieblau gefärbt wurden	17
3.2.5	Westernblot Analyse	18
3.2.6	Densitometrische Auswertung, Statistik	19
4	Ergebnisse	20
4.1	Vorversuche	20
4.2	Kontrolle zur Spezifität des α IIb β 3-Rezeptors beim Outside-in-Signaling	21
4.3	Ligandenabhängige Src-Aktivierung in humanen HPA-1a/1a (Leu33) Plättchen	22
4.4	Ligandenabhängige Src-Aktivierung in humanen HPA-1a/1a (Leu33) Plättchen in Anwesenheit von Mn ²⁺ Kationen	23
4.5	Ligandenabhängige Src-Aktivierung in humanen HPA-1b/1b (Pro33) Plättchen	25
4.6	Ligandenabhängige Src-Aktivierung in humanen HPA-1b/1b (Pro33) Plättchen in Anwesenheit von Mn ²⁺ Kationen	26
4.7	Einfluss des HPA-1-Rezeptorpolymorphismus auf die Src-Aktivierung unter Verwendung verschiedene Liganden	28
5	Diskussion	32
5.1	Unterschiede in der Ligandenbindung von Fibronectin und Fibrinogen am α IIb β 3-Rezeptor	32
5.2	Ligandenabhängige Unterschiede in der Src-Aktivierung in Verbindung mit Mn ²⁺	33
5.3	Rolle des α IIb β 3-Rezeptorpolymorphismus bei der Src-Aktivierung in Bezug auf immobilisiertes Fibronectin und Fibrinogen	36
5.4	HPA-1-abhängige Unterschiede in der Src-Aktivierung in Anwesenheit von Mn ²⁺ und immobilisiertem Fibronectin und Fibrinogen	37
5.5	Nachweis der Spezifität der Src-Kinase beim Outside-in-Signaling durch den α IIb β 3-Rezeptorantagonisten Abciximab	38
6	Schlussfolgerung	40
7	Literatur und Quellenverzeichnis	42

1 Einleitung

1.1 Die Plättchenaggregation

Plättchen (Thrombozyten) sind kernlose zytoplasmatische Abschnürungen aus Megakaryozyten, die bei der Hämostase zusammen mit plasmatischen Komponenten (Gerinnungsfaktoren) eine Schlüsselrolle einnehmen. Die Plättchenaggregation beinhaltet verschiedene Prozesse, die durch komplexe Interaktionen zwischen bestimmten Rezeptoren auf der Plättchenmembran und den entsprechenden Liganden bestimmt werden. Dabei handelt es sich um einen dynamischen Vorgang, der neben einem abgestimmten Rezeptor-Liganden-Kontakt auch weiteren Bedingungen wie flussdynamischem Stress, genetischen Rezeptorvarianten, endogener Antagonisierung etc. unterliegt. Die Plättchenaggregation oder primäre Thrombusbildung wird initiiert durch das „tethering“ (Anbinden, Abfangen) zirkulierender Plättchen an subendotheliale Matrixstrukturen. Die Interaktion zwischen Plättchen, subendotheliale von-Willebrand-Faktor (vWF) und Kollagen fördert die Plättchenaktivierung, Plättchensekretion und Adhäsion. Die Sekretion thrombozytärer Granulinhaltstoffe (ADP, Serotonin, Ca²⁺) und thrombozytärer Stoffwechselprodukte (TXA₂) führt zu einer weiteren Aktivierung und Rekrutierung von Plättchen. Der zunächst provisorische, noch instabile „weisse“ Thrombus wird durch die weitere Plättchenstimulation und der sich anschließenden Integrin-Ligandenbindung zunehmend fester, indem sich stabilere Plättchen-Plättchen bzw. Plättchen-Matrix Kontakte bilden („Adhäsion oder Cohesion“) (Li, 2010; Jackson, 2007; Bray, 2007; Abrams, 2005). Hierbei spielen neben der Bindung zwischen dem Kollagenrezeptor $\alpha 2\beta 1$ und den freiliegenden Kollagenfasern insbesondere die Interaktion zwischen Integrin $\alpha I\text{Ib}\beta 3$ und Fibrinogen, aber auch anderen Liganden wie Fibronectin oder vWF, welche im Plasma zirkulieren und aus den α -Granula aktivierter Plättchen freigesetzt werden, eine wichtige Rolle. Die Aktivierung von $\alpha I\text{Ib}\beta 3$ erfolgt zum einen durch Agonisten getriggertes Inside-out-Signaling (siehe auch Kapitel 1.4), zum anderen durch flussdynamische Scherkräfte, die $\alpha I\text{Ib}\beta 3$ im Sinne einer mechanoresponsiven Affinitätsmodulation beeinflussen (Feng, 2006). Durch interkorpuskuläre Brückenbildung zwischen aktivierten $\alpha I\text{Ib}\beta 3$, Fibrinogen und vWF wird der Plättchenthrombus zunehmend grösser. Unter Einbeziehung des kontraktilen thrombozytären Zytoskeletts kommt es zur Umorganisation der Plättchenmembran mit nachfolgender Retraktion und Aggregation des Primärthrombus mit der Folge, dass der Thrombus fester wird. Im Verlauf ereignen sich im Rahmen der sekundären Hämostase weitere mehrzeitige, sich teilweise überschneidende Prozesse. In der Aktivierungsphase wird Prothrombin zu Thrombin konvertiert, woraufhin in der Koagulationsphase aus Fibrinogen unlösliches Fibrin gebildet wird. In der Retraktionsphase bindet $\alpha I\text{Ib}\beta 3$ zum einen die den Thrombus umgarnenden Fibrinfäden, unter Zuhilfenahme des fibrinstabilisierenden Faktors XIIIa bindet $\alpha I\text{Ib}\beta 3$ auch Fibronectin. Das Fibringeflecht umspannt den Plättchenthrombus, stabilisiert ihn entsprechend und verhindert sein Abreißen durch den Blutstrom. Durch Einbeziehung kontraktiler zytoskeletaler Elemente des Aktin/Myosinsystems kommt es letztlich zur Ausbildung eines festen hämostatischen Pfropfs (Klinke/Silbernagl, 2009). Die differenzierte Kontaktaufnahme zwischen bestimmten

Plättchenintegrinen, Liganden und weiteren Signalmolekülen ist nicht nur essentiell zur Wahrung der vaskulären Integrität. Eine Störung des Gleichgewichts der oben genannten Interaktionen kann mit thromboembolischen Komplikationen wie z. B. Myokardinfarkt, Schlaganfall, einer erhöhten Rate von (Früh)Aborten und der Pathogenese der Atherosklerose assoziiert sein.

1.2. Struktur des Integrin α IIb β 3 Rezeptors

Integrine sind heterodimere, transmembranäre Rezeptoren, die zur bidirektionalen Signaltransduktion befähigt sind. Jedes Mitglied der Integrinfamilie kann im Allgemeinen mehrere Liganden binden und besteht aus einer α - und β -Untereinheit, die über eine nonkovalente Bindung verbunden sind. Die Bindung intrazellulärer Liganden an zytoplasmatische Integrindomänen steuert die Rezeptoraffinität gegenüber extrazellulären Matrix- oder Adhäsivproteinen bzw. plasmatischer Liganden. Die daraus resultierende Bindung adhäsiver Liganden an die extrazellulären Integrindomänen löst ein Signal aus, das durch Proteinkinasen in das Zellinnere weitergeleitet wird (Outside-in-Signaling, siehe auch Kapitel 1.4). Auf diese Weise sind Integrine in der Lage, eine Verbindung zwischen dem Zellinneren und dem extrazellulären Liganden herzustellen (Hynes, 1992 und 2002). Auf der Plättchenoberfläche ist Integrin α IIb β 3 mit 60.000-80.000 Kopien/Plättchen am häufigsten vertreten und bindet neben seinen Hauptliganden Fibrinogen auch Fibronektin, vWF, Vitronektin, CD40L und weitere Proteine (Plow et al 2000). α IIb β 3 nimmt bei der Plättchenaggregation eine Schlüsselrolle ein, sein Gen ist auf dem Chromosom 17 lokalisiert. Die glykolisierte α IIb-Untereinheit besteht aus einer extrazellulär gelegenen schweren Kette („heavy chain“) und aus einer leichten Kette („light chain“), welche sich über einen zytoplasmatischen Anteil, eine transmembranäre Helix sowie ein extrazelluläres Segment erstreckt und über Disulfidbrücken mit der schweren Kette verbunden ist. Am N-terminalen Ende der α -Untereinheit befindet sich der sog. „ β -propeller“, eine spezielle α -Domäne, die sieben klingenförmige Strukturen („blades“) mit vier divalenten Bindungsmotiven für Kationen besitzt (Springer, 1997). Der Rest der α IIb-Untereinheit ist wie eine „mehrgliedrige Extremität“ geformt, wovon eine wie ein „Schenkel“ („thigh“) und zwei weitere wie „Waden“ („calfs“) anmuten und über eine „knie“-ähnliche („genu“) Struktur miteinander verbunden sind. Die kleinere β 3-Untereinheit besteht analog zur α -Untereinheit ebenfalls aus einem grossen extrazellulären, transmembranären und zytoplasmatischen Anteil. (s. Abb. 1)

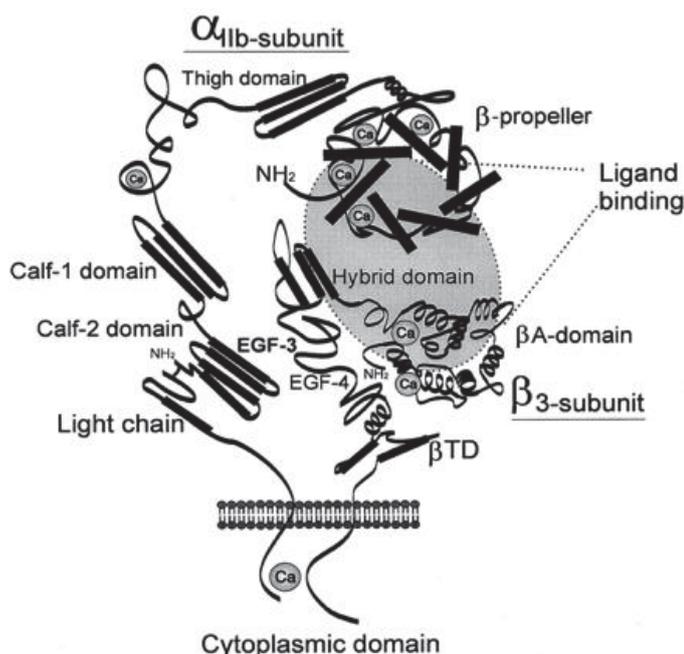


Abb. 1: Aufbau, Struktur und Domänen des Integrins α IIb β (Quinn et al, 2003)

Die β 3-Untereinheit beherbergt die sog. β A-Domäne („I-like Domain“), die drei für die Ligandenbindung ganz wesentliche kationenabhängige Bindungsstellen enthält; MIDAS („Metal Ion Adhesive Site), ADMIDAS („adjacent to Metal Ion Adhesive Site) und syMBS („synergistic metal ion-binding site, ehem. LIMBS „Ligand-induced Metal Binding Site“) (Zhang, 2012). MIDAS und syMBS sind in erster Linie essentiell für die Ligandenerkennung/bindung, während ADMIDAS sowohl bei der Ligandenbindung als auch der Stabilisierung der aktiven Rezeptorkonformation beteiligt ist (Mauld, 2003; Chen, 2006; Murcia, 2008). Der Asparagin-Rest der RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) tritt in direkter Interaktion mit MIDAS, wohingegen die Fibrinogen γ -Kette (KQAGDV-Sequenz) „grossflächiger“ interagiert und sowohl mit MIDAS als auch mit ADMIDAS eine Bindung eingeht (Springer, 2008; Xiong, 2001). Mn^{2+} Kationen kompetieren mit Ca^{2+} Ionen, die mit ADMIDAS einen Komplex bilden, um Bindungsstellen an der ADMIDAS und können dadurch eine Rezeptoraktivierung induzieren (Chen, 2003). Die Besetzung von β A-MIDAS und β A-syMBS mit Mn^{2+} erfolgt nur im Beisein eines RGD-haltigen Liganden wie z. B. Fibrinogen oder Fibronectin (Xiong, 2002) (S. Abb. 2). Zusammengefasst beeinflusst Mn^{2+} den Rezeptor somit auf verschiedenen Ebenen; zum einen führt Mn^{2+} selbst zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, zum anderen bewirkt Mn^{2+} durch Stabilisierung der ligandeninduzierten Konformationsänderung eine Affinitätssteigerung des Rezeptors und kann durch Clusterbildung auch zu einer Aviditätssteigerung gegenüber Liganden beitragen (Carman, 2003; Xiao, 2004; Litvinov, 2004; Joo, 2012).

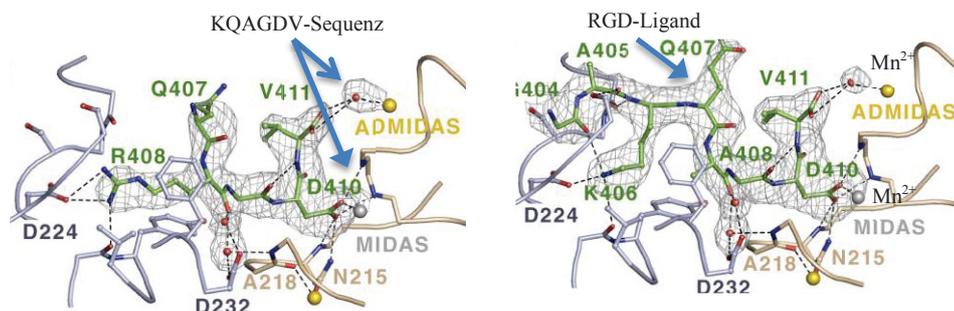


Abb. 2: Ligandeninteraktion mit β -MIDAS und ADMIDAS (Springer et al, 2008; Xiong et al, 2002)

Zwei weitere für die Integrinaktivierung wichtige β -Domänen, namentlich die Hybrid- und PSI- („Plexin Semaphorin Integrin“) Domäne grenzen an eine Region an, die vier EGF- („epidermal growth factor“) -artige Domänen beherbergt. Die einzelnen Domänen der β -Untereinheit liegen nestartig ineinander verschachtelt vor; die β A-Domäne ist in der Hybriddomäne eingefügt, welche wiederum von der PSI-Domäne umschlossen wird. Als letztes Strukturmotiv findet sich die β TD („tail domain“) (Xiao, 2004). Die α IIB und β 3-Untereinheit bilden im Bereich der Ektodomäne einen globulären „Kopf“ und zwei lange „Beine“, welche die Zellmembran umspannen. Der „globuläre Kopf“ ist der Sitz der Ligandenbindung und setzt sich zusammen aus dem β -Propeller der α IIB-Untereinheit und dem Kopfteil („headpiece“) der β 3-Untereinheit (Xiong, 2001; Xiao 2004) (s. auch Abb. 7). Xiao et al wiesen anhand von röntgenkristallographischen Untersuchungen die allosterischen Regulationsmechanismen in Bezug auf die Rezeptorkonformation und der Ligandenaffinität der Ektodomänen nach. Abhängig von der Ausrichtung des globulären Kopfes zu den jeweiligen α IIB- und β 3-„Beinen“ befindet sich der Rezeptor im aktivierten bzw. im Ruhezustand. Die globuläre, in sich gekrümmte Konformation entspricht der inaktiven Konformation. Die Mittelstellung ist charakterisiert durch ein „Aufrichten“ der sich berührenden Beine bei abgeknicktem Kopf. Bei der hochaffinen Konformation sind beide Beine vollständig voneinander getrennt und der globuläre Kopf weit über der Zellmembran hoch aufgerichtet („geöffnet“). Dabei spielt insbesondere die räumliche Nähe zwischen den beiden zytoplasmatischen Endstücken („tail“) als auch der heterodimeren transmembranären Abschnitte beider Untereinheiten eine grosse Rolle (s. Abb. 3). Die beiden transmembranären Helices sind somit bei der Aktivierung und der Inaktivierung bzw. Ruhestellung von α IIB β 3 beteiligt (Partridge, 2005). Die zu einer Konformationsänderungen und folglich Aktivierung des Rezeptors führenden Signale bedürfen daher einer feinsinnigen Koordination, da sie „langstreckig“ über die extrazellulären, transmembranären und zytoplasmatischen Integrinabschnitte des gesamten Rezeptors und vice versa transmittiert werden.

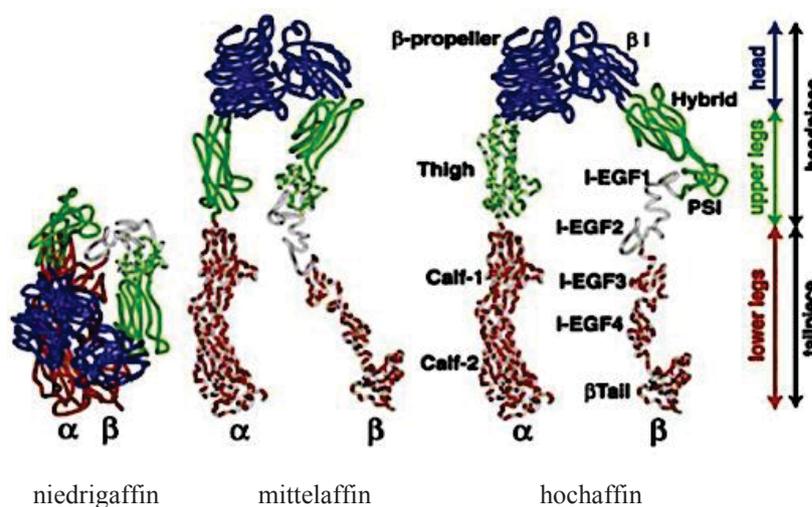


Abb. 3: Röntgenkristallographische Darstellung der Konformationsänderung bei Integrinaktivierung und des Affinitätszustands von α IIb β 3 (Xiao et al, 2004)

1.3 α IIb β 3-Integrin relevante Liganden bei der Hämostase

Bei der Hämostase spielen hauptsächlich die α IIb β 3-Liganden Fibrinogen und vWF sowie Fibronectin und Vitronectin eine Rolle. Generell erfolgt die Bindung der Liganden in Abhängigkeit von divalenten Kationen in den N-terminalen Domänen beider Untereinheiten und wird über die Ligandenerkennungssequenz RGD mit der β 3-Untereinheit der Ligandenbindungsstelle des globulären Kopfes hergestellt (s. Abb. 1, 2 und 7). Sowohl Fibronectin als auch Fibrinogen werden in der Leber produziert und liegen hauptsächlich in löslicher Form im Blutplasma und anderen Körperflüssigkeiten vor. Im Gewebe als auch subendothelial lässt sich Fibronectin in Form unlöslicher Multimere um Fibroblasten isolieren. Geringe Konzentrationen von Fibronectin und Fibrinogen befinden sich auch in den α -Granula der Thrombozyten (Klar, 1984). Fibrinogen nimmt bei der Plättchenaggregation eine Schlüsselrolle ein. Dabei handelt es sich um ein 340-kDa schweres Heterohexamer bestehend aus je zwei α -, β - und γ -Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Ungleich dem Vitronectinrezeptor α v β 3 wird Fibrinogen von α IIb β 3 nicht ausschliesslich RGD-abhängig gebunden, sondern es erfolgt zunächst eine vorausgehende Interaktion zwischen der non-RGD Dodecapeptidsequenz (QAGDV Sequenz) der Fibrinogen γ -Kette und der α IIb-Untereinheit (s. Abb. 4). Diese α IIb- γ -Bindung stellt eine Art Synergismus oder Amplifikation zur vollen Rezeptoraktivierung dar, möglicherweise indem durch diese vorausgehende Interaktion eine transkonformationale Änderung der β 3-Untereinheit induziert wird, die eine anschliessende RGD- β 3-Bindung erleichtert (Salsmann, 2005; Hu, 1998). Fibronectin bildet ein 250-kDa schweres Heterodimer bestehend aus zwei stabförmigen Polypeptidketten, die am C-terminalen Ende ebenfalls durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Fibronectinpolypeptidkette ist unterteilt in eine Vielzahl von Domänen, die aufgrund ihrer Homologie in die Strukturtypen I, II, III und in eine variable Region eingeteilt werden. Die Fibronectin- α IIb β 3-Bindung erfolgt primär RGD-abhängig an

der FN(Fibronectin)III-Domäne 10, wird aber auch über mindestens zwei nicht RGD-enthaltende Bindungsstellen im Bereich der N-terminalen Zellbindungsdomäne und der C-terminalen Heparinbindungsdomäne vermittelt (Mohri, 1996) (s. Abb. 4).

