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

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

Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen und an Von-Willebrand-Faktor unter flussdynamischen Bedingungen in Relation zum HPA-1-Polymorphismus des Integrins αIIbβ3

Dissertation

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

Robin Eileen Whited

2017

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

gez.:
Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöckner
Betreuer: Prof. Dr. med. Rüdiger Scharf
Erstgutachter: Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld
Zweitgutachter: PD Dr. med. Rainer Zotz

Zusammenfassung

Thema dieser Arbeit war die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen und an den Von-Willebrand-Faktor (vWF) unter flussdynamischen Bedingungen in Abhängigkeit vom Human-Platelet-Alloantigen-(HPA-1)-Polymorphismus. Dieser Polymorphismus beruht auf einem Aminosäureaustausch im Gen für die β-Kette des Integrins αIIbβ3 (Leu33 → Pro33). Die Varianten werden als HPA-1a (Leu33) und HPA-1b (Pro33) bezeichnet. Träger des HPA-1b/1b-Genotyps zeichnen sich durch ein erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt aus.

Antikoaguliertes Vollblut von gesunden Probanden mit dem HPA-1a/1a- und dem HPA-1b/1b-Genotyp wurden in einer Flusskammer über mit Liganden (Fibrinogen, vWF) beschichtete Deckgläser geleitet. Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten, adhärierten Thrombozyten wurden anschließend mithilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops quantifiziert.

Unter venösen Bedingungen (Scherrate 100 s^{-1}) zeigten die HPA-1b/1b-Thrombozyten eine gesteigerte Adhäsionstendenz. Unter arteriellen Bedingungen (Scherrate 1000 s^{-1}) konnte hingegen keine erhöhte Thrombogenität des HPA-1b/1b-Genotyps nachgewiesen werden. Die unter diesen Bedingungen stärkere Adhäsion der HPA-1a/1a-Thrombozyten resultiert möglicherweise aus einer verzögerten Latenzzeit für die Aktivierung der HPA-1b/1b-Thrombozyten. Die Affinitätsunterschiede zwischen Fibrinogen und vWF (Fibrinogen > vWF) waren bei Thrombozyten des HPA-1b/1b-Genotyps ausgeprägter als bei Thrombozyten des HPA-1a/1a-Genotyps, was möglicherweise die Bedeutung der Interaktion des Integrins αIIbβ3 mit Fibrinogen bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen unterstreicht. HPA-1b/1b-Thrombozyten bildeten mit Fibrinogen, nicht aber mit vWF stabilere Aggregate als HPA-1a/1a-Thrombozyten. Eine Steigerung der Ligandenkonzentration bewirkte in allen Versuchsreihen eine höhere Adhäsionsrate. Unter arteriellen Scherbedingungen kam es im Vergleich zu venösen Scherbedingungen unabhängig vom HPA-1-Genotyp zu einer stärkeren Adhäsion, was möglicherweise auf die höhere Anzahl der pro Zeiteinheit vorbeiströmenden Thrombozyten zurückzuführen ist.

Um den Stellenwert des HPA-1- Polymorphismus unter den Risikofaktoren für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen zu evaluieren, sind weiterführende *in vivo* Studien notwendig.

Abkürzungsverzeichnis

αIIbβ3	Fibrinogenrezeptor gehört zu den Integrinen
ASS	Acetylsalecylsäure
BSA	bovines Serum-Albumin
C°	Grad Celsius
Fg	Fibrinogen
Fn	Fibronectin
HPA	Human Platelet Alloantigen
I.E.	Internationale Einheit
kDa	Kilodalton
Leu	Leucin
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimol
PAF	Platelet Activating Factor
PBS	Phosphate Buffered Saline (Pufferlösung)
Pro	Prolin
RGD	Aminosäuresequenz aus den Aminosäuren Arginin, Glycin, Glutamat
s^{-1}	Reziproke Sekunden (Einheit der Scherrate)
vWF	Von-Willebrand-Faktor

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Integrine 1

1.1.1 Integrin αIIbβ3 2

1.1.2 Die Rolle des Integrins αIIbβ3 bei der Blutgerinnung 3

1.1.3 Liganden des Integrins αIIbβ3 5

1.1.4 HPA-1-Polymorphismus 6

1.2 Stand der Forschung zum HPA-1-Polymorphismus 7

1.3 Ziel der Arbeit 8

2 Material und Methoden 9

2.1 Geräte 9

2.2 Verwendete Chemikalien 12

2.3 Versuchsdurchführung 13

2.4 Versuchsvarianten 14

2.5 Nachweis der Spezifität der αIIbβ3-vermittelten Thrombozytenadhäsion 15

2.6 Probanden 16

2.7 Datenerhebung und statistische Auswertung der Versuche 17

3 Ergebnisse 20

3.1 Nachweis der Spezifität der αIIbβ3-vermittelten Thrombozytenadhäsion 20

3.2 Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf die Thrombozytenadhäsion 21

3.3 Thrombozytenadhäsion an verschiedene Liganden 24

3.4. Einfluss der Ligandenkonzentration auf die Thrombozytenadhäsion 26

3.5. Einfluss der Scherrate auf die Thrombozytenadhäsion 28

4 Diskussion 30

4.1 Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf die Thrombozytenadhäsion 30

4.2 Thrombozytenadhäsion an verschiedene Liganden 33

4.3 Einfluss der Konzentration auf die Thrombozytenadhäsion 33

4.4 Einfluss der Scherrate auf die Thrombozytenadhäsion 34

5 Schlussfolgerung 36

Literaturverzeichnis 38

Abbildungsverzeichnis 41

Tabellenverzeichnis 42

Anhang 43

Danksagung

Eidesstattliche Versicherung

1 Einleitung

In dieser Arbeit wird die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen und an von-Willebrand-Faktor (vWF) unter flussdynamischen Bedingungen in Relation zum *Human Platelet Alloantigen* HPA-1-Polymorphismus des Integrins αIIbβ3 untersucht. Vorarbeiten ergaben ein erhöhtes Myokardinfarkt-Risikos bei Trägern des HPA-1b/1b Genotyps. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Erforschung der Ursachen dieses Befundes liefern.

Für die Versuche in dieser Arbeit wurde eine Flusskammer verwendet. Dabei wird antikoaguliertes Vollblut von zuvor genotypisierten, gesunden Probanden über mit Liganden beschichtete Deckgläser geleitet. Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff eingefärbten Thrombozyten können anschließend mithilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops unter Verwendung einer Software quantifiziert werden. Mit Hilfe dieser Versuche soll der Einfluss der verschiedenen Varianten des Fibrinogen-Rezeptors αIIbβ3 (HPA-1a/1a und HPA-1b/1b), auf die Thrombozytenadhäsion aufgezeigt werden.

1.1 Integrine

Integrine bilden eine komplexe Proteinfamilie. Als Oberflächenmoleküle spielen sie eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell- und Zell-Oberflächen-Adhäsion. Sie verbinden demnach Zellen untereinander beziehungsweise Zellen mit der extrazellulären Matrix (Tamkun, 1986). Integrine sind in der Lage das Zytoskelett zu organisieren, führen nach Bindung eines Liganden zur Aktivierung von Proteinkinasen und beeinflussen

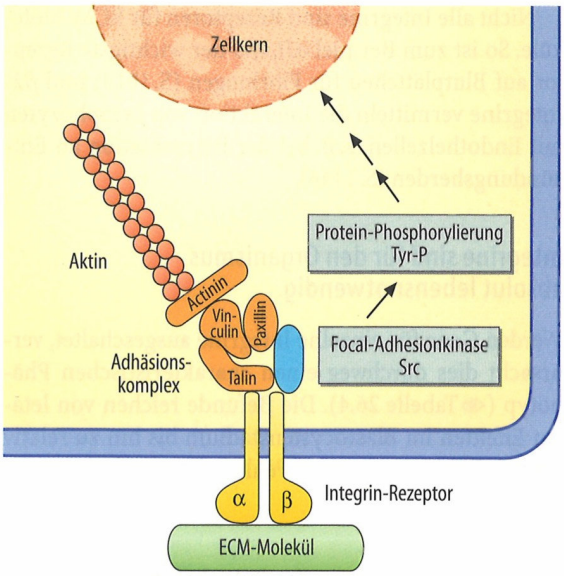


Abb. 1: Schema der Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Adhäsion.

Bindung der extrazellulären Domäne an extrazelluläre-Matrix-Moleküle (ECM-Moleküle) mit Regulierung auf intrazellulärer Seite. (Löffler)

intra- und extrazelluläre Signaltransduktionswege und den Funktionszustand der Zelle (siehe Abbildung 1). Die Integrin-vermittelten Signale sind entscheidend für die Gewebe- und Zelldifferenzierung sowie für die Zellproliferation, -adhäsion und –migration (Hynes, 2002).

Bei den Integrinen handelt es sich um heterodimere Transmembranproteine. Sie enthalten eine intrazelluläre, transmembrane und extrazelluläre Domäne. Funktionelle Proteinkomplexe bestehen aus einer α- und einer β-Untereinheit, welche nicht-kovalent miteinander assoziiert sind und molare Massen zwischen 100 und 200 kDa besitzen. 18 α-Ketten und acht β-Ketten können miteinander zu 24 verschiedenen Heterodimeren kombiniert werden (Löffler, 2006)

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Integrin αIIbβ3 bindet unter anderem an lösliches Fibrinogen und an den vWF auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten. Diese Interaktionen sind eine wichtige Voraussetzung für die Thrombozytenaggregation und -adhäsion während der Hämostase (Campbell, 2011).

1.1.1 Integrin αIIbβ3

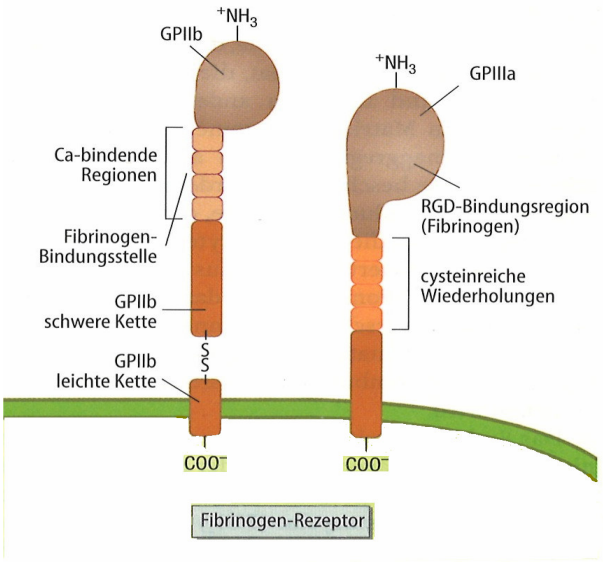


Abb. 2: Fibrinogenrezeptor an der Thrombozytenmembran.

α-Untereinheit rechts, ß-Untereinheit links. RGD: Aminosäuresequenz aus den Aminosäuren Arginin, Glycin, Glutamat (Löffler)

Das zur β3-Subfamilie gehörende Integrin αIIbβ3 wird auch Glykoprotein-(GP)-IIb/IIIa genannt. Diese Integrin-Subfamilie ist mit ca. 80.000 Kopien pro Zelle das am häufigsten vorkommende Glykoprotein auf Thrombozyten (Klinke, 2005, Bennett, 2005, Lefkovits, 1995).

Das Integrin besteht aus einer 136 kDa schweren β-Untereinheit, die sich wiederum aus einer leichten und einer schweren Kette zusammensetzt.

Die leichte Kette ist über eine Transmembranregion in der Membran verankert und besitzt lediglich eine kurze extrazelluläre Domäne. Die schwere Kette liegt vollständig extrazellulär vor. Die α-Untereinheit ist ein Polypeptid mit 762 Aminosäuren und einer molaren Masse von 92 kDa. Sie besitzt eine kurze zytoplasmatische Domäne, eine einzelne Transmembranregion und eine große extrazelluläre Domäne (siehe Abbildung 2). Die Untereinheiten stehen im aminoterminalen Bereich über repetitive Elemente der β-Propeller-Domäne der α-Untereinheit und über die β-I-Domäne der β-Untereinheit in Kontakt. Diese Region bildet auch die Bindungsstelle für Liganden (siehe Abbildung 4, Adair, 2002).

Das Integrin αIIbβ3 kann zwei Konfigurationen mit unterschiedlichen Affinitäten für Liganden annehmen. Unterschieden wird das *Outside-In-Signaling* und das *Inside-Out-Signaling*. Beim *Outside-In-Signaling* kommt es durch die Bindung von extrazellulären Liganden zu Konformationsänderung des Rezeptors und zur Weiterleitung von Signalen in das Zellinnere. Das *Inside-Out-Signaling* wird durch Ligandenbindung an die zytoplasmatische Domäne vermittelt, die ebenfalls zu Konformationsänderungen des Rezeptors führen. Dadurch entsteht ein bidirektionaler Signalweg (siehe unten) (Springer, 2008).

1.1.2 Die Rolle des Integrins αIIbβ3 bei der Blutgerinnung

Die Hämostase ist ein koordiniertes Zusammenspiel von vaskulären, zellulären und plasmatischen Vorgängen. Hauptakteure der zellulären Hämostase sind Thrombozyten, die durch Kontakt mit Matrixproteinen wie Kollagen, Laminin und Fibronectin aus dem beschädigten Gefäßendothel, aktiviert werden. Die Adhäsion der Thrombozyten an das freigelegte Kollagen findet mithilfe des im Endothel gebildeten vWF statt (siehe Abbildung 3).

Durch die Aktivierung des Thrombozyten werden Fibrinogen, vWF und verschiedene Wachstumsfaktoren aus den α-Granula freigesetzt. Serotonin und Kalzium-(Ca^{2+})-Ionen stammen hingegen aus den elektronendichten Granula der Thrombozyten. Über einen Feedback-Mechanismus führen die sezernierten Substanzen zur Aktivierung weiterer Thrombozyten. Es kommt zu einer Formänderung der Zellen mit Ausbildung langer Pseudopodien.

