

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

**Der Effekt von löslichem CD40L auf die Thrombogenese in vitro unter
Berücksichtigung des HPA-1-Polymorphismus
(HPA-1a/1a und HPA-1b/1b) von $\alpha_{IIb}\beta_3$**

Dissertation

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

vorgelegt von
Eva-Maria Reiff
2017

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

gez. :

Dekan/in: Prof.Dr. Nikolaj Klöcker

Betreuer/in: Prof. Dr. Rüdiger E. Scharf

Gutachter/innen: Prof. Dr. Ulrich. Decking
Prof. Dr. Thomas Hohlfeld

*La médecine c'est guérir parfois,
soulager souvent,
consoler toujours”*

(Ambroise Paré, 1510-1590)

Zusammenfassung

Lösliches CD40L ist ein Transmembranprotein der TNF-Familie. Bei Patienten mit thrombotischem Ereignis sind erhöhte sCD40L-Konzentrationen im Blut nachweisbar. Neben seiner immunologischen Funktion als Zytokin wurde *in vitro* eine thrombusstabilisierende Wirkung durch Bindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ nachgewiesen. sCD40L bindet über eine spezifische Bindungssequenz an die β_3 -Untereinheit des Integrins, wodurch ein Outside-in-Signaling induziert wird.

Durch einen Aminosäureaustausch an Position 33 weist $\alpha_{IIb}\beta_3$ einen HPA-1-Polymorphismus auf. Bei Trägern des homozygoten HPA-1b-Allels befindet sich hier Prolin, beim homozygoten HPA-1a-Isotyp hingegen Leucin. Für die homozygote HPA-1b-Variante von $\alpha_{IIb}\beta_3$ wurden prothrombotische Eigenschaften nachgewiesen.

Ziel unserer Untersuchungen war zu klären, ob sCD40L im Vollblut unter simulierten arteriellen Strömungsbedingungen einen thrombusstabilisierenden Effekt hat und ob dieser konzentrationsabhängig ist. Dieses Phänomen wurde vor allem in Abhängigkeit vom HPA-1-Polymorphismus des $\alpha_{IIb}\beta_3$ untersucht.

Citrat-antikoaguliertes Vollblut von Probanden wurde mittels einer Perfusorpumpe, die eine initiale Scherrate von 1000 sec^{-1} herstellte, durch eine rechteckige Strömungskammer aspiriert. Die Blutplättchen wurden vorher mittels Mepacrin fluoreszenzmarkiert. Als thrombogene Oberfläche wurde Kollagen Typ 1 auf den Kammerboden appliziert, rekombinantes sCD40L wurde dem Vollblut unmittelbar vor Versuchsbeginn zugesetzt. Die Strömungskammer wurde an ein konfokales Lasermikroskop montiert. Während des Versuchs wurden alle 25 sec Bildstapel aus jeweils 30 Schnittbildern akquiriert, die mit einer speziellen Software (ECCET) ausgewertet wurden. Thrombusvolumen, Thrombushöhe, Thrombusgrundfläche und Thrombenzahl wurden gemessen und als 4-dimensionale Darstellung des Thrombuswachstums über die Zeit ausgewertet. Zur Kontrolle weiterer Einflussfaktoren wurde das Spenderblut mittels ELISA und FACS-Analyse bez. der Konzentration weiterer Agenzien untersucht (u.a. CD40L-Konzentration in Plasma und Serum, $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptoräquivalente, Thrombozytenkonzentration im Vollblut).

Zunächst erfolgten Versuche mit Vollblut eines homozygoten HPA-1a-Probanden mit verschiedenen sCD40L-Konzentrationen zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve. Zum Vergleich der beiden homozygoten HPA1-Varianten wurden dann Versuche mit Blut homozygoter HPA-1a und HPA-1b-Probanden unter Zugabe der vorher ermittelten maximal wirksamen sCD40L-Konzentration durchgeführt. Als Kontrollexperiment diente der gleiche Versuchsaufbau unter Zugabe des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten Abciximab.

sCD40L führte konzentrationsabhängig zu einer Zunahme der Thrombushöhe und des Thrombusvolumens. Die Thrombusgrundfläche sowie die Thrombenzahl blieben unbeeinflusst von der Konzentration des hinzugefügten sCD40L. Der stärkste Effekt zeigte sich bei Zugabe von 5ng/ml sCD40L, hier bestanden statistisch signifikante Unterschiede im Thrombusvolumen und der Einzelthrombushöhe ($p < 0,05$ bzw. $p = 0,01$). Bei dem homozygoten HPA-1b-Isotyp-Kollektiv waren unter Zugabe von 5ng/ml sCD40L die Thromben statistisch signifikant höher und zeigten ein größeres Volumen als beim homozygoten HPA-1a-Kollektiv ($p < 0,01$).

Die Unterschiede in der maximalen Thrombushöhe und dem Thrombusvolumen unter hohen Scherraten sind Indikatoren für eine gesteigerte Thrombusstabilität.

Die primäre Interaktion zwischen Plättchen und thrombogener Oberfläche wurde nicht durch sCD40L beeinflusst, in der Thrombenzahl und der Thrombusgrundfläche zeigte sich kein signifikanter Unterschied unter Zugabe von sCD40L.

Der thrombusstabilisierende Effekt von sCD40L ist konzentrationsabhängig und maximal bei einer Konzentration von 5ng/ml. Dies entspricht den Konzentrationen, die im Blut von Patienten mit kardiovaskulären Ereignissen gemessen werden können. Diese Sättigungscharakteristik lässt sich möglicherweise durch das Besetzen aller Bindungsstellen und Trimerbildung von sCD40L erklären. Die Interaktion zwischen den Plättchen, die im Rahmen des Thrombuswachstums aneinander binden, ist der Angriffspunkt von sCD40L. Über den Einsatz von sCD40L als klinischer Marker bei ischämischen Ereignissen wird diskutiert, bisher ist eine Etablierung jedoch nicht gelungen.

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom (akuter Myokardinfarkt/ instabile Angina pectoris)
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
CD40L	Cluster of differentiation 40ligand
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent assay
EDTA	Ethylendiamintriacetat
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAK	Focal adhesion kinase
GPIIbIIIa	Glykoproteinkomplex IIbIIIa
HPA-1	Human-platelet-antigen (Nr. 1)
IL	Interleukin
LIBS	Liganden-induzierte Bindungsstellen
PPP	Platelet-poor-plasma
PTCA	perkutane Thrombokoronarintervention
Syk	Spleen tyrosine kinase
TRAP	Thrombin receptor activating peptide
TRALI	Transfusions-assoziiertes Lungenversagen (insufficiency)
vWF	Von Willebrand-Faktor
PNG	Portable network graphic (Dateiformat)
PRP	platelet rich plasma
PPP	platelet poor plasma
(.../sek)	Pro Sekunde

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 CD40L – Struktur und Vorkommen	1
1.2 CD40L – Funktion	1
1.2.1 Immunsystem	1
1.2.2 Pathophysiologische Bedeutung	2
1.2.3 Lösliches CD40L und kardiovaskuläres Risiko	2
1.2.4 sCD40L stabilisiert Thromben durch Bindung an das Integrin α_{IIb}	3
1.2.5 CD40L - Regulation der Freisetzung	3
1.3 Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa)	5
1.3.1 Rezeptor-Struktur	5
1.3.2 Aktivierungszustand und Ligandenaffinität	5
1.3.3 Der HPA-1-(PI ^A)-Polymorphismus des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins	6
2. Zielsetzung und Strategie	8
3. Material und Methoden	8
3.1 Verwendete Materialien	8
3.1.2 Konfokale Lasermikroskopie	9
3.1.3 Simulation arterieller Flussbedingungen – Versuchsaufbau	10
3.1.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	11
3.1.5 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	11
3.1.6 Verwendete Chemikalien und Stoffe	11
3.1.7 Abciximab (ReoPro)	12
3.1.8 Kollagen	12
3.1.9 Mepacrin als Fluoreszenzfarbstoff	12
3.1.10 Human CD40Ligand, TRAP-Analog	12
3.2 Probanden	13
3.3 Methodik	14
3.3.1 Strategie	14
3.3.1.1 Ermittlung der sCD40L-Konzentration mit der höchsten Wirksamkeit	14
3.3.1.2 Festlegung der Messparameter	14
3.3.1.3 Messung der sCD40L- und der TXB ₂ -Konzentration im Nativblut	14
3.3.1.4 Durchführung von Strömungsexperimenten mit venösem Vollblut verschiedener HPA-1-Varianten unter definierter sCD40L-Dosis	14
3.3.2 Durchführung	14
3.3.2.1 Blutentnahme und Probenvorbereitung	14
3.3.2.2 Präparation des Kollagentropfens	15
3.3.2.3 Reinigung und Vorbereitung der Strömungskammer	15
3.3.2.4 Laser-Scanning-Mikroskop: Einstellungen	16
3.3.2.5 Messung von fluoreszierenden Mikrosphären	17
3.3.2.6 Einstellen des Messpunktes	17
3.4 Durchführung des Versuches	17
3.5 Datenverarbeitung	18
3.6 Bestimmung der Messparameter Thrombusvolumen, -grundfläche, -höhe und -anzahl	18
3.7 Statistische Auswertung	19
4. Ergebnisse	19
4.1 Validität der verwendeten Messverfahren	19
4.1.1 Experimentelle Varianz der Strömungsexperimente	19
4.1.2 ELISA und FACS-Analyse	20
4.2 Darstellung der Ergebnisse	21
4.3 Intraindividuelle Varianz der Messmethode	21

4.3.1 Validierung der Messergebnisse	22
4.3.1.1 Gesamtthrombusvolumen	22
4.3.1.2 Einzelthrombusvolumen	23
4.3.1.3 Einzelthrombushöhe	24
4.3.1.4 Einzelthrombusgrundfläche	25
4.3.1.5 Einzelthrombenanzahl	26
4.4 Wirkung verschiedener sCD40L-Dosierungen auf das Thrombuswachstum	26
4.4.1 Spezifität der Wirkung von sCD40L auf die Thrombogenese durch Bindung an das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$	27
4.4.2 Versuche mit verschiedenen sCD40L-Konzentrationen in physiologischen Dosierungen	27
4.4.2.1 Gesamtthrombusvolumen	27
4.4.2.2 Mittleres Einzelthrombusvolumen	28
4.4.2.3 Mittlere Thrombenzahl	29
4.4.2.4 Mittlere Einzelthrombusgrundfläche	30
4.4.2.5 Mittlere Einzelthrombushöhe	31
4.4.3 Ergebnisse bei längerem Beobachtungszeitraum	32
4.5 Beeinflussung der Thrombogenese durch sCD40L bei homozygoten HPA-1a/1a- und HPA-1b/1b- Probanden	37
4.5.1 Kontrolle möglicher Einflussfaktoren	37
4.5.2 Mittlere Thrombenzahl	39
4.5.3 Mittlere Einzelthrombusgrundfläche	40
4.5.4 Mittleres Einzelthrombusvolumen	41
4.5.5 Mittlere Einzelthrombushöhe	42
5 Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion	43
5.1 Diskussion und Schlussfolgerungen	43
5.2 Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext und klinische Konsequenz	45
5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse und mögliche Weiterentwicklung	48
6 Literaturverzeichnis	51

1 Einleitung

Fast jeder Mensch in Deutschland hat eine Person in ihrem persönlichen Umfeld, die einmal im Leben einen Herzinfarkt erleidet. Trotz umfangreicher Prävention, Kontrolle der Risikofaktoren und deutlichen Fortschritten in der Therapie verstarben in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2015 knapp 50000 Menschen an einem Herzinfarkt. Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind in ihrer Gesamtheit weiterhin die führende Todesursache (1).

Erfahrungen aus dem klinischen Bereich deuten darauf hin, dass neben den erworbenen Risikofaktoren auch genetische Faktoren relevant sind.

Die pathogenetische Erforschung der Atherosklerose zeigt, dass diese ein komplexer Prozess aus Signalkaskaden des Immunsystems sowie der Hämostase ist (2). Um Zusammenhänge zu verstehen, können Thrombogenese und Immunreaktion nicht getrennt voneinander betrachtet werden.

Das Protein CD40L, dessen immunologische Bedeutung lange bekannt ist (3), wird nach neuen Erkenntnissen als Bindeglied zwischen Immunantwort und Hämostase betrachtet, da es in beiden Prozessen entscheidend Einfluss nimmt (4, 63).

1.1 CD40L – Struktur und Vorkommen

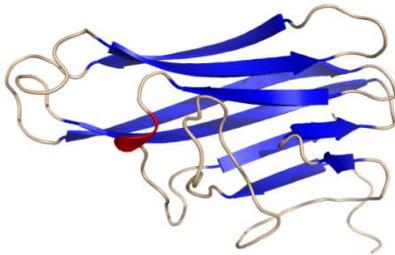


Abb.1: Proteinstruktur von löslichem humanem CD40Ligand (nach 4)

CD40-Ligand (CD40L/CD154/gp39/TRAP) ist ein trimerisches Typ II-Transmembranprotein der Superfamilie der Tumornekrosefaktoren (vgl. Abb. 1). Neben einer oberflächenassoziierten 39kD-Form existieren lösliche Formen (soluble CD40L = sCD40L), zu denen auch an Mikropartikel und an Exosomen gebundene Formen mit einem Molekulargewicht zwischen 14 und 33kD zählen.

CD40L wird von verschiedenen Zelltypen exprimiert (unter anderem aktivierte T-Lymphozyten (5,6,7), Mastzellen (8), Granulozyten(6), Makrophagen(9), natürliche Killerzellen (10)); Thrombozyten sind nach derzeitigem Wissensstand die Hauptquelle für 95% des im vaskulären System zirkulierenden sCD40L (11,12,13), das sie nach Aktivierung freisetzen.

CD40L bindet unter anderem an CD40, ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie, das auf Zellen des Immunsystems sowie Fibroblasten, Endothelzellen und glatter Muskulatur exprimiert wird.

1.2 CD40L – Funktion

1.2.1 Immunsystem

CD40L erfüllt als Zytokin wichtige Funktionen im Rahmen der Immunantwort: Durch Bindung an CD40 auf B-Lymphozyten stimuliert CD40L die Immunglobulinsynthese und den Isotypen-Switch der Immunglobulinklassen(14), trägt bei zur Bildung von Keimzentrum- und B-Gedächtnis-Zellen (15), stimuliert CD4-Zellen zur Expression von IL-4 (16), ist an der Expression proinflammatorischer

Zytokine und Chemokine wie IL-2, IL-6, TNF- α beteiligt (17) und moduliert außerdem die Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch B-Lymphozyten und Makrophagen.

Von Endothelzellen freigesetztes CD40L bewirkt die Expression von Adhäsionsmolekülen und ist ein essentieller Bestandteil der chronischen T-Zell-abhängigen Entzündungsreaktion (18), die auch bei der Atherosklerose bedeutend ist (12).

Die CD40-CD40L-Interaktion hat Einfluss auf die Apoptose (19,20) und hat klinische Bedeutung in der experimentellen Tumorthherapie (21).

1.2.2 Pathophysiologische Bedeutung

Eine Assoziation von CD40 und CD40L mit hämatologischen und soliden Malignomen wie der akuten und chronischen lymphatischen Leukämie, verschiedenen Lymphomen oder dem Ewing-Sarkom ist nachgewiesen (22). Das Hyper-IgM-Syndrom, eine genetisch bedingte Hypogammaglobulinämie mit fehlender Produktion spezifischer Antikörper und Verminderung der Immunglobulinklassen IgG und IgA bei normalem oder erhöhtem IgM, resultiert aus einer genetisch bedingten Störung der Bindung zwischen CD40L und CD40, wodurch der Isotypen-Switch im Rahmen der Immunantwort eingeschränkt ist (23,24,25,26).

Bedeutend ist die CD40-CD40L-Interaktion auch in der Pathogenese viraler und bakterieller Infektionen: Die Virusreplikation des HI-Virus wird durch die Bindung von CD40L an CD40 beeinflusst und ist ein wichtiges Element im Schutz vor opportunistischen Infektionen wie *Pneumocystis carinii* (27,28).

Im Rahmen der nach FFP- oder Thrombozyten-Transfusion möglichen TRALI wird sCD40L als Initiator einer der kausalen Mechanismen für dieses lebensbedrohliche Krankheitsbild betrachtet (29).

1.2.3 Lösliches CD40L und kardiovaskuläres Risiko

Epidemiologische Studien zeigen eine Assoziation zwischen Transfusionen und einem gehäuften Auftreten von Myokardinfarkten und Thrombosen (12,30,31); erhöhte sCD40L-Konzentrationen sind eine mögliche Ursache hierfür. Patienten mit einem ACS in Form eines akuten Myokardinfarktes (32) oder instabiler Angina pectoris (33) weisen signifikant erhöhte sCD40L-Konzentrationen im Blut auf (34,12) und haben auch nach dem Ereignis ein erhöhtes Risiko für das Wiederauftreten eines ACS (35) sowie ein erhöhtes Restenose-Risiko nach PTCA (36,37,38). Bei Patienten mit akutem oder chronischem Herzversagen sowie chronischem Vorhofflimmern wurden ebenfalls erhöhte sCD40L-Konzentrationen gemessen (39,40). Auch iatrogene Zustände mit erhöhtem Thromboserisiko wie beispielsweise kardiopulmonaler Bypass gehen mit erhöhten sCD40L-Konzentrationen einher (41). Eine Assoziation mit Atherosklerose - Risikofaktoren wie Diabetes, Nikotinkonsum oder auch erhöhtem LDL-Cholesterin wurde nicht nachgewiesen (42,128-130). Multifaktorielles Risikomanagement bei Patienten mit kardiovaskulärer Erkrankung führt jedoch zu einer Reduktion der sCD40L-Plasmaspiegel (43).

Ob erhöhte CD40L-Konzentrationen zu einer gesteigerten Aspirin-Resistenz der Plättchen führen wird diskutiert (44,45), über eine Assoziation mit einem erhöhtem Apoplex-Risiko liegen widersprüchliche Daten vor (46,47).

In atherosklerotischen Läsionen wird CD40L überdurchschnittlich stark exprimiert (9). CD40L ist an vielen Schritten der Atherosklerose-Progression beteiligt ist: Es führt zur Expression einer Reihe von Matrix-Metalloproteinasen, die essentiell sind für Plaqueprogression und Plaqueruptur (48,49,50,51). Die thrombotischen Folgen der Ruptur werden unter anderem durch Tissue factor stimuliert. CD40L fördert die Produktion von Tissue factor in allen Atherom-assoziierten Zellen (Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen) und wirkt proinflammatorisch, indem es Zytokine wie IL-6 und Adhäsionsmoleküle induziert (52,53,54).

Als Bindeglied zwischen Immunsystem und thrombotischem Ereignis ist CD40L als möglicher Marker für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko ins Interesse der Forschung gerückt (55,56).

Für den Einsatz als klinischer Marker gibt es bisher kein standardisiertes Verfahren. Im Serum gemessenes sCD40L erreicht deutlich höhere Konzentrationen, da es von aktivierten Plättchen freigesetzt wird. Zur korrekten Messung ist daher nur Plasma geeignet, das von Plättchen befreit wurde und in dem keine Plättchenaktivierung stattgefunden hat (57). *In vivo*-Konzentrationen von sCD40L werden nach bisherigem Kenntnisstand am besten durch PPP repräsentiert. Ob die verschiedenen Formen von CD40L auch unterschiedliche Funktionen aufweisen, ist noch unklar (58).

1.2.4 sCD40L stabilisiert Thromben durch Bindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Neben der Interaktion mit CD40 bindet sCD40L auch direkt an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (59). Durch eine spezifische Bindungssequenz (KGD;60) kann es an die β_3 -Untereinheit des Integrins andocken und den Rezeptor direkt aktivieren. Durch Tyrosin-Phosphorylierung der β_3 -Untereinheit wird ein Outside-In-Signalling initiiert (61). Bei hohen Scherraten wie in arteriellen Gefäßen zeigt sich dadurch eine erhöhte Thrombusstabilität unter *in vitro*-Bedingungen.

In Experimenten unter Zugabe von rekombinantem CD40L bei niedrigen Scherraten konnte gezeigt werden, dass Plättchen auch über Bindung von CD40L an CD40 aktiviert werden. Die Interaktion von CD40L mit CD40 führt zur Freisetzung von α -Granula und CD62P, dies sind morphologische Veränderungen die mit einer gesteigerten $\alpha_{IIb}\beta_3$ - Aktivierung assoziiert sind (62).

1.2.5 CD40L - Regulation der Freisetzung

Im Ruhezustand in α -Granula gespeichert, setzen die Plättchen nach Aktivierung durch Plättchenagonisten wie ADP, Thrombin oder Fibrinogen sCD40L frei (9). Hierbei kommt es zu einer schnellen Freisetzung aus den Granula und Translokation von CD40L an die Zelloberfläche. Parallel wird sCD40L durch Proteolyse freigesetzt (63,64). Dies erfolgt langsam über viele Stunden (65,8,66). Ebenso vielfältig wie seine Funktionen ist auch die Regulation der Freisetzung von CD40L. Beide Schritte der CD40L-Freisetzung – Oberflächenexpression und Freisetzung der löslichen Form –

werden getrennt voneinander reguliert (67). Auf molekularer Ebene wurde im CD40L-Gen ein Polymorphismus eines einzelnen Nukleotids gefunden, der zu erhöhten CD40L-Konzentrationen im Plasma führt (68).

Die Plättchenaktivierung ist einer der zentralen Schalter in der Regulation: *In vitro* führt die Plättchenadhäsion selbst via $\alpha_{IIb}\beta_3$ zu einer verstärkten CD40L-Expression (69). Die Zugabe starker Plättchenaktivatoren wie Thrombin bewirkt ebenfalls eine verstärkte CD40L-Expression an der Plättchenoberfläche (14).

CD40 ist - unabhängig von der Plättchenaktivierung - maßgeblich an der Abspaltung von CD40L und somit an der Generierung von löslichem CD40L beteiligt (14). CD40L kann so durch Bindung an den Rezeptor CD40 in einem negativen Feed-back-Mechanismus seine eigene Freisetzung hemmen (14).

Auch der Gehalt an freien Radikalen beeinflusst die CD40L-Freisetzung: Zugabe von Vitamin C verringert signifikant die CD40L-Konzentration im Plasma (70), ebenso konnte gezeigt werden, dass von Plättchen freigesetzte Sauerstoffradikale (O_2^-) die CD40L-Freisetzung fördern und im Umkehrschluss freie Radikalfänger diese hemmen (71).

Relevant als therapeutische Option ist die medikamentöse Beeinflussbarkeit der CD40L-Freisetzung: Sanguigni et al. konnten zeigen, dass Atorvastatin zu einer signifikanten Reduktion der CD40L-Freisetzung aus Plättchen führt und die Thrombusformation vermindert wird (72). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass $\alpha_{IIb}\beta_3$ an der Regulation der Freisetzung beteiligt ist: Furman et al. (73) sowie Nannizzi-Alaimo et al. (74) zeigten eine Hemmung der CD40L-Freisetzung durch $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten (Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban) und postulieren daher eine Beteiligung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ an der Regulation.

Welt et al. beobachteten an Patienten nach perkutaner Koronarintervention, die mit dem $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten Eptifibatid behandelt wurden, ebenfalls eine Reduktion der sCD40L-Freisetzung (75). Interessanterweise zeigte sich dieser Effekt nicht bei Gabe des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten Abciximab.

Der Mechanismus, der bei Aktivierung der Plättchen zur Freisetzung von sCD40L führt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt: Die Aktivierung einer NADPH-Oxidase im Rahmen von oxidativem Stress ist ein postulierter Mechanismus (46); Furman et al. konnten zeigen, dass der zweite Schritt, die Proteolyse von sCD40L, durch $\alpha_{IIb}\beta_3$, Aktinpolymerisation und einen MMP-Inhibitor-Signalweg beeinflusst wird (73). sCD40L stimuliert durch Bindung an CD40 auf Plättchen auch selbst seine Bildung (131,9,76).

Auf Thrombozyten, die ebenfalls auch in ruhendem Zustand CD40 auf der Oberfläche exprimieren, wird durch Bindung von CD40L an CD40 ein selbst-limitierender Prozess in Gang gesetzt, da es durch Bindung von CD40L an den Rezeptor zur Abspaltung von sCD40L kommt, das im Gegensatz zur membranassoziierten Form keine pro-inflammatorischen Eigenschaften aufweist. Dies wird als natürlicher Schutz vor einer überschießenden Immunantwort betrachtet (53).

1.3 Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa)

Integrine sind gleichzeitig Adhäsiv- und signalvermittelnde Moleküle. Sie bilden gewöhnlich ein Heterodimer aus nicht-kovalent miteinander assoziierten α - und β -Untereinheiten (77). Ihr Affinitätszustand ist durch zytoplasmatisches Signaling in Form von Phosphorylierung zwischen niedrig- und hoch-affin veränderbar.

1.3.1 Rezeptor-Struktur

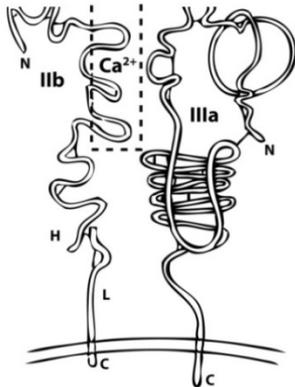


Abb. 2: $\alpha_{IIb}\beta_3$ - Strukturmodell (modifiziert nach 106)

Der Proteinkomplex $\alpha_{IIb}\beta_3$ besteht aus einer etwa 145 kD großen α_{IIb} - und einer kleineren ca. 90 kD großen β_3 - Einheit (78). Die α_{IIb} -Untereinheit kommt ausschließlich auf megakaryozytären Zellen vor, die β_3 -Untereinheit befindet sich auf verschiedenen Zelltypen (29). Um die heterodimere Struktur aufrecht zu erhalten wird Calcium benötigt (74). Auf einem ruhenden Plättchen weist es die höchste Rezeptordichte auf mit ca. 60000-100000 Rezeptorkopien (79). Bei Plättchenaktivierung kann die Oberflächenexpression um bis zu 50% ansteigen (80).

Die α_{IIb} - und die β_3 -Untereinheiten werden intrazellulär getrennt voneinander synthetisiert. In der Membran des endoplasmatischen Retikulums werden sie miteinander assoziiert. Nach der Passage des Golgi-Apparats, in dem unter anderem die weitere Prozessierung mittels Abspaltung von Oligosaccharid-Seitenketten erfolgt gelangt das Integrin zur Zelloberfläche (81). Beide Untereinheiten haben einen zytosolischen, transmembranären und extrazellulären Abschnitt (82).

1.3.2 Aktivierungszustand und Ligandenaffinität

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ weist je nach Aktivitätszustand des Plättchens eine unterschiedliche Ligandenaffinität auf. Im Ruhezustand besteht eine sehr niedrige Affinität zu löslichem Fibrinogen oder vWF. Nur immobilisiertes Fibrinogen wird erkannt und bindet an den Rezeptor (83).

