

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ)

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Dr. med. Johannes Fischer

**Untersuchung zum Einfluss β_3 -mimetischer Peptide auf
das Adhäsionsverhalten humaner Thrombozyten in
Relation zum Leu33/Pro33-Polymorphismus
des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$**

Dissertation

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

vorgelegt von Julia Maria Neuhann

2019

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

gez.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Betreuer/in: Univ.-Prof. em. Dr. med. Rüdiger E. Scharf

Gutachter/innen: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig
Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

meinen lieben Eltern

Elfi & Heiner

Zusammenfassung

Thrombozytäre Integrinrezeptoren, wie das Membran-dominierende $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrin, sind essentiell für eine adäquate Thrombozytenfunktion im Zuge der Hämostase. Sie können aber, bei Dysfunktion, unter anderem in Form gestörter Aggregation, ursächlich an der Entstehung thromboembolischer bzw. hämorrhagischer Ereignisse beteiligt sein. Der HPA-1-Polymorphismus (Leu33/Pro33-Polym.) des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors steht bei homozygoten Trägern des HPA-1b-Allels für eine erhöhte Thrombogenität, die sich klinisch u.a. in einer vorzeitigen Inzidenz eines akuten Myokardinfarkts äußert. Die zytoplasmatische β_3 -Untereinheit des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors interagiert im Zuge der Integrin-Aktivierung mit vielen Signal- und Zytoskelettproteinen, einschließlich Kindlin-3. Ein Verlust von β_3 -Wechselwirkungen mit dem Adaptorprotein Kindlin-3 kann eine fehlerhafte Signalweiterleitung und in der Folge eine gestörte Thrombozytenfunktion verursachen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Potenzial mimetischer Peptide und deren Einflussnahme auf die Rolle des Kindlin-3 in der Signalkaskade zu untersuchen. Die Untersuchungen dazu wurden anhand der statischen Adhäsion auf Fibrinogen und Fibronectin an humanen Thrombozyten durchgeführt. Dabei lag der Fokus auch auf der Untersuchung der beiden Genvarianten des HPA-1-Polymorphismus. In diesem Rahmen wurde initial ein Protokoll zum Einsatz β_3 -mimetischer Peptide für die Bindungsstelle von Kindlin-3 an der β_3 -Untereinheit des Integrinrezeptors $\alpha_{IIb}\beta_3$ entwickelt. Die Internalisierung der Peptide wurde lasermikroskopisch nach FIAsh-Labeling nachgewiesen. Darauf aufbauend wurden in mehreren Untersuchungsreihen die geeigneten Konzentrationen bzw. Inkubationsbedingungen mittels Aggregometrie und Fluorescan für beide Genvarianten ermittelt. Nach Protokolletablierung wurde dann in einem weiteren Schritt an Thrombozyten aus Spenderblut von homozygoten HPA 1a/1a- bzw. HPA 1b/1b-Trägern die Wirkung β_3 -mimetischer Peptide auf das statische Adhäsionsverhalten auf Fibrinogen und Fibronectin mittels quantitativer Fluoreszenzmessungen (n=25) und Lasermikroskopie untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen bezüglich des generellen Einsatzes mimetischer Peptide, dass die Peptide zum einen die komplexe Membranbarriere der Thrombozyten überwinden können und dass sie zum anderen einen stark unterschiedlichen spezifischen Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation beider Genvarianten haben. Bei der HPA 1a/1a-Variante ließ sich ein signifikant inhibitorischer Effekt auf die Thrombozytenadhäsion nach der Applikation β_3 -mimetischer Peptide für die Bindungsstelle von Kindlin-3 nachweisen, ein Effekt, der bei Weiterverfolgung dieser Untersuchungsrichtung die Möglichkeit zukünftiger pharmakologischer Therapien impliziert. Im Gegensatz dazu fand sich im Falle von Thrombozyten der HPA 1b/1b-Variante eine signifikant inverse Reaktion in Form einer - aufgrund der bisherigen Literatur unerwarteten und hier erstmals beschriebenen - gesteigerten statischen Adhäsion auf beiden Liganden Fibronectin mit einer Steigerung um 30% und Fibrinogen um 56%. Die aggregometrischen Untersuchungen im Rahmen der Protokolletablierung bestätigten diesen Trend. Auf Fibrinogen zeigten Thrombozyten der HPA-1b-Variante diesbezüglich durchgehend ein höheres Adhäsionspotenzial. Der inhibitorische Effekt β_3 -mimetischer Peptide auf Thrombozyten der HPA-1a-Variante war in unserem Experimentalansatz für beide Liganden mit einer Reduktion der statischen Adhäsion auf -22% gleich.

Im Rückschluss scheint Kindlin-3 **1.)** in der Signalkaskade der $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrin-Aktivierung eine Adhäsions-limitierende und **2.)** eine Polymorphismus-spezifische Rolle zu spielen. Es ergeben sich neue Hypothesen, die in dieser Arbeit diskutiert werden.

Der erfolgreiche Ersteinsatz β_3 -mimetischer Peptide für die Bindungsstelle von Kindlin-3 macht vertiefende (z.B. rheologische) Untersuchungen im Zuge einer in Zukunft möglichen Pharmakotherapie Erfolg versprechend und fordert zudem für ein späteres pharmakologisches Sicherheitsprofil den weiteren Vergleich beider Genvarianten.

Abstract

Platelet integrin receptors like membrane-dominating $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin are essential to ensure adequate platelet function during haemostasis. In case of a dysfunction, e.g. impaired aggregation, they can, however, be a causative factor of thromboembolic or haemorrhagic events. In homozygous carriers of the HPA-1b allele, the HPA-1 polymorphism (Leu33/Pro33 polymorphism) of the $\alpha_{IIb}\beta_3$ receptors indicates an increased thrombogenicity which is clinically manifested with an early incidence of acute myocardial infarction. The cytoplasmic β_3 subunit of the $\alpha_{IIb}\beta_3$ receptor interacts with many signalling and cytoskeletal proteins during integrin activation, including kindlin-3. Any loss of the β_3 interactions with the adaptor protein kindlin-3 can lead to a defective signalling and subsequently impaired platelet function.

