

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

**Charakterisierung der Adhäsion  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-  
transfektierter HEK293-Zellen an immobilisierte  
Adhäsivproteine (Fibrinogen und Fibronektin)**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Benjamin Chahem

2017

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger E. Scharf

Gutachter: Prof. Dr. Axel Gödecke

Prof. Dr. Thomas Hohlfeld

meinen Geschwistern Julia und Christian gewidmet

# I Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Hämostase.....	1
1.2 Liganden .....	2
1.2.1 Fibrinogen .....	2
1.2.2 Fibronectin .....	3
1.3 Integrine.....	5
1.3.1 Integrinkonformationen und Aktivierung.....	6
1.3.2 <i>Outside-in</i> und <i>Inside-out Signaling</i> .....	7
1.3.3 Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ .....	9
1.3.4 Leu33Pro Variante des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ .....	10
<b>2 Ziele der Arbeit .....</b>	<b>12</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
3.1 Material .....	14
3.1.1 Zelllinien und Vektoren.....	14
3.1.2 Chemikalien .....	14
3.1.3 Antikörper.....	15
3.1.4 Geräte und sonstiges Zubehör.....	16
3.1.5 Software .....	17
3.2 Methoden .....	17
3.2.1 Zellkultur .....	17
3.2.2 Passagieren der HEK293-Zellen.....	17
3.2.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer.....	18
3.2.4 Durchflusszytometrie.....	18
3.2.5 Fibronectin-Aufreinigung .....	19
3.2.6 Herstellung Fibrinogen- und Fibronectin-beschichteter Deckgläser .	20
3.2.7 Versuchsvorbereitung und -aufbau .....	21

3.2.7.1 Reservoir (1) .....	21
3.2.7.2 Flusskammer (2) .....	22
3.2.7.3 Laser Scanning Mikroskop (3) .....	22
3.2.7.4 Harvard Pumpe (4) und Scherratenberechnung .....	23
3.2.8 Versuchsablauf .....	24
3.2.9 Datenanalyse und Statistik .....	25
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
4.1 Expression der HPA-1 Fusionsproteine in HEK293- Zellen...	27
4.2 Differenzierung der $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Varianten .....	29
4.3 Detektion der Fluoreszenzsignale .....	30
4.4 Spezifität der $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Funktion .....	32
4.5 Adhäsionscharakteristik der HPA-1-Isoformen von $\alpha$ IIb $\beta$ 3 an immobilisierten Adhäsivproteinen.....	34
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>41</b>
5.1 Funktionalität der fluoreszierenden Fusionsproteine .....	42
5.2 Spezifität der Integrin-Liganden-Bindung .....	42
5.3 Adhäsionseigenschaften auf Fibrinogen .....	43
5.4 Adhäsionseigenschaften auf Fibronektin.....	44
5.5 Ursachen des prothrombotischen Effekts der Pro33-Isoform.	46
5.6 <i>In-vivo</i> Übertragbarkeit.....	48
5.7 Klinische Relevanz und Ausblick.....	49
<b>6 Schlussfolgerungen.....</b>	<b>50</b>
<b>7 Zusammenfassung .....</b>	<b>52</b>
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
<b>9 Anhang.....</b>	<b>65</b>

### III Abkürzungsverzeichnis

<b>Å</b>	Ångström	<b>IHHTM</b>	Institut für
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat		Hämoostaseologie,
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin		Hämotherapie und
<b>Cas</b>	Crk-associated Substrate		Transfusionsmedizin
<b>CD</b>	Cluster Of Differentiation	<b>LSM</b>	Laser Scanning Mikroskop
<b>cDNA</b>	Complementary Desoxyribuncleic Acid	<b>MEPE</b>	Molecule Of Equivalent Phycoerythrin Values
<b>CFP</b>	Cyan Fluorescent Protein	<b>mRNA</b>	Messenger Ribonucleic Acid
<b>CHO</b>	Chinese Hamster Ovary	<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlendioxid	<b>PBS</b>	Phosphat Buffer Saline
<b>c-Src</b>	Cellular Sarcoma Tyrosinkinase	<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	<b>ph</b>	Potentia Hydrogenii
<b>Fab</b>	Antigen Binding Fragment	<b>PMA</b>	Polymaleic Säure
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorting	<b>PSI</b>	Plexin-Semaphorin- Integrin
<b>FCS</b>	Fetal Calf Serum	<b>Ras</b>	Rat Sarcoma
<b>FRET</b>	Förster- Energieresonanztransfer	<b>RGD</b>	Arginin-Glycin-Aspartat
<b>g</b>	Erdschwerebeschleunigung	<b>RGDF</b>	Arginin-Glycin-Aspartat- Phenylalanin
<b>G418</b>	Geneticin	<b>RGDS</b>	Arginin-Glycin-Aspartat- Serin
<b>GdnHCL</b>	Guanidin Hydrochlorid	<b>Rho</b>	Ras Homologue
<b>GP</b>	Glykoprotein	<b>SDS-</b>	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>HEK293</b>	Human Embryonic Kidney	<b>Page</b>	Polyacrylamide Gel Elektrophoresis
<b>HPA</b>	Humanes Plättchen Antigen	<b>Tris</b>	Trishydroxymethyl- aminomethan
<b>ICAM</b>	Intercellular Adhesion Molecule	<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>IgG</b>	Immunglobulin G		
<b>YFP</b>	Yellow Fluorescent Protein		

## SI-Einheiten

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>s<sup>-1</sup></b>	reziproke Sekunde
<b>nm</b>	Nanometer
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>mm</b>	Millimeter
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>mg</b>	Milligramm
<b>g</b>	Gramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>ml</b>	Milliliter
<b>l</b>	Liter
<b>µs</b>	Mikrosekunde
<b>ms</b>	Millisekunde
<b>s</b>	Sekunde
<b>min</b>	Minute
<b>mM</b>	Millimolar
<b>M</b>	Molar

# 1 Einleitung

## 1.1 Hämostase

Die Hämostase stellt die überlebenswichtige Funktion der Blutstillung dar und wird in eine primäre, auch zelluläre und eine sekundäre, auch plasmatische Hämostase aufgeteilt, welche durchaus sequentiell ablaufen, aber in Wechselwirkung miteinander stehen.

Den Hauptschritt der primären Hämostase stellt die Freilegung subendothelialer Matrixproteine dar, an denen Thrombozyten adhären, aktiviert werden und miteinander aggregieren. Somit bildet sich ein erster, hämostatisch wirksamer Plättchenpfropf ("*hemostatic plug*").

Während der sekundären Hämostase kommt es zur Freisetzung von *Tissue factor* und über Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems (Faktor VII-Aktivierung) zur Bildung von Thrombin mit konsekutiver Umwandlung löslichen Fibrinogens in unlösliches Fibrin. Dieses Fibrin stellt ein Maschen- oder Netzwerk für den sich bildenden Plättchenpfropf dar und trägt entscheidend dazu bei, dass der Plättchen-Fibrin-Thrombus nicht durch den Blutstrom von der Gefäßwand abgerissen wird (Boon 1993; Monaco und Lawrence 2003).

Hauptakteure der primären Hämostase sind Thrombozyten, die mit ihrem Rezeptor GPIIb-IIIa über den Ligand von-Willebrand Faktor oder mit ihren Rezeptoren GPIIb-IIIa und GPIIb-IIIa direkt an Kollagen binden und somit Kontakt zur subendothelialen Matrix herstellen (Nieswandt und Watson 2003; Bergmeier *et al.* 2006; Clemetson 2012).

Für die Interaktion der Thrombozyten untereinander sorgt vor allem das Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (Watson *et al.* 2005), auf welches sich die folgende Arbeit konzentriert. Einer der wichtigsten Liganden stellt Fibrinogen dar, das für die Thrombozytenaggregation von entscheidender Bedeutung ist (Laurens *et al.* 2006; Lord 2007).

So kann ein hereditärer oder erworbener Fibrinogenmangel klinisch unauffällig sein oder zu einer erhöhten Blutungsneigung der Patienten führen (Weisel 2005; Undas 2011).

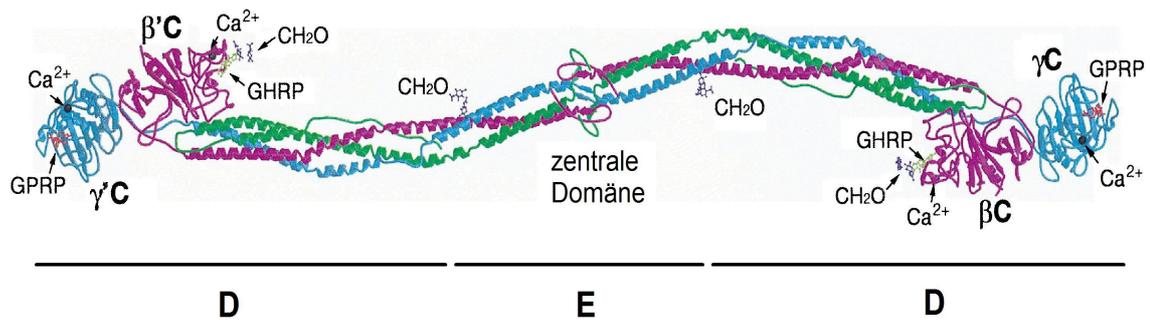
Obwohl Fibronectin in einem Plättchen-Fibrin-Thrombus nachgewiesen werden kann (Clark 2001), spielt es offenbar keine essentielle Rolle für die Hämostase (Sakai *et al.* 2001). Jedoch scheint es eine wichtige Funktion bei der Bildung und dem Wachstum von Thromben sowie im Falle der Abwesenheit von Fibrinogen oder des von-Willebrand Faktors einzunehmen (Ni *et al.* 2000; Ni *et al.* 2003; Maurer *et al.* 2010).

## 1.2 Liganden

Liganden stellen Substanzen dar, die an Zielproteine binden und eine Signaltransduktion bewirken können, welche zu einer Aktivierung oder Deaktivierung des Rezeptors führen kann. In dieser Arbeit wurden zur Durchführung der Adhäsionsversuche immobilisiertes Fibrinogen und Fibronectin als Liganden für das Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  verwendet.

### 1.2.1 Fibrinogen

Fibrinogen wird durch drei separate Gene codiert, die auf dem Chromosom Nummer 4 in der Region q23-q32 lokalisiert sind (Kant *et al.* 1985) und hauptsächlich in der Leber synthetisiert (Bennett 1985; Weisel 2005). Aber auch extrahepatische Syntheseorte, wie in Granulosazellen oder Trophoblasten sind beschrieben (Tennent *et al.* 2007). Fibrinogen besteht aus je zwei A $\alpha$ -, B $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten, die über insgesamt 29 intra- und inter-Ketten-Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und somit ein Heterohexamer von 45 nm Länge und 340 kDa Gewicht bilden (Blombäck und Blombäck 1972; Zhang und Redman 1996; Weisel 2005). Die Außendomänen, auch D-Domänen genannt, werden von den Carboxylenden der jeweiligen Untereinheiten gebildet und sind über ein *Coiled-Coil* Segment mit der zentralen E-Domäne, die durch die Aminoenden gebildet wird, verknüpft (Mosesson *et al.* 2001; Mosesson 2005) (Abb. 1).



**Abb. 1: Computergestützte Darstellung des Fibrinogens**

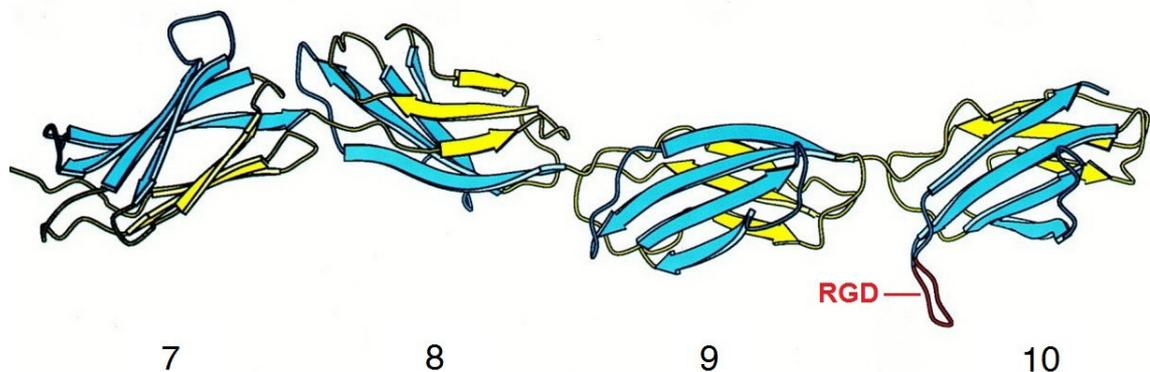
$\alpha$ -Ketten sind grün,  $\beta$ -Ketten rot und  $\gamma$ -Ketten blau dargestellt. D bezeichnet jeweils die Länge und Position der Außendomäne währenddessen E die zentrale Domäne markiert (modifiziert nach Doolittle 2003).

Fibrinogen spielt wie unter 1.1 beschrieben eine essenzielle Rolle in der Hämostase, aber auch ein wichtiger Stellenwert in der Fibroblastenproliferation sowie bei Abwehrmechanismen gegenüber Infektionen werden ihm zugeschrieben (Blombäck und Blombäck 1972). Unter anderem bindet Fibrinogen über zwei Sequenzen in der  $\alpha$ -Kette, A $\alpha$ 572-575 (RGDS (Arginin-Glycin-Aspartat-Serin)) und A $\alpha$ 95-98 (RGDF (Arginin-Glycin-Aspartat-Phenylalanin)) an das Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (Cheresh 1987; Felding-Habermann *et al.* 1992; Asakura *et al.* 1997; Gailit *et al.* 1997; Suehiro *et al.* 1997). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Bindung an dieses Integrin hauptsächlich über die  $\gamma$ <sub>A</sub>400-411 Sequenz des Moleküls erfolgt (Kloczewiak *et al.* 1984; Plow *et al.* 1984; Lam *et al.* 1987; Santoro und Lawing 1987; Andrieux *et al.* 1989; Bennett 2001).

### 1.2.2 Fibronektin

Fibronektin wird durch ein Gen auf dem Chromosom Nummer 2 in der Region q34 codiert (Wu *et al.* 1993) und als lösliches Plasma-Fibronektin in den Leberzellen synthetisiert oder als zelluläres Fibronektin von Fibroblasten, Epithel- oder anderen Zelltypen gebildet und in der Extrazellulärmatrix abgelagert (Pankov und Yamada 2002). Fibronektin ist ein Heterodimer, welches aus zwei nahezu identischen Polypeptidketten besteht, die an ihren C-terminalen Enden über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind und jeweils circa 250 kDa wiegen (Ruoslahti und Vaheri 1974; Mosesson *et al.* 1975; Mosher 1975). Durch alternatives Spleißen der mRNA sind heute über 20

verschiedene Isoformen bekannt. Die einzelnen Polypeptid-Monomere werden aufgrund ihrer Ähnlichkeiten in Module I, II und III eingeteilt (Muro *et al.* 2003). Fibronektin spielt eine wichtige Rolle für die Zelladhäsion und Zellmigration in der Embryogenese, der Gewebeintegrität, bei Abwehrmechanismen oder der Wundheilung und Hämostase (Vaehri 1980; Grinnell *et al.* 1981; French-Constant 1995; Kornblihtt *et al.* 1996). Hier kann es mit Glykosaminoglykanen, Kollagenen, Fibrinen oder Integrinen interagieren (Kornblihtt und Gutman 1988). Wie für Fibrinogen unter 1.2.1 beschrieben, weist auch Fibronektin eine RGD-Sequenz auf und stellt somit einen Liganden für das  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrin dar (Pierschbacher und Ruoslahti 1984; Gardner und Hynes 1985; Liu *et al.* 1997; Sechler *et al.* 1997). Die RGD-Sequenz befindet sich in der Domäne 10 des Moduls III (Abb. 2). Interessanterweise verfügt die Domäne 9 des gleichen Moduls über eine synergistische Bindungsstelle, die je nach Rotation des Moleküls räumlich näher an der Domäne 10 liegt und mit ihr zusammen eine höher affine Bindungsstelle für ein Integrin bildet (Leahy *et al.* 1996).



**Abb. 2: Computergestützte Darstellung der Domänen 7, 8, 9 und 10 des Fibronektin Moduls III**

Die oberen  $\beta$ -Blätter sind blau, die unteren  $\beta$ -Blätter gelb und die RGD-Bindungsstelle ist rot dargestellt (modifiziert nach Leahy *et al.* 1996).

### 1.3 Integrine

Integrine sind heterodimere Glykoproteine und gehören zur Gruppe der Transmembranproteine. Sie erfüllen die Aufgaben von Adhäsionsrezeptoren, da sie mit extrazellulärer Matrix, Zelloberflächen und gelösten oder immobilisierten Liganden Verbindungen eingehen und Signale bidirektional durch die Plasmamembran übertragen. Da Integrine keine eigenen Enzymaktivitäten aufweisen, sind andere Mechanismen notwendig, um schnell reagierende und reversible Rezeptoraktivitäten zu gewährleisten. Hierzu gehört die Fähigkeit, Ligandenaffinitäten durch Konformationsänderungen zu beeinflussen (Campbell und Humphries 2011), sowie die Fähigkeit, sich zu *Clustern* zusammenzufügen (Cluzel *et al.* 2005).

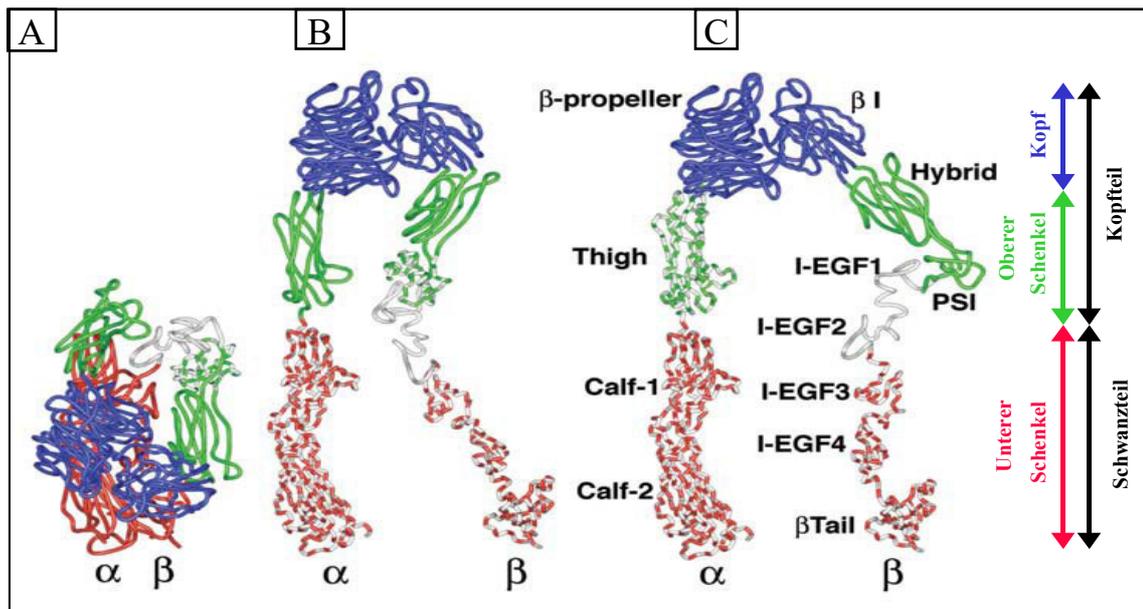
Integrine bestehen aus einer größeren  $\alpha$ - und einer kleineren  $\beta$ -Untereinheit die nicht kovalent miteinander verbunden sind. Beim Menschen sind bisher insgesamt 18 verschiedene  $\alpha$ - und 8 verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten identifiziert, die zusammen 24 unterschiedliche Heterodimere bilden (Hynes 2002; Humphries *et al.* 2006). Da es sich um Transmembranproteine handelt, besitzen die Untereinheiten jeweils einen extrazellulären, einen transmembranären und einen intrazellulären Teil. Die extrazellulären Abschnitte bilden zusammen Bindungstaschen für Liganden, die spezifische Aminosäuresequenzen erkennen. So existiert z.B. eine Bindungsstelle für die häufige RGD-Sequenz (Ruoslahti 1996; Plow *et al.* 2000), wie sie auch Fibrinogen und Fibronectin aufweisen (Ruoslahti und Pierschbacher 1987), aber auch Bindungsstellen für interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAMs) sind beschrieben (Bombeli 1998). Des Weiteren besitzen die  $\alpha$ -Untereinheiten im extrazellulären Bereich einen sogenannten  $\beta$ -Propeller, der über vier Bindungsstellen für divalente Kationen verfügt, durch die die Affinität und Spezifität der Ligandenbindung beeinflusst werden kann (Plow *et al.* 2000).

Integrine sind heute Bestandteil intensiver Forschung, vor allem in Hinsicht auf neue Arzneistoffe, da sie mit arteriellen Thrombosen und deren Komplikationen wie Myokardinfarkte oder zerebralen Insulten (Ross und Borg 2001) sowie anderen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (Wilder 2002) oder okulären Neovaskularisierungen (Friedlander *et al.* 1996) assoziiert sind.