Nach Plättchenstimulation durch Agonisten (ADP, Kollagen, Thrombin) kommt es durch ein Inside-out-Signaling zu einer Konformationsänderung des Integrins, so dass es in der Lage ist, lösliches Fibrinogen oder vWF zu binden (84). Die polyvalente Struktur dieser Proteine erlaubt ein „Cross-linking“ mehrerer Blutplättchen via an $\alpha_{IIb}\beta_3$ gebundenes Fibrinogen, das die Thrombusbildung maßgeblich steuert (85). Durch das „Cross-linking“ kommt es zum Outside-in-Signaling. Hierbei werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt, die noch nicht vollständig erforscht sind. Unter anderem erfolgt die Phosphorylierung von intrazellulär gelegenen Tyrosinresten der β_3 -Untereinheit (86). Es werden weitere zytoplasmatische Kaskaden in Gang gesetzt, und es kommt zur Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine (87) wie Syk und FAK (88,89), einer gesteigerten Calciummobilisation (90) und weiteren Veränderungen, wodurch sich das Zytoskelett der

Blutplättchen reorganisiert (91). So werden auf dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ unter anderem so genannte LIBS (ligandeninduzierte Bindungsstellen) exprimiert und Zytokine freigesetzt, die die Stabilität des gebildeten Thrombus unterstützen (92).

$\alpha_{IIb}\beta_3$ bindet verschiedene Liganden wie Fibrinogen, Fibronectin und vWF (92). Auf ruhenden Plättchen weist $\alpha_{IIb}\beta_3$ lediglich eine gering ausgeprägte Affinität für oberflächengebundenes Fibrinogen auf (93).

André et al konnten zeigen, dass auch CD40L an $\alpha_{IIb}\beta_3$ bindet und die Thrombusstabilität beeinflusst (59). Um an $\alpha_{IIb}\beta_3$ zu binden, muss der Ligand mindestens eine der folgenden Aminosäuresequenzen aufweisen:

- 1.) Position 95 bis 97: RGD(Arginin-Glycin-Aspartat) und
- 2.) Position 572 bis 575: RGDS (Arginin-Glycin-Aspartat-Serin)
- 3.) χ -Kette: Position 400-411(HHLGGAKQAGDV). Diese Bindungsstelle ist monospezifisch für Fibrinogen, das über eine AGDV-Sequenz bindet (94).

Alle potentiellen Adhäsionsproteine (Fibrinogen, Fibronectin, vWF), die an $\alpha_{IIb}\beta_3$ binden, weisen die Tripeptidsequenz RGD (Arg-Gly-Asp) auf, die vom Rezeptor als „Bindungsmotiv“ erkannt wird.

CD40L besitzt eine KGD-Sequenz, bei der Arginin gegen Lysin ausgetauscht ist. Diese wird ebenfalls vom Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ erkannt, wie erstmals anhand von Barbourin, einem Integrin in Schlangengift, gezeigt wurde (95).

Die klinische Relevanz zeigt sich bei Patienten mit einer Variante der Thrombasthenie Glanzmann, bei denen trotz normaler $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Konzentrationen keine Fibrinogenbindung und keine Thrombogenese erfolgt, da ein Aminosäureaustausch an Position 1 der RGD-Sequenz von Arginin zu Tyrosin nachgewiesen werden konnte (134).

1.3.3 Der HPA-1-(PI^A)-Polymorphismus des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins

Die β_3 -Untereinheit des Integrins weist zahlreiche Polymorphismen auf (96). Unter einem Polymorphismus versteht man eine stabile genetische Variation, die bei mehr als 1% einer gegebenen Population gefunden wird (97).

Ein relativ häufig auftretender Polymorphismus mit klinischer Relevanz betrifft das Antigen HPA-1. Der HPA-1-Polymorphismus des β_3 -Gens entsteht durch eine Punktmutation an Position 1565 im Exon 2 des Gens. Es kommt es zu einem Austausch von Thymin gegen Cytosin und infolgedessen zu einem Aminosäureaustausch von Leucin gegen Prolin an Position 33 des Alloantigens (98). Daraus resultiert eine Konformationsänderung in der aminoterminalen Disulfidschleife der β_3 -Untereinheit, die an der Fibrinogenbindung beteiligt ist (99). Die homozygote Leucin33-Variante ist verantwortlich für das PI^{A1}-Allel (HPA-1a/1a), die homozygote Prolin33-Variante bewirkt dementsprechend das Vorhandensein des PI^{A2}-Allels (HPA-1b/1b). Das PI^{A1}-Epitop ist mit einer Frequenz von 84-89% bei der weißen und über 99% bei der asiatischen Bevölkerung das häufigere (100). Homozygot für PI^{A2}

sind etwa 2% der kaukasischen Bevölkerung (100). Die heterozygote Variante $PI^{A1/A2}$ (HPA1a/1b) ist mit 25% Häufigkeit bei Kauasiern vorhanden (101).

In den vergangenen Jahren ist der HPA-1-Polymorphismus verstärkt untersucht worden bezüglich prothrombotischer Eigenschaften und seiner Bedeutung als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (102).

Es konnte gezeigt werden, dass die HPA 1b/1b-Variante mit einer verkürzten Blutungszeit, einer verstärkten Plättchenaktivierung und Sekretion der α -Granula sowie einer gesteigerten Aggregation assoziiert ist (103,104,105). Vijayan und Bray wiesen eine um etwa ein Drittel stärker ausgeprägte Bindungskapazität der HPA-1b/1b-Variante an Fibrinogen, vWF, und Prothrombin (106) sowie ein verändertes Migrationsverhalten von homozygoten HPA-1b-CHO-Zellen nach (107). Außerdem beobachteten sie scherratenabhängige Unterschiede in der Adhäsion an Fibrinogen zwischen den beiden homozygoten Genotypen (108).

Eine gesteigerte und beschleunigte Thrombinbildung nach mikrovaskulärer Verletzung wurde von Undas et al nachgewiesen, die gleichzeitig auch eine Beeinträchtigung der durch Acetylsalicylsäure vermittelten Thrombozytenaggregationshemmung beim HPA-1b/1b-Genotyp zeigten (109).

Post mortem-Untersuchungen bei Patienten, die am sogenannten „plötzlichen Herztod“ verstarben, zeigten eine Assoziation zwischen erhöhter Plaqueinstabilität und dem Vorliegen des HPA-1b/1b-Genotyps (110). Weiss et al. bezeichneten die HPA1b/1b-Variante als einen „vererbten Risikofaktor“ für das vorzeitige Auftreten eines akuten koronaren Ereignisses (111). Im Rahmen der LURIC-Studie wurde eine Assoziation des HPA-1b/1b-Genotyps mit dem vorzeitigen Auftreten von Myokardinfarkten bei vorliegender KHK nachgewiesen: Wie hier gezeigt wurde besteht keine Assoziation des Genotyps mit der Atherosklerose selbst, nichtsdestotrotz konnte eine Abhängigkeit zwischen der Prävalenz von HPA-1b/1b sowie dem Alter in dem zum ersten Mal ein Myokardinfarkt auftritt und dem Überleben nach dem Infarkt nachgewiesen werden. Dieses deutet auf eine erhöhte Thrombogenität der HPA-1b/1b-Variante hin (112).

Auch für die Therapie und Prävention koronararterieller Thrombosen könnte der Polymorphismus Relevanz haben: Verschiedene Arbeitsgruppen wiesen eine unterschiedliche Sensitivität der HPA-1-Varianten gegenüber $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten und Aspirin nach (74,113), die Datenlage ist jedoch nicht eindeutig (114).

Der Mechanismus, weshalb die verschiedenen HPA-1-Isoformen funktionell unterschiedliche Konsequenzen haben ist noch nicht vollständig geklärt:

Vijayan und Bray zeigten, dass die HPA-1b/1b-Variante das Outside-In-Signaling in Plättchen verstärkt, indem unter anderem Serin/Threonin-Phosphatasen inhibiert werden (115) und postulieren, dass es durch zytoskelettale Veränderungen auch retrograd zu verändertem Inside-Out-Signaling und einer Veränderung des Integrins kommt (116). Sie postulieren, dass die unterschiedliche Bindung an Fibrinogen durch Unterschiede der HPA1-Genotypen im Cyclooxygenase-Signalweg zu finden sind, da Experimente mit CHO-Zellen bei Substitution niedriger Konzentrationen von ASS unabhängig von

der Scherrate eine Hemmung der Adhäsion homozygoter HPA1b/1b -Zellen bewirkten, wohingegen die Adhäsion homozygoter HPA-1a -Zellen unbeeinträchtigt blieb (124).

2. Zielsetzung und Strategie

Bei Patienten mit einem thrombotischen Ereignis sind erhöhte Konzentrationen von sCD40L im Blut nachweisbar (12,34). Die Bedeutung von sCD40L für die Thrombogenese ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Wir postulierten, dass lösliches CD40L die Thrombogenese direkt durch Bindung an den Rezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ steigert. Folgende Vorgehensweise haben wir daher eingeschlagen:

Ziel der Untersuchungen war festzustellen, ob sich nach Zugabe von sCD40L zu antikoaguliertem Vollblut morphologische Unterschiede in der Thrombogenese unter simulierten arteriellen Strömungsbedingungen nachweisen lassen und ob diese abhängig von der vorhandenen sCD40L-Konzentration sind.

Morphologische Unterschiede in der Thrombogenese in Abhängigkeit vom Rezeptorpolymorphismus des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins wurden bereits in einer vorigen Arbeit nachgewiesen (117). Darauf aufbauend sollten Strömungsexperimente mit Blut von homozygoten HPA-1a/1a und HPA-1b/1b-Probanden unter Substitution von rekombinantem sCD40L durchgeführt werden um feststellen ob sich eine Abhängigkeit zwischen der sCD40L-Konzentration und der Thrombusformation nachweisen lässt.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

Die Experimente erfolgten unter Verwendung folgender Materialien und Geräte:

- Venenpunktionsbesteck (W.I.N. 21G, Innendurchmesser 0,6 mm, Abbott Ireland, Sligo/Irland, 63-HF-0050-01)
- Vacutainer® Natrium-Citrat (Konzentration: 0,129M) (BD, New Jersey, USA, Katalognummer 363079)
- Kolbenhub-Pipetten (Eppendorf reference 10-100 μ l und 0,5-10 μ l, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf)
- Pipettenspitzen (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf)
- Taumelschüttler (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Petrischalen (Greiner Labortechnik, No. 639102, 145/20 mm, Nürtingen)
- Deckgläser für Mikroskopie, 24mm x50mm, (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde)
- 15 ml Spitzboden Schraubröhrchen (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
- Präzisionsperfusorpumpe (Standard Pump 22 Holliston, Harvard Apparatus, Boston Massachusetts, USA)

- Perfusorspritzen (Original-Perfusor-Spritze, OPS, 50 ml, Luer Lock, B. BRAUN Melsungen AG, Melsungen)
- Spritzenkonus: 2ml Spritze (BD, New Jersey, USA)
- Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, Zeiss Axiovert 100M (Stativ) und LSM 510 (Scanmodul)(Carl Zeiss, Oberkochen)
- Computer (Siemens Scenic Pro M7)
- Bildverarbeitungssoftware ECCET (WWW.ECCET.de)
- ELISA-Kits: TXB₂: Correlate-EIA Thromboxane B₂ (Assay Designs, Inc., Ann Arbor, Michigan USA; Katalognummer: 900-002); CD40L: Quantikine Human soluble CD40 Ligand Immunoassay (Bender MedSystems GmbH, A-1030 Vienna Austria, Katalog-Nr.: BMS239CE)
- Statistikprogramm Graphpad InStat (Graphpad, San Diego, CA 92130 USA)

3.1.2 Konfokale Lasermikroskopie

Die konfokale Lasermikroskopie ist ein lichtmikroskopisches Verfahren. Das Lichtmikroskop ist mit einem Laser gekoppelt, dieser regt einen zuvor zum untersuchten Objekt hinzugegebenen Fluoreszenzfarbstoff zur Lichtemission an. Die Verwendung fluoreszierender Farbstoffe erlaubt im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie eine exaktere Lokalisation der markierten Objekte in der Tiefe (z-Dimension). Außerdem kann eine Dynamik, beispielsweise in der Form und Aktivität des mikroskopierten Objektes über die Zeit durch Zu- oder Abnahme der Fluoreszenz dargestellt werden.

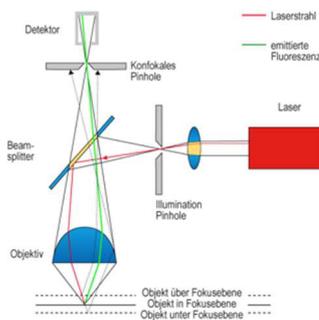


Abb. 3: Schematische Darstellung (modifiziert nach 118)

Bei der konfokalen Mikroskopie wird durch Verwendung von Lochblenden Licht, das von außerhalb der Fokusebene emittiert wird, ausgeblendet. Durch Unterdrückung von Streulicht sowie Verstärkung des Signals aus der Fokusebene wird eine hohe axiale Auflösung erzielt. Es kann immer nur ein Punkt des Objektes zur gleichen Zeit betrachtet werden. Die Laserquelle wird rasterförmig über das unter dem Mikroskop liegende Objekt bewegt um später aus den Messdaten verschiedener Punkte ein dreidimensionales Bild erzeugen zu können. Ein Detektor (Photomultiplier) weist die vom Objekt emittierte bzw. reflektierte Fluoreszenz nach. Die Informationen aus verschiedenen Schichten des Objektes werden dann mit Hilfe des Computers zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt. Dies ermöglicht eine topographische Darstellung (118).

3.1.3 Simulation arterieller Flussbedingungen - Versuchsaufbau

Für die Flusseexperimente wurden die Flusskammer sowie der Versuchsaufbau verwendet, die speziell für das Verfahren der „Vierdimensionalen Thrombogenese“ entwickelt wurden. Sie sind in ihrer Konzeption und Bauweise auf die besonderen Anforderungen des Messverfahrens abgestimmt. Durch die Konstruktionsweise der Kammer (5cm Länge, Strömungskanal misst 40 mm x 80 µm) werden die Verfälschung der Messergebnisse durch technische Gegebenheiten verringert und die Versuchsbedingungen optimiert (Laminare und zur Längsachse der Kammer parallele Strömungsbedingungen, minimaler Blutverbrauch durch geringes Totraumvolumen, dünner und gleichzeitig stabiler Kammerboden). Die Konstruktion der Kammer ist Gegenstand der Dissertation von Jan Peveling-Oberhag (117). Eine Präzisionsperfusorpumpe (Harvard Apparatus) aspiriert das venöse Blut, das sich in einem auf die Kammeröffnung aufgesteckten Reservoir befindetet, durch die Kammer. Durch das abnehmbare Reservoir können dem Blut während der Durchführung des Experimentes Reagenzien (Antikörper, sCD40L) zugesetzt werden. Die Pumpe ist über einen 10 cm langen Gummischlauch mit der Kammer verbunden, da die von ihr bei Betrieb ausgehenden Vibrationen die Messung stören würden. Der Blutfluss wird mittels der Perfusorpumpe so reguliert, dass eine initiale Wandscherrate von 1000/s innerhalb der Kammer entsteht. Die in diesem Versuchsaufbau gewählte Scherrate von 1000 sek^{-1} entspricht einer Flussrate von 19,2 ml/h. Zur Berechnung der Scherrate γ in der rechteckigen Strömungskammer wird folgende

Formel verwendet:

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

- Q = Flussrate in ml/s
- w = Länge des Feldes der Flusskammer (40mm)
- h = Höhe der Flusskammer (80 µm)

Durch Umformung lässt sich aus der Scherrate die Formel für die Flussrate bestimmen:

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

* Die Photographien zu Abb. 4 und 5 wurden freundlicherweise von J. Peveling-Oberhag zur Verfügung gestellt



Abb. 4: Strömungskammer mit Perfusorspritze und Schlauch*



Abb. 5 : Versuchsaufbau*

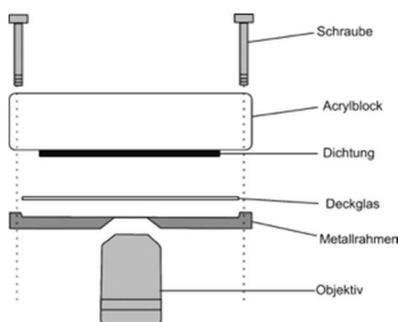


Abb. 6: Schematischer Aufbau der Strömungskammer

3.1.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie (FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (Zellen u.a.) in einem Flüssigkeitsstrom und damit die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. In unserem Fall wurde sie eingesetzt um die Fibrinogenrezeptordichte auf Thrombozyten zu bestimmen.

Grundlage ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen (119).

3.1.5 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Der ELISA gehört zur Gruppe der Immunoassays, dies sind antikörper-basierte Verfahren zum Nachweis von Proteinen, Viren und anderen Substanzen. Das zu untersuchende Medium wird auf eine mit einem Antikörper beschichtete Platte gegen das zu detektierende Antigen gegeben. Während der Inkubation kommt es mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion zur Bindung der Reagentien. Ein zweiter Antikörper, an den ein Marker- oder Reporterenzym gebunden ist und der ebenfalls an das Antigen bindet wird hinzugegeben. Nach Waschung wird ein Substrat zur Reaktion mit dem Markerenzym hinzugefügt, es entsteht ein Farbumschlag, dessen Intensität mittels eines Photometers gemessen wird. Das entstandene Produkt ist proportional zur vorhandenen Antigenkonzentration, die anhand einer standardisierten Konzentrationsreihe ermittelt werden kann (120).

3.1.6 Verwendete Chemikalien und Stoffe

- PBS (Phosphate Buffer Solution)-Puffer (pH 7,3 Serag-Wiessner GmbH&Co. KG, Naila)
- Natrium-Citrat (Konz. 0,129M) Vacutainer (BD, New Jersey, USA, Katalognr.: 363079)
- Edisonite Schnellreiniger (Art.-Nr. 60129, Merz+Co., Frankfurt, UBA-Nr.:05860001)
- BSA (Bovines Serum Albumin)(Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA)
- Fluoreszierende Mikrosphären, Durchmesser 6µm (Cat.Nr. F-36905, Molecular Probes, Eugene, USA)
- Kollagen (Kollagen Typ S, Roche)

- Mepacrin (gelöst in PBS-Puffer, Stocklösung 10 mM, Endkonzentration 10 μ M) (N^4 -(6-chloro-2-methoxy-9-acridinyl)- N^1,N^1 -diethyl-1,4-pentanediamine, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA)
- Abciximab (ReoPro® Lilly Indianapolis, Indiana 46285 USA PZM: 7123941)
- sCD40L (Human CD40 Ligand, TRAP-Analog, Pepro Tech. Inc; 50 μ g/ml PBS pH7,3)

3.1.7 Abciximab (ReoPro)

Abciximab (ReoPro®) ist ein künstlich hergestelltes Fab-Fragment eines chimären monoklonalen Antikörpers, der gegen den GPIIb/IIIa-Rezeptor der Thrombozyten gerichtet ist. Er bindet stabil und nicht-kompetitiv am Rezeptor und blockiert ihn irreversibel. Im klinischen Alltag findet Abciximab Verwendung in Kombination mit Heparin und ASS bei der PTCA.

3.1.8 Kollagen

Das als Adhäsionsfläche verwendete Kollagen ist eine Mischung aus 95 % Typ I und 5 % Typ III in Eisessig. Es wird gebrauchsfertig geliefert.

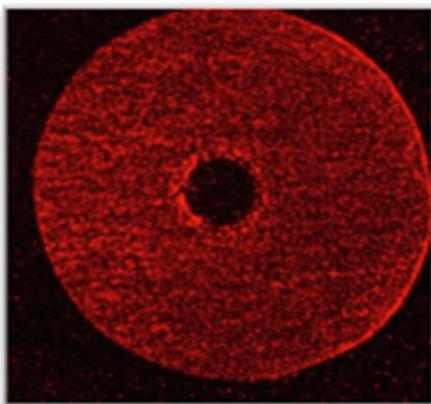


Abb. 7: Kollagentropfen mit fluoreszenzmarkierten Thromben nach Abschluss des Strömungsexperiments unter Zusatz von CD40L (5ng/ml).

3.1.9 Mepacrin als Fluoreszenzfarbstoff

Mepacrin (N^4 -(6-chloro-2-methoxy-9-acridinyl)- N^1,N^1 -diethyl-1,4-pentanediamine) ist ein trizyklisches, basisches Amin. Bei Anregung durch einfallendes Licht der Wellenlänge 440 nm zeigt es eine intrinsische, gelb-grüne Fluoreszenz. Aufgrund seiner hohen Affinität zu Adenosintriphosphat (ATP), das in den dichten Granula von Thrombozyten gespeichert wird kann es zur Thrombozytenmarkierung verwendet werden. Bei Applikation von Mepacrin zu einer venösen Blutprobe kumuliert der Farbstoff rasch in den

Thrombozyten (121). In der verwendeten Konzentration von 10 μ M wird die normale Thrombozytenfunktion durch Mepacrin nicht beeinflusst (122).

3.1.10 Human CD40Ligand, TRAP-Analog

Rekombinantes, lösliches humanes CD40-Ligand ist ein 16,3kDa großes Protein, bestehend aus 149 Aminosäure-Resten. Es wird gebrauchsfertig als Trimer in Lösung geliefert.

3.2 Probanden

Die Probanden sind regelmäßige Blutspender der Blutbank der Uniklinik Düsseldorf. Die Experimente erfolgten nach vorheriger Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität Düsseldorf (11.09.2001, Aktenzeichen: 1864).

Nach ausführlicher Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung erfolgte die Einbestellung der Probanden zur Blutabnahme (zwei 4,5ml Na-Citrat-Röhrchen (0,129M), zwei 5ml Serumröhrchen, ein K2EDTA -Röhrchen, 21-G-Nadel, Vacutainer). Zwischen dem 1. und dem 30. August 2006 wurden von insgesamt 11 männlichen und weiblichen Probanden, die nach eigenen Angaben gesund waren und in den letzten zwei Wochen keine Medikamente eingenommen hatten, Daten erhoben.

Eine Genotypisierung bezüglich des HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ und des C807T-Polymorphismus des Integrin $\alpha_2\beta_1$ (GP IaIIb) mittels allelspezifischer Restriktionsenzymanalyse war bereits im Vorfeld durchgeführt worden.

Bei jedem Probanden wurde ein kleines Blutbild (Erythrozytenzahl, MCV, MCH, MCHC, Hämoglobingehalt, Hämatokrit, Leukozytenzahl und Thrombozytenzahl) angefertigt sowie die TXB₂-Konzentration und die CD40L-Rezeptoräquivalente bestimmt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Kollektivs:

Proband Nr.	HPA1-Genotyp	Versuchstag	Geschlecht	Alter	TZ-Zahl/ μ l	GPIA807-Genotyp
2	1b/1b	17.08.2006	m	30	237000	CC
8	1b/1b	21.08.2006	w	31	271000	CC
9	1b/1b	23.08.2006	m	38	222000	CC
5	1b/1b	18.08.2006	m	36	260000	CC
6	1b/1b	21.08.2006	m	29	237000	CC
7	1b/1b	21.08.2006	m	42	158000	CC
MW				34,33	230833	
SD					39807	
10	1a/1a	24.08.2006	w	23	251000	CC
3	1a/1a	17.08.2006	w	23	147000	CC
11	1a/1a	23.08.2006	m	25	257000	CC
4	1a/1a	18.08.2006	m	40	163000	CC
1	1a/1a	16.08.2006	m	32	191000	CC
MW				28,6	201800	
SD					50231	

3.3 Methodik

3.3.1 Strategie

Vor Durchführung der Flusseperimente mit Spenderblut verschiedener HPA-1-Varianten wurden Versuche in der Flusskammer unter Simulation arterieller Strömungsbedingungen durchgeführt, bei denen venösem Vollblut rekombinantes sCD40L in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt wurde. Es sollte ermittelt werden inwiefern ein Effekt auf die Thrombusstabilität nachweisbar ist.

3.3.1.2 Festlegung der Messparameter

Die Thrombusstabilität bestimmten wir durch Messung verschiedener Parameter der Thrombusmorphologie über die Zeit: Einzel- und Gesamthrombushöhe, Einzel- und Gesamthrombusvolumen, Thrombenzahl und Thrombusgrundfläche (dies ist die direkte Kontaktfläche des Thrombus mit der thrombogenen Oberfläche, in unserem Fall Kollagen Typ S).

3.3.1.3 Messung der sCD40L- und der TXB₂-Konzentration im Nativblut

Zur Kontrolle möglicher weiterer Einflussfaktoren auf die Thrombogenese und um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit Proben verschiedener Blutspender zu erzielen bestimmten wir in jeder Probe die sCD40L-Konzentration vor Zusatz des von uns verwendeten rekombinanten sCD40L. Um auszuschließen, dass die Thrombogenese während der Flusseperimente durch Einnahme thrombozytenhemmender Medikamente (Acetylsalicylsäure) supprimiert wurde, bestimmten wir außerdem in jeder Probe die Thromboxan B₂-Konzentration.

3.3.1.4 Durchführung von Strömungsexperimenten mit venösem Vollblut verschiedener HPA-1-Varianten unter Zusatz einer definierten sCD40L-Dosis

Nach Anfertigung einer Konzentrationsreihe und Bestimmung der sCD40L-Dosis mit dem stärksten Effekt auf die Thrombogenese erfolgten Flusseperimente mit Proben homozygoter HPA-1a/1a- oder HPA-1b/1b-Varianten, denen vor Beginn jeweils eine definierte sCD40L-Dosis zugesetzt wurde. Vor dem Hintergrund des HPA-1-Polymorphismus wurde so der Effekt von sCD40L auf die Thrombusformation gemessen.

3.3.2 Durchführung

3.3.2.1 Blutentnahme und Probenvorbereitung

18ml venöses Blut werden dem Probanden durch Punktion der Kubitalvene entnommen. Für die FACS-Analyse wird mit einer 10µl Kolbenhub-Pipette 1µl venöses Blut aus den Na-Citrat-Röhrchen in ein Glasröhrchen gegeben und mit 9µl PBS-Puffer verdünnt. Anschließend wird das restliche Blut aus den Na-Citrat-Röhrchen in ein 15ml Spitzbodenröhrchen gegeben und auf 10µM Mepacrin eingestellt. Nach Verschluss des Röhrchens erfolgt eine 60-minütige Lagerung auf einem

Taumelschüttler bei 15 Umdrehungen/min, um eine möglichst vollständige Anfärbung der Thrombozyten mit Mepacrin zu erzielen.

Fünf Minuten vor Beginn des Flussexperiments wird dem Blut rsCD40L mit einer Pipette in der festgelegten Konzentration zugefügt. Anschließend erfolgt erneut eine 5-minütige Inkubation auf dem Taumelschüttler, um eine Interaktion des sCD40L mit den Thrombozyten zu ermöglichen.

Die Serumröhrchen werden sofort nach Entnahme für 30 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C gelagert, um die maximale Freisetzung von sCD40L durch Leukozyten und aktivierte Thrombozyten zu erzielen. Anschließend erfolgt die Gewinnung von Serum durch 5-minütige Zentrifugation (4000/s) und Überführung der Proben in 1ml-Plastikröhrchen. Aus den EDTA-Röhrchen wird parallel dazu mittels Zentrifugation PPP gewonnen. Durch Vergleich der CD40L-Konzentrationen in Serum und PPP mittels ELISA bei jedem Spender können durchschnittliche CD40L-Konzentrationen unter Nativbedingungen ermittelt und Schätzungen über die potentielle CD40L-Freisetzung durch Thrombozyten und Leukozyten bei Zytolyse erstellt werden.