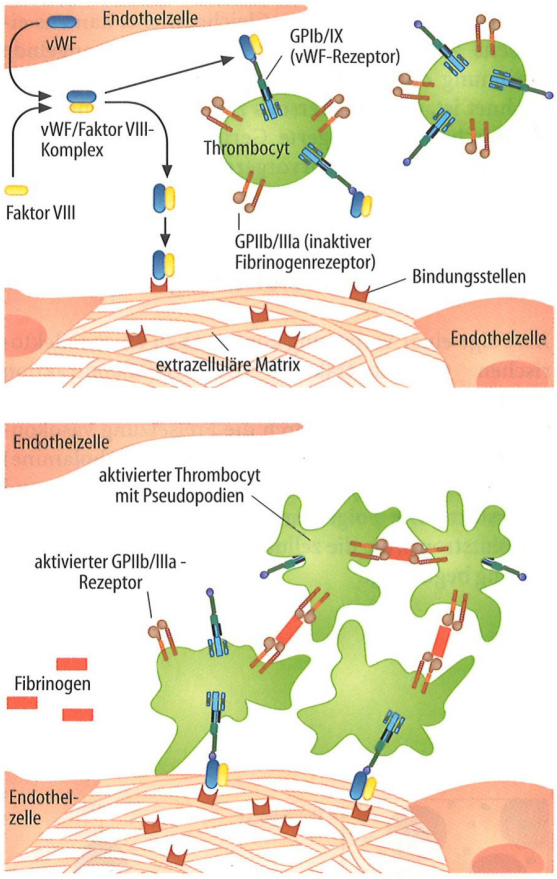


Abb. 3: ***Aktivierung des Thrombozyten durch Bindung des vWF-VIII-Komplexes.*** *Nach Aktivierung verändert Thrombozyt die Struktur des GP-IIb/IIIa-Rezeptors. Oben inaktivierter Fibrinogenrezeptor, unten aktivierter Fibrinogenrezeptor. (Löffler)*

Unterstützt wird die Aktivierung von dem Platelet Activating Factor (PAF) und Thromboxan A2, die eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne des Fibrinogen-Rezeptors αIIbβ3 bewirken (siehe Abbildung 4).

Dies führt schließlich zur Affinitätserhöhung des Rezeptors für Fibrinogen und weitere Adhäsionsmoleküle. Dieser Prozess wird als *Inside-Out-Signaling* bezeichnet (siehe Abbildung 3). Durch die hochaffine Bindung an Fibrinogen kommt es zur Quervernetzung und letztendlich zur Zusammenlagerung von Thrombozyten. Diese Interaktion bewirkt wiederum eine Aktivierung des αIIbβ3-Rezeptors, wodurch ein Signal in das Zellinnere übermittelt wird. Dieser Prozess wir als *Outside-In-Signaling* bezeichnet (siehe Abbildung 1). Als Folge dieses Signals bindet αIIbβ3 an das Zytoskelett (Calvete, 1994). Die Thrombozytenadhäsion und -aggregation führt zusammen mit der sekundären Hämostase (Blutgerinnung) zur Bildung eines stabilen Thrombus (Löffler, 2006).

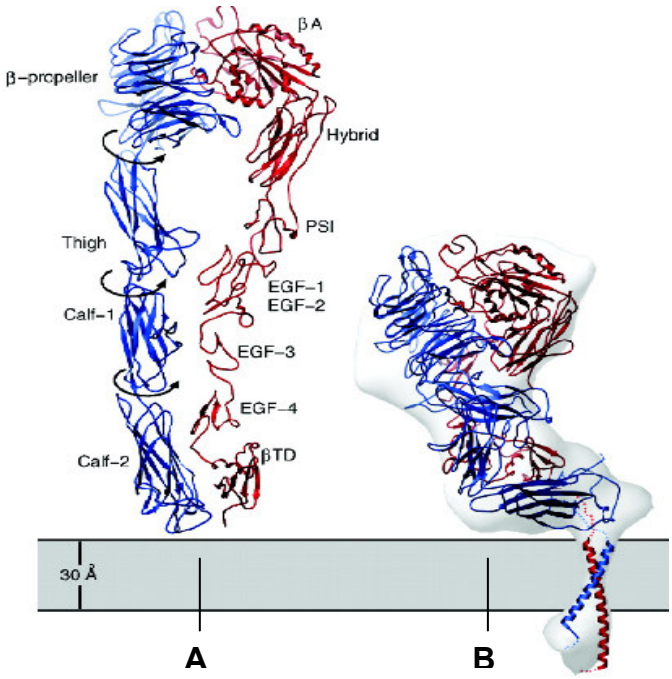


Abb. 4: Mittels Röntgen-Kristallographie nachgewiesene Konformation des Integrins αIIbβ3. *A: hoch-affine Konformation; B: niedrig-affine Konformation. blau = α-Untereinheit; rot = β-Untereinheit (Adair, 2002)*

1.1.3 Liganden des Integrins αIIbβ3

Fibrinogen ist der Hauptligand des Integrins αIIbβ3. Nach Aktivierung des Rezeptors (siehe oben) interagiert das Integrin αIIbβ3 über eine spezifische Fibrinogen-Bindungsstelle, auch RGD-Bindungsregion (siehe Abbildung 2) mit dem Liganden (Löffler, 2006). Bei der RGD-Bindungsregion handelt es sich um die oben beschriebene ß-Propeller-Domäne im aminoterminalen Bereich der α-Untereinheit des Integrins αIIbβ3. Die RGD-Bindungsregion erkennt eine Sequenz von Arginin (R), Glycin (G) und Glutamat (D). Diese Aminosäuresequenz kommt nicht nur im Fibrinogen vor, sondern auch unter anderem im vWF sowie in Fibronectin und Vitronectin. Der Rezeptor ist demzufolge in der Lage neben Fibrinogen auch vWF und weitere Liganden zu binden (Calvete, 1994).

Der vWF ist mit 2050 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 260 kDa das größte Protein in der Blutbahn. Seine molekulare Struktur besteht aus vier sich wiederholenden Domänen (A–D), die unterschiedliche Liganden binden. Die wichtigste Funktion des vWF ist die Adhäsion und Aggregation von

Thrombozyten. Es gibt Hinweise darauf, dass die Bindung des vWF an das Integrin αIIbβ3 eine wichtige Rolle bei hohen Scherraten von 1000 s^{-1} spielt (Schneider, 2008).

1.1.4 HPA-1-Polymorphismus

Das Human Platelet Alloantigen-1 (HPA-1) besteht aus zwei Allelen. Sie sind Teil des Fibrinogen-Rezeptor αIIbβ3, lokalisiert auf der β3-Untereinheit. Eine Punktmutation 1565T-C (Austausch von Thymidin gegen Cytosin) im Exon 2 des ITGB3-Gens führt zur Substitution von Leucin gegen Prolin in Position 33 (Leu33 → Pro33) der Aminosäuresequenz der β3-Untereinheit. Dies führt dazu, dass es zwei Varianten dieses Alloantigens gibt (Polymorphismus). Diese Varianten können im menschlichen Körper entweder homozygot oder aber heterozygot vorliegen: HPA-1a/1a (Proteine enthalten an Position 33 Leu), HPA-1b/1b-Variante (Proteine enthalten an Position 33 Pro) und HPA-1a/1b (beide Varianten kommen vor). Es wurde berechnet, dass die Allelfrequenzen für HPA-1a 85% und HPA-1b 15% betragen. 2% der kaukasischen Bevölkerung tragen den HPA-1b/1b-Genotyp (Newman, 1989). In der farbigen Bevölkerung besitzen 8% Träger den HPA-1b/1b-Genotyp und in der asiatischen Bevölkerung weniger als 1% (Vijayan und Bray, 2006).

Es wird vermutet, dass der Austausch von Leu zu Pro an Aminosäureposition 33 zu strukturellen Veränderungen in dem Integrin führt, die ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko für den Träger bedeuten. Vijayan und Bray et al. zeigten, dass es bei Trägern des HPA-1b/1b-Allels zu einer gesteigerten Thrombozytenaggregation sowie zu einer vermehrten Thrombozytensekretion kommt. Die Thrombozyten dieser Träger zeichnen sich durch eine gesteigerte Zelladhäsion, Ausbreitung (*Spreading*) und Migration, aber auch durch eine verstärkte Thrombusretraktion aus. Weiterhin wurde ein verstärktes *Outside-In-Signaling* nachgewiesen. Diese Prozesse haben zur Folge, dass es zu stabileren Interaktionen zwischen den Thrombozyten selbst, aber auch zwischen Thrombozyten und der extrazellulären Matrix kommt (Sajid, 2002, Vijayan, 2003 und 2005).

1.2 Stand der Forschung zum HPA-1-Polymorphismus

Bereits 1996 zeigten Weiss et al. eine deutliche Assoziation zwischen dem HPA-1b/1b-Genotyp und dem Auftreten einer akuten koronaren Thrombose. Dieser Zusammenhang war am deutlichsten bei Patienten, die vor dem 60. Lebensjahr ein Koronarereignis zeigten (*odds ratio* 6,2; 95 % *confidence interval*, 1,8–22,4) (Weiss, 1996).

Auch Zotz et al. zeigten in einer Fall-Kontroll-Studie, dass Träger des HPA-1b/1b-Genotyps und einer bestehenden Ein- oder Zweigefäßerkrankung im Schnitt 5,2 Jahre früher als Träger des HPA-1a/1a-Genotyps einen Myokardinfarkt erleiden (n=246, p=0,006) (Zotz, 2005). Thromben, die von HPA-1b/1b-Thrombozyten gebildet werden, zeigen charakteristische Abweichungen von Thromben aus HPA-1a/1a-Thrombozyten. Vijayan und Bray et al. untersuchten CHO-(*Chinese hamster ovary*)- und HEK-(*Human embryonic kidney*)-293-Zellen, die mit den Genen für die HLA-1-Varianten transfiziert wurden. Die Zellen, die das Gen für die HPA-1b-Variante trugen, zeigten unter statischen Bedingungen eine 30–60% höhere Adhäsionsrate an immobilisiertes Fibrinogen (Vijayan, 2003). Unter *low flow* Bedingungen (25–100 s^{-1}) zeigte sich für HPA-1b eine doppelt so hohe Adhäsionsrate. Unter flussdynamischen Bedingungen verstärkte sich die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen und vWF unter hohen Scherraten im Vergleich zu niedrigen Scherraten (Vijayan, 2003). Thrombozyten mit dem HPA-1b/1b-Genotyp zeigten eine verstärkte Aggregation, Sekretion, Migration, Thrombusbildung sowie ein verstärktes *Outside-In-Signaling* (Sajid, 2002, Vijayan, 2000).

Loncar et al. belegten in ihren *in vitro* Studien, dass unter flussdynamischen Bedingungen die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen bei Zellen mit der HPA-1b-Variante unabhängig vom Geschlecht eine höhere Stabilität aufweist (Loncar und Stoldt, 2007, Loncar und Zotz, 2007).

1.3 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss des HPA-1-Genotyps (homozygot HPA-1a/1a im Vergleich homozygot HPA-1b/1b) beim Fibrinogen-Rezeptor Integrin αIIbβ3 auf seine Interaktion mit seinen Liganden vWF und Fibrinogen.
Das Allgemeine Ziel dieser Arbeit ist die Unterschiede im Adhäsionsverhalten der beiden Genotypen HPA-1a/1a und HPA-1b/1b aufzuzeigen.
Dazu wird diese Arbeit spezifische Antworten auf die folgenden in der Literatur offenen Fragen liefern:

1.) Haben venöse oder arterielle Strömungsbedingungen (Scherraten 100 s^{-1} und 1000 s^{-1}) Auswirkungen auf das Adhäsionsverhalten?

2.) Verhält sich, die als prothrombotisch beschriebene HPA-1b-Rezeptovariante, unter venösen wie arteriellen flussdynamischen Bedingungen uniform prothrombotisch?

3.) Lassen sich Affinitätsunterschiede der beiden Rezeptorvarianten HPA-1a/1a bzw. HPA-1b/1b zu RGD-Bindungssequenz-tragenden Liganden Fibrinogen sowie vWF im Flussmodell abbilden?

4.) Welche Bedeutung haben Konzentrationsunterschiede der beiden Liganden (Fg und vWF) auf die Thrombozytenadhäsion unter flussdynamischen Bedingungen?

Letztendlich sollen anhand der Ergebnisse verschiedener wissenschaftlicher Arbeiten wie in 1.2 dargestellt, die Hypothese der Thrombogenität der HPA-1b-Variante bestätigt, widerlegt und erweitert werden. Dies soll zu einem umfassenderen Verständnis über die Auswirkungen des HPA-1-Polymorphismus beitragen.

Für die Versuche wurde antikoaguliertes Vollblut von zuvor genotypisierten, gesunden Probanden verwendet. Die Ergebnisse der *in vitro*-Flusskammerexperimente werden in den folgenden Abschnitten ausführlich diskutiert.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Folgende Geräte und Software wurden im Rahmen der Arbeit verwendet:

• Flusskammer	
• Deckgläser 24 x 50 mm: 0,13–0,17 mm	Engelbrecht Edermünde
• Perfusor R Secura	B. Braun Melsungen
• Perfusor R Spritze 50 ml	B. Braun Melsungen
• Mikroskop, Axiovert 100 M,	
• CLSM 510, Argonlaser	Oberkochen Carl Zeiss AG
• Inkubator, Heraeus CO2-Auto-Zero,	Heraeus Kulzer GmbH & Co.KG, Hanau
• Sysmex	
• Einmalskalpelle steril	Gebrüder Martin, Tuttlingen
• Petrischalen	
• 2 ml Spritze	

- Bildverarbeitungsprogramm des LSM 510 (Release 2.8 Service Pack 1)
- ImageJ Version 1.39, Wayne Rasband am Massachusetts Institute of Technology (MIT)
- Microsoft Office Excel 2007
- GraphPad Quick Calcs
- OpenOffice.org3.2
- Microsoft Word

Alle Experimente wurden in einer Flusskammer durchgeführt. Die Flusskammer besteht aus einer metallischen Unterplatte, in die ein Deckglas eingesetzt werden kann, und einem Acrylglasblock, in den zwei Kanülen eingearbeitet sind (siehe Abbildungen 5–7). Zu der Flusskammer gehören weiter ein Perfusor und ein Lasermikroskop (siehe Abbildung 8). Die metallische Unterplatte ist 7,3 x 4,5 cm groß und besitzt eine Dicke von 0,3 cm. Die vorhandene Fräsung auf der Oberseite bietet Platz für ein 24 x 50 mm großes Deckglas. Zentral auf der Unterplatte befindet sich eine kreisrunde Aussparung, die es ermöglicht Substanzen bzw. Zellen auf dem Deckglas von unten zu mikroskopieren.