### 1.3.1 Integrinkonformationen und Aktivierung

Unter Integrinaktivierung versteht man den Prozess einer Konformationsänderung des Rezeptors, durch die eine höhere Bindungsaffinität gegenüber seinen Liganden erlaubt wird. Es existieren drei bekannte Aktivierungszustände der Integrinrezeptoren:

1. Ein niedrig-affiner, geschlossener Zustand, in dem das Integrin in einer zur Plasmamembran hin gekrümmten Position steht (Abb. 3 A).
2. Ein mittel-affiner, entfalteter Zustand, in dem das Integrin in den Schenkeln gestreckt ist, aber einen noch geschlossenen Kopfteil vorweist (Abb. 3 B).
3. Ein durch Ligandenbindung induzierter hoch-affiner Zustand, in dem der Kopfteil geöffnet ist (Abb. 3 C). Durch ein nach unten Gleiten der  $\alpha 7$ -Helix der  $\beta_3$ I-Domäne kommt es zu einem nach außen Schwingen der Hybrid- und PSI (Plexin-Semaphorin-Integrin)-Domäne um  $62^\circ$ , wodurch sich der Winkel zwischen Hybrid- und  $\beta_3$ I-Domäne von spitz- zu stumpfwinklig verändert. Dies bewirkt ein Auseinanderweichen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Schenkel um  $70\text{\AA}$ , da die Hybrid- und PSI-Domäne wie ein starrer Hebel wirken, der die Konformationsänderung zum  $\beta$ -Schenkel hin überträgt und verstärkt (Takagi *et al.* 2002; Xiao *et al.* 2004; Puklin-Faucher *et al.* 2006).



**Abb. 3: Beispielhafte computergestützte Darstellung eines αIIbβ3-Integrins samt seiner Untereinheiten und ihrer Domänen**

A: niedrig-affiner, geschlossener Zustand. B: mittel-affiner, in den Schenkeln gestreckter Zustand mit geschlossenem Kopfteil. C: hoch-affiner Zustand mit offenem Kopfteil (modifiziert nach Xiao *et al.* 2004).

### 1.3.2 *Outside-in* und *Inside-out* Signaling

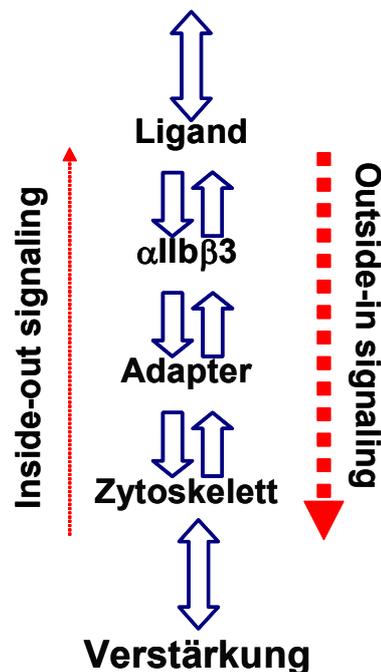
Integrine sind bidirektional funktionierende Rezeptoren, so dass eine von außen nach innen (*Outside-in*) und eine von innen nach außen (*Inside-out*) gerichtete Signaltransduktion existiert (Arnaout *et al.* 2005).

Beim *Outside-in Signaling* kommt es durch die Bindung von Liganden an den extrazellulären Teil der Integrine zu den unter 1.3.1 beschriebenen Konformationsänderungen des Rezeptors, die zu einer höheren Ligandenaffinität und einer räumlichen Trennung der Transmembran- und Intrazellulärdomänen führen (Kim *et al.* 2003; Lau *et al.* 2009). Die so in das Zellinnere vermittelten Signale bewirken eine Interaktion zwischen den Intrazellulärdomänen der Integrine und spezifischen Signalmolekülen innerhalb der Zelle, wie Enzymen (z.B. c-Src, Ras oder Rho) oder Adaptoren (z.B. Talin und Kindlin), die Verbindungen mit Adhäsivproteinen herstellen (z.B. Cas/Crk oder Paxillin) und somit tiefgreifende Veränderungen in der zytoskelettalen Organisation bewirken können (Ridley *et al.* 2003; Shattil 2005; Takada *et al.* 2007). Besonders der Phosphorylierung der β3-Untereinheit des αIIbβ3-Integrins scheint beim *Outside-In Signaling* eine wichtige Schlüsselrolle

zuzukommen und ist ein entscheidender Teil der Thrombozytenaggregation (Jenkins *et al.* 1998; Phillips *et al.* 2001).

Beim *Inside-out Signaling* binden intrazelluläre Adapterproteine wie Talin oder Kindlin an die  $\beta$ -Untereinheit und tragen zu Konformations- und Affinitätsveränderungen des Integrinrezeptors am extrazellulären Teil bei (Wegener und Campbell 2008; Shattil *et al.* 2010). Durch laterale Scherkräfte an der Zelloberfläche kommt es weiterhin zu einer Streckung und Konformationsänderung des extrazellulären Teils des Integrins, aus der eine erhöhte Affinität zur Ligandenbindung resultiert (Zhu *et al.* 2008). Abb. 4 gibt eine Übersicht über die Schaltstellen und Mitspieler bidirektionaler Rezeptoren am Beispiel des  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrins.

### Biomechanische Kräfte (z.B. Scherraten)



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Mechanotransduktion**

Dargestellt sind die Schaltstellen des Signalweges beim *Inside-out* und *Outside-in Signaling*. Die Pfeile geben die möglichen Richtungen der Mechanotransduktion wieder. Der hervorgehobene Pfeil verdeutlicht die in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchte und charakterisierte Signalrichtung (modifiziert nach Scharf und Stoldt 2008).

### 1.3.3 Integrin $\alpha$ IIb $\beta$ 3

$\alpha$ IIb $\beta$ 3, auch Glykoprotein IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) genannt, war eines der ersten Integrine, welches vollständig identifiziert (Nurden und Caen 1974) und während immunologischer Arbeiten in den 80er Jahren aufgereinigt (Jennings und Phillips 1982), kloniert und sequenziert wurde (Fitzgerald *et al.* 1987; Loftus *et al.* 1987; Poncz *et al.* 1987). Die Genloki für  $\alpha$ IIb und  $\beta$ 3 befinden sich auf Chromosom Nummer 17 in der q21-22 Region (Sosnoski *et al.* 1988), jedoch scheinen unabhängige Faktoren für die Transkription verantwortlich zu sein, da die  $\beta$ 3-Untereinheit zusammen mit  $\alpha_v$  das weit verbreitete Integrin  $\alpha_v\beta$ 3 bildet, wohingegen die  $\alpha$ IIb-Untereinheit nur zusammen mit der  $\beta$ 3-Untereinheit auf Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert wird (Calvete 1995).

Bei der  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Synthese wird eine  $\alpha$ IIb-Vorstufe im Golgi-Apparat durch proteolytische Spaltung zu einer schweren ( $\alpha$ IIbH 114 kDa) und einer leichten ( $\alpha$ IIbL 22 kDa) Kette prozessiert, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und zusammen mit der einkettigen  $\beta$ 3-Untereinheit (95 kDa) als funktionstüchtiger Rezeptor in der Zellmembran exprimiert werden (Duperray *et al.* 1987; O'Toole *et al.* 1989; Calvete 1994). Die proteolytische Spaltung der  $\alpha$ IIb Vorstufe scheint eine wichtige Rolle in Bezug auf die Funktionsfähigkeit des Rezeptors zu besitzen, da die Expression ungespaltener  $\alpha$ IIb Vorstufen zu Integrienen mit prothrombotischen Phänotypen führt (Iwamoto *et al.* 1994).

Das Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ist mit circa 80.000 Kopien der am häufigsten auf der Zelloberfläche von Thrombozyten vertretene Rezeptor (Wagner *et al.* 1996). Jedoch stellt dies nur circa 70 % der insgesamt den Thrombozyten verfügbaren  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Kopien dar. Die restlichen 30 % befinden sich in intrazellulären  $\alpha$ -Granula und können bei Aktivierung der Thrombozyten zusätzlich an deren Zelloberfläche exprimiert werden (Wencel-Drake *et al.* 1986; Woods *et al.* 1986; Shattil *et al.* 1998). Diese Aktivierung kann von Thrombozytenagonisten, wie Kollagen, Thrombin, ADP oder Epinephrin, hervorgerufen werden (Born 1962; Mustard *et al.* 1978; Bennett und Vilaire 1979; Marguerie *et al.* 1979) und führt nicht nur zu einer erhöhten Rezeptorgesamtzahl auf der Oberfläche, sondern auch zur wichtigen Aktivierung mittels *Inside-Out Signaling* der  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrine. Diese können nun Liganden mit einer RGD-Sequenz wie Fibrinogen, Fibrin, von-Willebrand Faktor, Fibronektin, Thrombospondin oder Vitronectin binden

und weisen die unter 1.3.1 beschriebenen Konformationsänderungen auf. Des Weiteren wurde ein räumliches Gruppieren der aktivierten und an Liganden bindenden  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrine beschrieben, welches als Clustern bezeichnet wird (Phillips und Agin 1977; Nurden und Caen 1979; Hagen *et al.* 1980; Hantgan *et al.* 1990; Du *et al.* 1991; Hato *et al.* 1998; Li *et al.* 2001; Ma *et al.* 2007; Varga-Szabo *et al.* 2008).

Die Bedeutsamkeit dieses Integrins wird bei der Glanzmann Thrombasthenie ersichtlich, die durch eine quantitative und / oder qualitative Anomalie des  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrins zu einer stark erhöhten Blutungsneigung führt (Glanzmann 1918; Caen *et al.* 1966).

#### **1.3.4 Leu33Pro Variante des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$**

Newman *et al.* gelang es 1989 erstmals, einen wichtigen Polymorphismus des Integrins  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  zu analysieren und differenzieren. Hierbei handelt es sich um eine Isoform des Integrins, welche durch einen Basenaustausch in Position 1565 (Thymin -> Cytosin) die Aminosäure Prolin statt Leucin an Position 33 der PSI-Domäne (Abb. 3) der  $\beta$ -Untereinheit aufweist (Newman *et al.* 1989). Die somit resultierenden humanen Plättchen Antigene HPA-1a (Leu33) und HPA-1b (Pro33) sind Gegenstand intensiver Forschung. Während circa 25 % der nordeuropäischen Bevölkerung heterozygot und circa 2 % homozygot für das HPA-1b-Allel sind, tritt es interessanterweise fast gar nicht in der asiatischen Bevölkerung in Erscheinung. Es konnte gezeigt werden, dass der Aminosäureaustausch der HPA-1b-Isoform zu einer Konformationsänderung des  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrins führt (Yee und Bray 2004) sowie eine Risikodeterminante für akute Koronarsyndrome darstellt (Weiss *et al.* 1996). Zotz *et al.* konnten diese Ergebnisse bestätigen und spezifizieren, indem sie zeigten, dass HPA-1b positive Patienten mit koronarer Herzkrankheit im Median 5,2 Jahre früher einen Myokardinfarkt erlitten als HPA-1b negative Patienten (Zotz *et al.* 2005). Außerdem scheinen Träger des HPA-1b-Allels ein erhöhtes Risiko für atherosklerotische Plaquerupturen zu besitzen (Kucharska-Newton *et al.* 2011). *In-vitro* Studien mit  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -transfektierten CHO- (*chinese hamster ovary*) und HEK293- (*human embryonic kidney*) Zellen konnten zeigen, dass dieser HPA-1-Polymorphismus zu einem  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin führt, welches eine erhöhte Affinität

gegenüber Fibrinogen aufweist. Gleichzeitig konnte eine verstärkte Adhäsion und Gerinnselretraktion bei den untersuchten Zellen festgestellt und somit eine gesteigerte prothrombotische Eigenschaft der HPA-1b- gegenüber der HPA-1a-Isoform konstatiert werden (Vijayan *et al.* 2000).

## 2 Ziele der Arbeit

Der HPA-1-Polymorphismus des thrombozytären  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrins ist Gegenstand vieler vergangener und aktueller Studien. Ziel dieser Arbeit war, die Adhäsionseigenschaften der HPA-1a- und HPA-1b-Isoform weiter zu spezifizieren.

Man unterteilt die Adhäsion in zwei Zustände. Zunächst kommt es zur rezeptorvermittelten Interaktion zwischen der transfektierten Zelle und einem immobilisierten Liganden unter statischen oder flussdynamischen Bedingungen. Hat diese Interaktion stattgefunden, besteht ein statischer Zustand der Adhäsion, bei dem die adhärenen Zellen in dieser Arbeit in einem Flusskammermodell steigenden Scherraten ausgesetzt wurden. Durch die Quantifizierung der adhärenen Zellen mittels digitalem Imaging, konnten Aussagen über die Adhäsionsstabilität durch die Rezeptor-Ligand-Interaktion und über die Resistenz gegenüber steigenden Scherraten gemacht werden. Dieses *in-vitro* Modell ließ gezielte Änderungen bestimmter Variablen zu, um deren Auswirkungen auf die Adhäsionseigenschaften der verwendeten  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin-exprimierenden HEK293-Zellen gegenüber immobilisierten Liganden zu untersuchen.

Zunächst sollte der vorbeschriebene prothrombotische Charakter der HPA-1b-Isoform des  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrins geprüft und die allgemeine Frage untersucht werden, ob und in welcher Weise applizierte Scherraten das Adhäsionsverhalten  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin-exprimierender HEK293-Zellen beeinflussen.

Im Detail wurde diese übergeordnete Frage in verschiedene spezifische Fragen untergliedert:

1.

Ergeben sich bei der Applikation von venösen bzw. arteriellen Strömungsbedingungen Unterschiede in der Adhäsionsstabilität  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin-exprimierender HEK293-Zellen und sind diese mit Beobachtungen anderer Flusskammerstudien zu vergleichen?

2.

Unterscheidet sich die Adhäsionsstabilität der transfektierten HEK293-Zellen bei Verwendung unterschiedlicher Liganden (Fibrinogen und Fibronectin) bei gleichen Versuchsbedingungen?

3.

Welchen Einfluss leisten unterschiedliche Konzentrationen der gewählten immobilisierten Liganden auf die Adhäsionsstabilität?

Anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sollten in Zusammenschau mit Resultaten vorangegangener Studien die flussdynamischen Adhäsionseigenschaften des HPA-1-Polymorphismus des thrombozytären Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  genauer charakterisiert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Zelllinien und Vektoren

Es wurden humane, embryonale Nierenepithelzellen (HEK293) verwendet, die mit der cDNA der  $\alpha$ IIb- und der  $\beta$ 3-Untereinheit doppel-transfiziert wurden. Die  $\alpha$ IIb-Untereinheit war mit einem *cyan fluorescent protein* (CFP) fusioniert. Entsprechend der zwei Isoformen HPA-1a (P101/92) und HPA-1b (P101/96) wurden zwei verschiedene  $\beta$ 3-Untereinheiten verwendet, die jeweils mit einem *yellow fluorescent protein* (YFP) fusioniert waren. HEK293-Zellen, die für Kontrollen vorgesehen waren, wurden lediglich mit dem Grundvektor P71 transfiziert.

Es kamen folgende Plasmide zur Verwendung, die alle von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) bezogen wurden:

Name	Vektor	Integrin-Untereinheit	Fluoreszenzprotein
P71	pcDNA3.1(-)	-	-
P92	pcDNA3.1(-)	$\beta$ 3 (HPA-1a)	YFP
P96	pcDNA3.1(-)	$\beta$ 3 (HPA-1b)	YFP
P101	pcDNA3.1(-)	$\alpha$ IIb	CFP

#### 3.1.2 Chemikalien

Name	Hersteller
Abciximab	Lilly, Bad Homburg, Deutschland
Albumin from bovine serum, BSA 1 %	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Alfazyme	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
DMEM-Medium 4,5 g/l Glucose	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
F-12-Medium GlutaMAX	Gibco Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fibrinogen-human	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Fibronektin	Eigenherstellung (siehe Methoden 3.2.5)
G418	InvivoGen, San Diego, USA
Gentamycin	Gibco Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
PBS (phosphat buffer saline)	Serag Wiessner KG, Naila, Deutschland
Trypanblau	Gibco Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

### 3.1.3 Antikörper

Antikörper	Zielantigen	Spezies	Hersteller
Anti-CD41 (PM6/248)	αIIb	mouse (monoclonal)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Anti-CD61-PE (SZ 21)	β3	mouse (monoclonal)	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Anti-γ1 (IgG1)-PE (X40)	Fab-Region des IgG	mouse (monoclonal)	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Anti-γ1 IgG1 kappa (MOPC-21)	Fab-Region des IgG	mouse (monoclonal)	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Anti-Mouse IgG, PE-gekoppelt	Maus IgG	goat (polyclonal)	Genetex, Irvine, USA

### 3.1.4 Geräte und sonstiges Zubehör

Name	Hersteller
Argonlaser CLSM 510	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Bunsenbrenner Labogaz 260	Campingaz, Hattersheim, Deutschland
Cellstar 6 Well Platten	Greiner Bio-One International AG, Gremsmünster, Österreich
CO <sub>2</sub> -Feuchtbrutschrank Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Conical Tubes (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Deckgläser (24 x 50 mm)	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Durchflussscytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Flusskammer	Eigenkonstruktion nach Hele-Shaw flow chamber (Lamb 1993)
Harvard-Pumpe	Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland
Laser-Scanning-Mikroskop Axiovert 100M	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	LO - Laboroptik Ltd., Lancing, England
Perfusorspritzen (50 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Personal Computer Celsius	Fujitsu Siemens, München, Deutschland
Rainbow Calibration Particles	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Silikonnäpfe (8 x 11 mm)	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Spektralphotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Sterilwerkbank BSB 4	Gelaire, Sydney, Australien
Vortex VF2	Cenco Instruments, Breda, Niederlande
Wasserbad	Julabo, Allentown, USA
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

### 3.1.5 Software

Name	Hersteller
Cell quest	Becton Dickinson, New Jersey, USA
GraphPad InStat 3.06	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
ImageJ 1.39h	Wayne Rasband, National institutes of Health, Bethesda, USA
LSM 510 3.2	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Microsoft Office Excel 2003 SP1	Microsoft Corporation, Redmond, USA
WinMDI 2.8	Joe Trotter, The Scripps Institute - Flow Cytometry Core Facility, La Jolla, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Die HEK293-Zellen wurden in 6 Well Platten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung gebrütet. Als Nährmedium wurde eine 1 : 1 Mischung aus DMEM und F12 mit einem FCS Anteil von 10 % verwendet sowie Gentamycin in einer Konzentration von 100 µg/ml hinzugefügt. Bei den transfektierten Zellen wurde als Selektionsmarker zusätzlich G418 in einer Konzentration von 600 µg/ml hinzugefügt. Die exponentiell wachsenden HEK293-Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 70 % in neue 6 Well Platten passagiert.

### 3.2.2 Passagieren der HEK293-Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurde das Nährmedium in der Sterilwerkbank mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt und der verbleibende Zellrasen mit PBS zweimal gewaschen. Nach dem Entfernen der PBS-Flüssigkeit wurden die Zellen acht Minuten lang bei 37 °C mit Alfasyme inkubiert. Anschließend wurden die nun gelösten Zellen mit FCS-haltigem Nährmedium aufgenommen und bei 4 °C und 300 g 7 Minuten lang zentrifugiert. Das sich daraufhin am Boden befindende Zellpellet wurde mit 1 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl unter Verwendung der Neubauer Zählkammer bestimmt.

### 3.2.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer

Nachdem die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen worden waren, wurden 10 µl dieser Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt, um ein Anfärben der HEK293-Zellen zu erzielen. Diese 20 µl wurden seitlich auf die vorbereitete Neubauer Zählkammer aufpipettiert, so dass sich die Zellsuspension durch Kapillarkräfte in den Zwischenräumen verteilt. Mit einem Lichtmikroskop bei Durchlicht war es möglich, die angefärbten Zellen innerhalb der vier vorgegebenen großen Quadrate der Neubauer Zählkammer zu erfassen und bei einem methodischen Fehler von 10 % anhand folgender Formel die Gesamtzahl der Zellen pro ml zu ermitteln.

$$GZ = (EZ/4) * 10^4 * A * V$$

GZ = Gesamtzellzahl  
EZ = ermittelte Zellzahl in allen 4 großen Quadraten  
A = Verdünnungsfaktor  
V = Gesamtvolumen in ml

### 3.2.4 Durchflusszytometrie

Um die Expression der αIIbβ3-Integrine auf der Zelloberfläche zu validieren, wurden die HEK293-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Hierzu wurden die Zellen von den Well Platten gelöst und mit PBS bei 4 °C und 300 g 7 Minuten lang gewaschen. Das entstandene Pellet wurde in 200 µl PBS aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und  $8 \times 10^5$  Zellen in 50 µl PBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde anschließend mit den jeweiligen komplex-spezifischen Antikörpern 30 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es kam einerseits ein nicht fluorophor-konjugierter anti-CD41 Antikörper (PM6/248) gegen die αIIb-Untereinheit zur Verwendung, andererseits wurde ein anti-CD61 Antikörper benutzt, der mit einer höheren Spezifität an die β3-Untereinheit der HPA-1a-Zellen als an die β3-Untereinheit der HPA-1b-Isoform bindet (Weiss *et al.* 1995). Um unspezifische Bindungen zu erfassen und eine Isotypkontrolle durchzuführen, wurden weitere Proben mit Anti-γ1 IgG1 kappa und Anti-γ1 IgG1-PE Antikörpern inkubiert. Da der anti-CD41 Antikörper nicht mit einem Fluorophor konjugiert ist, musste diese

Suspension mit einem Sekundärantikörper inkubiert werden, um eine durchflusszytometrische Detektion zu ermöglichen. Hierfür wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen (4 °C, 300 g, 7 Minuten), das entstandene Pellet mit 50 µl PBS resuspendiert und mit 1 µl Anti-Mouse IgG PE-gekoppelt 30 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurden die jeweiligen Suspensionen erneut mit PBS gewaschen (4 °C, 300 g, 7 Minuten), die Pellets in 500 µl PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert. Die Gerätestabilität war konstant. Zur Überprüfung wurden Rainbow Calibration Particles mit denselben Einstellungen wie die  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrin-exprimierenden Zellen zuvor durchflusszytometrisch gemessen.