Alle Proben für den ELISA wurden nach Fertigstellung bei -80°C tiefgefroren und nach dem Auftauen in Bezug auf TXB₂- und CD40L-Konzentration untersucht.

3.3.2.2 Präparation des Kollagentropfens

Ein Deckglas wird mit Hilfe eines Bunsenbrenners bei blauer Flamme erhitzt. Dies erfolgt zur Entfernung etwaiger Rückstände, außerdem soll so eine möglichst gleichmäßige Verteilung des später applizierten Kollagentropfens erzielt werden.

Nach 5-minütiger Abkühlung bei Raumtemperatur wird ein 2µl großer Kollagentropfen mit der Kolbenhub-Pipette auf die Mitte des Deckglases gegeben, eine darunter platzierte Schablone erleichtert die Positionierung des Tropfens in der Deckglas-Mitte. Die Kollagenlösung wird bis zum ersten Druckpunkt herausgedrückt und um eine gleichmäßige Verteilung zu ermöglichen unter Kontakt des Tropfens mit dem Deckglas darauf abgelegt. Anschließend wird dieses mit einer Plastikschaale bedeckt und 30 Minuten bei Raumluft getrocknet.

Das aufgetragene Kollagen dient als thrombogene Oberfläche. Die homogene Kollagenmatrix gewährleistet, dass es erst zu einer Aktivierung der Thrombozyten kommt, wenn diese den Messpunkt passieren.

Vor jedem Versuch werden mehrere Deckgläser mit Kollagentropfen angelegt. Mit Hilfe des Mikroskops wird schließlich der Kollagentropfen mit der homogensten Oberfläche für den Versuch ausgewählt, die übrigen Präparate werden verworfen.

3.3.2.3 Reinigung und Vorbereitung der Strömungskammer

Vor Durchführung des Experiments werden alle Bestandteile mit Aqua dest. aus einer Perfusorspritze gespült. Die Kammer trocknet auf Zellstoff gelagert an der Luft, ggf. vorhandene Restfeuchtigkeit in der Zu- und Abflusskanüle sowie der Gummidichtung werden mittels Pressluft (CO₂-Gas) entfernt.

Die Flusskammer, der abführende Schlauch mit 3-Wege-Hahn sowie die während des Versuchs als Blutreservoir dienende 2ml-Spritze werden zwischen den Experimenten durch mindestens achtstündige Lagerung in einer Reinigungslösung von jeglichen Rückständen befreit.

Das Deckglas wird mit der kollagenbeschichteten Seite nach oben in den als Boden dienenden Metallrahmen der Kammer eingelegt. Der Kollagentropfen darf dabei nicht berührt werden. Der als Deckel dienende Acrylglasblock wird gerade von oben darauf gelegt und mit 4 Metallschrauben über Kreuz am Boden befestigt. Durch die genau senkrechte Applikation des Deckels haften die Gummidichtungen fest an dem Deckglas, die Kammer ist so dicht nach außen abgeschlossen. Eine leere 50ml Perfusorspritze wird in die Pumpe eingespannt.

Die als Reservoir dienende 2ml-Spritze wird auf die zuführende Kanüle aufgesteckt. Eine zweite 50ml-Perfusorspritze wird mit 5ml 2%iger BSA-Lösung gefüllt (gelöst in PBS-Puffer). Ein Gummischlauch wird mit der Perfusorspritze über einen dichten Schraubverschluss verbunden und durch Druck auf den Spritzenkolben langsam unter Vermeidung von Luftblasen mit dieser Lösung gespült.

Die Spülung der Kammer mit einer Pufferlösung trägt dazu bei eine gleichmäßige Verteilung des Blutes in der Kammer zu gewährleisten. Außerdem wird so das Anhaften von Thrombozyten an Bestandteilen der Kammer verhindert und die Thrombogenese auf die als thrombogene Oberfläche dienende Kollagenmatrix konzentriert.

Anschließend verbindet man den Schlauch mit der Abflusskanüle der Kammer und spült diese blasenfrei durch weiteren Druck auf den Spritzenkolben retrograd mit der Pufferlösung, bis sich etwa 0,5ml Pufferlösung im Reservoir am anderen Ende der Kammer befinden. Der Schlauch wird von der Perfusorspritze abgeschraubt und mit der vorher in die Perfusorpumpe eingespannten leeren Perfusorspritze fest verbunden. Die Kammer wird auf den Objektisch gesetzt und dort fest verschraubt.

Nach Einstellung der Perfusorpumpe auf eine Flussrate von 19,2ml/h wird diese eingeschaltet und das in der Kammer vorhandene Puffer-BSA-Gemisch in der späteren Blutflussrichtung aspiriert. Nachdem etwa die Hälfte der im Reservoir befindlichen Pufferlösung aspiriert ist, wird die Pumpe ausgeschaltet und das Reservoir abgenommen. Die sich noch darin befindende Pufferlösung wird entfernt.

2ml des mit Mepacrin und sCD40L-versetzten Blutes werden mit einer 1000 μ l-Kolbenhubpipette in eine neue 2ml-Spritze aus der der Kolben entfernt wurde gegeben und diese wieder auf die Zuflusskanüle der Kammer aufgesteckt. Während des Aufsetzens wird zur Aufrechterhaltung eines Vakuums in der Spritze die obere Spritzenöffnung mit dem Daumen verschlossen um ein Auslaufen des Blutes zu verhindern.

3.3.2.4 Laser-Scanning-Mikroskop: Einstellungen

- Argonlaser (100% Leistung, Wellenlänge 458nm)
- optische Vergrößerung 400fach (Zeiss Plan-Neofluar 40*/0,3 Objektiv)
- Scanmode: Time series, 25 Stacks, 12bit

- Stack-Size 512x256x30 230,3 μ m x 115,1 μ m x 29 μ m
- Scaling: 0,45 μ m x 0,45 μ m x 1 μ m
- Beam Splitter: MBS: HFT458
- Filter: Ch2: BP 505-550
- Pinhole: 80 μ m
- Scan-Geschwindigkeit pro Pixel: 1,12 μ s
- Scan-Geschwindigkeit pro Bild: 491,5ms
- Detektor Gain: 670
- Amplification Offset: 0,675
- Amplification: 1,3

3.3.2.5 Messung von fluoreszierenden Mikrosphären

Vor Beginn jedes Experiments wird das Volumen industriell hergestellter fluoreszierender Mikrosphären mit einem definierten Durchmesser von 6 μ m gemessen. Hierdurch soll eine durch die ggf. verursachte Varianz zwischen den Ergebnissen erfasst und kontrolliert werden um so die Messergebnisse zu standardisieren.

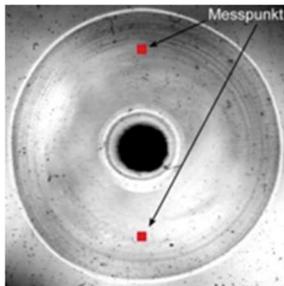


Abb. 8: Mögliche Messpunkte im Kollagentropfen

3.3.2.6 Einstellen des Messpunktes

Vor dem Start des Perfusors wird mit der Durchlichtfunktion des Mikroskops auf die Kollagenmatrix fokussiert und eine Stelle für die Messung ausgewählt, die sich genau parallel zur Mitte des Kollagentropfens befindet, um die Messungen einheitlich durchzuführen. Anschließend wird zur Laserscanningfunktion des Mikroskops gewechselt.

3.4 Durchführung des Versuches

Der Perfusor wird eingeschaltet und das Blut in die Kammer gesaugt. Die Messung wird manuell gestartet sobald der Kollagentropfen vom Blutfluss vollständig bedeckt ist.

Über einen Gesamtzeitraum von 10 Minuten werden am eingestellten Messpunkt alle 25 Sekunden insgesamt 25 Messungen durchgeführt. Bei jeder Messung werden 30

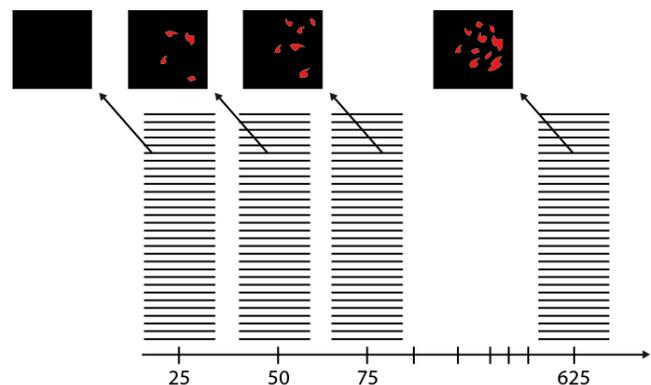


Abb. 9: Bilderstapel zu verschiedenen Messzeitpunkten (aufgetragen auf der X-Achse in Sekunden)

Einzelschichten durchgerastert mit einem Abstand von jeweils 1 μ m. So erhält man 25 Bildstapel bestehend aus jeweils 30 Bildern, die später mithilfe der Datenverarbeitung die 4-dimensionale Analyse der Thrombogenese ermöglichen. Der Bildstapel hat eine Höhe von 30 μ m.

3.5 Datenverarbeitung

Nach Abschluss des Versuchs werden die erhobenen Daten manuell in ein Standardformat (PNG = Portable Network Graphics) exportiert, da das Format der Mikroskop-Software nicht zu dreidimensionalen Abbildungen verrechnet werden kann. Pro Experiment entstehen 1750 chronologisch nummerierte Einzelbilder.

Die Auswertung erfolgt mit der Software „ECCET“ (123). Mittels der Schnittbilder zu jedem Messzeitpunkt erstellt das Computerprogramm 25 dreidimensionale Abbildungen, dies ermöglicht die dynamische Darstellung der Thrombusformation, wie unten exemplarisch dargestellt. Die Analyse unterliegt folgendem Prinzip:

Der Messbereich wurde in „Voxel“ aufgeteilt. Ein Voxel hat die Form eines Quaders ($0,45\mu \times 0,45\mu \times 1\mu$). Die Software erkennt einen Voxel als „aktiv“, wenn in mehr als 50% seiner Fläche ein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

Die Software kann nicht unterscheiden zwischen „richtig und falsch“, folgende Signale werden daher ohne Differenzierung detektiert:

- Artefakte verursacht von Fluoreszenzsignalen aus nicht angesteuerten Ebenen
- Das Fluoreszenzsignal von Leukozyten, die wie Plättchen durch Mepacrin angefärbt wurden
- „Grundrauschen“ des Fluoreszenzsignals
- Das Fluoreszenzsignal von einzelnen Thrombozyten
- Aggregate von Thrombozyten (= Thromben)

Relevant für die Auswertung ist nur das letztgenannte Signal. Um die irrelevanten Signale zu unterdrücken werden zwei Schritte vorgenommen:

- Clusterung (Bündelung leicht unterbrochener Voxel mit ausreichender Helligkeit): Mit einem separierten linearen Gaussfilter (Sigma=2) erfolgt die Glättung aller Volumina in allen Achsen, alle verbleibenden Voxel mit einem Intensitätswert > 10 werden als Thromben markiert, der Rest wird durch das Programm als Artefakt bzw. „Grundrauschen“ unterdrückt.
- Festlegung eines Cut-off-Volumens: Durch Festlegung eines Cut-off-Volumens von 510 Voxel (ca. $100\mu\text{m}^3$) werden nur Thromben erfasst, die dieses überschreiten. Weitere Artefakte, beispielsweise durch Leukozyten werden so ausgeschlossen.

3.6 Bestimmung der Messparameter Thrombusvolumen, -grundfläche, -höhe und -anzahl

Für jeden Thrombus dessen Volumen oberhalb des „Cut-off“-Wertes liegt, werden das Einzelvolumen (in voxel) sowie die Grundfläche und die Einzelthrombushöhe (jeweils in pixel) bestimmt. Außerdem wird die Thrombusanzahl zu jedem Messzeitpunkt ermittelt.

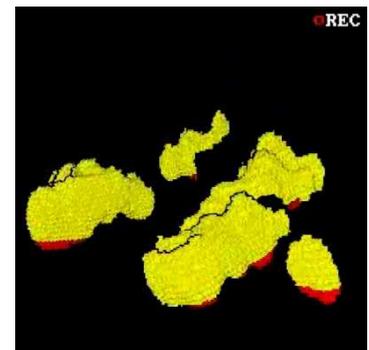


Abb. 10: 3-dimensionale Rekonstruktion der Thrombogenese mit ECCET (123)

Das Thrombusvolumen ergibt sich durch Zählung aller zusammenhängenden Voxel, die man in ein Volumen umrechnen kann. Der angegebene Wert zu jedem Messzeitpunkt stellt einen durchschnittlichen Wert für alle an diesem Zeitpunkt gemessenen Thromben dar (ermittelt durch die Division der Anzahl der zu diesem Messzeitpunkt vorhandenen Thromben).

Unter der Thrombusgrundfläche versteht man die Kontaktfläche des Thrombus mit der Kollagenmatrix. Für das System ist die Kollagenmatrix nicht sichtbar. Es wird eine virtuelle Grundfläche definiert, indem die beiden untersten Voxelreihen jedes Thrombus gemittelt werden.

Die Einzelthrombushöhe wird berechnet durch Zählung aller Voxel zwischen der virtuellen Grundfläche und dem höchsten Punkt des Thrombus, auch hier wird ein durchschnittlicher Wert aller zum Messzeitpunkt im Messfeld vorhandenen Thromben berechnet.

Die grafische Auswertung erfolgt durch Importierung der Daten in Microsoft Excel. Die Daten werden manuell in die Maßeinheit μm umgerechnet und in einem Diagramm über den Zeitverlauf zweidimensional dargestellt.

3.7 Statistische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm „InStat GraphPad“.

Aus den Ergebnissen der Strömungsversuche, den FACS- und ELISA-Analysen wurde jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung bzw. der Standardfehler des Mittelwertes (Standard error of mean; SEM) berechnet.

Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs ($n < 30$) wurde ein non-parametrisches Verfahren angewendet, hier der Mittelwertdifferenztest des Student t-Tests. Die Testgröße lautet:

$$t = \frac{\text{Mittelwert differenz}}{\text{Standardfehler}}$$

Es wurde der sog. Mittelwertdifferenztest für unabhängige Stichproben gewählt. Normalverteilung der Ergebnisse, Varianzhomogenität zwischen den beiden unabhängigen Probandenkollektiven (HPA-1a/1a vs. HPA 1b/1b) sowie intervallskalierte Daten sind vorausgesetzt. Um den α -Fehler bei wiederholter Durchführung des t-Tests gering zu halten wurde als post-hoc-Verfahren die Bonferroni-Korrektur angewendet. Hierbei wird das α -Fehlerniveau (hier 0,05) durch die Anzahl der durchgeführten Vergleiche geteilt, die Mittelwerte werden auf dem korrigierten α -Niveau verglichen.

4. Ergebnisse

4.1 Validität der verwendeten Messverfahren

4.1.1 Experimentelle Varianz der Strömungsexperimente

Um den methodenbedingten Messfehler gering zu halten wurde vor und nach jeder Messung die Genauigkeit der Auswertungssoftware durch ein bewährtes Verfahren bestimmt. Hierzu wurde

unmittelbar vor und nach jeder Messung das Volumen von fluoreszierenden Mikrosphären mit einem normierten Durchmesser von $6\mu\text{m}$ bestimmt. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung dargestellt.

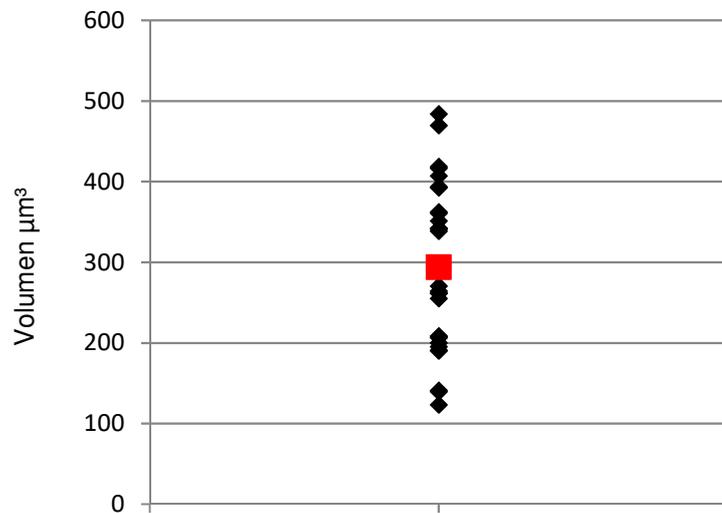


Abb. 11: Ergebnisse der Kalibrierung mittels Messung der Fluoreszenzintensität normierter Mikrosphären (Mittelwert $294,1\mu\text{m}^3$, Standardabweichung $97,5\mu\text{m}^3$)

4.1.2 ELISA und FACS-Analyse

Bei den verwendeten Kits handelt es sich um industriell hergestellte und standardisierte Verfahren (s. Herstellerangaben). Bei Durchführung der ELISA-Untersuchung wurde mit Hilfe standardisierter Fluoreszenzfarbstoffe eine Eichkurve erstellt, die in folgender Abbildung exemplarisch dargestellt ist.

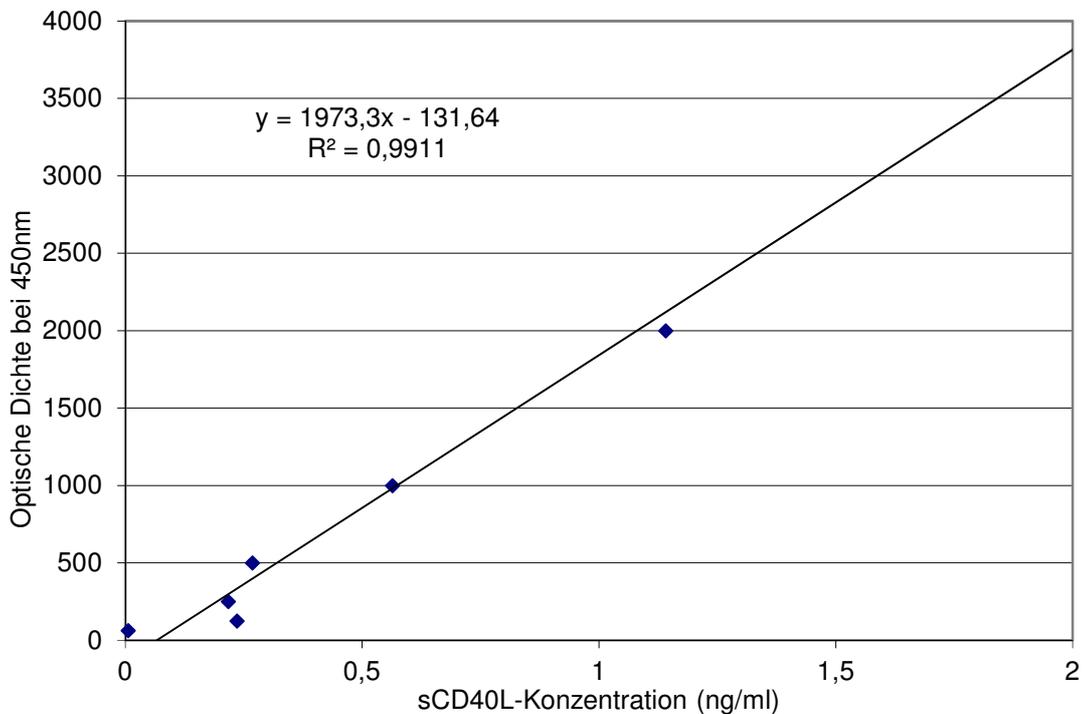


Abb. 12: Ermittelte Standardkurve des humanen sCD40L-ELISA.

Im FACS wurden parallel zur eigentlichen Messung industriell hergestellte und geeichte Fluoreszenzbeads gemessen und als Maßstab für die Rezeptorkopiezahl zugrunde gelegt.

4.2 Darstellung der Ergebnisse

Den dynamischen Prozess der Thrombogenese in seiner Mehrdimensionalität darzustellen ist in Form von Graphiken nur unzureichend möglich: Nach Bindung der Thrombozyten an Kollagen als thrombogene Oberfläche bildet sich die sogenannte Thrombusgrundfläche (base area), gemessen in μm^2 . Anschließend wächst der Thrombus in seiner Höhe und im Volumen, gemessen in μm bzw. μm^3 , das ganze gemessen zu verschiedenen Messzeitpunkten während der Versuchszeit.

Die Ergebnisse werden in dieser Arbeit in zweidimensionalen Graphiken gezeigt, in der die Änderungen der morphologischen Parameter der Thrombogenese sowie die innerhalb des Messbereichs registrierte Thrombenzahl über die Zeit dargestellt sind.

4.3 Intraindividuelle Varianz der Messmethode

Zur Untersuchung der intraindividuellen Varianz der Messmethode wurden unter Standardbedingungen wiederholt Strömungsexperimente mit Blut desselben Probanden durchgeführt. Er wies den homozygoten HPA 1a-Genotyp des $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Rezeptors auf. Für jeden Versuch erfolgte eine neue venöse Blutentnahme unmittelbar vor Versuchsbeginn. Alle Experimente wurden unter gleichen Bedingungen bei einer Scherrate von 1000 sec^{-1} durchgeführt. Die Zeitabstände zwischen den Tests lagen zwischen 60 Minuten und 2 Wochen.

Insgesamt wurden 10 Versuche mit nativem venösem Vollblut einer gesunden, 23 Jahre alten, weiblichen Probandin, die keine Medikamente einnahm, durchgeführt.

Dargestellt sind das Gesamt- und Einzelthrombusvolumen, die Einzelthrombushöhe, die Thrombusgrundfläche sowie die Thrombenzahl. Gezeigt sind jeweils das arithmetische Mittel und die Standardabweichung als vertikale Fehlerindikatorbalken für jeden Messzeitpunkt.

Auf der Abszisse ist die Versuchszeit in Sekunden (von 0 bis 625 Sekunden) aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Messwerte für die oben angegebenen Parameter dargestellt.

Zusätzlich ist jeweils das Ergebnis eines identisch durchgeführten Experiments unter Zugabe des $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Antagonisten Abciximab (ReoPro Konzentration $2\mu\text{g/ml}$) dargestellt.

4.3.1 Validierung der Messergebnisse

4.3.1.1 Gesamthrombusvolumen

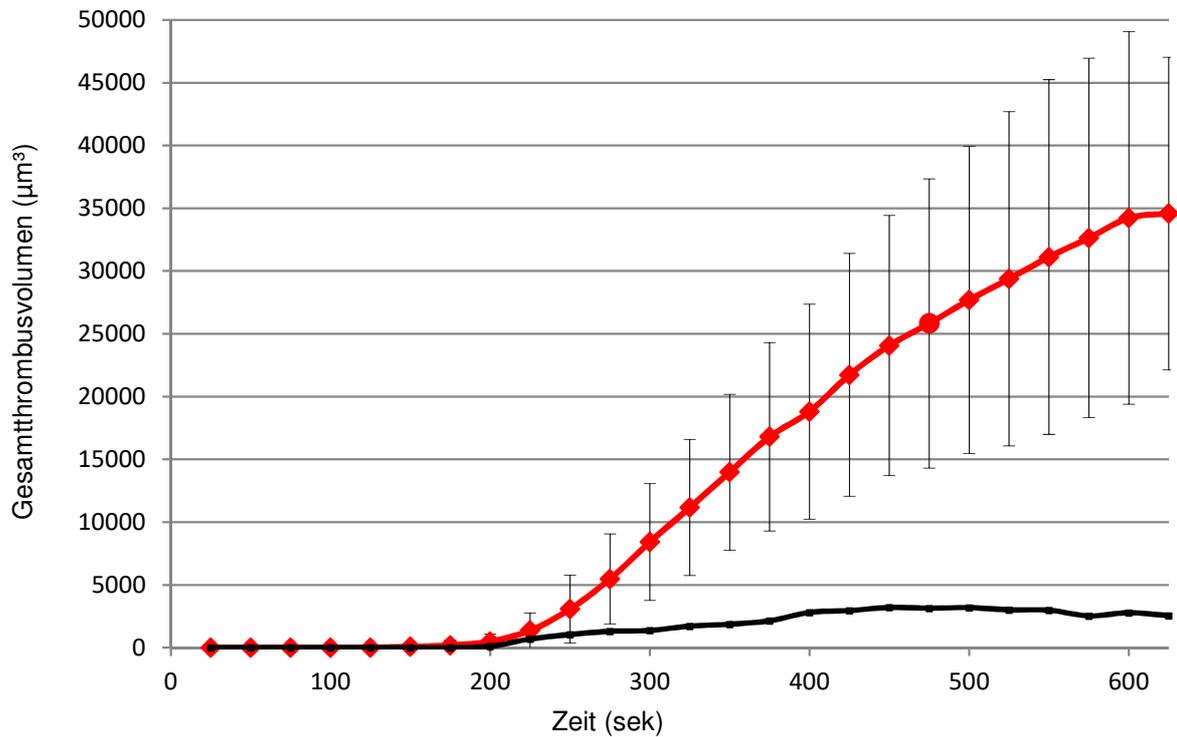


Abb. 13: Mittleres Gesamthrombusvolumen. Rot dargestellt die Ergebnisse mit antikoaguliertem Vollblut eines homozygoten HPA-1a-Spenders (Mittelwert aus n=10 mit Standardabweichung), schwarz dargestellt Versuche mit Blut desselben Spenders unter Zugabe des α IIb β ₃ - Antagonisten Abciximab.

Nach einer anfänglichen Latenzperiode von etwa 125 Sek, in denen das Thrombuswachstum den Cut-off-Wert noch nicht überschritt, folgte eine sichtbare Zunahme des Thrombuswachstums über den gesamten weiteren Verlauf. Kurz vor Ende des Experiments nach etwa 10 Minuten erreichte das Thrombuswachstum sein Maximum bei ca. 34000µm³ und blieb auf diesem Level konstant.

Bei Hinzugabe von Abciximab erfolgte kein signifikantes Thrombuswachstum.

4.3.1.2 Einzelthrombusvolumen

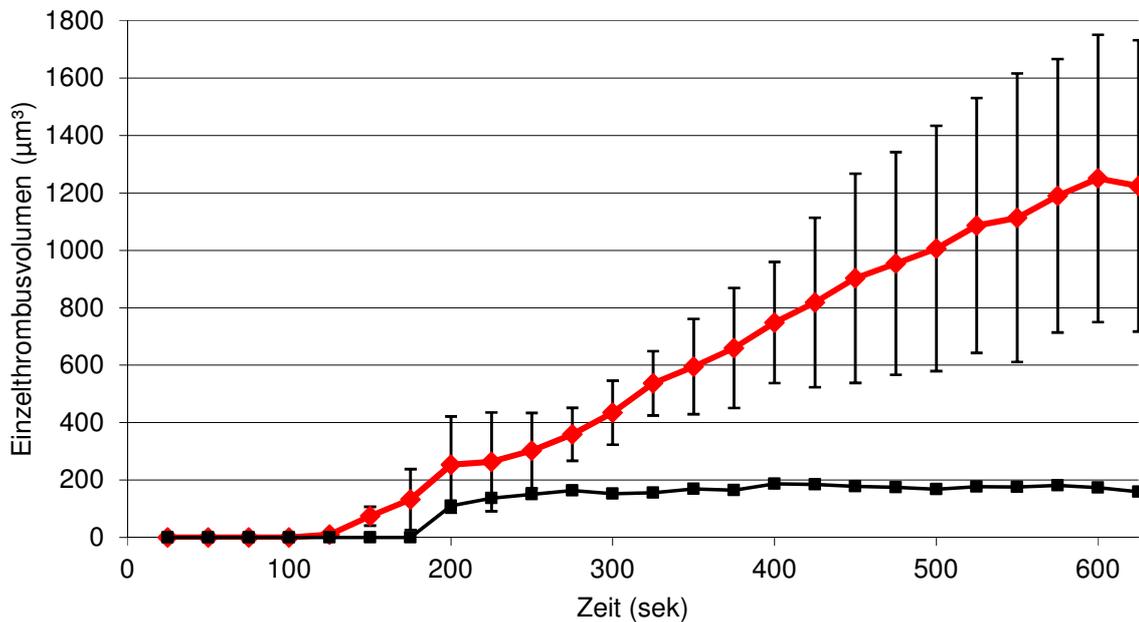


Abb. 14: Mittleres Einzelthrombusvolumen. Rot dargestellt die Ergebnisse mit antikoaguliertem Vollblut eines homozygoten HPA-1a-Spenders (Mittelwert aus n=10 mit Standardabweichung), schwarz dargestellt Versuche mit Blut desselben Spenders unter Zugabe des $\alpha_{IIb}\beta_3$ - Antagonisten Abciximab.

