

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und  
Zelltherapeutika (ITZ)

Universitätsklinikum Düsseldorf

Direktor: Dr. med. Johannes Fischer

**Charakterisierung des *Outside-in Signaling* in  
humanen Thrombozyten und HPA-1- $\alpha$ IIb $\beta$ 3  
exprimierenden HEK293-Zellen nach Adhäsion  
an immobilisiertes Heparin**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Katharina Baratella  
(2018)

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

Gez.:

Dekan/in: Univ.-Prof. Nikolaj Klöcker

Betreuer/in: Prof. Rüdiger Scharf

Gutachter/innen: Prof. Rainer Zotz

Prof. Hubert Schelzig

## Zusammenfassung

Heparin ist weltweit eines der meist genutzten Antikoagulanzen und kann in 10-30% der Fälle zu einer moderaten Reduktion der Plättchenanzahl, der sogenannten Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) vom Typ I, führen (Cooney, 2006). Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist, von welcher Bedeutung das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte *Outside-in Signaling* für die Heparin-induzierte Aktivierung von Thrombozyten ist.

In der vorliegenden Studie zeigen wir, dass unfraktioniertes Heparin (UFH) und Fondaparinux zu einer Plättchenaktivierung führen und verifizieren die maßgebliche Beteiligung von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an diesem Prozess. Zu diesem Zweck führten wir unter statischen Bedingungen an immobilisierten Liganden Adhäsionsversuche mit Thrombozyten sowie mit  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten HEK293-Zellen durch.

Die Versuche konnten belegen, dass Thrombozyten nach Adhäsion an immobilisiertes UFH und Fondaparinux ein signifikant erhöhtes *Outside-In Signaling* im Sinne einer verstärkten Phosphorylierung der Kinase Src (pY418) und der Fokalen Adhäsions-Kinase (pY397) aufweisen (Abb. 13). Des Weiteren kommt es Heparin-induziert zum *Spreading* der Thrombozyten; dabei entsprechen die morphologischen Veränderungen denen nach Adhäsion an Fibrinogen (Abb. 15A). Die zuvor beschriebenen Effekte von immobilisiertem UFH und Fondaparinux auf das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte *Outside-In Signaling* bzw. die Zellmorphologie von Thrombozyten ließen sich durch Vorbehandlung der Thrombozyten mit dem  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten Abciximab in signifikantem Ausmaß hemmen, was die zentrale Rolle von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bei der Interaktion zwischen Heparin und Thrombozyten beweist (Abb. 14, Abb. 15B). Diese These konnten wir durch Versuche mit unserem Zell-Modell weiter untermauern. Auch in  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten HEK293-Zellen zeigte sich Heparin-induziert eine erhöhte Phosphorylierung der Kinase C-Src und der Fokalen Adhäsions-Kinase (FAK). Diese Ergebnisse unterstützen unsere Annahme, dass es durch die direkte Interaktion zwischen  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und Heparin zu einer Aktivierung von Thrombozyten kommt.

Die Heparin-induzierte Aktivierung von Thrombozyten könnte deren Verbrauch steigern und so zu einer Reduktion der absoluten Plättchenanzahl im Blut führen. Die direkte Interaktion zwischen Thrombozyten und Heparin mittels  $\alpha_{IIb}\beta_3$  könnte demzufolge die Ursache für die HIT vom Typ I sein.

## Abstract

Heparin is one of the most widely used anticoagulants worldwide and can lead, in 10-30% of cases, to a moderate reduction in the number of platelets, or what is known as heparin-induced thrombocytopenia (HIT) of type I (Cooney, 2006). The central subject of this work is to determine how significant  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -associated outside-in signaling is for the heparin-induced activation of thrombocytes.

In this study, we reveal that unfractionated heparin (UFH) and fondaparinux lead to a thrombocyte activation and verify the crucial involvement of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in this process. For this purpose, we conducted adhesion experiments with thrombocytes as well as with  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfected HEK293 cells on immobilized ligands under static conditions.

The experiments were able to verify that, after adhesion to immobilized UFH and fondaparinux, thrombocytes exhibit a significantly increased outside-in signaling as expressed by a more intensive phosphorylation of the kinase Src (pY418) and focal adhesion kinase (pY397) (Fig.13). Furthermore, heparin-induced spreading of the thrombocytes results; here the morphological changes correspond to those after adhesion to fibrinogen (Fig. 15A). The effects of immobilized UFH and fondaparinux on  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -associated outside-in signaling or the cell morphology of thrombocytes described above can be inhibited to a significant extent by pretreatment of the thrombocytes with the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  receptor antagonist abciximab, which demonstrates the central role of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in the interaction between heparin and thrombocytes (Fig. 14, Fig. 15B). We were able to further corroborate this thesis through experiments with our cell model. Heparin-induced increased phosphorylation of the kinase C-Src and focal adhesion kinase (FAK) was apparent in  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfected HEK293 cells as well. These results support our hypothesis that an activation of thrombocytes results through direct interaction between  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and heparin.

Heparin-induced activation of thrombocytes could increase their uptake and hence lead to a reduction in the absolute number of platelets in the blood. In consequence the direct interaction between thrombocytes and heparin by means of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  could be the cause of type I HIT.

## Abkürzungen

|              |                                                               |                      |                                                                           |
|--------------|---------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>μ</b>     | micro                                                         | <b>NMH</b>           | Niedermolekulares Heparin                                                 |
| <b>Abb.</b>  | Abbildung                                                     | <b>NaF</b>           | Natrium-Fluorid                                                           |
| <b>AT</b>    | Antithrombin                                                  | <b>PBS</b>           | Phosphate buffered saline                                                 |
| <b>aPPT</b>  | aktivierte partielle<br>Thromboplastinzeit                    | <b>PVDF</b>          | <i>Polyvinylidene Difluoride</i>                                          |
| <b>BSA</b>   | <i>bovine serum albumin</i>                                   | <b>SDS</b>           | <i>sodium dodecyl sulfate</i>                                             |
| <b>bzw.</b>  | beziehungsweise                                               | <b>SDS-<br/>PAGE</b> | <i>sodium dodecyl sulfate<br/>polyacrylamide gelelectropho-<br/>resis</i> |
| <b>DMEM</b>  | Dulbecco's <i>Modified<br/>Eagle</i> Medium                   | <b>SFKs</b>          | <i>Src family protein tyrosine<br/>kinases</i>                            |
| <b>DTT</b>   | Dithiothreitol                                                | <b>SH2</b>           | Src-homology 2                                                            |
| <b>ECM</b>   | extrazelluläre Matrix                                         | <b>SH3</b>           | Src-homology 3                                                            |
| <b>EDTA</b>  | <i>Ethylenediaminetetraac-<br/>etic acid</i>                  | <b>SPR</b>           | <i>surface plasmon resonance</i>                                          |
| <b>FAK</b>   | Fokale Adhäsions-<br>Kinase                                   | <b>TBS-T</b>         | <i>Tris Buffered Saline with<br/>Tween 20</i>                             |
| <b>FAT</b>   | <i>focal adhesion<br/>targeting</i>                           | <b>TEMED</b>         | <i>Tetramethylethylenediamine</i>                                         |
| <b>FCS</b>   | <i>Fetal Calf Serum</i>                                       | <b>UFH</b>           | unfraktioniertes Heparin                                                  |
| <b>HEK</b>   | <i>Human embryonic<br/>kidney</i>                             | <b>ULMWH</b>         | <i>ultra low molecular weight<br/>heparine</i>                            |
| <b>HEPES</b> | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-<br>1-piperazinyl)-<br>ethansulfonsäure | <b>M</b>             | Molar                                                                     |
| <b>HIT</b>   | Heparin-induzierte<br>Thrombozytopenie                        |                      |                                                                           |
| <b>kDa</b>   | kilo Dalton                                                   |                      |                                                                           |
| <b>LIBS</b>  | ligandeninduzierte<br>Bindungsstelle                          |                      |                                                                           |

## Inhalt

|          |                                                                 |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>                                               | <b>1</b>  |
| 1.1      | Heparin                                                         | 1         |
| 1.2      | Hämostase                                                       | 2         |
| 1.3      | Integrine                                                       | 4         |
| 1.3.1    | Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und seine Rezeptorkonformationen | 5         |
| 1.4      | Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziiertes Signaling          | 7         |
| 1.4.1    | Src family protein tyrosine kinases – cSrc                      | 9         |
| 1.4.2    | Fokale Adhäsions-Kinase                                         | 11        |
| 1.5      | Abciximab                                                       | 11        |
| <b>2</b> | <b>Ziele der Arbeit</b>                                         | <b>13</b> |
| <b>3</b> | <b>Methoden und Materialien</b>                                 | <b>14</b> |
| 3.1      | Verwendete Chemikalien                                          | 14        |
| 3.2      | Verwendete Puffer und Lösungen                                  | 16        |
| 3.3      | Methoden                                                        | 18        |
| 3.3.1    | Zellkultur                                                      | 18        |
| 3.3.2    | Kryokonservierung der Zellen                                    | 19        |
| 3.3.3    | Auftauen und Revitalisierung von Zellen                         | 19        |
| 3.3.4    | Durchflusszytometrie                                            | 19        |
| 3.3.5    | Plättchenpräparation                                            | 20        |
| 3.3.6    | HEK293-Zellen-Präparation                                       | 21        |
| 3.3.7    | Statische Adhäsion                                              | 21        |
| 3.3.8    | Gelelektrophorese und Western Blot                              | 22        |
| 3.3.9    | Densitometrie                                                   | 23        |
| 3.3.10   | Statistische Methoden                                           | 24        |
| 3.3.11   | Epifluoreszenzmikroskopie                                       | 24        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b>                                               | <b>25</b> |
| 4.1      | Optimierung des experimentellen Verfahrens                      | 25        |

|          |                                                                                                                                                         |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2      | Validierung der Antikörper .....                                                                                                                        | 29        |
| 4.3      | Src/FAK-Aktivierung von Thrombozyten nach Adhäsion an immobilisiertes Heparin unter statischen Bedingungen .....                                        | 30        |
| 4.4      | Wirkung von Abciximab auf den Phosphorylierungsgrad von Src pY418 und FAK pY397 in Thrombozyten nach statischer Adhäsion an Heparin .....               | 33        |
| 4.5      | Morphologische Veränderungen von Thrombozyten nach Adhäsion an immobilisiertes Heparin .....                                                            | 34        |
| 4.6      | Src/FAK-Aktivierung in $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten HEK293-Zellen nach Adhäsion an immobilisiertes Heparin unter statischen Bedingungen ..... | 36        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion .....</b>                                                                                                                                 | <b>39</b> |
| 5.1      | $\beta_3$ als Referenzprotein .....                                                                                                                     | 40        |
| 5.2      | $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziiertes <i>Outside-in Signaling</i> in statisch adhärenen Plättchen an immobilisierte Liganden .....                        | 40        |
| 5.2.1    | Abhängigkeit von der Art des immobilisierten Liganden .....                                                                                             | 41        |
| 5.2.2    | Abhängigkeit von der Konzentration des immobilisierten Liganden .....                                                                                   | 43        |
| 5.2.3    | Abhängigkeit von der Adhäsionszeit .....                                                                                                                | 44        |
| 5.2.4    | Effekt von Abciximab auf das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte <i>Outside-in Signaling</i> ....                                                        | 44        |
| 5.3      | Morphologische Veränderungen statisch adhärenter Plättchen an immobilisierten Liganden .....                                                            | 45        |
| 5.4      | Validierung der Antikörper .....                                                                                                                        | 46        |
| 5.5      | Modell der HEK293-Zellen im Vergleich zu Thrombozyten .....                                                                                             | 46        |
| <b>6</b> | <b>Schlussfolgerung .....</b>                                                                                                                           | <b>49</b> |
| <b>7</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>                                                                                                                       | <b>50</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Heparin

Das Glykosaminoglykan Heparin ist ein in vivo vorkommendes Antikoagulans. Heparin entfaltet seine antithrombotische Wirkung durch die Verstärkung des Effektes von Antithrombin III. Die verstärkte Hemmung der Gerinnungsfaktoren IIa, IX und X durch Antithrombin III führt zu einer verringerten Bildung von Thrombin und dadurch zu einer Hemmung der plasmatischen Hämostase (Schmidt, 2001).

Laut Schätzungen nehmen rund 0,7 % der westlichen Bevölkerung Antikoagulanzen ein (Gustafsson, et al., 2004). Darunter ist Heparin eines der meist genutzten Antikoagulanzen im klinischen Alltag und wird seit mehr als 50 Jahren eingesetzt (Ehud, et al., 2006). Insbesondere wenn ein schneller Effekt gewünscht ist, ist Heparin das Mittel der Wahl (Ehud, et al., 2006) wie zum Beispiel bei einer intensivmedizinischen Behandlung, bei Patienten mit Niereninsuffizienz oder während einer Operation. Heparin wird weltweit zur Prävention und Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen verwendet (Yagi, et al., 2012). Therapeutisch unterscheidet man unfraktionierte und niedermolekulare Heparine. Niedermolekulare Heparine (NMH) sind Fragmente von unfraktionierten Heparinen (UFH). NMH verfügen im Vergleich zu UFH über eine längere Halbwertszeit und eine besser voraussagbare Pharmakokinetik (Ehud, et al., 2006).

Nach *intravenöser* Gabe von UFH erleiden 10-30 % der Patienten eine moderate Reduktion der Plättchenanzahl (Cooney, 2006). Diese klinische Nebenwirkung wird durch nicht immunologische Prozesse verursacht und trägt den Namen Heparin-induzierte Thrombozytopenie vom Typ I (Greinacher, 1995). Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie vom Typ II (HIT II) und die ihr zugrunde liegenden immunologischen Prozesse werden weitaus besser verstanden. 0,5-2 % der Patienten erleiden nach Behandlung mit UFH eine HIT II (Greinacher, 1995). Ursächlich ist eine indirekte Interaktion zwischen Plättchen und Heparin. Immunglobuline der Klasse G reagieren dabei mit Komplexen aus Plättchenfaktor 4 und Heparin (Admiral, et al., 1993). Die HIT I hingegen wird wahrscheinlich durch eine direkte Interaktion zwischen Heparin und Thrombozyten verursacht (Gao, et al., 2011; Yagi, et al., 2012). Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass Heparin in der Lage ist, über Integrine auf der Plättchenoberfläche Thrombozyten direkt zu binden (Faye, et al., 2009). In den vergangenen Jahren wurde zusätzlich gezeigt, dass Heparin über  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermitteltes

*Outside-in Signaling* zur Plättchenaktivierung führt (Yagi, et al., 2012). Diese Zellaktivierung könnte ursächlich für die HIT I sein.

Das *Pentasaccharid* Fondaparinux ist die erste Substanz der neuen Klasse synthetisch hergestellter Antithrombotika (Turpie, et al., 2002) und stellt eine wichtige therapeutische Alternative zu UFH und NMH dar (Gawaz, 2010). Fondaparinux gleicht strukturell der kleinsten funktionellen Einheit von Heparin (Gawaz, 2010) und wirkt durch selektive Inhibition von Faktor Xa antithrombotisch (Turpie, et al., 2002). Als sehr kleines Molekül bindet Fondaparinux kaum an Plasmaproteine und hat dadurch einen höchstgradig vorhersehbaren Effekt auf die Antikoagulation. Aus diesem Grund ist im Vergleich zu den UFH kein Monitoring durch regelmäßige Kontrolle der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) notwendig (Gawaz, 2010). Fondaparinux bindet reversibel an Antithrombin (AT); die Bindung führt zu einer Konformationsänderung von AT und dadurch zur irreversiblen Bindung von Gerinnungsfaktor Xa (Kwong, 2013). Die Inhibition von Faktor Xa via AT führt zur effektiven Hemmung von Thrombin (Turpie, et al., 2002). Fondaparinux weist im Vergleich zu UFH und NMH eine geringere Inzidenz an tiefen Beinvenenthrombosen und Heparin-induzierten Thrombozytopenien auf (Turpie, et al., 2002; Liu, et al., 2014). Moderate Thrombozytopenien im Sinne einer HIT I treten nach Therapie mit Fondaparinux nur in 0,2 bis 3 % der Fälle auf (Administration, U.S. Food and Drug, 2014). Durch das günstigere Nebenwirkungsprofil und die besser voraussehbare Pharmakokinetik hat Fondaparinux in den letzten Jahren deutlich an Relevanz gewonnen.

## 1.2 Hämostase

Die sogenannte Hämostase bildet den physiologischen Schutz gegen Blutungen und ist eine lebenswichtige Funktion des menschlichen Organismus. Pathologisch veränderte Gerinnungsprozesse spielen bei der Pathogenese von vielen Erkrankungen eine zentrale Rolle, wodurch die Hämostase eine besondere klinische Bedeutung erhält (Hick & Hick, 2006). Besonders hervorzuheben sind dabei Thrombosen im venösen System. Die flachen, unregelmäßig geformten, kernlosen Thrombozyten sind die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes und ihre Hauptaufgabe ist die Mitwirkung bei der Blutgerinnung (Schmidt & Lang, 2007). Die Verweildauer der Thrombozyten im Blutkreislauf und somit ihre Lebensdauer beträgt 5-11 Tage (Schmidt & Lang, 2007).

Die Blutgerinnung besteht in der historischen Einteilung aus der primären (zellulären) und sekundären (plasmatischen) Hämostase (Hick & Hick, 2006). Da die Gerinnungsprozesse nicht streng sequentiell ablaufen, sondern ineinander übergreifen, entwickelten Hoffmann und Monroe 2001 das zellbasierte Modell der Gerinnung. Zum besseren Verständnis der komplexen Abläufe beschränken wir uns auf die Erläuterung des Modells der primären und sekundären Hämostase.

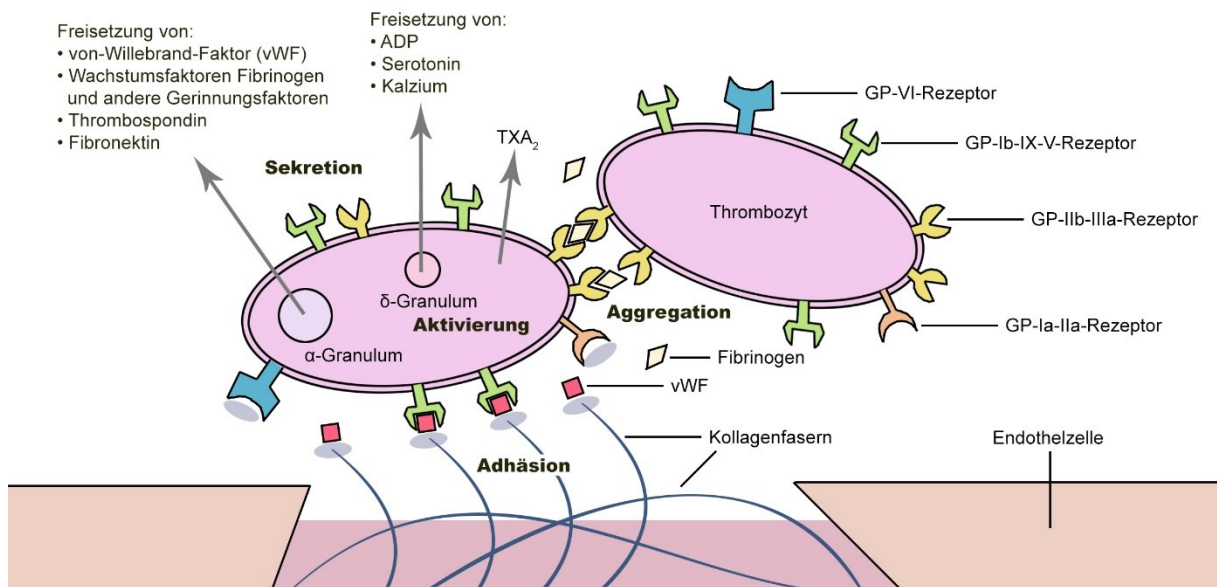


Abb. 1: Schematische Darstellung des Modells der primären Hämostase, sowie Veranschaulichung der Rolle der wichtigsten Glykoproteine (GP): Integrine GP-IIb-IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ), GP-Ib-IX-V und GP-V.