The aim of the present study was to investigate the potential of mimetic peptides and their influence on the role of kindlin-3 in the signalling cascade. Studies on human platelets were performed to evaluate the static adhesion to fibrinogen and fibronectin. One focus was placed on evaluating the two gene variants of the HPA-1 polymorphism. Initially, a protocol was developed for the use of β_3 mimetic peptides for the binding site of kindlin-3 to the β_3 subunit of the integrin receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$. Internalisation of the peptides was confirmed by means of laser microscope after FIASH labelling. On this basis, the suitable concentrations and incubation conditions were determined for both gene variants in a series of tests using aggregometry and fluoroscan. After implementation of the protocol, the effect of β_3 mimetic peptides on the static adhesion behaviour to fibrinogen and fibronectin was analysed in a further step by means of quantitative fluorescence measurement (n=25) and laser microscopy using platelets from donor blood of homozygous carriers of HPA 1a/1a or HPA 1b/1b, respectively.

Regarding the general use of mimetic peptides, the results show that peptides are able to overcome the complex membrane barrier of the platelets and also have a different specific influence on the platelet adhesion and aggregation of both gene variants. In the HPA 1a/1a variant, a significant inhibitory effect on platelet adhesion was demonstrated after application of β_3 mimetic peptides for the binding site of kindlin-3 implying the possibility of pharmacological therapies after further pursuing these research activities. In contrast, platelets of the HPA 1b/1b variant showed a significant inverse reaction, i.e. increased static adhesion to both ligands fibronectin by 30% and fibrinogen by 56%, respectively; this effect was unexpected, as it has not yet been described in scientific literature. Aggregometry tests performed within the scope of the development of the protocol confirm this trend. Platelets of the HPA-1b variant consistently demonstrated a higher adhesion potential to fibrinogen. In our experimental design, the inhibitory effect of β_3 mimetic peptides on platelets of the HPA-1a variant was equivalent for both ligands with a reduction of the static adhesion of -22%.

In conclusion, kindlin-3 seems to 1.) have an adhesion-limiting effect in the signalling cascade of the $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin activation and 2.) play a polymorphism-specific role. This results in new hypotheses that will be discussed in the present study. Due to the successful initial use of β_3 mimetic peptides for the binding site of kindlin-3, further (e.g. rheological) analyses appear promising with regard to a potential future pharmacotherapy. Moreover, a more accurate comparison of both gene variants is required for the assessment of the pharmacological safety profile.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ADAP	<i>adhesion and degranulation-promoting protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Aktenzeichen
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CMFDA	<i>5-chloromethylfluorescein diacetate</i>
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	extrazelluläre Matrix
Em	Emission
Ex	Extinktion
FVIIIa	aktivierter Faktor 8
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FERM	<i>four-point-one/ezrin/radixin/moesin</i>
FG	Fibrinogen
FN	Fibronektin
g	Gramm
GP	Glykoprotein
HCl	Hydrogenchlorid/ Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HPA- 1	Humanes Plättchenantigen 1
Ig	Immunglobulin
KHK	Koronare Herzkrankheit
kDa	Kilodalton
LAD III	<i>leukocyte adhesion deficiency III</i>
Leu	Leucin
LSM	Lasermikroskop, <i>Laser-Scanning-Microscop</i>
M	mol
m	milli
μ	mikro
mRNA	<i>messengerRNA</i>

miRNA	microRNA
min	Minute
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mig-2	mitogen inducible gene 2
P1	Kontrollpeptid/ Peptid ohne mimetische Funktion, nur mit TAT-Sequenz
P1a	Kontrollpeptid/ Peptid ohne mimetische Funktion, nur mit TAT-Sequenz und mit Erkennungssequenz für den Farbstoff FIAsH
P2	Wirkpeptid/ mimetisches Peptid für die Bindungsstelle von Kindlin-3 an der β_3 -Untereinheit und TAT-Sequenz
P2a	mimetisches Peptid für die Bindungsstelle von Kindlin-3 an der β_3 -Untereinheit mit Erkennungssequenz für den Farbstoff FIAsH
PBS	Phosphate Buffer Solution
Plts	Plättchen/ <i>platelets</i>
Pro	Prolin
PRP	Plättchenreiches Plasma
RGD	Arginin / Glycin / Aspartat
rpm	revolutions per minute
SKAP55	<i>Src kinase-associated phosphoprotein 55</i>
t	Zeit
Unc-112	<i>uncoordinated protein 112</i>
URP	Unc-112 related protein
WT	Wildtyp
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	<i>World Health Organisation</i>
Y	Tyrosin
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogenrezeptor, GPIIb-IIIa

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Hämostase	1
1.3	Integrine	2
1.4	Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$	2
1.5	Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$-Aktivierung	3
1.6	Der HPA-1-Polymorphismus des $\alpha_{IIb}\beta_3$-Rezeptors	5
1.7	Kindlin-3	7
1.8	Das HIV-Tat-Peptid und Mimetische Peptide	8
1.9	Arbeitshypothese	10
1.10	Spezifische Fragestellungen	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Verwendete Chemikalien	12
2.1.2	Verwendete Peptide	13
2.1.3	Puffer	14
2.1.4	Verwendete Geräte	14
2.1.5	Probanden und Statistik	15
2.2	Methoden	16
2.2.1	Versuchsvorbereitung und Ablauf	16
2.2.1.1	Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Fibrinogen und mit Fibronectin	16
2.2.1.2	Blutentnahme	17
2.2.1.3	Thrombozytenpräparation	18
2.2.1.3.1	Thrombozyten-Waschprotokoll	18
2.2.1.3.2	Thrombozytenfärbung und Peptidzugabe	18
2.2.1.4	Thrombozytenadhäsion	19
2.2.1.5	Messung am Fluoroskan	19
2.2.2	Darstellung Adhäsionsverhalten mittels Lasermikroskopie	20
2.2.3	Vorversuche	22
2.2.3.1	Bestimmung der Inkubationszeiten von FIAsH und Peptid 1 & 2	22
2.2.3.2	Nachweis der Peptidinternalisierung mittels FIAsH-Labeling	23
2.2.3.3	Exogene Applikation von N-Ethylmaleinimid (NEM) an FIAsH markierte HEK 293 Zellen	25
2.2.3.4	Aggregometrie zur Bestimmung der Peptidkonzentration	26
2.2.3.4.1	Messprinzip	26
2.2.3.4.2	Durchführung	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Vorversuche	28
3.1.1	Nachweis der Peptidpenetration in die Thrombozyten	28
3.1.2	Einfluss der Applikation von NEM auf die Hintergrundfluoreszenz von FIAsH	31
3.1.3	Ermittlung der geeignetsten Peptidkonzentration mittels Aggregometrie	32
3.2	Hauptversuch	35