Ähnlich der Entwicklung des Gesamthrombusvolumens sind entsprechend die Ergebnisse bei der Ermittlung des Einzelthrombusvolumens. Nach Erreichen des „Cut-off“-Wertes nach ca. 125 Sek kam es initial im Intervall bis 300 Sek zu einem allmählichen Anstieg des Volumens um dann bis zum Zeitpunkt 600 Sek in einem etwas steileren Verlauf ein Maximum zu erreichen.

Die im Vergleich dazu durchgeführten Versuche unter Zugabe des $\alpha_{IIb}\beta_3$ - Antagonisten Abciximab („ReoPro“; Konzentration 2µg/ml) zeigten hingegen eine fast komplette Hemmung des Thrombuswachstums mit nur geringem Anstieg der Kurve nach 175 Sek und anschließend parallel zur Abszisse verlaufender Kurve mit stagnierendem Wachstum.

4.3.1.3 Einzelthrombushöhe

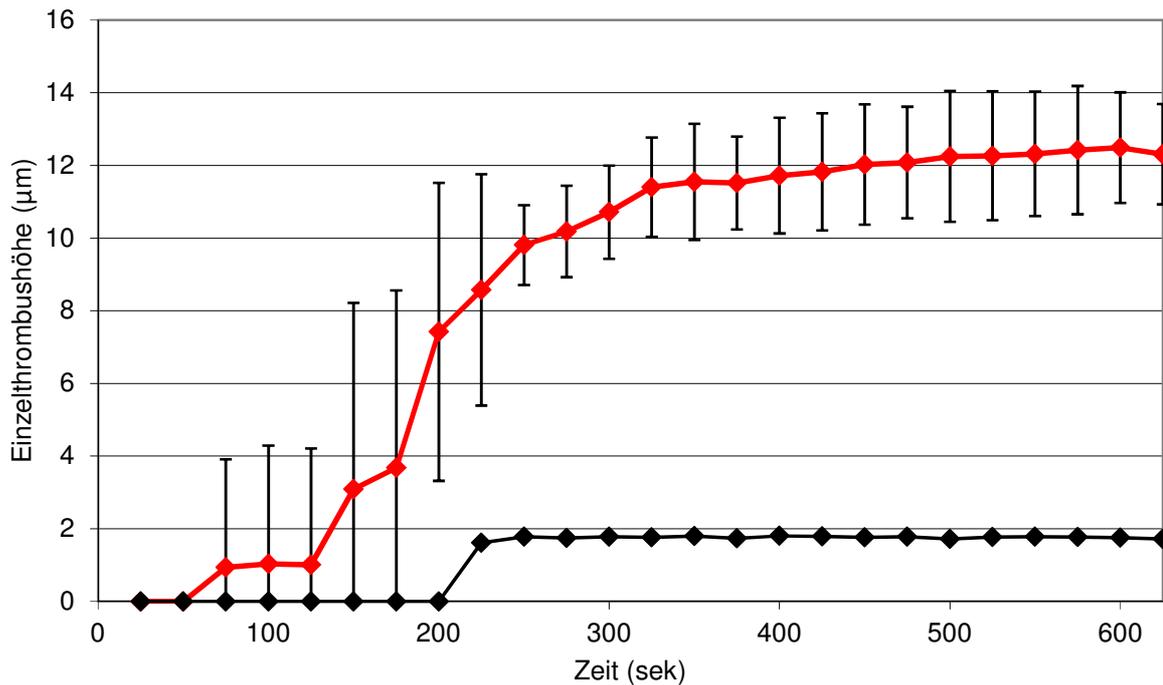


Abb. 15: Mittlere Einzelthrombushöhe. Rot dargestellt die Ergebnisse mit antikoaguliertem Vollblut eines homozygoten HPA-1a-Spenders (Mittelwert aus n=10 mit Standardabweichung), schwarz dargestellt Versuche mit Blut desselben Spenders unter Zugabe des α IIb β 3 – Antagonisten Abciximab.

Bezüglich der Höhe des einzelnen Thrombus zeigte sich nach Erreichen des Cut-off-Volumens bereits nach 75 Sek eine Steigung parallel zur Abszisse um dann nach 125 Sek unter Durchlaufen zweier flacher Anstiege zwischen 150 und 175 bzw. 200 und 225 Sek einen steilen Verlauf zu nehmen. Nach 325 Sek erreichte die Thrombushöhe ihr Maximum bei ca. 12,2 µm und verlief bis zum Versuchsende annähernd parallel zur Abszisse.

4.3.1.4 Einzelthrombusgrundfläche

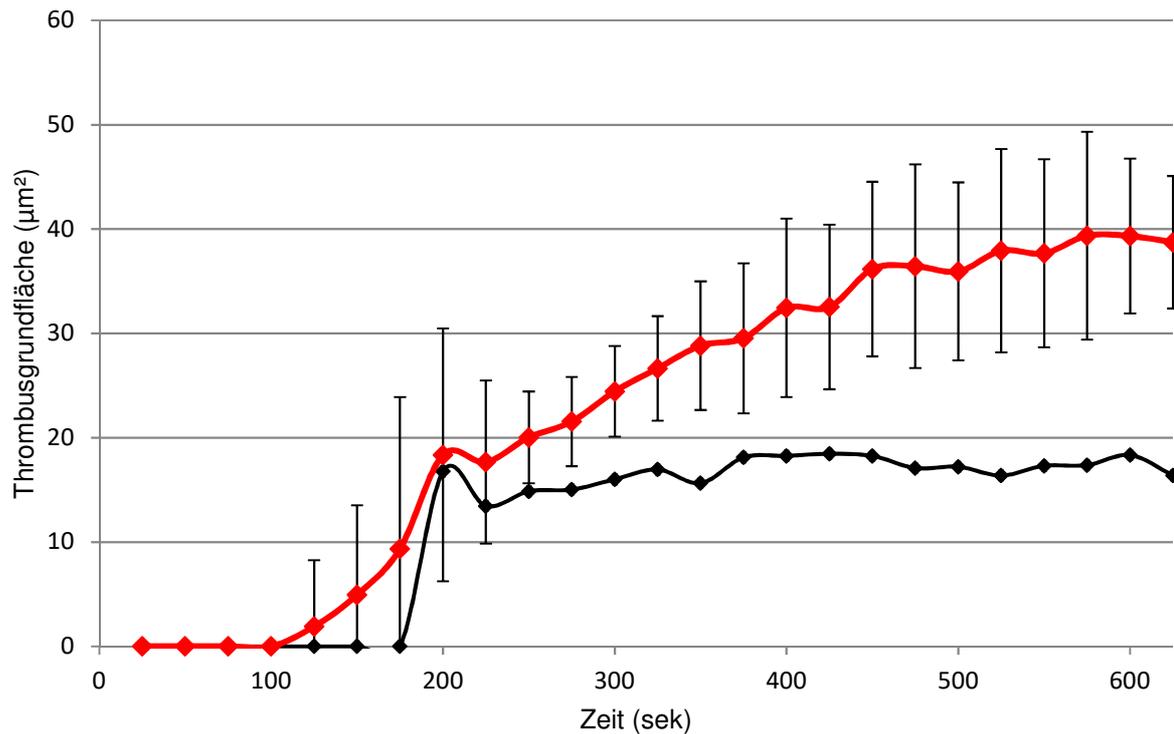


Abb.16: Mittlere Einzelthrombusgrundfläche. Rot dargestellt die Ergebnisse mit antikoagulierte Vollblut eines homozygoten HPA-1a-Spenders (Mittelwert aus n=10 mit Standardabweichung), schwarz dargestellt Versuche mit Blut desselben Spenders unter Zugabe des α IIb β 3 – Antagonisten Abciximab.

Nach 125 Sek zeigte sich eine steile Zunahme der Thrombusgrundfläche durch Adhäsion an die Kollagenmatrix bis zum Erreichen eines vorläufigen Maximums bei ca. 90 μ m². Im weiteren Verlauf nahm die Thrombusgrundfläche mit flacherer Steigung stetig weiter zu um nach ca. 600 Sek ihr Maximum bei ca. 194 μ m² zu erreichen.

Die Standardabweichung lag hier nach Erreichen der Plateauphase bei ca. 20%.

4.3.1.5 Einzelthrombenanzahl

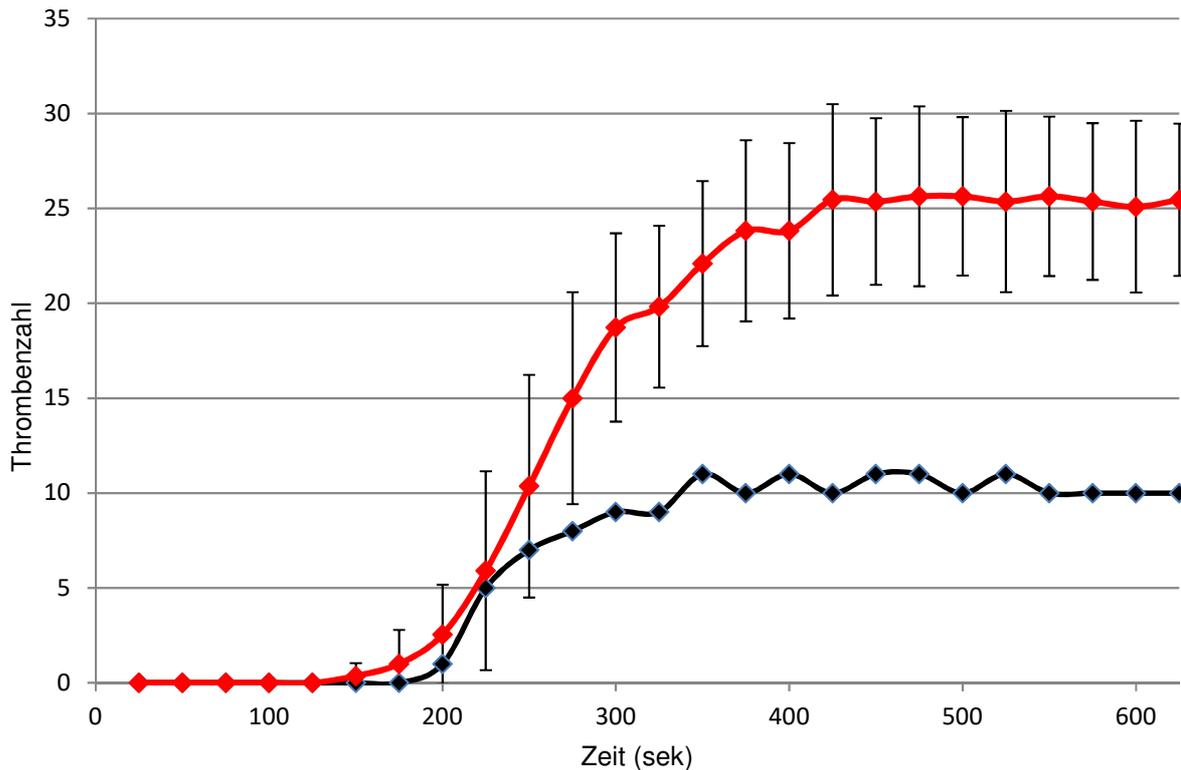


Abb. 17 : Mittlere Einzelthrombenzahl. Rot dargestellt die Ergebnisse mit antikoaguliertem Vollblut eines homozygoten HPA-1a-Spenders (Mittelwert aus n=10 mit Standardabweichung), schwarz dargestellt Versuche mit Blut desselben Spenders unter Zugabe des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten Abciximab.

Nach Erreichen des Cut-off-Volumens nach 125 Sek stieg die Thrombenzahl bis ca. 425 Sek an um sich dann bei einem Maximum von ca. 25 Thromben im Messfeld zu stabilisieren.

Auch unter Inhibition durch Abciximab (ReoPro) bildeten sich wie hier dargestellt scheinbar Thromben. Dies ist unter anderem dadurch zu erklären, dass Abciximab zwar die Plättchen-Plättchen-Interaktion durch Hemmung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ minimiert, die Adhäsion an die thrombogene Oberfläche bleibt jedoch unbeeinträchtigt.

Die Standardabweichung lag bei diesem Parameter zwischen 56% zu Beginn des Thrombuswachstums und 15% nach Erreichen der Plateauphase.

4.4 Wirkung verschiedener sCD40L-Dosierungen auf das Thrombuswachstum

Aufbauend auf die unter 4.3 dargestellten Ergebnisse wurde untersucht, ob der Zusatz von löslichem CD40L (sCD40L) unmittelbar vor Versuchsbeginn Auswirkungen auf die Thrombogenese hat.

Für die Experimente wurde rekombinantes lösliches humanes CD40L (human sCD40L) aus industrieller Herstellung verwendet und mit PBS-Puffer verdünnt.

Es wurden Experimente unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von rekombinantem sCD40L zu antikoaguliertem Vollblut durchgeführt, hierzu wurde das Blut des bereits in den vorherigen Experimenten untersuchten Probanden verwendet. Eine definierte Konzentration wurde jeweils exakt

5 Minuten vor Beginn des Strömungsexperimentes zugegeben und die Wirkung auf die Thrombogenese anhand der Messwerte Gesamt – und Einzelthrombusvolumen, Thrombuszahl und Einzelthrombusgrundfläche sowie –höhe bewertet.

Um die sCD40L-Konzentration, die wir für die Versuchsreihen verwendeten vor Beginn der Testreihen grob festzulegen orientierten wir uns an den in der Literatur angegebenen Konzentrationen von sCD40L, die in Patientenkollektiven ermittelt worden waren, bei denen atherothrombotische Ereignisse akut aufgetreten waren (54,56,58,63,67).

4.4.1 Spezifität der Wirkung von sCD40L auf die Thrombogenese durch Bindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Zur Kontrolle der Spezifität der sCD40L-Wirkung via $\alpha_{IIb}\beta_3$ erfolgten Experimente unter Zugabe von Abciximab (Reopro), einem spezifischen Antagonisten des Integrins und gleichzeitiger Substitution von sCD40L. Hier konnte kein Effekt von sCD40L auf die Thrombogenese nachgewiesen werden.

4.4.2 Versuche mit verschiedenen sCD40L-Konzentrationen in physiologischen Dosierungen

4.4.2.1 Gesamtthrombusvolumen

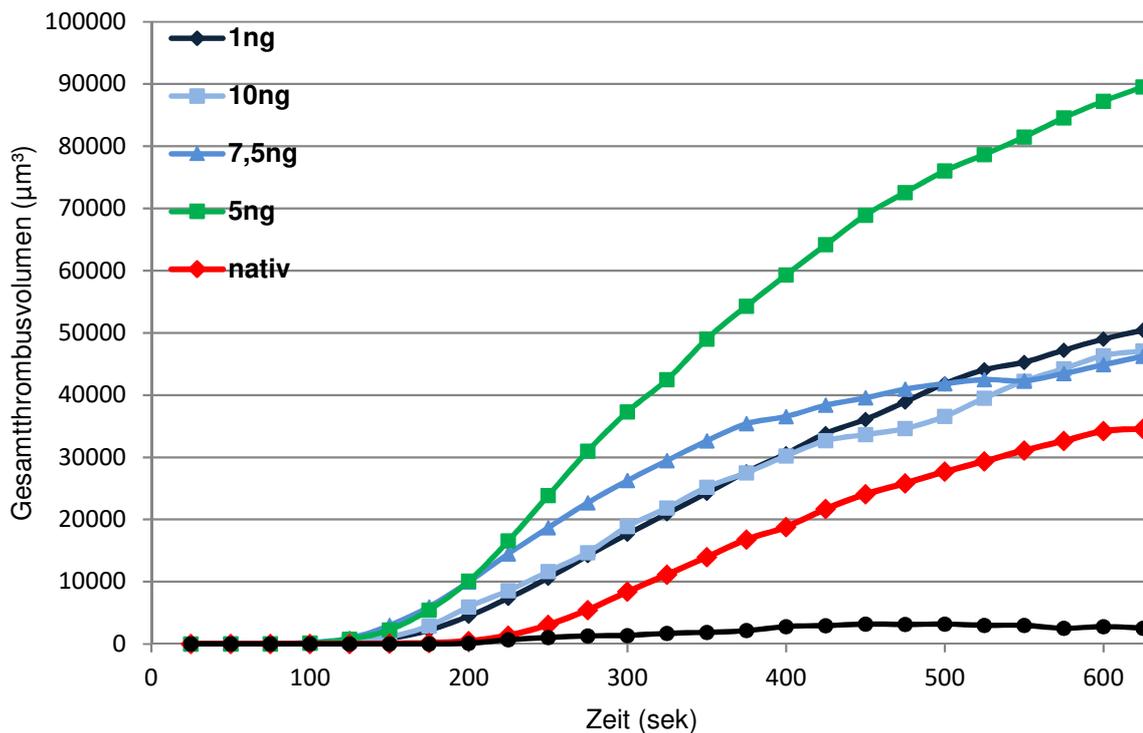


Abb. 18: Mittleres Gesamtthrombusvolumen nach Zugabe von sCD40L; mittleres Gesamtthrombusvolumen nach Zugabe von 1/5/7,5/10ng pro ml sCD40L und Abciximab mit sCD40L 5ng/ml. Der Übersichtlichkeit halber wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Die Standardabweichung betrug bei den Experimenten mit 5ng/ml sCD40L im Mittel ca. 25%.

Unter Zusatz von sCD40L in Konzentrationen zwischen 1 und 10ng/ml zeigten sich folgende Effekte auf das mittlere Gesamthrombusvolumen:

- Alle Proben mit sCD40L erreichten früher das Cut-Off-Volumen als unter Nativbedingungen. Ein messbares Thrombuswachstum wurde nach 125 Sek erreicht.
- Das erzielte maximale Gesamthrombusvolumen war bei allen Messreihen höher als mit antikoaguliertem Vollblut.
- Das höchste Gesamthrombusvolumen wurde erzielt unter Zusatz von 1 bzw. 5ng sCD40L pro ml. Es bestand ein statistisch signifikanter Unterschied im maximalen Gesamthrombusvolumen zwischen 5ng/ml und dem Experiment mit antikoaguliertem Vollblut ($p=0,01$).
- Im Vergleich zu den anderen Versuchsreihen nahm das Thrombusvolumen unter Zugabe von 5ng/ml sCD40L schneller und deutlich stärker zu. In der Versuchszeit von 625 Sek wurde scheinbar noch nicht das mögliche Gesamthrombusvolumen erreicht.

4.4.2.2 Mittleres Einzelthrombusvolumen

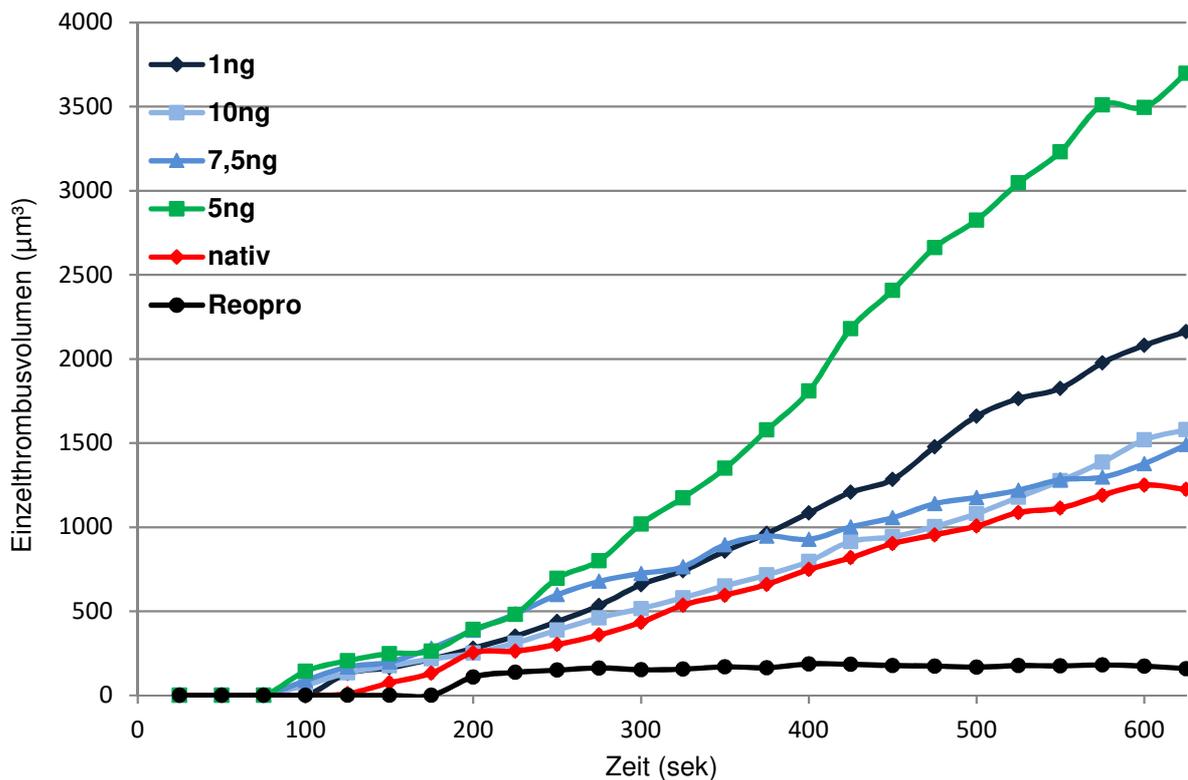


Abb. 19: Mittleres Einzelthrombusvolumen nach Zugabe von sCD40L. Dargestellt sind Mittelwerte der einzelnen Messreihen (10ng/7,5ng pro ml jeweils n=3, 5ng und 1ng pro ml jeweils n=5, nativ n=10). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Standardabweichungen hier nicht dargestellt.

Die Ergebnisse bezüglich des mittleren Einzelthrombusvolumens zeigten:

- Der „cut-off-Wert“ wurde unter Zugabe von sCD40L in Konzentrationen zwischen 1 und 10ng/ml sCD40L früher erreicht als mit antikoagulierte Vollblut (im Mittel nach 75 bis 100 Sek).
- Das Einzelthrombusvolumen zeigte nach Erreichen des Cut-off-Wertes im Messbereich zwischen 100 und 250 Sek eine langsame Zunahme mit flacher Steigung der Graphen.
- Nach ca. 300 Sek nahm das mittlere Einzelthrombusvolumen unter Zugabe von 5ng/ml sCD40L stark zu. Bis zum Ende des Experimentes war noch kein Plateau erreicht.
- Einen ähnlichen Verlauf mit insgesamt jedoch geringerer Steigung nahm das Thrombusvolumen unter Zugabe von 1ng sCD40L/ml.

Bezüglich des maximalen Einzelthrombusvolumens bestand ein signifikanter Unterschied zwischen dem Experiment mit Vollblut und den Versuchsreihen mit Zusatz von 5ng sCD40L/ml ($p < 0,05$).

Die maximalen Einzelthrombusvolumina unter Zugabe von 7,5ng/ml und 10ng/ml sCD40L zeigten keinen signifikanten Unterschied zum Experiment mit antikoagulierte Vollblut.

4.4.2.3 Mittlere Thrombenzahl

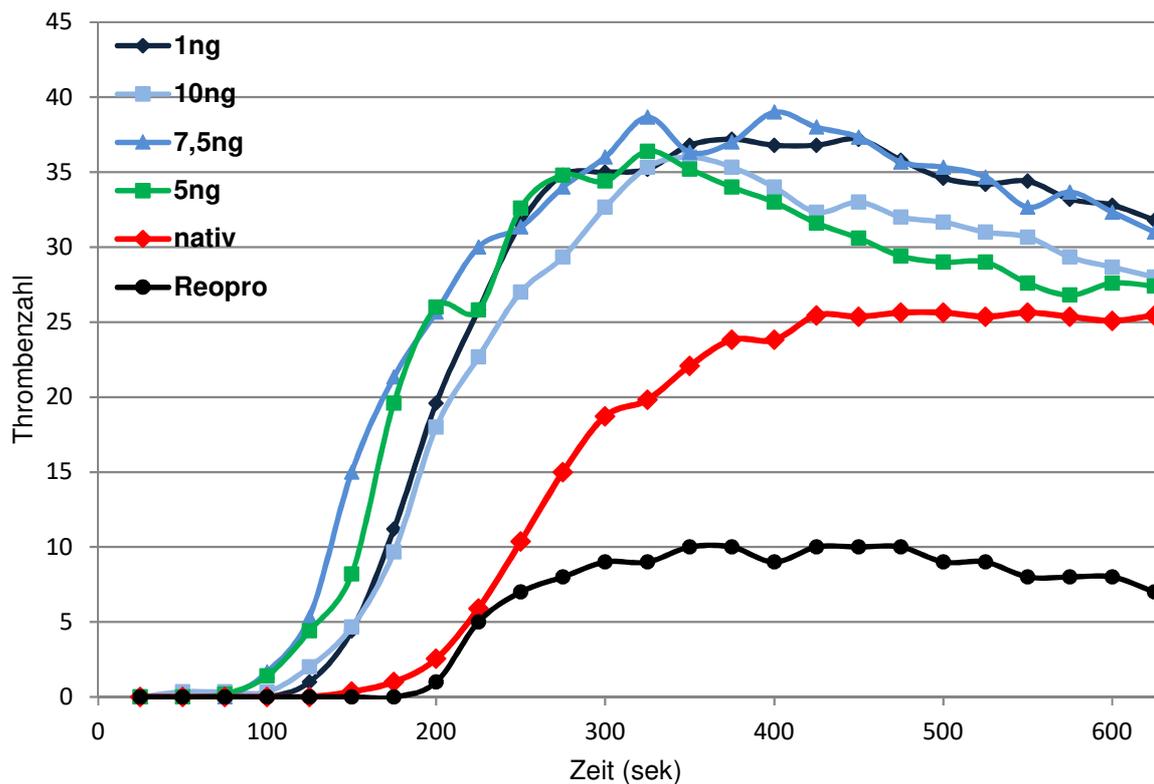


Abb. 20: Mittlere Thrombenzahl nach Zugabe von sCD40L. Dargestellt sind Mittelwerte der einzelnen Messreihen (10ng/7,5ng pro ml jeweils n=3, 5ng und 1ng pro ml jeweils n=5, nativ n=10). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Standardabweichungen nicht dargestellt.