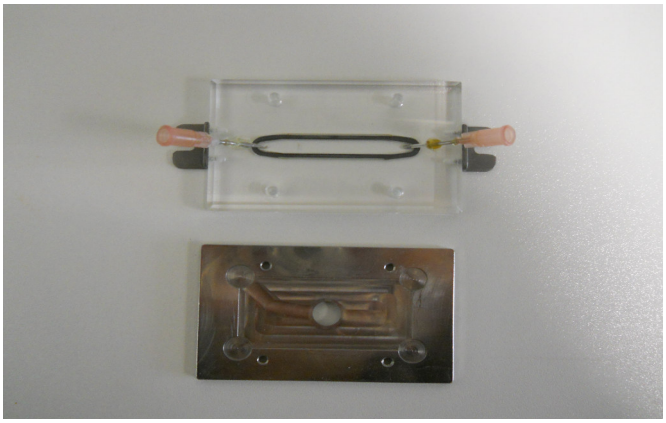


Abb. 5: Deckplatte aus Acryl mit eingearbeiteten Kanülen (oben im Bild). Metallische Unterplatte (unten im Bild)

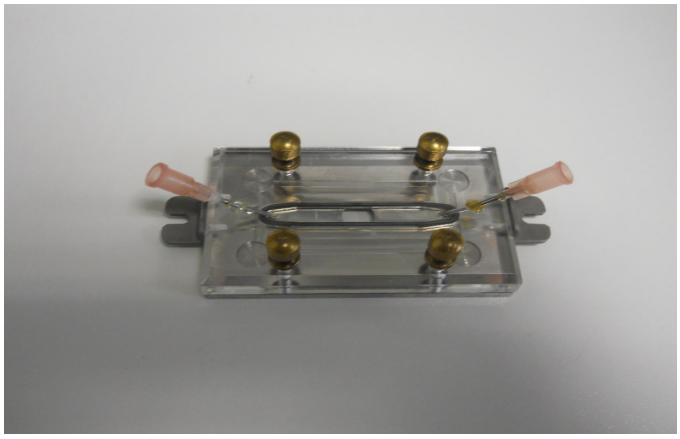


Abb. 6: Zusammengebaute Deck-und Unterplatte.

Der Acrylglasblock ist 7,3 x 4,5 cm groß und hat eine Dicke von 0,7 cm. Die beiden 1,2 mm starken Kanülen sind an den beiden Längsenden eingelassen und bilden so einen Kanal zur Unterseite der Deckplatte. Für die Verbindung der Unterplatte mit dem Acrylglasblock, dienen vier Schrauben und entsprechende Bohrungen im Acrylglasblock. Um die Flusskammer in das Lasermikroskop einspannen zu können, besitzt die Oberplatte zwei metallische Halterungen an

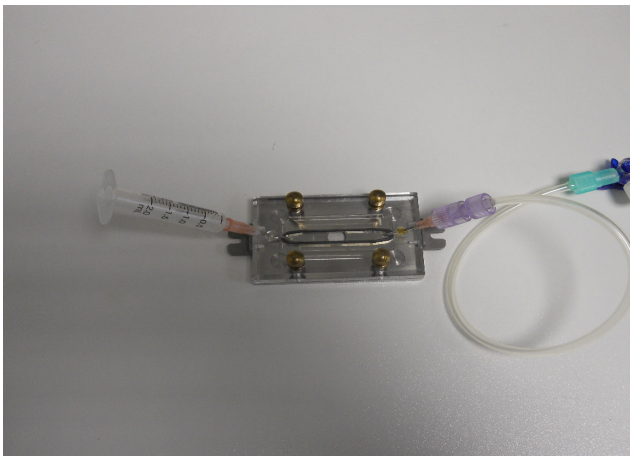


Abb. 7: Zusammengebaute Deck-und Unterplatte mit Verbindungsschlauch für Perfusorspritze (ausleitende Kanüle) und Spritze für Probandenblut (zuleitende Kanüle)

beiden Enden.

Durch Erzeugung von Unterdruck wird mit Hilfe eines Perfusors Flüssigkeit durch die Flusskammer geleitet. Hierzu wird eine 50 ml Spritze in den Perfusor platziert. Die Spritze wird durch einen ca. 20 cm langen Schlauch mit einer in den Acrylglasblock eingearbeiteten Kanüle (ausleitende Kanüle) verbunden. In die andere Kanüle (zuleitende Kanüle) können Flüssigkeiten eingeführt werden (in den vorliegenden Untersuchungen Probandenblut). Der Stempel der Spritze kann durch den Perfusor in beliebiger Geschwindigkeit hinausgezogen werden. Die daraus resultierenden, unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten führen zu unterschiedlichen Scherraten in der Flusskammer.

Für die mikroskopische Analyse wurde das LSM 510 genutzt. Dabei handelt es sich um ein Laser-Scanning-Mikroskop der Firma Zeiss. Dieses Mikroskop ermöglichte es, die mit Mepacrin angefärbten Thrombozyten mit einem Laserstrahl zur Fluoreszenz anzuregen und die dabei entstehenden Bilder zu scannen und zu digitalisieren. Zur Digitalisierung wurde die Software des LSM 510 genutzt. Der verwendete Laser ist ein Argonlaser, mit einer Leistung von 100% und einer Wellenlänge von 458 nm Argonlinie. Alle Versuche wurden mit einem 40er Objektiv (Plan Neofluar 40x / 1,3 Oil) durchgeführt. Die Einstellungen des Mikroskops lauteten: *Pinhole* 1000 *µ*m, Filter: BP 505-550, *Detector Gain*: 750.

Jeder Versuch dauerte 11,5 Minuten. Dabei wurden hundert Einzelbilder in zehn Bildstapel bestehend aus zehn Einzelbildern
mit je 900 ms Abstand angefertigt. Die Aufzeichnung dieser Bilderserien wurde

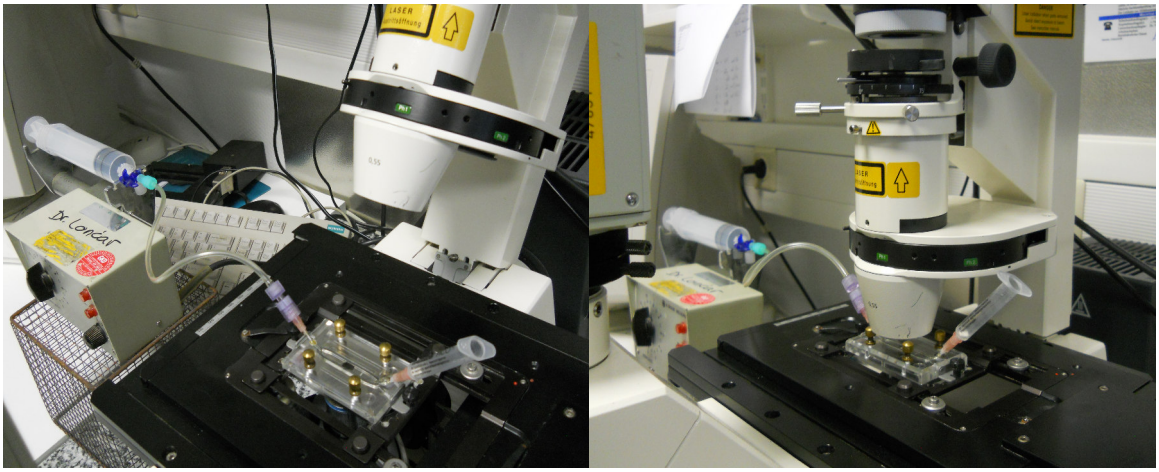


Abb. 8: Eingesetzte Flusskammer mit angeschlossenem Perfusor und Mikroskop.
Links hochgeklapptes Mikroskop, rechts positioniertes Mikroskop.

jede Minute zehnmal wiederholt. Das Bildformat betrug 512 x 512 in 8 bit Graustufen.

2.2 Verwendete Chemikalien

Auflistung der Chemikalien:

• Fibrinogen, Plasminogen-*Depleted from human Plasma*	Calbiochem
• Wilate 450; 450 I.E. FVIII, 400 I.E.vWF	Octapharm GmbH
• *Phosphate buffered saline* (PBS) pH 7,3	Serag Wiessner
• *Albumin from bovine serum (BSA)*	Sigma
• Mepacrin (Quinacrine)	Sigma
• Aqua Delta Select 1000 ml Spüllösung	
• ReoPro (Abciximab)	Eli Lilly
• Edisonite Classic (Pulver)	Merz
• Zeiss Immersol TM 518F	

2.3 Versuchsdurchführung

Zu Beginn des Versuches wurden die Thrombozyten mit dem Fluoreszenzmarker Mepacrin (10 mM) in einer Verdünnung von 1:1000 (Mepacrin/Blut) eingefärbt. Um eine ausreichende Färbung zu gewährleisten, betrug die Inkubationszeit 60 Minuten auf einer Rollbank. Zur Beschichtung der Deckgläser wurden Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen vWF (60 µg/ml und 300 µg/ml) bzw. Fibrinogen (20 µg/ml und 100 µg/ml) verwendet. Zur Herstellung der benötigten Konzentrationen wurden die Liganden mit PBS-Puffer verdünnt. Die beschichteten Deckgläser wurden geschützt von einer Petrischale in einem Feuchtinkubator bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid (CO_2) für 30 Minuten aufbewahrt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die mit den Liganden beschichteten Deckgläser aus dem Feuchtinkubator entnommen und in die metallische Unterplatte der Flusskammer eingesetzt. Anschließend wurde der Acrylglasblock auf der Unterplatte festgeschraubt. Vor Einspannen der Flusskammer in das Lasermikroskop wurde das Objektiv mit einem Tropfen Öl versehen. Durch den Schlauch wurden die Kanülen der Flusskammer mit der Perfusorspritze verbunden. Die gegenüberliegende Kanüle wurde mit einer 2 ml Spritze ohne Stempel verbunden. Die Flusskammer wurde zunächst mit 1% BSA in PBS gespült, um unspezifische Bindungsstellen für die Thrombozyten zu blockieren. Anschließend wurde die 2 ml Spritze mit dem angefärbten Vollblut befüllt und der Perfusor auf die gewünschte Scherrate eingestellt. Sobald die ersten Thrombozyten durch das Lasermikroskop digitalisiert erfasst wurden, wurde innerhalb von 30 Sekunden die Ebene eingestellt und die Aufnahme der Bildserien gestartet.

Nach Aufzeichnung der zehn Bildserien endete das Programm automatisch. Die Aufzeichnungen wurden gespeichert. Zur Reinigung der Flusskammer wurde Edisonite Classic Pulver zur Denaturierung von anheftenden Proteinen verwendet. Eine gründliche Reinigung war vor jedem Versuch zwingend erforderlich.

2.4 Versuchsvarianten

Bei den Versuchen wurden die Liganden, die Ligandenkonzentrationen und die Scherraten variiert. Alle Kombinationen wurden mit Thrombozyten mit dem HPA-1a/1a- und HPA-1b/1b-Genotyp getestet.

Liganden

- Fibrinogen aus humanem Plasma
- vWF aus humanem Plasma

Ligandenkonzentrationen

- Fibrinogen: 20 µg/ml und 100 µg/m
- vWF: 60 µg/ml und 300 µg/ml

  Bei dem verwendeten vWF handelte es sich um das Konzentrat Wilate, bestehend aus 450 I.E. Faktor VIII (FVIII) und 400 I.E. vWF. Um eine Thrombozytenadhäsion an das vWF zu erreichen, musste eine dreifach höhere Konzentration im Vergleich zu Fibrinogen gewählt werden, da ansonsten keine Adhäsion nachweisbar war.

Scherraten

venöse Flussrate: 100 s^{-1}

arterielle Flussrate: 1000 s^{-1}

Die verschiedenen Liganden und Ligandenkonzentrationen wurden mit den zwei Scherraten kombiniert, sodass die niedrigen Konzentrationen wie auch die hohen Konzentrationen beider Liganden unter venösen und arteriellen Bedingungen beobachtet werden konnten.

Für das Blut jedes Probanden (HPA-1a/1a- oder HPA-1b/1b-Genotyp) ergaben sich daher acht Versuchskombinationen (siehe Tabelle 1).

HPA-1a/1a			HPA-1b/1b		
Ligand	Liganden-Konzentration	Scherrate	Ligand	Liganden-Konzentration	Scherrate
Fibrinogen	100 µg/ml	1000 s^{-1}	Fibrinogen	100 µg/ml	1000 s^{-1}
Fibrinogen	100 µg/ml	100 s^{-1}	Fibrinogen	100 µg/ml	100 s^{-1}
Fibrinogen	20 µg/ml	1000 s^{-1}	Fibrinogen	20 µg/ml	1000 s^{-1}
Fibrinogen	20 µg/ml	100 s^{-1}	Fibrinogen	20 µg/ml	100 s^{-1}
vWF	300 µg/ml	1000 s^{-1}	vWF	300 µg/ml	1000 s^{-1}
vWF	300 µg/ml	100 s^{-1}	vWF	300 µg/ml	100 s^{-1}
vWF	60 µg/ml	1000 s^{-1}	vWF	60 µg/ml	1000 s^{-1}
vWF	60 µg/ml	100 s^{-1}	vWF	60 µg/ml	100 s^{-1}

Tabelle 1: Versuchskombinationen
Alle acht möglichen Versuchskombinationen für den HPA-Polymorphismus; links HPA-1a/1a-Genotyp, rechts HPA-1b/1b-Genotyp

2.5 Nachweis der Spezifität der αIIbβ3-vermittelten Thrombozytenadhäsion

Die Kontrollversuche zum Nachweis der Spezifität der αIIbβ3-vermittelten Thrombozytenadhäsion wurden mit Abciximab (Reopro) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen gentechnisch hergestellten monoklonalen Antikörper, welcher mit einer hohen Affinität an αIIbβ3 bindet und so dessen Interaktion mit Fibrinogen, vWF und weiteren Adhäsionsmolekülen hemmt. Erfolgt die Bindung der Thrombozyten über das Integrin αIIbβ3, sollte eine Thrombozytenadhäsion durch eine Inkubation mit Abciximab verhindert werden können.

Für die Durchführung wurde Probandenblut im Anschluss an die Entnahme unmittelbar mit Abciximab und Mepacrin vermengt und für 60 Minuten inkubiert. Das Mischverhältnis bestand aus 4 µg Abciximab (Reopro) pro ml Blut. Die Kontrollversuche erfolgten mit einer Flussgeschwindigkeit von 500 s^{-1} und einer Ligandenkonzentration des vWF von 350 µg/ml. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte wie oben beschrieben.

2.6 Probanden

Die Versuchsdurchführung erfolgte mit vorheriger Genehmigung der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf vom 11.09.2001, Aktenzeichen 1864.
Insgesamt nahmen 19 Probanden an der Studie teil. Dabei handelte es sich um zehn Probanden mit dem HPA-1a/1a-Genotyp und neun Probanden mit dem HPA-1b/1b-Genotyp. Unter den Probanden mit dem HPA-1a/1a-Genotyp befanden sich acht weibliche und zwei männliche Personen im Alter zwischen 24 und 48 Jahren. Zur Genotypisierung wurden den Probanden Blut entnommen.
Aufgrund der Rarität des HPA-1b/1b-Genotyps wurden die Probanden aus der Kartei des Instituts für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf rekrutiert. Die Probanden mit dem HPA-1b/1b-Genotyp bestanden aus acht männlichen und einer weiblichen Person im Alter zwischen 26 und 54 Jahren. Personen mit einem HPA-1a/1b-Genotyp (heterozygot) wurden nicht in die Analyse aufgenommen. Weitere Ausschlusskriterien waren die Einnahme eines blutverdünnenden Mittels wie Acetylsalicylsäure (ASS) oder eine zu geringe bzw. zu hohe Thrombozytenzahl. Eingeschlossen wurden Probanden mit Thrombozytenzahlen zwischen 150.000/µl und 350.000/µl.