3.2.1	Statische Adhäsion von Thrombozyten des Leu33/Pro33-Polymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ nach Applikation β_3 -mimetischer Peptide.....	35
3.2.2	Lasermikroskopie	37
3.2.2.1	Lasermikroskopische Darstellung von Thrombozyten nach Peptidbehandlung auf BSA	37
3.2.2.2	Lasermikroskopische Darstellung von Thrombozyten nach Peptidbehandlung auf FG.....	39
3.2.2.3	Lasermikroskopische Darstellung von Thrombozyten nach Peptidbehandlung auf FN.....	41
4	Diskussion	43
4.1	Methodenvalidierung	43
4.1.1	FIAsH-Labeling.....	43
4.1.2	Aggregometrie.....	44
4.1.3	Mimetische Peptide	46
4.2	Versuche zur statischen Adhäsion.....	48
4.2.1	Einführung	48
4.2.2	Statisches Adhäsionsverhalten in Abhängigkeit auf den immobilisierten Liganden Fibrinogen und Fibronektin.....	49
4.2.3	Statisches Adhäsionsverhalten in Abhängigkeit vom HPA-1-Polymorphismus	49
4.2.4	Deutungsansätze	50
4.2.4.1	Änderung der Konformation	50
4.2.4.2	Interaktionspartner	51
4.2.4.2.1	Einfluss der <i>Micro RNA</i>	51
4.2.4.2.2	Einfluss auf das <i>signaling</i>	52
4.2.4.2.3	Einfluss von Talin	53
4.2.4.2.4	Einfluss von ADAP	58
5	Ausblick & Schlussfolgerung	60
6	Literaturverzeichnis	62

Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Aufbau Integrin-Rezeptor und schematische Darstellung der Aktivierungsgrade.....	5
Abb. 2:	Aminosäuresequenz des basischen Tat-Peptids (modifiziert nach Rizzuti et al., 2015)	9
Abb. 3:	Adhäsion von Thrombozyten auf FG bei unterschiedlicher Inkubationszeit mit Peptid.....	29
Abb. 4:	Adhärente FIAsh-markierte Thrombozyten nach Behandlung gemäß Ansatz IX	30
Abb. 5:	Lasermikroskopische Darstellung von FIAsh gefärbten HEK 293 Zellen mit bzw. ohne vorheriger NEM Inkubation	31
Abb. 6:	Dosis-Wirkungs-Kurve β_3 -mimetischer Peptide bei der HPA-1a-abhängigen Thrombozytenaggregation.....	33
Abb. 7:	Dosis-Wirkungs-Kurve β_3 -mimetischer Peptide bei der HPA-1b-abhängigen Thrombozytenaggregation.....	33
Abb. 8:	Statische Adhäsion auf Fibrinogen (Zieluntersuchung)	35
Abb. 9:	Statische Adhäsion auf Fibronektin (Zieluntersuchung)	36
Abb. 10:	Block 1 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten nach Applikation von Peptid 1a auf BSA, Negativkontrolle	37
Abb. 11:	Block 2 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten nach Applikation von Peptid 2a auf BSA, Negativkontrolle	38
Abb. 12:	Block 3 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten nach Applikation von Peptid 1a auf FG	39
Abb. 13:	Block 4 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten nach Applikation von Peptid 2a auf FG	40
Abb. 14:	Block 5 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten nach Applikation von Peptid 1a auf FN	41
Abb. 15:	Block 6 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten nach Applikation von Peptid 2a auf FN	42
Abb. 16:	Western-Blot-Nachweis der spezifischen Bindung von den synthetischen Peptiden mit Talin bzw. Kindlin	47
Abb. 17:	Integrin-aktivierende Proteine Talin und Kindlin	54
Abb. 18:	Talin und Kindlin als kooperative Partner	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Listung der verwendeten Chemikalien	12
Tabelle 2:	Nomenklatur der Peptide	13
Tabelle 3:	Listung verwendeter Geräte	15
Tabelle 4:	Pipettierschema Hauptversuch der 96Well Platte	17
Tabelle 5:	Pipettierschema der 4 Chamberslides, Ansatz stat. Adhäsion auf FG	21
Tabelle 6:	Pipettierschema der 4 Chamberslides, Ansatz stat. Adhäsion auf FN	22
Tabelle 7:	Schema Inkubationsansätze	23

1 Einleitung

1.1 Einführung

Seit Jahren weisen die Daten der WHO (World Health Organisation) und des Statistischen Bundesamts chronisch ischämische Herz-Kreislaufkrankungen als die häufigste Todesursache aus ("WHO | The top 10 causes of death").

Die Ursachen für ihre Entstehung sind multifaktoriell. Neben den traditionell bekannten Risikofaktoren wie Hyperlipidämie, Hypertonus und Nikotinabusus existieren auch hereditäre Normvarianten, die pathogenes Potenzial aufweisen (Lefkowitz and Willerson, 2001; Yusuf et al., 2004). Dem Pathomechanismus chronisch ischämischer Gefäßerkrankungen liegt eine Störung der Integrität des Gefäßwandendothels zugrunde. Es lässt sich eine Vielfalt unterschiedlicher pathogener Faktoren auf unterschiedlichen Ebenen beobachten, die ursächlich das sensible Gleichgewicht zwischen prothrombotischen und fibrinolytischen Prozessen stören (Scharf et al., 2016). Neben quantitativen Veränderungen der Blutbestandteile kommt auch den qualitativen Veränderungen des Gerinnungssystems auf molekularer Ebene, die durch genetische Mutationen entstanden sind, eine nicht zu unterschätzende Rolle zu, insbesondere der Mutation des $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrins von Thrombozyten (Loncar et al., 2007).