Die Ergebnisse bezüglich der mittleren Einzelthrombenzahl sind wie folgt:

- Unter Zugabe aller gewählten sCD40L-Konzentration wurde auch hier früher der „cut-off“-Wert erreicht. Bei Zugabe von 5ng und 7,5ng/ml sCD40L wurden bereits nach 75 Sek Thromben gemessen, bei Zusatz von 10ng und 1ng/ml bereits nach 100 Sek. Im Versuch ohne Zugabe von sCD40L wurden die ersten Thromben nach 125 Sek gemessen.
- Die maximale Thrombenzahl war unter Zusatz von sCD40L jeder gewählten Konzentration höher ohne Zugabe von sCD40L, jedoch nicht statistisch signifikant.
- Nach initial rascher Zunahme der Thrombenzahl kam es nach ca. 250 Sek nach Erreichen des Maximums zu einer Abflachung der Kurven.
- Im Gegensatz zum Versuch ohne Zugabe von sCD40L, bei dem sich ein stabiles Maximum bei ca. 25 Thromben im Messfeld einstellte, kam es unter Zugabe von sCD40L zu einem früheren Erreichen des Maximums. Im Verlauf jedoch nahm dieses wieder ab, vermutlich durch das Abreißen von Thromben. Unter Zugabe von 5ng/ml sCD40L war dieser Effekt am stärksten ausgeprägt, gegen Ende des Versuchs wurden nur noch 27 Thromben gemessen, somit wurde fast wieder das Niveau des Nativexperimentes erreicht.
- Die Unterschiede zwischen den einzelnen Messreihen waren diesbezüglich nicht statistisch signifikant.

4.4.2.4 Mittlere Einzelthrombusgrundfläche

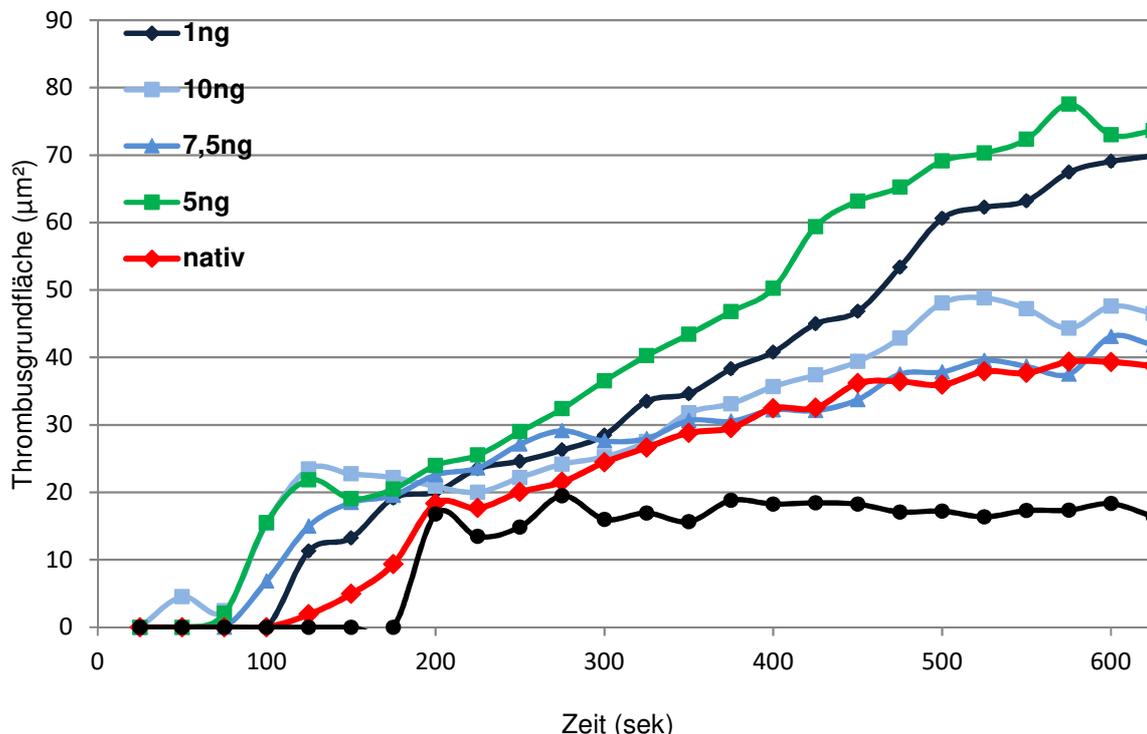


Abb. 21: Mittlere Thrombusgrundfläche nach Zugabe von sCD40L. Dargestellt sind Mittelwerte der einzelnen Messreihen (10ng/7,5ng pro ml jeweils n=3, 5ng und 1ng pro ml jeweils n=5, nativ n=10). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Standardabweichungen nicht dargestellt.

Bezüglich der Einzelthrombusgrundfläche zeigten sich folgende Erkenntnisse:

- Der Cut-off-Wert wurde früher erreicht als unter Nativbedingungen, bereits nach 75 Sek können Werte gemessen werden.
- Alle Versuche unter Zugabe von sCD40L zeigten nach Erreichen des Cut-off-Wertes initial eine rasche Zunahme der Grundfläche auf ca. 20 μm^2 , dies ist ähnlich dem Ergebnis mit antikoaguliertem Vollblut, hier wurde dieser Wert jedoch später erreicht.
- Im weiteren Verlauf nahmen die Werte initial nur noch langsam zu. Nach ca. 300 Sek zeigte sich jedoch wieder eine deutliche und rasche Zunahme der mittleren Einzelthrombusgrundfläche unter Zusatz von 5ng/ml und 1ng/ml sCD40L. Ähnlich wie beim Volumen scheint für die Reihe mit 5ng/ml am Ende des Versuchs noch nicht eindeutig das Maximum erreicht, ein vergleichbares Bild zeigte sich bei Zugabe von 1ng/ml sCD40L.
- Die Zugabe von 10ng/ml und 7,5ng/ml sCD40L zeigten keinen wesentlichen Unterschied in der maximalen Grundfläche im Vergleich zum Nativexperiment.

4.4.2.5 Mittlere Einzelthrombushöhe

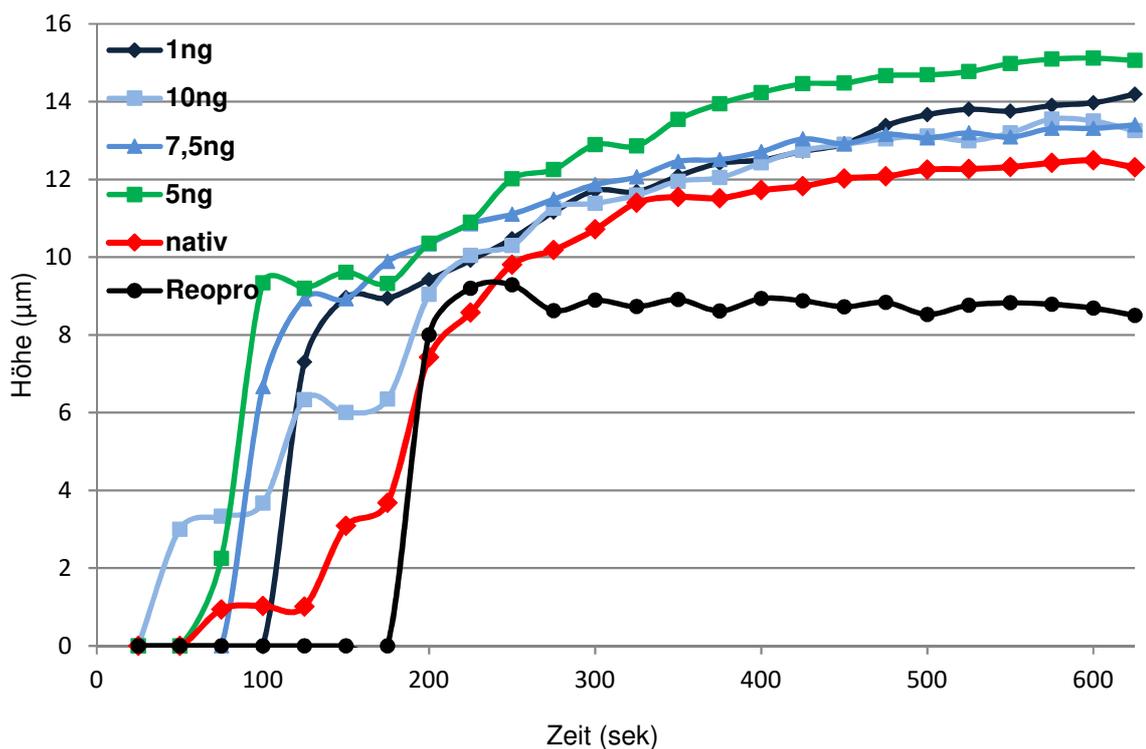


Abb. 22: Mittlere Einzelthrombushöhe nach Zugabe von sCD40L. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Messreihen (10ng/7,5ng sCD40L pro ml jeweils n=3, 5ng und 1ng sCD40L pro ml jeweils n=5, nativ n=10). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Standardabweichungen nicht dargestellt.

Auch bezüglich der mittleren Einzelthrombushöhe zeigten sich Unterschiede zwischen dem Nativexperiment und den Versuchen mit sCD40L:

- Der Cut-off-Wert wurde früher erreicht als im Versuch mit Citrat-antikoaguliertem Vollblut ohne weitere Zusätze.

- Nach einer – ähnlich wie im Experiment mit Vollblut ohne sCD40L - initial raschen Zunahme der Höhe zwischen Erreichen des Cut-off-Wertes und ca. 125 Sekunden nahmen alle Kurven anschließend einen flacheren Verlauf um nach ca. 400 Sekunden annähernd ihr Maximum zu erreichen.
- Die höchsten Werte wurden unter Zugabe von 5ng/ml sCD40L gemessen. Der Unterschied in der maximalen Höhe ist statistisch signifikant zum Experiment ohne sCD40L ($p=0,01$).

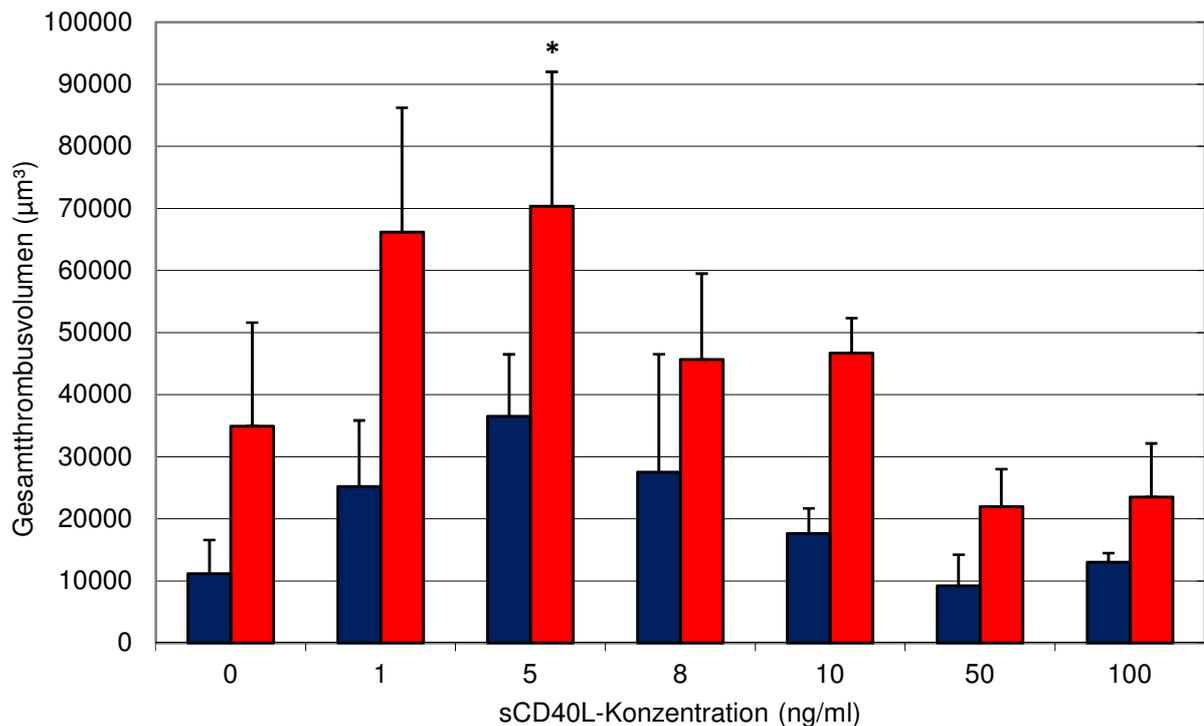


Abb. 23: Mittleres Gesamtthrombusvolumen nach 5 Minuten (blau) bzw. 10 Minuten (rot) mit Standardfehler. (* $p=0,01$)

In den Versuchen unter Zugabe von 5ng/ml sCD40L erreichte das Thrombuswachstum im gewählten Versuchszeitraum von 625 Sekunden scheinbar noch nicht das Maximum. Um diesen Sachverhalt weiter zu klären führten wir daher ergänzend exemplarisch Untersuchungen mit 5ng/7,5ng/10ng pro ml sCD40L durch.

4.4.3 Ergebnisse bei längerem Beobachtungszeitraum

Wir führten Versuche unter Zugabe von 5ng, 7,5ng und 10ng/ml sCD40L durch. Der Versuchsaufbau war identisch zu den bisherigen Experimenten, der Beobachtungszeitraum wurde jedoch auf 875 Sekunden verlängert.

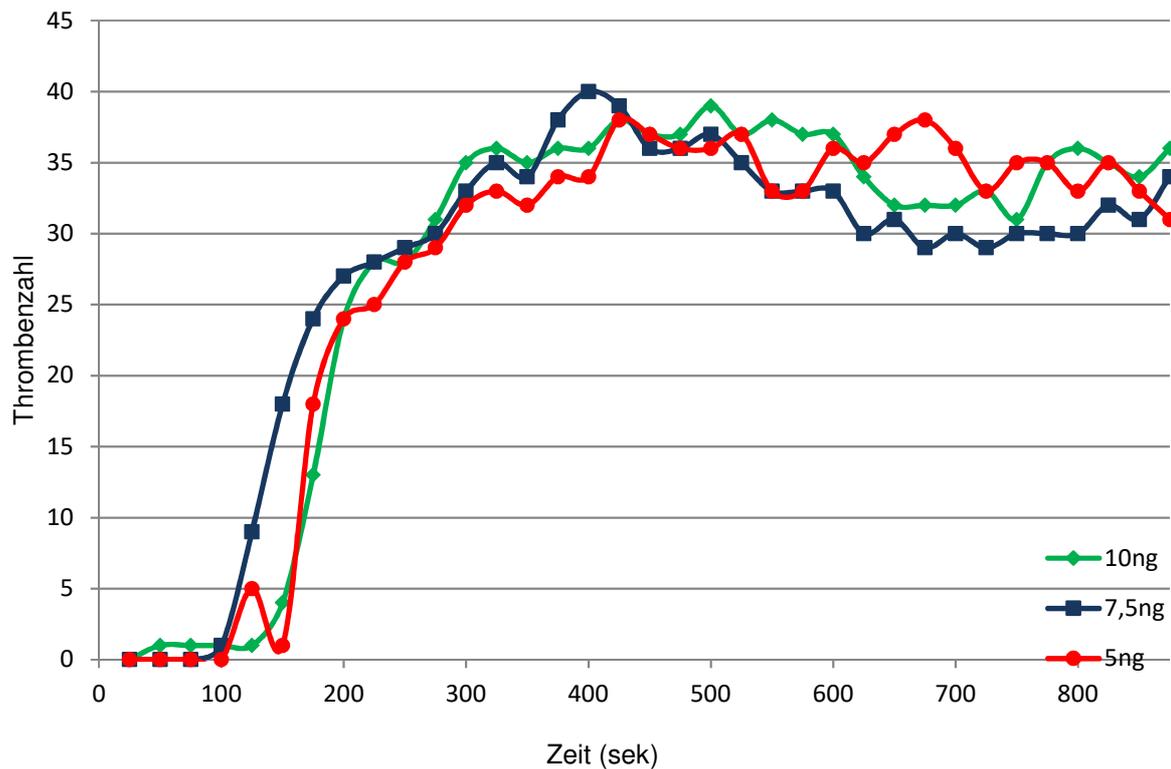


Abb. 24: Mittlere Thrombenzahl unter Zusatz von sCD40L. Dargestellt sind die Versuche mit venösem Vollblut unter Zugabe von 5/7,5 bzw. 10ng/ml sCD40L. Für jede Versuchsreihe ist der Mittelwert aus jeweils n=2 Versuchen dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber sind die Standardabweichungen nicht dargestellt.

Bezüglich der mittleren Thrombenzahl ergaben sich keine neuen Erkenntnisse, zwischen den verschiedenen sCD40L-Konzentrationen ergab sich kein signifikanter Unterschied.

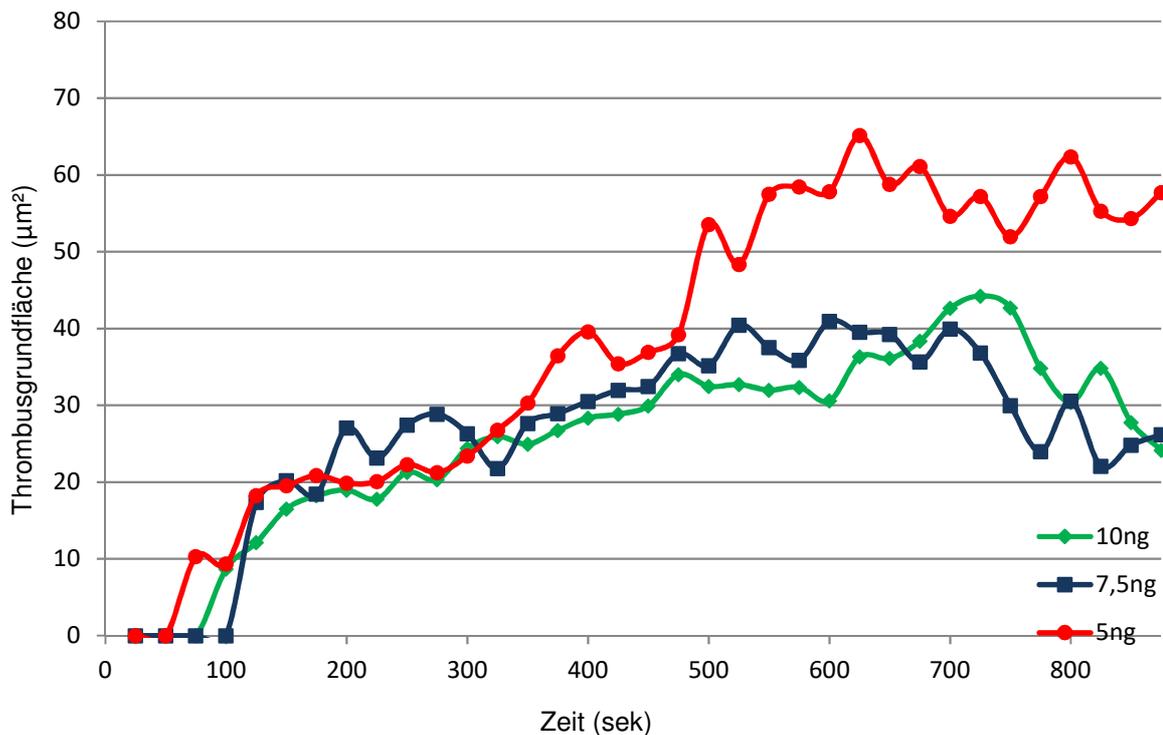


Abb. 25: Mittlere Thrombusgrundfläche unter Zugabe von sCD40L. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils n=3 Versuchen unter Zugabe von 5/7,5ng und 10ng/ml sCD40L.

Die Thrombusgrundfläche stellt sich wie folgt dar:

- 600 Sek ein Maximum bei ca. $58\mu\text{m}^2$. Im Versuch mit 5ng/ml sCD40L erreichte die mittlere Einzelthrombusgrundfläche nach ca.
- Nach Erreichen des Cut-off-Wertes kam es im Zeitraum zwischen 125 und 475 Sek zu einer langsam stetigen Zunahme der Grundfläche um anschließend noch einmal zwischen 475 und 500 Sek einen größeren Sprung auf ca. $50\mu\text{m}^2$ zu machen.
- Der weitere Verlauf war langsam stetig zunehmend um dann rasch nach ca. 550 Sek das Maximum zu erreichen. Dieses Maximum blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraums stabil.
- Die Versuche mit 10ng/ml und $7,5\text{ng/ml}$ sCD40L zeigten nach Erreichen des Cut-off-Wertes eine langsam stetige Zunahme, beide erreichten nach etwa 500 Sek ihr Maximum bei ca. $40\mu\text{m}^2$. Dieses blieb bis ca. 700 Sek stabil um anschließend leicht abzufallen.

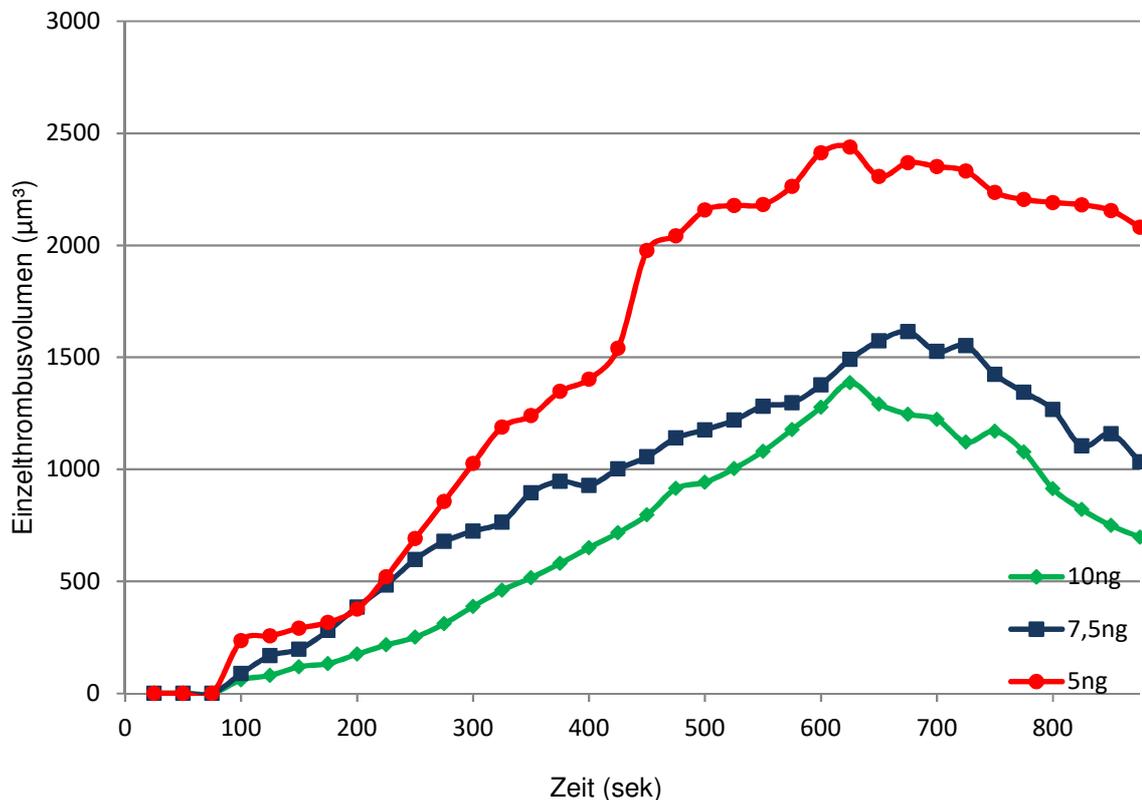


Abb. 26: Mittleres Einzelthrombusvolumen. Gezeigt sind die Mittelwerte nach Zugabe von 5/7,5ng bzw. 10ng/ml sCD40L aus jeweils $n=3$.

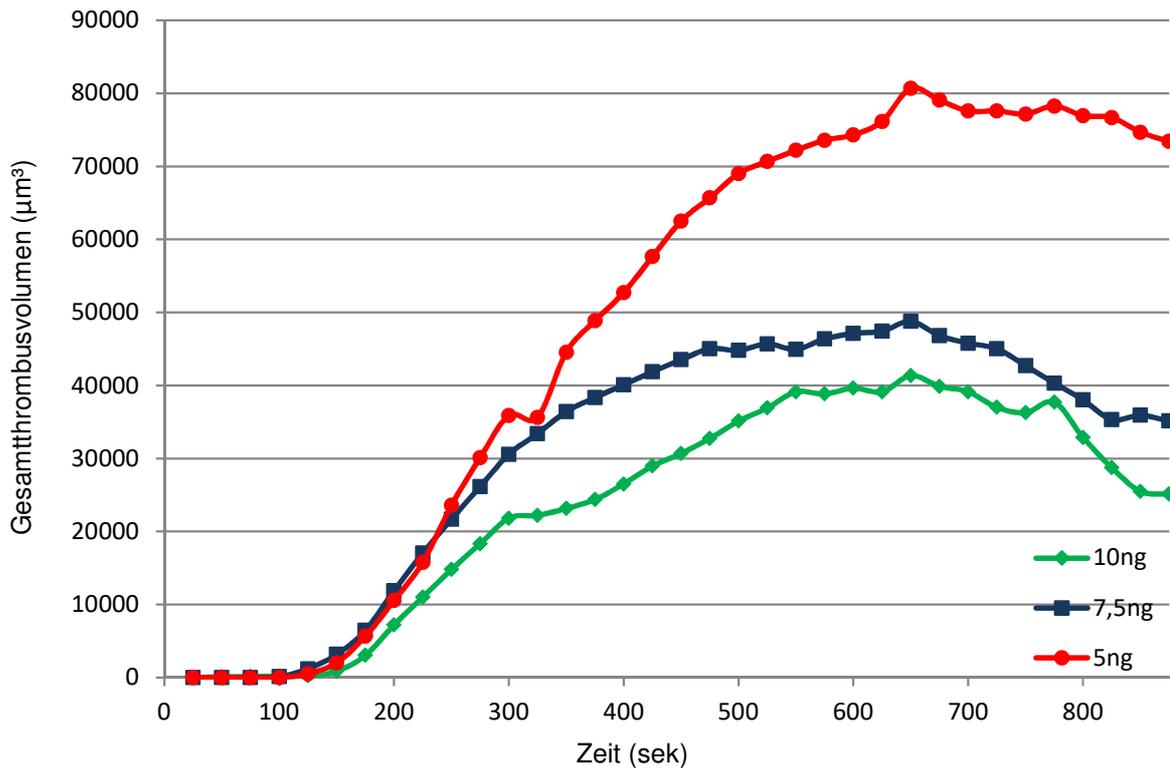


Abb. 27: Mittleres Gesamtthrombusvolumen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus n=3 für 5/7,5/10ng pro ml sCD40L.