Am Tag der Versuchsdurchführung wurde den Probanden 20 ml Blut entnommen. Dabei wurde das Blut mit Citrat antikoaguliert, wobei das erste Röhrchen verworfen wurde, um eine vorzeitige Aktivierung der Gerinnungskaskade durch *Tissue Factor* auszuschließen. Anschließend wurde das antikoagulierte Blut in Reagenzgläser umgefüllt, um dort mit Mepacrin versetzt zu werden. Da Mepacrin sich kontinuierlich abbaut, musste das Blut für jeden Versuch separat inkubiert werden, um systematische Messfehler zu vermeiden. Nach abgeschlossener Blutentnahme wurde der kreislaufstabile Proband entlassen.
Die gemessenen Blutparameter der Probanden mit HPA-1a/1a-Genotyp sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Proband	Thrombozyten x 10^3/µl	Leukozyten x 10^3/µl	Erythrozyten x 10^6/µl	Hämoglobin g/dl	Hämatokrit %
1	260	9,2	4,39	13,5	38,9
2	210	5,1	4,62	14,3	39,9
3	211	5,8	4,25	12,5	37,4
4	218	5	4,24	12,7	36,4
5	169	5	4,07	12,5	36,6
6	200	5,6	4,17	12,9	37,5
7	274	7,9	3,98	12,2	35,9
8	230	5,3	3,92	12,4	35
9	177	5	4,64	13,7	38,8
10	173	4,6	4,02	11,6	33,5

Tabelle 2: Blutparameter der Probanden mit dem HPA-1a/1a-Genotyp

Die gemessenen Blutparameter der Probanden mit HPA-1b/1b-Genotyp sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Proband	Thrombozyten x 10^3/µl	Leukozyten x 10^3/µl	Erythrozyten x 10^6/µl	Hämoglobin g/dl	Hämatokrit %
1	207	5,9	4,82	15	43,7
2	230	7,2	3,98	12,6	36,1
3	181	4,7	4,78	15,2	42,4
4	223	4,3	4,57	13,5	40,6
5	203	5,5	4,52	14,5	40,1
6	245	5,1	4,62	13,9	39,6
7	213	5,4	3,97	12,1	34,6
8	182	5,3	4,3	13,9	41,1
9	261	4,2	4,83	14,6	42,1

Tabelle 3: Blutparameter der Probanden mit dem HPA-1b/1b-Genotyp

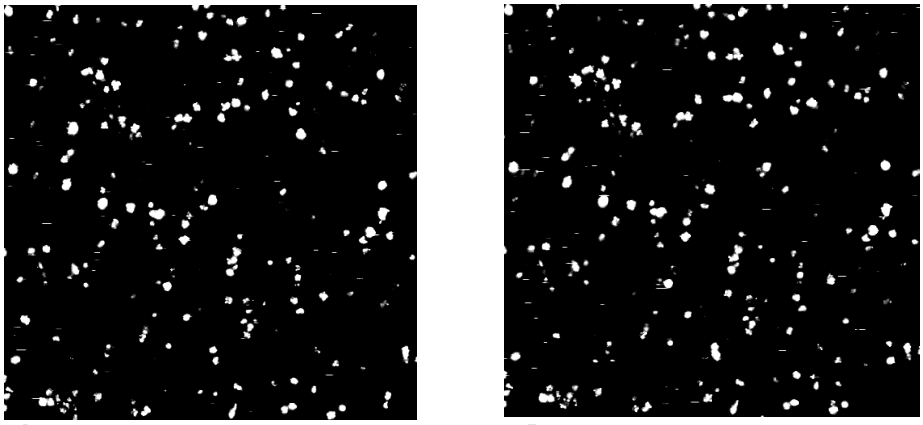
2.7 Datenerhebung und statistische Auswertung der Versuche

Die in den Versuchen generierten Bilder wurden durch das Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) in Zahlen umgewandelt. Dabei wurde die genaue Zahl der adhärierten Thrombozyten zu verschiedenen Zeitpunkten (Minute 1–10) ermittelt.

Dazu analysierte das Programm die aufgezeichneten Pixel der adhärenten Thrombozyten und gab sie als Fläche wieder (*Total Area*). Um zu gewährleisten,

dass nur adhärente Thrombozyten und nicht vorbeifließende Thrombozyten einberechnet wurden, wurden durch das Programm zwei der zehn aufeinander folgenden Aufnahmen eines Bildstapels miteinander verrechnet. Aufgrund des geringen Zeitabstandes der zwei Bilder (900 ms), konnte das Programm die bewegten Thrombozyten mittels digitaler Bildsubtraktion identifizieren und verwerfen. Mit der Funktion *Threshold* konnten Grauwerte reduziert und Fluoreszenzunterschiede ausgeglichen werden.

Damit die Berechnungen nicht für jeden der zehn in einem Versuchsdurchlauf angefertigten Bilderstapel neu erfolgen mussten, wurde ein Macro (siehe Anhang) für das Programm geschrieben. Dieses wurde für jeden Versuch mit ImageJ geöffnet und gab dem Programm den Befehl, für jeden der zehn Bildstapel die verrechnete Fläche von Bild 5 und 6 anzugeben (siehe Abbildung 9). Die Analyse (*Summary*) wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel angezeigt (siehe Tabelle 4).



A ***B***

Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, die zur Verrechnung von Bild 5 aus Bildstapel 1 (A) und Bild 6 aus Bildstapel 1(B) verwendet wurde.
A *und* ***B****: Emittiertes Licht der Wellenlänge 458 nm.*

Slice	Count	Total Area
Result of 0005	181	11027
Result of 0015	364	31044
Result of 0025	482	44634
Result of 0035	478	52129
Result of 0045	519	54300
Result of 0055	482	55487
Result of 0065	532	59192
Result of 0075	558	59860
Result of 0085	595	62774
Result of 0095	565	64721

Tabelle 4: Bildverrechnung durch ImageJ
Result of 0005 entspricht der Verrechnung der Bilder aus Abbildung 9.

Um zu verhindern, dass die unterschiedliche Anzahl der Thrombozyten bei den verschiedenen Probanden Einfluss auf das Ergebnis nimmt, wurden die ermittelten Werte durch die Thrombozytenzahl des Probanden dividiert.

Zur statistischen Auswertung wurde das Internetprogramm GraphPad Quick Calcs verwendet, welches durch einen t-Test die Signifikanz berechnet. Als signifikant wurden Unterschiede mit einem p-Wert kleiner 0,05 gewertet ($p<0,05$).

Für die Auswertung benötigte Programme:

- Bildverarbeitungsprogramm des LSM 510 (Release 2.8 Service Pack 1)
- ImageJ Version 1.39, Wayne Rasband am Massachusetts Institute of Technology (MIT)
- Microsoft Office Excel 2007
- GraphPad Quick Calcs

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Spezifität der αIIbβ3-vermittelten Thrombozytenadhäsion

Zum Nachweis der Beteiligung des Integrins αIIbβ3 an der Thrombozytenadhäsion wurde das Blut der Probanden mit Abciximab und Mepacrin inkubiert (siehe Kapitel 2.5).

Abciximab unterbindet die Interaktion von αIIbβ3 mit Fibrinogen und dem vWF.

Durch den Zusatz von Reopro (Abciximab) wurde bei dem Blut der Probanden mit dem HPA-1b/1b-Genotyp eine Inhibition der Thrombozytenadhäsion an vWF von über 95% (nach der zehnten Minute) erzielt.

Bei gleichem Versuchsaufbau betrug die Inhibition der Thrombozytenadhäsion an vWF beim Blut von Probanden mit dem HPA-1a/1a Genotyp über 96%.

Damit konnte belegt werden, dass die Adhäsion der Thrombozyten unabhängig vom HPA-1-Genotyp fast ausschließlich auf die Bindung des Integrins αIIbβ3 an seine Liganden zurückzuführen ist (siehe Abbildung 10).

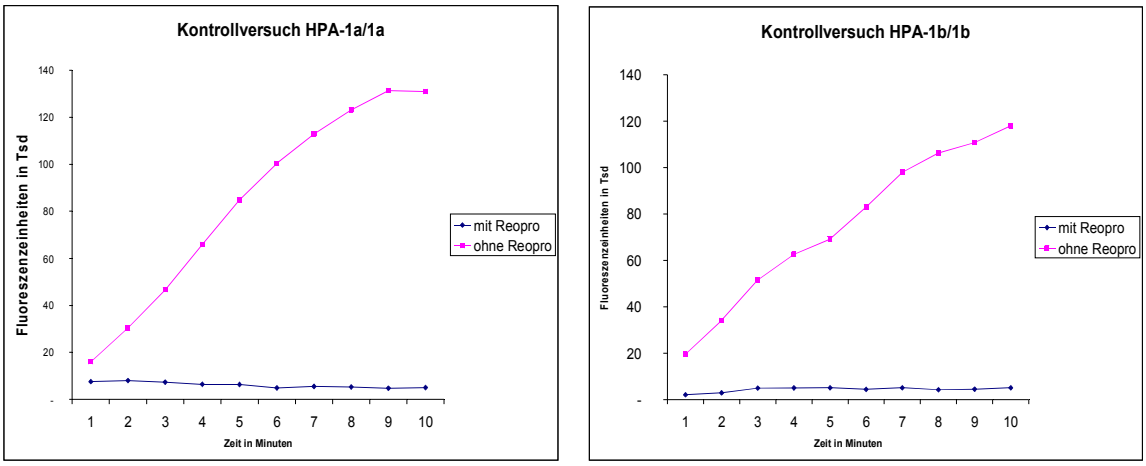


Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenadhäsion aus mit BSA (pinke Kurve) und Abciximab (blaue Kurve) inkubiertem Probandenblut an vWF

links HPA-1a/1a, rechts HPA-1b/1b; Scherrate 500 s^{-1}

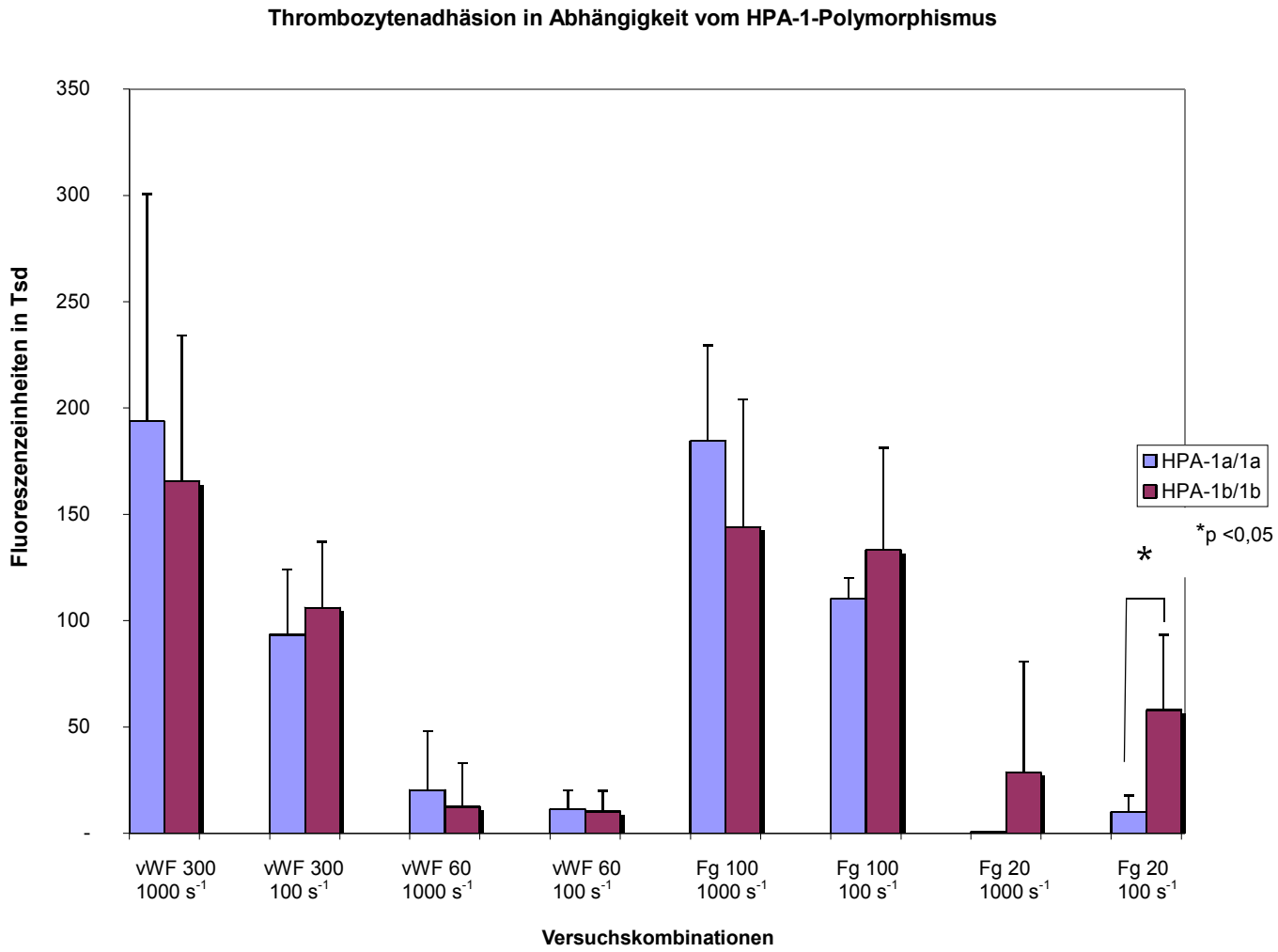
3.2 Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf die Thrombozytenadhäsion

Für die Analyse der Abhängigkeit der Thrombozytenadhäsion vom HPA-1-Polymorphismus wurde Blut von Probanden mit dem Genotyp HPA-1a-/1a und HPA-1b-/1b verglichen (siehe Kapitel 2.5). Die Versuche wurden mit zwei verschiedenen Liganden (vWF, Fibrinogen), verschiedenen Ligandenkonzentrationen und bei arteriellen und venösen Scherraten durchgeführt (siehe Kapitel 2.4 und Abbildung 11).