1.2 Hämostase

In der primären Hämostase erfolgt die Aktivierung von Thrombozyten zur Bildung eines hämostatischen Pfropfs („hemostatic plug“), der den Bruch in der Gefäßwand abdichtet und überschüssigen Blutverlust verhindert. Es folgen Wechselwirkungen zwischen den Bestandteilen des exponierten Subendothels einschließlich Fibrinogen (FG), Kollagen, von Willebrandfaktor (VWF), Fibronectin (FN) und spezifischen Membranrezeptoren der Thrombozytenoberfläche, den sogenannten Integrinen (Baker-Groberg et al., 2014; Kasirer-Friede et al., 2002; McCarty et al., 2004). Dadurch können die Thrombozyten die hohen intravasalen Blutscherkräfte überwinden und sich an der Ziel-Endothelstelle anheften. Die Bindung von Fibrinogen und ausgewählten Matrixproteinen mit Arg-Gly-Asp (RGD)-Sequenzen an diesen spezifischen Integrin-Rezeptor vermittelt u.a. eine stabile Thrombozytenadhäsion, Aggregation und Thrombusbildung. Der weitere Aktivierungsprozess erfolgt durch Konformationsänderungen („shape change“),

die das Auftreten mehrerer interner Signalisierungsnetze induziert, wie u.a. die Sekretion von Granula.

Anschließend ermöglichen die aktivierten Thrombozyten eine sekundäre Hämostase, die die Bildung eines Fibrin-Gerinnsels unterstützt, indem sie Koagulationsfaktoren freisetzen und eine katalytische Oberfläche für die Hauptinteraktionen der Koagulationskaskade bieten (Jurk and Kehrel, 2005; Stassen et al., 2004).

1.3 Integrine

Aufgrund einer großen Anzahl dieser spezifischen Integrin-Rezeptoren sind Thrombozyten hochreaktive Zellen, die leicht durch viele physiologische und nichtphysiologische Agonisten aktiviert werden. Die Signalwege über diese Rezeptoren sind abhängig von der Art der Agonisten, aber sie führen immer zu Reaktionen, die in der Aktivierung von Thrombozyten enden. Die Expression von multiplen Membranrezeptoren, sowohl konstitutiv als auch aktivierungsabhängig, vermittelt die Thrombozytenadhäsion und -aggregation an Stellen der vaskulären Verletzung. Integrine vermitteln extrazelluläre Signale nach intrazellulär und umgekehrt, eine sogenannte bidirektionale Signaltransduktion („bidirectional signaling“), (Hynes, 2002). Dadurch können die Zellen auf ihre chemische bzw. physikalische Umgebung dynamisch reagieren (Calderwood et al., 2013).

1.4 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin-Rezeptor ist ein spezifischer Membranrezeptor aus der Gruppe der β -Integrine, zu denen unter anderem auch das Integrin $\alpha v\beta_3$ gehört. Der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin-Rezeptor wird primär nur auf Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert (Nakazawa et al., 2013).

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist ein heterodimeres, transmembranes Glykoprotein. Es ist mit 60.000 bis 100.000 Kopien am häufigsten auf der Thrombozytenmembran vertreten (Massberg et al., 2002; Wagner et al., 1996; Ye et al., 2010). Es besteht aus einer 115 Kilodalton (kDa) schweren β_3 -Untereinheit und einer 90 kDa großen α -Untereinheit (Phillips et al., 2001). Beide Untereinheiten durchdringen die Membran und lassen sich demzufolge in eine extrazelluläre, transmembrane und zytoplasmatische Region unterteilen. Diese beiden zytoplasmatischen Regionen, auch „tails“ genannt, stellen als funktionelle Einheit im Verlauf der Integrin-

Aktivierung mit Hilfe spezifischer Adhäsionsproteine wie Talin und Kindlin-3 auch eine Verbindung zum Zytoskelett her (Larjava et al., 2008; Moser et al., 2009; Zhu et al., 2017). Die α -Untereinheit ist eine primäre Determinante der extrazellulären Ligandenbindungsspezifität, während der β -tail der Hauptmediator intrazellulärer Wechselwirkungen ist (Hynes, 2002; Tozer et al., 1999).

Integrine sind verantwortlich für die Zell-Zell Adhäsion der Thrombozyten untereinander und die Zell-ECM Adhäsion (Kahner et al., 2012). Der Integrin- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor besitzt verschiedene Liganden, die ihn aktivieren können. Diese Aktivierung ist mitunter entscheidend für die kohäsiven Eigenschaften von Thrombozyten. Zu diesen Liganden gehören, neben Fibrinogen mit dem größten Aktivierungspotenzial, u.a. Fibronektin, Vitronektin und vWF (Bennett, 2005; Bennett et al., 2009; Cierniewski et al., 1999; Gawaz et al., 1999). Für die Ligandenbindung ist das extrazelluläre globuläre Kopfstück verantwortlich (Takagi et al., 2002).

1.5 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist aufgrund seines bereits erwähnten *bidirectional signaling* ein wichtiges Rezeptorprotein zur Vereinigung intra- und extrazellulärer Prozesse (Calderwood et al., 2000). Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ kann durch diesen komplexen Mechanismus u.a. mit Hilfe von „Triggerproteinen“ reversibel von einem „low-affinity state“ in einen „high-affinity state“ wechseln (Gottschalk et al., 2002) (vgl. Abb.1). In ihrer inaktiven Konformation (intravasal zirkulierende Thrombozyten) weisen die $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptoren eine geringe Affinität für Liganden auf, wohingegen nach Aktivierung (*Inside-out signaling*) die Affinität zunimmt, was im Folgenden zur Ligandenbindung, Integrin-Clusterbildung (Cluzel et al., 2005) und schließlich zum *Outside-in signaling* führt. Man unterscheidet folglich das *Inside-out signaling* von dem *Outside-in signaling* (Giancotti and Ruoslahti, 1999; Schwartz and Ginsberg, 2002).

Eine erhöhte Aktivität in Form einer gesteigerten Affinität des Integrin-Rezeptors für seine extrazellulären Liganden (u.a. FG und FN), die durch eine Konformationsänderung bedingt ist, wird als *Inside-out signaling* bezeichnet (Ginsberg et al., 2005; Tadokoro et al., 2003; Ye et al., 2011). Hier kommt es zu intrazellulären Signalisierungsereignissen, wie beispielsweise der Bindung von Adaptorproteinen wie Kindlin-3 und Talin an die zytosmatische β -Untereinheit oder an Phospholipide der Membran, was dann in einer erhöhten Ligandenbindungsaffinität und dem sogenannten „Integrin-Clustering“ endet (Harburger and Calderwood, 2009; Luo et al., 2007; Ma et al., 2006; Roberts and Critchley, 2009; Shattil et al., 2010; Wegener et al., 2007).