Das mittlere Einzel- und Gesamtthrombusvolumen stellte sich wie folgt dar:

- Die Versuchsreihen 10ng/ml und 7,5ng/ml sCD40l zeigten nach Erreichen des Cut-off-Wertes nach 175 Sek eine rasche Zunahme des Volumens bis ca. 375 Sek (10ng/ml etwas später). Beide erreichten dann ein Maximum bei 48000 bzw. 40000µm³, welches bis etwa 600 Sek stabil blieb.
- Im weiteren Beobachtungszeitraum kam es bei beiden Reihen zu einem leichten Rückgang des Volumens auf Werte zwischen 38000 bzw. 28000µm³ im Gesamtthrombusvolumen.
- Die Versuchsreihe 5ng/ml sCD40L erreichte zum gleichen Zeitpunkt das Cut-off-Volumen.
- Initial war der Verlauf des Graphen dem der anderen ähnlich.
- Während die anderen Versuchsreihen nach ca. 400 Sek langsam ein Maximum erreichten nahm das Gesamtthrombusvolumen unter Zugabe von 5ng/ml sCD40L weiter schnell und deutlich zu.
- Erst nach ca. 500 Sekunden erreichte das Thrombusvolumen sein Maximum.
- Im Gegenteil zu den anderen Versuchsreihen blieb dieses bis zum Ende des Beobachtungszeitraums auf maximalem Niveau stabil.

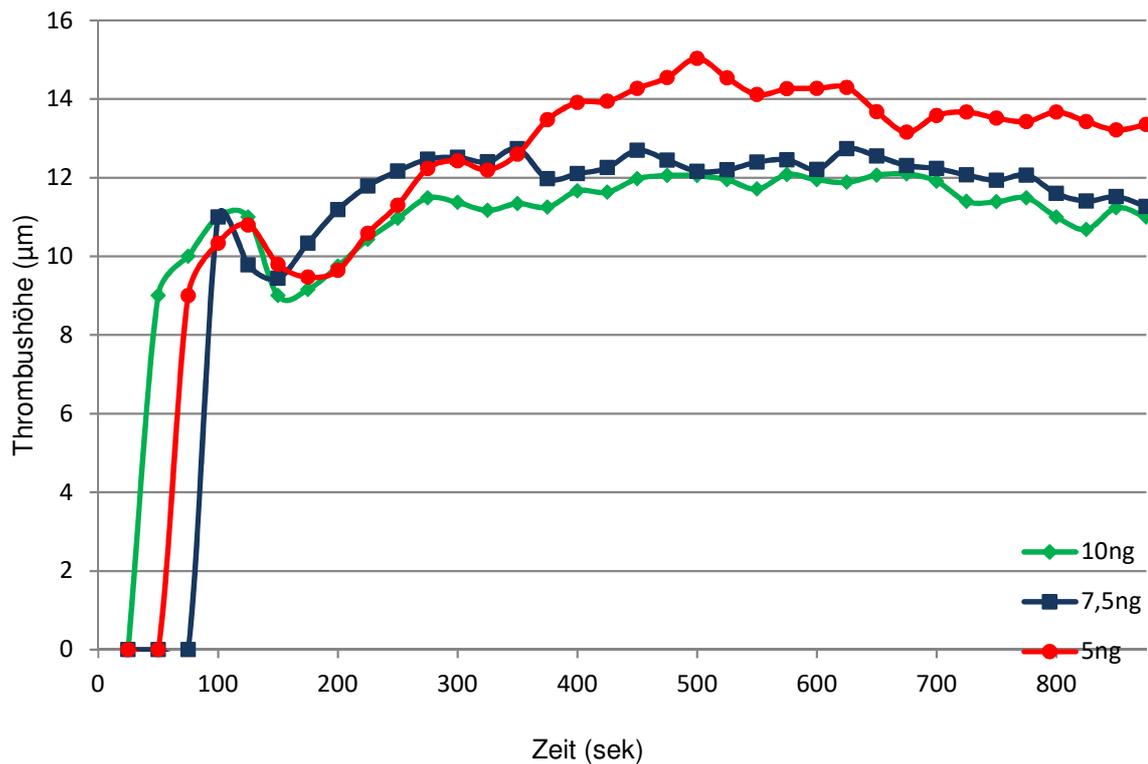


Abb. 28: Mittlere Einzelthrombushöhe. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus n=3 für 5/7,5/10ng pro ml sCD40L.

Bezüglich der Einzelthrombushöhe zeigten sich folgende Ergebnisse:

- 25 bis 75 Sek nach Messbeginn erreichten alle Versuchsreihen den Cut-off-Wert.
- Bei allen Reihen zeigte sich nach Durchlaufen einer vorübergehenden Abnahme der Höhe bei ca. 200 Sek eine langsame Zunahme der Einzelthrombushöhe.
- Die Versuchsreihen 10ng/ml und 7,5ng/ml sCD40L erreichten bereits nach 250 Sek ihr Maximum, das annähernd gleich ist (ca. 12µm). Dieses blieb bei beiden bis zum Ende des Beobachtungszeitraums annähernd stabil.
- Die Versuchsreihe mit 5ng/ml sCD40L erreichte ihr Maximum erst nach ca. 450 Sek (bei ca. 14µm). Auch dieses blieb bis zum Ende des Versuchs auf maximaler Höhe stabil.

4.5 Beeinflussung der Thrombogenese durch sCD40L bei homozygoten HPA-1a/1a- und HPA-1b/1b- Probanden

Um zu untersuchen, ob die an einem homozygoten HPA-1a/1a-Spender gezeigten Eigenschaften von löslichem CD40L auch Unterschiede in Bezug auf den Rezeptorpolymorphismus zeigen, wurden Flussexperimente nach dem beschriebenen Prinzip mit Spenderblut homozygoter HPA-1a/1a und HPA-1b/1b-Blutspender im Vergleich durchgeführt. Das antikoagulierte Vollblutblut wurde mit 5ng/ml sCD40L 5 Minuten vor Experimentbeginn inkubiert.

Die Thrombogenese wurde anhand der morphologischen Parameter Gesamthrombusvolumen, Einzelthrombusvolumen und -höhe sowie Einzelthrombusgrundfläche und Thrombusanzahl bewertet und die Mittelwerte beider Kollektive im zeitlichen Verlauf miteinander verglichen.

Zur Kontrolle möglicher Einflussfaktoren wurden bei jedem Probanden folgende Parameter bestimmt: Thrombozytenzahl/ μ l im antikoagulierten, venösen Vollblut, CD40L-Konzentration im Serum und plättchenfreien Plasma (PPP), Thromboxan B_2 -Konzentration im Serum (zum Ausschluss einer Plättchenhemmung durch Einnahme von Pharmaka) und die Anzahl der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptoräquivalente auf den Thrombozyten.

4.5.1 Kontrolle möglicher Einflussfaktoren

Wie in den folgenden Abbildungen dargestellt bestand bezüglich der untersuchten Einflussfaktoren kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen homozygoten HPA-1a/1a und homozygoten HPA-1b/1b-Probanden.

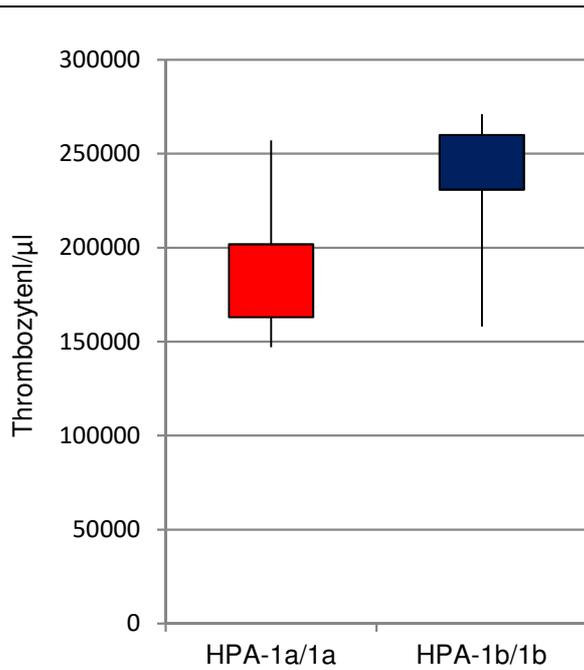


Abb. 29: Thrombozytenkonz./µl. Diese lag beim homozygoten HPA-1a -Kollektiv im Mittel bei 201800/µl mit einer Standardabweichung (SD) von ±50231. Im HPA-1b-Kollektiv lag die Thrombozytenzahl bei 230833/µl mit einer SD von ±39861; p=0,3298.

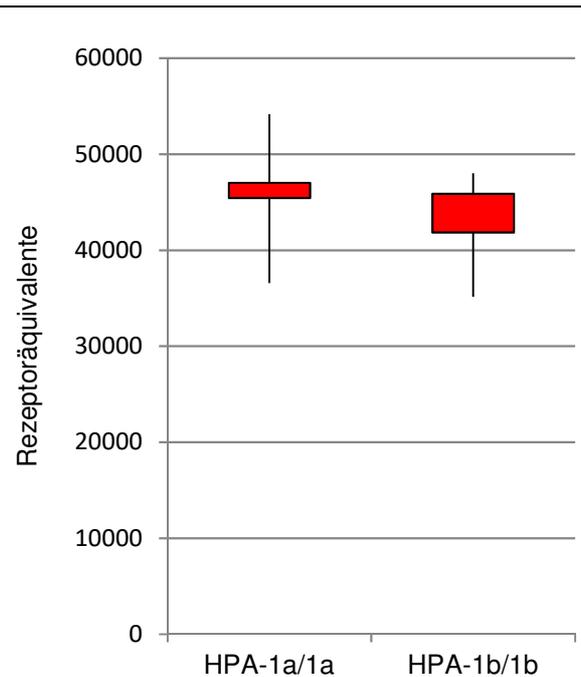


Abb. 30: αIIbβ3-Rezeptoräquivalente. Beim HPA-1a-Kollektiv lag der Mittelwert bei 45455,8, SD ±7704,06, der Mittelwert beim HPA1b-Kollektiv betrug 41853,67 mit einer SD von 4798,09; p=0,6824.

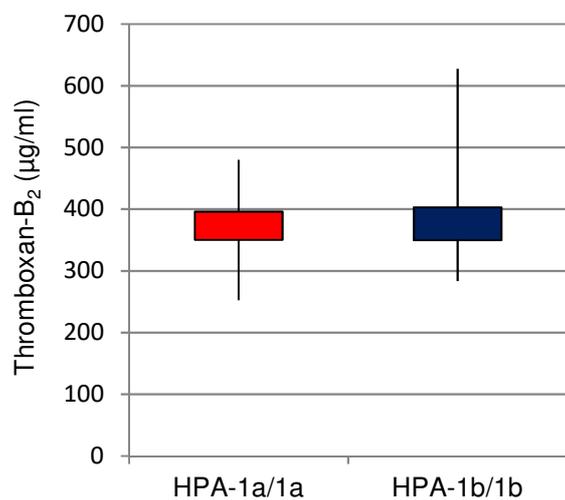


Abb. 31: Thromboxan-B₂-Konzentration im Serum. Die TXB₂-Konzentration lag im Mittel bei 350,446µg/ml im HPA-1a-Kollektiv, SD ±98,191 und bei 403,15µg/ml, SD ±126,90 im HPA-1b-Kollektiv; p=0,46.

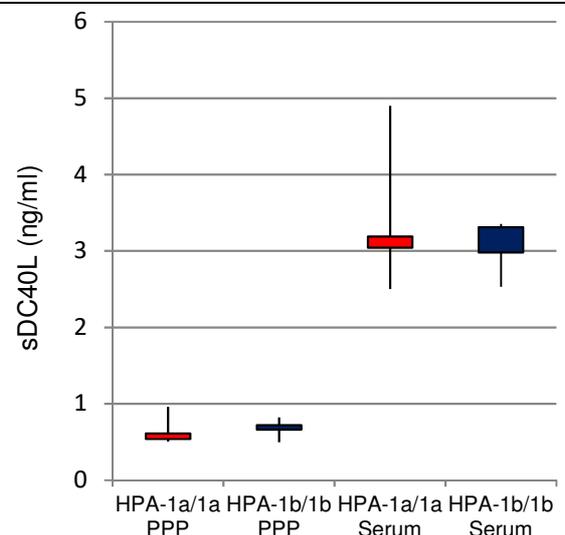


Abb. 32: sCD40L-Konzentration in plättchenfreiem Plasma (PPP) und Serum. Die CD40L-Konzentration in PPP lag beim HPA-1a-Kollektiv bei 0,61ng/ml, SD ±0,195, im HPA1b-Kollektiv bei 0,66ng/ml, SD±0,13. Im Serum lag der Mittelwert im HPA-1a-Kollektiv bei 3,19ng/ml, SD ±0,87; HPA-1b-Mittelwert 2,98ng/ml, SD 0,33; p=0,62 (PPP) bzw. p=0,67 (Serum).

In den Strömungsexperimenten zeigten sich nach Zugabe von 5ng/ml sCD40L folgende Ergebnisse:

4.5.2 Mittlere Thrombenzahl

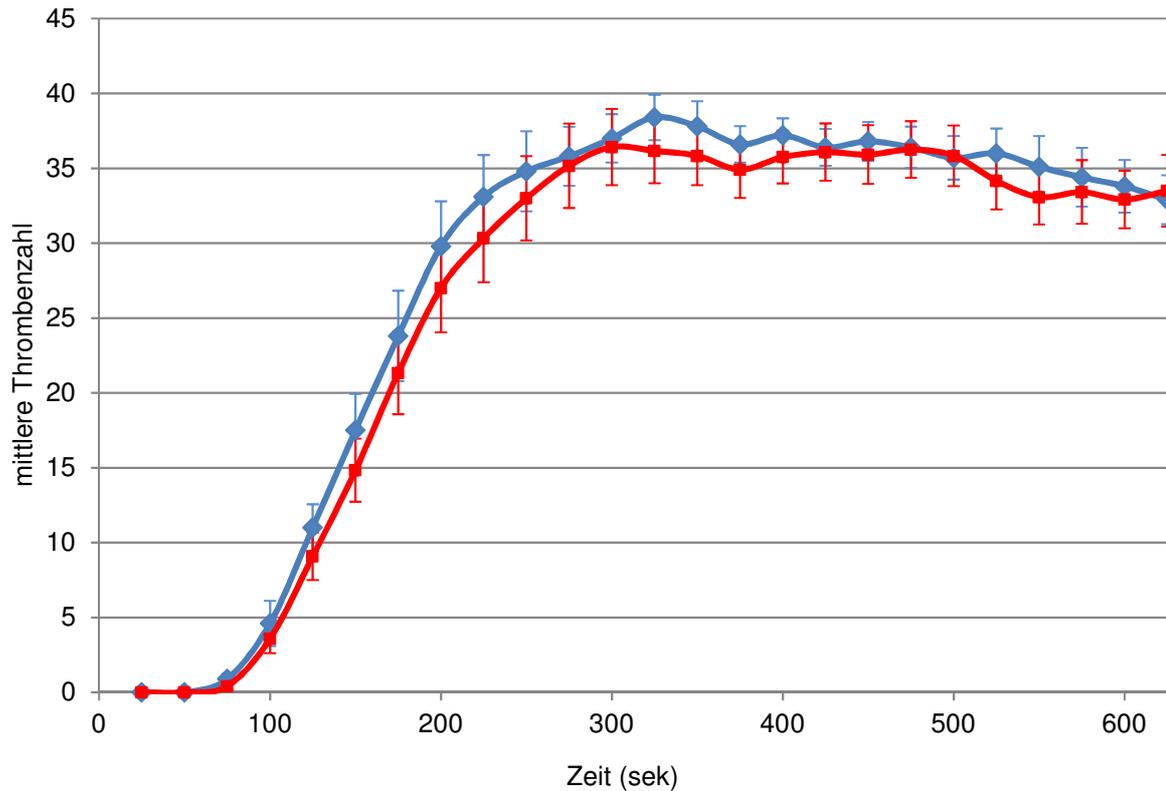


Abb. 33: Mittlere Thrombusanzahl nach Zugabe von 5ng/ml sCD40L; HPA-1a/1a blau (n=5) und HPA-1b/1b (n=6); Dargestellt jeweils die Mittelwerte sowie der mittlere Standardfehler.

Im Vergleich zwischen den homozygoten HPA-1a/1a- und dem HPA-1b/1b-Kollektiven ergaben sich bezüglich der Thrombenzahl keine signifikanten Unterschiede nach Zugabe von 5ng/ml sCD40L ($p=0,52$). Nach einer Latenzzeit von ca. 75 Sek, in der bei beiden Genotypen das „cut-off-Volumen“ noch nicht erreicht wurde, kam es bei beiden Kollektiven im Zeitraum zwischen 75 und 300 Sek zu einer nahezu linearen Zunahme der Thrombenzahl auf maximale Werte von 38 (HPA-1a/1a) bzw. 37 Thromben (HPA-1b/1b) im untersuchten Feld. In beiden Kollektiven ging die Thrombuszahl nach ca. 300 Sek in eine Plateauphase mit annähernd konstanter Thrombuszahl über. Nach 500 Sek verringerte sie sich gering und stagnierte am Versuchsende bei 33 (HPA-1a/1a) bzw. 34 (HPA-1b/1b) Thromben.

4.5.3 Mittlere Einzelthrombusgrundfläche

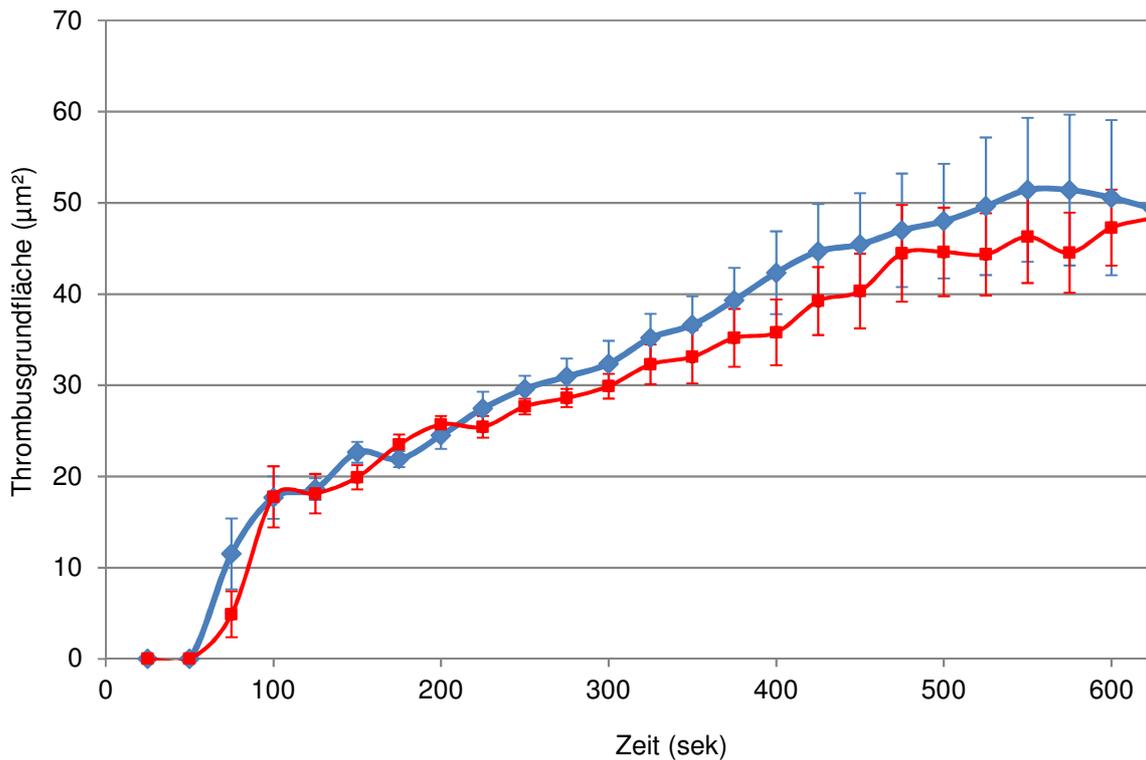


Abb. 34: Mittlere Einzelthrombusgrundfläche nach Zugabe von 5ng/ml sCD40L HPA-1a/1a (blau), HPA-1b/1b (rot); Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit dem mittleren Standardfehler.

In Bezug auf die Einzelthrombusgrundfläche zeigte sich zwischen den beiden Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,14$).

Beide Kollektive erreichten nach 50 Sek das Cut-off-Volumen. Wie dem Diagramm zu entnehmen zeigte sich bei beiden Kollektiven nach Erreichen des „cut-off“-Volumens nach 50 Sek eine scheinbar sprunghafte Zunahme der Einzelthrombusgrundfläche auf Werte um die $90 \mu\text{m}^2$. Ab dem Zeitpunkt 100 Sek bis zum Versuchsende war in beiden Kollektiven eine langsam stetige Zunahme der Einzelthrombusgrundfläche zu beobachten, die beim homozygoten HPA-1a/1a-Genotyp nach ca. 550 Sek ein Maximum bei $255 \mu\text{m}^2$ erreichte und bis zum Versuchsende auf einen mittleren Wert von $244 \mu\text{m}^2$ absank. Das Erreichen eines Maximums ist weniger eindeutig erkennbar im homozygoten HPA-1b/1b-Kollektiv, aber auch hier wurde nach etwa 550 Sekunden ein Maximum ($231 \mu\text{m}^2$) erreicht.

4.5.4 Mittleres Einzelthrombusvolumen

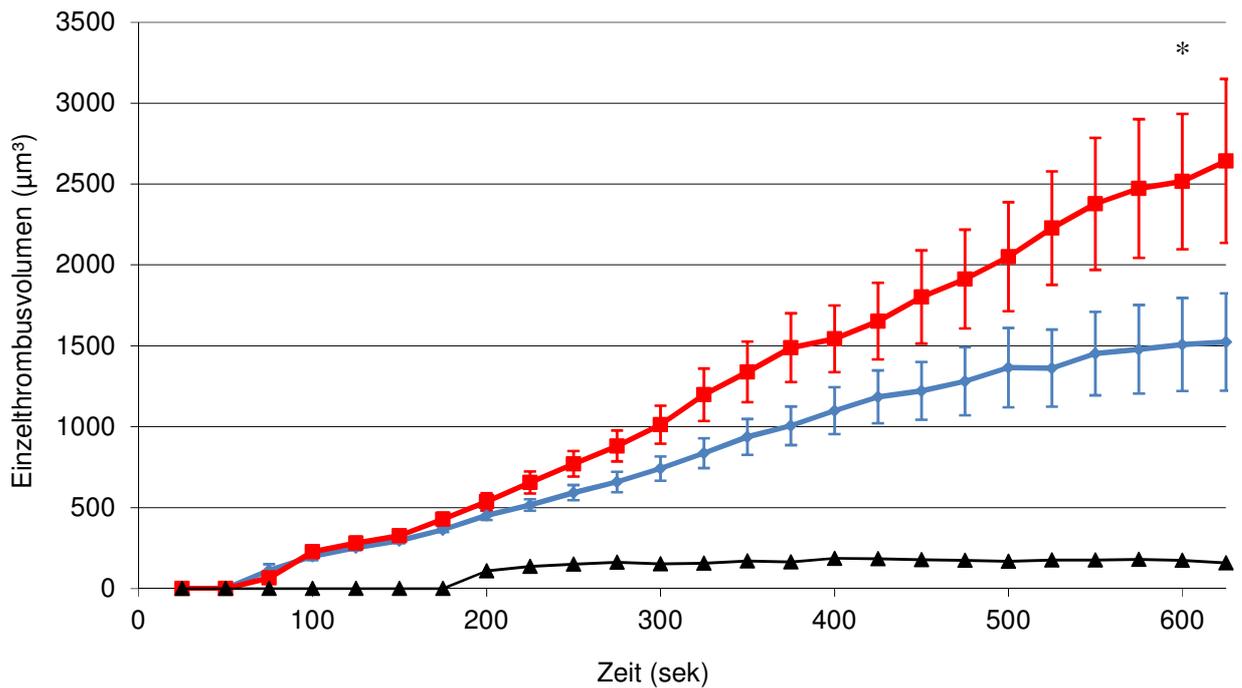


Abb. 35: Mittleres Einzelthrombusvolumen nach Zugabe von 5ng/ml sCD40L.

HPA-1a/1a (blau) vs. HPA-1b/1b (rot), HPA-1a/1a mit 2µg Reopro und 5ng/ml sCD40L (schwarz). Dargestellt sind Mittelwerte und mittlerer Standardfehler; *: $p < 0,01$.

Zu Anfang des Versuchs war kein signifikanter Unterschied zwischen den Einzelthrombusvolumina beider Genotypen festzustellen. Nach 10 Minuten unterschied sich das mittlere Einzelthrombusvolumen des homozygoten HPA-1b/1b-Genotyps signifikant von den Messwerten des anderen Genotyps ($p < 0,01$).

Nach Überschreiten des Cut-Off-Volumens zeigten beide HPA-1-Genotypen zunächst einen sehr ähnlichen Verlauf in der Zunahme des Einzelthrombusvolumens. Ab der 50. Sek verlief die Kurve beider Genotypen flach ansteigend und nahezu parallel bis zur 150. Sek. Beim homozygoten HPA-1a/1a-Genotyp nahm das Einzelthrombusvolumen im Zeitraum zwischen 200 und 600 Sek stetig zu, um ca. nach 10 Minuten in eine Plateauphase überzugehen, nachdem es sein Maximum bei einem Wert von ca. $1500\mu\text{m}^3$ erreichte. Die HPA-1b/1b-Kurve zeigte einen steiler ansteigenden Verlauf über den gesamten Versuchszeitraum. Nach 10 Minuten kam es zu einer leichten Abflachung der Kurve und Erreichen des Maximums (ca. $2650\mu\text{m}^3$). Das Erreichen einer Plateauphase war hier nicht so deutlich erkennbar wie beim HPA-1a/1a-Genotyp.

Bei Durchführung des gleichen Experiments mit Blut eines homozygoten HPA-1a/1a-Probanden und gleichzeitiger Substitution von 5ng/ml sCD40L sowie Abciximab (ReoPro) konnte kein Effekt von sCD40L auf das Einzelthrombusvolumen beobachtet werden.