### **3.2.5 Fibronektin-Aufreinigung**

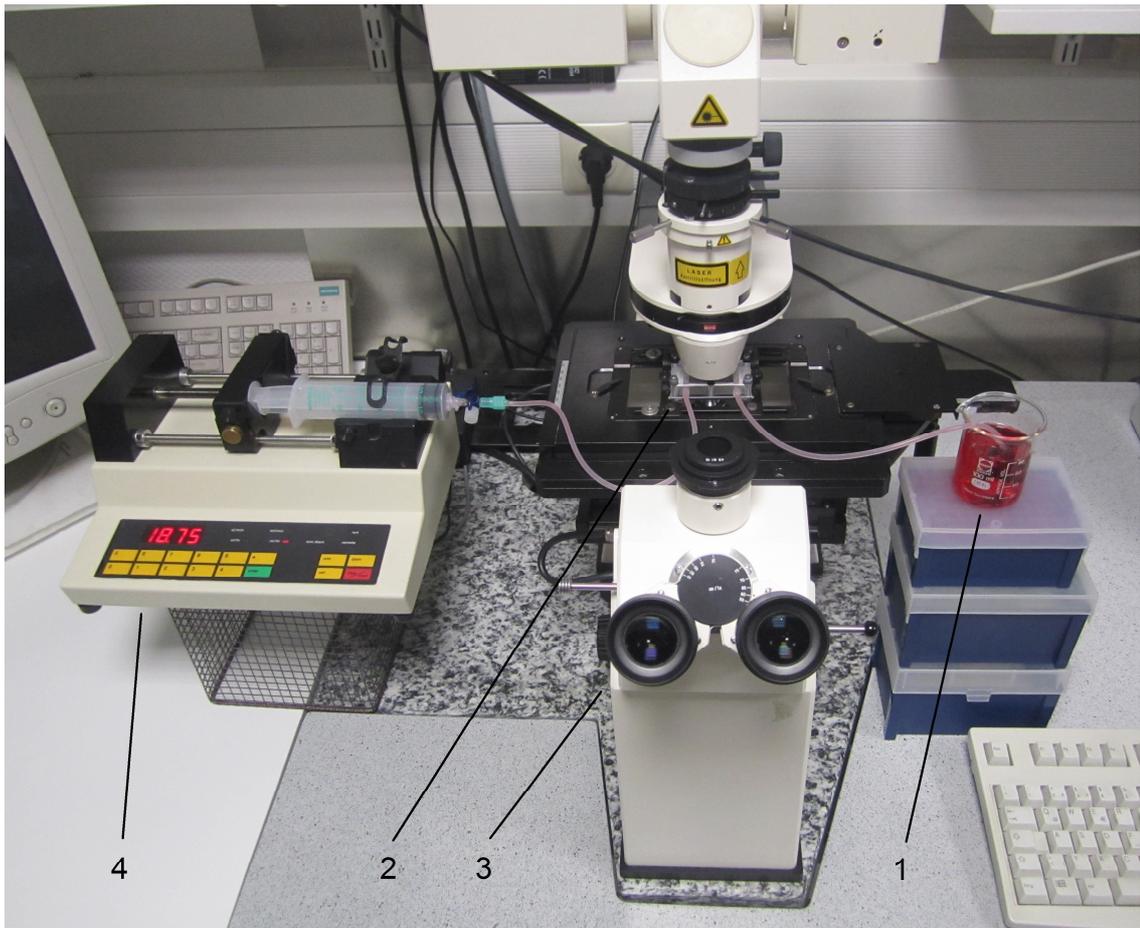
Gefrorenes Frischplasma wurde von der Blutbank des Instituts für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin (IHHTM) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen, bei 37 °C aufgetaut und in eine Gelatine-Sepharose Säule überführt. Zuerst wurde diese mit Tris Puffer gewaschen, bis, gemessen im Spektralphotometer, keine Proteine mehr im Eluat nachweisbar waren, anschließend mit Tris Puffer gewaschen, der zusätzlich 1 M NaCl enthielt, bis wiederum keine Proteine mehr im Eluat nachweisbar waren und letztendlich mit Tris Puffer gewaschen, der 200 mM GdnHCL enthielt, bis abschließend erneut keine Proteine mehr im Eluat nachweisbar waren. Alle Messungen im Spektralphotometer wurden bei pH 7,5 und 280 nm UV-Strahlung durchgeführt. Das nun gebundene Fibronektin wurde mit Tris Puffer, angereichert mit 1 M GdnHCL, gelöst. Es erfolgte ein Pufferwechsel auf einen PBS-Puffer mithilfe einer größentrennenden PD-10 Säule. Anschließend wurde die finale Proteinkonzentration ermittelt. Die Reinheit konnte per SDS-Page (sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis), ein Verfahren zur Fraktionierung denaturierter Proteine anhand ihrer Molekülmasse (Laemmli 1970), bestätigt werden. Diese polyacrylamid-gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 150 Volt über einen Zeitraum von 90 Minuten.

### **3.2.6 Herstellung Fibrinogen- und Fibronectin-beschichteter**

#### **Deckgläser**

Zur Reinigung der Deckgläser wurden diese mit einem Bunsenbrenner abgeflammt und nachfolgend mithilfe einer Schablone die Ethanol-gereinigten Silikonnapfe zentral aufgesetzt. In diese wurden dann 250 µl Fibrinogen oder Fibronectin in einer Konzentration von 50 oder 100 µg/ml pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die 250 µl abgesaugt und der nun vorhandene Fibrinogen- bzw. Fibronectin-*Layer* mit 1 % BSA in PBS gewaschen, um alle überschüssigen Liganden zu entfernen.

### 3.2.7 Versuchsvorbereitung und -aufbau



**Abb. 5: Exemplarischer Versuchsaufbau**

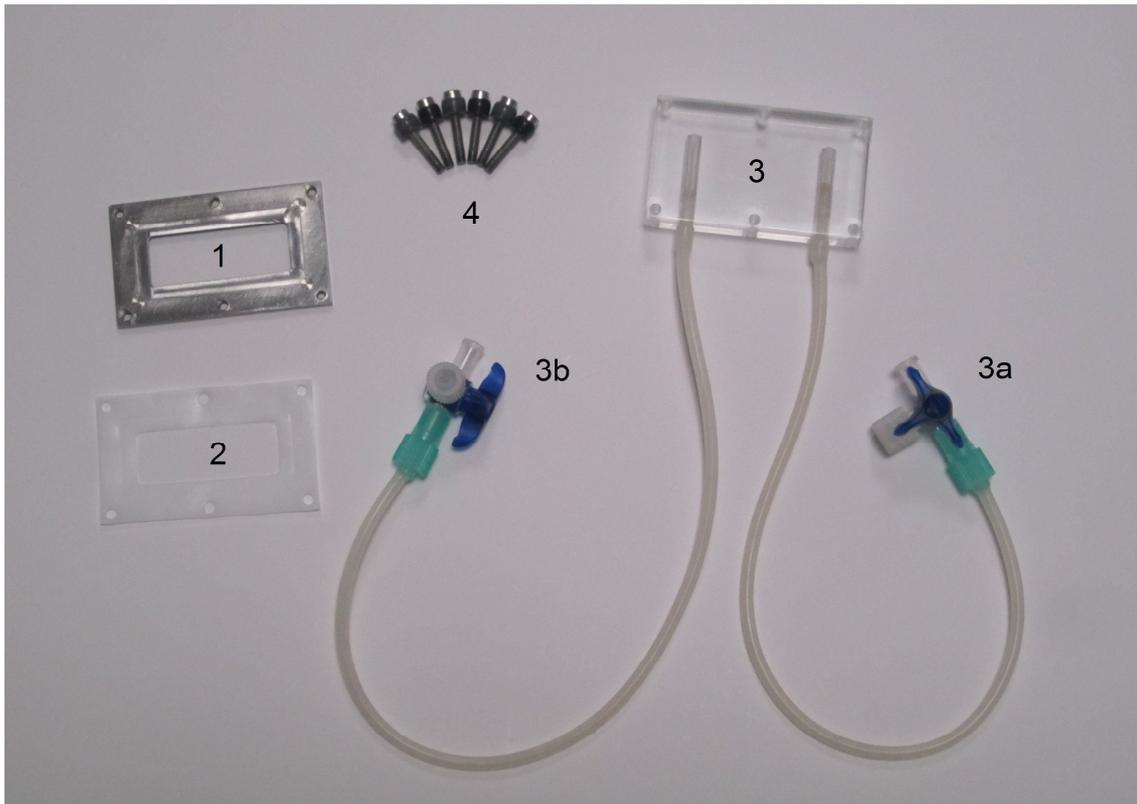
Aufsicht auf einen vollständigen Versuchsaufbau mit den Einzelkomponenten Reservoir (1), Flusskammer im Laser Scanning Mikroskop (2 & 3) und Harvard-Pumpe (4).

Der Versuchsaufbau besteht aus drei in Reihe geschalteter Elemente sowie dem Laser Scanning Mikroskop, in das die Flusskammer eingespannt ist.

#### 3.2.7.1 Reservoir (1)

Rechts in Abb. 5 ist das Reservoir zu erkennen, welches aus einem Gefäß gefüllt mit 80 ml Nährmedium besteht. Es ist von großer Wichtigkeit, dass die Flüssigkeitsoberfläche auf gleicher Höhe mit der später eingespannten Flusskammer steht, damit kein beeinflussender hydrostatischer Druck oder Sog anliegt.

### 3.2.7.2 Flusskammer (2)



**Abb. 6: Einzelkomponenten der Flusskammer**

Die Flusskammer besteht aus einer Metallplatte (1), einer Teflondichtung (2), einem Plexiglasblock (3) mit Zu- und Abfluss (3a & 3b) sowie 6 Schrauben (4) zur Verriegelung.

Mittig, im Laser Scanning Mikroskop eingespannt, befindet sich die Flusskammer (Abb. 5 & 6), welche aus einer rechteckigen (3,8 x 6,5 cm) Metallplatte (1) besteht, in die eine ca. 0,2 mm tiefe Versenkung zur planen Aufnahme der Deckgläser gefräst ist. Unter Verwendung einer 0,25 mm dicken Teflondichtung (2) lässt sich auf diese Metallplatte ein Plexiglasblock (3) gleicher Außenmaße mit 6 Schrauben (4) luftdicht befestigen. Dieser Plexiglasblock verfügt in einem Abstand von 37 mm über einen Zu- und einen Abfluss, die jeweils in gummierte Schläuche auslaufen an deren Enden sich ein Dreiwegehahn befindet.

### 3.2.7.3 Laser Scanning Mikroskop (3)

Die Flusskammer wird auf dem Objektträgertisch des konfokalen Laser Scanning Mikroskop Axiovert 100M fixiert. Über die mitgelieferte Software LSM 510 3.2 wurden folgende Einstellungen festgelegt:

Lasertyp	Argonlaser
Objektiv	Plan-Neofluar 10x / 0,3
Exzitation	458 nm
Detektion	530 nm
Scan-Geschwindigkeit pro Pixel	1,60 $\mu$ s
Scan-Geschwindigkeit pro Bild	983,04 ms
Staple Scan	4,915 s
Bildgröße	512 x 512 x 5 Pixel, 8 bit Datentiefe, Graustufen
Stack Size	921,4 $\mu$ m x 921,4 $\mu$ m x 0,4 $\mu$ m
Scaling	1,8 $\mu$ m x 1,8 $\mu$ m x 0,1 $\mu$ m
Amplifier Offset	- 1,995
Amplifier Gain	1

#### 3.2.7.4 Harvard Pumpe (4) und Scherratenberechnung

Links in Abb. 5 ist die Harvard Pumpe zu erkennen, in die eine Braun Perfusorspritze eingespannt ist und über deren Bedienfeld, errechnet anhand des Durchmessers der Spritze, die Flussrate in ml/min festgelegt wird. Mithilfe folgender Formel lässt sich über die Flussrate die auf die Zellen einwirkenden Scherraten errechnen:

$$\gamma = 6 * Q / b * h^2$$

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

Q = Flussrate (ml/s)

b = Breite der Flusskammer (16 mm)

h = Höhe der Flusskammer

(Teflondichtungsdicke: 250  $\mu$ m)

Mit einem Quotienten von  $b/h = >20$  ist gewährleistet, dass über 85 % der Deckglasoberfläche einer konstanten und gleichmäßigen Scherrate ausgesetzt ist (Bacabac *et al.* 2005). Für die Durchführung der Versuche wurden folgende Scherraten verwendet, um venöse (30 - 500  $s^{-1}$ ) sowie arterielle (1000 - 2000  $s^{-1}$ ) Strömungsverhältnisse zu imitieren:

Flussrate (ml/h)	Scherrate (s <sup>-1</sup> )
18,75	30
37,50	60
75	125
150	250
300	500
600	1000
1200	2000

### 3.2.8 Versuchsablauf

Nachdem die Deckgläser, wie unter 3.2.6 beschrieben, mit dem entsprechenden Liganden und der zu überprüfenden Konzentration beschichtet worden waren, wurden diese mit den verschiedenen Isoform-HEK293-Zellen (HPA-1a oder HPA-1b) inkubiert. Hierfür wurden die entsprechenden Zellen bei ca. 70 %-iger Konfluenz aus den Well Platten gelöst und mittels der Neubauer Zählkammer gezählt (siehe 3.2.3). Für jeden Versuch wurden ca. 300.000 HEK293-Zellen benutzt, da mehrere Vorexperimente zeigten, dass bei einer größeren Zellzahl sich diese durch Kontakt gegenseitig beeinflussten und dass bei einer zu kleinen Zellzahl die Genauigkeit in Frage gestellt würde. Ausgezählte 300.000 HEK293-Zellen wurden mit PBS verdünnt, um eine Zellsuspension von 230 µl Gesamtmenge zu erhalten. Diese pipettierte man in die sich nach der Ligandenbeschichtung noch auf den Deckgläsern befindenden Silikonäpfe und ließ die Zellen für eine Minute bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung an das Fibrinogen, bzw. Fibronectin, adhären. Währenddessen füllte man die Schläuche des Zu- und Abflusses der Kammer mit Nährmedium, um einen luftblasenfreien Zusammenbau gewährleisten zu können. Nach der Inkubation der Zellen auf den Liganden wurden die Deckgläser in die dafür vorgesehene Fräsung der Metallplatte der Flusskammer eingelegt und die Silikonäpfe mit größter Vorsicht entfernt, um ein Verlaufen der Zellsuspension zu vermeiden, welche bei Kontakt mit der anschließend aufgelegten Dichtung deren Funktion negativ beeinflussen könnte. Nachfolgend konnte der Plexiglasblock mit dem integrierten Zu- und Abfluss aufgelegt und mit 6 gleichmäßig festgezogenen Schrauben fixiert werden, so dass die nun

vollständig vorbereitete Flusskammer in das Laser Scanning Mikroskop eingesetzt wurde. Der Dreiwegehahn des Zuflussschlauches wurde geöffnet und in den Reservoirbehälter eingetaucht. Der Dreiwegehahn des Abflussschlauches blieb vorerst verschlossen und wurde an eine Braun Perfusorspritze konnektiert, die bereits zuvor in die Harvard Pumpe eingespannt worden war. Nach nun insgesamt 5 Minuten des Vorbereitens und Herrichtens des Versuchsaufbaus wurde der noch verschlossene Dreiwegehahn des Abflusses geöffnet und zeitgleich eine Initialscherrate von  $30 \text{ s}^{-1}$  über einen Zeitraum von einer Minute angelegt, um letzte, nicht adhärenente Zellen abzulösen. Ab der 6. Minute erfolgte eine schrittweise Scherratensteigerung auf die unter 3.2.7.4 genannten Werte, denen die Zellen für jeweils 60 Sekunden ausgesetzt waren. Somit dauerte ein gesamter Versuchsdurchlauf 12 Minuten. Jede Scherratensteigerung ging mit einer zeitgleichen Aufnahme von 5 Bildern in der z-Ebene im Intervall von 983 ms einher, in dem das Laser Scanning Mikroskop die Zellen mit 458 nm anregte und das YFP Signal bei 530 nm detektierte. Somit erzielte man am Ende eines jeden Versuchsdurchlaufs ein Datenpaket von insgesamt 35 Aufnahmen (1 Stapel à 5 Bilder pro angesetzter Scherrate). Nach Beendigung eines Versuchs wurden alle Komponenten ab- und auseinanderggebaut, gereinigt und getrocknet um für einen weiteren Durchlauf zur Verfügung zu stehen.

### **3.2.9 Datenanalyse und Statistik**

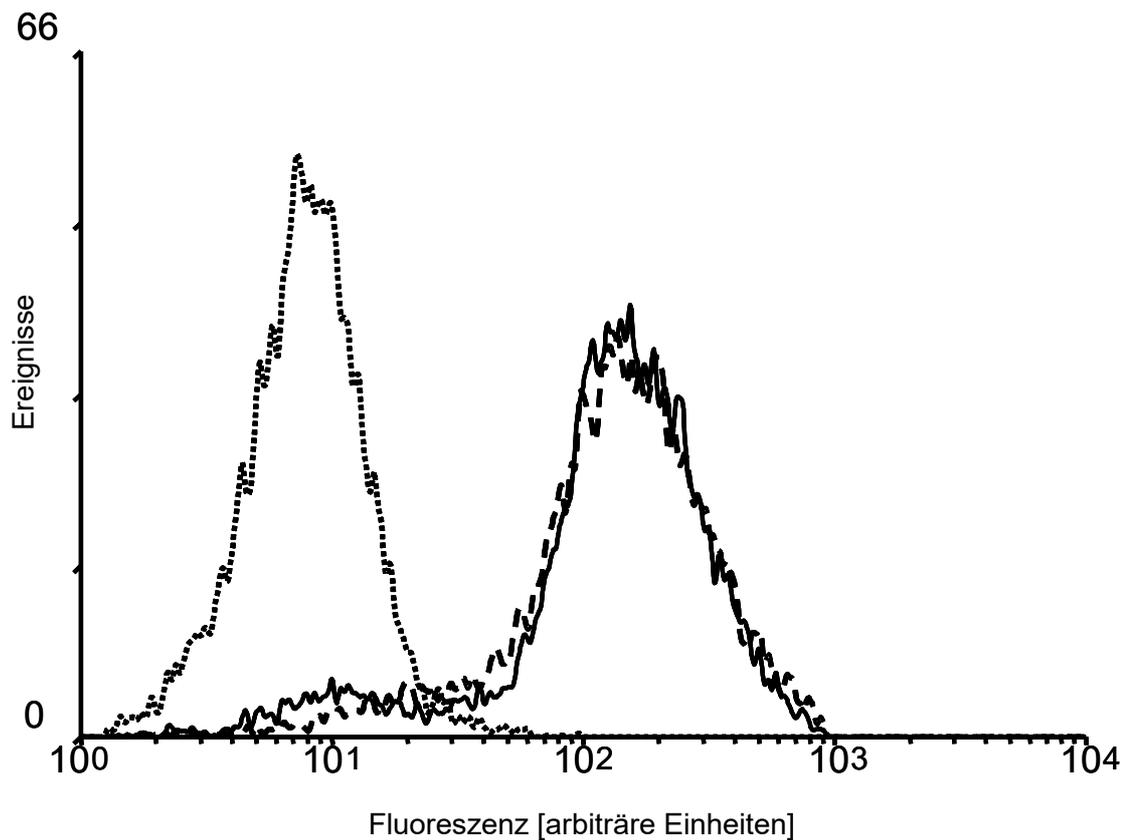
Da die vom Laser Scanning Mikroskop aufgenommenen Bilder ebenfalls Zellen zeigten, die sich im Moment der Aufnahme durch die Bildebene bewegten, mussten diese zur Datenauswertung mittels digitaler Bildbearbeitung subtrahiert werden. Hierfür wurde das Programm ImageJ 1.39h mit einem angepassten Makro verwendet (siehe Anhang). Die Software konvertiert die Bilder zuerst in Graustufenaufnahmen und vergleicht die 5 Bilder einer jeden Scherrate miteinander. Jeder sich in der X- oder Y-Achse bewegende Pixel innerhalb eines Stapels wurde entfernt, so dass ein "*Summary Image*" (Summationsbild) für jeden Stapel und somit repräsentativ für jede Scherrate erstellt wurde, welches die adhärenente Zellen als schwarze Pixel darstellt (Abb. 10). Das Programm ImageJ gibt die Gesamtzahl der schwarzen Pixel eines jeden

Summationsbildes in einem ganzen Zahlenwert an. Jeder Versuchsdurchlauf wurde 5 bis 7 mal wiederholt, der Mittelwert der Gesamtzahl der schwarzen Pixel pro Scherrate gebildet und die Daten in Microsoft Office Excel 2003 SP1 exportiert. Die Pixelanzahl des Summationsbildes der Initialscherrate von  $30\text{s}^{-1}$  wurde gleich 100 % adhärenter Zellen gesetzt. Somit konnten die Anzahl der Pixel der Summationsbilder der höheren Scherraten in Relation zu denen der Initialscherrate angegeben werden. Dadurch ergab sich anhand der Gesamtzahl der Pixel eines jeden Summationsbildes die relative Anzahl adhärenter Zellen zur entsprechenden Scherrate. Mithilfe von Excel wurden die Standardabweichungen berechnet und die graphischen Darstellungen angefertigt. Mittels GraphPad InStat 3.06 wurden die Signifikanzen anhand eines ungepaarten T-Tests und einem definierten Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  ermittelt. Ergaben sich Signifikanzen von  $p < 0,05$  wurden diese mit einem \*-Symbol in den Grafiken markiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression der HPA-1 Fusionsproteine in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen, die die Isoformen HPA-1a und HPA-1b des Integrins  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 exprimierten, wurden mit dem komplex-spezifischen Anti-CD41 Antikörper, der an die  $\alpha$ IIb-Untereinheit des  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrins bindet, inkubiert. Zur Detektion im Durchflusszytometer kam ein PE-konjugierter anti-mouse IgG Sekundärantikörper zum Einsatz. Da nur funktionsfähige Integrine bestehend aus beiden Untereinheiten auf der Zelloberfläche exprimiert werden (O'Toole *et al.* 1989), konnte gezeigt werden, dass die Zellen mit beiden Untereinheiten des  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrins transfektiert waren. Die Isotypkontrollen wurden mit Anti- $\gamma$ 1 IgG1 kappa und Anti- $\gamma$ 1 IgG1-PE Antikörpern durchgeführt (Abb. 7).