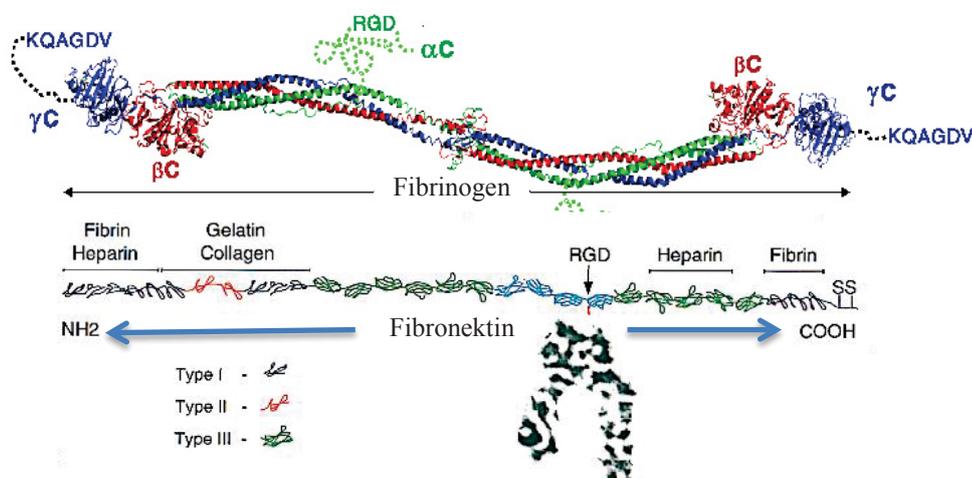


Abb. 4: Struktur des Fibrinogenhexamers und Fibronektindimers (hier als Monomer)
(Yang et al 2001; Leahy et al 1996)

Fibronectin ist durch die Interaktionen mit dem Fibronectinrezeptor $\alpha 5\beta 1$ und dem aktiviertem Fibrinogenrezeptor $\alpha IIb\beta 3$ in allen Stadien der Thrombusbildung wie der Adhäsion, dem Spreading und Clotting beteiligt (Cho und Moscher 2006). Durch seine strukturelle Ähnlichkeit mit Fibrinogen kann Fibronectin die Plättchenaggregation potentiell inhibitorisch durch Blockieren der Fibrinogenbindung bzw. synergistisch im Sinne eines Fibrinogenersatzes beeinflussen. Interessanterweise ist in vivo bei völligem Fehlen von Fibrinogen und vWF weiterhin die Thrombusbildung durch Fibronectin vor allen bei hohen Scherraten möglich. (Ni, 2000). Mengenmässig ist auf Thrombozyten der Fibronectinrezeptor $\alpha 5\beta 1$ mit lediglich 1000 Kopien/Plättchen dem Fibrinogenrezeptor $\alpha IIb\beta 3$ weit unterlegen (Gawaz, 1999). Die Plättchenadhäsion wird durch $\alpha 5\beta 1$ in bedingtem Masse auch in Abwesenheit von $\alpha IIb\beta 3$ gewährleistet. Um ein stabiles Spreading mit Ausbildung von Lamellopodien zu erreichen, bedarf es jedoch der Anwesenheit von $\alpha IIb\beta 3$ und der Tyrosinphosphorylierung von FAK und PLC $\gamma 2$ (McCarty, 2004). Die untergeordnete Rolle von $\alpha 5\beta 1$ spiegelt sich auch in der geringeren Inhibitionsleistung des $\alpha 5\beta 1$ -Antagonisten P1D6 in Bezug auf die Fibronectinentfaltung im Vergleich zu einem $\beta 3$ -Antagonisten wider (Huynh, 2013). Manganionen (Mn^{2+}) sind in vitro in der Lage, eine spezifische Konformationsänderung der Integrinektodomänen mit konsekutiver Affinitätssteigerung gegenüber Liganden hervorzurufen. Ferner stabilisieren Manganionen die Plättchen-Fibrinogen Interaktion, indem sie die MIDAS und LIMBS-Motive der βA -Domäne besetzen und die Clusterbildung fördern (Litvinov, 2004). Zudem führt die Anwesenheit von Mn^{2+} sowohl zu einer verstärkten Rezeptoraffinität als auch zu einer verstärkten Rezeptorspezifität bezüglich einzelner Liganden (Smith 1994; Gailit, 1989).

1.4 Liganden induzierte Konformationsänderung, bidirektionales Signaling

Ohne einen definierten Stimulus befindet sich der α IIb β 3-Rezeptor in einem Ruhe- oder inaktiven Zustand und weist trotz seiner umfangreichen Präsenz auf der Plättchenoberfläche praktisch keine Ligandenbindung auf. Bei der Plättchenaggregation erfährt der Rezeptor durch Agonisten wie Thrombin, ADP, Adrenalin, TXA2 und andere zunächst eine Konformationsänderung interner zytoplasmatischer Domänen, was eine erhöhte Affinität des Rezeptors gegenüber löslichen Liganden wie Fibrinogen, Fibronectin und vWF zur Folge hat. Zugrunde liegt dem ein intrinsischer rezeptormodulierender Vorgang, wobei regulatorische Signale aus dem Zytoplasma retrograd auf die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors übertragen werden. Dadurch wird makromolekularen Liganden der Zugang zu den taschenförmigen Bindungsstellen erleichtert (Faull, 1996). Dieser Vorgang der „Affinitätsmodulation“ wird durch das sog. Inside-out-Signaling vermittelt und funktioniert nur in Gegenwart der Adaptorproteine Talin und Kindlin-3 (Shattil, 2004; Moser, 2008). Adaptorproteine stellen strukturelle und funktionelle Verbindungselemente dar („Linker“), die zwischen dem Rezeptor („Integrin“) und dem Zytoskelett (Aktin/Myosin) fungieren. NMR („nuclear magnetic resonance“) Untersuchungen zeigen, dass bei aktivierten Plättchen das Adaptorprotein Talin mit dem zytoplasmatischem Endstück der β 3-Untereinheit eine Bindung eingeht. Kindlin-3 bindet weiter distal als Talin mit der β 3-Untereinheit (Moser, 2008). In der Folge kommt es zu einer Trennung der räumlichen Nähe zwischen diesen beiden Proteinen und der β 3-Untereinheit mit konsekutivem „Auseinanderspreizen“ beider zytoplasmatischen Endstücke (Vinogradova, 2002) (s. Abb. 5

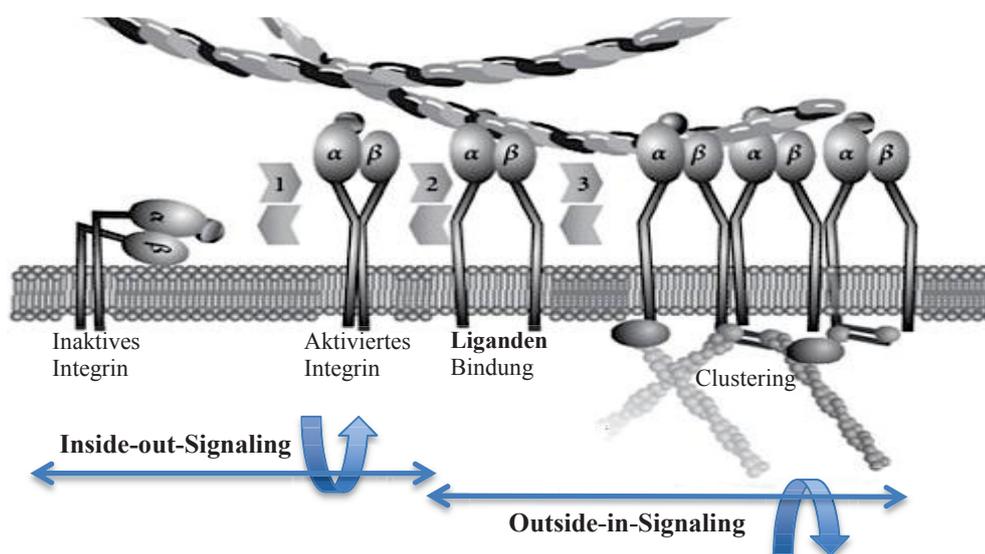


Abb. 5: Bidirektionales Signaling: Inside-out und Outside (modifiziert nach Niland et Eble, 2012)

Eine enge Assoziation zwischen den zytoplasmatischen Domänen („tails“) beider Untereinheiten ist also assoziiert mit der nichtadhäsiven Ruhekongformation, wohingegen eine Dissoziation mit Veränderungen extrazellulärer Domänen und folglich einer Affinitätssteigerung des Rezeptors vergesellschaftet ist. Da viele der Agonisten an G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden, sind bei der Transmission von Inside-Out-Signalen die PLC (Phospholipase C) und die „second messenger“ DAG

(Diacylglycerol) und IP3 (Inositoltriphosphat) essentiell. Bei der Interaktion zwischen α Ib β 3 und immobilisierten Fibrinogen oder Fibronectin wird kein vorgeschaltetes Inside-out-Signaling benötigt, da durch die veränderte Ligandenkonformation der Rezeptor direkt aktiviert wird (Coller, 1986). Zudem kommt es während der Plättchenaktivierung durch laterale Diffusion von α Ib β 3-Integrinen zum sog. „Clustering“ (Zusammenlagerung von Rezeptormolekülen). Clustering beschreibt einen Vorgang, der zusätzlich zur Affinitätsmodulation eine Ergänzung bzw. Verstärkung der sich anschliessenden Rezeptoraktivierung darstellt, indem die Avidität zum Liganden erhöht wird. Es wird begünstigt durch verschiedene Mechanismen u. a. durch Bindung mit multivalenten makromolekularen Liganden, die laterale Interaktion von Integrinen mit weiteren Membranproteinen oder die reversible Verknüpfung zum Aktinzytoskelett (Hato 1998, Shattil 1998, 2004). Die durch Clustering (=Aviditätsmodulation) induzierte Ligandenbindung ist im Gegensatz zur Affinitätsmodulation irreversibel, was mitunter durch ligandengetriggerte intrinsische Veränderungen am Rezeptor und die Rezeptorinternalisierung bedingt ist. Durch die Ligandenbindung erfährt der Rezeptor eine weitere Konformationsänderung, die mit der Freilegung neuer extra- und intrazellulärer Epitope, den sog. SyMBS (SYnergistic Metal ion-Binding Site), ehem. LIBS („Ligand-Induced Binding Site“) einhergeht (Leisner, 1999; Mondoro, 1996). In der Folge wird eine Serie von Signalkomplexen („Outside-in-Signalen“) aktiviert, welche ihren Ursprung proximal der zytoplasmatischen Domänen von α Ib β 3 haben und nachgeschaltet („downstream“) in das Zellinnere übertragen werden. Das bislang proximalste Signalereignis nach Rezeptoraktivierung ist die Bindung der G-Proteinuntereinheit $G\alpha$ 13 an die zytoplasmatische Domäne der β 3-Untereinheit, was wiederum zur Aktivierung von SFKs („Src Family Kinase“) und c-Src im speziellen führt. Die $G\alpha$ 13- β 3 Interaktion kann sowohl durch Fibrinogen (ligandeninduziert) als auch durch Thrombin (GPCR=G-Protein Coupled Receptors) ausgelöst werden (Gong, 2010). Die im Rahmen des Outside-in-Signalings nachgeschalteten Signalproteine PLC γ (Phospholipase C γ) und α -Actinin bilden eigene Signalkomplexe, die primär das Aktingerüst und die zelluläre Reorganisation beeinflussen und somit massgeblich an Adhäsion, Spreading, Sekretion von Granula und der Retraktion im Rahmen der primären und sekundären Hämostase beteiligt sind (Shattil, 2004; Li, 2010).

1.5 Die Rolle von Src beim Signaling Prozess

Die Familien der Src („cellular und sarcoma“-)Kinasen (SFKs) spielen eine kritische Rolle beim bidirektionalem Signaling. Die sekundäre Aktivierung von α Ib β 3 durch den vWF Rezeptor Glycoprotein(GP)-Ib-IX-V oder den Kollagenrezeptor GP-VI verläuft mitunter Src-abhängig (Kasirer-Friede, 2004; Shattil, 2004). Die Src-Kinase fungiert wiederum auch als Schlüsselenzym des frühen Outside-in-Signalings und ist u. a. an Spreading, Aggregation, aktinabhängigen Reorganisation des Zytoskelettes und Retraktion beteiligt (Bjorge, 2000). Src als auch Syk werden im Gegensatz zu FAK („focal adhesion kinase“) unabhängig von einer vorausgehenden Aktinpolymerisation innerhalb von Sekunden aktiviert (Inoue, 2003; Obergfell, 2002). Sowohl das Spreading als auch die Migration von

Megakaryozyten auf einer Fibronectinmatrix werden durch die Zugabe von PP1, einem Inhibitor der Src-Kinase Familie, und dem Syk-Kinase Inhibitor R406 supprimiert (Mazharian, 2010). Die Regulation von Src durch α IIb β 3 kann modellhaft in drei Aktivierungszustände unterteilt werden. In der inaktiven Form liegt c-Src konstitutiv membrangebunden vor und befindet sich in einer gefalteten, „clamped“ („geschlossenen“, gebündelten“) Konformation. Durch die Bindung des „Src-Inaktivierungsprotein“ Csk an die C-Terminale von Src kommt es zur Phosphorylierung von Src am Tyrosinrest 529 (pY529). Dadurch entsteht eine neue Bindungsstelle für die SH2-(Src Homology)Domäne und die Prolin-reiche Verbindungsregion („linker region“), welche zwischen der SH2-Domäne und der katalytischen Kinase-Domäne eingebettet ist, und kann eine Bindung mit der membrannahen SH3-Domäne eingehen. In Plättchen wird c-Src auch konstitutiv an die cytoplasmatische β 3-Untereinheit gebunden aufgrund von Wechselwirkungen zwischen der SH3-Domäne und der β 3-Untereinheit. Infolgedessen kommt es zu einer partiellen Lösung der oben genannten intramolekularen Verbindungen im Sinne einer inkompletten „unclamped“ („entfalteten“) oder „primed“ („aufbereiteten“) Konformation. Wegen der fortbestehenden Src-Phosphorylierung an pY529 durch Csk entspricht dies jedoch noch keiner kompletten Aktivierung (Huveneers und Danen, 2010; Shattil, 2004, Arias-Salgado 2003). Erst durch Ligandenbindung von z. B. Fibrinogen oder Fibronectin erfolgt eine komplette Aktivierung des Rezeptors mit vollständiger Dissoziation von Csk vom Integrinkomplex und konsekutiver Dephosphorylierung an Position Tyrosin 529. Dabei führt die Akkumulation der lokalen c-Src Konzentration zur Transautophosphorylierung am Src-Tyrosinrest 418 (s. Abb. 6). Sehr rasch kommt es in der nachgeschalteten Signaltransduktion u. a. zu einer Src-abhängigen Aktivierung von Syk bzw. Inhibition von RhoA, also der Aktivierung weiterer Rückkopplungsregelkreise („feedback loops“), die im Rahmen des Outside-in-Signalings letztlich die Reorganisation des Zytoskeletts bewirken (Li et al, 2010; Gong et al, 2010).

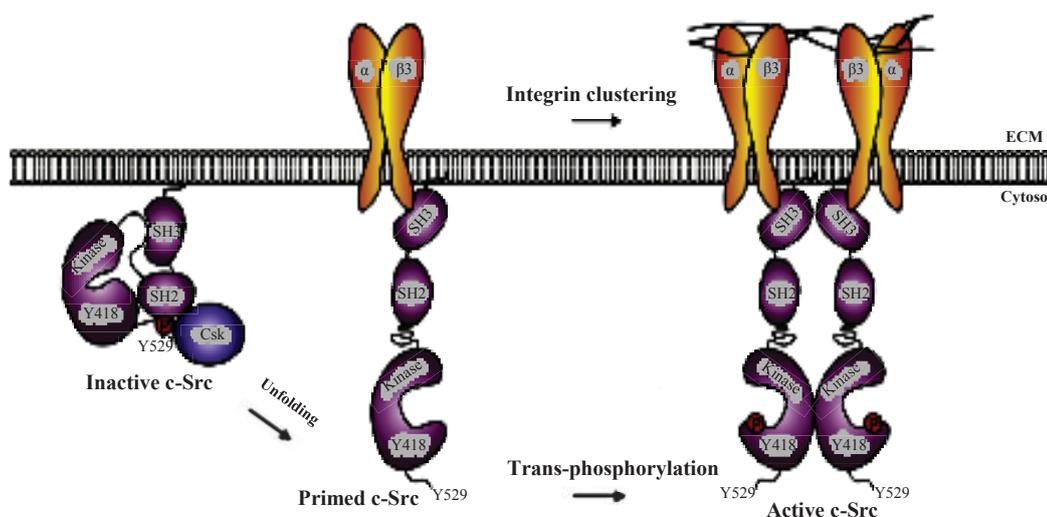


Abb. 6: model of c-Src by β 3 Integrins (modifiziert nach Huveneers and Danen, 2010)

1.6 Die Bedeutung des HPA-1-Rezeptorpolymorphismus

Der HPA-1-Rezeptorpolymorphismus beruht auf einem singulären Basenaustausch im Gen der β 3-Untereinheit. Daraus resultiert für die HPA-1b/1b Variante an Position 33 ein Prolin (Pro33) statt eines Leucins (Leu33). In der kaukasischen („weissen“) Bevölkerung ist der Anteil der heterozygoten HPA-1a/1b-Träger mit bis zu 25% recht hoch, 2% sind HPA-1b/b homozygot. In der schwarzen Bevölkerung verringert sich dieser Anteil bereits erheblich und in der asiatischen Bevölkerung ist die Pro33-Variante kaum anzutreffen (Kim, 1995). Klinische Relevanz erlangt der HPA-1-Polymorphismus bei der Auslösung allogener Immunthrombozytopenien, der posttransfusionellen Purpura und aufgrund seines prothrombogenen Potentials. Der HPA-1b/1b-Phänotyp bildet ein kongenital (leicht) erhöhtes Risiko, in jungen Jahren (<60 Jahren) bereits in frühen Stadien der KHK am Myokardinfarkt zu erkranken mit einem im Schnitt 5,2 bis 7 Jahren vorgezogenen Krankheitsbeginn (Weiss, 1996; Zotz et al., 1998 und 2005). Ferner ist das Risiko an rekurrenten Spontanaborten in der Frühschwangerschaft (10.-20. Schwangerschaftswoche) deutlich erhöht bei Frauen, die Trägerinnen des homozygoten HPA-1b-Allels sind (Ivanov, 2008). Anders als bei der KHK besteht bei der Pro33-Variante kein statistisch erhöhtes Risiko an einem Apoplex zu erkranken, obgleich im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt HPA-1b-Träger vorzufinden waren (Carsson, 1997). Kontrovers wird diskutiert, ob der HPA-1-Polymorphismus auch ursächlich an der Arterogenese beteiligt ist, da die veränderte β 3-Untereinheit auch den endothelialen Vitronektinrezeptor α v β 3 betrifft (Mikkelsen, 2001). In verschiedenen Arbeiten wurde postuliert, dass die Thrombogenität HPA-1b/1b-positiver Plättchen bedingt ist durch ein „hyperreaktives“ Rezeptorpotential. Die Aktivierung des Pro33-Rezeptors bedarf geringerer Konzentrationen von Adrenalin und ADP, zudem findet sich nach Stimulation eine gesteigerte Sekretion an α -Granula. Funktionelle Unterschiede zur HPA-1a/1a-Variante betreffen die kürzere Blutungszeit, die vermehrte Generierung von Thrombin und der erhöhte Verbrauch an Prothrombin (Michelson, 2000; Vijayan und Bray, 2006). Nach Ligandenbindung fanden sich bei der HPA-1b/1b-Variante Hinweise für ein verstärktes Outside-in-Signaling. Auf subzellulärer Ebene beobachtete man im Vergleich zur HPA-1a/1a-Variante eine erhöhte Funktion von FAK („Focal Adhesion Kinase), ERK2 („Extracellular Signal Related Kinase“) und MLCK („Myosin Light Chain Kinase“), sowie eine verstärkte Phosphorylierung/Inaktivierung der MP („PP1-Myosin Phosphatase“) am Threoninrest 696 mit konsekutiv erhöhter Phosphorylierung bzw. Aktivierung der MLC („Myosin Light Chain“) (Vijayan, 2000 und 2003). Anhand der Kristallstruktur von α I**b** β 3 liesse sich das verstärkte Outside-in-Signaling der HPA-1b/1b-Variante folgendermassen erklären: Die β -PSI-Domäne, welche Pro33 statt Leu33 enthält, ist durch diesen Umstand „starrer“ und weniger „helikal“ geartet, was wiederum nach Ligandenbindung eine Trennung der Integrin- „Beine“ und folglich eine grössere Stabilität des gestreckten, „offenen“ Kopfes begünstigen würde (S. Abb. 3 und 7) (Xiao, 2004; Vijayan, 2006). Hierdurch wird möglicherweise eine Konformationsänderung der Pro33 (HPA-1b)-Variante von α I**b** β 3 erreicht, die konsekutiv das Outside-in-Signaling positiv verstärkt und einhergeht mit einer gesteigerten Sekretion und Aggregation, sowie einer verstärkten Adhäsion, Spreading,

Gerinnselretraktion und Migration (Vijayan et al, 2000; Sajid et al, 2002).