Führt eine Integrin-Rezeptor-Aktivierung zum Ablauf von Signalwegen in das Zellinnere mit Verbindung zu Bestandteilen des Zytoskeletts, wie u.a. Aktin, handelt es sich um das sogenannte *Outside-in signaling*, welches neben der Zelladhäsion auch zur Zellmigration beiträgt (Ginsberg et al., 2005; Legate et al., 2009; Montanez et al., 2008). Die Bindung extrazellulärer Liganden induziert auch eine Reihe von *Outside-in* Signalen, die in der Aktivierung zahlreicher Kinasen (u.a. die Tyrosinkinase Src) und Phosphatasen (u.a. Tyrosin Phosphatase SHP-2) und schließlich in der zytoskelettalen Reorganisation (Filopodien- bzw. Lamellipodienausbildung) enden, wodurch die Thrombozyten sich auf einer adhäsiven Oberfläche ausbreiten können („Spreading“) (Oberfell et al., 2002; Phillips et al., 2001; Shattil and Newman, 2004; Vijayan et al., 2004). Die Erkennung von Fibrin oder Fibrinogen als immobilisiertes Substrat erfordert kein *Inside-out signaling*, induziert jedoch mitunter eben dieses *Outside-in signaling* (Byzova and Plow, 2000; Vijayan et al., 2000).

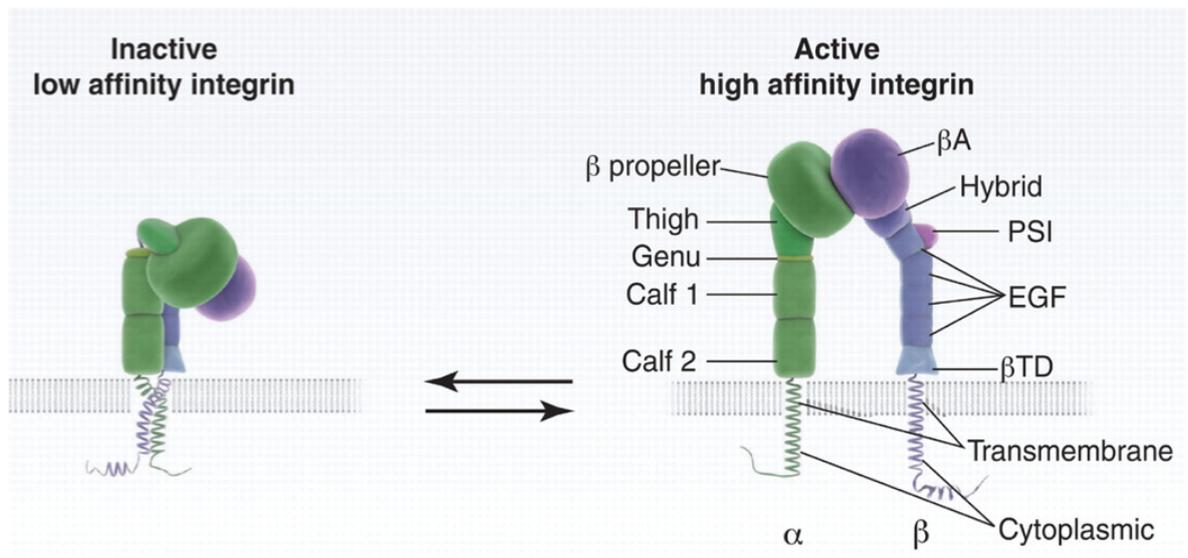


Abb.1: Aufbau Integrin-Rezeptor und schematische Darstellung der Aktivierungsgrade

Spezifische Kontakte zwischen den Ektodomänen (extrazellulär), der Transmembran-Domäne (TM) und den cytoplasmatischen Domänen halten das Integrin in seiner gebogenen Konformation. Die Trennung der Integrin-Beine, TM und cytoplasmatischen Domänen erfolgt während der Integrin-Aktivierung, was zu einer erweiterten (aufgerichteten) Integrin-Konformation führt. Die α -Untereinheit ist grün dargestellt und die β -Untereinheit violett (modifiziert nach Moser et al., 2009).

1.6 Der HPA-1-Polymorphismus des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors

Die medizinische Forschung kennt verschiedene Genvarianten der β -Untereinheit des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors. Die häufigste Variante und auch von ihrer klinischen Relevanz wichtigste ist der HPA-1-Polymorphismus (Zotz et al., 2005, 1998). Dieser Polymorphismus ist durch den Austausch eines Nukleotids an Position 1565 im Exon des β_3 -Gens bedingt. Die Base Thymin wird gegen Cytosin ausgetauscht und führt daraufhin zu einer Änderung der Aminosäuresequenz an Position 33 der β_3 -Untereinheit. Es wird dann Prolin für Leucin eingebaut (Vijayan et al., 2005). Dieser Austausch führt zu einer Konformationsänderung des Integrin- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors (Xiao et al., 2004; Yee and Bray, 2004).

Die homozygote Genvariante HPA-1b/1b mit beschriebener Änderung der Aminosäuresequenz (Pro33/Pro33) kommt allerdings nur zu 3% in der europäischen Bevölkerung vor. Mit 75,1 % ist der homozygote Genotyp HPA-1a/1a (Leu33/Leu33) am häufigsten vertreten. Die heterozygote Genvariante HPA-1a/1b (Leu33/Pro33) kommt in Europa mit 25% ebenfalls relativ häufig vor (Di Castelnuovo et al., 2005; Williams and Bray, 2001). Die HPA-1b/1b-Variante ist ein wichtiger Faktor für gesteigerte Thrombogenität. Ursächlich dafür ist ein

„hyperreaktives“ Rezeptorpotential des $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrins. Diese gesteigerte Aktivität äußert sich z.B. in einem geringeren Aktivierungsschwellenwert durch Stimulantien wie ADP und Adrenalin sowie in einer erhöhten Degranulierungsrate von α -Granula nach erfolgter Stimulation (Michelson et al., 2000). Auf klinischer Ebene resultiert für Thrombozyten dieser Genvariante eine verkürzte Blutungszeit, durch einen Integrin-getriggerten höheren Verbrauch an Prothrombin bzw. der Generierung von Thrombin (Byzova and Plow, 1997; Vijayan and Bray, 2006). Generell wird für Thrombozyten der prothrombotischen Variante postuliert, dass es bei diesen zu einer stabileren Bindung zwischen dem $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin-Rezeptor mit seinen extrazellulären Liganden Fibrinogen und Prothrombin kommt (Vijayan and Bray, 2006). Ein gesteigertes *Outside-in signaling* wird hier vermutet.