**Abb. 7: Durchflusszytometrische Analyse der  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Oberflächenexpression**

HPA-1a- (durchgezogen) und HPA-1b- (gestrichelt) Isoform exprimierende HEK293-Zellen wurden mit dem komplex-spezifischen Anti-CD41-PE Antikörper inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Die Negativkontrolle (gepunktet) wurde mit einem IgG1-PE Antikörper durchgeführt.

Die Mittelwerte der Fluoreszenz der  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrine der verwendeten HEK293-Transfektanten wichen nicht mehr als 1% voneinander ab, sodass von einer gleichwertigen Rezeptordichte für beide Varianten ausgegangen werden konnte (Tab. 1).

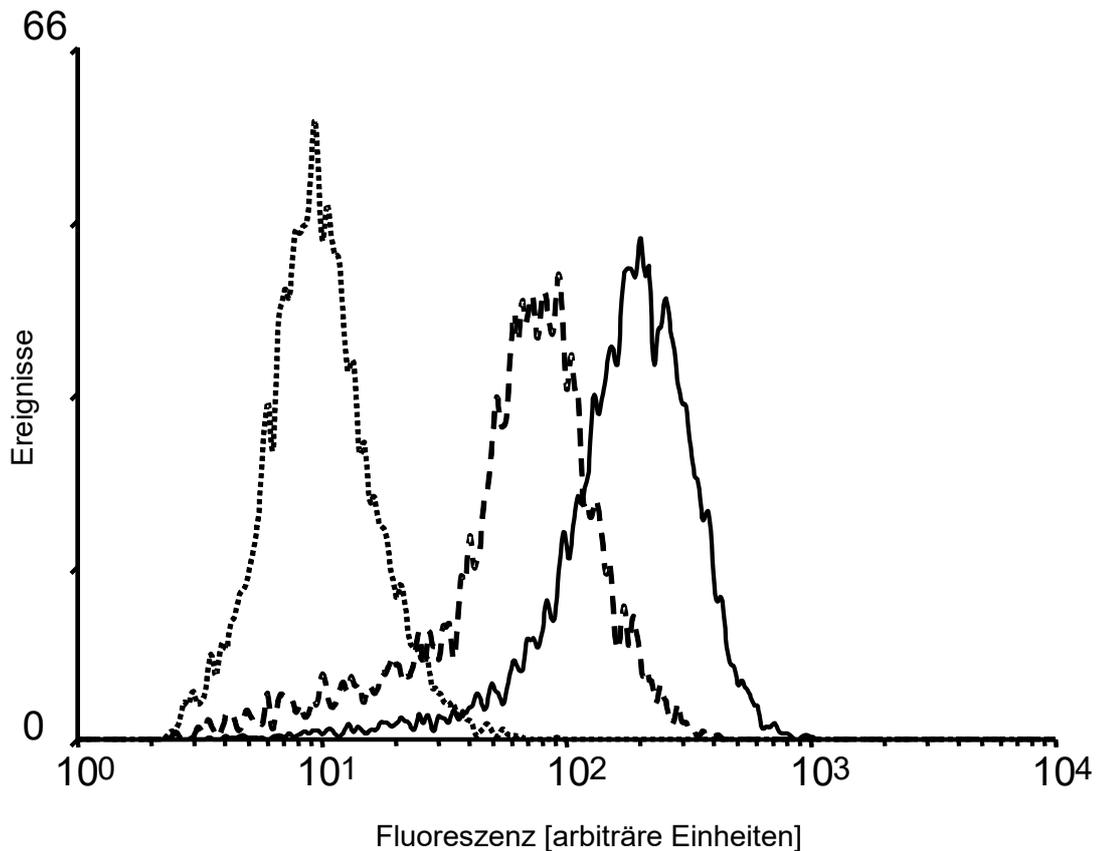
	<b>HPA-1a</b>	<b>HPA-1b</b>
n	9	9
	Fluoreszenz-Mittelwert [arbiträre Einheiten]	Fluoreszenz-Mittelwert [arbiträre Einheiten]
Isotyp	8.58	8.51
$\alpha$ IIb $\beta$ 3-Expression	116.18	117.64

Tab. 1: Ermittlung der  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Expression pro Zelle

Die Verwendung der Rainbow Calibration Particles bei gleichen Geräteeinstellungen erbrachte 3 Durchschnittswerte je Messung, deren Mittelwerte an unterschiedlichen Messtagen weniger als 5% voneinander abwichen und somit die Konstanz der Geräteeinstellung unterstützte.

## **4.2 Differenzierung der $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Varianten**

Um zu zeigen, dass die transfektierten HEK293-Zellen beide HPA-1 Varianten (HPA-1a und HPA-1b) exprimierten, wurden die Zellen mit einem anti-CD61 Antikörper inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dieser Antikörper besitzt die Eigenschaft, mit einer höheren Spezifität an die HPA-1a- als an die HPA-1b-Isoform der  $\beta$ 3-Untereinheit zu binden (Weiss *et al.* 1995). Abb. 8 zeigt dieses Verhalten, indem der Mittelwert der Ereignisse für die HPA-1a-Isoform zwischen der zweiten und dritten Dekade in Erscheinung tritt, wohingegen der Mittelwert der Ereignisse der HPA-1b-Isoform zwischen die erste und zweite Dekade fällt. Die Isotypkontrollen wurden mit Anti- $\gamma$ 1 IgG1 kappa und Anti- $\gamma$ 1 IgG1-PE Antikörpern durchgeführt (Abb. 8).



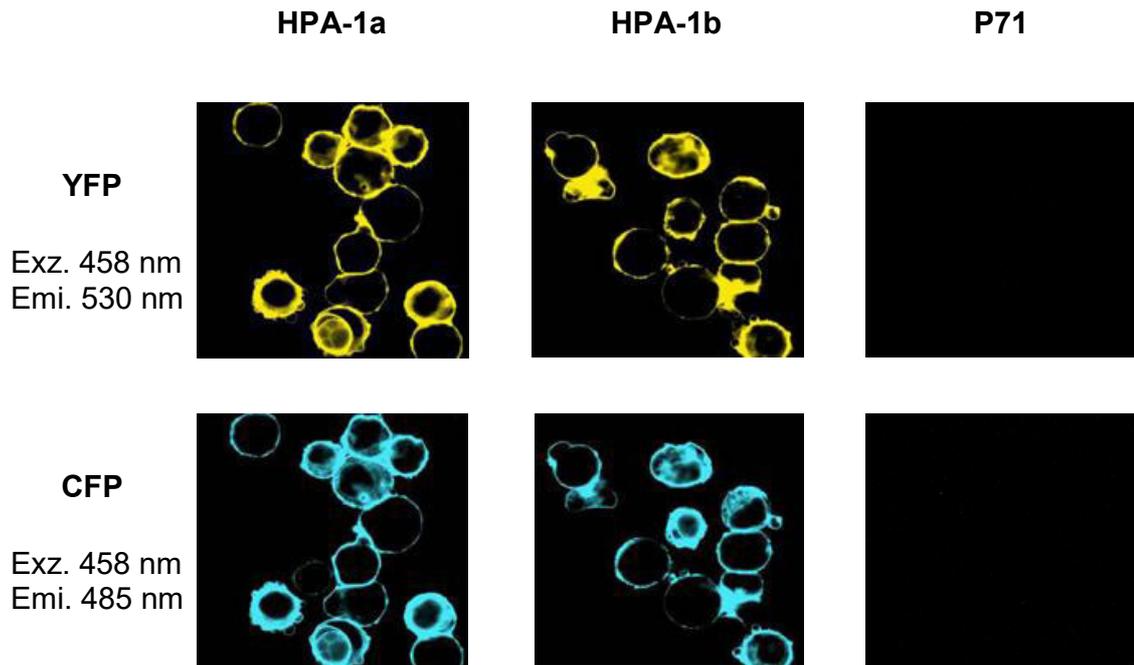
**Abb. 8: Durchflusszytometrische Differenzierung der HPA-1 Varianten**

Spezifizierung der HPA-1a- (durchgezogen) und HPA-1b- (gestrichelt) Isoform mithilfe eines PE-markierten anti-CD61 Antikörpers, der mit einer höheren Spezifität an die  $\beta$ 3-Untereinheit der 1a- als an die der 1b-Variante bindet. Die Negativkontrolle (gepunktet) wurde mit einem IgG1-PE Antikörper durchgeführt.

### 4.3 Detektion der Fluoreszenzsignale

Um das Verhalten der Zellen während der Versuche nicht durch äußere Einflüsse wie etwaige Färbeschritte zur Detektion zu beeinflussen, wurden die Integrin-Untereinheiten mit Fluoreszenzproteinen fusioniert, welche bei entsprechender Exzitation und Detektion durch das Laser Scanning Mikroskop registriert werden konnten. Bei einer Exzitation von 458 nm konnte die CFP Emission der  $\alpha$ 1b Integrin-Untereinheit bei 485 nm und die YFP Emission der  $\beta$ 3 Integrin-Untereinheit bei 530 nm Wellenlänge detektiert werden. Die Position der fluoreszenzmarkierten Integrine stimmte mit dem zu erwarteten Expressionsmuster überein, da die Zellmembranen wesentlich mehr fluoreszierten als das Zytoplasma. Die Emissionen beider Wellenlängen waren deckungsgleich (El-Khattouti 2010). Kontrollversuche wurden bei gleichen

Mikroskopeinstellungen mit HEK293-Zellen durchgeführt, die stabil mit einem leeren Vektor (P71) transfektiert wurden, der keine cDNA der Fusionsproteine beinhaltet. Wie in Abb. 9 zu erkennen ist, konnte bei diesen Zellen bei Anregung mit 458 nm weder bei 485 nm noch bei 530 nm Wellenlänge eine Emission detektiert werden und somit zeigen die Bildaufnahmen keine fluoreszierenden HEK293-Zellen.



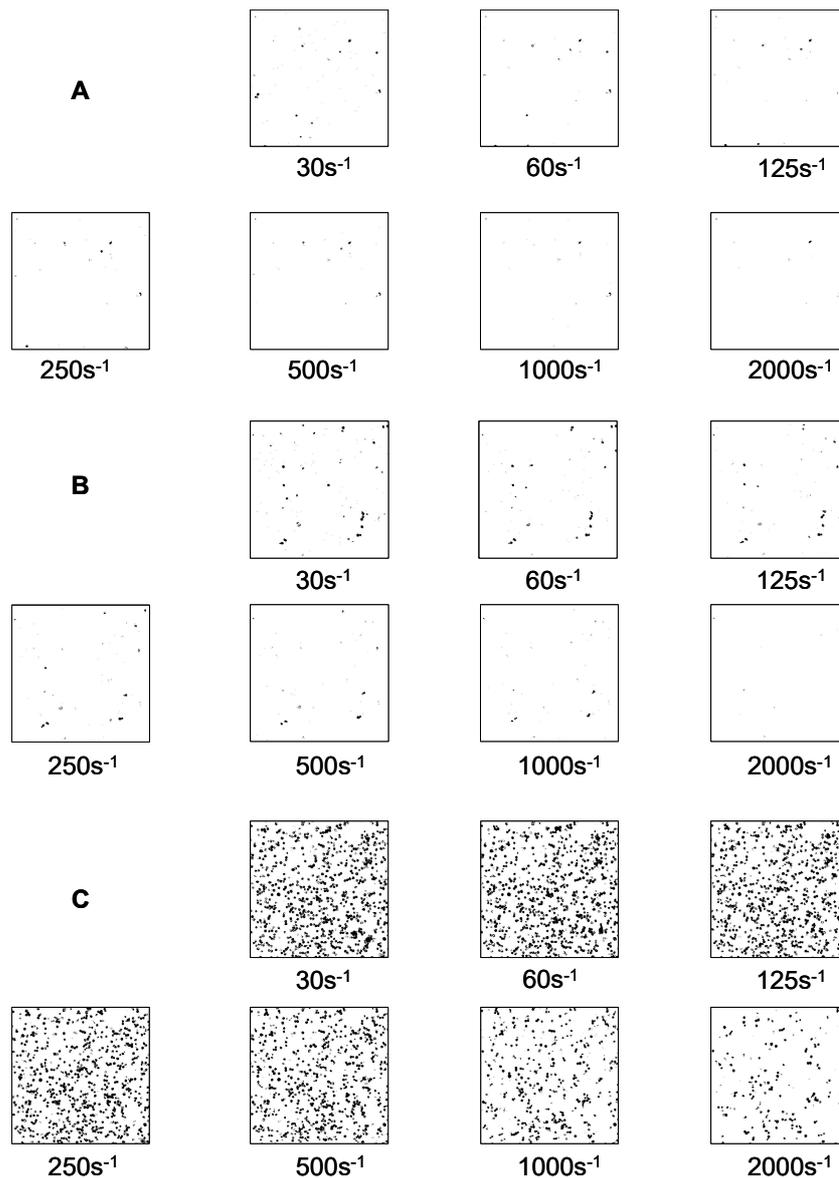
**Abb. 9: Detektion membranständiger fluoreszenzfusionierter  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrine**

Anregung des *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) und *Cyan Fluorescent Protein* (CFP), welches mit der  $\beta$ 3- bzw. der  $\alpha$ IIb-Untereinheit fusioniert ist, bei einer Exzitation (Exz.) von 458 nm und Emission (Emi.) von 530 nm für YFP und 485 nm Wellenlänge für CFP durch ein konfokales Laser Scanning Mikroskop. Kontrollen wurden mit gleichen Mikroskopeinstellungen und HEK293-Zellen durchgeführt, die lediglich mit dem Vektorgerüst (P71) transfektiert waren. Vergrößerung: 40-fach (modifiziert nach El-Khattouti 2010).

Für die Versuche wurde, um die Zellen zu detektieren, das YFP Signal vom Laser Scanning Mikroskop genutzt.

## 4.4 Spezifität der $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Funktion

Die Spezifität der Bindung zwischen den immobilisierten Adhäsionsliganden und den  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrinen der HEK293-Zellen wurde bei der Herstellung der beschichteten Deckgläser durch einen Austausch von Fibrinogen und Fibronectin gegen 1 % BSA überprüft. Spezifische Bindungen konnten als Negativkontrolle durch Vorinkubation der Zellsuspension mit dem  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Rezeptor blockierenden Antikörper Abciximab (Reopro<sup>®</sup> 4  $\mu$ g/ml) validiert werden. Bei beiden Varianten zeigte sich unmittelbar nach Initiierung der Initialscherrate von 30  $s^{-1}$  ein Ablösen der Zellen, so dass die ersten Aufnahmen durch das Laser Scanning Mikroskop kaum haftende Zellen darstellte. Bei Steigerung der Scherraten lösten sich frühzeitig die wenigen residuellen Zellen ebenso ab. Abb. 10 zeigt exemplarisch das Summationsbild der jeweiligen Scherrate bei Durchführung eines Versuches mit 50  $\mu$ g/ml Fibrinogen-beschichteter Deckgläser mit Zellen der HPA-1a-Isoform, die mit 4  $\mu$ g/ml Abicximab vorinkubiert wurden (A), auf Deckgläsern mit 1 % BSA statt Fibrinogen- bzw. Fibronectin-Beschichtung inkubiert wurden (B) und unbehandelt an den immobilisierten Liganden binden konnten (C).



**Abb. 10: Spezifität der  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Bindung**

Während jeder Scherrate wurde ein Stapel von 5 Bildern aufgenommen und mittels ImageJ alle beweglichen Pixel subtrahiert. Die übrig gebliebenen Pixel repräsentieren somit die adhärenen Zellen bei entsprechender Scherrate.

A: Versuchsdurchführung mit Deckgläsern die mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Fibrinogen beschichtet und mit 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Abciximab vorbehandelten HPA-1a HEK293-Zellen inkubiert wurden.

B: Versuchsdurchführung mit Deckgläsern die mit 1 % BSA beschichtet und mit HPA-1a HEK293-Zellen inkubiert wurden.

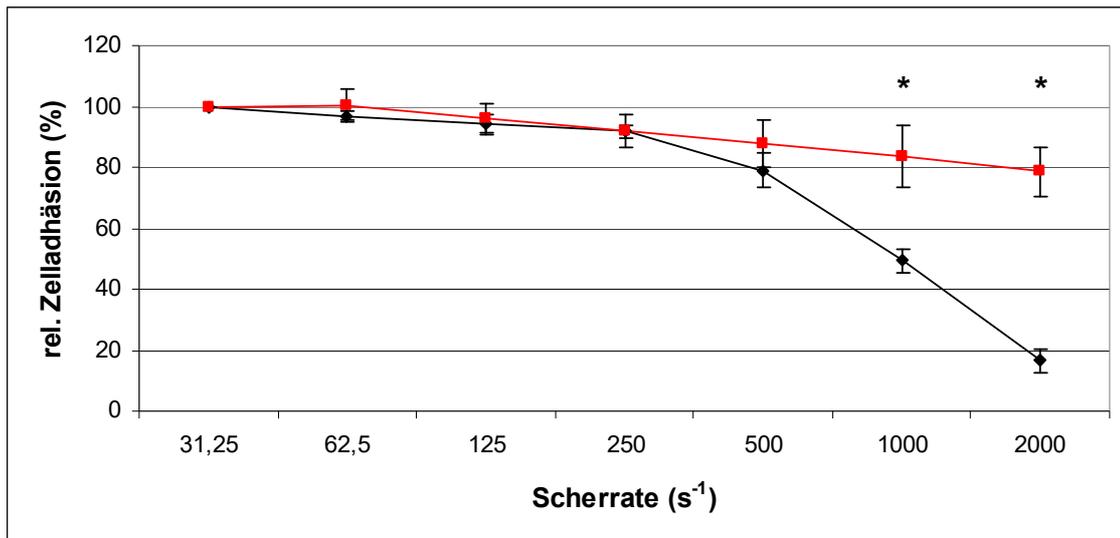
C: Versuchsdurchführung mit Deckgläsern die mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Fibrinogen beschichtet und mit HPA-1a HEK293-Zellen inkubiert wurden.

Vergrößerung: 10-fach.

## **4.5 Adhäsionscharakteristik der HPA-1-Isoformen von $\alpha$ IIb $\beta$ 3 an immobilisierten Adhäsivproteinen**

Während des Versuchsablaufes wurden die an die jeweiligen Liganden adhärierenden HEK293-Zellen, wie unter 3.2.8 beschrieben, schrittweise steigenden Scherraten ausgesetzt.