Die primäre Hämostase (Abb. 1) teilt sich in Adhäsion und Aggregation auf. An diesen Prozessen sind zahlreiche Integrine beteiligt, wobei der Glykoproteinrezeptorkomplex  $\alpha_{IIb}\beta_3$  eine besondere Rolle einnimmt (Shattil & Newman, 2004). Die Thrombozytenaggregation ist essentieller Bestandteil der primären Hämostase. Nach einer Endothelläsion kommt es zur Freilegung von extrazellulärer Matrix (ECM). Die Plättchen sind in der Lage, über verschiedene Glykoproteinrezeptoren entweder direkt (GP-V) oder indirekt (GP-Ib-IX-V) über den von-Willebrand-Faktor an die ECM zu binden (Hick & Hick, 2006). Durch die Anlagerung an das Kollagen kommt es zur Plättchenaktivierung und somit zur Freisetzung ihrer  $\alpha$ -Granula. Das wiederum führt zur Ausbildung von sogenannten Pseudopodien, welche die Adhäsions- und Vernetzungsfähigkeiten von Thrombozyten verstärken, sowie zur Konformationsänderung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Hick & Hick, 2006). Als Bestandteil der sekundären Hämostase ist Fibrin nun in der Lage, eine stabile Brücke zwischen den  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptoren verschiedener Plättchen zu bilden, was zu einer Quervernetzung der Thrombozyten untereinander führt (Hick & Hick, 2006). Die sekundäre Hämostase

besteht aus einer Aktivierungs-, Koagulations- und Retraktionsphase. Der dabei entstehende rote Abscheidungsthrombus führt zum stabilen Verschluss der Gefäßläsion (Schmidt & Lang, 2007).

### 1.3 Integrine

Integrine sind heterodimere ( $\alpha\beta$ ) Rezeptoren vom Typ I. Die Aufgabe dieser Transmembranproteine ist es, Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix oder Glykoproteinen zu verbinden. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sind nicht kovalent miteinander verbunden (Hynes, 1992). Beide Untereinheiten sind in Abb. 2 schematisch dargestellt. Sie bestehen aus einer großen extrazellulären Domäne, einer transmembranären Domäne zur Verankerung in der Zellmembran und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne, welche für die Signalweiterleitung nach intrazellulär verantwortlich ist (Shattil & Newman, 2004; Schmidt & Lang, 2007). Die extrazelluläre Seite des Rezeptors interagiert mit Liganden der ECM und Glykoproteinen, die intrazelluläre Seite hingegen mit zytoplasmatischen Proteinen. Eine Ligandenbindung an einer der beiden Seiten des Rezeptors kann den Transfer von Informationen durch die Plasmamembran auf die andere Seite triggern und dort weitere Prozesse aktivieren (Shattil & Newman, 2004).

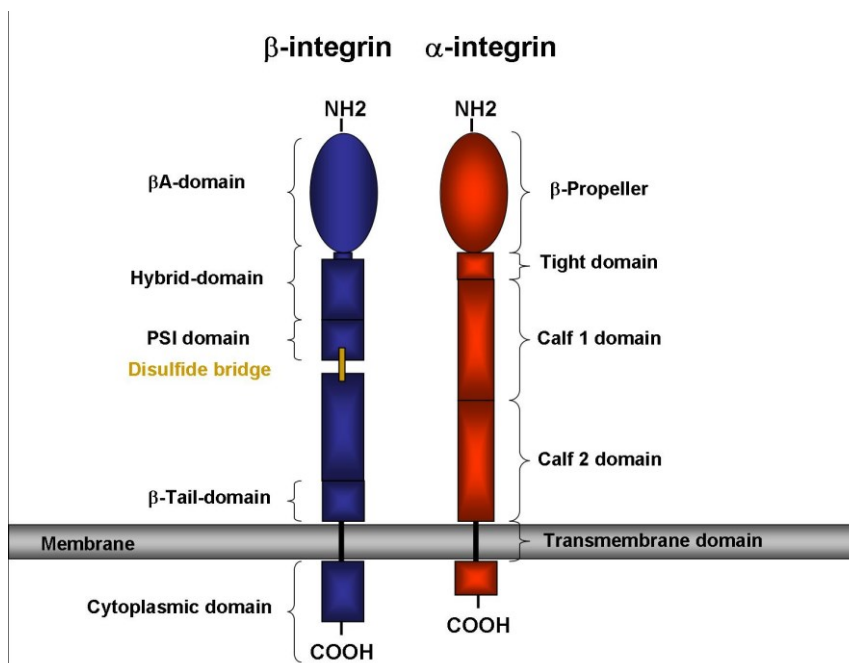


Abb. 2: Schematische Darstellung der  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheit von Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist als Heterodimer mit seinen transmembranären Domänen optimal für bidirektionale Signalweiterleitung designt (Alexander & Bendas, 2011). Mit freundlicher Genehmigung verwendet: © 2011 Alexander M, Bendas G. Published in [short citation] under CC BY-NC-SA 3.0 license.

### 1.3.1 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und seine Rezeptorkonformationen

Das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  kommt ausschließlich auf Thrombozyten vor (Bennett, 2001) und ist das häufigste Protein auf deren Oberfläche (Wagner, et al., 1996). Es wird zu 70 % konstitutiv an der Oberfläche exprimiert und liegt zu 30 % in intrazellulären Speichern vor, welche nach Plättchenaktivierung freigesetzt werden können (Gawaz, et al., 2010). Das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist von großer Bedeutung bei der Interaktion zwischen Plättchen und Plasmaproteinen oder extrazellulärer Matrix (Shattil & Newman, 2004). Diese Interaktion ist essentiell für die Plättchenadhäsion und -aggregation während der Hämostase. Das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist ein bidirektionaler Rezeptor. Die Aktivität des Integrins wird durch verschiedene Einflüsse gesteuert. Das Modell des *Inside-Out* und *Outside-In Signalings* spielt dabei eine grundlegende Rolle (Alexander & Bendas, 2011).

Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors wird durch *Inside-Out Signaling* kontrolliert. Das *Inside-Out Signaling* ist für die Veränderung der Rezeptorkonformation und deren *Cluster*-Bildung verantwortlich. Kommt es zur extrazellulären Bindung eines Liganden, löst dies hingegen die Kaskade des *Outside-In Signaling* aus (Shattil & Newman, 2004). Die Bedeutung des *Inside-Out* und *Outside-In Signaling* für Plättchen ist in Abb. 3 schematisch dargestellt.

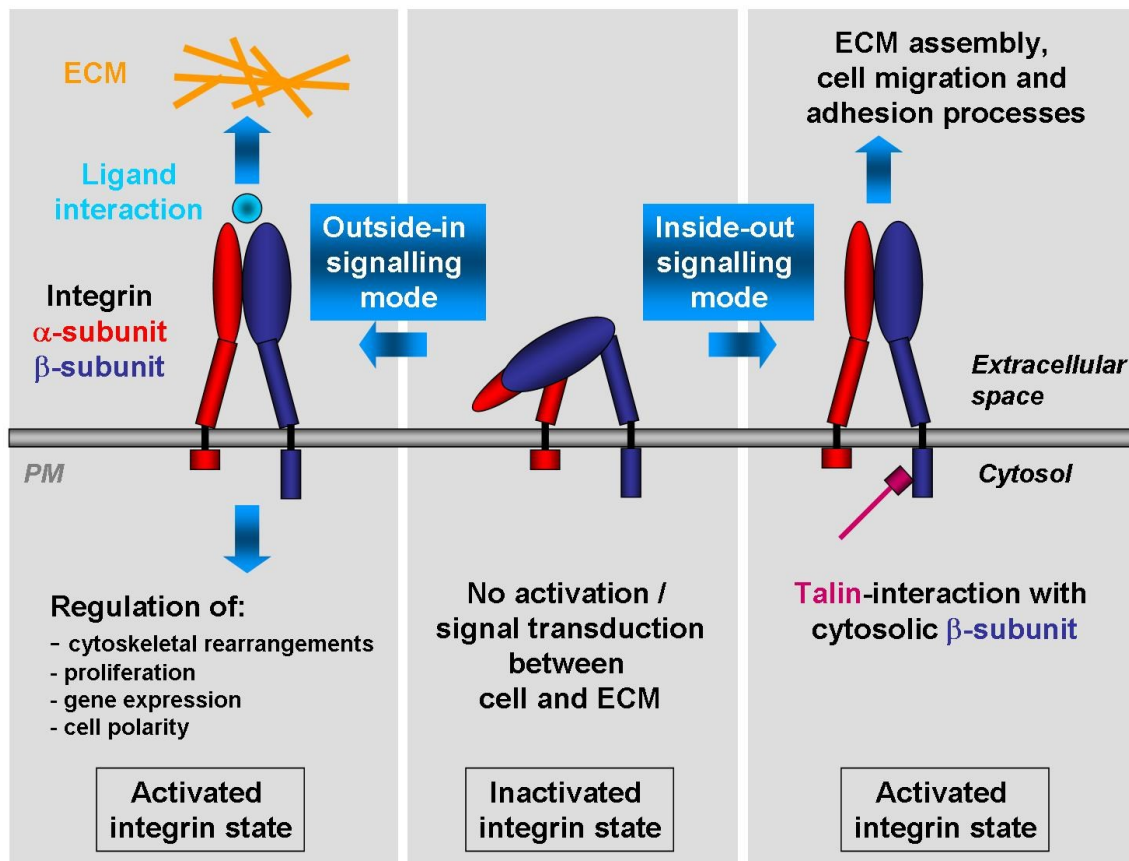


Abb. 3: Das *Signaling* von Integrinen kann in zwei Wege unterteilt werden, das *Outside-In* (links) und das *Inside-Out Signaling* (rechts). So kann der bidirektionale Rezeptor je nach Signalrichtung zu unterschiedlichen biologischen und biochemischen Konsequenzen führen. Die Kaskade des *Inside-Out Signaling*s führt zu Konformationsänderungen und erhöhter Affinität des Rezeptors gegenüber extrazellulären Liganden. Bindet ein extrazellulärer Ligand an das Integrin, führt dies zum *Outside-In Signaling* und kann so z. B. zu Veränderungen in der Genexpression oder der Struktur des Zytoskeletts führen (Alexander & Bendas, 2011). Mit freundlicher Genehmigung verwendet: © 2011 Alexander M, Bendas G. Published in [short citation] under CC BY-NC-SA 3.0 license.

In ruhenden Plättchen liegt das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in einer *low-affinity* Konformation vor und ist nicht in der Lage, gelöstes Fibrinogen zu binden (Shattil, 2005). In diesem Zustand ist die Liganden-Bindungstasche des Rezeptors, gebildet durch die N-terminalen Endstücke der extrazellulären Domänen von  $\alpha_{IIb}$  und  $\beta_3$ , leicht zur Membran gebeugt und die transmembranäre und zytoplasmatische Domäne beider Untereinheiten reihen sich nah aneinander (Shattil, 2005). Durch *Inside-Out Signaling* kann das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  die *high-affinity* Konformation annehmen; dabei richten sich die extrazellulären Domänen auf und die transmembranären und zytoplasmatischen Domänen separieren sich voneinander (Shattil, 2005). Durch diese Konformationsänderung werden ligandeninduzierte Bindungsstellen (LIBS) freigelegt. In Abb. 4 sind beide Konformationen schematisch dargestellt.

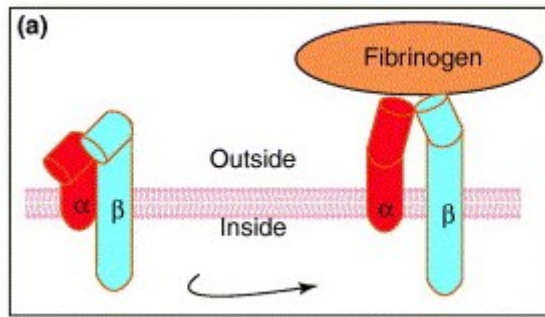


Abb. 4: In ruhenden Plättchen liegt  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in der *low-affinity* Konformation vor (links). In der *high-affinity* Konformation ist  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in der Lage lösliches Fibrinogen zu binden (rechts) (Shattil, 2005). Mit freundlicher Genehmigung verwendet: Elsevier und Copyright Clearance Center.

Diese strukturellen Veränderungen des Rezeptors können über zwei Wege ausgelöst werden: durch das intrazelluläre Binden des zytoskeletalen Adapterproteins Talin an die  $\beta_3$ -Domäne oder durch die extrazelluläre Bindung von immobilisiertem Fibrinogen (Shattil, 2005).

#### 1.4 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziiertes Signaling

Eine weitgehend erforschte und wichtige Interaktion *downstream* des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist die zwischen SFKs (*Src family protein tyrosine kinases*) und FAK (fokaler Adhäsionskinase): In adhären Zellen bilden C-Src und andere SFKs einen physikalischen Komplex mit FAK als Antwort auf ligandeninduziertes *Clustering* (Shattil, 2005). Nach Ligandenbindung an  $\alpha_{IIb}\beta_3$  kommt es zum Rezeptor-*Clustering* und dadurch auch zu einer Häufung von c-Src, was die Dissoziation von Csk verursacht (Shattil & Newman, 2004). Wie in Abb. 5 dargestellt, führt dies zur Dephosphorylierung von Src pY529 durch eine bisher nicht identifizierte Phosphatase und zur Autophosphorylierung von Src pY418 im *Src activation-loop* (Shattil & Newman, 2004). C-Src ist nun vollkommen aktiviert und in der Lage *downstream* Effektoren zu phosphorylieren (Shattil & Newman, 2004). Die Dephosphorylierung von Src pY529 und Phosphorylierung von Src pY418 sind Bestandteil des gesteigerten *Outside-In Signalings* nach ligandeninduzierter Stimulation und wurden in unserer Arbeit als Marker für die Aktivität von Thrombozyten genutzt.

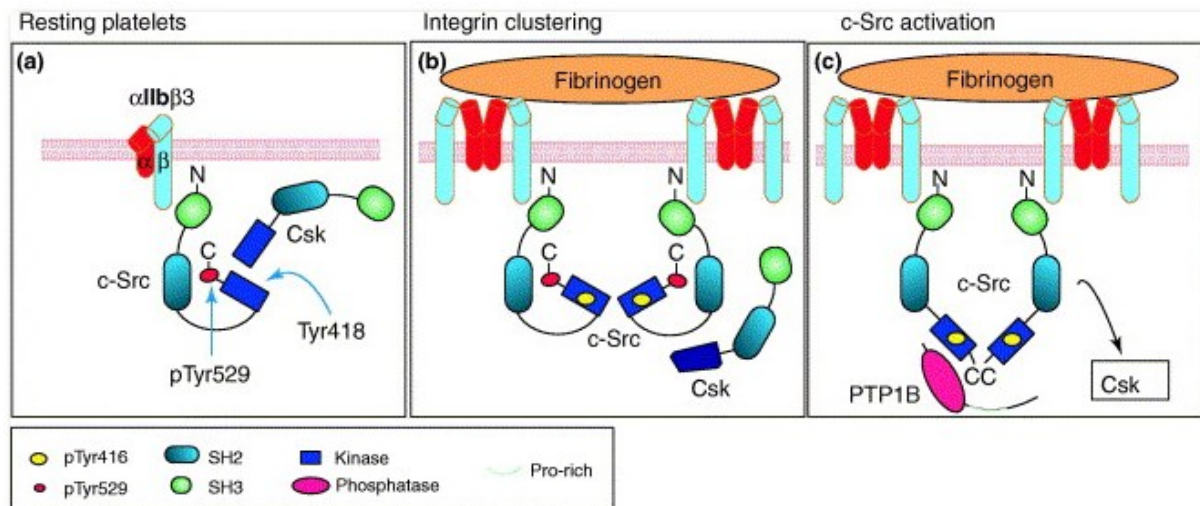


Abb. 5: a) Schematische Darstellung von  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -gebundenem C-Src in ruhenden Plättchen. b) Rezeptor-Clustering und Häufung von C-Src durch Bindung von löslichem Fibrinogen an  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . c) Nach Bindung von Fibrinogen an  $\alpha_{IIb}\beta_3$  kommt es zur Aktivierung von C-Src: Dissoziation von Csk, Dephosphorylierung von Src pY529 und Autophosphorylierung von Src pY416 (Shattil, 2005). Mit freundlicher Genehmigung verwendet: Elsevier und Copyright Clearance Center.

Integrin *Clustering* führt des Weiteren zur Aktivierung von FAK und somit zur Autophosphorylierung von FAK pY397 an ihrer C-terminalen Domäne und an einigen weiteren Stellen der Kinase (Parson, 2003). Die Phosphorylierung an FAK pY397 korreliert mit einer erhöhten katalytischen Aktivität der fokalen Adhäsionskinase (Parson, 2003). Nach Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase bildet diese Bindungsstellen für Proteine mit SH2- oder SH3-Domänen wie z. B. SFKs aus. Im Bereich der Autophosphorylierungsstelle FAK pY397 entsteht eine Bindungsstelle mit hoher Affinität zu SH2 Domänen von SFKs (Mitra, et al., 2005), und innerhalb der Prolin-reichen Sequenz von FAK entsteht eine Bindungsstelle mit hoher Affinität zu SH3-Domänen von Proteinen (Playford & Schaller, 2004). Die Aktivierung von FAK führt so zur Rekrutierung einer Vielzahl an Proteinen mit SH2- und SH3-Domänen und zur Vermittlung der Signale entlang verschiedener *downstream* Signalwege (Parson, 2003). Die Phosphorylierung von FAK pY397 ist Bestandteil des gesteigerten *Outside-In Signalings* nach ligandeninduzierter Stimulation und wurde in unserer Arbeit ebenfalls als Marker für die Aktivität von Thrombozyten genutzt. Der c-Src-FAK Komplex fördert die SFK-abhängige Phosphorylierung von zusätzlichen Tyrosin-Resten, welche nachfolgend als Bindungsstellen für Proteine dienen, die in der anschließenden Phase des *Outside-In Signalings* involviert sind, und verbreitet so das Integrin-Signal (Playford & Schaller, 2004). Diese komplexe Signalkaskade (siehe Abb. 6) spielt eine entscheidende Rolle in der Plättchenadhäsion und über die

Ausbildung von Lamellipodien durch Aktin-Polymerisation auch in der Zellmigration (Parson, 2003).