Klinische Assoziationsstudien haben gezeigt, dass Patienten mit bekannter koronarer Herzkrankheit (KHK), die heterozygote oder homozygote Träger des HPA-1b-Genotyps waren, im Median 5,2 Jahre früher einen Myokardinfarkt erlitten haben als Träger des homozygoten HPA-1a-Genotyps (Weiss et al., 1996; Zotz et al., 2005, 1998). Des Weiteren wird über ein erhöhtes Risiko für wiederholte Spontanaborte bei Trägerinnen des homozygoten HPA-1b-Allels berichtet (Ivanov et al., 2008). Loncar et al. (2007) konnten nachweisen, dass Thrombozyten von Trägern des HPA-1b-Genotyps im Vergleich zu Thrombozyten von HPA-1a-Genotyp-Trägern bei höheren Scherraten unter flussdynamischen Bedingungen eine höhere Resistenz aufweisen. Experimente, die eine Verbindung zwischen der HPA-1b-Variante und einem Thromboserisiko herstellen, haben zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt (Bennett et al., 2001; Bussel et al., 2000; Loncar et al., 2007; Vijayan and Bray, 2006). Diese Widersprüche beziehen sich aber nicht auf die generelle Annahme, dass bei Thrombozyten der HPA-1b-Variante die Adhäsion an Fibrinogen erleichtert ist (Ghosh et al., 2002; Jallu et al., 2012). Vijayan and Bray (2006) legen nahe, dass β_3 -Strukturmodifikationen, die mit der Leu33-Substitution verknüpft sind, die Stabilität der offenen Kopfkonformation des Integrins nach der Ligandenbindung verbessern.

Konnte man Unterschiede experimentell *in vitro* aufzeigen, so wird die klinische Relevanz dieser Mutation, trotz der immensen Bedeutung der HPA-Polymorphismen auf den Gebieten der Immunologie und Transfusionsmedizin (Grotto et al., 2015; Rozman et al., 1999; Verran et al., 2000), weiterhin diskutiert (Bojesen et al., 2003; Di Castelnuovo et al., 2005; Lambrinouadaki et al., 2010; Loncar et al., 2007; Reiner et al., 2001; Sucker et al., 2009; Verdoia et al., 2015). Dies ist sicherlich durch das vergleichsweise geringere Vorkommen homozygoter HPA-1b-Träger mitbedingt.

1.7 Kindlin-3

Die Aktivierung von verschiedenen heterodimeren Integrin-Rezeptoren durch das zytosolische Protein Kindlin-3 ist dabei entscheidend für die Regulierung verschiedener zelladhäsionsabhängiger Prozesse, einschließlich der Blutgerinnung. Die Kindline gehören zur Familie der intrazellulären Adaptorproteine, zu denen auch Talin gehört (Moser et al., 2009; Petrich et al., 2007; Rojas and Ahmed, 1999). Bei Mäusen und Menschen zählt man drei Familienmitglieder, Kindlin-1, -2 und -3. Der Name Kindlin leitet sich ab vom Kindler Syndrom, einer autosomal rezessiv vererbten Dermatose. Sie beruht auf einer Genmutation, die erstmals von Therese Kindler beschrieben wurde (Fassihi et al., 2005; Jurk et al., 2010; Kloeker et al., 2004; Mory et al., 2008).

Die drei Kindline werden in Geweben bzw. Zellen unterschiedlich exprimiert. So findet sich Kindlin-2 fast ubiquitär in Epithelzellen, Fibroblasten, embryonalen Stammzellen (z.B. CHO-„chinese hamster ovarial cells“ Zellen) und Gewebezellen von Leber, Niere, Colon und Herz. Kindlin-1 wird bereits eingeschränkter exprimiert, u.a. wie Kindlin-2 in Epithelzellen, in Keratinozyten der Haut (siehe Kindler Syndrom), Zellen der Harnblase, der Niere und Zellen des Magen-Darm-Trakts (Karaköse et al., 2010). Kindlin-2 ist ein essentielles Signalprotein im Zuge des *Outside-in signalings* über die β_3 -Untereinheit des $\alpha\beta_3$ Integrin-Rezeptors von Endothelzellen und hier maßgeblich an der Angiogenese beteiligt (Liao et al., 2015; Simon, 2015).

Kindlin-3 (75kDa) hingegen wird hauptsächlich in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert. Zu diesen Zellen gehören Leukozyten, Erythrozyten und mit Blick auf das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auch Thrombozyten (Fagerholm et al., 2014; Meves et al., 2009; Ussar et al., 2006). In neueren Arbeiten wurde es auch in niedrigerer Konzentration in Epithelzellen gefunden (Bialkowska et al., 2010). Kindlin-3 interagiert direkt mit der zytoplasmatischen Untereinheit von β_3 - bzw. β_1 -Integrinen (Lu et al., 2016; Yates et al., 2012). Im Mausmodell führt ein Knockout des Kindlin-3 Gens zu perinataler Letalität aufgrund von Anämien (Krüger et al., 2008) und diffusen Blutungen in verschiedenen Körperregionen. Trotz unveränderter Talin-Expression können Integrine, *in vivo*, in Thrombozyten ohne das Adaptorprotein Kindlin-3 nicht aktiviert werden (Joo, 2012; Moser et al., 2009, 2008). Kindlin-3 ist deshalb essentiell für die Aktivierung und Regulation von β_1 - und β_3 -Integrinen (Ma et al., 2008; Moser et al., 2008).

Die LAD-III („Leukocyte adhesion deficiency-III“) ist ein seltenes primäres Immundefizienz-Syndrom und ist charakterisiert durch eine homozygote Mutation im Kindlin-3-Gen (Cytosin->Thymidin Punktmutation) (Crazzolara et al., 2015). Auf molekularer Ebene kommt es zu einem gestörten *signaling* über die β -Untereinheit von Integrinen, was dann letztendlich zu einer gestörten Leukozytenadhäsion, Chemotaxis sowie einer gestörten Thrombozytenadhäsion /-aggregation führt. Klinisch findet sich dementsprechend eine hohe Anfälligkeit für Infektionen, spontane episodische Blutungen und eine Osteopetrosis (Kuijpers et al., 2009; Malinin et al., 2009; Mory et al., 2008; Sabnis et al., 2010; Svensson et al., 2009). Kindlin-3 ist an der Podozytenbildung in Osteoklasten beteiligt (Schmidt et al., 2011), eine Beobachtung, die zum Teil die Osteopetrosis bei Kindlin-3-defizienten Mäusen und bei humanen LAD-III-Patienten erklärt (Malinin et al., 2009; Moser et al., 2009; Schmidt et al., 2011).