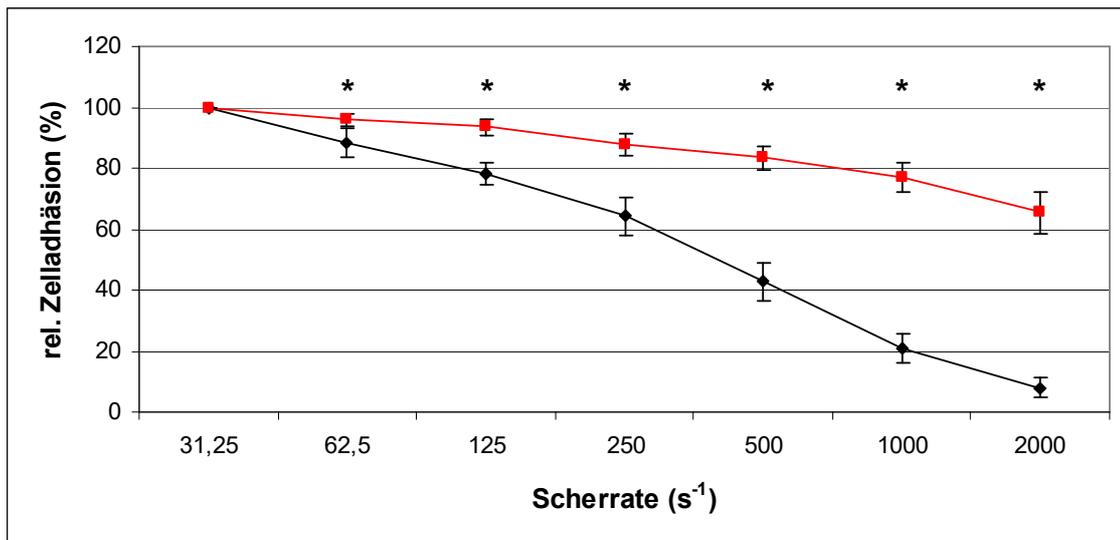
Bei der Verwendung von 50  $\mu$ g/ml Fibrinogen als Adhäsivprotein verhielten sich beide Isoformen, HPA-1a und HPA-1b, sehr ähnlich gegenüber venösen Scherraten (30 - 500  $s^{-1}$ ):  $79 \pm 6$  % (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) der HPA-1a-exprimierenden und  $88 \pm 8$  % der HPA-1b-exprimierenden Zellen adhärten am Ende der höchsten venösen Scherrate noch am beschichteten Deckglas. Die weitere Steigerung der Scherraten auf arterielles Niveau (1000 - 2000  $s^{-1}$ ) führte allerdings zu einer signifikant unterschiedlichen Kinetik beider Isoformen ( $p < 0,0001$ ). Bei einer Scherrate von 1000  $s^{-1}$  waren noch  $84 \pm 10$  % der HPA-1b-exprimierenden Zellen adhärent, jedoch nur  $49 \pm 4$  % der HPA-1a-exprimierenden Zellen konnten auf den mit Fibrinogen beschichteten Deckgläsern detektiert werden. Dieser Unterschied wurde bei der letzten Scherratensteigerung auf 2000  $s^{-1}$  noch drastischer: bei dieser höchsten anzusetzenden Scherrate verblieben immer noch  $79 \pm 8$  % der HPA-1b-exprimierenden HEK293-Zellen an den Deckgläsern haften, wohingegen nur noch  $17 \pm 4$  % der HPA-1a-exprimierender Zellen als adhärent zu verzeichnen waren (Abb. 11).



**Abb. 11: Adhäsionscharakteristik  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-transfektierter HEK293-Zellen der HPA-1a- und HPA-1b-Isoform auf immobilisiertem Fibrinogen (50  $\mu$ g/ml) unter steigenden Scherraten**

Es besteht kein signifikanter Unterschied der Adhäsionsstabilität der Zellen bei Scherraten bis 500 s<sup>-1</sup>, jedoch zeigen die HPA-1a-exprimierenden Zellen (schwarz) ein 3,1-fach verstärktes Ablösen gegenüber der HPA-1b-Isoform (rot) bei 1000 s<sup>-1</sup> sowie ein 3,9-fach verstärktes Ablösen bei 2000 s<sup>-1</sup>. HPA-1a n = 5, HPA-1b n = 6, \*p < 0,0001

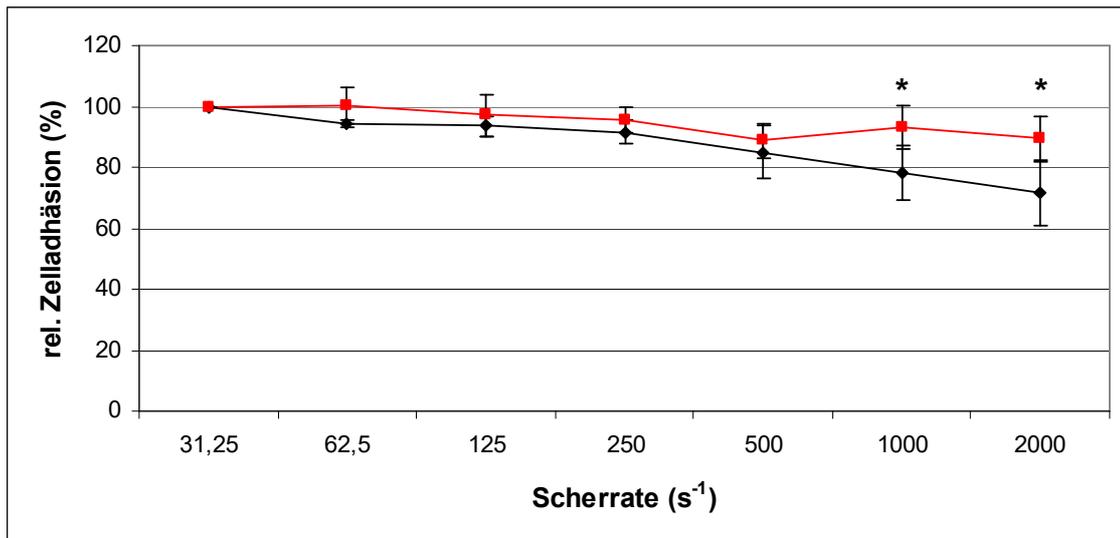
Bei einem Wechsel des Adhäsivliganden von 50  $\mu$ g/ml Fibrinogen zu 50  $\mu$ g/ml Fibronectin konnten wir einen deutlichen Unterschied in der Adhäsionscharakteristik feststellen. Die HPA-1b-exprimierenden HEK293-Zellen zeigten ein ähnliches Verhalten wie unter Benutzung von Fibrinogen als Liganden, da bei der höchsten Scherrate von 2000 s<sup>-1</sup> noch 65  $\pm$  7% der Zellen adhärierend auf den Deckgläsern zu detektieren waren. Im Vergleich dazu hatten sich schon 57  $\pm$  6 % der HPA-1a-exprimierenden Zellen bei einer Scherrate von lediglich 500 s<sup>-1</sup> aus der Bildebene bewegt, was in nur 8  $\pm$  3 % residueller HPA-1a-Zellen bei 2000 s<sup>-1</sup> resultierte. Die Adhäsionskinetik der HPA-1a-Zellen auf Fibronectin zeigte eine kontinuierlich hohe Abnahme der Adhäsionsstabilität der Zellen unter steigenden Scherraten, welche zu einem signifikanten Unterschied bereits unter venösen Strömungsbedingungen von nur 60 s<sup>-1</sup> gegenüber den HPA-1b-Zellen führte (p < 0,05) (Abb. 12). Diese Ergebnisse stehen in einem starken Kontrast zu denen unter Verwendung von Fibrinogen-beschichteter Deckgläser, da dort die HPA-1a- und HPA-1b-exprimierenden Zellen eine ähnliche Adhäsionsstabilität bis zu Scherraten von 500 s<sup>-1</sup> zeigten (Abb. 11).



**Abb. 12: Adhäsionscharakteristik  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-transfektierter HEK293-Zellen der HPA-1a- und HPA-1b-Isoform auf immobilisiertem Fibronektin (50  $\mu$ g/ml) unter steigenden Scherraten**

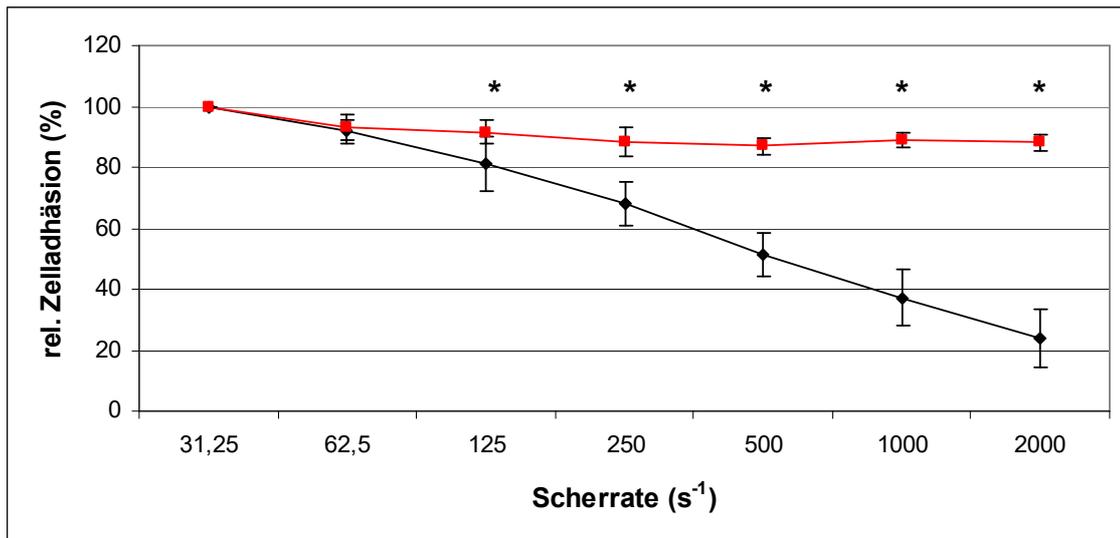
Signifikante Unterschiede in der Adhäsionsstabilität beginnen bereits ab einer Scherrate von 60 s<sup>-1</sup> mit einem 2,9-fach verstärktem Ablösen der HPA-1a-exprimierenden Zellen (schwarz) gegenüber den HPA-1b-exprimierenden Zellen (rot) bei 60 s<sup>-1</sup> und 250 s<sup>-1</sup>, einem 3,4-fach verstärktem Ablösen bei 125 s<sup>-1</sup>, 500 s<sup>-1</sup> und 1000 s<sup>-1</sup>, sowie einem 2,7-fach verstärktem Ablösen bei 2000 s<sup>-1</sup>. HPA-1a n = 6, HPA-1b n = 7, \*p < 0,05

Interessanterweise zeigten sich abweichende Ergebnisse bei Verdopplung der Fibrinogenkonzentration von 50  $\mu$ g/ml auf 100  $\mu$ g/ml. Bei Scherraten auf venösem Flussniveau verhielten sich beide Isoformen ähnlich den Versuchen mit der niedrigeren Ligandenkonzentration. 85  $\pm$  9 % der HPA-1a- und 89  $\pm$  6 % der HPA-1b-exprimierenden Zellen konnten bei 500 s<sup>-1</sup> als adhären detektiert werden. Erhöhte man nun die Scherraten auf arterielles Niveau, zeigte die HPA-1a-Isoform eine wesentlich höhere Adhäsionsstabilität als unter 50  $\mu$ g/ml Fibrinogen. Dies resultierte in 72  $\pm$  2 % residuellen HPA-1a-exprimierenden Zellen bei der höchsten Scherrate von 2000 s<sup>-1</sup>, was eine Steigerung von 55 % im Vergleich zur Benutzung der halben Ligandenkonzentration von 50  $\mu$ g/ml Fibrinogen bedeutete. HEK293-Zellen der HPA-1b-Isoform zeigten dagegen eine ähnliche Adhäsionskinetik bei arteriellen Scherraten wie beim Gebrauch von 50  $\mu$ g/ml Fibrinogen, mit 90  $\pm$  7 % residuellen Zellen bei 2000 s<sup>-1</sup> (Abb. 11 & 13).



**Abb. 13: Adhäsionscharakteristik  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-transfektierter HEK293-Zellen der HPA-1a- und HPA-1b-Isoform auf immobilisiertem Fibrinogen (100  $\mu$ g/ml) unter steigenden Scherraten**  
 Es besteht kein signifikanter Unterschied der Adhäsionsstabilität der Zellen bei Scherraten bis 500 s<sup>-1</sup>, jedoch zeigen die HPA-1a-exprimierenden Zellen (schwarz) ein 3,1-fach verstärktes Ablösen gegenüber der HPA-1b-Isoform (rot) bei 1000 s<sup>-1</sup> sowie ein 2,8-fach verstärktes Ablösen bei 2000 s<sup>-1</sup>. HPA-1a n = 6, HPA-1b n = 5, \*p < 0,05

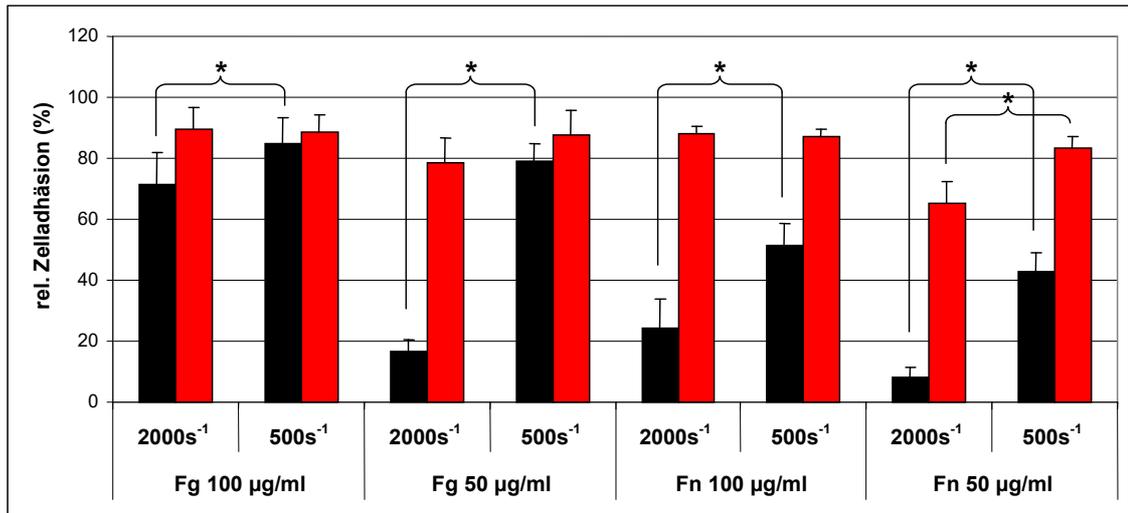
Obgleich eine Verdopplung der Ligandenkonzentration von Fibrinogen zu einer wesentlich höheren Adhäsionsstabilität der HPA-1a-exprimierenden Zellen führte, konnte dieser Effekt nur abgeschwächt bei der Verwendung von 100  $\mu$ g/ml Fibronectin-beschichteter Deckgläser beobachtet werden. HEK293-Zellen der HPA-1a-Isoform zeigten bei steigenden Scherraten eine kontinuierlich hohe Abnahme der Adhäsionsstabilität was in  $24 \pm 10$  % residuellen Zellen bei der höchsten Scherrate von 2000 s<sup>-1</sup> resultierte. Dies sind lediglich 13 % mehr adhärenente Zellen zum Ende des Versuchsablaufes gegenüber der Verwendung der halben Fibronectinkonzentration von 50  $\mu$ g/ml. HPA-1b-exprimierende HEK293-Zellen zeigten bei einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml Fibronectin ein ähnliches Adhäsionsverhalten wie unter Benutzung von 50  $\mu$ g/ml Fibronectin, mit  $89 \pm 3$  % residuellen Zellen bei 2000 s<sup>-1</sup>. Dadurch ergab sich ein signifikanter Unterschied zu den HPA-1a-Isoform-Zellen ab einer Scherrate von 125 s<sup>-1</sup> aufwärts (p < 0,05) (Abb. 12 & 14).



**Abb. 14: Adhäsionscharakteristik  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-transfektierter HEK293-Zellen der HPA-1a- und HPA-1b-Isoform auf immobilisiertem Fibronectin (100  $\mu$ g/ml) unter steigenden Scherraten**  
 Signifikante Unterschiede in der Adhäsionsstabilität beginnen bereits ab einer Scherrate von 125 s<sup>-1</sup> mit einem 2,2-fach verstärktem Ablösen der HPA-1a-exprimierenden Zellen (schwarz) gegenüber den HPA-1b-exprimierenden Zellen (rot). Diese Differenz steigt auf ein 2,8-fach verstärktes Ablösen bei 250 s<sup>-1</sup>, ein 3,7-fach verstärktes Ablösen bei 500 s<sup>-1</sup>, ein 5,7-fach verstärktes Ablösen bei 1000 s<sup>-1</sup> und ein 6,7-fach verstärktes Ablösen bei 2000 s<sup>-1</sup>. HPA-1a n = 7, HPA-1b n = 6, \*p < 0,05

Gibt man die Ergebnisse aus den obigen Verlaufskurven für die Adhäsionsrate bei 500 s<sup>-1</sup> und 2000 s<sup>-1</sup> in einem gruppierten Säulendiagramm wieder, ergeben sich zwei weitere Aussagen.

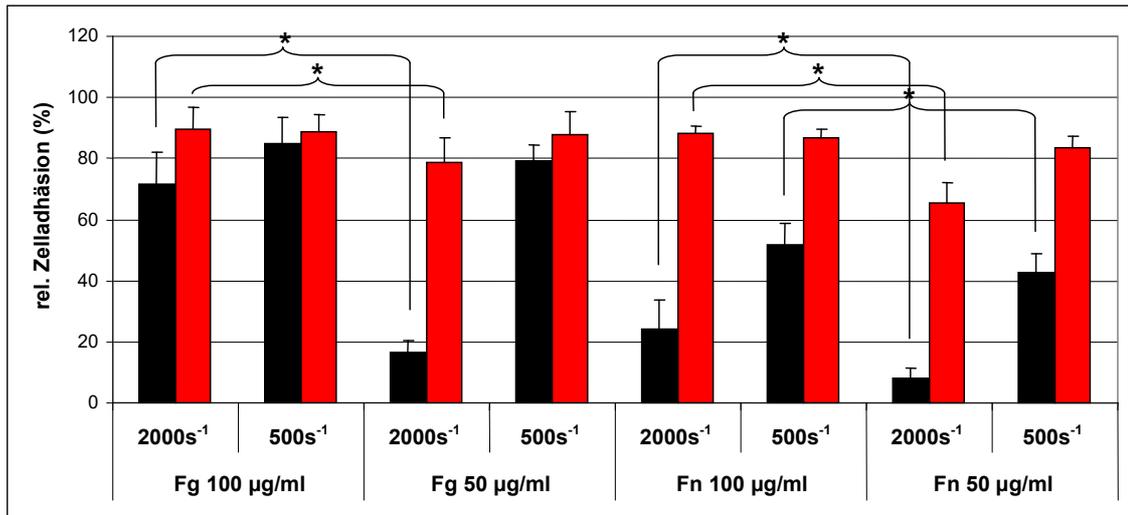
Zum einen zeigen sich signifikante scherratenabhängige Unterschiede in der Adhäsionsstabilität der HPA-1a-exprimierenden Zellen, unabhängig von dem gewählten Liganden und dessen Konzentration (p < 0,05). Dies lässt sich bei den HPA-1b-exprimierenden Zellen nicht erkennen, die lediglich bei Fibronectin in einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml einen signifikanten scherratenabhängigen Unterschied aufweisen (Abb. 15).



**Abb. 15: Bedeutung der Scherrate auf HPA-1-exprimierende HEK293-Zellen**

Relative adhärenente Zellen (HPA-1a schwarz, HPA-1b rot) bei 500s<sup>-1</sup> und 2000s<sup>-1</sup> auf den untersuchten Liganden (Fibrinogen / Fibronectin, 50 / 100 µg/ml). Es zeigt sich eine scherratenabhängige Signifikanz der HPA-1a-exprimierenden HEK293-Zellen, unabhängig vom Ligand und dessen Konzentration. \*p < 0,05

Zum anderen lässt sich darstellen, dass sich der Einfluss der Konzentrationshöhe der Liganden bei beiden Isoformen erst im arteriellen Strömungsbereich signifikant bemerkbar macht (p < 0,05). Lediglich bei Fibronectin weisen die HPA-1a-exprimierenden Zellen signifikante Unterschiede in der Adhäsionsstabilität bereits bei venösen Scherbedingungen von 500 s<sup>-1</sup> auf (p < 0,05), wohingegen die HPA-1b-Isoform, wie auch bei Fibrinogen in der gleichen Konzentration von 50 µg/ml, keine signifikanten Unterschiede erkennen lässt (Abb. 16).