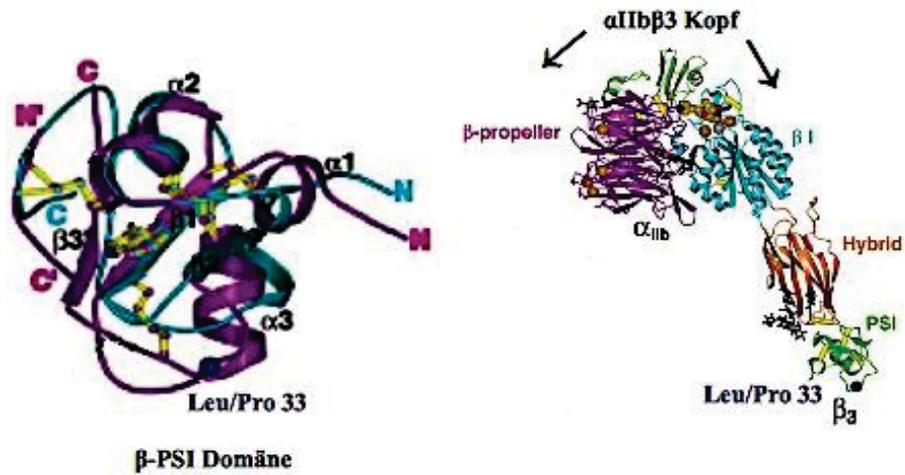


Abb. 7: Der Kopf von $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist zusammengesetzt aus dem β -Propeller der α_{IIb} Untereinheit und der β_A -Domäne (I-like Domäne) der β_3 -Untereinheit. Daran grenzen Hybrid- und PSI-Domäne der β_3 -Untereinheit, welche Sitz des Leu/Pro33 Polymorphismus ist (Xiao et al, 2004)

2 Zielsetzung

Die homozygote HPA-1b/1b-Rezeptorvariante (Pro33) unterscheidet sich von der HPA-1a/1a-Variante (Leu33) durch einen singulären Aminosäureaustausch an Position 33 der $\beta 3$ -Untereinheit. Pro33- α I**Ib** $\beta 3$ wird ein hyperreaktives Rezeptorpotential zugeschrieben. Klinisch äussert sich dieser Genotyp durch eine gering erhöhte Thrombophilieneigung, welche z. B. mit einer vorzeitigen Manifestation für Myokardinfarkte bei bestehender KHK und einer höheren Inzidenz von Frühaborten vergesellschaftet ist. Auf molekularer Ebene fand sich bei der Pro-33-Variante im Vergleich zur Leu33-Variante eine verstärkte durch Agonisten getriggerte Rezeptoraktivierung, sowie ein verstärktes Outside-in-Signaling nach Ligandenbindung, möglicherweise als Konsequenz allosterischer Mechanismen, die durch die veränderte Tertiärstruktur der Pro33-Variante bedingt ist. Ziel der vorliegenden Arbeit beinhaltet die Untersuchung der HPA-1-abhängigen Modulation der Src pY418, einem Schlüsselenzym des frühen Outside-in-Signalings. Die Aktivierung der Src pY418 wurde in Abhängigkeit der Liganden Fibronektin und Fibrinogen, sowie in Anwesenheit von Manganionen (Mn^{2+}) untersucht. Zentrale Fragestellung der Untersuchung beinhaltete relevante Unterschiede zwischen beiden Genotypen in Bezug auf die Aktivierung der Src-Kinase nach Adhäsion von gereinigten Plättchen beider Varianten auf einer Fibrinogen bzw. Fibronektinmatrix. Ferner wurde unter dem Aspekt der Genotypabhängigkeit der rezeptorverstärkende Einfluss von Mn^{2+} in Kombination mit beiden Liganden untersucht. Da postuliert wird, dass es genotyp-abhängig zu einer unterschiedlich starken Aktivierung innerhalb der bidirektionellen Signalkaskade von α I**Ib** $\beta 3$ kommt, resultiert daraus konsekutiv eine unterschiedliche Pharmakokinetik für beide Varianten des α I**Ib** $\beta 3$ -Rezeptors. Möglicherweise bilden zukünftig Signalproteine des Outside-in-Signalwegs wie die Src-Kinase einen gezielten Angriffspunkt für pharmakologische Interventionen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Enzyme

Abciximab (Reopro, Lilly)
 Acrylamid/Bisacrylamid; National Diagnostics, UK- Hessle-Hull
 AEBSF (4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Ammoniumpersulfat; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Anti-Src p418-Antikörper; Biosource (Invitrogen), Cat# 44-660G, D- Darmstadt
 Anti-v-Src(gesamt)-Antikörper; Calbiochem, Cat# OP07, D- Darmstadt
 Anti- α IIb-Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, D- Heidelberg
 Antipain Dihydrochlorid; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Apyrase; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Advanced Western Blot Kit; Amersham GE Healthcare, D- Freiburg
 Bromphenolblau; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 BSA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Chymostatin; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Coomassie R 250; Invitrogen, D- Darmstadt
 D-Glukose; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 DMSO; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 DTT; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 ECL Western Blotting Detection Reagents 1+2; Amersham GE Healthcare, D- Freiburg
 Essigsäure; Merck Chemicals, D- Darmstadt
 Ethanol per Analysis; Merck Chemicals, D- Darmstadt
 Glycin 99 %; Roth, D- Karlsruhe
 Glycerol; Bio-Rad Laboratories GmbH, D- München
 HCl 37 %; Merck Chemicals, D- Darmstadt
 Humanes Fibrinogen; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Humanes Fibronectin; Calbiochem, D- Darmstadt
 HRP-labeled anti-rabbit-antibody; BioRad Laboratories GmbH, D- München
 Isotone NaCl-Lösung; Braun, D-Melsungen
 Leupeptin Trifluoroacetate; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Manganchlorid; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Methanol per Analysis; Merck Chemicals, D- Darmstadt
 Mercaptoethanol; Roth, D- Karlsruhe
 NaCl, Na₂PO₄, NaHCO₃, NaF, Na₃VO₄; Merck Chemicals, D- Darmstadt
 PBS Pufferlösung, pH 7,1
 Pepstatin A; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Ponceau S; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Precision Plus Protein Western C Standards (ECL Marker); BioRad Laboratories GmbH, D- München
 Precision Plus Protein Standards (Dual Color); BioRad Laboratories GmbH, D- München
 Prostaglandin E1; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Protein-Assay-Dye-Reagent-Concentrate
 PVDF Immunblotting Membran; BioRad Laboratories GmbH, D- München
 SDS Solution 20 %; Roth, D- Karlsruhe
 SuperSignal West Dura Chemiluminescent Detection Kit; Pierce Protein Research Products
 TEMED; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Thrombin; Nobis, D- Endingen
 Tris Base; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Tris-Glycin Gel (4-12 %); Invitrogen, D- Darmstadt
 Triton X-100; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München
 Tween 20; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D- München

3.1.1 Puffer und Lösungen

Tyrodepuffer: (pH 7,3)

- 137 mM NaCl
- 2,9 mM KCl
- 0,42 mM Na₂PO₄
- 1,19 mM NaHCO₃
- 5,5 mM D-Glukose

6 X DTT Probenpuffer:

- 350 mM Tris-HCl (pH 6,8)
- 30 % Glycerin
- 13 % SDS
- 9,3 % DTT
- 0,1 % Bromphenolblau

10 X TBS Puffer, pH 7,6 (Stammlösung):

- 200 mM Tris-HCl
- 1.37 M NaCl

TBS-T (Gebrauchslösung):

- 1X TBS Puffer, pH 7,6 (Stock Solution)
- 0,1% Tween 20

5X TGE (Stammlösung)

- 120 mM Tris Base
- 950 mM Glycin
- 0,5% SDS

Laufpuffer:

- 1X TGE

10X Towbin Puffer (Stammlösung):

- 120 mM Tris base
- 960 mM Glycin

Transferpuffer (Gebrauchslösung):

- 1X Towbin Puffer
- 20% Methanol
- 0,033% SDS

Blocking Puffer

- 5% BSA in TBS-T

Lysispuffer:

- 20 mM TrisHCl pH 7,4
- 145 mM NaCl
- 0,5 % Triton X-100
- 2 mM Na₃VO₄
- 1 mM NaF
- 1 mM AEBSF
- 1 µM Pepstatin A
- 15 µg/ml Chymostatin
- 15 µg/ml Antipain HCl
- 40 µg/ml Leupeptin
- 1 % Phosphatase Inhibitor Cocktail 1
- 1 % Phosphatase Inhibitor Cocktail 2
- 5 µg/ml Aprotinin

3.1.2 Westernblotgele

8 % SDS Polyacrylamid Separating Gel (15 ml pro Gel)

- 4 ml 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid,
- 3,75 ml 1,5 M Tris-HCl/ 0,4 % SDS pH 8,8,
- 7,25 ml H₂O
- 0,1 ml 10 % Ammoniumpersulfat
- 0,01 ml TEMED

3,9 % Polyacrylamid Stacking Gel (5 ml pro Gel)

- 0,65 ml 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid
- 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl/ 0,4 % SDS pH 6,8,
- 3,05 ml H₂O,
- 50 µl Ammoniumpersulfat 10 %,
- 5 µl TEMED

3.1.3 Primäre Antikörper (Tabelle 1)

Antikörper (AK)	Spezies	Verdünnung
Anti-Src [pY ⁴¹⁸] AK	Kaninchen (polyclonal)	1:1000 in 2,5% BSA und TBS-T
Anti-vsrc AK	Maus (monoclonal)	1:100 in 2,5% BSA und TBS-T
Anti-αIIb AK	Kaninchen (polyclonal)	1: 400 in TBS-T

3.1.4 Sekundäre Antikörper (Tabelle 2)

Antikörper (AK)	Spezies	Verdünnung
Anti-Maus IgG AK, HRP-gekoppelt	Schaf (polyclonal)	1: 5000 in TBS-T
Anti-Kaninchen IgG AK, HRP-gekoppelt	Esel (polyclonal)	1: 5000 in TBS-T
Precision Strep Tactin, HRP-gekoppelt		1: 5000 in TBS-T

3.2 Methoden

3.2.1 Plättchenpräparation

Die Plättchenpräparation wurde aus dem Vollblut von Probanden mit bekannten homozygoten HPA-1a/1a bzw. HPA-1b/1b-Genotyp durchgeführt, Probanden heterozygoter Genotypen (HPA-1a/1b) wurden ausgeschlossen. Die Probanden waren körperlich gesund und hatten zwei Wochen vor der bevorstehenden Blutentnahme keine thrombozytenfunktionshemmenden Medikamente wie ASS, Thienopyridine (Clopidogrel, Ticlopidin), Fibrinogenrezeptorantagonisten (Abciximab) oder andere

unspezifische COX-Hemmer wie Ibuprofen erhalten. Die Blutentnahme erfolgte mit fünf 9 ml-Citratröhrchen (Fa. Sarstedt), denen unmittelbar vorher je 45 µl PGE₂ (1 mM Stammlösung) zugesetzt wurde. Das erste Blutentnahmeröhrchen wurde verworfen, um den Einfluss der plättchenaktivierenden Wirkung von Tissue Factor, welcher initial bei Gefäßwandläsionen freigesetzt wird, so gering wie möglich zu halten. Die mit Vollblut und PGE₂ befüllten Citratröhrchen wurden bei Raumtemperatur für 3 min bei 2350 RPM (750 x g) im Soft-Modus zentrifugiert (Hettich Zentrifuge Universal 30 RF, Ø 24,4 cm). Im abgenommenen Überstand befindet sich das plättchenreiche Plasma (PRP). Zu je 2 ml PRP wurden je 2 ml PBS pH 6,5 und 40 µl (500 U/ml) Apyrase hinzugefügt. Danach erfolgte ein zweiter Zentrifugationszyklus bei Raumtemperatur für 6 min bei 2500 RPM (850 x g) ohne Soft-Modus. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in Tyrodepuffer ohne Zusatz von Ca²⁺ oder Mn²⁺ resuspendiert. Die für die Adhäsionsversuche benötigte Zielplättchenkonzentration betrug 1 X 10⁹ Plättchen/ml und wurde durch den Sysmex Counter (Sysmex K-4500, D- Langenfeld) bestimmt.

3.2.2 Plättchenadhäsion

Beschichtung der 6-well Platten (Greiner Labortechnik, D- Frickenhausen)

(Tabelle 3)

	6 well Platten (Volumen)	12 well	24 well
Liganden: Fibrinogen 100 µg/ml Fibronectin 100 µg/ml hitzeinaktiviertes BSA 1% (Negativkontrolle)	500 µl	150 µl	100 µl
hitzeinaktiviertes BSA 1% (Saturation)	1000 µl	300 µl	200 µl
PBS pH 7,3	1600 µl	600 µl	400 µl
10 ⁹ /ml gewaschene Plättchen ± MnCl ₂ (0,5 mM) 10 ⁹ /ml gewaschene Plättchen ± Abciximab (10µg/ml)	500 µl	150 µl	60 µl
Lysispuffer	500 µl	150 µl	100 µl

Die Böden der 6-Well-Platten wurden mit den entsprechenden Liganden (s. Tabelle 3) beschichtet und bei 4 °C im Kühlschrank über Nacht bzw. bei 37 °C, 5 % CO₂ im Zellkulturbrutschrank für 1 Std. inkubiert. Hierbei kam es zur Bindung des Liganden an das Polystyren des Plattenbodens. Anschliessend wurden die Wells mit 1 % BSA für 2 X 5 min blockiert. Die Plättchen binden nur an den Liganden und nicht an BSA. Die Wells wurden hiernach mit PBS pH 7,3 gewaschen und die gewaschenen Plättchen in einer Konzentration von 10⁹/ml zu den Wells hinzugefügt (s. Tabelle 3). Bei den Plättchen, die mit 10 µg/ml Abciximab bzw. mit 0,5 mM MnCl₂ behandelt wurden, handelte es sich um sog. präinkubierte Plättchen. D. h. einem definierten Volumen von 10⁹ Plättchen/ml wurde

Abciximab zugesetzt und für 1 Std. bei 37 °C, 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert und/oder einer kurzen Inkubationszeit von 3 min mit MnCl₂ bei Raumtemperatur (RT) unterzogen. Hiernach wurden die einzelnen Plättchensuspensionen ± MnCl₂ bzw. ± Abciximab bei 37 °C, 5 % CO₂ für 2,5, 5, 10, 20 und 40 min auf die mit den jeweiligen Liganden beschichteten Wells im Brutschrank inkubiert. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden die nichtadhärenten Plättchen abgenommen und verworfen. Die adhärenen Plättchen wurden nach einmaligem Waschen mit TBS-T (TRIS-buffered Saline mit 0,1% Tween20) mit Lysispuffer für 30 min auf Eis lysiert. Die nicht lysierten Zellreste im Pellet wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und bei 14,000 RPM (16000 x G) in einer Eppendorf Zentrifuge 5415R entfernt und das Proteinlysate in neue Eppendorf Röhren überführt. Als Negativkontrollen wurden sowohl je 50 µl Suspension von ruhenden Plättchen als auch die nicht adhärenen Plättchen auf der BSA Matrix in 400 µl Lysispuffer lysiert. Es erfolgte abschliessend die photometrische Proteinbestimmung nach Bradford.

3.2.3 Photometrische Proteinbestimmung (Bradford Methode)

Erstellen einer BSA Standardverdünnungsreihe mit 10 mg/ml BSA (Stammlösung) in Lysispuffer. (Tabelle 4)

BSA Standardlösungen	100 µg/ml	250	500	750	1000	1500
BSA (10 mg/ml Stammlösung)	1 µl	2,5 µl	5 µl	7,5 µl	10 µl	15 µl
Lysispuffer	99 µl	97,5 µl	95 µl	92,5 µl	90 µl	85 µl

Die Proteinkonzentration in den Proben wurde mittels einer BSA Standardverdünnungsreihe bestimmt. Hierzu wurde zwecks Standardisierung nach der Vorbereitung des Farbstoffes (Protein-Assay-Dye-Reagent-Concentrate von BioRad 1:4 in H₂O verdünnt) 8 µl von der jeweiligen BSA Standardprobe mit 400 µl des verdünnten Farbstoff in eine Küvette (8,5 mm Küvettenlänge, Fa Sarstedt) zusammengeführt. Nach 8 minütiger Inkubation bei RT erfolgte die photometrische Messung der BSA-Proteinkonzentrationen bei 595 nm Wellenlänge. Nach erfolgreicher Standardeinstellung erfolgte die Proteinmessung in den Proben, indem je 8 µl von den Proben aus den Adhäsionsversuchen mit 400 µl des verdünnten Farbstoff in eine Küvette zusammengeführt und nach 8 minütiger Inkubation die Proteinkonzentration photometrisch gemessen wurde. Als Leerprobe wurde Lysispuffer verwendet.

3.2.4 Alternative Proteinbestimmung durch Quantifizierung von Elektrophorese-Gelen, die mit Coomassieblau gefärbt wurden

Nach Zellyse und Proteinextraktion wurde jeweils ein definiertes Volumen von 15 µl Proteinlösung pro Tasche eines industriell vorgefertigten 4-12 % Tris Glycin Gels befüllt und anschliessend die Elektrophorese für 1,5 Std bei 25 mA/Gel in einer Gelelektrophoresekammer von Peqlab Biotechnologie GmbH (D-Erlangen) durchgeführt. Hiernach wurde das Gel zunächst für 30 min bei RT in einer Fixierlösung (40 % Methanol und 10 % Essigsäure) fixiert und für 1 Std. bei RT mit 10 % Coomassieblau gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit einer Entfärberlösung (12 % Methanol und 7 % Essigsäure) für 30 min bei RT. Je nach Färbungsintensität des Gels musste das Gel erneut entfärbt werden. In einem letzten Schritt erfolgte die Fixierung in 1 % Glycerol, danach wurde das Gel im ChemiDoc XRS Imaging Tower fotografiert und mit Hilfe der QuantityOne 4.6.5. Imaging Software von BioRad quantifiziert. Die Proteinbestimmung erfolgte anhand der densitometrisch ermittelten Daten mittels 3-Satzverfahren.

3.2.5 Westernblot Analyse

Für die Westernblots wurden 8 % SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 6-fach DTT Sample-Buffer bei 100 °C für 7 min aufgeköcht. Die aufgetragene Proteinmenge der jeweiligen Probe betrug 25 µg. Als Molekulargewichtsmarker diente der Precision Plus Protein Standards (s. Chemikalien und Enzyme). Die Proteinelektrophorese erfolgte für 1,5 Std. bei 25 mA/Gel in einer Gelelektrophoresekammer von Peqlab Biotechnologie GmbH (D-Erlangen). Danach wurde das Gel in Transferpuffer für 15 min äquilibriert. Die zuvor auf die Gelgrösse zurecht geschnittenen PVDF Membran (0,2 µm) wurde für 1 min in Methanol äquilibriert, danach zusammen mit dem Filterpapier und den Schwämmen für 15 min in Transferpuffer getränkt. Der Tank wurde mit dem zuvor auf 4 °C abgekühlten Transferpuffer aufgefüllt, anschliessend wurden Membran, Gel, Filterpapier und Schwämme mittels Sandwichverfahren geschichtet. Das Blotting in der Blotting Kammer (Novel Experimental Technology, US - San Diego) erfolgte bei 50 Volt über 1 Std. Hiernach wurde die Membran zunächst zwecks Kontrolle eines erfolgreichen Proteintransfers einer reversiblen Färbung mit Ponceau Rotfärbelösung (5 % Ponceau S, 1 % Essigsäure) für 1 min unterzogen. Das Entfärben wurde unter visueller Kontrolle mit bidest. Wasser durchgeführt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Anschliessend wurde die Membran 2 X 5 min in TBS-T gewaschen und 1 Std. bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank in Blockingbuffer geblockt, um mögliche unspezifische freie Bindungsstellen zu besetzen. Die Inkubation der Membran mit dem spezifischen Antikörper (s. Tabelle 1) erfolgte über Nacht bei 4 °C oder über 2 Std. bei RT. Danach wurde die Membran erneut mit TBS-T für 2 X 5 min gewaschen und mit dem 2. Antikörper (s. Tabelle 2) sowie einem Lumineszenzmarker für den Molekularmarker (Precision Strep Tactin, BioRad) über 1,5 Std. bei RT inkubiert. Es erfolgte ein Waschgang der Membran mit TBS-T für 4 X 5 min. Im Anschluss wurde die Membran mit ECL Western Blotting Reagents 1+2 im Verhältnis 1:1 für 2 min inkubiert und bei

unterschiedlichen Belichtungszeiten im ChemiDoc XRS Imaging Tower belichtet. Bei niedrigen Proteinkonzentrationen ist die durch ECL erreichte Signalstärke teilweise nicht ausreichend gewesen. In diesen Fällen wurde die Membran erneut mit TBS-T für 3 X 5 min gewaschen und mit Super Signal West Dura Chemiluminescent Detection Kit für 5 min inkubiert und erneut belichtet.