4.5.5 Mittlere Einzelthrombushöhe

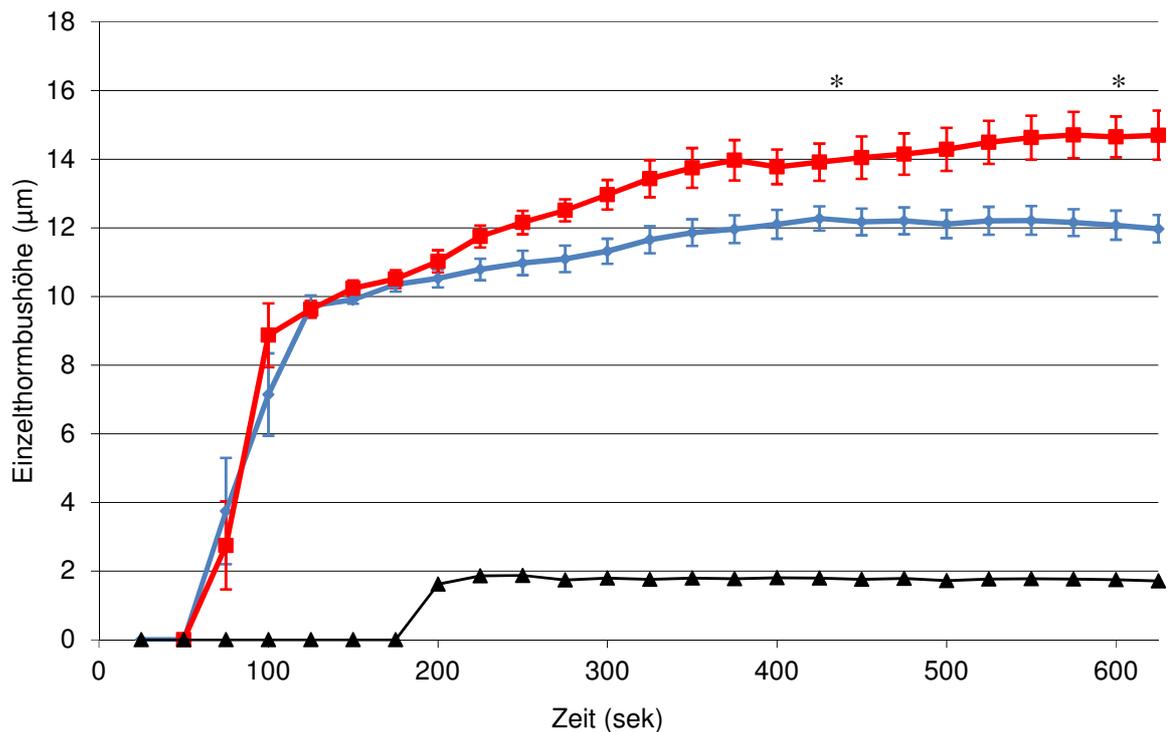


Abb. 36: Mittlere Einzelthrombushöhe nach Zugabe von 5ng/ml sCD40L. HPA-1a/1a blau (n=5), HPA-1b/1b rot (n=6), HPA1a/1a mit Reopro (2µg/ml) und 5ng/ml sCD40L (schwarz); dargestellt sind die Mittelwerte mit dem mittleren Standardfehler; *: $p < 0,01$.

Die mittlere Einzelthrombushöhe zeigte zu Beginn und bis nach 200 Sek keinen signifikanten Unterschied, zum Zeitpunkt 6 Minuten und 10 Minuten bestehen statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Kollektiven ($p=0,01$).

Nach einer Latenzzeit von ca. 50 Sek kam es bei beiden zu einer scheinbar sprunghaften Zunahme der Thrombushöhe, was durch das Überschreiten des Cut-off-Wertes zu erklären ist. Zwischen 75 und 125 Sek nahm die Thrombushöhe in beiden Kollektiven sehr stark zu auf Werte zwischen 9,62 µm bzw. 9,7 µm. Im weiteren Verlauf zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede: Die Thrombushöhe bei der homozygoten HPA-1a/1a-Variante nahm bis zur 6. Minute mäßig zu auf Werte um 12 µm und zeigte bis zum Versuchsende einen plateauförmigen Verlauf auf diesem Niveau. Die homozygote HPA-1b/1b-Variante hingegen nahm im Zeitraum zwischen 200 und 375 Sek Versuchsdauer noch stark an Höhe zu und erreicht Werte über 14 µm. Bis zum Versuchsende stiegen die Werte weiter und erreichten kurz vor Versuchsende Maximalwerte um 14,7 µm. Nach ca. 400 Sek wurde auch hier eine Plateauphase erreicht.

5 Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion

Ein Zusammenhang zwischen erhöhten sCD40L-Konzentrationen und kardiovaskulären bzw. thrombotischen Ereignissen konnte in vielen Studien nachgewiesen werden. Ein kausaler Zusammenhang mit direkter Beeinflussung der Thrombusformation ist allerdings bisher nur unzureichend belegt, André et al haben die Bindung von sCD40L an $\alpha\text{IIb}\beta_3$ und eine daraus resultierende gesteigerte Thrombusstabilität unter statischen Bedingungen gezeigt (61).

In dieser Arbeit zeigen wir, dass physiologische Konzentrationen von sCD40L die Thrombogenese speziell über $\alpha\text{IIb}\beta_3$ in vitro unter simulierten arteriellen Strömungsbedingungen beeinflussen. Der Unterschied ist messbar, nämlich in einer Änderung verschiedener Parameter der Thrombusformation. Lösliches CD40L hat keinen Einfluss auf die Initiation der Thrombogenese an Kollagen und somit primäre Plättchenadhäsion, die Anzahl der entstehenden Thromben sowie die Einzelthrombusgrundfläche unterscheiden sich nicht signifikant.

Die primäre Plättchenadhäsion an die thrombogene Oberfläche Kollagen wird durch sCD40L demnach nicht beeinflusst.

Thrombusvolumen und Thrombushöhe sind unter Zugabe von sCD40L statistisch signifikant größer als in Versuchen mit antikoaguliertem Vollblut. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig und ein Maximum besteht bei Zugabe von 5ng sCD40L/ml. Höhere und niedrigere sCD40L-Konzentrationen zeigen diesen Effekt nicht. Bei deutlich höheren Konzentrationen im Bereich von 50-100ng/ml bestanden sogar geringere Volumina und Thombushöhen als unter Nativbedingungen.

Blockade des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta_3$ durch Abciximab (ReoPro) führt verständlicherweise zu einer Hemmung der Thrombusformation, die auch durch sCD40L nicht aufgehoben werden kann, da das Integrin durch den spezifischen Antagonisten blockiert ist.

sCD40L vermittelt beim homozygoten HPA-1b/1b-Genotyp von $\alpha\text{IIb}\beta_3$ signifikant höhere Werte für das Einzelthrombusvolumen und die Einzelthombushöhe im Vergleich zum homozygoten HPA-1a/1a-Genotyp.

5.1 Diskussion und Schlussfolgerungen

$\alpha\text{IIb}\beta_3$ vermittelt die Plättchen-Plättchen-Interaktion im Aggregationsprozess. Die Blockade von $\alpha\text{IIb}\beta_3$ durch den spezifischen Rezeptorantagonisten Abciximab (ReoPro) führt zu einer Hemmung der Aggregation und infolgedessen auch der Thrombusformation. sCD40L zeigt unter Zugabe von Abciximab keinen steigernden Effekt auf die Thrombusstabilität. Dies legt nahe, dass seine thrombusstabilisierende Wirkung über $\alpha\text{IIb}\beta_3$ vermittelt wird. Zwischen der Konzentration an sCD40L und der Thrombusstabilität besteht kein linearer Zusammenhang, eher kann man von einer Sättigungscharakteristik sprechen. Dieses Ergebnis scheint auf den ersten Blick unerwartet. Jedoch wird die thrombusstabilisierende Wirkung von sCD40L-Wirkung über Bindung an Oberflächenrezeptoren und trimerische Vernetzung vermittelt. Dies ist eine mögliche Erklärung für

das beobachtete Sättigungsphänomen, da nach Besetzen aller vorhandenen Oberflächenrezeptoren der Plättchen kein stärkerer thrombusstabilisierender Effekt erreicht wird.

Insgesamt sind die in der Literatur zu findenden Konzentrationen von sCD40L im Blut gesunder Probanden und Patienten mit kardiovaskulären Ereignissen unterschiedlich, zumeist liegen sie jedoch im Bereich weniger Nanogramm (58), ähnlich der von uns verwendeten Dosierung von 5ng/ml. Dies dürfte den maximalen Effekt bei Zugabe dieser Konzentration erklären.

Das Thrombusvolumen und die Höhe resultieren aus Plättchen-Plättchen-Verbindungen, die über $\alpha\text{IIb}\beta_3$ vermittelt werden. Das Volumen und die Thrombushöhe können als morphologische Parameter der Thrombusstabilität angesehen werden. Nach Zugabe von 5ng/ml sCD40L findet man eine gesteigerte Thrombusstabilität, da auch bei hohen Scherraten (1000/sek), wie sie in arteriellen Gefäßen zu finden sind, ein über die Zeit stabiles signifikant größeres Einzelthrombusvolumen und Einzelthrombushöhe besteht. sCD40L beeinflusst demnach primär die Plättchen-Plättchen-Interaktion und vermittelt darüber seinen prothrombotischen Effekt. André et al (59) konnten bereits zeigen, dass sCD40L an $\alpha\text{IIb}\beta_3$ bindet und so aus morphologischer Sicht zu einer gesteigerten Thrombusstabilität führt.

Eine mögliche Erklärung für die maximale Wirkung von sCD40L in einer Konzentration von 5ng/ml ist die Tatsache, dass sCD40L ein Trimer bildet. Es bindet nicht nur direkt an $\alpha\text{IIb}\beta_3$ sondern auch an andere sCD40L-Moleküle und könnte so - ähnlich wie Fibrinogen - auch eine Vernetzung von Plättchen herbeiführen. Umgekehrt kommt es aber so auch – bei sehr hohen sCD40L-Konzentrationen im Blut – zu einer gewissen Hemmung der sCD40L-Wirkung, da einzelne Moleküle durch Trimerisierung abgefangen werden und nicht mehr an $\alpha\text{IIb}\beta_3$ binden können. Die Frage, ob sCD40L nur als Monomer bzw nur als Trimer oder in beiden Formen an $\alpha\text{IIb}\beta_3$ bindet ist derzeit noch nicht geklärt.

Noch nicht endgültig geklärt ist ebenfalls, ob die thrombusstabilisierende Wirkung von sCD40L primär aus der Modulation der intrathrombozytären Signaltransduktion oder durch verstärkte Quervernetzung der Plättchen resultiert. Es konnte gezeigt werden, dass sCD40L die Signaltransduktion der Thrombozyten moduliert, ob dies der Hauptgrund für die gesteigerte Thrombusstabilität bei Zugabe von sCD40L ist, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Die gesteigerte Thrombusstabilität wurde in dieser Arbeit anhand von morphologischen Parametern nachgewiesen.

In vorhergehenden Arbeiten aus unserem Institut wurden bereits Unterschiede bezüglich der Thrombusstabilität zwischen den homozygoten HPA-1-Genotypen nachgewiesen (117). Diese Unterschiede werden nun auch bei Zugabe von sCD40L bestätigt. Es ist daher anzunehmen, dass der HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta_3$ auch die thrombusstabilisierende Wirkung von sCD40L moduliert. Unterschiede in der Signaltransduktion der beiden Genotypen sind eine mögliche Ursache und derzeit noch unzureichend aufgeklärt. Vijayan et al. konnten zeigen, dass die HPA-1b/1b-Variante Unterschiede im Outside-In-Signaling aufweist: Durch Modulation der Aktivität verschiedener

Proteine (MLCK, MAPK und phosphorylierter ERK2 sowie Serin-Threonin-Phosphatasen; 116,124) bestand eine Verstärkung des Outside-In-Signaling. Beim HPA-1b/1b-Genotyp bestand eine erhöhte Bindungskapazität gegenüber Fibrinogen. Diese war nach Hemmung von MLCK und MAPK nicht mehr nachweisbar.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre eine unterschiedliche Oberflächenexpression von $\alpha_{IIb}\beta_3$, bedingt durch den HPA1-Polymorphismus.

Michelson et al. beobachteten eine erhöhte Expression von $\alpha_{IIb}\beta_3$ bei aktivierten Thrombozyten mit dem homozygoten HPA-1b/1b-Genotyp (103). Wäre dies die Erklärung für die gesteigerte Thrombusstabilität bei der HPA-1b/1b-Variante müssten sich bereits initial Unterschiede im Thrombuswachstum zeigen. Dies ist nicht der Fall. Die primäre Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand bleibt daher vermutlich unbeeinflusst vom Polymorphismus des Integrins.

Das Thrombusvolumen und die Einzelthrombushöhe bei der homozygoten HPA-1b/1b-Variante nehmen über den Verlauf stärker zu als bei der HPA-1a/1a-Variante und erreichen erst später eine Plateauphase auf einem höheren Niveau. Indirekt lässt sich aus diesen morphologischen Parametern arbeiten, dass Thromben aus Plättchen mit dem HPA-1b/1b-Genotyp von $\alpha_{IIb}\beta_3$ stabiler gegenüber hohen Scherraten sind. Eine Veränderung im Zytoskelett der aggregierenden Thrombozyten könnte diese höhere Thrombusstabilität bedingen.

Die Unterschiede zwischen den beiden HPA-1-Genotypen sind auch abhängig von der Scherrate. Vijayan et al. führten Strömungsexperimente mit $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten CHO-Zellen (Chinesische Hamsteroovarienzellen) durch, die entweder den homozygoten HPA-1a/1a- oder den HPA-1b/1b-Genotyp exprimierten. Bei Scherraten von 25 bis 125 pro Sekunde wiesen sie mit steigender Scherrate eine signifikant stärkere Adhäsion des homozygoten HPA1b-Genotyps an Fibrinogen und vWF nach. Der Unterschied zwischen beiden Genotypen war deutlich größer als unter statischen Bedingungen (108).

Experimente mit HPA-1-transfektierten CHO-Zellen (125) zeigten, dass die mit der homozygoten HPA-1b/1b-Variante transfektierten Zellen bei steigenden Scherraten länger und in größerer Zahl an immobilisiertem Fibrinogen adhärent blieben als die HPA1a-Variante, somit resistenter gegenüber der Exposition von höheren Scherraten waren. Auch diese Arbeit weist auf eine mögliche Assoziation der homozygoten HPA-1b-Variante mit einer erhöhten Thrombusstabilität hin.

5.2 Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext und klinische Konsequenz

Lösliches CD40L ist nach Erkennung seiner Bedeutung als Bindeglied zwischen Immunantwort und Thrombogenese in den Fokus wissenschaftlichen Interesses gerückt. Verschiedene Untersuchungen wurden durchgeführt um seine Wertigkeit als Biomarker zur Früherkennung kardiovaskulärer Ereignisse zu evaluieren.

Im Plättchen-freien Plasma gesunder Probanden konnten wir sCD40L-Konzentrationen um 0,64ng/ml messen. Im Serum finden sich nach 30-minütiger Inkubation im Wasserbad bei 37°C durchschnittlich 3,09ng/ml sCD40L.

Dies repräsentiert die maximal freisetzbare Menge, da es während der Inkubationszeit zur Plättchenaktivierung und so zur Freisetzung von sCD40L kommt, wie von Henn et al bereits gezeigt wurde (11). Die Konzentration ist als maximal zu betrachten, da Plättchen die Hauptquelle für sCD40L sind. Diese Ergebnisse decken sich mit einem Großteil der in der Literatur angegebenen Werte (55,56,58).

Die sCD40L-Konzentrationen, die im Rahmen thrombotischer Ereignisse im Blut von Patienten gemessen werden, sind in der Literatur unterschiedlich. Klinische Studien an Patienten mit einer kardiovaskulären Erkrankung ermittelten sCD40L-Werte im Plasma und Serum. Diese differieren zwischen 3ng/ml bis 12 ng/ml sCD40L im Serum bzw. 0,4ng/ml bis 0,78ng/ml im Plasma (55-58, 60). Die Vergleichbarkeit der Quellen untereinander muss kritisch betrachtet werden: Es werden teilweise unterschiedliche ELISA-Kits benutzt. Außerdem werden meistens – vermutlich aufgrund der einfacheren Handhabung – Serumproben verwendet. Diese repräsentieren jedoch, wie unter anderem von Ahn et al. (58) gezeigt, nicht die realen Konzentrationen im Nativblut sondern Werte nach Plättchenaktivierung und maximaler Freisetzung in vitro und sind außerdem stark abhängig sind von der Probenverarbeitung, Thrombozytenzahl und anderen Faktoren.

Die Probenprozessierung, die Auswahl des geeigneten Mediums sowie auch des Messverfahrens beeinflussen das Ergebnis nicht unerheblich, weshalb die in der Literatur zu findenden Ergebnisse teilweise deutlich differieren (126, 127).

André et al. haben Experimente unter Zugabe von bis zu 40µg/ml sCD40L durchgeführt (61), allerdings im Aggregometer und bei einer deutlich niedrigeren Scherrate als in Arterien besteht.

Die Bedeutung von sCD40L als klinischer Marker für thromboembolische Ereignisse wird durch unsere Resultate unterstrichen. Es ist nicht nur bedeutendes Zytokin der inflammatorischen Reaktion im Rahmen des atherosklerotischen Prozesses, sondern auch das Bindeglied zur thrombotischen Reaktionskette im Rahmen der Plaqueruptur. Durch diese Eigenschaft ist es ein interessantes Ziel für mögliche therapeutische Interventionen. Eine medikamentöse Beeinflussung der CD40L-Konzentration im Blut bzw. seiner Wirkung könnte zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse genutzt werden. Dass die CD40L-Konzentration im Blut beeinflussbar ist, wurde bereits in mehreren Studien gezeigt: Hypercholesterinämie, Nikotinkonsum, Adipositas und das metabolische Syndrom zeigen eine enge Assoziation mit erhöhten sCD40L-Konzentrationen. Die Therapie in Form von medikamentöser Behandlung, Nikotinabstinenz bzw. Gewichtsreduktion führte jeweils zur Senkung der sCD40L-Spiegel (128,129,130). Lim et al. zeigten in einer großen multifaktoriellen Interventionsstudie zur Senkung des kardiovaskulären Risikos bei Patienten mit Diabetes mellitus, dass eine Kombinationsbehandlung verschiedener Risikofaktoren zu einer Senkung der sCD40L-

Konzentration im Blut der Studienteilnehmer führte (43). Medikamentös konnte ein sCD40L-senkender Effekt für verschiedene Medikamente, die bereits zur Hemmung der Thrombozyten-Aggregation nach Infarkt eingesetzt werden, gezeigt werden (74). Arbeiten unter direkter Hemmung von sCD40L mittels antiCD40L-Antikörpern zeigten jedoch eine erhöhte Rate an thromboembolischen Ereignissen, möglicherweise verursacht durch direkte Interaktion der Antikörper mit CD40 und den Plättchen (131).

Immer wieder diskutiert wird auch, an welcher Stelle der Atherosklerose-Pathogenese CD40L einzuordnen ist: Sind erhöhte CD40L-Konzentrationen eine Ursache oder lediglich Folge eines kardiovaskulären Ereignisses (132,133)? Um CD40L als Marker einzusetzen, muss erst seine kausale Bedeutung geklärt werden: Ist das thrombotische Risiko gesteigert bei erhöhten CD40L-Konzentrationen oder ist das thrombotische Ereignis dann bereits eingetreten? Aus diesen beiden Möglichkeiten leitet sich ab, ob CD40L eher als Parameter zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos oder zur Beurteilung des Verlaufs nach einem kardiovaskulären Ereignis herangezogen werden kann.

Ob die Senkung der sCD40L-Konzentration letztlich auch direkt assoziiert ist mit einer Senkung des kardiovaskulären Risikos muss noch weiter untersucht werden.

Lösliches CD40L ist nicht der einzige Vermittler zwischen der inflammatorischen und der thrombotischen Kaskade. Es ist jedoch das einzige inflammatorische Zytokin, für das bisher eindeutig eine direkte Einflussnahme auf die Thrombogenese durch Bindung an $\alpha_{IIb}\beta_3$ nachgewiesen werden konnte. Eine Beeinflussung der Thrombogenese durch Bindung an einen anderen Rezeptor der Thrombozyten wie beispielsweise CD40 kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Auch immunmodulatorische Signalwege beeinflussen die Thrombusformation, wie die Bindung an CD40.

Lösliches CD40L ist einfach in Serum und Plasma bestimmbar, was für den Einsatz im klinischen Alltag von nicht zu unterschätzender Bedeutung ist. Vor einer Etablierung als klinischer Marker für ein erhöhtes thromboembolisches Risiko bei Patienten mit Atherosklerose muss jedoch noch einige Vorarbeit geleistet werden:

Einerseits muss das Bestimmungsverfahren standardisiert und somit vergleichbar gemacht werden. Hierzu sind Fall-Kontroll-Studien mit einer großen Teilnehmerzahl notwendig. Es muss geklärt werden, ob die Bestimmung im Serum oder PPP besser die *In-vivo*-Bedingungen repräsentiert. Serumproben sind einfach herzustellen, längere Zeit haltbar und günstig. Für die PPP-Gewinnung muss das venöse Vollblut schnell verarbeitet werden um die sCD40L-Freisetzung aus aktivierten Plättchen zu vermeiden, die darauf folgende Lagerung und Verarbeitung entspricht der von Serumproben. Auch EDTA- und Citratproben kommen potentiell in Frage.

In dieser Arbeit zeigen wir, dass sCD40L einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Plättchenaggregation hat. Diese Wirkung sollte in anderen unabhängigen Untersuchungen noch genauer untersucht werden. Auch *in vitro*-Versuche mit transfektierten CHO-Zellen können hierzu eingesetzt werden.

Wichtig zur Klärung der Frage wie sCD40L die Thrombusstabilität beeinflusst ist, ist außerdem die weitere Erforschung der Signalkaskade von $\alpha_{IIb}\beta_3$. Erst nach genauer Kenntnis der einzelnen Enzyme kann geklärt werden, an welcher Stelle sCD40L Einfluss auf die Plättchenaggregation nimmt und gegebenenfalls medikamentös eine spezifische Hemmung dieser Wirkung erfolgen.

Die klinische Bedeutung des HPA-1-Polymorphismus ist eingehend untersucht worden (110,111,112). Der HPA-1b/1b-Genotyp ist, wie bereits erläutert, bei Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung assoziiert mit einem erhöhten Risiko, ein thromboembolisches Ereignis zu erleiden. Morphologisch lässt sich dies auch durch die gesteigerte Thrombusstabilität dieses Genotyps erklären: Die zunehmende Verengung des Gefäßlumens, zu der es bei der Ruptur eines Atherom-Plaques mit Anlagerung von Blutplättchen zwangsläufig kommt, führt zu einer erhöhten Scherrate von bis zu 1000/sek. Plättchenthromben des homozygoten HPA-1b/1b-Genotyps sind stabiler gegenüber der steigenden Scherrate und reißen daher seltener ab. Das Risiko einen totalen Gefäßverschlusses und somit eine Thrombose oder Embolie zu erleiden ist hier erhöht. Dies ist eine mögliche Erklärung, warum bei Patienten mit KHK, die Träger der homozygoten HPA-1b-Variante sind, häufiger und früher ein akutes Koronarsyndrom auftritt.

Die Verbreitung des homozygoten HPA-1b/1b-Genotyps ist mit ca. 1-2% in der kaukasischen Bevölkerung relativ gering ausgeprägt. Ein generelles Screening, das auf diesen Polymorphismus ausgerichtet ist, macht daher aus Kostengründen wenig Sinn. Bei einer positiven Familienanamnese in Bezug auf ein gehäuftes und verfrühtes Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse sollte hingegen eine Untersuchung bezüglich des HPA-1-Polymorphismus von $\alpha_{IIb}\beta_3$ individuell abgewogen werden.

5.3 Zusammenfassung

Lösliches CD40L ist ein Transmembranprotein der TNF-Familie. Bei Patienten mit einem thrombotischen Ereignis sind erhöhte sCD40L-Konzentrationen im Blut nachweisbar. Neben seiner immunologischen Funktion als Zytokin wurde *in vitro* eine thrombusstabilisierende Wirkung durch Bindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ nachgewiesen. sCD40L bindet über eine spezifische Bindungssequenz an die β_3 -Untereinheit des Integrins, wodurch ein Outside-in-Signaling induziert wird.

Ziel unserer Untersuchungen war zu klären, ob der thrombusstabilisierende Effekt von sCD40L unter simulierten arteriellen Strömungsbedingungen im Vollblut ebenfalls nachweisbar ist. Ergänzend wurde untersucht wie sich dieser Effekt in Abhängigkeit vom HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ verhält, .

Citrat-antikoaguliertes Vollblut von Probanden mit dem homozygoten HPA-1a/1a oder HPA-1b/1b wurde mittels einer Perfusorpumpe, die eine initiale Scherrate von 1000 sec^{-1} herstellte, durch eine rechteckige Strömungskammer aspiriert, die enthaltenen Plättchen wurden mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Mepacrin markiert. Rekombinantes sCD40L wurde dem Vollblut unmittelbar vor Versuchsbeginn zugesetzt. Als thrombogene Oberfläche wurde vor Versuchsbeginn ein Tropfen Kollagen in die Kammer appliziert. Die Strömungskammer wurde in einem konfokalen

Lasermikroskop befestigt. Während des Versuchs wurden alle 25 sec Bildstapel aus jeweils 30 Schnittbildern akquiriert, die mit einer hierfür entwickelten Software anschließend ausgewertet wurden. So wurden Thrombusvolumen, -höhe, -grundfläche und Thrombenzahl gemessen.

sCD40L führt konzentrationsabhängig zu einer Zunahme der morphometrischen Parameter Thrombushöhe und Thrombusvolumen als Folge einer gesteigerten Thrombusstabilität. Die Thrombusgrundfläche sowie die Thrombuszahl bleiben unbeeinflusst von der Konzentration des hinzugefügten sCD40L, da die primäre Interaktion zwischen Plättchen und thrombogener Oberfläche nicht durch sCD40L beeinflusst wird. Die Interaktion zwischen den Plättchen, die im Rahmen des Thrombuswachstums aneinander binden, ist der Angriffspunkt von sCD40L: Es führt zur Bildung eines stabileren Thrombus als ohne Zusatz von sCD40L, der - trotz hoher Scherraten - relativ konstant über die Dauer des Experiments, in der Höhe und im Volumen ist. Die Scherrate innerhalb der Kammer steigt im Verlauf des Experiments, da es zu einer Verengung des Strömungskanal durch den hineinwachsenden Thrombus kommt.

In dieser Arbeit ist der morphologisch sichtbare Effekt von sCD40L auf die Thrombogenese untersucht worden. Zu klären bleiben noch einige Punkte: Wo greift sCD40L am Fibrinogenrezeptor an und in welcher Weise moduliert sCD40L das Outside-in-Signaling des Rezeptors? Ist die Ursache für die gesteigerte Thrombusstabilität in einer stabileren Quervernetzung der Plättchen zu sehen? Wenn dies der Fall ist, muss geklärt werden, ob neben der Quervernetzung über Fibrinogen auch direkte Verbindungen gebundener CD40L-Moleküle dazu beitragen. Außerdem ist zu klären, ob die durch sCD40L induzierte Signaltransduktion zu Änderungen im Zytoskelett der Plättchen führt.

Nicht zu vernachlässigen ist außerdem die Bindung von sCD40L an CD40. Inwald et al postulierten in ihrer Arbeit, dass die CD40L-CD40-Interaktion primär für die gesteigerte Thrombusstabilität unter hohen sCD40L-Konzentrationen verantwortlich sei (62). Die Komplexität der Thrombozyten-Signaltransduktionsketten lässt vermuten, dass auch über CD40 die Thrombogenese mindestens beeinflusst wird, in welcher Weise dies erfolgt muss Gegenstand weitere Forschung sein.

Über den Einsatz von sCD40L als klinischer Marker nach ischämischen Ereignissen wird diskutiert(135,136).

Theoretisch böte er gegenüber einigen etablierten Markerproteinen wie zum Beispiel Troponin I oder D-Dimeren Vorteile: Diese werden erst messbar, wenn bereits ein zellulärer Schaden eingetreten ist. CD40L, das nachweislich im Bereich rupturierter Atherosklerose-Plaques in erhöhten Konzentrationen vorhanden ist, wäre eher „positiv“ – ggf. könnte so eher eine Diagnose gestellt und entsprechende therapeutische Maßnahmen eingeleitet werden.

Aufgrund seiner komplexen Funktionen innerhalb des Immunsystems sowie der Thrombogenese und außerdem noch offenen Fragen bezüglich des Messverfahrens ist dies allerdings bisher nicht gelungen.