**Abb. 16: Bedeutung der Konzentrationshöhe des Liganden auf HPA-1-exprimierende HEK293-Zellen**

Relative adhärenzte Zellen (HPA-1a schwarz, HPA-1b rot) bei 500s<sup>-1</sup> und 2000s<sup>-1</sup> auf den untersuchten Liganden (Fibrinogen / Fibronectin, 50 / 100 µg/ml). Es zeigen sich signifikante Unterschiede der Adhäsionsstabilität bedingt durch die verwendete Konzentrationshöhe der Liganden erst im arteriellen Strömungsbereich mit Ausnahme der HPA-1a-Zellen auf Fibronectin. \*p < 0,05

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, die Adhäsionseigenschaften des HPA-1-Polymorphismus des thrombozytären Integrins  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  in einem Flussmodell mithilfe verschiedener Liganden zu charakterisieren und spezifizieren.

Dazu wurden stabil transfektierte HEK293-Zellen, die entweder die HPA-1a- oder HPA-1b-Isoform des  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrins exprimierten, verwendet. Diese Zellen wurden auf zuvor beschichteten Deckgläsern zur Adhäsion gebracht und nachfolgend zunehmenden Scherraten ausgesetzt. Als Liganden für diese Beschichtung kamen Fibrinogen und Fibronectin in jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen (50 und 100  $\mu\text{g/ml}$ ) zum Einsatz. Anschließend wurden die adhärenen Zellen in einer Flusskammer schrittweise steigenden Scherraten ausgesetzt, die venöse (30 - 500  $\text{s}^{-1}$ ) bzw. arterielle (1000 - 2000  $\text{s}^{-1}$ ) Flussbedingungen simulierten. Die HEK293-Zellen waren mit fluoreszierenden Proteinen (CFP an der  $\alpha\text{IIb}$ - und YFP an der  $\beta\text{3}$ -Untereinheit) fusioniert, anhand derer sie von einem Laser Scanning Mikroskop detektiert werden konnten. In definierten Zeitabständen wurden die Scherraten erhöht und digitale Aufnahmen zur Charakterisierung der Adhäsionsrate registriert. Die Adhäsionskinetik beschreibt somit zum einen die Adhäsion der transfektierten HEK293-Zellen an den immobilisierten Adhäsivproteinen, zum anderen die Desorption der Zellen unter den applizierten Scherraten (auch „*detachment*“ genannt). Es war von Bedeutung, Versuche nur mit solchen transfektierten Zellen durchzuführen, die eine gleichwertige Rezeptordichte aufwiesen, da eine erhöhte  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  Rezeptoranzahl auf der HEK293-Zelloberfläche mit einer erhöhten Gesamtzahl an Rezeptor-Ligand Bindungen einhergehen könnte. Dies würde die Adhäsionseigenschaften beeinflussen (Kunicki *et al.* 2011) und die Vergleichbarkeit der Zelllinien in Frage stellen.

Es ließ sich zeigen, dass die Adhäsionseigenschaften des HPA-1-Polymorphismus des  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrins in unseren Experimenten durch die Höhe der initiierten Scherrate, der Art des verwendeten immobilisierten Liganden und dessen Konzentration charakterisiert wurde.

## 5.1 Funktionalität der fluoreszierenden Fusionsproteine

Zur Detektion der HEK293-Zellen wurden diese mit dem Laser Scanning Mikroskop angeregt, um die Emission der fusionierten Fluoreszenzproteine CFP und YFP zu detektieren und zu quantifizieren. Abb. 9 zeigt die fluoreszierenden  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Rezeptoren bei den jeweiligen Exzitationen und Emissionen. Gleichzeitig konnte durch diese Aufnahmen festgestellt werden, dass die Fusionsproteine offenbar keinen Einfluss auf die Lokalisation der membranständigen Integrine ausübten, da sich diese fluoreszierend fast ausschließlich in der Zellmembran befanden. El-Khattouti *et al.* (El-Khattouti 2010) konnten mit denselben transfektierten HEK293-Zellen mittels Akzeptor-Photobleach-Methode nachweisen, dass beide Untereinheiten mit ihren jeweils fusionierten Fluorophoren in enger räumlicher Nähe zueinander auf der Oberfläche der Zellen exprimiert wurden. Bei diesem Verfahren wird durch Photodesstruktion des Akzeptors, in diesem Fall des YFP-Fluorophors, dessen Emission ausgelöscht, und es kommt zu einer starken Emissionszunahme des Donors, in diesem Fall des CFP-Fluorophors. Da nur funktionstüchtige Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert werden (O'Toole *et al.* 1989), genügte es, während der Versuche lediglich das YFP Signal zu detektieren.

## 5.2 Spezifität der Integrin-Liganden-Bindung

Es musste sichergestellt werden, dass die Adhäsion der HEK293-Zellen auf den Liganden-beschichteten Deckgläsern nur durch eine spezifische Bindung zwischen dem  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrin und den eingesetzten Liganden, Fibrinogen oder Fibronectin, stattfand. Hierfür wurde zum einen das Fab-Fragment des monoklonalen Antikörpers Abciximab, der die Bindungsstelle für Fibrinogen und Fibronectin blockiert, verwendet (Topol *et al.* 1999). Zum anderen wurden zur Kontrolle die Deckgläser statt mit einem der Liganden mit 1 % BSA, auf dem es zu keinerlei Adhäsion der Zellen durch fehlende Bindungsmöglichkeiten des Rezeptors kam, beschichtet (Kirchhofer *et al.* 1990) (Abb. 10). Somit konnte sichergestellt werden, dass die Adhäsion zwischen den  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrinen der HEK293-Zellen und den immobilisierten Liganden spezifisch ist.

### 5.3 Adhäsionseigenschaften auf Fibrinogen

Es zeigte sich, dass bei Verwendung von 50 µg/ml Fibrinogen erst bei arteriellen Scherbedingungen signifikante Unterschiede zwischen den HPA-1a- und HPA-1b-Isoform exprimierenden HEK293-Zellen zu erkennen waren (Abb. 11).

Diese scherratenabhängigen Unterschiede der Adhäsionsstabilität sind vergleichbar mit denen anderer Flusskammerversuche (Cadroy *et al.* 2001; Tzima *et al.* 2001; Vijayan *et al.* 2003; Loncar *et al.* 2007) und konnten in weiterführenden Arbeiten an unserem Institut durch Kunstreich *et al.* (Kunstreich 2013) sowie mithilfe von Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Analysen bestätigt werden (El-Khattouti 2010). Außerdem korrespondieren die gemachten Beobachtungen mit klinisch-epidemiologischen Studien, die einen Zusammenhang zwischen dem Pro33-Genotyp und arteriellen, aber nicht venösen Thromben herstellen (Ridker *et al.* 1997; Hooper *et al.* 1999; Larsson und Hillarp 1999; Renner *et al.* 2001; Zotz *et al.* 2005).

Wurde die Fibrinogenkonzentration auf 100 µg/ml verdoppelt, zeigten die HPA-1b-Zellen eine ähnliche Adhäsionskinetik wie bei Verwendung der halben Fibrinogenkonzentration. Die HPA-1a-Zellen wiesen jedoch eine um 55 % stärkere Adhäsionsstabilität auf (Abb. 13). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Beobachtungen von Schlesinger *et al.* 2013. Schlesinger zeigte, dass die maximalen Adhäsionsunterschiede der beiden Isoformen HPA-1a und HPA-1b unter niedrigen Ligandendosierungen (20 µg/ml Fibrinogen) und hohen Scherraten (1000 s<sup>-1</sup>) auftreten (Schlesinger 2013). Trotz der niedrigeren Konzentration und der daraus resultierenden ebenfalls niedrigeren Gesamtanzahl der RGD-Bindungsstellen im Vergleich zur doppelten Ligandenkonzentration, ist davon auszugehen, dass die Deckglasoberfläche bereits bei 50 µg/ml Fibrinogen gesättigt gewesen sein müsste (Salim *et al.* 2007). Daher stellte sich die Frage, warum bei einer Fibrinogenkonzentration von 100 µg/ml bei arteriellen Scherraten eine höhere Rate adhärenter Zellen zu verzeichnen war. Verschiedene Studien zuvor hatten zeigen können, dass die Konzentration eines auf einer Fläche adsorbierten Liganden dessen Ausrichtung und Orientierung beeinflussen kann (Moskowitz *et al.* 1998; Snopok 1998; Kim und Somorjai 2003). Somit könnte das mit 50 µg/ml niedrig

konzentrierte Fibrinogen auf den für die Versuche präparierten Deckgläsern in der räumlichen Anordnung weniger RGD-Bindungsstellen für die  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrine präsentiert haben, als es bei einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml Fibrinogen der Fall gewesen wäre. Dies würde in einer geringeren Gesamtanzahl an Rezeptor-Ligand Bindungen bei Verwendung von 50  $\mu$ g/ml Fibrinogen resultieren, die aber ausreicht, bei venösen Scherraten eine ähnliche Adhäsionsstabilität wie bei 100  $\mu$ g/ml Fibrinogen zu erzeugen. Erst im arteriellen Strömungsbereich wirkt sich die geringere Anzahl der Rezeptor-Ligand Bindungen bei 50  $\mu$ g/ml Fibrinogenkonzentration dahingehend aus, dass signifikant weniger adhärenente Zellen registriert werden können, als dies bei 100  $\mu$ g/ml Fibrinogen der Fall ist (Abb. 16).

## 5.4 Adhäsionseigenschaften auf Fibronectin

Da Fibronectin ebenfalls eine wichtige Rolle in der Hämostase und Thrombusformation zugeschrieben wird, wurde dieser Ligand unter denselben Versuchsbedingungen zum Vergleich eingesetzt. Vijayan *et al.* berichteten, dass die erhöhte Adhäsionsstabilität der HPA-1b- gegenüber der HPA-1a-Isoform substratspezifisch für Fibrinogen sei und sich somit kein signifikanter Adhäsionsunterschied der beiden Isoformen unter Verwendung von Fibronectin darstellen ließe (Vijayan *et al.* 2003).

Interessanterweise lassen die Ergebnisse dieser Arbeit andere Schlüsse zu. Bei Verwendung Fibronectin-beschichteter Deckgläser konnten bereits unter venösen Scherbedingungen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Isoformen detektiert werden (Abb. 12).

Diese Unterschiede treten sowohl bei Fibrinogen als auch bei Fibronectin in Erscheinung, da beide Liganden, wie unter 1.2.1 und 1.2.2 beschrieben, eine Aminosäuresequenz mit einem RGD-Motiv in ihrer Struktur aufweisen, die vom  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrin als Bindungsstelle erkannt wird (Ruoslahti und Pierschbacher 1987; Kunicki 1989; Plow *et al.* 2000). Des Weiteren verwendete Vijayan *et al.* in der oben erwähnten Arbeit maximale Scherraten von nur 125  $s^{-1}$ , so dass unter diesen Umständen kein signifikanter Unterschied der beiden Isoformen festgestellt werden konnte. Denn wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bei Verwendung von 50  $\mu$ g/ml Fibronectin-beschichteter

Deckgläser zeigen, kommt die gesteigerte Adhäsionsstabilität der HPA-1b-Isoform exprimierender Zellen besonders im arteriellen Strömungsbereich zur Geltung (Abb. 12).

Bei Verwendung von Fibronektin in einer Konzentration von 100 µg/ml zeigten beide Isoformen eine ähnliche Adhäsionskinetik wie bei Verwendung der halben Fibronektinkonzentration von 50 µg/ml (Abb. 14) und wiesen somit nicht die unter verdoppelter Fibrinogenkonzentration beobachtete, signifikant gesteigerte Adhäsionsstabilität der HPA-1a-exprimierenden Zellen auf (Abb. 13).

Es muss daher überlegt werden, warum das Adhäsionsverhalten  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-transfektierter HEK293-Zellen sowohl der HPA-1a- als auch der HPA-1b-Isoform auf Fibronektin schwächer ausfällt als auf Fibrinogen.

Beim Vergleich der Molekülmassen der verwendeten Liganden untereinander fällt auf, dass das Heterodimer Fibronektin mit 440 kDa schwerer ist als das Heterohexamer Fibrinogen mit 340 kDa (Blombäck und Blombäck 1972; Mosher 1975). Für die Beschichtung der Deckgläser wurden identische Proteinkonzentrationen beider Liganden verwendet (50, bzw. 100 µg/ml). Daraus ergibt sich eine mit circa 77% im Vergleich zum Fibrinogen geringere Fibronektinbeschichtungsdichte der Deckgläser. Bei gleicher Anzahl RGD-Bindungsplätze je Molekül Fibrinogen und Fibronektin ist davon auszugehen, dass bei identischen Proteinkonzentrationen der Liganden somit nur circa 77% der Anzahl RGD-Bindungsplätze bei Verwendung von Fibronektin gegenüber Fibrinogen den  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrinen zur Verfügung standen. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die schwächere Adhäsionsstabilität  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-transfektierter HEK293-Zellen sowohl der HPA-1a- als auch der HPA-1b-Isoform auf Fibronektin darstellen. Dass die Differenz der relativ adhärenen Zellen bei identisch applizierter Scherrate unter Verwendung der gleichen Proteinkonzentration Fibrinogen und Fibronektin nicht immer den 23% der theoretischen Überlegungen entspricht, könnte mit verschiedenen Quartärstrukturen der Liganden zusammenhängen. Dadurch ist eine unterschiedliche Ausrichtung der adhärenen Liganden auf den Deckgläsern möglich, die die räumliche Anordnung der RGD-Bindungsstellen und somit auch die Möglichkeit der Integrin-Ligand-Bindung beeinflussen könnte.

## 5.5 Ursachen des prothrombotischen Effekts der Pro33-Isoform

Es scheint, als seien die in dieser Arbeit auffälligen phänotypischen Unterschiede des HPA-1-Polymorphismus des  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrins maßgeblich durch vier verschiedene Faktoren und Umstände hervorgerufen, die die Bindung des Liganden zum Rezeptor, sowie dessen Verankerung im Zytoskelett der HEK293-Zellen beeinflussen.

1.

Es existiert eine Theorie, die von einer durch den Polymorphismus ausgelösten, erhöhten Affinität des  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrins gegenüber seiner Liganden ausgeht. Feng *et al.* bestimmten den Genotyp und die Thrombozyten Reaktivität von 1422 Personen der Framingham Offspring Studie, eine epidemiologische Kohortenstudie, die mit den Kindern der Framingham Heart Studie von 1948 fortgeführt wurde und konnten eine erhöhte Affinität homozygoter HPA-1b Thrombozyten zu einem ihrer Agonisten, Adrenalin, feststellen (Kannel *et al.* 1979; Feng *et al.* 1999). Diese Beobachtungen wurden durch Vijayan *et al.* unterstützt. Sie zeigten, dass Pro33 positive Integrine eine verstärkte Bindung zu Fibrinogen und Prothrombin aufwiesen (Vijayan *et al.* 2000). Jedoch gibt es bis heute keine absolute Klarheit über diese Theorie. Bennett *et al.* zeigten nämlich in einer ihrer Studien, dass die Konzentration an benötigtem Fibrinogen für die halb-maximale Bindung an CHO-Zellen unabhängig vom HPA-1-Polymorphismus der transfektierten  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrinen sei (Bennett 2001).

2.

Wie unter 1.3.1 beschrieben, kommt es bei der Konformationsänderung des  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Rezeptors vom niedrig-affinen zum hoch-affinen Zustand zu einer Veränderung des Winkels zwischen der Hybrid- und der PSI-Domäne (Xiao *et al.* 2004; Ma *et al.* 2007). Nun findet der Aminosäureaustausch des HPA-1-Polymorphismus in eben dieser PSI-Domäne statt, so dass er zu einer Konformationsänderung der HPA-1b- gegenüber der HPA-1a-Isoform führen könnte. Führt man sich nun vor Augen, dass der Bindungsprozess des  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrins zu seinen Liganden keineswegs eine einphasische Reaktion ist,

sondern aus mindestens zwei aufeinanderfolgenden Schritten besteht (Huber *et al.* 1995), könnte eine solche Konformationsänderung einen positiven Einfluss auf die Affinität des Rezeptors gegenüber seinen Liganden haben. Vijayan *et al.* sehen hier ebenfalls eine mögliche Begründung für die prothrombotischen Eigenschaften der HPA-1b-Isoform. Sie vermuten, dass sich die PSI-Domäne mit der ausgetauschten Aminosäure rigider verhält und somit eine größere Stabilität hin zur von Xiao *et al.* beschriebenen hoch-affinen Konformation des Kopfteils aufweist (Xiao *et al.* 2004; Vijayan und Bray 2006). Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass die HPA-1b Variante bereits bei den niedrigen Ligandenkonzentrationen eine stärkere Adhäsion als die HPA-1a Variante aufweist und deren Stabilität durch eine Verdopplung der Ligandenkonzentration auf 100 µg/ml nur noch gering gesteigert werden kann.

### 3.

Die Integrin-Ligand-Interaktion darf nicht rein isoliert betrachtet werden. Es besteht die Möglichkeit, dass der HPA-1-Polymorphismus des  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin zu einer stärkeren Verankerung des Integrins zum Zytoskelett führt und dies somit für die gesteigerte Adhäsionsstabilität der Pro33-Zellen mitverantwortlich ist. Vijayan *et al.* beschrieben bereits 2000, dass es durch den Aminosäureaustausch zu einem "Knick" in der Sekundärstruktur des Integrins kommt. Daraus resultiere eine Konformationsänderung der  $\beta\text{3}$ -Untereinheit, die zu einer Reorganisation des Zytoskeletts führe (Vijayan *et al.* 2000). Außerdem konnte an thrombozytären  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrinen gezeigt werden, dass das durch Ligandenbindung aktivierte *Outside-in Signaling* zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts beiträgt (Shattil und Newman 2004). Diese Reorganisationen könnten zusätzlich zu der oben genannten stabileren Verankerung des Rezeptors mit der Zelle, zu einer verstärkten zytoskelettalen Aktivität führen und somit ebenfalls die prothrombotischen Eigenschaften der HPA-1b-Isoform bei Thrombozyten begünstigen. Diese These kann durch die Tatsache unterstützt werden, dass die verstärkte Adhäsion der Pro33-Zellen durch eine Inhibierung der aktinzytoskelettalen Reorganisation durch Cytochalasin-D aufgehoben werden konnte (Sajid 2002).

4.

Kim *et al.* konnten zeigen, dass die bekannten extrazellulären Konformationsänderungen sowohl beim *Outside-in* als auch beim *Inside-out Signaling* zu einer zytoplasmatischen räumlichen Trennung der beiden Untereinheiten, des strukturell ähnlichen  $\alpha_v\beta_3$  Integrins führten (Kim *et al.* 2003; Arnaout *et al.* 2005). El-Khattouti *et al.* gelang es, dieses Phänomen auch bei  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin-exprimierenden HEK293-Zellen mittels FRET-Analysen nachzuweisen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die HPA-1b-Isoform im nicht aktivierten Ruhezustand bereits eine größere räumliche Trennung der  $\alpha_{IIb}$ - von der  $\beta_3$ -Untereinheit aufwies, als dass bei der HPA-1a Variante der Fall war (El-Khattouti 2010). Somit könnte die HPA-1b-Isoform bereits in einer voraktivierten Form exprimiert sein, was sich verstärkend auf deren prothrombotische Eigenschaften auswirke.

Diese vier Mechanismen zusammengenommen bilden die Hauptgrundlagen für die erhöhte Adhäsionsstabilität gegenüber schrittweise gesteigerten Scherraten des HPA-1b- gegenüber des HPA-1a-Isoformen. Insbesondere die Reorganisation des Zytoskeletts und die vermeintliche Voraktivierung des Rezeptors stellt gerade bei niedrigen Ligandenkonzentrationen den Hauptgrund für die ausgeprägten prothrombotischen Eigenschaften der HPA-1b-Isoform dar.

## **5.6 *In-vivo* Übertragbarkeit**

Vorbehaltlich des Modellcharakters, der weder die Größenunterschiede der HEK293-Zellen gegenüber Thrombozyten, noch die komplexe Rheologie des Blutflusses berücksichtigt, konnte der durch diese Arbeit beschriebene Versuchsaufbau in seiner Reliabilität und Validität überzeugen. Es konnte eine sinnvolle Möglichkeit gefunden werden, den HPA-1-Polymorphismus des thrombozytären Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  möglichst unbeeinflusst und reproduzierbar in seinen Details und Eigenschaften zu erforschen. Durch Verwendung transfektierter HEK293-Zellen konnte sichergestellt werden, dass die Ergebnisse der Flusskammerversuche in keiner Weise durch andere Integrine oder Oberflächenmoleküle beeinflusst werden konnten, wie dies bei Verwendung von Thrombozyten der Fall gewesen wäre. Somit ergab sich durch

diese Art des Versuchsaufbaus die Möglichkeit, die HPA-1 Varianten des  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrins isoliert und durch fest definierte Ligandenarten und -konzentrationen, spezifisch wie möglich zu untersuchen.