3.2.6 Densitometrische Auswertung, Statistik

Die densitometrische Auswertung der spezifischen Banden erfolgte mit Hilfe der QuantityOne 4.6.5. Imaging Software von BioRad. Hierzu wurde zu den verschiedenen Zeitpunkten (2,5, 5, 10, 20 und 40 min., bzw. Kontrolle) in Bezug auf die jeweiligen Rezeptorphänotypen und der oben genannten Liganden der Quotient aus dem densitometrisch ermittelten Wert der Src [pY⁴¹⁸]-Aktivierung durch den α IIb Wert (=totale Rezeptordichte) gebildet, entsprechend

$$\sim \frac{\text{aktiviertes Src [pY}^{418}\text{]}}{\text{gesamtes Src}}$$

Rezeptorphänotyp	Zeitpunkte	Liganden
Src [pY ⁴¹⁸] (HPA 1a/1a) α IIb (HPA 1a/1a) bzw.	2,5, 5, 10, 20 und 40 min., bzw. Kontrolle	Fibrinogen 100 μ g/ml \pm MnCl ₂ (0,5 mM) \pm Abciximab (10 μ g/ml) Fibronectin 100 μ g/ml \pm MnCl ₂ (0,5 mM) \pm Abciximab (10 μ g/ml) hitzeinaktiviertes BSA 1% (Kontrolle)
Src [pY ⁴¹⁸] (HPA 1b/1b) α IIb (HPA 1b/1b)	2,5, 5, 10, 20 und 40 min., bzw. Kontrolle	Fibrinogen 100 μ g/ml \pm MnCl ₂ (0,5 mM) Fibronectin 100 μ g/ml \pm MnCl ₂ (0,5 mM) hitzeinaktiviertes BSA 1% (Kontrolle)

Der Direktvergleich zwischen den Src-Aktivitäten beider Rezeptorphänotypen erfolgte analog zu der oben genannten Quotientenbildung, indem in Abhängigkeit von Zeit und Ligand der Quotient gebildet wurde aus:

$$\frac{\text{Src pY}^{418}/\alpha\text{IIb (HPA 1b/1b)}}{\text{Src pY}^{418}/\alpha\text{IIb (HPA 1a/1a)}}$$

Die Statistik wurde mit Hilfe der GraphPad Prism Software durchgeführt. Zur Anwendung kam der ungepaarte t-test. Die zu allen Adhäsionszeitpunkten ermittelten Quotienten (jeweils n=3) wurden in Abhängigkeit vom Liganden und/oder des Rezeptorphänotyps miteinander verglichen und auf signifikante Unterschiede geprüft (p<0,05 bzw. p<0,01).

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche

Zunächst erfolgten Vorversuche, um die Sensitivität der Untersuchungstechnik zu validieren. Ein Vorversuch erfolgte mit Thrombin, um die Aktivierbarkeit von Src zu testen. Thrombin initiiert nach Bindung an den G-Protein gekoppelten Thrombinrezeptor ein Inside-out-Signaling, was eine Konformationsänderung des α IIb β 3-Rezeptors und unter anderem die Phosphorylierung der Src-Kinase am Tyrosinrest an Position 418 zur Folge hat. Als Negativkontrolle dienten ruhende Plättchen, als Referenzprotein das gesamte Src-Protein. Um die Src-Aktivierung zu quantifizieren und somit Rückschlüsse auf die Rezeptoraktivierung treffen zu können, wurde der Quotient aus den densitometrisch ermittelten Werten von Src pY418 und vSrc (gesamtes Src) gebildet. Hierbei zeigte sich die geringste Src-Aktivierung bei Lysaten von ruhenden Plättchen im Vergleich zu mit Thrombin aktivierten Plättchen, die das 10-fache der Src-Aktivierung aufwiesen (Abb. 8)

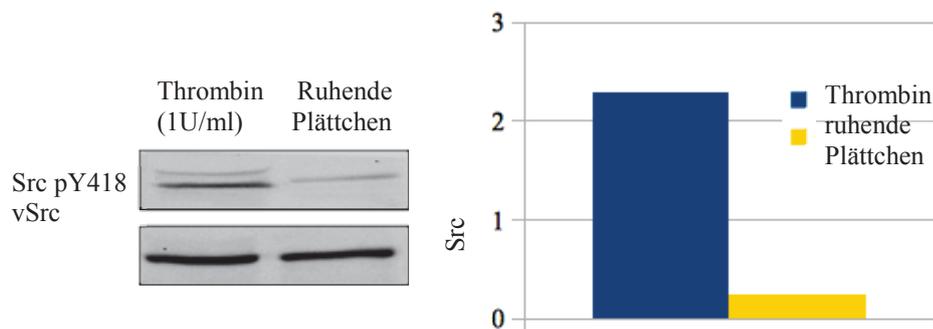


Abb. 8: Src Aktivierung in humanen HPA 1a/1a positiven Plättchen durch Thrombin

Gewaschene Plättchen (HPA 1a/1a) in Suspension wurden mit Thrombin (1 U/ml) 2 min. bei 37°C inkubiert. Zugabe von 2-fach Lysispuffer zu gleichen Volumenanteilen wie die Plättchensuspension, um eine weitere Aktivierung zu stoppen. Je 25 μ g lysiertes Protein wurden hiernach auf 8 % SDS Polyamidgel aufgetrennt, die Westernblots mit anti-Src pY418 bzw. mit anti-vSrc-Antikörpern inkubiert und densitometrisch ausgewertet. Westernblotbilder und densitometrische Daten entsprechen einem repräsentativen Versuch.

4.2 Kontrolle zur Spezifität der Src-Kinase beim Outside-in-Signaling

Die Spezifität der Src-Aktivierung beim Outside-in-Signaling während der Adhäsion wurde unter Zuhilfenahme des α Ib β 3-Rezeptorantagonisten Abciximab untersucht. Die Adhäsion von HPA-1a/1a-positiven Plättchen auf immobilisiertem Fibronektin bzw. Fibrinogen jeweils in Kombination mit bzw. ohne Mn^{2+} für die Dauer von 30 min führte zu einer spezifischen Src-Aktivierung. Diese lag bei den mit Mn^{2+} und Fibronektin behandelten HPA-1a/1a-Plättchen etwa 1,4-fach höher im Vergleich zur alleinigen Fibronektinadhäsion. In Verbindung mit Fibrinogen und Mn^{2+} wurde sogar eine mehr als 3-fach höhere Src-Aktivierung im Vergleich zu den Proben ohne Mn^{2+} -Zusatz beobachtet. Durch die 60 min. Vorinkubation der Plättchen mit dem α Ib β 3-Rezeptorantagonisten Abciximab liess sich bei den Fibrinogen $\pm Mn^{2+}$ bzw. Fibronektin $\pm Mn^{2+}$ adhärenen Plättchen auch indirekt eine Inhibition der Src-Aktivierung erzielen. Dabei fand sich nach Abciximab-Behandlung bei allen Gruppen eine ähnliche niedrige Src-Grund oder -Schwellenaktivität. Aufgrund der starken Src-Aktivierung bei Plättchen, die in Anwesenheit von Mn^{2+} auf Fibrinogen adhärten, konnte durch die Rezeptorblockade mit Abciximab auch eine entsprechende Reduktion der Src-Aktivierung um mehr als 70 % erreicht werden. Bei den mit Fibrinogen sowie Fibronektin + Mn^{2+} behandelten Plättchen wurde durch Abciximab eine Minderung um ca. 40% erzielt. In Verbindung mit Fibronektin zeigte sich eine Reduktion der Src-Aktivierung um 30% (Abb. 9).

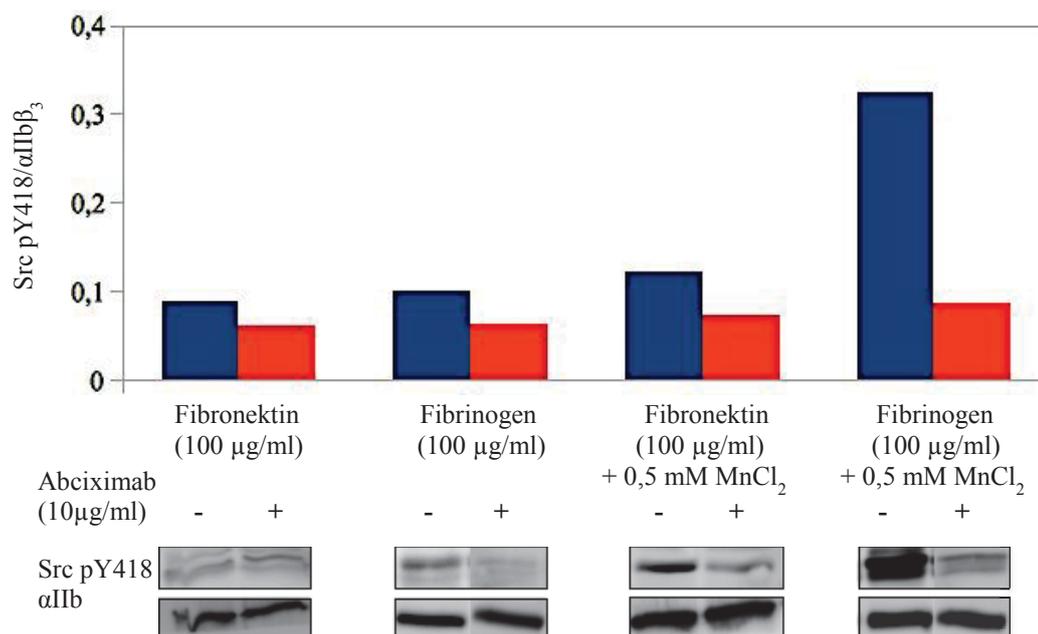


Abb. 9: Inhibition der Src-Aktivierung in HPA-1a/1a-positiven Plättchen unter verschiedenen statischen Adhäsionsbedingungen

Gewaschene Plättchen wurden mit 10 µg/ml Abciximab 1 Std. bei 37°C inkubiert. Anschliessend erfolgten statische Adhäsionsversuche über 20 min unter den in der Abszisse angegebenen Bedingungen. Westernblot und densitometrische Daten wurden einmalig im Rahmen eines repräsentativen Versuches durchgeführt.

4.3 Ligandenabhängige Src-Aktivierung in humanen HPA-1a/1a (Leu33) Plättchen

Zunächst erfolgte die Untersuchung α IIb β 3-ligandenabhängiger Unterschiede in Bezug auf die Src-Aktivierung. HPA-1a/1a-Plättchen, die auf immobilisiertem Fibrinogen adhärten, zeigten stets eine höhere Src-Aktivierung als nach Fibronectinadhäsion. Es fand sich sowohl nach Fibrinogen- als auch nach Fibronectinadhäsion zwischen 2,5 min und 5 min ein vorübergehender Abfall, im weiteren Verlauf zwischen 5 min und 40 min dann eine leichte Steigerung der Src-Aktivierung (Abb. 10 und Abb. 13). Die erhöhte Src-Aktivierung nach 2,5 min, die nach Adhäsion mit beiden Liganden auftrat, ist möglicherweise Folge des Ausplattierungsverfahrens im Rahmen der Proteinextraktion durch das Einwirken von Scherkräften während des Wasch- und Lysevorgangs.

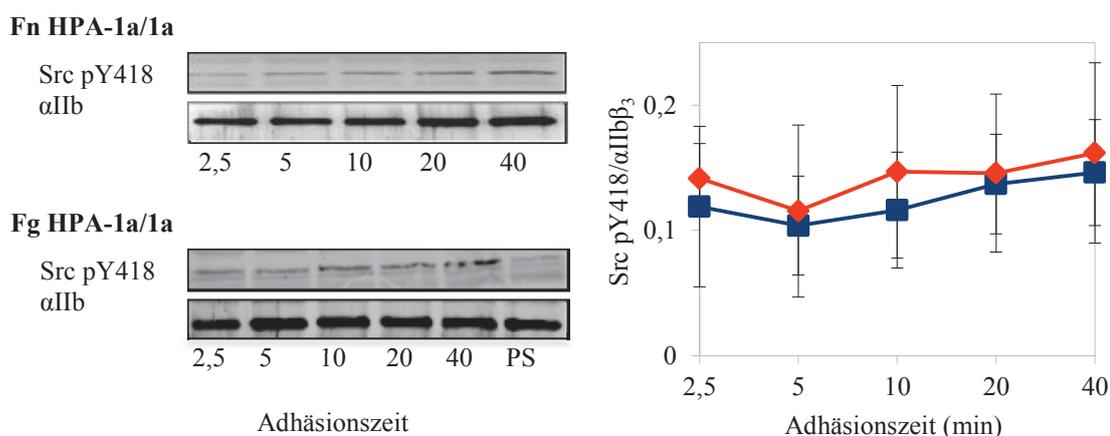


Abb. 10: Src-Aktivierung in humanen HPA-1a/1a positiven Plättchen auf immobilisiertem Fibronectin bzw. Fibrinogen unter statischen Adhäsionsbedingungen

Gewaschene Plättchen (HPA-1a/1a) in Suspension (PS= Plättchensuspension) wurden entweder auf 100 μ g/ml immobilisierten Fibronectin (Fn) bzw. 100 μ g/ml immobilisierten Fibrinogen (Fg) für 2,5, 5, 10, 20 und 40 min bei Raumtemperatur zur Adhäsion gebracht. Jeweils 25 μ g lysierte Proteinproben wurden hiernach in einem 8 % SDS Polyamidgel aufgetrennt. Die Westernblots wurden mit anti-Src pY418 bzw. mit anti- α IIb β 3-Antikörpern inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Westernblotbilder und densitometrische Daten sind repräsentativ für 3 Versuche \pm SD. p zu allen Zeitpunkten nicht signifikant. Die Fehlerbalken entsprechen den jeweiligen Mittelwerten \pm SD.

- 100 μ g/ml immobilisierten Fibronectin (Fn)
- ◆ 100 μ g/ml immobilisierten Fibrinogen (Fg)

4.4 Ligandenabhängige Src-Aktivierung in humanen HPA-1a/1a (Leu33) Plättchen in Anwesenheit von Mn^{2+} -Kationen

Im folgenden Teil der Arbeit wurde der Effekt des divalenten Kations Mn^{2+} auf die Src-Aktivierung von Plättchen, die auf Fibrinogen bzw. Fibronectin adhärten, untersucht. Manganionen (Mn^{2+}) können durch Induktion einer spezifischen Konformationsänderung der Integrinectodomänen und Integrin-Clusterbildung die Affinität und Avidität gegenüber Liganden modulieren. Der zusätzliche Einfluss von Mn^{2+} in Verbindung mit der Ligandenadhäsion hatte eine deutliche Zunahme der Src-Aktivierung zur Folge. Bei der HPA-1a/1a-Variante fanden sich bei den mit Mn^{2+} und Fibrinogen coadhärenten Plättchen im Vergleich zu den Plättchen, die alleinig auf immobilisierten Fibrinogen adhärten nach 10 min eine 2-fache, nach 20 min eine 2,5-fache und nach 40 min eine mehr als 3-fache Steigerung der Src-Aktivierung (Abb. 11 und Abb. 13).

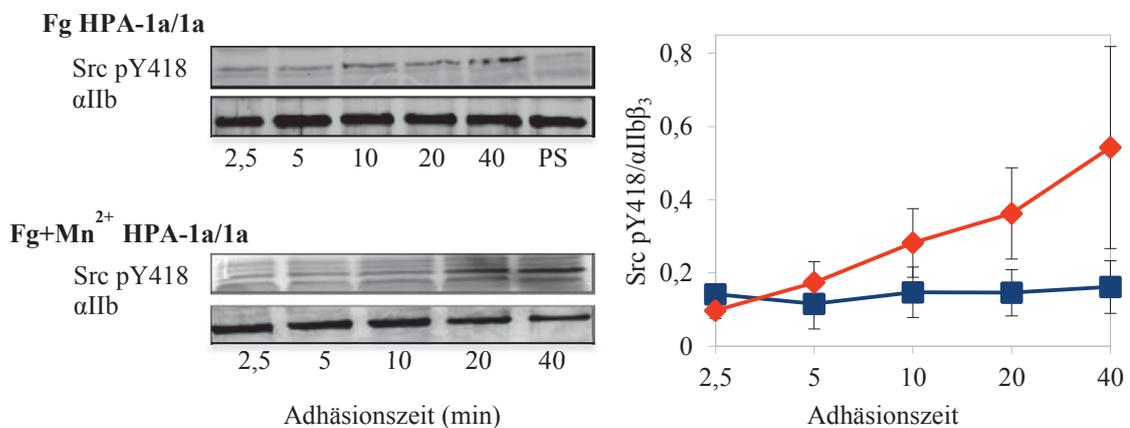


Abb. 11: Src-Aktivierung in humanen HPA-1a/1a positiven Plättchen auf immobilisiertem Fibrinogen mit bzw. ohne $MnCl_2$ Zugabe unter statischen Adhäsionsbedingungen

Gewaschene Plättchen (HPA-1a/1a) in Suspension (PS= Plättchensuspension) wurden auf 100 μ g/ml immobilisierten Fibrinogen (Fg) jeweils mit bzw. ohne 0,5 mM $MnCl_2$ für 2,5, 5, 10, 20 und 40 min bei Raumtemperatur zur Adhäsion gebracht. Jeweils 25 μ g lysierte Proteinproben wurden hiernach in einem 8 % SDS Polyamidgel aufgetrennt. Die Westernblots wurden mit anti-Src pY418 bzw. mit anti- α IIb₃-Antikörpern inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Westernblotbilder und densitometrische Daten sind repräsentativ für 3 Versuche \pm SD. p zu allen Zeitpunkten nicht signifikant. Die Fehlerbalken entsprechen den jeweiligen Mittelwerten \pm SD.

- 100 μ g/ml immobilisierten Fibrinogen (Fg)
- ◆ 100 μ g/ml immobilisierten Fibrinogen (Fg) + 0,5 mM $MnCl_2$ (Fg+ Mn^{2+})

In Verbindung mit Fibronectin und Mn^{2+} verlief die Src-Aktivierung moderater, in ihrem Verlauf jedoch analog zu den mit Mn^{2+} und Fibrinogen behandelten Plättchen. Im Vergleich zur alleinigen Fibronectinadhäsion fanden sich in Anwesenheit von Mn^{2+} zu den frühen Zeitpunkten 2,5 und 5 min zunächst noch keine Unterschiede. Bei 20 min zeigte sich dann eine 1,5-fache, bei 40 min eine 2,5-fach höhere Src-Aktivierung (Abb. 12 und Abb. 13).

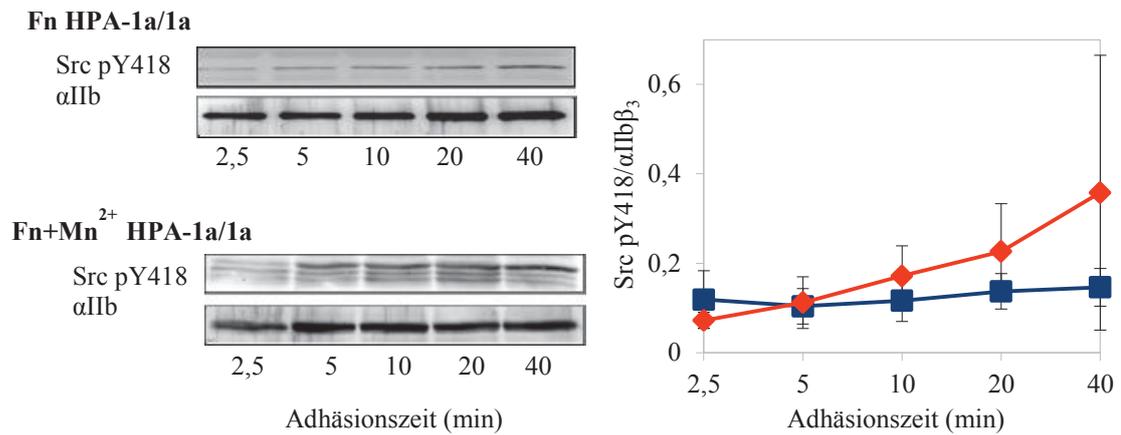


Abb. 12: Src-Aktivierung in humanen HPA-1a/1a positiven Plättchen auf immobilisiertem Fibronectin mit bzw. ohne MnCl₂ Zugabe unter statischen Adhäsionsbedingungen

Gewaschene Plättchen (HPA-1a/1a) in Suspension wurden auf 100 µg/ml immobilisiertem Fibronectin (Fn) jeweils mit bzw. ohne 0,5 mM MnCl₂ für 2,5, 5, 10, 20 und 40 min bei Raumtemperatur zur Adhäsion gebracht. Jeweils 25 µg lysierte Proteinproben wurden hiernach in einem 8 % SDS Polyamidgel aufgetrennt. Die Westernblots wurden mit anti-Src pY418 bzw. mit anti- α IIb₃-Antikörpern inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Westernblotbilder und densitometrische Daten sind repräsentativ für 3 Versuche \pm SD. p zu allen Zeitpunkten nicht signifikant. Die Fehlerbalken entsprechen den jeweiligen Mittelwerten \pm SD.