Zwischen den HPA-1a- und HPA-1b-Varianten ergab sich lediglich bei der Parameterkombination 20 µg/ml Fibrinogen und venöse Scherraten von 100 s^{-1} (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12: $p = 0,0287$) ein signifikanter Unterschied. Unter diesen Bedingungen adhärierten Thrombozyten mit der HPA-1a-Variante deutlich schlechter als Thrombozyten der HPA-1b-Variante).
Bei hohen Fibrinogen-Konzentrationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der HPA-1-Varianten, weder unter arteriellen noch unter venösen Flussgeschwindigkeiten. Bei der Versuchskombination aus niedrigen Fibrinogen-Konzentrationen unter arteriellen Flussbedingungen, konnten die adhärenten Thrombozyten der Strömung nicht standhalten und rissen immer wieder ab. Dieses Phänomen war besonders bei der HPA-1a-Variante zu beobachten. Die gemessenen Fluoreszenzeinheiten lagen bei der HPA-1a-Variante im Mittel deutlich niedriger mit 0,44 x 10^3 als bei der HPA-1b-Variante mit 28,73 x 10^3. Dennoch erreichte der Unterschied keine statistische Signifikanz.
Die Versuchsreihen mit vWF zeigten bei den verschiedenen Versuchskombinationen keine signifikanten Unterschiede zwischen Thrombozyten mit der HPA-1a- und HPA-1b-Variante.

Bei hohen Ligandenkonzentrationen und arteriellen Flussbedingungen adhärierten Thrombozyten mit der HPA-1a-Variante im Vergleich zu Thrombozyten mit der HPA-1b-Variante tendenziell besser (vWF: 193,63 zu 165,44 Fluoreszenzeinheiten x 10^3; Fibrinogen: 184,51 zu 144,09 Fluoreszenzeinheiten x 10^3). Unter venösen Bedingungen war das umgekehrte Phänomen zu beobachten, d. h. Thrombozyten mit der HPA-1b-Variante

adhärierten tendenziell besser (vWF: 93,4 zu 106,11 Fluoreszenzeinheiten x 10^3; Fibrinogen: 110,17 zu 133,17 Fluoreszenzeinheiten x 10^3). Keiner dieser Unterschiede erreichte aber eine statistische Signifikanz.



Ligand	Konzentration	Scherrate	Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit vom Genotyp		
vWF	300 µg/ml	1000 s^{-1} →	HPA-1a/1a	>	HPA-1b/1b
vWF	300 µg/ml	100 s^{-1} →	HPA-1a/1a	<	HPA-1b/1b
vWF	60 µg/ml	1000 s^{-1} →	HPA-1a/1a	>	HPA-1b/1b
vWF	60 µg/ml	100 s-1 →	HPA-1a/1a	>	HPA-1b/1b
Fibrinogen	100 µg/ml	1000 s^{-1} →	HPA-1a/1a	>	HPA-1b/1b
Fibrinogen	100 µg/ml	100 s-1 →	HPA-1a/1a	<	HPA-1b/1b
Fibrinogen	20 µg/ml	1000 s^{-1} →	HPA-1a/1a	<	HPA-1b/1b
Fibrinogen	20 µg/ml	100 s-1 →	HPA-1a/1a	< *	HPA-1b/1b

Abb. 11: Thrombozytenadhäsion (Fluoreszenzeinheiten x 10^3) in Abhängigkeit vom HPA-1-Polymorphismus nach 10 Minuten

Die Versuchsreihe wurde mit verschiedenen Liganden in verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlichen Scherraten durchgeführt.
*Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Versuchskombinationen dargestellt. *p<0,05*

Der zeitliche Verlauf der Adhäsion der Thrombozyten mit der HPA-1a- bzw. HPA-1b-Variante an niedrige Fibrinogen-Konzentrationen unter venösen Scherraten ist in Abbildung 13 dargestellt. Es wird deutlich, dass in den ersten Minuten die Thrombozyten vergleichbar stark adhärieren. Während die Anzahl der adhärierten Zellen bei der HPA-1b-Variante weiter zunimmt, stagniert die Zahl der Thrombozyten mit der HPA-1a-Variante auf einem niedrigen Niveau.

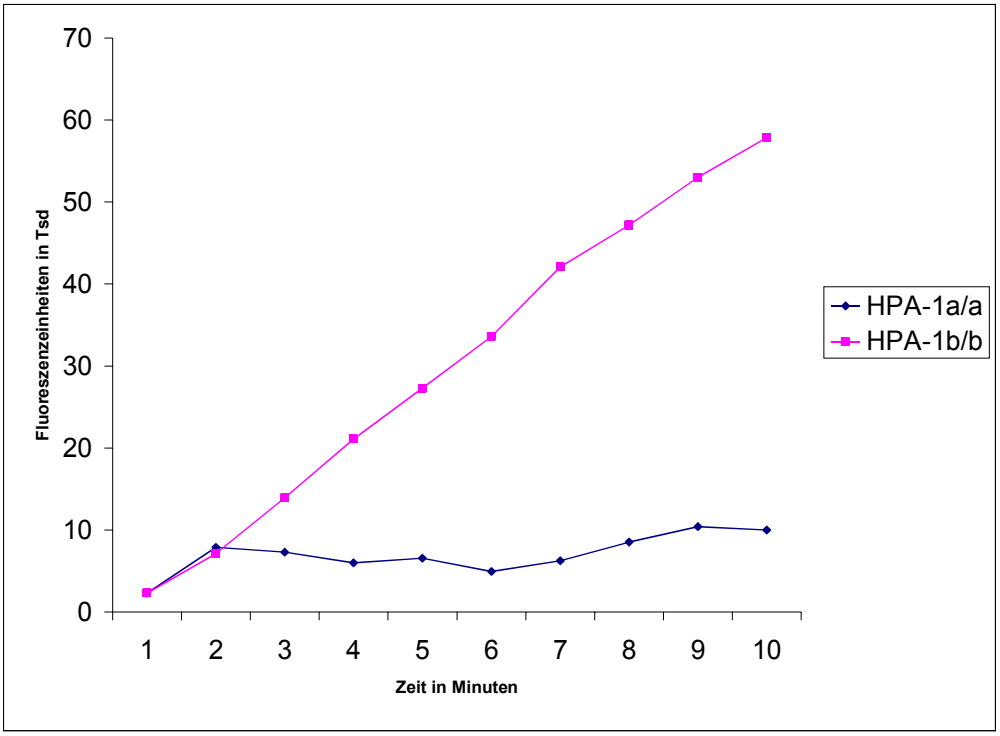
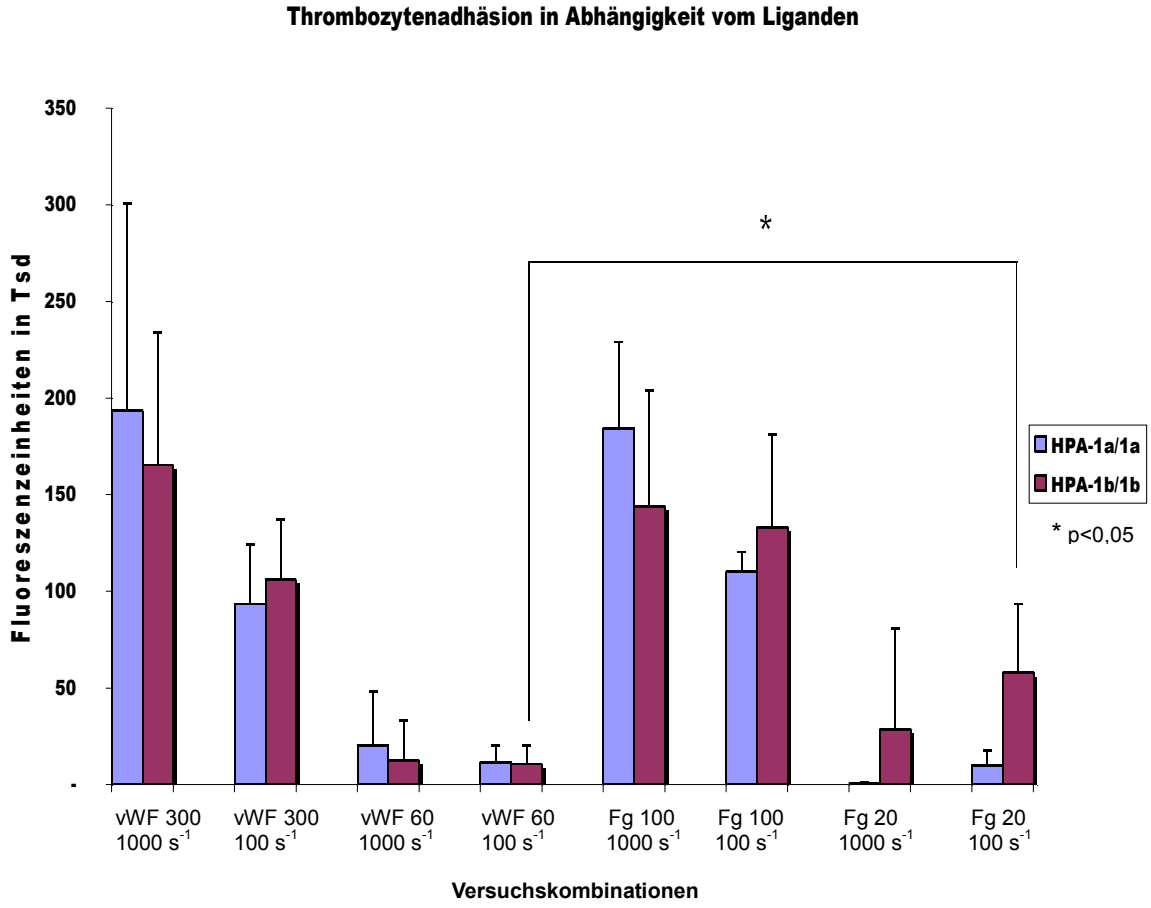


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenadhäsion (Fluoreszenzeinheiten x 10^3) an Fibrinogen (20 µg/ml) bei 100 s^{-1}; p<0,05

3.3 Thrombozytenadhäsion an verschiedene Liganden

Weiter wurde die Thrombozytenadhäsion (HPA-1a/1a- und HPA-1b/1b-Genotyp) an zwei Liganden (vWF, Fibrinogen) miteinander verglichen (siehe Kapitel 2.4). Dabei wurden wiederum verschiedene Ligandenkonzentrationen und Scherraten berücksichtigt (siehe Abbildung 13).

Thrombozyten mit dem Genotyp HPA-1b/1b adhärieren bei niedriger Ligandenkonzentration unter venösen Bedingungen signifikant besser an Fibrinogen als an den vWF (siehe Abbildung 14, p=<0,05).
Bei allen weiteren Parameterkombinationen war die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen und vWF vergleichbar.



Vergleich der Adhäsion der Thrombozyten mit dem Genotyp HPA-1a/1a						
Ligand	Konzentration	Scherrate		Ligand	Konzentration	Scherrate
vWF	300 µg/ml	1000 s^{-1}	>	Fibrinogen	100 µg/ml	1000 s^{-1}
vWF	300 µg/ml	100 s^{-1}	<	Fibrinogen	100 µg/ml	100 s^{-1}
vWF	60 µg/ml	1000 s^{-1}	>	Fibrinogen	20 µg/ml	1000 s^{-1}
vWF	60 µg/ml	100 s^{-1}	>	Fibrinogen	20 µg/ml	100 s^{-1}
Vergleich der Adhäsion der Thrombozyten mit dem Genotyp HPA-1b/1b						
Ligand	Konzentration	Scherrate		Ligand	Konzentration	Scherrate
vWF	300 µg/ml	1000 s^{-1}	>	Fibrinogen	100 µg/ml	1000 s^{-1}
vWF	300 µg/ml	100 s^{-1}	<	Fibrinogen	100 µg/ml	100 s^{-1}
vWF	60 µg/ml	1000 s^{-1}	<	Fibrinogen	20 µg/ml	1000 s^{-1}
vWF	60 µg/ml	100 s^{-1}	<*	Fibrinogen	20 µg/ml	100 s^{-1}

Abb. 13: Thrombozytenadhäsion (Fluoreszenzeinheiten x 10^3) in Abhängigkeit vom gewählten Liganden nach 10 Minuten

Die Versuchsreihe wurde mit zwei HPA-1-Genotypen (HPA-1a/1a, HPA-1b-1b), verschiedenen Ligandenkonzentrationen und unterschiedlichen Scherraten durchgeführt.

*Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Versuchkombinationen dargestellt. *p<0,05*