1.8 Das HIV-Tat-Peptid und Mimetische Peptide

Das Tat-Peptid wird von dem Tat-Protein („transactivator of transcription“) des humanen Immundefizienzvirus (HIV) abgeleitet und gehört zur Gruppe der zellpenetrierenden Peptide (CCP) (Brooks et al., 2005). Es ist die kürzeste abgeleitete Aminosäuresequenz, die effizient in die Zellen eintreten kann und dort die HIV-Virusgenexpression generieren kann (Rizzuti et al., 2015; Vivès et al., 1997). Es dient in dieser Arbeit als Träger und Transportmolekül des Wirkpeptids.

CPPs („cell penetrating peptides“) können die Zellbarriere über Internalisierungswege überwinden. Sie sind seit Längerem eine erprobte Methode, gekoppelte bioaktive Makromoleküle wie Peptide, Oligonukleotide, Proteine und eben auch Arzneimoleküle zu ihrem Wirkort zu transportieren. Sie bieten so einen Weg der spezifischen Pharmakotherapie (GUO et al., 2016).

Tat-Peptid



Abb. 2: Aminosäuresequenz des basischen Tat-Peptids (modifiziert nach Rizzuti et al., 2015)

Es ist bis jetzt jedoch nicht ausreichend geklärt, wie die CPPs diesen effizienten molekularen Transport mit geringer Zytotoxizität erreichen (Futaki et al., 2001). Der generelle Mechanismus, wie die eher hydrophilen kationischen Peptide die hydrophobe Zellmembran durchdringen, ist noch nicht vollständig geklärt. Es gibt mehrere Studien, die die Beteiligung der Endozytose als Hauptweg für die Internalisierung der Peptide unterstützen (Richard et al., 2003). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass dies nicht durch Endozytose geschieht (Dimitriou et al., 2009). Herce et al. (2009) haben diesbezüglich herausgefunden, dass argininreiche Peptide (Futaki et al., 2003), wie auch das Tat-Peptid, u.a. durch vorübergehende Porenbildung in die Zelle aufgenommen werden. Ein weiterer aktinabhängiger Aufnahmemechanismus wird diskutiert (He et al., 2015). Das α -Globin (Hb α X)-mimetische Peptid steht beispielhaft für ein aktuell in der Erprobung stehendes mimetisches Peptid in der pharmakologischen Forschung. Die Fähigkeit des Hämoglobins, den potenten Vasodilatator Stickstoffmonoxid (NO) im Blut abzufangen, dient generell als Sicherstellung eines ausgeglichenen Gefäßtonus. In Endothelzellen bilden die α -Ketten von Hämoglobin (α -Globin) und die endotheliale NO-Synthase einen makromolekularen Komplex, der eine Reduzierung von bioaktivem NO direkt neben der Produktionsquelle induziert. Hb α X verdrängt endogenes α -Globin und erhöht das bioverfügbare NO für die

Vasodilatation. Die nachgewiesene Zielspezifität des Peptids verhindert negative Wechselwirkungen mit endogenem Hämoglobin und verbessert die NO-Signalisierung, was zu vasodilatatorischen Effekten führt (Keller et al., 2016).

Es gibt bereits Untersuchungsreihen mit Tat₍₄₇₋₅₇₎ konjugierten β_3 -mimetischen Peptiden für die zytosolische β_3 -Untereinheit. Es konnte dort gezeigt werden, dass die Thrombozytenmembran nicht nur penetriert wird, sondern dass das mimetische Peptid die Thrombozytenaggregation sowohl im PRP als auch bei gewaschenen Thrombozyten dosisabhängig hemmt (Dimitriou et al., 2009). Litjens et al. (2003) berichten in ihrer Veröffentlichung über eine 25%-ige Verringerung der Thrombozytenadhäsion auf FG-beschichteter Oberfläche durch das β_3 -Peptidanalogen, welches auch u.a. die Kindlin-3 Bindungsstelle enthält. Frühere Versuchsreihen konnten mit Hilfe mimetischer Peptide für den zytoplasmatischen β_3 -tail (β -3755-762-Sequenz) die Bedeutung dieser Proteinregion für Adhäsionsprozesse von HEL- („human erythroleukemia cells“) und ECV- („human endothelial cells“) Zelllinien aufzeigen (Liu et al., 1996).

Für die Arbeit wurde das Tat-Peptid₍₄₇₋₅₇₎ mit dem spezifischen Peptidanalogen der β_3 -Bindungsdomäne von Kindlin-3 konjugiert.

1.9 Arbeitshypothese

Das Zusammenspiel von interventioneller und medikamentöser Behandlung bzw. Sekundärprophylaxe von kardiovaskulären Erkrankungen ist essentiell. Auf Grund seiner Bedeutsamkeit steht die Ergründung, aber auch im Besonderen die Beeinflussung der Thrombogenese in seinem komplexen vaskulären Umfeld weiterhin im Fokus naturwissenschaftlicher Forschung. Die Angriffspunkte antithrombotischer Forschung sind vielfältig. Die Erkenntnis, dass zum Beispiel ADP-Rezeptor-Antagonisten wie Clopidogrel bzw. sein Nachfolger zweiter Generation Ticagrelor maßgeblich zur Verhinderung eines Stentverschlusses nach Koronararterienverschluss beitragen, schließt auch andere Mitspieler der primären Hämostase als medikamentöse Angriffspunkte nicht aus (Bledzka et al., 2013a; Kössler et al., 2009). Klinische Studien zur direkten Blockade der globalen Ligandenbindung am Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor durch orale Therapeutika (z.B. Sibrafiban) zeigten sich bezüglich Dosis und Wirkung als sehr ungünstig und mortalitätssteigernd, vor allem im Hinblick auf Blutungskomplikationen (Cannon,

2003; Chew et al., 2001; Leebeek et al., 2002). Alle Therapeutika dieser Substanzklasse wirkten hier blockierend auf das RGD-Motiv, eine von mehreren Bindungsdomänen am Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor. Es kam in diesem Fall wahrscheinlich nicht zur gewünschten Thromboseprophylaxe durch eine Integrin-Modulation, sondern zur vollständigen Blockade des Integrin-Rezeptors und zur Verhinderung dessen Bindung an ECM-Proteine, die dieses Bindungsmotiv tragen. Kindlin-3, als Protagonist und als teilweise bereits beschriebener Regulator anderer Adaptorproteine wie Talin in der Signalkaskade der Aktivierung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors (Montanez et al., 2008; Moser et al., 2009, 2008), stellt eine wirkungsvolle und möglicherweise komplikationsärmere Alternative der spezifischeren Thromboseprophylaxe dar.