- 100µg/ml immobilisiertes Fibronectin (Fn)
- ◆ 100µg/ml immobilisiertes Fibronectin (Fn) + 0,5 mM MnCl₂ (Fn+Mn²⁺)

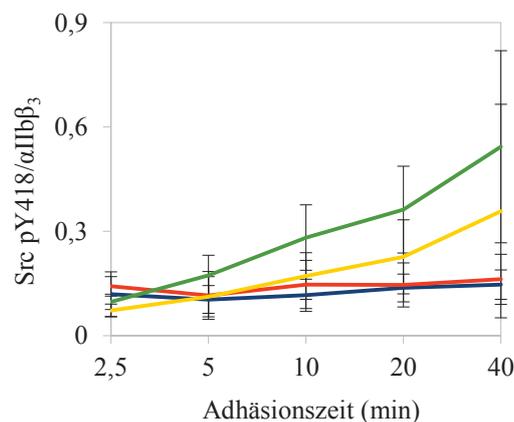


Abb. 13: Direkter Vergleich der Src-Aktivierung in humanen HPA-1a/1a Plättchen unter verschiedenen Adhäsionsbedingungen

Vergleich der in den Abb. 9-11 dargestellten Ergebnisse in einem Gesamtdiagramm. Die Fehlerbalken entsprechen den jeweiligen Mittelwerten \pm SD.

- 100µg/ml immobilisiertes Fibronectin
- ◆ 100µg/ml immobilisiertes Fibrinogen
- ▼ 100µg/ml immobilisiertes Fibronectin + 0,5mM MnCl₂
- ▲ 100µg/ml immobilisiertes Fibrinogen + 0,5mM MnCl₂

4.5 Ligandenabhängige Src-Aktivierung in humanen HPA-1b/1b (Pro33) Plättchen

Bei den auf Fibrinogen adhärenen Pro33-Plättchen (HPA-1b/1b) zeigte sich im Vergleich zur Leu33-Variante eine schnellere Zunahme der Src-Aktivierung mit Höchstwerten nach 10-min. Adhäsion und anschließender Abnahme der Src-Aktivierung. Auch beim HPA-1b/1b-Genotyp wurde nach Fibrinogenadhäsion stets eine höhere Src-Aktivierung als nach Fibronectinadhäsion erzielt (Abb. 14 und Abb. 17). Auf der Fibronectinmatrix fand sich bei der HPA-1b/1b-Variante nach 2,5 min Adhäsionszeit ähnlich wie bei der HPA-1a/1a-Variante nach Fibrinogenadhäsion eine leicht erhöhte Src-Aktivierung, möglicherweise als Folge des Einwirkens von Scherkräften während des Wasch- und Lysevorgangs bei der Proteinextraktion.

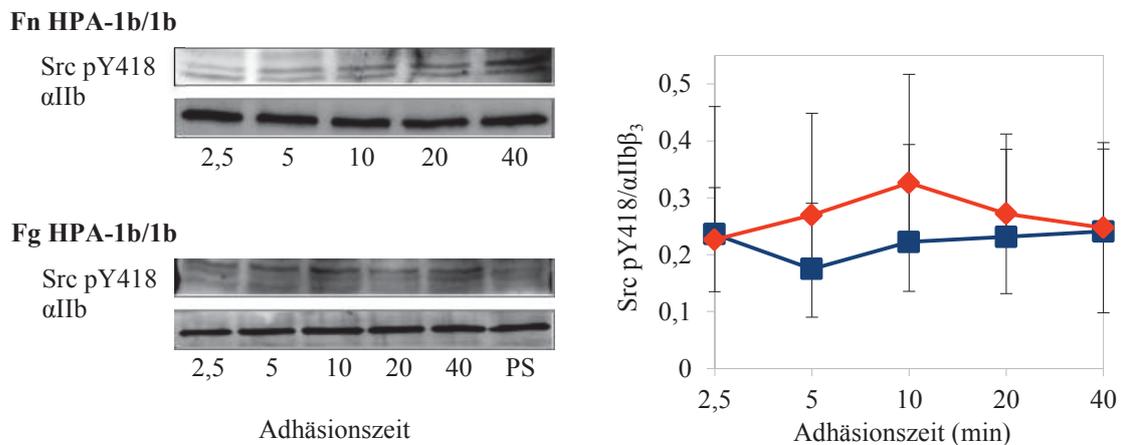


Abb. 14: Src-Aktivierung in humanen HPA-1b/1b positiven Plättchen auf immobilisiertem Fibronectin bzw. Fibrinogen unter statischen Adhäsionsbedingungen

Gewaschene Plättchen (HPA-1b/1b) in Suspension (PS= Plättchensuspension) wurden auf 100 μ g/ml immobilisierten Fibronectin (Fn) bzw. 100 μ g/ml immobilisierten Fibrinogen (Fg) für 2,5, 10, 20 und 40 min bei Raumtemperatur zur Adhäsion gebracht. Jeweils 25 μ g lysierte Proteinproben wurden hiernach in einem 8 % SDS Polyamidgel aufgetrennt. Die Westernblots wurden mit anti-Src pY418 bzw. mit anti- α IIb₃-Antikörpern inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Westernblotbilder und densitometrische Daten sind repräsentativ für 3 Versuche \pm SD. p zu allen Zeitpunkten nicht signifikant. Die Fehlerbalken entsprechen den jeweiligen Mittelwerten \pm SD.

- 100 μ g/ml immobilisierten Fibronectin (Fn)
- ◆ 100 μ g/ml immobilisierten Fibrinogen (Fg)

4.6 Ligandenabhängige Src-Aktivierung in humanen HPA-1b/1b (Pro33) Plättchen in Anwesenheit von Mn^{2+} Kationen

Bei der HPA-1b/1b-Variante war im Vergleich zur HPA-1a/1a-Variante die Src-Aktivierung in Anwesenheit von Mn^{2+} in Verbindung mit der ligandeninduzierten Rezeptoraktivierung noch prägnanter. Vor allem mit Fibrinogen, aber auch mit Fibronectin fand sich bei Zugabe von Mn^{2+} im Vergleich zur alleinigen Ligandengabe zu allen Zeitpunkten eine deutlich gesteigerte Aktivierung von Src. In Kombination mit Mn^{2+} und immobilisierten Fibrinogen zeigte sich im Vergleich zur alleinigen Fibrinogenadhäsion bereits nach 2,5 min eine 2,5 fache Steigerung, nach 10 min eine Verdreifachung, sowie eine Verfünffachung der Src Aktivität nach 40 min (Abb. 15 und Abb. 17). Unterschiede im signifikanten Bereich ($p < 0,05$) fanden sich demzufolge nach 10 min, im hochsignifikanten ($p < 0,01$) Bereich nach 20 min und 40 min.

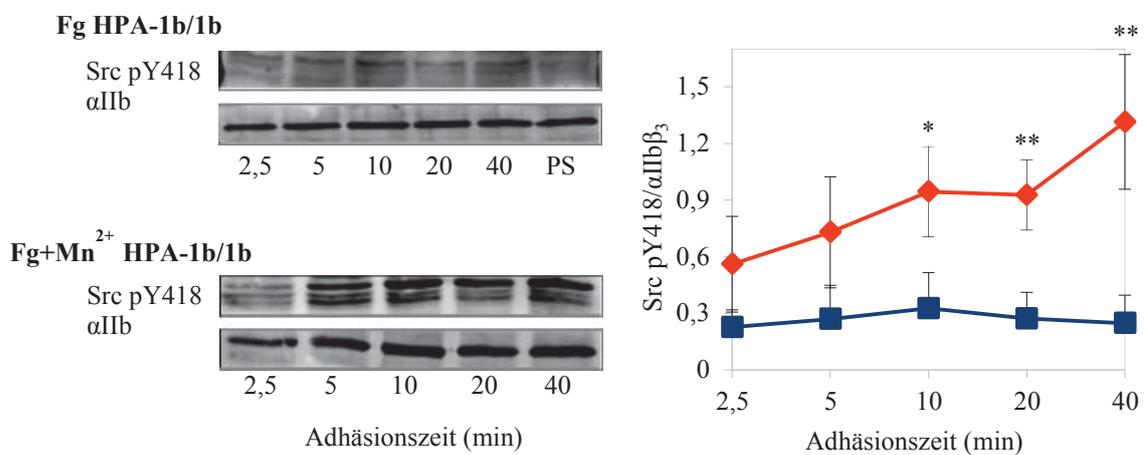


Abb. 15: Src-Aktivierung in humanen HPA-1b/1b positiven Plättchen auf immobilisiertem Fibrinogen mit bzw. ohne $MnCl_2$ Zugabe unter statischen Adhäsionsbedingungen

Gewaschene Plättchen (HPA-1b/1b) in Suspension (PS= Plättchensuspension) wurden auf 100 μ g/ml immobilisierten Fibrinogen (Fg) jeweils mit bzw. ohne 0,5 mM $MnCl_2$ für 2,5, 5, 10, 20 und 40 min bei Raumtemperatur zur Adhäsion gebracht. Jeweils 25 μ g lysierte Proteinproben wurden hiernach in einem 8 % SDS Polyamidgel aufgetrennt. Die Westernblots wurden mit anti-Src pY418 bzw. mit anti- α IIb β_3 -Antikörpern inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Westernblotbilder und densitometrische Daten sind repräsentativ für 3 Versuche \pm SD. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$
Die Fehlerbalken entsprechen den jeweiligen Mittelwerten \pm SD.

- 100 μ g/ml immobilisierten Fibrinogen (Fg)
- ◆ 100 μ g/ml immobilisierten Fibrinogen (Fg) + 0,5 mM $MnCl_2$ (Fg+ Mn^{2+})

Bei den mit Mn^{2+} und Fibronectin behandelten Plättchen fielen die Ergebnisse etwas weniger ausgeprägt aus. Nach 2,5 min trat eine 1,5-fache Erhöhung der Src-Aktivierung, eine Verdoppelung nach 5 min und eine Verdreifachung nach 40 min auf. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) fanden sich hierbei nach 40 min. Adhäsion. (Abb. 16 und Abb. 17)

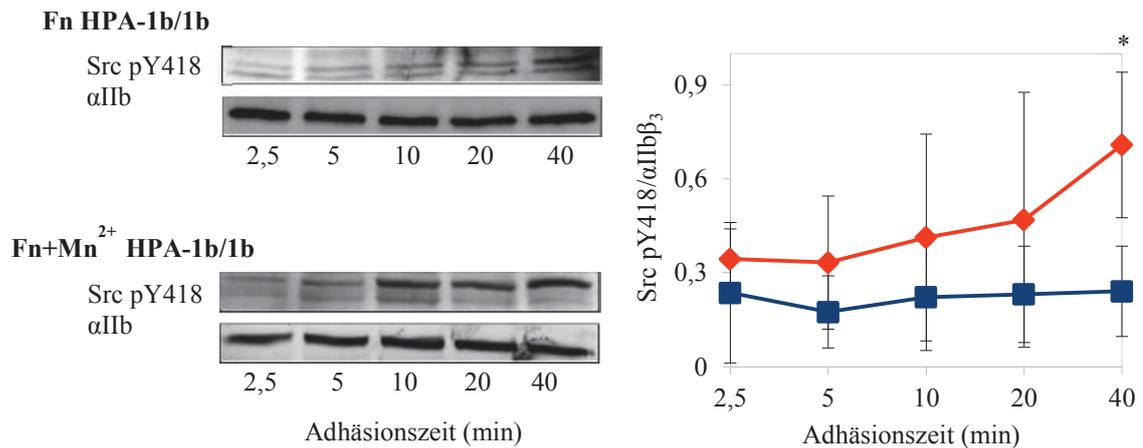


Abb. 16: Src-Aktivierung in humanen HPA-1b/1b positiven Plättchen auf immobilisiertem Fibronectin mit bzw. ohne MnCl₂ Zugabe unter statischen Adhäsionsbedingungen

Gewaschene Plättchen (HPA-1b/1b) in Suspension wurden entweder auf 100 μg/ml immobilisierten Fibronectin (Fn) jeweils mit bzw. ohne 0,5 mM MnCl₂ für 2,5, 5, 10, 20 und 40 min bei Raumtemperatur zur Adhäsion gebracht. Jeweils 25 μg lysierte Proteinproben wurden hiernach in einem 8 % SDS Polyamidgel aufgetrennt. Die Westernblots wurden mit Src pY418 bzw. mit αIIbβ₃-Antikörpern inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Westernblotbilder und densitometrische Daten sind repräsentativ für 3 Versuche ± SD. * p<0,05.

Die Fehlerbalken entsprechen den jeweiligen Mittelwerten ± SD.

- 100μg/ml immobilisierten Fibronectin (Fn)
- ◆ 100μg/ml immobilisierten Fibronectin (Fn) + 0,5 mM MnCl₂ (Fn+Mn²⁺)

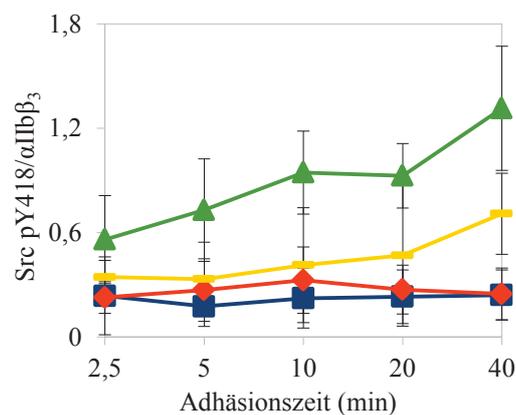


Abb. 17: Direkter Vergleich der Src-Aktivierung in humanen HPA-1b/1b Plättchen unter verschiedenen Adhäsionsbedingungen

Vergleich der in den Abb. 13-15 dargestellten Ergebnisse in einem Gesamtdiagramm. Die Fehlerbalken entsprechen den jeweiligen Mittelwerten ± SD.

- 100μg/ml immobilisiertes Fibronectin
- ◆ 100μg/ml immobilisiertes Fibrinogen
- ▼ 100μg/ml immobilisiertes Fibronectin + 0,5mM MnCl₂
- ▲ 100μg/ml immobilisiertes Fibrinogen + 0,5mM MnCl₂

4.7 Einfluss des HPA-1 Rezeptorpolymorphismus auf die Src-Aktivierung unter Verwendung verschiedener Liganden

Beim HPA-1b/1b-Genotyp zeigte sich im Vergleich zum HPA-1a/1a-Genotyp stets eine stärkere Src-Aktivierung in Bezug auf beide Liganden, wobei unterschiedslos bei beiden Rezeptorvarianten eine etwas höhere Src-Aktivierung bei den auf Fibrinogen adhärenen Plättchen als nach Fibronectinadhäsion vorlag. Um das Mass der vermehrten HPA-1b/1b-Src-Aktivierung zu präzisieren, wurde der Quotient zwischen Src pY418/ α IIB β 3 [HPA-1b/1b] durch Src pY418/ α IIB β 3 [HPA-1a/1a] für beide Liganden mit bzw. ohne Mn^{2+} zu den jeweiligen Zeitpunkten (2,5, 5, 10, 20 und 40 min) gebildet. Der Quotient spiegelt somit indirekt die vermehrte Aktivität der HPA-1b/1b-Variante im Vergleich zur HPA-1a/1a-Variante wieder (Abb. 22). Betrachtet man in Bezug auf beide Rezeptorvarianten isoliert den Kurvenverlauf der einzelnen Liganden, so fällt bei der HPA-1b/1b-Variante nach Fibrinogenadhäsion eine frühzeitige Src-Aktivierung mit densitometrischen Höchstwerten bei 10 min auf, die mit zunehmender Adhäsionszeit abnimmt. Die auffällig frühe Src-Aktivierung der HPA-1b/1b-Variante zeigt sich auch in Abb. 22; zum Adhäsionszeitpunkt 5 min entspricht die Src-Aktivierung beim Pro33-Genotyp in Relation zum Leu33-Genotyp etwa dem 2,5-Fachen und ebbt im Verlauf wieder ab (Abb. 18 und Abb. 22).

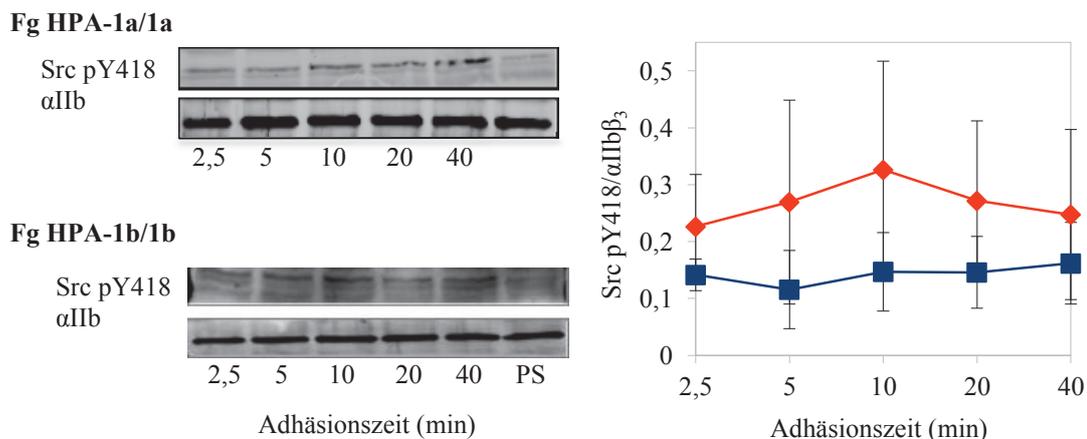


Abb. 18: Vergleich der Src-Aktivierung zwischen beiden Phänotypen in humanen HPA-1a/1a und HPA-1b/1b positiven Plättchen auf immobilisierten Fibrinogen unter statischen Adhäsionsbedingungen

Gewaschene Plättchen beider Phänotypen (HPA-1a/1a und HPA-1b/b) in Suspension (PS= Plättchensuspension) wurden auf 100 μ g/ml immobilisierten Fibrinogen (Fg) für 2,5, 5, 10, 20 und 40 Min. bei 37 °C zur Adhäsion gebracht. Jeweils 25 μ g lysierte Proteinproben wurden hiernach in einem 8 % SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Westernblots wurden mit anti-Src pY418 bzw. mit anti- α IIB β 3-Antikörpern inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Westernblotbilder und densitometrische Daten sind repräsentativ für 3 Versuche \pm SD. p zu allen Zeitpunkten nicht signifikant. Die Fehlerbalken entsprechen den jeweiligen Mittelwerten \pm SD.

- HPA-1a/1a positive Plättchen
- ◆ HPA-1b/1b positive

Vergleicht man das Plättchensignaling nach Adhäsion an Fibronektin miteinander, so lässt sich bei beiden Rezeptorvarianten gleichermaßen eine leichte kontinuierliche Steigerung der Src-Aktivierung mit der Zeit dokumentieren. Hierbei zeigte sich bei der HPA-1b/1b-Variante im Vergleich zur HPA-1a/1a-Variante zu allen Zeitpunkten eine im Durchschnitt 1,7-fach höhere Aktivierung, wobei diese bei 2,5 und 10 min sogar doppelt so hoch lag (Abb. 19 und Abb. 22).