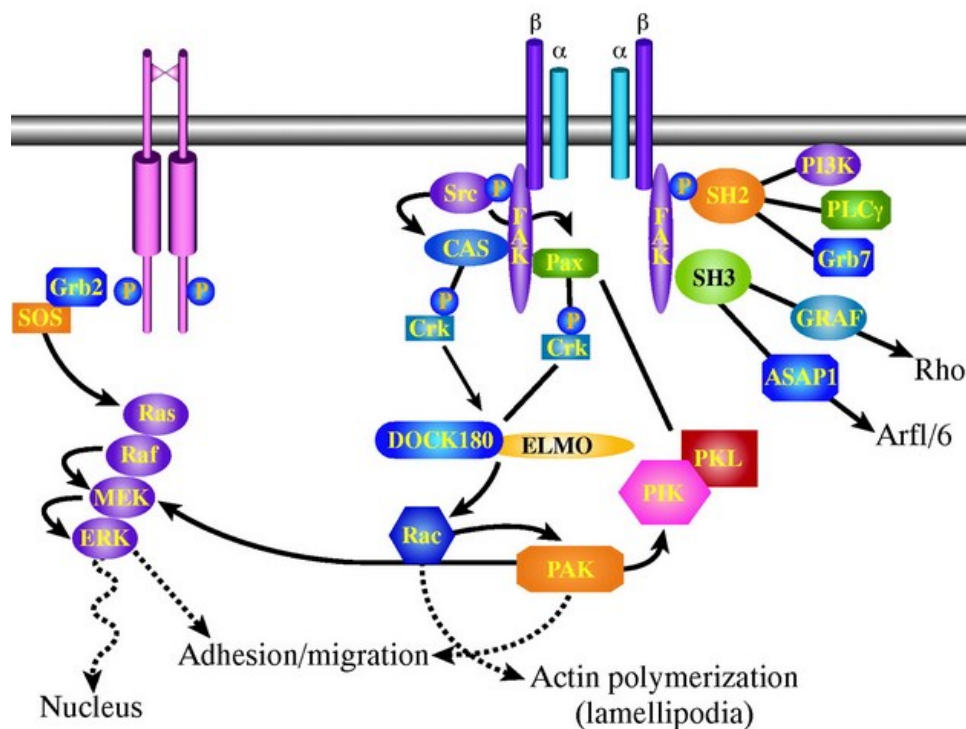


Abb. 6: Integrin  $\alpha_{11b}\beta_3$ -assoziiertes *Outside-in Signaling*. Die Signalkaskade von C-Src und FAK über Rac und Pak spielen eine entscheidende Rolle in der Modulation von Zelladhäsion, Migration und Aktin-Polymerisation (Parson, 2003). Mit freundlicher Genehmigung verwendet: The Company of Biologists Ltd..

#### 1.4.1 Src family protein tyrosine kinases – cSrc

SFKs (*Src family protein tyrosine kinases*) spielen eine entscheidende Rolle im  $\alpha_{11b}\beta_3$ -vermittelten *Outside-In Signaling* (Shattil, 2005). C-Src liegt durch N-terminale Myristoylierung zum einen an der Plasmamembran gebunden vor, zum anderen ist ein Vorrat konstitutiv mit  $\alpha_{11b}\beta_3$  verbunden (Shattil, 2005). C-Src ist ein intrazelluläres Protein. Sein Aufbau ist in Abb. 7 schematisch dargestellt. C-Src besteht wie alle SFKs aus SH3- und SH2-Domänen, einer katalytischen Domäne, einer C-terminalen Sequenz und einem N-terminalen Ende (Shattil, 2005). Die SH3- und SH2-Domänen sind für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich. Die C-terminale Sequenz enthält einen Tyrosin-Rest, der essentiell für die Regulierung der katalytischen Aktivität ist. Über das N-terminale Ende ist Src mit der Zellmembran verbunden (Shattil, 2005). In Plättchen liegt ein Pool an c-Src konstitutiv an  $\alpha_{11b}\beta_3$  assoziiert vor. Diese direkte Interaktion findet zwischen der SH3-Domäne von c-Src und der zytoplasmatischen Domäne der  $\beta_3$ -Untereinheit von  $\alpha_{11b}\beta_3$  statt (Shattil & Newman, 2004). In nicht stimulierten Zellen ist die Src-Aktivität durch diverse intramolekulare

Wechselwirkungen inhibiert (Shattil, 2005). Es finden sich Interaktionen zwischen den Domänen SH3, SH2 und der Kinase-Domäne. Weitere Wechselwirkungen liegen zwischen der SH2-Domäne und phospho-Tyrosin529 am C-Terminus vor (Shattil, 2005). Src pY418 hingegen ist im inaktivierten Zustand nicht phosphoryliert, es befindet sich im *activation loop* der Kinase und limitiert im nicht-phosphorylierten Zustand die Fähigkeit von c-Src, Substrate zu phosphorylieren (Shattil, 2005).

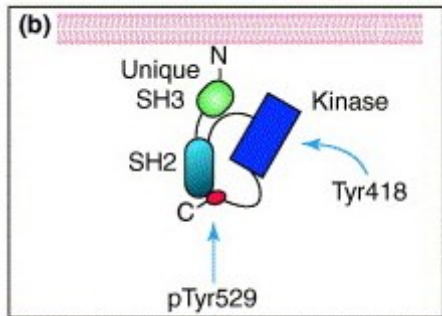


Abb. 7: Darstellung der Struktur der Kinase C-Src, welche konstitutiv über ihr N-terminales Ende an die Plasmamembran gebunden ist (Shattil, 2005). Mit freundlicher Genehmigung verwendet: Elsevier und Copyright Clearance Center.

### 1.4.2 Fokale Adhäsions-Kinase

Die fokale Adhäsions-Kinase (FAK) ist eine ubiquitär vorkommende Tyrosin-Kinase mit einer Molekülmasse von 125 kDa (Mitra, et al., 2005). FAK ist nicht Membran-assoziiert (Schlaepfer, et al., 1999) und besteht aus einer zentralen katalytischen Kinase-Domäne, umgeben von zwei großen N- und C-terminalen nicht-katalytischen Domänen (Parson, 2003) und einer Prolin-reichen Sequenz (Mitra, et al., 2005). Der Aufbau von FAK ist in Abb. 8 schematisch dargestellt. Die N-terminale Domäne enthält die Autophosphorylationsstelle FAK pY397 (Schlaepfer, et al., 1999) und vermittelt die Interaktion mit Integrinen und *Growth Factor* Rezeptoren (Parson, 2003). Die C-terminale Domäne ist essentiell für Protein-Protein Interaktionen und enthält unter anderem eine Bindungsstelle für Proteine, die SH3- oder SH2-Domänen enthalten (Parson, 2003). Die Phosphorylierung von FAK pY397 ist Bestandteil des gesteigerten *Outside-In Signalings* nach ligandeninduzierter Stimulation und wurde in unserer Arbeit ebenfalls als Marker für die Aktivität von Thrombozyten genutzt.

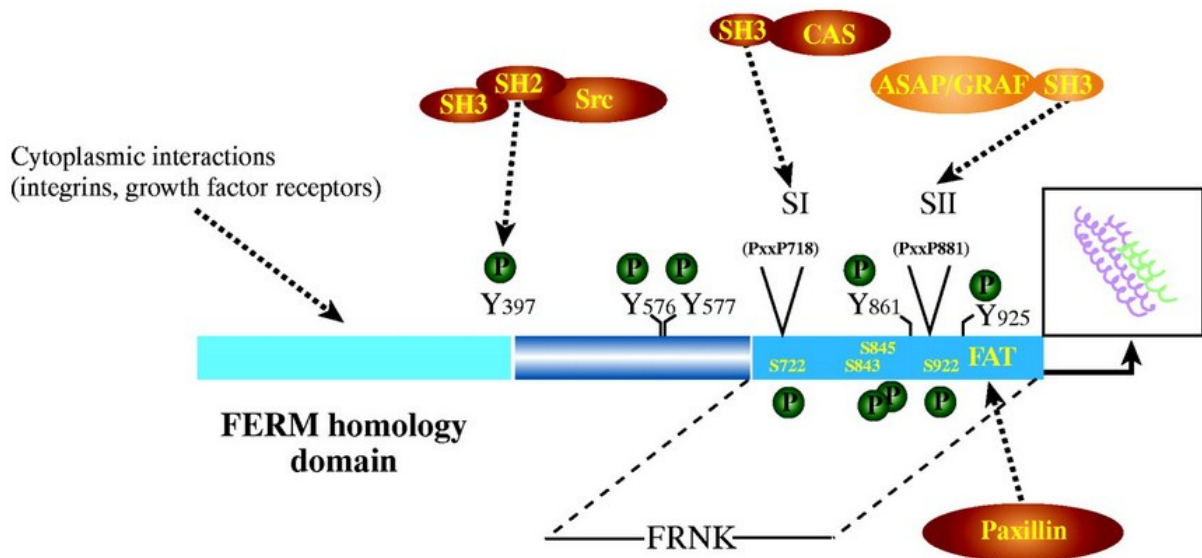


Abb. 8: Aufbau der Fokalen Adhäsions-Kinase. Die N-terminale Domäne, dargestellt in hellblau (links), weist Ähnlichkeiten zu Proteinen der *FERM homologie domain* Familie auf. Aus diesem Grund wird sie auch als FERM-Domäne bezeichnet. Mittig, in dunkelblau dargestellt, ist die katalytische Domäne zu sehen. Die C-terminale Domäne (rechts, in mittelblau dargestellt) wird auch als *focal adhesion targeting* (FAT) Domäne bezeichnet und ist in der Lage, mit Praxillin zu interagieren (Parson, 2003). Mit freundlicher Genehmigung verwendet: The Company of Biologists Ltd..

### 1.5 Abciximab

Abciximab ist ein gentechnisch hergestelltes Fab-Antikörperfragment des monoklonalen Antikörpers 7E3 (Gawaz, 2010). Es hat eine hohe Affinität zum  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -

Komplex und blockiert diesen irreversibel. Abciximab verhindert so die Quervernetzung der Plättchen mittels Fibrin und wirkt als Thrombozytenaggregationshemmer (Gawaz, 2010). Die Halbwertszeit von Abciximab beträgt nur wenige Minuten, die Wirkdauer ist allerdings durch die irreversible Bindung von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  mit 24-48 Stunden deutlich länger. Abciximab wird gewichtsadaptiert verabreicht und ist ein Notfallmedikament, welches bei der Therapie eines akuten Koronarsyndroms (instabile Angina pectoris, NSTEMI) zum Einsatz kommt. Des Weiteren wird es zur Prävention von kardialen ischämischen Komplikationen während perkutanen Koronarinterventionen bei Hochrisiko-Patienten verabreicht (Ibbotson, et al., 2003; Piccolo, et al., 2015).

## 2 Ziele der Arbeit

Allgemeines Ziel der Arbeit war es, die biochemische Grundlage der Heparin-induzierten Thrombozytopenie vom Typ I zu untersuchen. Unsere Arbeitshypothese war, dass es durch die direkte Interaktion zwischen dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und Heparin zu einer Aktivierung der Thrombozyten kommt und dass diese Plättchenaktivierung ursächlich für die HIT I ist.

Zur Verifizierung, in welchem Ausmaß  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an der Plättchenaktivierung beteiligt ist, planten wir die genaue Untersuchung des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierten *Outside-in Signalings* nach Wechselwirkung von Thrombozyten mit Heparin. Diesem Zweck sollten Adhäsionsexperimente mit gewaschenen Plättchen an immobilisiertem Heparin dienen. Im Anschluss sollte der Aktivitätszustand der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierten Src-Kinase (spezifische Phosphorylierung an Src pY418) und der Fokalen Adhäsionskinase (spezifische Phosphorylierung an FAK pY397) durch Western Blot-Analysen bestimmt werden. Der Effekt von unfraktioniertem Heparin und dem *ultra low molecular weight heparin* Fondaparinux auf Thrombozyten sollte dabei vergleichend untersucht werden. Zur genauen Validierung der Rolle von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  im Prozess der Heparin-induzierten Plättchenaktivierung planten wir außerdem Adhäsionsversuche mit  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten HEK293-Zellen und untersuchten den Effekt des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten Abciximab auf die Heparin-induzierte Plättchenaktivierung.

### 3 Methoden und Materialien

#### 3.1 Verwendete Chemikalien

2-Propanol; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München

Abciximab; Lilly Deutschland GmbH, D-Gießen

30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid; National Diagnostics, D-Hessisch Oldendorf

Ammoniumpersulfat; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München

Anti-Mouse IgG; GE Healthcare, D-Solingen

Anti-Rabbit IgG; GE Healthcare, D-Solingen

Anti-Src (pY418); Invitrogen-Life Technologies, D-Darmstadt

Anti-Src (pY529); Invitrogen-Life Technologies, D-Darmstadt

Anti-FAK (pY397); Cell Signaling Technology, D-Frankfurt

Apyrase; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München

Bisacrylamid; National Diagnostics, D-Hessisch Oldendorf

Bromphenol-blau; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München

BSA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München

CaCl<sub>2</sub>; Merck Chemicals, D-Darmstadt

Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail; Roche, D-Grenzach Whylen

D-Glucose; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München

DMEM (1x); Gibco-Life Technologies, D-Darmstadt

DTT; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München

*Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München

F12 + GlutaMax; gibco-Life Technologies, D-Darmstadt

Fetal Calf Serum; Invitrogen-Life Technologies, D-Darmstadt

Fibrinogen; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München

G418 Sulfate; InvivoGen, F-Toulouse

Gentamycin; Gibco-Life Technologies, D-Darmstadt

Glycerol; Sigma- Aldrich Chemie GmbH, D-München

Glycin; Carl Roth GmbH, D-Karlsruhe

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES); Sigma- Aldrich Chemie GmbH, D-München

Integrin  $\beta_3$  Rabbit Antikörper; Cell Signaling Technology, D-Frankfurt

KCl; Merck Chemicals, D-Darmstadt

Methanol; Merck Chemicals, D-Darmstadt

MgCl<sub>2</sub>; Merck Chemicals, D-Darmstadt  
 Milchpulver; Sucofin, D-Zeven  
 MnCl<sub>2</sub>; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München  
 Monoklonal Anti-Integrin  $\alpha$ IIb (CD41) Clone PM6/248; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München  
 Mouse IgG1; Becton Dickinson (BD) Biosciences, D-Dümmer  
 Mouse IgG antibody (PE); BIOZOL, D-Eching  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; Merck Chemicals, D-Darmstadt  
 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; Merck Chemicals, D-Darmstadt  
 NaCl; Sigma- Aldrich Chemie GmbH, D-München  
 NaF; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München  
 NaHCO<sub>3</sub>; Merck Chemicals, D-Darmstadt  
 Paraformaldehyd; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München  
 PBS-Pufferlösung pH 7,3 und 6,5; PAA, D-Solingen  
 Phalloidin-FITC; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München  
 Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München  
 Protein-Assay-Dye-Reagent-Concentrate; Bio-Rad Laboratories GmbH, D-München  
 Prostaglandin E1; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München  
 Precision Plus Protein Western C Standard; Bio-Rad Laboratories GmbH, D-München  
 Precision Plus Protein Standard Dualcolor; Bio-Rad Laboratories GmbH, D-München  
 Precision Protein Strep Tactin-HRP Conjugate; Bio-Rad Laboratories GmbH, D-München  
 Rainbow Calibration Particles (8 peaks); BD Bioscience, D-Dümmer  
 Saponin; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München  
*sodium dodecyl sulfate* 20 % (SDS); Carl Roth GmbH, D-Karlsruhe  
 Super Signal West Dura Stable Peroxide Buffer; Thermo Scientific, D-Braunschweig  
 Super Signal West Dura Luminol / Enhancer Solution; Thermo Scientific, D-Braunschweig  
*Tetramethylethylenediamine* (TEMED); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München  
 Tris Base; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München  
 Tris-HCL; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München  
 Triton X-100; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-München  
 Tween 20; Merck Chemicals, D-Darmstadt  
 Unfraktioniertes Heparin; Rotexmedica, D-Trittau

## 3.2 Verwendete Puffer und Lösungen

### Adhäsionsversuch:

#### 1x Lysepuffer:

- 1 % (v/v) Triton X-100
- 10 % Glycerol
- 145 mM NaCl
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 50 mM Tris-HCl, pH 7.4
- 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>
- 0,2 mM NaF
- 1 % (v/v) Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2
- Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail
- H<sub>2</sub>O

Bei Thrombozyten zusätzlich:

- 2,5 % EDTA

#### Tyrode-Puffer:

- 137 mM NaCl
- 2,8 mM KCl
- 0,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 12 mM NaHCO<sub>3</sub>
- 5,5 mM D-Glucose
- H<sub>2</sub>O

Zusätzlich bei HEK293-Zellen:

- 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>

Zusätzlich bei Thrombozyten:

- 0,1 % BSA
- 10 mM HEPES
- 0,9 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1 mM CaCl<sub>2</sub>

## **Gelelektrophorese:**

### ***Separating-Gel:***

- 7 % Acrylamid/ 0,19 % Bisacrylamid
- 375 mM Tris-HCl/ 0,4 % SDS, pH 8.8
- 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,1 % (v/v) TEMED
- H<sub>2</sub>O

### ***Stacking-Gel:***

- 3,9 % Acrylamid/ 0,1 % Bisacrylamid
- 125 mM Tris-HCl/ 0,4 % SDS, pH 6.8
- 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,1 % (v/v) TEMED
- H<sub>2</sub>O

### ***Laufpuffer (pH~ 8,3):***

- 120 mM Tris Base
- 950 mM Glycin
- 0,5 % (w/v) SDS
- H<sub>2</sub>O

### ***6x Sample Buffer:***

- 350 mM Tris-HCl/ 0,25 % SDS, pH 6.8
- 30 % (v/v) Glycerol
- 10 % (w/v) SDS
- 500 mM Dithiothreitol (DTT)
- 0,002 % (w/v) Bromphenol-blau

## **Western Blot:**

### ***Transferpuffer (pH~ 8,3):***

- 1x Towbin Puffer (12 mM Tris Base, 96 mM Glycin, H<sub>2</sub>O)
- 20 % (v/v) Methanol
- 0,05 % (w/v) SDS

- H<sub>2</sub>O

### **Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS-T) (pH 7,6)**

- 20 mM Trisbase
- 137 mM NaCl
- auf pH 7,6 titrieren
- 0.1 % Tween 20
- H<sub>2</sub>O

## **3.3 Methoden**

### **3.3.1 Zellkultur**

Bei den HEK (*Human embryonic kidney*) 293-Zellen handelt es sich um eine adhären wachsende Zelllinie menschlicher embryonaler Nierenzellen. Die Zelllinie ist das Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit menschlichem Adenovirus 5. Die  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten HEK293-Zellen wurden in einem Inkubator [BINDER; Tuttingen] bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Zellkulturmedium bestand aus einer 1:1-Mischung von Dulbecco's *Modified Eagle* Medium (DMEM) und F-12-Medium mit 10 % *Fetal Calf Serum* (FCS) und 100 µg/ml Gentamycin. Als Selektionsmarker für die  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten Zellen diente Geneticin (G418) in einer Konzentration von 1000 µg/ml. Nach Erreichen von 70-80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen in PBS suspendiert und für 7 Minuten bei 4°C und 300 x g zentrifugiert [Hettich Zentrifuge Universal 30 RF, Ø = 24,4 cm]. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml Zellmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauerkammer bestimmt. Die Zellkonzentration wurde mit folgender Formel berechnet:

#### **Formel 1: Formel zur Berechnung der Zellkonzentration**

$$C = \frac{n}{Q} \times VF \times 10^4$$

C = Zellzahl/ml

n = ermittelte Zellzahl in allen gezählten  
Quadranten

Q = Anzahl der gezählten Quadranten

VF = Verdünnungsfaktor

Alle Arbeiten im Zusammenhang mit der Kultivierung der HEK293-Zellen wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt.