Literaturverzeichnis

1 Statistisches Bundesamt Deutschland:

Gesundheit - Todesursachen in Deutschland .Fachserie 12 Reihe 4. 2015: S.3

2 Lambert MP, Sachais BS, Kowalska MA.:

Chemokines and thrombogenicity. *Thromb Haemost.* 2007 May;97(5):722-9.

3 Thusberg et al: The structural basis of hyper IgM deficiency - CD40L mutations; *Protein Eng Des Sel.* 2007 Mar;20(3):133-41

4 Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman.

Platelets and the immune continuum. *J.Nat Rev Immunol.* 2011 Apr;11(4):264-74.

5 Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM,

Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maiszewski CR, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature.* 1992 May 7;357(6373):80-2.

6 Graf D, Korthäuer U, Mages HW, Senger G, Kroczeck RA.

Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells.*Eur J Immunol.* 1992 Dec;22(12):3191-4.

7 Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A,

Belko J, Lee JJ, Chess L. Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med.* 1992 Apr 1;175(4):1091-101.

8 Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, Aubry JP, Brunner T, Blasey H, Life P, Talabot D,

Flores-Romo L, Thompson J, et al. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature.* 1993 Sep 23;365(6444):340-3.

9 Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P.

Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis.*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Mar 4;94(5):1931-6.

10 Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G, Palomba C, Manzo C, Fontana S, Spits H, Kärre K, Zappacosta S. A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40

ligand interaction.*J Exp Med.* 1997 Jun 16;185(12):2053-60.

11 Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA.

CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells.*Nature.* 1998 Feb 5;391(6667):591-4.

12 Viallard JF, Solanilla A, Gauthier B, Contin C, Déchanet J, Grosset C, Moreau JF, Praloran V, Nurden P, Pellegrin JL,

Nurden AT, Ripoche J. Increased soluble and platelet-associated CD40 ligand in essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis.*Blood.* 2002 Apr 1;99(7):2612-4.

12 Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML; CAPTURE Study Investigators.

Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes.*N Engl J Med.* 2003 Mar 20;348(12):1104-11.

14 Cerutti A, Zan H, Schaffer A, Bergsagel L, Harindranath N, Max EE, Casali P.

CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+ B cell line.*J Immunol.* 1998 Mar 1;160(5):2145-57.

15 McLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:117-39.

16 Blotta MH, Marshall JD, DeKruyff RH, Umetsu DT.

Cross-linking of the CD40 ligand on human CD4+ T lymphocytes generates a costimulatory signal that up-regulates IL-4 synthesis. *J Immunol.* 1996 May 1;156(9):3133-40.

17 Schönbeck U, Libby P.

The CD40/CD154 receptor/ligand dyad.*Cell Mol Life Sci.* 2001 Jan;58(1):4-43.

18 Moses AV, Williams SE, Strussenberg JG, Heneveld ML, Ruhl RA, Bakke AC, Bagby GC, Nelson JA.

HIV-1 induction of CD40 on endothelial cells promotes the outgrowth of AIDS-associated B-cell lymphomas.*Nat Med.* 1997 Nov;3(11):1242-9.

19 von Leoprechting A, van der Bruggen P, Pahl HL, Aruffo A, Simon JC. Stimulation of CD40 on immunogenic human malignant melanomas augments their cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis and induces apoptosis. *Cancer Res.* 1999 Mar 15;59(6):1287-94.

20 Dzojic H, Loskog A, Tötterman TH, Essand M. Adenovirus-mediated CD40 ligand therapy induces tumor cell apoptosis and systemic immunity in the TRAMP-C2 mouse prostate cancer model. *Prostate.* 2006 Jun 1;66(8):831-8.

21 Loskog A, Tötterman TH. CD40L - a multipotent molecule for tumor therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2007 Mar;7(1):23-8.

22 Koho H, Paulie S, Ben-Aissa H, Jónsdóttir I, Hansson Y, Lundblad ML, Perlmann P. Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. I. Determination of the selectivity of six antibodies by cell ELISA and immunofluorescence. *Cancer Immunol Immunother.* 1984;17(3):165-72.

23 Korthaeuer U., Graf D., Mages H.W., Briere F., Padayachee M., Malcolm S., Ugazio A.G., Notarangelo L.D., Levinsky R.J., Kroczeck R.A. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993;361:539-541

24 Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, Bajorath J, Grosmaire LS, Stenkamp R, Neubauer M, et al. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell.* 1993 Jan 29;72(2):291-300.

25 Ferrari S, Giliani S, Insalaco A, Al-Ghonaïm A, Soresina AR, Loubser M, Avanzini MA, Marconi M, Badolato R, Ugazio AG, Levy Y, Catalan N, Durandy A, Tbakhi A, Notarangelo LD, Plebani A. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Oct 23;98(22):12614-9

26 Allen R.C., Armitage R.J., Conley M.E., Rosenblatt H., Jenkins N.A., Copeland N.G., Bedell M.A., Edelhoff S., Disteché C.M.,

Simoneaux D.K., Fanslow W.C., Belmont J.W., Spriggs M.K. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 259:990-993(1993)

27 Gras G, Legendre C, Krzysiek R, Dormont D, Galanaud P, Richard Y. CD40/CD40L interactions and cytokines regulate HIV replication in B cells in vitro. *Virology.* 1996 Jun 15;220(2):309-19.

28 Grewal IS, Borrow P, Pamer EG, Oldstone MB, Flavell RA. The CD40-CD154 system in anti-infective host defense. *Curr Opin Immunol.* 1997 Aug;9(4):491-7.

29 Khan SY, Kelher MR, Heal JM, Blumberg, Boshkov LK, Phipps R et al. Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components; primes neutrophils through CD40, and is potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood.* 2006 Oct 1; 108 (7):2455-62

30 Rao SV, Jollis JG, Harrington RA, Granger CB, Newby LK, Armstrong PW, et al. Relationship of blood transfusion and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *JAMA.* 2004 Oct. 6; 292 (13):1555-62.

31 Khorana AA, Francis CW, Blumberg N, Culakova E, Refaai MA, Lyman GH. Blood transfusion and survival in adults with acute leukemia. *Leukemia.* 2008 Mar; 22(3):631-5.

32 Tousoulis D, Antoniadou C, Nikolopoulou A, Koniari K, Vasiliadou C, Marinou K, Koumallos N, Papageorgiou N, Stefanadi E, Siasos G, Stefanadis C. Interactions between cytokines and sCD40L in patients with stable and unstable coronary syndromes. *Eur J Clin Invest.* 2007 Aug;37(8):623-8.

33 Garlich CD, Eskafi S, Raaz D, Schmidt A, Ludwig J, Herrmann M, Klinghammer L, Daniel WG, Schmeisser A. Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart.* 2001 Dec;86(6):649-55.

34 Aukrust P, Müller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Frøland SS, Gullestad L. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet

involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation*. 1999 Aug 10;100(6):614-20.

35 Varo N, de Lemos JA, Libby P, Morrow DA, Murphy SA, Nuzzo R, Gibson CM, Cannon CP, Braunwald E, Schönbeck U. Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003 Sep 2; 108(9):1049-52.

36 Cipollone F, Ferri C, Desideri G, Paloscia L, Materazzo G, Mascellanti M, Fazia M, Iezzi A, Cuccurullo C, Pini B, Bucci M, Santucci A, Cuccurullo F, Mezzetti A. Preprocedural level of soluble CD40L is predictive of enhanced inflammatory response and restenosis after coronary angioplasty. *Circulation*. 2003 Dec 2;108(22):2776-82.

37 Wexberg P, Jordanova N, Strehblow C, Syeda B, Meyer B, Charvat S, Zorn G, Scheinig D, Wojta J, Huber K, Glogar D, Gyöngyösi M. Time course of prothrombotic and proinflammatory substance release after intracoronary stent implantation. *Thromb Haemost*. 2008 Apr;99(4):739-48

38 Youssef AA, Chang LT, Sheu JJ, Lee FY, Chua S, Yeh KH, Yang CH, Wu CJ, Yip HK. Association between circulating level of CD40 ligand and angiographic morphologic features indicating high-burden thrombus formation in patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary intervention. *Circ J*. 2007 Dec; 71(12): 1857-61.

39 Ueland T, Aukrust P, Yndestad A, Otterdal K, Frøland SS, Dickstein K, Kjekshus J, Gullestad L, Damås JK. Soluble CD40 ligand in acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2005 Jun;26(11):1101-7.

40 Duygu H, Barisik V, Kurt H, Turk U, Ercan E, Kose S. Prognostic value of plasma soluble CD40 ligand in patients with chronic non-valvular atrial fibrillation. *Europace*. 2008 Feb;10(2):210-4.

41 Nannizzi-Alaimo L, Rubenstein MH, Alves VL, Leong GY, Phillips DR, Gold HK. Cardiopulmonary bypass induces release of soluble CD40 ligand. *Circulation*. 2002 Jun 18;105(24):2849-54

42 de Lemos JA, Zirlik A, Schönbeck U, Varo N, Murphy SA, Khera A, McGuire DK,

Stanek G, Lo HS, Nuzzo R, Morrow DA, Peshock R, Libby P. Associations between soluble CD40 ligand, atherosclerosis risk factors, and subclinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Oct;25(10):2192-6.

43 Lim HS, Blann AD, Lip GY. Soluble CD40 ligand, soluble P-selectin, interleukin-6, and tissue factor in diabetes mellitus: relationships to cardiovascular disease and risk factor intervention. *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21):2524-8.

44 Pamukcu B, Oflaz H, Onur I, Midilli K, Yilmaz G, Yilmaz E, Nisanci Y. Relationship between the serum sCD40L level and aspirin-resistant platelet aggregation in patients with stable coronary artery disease. *Circ J*. 2008 Jan;72(1):61-6.

45 Kulickowski W, Kobusiak-Prokopowicz M, Prajs I, Karolko B, Mazurek W. Aspirin failure course during exercise and its connection with soluble CD40L. *Thromb Res*. 2007;119(6):679-86.

46 Ferro D, Loffredo L, Polimeni L, Fimognari F, Villari P, Pignatelli P, Fuster V, Violi F. Soluble CD40 ligand predicts ischemic stroke and myocardial infarction in patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Dec;27(12):2763-8.

47 Lip GY, Patel JV, Hughes E, Hart RG. High-sensitivity C-reactive protein and soluble CD40 ligand as indices of inflammation and platelet activation in 880 patients with nonvalvular atrial fibrillation: relationship to stroke risk factors, stroke risk stratification schema, and prognosis. *Stroke*. 2007 Apr;38(4):1229-37.

48 Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res*. 1997 Sep;81(3):448-54.

49 Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation*. 1997 Jul 15;96(2):396-9.

- 50 Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA.** Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol.* 1996 May 15;156(10):3952-60.
- 51 Schönbeck U, Libby P.** CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res.* 2001 Dec 7;89(12):1092-103.
- 52 Blumberg N, Spinelli SL, Francis CW, Taubman MB, Phipps RP.** The platelet as an immune cell-CD40 ligand and transfusion immunomodulation. *Immunol. Res.* 2009 Dec; 45 (2-3):251-60
- 53 Yellin MJ, Brett J, Baum D, Matsushima A, Szabolcs M, Stern D, Chess L.** J Exp Med. Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals. 1995 Dec 1;182(6):1857-64.
- 54 Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS.** CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 9;92(10):4342-6.
- 55 Schönbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM.** Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation.* 2001 Nov 6;104(19):2266-8.
- 56 Ferroni P, Riondino S, Vazzana N, Santoro N, Guadagni F, Davi G.** Biomarkers of platelet activation in acute coronary syndromes. *Thromb and Haemost.* 2012 Sept. 7; 108(6):1109-23
- 57 Varo N, Nuzzo R, Natal C, Libby P, Schönbeck U.** Influence of pre-analytical and analytical factors on soluble CD40L measurements. *Clin Sci (Lond).* 2006 Nov;111(5):341-7.
- 58 Ahn ER, Lander G, Jy W, Bidot CJ, Jimenez JJ, Horstman LL, Ahn YS.** Differences of soluble CD40L in sera and plasma: implications on CD40L assay as a marker of thrombotic risk. *Thromb Res.* 2004;114(2):143-8.
- 59 André P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagner DD.** CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med.* 2002 Mar;8(3):247-52.
- 60 Graf D, Müller S, Korthäuer U, van Kooten C, Weise C, Kroczeck RA.** A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol.* 1995 Jun;25(6):1749-54.
- 61 Prasad KS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR.** Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct 14;100(21):12367-71.
- 62 Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ.** CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res.* 2003 May 16;92(9):1041-8.
- 63 André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR.** Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation.* 2002 Aug 20;106(8):896-9.
- 64 Wykes M, Poudrier J, Lindstedt R, Gray D.** Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells. *Eur J Immunol.* 1998 Feb;28(2):548-59.
- 65 Henn V, Steinbach S, Büchner K, Presek P, Kroczeck RA** The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood.* 2001 Aug 15;98(4):1047-54
- 66 Jin Y, Nonoyama S, Morio T, Imai K, Ochs HD, Mizutani S.** Characterization of soluble CD40 ligand released from human activated platelets. *J Med Dent Sci.* 2001 Mar;48(1):23-7.
- 67 Aukrust P, Damas JK, Solum NO.** Soluble CD40 ligand and platelets: self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation? *J Am Coll Cardiol.* 2004 Jun 16;43(12):2326-8
- 68 Mälarstig A, Lindahl B, Wallentin L, Siegbahn A.** Soluble CD40L levels are regulated by the -3459 A>G polymorphism and predict myocardial infarction and the efficacy of antithrombotic treatment in non-ST elevation acute coronary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Jul;26(7):1667-73.

69 May AE, Kälsch T, Massberg S, Herouy Y, Schmidt R, Gawaz M. Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha IIb beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation*. 2002 Oct 15;106(16):2111-7.

70 Pignatelli P, Sanguigni V, Paola SG, Lo Coco E, Lenti L, Violi F. Vitamin C inhibits platelet expression of CD40 ligand. *Free Radic Biol Med*. 2005 Jun 15;38(12):1662-6.

71 Pignatelli P, Sanguigni V, Lenti L, Ferro D, Finocchi A, Rossi P, Violi F. gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand. *Circulation*. 2004 Sep 7;110(10):1326-9

72 Sanguigni V, Pignatelli P, Lenti L, Ferro D, Bellia A, Carnevale R, Tesauro M, Sorge R, Lauro R, Violi F. Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 2005 Feb 1;111(4):412-9.

73 Furman MI, Krueger LA, Linden MD, Barnard MR, Frelinger AL 3rd, Michelson AD Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jun 16;43(12):2319-25.

74 Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation*. 2003 Mar 4;107(8):1123-8.

75 Welt FG, Rogers SD, Zhang X, Ehlers R, Chen Z, Nannizzi-Alaimo L, Phillips DR, Simon DI. GP IIb/IIIa inhibition with eptifibatid lowers levels of soluble CD40L and RANTES after percutaneous coronary intervention. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2004 Feb;61(2):185-9.

76 Aukrust P, Damas JK, Solum NO. Soluble CD40 ligand and platelets: self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation? *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jun 16;43(12):2326-8.

77 Freedman JE. Molecular regulation of platelet-dependent thrombosis. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):2725-34.

78 Kunicki TJ, Newman PJ. The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood*. 1992 Sep 15;80(6):1386-404.

79 Wagner, C. L., Mascelli, M. A., Neblock, D. S., Weisman, H. F., Collier, B. S., and Jordan, R. E. (1996). Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 88, 907-914.

80 Niiya, K., Hodson, E., Bader, R., Byers-Ward, V., Koziol, J. A., Plow, E. F., and Ruggeri, Z. M. (1987). Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood* 70, 475-483.

81 Duperray A, Berthier R, Chagnon E, Ryckewaert JJ, Ginsberg M, Plow E, Marguerie G. Biosynthesis and processing of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes. *J Cell Biol*. 1987 Jun;104(6):1665-73.

82 Calvete JJ. Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *Thromb Haemost*. 1994 Jul;72(1):1-15

83 Lindon JN, McManama G, Kushner L, Merrill EW, Salzman EW. Does the conformation of adsorbed fibrinogen dictate platelet interactions with artificial surfaces? *Blood*. 1986 Aug;68(2):355-62.

84 Loftus JC, Liddington RC. New insights into integrin-ligand interaction. *J Clin Invest*. 1997 Dec 1;100(11 Suppl):S77-81.

85 Shattil SJ. Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost*. 1999 Aug;82(2):318-25.

86 Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Phillips DR. Outside-in integrin signal transduction. Alpha IIb beta 3-(GP IIb IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation. *J Biol Chem*. 1996 May 3;271(18):10811-5.

87 Huang MM, Lipfert L, Cunningham M, Brugge JS, Ginsberg MH, Shattil SJ. Adhesive ligand binding to integrin alpha IIb beta 3 stimulates tyrosine phosphorylation of novel protein substrates before

phosphorylation of pp125FAK. *J Cell Biol.* 1993 Jul;122(2):473-83.

88 Clark EA, Shattil SJ, Ginsberg MH, Bolen J, Brugge JS Regulation of the protein tyrosine kinase pp72syk by platelet agonists and the integrin alpha IIb beta 3. *J Biol Chem.* 1994 Nov 18;269(46):28859-64.

89 Lipfert L, Haimovich B, Schaller MD, Cobb BS, Parsons JT, Brugge JS. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J Cell Biol.* 1992 Nov;119(4):905-12

90 Phillips DR, Jennings LK, Edwards HH Secondary signals mediated by GPIIb/IIIa in thrombin-activated platelets. *Biochim Biophys Acta.* 1990 Aug 13;1054(1):8-13.

91 Yamaguchi A, Tanoue K, Yamazaki H. Identification of membrane proteins mediating the interaction of human platelets. *J Cell Biol.* 1980 Jul;86(1):77-86.

92 Denis CV, Wagner DD. Platelet adhesion receptors and their ligands in mouse models of thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Apr;27(4):728-39.

93 Savage B, Ruggeri ZM. Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets. *J Biol Chem.* 1991 Jun 15;266(17):11227-33.

94 Farrell, D. H., Thiagarajan, P., Chung, D. W., and Davie, E. W. (1992). Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10729-10732.

95 Scarborough RM, Rose JW, Hsu MA, Phillips DR, Fried VA, Campbell AM, Nannizzi L, Charo IF. Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. *J Biol Chem.* 1991 May 25;266(15):9359-62.

96 Vijayan KV, Bray PF. Molecular mechanisms of prothrombotic risk due to genetic variations in platelet genes: Enhanced outside-in signaling through the Pro33 variant of integrin beta3. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006 May;231(5):505-13.

97 G. Gibson: Rare and common variants: twenty arguments. In: *Nature reviews.*

Genetics. Band 13, Nummer 2, Februar 2011, S. 135–145

98 Valentin N, Newman PJ. Human platelet alloantigens. *Curr Opin Hematol.* 1994 Sep;1(5):381-7.

99 Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Feb;24(2):216-29.

100 von dem Borne AE, Décarry F. Nomenclature of platelet-specific antigens. *Hum Immunol.* 1990 Sep;29(1):1-2.

101 Williams MS, Bray PF. Genetics of arterial prothrombotic risk states. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001 May;226(5):409-19.

102 Newman PJ. Platelet alloantigens: cardiovascular as well as immunological risk factors? *Lancet.* 1997 Feb 8;349(9049):370-1.

103 Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendrix C, Coleman L, Hamlington J, Barnard MR, Kickler T, Christie DJ, Kundu S, Bray PF. Platelet GP IIIa PI(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation.* 2000 Mar 7;101(9):1013-8.

104 Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, O'Donnell CJ, Lipinska I, Sutherland PA, Mittleman M, Muller JE, D'Agostino RB, Levy D, Tofler GH. Platelet glycoprotein IIIa PI(a) polymorphism, fibrinogen, and platelet aggregability: The Framingham Heart Study. *Circulation.* 2001 Jul 10;104(2):140-4.

105 Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, Schmitz C, Sutherland PA, Silbershatz H, D'Agostino RB, Muller JE, Myers RH, Levy D, Tofler GH. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PIA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Apr;19(4):1142-7.

106 Vijayan KV, Liu Y, Souza S, Thiagarajan P, Bray PF. Fibrinogen and prothrombin binding is enhanced to the Pro33 isoform of purified integrin alphaIIbbeta3. *J Thromb Haemost.* 2006 Apr;4(4):905-6.

- 107 Sajid M, Vijayan KV, Souza S, Bray PF.** PIA polymorphism of integrin beta 3 differentially modulates cellular migration on extracellular matrix proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Dec 1;22(12):1984-9.
- 108 Vijayan KV, Huang TC, Liu Y, Bernardo A, Dong JF, Goldschmidt-Clermont PJ, Alevriadou BR, Bray PF.** Shear stress augments the enhanced adhesive phenotype of cells expressing the Pro33 isoform of integrin beta3. *FEBS Lett.* 2003 Apr 10;540(1-3):41-6.
- 109 Undas A, Brummel K, Musial J, Mann KG, Szczeklik A.** PI(A2) polymorphism of beta(3) integrins is associated with enhanced thrombin generation and impaired antithrombotic action of aspirin at the site of microvascular injury. *Circulation.* 2001 Nov 27;104(22):2666-72.
- 110 Mikkelsen J, Perola M, Laippala P, Savolainen V, Pajarinen J, Lalu K, Penttilä A, Karhunen PJ.** Glycoprotein IIIa PI(A) polymorphism associates with progression of coronary artery disease and with myocardial infarction in an autopsy series of middle-aged men who died suddenly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Oct;19(10):2573-8.
- 111 Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ.** A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med.* 1996 Apr 25;334(17):1090-4.
- 112 Zotz RB, Winkelmann BR, Müller C, Boehm BO, März W, Scharf RE.** Association of polymorphisms of platelet membrane integrins alpha IIb(beta)3 (HPA-1b/PI) and alpha2(beta)1 (alpha807TT) with premature myocardial infarction. *J Thromb Haemost.* 2005 Jul;3(7):1522-9.
- 113 Sirotkina OV, Khaspekova SG, Zabortina AM, Shimanova YV, Mazurov AV.** Effects of platelet glycoprotein IIb-IIIa number and glycoprotein IIIa Leu33Pro polymorphism on platelet aggregation and sensitivity to glycoprotein IIb-IIIa antagonists. *Platelets.* 2007 Nov;18(7):506-14.
- 114 Lev EI, Patel RT, Guthikonda S, Lopez D, Bray PF, Kleiman NS.** Genetic polymorphisms of the platelet receptors P2Y(12), P2Y(1) and GP IIIa and response to aspirin and clopidogrel. *Thromb Res.* 2007;119(3):355-60.
- 115 Vijayan KV, Liu Y, Sun W, Ito M, Bray PF.** The Pro33 isoform of integrin beta3 enhances outside-in signaling in human platelets by regulating the activation of serine/threonine phosphatases. *J Biol Chem.* 2005 Jun 10;280(23):21756-62
- 116 Vijayan KV, Bray PF.** Molecular mechanisms of prothrombotic risk due to genetic variations in platelet genes: Enhanced outside-in signaling through the Pro33 variant of integrin beta3. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006 May;231(5):505-13.
- 117 Peveling-Oberhag J:** Dynamik des Thrombuswachstums in vitro. Validierung digitaler Imaging-Techniken zur exakten Bestimmung der Thrombusvolumina. Dissertation. Medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2010:23-26;70-71
- 118 James Pawley (Hrsg.):** Handbook of Biological Confocal Microscopy. 3. Auflage. Springer Science and Business Media LLC, 2006
- 119 M. J. Fulwyler:** Electronic separation of biological cells by volume. *Science* (1965), Band 150(3698), S. 910-11
- 120 E. Engvall, P. Perlman:** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 8, Nr.9, 1971, S. 871-4.
- 121 Skaer RJ, Flemans RJ, McQuilkan S.** Mepacrine stains the dense bodies of human platelets and not platelet lysosomes. *Br J Haematol.* 1981 Nov;49(3):435-8.
- 122 Dise CA, Burch JW, Goodman DB.** Direct interaction of mepacrine with erythrocyte and platelet membrane phospholipid. *J Biol Chem.* 1982 May 10;257(9):4701-4.
- 123 Stoldt VR, Peveling J, Loncar R, Beck A, Aurich V, Scharf RE:** Evaluation of platelet thrombus formation under flow. *Blood.* 2005;106:70B-71B
- 124 Vijayan KV, Liu Y, Dong JF, Bray PF.** Enhanced activation of mitogen-activated protein kinase and myosin light chain kinase by the Pro33 polymorphism of integrin beta 3. *J Biol Chem.* 2003 Feb 7;278(6):3860-7.

125 Vijayan, K.V., Huang, T.C., Liu, Y., Bernardo, A., Dong, J.F., Goldschmidt-Clermont, P.J., Alevriadou, B.R., and Bray, P.F. Shear stress augments the enhanced adhesive phenotype of cells expressing the Pro33 isoform of integrin beta3. *FEBS Lett* 540, 41-46.

126 Mason PJ, Chakrabarti S, Albers AA, Rex S, Vitseva O, Varghese S, Freedman JE. Plasma, serum, and platelet expression of CD40 ligand in adults with cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2005 Nov 15;96(10):1365-9.

127 Weber M, Rabenau B, Stanisch M, Nef HM, Möllmann H, Elsässer A, Mitrovic V, Heeschen C, Hamm C. Influence of sample type on soluble CD40 ligand assessment in patients with acute coronary syndromes. *Thromb Res.* 2007;120(6):811-4.

128 Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, Di Febbo C, Nutini M, Fazia M, Falco A, Cuccurullo F, Davi G. Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia: effects of statin therapy. *Circulation.* 2002 Jul 23;106(4):399-402.

129 Harding SA, Sarma J, Josephs DH, Cruden NL, Din JN, Twomey PJ, Fox KA, Newby DE. Upregulation of the CD40/CD40 ligand dyad and platelet-monocyte aggregation in cigarette smokers. *Circulation.* 2004 Apr 27;109(16):1926-9.

130 Davi G, Guagnano MT, Ciabattone G, Basili S, Falco A, Marinopicolli M, Nutini M, Sensi S, Patrono C. Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress *JAMA.* 2002 Oct 23-30;288(16):2008-14.

131 Langer F, Ingersoll SB, Amirkhosavi A, Meyer T, Siddiqui FA, Ahmad S, et al. The role of CD40 in CD40L- and antibody-mediated platelet activation. *Thromb Haemost.* 2005;93:1137-46

132 Santilli F, Basili S, Ferroni P, Davi G. CD40/CD40L system and vascular disease. *Intern Emerg Med.* 2007 Dec;2(4):256-68.

133 Prasad KS, Andre P, Yan Y, Phillips DR. The platelet CD40L/GP IIb-IIIa axis in

atherothrombotic disease. *Curr Opin Hematol.* 2003 Sep;10(5):356-61.

134 Baker EK, Tozer EC, Pfaff M, Shattil SJ, Loftus JC, Ginsberg MH. A genetic analysis of integrin function: Glanzmann thrombasthenia in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 Mar 4;94(5):1973-8.

135 Wang JH, Zhang YW, Zhang P, Deng Q, Ding S, Wang ZK, Wu T, Wang J. CD40 ligand as a potential biomarker for atherosclerotic instability. *Neurol Res.* 2013 Sep;35(7):693-700.

136 Pamukcu B, Lip GY, Snezhitskiy V, Shantsila E. The CD40-CD40L system in cardiovascular disease. *Ann Med.* 2011 Aug;43(5):331-40.