## 5.7 Klinische Relevanz und Ausblick

Klinisch spielt das  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin einen wichtigen Angriffspunkt in der Prävention und Therapie von Thromben und koronarer Herzerkrankungen. So konnte gezeigt werden, dass der HPA-1-Polymorphismus des thrombozytären  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin eine Risikodeterminante für akute Koronarsyndrome ist. Patienten mit HPA-1b-Allel, die an einer koronaren Herzkrankheit leiden, erfahren einen Myokardinfarkt im Median 5,2 Jahre früher als HPA-1b-negative Patienten (Weiss *et al.* 1996; Zotz *et al.* 2005). Jedoch gibt es auch Studien, die keinen Zusammenhang des HPA-1-Polymorphismus von  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  und koronarer Herzerkrankungen erkennen konnten (Herrmann *et al.* 1997; Sperr *et al.* 1998). Es stellt sich die Frage, ob die *in-vitro* gemachten Beobachtungen relevante Konsequenzen für die Behandlung HPA-1b homozygoter Patienten haben. So konnten Kunicki *et al.* feststellen, dass eine definierte Menge eines Antikörpers gegen das  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin bei HPA-1a homozygoten Individuen zu einer Sättigung der Rezeptoren und vollständigen Inhibierung der Bindungsfähigkeit des Integrins an Fibrinogen führte, bei HPA-1b homozygoten Patienten jedoch nur eine Teilinhibierung auslöste und somit höhere Konzentrationen des Antikörpers nötig waren (Furihata *et al.* 1987; Kunicki und Newman 1992). Außerdem gibt es Studien, die eine Resistenz HPA-1b homozygoter Patienten gegenüber Aspirin aufweisen (Szczeklik *et al.* 2000, Cambria-Kiely and Gandhi 2002), welches bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit zur Dauertherapie mit dem Evidenzgrad 1 in der nationalen Versorgungsleitlinie (NVL) empfohlen wird (Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2013). Gleichzeitig wird von der NVL bei Kontraindikationen oder Unverträglichkeiten von Aspirin, Clopidogrel als alternative Monotherapie mit dem Evidenzgrad 2 vorgeschlagen, demgegenüber Träger des HPA-1b-Allels keine gesteigerten Resistenzen aufweisen (Papp *et al.* 2007).

## 6 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit leistet einen weiteren Beitrag zum Verständnis des HPA-1-Polymorphismus des thrombozytären Integrins  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ . Die durchgeführten Experimente konnten bekannte signifikante Unterschiede der HPA-1b- gegenüber der HPA-1a-Isoform bestätigen und neue Erkenntnisse dazu beisteuern.

Es konnte gezeigt werden, dass der Aminosäureaustausch von Leucin zu Prolin an Position 33 der PSI-Domäne der  $\beta_3$ -Untereinheit des  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Integrins transfektierter HEK293-Zellen zu einer signifikant höheren Adhäsionsrate der so entstandenen HPA-1b-Isoform unter arteriellen Bedingungen auf immobilisiertem Fibrinogen führt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit klinisch-epidemiologischen Studien (Ridker *et al.* 1997; Hooper *et al.* 1999; Larsson und Hillarp 1999; Renner *et al.* 2001). Der Unterschied der Adhäsionsstabilität gegenüber der HPA-1a-Isoform ist auf immobilisiertem Fibronectin noch größer und schon bei venösen Scherraten signifikant. Außerdem moduliert die Ligandenkonzentration die Adhäsionsstabilität der Integrine dahingehend, dass die größten Unterschiede der Isoformen bei niedrigen Konzentrationen festgestellt werden konnten. In der Zusammenschau scheinen vor allem vier Mechanismen, die alle die Integrin-Liganden Bindung oder deren Verankerung mit dem Zytoskelett betreffen, für das phänotypisch unterschiedliche Verhalten der beiden HPA-1-Isoformen verantwortlich zu sein: In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die HPA-1b-Isoform Konformationsänderungen des Integrins (Vijayan und Bray 2006), dessen Affinität zu den Liganden (Feng *et al.* 1999), zytoskelettale Reorganisationen (Vijayan *et al.* 2000) und auch eine Voraktivierung (El-Khattouti 2010) aufweist und somit Erklärungsansätze für den prothrombotischen Charakter liefert. Jedoch sollten gerade im Hinblick auf die in der Literatur wenigen und unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der phänotypischen Eigenschaften des Polymorphismus bei Verwendung von Fibronectin als Liganden, weitere Forschungsansätze entstehen.

Für das klinische Arbeiten leistet diese Dissertation hoffentlich einen wertvollen Beitrag zum besseren Verständnis der Funktionsweise und Charakteristik des

HPA-1-Polymorphismus des thrombozytären Integrins  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , um darüber hinaus neue Ansätze und Ideen für die Erforschung und Entwicklung weiterer therapeutischer Strategien gegen pathologische Thrombusbildungen zu geben.

## 7 Zusammenfassung

Der HPA-1-Polymorphismus des thrombozytären Integrins  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  bedingt einen Aminosäureaustausch von Leucin (Leu33, HPA-1a) zu Prolin (Pro33, HPA-1b) in Position 33 der  $\beta$ -Untereinheit. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit koronarer Herzkrankheit, die zugleich Träger eines HPA-1b-Allels sind, im Median 5,2 Jahre früher einen Myokardinfarkt erleiden als homozygote HPA-1a-Patienten. Außerdem wiesen  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -transfizierte Zellen der HPA-1b-Isoform in Flusskammerversuchen höhere Adhäsionsraten an immobilisiertes Fibrinogen auf.

Ziel dieser Arbeit war, das Adhäsionsverhalten der beiden HPA-1-Varianten gegenüber verschiedenen Liganden in unterschiedlicher Konzentration unter flusssynamischen Bedingungen zu analysieren und zu charakterisieren. Hierzu wurden  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -transfizierte HEK293-Zellen und ein Flusskammermodell eingesetzt, das die Applikation variabler Scherraten erlaubt. Die Visualisierung der Zellen erfolgte mit digitalem Imaging. Fluoreszenzmarkierte HEK293-Zellen, die  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  entweder in der HPA-1a- oder HPA-1b-Isoform exprimierten, wurden auf mit Fibrinogen oder Fibronectin beschichteten Deckgläsern über eine Minute bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ -Sättigung zur Adhäsion gebracht. Anschließend wurden die Zellen in der Flusskammer schrittweise steigenden Scherraten, die venöse (30 - 500  $\text{s}^{-1}$ ) und arterielle (1000 - 2000  $\text{s}^{-1}$ ) Bedingungen simulierten, für je eine Minute exponiert und die Rate noch adhärerter Zellen bestimmt.

$\alpha\text{IIb}\beta 3$  exprimierende Zellen der HPA-1b (Pro33)-Isoform zeigten bei 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Fibrinogen einen signifikant höheren Prozentsatz residueller Zellen unter arteriellen Strömungsbedingungen als die Zellen der HPA-1a (Leu33)-Isoform ( $p < 0,0001$ ). Dieser Unterschied war mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Fibrinogen geringer ausgeprägt, aber immer noch signifikant ( $p < 0,05$ ). HPA-1b-Isoform exprimierende Zellen wiesen mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Fibronectin einen ähnlich hohen Anteil residueller Zellen über alle Scherraten wie bei Verwendung der gleichen Fibrinogenkonzentration auf. Hingegen waren bereits bei venösen Scherraten von 60  $\text{s}^{-1}$  signifikant weniger HPA-1a-Isoform exprimierende Zellen adhären ( $p < 0,05$ ). Die gesteigerte Adhäsionsstabilität, die bei Verdopplung der Fibrinogenkonzentration auf 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bei der HPA-1a-Isoform zu verzeichnen

war, konnte bei Verwendung von 100 µg/ml Fibronectin nur in einer wesentlich geringeren Ausprägung registriert werden ( $p < 0,05$ ).

Die Versuche zeigen, dass die HPA-1b-Isoform  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-transfektierter HEK293-Zellen einen Einfluss auf die Adhäsionsstabilität unter flussdynamischen Bedingungen hat. Die Resistenz gegenüber steigenden Scherraten wird durch den Liganden und seine Konzentration moduliert. Das Adhäsionsverhalten der HPA-1b-Isoform des thrombozytären  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrins ist ein Beleg für ihren prothrombotischen Phänotyp.

## 8 Literaturverzeichnis

- Andrieux, A.; Hudry-Clergeon, G.; Ryckewaert, J. J.; Chapel, A.; Ginsberg, M. H.; Plow, E. F.; Marguerie, G. (1989): Amino acid sequences in fibrinogen mediating its interaction with its platelet receptor, GPIIb/IIIa. In: *J. Biol. Chem.* 264 (16), S. 9258–9265.
- Arnaout, M. A.; Mahalingam, B.; Xiong, J-P (2005): Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, S. 381–410. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.cellbio.21.090704.151217.
- Asakura, S.; Niwa, K.; Tomozawa, T.; Jin, Y. M.; Madoiwa, S.; Sakata, Y. et al. (1997): Fibroblasts spread on immobilized fibrin monomer by mobilizing a beta1-class integrin, together with a vitronectin receptor alpha v beta 3 on their surface. In: *J. Biol. Chem.* 272 (13), S. 8824–8829.
- Bacabac, R. G.; Smit, T. H.; Cowin, S. C.; van Loon, J. J. W. A.; Nieuwstadt, F. T. M.; Heethaar, R.; Klein-Nulend, J. (2005): Dynamic shear stress in parallel-plate flow chambers. In: *J Biomech* 38 (1), S. 159–167. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jbiomech.2004.03.020.
- Bennett, J. S. (2001): Platelet-fibrinogen interactions. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, S. 340–354.
- Bennett, J. S.; Vilaire, G. (1979): Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. In: *J. Clin. Invest.* 64 (5), S. 1393–1401.
- Bennett, J. S. (1985): The Platelet—Fibrinogen Interaction. In: *Platelet Membrane Glycoproteins*, S. 193–214.
- Bergmeier, W.; Piffath, C. L.; Goerge, T.; Cifuni, S. M.; Ruggeri, Z. M.; Ware, J.; Wagner, D. D. (2006): The role of platelet adhesion receptor GPIIalpha far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (45), S. 16900–16905.
- Blombäck, B.; Blombäck, M. (1972): The molecular structure of fibrinogen. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 202, S. 77–97.
- Bombeli, T. (1998): Adhesion of Activated Platelets to Endothelial Cells: Evidence for a GPIIb/IIIa-dependent Bridging Mechanism and Novel Roles for Endothelial Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), alpha v beta 3 Integrin, and GPIIalpha. In: *Journal of Experimental Medicine* 187 (3), S. 329–339.
- Boon, G. D. (1993): An overview of hemostasis. In: *Toxicol Pathol* 21 (2), S. 170–179.
- Born, G. V. (1962): Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. In: *Nature* 194, S. 927–929.
- Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (2013): *Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK – Langfassung*, 2. Auflage, Version 1, S. 48.
- Cadroy, Y.; Sakariassen, K.; Grandjean, H.; Thalamas, C.; Boneu, B.; Sié, P. (2001): The effect of platelet PIA polymorphism on experimental thrombus

- formation in man depends on blood flow and thrombogenic substrate. In: *Thromb. Haemost.* 85 (6), S. 1097–1103.
- Caen, J. P.; Castaldi, P. A.; Leclerc, J. C.; Inceman, S.; Larrieu, M. J.; Probst, M.; Bernard, Jean (1966): Congenital bleeding disorders with long bleeding time and normal platelet count: I. Glanzmann's thrombasthenia (report of fifteen patients). In: *The American Journal of Medicine* 41 (1), S. 4–26. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002934366900039>.
- Calvete, J. J. (1994): Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. In: *Thromb. Haemost.* 72 (1), S. 1–15.
- Calvete, J. J. (1995): On the structure and function of platelet integrin alpha IIb beta 3, the fibrinogen receptor. In: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208 (4), S. 346–360.
- Cambria-Kiely, J. A.; Gandhi, P. J. (2002): Aspirin Resistance and Genetic Polymorphisms. In: *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 14 (1), S. 51–58.
- Campbell, I. D.; Humphries, M. J. (2011): Integrin structure, activation, and interactions. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 (3). Online verfügbar unter doi:10.1101/cshperspect.a004994.
- Cheresh, D. A. (1987): Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (18), S. 6471–6475.
- Clark, R. A. F. (2001): Fibrin and Wound Healing. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 936 (1), S. 355–367.
- Clemetson, K. J. (2012): Platelets and Primary Haemostasis. In: *XI etro advanced teaching course "Thrombosis: a multidisciplinary approach" September 18-23, 2011, Campobasso, Italy* 129 (3), S. 220–224. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049384811006323>.
- Cluzel, C.; Saltel, F.; Lussi, J.; Paulhe, F.; Imhof, B. A.; Wehrle-Haller, B. (2005): The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells. In: *J. Cell Biol.* 171 (2), S. 383–392. Online verfügbar unter doi:10.1083/jcb.200503017.
- Doolittle, R. F., 2003. Structural basis of the fibrinogen-fibrin transformation: contributions from X-ray crystallography. *Blood reviews*, 17(1), 33–41
- Duperray, A.; Berthier, R.; Chagnon, E.; Ryckewaert, J. J.; Ginsberg, M.; Plow, E.; Marguerie, G. (1987): Biosynthesis and processing of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes. In: *J. Cell Biol.* 104 (6), S. 1665–1673.
- Du, X. P.; Plow, E. F.; Frelinger, A. L.; O'Toole, T. E.; Loftus, J. C.; Ginsberg, M. H. (1991): Ligands "activate" integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa). In: *Cell* 65 (3), S. 409–416.
- El-Khattouti, A. (2010): Allosterie der HPA-1a Varianten des thrombozytären Integrins  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . *Dissertation am Institut für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.

- Felding-Habermann, B.; Ruggeri, Z. M.; Cheresh, D. A. (1992): Distinct biological consequences of integrin alpha v beta 3-mediated melanoma cell adhesion to fibrinogen and its plasmic fragments. In: *J. Biol. Chem.* 267 (8), S. 5070–5077.
- Feng, D.; Lindpaintner, K.; Larson, M. G.; Rao, V. S.; O'Donnell, C. J.; Lipinska, I. et al. (1999): Increased Platelet Aggregability Associated With Platelet GPIIIa PIA2 Polymorphism. The Framingham Offspring Study. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19 (4), S. 1142–1147.
- French-Constant, C. (1995): Alternative splicing of fibronectin--many different proteins but few different functions. In: *Exp. Cell Res.* 221 (2), S. 261–271.
- Fitzgerald, L. A.; Poncz, M.; Steiner, B.; Rall, S. C.; Bennett, J. S.; Phillips, D. R. (1987): Comparison of cDNA-derived protein sequences of the human fibronectin and vitronectin receptor alpha-subunits and platelet glycoprotein IIb. In: *Biochemistry* 26 (25), S. 8158–8165.
- Friedlander, M.; Theesfeld, C. L.; Sugita, M.; Fruttiger, M.; Thomas, M. A.; Chang, S.; Cheresh, D. A. (1996): Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (18), S. 9764–9769.
- Furihata, K.; Nugent, D. J.; Bissonette, A.; Aster, R. H.; Kunicki, T. J. (1987): On the association of the platelet-specific alloantigen, Pen<sup>a</sup>, with glycoprotein IIIa. Evidence for heterogeneity of glycoprotein IIIa. In: *J. Clin. Invest.* 80 (6), S. 1624–1630.
- Gailit, J.; Clarke, C.; Newman, D.; Tonnesen, M. G.; Mosesson, M. W.; Clark, R. A. (1997): Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through integrin alpha(v)beta3. In: *Exp. Cell Res.* 232 (1), S. 118–126.
- Gardner, J. M.; Hynes, R. O. (1985): Interaction of fibronectin with its receptor on platelets. In: *Cell* 42 (2), S. 439–448.
- Glanzmann, W.E. (1918): Hereditäre hämorrhägische Thrombasthenie. Ein Beitrag zur Pathologie der Blutplättchen. In: *Jahrbuch für Kinderheilkunde* 88: 113-141.
- Grinnell, F.; Billingham, R. E.; Burgess, L. (1981): Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. In: *J. Invest. Dermatol.* 76 (3), S. 181–189.
- Hagen, I.; Nurden, A.; Bjerrum, O. J.; Solum, N. O.; Caen, J. (1980): Immunochemical evidence for protein abnormalities in platelets from patients with Glanzmann's thrombasthenia and Bernard-Soulier syndrome. In: *J. Clin. Invest.* 65 (3), S. 722–731.
- Hantgan, R. R.; Hindriks, G.; Taylor, R. G.; Sixma, J. J.; Groot, P. G. de (1990): Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. In: *Blood* 76 (2), S. 345–353.
- Hato, T.; Pampori, N.; Shattil, S. J. (1998): Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin alphaIIb beta3. In: *J. Cell Biol.* 141 (7), S. 1685–1695.
- Herrmann, S. M.; Poirier, O.; Marques-Vidal, P.; Evans, A.; Arveiler, D.; Luc, G. et al. (1997): The Leu33/Pro polymorphism (PIA1/PIA2) of the glycoprotein IIIa

- (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. Etude Cas-Temoins de l'Infarctus du Myocarde. In: *Thromb. Haemost.* 77 (6), S. 1179–1181.
- Hooper, W. C.; Lally, C.; Austin, H.; Benson, J.; Dilley, A.; Wenger, N. K. et al. (1999): The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans. In: *Chest* 116 (4), S. 880–886.
- Huber, W.; Hurst, J.; Schlatter, D.; Barner, R.; Hübscher, J.; Kouns, W. C.; Steiner, B. (1995): Determination of kinetic constants for the interaction between the platelet glycoprotein IIb-IIIa and fibrinogen by means of surface plasmon resonance. In: *Eur. J. Biochem.* 227 (3), S. 647–656.
- Humphries, J. D.; Byron, A.; Humphries, M. J. (2006): Integrin ligands at a glance. In: *J. Cell. Sci.* 119 (Pt 19), S. 3901–3903. Online verfügbar unter doi:10.1242/jcs.03098.
- Hynes, R. O. (2002): Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. In: *Cell* 110 (6), S. 673–687.
- Iwamoto, S.; Nishiumi, E.; Kajii, E.; Ikemoto, S. (1994): An exon 28 mutation resulting in alternative splicing of the glycoprotein IIb transcript and Glanzmann's thrombasthenia. In: *Blood* 83 (4), S. 1017–1023.
- Jenkins, A. L.; Nannizzi-Alaimo, L.; Silver, D.; Sellers, J. R.; Ginsberg, M. H.; Law, D. A.; Phillips, D. R. (1998): Tyrosine phosphorylation of the beta3 cytoplasmic domain mediates integrin-cytoskeletal interactions. In: *J. Biol. Chem.* 273 (22), S. 13878–13885.
- Jennings, L. K.; Phillips, D. R. (1982): Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex. In: *J. Biol. Chem.* 257 (17), S. 10458–10466.
- Kannel, W. B. et al., 1979. An investigation of coronary heart disease in families. The Framingham offspring study. *American journal of epidemiology*, 110(3), 281–290
- Kant, J. A.; Fornace, A. J.; Saxe, D.; Simon, M. I.; McBride, O. W.; Crabtree, G. R. (1985): Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (8), S. 2344–2348.
- Kim, M.; Carman, C. V.; Springer, T. A. (2003): Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. In: *Science* 301 (5640), S. 1720–1725. Online verfügbar unter doi:10.1126/science.1084174.
- Kim, J.; Somorjai, G. A. (2003): Molecular packing of lysozyme, fibrinogen, and bovine serum albumin on hydrophilic and hydrophobic surfaces studied by infrared-visible sum frequency generation and fluorescence microscopy. In: *J. Am. Chem. Soc.* 125 (10), S. 3150–3158. Online verfügbar unter doi:10.1021/ja028987n.
- Kirchhofer, D.; Gailit, J.; Ruoslahti, E.; Grzesiak, J.; Pierschbacher, M. D. (1990): Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor GPIIb/IIIa. In: *J. Biol. Chem.* 265 (30), S. 18525–18530.