### 3.3.2 Kryokonservierung der Zellen

Um im Laufe der Experimente auf Zellen zurückgreifen zu können, wurden Reserven in Form von tiefgefrorenen Zellen angelegt. Die Zellen wurden für einen kurzen Zeitraum bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bzw. für einen längeren Zeitraum bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dabei wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen in PBS suspendiert. Die Zellsuspension wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $150 \times g$  für 7 Minuten zentrifugiert, resuspendiert und anschließend wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauerkammer bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte das Resuspendieren der Zellen in DMEM und F<sub>12</sub> im Verhältnis 1:1, 40 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Im Anschluss wurden die Zellen zügig bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bzw.  $-196^{\circ}\text{C}$  in Kryo-Röhrchen eingefroren. Die Ausgangszellzahl betrug  $1 \times 10^6$  in einem Milliliter Medium.

### 3.3.3 Auftauen und Revitalisierung von Zellen

Die eingefrorenen Kryo-Röhrchen wurden dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Wasserbad aufgetaut. Nach Zugabe von 4 ml PBS folgte die Zentrifugation bei  $150 \times g$  für 7 Minuten. Das alte Medium wurde abgezogen und das Pellet in Zellkulturmedium (s. o.) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zur weiteren Kultivierung verwendet.

### 3.3.4 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie [FACSCalibur; BD Biosciences] wurden die HEK293-Zellen regelmäßig auf die Anzahl an exprimierten  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Rezeptoren untersucht. Die Detektion des Rezeptors erfolgte über einen Phycoerythrin(PE)-markierten, monoklonalen Anti-Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}$  (CD41) Antikörper.

Zunächst wurde das Medium abgezogen, darauffolgend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurden die Zellen in PBS suspendiert und mit Hilfe von 2-prozentigem Paraformaldehyd fixiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Zellgemisch 1:1 mit PBS verdünnt und für 10 Minuten bei  $200 \times g$  und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgezogen und es folgte die Resuspension in 90  $\mu\text{l}$  PBS. Nach Zugabe des spezifischen Antikörpers (Anti-CD41) folgte eine 30-minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Zellen mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 10 Minuten,  $200 \times g$ , Raumtemperatur), der

Überstand wurde abgezogen und der PE-markierte Zweitantikörper hinzugefügt (*Mouse IgG antibody*). Zur Erfassung der unspezifischen Bindung wurde eine Zellprobe mit *Mouse IgG<sub>1</sub>* als Isotypkontrolle mitgeführt. Beide Proben wurden im Anschluss für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurde zu allen Ansätzen 1 ml PBS gegeben. Zur Berechnung der Rezeptorzahl wurden Rainbow-Kalibrationspartikel bei gleicher Geräteeinstellung gemessen. Mit den Rainbow-Partikeln können maximal acht Meanwerte einer definierten Anzahl von PE-Molekülen zugeordnet und jeweils eine Ausgleichsgerade berechnet werden. Der ermittelte PE-Meanwert der Probe kann anhand der Geradengleichung als Fluoreszenz-Äquivalente wiedergegeben werden. Über die Fluoreszenz-Äquivalente und die PE-Ratio konnte die Rezeptorzahl pro Zelle berechnet werden.

### 3.3.5 Plättchenpräparation

Die Probanden unserer Studie haben der Verwendung ihrer Blutproben für experimentelle Zwecke zugestimmt und wurden über die Studie aufgeklärt. Unsere Studie ist Teil eines Forschungsprogramms mit dem Titel „Modulation der Plättchenthrombogenität durch genetisch determinierte Varianten thrombozytärer Integrine“. Dieses Forschungsprogramm wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät geprüft und bei fehlenden ethischen oder berufsrechtlichen Bedenken freigegeben (Studiennummer: 1864). Alle Probanden waren körperlich gesund und haben in den zehn Tagen vor der Blutabnahme keine thrombozytenfunktionshemmenden Medikamente (ASS, Thienopyridine) eingenommen. Die insgesamt 8 Probanden hatten zum Zeitpunkt der Experimente ein Durchschnittsalter von 28,9 Jahren. Es lag eine Geschlechterverteilung von sieben Frauen und einem Mann vor. Den Probanden wurde am jeweiligen Versuchstag etwa 54 ml Blut aus der V. mediana cubiti in Citrat Röhrchen (0,129 M gepuffertes Natrium-Citrat) entnommen. Dabei wurden die ersten ml Blut verworfen, um aktivierten Tissue Factor aus den Blutproben zu entfernen. Tissue Factor hat eine plättchenaktivierende Wirkung und entsteht bei Gefäßläsionen (z. B. in Folge eines Einstiches bei der Blutabnahme).

Nach der Blutabnahme wurden die Proben bei Raumtemperatur und 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert [Hettich Zentrifuge Universal 30 RF, Ø = 24,4 cm, Soft-Modus]. Das entstandene plättchenreiche Plasma (PRP) wurde 1:1 mit PBS (pH 6,5) gemischt. Dabei wurden jeweils 2 ml PRP mit 2 ml PBS verdünnt und mit 8 µl 500 U/ml Apyrase (Endkonzentration: 0,5 U/ml) und 40 µl 1 mM PGE1 (Endkonzentration: 0,01 mM)

versetzt. Das Gemisch aus PRP, PBS, Apyrase und PGE1 wurde erneut 6 Minuten bei Raumtemperatur und 850 x g zentrifugiert. Nach abgießen des Überstandes wurde das entstandene Pellet in 250 µl Tyrode-Puffer schonend suspendiert (in einem Zeitraum von ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur).

Zur Bestimmung der Plättchenzahl in der Suspension dienten Sysmex-Messungen [Sysmex K-4500, Sysmex Deutschland, Norderstedt]. Die so ermittelte Plättchenanzahl des Resuspendats wurde zuletzt mit Hilfe von Tyrode-Puffer auf die gewünschte Zellkonzentration von  $5 \times 10^8$  Plättchen/ml eingestellt. Im Anschluss ruhten die Plättchen für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Gegebenenfalls wurden die Plättchen zuvor zusätzlich mit Abciximab versetzt (Endkonzentration: 10µg/ml) und ruhten anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur.

### **3.3.6 HEK293-Zellen-Präparation**

Nach Erreichen von 70-80 % Konfluenz wurden die Zellen zu experimentellen Zwecken genutzt. Zunächst wurde das Medium gründlich entfernt und die Petrischalen mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen in einem ml Tyrode-Puffer suspendiert. Mit Hilfe der Neubauerkammer wurde die Zellzahl bestimmt (s. o.). Für die Experimente wurden 750.000 Zellen/400 µl Tyrode-Puffer genutzt. Drei Minuten vor Beginn der statischen Adhäsion wurde dem Tyrode-Zellgemisch 0,5 mM  $\text{MnCl}_2$  hinzugefügt.

### **3.3.7 Statische Adhäsion**

Die Adhäsionsversuche wurden unter statischen Bedingungen auf 12-Well-Platten [Greiner Bio-One GMBH, D-Frickenhäusen) durchgeführt. Die Adhäsionsfläche betrug 3,9 cm<sup>2</sup> pro Well. Die 12-Well Platten wurden am Vortag mit 10 U/ml unfraktioniertem Heparin (UFH), 3 µg/ml Fondaparinux, 100 µg/ml humanem Fibrinogen und 1 % Hitze-inaktivierten BSA (jeweils verdünnt in PBS pH 7,3) beschichtet. Pro Well wurden 400 µl Liganden-Lösung aufgetragen. Durch Lagerung für 12 Stunden bei 4°C sowie für eine Stunde bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Immobilisierung von Fibrinogen, Fondaparinux und Heparin. Nach der Immobilisierung wurden die Wells einmal mit 2 ml PBS (pH 7,3) gespült und anschließend mit je 400 µl 1 % Hitze-inaktiviertem BSA für 30 Minuten bei Raumtemperatur saturiert. Zuletzt wurden die Wells erneut mit PBS gewaschen.

Auf die beschichteten Wells wurde 400 µl Plättchen-/HEK293-Zellsuspension aufgetragen. Dies entsprach einer Zellanzahl von  $2 \times 10^8$ . Kurz vor der Gabe auf die

Wells wurde 1mM CaCl<sub>2</sub> zur Plättchen-/Zellsuspension hinzugefügt. Anschließend wurden die 12-Well-Platten für 60 Minuten bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> gelagert. Danach wurde je 400 µl 2 x Lysepuffer auf die mit BSA beschichteten Wells und auf die Wells mit Abciximab-behandelten Plättchen gegeben. Der Überstand der restlichen Wells wurde abgezogen, mit 400 µl eiskaltem PBS (pH 7,3) gespült und zuletzt mit 200 µl 1 x Lysepuffer befüllt. Zur vollständigen Lyse wurden die Wells eine Stunde auf Eis gelagert, anschließend in Eppendorf Tubes überführt und durch 15-minütige Zentrifugation bei 16.000 x g und 4°C wurden die Zellmembranreste entfernt [Eppendorf Zentrifuge 5415 R].

### 3.3.8 Gelelektrophorese und Western Blot

Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben wurde über die Bradford-Methode mittels eines Spektrofotometers vom Typ Genesys 10s UU-Vis [Thermo Fisher Scientific, D-Schwerte] photometrisch bestimmt. Dazu wurde mit dem jeweiligen Lysepuffer eine Verdünnungsreihe als *bovine serum albumin* Standard (BSA-Standard) angefertigt:

- 100 µg/ml BSA
- 250 µg/ml BSA
- 500 µg/ml BSA
- 750 µg/ml BSA
- 1000 µg/ml BSA
- 1500 µg/ml BSA

Je 8 µl *Blank* (Lysepuffer), BSA-Standard oder Probe wurden zu 400 µl 1:4-verdünntem (in H<sub>2</sub>O; filtriert mit Filterpapier) *Protein-Assay-Dye-Reagent-Concentrate* zugefügt, für 8 min inkubiert und anschließend wurde die Proteinkonzentration bei 595 nm Wellenlänge im Photometer gemessen. Die Proben wurden mit 15 µl *Sample-Buffer* und H<sub>2</sub>O auf das gleiche Volumen (75µl) aufgefüllt und im Anschluss bei 95°C denaturiert. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben durch 5-minütige Zentrifugation bei 16000 x g und 4°C gereinigt [Eppendorf Zentrifuge 5415 R].

Für die Western Blot-Analyse wurden 25 µg Protein der jeweiligen Proben auf 7-prozentiges SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden bei 230 V Spannung in der Gelelektrophoresekammer [Peqlab Biotechnologie GmbH, D-Erlangen] für ca. 120 Minuten auf das Gel aufgetrennt. Als Molekulargewichtmarker wurden Precision Plus Protein Standards von Bio-Rad verwendet.

Das Blotting wurde mittels des sogenannten nassen Blot-Verfahrens durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 10 Minuten in Transfer-Puffer inkubiert. Die verwendeten *Polyvinylidene Difluoride* Membranen (PVDF-Membranen) [0,2 µm; Bio-Rad Laboratories GmbH, D-München] wurden vor dem Blot für eine Minute in Methanol und anschließend für 10 Minuten in eiskaltem Transfer-Puffer inkubiert. In einer Blotting Kammer [Bio-Rad Laboratories GmbH, D-München] wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran in einem elektrischen Feld geblottet. Nach 60-minütigem Blotting bei 100 V wurden die Membranen für ca. 10 Minuten in TBS-T inkubiert. Anschließend wurden die Membranen eine Stunde in 5-prozentigem BSA (gelöst in TBS-T) und 1 mM NaF bei Raumtemperatur geblockt. Im Anschluss erfolgte die Immunreaktion mit Anti-Src pY418 Antikörpern (oder Anti-Src Y529), Anti-FAK pY397 Antikörpern und am darauffolgenden Tag mit Integrin β3 Antikörpern. Die Inkubation mit den Erstantikörpern Src pY418, Src Y529 und FAK pY397 erfolgte in einer Verdünnung von 1:1000 in 2,5-prozentigem BSA (gelöst in TBS-T). Der Erstantikörper für β3 wurde in einer Verdünnung von 1:2500 genutzt. Die Erstantikörper-Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden je zwei Waschvorgänge mit TBS-T für jeweils 5 Minuten durchgeführt. Die Zweitantikörper-Inkubation erfolgte in einem Zeitraum von 1,5 Stunden mit HRP-markierten Anti-Kaninchen-Antikörpern in einer Verdünnung von 1:5000 in TBS-T. Darauf folgten drei Spülvorgänge in TBS-T für jeweils 5 Minuten. Die gewaschenen Membranen wurden mit *Super Signal West Dura Stable Peroxide Buffer* und *Enhancer Solution* (Mischverhältnis 1:1) und Wasser (Mischverhältnis 1:2) für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Membranen bei unterschiedlichen Expositionszeiten belichtet.

### 3.3.9 Densitometrie

Für die densitometrische Auswertung der Banden wurde ein Bio-Rad *VersaDoc Imaging* System verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels der *QuantityOne Imaging Software* [Bio-Rad Laboratories GmbH, D-München]. Zur Beschreibung der jeweiligen Src- bzw. FAK-Kinase-Aktivität wurde der Quotient gebildet, bestehend aus ermittelten Src pY418-/ Src pY529-/ FAK pY397-Signalen und den entsprechenden ges. β3-Signalen.

### 3.3.10 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz zwischen zwei Stichproben erfolgte mittels Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (IBM SPSS Software). Es lag ein Signifikanzniveau von 95 % bzw.  $\alpha < 0,05$  zugrunde.

### 3.3.11 Epifluoreszenzmikroskopie

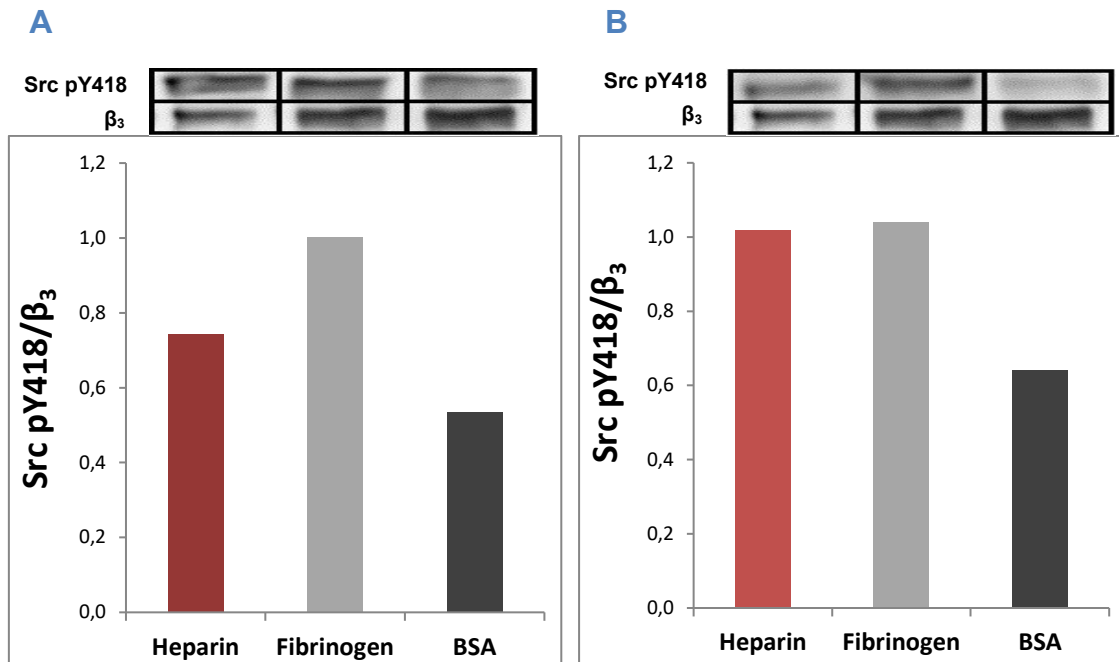
Insgesamt 20  $\mu\text{l}$  gewaschene Plättchen in einer Verdünnung von  $1 \times 10^5/\mu\text{l}$  wurden zur statischen Adhäsion für 45 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  auf den entsprechenden Liganden inkubiert. Zum Teil wurden die Plättchen wie oben beschrieben zuvor mit Abciximab behandelt. Nach der statischen Adhäsion wurden die überschüssigen, nicht adhärenen Plättchen entfernt. Die adhärenen Plättchen wurden mit Hilfe von 4-prozentigem Paraformaldehyd fixiert und mittels Behandlung mit 0,1-prozentigem Saponin permeabilisiert. Im Anschluss wurden die Plättchen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Phalloidin-FITC ( $50\mu\text{g/ml}$ ) angefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten, in Dunkelheit und bei Raumtemperatur, wurden die Plättchen mit einer 0,1-prozentigen Saponin-Lösung gewaschen. Die Bilder wurden mit der Axiocam ICm1-Kamera [Carl-Zeiss, D-Jena] unter Nutzung des Axiovert 100M Mikroskops [Carl-Zeiss, D-Jena] und mit einem 100x Öl-Immersions-Objektiv [Carl-Zeiss, D-Jena] akquiriert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Optimierung des experimentellen Verfahrens

Zur Validierung der Experimentbedingungen fanden zunächst diverse Vorexperimente statt. Dabei wurde mittels Western Blot der Aktivierungsgrad von Src pY418 und FAK pY397 in Heparin-adhärenenten Plättchen bei diversen Adhäsionszeiten und Ligandenkonzentrationen ermittelt. In Abb. 9 und Abb. 10 ist der Aktivierungsgrad von Src pY418 und FAK pY397 nach 15 bzw. 45 Minuten Adhäsionszeit vergleichend dargestellt. Als Positivkontrolle diente der Phosphorylierungsgrad von Src pY418 und FAK pY397 nach Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen (100 µg/ml). Einprozentiges BSA wurde hingegen als Negativkontrolle eingesetzt. In der Literatur sind aktivierende Effekte von Heparin auf Thrombozyten in einer Konzentration von 10 U/ml beschrieben (Gao, et al., 2011); aufgrund dessen haben wir uns entschieden, in unseren Vorexperimenten mit dieser Konzentration zu arbeiten.