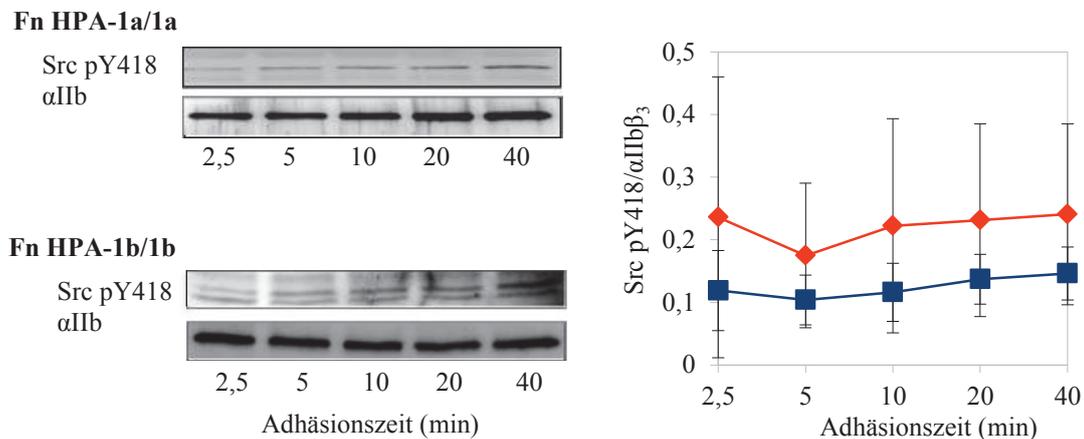


Abb. 19: Vergleich der Src-Aktivierung zwischen beiden Phänotypen in humanen HPA-1a/1a und HPA-1b/1b positiven Plättchen auf immobilisiertem Fibronektin unter statischen Adhäsionsbedingungen

Gewaschene Plättchen beider Phänotypen (HPA-1a/1a und HPA-1b/b) in Suspension wurden auf 100 µg/ml immobilisiertem Fibronektin (Fn) für 2,5, 5, 10, 20 und 40 Min. bei 37 °C zur Adhäsion gebracht. Jeweils 25 µg lysierte Proteinproben wurden hiernach in einem 8 % SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Westernblots wurden mit anti-Src pY418 bzw. mit anti-αIIbβ₃-Antikörpern inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Westernblotbilder und densitometrische Daten sind repräsentativ für 3 Versuche ± SD. p zu allen Zeitpunkten nicht signifikant. Die Fehlerbalken entsprechen den jeweiligen Mittelwerten ± SD..

- HPA-1a/1a positive Plättchen
- ◆ HPA-1b/1b positive Plättchen

Welchen Einfluss hat Mn^{2+} in Verbindung mit den verschiedenen Liganden auf das Outside-in-Signaling der jeweiligen Genotypen? Im direkten Vergleich zwischen Plättchen beider Rezeptorvarianten, die in Anwesenheit von Mn^{2+} auf Fibrinogen adhärten, zeigte sich bei beiden Rezeptorvarianten eine deutliche zeitabhängige Steigerung der Src-Aktivierung mit einer signifikant vermehrten ($p < 0,05$) Aktivierung der HPA-1b/1b-Variante zu allen Zeitpunkten der Adhäsion. Hierbei fand sich bei den Pro33-Plättchen eine fast sechsfach höhere Src-Aktivierung nach 2,5 min, eine Vervielfachung nach 5 min und etwa das 2,5-Fache nach 20 und 40 min Adhäsionszeit (Abb. 20 und Abb. 22).

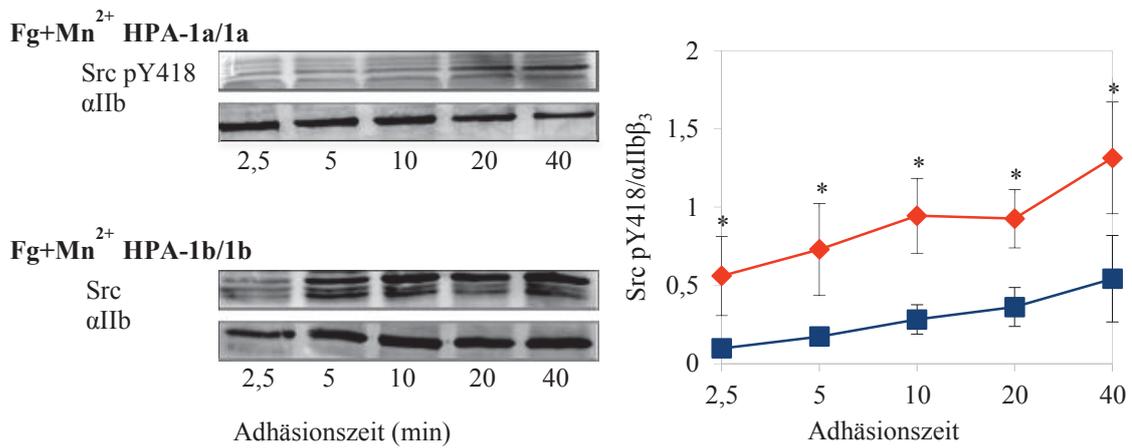


Abb. 20: Vergleich der Src Aktivierung zwischen beiden Phänotypen in humanen HPA 1a/1a und HPA 1b/1b positiven Plättchen auf immobilisierten Fibrinogen nach Zugabe von $MnCl_2$ unter statischen Adhäsionsbedingungen

Gewaschene Plättchen beider Phänotypen (HPA 1a/1a und HPA 1b/b) in Suspension wurden auf 100 $\mu\text{g/ml}$ immobilisierten Fibrinogen (Fg) und 0,5 mM $MnCl_2$ für 2,5, 5, 10, 20 und 40 Min. bei 37 °C zur Adhäsion gebracht. 25 μg der lysierten Proteinproben wurden hiernach in einem 8 % SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Westernblots wurden mit anti-Src pY418 bzw. mit anti- $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Antikörpern inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Westernblotbilder und densitometrische Daten sind repräsentativ für 3 Versuche \pm SD. * $p < 0,05$

Die Fehlerbalken entsprechen den jeweiligen Mittelwerten \pm SD.

- HPA-1a/1a positive Plättchen
- ◆ HPA-1b/1b positive Plättchen

Ein ähnliches Aktivierungsmuster, wenn auch in abgemilderter Form demonstrierten Pro33-Plättchen, die mit Mn^{2+} auf Fibronektin adhärten. Im Vergleich zur HPA-1a/1a-Variante fand sich hierbei eine fast fünffach höhere Src-Aktivierung nach 2,5 min, eine Verdreifachung nach 5 min und Verdoppelung nach 20 und 40 min (Abb. 21 und Abb. 22). Zusammenfassend fiel im Vergleich zwischen beiden Varianten durch die Anwesenheit von Mn^{2+} ligandenunabhängig eine verstärkte Aktivierung der HPA-1b/1b-Variante insbesondere zu den frühen Zeitpunkten zwischen 2,5 bis 10 min auf, die sich im weiteren zeitlichen Verlauf zunehmend dem Src-Aktivierungsniveau der HPA-1a/1a-Variante annäherte, bei der HPA-1b/1b-Variante jedoch stets höher lag. Die Src-Antwort von Pro33-Plättchen, die zuvor zusammen mit Mn^{2+} und Fibrinogen stimuliert wurden, war im Vergleich zu Leu33-Plättchen sogar signifikant erhöht. Im Vergleich zwischen beiden Liganden zeigte sich unabhängig von der Rezeptorvariante stets eine stärkere, wenn auch nicht signifikante Src-Aktivierung nach Adhäsion auf immobilisiertem Fibrinogen als nach Fibronektin. (Abb. 12, 14 und 22).

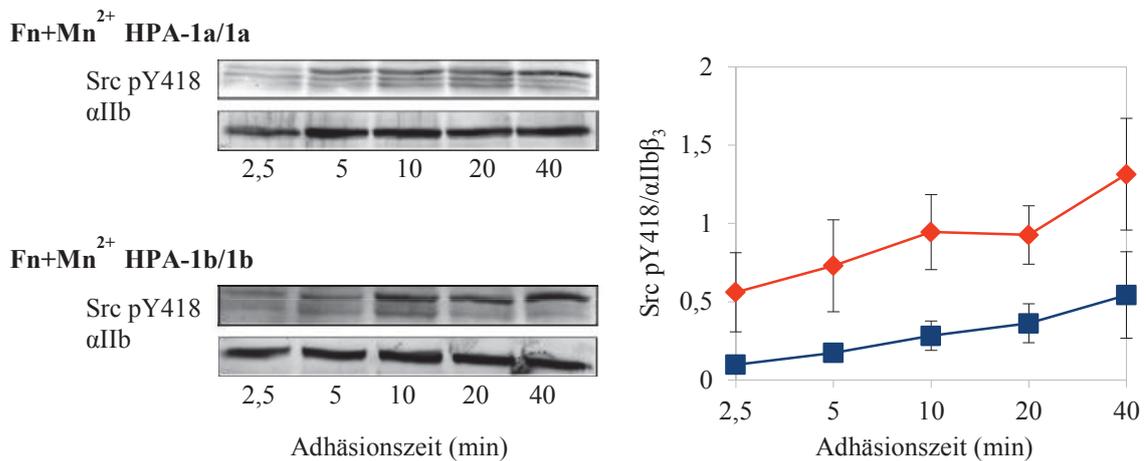


Abb. 21: Vergleich der Src Aktivierung zwischen beiden Phänotypen in humanen HPA 1a/1a und HPA 1b/1b positiven Plättchen auf immobilisiertem Fibronektin nach Zugabe von MnCl₂ unter statischen Adhäsionsbedingungen

Gewaschene Plättchen beider Phänotypen (HPA 1a/1a und HPA 1b/1b) in Suspension wurden auf 100 μ g/ml immobilisiertem Fibronektin (Fn) und 0,5 mM MnCl₂ für 2,5, 5, 10, 20 und 40 Min. bei 37 °C zur Adhäsion gebracht. 25 μ g der lysierten Proteinproben wurden hiernach in einem 8 % SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Westernblots wurden mit anti-Src pY418 bzw. mit anti- α IIb β ₃-Antikörpern inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Westernblotbilder und densitometrische Daten sind repräsentativ für 3 Versuche \pm SD. p zu allen Zeitpunkten nicht signifikant. Die Fehlerbalken entsprechen den jeweiligen Mittelwerten \pm SD.

- HPA-1a/1a positive Plättchen
- ◆ HPA-1b/1b positive Plättchen

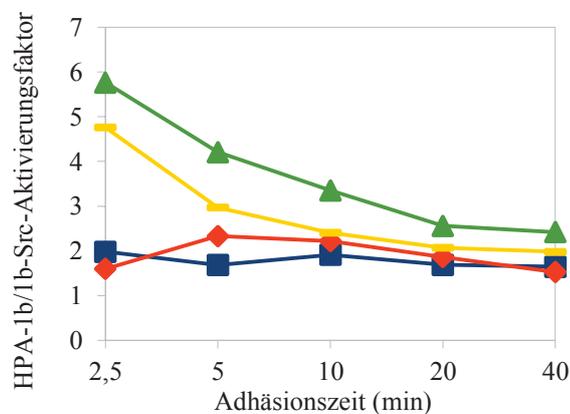


Abb. 22: Vermehrte Src-Aktivierung der HPA-1b/1b Variante im Vergleich zur HPA-1a/1a Variante

Vergleich der Src-Aktivierung zwischen HPA-1a/1a und HPA-1b/1b, indem zu den Zeitpunkten 2,5, 5, 10, 20, 40 min. und den entsprechenden Adhäsionsbedingungen (s. farbige Legende) der Quotient gebildet wurde aus:

$\frac{\text{Src pY418}/\alpha\text{IIb}}{\text{Src pY418}/\alpha\text{IIb}}$ (HPA-1b/1b)

$\frac{\text{Src pY418}/\alpha\text{IIb}}{\text{Src pY418}/\alpha\text{IIb}}$ (HPA-1a/1a)

- 100 μ g/ml immobilisiertes Fibronektin
- ◆ 100 μ g/ml immobilisiertes Fibrinogen
- ▼ 100 μ g/ml immobilisiertes Fibronektin + 0,5mM MnCl₂
- ▲ 100 μ g/ml immobilisiertes Fibrinogen + 0,5mM MnCl₂

5 Diskussion

Der HPA-1-Rezeptorpolymorphismus (Leu33/Pro33) des Integrin α I**IIb** β 3 beruht auf einem singulären Basenaustausch des Gens der β 3-Untereinheit. Die homozygote HPA-1b/1b-Rezeptorvariante (Pro33) ist phänotypisch vergesellschaftet mit einer erhöhten Plättchenthrombogenität, die sich klinisch mit einer vorzeitigen Manifestation für Myokardinfarkte bei KHK und höheren Inzidenz von Frühaborten bemerkbar macht (Weiss, 1996; Zotz et al, 1998, 2005; Ivanov, 2008). Auf molekularer Ebene zeigten diverse Untersuchungen HPA-1-abhängige Unterschiede bezüglich des rezeptorabhängigen-Signaling im Sinne eines verstärkten Outside-in-Signaling (Vijayan, 2000). Die Tyrosinphosphorylierung der Src-Kinase an Position 418 stellt ein frühes Ereignis innerhalb der Outside-in-Signaling Kaskade dar und kann somit nützliche Hinweise in Bezug auf unmittelbar rezeptorassoziierte Veränderungen liefern. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der HPA-1-abhängigen Modulation der Src pY418 als Mass für die α I**IIb** β 3-Rezeptoraktivierung durch immobilisiertes Fibronectin und Fibrinogen. Ferner wurde der rezeptorstabilisierende Einfluss von Manganionen (Mn^{2+}) nach Ligandenadhäsion getestet.

5.1 Unterschiede in der Ligandenbindung von Fibronectin und Fibrinogen am α I**IIb** β 3-Rezeptor

Das polyspezifische Integrin α I**IIb** β 3 vermag neben Fibrinogen, wenn auch mit geringerer Affinität Fibronectin, vWF, Vitronectin, CD 40L, Schlangengift-disintegrine und andere Pathogene zu binden (Merten 1999; Plow 2000). In verschiedenen Stadien der Hämostase wie der Plättchenaggregation, der Thrombusvergrößerung- und Retraktion kommt es zu einer Interaktion zwischen dem α I**IIb** β 3-Rezeptor und Fibrinogen bzw. Fibronectin (Gawaz, 1999). Ohne Agonisten-induzierten Stimulus bzw. vorangegangenes Inside-out-Signaling befindet sich der α I**IIb** β 3-Rezeptor im Ruhekonformationszustand und besitzt eine niedrige Affinität gegenüber Liganden wie lösliches Fibrinogen und Fibronectin. Immobilisiertes Fibrinogen als auch Fibronectin sind jedoch beide in der Lage, am α I**IIb** β 3-Rezeptor direkt ein Outside-in-Signaling auszulösen (Coller, 1986). Die im Zytoplasma vorliegende Src-Kinase ist ein Schlüsselenzym des frühen Outside-in-Signaling und ist am Spreading, der Thrombozytenaggregation, der aktinabhängigen Reorganisation des Zytoskelettes und der Retraktion beteiligt. Ein geringer Teil des zellulären Pools von Src-Kinase ist konstitutiv an die β 3-Untereinheit gebunden. Src als auch Syk werden im Gegensatz zu FAK („focal adhesion kinase“) innerhalb von Sekunden aktiviert, was auch durch unsere Beobachtungen bestätigt werden konnte (Bjorge, 2000; Obergfell, 2002). Wie in Abb. 10 und 14 ersichtlich, führten in unseren Experimenten hohe Konzentrationen von immobilisiertem Fibrinogen (100 μ g/ml) als auch von Fibronectin bereits nach 2,5 min bei beiden Rezeptorvarianten zu einer nahezu maximalen Aktivierung der Src-Kinase, welche nach Fibronectinadhäsion stets geringer ausfiel. Geringere Konzentrationen von Fibrinogen (10 μ g/ml) zeigten erst nach 40 minütiger Inkubationszeit eine Src-

Aktivierung (Hasse, 2011). Welche Faktoren könnten für die beobachteten Unterschiede in Bezug auf die Ligandenbindung verantwortlich sein?

Unterschiede betreffen zum einem die Konformationsänderung beider Proteine. Bei Fibronectin handelt es sich um ein 250 kDa schweres Heterodimer, wohingegen Fibrinogen ein Heterohexamer (340 kDa) bildet. Die in unseren Adhäsionsversuchen applizierten Fibronectin- bzw. Fibrinogenstammlösungen besaßen jeweils dieselben Proteinkonzentrationen von 100 µg/ml.

Offensichtlich spielen von daher die Integrindomänen innerhalb der einzelnen Untereinheiten, sowie die verschiedenen Integrin-Erkennungssequenzen des Liganden wie z. B. RGD, LDV, KGD, RTD und KQAGD eine bedeutendere Rolle (Arnaout, 2002). Sowohl Fibronectin als Fibrinogen beherbergen beide die RGD(Arg-Gly-Asp)-Sequenz. Diese befindet sich z. B. auf den Fibrinogen- α -Ketten sowie auf der Fibronectin-III-Domäne₁₀₌₁₀ (FNIII). Fibronectin wird vom Rezeptor hauptsächlich über die RGD-Sequenz erkannt und gebunden. Die initiale Fibrinogenbindung wiederum erfolgt primär über eine non-RGD=(AGD)-Sequenz der Fibrinogen- γ -Ketten, welche sich zunächst mit der α Ib-Untereinheit assoziiert. In der Folge wird die Fibrinogenbindung durch eine weitere Interaktion zwischen der RGD-Sequenz der Fibrinogen- α -Ketten mit der β 3-Untereinheit komplettiert. Die vorangegangene α Ib-(KQ)AGD(V)-Bindung bildet möglicherweise eine Art Synergismus zu der sich anschließenden RGD- β 3-Bindung (Salsmann, 2005). Die Fibrinogen- α Ib β 3-Bindung findet quasi „grossräumiger“ statt, da die zwei verschiedenen und somit unabhängig voneinander fungierenden Fibrinogen-Peptidmotive auch an zwei unterschiedlichen Bindungsstellen des Rezeptors binden (Gawaz, 1999). Dies könnte auch die erhöhte α Ib β 3-Ligandenspezifität für Fibrinogen erklären, was sich bei beiden HPA-1-Rezeptorvarianten durch eine stets höhere Src-Aktivierung nach Fibrinogenadhäsion und folglich stärkeres Outside-in-Signaling als nach Fibronectinadhäsion bemerkbar machte. Die Ligandenerkennung wird zudem beeinflusst durch den Konformationszustand bzw. dem Aktivierungszustand des Integrins. Rezeptorinteraktionen durch Integrin-Clustering („Zusammenlagern/Gruppieren“) werden der α Ib- γ -Interaktion zugeschrieben und führen eher zu einer niedrigaffinen Rezeptorkonformation (Salsmann, 2005). Um lösliche Liganden jedoch stabil zu binden, bedarf es einer Konformationsänderung durch Inside-out-Signale in den sog. hochaffinen Zustand, wodurch Veränderungen zytoplasmatischer Integrindomänen mit einer Reorganisation der extrazellulären Tertiär- und Quartärstruktur einhergehen. Ein weiterer Aspekt betrifft die Beteiligung divalenter Ionen, die die Integrin-Liganden-Interaktion regulieren (Arnaout, 2002).

5.2 Ligandenabhängige Unterschiede in der Src-Aktivierung in Verbindung mit Mn^{2+}

Mit Hilfe rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen liess sich alleinig durch Mn^{2+} eine Konformationsänderung des Rezeptors von einer ursprünglich inaktiv „geschlossenen“ zu einer aktiv „geöffneten“ Rezeptorkonformation mit getrennten „Rezeptorbeinen“ induzieren (s. Kapitel 1.2 Einleitung) sowie eine Form- und Grössenveränderung des α Ib β 3-Kopfes nachweisen (Litvinov,

2004). In Anwesenheit von Fibrinogen und Mn^{2+} wurden die Rezeptorbeine noch weiter voneinander separiert. Mn^{2+} induziert also eine spezifische Konformationsänderung der Integrintransmembrandomänen, welche synergistisch zur Stabilisierung der ligandeninduzierten Konformationsänderung beiträgt und durch Affinitätssteigerung des Rezeptors das Outside-in-Signaling eines Liganden positiv beeinflusst. (Litvinov, 2004; Chen, 2003). Mn^{2+} fördert zudem die Bildung von $\alpha IIb\beta 3$ -Clustern und kann somit neben der Affinität auch die Avidität des Rezeptors gegenüber Liganden steigern (Litvinov, 2004; Carman, 2003; Joo, 2012). Im Folgenden soll zunächst das Src-Aktivierungsmuster von Plättchen in Anwesenheit von Mn^{2+} und Ligand erörtert werden. Bei beiden HPA-1-Varianten konnte durch den zusätzlichen Einfluss von $MnCl_2$ im Vergleich zur alleinigen Ligandengabe eine verstärkte Aktivierung der Src-Kinase mit der Zeit ausgelöst werden. Auffallend war in unseren Versuchen, dass bei beiden Rezeptorvarianten die verstärkte Src-Aktivierung jedoch relativ verzögert auftrat. Möglicherweise kommt es im Zuge der durch Mn^{2+} induzierten Rezeptoraktivierung zu weiteren Aktivierungsprozessen innerhalb der Plättchen wie die Freisetzung von endogenem Fibrinogen oder ADP aus den Plättchengranula, die zu einer weiteren Src-Aktivierung führen (Salsmann, 2005). In unseren Untersuchungen wurden Plättchen beider Phänotypen mit 0,5 mM $MnCl_2$ auf immobilisierten Fibrinogen bzw. Fibronectin zur Adhäsion gebracht; 0,5 mM $MnCl_2$ erwies sich als optimale Konzentration, da bei beiden Varianten in Anwesenheit stärkerer Konzentrationen wie 1 bzw. 2 mM $MnCl_2$ und Fibrinogen zwar zunächst eine höhere Src-Aktivierung erzielt werden konnte, allerdings schon nach 10 min Adhäsionszeit zelltoxische, morphologische Veränderungen zu verzeichnen waren (Hasse, 2011). Vergleicht man das Src-Aktivierungsmuster zwischen Fibrinogen und Fibronectin in Anwesenheit von Mn^{2+} , so fällt bei beiden Rezeptorvarianten eine ungleich moderatere Src-Aktivierung nach Fibronectinadhäsion auf.