- Kloczewiak, M.; Timmons, S.; Lukas, T. J.; Hawiger, J. (1984): Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain. In: *Biochemistry* 23 (8), S. 1767–1774.
- Kornblihtt, A. R.; Gutman, A. (1988): Molecular biology of the extracellular matrix proteins. In: *Biol Rev Camb Philos Soc* 63 (4), S. 465–507.
- Kornblihtt, A. R.; Pesce, C. G.; Alonso, C. R.; Cramer, P.; Srebrow, A.; Werbajh, S.; Muro, A. F. (1996): The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. In: *FASEB J.* 10 (2), S. 248–257.
- Kucharska-Newton, A. M.; Monda, K. L.; Campbell, S.; Bradshaw, P. T.; Wagenknecht, L. E.; Boerwinkle, E. et al. (2011): Association of the platelet GPIIb/IIIa polymorphism with atherosclerotic plaque morphology: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. In: *Atherosclerosis* 216 (1), S. 151–156.
- Kunicki, T. J. (1989): Platelet membrane glycoproteins and their function: an overview. In *Blood* 59 (1), S. 30–34.
- Kunicki, T. J.; Newman, P. J. (1992): The molecular immunology of human platelet proteins. In: *Blood* 80 (6), S. 1386–1404.
- Kunicki, T. J. et al., 2011. Mean Platelet Volume and Integrin Alleles Correlate With Levels of Integrins IIb 3 and 2 1 in Acute Coronary Syndrome Patients and Normal Subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(1), 147–152
- Kunstreich, M. (2014): Charakterisierung der Adhäsionsstabilität  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-exprimierender HEK293-Zellen an immobilisierte Adhäsivproteine (Fibrinogen und von-Willebrand-Faktor). *Dissertation am Institut für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.*
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685
- Lam, S. C.; Plow, E. F.; Smith, M. A.; Andrieux, A.; Ryckwaert, J. J.; Marguerie, G.; Ginsberg, M. H. (1987): Evidence that arginyl-glycyl-aspartate peptides and fibrinogen gamma chain peptides share a common binding site on platelets. In: *J. Biol. Chem.* 262 (3), S. 947–950.
- Lamb, H., 1993. *Hydrodynamics*. 6th ed. Cambridge, New York: Cambridge University Press. (Cambridge mathematical library)
- Larsson, J.; Hillarp, A. (1999): The prothrombin gene G20210A mutation and the platelet glycoprotein IIIa polymorphism PIA2 in patients with central retinal vein occlusion. In: *Thromb. Res.* 96 (4), S. 323–327.
- Laurens, N.; Koolwijk, P.; Maat, M. P. M. de (2006): Fibrin structure and wound healing. In: *J. Thromb. Haemost.* 4 (5), S. 932–939.
- Lau, T. L.; Kim, C.; Ginsberg, M. H.; Ulmer, T. S. (2009): The structure of the integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. In: *EMBO J.* 28 (9), S. 1351–1361. Online verfügbar unter doi:10.1038/emboj.2009.63.

- Leahy, D. J.; Aukhil, I.; Erickson, H. P. (1996): 2.0 Å crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region. In: *Cell* 84 (1), S. 155–164.
- Li, R.; Babu, C. R.; Lear, J. D.; Wand, A. J.; Bennett, J. S.; DeGrado, W. F. (2001): Oligomerization of the integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: roles of the transmembrane and cytoplasmic domains. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (22), S. 12462–12467.
- Liu, Y. K.; Nemoto, A.; Feng, Y.; Uemura, T. (1997): The binding ability to matrix proteins and the inhibitory effects on cell adhesion of synthetic peptides derived from a conserved sequence of integrins. In: *J. Biochem.* 121 (5), S. 961–968.
- Loftus, J. C.; Plow, E. F.; Frelinger, A. L.; D'Souza, S. E.; Dixon, D.; Lacy, J. et al. (1987): Molecular cloning and chemical synthesis of a region of platelet glycoprotein IIb involved in adhesive function. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (20), S. 7114–7118.
- Loncar, R.; Stoldt, V.; Hellmig, S.; Zotz, R. B.; Mihalj, M.; Scharf, R. E. (2007): HPA-1 polymorphism of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 modulates platelet adhesion onto immobilized fibrinogen in an in-vitro flow system. In: *Thromb J* 5, S. 2. Online verfügbar unter doi:10.1186/1477-9560-5-2.
- Lord, S. T. (2007): Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis. In: *Curr. Opin. Hematol.* 14 (3), S. 236–241.
- Marguerie, G. A.; Plow, E. F.; Edgington, T. S. (1979): Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. In: *J. Biol. Chem.* 254 (12), S. 5357–5363.
- Maurer, L. M.; Tomasini-Johansson, B. R.; Mosher, D. F. (2010): Emerging roles of fibronectin in thrombosis. In: *Thrombosis Research* 125 (4), S. 287–291.
- Ma, Y. Q.; Qin, J.; Plow, E. F. (2007): Platelet integrin  $\alpha$ (IIb) $\beta$ (3): activation mechanisms. In: *J. Thromb. Haemost.* 5 (7), S. 1345–1352.
- Monaco, J. L.; Lawrence, W. T. (2003): Acute wound healing an overview. In: *Clin Plast Surg* 30 (1), S. 1–12.
- Mosesson, M. W. (2005): Fibrinogen and fibrin structure and functions. In: *J. Thromb. Haemost.* 3 (8), S. 1894–1904.
- Mosesson, M. W.; Chen, A. B.; Huseby, R. M. (1975): The cold-insoluble globulin of human plasma: studies of its essential structural features. In: *Biochim. Biophys. Acta* 386 (2), S. 509–524.
- Mosesson, M. W.; Siebenlist, K. R.; Meh, D. A. (2001): The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, S. 11–30.
- Mosher, D. F. (1975): Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor. In: *J. Biol. Chem.* 250 (16), S. 6614–6621.
- Moskowitz, K. A.; Kudryk, B.; Coller, B. S. (1998): Fibrinogen coating density affects the conformation of immobilized fibrinogen: implications for platelet adhesion and spreading. In: *Thromb. Haemost.* 79 (4), S. 824–831.

- Muro, A. F.; Chauhan, A. K.; Gajovic, S.; Iaconig, A.; Porro, F.; Stanta, G.; Baralle, F. E. (2003): Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. In: *J. Cell Biol.* 162 (1), S. 149–160.
- Mustard, J. F.; Packham, M. A.; Kinlough-Rathbone, R. L.; Perry, D. W.; Regoeczi, E. (1978): Fibrinogen and ADP-induced platelet aggregation. In: *Blood* 52 (2), S. 453–466.
- Newman, P. J.; Derbes, R. S.; Aster, R. H. (1989): The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. In: *J. Clin. Invest.* 83 (5), S. 1778–1781. Online verfügbar unter doi:10.1172/JCI114082.
- Nieswandt, B.; Watson, S. P. (2003): Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? In: *Blood* 102 (2), S. 449–461.
- Ni, H.; Denis, C. V.; Subbarao, S.; Degen, J. L.; Sato, T. N.; Hynes, R. O.; Wagner, D. D. (2000): Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. In: *J. Clin. Invest.* 106 (3), S. 385–392. Online verfügbar unter doi:10.1172/JCI9896.
- Ni, H.; Yuen, P. S. T.; Papalia, J. M.; Trevithick, J. E.; Sakai, T.; Fässler, R. et al. (2003): Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (5), S. 2415–2419. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.2628067100.
- Nurden, A. T.; Caen, J. P. (1974): An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann's thrombasthenia. In: *Br. J. Haematol.* 28 (2), S. 253–260.
- Nurden, A. T.; Caen, J. P. (1979): The different glycoprotein abnormalities in thrombasthenic and Bernard-Soulier platelets. In: *Semin. Hematol.* 16 (3), S. 234–250.
- O'Toole, T. E.; Loftus, J. C.; Plow, E. F.; Glass, A. A.; Harper, J. R.; Ginsberg, M. H. (1989): Efficient surface expression of platelet GPIIb-IIIa requires both subunits. In: *Blood* 74 (1), S. 14–18.
- Pankov, R.; Yamada, K. M. (2002): Fibronectin at a glance. In: *J. Cell. Sci.* 115 (Pt 20), S. 3861–3863.
- Papp, E.; Havasi, V.; Bene, J.; Komlosi, K.; Talian, G.; Feher, G. et al. (2007): Does Glycoprotein IIIa Gene (PIA) Polymorphism Influence Clopidogrel Resistance? In: *Drugs & Aging* 24 (4), S. 345–350.
- Phillips, D. R.; Agin, P. P. (1977): Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins. In: *J. Clin. Invest.* 60 (3), S. 535–545.
- Phillips, D. R.; Nannizzi-Alaimo, L.; Prasad, K. S. (2001): Beta3 tyrosine phosphorylation in alphaIIb beta3 (platelet membrane GP IIb-IIIa) outside-in integrin signaling. In: *Thromb. Haemost.* 86 (1), S. 246–258.
- Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. (1984): Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. In: *Nature* 309 (5963), S. 30–33.

- Plow, E. F.; Haas, T. A.; Zhang, L.; Loftus, J.; Smith, J. W. (2000): Ligand binding to integrins. In: *J. Biol. Chem.* 275 (29), S. 21785–21788. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.R000003200.
- Plow, E. F.; Srouji, A. H.; Meyer, D.; Marguerie, G.; Ginsberg, M. H. (1984): Evidence that three adhesive proteins interact with a common recognition site on activated platelets. In: *J. Biol. Chem.* 259 (9), S. 5388–5391.
- Poncz, M.; Eisman, R.; Heidenreich, R.; Silver, S. M.; Vilaire, G.; Surrey, S. et al. (1987): Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors. In: *J. Biol. Chem.* 262 (18), S. 8476–8482.
- Puklin-Faucher, E.; Gao, M.; Schulten, K.; Vogel, V. (2006): How the headpiece hinge angle is opened: New insights into the dynamics of integrin activation. In: *J. Cell Biol.* 175 (2), S. 349–360.
- Renner, W.; Winkler, M.; Hoffmann, C.; Köppel, H.; Seinost, G.; Brodmann, M.; Pilger, E. (2001): The PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa is not associated with deep venous thrombosis. In: *Int Angiol* 20 (2), S. 148–151.
- Ridker, P. M.; Hennekens, C. H.; Schmitz, C.; Stampfer, M. J.; Lindpaintner, K. (1997): PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. In: *Lancet* 349 (9049), S. 385–388. Online verfügbar unter doi:10.1016/S0140-6736(97)80010-4.
- Ridley, A. J.; Schwartz, M. A.; Burridge, K.; Firtel, R. A.; Ginsberg, M. H.; Borisy, G. et al. (2003): Cell migration: integrating signals from front to back. In: *Science* 302 (5651), S. 1704–1709.
- Ross, R. S.; Borg, T. K. (2001): Integrins and the Myocardium. In: *Circulation Research* 88 (11), S. 1112–1119.
- Ruoslahti, E. (1996): RGD and other recognition sequences for integrins. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, S. 697–715.
- Ruoslahti, E.; Pierschbacher, M. D. (1987): New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. In: *Science* 238 (4826), S. 491–497.
- Ruoslahti, E.; Vaheri, A. (1974): Novel human serum protein from fibroblast plasma membrane. In: *Nature* 248 (5451), S. 789–791.
- Sajid, M. (2002): PIA Polymorphism of Integrin beta3 Differentially Modulates Cellular Migration on Extracellular Matrix Proteins. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (12), S. 1984–1989.
- Sakai, T.; Johnson, K. J.; Murozono, M.; Sakai, K.; Magnuson, M. A.; Wieloch, T. et al. (2001): Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. In: *Nat Med* 7 (3), S. 324–330. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/85471>.
- Salim, M.; O'Sullivan, B.; McArthur, S. L.; Wright, P. C. (2007): Characterization of fibrinogen adsorption onto glass microcapillary surfaces by ELISA. In: *Lab Chip* 7 (1), S. 64–70. Online verfügbar unter doi:10.1039/b612521m.

- Santoro, S. A.; Lawing, W. J. (1987): Competition for related but nonidentical binding sites on the glycoprotein IIb-IIIa complex by peptides derived from platelet adhesive proteins. In: *Cell* 48 (5), S. 867–873.
- Scharf, R. E.; Stoldt, V. (2008): Modulation der Plättchenthrombogenität durch genetisch determinierte Varianten thrombozytärer Integrine. In: *Antragsband SFB 612 Teilprojekt B2*, S. 231.
- Schlesinger, S.C.; (2013): Auswirkungen des HPA-1-Polymorphismus des Integrins  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  auf die Thrombozytenadhäsion unter flusss dynamischen Bedingungen. *Dissertation am Institut für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Sechler, J. L.; Corbett, S. A.; Schwarzbauer, J. E. (1997): Modulatory roles for integrin activation and the synergy site of fibronectin during matrix assembly. In: *Mol. Biol. Cell* 8 (12), S. 2563–2573.
- Shattil, S. J.; Kashiwagi, H.; Pampori, N. (1998): Integrin signaling: the platelet paradigm. In: *Blood* 91 (8), S. 2645–2657.
- Shattil, S. J. (2005): Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signaling. In: *Trends Cell Biol* 15 (8), S. 399–403.
- Shattil, S. J.; Kim, C.; Ginsberg, M. H. (2010): The final steps of integrin activation: the end game. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (4), S. 288–300.
- Shattil, S. J.; Newman, P. J. (2004): Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. In: *Blood* 104 (6), S. 1606–1615. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2004-04-1257.
- Snopok, B. A.; Kostyukevych, K.V.; Rengevych, O.V.; Shirshov, Y.M.; Venger, E. F.; (1998): A biosensor approach to probe the structure and function of the adsorbed proteins: fibrinogen at the gold surface. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics* 1, S. 121–134.
- Sosnoski, D. M.; Emanuel, B. S.; Hawkins, A. L.; van Tuinen, P.; Ledbetter, D. H.; Nussbaum, R. L. et al. (1988): Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors alpha subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa. In: *J. Clin. Invest.* 81 (6), S. 1993–1998.
- Sperr, W. R.; Huber, K.; Roden, M.; Janisiw, M.; Lang, T.; Graf, S. et al. (1998): Inherited platelet glycoprotein polymorphisms and a risk for coronary heart disease in young central Europeans. In: *Thromb. Res.* 90 (3), S. 117–123.
- Suehiro, K.; Gailit, J.; Plow, E. F. (1997): Fibrinogen is a ligand for integrin  $\alpha\text{5}\beta\text{1}$  on endothelial cells. In: *J. Biol. Chem.* 272 (8), S. 5360–5366.
- Szczeklik, A.; Undas, A.; Sanak, M.; Frolow, M.; Wegrzyn, W. (2000): Relationship between bleeding time, aspirin and the PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa. In: *Br J Haematol* 110 (4), S. 965–967.
- Takada, Y.; Ye, X.; Simon, S. (2007): The integrins. In: *Genome Biol* 8 (5), S. 215.
- Takagi, J.; Petre, B. M.; Walz, T.; Springer, T. A. (2002): Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. In: *Cell* 110 (5), S. 599–11.

- Tennent, G. A. et al., 2007. Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *Blood*, 109(5), 1971–1974
- Topol, E. J.; Byzova, T. V.; Plow, E. F. (1999): Platelet GPIIb-IIIa blockers. In: *Lancet* 353 (9148), S. 227–231.
- Tzima, E.; del Pozo, M. A.; Shattil, S. J.; Chien, S.; Schwartz, M. A. (2001): Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. In: *EMBO J.* 20 (17), S. 4639–4647. Online verfügbar unter doi:10.1093/emboj/20.17.4639.
- Undas, A.; Zabczyk, M.; Iwaniec, T. (2011); Dysfibrinogenemia: from bleeding tendency to thromboembolic disorders. *Boletim da SPM* 26: S. 5-17
- Vaheri, A. (1980): Fibronectin (cold-insoluble globulin): role in defence. In: *Schweiz Med Wochenschr* 110 (40), S. 1437–1440.
- Varga-Szabo, D.; Pleines, I.; Nieswandt, B. (2008): Cell adhesion mechanisms in platelets. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (3), S. 403–412.
- Vijayan, K. V.; Goldschmidt-Clermont, P. J.; Roos, C.; Bray, P. F. (2000): The PI(A2) polymorphism of integrin beta(3) enhances outside-in signaling and adhesive functions. In: *J. Clin. Invest.* 105 (6), S. 793–802. Online verfügbar unter doi:10.1172/JCI6982.
- Vijayan, K. Vinod; Bray, Paul F. (2006): Molecular mechanisms of prothrombotic risk due to genetic variations in platelet genes: Enhanced outside-in signaling through the Pro33 variant of integrin beta3. In: *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 231 (5), S. 505–513.
- Vijayan, K. Vinod; Huang, Trevor C.; Liu, Yan; Bernardo, Aubrey; Dong, Jing Fei; Goldschmidt-Clermont, Pascal J. et al. (2003): Shear stress augments the enhanced adhesive phenotype of cells expressing the Pro33 isoform of integrin beta3. In: *FEBS Lett.* 540 (1-3), S. 41–46.
- Wagner, C. L.; Mascelli, M. A.; Neblock, D. S.; Weisman, H. F.; Collier, B. S.; Jordan, R. E. (1996): Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. In: *Blood* 88 (3), S. 907–914.
- Watson, S. P.; Auger, J. M.; McCarty, O. J. T.; Pearce, A. C. (2005): GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. In: *J. Thromb. Haemost.* 3 (8), S. 1752–1762.
- Wegener, K. L.; Campbell, I. D. (2008): Transmembrane and cytoplasmic domains in integrin activation and protein-protein interactions (review). In: *Mol. Membr. Biol.* 25 (5), S. 376–387.
- Weisel, J. W. (2005): Fibrinogen and fibrin. In: *Adv. Protein Chem.* 70, S. 247–299.
- Weiss, E. J.; Bray, P. F.; Tayback, M.; Schulman, S. P.; Kickler, T. S.; Becker, L. C. et al. (1996): A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. In: *N. Engl. J. Med.* 334 (17), S. 1090–1094. Online verfügbar unter doi:10.1056/NEJM199604253341703.
- Weiss, E. J.; Goldschmidt-Clermont, P. J.; Grigoryev, D.; Jin, Y.; Kickler, T. S.; Bray, P. F. (1995): A monoclonal antibody (SZ21) specific for platelet GPIIIa distinguishes P1A1 from P1A2. In: *Tissue Antigens* 46 (5), S. 374–381.

- Wencel-Drake, J. D.; Plow, E. F.; Kunicki, T. J.; Woods, V. L.; Keller, D. M.; Ginsberg, M. H. (1986): Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. In: *Am. J. Pathol.* 124 (2), S. 324–334.
- Wilder, R. L. (2002): Integrin alpha V beta 3 as a target for treatment of rheumatoid arthritis and related rheumatic diseases. In: *Ann. Rheum. Dis.* 61 Suppl 2, S. ii96-9.
- Woods, V. L.; Wolff, L. E.; Keller, D. M. (1986): Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. In: *J. Biol. Chem.* 261 (32), S. 15242–15251.
- Wu, B. L.; Milunsky, A.; Wyandt, H.; Hoth, C.; Baldwin, C.; Skare, J. (1993): In situ hybridization applied to Waardenburg syndrome. In: *Cytogenet. Cell Genet.* 63 (1), S. 29–32.
- Xiao, T.; Takagi, J.; Collier, B. S.; Wang, J. H.; Springer, T. A. (2004): Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. In: *Nature* 432 (7013), S. 59–67. Online verfügbar unter doi:10.1038/nature02976.
- Yee, D. L.; Bray, P. F. (2004): Clinical and functional consequences of platelet membrane glycoprotein polymorphisms. In: *Semin. Thromb. Hemost.* 30 (5), S. 591–600. Online verfügbar unter doi:10.1055/s-2004-835679.
- Zhang, J. Z.; Redman, C. M. (1996): Assembly and secretion of fibrinogen. Involvement of amino-terminal domains in dimer formation. In: *J. Biol. Chem.* 271 (21), S. 12674–12680.
- Zhu, J.; Luo, B. H.; Xiao, T.; Zhang, C.; Nishida, N.; Springer, T. A. (2008): Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. In: *Mol. Cell* 32 (6), S. 849–861. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.molcel.2008.11.018.
- Zotz, R. B.; Winkelmann, B. R.; Müller, C.; Boehm, B. O.; März, W.; Scharf, R. E. (2005): Association of polymorphisms of platelet membrane integrins alpha IIb(beta)3 (HPA-1b/PI) and alpha2(beta)1 (alpha807TT) with premature myocardial infarction. In: *J. Thromb. Haemost.* 3 (7), S. 1522–1529. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01432.

## 9. Anhang

Verwendetes Makro zur Datenanalyse für ImageJ 1.39h (siehe 3.2.9):

```
open("[directory]0000.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("[directory]0004.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0000.png","0004.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0000.png operation=AND image2=0004.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("[directory]0005.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("[directory]0009.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0005.png","0009.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0005.png operation=AND image2=0009.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("[directory]0010.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("[directory]0014.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
```

```

run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0010.png", "0014.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0010.png operation=AND image2=0014.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("[directory]0015.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("[directory]0019.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0015.png", "0019.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0015.png operation=AND image2=0019.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("[directory]0020.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("[directory]0024.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0020.png", "0024.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0020.png operation=AND image2=0024.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("[directory]0025.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("[directory]0029.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");

```

```
imageCalculator("AND create", "0025.png", "0029.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0025.png operation=AND image2=0029.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("[directory]0030.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("[directory]0034.png");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0030.png", "0034.png");
//run("Image Calculator...", "image1=0030.png operation=AND image2=0034.png create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
```

# Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung als Doktorvater danken.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke, der die Erstbegutachtung dieser Dissertation übernahm.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. Volker Stoldt, der mir als Betreuer im Labor zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mit seiner Begutachtung weiterhalf.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Abdelouid El-Khattouti meinen Dank aussprechen. Die unzähligen Stunden der Zusammenarbeit bereicherten mein Wissen der Thematik ungemein und seine Freundschaft möchte ich nicht missen.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, die mir die medizinische Ausbildung erst ermöglichten und mich während dieser Zeit und darüber hinaus stets unterstützten.

## Eidesstattliche Versicherung

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

10.07.2017, Benjamin Chahem