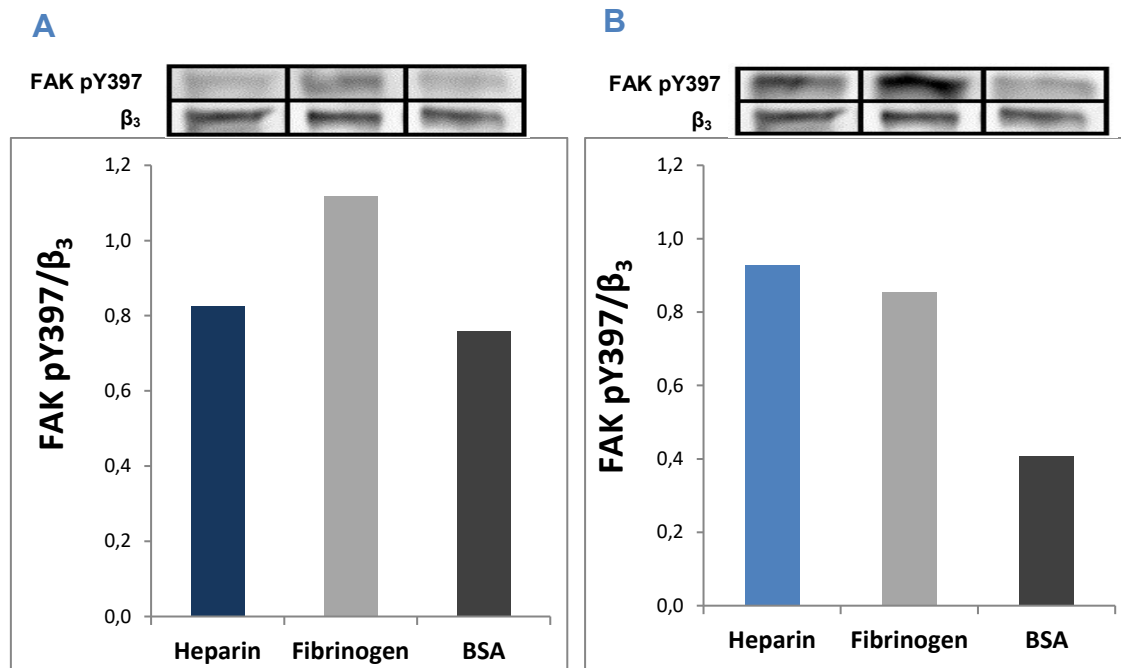
In unseren Versuchen konnten wir exemplarisch zeigen, dass der Phosphorylierungsgrad von Src pY418 sowohl nach 15-, als auch 45-minütiger statischer Adhäsion an Fibrinogen erhöht ist. Für die statische Adhäsion an Heparin ist erst bei einer 45-minütigen Adhäsionszeit ein erhöhter Phosphorylierungsgrad von Src pY418 im Vergleich zur Negativkontrolle mit BSA festzustellen (Abb. 9 A).



**Abb. 9: Vergleich des Phosphorylierungsgrades von Src pY418 nach Adhäsion an immobilisiertes Heparin unter statischen Bedingungen bei diversen Inkubationszeiten.**

Gewaschene Plättchen wurden auf Heparin (10 U/ml), Fibrinogen (100 µg/ml) als Positivkontrolle und BSA (1 %) als Negativkontrolle für 15 (A) bzw. 45 Minuten (B) bei 37°C unter statischen Bedingungen inkubiert. Die Blots wurden mit anti-Src pY418 Antikörpern inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Als Referenzprotein wurde β<sub>3</sub> verwendet.

Der Phosphorylierungsgrad von FAK pY397 zeigt ähnliche Tendenzen. Nach 15-minütiger Adhäsionszeit konnten wir exemplarisch eine erhöhte Aktivierung der Fibrinogen-adhärenenten Plättchen, im Vergleich zur Negativkontrolle mit BSA, feststellen (Abb. 10 A). Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten zeigt sich auch für den Liganden Heparin ein erhöhter Phosphorylierungsgrad von FAK pY397 im Vergleich zur Negativkontrolle mit BSA (Abb. 10 B).



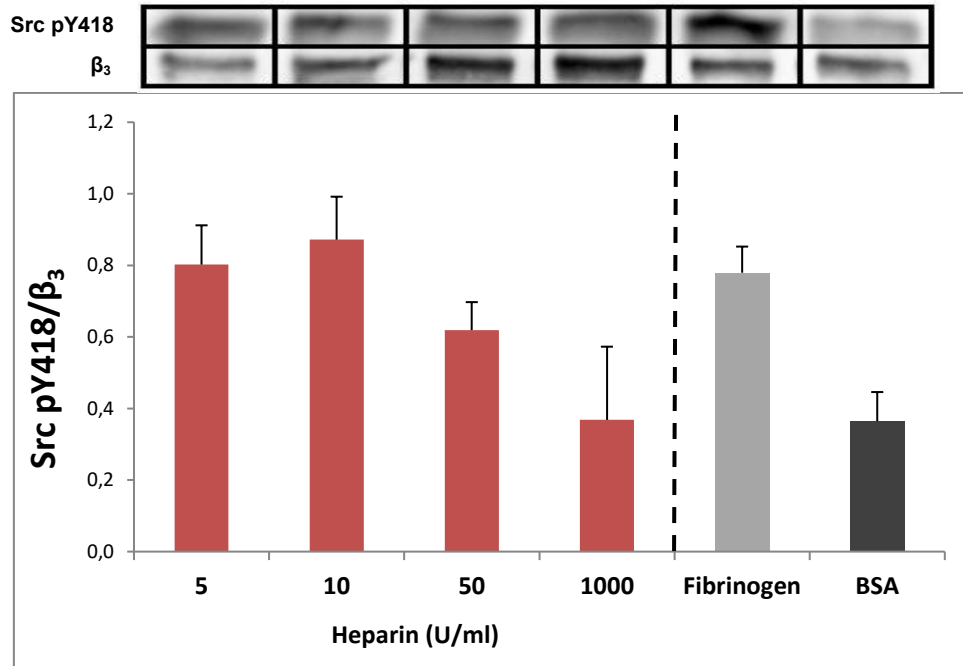
**Abb. 10: Vergleich des Phosphorylierungsgrades von FAK pY397 nach Adhäsion an immobilisiertes Heparin unter statischen Bedingungen bei diversen Inkubationszeiten.**

Gewaschene Plättchen wurden auf Heparin (UFH 10 U/ml), Fibrinogen (100 µg/ml) als Positivkontrolle und BSA (1 %) als Negativkontrolle für 15 (A) bzw. 45 Minuten (B) bei 37°C unter statischen Bedingungen inkubiert. Die Blots wurden mit anti-FAK pY397 Antikörpern inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Als Referenzprotein wurde β<sub>3</sub> verwendet.

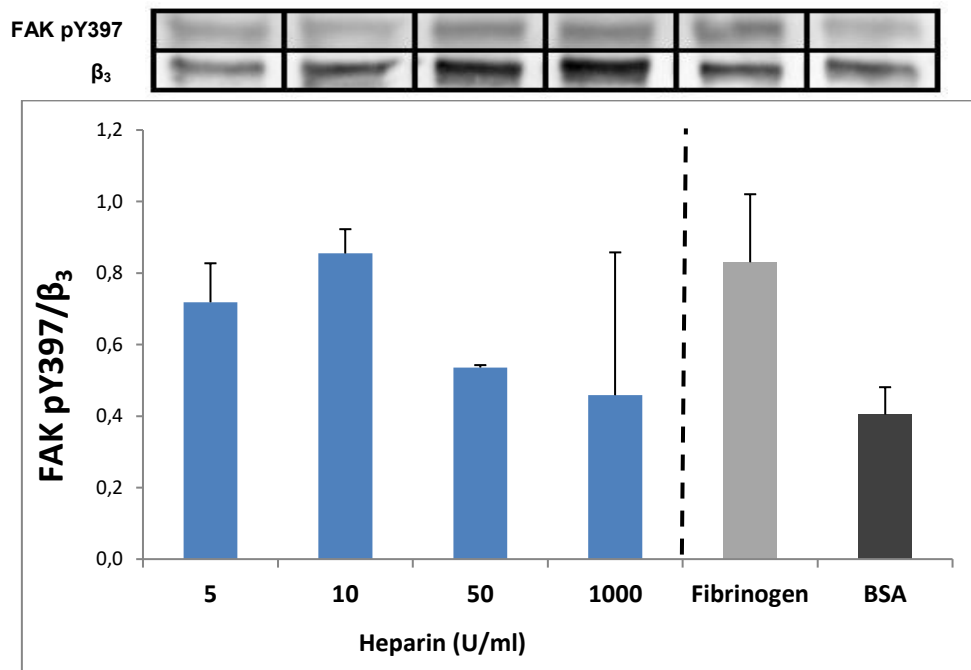
Nach einer Adhäsionszeit von 45 Minuten ist im Vergleich zu einer 15-minütigen Adhäsionszeit bei den Heparin-adhären Plättchen in unseren exemplarisch durchgeführten Experimenten ein höherer Aktivierungsgrad zu erkennen. Zusätzlich findet sich ein größerer Unterschied im Phosphorylierungsgrad zwischen der Negativkontrolle mit BSA und den Liganden Heparin bzw. Fibrinogen. Aus diesen Gründen entschieden wir uns in unserer Versuchsreihe für eine Inkubationszeit von 45 Minuten.

In nachfolgenden Experimenten wurde die Aktivierbarkeit von Src pY418 und FAK pY397 nach 45-minütiger Adhäsion an Heparin in diversen Konzentrationen getestet. Zunächst einmal fällt in Abb. 11 auf, dass kein lineares Verhältnis zwischen Ligandenkonzentration und Phosphorylierungsgrad von Src pY418 und FAK pY397 vorliegt. Bei der Erhöhung der Heparinkonzentration von 5 U/ml auf 10 U/ml findet sich zunächst ein Anstieg der Plättchenaktivität. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration an UFH auf 50 bzw. 1000 U/ml kommt es hingegen zu einer Verringerung des Phosphorylierungsgrades von Src pY418 und FAK pY397.

**A**



**B**



**Abb. 11: Vergleich des Phosphorylierungsgrades von Src pY418 und FAK pY397 nach Adhäsion unter statischen Bedingungen bei 45-minütiger Adhäsionszeit an immobilisiertes Heparin in diversen Konzentrationen.**

Gewaschene Plättchen wurden auf Heparin (UFH 5 U/ml, 10 U/ml, 50 U/ml und 1000 U/ml), Fibrinogen (100 µg/ml) als Positivkontrolle und BSA (1 %) als Negativkontrolle für 45 Minuten bei 37°C unter statischen Bedingungen inkubiert. Die Blots wurden entweder nur mit anti-Src pY418 (A) oder anti-FAK pY397 (B) Antikörpern inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Als Referenzprotein wurde β<sub>3</sub> verwendet. Densitometrie Daten sind Mittelwerte ± SD, n=2. Die Blot-Bilder sind repräsentativ.

Wie in Abb. 11 zu sehen, ergaben sich für Src pY418 nach statischer Adhäsion an 10 U/ml UFH stabile Werte mit relativ niedriger Standardabweichung. Des Weiteren fand sich nach Plättchenadhäsion an 10 U/ml immobilisiertes UFH die stärkste Aktivierung von Src pY418 im Vergleich zur Negativkontrolle mit BSA (Abb. 11 A). Selbiges ist für den Phosphorylierungsgrad von FAK pY397 in Abb. 11 B zu erkennen. In der Notfallmedizin wird Heparin üblicherweise als Bolus in einer Dosis von 5000 IE gegeben. Das Gefäßsystem eines erwachsenen menschlichen Körpers enthält eine durchschnittliche Blutmenge von 5-6 Liter. Nach einer Bolus-Therapie mit Heparin erlangt man somit eine Konzentration von 8-10 IE/ml Blut. Zusätzlich sind in der Literatur bereits gute Effekte von Heparin in einer Konzentration von 10 U/ml beschrieben (Gao, et al., 2011). Aus den zuvor genannten Gründen entschieden wir uns in unserer Experimentreihe für eine Heparinkonzentration von 10 U/ml.

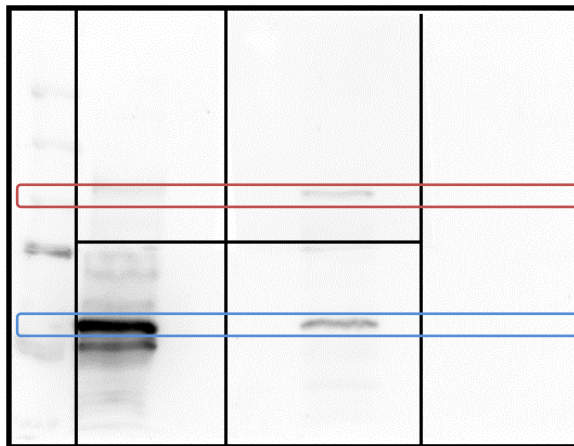
## 4.2 Validierung der Antikörper

Zur Überprüfung der Funktionalität der Antikörper und zum Ausschluss unspezifischer Signale auf Höhe des Molekulargewichtes von FAK bzw. Src wurden experimentell die nachfolgenden Blot-Bilder erstellt. Es wurden Proben mit hoher Aktivität genutzt. Die FAK pY397 und gesamt FAK-spezifischen Banden befinden sich bei einem Molekulargewicht von 119 kDa. Der zweite Antikörper alleine führt auf der Höhe von 119 kDa Molekulargewicht weder bei den Plättchen (Abb. 12 B) noch bei den HEK293-Zellen (Abb. 12 C) zu unspezifischen Signalen. Die Src pY418 und gesamt Src-spezifischen Banden befinden sich bei einem Molekulargewicht von 60 kDa. Auch hier kommt es durch den zweiten Antikörper weder bei Plättchen (Abb. 12 B) noch bei HEK293-Zellen (Abb. 12 C) zu unspezifischen Signalen.

A

|    |           |     |       |
|----|-----------|-----|-------|
| MM | FAK pY397 | FAK | 2. AK |
|    | Src pY418 | Src |       |

B



C

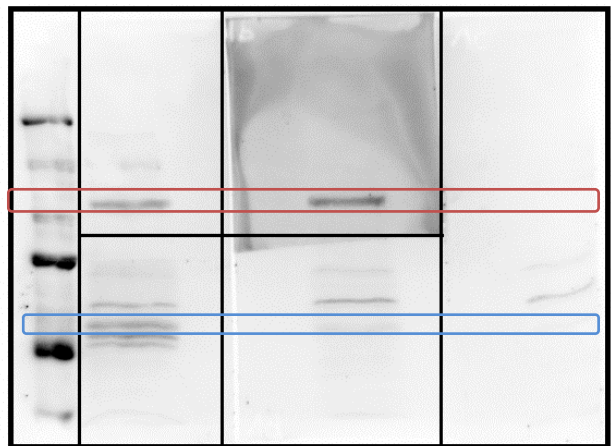


Abb. 12: Validierung des 1. und 2. Antikörpers.

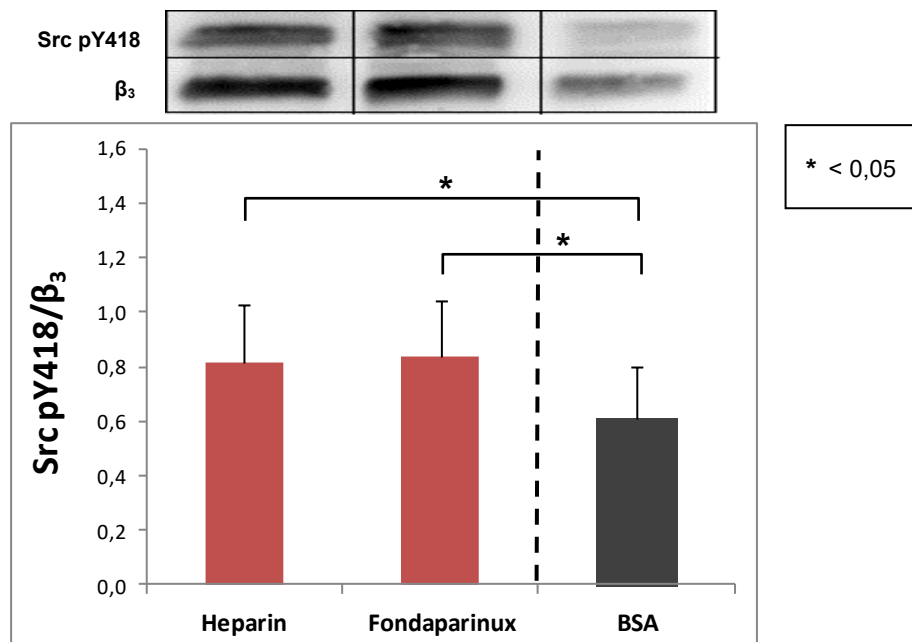
Gewaschene Plättchen (B) bzw. HEK293-Zellen (C) wurden auf Fibrinogen (100 µg/ml) für 45 Minuten bei 37°C unter statischen Bedingungen inkubiert. Die Blots wurden, wie in Abb. 12 A schematisch dargestellt, entweder mit anti-FAK pY397, anti-FAK gesamt, anti-Src pY418, anti-Src gesamt Antikörpern oder nur mit HRP-markiertem Anti-Kaninchen-Antikörper (zweiter Antikörper) inkubiert. MM = Molekulargewichtsmarker, rotes Rechteck = 60 kDa (Src), blaues Rechteck = 119 kDa (FAK).

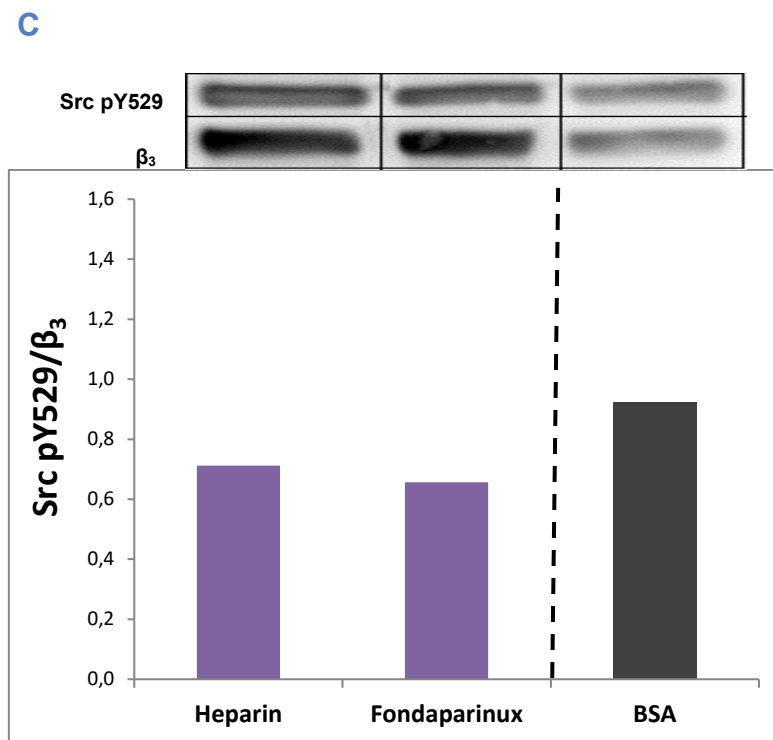
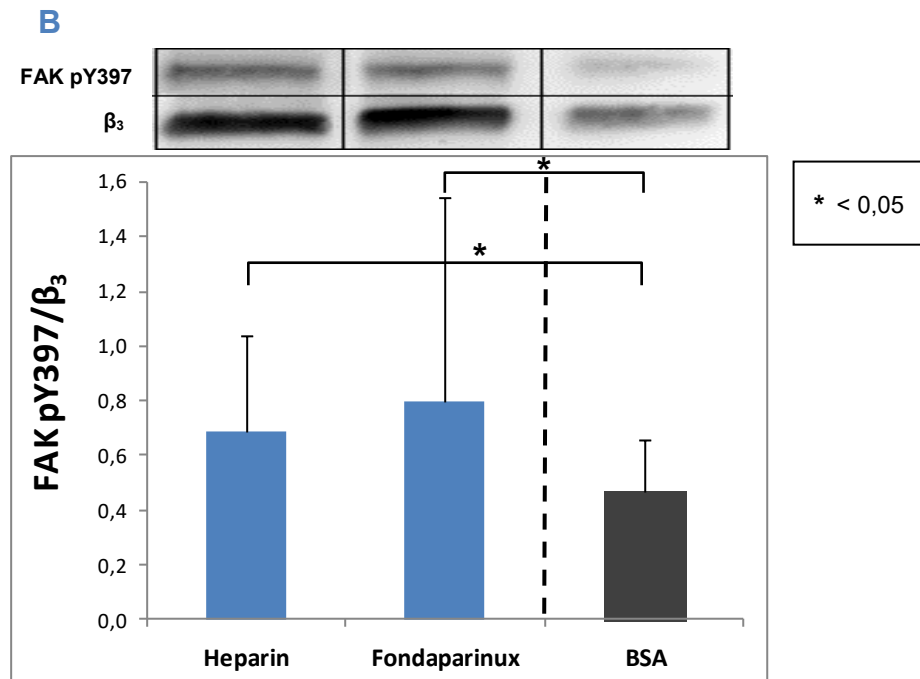
### 4.3 Src/FAK-Aktivierung von Thrombozyten nach Adhäsion an immobilisiertes Heparin unter statischen Bedingungen

Die Wirkung von UFH und Fondaparinux auf das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte *Outside-in Signaling* und damit die Phosphorylierung von Src pY418 und FAK pY397 sowie die Dephosphorylierung von Src pY529 wurden in Adhäsionsversuchen unter statischen Bedingungen an den entsprechenden immobilisierten Liganden untersucht. Abb. 13 A illustriert den Phosphorylierungsgrad von Src pY418 in Plättchen nach statischer

Adhäsion an die immobilisierten Liganden UFH, Fondaparinux und BSA. Der Phosphorylierungsgrad von Src pY418 nach Adhäsion an UFH ist signifikant höher als der Grad der Phosphorylierung nach Adhäsion an die Negativkontrolle BSA. Selbiges gilt für Fondaparinux. In Abb. 13 B ist die Illustration des Aktivierungsgrades von FAK pY397 gezeigt. Nach statischer Adhäsion von Thrombozyten an UFH und Fondaparinux zeigt sich der Phosphorylierungsgrad von FAK pY397 im Vergleich zur Negativkontrolle mit BSA ebenfalls signifikant erhöht. Zwischen den beiden Liganden Fondaparinux und unfractioniertem Heparin zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Des Weiteren ist der Phosphorylierungsgrad von Src pY529 als Marker für die Aktivierung von Src exemplarisch dargestellt (Abb. 13 C). Nach statischem Adhäsionsversuch an der Negativkontrolle mit BSA zeigt sich eine vermehrte Phosphorylierung von Src pY529. Nach Adhäsion an UFH und Fondaparinux zeigt sich hingegen eine verminderte Phosphorylierung von Src pY529.