Welche Erklärungsmodelle können zur Klärung beitragen?

Mn^{2+} ist in der Lage, auf die Bindungskinetik und Affinität für natürliche und synthetische Liganden von Integrinen einzuwirken (Gailit, 1988; Smith, 1994; Litvinov, 2004). Divalente Ionen besitzen nicht nur eine eigene Affinität zum Rezeptor, sondern können mit unterschiedlicher Potenz die Ligandenassoziationsrate des Rezeptors beeinflussen (Smith, 1994; Kamata, 2005). In einer älteren Untersuchung von Gailit liess sich im Beisein von Mn^{2+} eine 2-3-fach höhere Bindung von immobilisierten Fibronectin an membrangebundenen Fibronectinrezeptoren erzielen (Gailit, 1988). Obwohl der Fibronectinrezeptor $\alpha 5\beta 1$ wie alle Integrine verschiedene Liganden zu binden vermag, wurden trotz Anwesenheit des Rezeptoraktivators Mn^{2+} andere RGD-haltige Proteine wie Vitronectin und Fibrinogen im Vergleich zu Fibronectin ungleich schlechter von diesem Fibronectinrezeptor erkannt. Somit moduliert Mn^{2+} nicht nur die Ligandenaffinität des Rezeptors, sondern führt auch zu einer verstärkten Rezeptorsensitivität in Bezug auf einzelne Liganden (Gailit, 1989). Hiermit erklären sich mitunter auch unsere Beobachtungen, warum bei beiden Rezeptorvarianten in Verbindung mit Fibronectin und Mn^{2+} eine abgemilderte Src-Aktivierung im Vergleich zu Fibrinogen und Mn^{2+} vorliegt. Vermutlich hat die mit Mn^{2+} vorangegangene Rezeptorstimulation bzw.

Konformationsänderung eine verminderte Dissoziationsrate gegenüber Fibrinogen zur Folge. Zusätzlich dürfte auch das Clustering eine Rolle spielen, da es die Avidität für den Liganden -in unserem Fall Fibrinogen- steigert. Trotz gleicher experimenteller Bedingungen in Bezug auf beide Liganden kommt es zu einer relativen Kumulation von Fibrinogen- α IIb β 3-Interaktionen respektive verstärkter Src-Aktivierung bzw. Outside-in-Signaling.

Aber auch allosterische Mechanismen der Rezeptoraktivierung in Bezug auf die Integrinextradomänen veranschaulichen die Unterschiede in der Src-Aktivierung von Fibronectin und Fibrinogen in Anwesenheit von Mn^{2+} . Ligandenerkennung und -Bindung sowie die Stabilisierung der aktiven Rezeptorkonformation werden durch die an der β A-Domäne lokalisierten Bindungsstellen MIDAS, ADMIDAS und syMBS moduliert (Mauld, 2003; Chen, 2006). Manganionen (Mn^{2+}) sind in vitro in der Lage, durch Konkurrenz mit Ca^{2+} Ionen um Bindungsstellen an der β A-ADMIDAS selbst eine spezifische Konformationsänderung der Integrintransmembrandomänen zu induzieren. In Abwesenheit eines Liganden wird ausschliesslich die Kationenbindungsstelle der β A-ADMIDAS durch Mn^{2+} besetzt, wohingegen in Anwesenheit eines RGD-haltigen Liganden zusätzlich zur β A-ADMIDAS noch β A-MIDAS und β A-syMBS mit Mn^{2+} besetzt werden. Ein Kontakt zwischen Mn^{2+} und Liganden findet nur an der β A-ADMIDAS statt, nicht an syMBS (Xiong, 2001 und 2002). Fibronectin bindet über die FNIII-Domäne primär RGD-abhängig an den Rezeptor. Untersuchungen von Springer et al. und anderen Arbeitsgruppen zeigten, dass die RGD-Sequenz primär mit dem MIDAS Motiv interagiert (Springer, 2008). In Anwesenheit von Mn^{2+} und einem RGD-haltigen Liganden wie z. B. Fibronectin geht Mn^{2+} nicht nur mit ADMIDAS, sondern auch mit MIDAS und syMBS eine Bindung ein. An MIDAS kommt es also zu einer doppelgandigen Besetzung mit Mn^{2+} und Fibronectin. Im Vergleich zu Fibrinogen besitzt Fibronectin keine sog. (KQ)AGD(V)-Sequenz (siehe Fibrinogen γ -Kette). Dieses zusätzliche Ligandenerkennungsmotif assoziiert sich zuvor mit der α IIb-Untereinheit, bevor es an die β 3-Untereinheit bindet. Durch die Beteiligung beider Rezeptoruntereinheiten wird mutmasslich eine Amplifikation zu der vollen Rezeptoraktivierung erreicht (Salsmann, 2005). Ungleich RGD bindet (KQ)AGD(V) nicht nur an MIDAS, sondern auch an ADMIDAS. Von daher gestaltet sich die Bindung mit Fibrinogen in Anwesenheit von Mn^{2+} komplexer. In Verbindung mit Fibrinogen und Mn^{2+} erfolgt quasi eine trippelligandige Besetzung der MIDAS mit RGD, Mn^{2+} und dem zweiten Fibrinogen-Peptidmotiv (KQ)AGD(V) der γ -Kette. Durch die zusätzliche Bindung von (KQ)AGD(V) mit ADMIDAS wird eine „globalere oder gestrecktere“ Konstellation bzw. Interaktion erreicht, was eine Stabilisierung der aktiven Rezeptorkonformation zur Folge hat (Xiong, 2001; Mauld, 2003; Chen, 2006; Springer, 2008). Die Rezeptorinteraktion mit Fibronectin und Mn^{2+} beinhaltet demnach allosterische Mechanismen, die eine andere möglicherweise „weniger stabile“ Konformationsänderung der Rezeptortodomänen hervorruft, als es mit Fibrinogen und Mn^{2+} möglich ist.

5.3 Rolle des α I**II** β 3-Rezeptorpolymorphismus bei der Src-Aktivierung in Bezug auf immobilisiertes Fibronektin und Fibrinogen

Die Untersuchung HPA-1-abhängiger Unterschiede in Bezug auf verschiedene Liganden war bereits Gegenstand früherer Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen. Dabei zeigte sich, dass die HPA-1b/1b-Variante des α I**II** β 3-Rezeptors ein verstärktes Rezeptor-Outside-in-Signaling aufweist. Das prothrombotische „hyperreaktive“ Potential der Pro33-Variante scheint in der strukturellen Konformation ihren Ursprung zu haben, welche von der Leu33-Variante abweicht. Der Aminosäureaustausch durch Pro33 statt Leu33 an der β -PSI-Domäne bedingt eine „starrere“ und weniger „helikal“ geartete Sekundärstruktur, was wiederum nach Ligandenbindung eine Trennung der im Zytoplasma befindlichen Integrin- „Beine“ mit konsekutiv gestrecktem „offenen“ Kopfes begünstigt (Xiao, 2004; Vijayan, 2006). Auf subzellulärer Ebene beobachtete man bei der HPA-1b/1b-Variante nach Fibrinogenadhäsion im Vergleich zur HPA-1a/1a-Variante eine erhöhte Funktion von FAK („Focal Adhesion Kinase“), ERK2 („Extracellular Signal Related Kinase“), MLCK („Myosin Light Chain Kinase“), MP („PP1-Myosin Phosphatase“) und MLC („Myosin Light Chain“) (Vijayan; 2000, 2002 und 2006). Die gesteigerte Aktivität der HPA-1b/1b-Variante war vergesellschaftet mit einer erhöhten Adhäsions- und Migrationsrate, einer intensiveren Aktinpolymerisation durch eine akzelerierte zelluläre Reorganisation, sowie einer vermehrten Sekretion von α -Granula (P-selectin), Spreading und Gerinseltrektion (Sajid, 2002; Vijayan et al, 2000, 2003 und 2006). Signifikante HPA-1-abhängige Unterschiede zwischen beiden Rezeptorvarianten fanden sich hierbei nur nach Fibrinogen- und nicht nach Fibronektinadhäsion.

In unseren Versuchen zeigte sich bei der Pro33-Variante jedoch eine deutlich gesteigerte Src-Aktivierung sowohl nach Fibrinogen als auch nach Fibronektinadhäsion, obgleich die Unterschiede zwischen beiden Varianten statistisch gesehen nicht signifikant waren. Vergleicht man die Src-Aktivierung der jeweiligen Genotypen miteinander, indem man den Quotienten aus Src pY418/ α I**II** β (HPA-1b/1b) durch Src pY418/ α I**II** β (HPA-1a/1a) bildet, so zeigt der Src-Kurvenverlauf der HPA-1b/1b-Variante nach Fibronektinadhäsion zu allen Zeitpunkten eine im Schnitt 1,7-fach höhere Src-Aktivierung im Vergleich zur HPA-1a/1a Variante. Nach Fibrinogenadhäsion zeichnete sich die Src-Kurve beim Pro33-Genotyp ungleich der kontinuierlich ansteigenden Leu33-Kurve durch eine frühzeitigere und schnellere Src-Aktivierung mit einem Maximum bei 10 min auf, welche zu späteren Adhäsionszeitpunkten eher geringer ausgeprägt war. Diese frühzeitige Src-Aktivität der HPA-1b/1b-Variante war besonders ausgeprägt in Anwesenheit von Mn^{2+} . Vermutlich beruhen die Diskrepanzen in unseren Beobachtungen in Bezug auf ligandenspezifische Unterschiede und den Ergebnissen von Vijayan et al am ehesten auf unterschiedliche Versuchsbedingungen. In unseren Experimenten wurde mit gewaschenen Plättchen gearbeitet, die eine deutlich höhere Rezeptordichte an Integrin α I**II** β 3 aufweisen als α I**II** β 3-Rezeptor exprimierende Pro33/Leu33-CHO („Chinese Hamster Ovary“) bzw. HEK („Human Embryonic Kidney“)-293-Zellen (Vijayan, 2000). Im Gegensatz zu HEK bzw. CHO-Zellen werden auf der Plättchenoberfläche auch andere Rezeptorarten wie der Fibronektinrezeptor α 5 β 1 exprimiert. Auch wenn Integrin α 5 β 1 aufgrund seiner Oberflächendensität im Vergleich zu

α IIb β 3 nur eine untergeordnete Rolle beim Outside-in-Signaling spielt, sind Interferenzen zwischen den beiden Rezeptorarten und beiden Liganden nicht auszuschliessen (Huynh, 2013). Zudem wurde in unseren Experimenten im Vergleich zu Vijayan et al mit 8-fach höheren Ligandenkonzentration von 100 μ g/ml gearbeitet und frühere Untersuchungen belegen, dass das α IIb β 3-medierte Verhalten bezüglich Signaling, Morphologie, Adhäsion und Spreading konzentrationsabhängig moduliert wird.

In der Arbeit von Jirouskova et al wurde anhand von Plättchen das unterschiedliche Aktivierungsmuster von α IIb β 3 in Abhängigkeit von der Fibrinogen Oberflächendensität untersucht (Jirouskova 2007). Das Spreading von Plättchen unterlag bei einer entsprechend unserer Arbeitskonzentration hohen Fibrinogenkonzentrationen (100 μ g/ml) einer Src, PKC, PIK3 und FAK-abhängigen Modulation. Ferner führten hohe Fibrinogenkonzentrationen zu einer simultanen und weniger sequentiellen Ausbildung von Lamello- und Filopodien, sowie zu schwächer ausgeprägten intracellulären Calciumoszillationen. Im Gegenzug wurde bei niedrigen Fibrinogenkonzentrationen (3 μ g/ml) das Attachment von Plättchen Src-abhängig beeinflusst. Die GTPasen Rho und Rac-1 agierten unabhängig von der Fibrinogendichte (Jirouskova et al, 2007). Bei der Phosphorylierung der von uns untersuchten Src-Kinase handelt es sich im Gegensatz zur Phosphorylierung von FAK oder ERK2/MLCK um ein frühes, unmittelbar proximal am Rezeptor assoziiertes Ereignis, wobei die Aktivierung von ERK2 direkt abhängig von Src zu sein scheint, da die Inhibition von Src auch zu einer verminderten Aktivierung von ERK2 führte. Ein Src-abhängiges ERK2 Signaling wird ebenso durch unsere Ergebnisse unterstützt. Interessanterweise zeigte sich nach Fibrinogenadhäsion (100 μ g/ml) und Zugabe von 10 μ M PP1, einem Inhibitor der Src-Kinase Familie, bei beiden Rezeptorvarianten eine vergleichbar vollständige Inhibition von ERK2 (Gyenes, unveröffentlichte Daten).

5.4 HPA-1-abhängige Unterschiede in der Src-Aktivierung in Anwesenheit von Mn²⁺ und immobilisiertem Fibronectin und Fibrinogen

Bei den Leu33-Plättchen beobachteten wir in Anwesenheit von MnCl₂ und Fibronectin bzw. Fibrinogen eine langsame, aber deutliche Steigerung der Src-Aktivierung, die nach 40 min dem 2,5 - bzw. 3-fachen entsprach als nach alleiniger Ligandenadhäsion. Bemerkenswerterweise fanden sich zwischen den Leu33-Plättchen, die mit MnCl₂ und Plättchen, die ohne MnCl₂ behandelt wurden, zu den frühen Adhäsionszeitpunkten keine nennenswerten Unterschiede in der Src-Aktivierung. Anders verhielt es sich beim Pro33-Genotyp. In Anwesenheit von Mn²⁺ und Fibronectin zeigte sich im Vergleich zur alleinigen Ligandenbindung bereits nach 2,5 min eine merkliche Steigerung der Src-Aktivierung, die nach 40 min statistisch signifikante Werte (p<0,05) erreichte. In Kombination mit Mn²⁺ und Fibrinogen beobachteten wir bei der Pro33-Variante sogar eine exzessive, statistisch signifikante Src-Aktivierung (p<0,01), die bereits nach 2,5 min dem 2,5-fachen und nach 40 min dem fünffachen der Src-Aktivierung dessen ohne Mn²⁺ entsprach. Die im zeitlichen Kontext stärkere

Aktivierung der HPA-1b/1b-Variante, welche durch Src/ α IIb-Quotientenbildung aus HPA-1b/1b durch HPA-1a/1a ermittelt wurde, fällt unter den Einfluss von Mn^{2+} besonders ins Gewicht. Die Src-Aktivierung der mit Mn^{2+} und Fibronektin behandelten Pro33-Plättchen entsprach im Vergleich zu den analog behandelten Leu33-Plättchen nach 2,5 min etwa dem Fünffachen und nach 5 min dem Dreifachen. Bei den mit $MnCl_2$ und Fibrinogen behandelten Pro33-Plättchen fanden sich nach 2,5 min sogar eine fast sechsfach höhere Src-Aktivierung und ein Vierfaches nach 5 min Adhäsionszeit.

Obgleich dem HPA-1b/1b-Genotyp ein verstärktes Rezeptor-Outside-in-Signaling zugeschrieben wird, fällt in Anwesenheit von Mn^{2+} und Fibronektin -im Gegensatz nach Fibrinogenadhäsion- auch bei der Pro33-Variante eine moderatere Src-Aktivierung auf. Trotz einer „starreren“ und weniger „helikal“ gearteten Sekundärstruktur der Pro33- β -PSI-Domäne scheinen allosterische Mechanismen, die nach Rezeptorinteraktion mit Fibronektin und Mn^{2+} zum Tragen kommen, möglicherweise eine Konformationsänderung der Rezeptortodomänen hervorzurufen, die mehr der Leu33-Variante ähnelt.

In Bezug auf die Src-Zeitkinetik stehen unsere Ergebnisse in Einklang mit den Untersuchungen von Sajid und Vijayan et al (Sajid, 2002; Vijayan 2000). Nach Adhäsion auf immobilisiertem Fibrinogen verzeichnete man bei der jeweiligen β -Pro33-Variante an CHO/HEK-293-Zellen vor allem zu frühen Zeitpunkten eine vermehrte Aktivierung von pERK2/MLCK. In einer Untersuchung über das HPA-1-abhängige Migrationsverhalten auf einer Vitronektinmatrix fand sich bei den Pro33-CHO-Zellen im Vergleich zu Leu33-CHO-Zellen ein grösserer Unterschied nach 2 Stunden als zu späteren Zeitpunkten wie nach 4 oder 6 Stunden. (Sajid et al, 2002; Vijayan et al 2000). Zusammenfassend stützen unsere als auch frühere Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen den Befund, dass der prothrombotische Charakter der Pro33-Isoform nicht nur auf eine verstärkte, aber vor allem auf eine verfrühte Aktivierung des α IIb β 3-Rezeptors beruht.

5.5 Nachweis der Spezifität der Src-Kinase beim Outside-in-Signaling durch den α IIb β 3-Rezeptorantagonisten Abciximab

Bei Abciximab (ReoPro) handelt es sich um das Fab-Fragment eines chimären (human-murinen) monoklonalen Antikörpers, der hauptsächlich gegen den Fibrinogenrezeptor α IIb β 3 gerichtet ist, aber auch an den Vitronektinrezeptor α v β 3 binden kann, der auf Plättchen, Osteoklasten, Endothel und Tumorzellen exprimiert wird. Allerdings spielt die Inhibition von α v β 3 aufgrund seiner geringen Anzahl mit 100 Kopien/Plättchenoberfläche im Vergleich zu α IIb β 3, welches mit 60000-80000 Kopien/Plättchenoberfläche vertreten ist, eher eine untergeordnete Rolle (Gawaz, 1999). Klinische Anwendung findet Abciximab als Thrombozytenaggregationshemmer. Kardiale Indikationen für Abciximab sind die percutane Coronarintervention (PCI) zur Herzinfarktprophylaxe und die instabile Angina pectoris mit geplanter PCI innerhalb 24 Stunden bei Nichtansprechen der herkömmlichen

antithrombotischen Medikation. Aber auch bei der Behandlung peripherer arterieller Thrombosen wird Abciximab neben anderen Fibrinolytika angewendet.

Die Adhäsion von HPA-1a/1a positiven Plättchen auf immobilisiertes Fibronectin bzw. Fibrinogen jeweils in Kombination mit bzw. ohne Mn^{2+} führte zu einer spezifischen Src-Aktivierung. Die Spezifität der Src-Aktivierung in Bezug auf verschiedene Liganden wurde unter Zuhilfenahme des $\alpha IIb\beta 3$ -Rezeptorantagonisten Abciximab untersucht, welcher an die extrazelluläre Domäne der $\beta 3$ -Untereinheit bindet (Gawaz, 2000). Durch Präkubation der Plättchen mit Abciximab konnte sowohl nach alleiniger Fibronectin -und Fibrinogenadhäsion als auch in Anwesenheit von Mn^{2+} eine Hemmung der Src-Aktivierung nachgewiesen werden. Interessanterweise trat bei allen Gruppen nach Abciximab Behandlung eine ähnliche niedrige Src Grund- oder Schwellenaktivierung auf. Hierbei handelt es sich vermutlich um zelluläres und nicht membrangebundenes Src, da sich durch Abciximab der zytoplasmatische Pool an $\alpha IIb\beta 3$ nicht vollständig blockieren lässt (Gawaz, 2000).

Zusammengefasst lässt sich durch $\alpha IIb\beta 3$ -Inhibition indirekt auch eine Inhibition der $\beta 3$ -assoziierten Src-Kinase erzielen, d. h. Abciximab führt zu einer weit proximal gelegene Rezeptorinhibition bzw. Frühinhibition innerhalb der Outside-in-Signalkaskade. Unsere Ergebnisse stehen in Konkordanz zu einer Untersuchung von Merten et al., in der bei aktivierten Plättchen im Beisein von Abciximab das Adhäsions- und Bindungsverhalten auf verschiedenen Ligandenmatrices wie Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen, Vitronectin und vWF getestet wurde (Merten, 1999). Durch Präinkubation der Plättchen mit Abciximab liess sich im Gegensatz zu Kollagen eine Adhäsionsminderung auf allen $\alpha IIb\beta 3$ -kompatiblen Ligandematrices wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin und vWF erzielen (Merten, 1999). In Verbindung mit Fibrinogen und Mn^{2+} zeigten laserspektroskopische Untersuchungen, dass die Zerreißkräfte („rupture forces“), die es braucht, um die durch Mn^{2+} induzierte verstärkte Bindung zwischen Fibrinogen und $\alpha IIb\beta 3$ zu zerstören, durch Abciximab aufgehoben werden können (Livinov, 2004). HPA-1-abhängige Unterschiede in Bezug auf Abciximab und einer entsprechenden Inhibition der ADP-induzierten Fibrinogenbindung konnten nicht festgestellt werden (Weber, 2000). Interessanterweise reagierten heterozygote HPA-1a/1b Träger am sensibelsten sowohl auf Abciximab als auch auf Aspirin (Michelsen, 2000). Dieses Ergebnis steht in Diskonkordanz zu einer anderen Studie von Wheeler über Abciximab-Bindungsassays von Patienten, die sich einer percutanen Coronarintervention unterzogen haben (Wheeler, 2002). Im Vergleich zum homozygoten Phänotyp zeigte sich bei den heterozygoten HPA-1a/1b-Trägern nach Abciximab Bolus eine verminderte Inhibition der Plättchenaggregation möglicherweise durch eine höhere Anzahl frei werdender Fibrinogenrezeptoren.