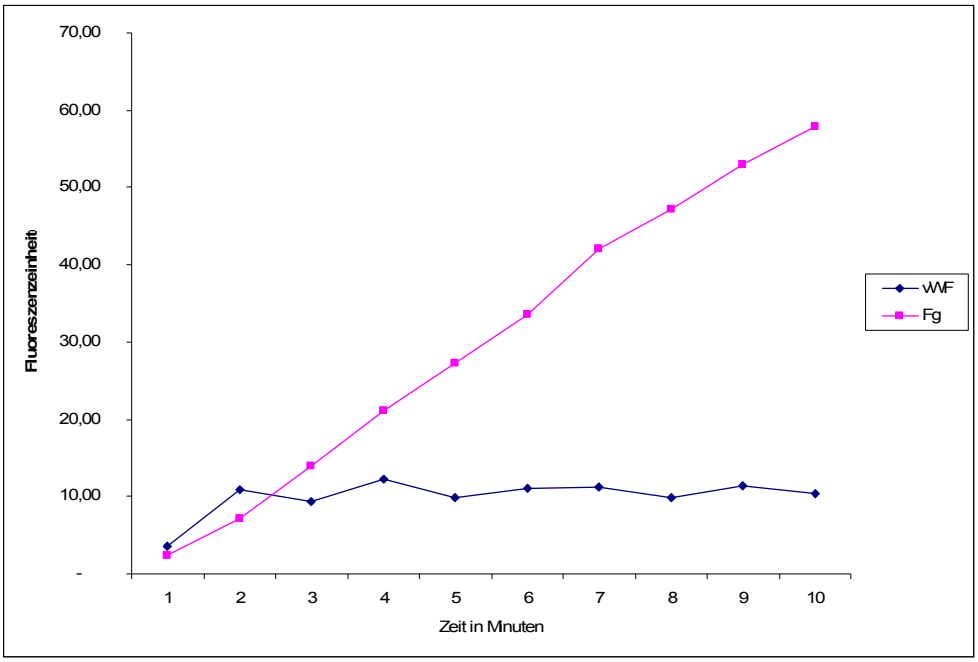
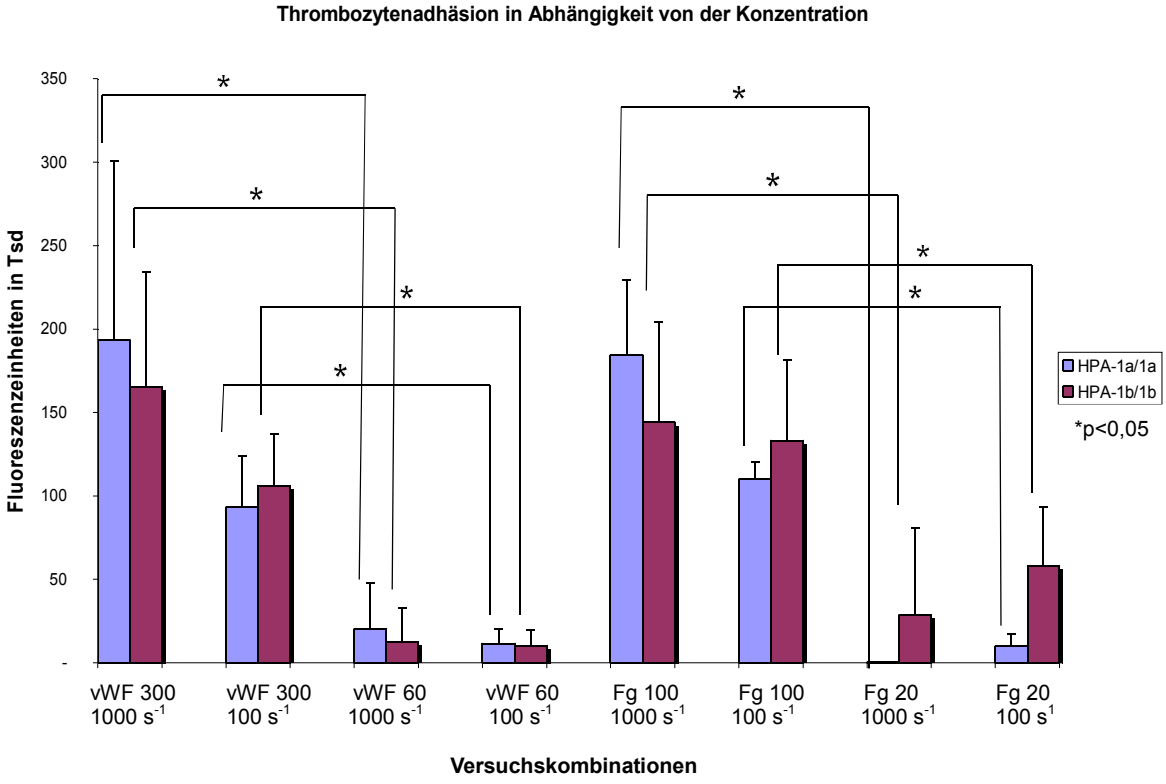


Abb. 14: Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenadhäsion (Fluoreszenzeinheiten x 10^3) an Fibrinogen 20 µg/ml (pinke Kurve) und vWF 60 µg/ml (blaue Kurve) bei 100 s^{-1}; p<0,05

3.4 Einfluss der Ligandenkonzentration auf die Thrombozytenadhäsion

Beide untersuchte Liganden wurden in zwei Konzentrationen eingesetzt. Beim vWF wurden 60 µg/ml und 300 µg/ml analysiert, und bei Fibrinogen 20 µg/ml und 100 µg/ml. Die Adhäsion wurde bei verschiedenen Scherraten (arterielle und venöse Bedingungen) und mit Thrombozyten mit verschiedenem Genotyp (HPA-1a/1a und HPA-1b/1b) untersucht.

Die Auswertung ergab eine signifikant höhere Thrombozytenadhäsion bei einer Erhöhung der Ligandenkonzentration in jeder der acht Parameterkombinationen ($p<0,05$), unabhängig von der Scherrate, dem HPA-1-Genotyp und dem Liganden (siehe Abbildung 15).



Vergleich der Adhäsion der Thrombozyten mit dem Genotyp HPA-1a/1a						
Ligand	Konzentration	Scherrate		Ligand	Konzentration	Scherrate
vWF	300 µg/ml	1000 s^{-1}	>*	vWF	60 µg/m	1000 s^{-1}
vWF	300 µg/ml	100 s^{-1}	>*	vWF	60 µg/ml	100 s^{-1}
Fibrinogen	100 µg/ml	1000 s^{-1}	>*	Fibrinogen	20 µg/ml	1000 s^{-1}
Fibrinogen	100 µg/ml	100 s^{-1}	>*	Fibrinogen	20 µg/ml	100 s^{-1}
Vergleich der Adhäsion der Thrombozyten mit dem Genotyp HPA-1b/1b						
vWF	300 µg/ml	1000 s^{-1}	>*	vWF	60 µg/m	1000 s^{-1}
vWF	300 µg/ml	100 s^{-1}	>*	vWF	60 µg/ml	100 s^{-1}
Fibrinogen	100 µg/ml	1000 s^{-1}	>*	Fibrinogen	20 µg/ml	1000 s^{-1}
Fibrinogen	100 µg/ml	100 s^{-1}	>*	Fibrinogen	20 µg/ml	100 s^{-1}

Abb. 15: Thrombozytenadhäsion (Fluoreszenzeinheiten x 10^3) in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration nach 10 Minuten

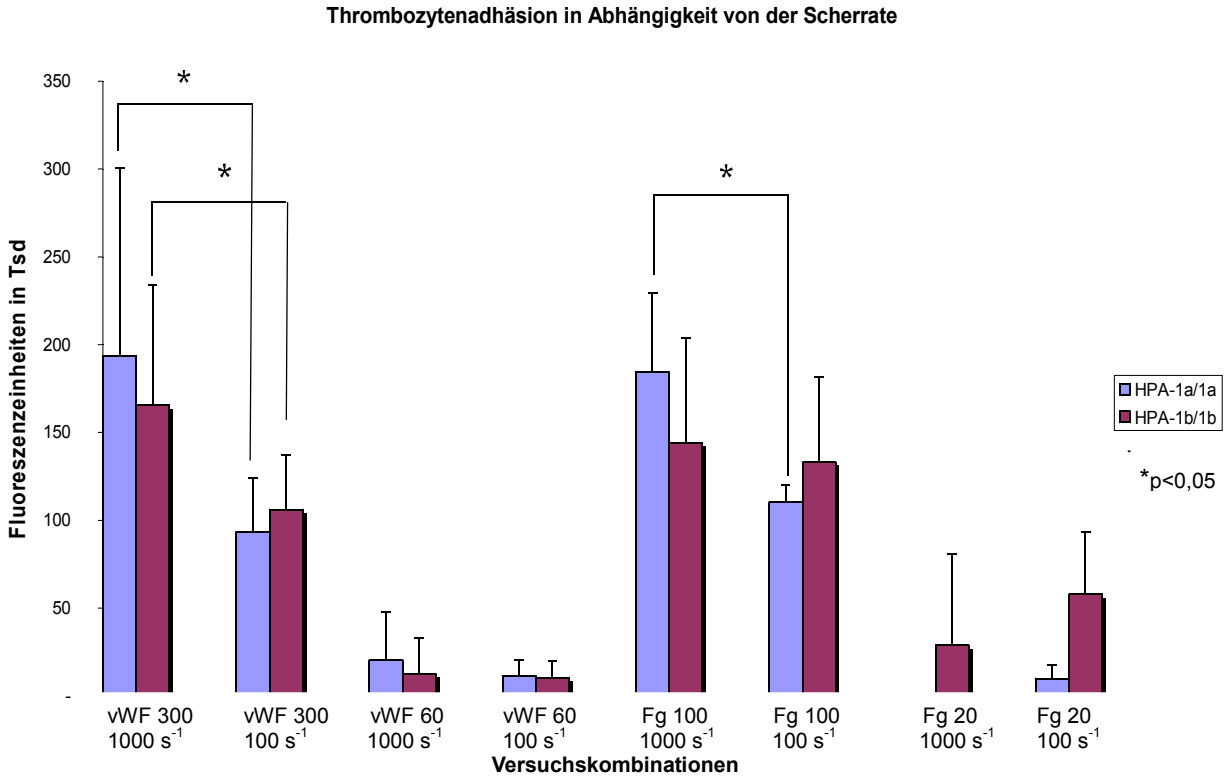
Die Versuchsreihe wurde mit zwei HPA-1-Genotypen (HPA-1a/1a, HPA-1b-1b), verschiedenen Ligandenkonzentrationen und unterschiedlichen Scherraten durchgeführt.

*Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Versuchskombinationen dargestellt. *p<0,05*

3.5 Einfluss der Scherrate auf die Thrombozytenadhäsion

In der folgenden Versuchsreihe wurde die Thrombozytenadhäsion bei venösen (100 s^{-1}) und arteriellen (1000 s^{-1}) Scherrate verglichen. Dabei wurden Thrombozyten mit unterschiedlichem Genotyp (HPA-1a/1a, HPA-1b/1b) sowie verschiedene Liganden in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (siehe Abbildung 16).
Signifikante Unterschiede ergaben sich bei dem HPA-1a/1a-Genotyp bei hohen Ligandenkonzentrationen (vWF und Fibrinogen). In diesen Versuchsreihen war unter arteriellen Bedingungen eine stärkere Thrombozytenadhäsion zu verzeichnen. Auch die Thrombozyten mit einem HPA-1b/1b-Genotyp adhärierten bei hohen Scherraten signifikant besser an hohe vWF-Konzentrationen als bei niedrigen Scherraten. Bei der Versuchsreihe mit hohen Fibrinogen-Konzentrationen war zwar eine stärkere Adhäsion unter arteriellen Bedingungen (144,09 Fluoreszenzeinheiten x 10^3 zu 133,17 Fluoreszenzeinheiten x 10^3) zu verzeichnen, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Bei den Versuchen mit niedrigen Ligandenkonzentrationen (vWF und Fibrinogen) ergab sich unter unterschiedlichen Scherraten keine signifikant verschiedene Thrombozytenadhäsion. Prinzipiell zeigten die Thrombozytenadhäsionsraten große Unterschiede (siehe Abbildung 16).



Vergleich der Adhäsion der Thrombozyten mit dem Genotyp HPA-1a/1a						
Ligand	Konzentration	Scherrate		Ligand	Konzentration	Scherrate
vWF	300 µg/ml	1000 s^{-1}	>*	vWF	300 µg/ml	100 s^{-1}
vWF	60 µg/ml	1000 s^{-1}	>	vWF	60 µg/ml	100 s^{-1}
Fibrinogen	100 µg/ml	1000 s^{-1}	>*	Fibrinogen	100 µg/ml	100 s^{-1}
Fibrinogen	20 µg/ml	1000 s^{-1}	<	Fibrinogen	20 µg/ml	100 s^{-1}
Vergleich der Adhäsion der Thrombozyten mit dem Genotyp HPA-1b/1b						
Ligand	Konzentration	Scherrate		Ligand	Konzentration	Scherrate
vWF	300 µg/ml	1000 s^{-1}	>*	vWF	300 µg/m	100 s^{-1}
vWF	60 µg/ml	1000 s^{-1}	>	vWF	60 µg/ml	100 s^{-1}
Fibrinogen	100 µg/ml	1000 s^{-1}	>	Fibrinogen	100 µg/ml	100 s^{-1}
Fibrinogen	20 µg/ml	1000 s^{-1}	<	Fibrinogen	20 µg/ml	100 s^{-1}

Abb. 16: Thrombozytenadhäsion (Fluoreszenzeinheiten x 10³) in Abhängigkeit von der Scherrate nach 10 Minuten

Die Versuchsreihe wurde mit zwei HPA-1-Genotypen (HPA-1a/1a, HPA-1b-1b), verschiedenen Liganden in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt.

*Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Versuchskombinationen dargestellt. *p<0,05*

4 Diskussion

Träger des HPA-1b/1b-Genotyps zeichnen sich durch ein erhöhtes Myokardinfarkt-Risiko aus (Zotz, 2005). In verschiedenen wissenschaftlichen Untersuchungen wurde eine erhöhte Thrombozytenadhäsion, eine verstärkte Aggregation, Sekretion, Migration, sowie eine verstärkte Thrombusbildung und ein verstärktes *Outside-In-Signaling* bei der HPA-1b/1b-Variante nachgewiesen (Vijayan und Bray, 2006).

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des HPA-1-Polymorphismus des Integrins αIIbβ3 auf die Thrombozytenadhäsion näher zu analysieren. Hierzu wurde die Adhäsion der Thrombozyten mit den Genotypen HPA-1a/1a und HPA-1b/1b an verschiedene Liganden (vWF, Fibrinogen) bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen und bei verschiedenen Scherrate (arterielle Bedingungen, venöse Bedingungen) analysiert. Für die Versuche wurde antikoaguliertes Vollblut von zuvor genotypisierten, gesunden Probanden verwendet. Die Ergebnisse der *in vitro*-Flusskammerexperimente werden in den folgenden Abschnitten ausführlich diskutiert.

4.1 Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf die Thrombozytenadhäsion

In dieser Versuchsreihe zeigte sich bei den meisten Parameterkombinationen kein signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten der Thrombozyten mit dem HPA-1a/1a- und HPA-1b/1b-Genotyp. Allerdings trat ein signifikanter Unterschied bei niedrigen Fibrinogen-Konzentrationen unter venösen Flussbedingungen auf (Fibrinogen 20 µg/ml, 100 s^{-1}). Bei dieser Parameterkombination zeigten die Thrombozyten mit dem HPA-1b/1b-Genotyp verglichen mit den Thrombozyten mit dem HPA-1a/1a-Genotyp eine höhere Tendenz zur Adhäsion. Bei der Analyse des zeitlichen Verlaufs der Adhäsion zeigen die Thrombozyten mit den verschiedenen HPA-1-Genotypen in den ersten beiden Minuten ein ähnliches Adhäsionsverhalten. Im weiteren Verlauf kam es jedoch bei den Thrombozyten mit dem HPA-1b/1b-Genotyp zu einem weiteren Anstieg der Adhäsionsrate, wohingegen bei den Thrombozyten mit dem HPA-1a/1a-Genotyp keine weitere

Zunahme der Adhäsion zu beobachten war (siehe Abbildung 13). Nach zehn Minuten betrug die Adhäsion der Thrombozyten mit dem Genotyp HPA-1b/1b das Fünffache der Adhäsion der Thrombozyten mit dem Genotyp HPA-1a/1a (57,9 +/- 35,6 Immunfluoreszenzeinheiten x 10^3 für HPA-1b/1b vs. 10 +/-7,5 Immunfluoreszenzeinheiten x 10^3 für HPA-1a/1a, p = 0,0287). Diese Befunde verdeutlichen die prothrombotische Eigenschaft der HPA-1b-Variante unter venösen Bedingungen. Die Beobachtungen der vorliegenden Studie decken sich mit den Ergebnissen anderer Studien (Vijayan, 2003 und 2006, Loncar, 2007, Schlesinger, 2013).