**A**





**Abb. 13: Phosphorylierungsgrad von Src pY418, Src pY529 und FAK pY397 nach Adhäsion an UFH und Fondaparinux unter statischen Bedingungen.**

Gewaschene Plättchen wurden auf Heparin (UFH 10 U/ml), Fondaparinux (3 µg/ml) und BSA (1 %) als Negativkontrolle für 45 Minuten bei 37°C unter statischen Bedingungen inkubiert. Die Blots wurden entweder mit anti-Src pY418 (A), anti-FAK pY397 (B) oder anti-Src pY529 (C) Antikörpern inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Als Referenzprotein wurde β<sub>3</sub> verwendet. Die Blot-Bilder sind repräsentativ aus acht Versuchen (A, B) bzw. einem Versuch (C).

#### 4.4 Wirkung von Abciximab auf den Phosphorylierungsgrad von Src pY418 und FAK pY397 in Thrombozyten nach statischer Adhäsion an Heparin

Zur Validierung der Rolle von Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in der Heparin-induzierten Aktivierung von Thrombozyten wurde in den folgenden Experimenten die Wirkung des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten Abciximab auf den Aktivierungsgrad von Src pY418 und FAK pY397 untersucht. Die Zugabe von 10  $\mu\text{g}$  Abciximab/ml Plättchensuspension während der statischen Adhäsion an 10 U/ml UFH führte zu einer signifikant erniedrigten Aktivierung von Src pY418 im Vergleich zu nicht-Abciximab behandelten Plättchen. Für FAK pY397 ließ sich im Adhäsionsversuch ebenfalls ein signifikant erniedrigter Phosphorylierungsgrad in den Abciximab-vorbehandelten Plättchen zeigen. Sowohl die Src-Kinase als auch die fokale Adhäsionskinase in Abciximab vorbehandelten Plättchen zeigen ein ähnliches Aktivitätsniveau wie die entsprechenden Kinasen in Plättchen nach statischer Adhäsion an BSA (Negativkontrolle).

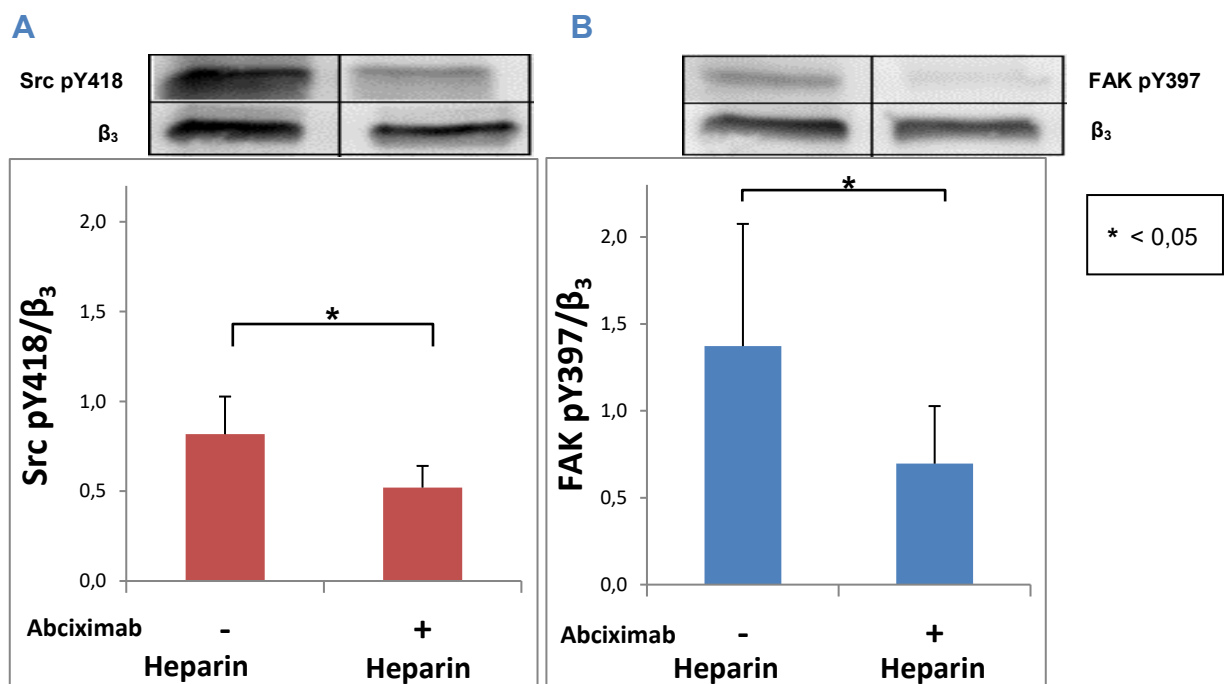


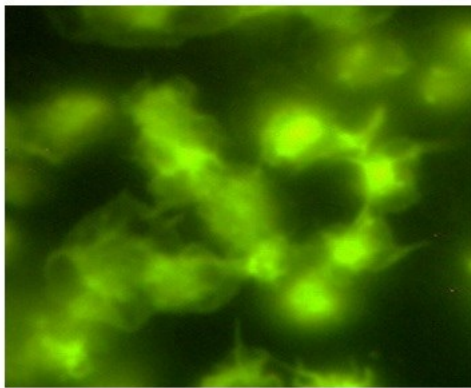
Abb. 14: Veränderungen des Phosphorylierungsgrades von Src pY418 oder FAK pY397 nach Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertes Heparin unter statischen Bedingungen durch Blockade von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  mittels Abciximab.

Gewaschene Plättchen wurden unter statischen Bedingungen auf Heparin (UFH 10 U/ml) für 45 Minuten bei 37°C inkubiert, mit (+) oder ohne (-) Vorbehandlung mit Abciximab (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die Blots wurden entweder mit anti-Src pY418 (A) oder anti-FAK pY397 (B) Antikörpern behandelt und densitometrisch quantifiziert. Als Referenzprotein wurde  $\beta_3$  verwendet. Die Densitometrie-Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SD, n=8. Die Blot-Bilder sind repräsentativ.

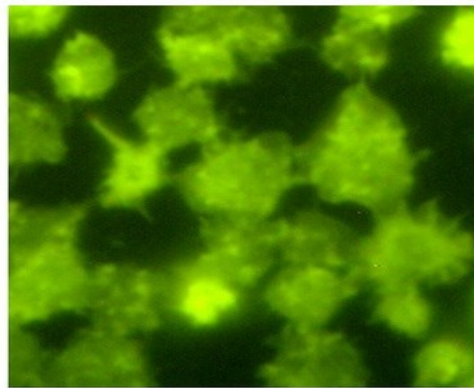
#### 4.5 Morphologische Veränderungen von Thrombozyten nach Adhäsion an immobilisiertes Heparin

Mit diesem Experiment konnten wir zeigen, dass Plättchen nach Adhäsion an immobilisiertes Heparin nicht nur eine Aktivierung des *Outside-In Signalings* aufweisen, sondern dass diese Aktivierung der Signalkaskade auch zu morphologischen Veränderungen der Zellen führt. Abb. 15 zeigt, dass es nach Adhäsion der Plättchen an immobilisiertes UFH, Fondaparinux und Fibrinogen zum *Spreading* kommt. Es zeigen sich bei allen drei Liganden ähnliche Veränderungen der Zellmorphologie: Der Durchmesser vergrößert sich und die Zellen bilden feine Zellausläufer aus (Abb. 15 A). Im Vergleich dazu sind die Plättchen nach dem Adhäsionsversuch an der Negativprobe mit BSA rund bis oval geformt und glatt begrenzt. Es kommt also nicht zur Ausbildung von Zellausläufern oder anderen Veränderungen der Zellmorphologie (Abb. 15 A).

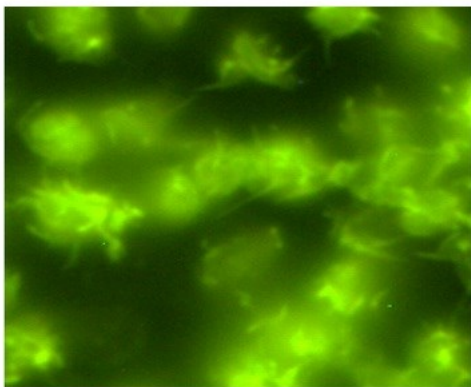
**A**



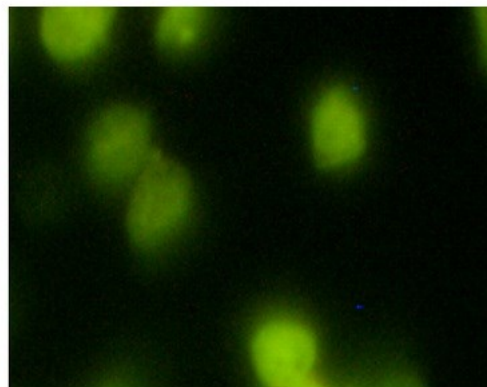
**Heparin**



**Fondaparinux**

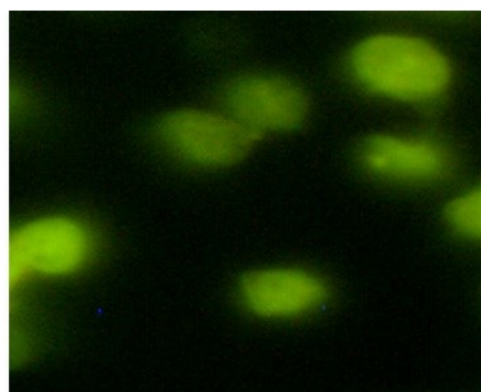


**Fibrinogen**

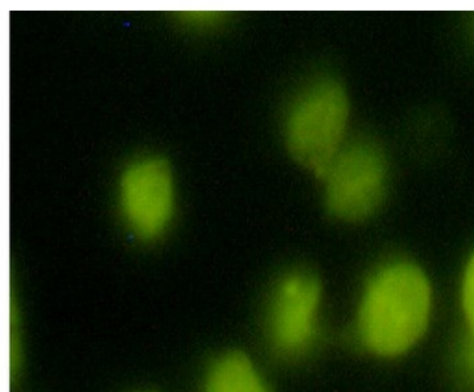


**BSA**

**B**



**Heparin**



**Fondaparinux**

**Abb. 15: Veränderungen der Plättchenmorphologie nach Adhäsion (unter statischen Bedingungen) an UFH, Fondaparinux, Fibrinogen und BSA (A). Wirkung von Abciximab auf die morphologischen Veränderungen von Thrombozyten nach Adhäsion an Heparin und Fondaparinux unter statischen Bedingungen (B).**

Gewaschene Plättchen wurden an UFH (10 U/ml), Fondaparinux (3 µg/ml), Fibrinogen (100 µg/ml) als Positivkontrolle und BSA (1 %) als Negativkontrolle für 45 Minuten bei 37°C unter statischen Bedingungen inkubiert. Die in Abbildung B gezeigten Plättchen wurden mit Abciximab (10 µg/ml) vorbehandelt. Die Epifluoreszenz-mikroskopisch gemachten Bilder sind repräsentativ aus 2 Versuchen.

Durch Vorbehandlung der Plättchen mit Abciximab und somit durch die Blockade des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors lässt sich der Effekt von UFH und Fondaparinux auf die Morphologie der Plättchen inhibieren. Die Plättchen erscheinen rund bis oval und glatt begrenzt (Abb. 15 B). Die mit Abciximab vorbehandelten Zellen zeigen nach statischer Adhäsion an UFH und Fondaparinux zellmorphologisch keinen Unterschied zu Plättchen nach Adhäsion an der Negativkontrolle mit BSA.

#### 4.6 Src/FAK-Aktivierung in $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten HEK293-Zellen nach Adhäsion an immobilisiertes Heparin unter statischen Bedingungen

Auf der Oberfläche von Thrombozyten befinden sich eine Vielzahl von Rezeptoren, darunter auch zahlreiche Integrine. Es lässt sich deshalb in Versuchen mit Thrombozyten nicht ausschließen, dass auch andere Rezeptoren bei der Heparin-induzierten Aktivierung von Plättchen eine wichtige Rolle spielen. Aus diesem Grund haben wir uns für das biologische Modell mit  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten HEK293-Zellen entschieden.

Die  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten HEK293-Zellen wurden vor den Experimenten mittels Durchflusszytometrie auf ihre Rezeptordichte untersucht. Die HEK293-Zellen wurden dafür mit dem  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -komplexspezifischen CD41-Antikörper inkubiert. Ein Anti-Maus-PE-markierter Antikörper diente als Zweitantikörper. In der durchflusszytometrischen Detektion des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins auf der Zelloberfläche (Abb. 16) ist zu erkennen, dass eine Überexpression des Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  auf den HEK293-Zellen vorliegt.

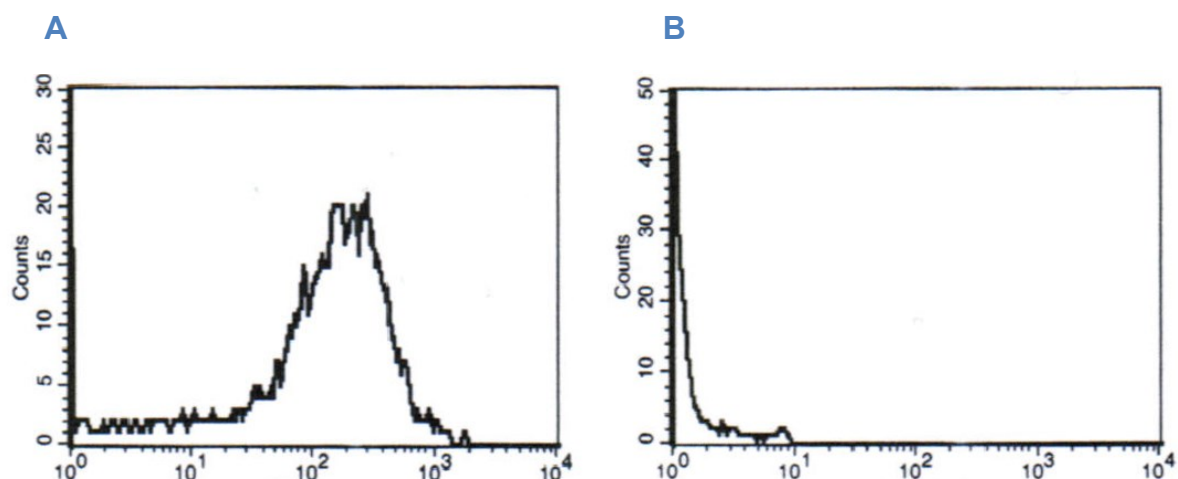
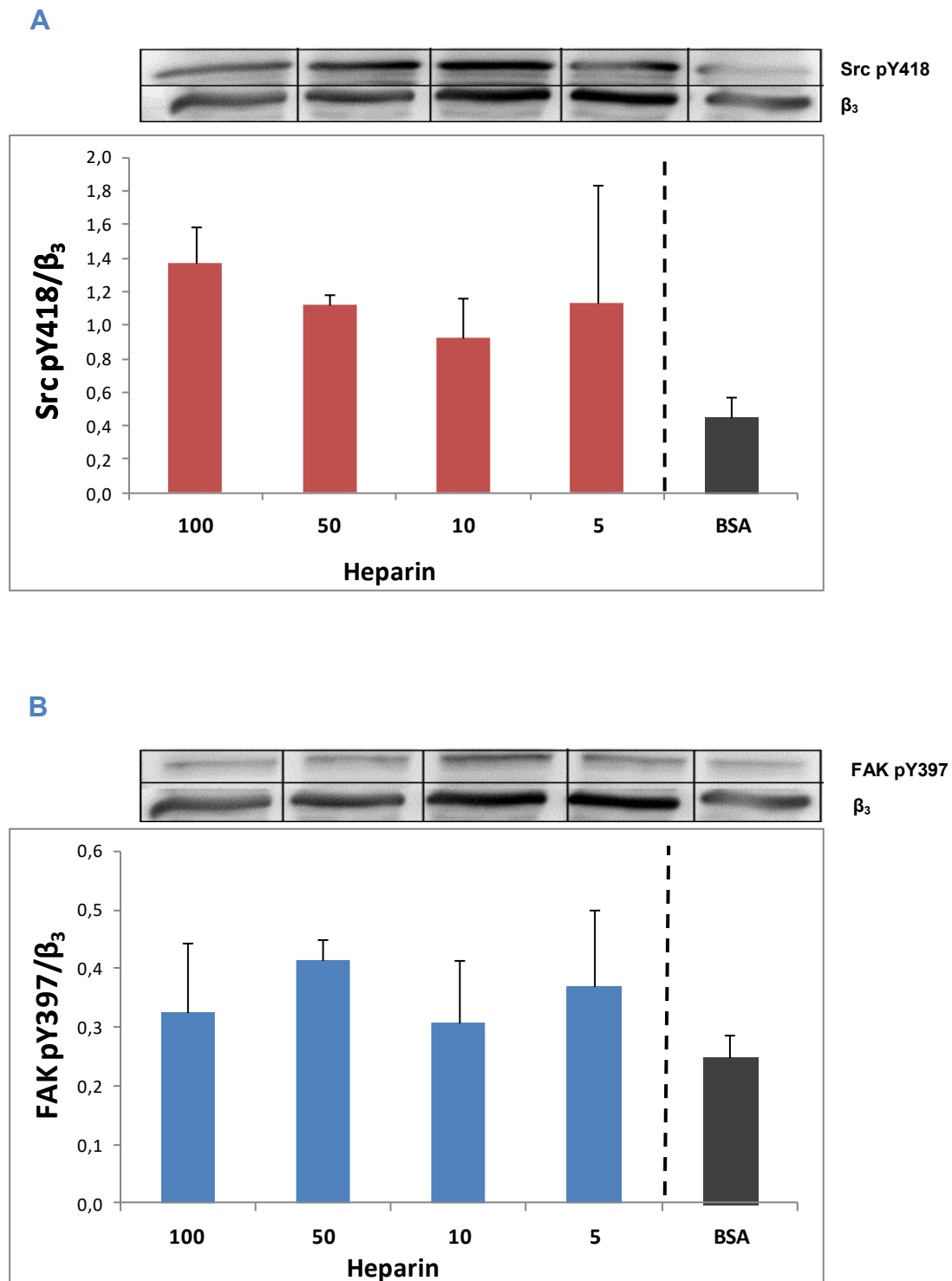


Abb. 16: Durchflusszytometrische Analyse zur Darstellung der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Expression von HEK293-Zellen.