6 Schlussfolgerung

Die spezifische Phosphorylierung der Src-Tyrosinkinase an Position 418 ist ein Frühmarker des Outside-in-Signaling. Unsere Untersuchungen an humanen Plättchen beider Genotypen zeigen, dass das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -abhängige Outside-in-Signaling einer HPA-1-abhängigen Modulation unterworfen ist und bei der Pro33-Variante stets ausgeprägter war als bei der Leu33-Variante. In Bezug auf die Liganden Fibrinogen und Fibronectin beobachteten wir bei beiden Phänotypen eine submaximale Src-Aktivierung zu frühen Adhäsionszeitpunkten, welche einer Ligandenspezifität unterlag und mit einer stets geringeren Src-Aktivierung nach Fibronectin als nach Fibrinogenadhäsion einherging. Dem zugrunde liegen könnten allosterische Regulationsmechanismen, die mit der Besetzung der Rezeptortodomänen assoziiert sind. Fibronectin besitzt ungleich Fibrinogen keine (KQ)AGD(V)-Sequenz, sondern bindet primär RGD-abhängig an die β3 -Untereinheit des Rezeptors (Mohri, 1996). Das Peptidmotiv (KQ)AGD(V) der Fibrinogen- γ -Kette interagiert sowohl mit αIIb als auch mit β3 (Salsmann, 2005). An der β3 -Untereinheit kommt es ungleich RGD nicht nur zu einer Bindung an β3 -MIDAS, sondern auch an β3 -ADMIDAS (Springer, 2008; Xiong, 2001). Im Vergleich zur Fibronectinbindung wird dadurch eine globalere oder gestrecktere Vernetzung der Integrinoberfläche erreicht. Mn^{2+} ist in der Lage sowohl selbst ein Outside-Signaling zu induzieren als auch auf die Ligandenbindungskinetik einzuwirken und die Clusterbildung zu fördern (Litvinov, 2004). In Verbindung mit Mn^{2+} fand sich bei beiden Rezeptorvarianten in Kombination mit den jeweiligen Ligandenmatrices eine zeitabhängige, ebenfalls substratabhängige Potenzierung der Src-Aktivierung, die in Verbindung mit Fibronectin und Mn^{2+} geringer ausgeprägt war als mit Fibrinogen und Mn^{2+} . Auch hier spielen möglicherweise allosterische Mechanismen eine Rolle, die in der Folge das Outside-in-Signaling begünstigen. Die Besetzung der β3 -Ektodomänen beinhaltet im Fall von Fibronectin und Mn^{2+} neben der Interaktion mit RGD-MIDAS auch das Besetzen der βA -MIDAS und βA -LIMBS mit Mn^{2+} . Bemerkenswerterweise scheint trotz der starrer konfigurierten Pro33- β3 -PSI-Domäne, welche das Outside-in-Signaling begünstigen soll, vor allem die zusätzliche Interaktion mit dem Peptidmotiv (KQ)AGD(V) mit MIDAS und ADMIDAS die Src-Aktivierung zu verstärken. Unter Zusammenschau unserer Ergebnisse kommen wir zu dem Schluss, dass das prothrombogene Potential der HPA-1b/1b-Variante (Pro33) relativ ligandenunabhängig mit einer frühzeitigen und verstärkten Rezeptoraktivierung vergesellschaftet ist und durch das synergistisch agierende Mn^{2+} weiter potenziert wird, indem Mn^{2+} zu einer ligandenspezifischeren bzw. substrataffineren HPA-1-abhängigen Src-Modulation beiträgt. Die spezifische Src-Phosphorylierung bzw. das Outside-in-Signaling nach alleiniger Adhäsion am Fibronectin –bzw. Fibrinogen, sowie jeweils in Kombination mit Mn^{2+} wurde erwartungsgemäss durch den $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Rezeptorantagonisten Abciximab (ReoPro) unterbunden. Der homozygote HPA-1b/b Rezeptorphenotyp (Pro33) ist aufgrund seiner gesteigerten Thrombogenität mit einer vorzeitigen Manifestation für Myokardinfarkte bei KHK und höheren Inzidenz von Frühaborten vergesellschaftet (Ivanov, 2008; Zotz, 1998, 2005). Von daher sollte bei HPA-1b-Trägern ein besonderes Augenmerk auf eine gezielte Inhibition des $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Rezeptors gelegt werden.

Klinische Anwendung findet Abciximab bereits z. B. in der Kardiologie als adjuvanter Thrombozytenaggregationshemmer bei percutanen Coronarintervention (PCI) oder instabiler Angina pectoris. Ein Nutzen durch die zusätzliche Applikation von Abciximab ist belegt bei Patienten in der Hochrisikophase eines akuten Koronarsyndroms, bei denen eine PTCA in Verbindung mit Diabetes, einer non-STEMI („non ST Elevation Myocardial Infarction“)-Konstellation und positiven Troponin T durchgeführt wurde (Stangl, 2010). Interessanterweise scheinen heterozygote Merkmalsträger HPA-1a/1b im Vergleich zur jeweiligen homozygoten Variante teilweise sensibler bzw. weniger gut auf Abciximab und andere Antithrombotika anzusprechen. Die innerhalb der bidirektionellen Signalkaskade des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ mit assoziierten Signalwege sind weiterhin Gegenstand der Forschung. Da die Pharmakokinetik des $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Rezeptors möglicherweise einer Variantenabhängigkeit unterliegt, könnten zukünftig auch direkt mit der β3 -Untereinheit assoziierte Proteine wie die Src-Kinase einen gezielten Angriffspunkt für eine pharmakologische Intervention bilden.

7 Literaturverzeichnis

Abrams CS

Intracellular signalling in platelets
Curr Opin Hematol **2005**; 12: 401-405

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

Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP
Coming to grips with integrin binding to ligands Opinion
Curr Opin Cell Biol. **2002**; 14: 641-651

Bjorge JD, Jakymiw A, Fujita DJ
Selected glimpses into the activation and function of Src kinase
Oncog **2000**; 49: 5620-5635

Bray
Platelet Hypereactivity: Predictive and intrinsic properties
Hematol Oncol Clin North Am **2007**; 21: 633-vi

Carman CV, Springer TA
Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized?
Curr Opin Cell Biol. **2003**; 15:1-10

Carsson L, Greinachwr A, Spitzer C, Walther R, Kessler C
Polymorphisms of the Human Platelet Antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-5 on the Platelet
Receptors for Fibrinogen (GPIIb/IIIa), von Willebrand Factor (GPIb-IX), and Collagen (GPIa/IIa)
Aren not Correlated with an Increased Risk for Stroke
Stroke **1997**; 28:1392-1395

Chen JF, Salas A, Springer T
Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster
Nature Struct. Biol. **2003**; 10: 995-1001

Chen JF, Yang W, Kim M, Carman CV, Springer TA
Regulation of outside-in signaling and affinity by the $\beta 2$ I domain of integrin $\alpha L\beta 2$
PNAS **2006**; 103: 13062-13067

Cho J, Mosher DF
Role of Fibronectin Assembly in Platelet Thrombus Formation
J Thromb Haemost. **2006**; 4: 1461-9

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

Faull RJ, Ginsberg MH
Inside-Out Siganling Through Integrins
J. Am. Soc. Nephrol. **1996**; 7: 1091-1097

Feng S, Lu X, Resendiz JC, Kroll MH
Pathological shear stress directly regulates platelet $\alpha I I b \beta 3$ signaling
Am J Physiol Cell Physiol 291: C1346-C1353, 2006

Gailit J, Ruoslahti E
Regulation of the Fibronectin Receptor Affinity by Divalent Cations
J Biol Chem. **1988**; 263: 12927-12932

Gawaz M.

Das Blutplättchen

Thieme Verlag, Stuttgart **1999**

Gawaz M, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Dickfeld T, Rüdiger S, Taubitz W, Fischer J, Müller I, Meier D, Patscheke H, Schömig A.

Incomplete inhibition of platelet aggregation and glycoprotein IIb-IIIa receptor blockade by abciximab: importance of internal pool of glycoprotein IIb-IIIa receptors

Thromb Haemost. **2000**; 83:915-22.

Gong H, Shen B, Flevaris P, Chow C, Lam SC, Voyno-Yasenetskaya TA, Kozasa T, Du X
G protein subunit G alpha 13 binds to integrin alphaIIb beta3 and mediates integrin „outside in“ signaling

Science **2010**; 327: 340-343

Hasse M

Die prothrombotische Variante von Integrin α IIb β 3 in Plättchen (HPA-1b) korreliert mit einem erhöhten Rezeptor-assoziierten Outside-in Signaling

Dissertation HHU Düsseldorf, **2011**

Hato T, Pampori N, Shattil SJ

Complementary Roles for Receptor Clustering and Conformational Change in the Adhesive and Signaling Function of Integrin α IIb β 3

J Cell Biol. **1998**; 141: 1685-1695

Hu DD, White CA, Panzer-Knodle S, Pge JD, Nicholson N, Smith JW

A New Model of Dual Interacting Ligand Binding Site on Integrin α IIb β 3

J Biol Chem. **1999**; 274: 4633-4639

Huveneers S, Danen EH.

The interaction of SRC kinase with beta3 integrin tails: a potential therapeutic target in thrombosis and cancer.

ScientificWorldJournal. **2010** Jun 15;10:1100-5.

Huynh KC, Stoldt VR, Scharf RE

Contribution of distinct platelet integrins to binding, unfolding and assembly of fibronectin

Biol Chem. (Just Accepted paper) DOI: 10.1515/hsz-**2013**-0182

Hynes RO

Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.

Cell. **1992**; 69: 11-25

Hynes RO

Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines

Cell. **2002**; 110: 673-687

Inuoue O, Suzuki-Inoue K, Dean W, Frampton J, Watson S

Integrin α 2 β 1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src Kinase and PLC γ 2

J Cell Biol. **2003**; 160: 269-780

Ivanov P, Komsa-Penkova R, Ivanov I, Konova E, Kovacheva K, Stoikov S, Popov I

High risk of recurrent spontaneous abortion during second trimester in women carriers of polymorphism A2 in platelet glycoprotein IIb/IIIa

Akush Ginekol (Sofia) **2008**; 47:43-9

Jackson SP

The growing complexity of platelet aggregation

blood. **2007**; 5087-5095

- Jirouskova M, Jaiswal JK, Collier BS
Ligand density dramatically affects integrin α IIb β 3-mediated platelet signaling and spreading
blood. **2007**; 109: 5260-5269
- Joo SJ
Mechanisms of Platelet Activation and α IIb β 3
Korean Circ. J. **2012**; 42(5): 295-301
- Kamata T, Handa M, Sato Y, Ikeda Y, Aiso S
Membrane-proximal α/β Stalk Interactions Differentially Regulate Integrin Activation
J Biol Chem. **2005**; 280: 24775-24783
- Kasirer-Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM, Shattil SJ
Signaling through GP Ib-IX-V activates α IIb β 3 independently of other receptors
Blood **2004**;103:3403-3411
- Kim HO, Jin Y, Kickler TS, Blakemore K, Kwon OH, Bray PF
Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American, white, and Korean
populations.
Transf. **1995**; 35: 863-7
- Klar E, Heene DL
Fibronectin
Klin Wochenschr **1984**; 62: 963-974
- Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S
Physiologie, Lehrbuch
Thieme Verlag, **2009**
- Leahy DJ, Aukhil I, Erickson HP
2.0 Å Crystal Structure of a Four-Domain Segment of Human Fibronectin Encompassing the RGD
Loop and Synergy Region
Cell **1996**; 84: 155–164
- Leisner TM, Wencel-Drake JD, Wang W, Lam SCT
Bidirectional Transmembrane Modulation of Integrin α IIb β 3 Conformations
J Biol Chem. **1999**; 274: 12945-12949
- Li Z, Delaney K, O'Brien KA, Du X
Signaling During Platelet Adhesion and Activation
Arterioscler Thromb Vasc Bio. **2010**; 30: 2341-2349
- Litvinov R, Nagaswami C, Viltaire G, Shuman H, Bennet J, Weisel JW
Functional and structural correlations of individual α IIb β 3 molecules
blood. **2004**, 104: 3979-3985
- Mazharian A, Thomas SG, Dhanjal TS, Buckley CD, Watson SP
Critical role of Src-Syk-PLC γ 2 signaling in megakaryocyte migration and thrombopoiesis
blood **2010** 116: 793-800
- Mauld AP, Barton SJ, Askari JA, Craug SE, Humphries MJ
role of ADMIDAS Cation-binding Site in Ligand Recognition by Integrin α 5 β 1
J Biol Chem. **2003**; 278: 51622-51629
- McCarty OJT, Zhao Y, Andrew N, Machesky LM, Staunton D, Frampton J, Watson SP
Evaluation of the role of platelet integrins in fibronectin-dependant spreading and adhesion
J Thromb Haemost. **2004**, 2: 1823-1833

- Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, Benedict CR
Platelet Microparticles Promote Platelet Interaction With Subendothelial Matrix in Glycoprotein Iib/IIIa-Dependant Mechanism
Circul. **1999**, 99: 2577-2582
- Michelson AD, Furman M, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendrix C, Coleman L, Hamlington J, Barnard MR, Kickler T, Christie DJ, Kundu S, Bray PF
Platelet GP IIIa PI Polymorphism Display Different Sensitivities to Agonists
Circul. **2000**; 101: 1013-1018
- Mikkelsson J, Perola M, Penttilä A, Goldschmidt-Clermont P, Karhunen PJ
The GP IIIa (beta 3 Integrin) PIA in the early development of coronary atherosclerosis
Arterioscler **2001**; 154: 721-7
- Mohri H, Tanabe J, Katoh K, Okubo T
Identification of a Novel Binding Site to the Integrin- α IIb β 3 Located in the C-Terminal Heparin-binding Domain of Human Plasma Fibrinogen
J Biol Chem. **1996**; 26:15724-15728
- Mondoro TH, Wall CD, White MM, Jennings LK
Selective Induction of a Glycoprotein IIIa Ligand-Induced Binding Site by Fibrinogen an von Willebrand Factor
Blood. **1996**; 88: 3824-3830
- Moser M, Nieswandt B, Ussar S, Pozgajova M, Fässler R
Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation.
Nat Med. **2008**; 14: 325-30
- Murcia M, Jirouskova M, Li J, Coller BS, Filizola M.
Functional and computational studies of the ligand-associated metal binding site of beta3 integrins.
Proteins. **2008 Jun**;71(4):1779-91. doi: 10.1002/prot.21859.
- Ni H, Denis CV, Subbaro S, Degen JL, Sato TN, Hynes RO, Wagner DD
Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrandt factor and fibrinogen
J Clin Invest. **2000**; 106: 385-92
- Niland S, Eble JA
Integrin-Mediated Cell-Matrix Interaction in Physiological and Pathological Blood Vessel Formation
J Oncol. **2012**; 125278: 1-25
- Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA, Shattil SJ
Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $[\alpha]IIb[\beta]3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton.
J Cell Biol. **2002**; 157: 265-75
- Partridge AW, Liu S, Kim SG, Bowie JU, Ginsberg MH
Transmembrane Domain Helix Packing Stabilizes Integrin α IIb β 3 in the Low Affinity State
J Biol Chem. **2005**; 25: 7294-7300
- Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW
Ligand binding to integrins.
J Biol Chem. **2000**; 275: 21785-8
- Quinn MJ, Byzova TV, Qin J, Topol EJ, Plow EF
Integrin α IIb β 3 and its antagonism.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. **2003**; 23: 945-52

- Sajid M, Vijayan KV, Souza S, Bray PF
PIA Polymorphism of Integrin $\beta 3$ Differentially Modulates Cellular Migration on Extracellular Matrix Proteins
Arterioscl Thromb Vasc Biol. **2002**; 22: 1984-1989
- Salsmann A, Schaffner-Reckinger E, Kabile F, Plancon S, Kieffer N
A new Functional Role of the Fibrinogen Motif as the Molecular Switch that Selectively Triggers Integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ -dependent RhoA Activation during Cell Spreading
J Biol Chem. **2005**; 280: 33610-33619
- Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N
Integrin Signaling: The Platelet Paradigm
Blood. **1998**; 91: 2645-2657
- Shattil SJ, Newman PJ
Integrin: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets
Blood **2004**; 104: 1606-1615
- Smith JW, Piotrowicz RS, Mathis D
A Mechanism for Divalent Cation Regulation of $\beta 3$ Integrins
J Biol Chem. **1994**; 269: 960-967
- Springer TA.
Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain.
Proc Natl Acad Sci U S A. **1997** Jan 7;94(1):65-72.
- Springer TA, Zhu J, Xiao T
Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen C peptide by the platelet integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$
J. Cell Biol. **2008**; 182: 791–800
- Stangl PA, Lewis S
Review of Currently Available GP IIb/IIIa Inhibitors and Their Role in Peripheral Vascular Interventions
Semin Intervent Radiol **2010**; 27: 412–421
- Vijayan KV, Goldschmidt-Clermont PJ, Roos C, Bray PF
The PI(A2) polymorphism of integrin beta 3 enhances outside-in signaling and adhesive functions.
J Clin Invest. **2000**; 105: 793-802
- Vijayan KV, Liu Y, Dong JF, Bray PF
Enhanced Activation of Mitogen-activated Protein Kinase and Myosin Light Chain Kinase by the Pro33 Polymorphism of Integrin $\beta 3$
J Biol. Chem. **2003**; 278: 3860-3867
- Vijayan KV, Liu Y, Souza S, Thiagarajan P, Bray PF
Fibrinogen and prothrombin binding is enhanced to the Pro33 isoform of purified integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$
J Thromb Haemost. **2006**; 4 :905-6
- Vijayan KV, Bray PF
Molecular mechanisms of prothrombotic risk due to genetic variations in platelet genes: Enhanced outside-in signaling through the Pro33 variant of integrin $\beta 3$.
Exp Biol Med. **2006**; 231: 505-13
- Vinogradova O, Velyvis A, Veliviene A, Jhu B, Haas TA, Plow EF, Quin JA
Structural mechanism of integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ “inside-out” activation as regulated by its cytoplasmic face
Cell. **2002**; 110:587-597

- Weber AA, Jacobs C, Meila D, Weber S, Zotz RB, Scharf RE, Kelm M, Strauer BE, Schrör K
No evidence for an influence of the human platelet antigen-1 polymorphism on the antiplatelet effects of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors.
Pharmacogenetics. **2002**; 12: 581-3.
- Weiss EJ, Bray P, Taybach M, Schulman SP, Kickler TS, Becher LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ
A Polymorphism of a Platelet Glycoprotein Receptor as an Inherited Risk Factor for Coronary Thrombosis
N Engl J Med **1996**; 334:1090-4
- Wheeler GL, Braden GA, Bray PF, Marciniak SJ, Mascelli MA, Sane DC.
Reduced inhibition by abciximab in platelets with the PIA2 polymorphism.
Am Heart J. **2002**;143: 76-82
- Xiao T, Takagi J, Collier BS, Wang JH, Springer T
Structural basis for allostery in integrin and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics
Nature **2004**; 432: 59-67
- Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott L, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA
Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha v \beta 3$
Science **2001**; 294: 339-345
- Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL, Arnaout MA
Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand.
Science **2002**; 296: 151-5
- Yang Z, Kollman JM, Pandi L, Doolittle RF
Crystal structure of native chicken fibrinogen at 2.7 Å resolution
Biochem. **2001**, 40: 12515–12523
- Zhang K, Chen JF
The regulation of integrin function by divalent cations
Cell Adhesion & Migration **2012**; 6: 20–29
- Zotz RB, Winkelmann BR, Nauck M, Giers G, Maruhn-Debowski B, März W, Scharf RE
Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: human platelet antigen 1b (HPA-1b/PIA2) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease.
Thromb Haemost. **1998**; 79: 731-5.
- Zotz RB, Winkelmann BR, Müller C, Boehm BO, März W, Scharf RE.
Association of polymorphisms of platelet membrane integrins alpha IIb(beta)3 (HPA-1b/PI) and alpha2(beta)1 (alpha807TT) with premature myocardial infarction.
J Thromb Haemost. **2005** Jul;3(7):1522-9

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.

Düsseldorf, 28.08.2015

(Una Lee)