Eine potentielle Ursache für die fehlende Signifikanz bei den anderen Parameterkombinationen ist die auftretende hohe Varianz der Ergebnisse in den einzelnen Versuchsgruppen, die sich in einer hohen Standardabweichung niederschlägt. Tendenziell zeigten jedoch Thrombozyten mit dem HPA-1a/1a-Genotyp im Vergleich zu Thrombozyten mit dem HPA-1b/1b-Genotyp unter arteriellen Bedingungen (1000 s^{-1}) eine erhöhte Adhäsion sowohl an vWF (300 µg/ml, 60 µg/ml) als auch an Fibrinogen (100 µg/ml). Schlesinger untersuchte 2012 ebenfalls den Einfluss des HPA-1-Genotyps auf das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten. Auch in dieser Arbeit zeigten Thrombozyten mit dem Genotyp HPA-1a/1a eine höhere Adhäsion an Fibrinogen (100 µg/ml) und Fibronectin (100 µg/ml) unter arteriellen Bedingungen 1000 s^{-1} (Schlesinger, 2013).

Bei den Versuchsansätzen mit venösen Bedingungen (Scherraten von 100 s^{-1}) zeigte sich ein entgegengesetzter Trend. Thrombozyten mit dem HPA-1b/1b-Genotyp adhärierten unter diesen Bedingungen tendenziell besser an hohe vWF- (300 µg/ml) und hohe Fibrinogen-Konzentrationen (100 µg/ml). Dies spricht wie auch die signifikant stärkere Adhäsion bei niedrigen Fibrinogen-Konzentrationen für eine Prothrombogenität der HPA-1b-Variante besonders unter venösen Bedingungen. Unter arteriellen Bedingungen weist diese Variante hingegen eine abgeschwächte Thrombogenität auf. Eine mögliche Erklärung für diesen widersprüchlich erscheinenden Befund könnte eine verzögerte Latenzzeit der Aktivierung der Thrombozyten mit dem HPA-1b/1b-Genotyp sein. Unter dieser Voraussetzung wäre es möglich, dass unter arteriellen Bedingungen die kurze

Kontaktzeit zwischen Thrombozyt und Ligand zur Aktivierung nicht ausreichend ist (Loncar, 2007). Auch in der Arbeit von Schlesinger (2013) zeigten Thrombozyten mit dem HPA-1b/1b-Genotyp im Vergleich zu Thrombozyten mit dem HPA-1a/1a-Genotyp unter venösen Bedingungen eine höhere Adhäsionsneigung an hohe Fibrinogen-Konzentrationen.

Auch die Untersuchungen von Vijayan et al. belegen eine signifikant höhere Adhäsionsrate von Thrombozyten mit dem HPA-1b/1b-Genotyp an Fibrinogen unter venösen Bedingungen. Höhere Flussraten wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, sodass hier kein Vergleich möglich ist (Vijayan und Bray, 2006).
Die Arbeitsgruppe um Loncar et al. zeigte mit einem Flusskammer-Experiment, das die HPA-1a-Variante eine stärkere Adhäsion an Fibrinogen aufweist. Jedoch konnte unter arteriellen Bedingungen für die HPA-1b-Variante eine stabilere Bindung festgestellt werden. Diese Befunde sind möglicherweise auf ein verstärktes *Outside-In-Signaling* zurückzuführen. Außerdem wurde für die HPA-1b-Variante eine längere Latenzzeit bis zur Aktivierung der Thrombozyten beschrieben (Vijayan und Bray, 2006, Loncar, 2007). Ein Hinweis auf eine höhere Stabilität der Bindung von HPA-1b an Fibrinogen unter arteriellen Bedingungen liefern die Ergebnisse bei niedrigen Fibrinogen-Konzentrationen. Im Vergleich zu Thrombozyten mit dem HPA-1a/1a-Genotyp adhärieren Thrombozyten mit dem HPA-1b/1b-Genotyp deutlich besser (HPA-1b/1b-Genotyp 28,73 +/- 51,9 Immunfluoreszenzeinheiten x 10^3; HPA-1a/1a-Genotyp 0,44 +/- 0,44 Immunfluoreszenzeinheiten x 10^3, p= 0,39). Die HPA-1a-Variante kann bei niedriger Ligandenkonzentration der Scherrate nicht standhalten, die Thromben reißen sofort ab. Diese Befunde deuten auf eine höhere Stabilität der Thromben mit Thrombozyten der HPA-1b-Variante. Die Versuchsreihe mit dem zweiten Liganden, vWF, unterstützt diese Befunde jedoch nicht.

4.2 Thrombozytenadhäsion an verschiedene Liganden

Bei der Interpretation muss berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen an Fibrinogen und vWF nur eingeschränkt vergleichbar sind. Für eine nachweisbare Thrombozytenadhäsion war eine höhere vWF-Konzentration nötig. Diese Befunde könnten ein Hinweis darauf sein, dass das Integrin αIIbβ3 eine höhere Affinität zu Fibrinogen als zu vWF aufweist. Die unterschiedliche Adhäsion ist sowohl unter venösen wie auch unter arteriellen Bedingungen zu beobachten.
Die HPA-1-Varianten unterschieden sich hinsichtlich ihrer Affinität zu den getesteten Liganden. Die HPA-1b-Variante wies eine nachweislich höhere Affinität zu Fibrinogen auf. Dieses Phänomen konnte unter venösen (100 s^{-1}) sowie arteriellen Bedingungen (1000 s^{-1}) bei niedrigen Ligandenkonzentrationen (vWF 60 µg/ml und Fibrinogen 20 µg/ml) beobachtet werden. Bei hohen Konzentrationen war dieser Trend nur unter venösen Bedingungen nachzuweisen (vWF 300 µg/ml vs. Fibrinogen 100 µg/ml). Signifikant war der Unterschied unter venösen Bedingungen mit niedriger Ligandenkonzentration ($p< 0,05$). Die HPA-1a-Variante weist bezüglich der Affinitätsunterschiede zu den untersuchten Liganden keinen eindeutigen Trend auf.

4.3 Einfluss der Konzentration auf die Thrombozytenadhäsion

In der vorliegenden Arbeit kam es bei allen untersuchten Parameterkombinationen durch die Erhöhung der Ligandenkonzentration zu einer signifikant höheren Adhäsion von Thrombozyten. Welches eine gute Positivkontrolle im Bezug auf die Dosiswirkung darstellt.

Die Versuchsreihen mit Fibrinogen ergaben deutliche Unterschiede zwischen den HPA-1-Varianten. Bei den Thrombozyten mit dem HPA-1b/1b-Genotyp wirkte sich eine Erhöhung der Ligandenkonzentration deutlich geringer aus als bei Thrombozyten mit dem Genotyp HPA-1a/1a. So zeigte die HPA-1a/1a Variante bei hoher Fibrinogenkonzentration (100 µg/ml) eine 420x höhere Thrombozytenadhäsion unter arterieller Bedingungen im Vergleich zur niedrigen

Konzentration (20 µg/ml). Unter venösen Bedingungen zeigte sich eine 11x höher Adhäsion. Die HPA-1b/1b-Variante hingegen zeigte unter arterieller Bedingungen lediglich eine 5x höhere Thrombozytenadhäsion und unter venösen Bedingungen eine nur noch 2x höhere Adhäsionsrate. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der HPA-1b/1b-Genotyp bei niedrigen Fibrinogen Konzentrationen eine höhere Thrombozytenadhäsion aufweist als der HPA-1a/1a-Genotyp.

Die fast generell höheren Adhäsionsraten bei niedrigen Konzentrationen der Thrombozyten mit dem HPA-1b/1b-Genotyp sind ein weiterer Hinweis auf die höhere Affinität der HPA-1b-Variante zu Fibrinogen.

In der Versuchsvariante mit vWF zeigten sich diese deutlichen Unterschiede nicht. Dies weist möglicherweise die herausragende Bedeutung des Fibrinogens in Zusammenhang mit den prothrombotischen Eigenschaften des HPA-1b/1b-Genotyps aus.

4.4 Einfluss der Scherrate auf die Thrombozytenadhäsion

In dieser Arbeit konnte unabhängig vom HPA-1-Genotyp eine signifikant höhere Thrombozytenadhäsion an hohe vWF-Konzentrationen (300 µg/ml) unter hohen Scherraten (1000 s^{-1}) im Vergleich zu niedrigen Scherraten (100 s^{-1}) festgestellt werden ($p < 0,05$). Die Versuchsreihe mit hohen Fibrinogen Konzentrationen zeigte für Thrombozyten mit dem HPA-1a/1a-Genotyp unter arteriellen Scherbedingungen (1000 s^{-1}) eine signifikant stärkere Adhäsion als unter venösen Scherbedingungen (100 µg/ml, $p < 0,05$). Als mögliche Ursache für diese Befunde kommt die pro Zeiteinheit höhere Anzahl an vorbeiströmenden Thrombozyten unter hohen Scherraten.
Diese Ergebnisse der vorliegenden Studie widersprechen einigen Befunden anderer Studien. Jen et al. zeigten eine höhere Adhäsionsrate an immobilisiertes Fibrinogen bei Scherraten von 70 s^{-1} im Vergleich zu 445 s^{-1} (Jen, 1991). In der Studie von Savage et al. war die Adhäsionsrate an immobilisiertes Fibrinogen bei

Scherraten von 50 s^{-1} am größten, wohingegen bei einer Scherrate von 1500 s^{-1} keine Thrombozytenadhäsion nachweisbar war (Savage, 1996).

Die zuvor in einigen Studien besondere Bedeutung des vWF für die Adhäsion der Thrombozyten unter hohen Scherraten konnte in dieser Arbeit nur bedingt bestätigt werden (Tamkun, 1986, Hynes, 2002, Campbell, 2011, Calvete, 1994, Savage, 1996). Savage et al. fanden anders als in den Versuchsreihen mit Fibrinogen ein Maximum der Adhäsion der Thrombozyten an vWF unter der Scherrate 1500 s^{-1}(Savage, 1996). In der vorliegenden Arbeit zeigten sowohl Thrombozyten mit dem HPA-1a/1a-Genotyp als auch Thrombozyten mit dem HPA-1b/1b-Genotyp bei hohen vWF-Konzentrationen eine signifikant höhere Adhäsionsrate unter arteriellen Scherbedingungen (HPA-1a/1a-Genotyp: 193,6 +/- 107 Immunfluoreszenzeinheiten x 10^3 vs. 93,4 +/- 30,7 Immunfluoreszenzeinheiten x 10^3; p=0,0158; HPA-1b/1b-Genotyp: 165,4 +/- 68,5 Immunfluoreszenzeinheiten x 10^3 vs. 106,1 +/- 31 Immunfluoreszenzeinheiten x 10^3, p=0,0399). Bei der Bewertung der Befunde sollte man wiederum die höhere Anzahl an vorbeiströmenden Thrombozyten unter hohen Scherraten berücksichtigen.

5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, ein umfassenderes Verständnis über die Auswirkungen des HPA-1-Polymorphismus im Bezug auf die Interaktion mit den Liganden Fibrinogen und vWF, unterschiedlichen Konzentrationen dieser Liganden, unter arteriellen und venösen Bedingungen zu erlangen.

Es gilt die im Vergleich zu Thrombozyten mit dem Genotyp HPA-1a/1a höhere Adhäsionsrate der Thrombozyten mit dem Genotyp HPA-1b/1b unter venösen Bedingungen zu unterstreichen. Unter arteriellen Bedingungen konnte eine erhöhte Thrombogenität der Thrombozyten mit dem HPA-1b/1b-Genotyp dagegen nicht nachgewiesen werden. Vielmehr scheinen die vorliegenden Befunde darauf hinzudeuten, dass unter hohen Scherraten Thrombozyten mit einem HPA-1a/1a-Genotyp stärker adhärieren. Als mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte die verzögerte Latenzzeit für die Aktivierung der Thrombozyten mit dem HPA-1b/1b-Genotyp sein. Eine verzögerte Latenzzeit wirkt sich bei hohen Scherraten verstärkt aus, da die Kontaktzeiten zwischen Ligand und Zelle reduziert ist.

Weiterhin konnte eine höhere Affinität des Integrins αIIbβ3 für Fibrinogen im Vergleich zu vWF aufgezeigt werden. Die Affinität für Fibrinogen bei der HPA-1b-Variante ist besonders hoch. Daher sind möglicherweise die Interaktionen zwischen dem Integrin αIIbβ3 und Fibrinogen im Hinblick auf die physiologischen Konsequenzen des HPA-1-Polymorphismus von besonderer Bedeutung.
Der Kontakt von Thrombozyten mit dem Genotyp HPA-1b/1b zu Fibrinogen scheint stabiler zu sein als der Kontakt zu vWF. Ob dies Einfluss auf eine gesteigerte Thrombogenität des HPA-1b/1b-Genotyps haben könnte, müsste weiter erforscht werden.

Durch eine Erhöhung der Ligandenkonzentration ließ sich die Adhäsionsrate der Thrombozyten unabhängig von ihrem HPA-1-Genotyp sowohl unter arteriellen als auch venösen Scherbedingungen steigern. Dies deutet darauf hin, dass der in der vorliegenden Arbeit verwendete Konzentrationsbereich die auf den

Thrombozyten vorhandenen Integrin αIIbβ3 Moleküle noch nicht abgesättigt sind. Weitere Studien mit einem größeren Konzentrationsbereich sollten daher folgen.

Zuletzt wurde bei der Mehrzahl der untersuchten Parameterkombinationen eine höhere Adhäsionsrate unter hohen Scherraten (1000 s^{-1}) detektiert. Als mögliche Ursache für dieses Phänomen kann die höhere Anzahl vorbeiströmender Thrombozyten pro Zeiteinheit angenommen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente konnten nur teilweise die Befunde veröffentlichter Studien nachvollziehen, tragen jedoch zu deren Ergänzung bei. Auch werden weitere Fragen aufgeworfen, welche es in weiterführenden Studien zu untersuchen gilt.
Abschließend bleibt festzustellen, dass der HPA-1b/1b-Genotyp ein Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Myokardinfarkt darstellen könnte. Die in der hier vorliegenden Analyse erhobenen *in vitro* Befunde müssen aber unter *in vivo* Bedingungen bestätigt werden. Welchen Stellenwert der HPA-1-Polymorphismus im Zusammenspiel aller Risikofaktoren (Lebensstil, andere genetische Faktoren) bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen einnimmt, kann nur in großen epidemiologischen Studien analysiert werden.