Die Zellen wurden mit CD41-Antikörpern inkubiert, als Zweitantikörper diente ein Anti-Maus-PE-markierter Antikörper (A). Als Kontrolle wurden die Zellen alternativ mit Anti-Maus-IgG1-PE inkubiert (B). Die dargestellte PE-Fluoreszenz ist exemplarisch.

Mit Hilfe der Rainbow-Kalibrationspartikel konnte die  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Expression ermittelt werden. Über die Fluoreszenzäquivalente und die PE-Ratio des Zweitantikörpers ließ sich die Rezeptorzahl pro Zelle berechnen. Die *Mean-Channel* Nummer korrespondiert mit der Fluoreszenz-Intensität der Zellen. Daher kann dieser Wert als Maß für die  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Oberflächenexpression der gesamten Population gewertet werden. Für unsere Experimente haben wir bewusst Populationen mit nahezu identischem *Mean*-Werten und somit mit nahezu identischem Ausmaß der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Expression gewählt.

Nachfolgend wurden die  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten HEK293-Zellen auf immobilisiertem UFH inkubiert, um dessen Wirkung auf das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte *Outside-in Signaling* zu überprüfen. Die HEK293-Zellen zeigen nach statischer Adhäsion an UFH in allen verwendeten Konzentrationen (100, 50, 10, 5 U/ml), bei kleiner Fallzahl (n=2), eine nicht-signifikant erhöhte Aktivität der  $\alpha_{IIb}\beta_3$  assoziierten Kinasen Src und FAK im Vergleich zur Negativkontrolle BSA (Abb. 17 A, B). Wie bei den Plättchen zeigt sich auch hier kein lineares Verhältnis zwischen der Ligandenkonzentration und dem Phosphorylierungsgrad von Src pY418 und FAK pY397.



**Abb. 17: Vergleich des Phosphorylierungsgrades von Src pY418 und FAK pY397 nach Adhäsion unter statischen Bedingungen an immobilisiertes UFH in diversen Konzentrationen.**

$\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfizierte HEK293-Zellen wurden auf Heparin (UFH 5 U/ml, 10 U/ml, 50 U/ml und 100 U/ml) und BSA (1 %) als Negativkontrolle für 45 Minuten bei 37°C unter statischen Bedingungen inkubiert. Die Blots wurden entweder mit anti-Src pY418 (A) oder anti-FAK pY397 Antikörpern (B) inkubiert und densitometrisch quantifiziert. Die Densitometrie-Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Als Referenzprotein wurde  $\beta_3$  verwendet. Die Blot-Bilder sind repräsentativ aus zwei Versuchen.

## 5 Diskussion

Heparin ist eines der meist genutzten Antikoagulanzen und kann in 10-30 % der Fälle zu einer moderaten Reduktion der Plättchenanzahl, der Heparin-induzierten Thrombozytopenie vom Typ I, führen (Cooney, 2006). Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist, von welcher Bedeutung das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte *Outside-in Signaling* für die Heparin-induzierte Aktivierung von Thrombozyten ist. Dabei sollte überprüft werden, ob und inwieweit sich das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte *Outside-in Signaling* durch Heparin beeinflussen lässt. Entscheidende Prozesse der Hämostase wie die Plättchenadhäsion und das Spreading werden durch  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziiertes *Signaling* organisiert (Parson, 2003). Als Ligand von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wäre Heparin möglicherweise in der Lage, zu einer Plättchenaktivierung und dadurch letztendlich zu einer Reduktion der Plättchenanzahl zu führen. Zur Verifizierung, in welchem Ausmaß die Interaktion zwischen Heparin und  $\alpha_{IIb}\beta_3$  für die Plättchenaktivierung verantwortlich ist, wurde mit  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten HEK293-Zellen gearbeitet. Auf der Oberfläche von Thrombozyten befindet sich neben  $\alpha_{IIb}\beta_3$  eine Vielzahl anderer Rezeptoren, darunter auch zahlreiche Integrine. Diese sind dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  zwar zahlenmäßig deutlich unterlegen, könnten die Ergebnisse jedoch entscheidend beeinflussen (Gawaz, 1999). Aus diesem Grund haben wir uns für das biologische Modell der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten HEK293-Zellen entschieden.

Ferner sollte der Effekt des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten Abciximab auf die Aktivierung der Plättchen und somit auf morphologischen Veränderungen und auf das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte *Outside-in Signaling* analysiert werden.

In der Vergangenheit wurde durch (Yagi, et al., 2012) bereits gezeigt, dass Heparin in der Lage ist, an  $\alpha_{IIb}\beta_3$  zu binden und dass die Bindungsstelle wahrscheinlich im Kopfstück oder in der Beindomäne von  $\alpha_{IIb}$  liegt. Des Weiteren untermauern sie mit ihren Ergebnissen, dass Heparin in Anwesenheit von  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Liganden zu einem signifikant erhöhten *Signaling* führt, jedoch alleine keinen wahrnehmbaren Effekt auf die  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte *Outside-in* Signalkaskade hat. Gao et al. (2011) haben berichtet, dass Heparin das *Signaling* des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  potenziert und zu einer verstärkten Phosphorylierung von Kinasen (FAK und Akt) führt.

Aufgrund der zuvor erläuterten Datenlage haben wir das *Outside-in Signaling* des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in den Fokus unserer Untersuchungen gerückt, unter besonderer Berücksichtigung von c-Src und FAK, die eine zentrale Rolle innerhalb der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierten Signalkaskade spielen. C-Src liegt zum Teil direkt an der

zytoplasmatischen Domäne der  $\beta_3$ -Untereinheit von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  gebunden vor und ist eine der ersten Kinasen Downstream von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Shattil & Newman, 2004).

In der vorliegenden Studie zeigen wir, dass UFH und Fondaparinux zu einer Plättchenaktivierung führen und verifizieren die maßgebliche Beteiligung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an diesem Prozess. Die im Ergebnisteil aufgeführten Daten sollen nun im Folgenden diskutiert werden.

### 5.1 $\beta_3$ als Referenzprotein

Wir haben für unsere Experimente  $\beta_3$  als Referenzprotein ausgewählt. Eine mögliche Alternative zu  $\beta_3$  wäre Src gewesen. Bei der Verwendung von Src als Referenzprotein muss man die Membranen nach dem Blotting *strippen* und die bereits gebundenen Proteine entfernen, was zu Proteinverlusten führen kann. Des Weiteren kann die Anzahl der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche bei humanen Spendern stark schwanken. Durchschnittlich befinden sich 60.000-100.000  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrine auf der Thrombozytenoberfläche (Gawaz, 1999). Die individuelle Variabilität ist allerdings sehr hoch, so dass es durchaus auch vorkommt, dass Spender weniger als 60.000 oder mehr als 100.000  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrine auf der Thrombozytenoberfläche exprimieren (Gawaz, 1999). Mit  $\beta_3$  als Referenzprotein hat man die Möglichkeit, die  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -abhängigen Signale auf die Rezeptorzahl zu beziehen. Dadurch lassen sich Schwankungen in den Ergebnissen aufgrund der individuellen Variabilität unter den Spendern reduzieren. Als Störfaktor tritt auf, dass auf der Plättchenoberfläche auch andere Integrine mit  $\beta_3$ -Untereinheiten wie  $\alpha_v\beta_3$  vorkommen. Diese sind  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in der Anzahl jedoch deutlich unterlegen und können daher vernachlässigt werden. Thrombozyten exprimieren durchschnittlich nur 100 dieser Integrine auf ihrer Oberfläche (Gawaz, 1999).

Zusammenfassend haben wir uns aufgrund des geringeren technischen Aufwandes sowie des daraus resultierenden geringeren Risikos für technische Fehlerquellen und der Reduktion der individuellen Variabilität als Störfaktor für  $\beta_3$  als Referenzprotein entschieden.

### 5.2 $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziiertes *Outside-in Signaling* in statisch adhärennten Plättchen an immobilisierte Liganden

In dem von uns gewählten Versuchsaufbau (wie unter Punkt 3.3.7 beschrieben) testen wir, inwieweit UFH und Fondaparinux dazu in der Lage sind, das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte *Outside-in Signaling* von Thrombozyten zu aktivieren.

Nach Adhäsion an immobilisiertes UFH und Fondaparinux konnten wir einen signifikant erhöhten Phosphorylierungsgrad von Src pY418 und FAK pY397 nachweisen (Abb. 13A, Abb. 13B). Das verstärkte *Outside-in Signaling* spricht insgesamt dafür, dass Heparin in der Lage ist, Plättchen zu aktivieren. Unsere Ergebnisse harmonisieren mit den Ergebnissen von Gao et al. (2011). Sie konnten ebenfalls ein gesteigertes *Outside-in Signaling* in Heparin-adhärenenten Zellen zeigen. Gao, et al. (2011) haben ihre Ergebnisse jedoch nicht quantifiziert, so dass ein direkter Vergleich nicht möglich ist. Der von uns exemplarisch gezeigte erniedrigte Phosphorylierungsgrad von Src pY529 ist ein weiterer Hinweis für die Aktivierbarkeit von Src in Heparin- und Fondaparinux-adhärenenten Plättchen (Abb. 13C).

### 5.2.1 Abhängigkeit von der Art des immobilisierten Liganden

Nach statischer Adhäsion an immobilisiertes UFH und Fondaparinux konnten wir einen signifikant erhöhten Phosphorylierungsgrad sowohl von Src pY418 als auch von FAK pY397 nachweisen (Abb. 13).

Das *Pentasaccharid* Fondaparinux ist die erste Substanz einer neuen Klasse von synthetisch hergestellten Antithrombotika (Turpie, et al., 2002) und gleicht strukturell der kleinsten funktionellen Einheit von UFH (Gawaz, 2010). Als sehr kleines Molekül bindet Fondaparinux kaum an Plasmaproteine und hat dadurch einen höchstgradig vorhersehbaren Effekt auf die Antikoagulation. Fondaparinux wirkt durch selektive Inhibition von Faktor Xa antithrombotisch (Turpie, et al., 2002) und stellt eine wichtige therapeutische Alternative zu UFH und NMH dar (Gawaz, 2010). Durch das günstigere Nebenwirkungsprofil, den besseren antithrombotischen Effekt und die besser voraussehbare Pharmakokinetik hat Fondaparinux in den letzten Jahren deutlich an Relevanz gewonnen.

In unserer Versuchsreihe zeigten Thrombozyten nach Adhäsion an immobilisiertes Fondaparinux keinen signifikanten Unterschied im Phosphorylierungsgrad von Src pY418 und FAK pY397 im Vergleich zu den Thrombozyten nach Adhäsion an immobilisiertes UFH (Abb. 13). Dies spricht für eine Plättchenaktivierung in einem ähnlich hohen Ausmaß und widerspricht dem klinischen Nebenwirkungsprofil von Fondaparinux. Unter der Gabe von Fondaparinux liegt im Vergleich zu UFH-therapierten Patienten eine deutlich geringere Inzidenz an moderaten Heparin-induzierten Thrombozytopenien vor (Liu, et al., 2014). Die HIT I tritt bei der Behandlung mit UFH in 10-30 % der Fälle auf, hingegen bei der Therapie mit Fondaparinux nur in 0,2-3 % der Fälle (Administration, U.S. Food and Drug, 2014). In unserer

Versuchsreihe untersuchen wir nur einen sehr kleinen Ausschnitt aus den komplexen physiologischen Prozessen in unserem Körper, wodurch ein direkter Rückschluss von unseren Ergebnissen auf das Nebenwirkungsprofil von Fondaparinux bzw. UFH nicht möglich ist. Im klinischen Alltag wird Fondaparinux bei einem Großteil der Indikationen einmal täglich in einer Dosis von 2,5 mg verabreicht. Bei subkutaner Gabe verfügt Fondaparinux über eine Bioverfügbarkeit von 100 % (Administration, U.S. Food and Drug, 2014). Nach Umrechnung auf ein Blutvolumen von 6 Litern ergibt sich eine Konzentration von etwa 0,042 µg/ml. Die von uns verwendete Konzentration von 3 µg/ml ist somit circa um das 70-fache höher. Dieser deutliche Unterschied der Konzentrationen in vivo im Vergleich zu unseren in vitro Experimenten ist ein möglicher Erklärungsansatz für das signifikant erhöhte *Outside-in Signaling* nach statischer Adhäsion von Plättchen an Fondaparinux.

Unfraktionierte Heparine werden meist aus Schweinedärmen oder Rinderlungen gewonnen und haben ein etwa viermal bis siebzehnmal höheres Molekulargewicht im Vergleich zu *ultra low molecular weight heparin* (ULMWH) wie Fondaparinux. Fondaparinux ist ein synthetisch hergestelltes Pentasaccharid und besteht lediglich aus der kleinsten funktionellen Einheit von UFH (Gawaz, 2010). Da beide Substanzen in der Lage sind, das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte *Outside-in Signaling* zu aktivieren, können wir vermuten, dass UFH mit Anteilen der kleinsten funktionellen Einheit an  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bindet. Die genaue Bindungsstelle von Heparin an  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht bekannt. Aktuell sind zwei Theorien vorherrschend. Gao, et al. (2011) kamen zu der Annahme, dass Heparin in der Nähe der Ligandenbindungsstelle von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bindet. Yagi, et al. (2012) hingegen stellten auf dem Boden ihrer Forschungsarbeit die Theorie auf, dass sich die Bindungsstelle für Heparin an der  $\alpha_{IIb}$ -Untereinheit (*head domain*, *thigh domain* und beide *calf domains*) befindet.

Dass sowohl Abciximab (Abb. 14) als auch Eptifibatid (Gao, et al., 2011) das *spreading* von Thrombozyten an immobilisiertes Heparin hemmen, legt nahe, dass Heparin mit der Ligandenbindungsstelle der extrazellulären Kopfdomäne interagiert. Yagi, et al. (2012) haben mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie die Affinität von Heparin zu verschiedenen Regionen von  $\alpha_{IIb}\beta$  getestet. Sie konnten eine signifikant erhöhte Affinität zwischen Heparin und 2 verschiedenen Regionen von  $\alpha_{IIb}$  zeigen. Region 1 entspricht der Kopf-Domäne von  $\alpha_{IIb}$  und Region 3 enthält Abschnitte der *thigh* Domäne und beider *calf* Domänen (Yagi, et al., 2012). Region 2 hingegen, welche der Kopfdomäne und den angrenzenden *thigh* Domänen von  $\alpha_{IIb}$  und  $\beta_3$

entspricht, zeigte keine erhöhte Affinität zu Heparin und schien Heparin somit nicht zu binden. Anders als von Gao, et al. (2011) und uns angenommen, weisen die Ergebnisse von Yagi, et al. (2012) darauf hin, dass Heparin nicht mit der Ligandenbindungsstelle der extrazellulären Kopfdomäne interagiert. Allerdings zeigten Yagi, et al. (2012) die Untersuchungen und die Ergebnisse, in der sie wohl eine signifikant erhöhte Affinität von Heparin zu  $\alpha_{IIb}$  in der Region 1 und 3 nachweisen konnten, nicht in ihrer Veröffentlichung. Aufgrund dessen sind die Resultate aktuell nicht prüfbar.

### 5.2.2 Abhängigkeit von der Konzentration des immobilisierten Liganden

Der stärkste Effekt auf die  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte Signalkaskade zeigte sich bei Adhäsion an 5 und 10 U/ml immobilisiertes UFH. Wie in Abb. 11 zu sehen, verhalten sich die Ligandenkonzentration und der Phosphorylierungsgrad von Src pY418 und FAK pY397 nichtlinear und nicht konkordant zueinander.

Yagi, et al. (2012) stellten ebenfalls fest, dass sich der Effekt von Heparin durch höhere Konzentrationen nicht verstärken lässt. In den von Yagi, et al. verwendeten Konzentrationen (5 U/ml, 50 U/ml) kommt es zu ähnlich hohen Effekten. Wir konnten hingegen bereits ab einer Konzentration von 50 U/ml eine leichte Reduktion des Effektes beobachten. Leider untersuchten Yagi, et al. keine höheren Konzentrationen. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass Yagi, et al. mit löslichem Heparin gearbeitet haben und den aktivierenden Effekt von Heparin nur in Anwesenheit von anderen Stimulatoren wie Fibrinogen zeigen konnten.

Wir haben im Vorhinein erwartet, dass ab einer bestimmten Ligandenkonzentration ein Effektplateau auftritt, welches sich z. B. durch eine Rezeptorsättigung, eine Sättigung der 3,9 cm<sup>2</sup> großen Adhäsionsfläche und durch das Entfernen des überschüssigen Heparins beim Spülvorgang erklären ließe.

Es kommt hingegen ab einer Konzentration von 50 U/ml zu einer Reduktion des Effekts. Bei weiterer Steigerung der Konzentration auf 1000 U/ml nimmt die Aktivierbarkeit der Thrombozyten weiter ab (Abb. 11). Eine mögliche Erklärung ist eine Überlappung der Heparinmoleküle, so dass deren Bindungsstellen zum Teil verdeckt sein könnten. Weiter ziehen wir in Betracht, dass die Heparinmoleküle durch die Fülle nicht in der Lage sind, sich an der Adhäsionsfläche der Wells auszubreiten und dadurch nicht an der Oberfläche adhärent werden. Durch den Spülvorgang würde ein Großteil des Heparins abgespült werden und es befände sich eine deutlich reduzierte Menge an Heparin an der Adhäsionsfläche.