Literaturverzeichnis

Adair BD, Yeager M (2002) Three-dimensional model of the human platelet integrin alpha IIb beta 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography. Proc Natl Acad Sci U S A 99:14059–14064. Copyright (2002) National Academy of Sciences, U.S.A.

Bennett JS (2005) Structure and function of the platelet integrin alphaIIbbeta3. J Clin Invest 115: 3363–3369

Calvete CC (1994) Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. Thromb Haemost 72: 1–15

Campbell I, Humphries MJ (2011) Integrin structure, sctivation, and interactions. Cold Spring Harb Perspect Biol 3 pii: a004994

Hynes RO (2002) Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 110: 673–687

Jen CJ, Lin JS (1991) Direct observation of platelet adhesion to fibrinogen- and fibrin-coated surfaces. Am J Physiol 261: H1457–H1463

Klinke, Pape, Silbernagl. Physiologie. 5. Auflage, Thieme Verlag 2005. S. 247-253

Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ (1995) Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. N Engl J Med 332: 1553–1559

Loncar R, Stoldt V, Hellmig S, Zotz RB, Mihalj M, Scharf RE (2007) HPA-1 polymorphism of alphaIIbbeta3 modulates platelet adhesion onto immobilized fibrinogen in an in-vitro flow system. Thromb J 5: 2

Loncar R, Zotz RB, Sucker C, Vodovnik A, Mihalj M, Scharf RE (2007) Platelet adhesion onto immobilized fibrinogen under arterial and venous in-vitro flow conditions does not significantly differ between men and women. Thromb J 5: 5

Löffler, Petrides PE: Biochemie und Pathobiochemie. Georg Löffler, Petro E.Petrides, Peter, C. Heinrich, Berlin: Springer 2006. S. 769–770, 1016–1021, Bilder: S. 769, 1017, 1018

Newman PJ, Derbes RS, Aster RH (1989) The human platelet alloantigens, PlA1 and PlA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. J Clin Invest 83: 1778–1781

Sajid M, Vijayan KV, Souza S, Bray PF (2002) PlA polymorphism of integrin beta 3 differentially modulates cellular migration on extracellular matrix proteins. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22: 1984–1989

Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM (1996) Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von-Willebrand factor. Cell 84: 289–297

Schlesinger, Saskia Christina (2013) Auswirkungen des HPA-1-Polymorphismus des Integrins αIIbβ3 auf die Thrombozytenadhäsion unter flussdynamischen Bedingungen. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Schneider MF, Schneider SW (2008) Der von-Willebrand-Faktor□: ein intelligenter Gefäßkleber. BIOspektrum 14: 134–139.

Springer TA, Zhu J, Xiao T (2008) Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen gammaC peptide by the platelet integrin alphaIIbbeta3 J Cell Biol 182: 791–800

Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, Hynes RO (1986) Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane

linkage between fibronectin and actin. Cell 46: 271–282

Vijayan KV, Bray PF (2006) Molecular mechanisms of prothrombotic risk due to genetic variations in platelet genes: Enhanced outside-in signaling through the Pro33 variant of integrin beta3. Exp Biol Med (Maywood) 231: 505–513

Vijayan KV, Goldschmidt-Clermont PJ, Roos C, Bray PF (2000) The PI(A2) polymorphism of integrin beta(3) enhances outside-in signaling and adhesive functions. J Clin Invest 105: 793–802

Vijayan KV, Huang TC, Liu Y, Bernardo A, Dong JF, Goldschmidt-Clermont PJ, Alevriadou BR, Bray PF (2003) Shear stress augments the enhanced adhesive phenotype of cells expressing the Pro33 isoform of integrin beta3. FEBS Lett 540: 41–46

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

Vijayan KV, Liu Y, Sun W, Ito M, Bray PF (2005) The Pro33 isoform of integrin beta3 enhances outside-in signaling in human platelets by regulating the activation of serine/threonine phosphatases. J Biol Chem 280: 21756–21762

Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ (1996) A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. N Engl J Med 334: 1090–1094

Zotz RB, Winkelmann BR, Müller C, Boehm BO, März W, Scharf RE (2005) Association of polymorphisms of platelet membrane integrins alphaIIbbeta3 (HPA-1b/PI) and alpha2beta1 (alpha807TT) with premature myocardial infarction. J Thromb Haemost 3: 1522–1529

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schema der Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Adhäsion. 1

Abb. 2 Fibrinogenrezeptor an der Thrombozytenmembran. 2

Abb. 3 Aktivierung des Thrombozyten durch Bindung des vWF-VIII-Komplexes 4

Abb. 4 Mittels Röntgen-Kristallographie nachgewiesene Konformation des Integrins αIIbβ3 5

Abb. 5 Deckplatte aus Acryl mit eingearbeiteten Kanülen 10

Abb. 6 Zusammengebaute Deck-und Unterplatte 10

Abb. 7 Zusammengebaute Deck-und Unterplatte 11

Abb. 8 Eingesetzte Flusskammer mit angeschlossenem Perfusor und Mikroskop 12

Abb. 9 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme 18

Abb. 10 Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenadhäsion aus mit BSA und Abciximab inkubiertem Probandenblut an vWF 20

Abb. 11 Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit vom HPA-1-Polymorphismus 22

Abb. 12 Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenadhäsion 23

Abb. 13 Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit vom gewählten Liganden 24

Abb. 14 Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen und vWF 25

Abb. 15 Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration 26

Abb. 16 Thrombozytenadhäsion in Abhängigkeit von der Scherrate 29

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Versuchskombinationen 15
Tabelle 2 Blutparameter der Probanden mit dem HPA-1a/1a-Genotyp 17
Tabelle 3 Blutparameter der Probanden mit dem HPA-1b/1b-Genotyp 17
Tabelle 4 Bildverrechnung durch ImageJ 18

Anhang

HPA-1a/1a

vWF 300µg/ml bei 1000s-1

Mean	SD	SD in %	N=9
37,98	19,50	51,35	
84,18	45,33	53,85	
115,65	61,01	52,75	
138,03	72,48	52,51	
155,39	81,00	52,13	
167,10	87,18	52,17	
178,36	96,17	53,92	
185,74	102,44	55,15	
189,47	105,76	55,82	
193,63	107,12	55,32	

vWF 300µg/ml bei 100s-1

Mean	SD	SD in %	N=9
1,95	1,18	60,77	
7,45	5,15	69,21	
13,89	8,65	62,23	
24,27	12,93	53,27	
35,12	17,69	50,38	
47,76	22,48	47,07	
59,23	22,56	38,09	
70,75	24,64	34,83	
82,10	27,89	33,97	
93,40	30,71	32,88	

vWF60µg/ml bei 1000s-1

Mean	SD	SD in %	N=9
18,37	12,08	65,75	
28,38	26,87	94,7	
29,62	37,91	127,97	
29,79	39,86	133,82	
31,65	48,17	152,19	
28,21	38,41	136,15	
28,89	40,59	140,47	
22,65	30,27	133,63	
19,04	24,43	128,32	
20,39	27,64	135,57	

vWF 60µg/ml bei 100s-1

Mean	SD	SD in %	N=9
2,20	1,84	83,41	
8,43	5,90	70,01	
8,58	3,49	40,72	
9,57	3,35	34,97	
6,89	3,33	48,36	
7,69	4,09	53,24	
10,24	5,68	55,45	
9,41	6,37	67,72	
10,55	9,03	85,56	
11,52	8,96	77,75	

HPA-1b/1b

vWF 300µg/ml bei 1000s-1

Mean	SD	SD in %	N=9
34,39	18,33	53,31	
70,74	34,34	48,54	
98,71	55,60	56,33	
115,03	73,15	63,59	
128,57	82,62	64,26	
141,17	88,13	62,43	
152,48	91,49	60,00	
160,69	89,06	55,42	
162,14	80,84	49,86	
165,44	68,51	41,41	

vWF 300µg/ml bei 100s-1

Mean	SD	SD in %	N=8
2,78	1,29	46,38	
7,99	3,90	48,83	
18,00	6,75	37,49	
31,45	10,21	32,45	
49,25	12,31	25,00	
63,17	12,94	20,49	
72,22	15,06	20,85	
83,22	20,34	24,44	
94,19	25,29	26,85	
106,11	31,06	29,27	

vWF 60µg/ml bei 1000s-1

Mean	SD	SD in %	N=9
14,24	4,77	33,48	
24,06	18,77	78,04	
27,66	32,37	117,03	
27,52	36,11	131,19	
19,49	24,35	124,93	
15,82	19,57	123,70	
12,68	15,91	125,45	
12,73	18,42	144,70	
11,22	15,92	141,81	
12,43	20,70	166,58	

vWF 60µg/ml bei 100s-1

Mean	SD	SD in %	N=8
3,61	2,11	58,50	
10,96	5,07	46,26	
9,32	7,11	76,26	
12,34	7,43	60,23	
9,85	8,47	85,99	
11,09	8,85	79,77	
11,17	11,40	102,09	
9,90	7,57	76,45	
11,48	7,04	61,30	
10,37	9,58	92,34	

HPA-1a/1a

Fg 100µg/ml bei 1000s-1

Mean	SD	SD in %	N=6
26,65	6,07	22,79	
74,36	19,84	26,68	
101,75	27,56	27,08	
127,55	34,28	26,88	
143,60	40,28	28,05	
156,00	39,13	25,09	
168,50	42,89	25,45	
172,87	41,39	23,94	
179,62	44,43	24,74	
184,51	44,82	24,29	

Fg 100µg/ml bei 100s-1

Mean	SD	SD in %	N=4
9,02	6,74	74,71	
11,44	8,20	71,73	
20,74	9,85	47,51	
30,64	8,90	29,06	
46,33	7,33	15,83	
58,01	6,82	11,75	
73,35	7,46	10,17	
84,18	9,58	11,38	
98,65	9,45	9,57	
110,17	10,09	9,16	

Fg 20µg/ml bei 1000s-1

Mean	SD	SD in %	N=3
1,92	3,00	156,37	
1,49	2,16	145,49	
0,99	1,01	101,60	
0,58	0,40	68,45	
0,70	0,53	75,27	
0,54	0,68	126,47	
0,64	0,92	142,79	
0,72	0,85	118,75	
0,41	0,41	100,16	
0,44	0,44	99,56	

20µg/ml bei 100s-1

MW	StAw	%	N=4
2,31	1,71	73,90	
7,90	5,65	71,51	
7,29	6,65	91,23	
5,98	4,92	82,28	
6,56	4,41	67,19	
4,94	3,29	66,49	
6,23	4,47	71,74	
8,53	6,28	73,58	
10,42	7,95	76,32	
10,01	7,51	75,00	

HPA-1b/1b

Fg 100µg/ml bei 1000s-1

Mean	SD	SD in %	N=7
28,70	11,88	41,38	
71,63	31,01	43,29	
97,74	40,44	41,37	
116,16	46,12	39,71	
129,22	50,08	38,76	
135,62	50,98	37,59	
138,61	51,61	37,24	
143,97	55,00	38,20	
146,52	60,35	41,19	
144,09	59,99	41,63	

Fg 100µg/ml bei 100s-1

Mean	SD	SD in %	N=7
3,00	2,40	80,10	
11,92	5,03	42,21	
25,43	9,88	38,86	
41,58	15,11	36,34	
56,66	17,08	30,14	
73,18	20,98	28,67	
88,78	25,96	29,24	
105,11	35,22	33,50	
119,57	41,94	35,08	
133,17	48,19	36,19	

Fg 20µg/ml bei 1000s-1

Mean	SD	SD in %	N=6
4,82	6,25	129,58	
5,78	8,06	139,41	
7,26	11,61	159,96	
9,03	16,34	181,01	
11,39	22,21	195,10	
15,28	28,56	186,87	
20,44	38,84	189,97	
24,69	46,26	187,36	
26,44	48,57	183,68	
28,73	51,90	180,65	

Fg 20µg/ml bei 100s-1

Mean	SD	SD in %	N=7
2,30	0,78	33,93	
7,13	2,86	40,05	
13,92	8,03	57,67	
21,07	12,29	58,31	
27,28	15,82	57,98	
33,59	20,45	60,87	
42,10	22,99	54,61	
47,18	27,48	58,24	
53,00	32,32	60,99	
57,85	35,56	61,47	

Daten aller Versuchsreihen jeweils für die Minuten 1-10;
Mean= Mittelwert; SD= absolute Standardabweichung; SD in %= Standardabweichung vom Mittelwert in Prozent; N= Anzahl Probanden pro Versuch

Makro Thrombozytenadhäsion

```
open("F:\\100214-03\\0005.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\100214-03\\0006.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0005.png","0006.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0005.png operation=AND image2=0006.png
create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("F:\\100214-03\\0015.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\100214-03\\0016.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0015.png","0016.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0015.png operation=AND image2=0016.png
create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("F:\\100214-03\\0025.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\100214-03\\0026.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0025.png","0026.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0025.png operation=AND image2=0026.png
create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("F:\\100214-03\\0035.png");
setAutoThreshold();
```

```
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\100214-03\\0036.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0035.png","0036.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0035.png operation=AND image2=0036.png
create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("F:\\100214-03\\0045.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\100214-03\\0046.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0045.png","0046.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0045.png operation=AND image2=0046.png
create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("F:\\100214-03\\0055.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\100214-03\\0056.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0055.png","0056.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0055.png operation=AND image2=0056.png
create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("F:\\100214-03\\0065.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\100214-03\\0066.png");
setAutoThreshold();
```

```
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0065.png","0066.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0065.png operation=AND image2=0066.png
create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("F:\\100214-03\\0075.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\100214-03\\0076.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0075.png","0076.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0075.png operation=AND image2=0076.png
create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("F:\\100214-03\\0085.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\100214-03\\0086.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0085.png","0086.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0085.png operation=AND image2=0086.png
create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("F:\\100214-03\\0095.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("F:\\100214-03\\0096.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0095.png","0096.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0095.png operation=AND image2=0096.png
```

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

Danksagung:

Zunächst danke ich Prof. Dr. Scharf für die Bereitstellung des Themas meiner Arbeit. Ich danke ebenfalls Dr. Volker Stoldt für die tolle Betreuung und, dass er als Ansprechpartner jederzeit bereit stand.

Außerdem spreche ich einen großen Dank an meine Eltern und meinen Freund Panajiotis Karanikas aus, die mich zu jedem Zeitpunkt unterstützten.

Auch geht ein großer Dank an meinen Erstgutachter Prof. Hohlfeld, der die Begutachtung meiner Arbeit ohne weiteres übernommen hat.

Zu guter Letzt danke ich natürlich allen Probanden, die sich bereit erklärt haben ihr Blut für die Versuchsdurchführung zu spenden.

Eidesstattliche Versicherung

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

30.09.2016, Robin Eileen Whited