### 5.2.3 Abhängigkeit von der Adhäsionszeit

In unserer Versuchsreihe haben wir mit 15 bzw. 45 Minuten Adhäsionszeit gearbeitet. Nach 15 Minuten Adhäsionszeit konnten wir keine erhöhte Aktivierbarkeit des *Outside-in Signalings* feststellen (Abb. 9A, Abb. 10A). Nach 45-minütiger Adhäsion an immobilisiertes UFH und Fibrinogen konnten wir hingegen einen erhöhten Phosphorylierungsgrad von Src pY418 und FAK pY397 zeigen (Abb. 9B, Abb. 10B). In vivo sind Plättchenadhäsion und Thrombogenese sehr schnelle Prozesse von Sekunden bis wenigen Minuten (Schmidt & Lang, 2007). In unserer Versuchsreihe hingegen waren diese Prozesse deutlich verlangsamt, was daran liegen könnte, dass wir die Plättchen aus ihrem physiologischen Milieu entfernt haben. In der Blutbahn sind Thrombozyten ständig variierenden Scherraten ausgesetzt. Diese sind besonders hoch, wenn sich die Thrombozyten in einer laminaren Strömung nah an der Gefäßwand befinden (Gegle, et al., 2010) oder wenn turbulente Strömungen entstehen, wie dies z. B. an Gefäßstenosen möglich ist. Des Weiteren verhalten sich Strömungsgeschwindigkeit und Scherrate positiv konkordant zueinander (Gegle, et al., 2010). In Gefäßen mit hoher Strömungsgeschwindigkeit wie der Aorta sind die Plättchen zeitweise relativ hohen Scherkräften ausgesetzt. Zusätzlich sind sie von physiologischen  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Liganden und plättchenstimulierenden Substanzen wie Calcium, Adenosindiphosphat, Adrenalin, Thrombin oder Serotonin umgeben (Hick & Hick, 2006). Der Entzug dieser physiologischen Stimulatoren erklärt möglicherweise die zeitlich verlangsamte Aktivierbarkeit der Thrombozyten in unserer Experimentreihe, wobei dies trotzdem nicht zu einer Verlangsamung in diesem Ausmaß führen sollte.

### 5.2.4 Effekt von Abciximab auf das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte *Outside-in Signaling*

Yagi, et al. (2012) haben bereits gezeigt, dass Heparin in der Lage ist, an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an der Plättchenoberfläche zu binden. In unserer Versuchsreihe konnten wir zeigen, dass Heparin zu einem signifikant verstärkten *Outside-in Signaling* und somit zu einer Aktivierung von Thrombozyten führt (Abb. 13). In einer weiteren Versuchsreihe haben wir die Plättchen mit dem  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten Abciximab vorbehandelt. Mit Abciximab vorbehandelte Thrombozyten zeigten nach statischer Adhäsion an immobilisiertes UFH eine signifikant erniedrigte Phosphorylierung von Src pY418 und FAK pY397 im Vergleich zu nicht mit Abciximab behandelten Plättchen (Abb. 14). Die Blockade des Integrins führte dazu, dass Heparin keinen aktivierenden Effekt mehr auf die Thrombozyten hatte. Daraus schließen wir, dass das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$

eine maßgebliche Rolle bei der Heparin-induzierten Aktivierung von Plättchen spielt und dass die Bindungsstelle von Heparin wahrscheinlich in der Kopfdomäne von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  liegt. Unsere Ergebnisse unterstützen und erweitern dabei die Ergebnisse von Gao, et al. (2011). Gao, et al. konnten exemplarisch zeigen, dass der Phosphorylierungsgrad von Akt in  $\alpha_{IIb}\beta_3$  *knockout* Mäusen nach statischem Adhäsionsversuch an Heparin nicht erhöht ist und dass Eptifibatid die Heparin-induzierte Aktivierung von humanen Plättchen in Lösung blockiert. Des Weiteren zeigten sie exemplarisch, dass es bei humanen Thrombozyten von Spendern mit Glanzmann-Thrombasthenie, denen die cytoplasmatische Domäne von  $\beta_3$  fehlt, ebenfalls nicht zu einer Heparin-induzierten Erhöhung des Phosphorylierungsgrades von Akt kommt.

### 5.3 Morphologische Veränderungen statisch adhärenter Plättchen an immobilisierten Liganden

In dem von uns gewählten Versuchsaufbau (wie unter Punkt 3.3.11 beschrieben) testeten wir, ob UFH und Fondaparinux morphologische Veränderungen bei Plättchen bedingen können. Nach statischer Adhäsion an immobilisierte Liganden wurden die Plättchen mit Fluoreszenz-Farbstoff markiert und mit Hilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskops fotografiert. Mit diesem Experiment konnten wir zeigen, dass es bei Plättchen nach Adhäsion an immobilisiertes UFH und Fondaparinux nicht nur zur Aktivierung des *Outside-In Signalings* kommt, sondern auch zu morphologischen Veränderungen, die denen nach Adhäsion an Fibrinogen entsprechen. Der Durchmesser der Plättchen vergrößerte sich und sie bildeten stachelartige Zellausläufer, sog. Pseudopodien, aus (Abb. 15A). Auch Gao, et al. (2011) konnten dieses Heparin-induzierte Thrombozyten-*Spreading* zeigen, bei ihnen offenbarten sich jedoch leichte Unterschiede in der Morphologie zwischen Heparin- und Fibrinogen-induziertem Thrombozyten-*Spreading*.

Durch diesen Versuch konnten wir beweisen, dass sowohl UFH als auch Fondaparinux zum Zell-*Spreading* führen. Diese Umformung der Plättchen während der Phase der reversiblen Thrombozytenaggregation wird durch die Freisetzung ihrer Granula ausgelöst und würde in vivo durch die Quervernetzung der Thrombozyten untereinander mittels Fibrinogen zur Ausbildung eines stabilen Thrombus führen. Wurden die Plättchen mit dem  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten Abciximab behandelt, blieb der zuvor beschriebene Effekt auf die Zellmorphologie gänzlich aus, was dafürspricht, dass das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  maßgeblich an der Interaktion mit Heparin beteiligt ist. Bei

blockiertem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist weder UFH noch Fondaparinux in der Lage, morphologische Veränderungen von Thrombozyten auszulösen (Abb. 15B). Gao, et al. konnten wie wir exemplarisch zeigen, dass Fibrinogen-Rezeptor-Antagonisten in gewaschenen humanen Plättchen zur Blockade des *Spreadings* nach statischer Adhäsion in UFH führen. Allerdings konnten Gao, et al. diesen Effekt nicht nur bei Abciximab, sondern auch bei Eptifibatid zeigen. Des Weiteren dokumentierten sie, dass es bei  $\alpha_{IIb}\beta_3$  *knockout* Mäusen nicht zum Heparin-induzierten *Spreading* kommt.

#### 5.4 Validierung der Antikörper

Wie unter Punkt 4.2 beschrieben überprüften wir die Funktionalität der Antikörper und schlossen unspezifische Signale auf Höhe des Molekulargewichts von FAK bzw. Src aus. Im Gegensatz zu Plättchen finden sich bei HEK-Zellen auch unspezifische Signale auf den 2. AK. Dies könnte daran liegen, dass HEK-Zellen ein Src-ähnliches Protein besitzen, dessen *Overlapping* relativ hoch ist. Diese unspezifischen Banden befinden sich jedoch oberhalb der spezifischen Bande von Src und können somit vernachlässigt werden.

#### 5.5 Modell der HEK293-Zellen im Vergleich zu Thrombozyten

In Versuchsreihen mit humanen Thrombozyten trifft man auf verschiedene Schwierigkeiten. Zum einen besitzen Plättchen eine Vielzahl von Rezeptoren und Integrinen auf der Zelloberfläche, was es schwierig macht, die Kausalität für die Thrombozytenaktivierung nach Adhäsion an Heparin zu beweisen. Zum anderen gibt es bei humanen Spendern viele Störfaktoren, welche die Experimente beeinflussen könnten (Alter, Geschlecht, Einnahme von Medikamenten, Zigarettenkonsum, Grunderkrankungen u. v. m.). All diese Punkte sprechen für den Einsatz eines Zellkulturmodells. Wir entschieden uns für HEK293-Zellen mit heterologer Expression des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors.

In dem von uns gewählten Versuchsaufbau (wie unter Punkt 3.3.7 beschrieben) untersuchten wir, inwieweit UFH dazu in der Lage ist, das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierte *Outside-in Signaling* in HEK293-Zellen zu aktivieren. Nach statischer Adhäsion an immobilisierte Liganden wurden die  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten HEK293-Zellen lysiert, die Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und der Phosphorylierungsgrad von Src pY418 und FAK pY397 auf den Blots densitometrisch bestimmt.

Die HEK293-Zellen zeigten nach statischer Adhäsion an UFH in allen von uns gewählten Heparinkonzentrationen (100, 50, 10, 5 U/ml) eine erhöhte Aktivität der

$\alpha_{IIb}\beta_3$  assoziierten Kinasen Src und FAK (Abb. 17 A, B), wobei sich für die Konzentration 50 U/ml besonders stabile Werte mit einer geringen Standardabweichung zeigten. Signifikante Ergebnisse konnten wir mit unseren exemplarisch durchgeführten Versuchen (n=2) mit der Zelllinie nicht erzielen. Zur weiteren Untermauerung unserer These, dass die direkte Interaktion zwischen Heparin und  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ursächlich für die HIT I ist, ist zukünftig eine Versuchsreihe mit  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten Zellen mit höheren n-Zahlen sinnvoll.

Wir führten die Versuche mit der Zelllinie durch, um zu zeigen, dass der aktivierende Effekt von Heparin auf Plättchen abhängig von dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist. Mittels Durchflusszytometrie konnte Herr El-Khattouti bereits in seiner Dissertation zeigen, dass die HEK293-Zellen keine signifikante Menge an anderen Rezeptoren aufweisen (El-Khattouti, 2010). Bei der Transfektion von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  können theoretisch auch  $\alpha_V\beta_3$  Integrine an der Zelloberfläche entstehen.  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und  $\alpha_V\beta_3$  sind Mitglieder der Unterfamilie der  $\beta_3$  Integrin-Rezeptoren. Beide haben die gleiche  $\beta$ -Untereinheit, jedoch unterschiedliche  $\alpha$ -Untereinheiten.  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und  $\alpha_V\beta_3$  sind oligospezifisch und nur zum Teil in der Lage, dieselben Liganden zu binden (Suehiro, et al., 1996). Es lässt sich also nicht ausschließen, dass unsere Zellklone eine geringe, nicht-signifikante Anzahl an  $\alpha_V\beta_3$ -Integrinen an ihrer Zelloberfläche exprimieren. In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass Heparin in Lage ist, eine Reihe von transmembranären Glykoproteinen zu binden, darunter auch  $\alpha_V\beta_3$  (Faye, et al., 2009). Eine Aktivierung von Thrombozyten durch das Binden von Heparin an  $\alpha_V\beta_3$  konnte jedoch nicht gezeigt werden (Faye, et al., 2009). Des Weiteren haben andere Forschungsgruppen gezeigt, dass das Integrin  $\alpha_V\beta_3$  bei ligandeninduzierter Aktivierung  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfekterter Zellen keine Rolle spielt (Vijayan, et al., 2000). Nach Blockade von  $\alpha_V\beta_3$  kam es wie erwartet nicht zu einer signifikant verringerten Aktivierung des *Outside-in Signalings* (Vijayan, et al., 2000). Gao, et al. (2011) konnten in ihren Versuchen zeigen, dass es bei Abciximab- und Eptifibatid-behandelten Plättchen nach Adhäsion auf immobilisiertes Heparin nicht zum *Spreading* kommt. In unseren Experimenten ließ sich die Hemmung des *Spreadings* durch Abciximab bestätigen (Abb. 15B). Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die Aktivierung des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -assoziierten *Outside-in Signalings* signifikant verringert ist (Abb. 14 ). Das impliziert nicht, dass  $\alpha_{IIb}\beta_3$  die einzige Bindungsstelle ist, es zeigt jedoch, dass funktionsfähige  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrine zur Heparin-assoziierten Plättchenaktivierung essentiell sind.

Yagi, et al., (2012) führten eine ähnliche Versuchsreihe mit  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten K562-Zellen durch und zeigten, dass diese Zellen eine signifikant erhöhte Adhäsionsneigung an Fibrinogen in Anwesenheit von Heparin aufweisen. Unsere Ergebnisse zeigen zusätzlich exemplarisch eine erhöhte Aktivierung des *Outside-in Signalings* nach statischer Adhäsion an immobilisiertes UFH in Abwesenheit von zusätzlichen Stimulatoren wie Fibrinogen.

## 6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass Heparin über seine Bindung an  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Thrombozyten aktiviert. Auf dem Boden der Hypothese, dass eine vermehrte Aktivierung von Thrombozyten einen gesteigerten Verbrauch zur Folge hat, könnte die Heparin-induzierte Aktivierung von Thrombozyten letztlich zu einer Reduktion der absoluten Plättchenanzahl im Blut führen. Die direkte Interaktion zwischen Heparin und Thrombozyten mittels  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist möglicherweise die Ursache für die Heparin-induzierte Thrombozytopenie vom Typ I.

## 7 Literaturverzeichnis

- Administration, U.S. Food and Drug, 2014. *ARIXTRA (fondaparinux sodium)*, s.l.: U.S. Food and Drug Administration.
- Admiral, J. et al., 1993. Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia.. *Thrombosis and haemostasis.*, 6 July, pp. 95-96.
- Alexander, M. & Bendas, G., 2011. *The Role of Adhesion Receptors in Melanoma Metastasis and Therapeutic Intervention Thereof*. s.l.:INTECH Open Access Publisher.
- Behrends, J., Bischofberger, J. & Deutzmann, R., 2012. *Duale Reihe Physiologie*. 2. Auflage Hrsg. s.l.:Thieme.
- Bennett, J. S., 2001. Platelet-Fibrinogen Interactions. *Annals of New York academy of sciences*, Issue 936, pp. 340-354.
- Cooney, M. F., 2006. Heparin-induced thrombocytopenia: advances in diagnosis and treatment.. *Critical care nurse.*, 26 December, pp. 30-36.
- Ehud, A., Michael, G., Isabel, G.-O. & Shingai, M., 2006. Oral heparin: status review. *Thombosis Journal*, p. 6.
- El-Khattouti, A., 2010. *Allosterie der HPA-1 Varianten des thrombozytären Integrins  $\alpha IIb\beta 3$* , Heinrich Heine-Universität Düsseldorf: s.n.
- Faye, C. et al., 2009. Molecular Interplay between Endostatin, Integrins, and Heparan Sulfate. *The Journal of Biological Chemistry*, 5 June, pp. 22029-22040.
- Faye, C. et al., 2009. Molecular Interplay between Endostatin, Integrins, and Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 284(33), pp. 22029-22040.
- Gao, C. et al., 2011. Heparin promotes platelet responsiveness by potentiating  $\alpha IIb\beta 3$ -mediated outside-in signaling. *blood*, Band 117(18), pp. 4946-4952.
- Gawaz, M., 2010. *Blood Platelets - Clinical Relevance*. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag KG.
- Gawaz, M., Mannhalter, C., Geiger, M. & Langer, H., 2010. *Hamöstateologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie*. 2 Hrsg. s.l.:Springer.
- Gawaz, M. P., 1999. *Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung*. New York: Thieme.
- Gegle, M. et al., 2010. *Taschenlehrbuch Physiologie*. s.l.:Georg Thieme Verlag KG.

- Greinacher, A., 1995. Antigen Generation in Heparin-Associated Thrombocytopenia: The Nonimmunologic Type and the Immunologic Type Are Closely Linked in Their Pathogenesis. *Seminar in Thrombosis and Hemostasis*, 1 Januar, pp. 106-116.
- Gustafsson, D. et al., 2004. A new anticoagulant: 50-year challenge. *Nature Reviews. Drug Discovery.*, pp. 649-659.
- Hick, C. & Hick, A., 2006. *Intensivkurs Physiologie*. München: Urban & Fischer Verlag.
- Hynes, R. O., 1992. Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion. *Cell*, 3 April, pp. 11-25.
- Ibbotson, T., McGavin, J. & Gao, K., 2003. Abciximab: an updated review of its therapeutic use in patients with ischaemic heart disease undergoing percutaneous coronary revascularisation.. *Drugs*, 63(11), pp. 1121-63.
- Kaul, U. et al., 2015. Comparison of anti-thrombotic strategies using Bivalirudin, Heparin plus Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors and Unfractionated Heparin Monotherapy for patients undergoing percutaneous coronary intervention - A single centre observational study.. *Indian Heart Journal*, 67(4), pp. 311-317.
- Kwong, L. M., 2013. Comparative safety and efficacy of antithrombotics in the management of venous thromboembolism after knee or hip replacement surgery: focus on rivaroxaban. *Clinical Pharmacology*, 2 August, pp. 143-148.
- Liu, Z., Ji, S., Sheng, J. & Wang, F., 2014. Pharmacological effects and clinical applications of ultra low. *Review*, Volume 8, pp. 1-10.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A. & Schlaepfer, D. D., 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, Januar, pp. 56-68.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A. & Schllllaepfer, D. D., 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility 6. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, January, pp. 56-68.
- Niessner, H. & Neustadt, W., 2009. Prophylaxe mit niedermolekularen Heparinen (NMH) bei Indikationen mit hohem venösen Thromboembolie- (VTE)-Risiko. *skriptum Kongressjournal*, 10 Juli.Issue 6.
- Parson, T. J., 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *Journal of Cell Science* 116, pp. 1409-1416.

- Piccolo, R. et al., 2015. Intracoronary abciximab in diabetic patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention.. *Vascul Pharmacol*, Band 73, pp. 23-7.
- Playford, M. P. & Schaller, M. D., 2004. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene*, pp. 7928-7946.
- Playford, M. P. & Schaller, M. D., 2004. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 23, pp. 7928-7946.
- Pottgiesser, T. & Ophoven, S., 2013. *Die 50 wichtigsten Fälle Innere Medizin. 2. Edition* Hrsg. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R. & Sieg, D. J., 1999. Signaling through focal adhesion kinase. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 71, pp. 435-478.
- Schlaepfer, D. D., Mitra, S. K. & Ilic, D., 2004. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *BBA-Molecular Cell Research*, Band 1692, pp. 77-102.
- Schmidt, R. F., 2001. *Physiologie kompakt 4. Auflage*. Berlin: Springer Verlag.
- Schmidt, R. F. & Lang, F., 2007. *Physiologie des Menschen*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Shattil, S. J., 2005. Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signaling. *Trends in Cell Biology*, 15 August, pp. 399-403.
- Shattil, S. J. & Newman, P. J., 2004. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood Journal*, 15 September, pp. 1606-1615.
- Suehiro, K., Smith, J. W. & Plaw, E. F., 1996. The Ligand Recognition Specificity of beta3 Integrins. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 271, pp. 10365-10371.
- Turpie, A. G., Bauer, K. A., Eriksson, B. I. & Lassen, M. R., 2002. Fondaparinux vs Enoxaparin for the Prevention of Venous Thromboembolism in Major Orthopedic Surgery. *Arch Intern Med*, 162(16), pp. 1833-40.
- Turpie, A. G., Bauer, K. A., Eriksson, B. I. & Lassen, M. R., 2002. Fondaparinux vs Enoxaparin for the Prevention of Venous Thromboembolism in Major Orthopedic Surgery. *Archives of Internal Medicine*, pp. 1833-1840.
- Vijayan, V. K., Goldschmidt-Clermont, P. J., Roos, C. & Bray, P. F., 2000. The PIA2 polymorphysm of integrin  $\beta 3$  enhances outside-in signaling and adhesive functions. *The journal of Clinical Investigation*, 105(6), pp. 793-802.
- Wagner, C. et al., 1996. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets.. *Blood*, 88(3), pp. 907-914.

Yagi, M. et al., 2012. Heparin Modulates the Conformation and Signaling of Platelet Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ . *Thrombosis Research*, pp. 743-749.