Mit dieser Arbeit wird ein Protokoll zum Einsatz β_3 -mimetischer Peptide für die Bindungsstelle von Kindlin-3 an der β_3 -Untereinheit des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors vorgestellt. Anhand von Untersuchungen zur statischen Adhäsion auf Fibrinogen und Fibronectin soll in einem zweiten Schritt nicht nur der Einfluss mimetischer Peptide bezüglich ihrer Adhäsionsfähigkeit diskutiert, sondern auch eine Relation zum HPA-1-Polymorphismus gezogen werden. In diesem Zusammenhang soll das Potential mimetischer Peptide geprüft werden. So könnte ein vollständiges Verständnis der Rolle von Kindlin-3 in der Signalkaskade der Beeinflussung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins Kindlin-3 direkt oder seine Effektoren wie die β_3 -Untereinheit zu einem wirksamen medikamentösen *target* machen.

1.10 Spezifische Fragestellungen

- a) Welchen Einfluss haben die β_3 -mimetischen Peptide für die Bindungsstelle von Kindlin-3 an der β_3 -Untereinheit des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf die statische Adhäsion von Thrombozyten?
- b) Gibt es Unterschiede im Adhäsionsverhalten von Thrombozyten der HPA-1a-Variante und der HPA-1b-Variante nach Applikation β_3 -mimetischer Peptide?
- c) Gibt es Unterschiede im Adhäsionsverhalten der Thrombozyten an die Liganden Fibrinogen und Fibronectin unter dem Einfluss β_3 -mimetischer Peptide?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
MgCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
CaCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
HCl (0,5 M)	Merck KGaA, Darmstadt
PBS (Phosphate Buffer Solution)-Puffer (pH 7,3; ohne Mg/Ca)	PAA Laboratories GmbH, Austria
PBS (Phosphate Buffer Solution)-Puffer (pH 6,5 aus Stammlösung mit pH 7,3 mit HCl (0,5 M))	Im eigenen Institut hergestellt
Humanes Fibrinogen (stock solution: 5,9 mg/ml; working solution: 50 µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Apyrase, 1 kU	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Humanes Fibronectin, working solution: 50 µg/ml	Im eigenen Institut gereinigt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
HEPES 1M, pH 7,4 (4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid))	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München
Hitzeinaktiviertes BSA (BSA erhitzt bei 56°C für 30 min)	Im eigenen Institut hergestellt
CMFDA (5-Chloromethylfluorescein Diacetat), Cell Tracker™ Green	Life Technologies Corporation, Darmstadt
TC- FLAsH™, In- Cell Tetracysteine Tag Detection Kit Green Fluorescence	Life Technologies Corporation, Darmstadt
Peptide	Peptides & Elephants GmbH, Berlin Potsdam

Tabelle 1: Listung der verwendeten Chemikalien

2.1.2 Verwendete Peptide

Alle verwendeten Peptide wurden von der Firma „Peptides & Elephants“ synthetisiert und in PBS pH 7,3 gelöst bei -20 °C gelagert.

Peptid 2/2a, das Wirkpeptid, enthält das zytoplasmatische β_3 -Bindungsmotiv für Kindlin-3, das NxxY-Motiv ($^{751}\text{TSTFTNITY}^{759}$). Gebunden an alle aufgeführten Peptide ist die Tat-Sequenz ($^{47}\text{YGRKKRRQRRR}^{57}$). Das Tat-Peptid gehört zur Gruppe der CCP (*cell-penetrating-peptides*). Es vermittelt den Transport der oben genannten Peptide nach intrazellulär.

Peptid 1/1a enthalten, als Kontrollpeptide, nur die Tat-Sequenz ($^{47}\text{YGRKKRRQRRR}^{57}$).

Peptid 1a und 2a enthalten beide des Weiteren ein Tetracystein-Motiv. Diese Peptide wurden in Färbeversuchen mit FIAsh verwendet. Der zellpermeable fluoreszierende Farbstoff FIAsh liegt inaktiv in einem Komplex mit Ethandiol vor und beginnt erst dann zu fluoreszieren, sobald er an ein Tetracystein-Motiv gebunden ist.

Peptid	Peptidsequenz	Molekulargewicht (kDa)
Peptid 1a, Tat-Peptid mit Tetracysteinsequenz	YGRKKRRQRRRHRWCCPGCKTFT-NH ₂	3.08
Peptid 1, Tat-Peptid	YGRKKRRQRRRT-NH ₂	1.66
Peptid 2a, Tat-Peptid mit Tetracysteinsequenz und β_3 -mimetischer Bindungsstelle für Kindlin-3	YGRKKRRQRRRHRWCCPGCKTFTSTFTNITYT-NH ₂	4.11
Peptid 2, Tat-Peptid mit β_3 -mimetischer Bindungsstelle für Kindlin-3	YGRKKRRQRRRTSTFTNITYT-NH ₂	2.69

Tabelle 2: Nomenklatur der Peptide

2.1.3 Puffer

Tyrode Stammlösung: zur Erstellung des Thrombozyten/ Tyrode-Waschpuffers:

Tyrode 1000 ml (10fach):

- 80 g NaCl
- 2,1 g KCl
- 10,1 g NaHCO₃
- 0,6 g Na₂HPO₄
- 9,9 g Glukose

Die eingewogenen Chemikalien werden mit Aqua dest. in 800 ml gelöst (pH 7,4; einstellen mit 1 M HCl) und anschließend auf 1000 ml aufgefüllt. Der Thrombozyten-Waschpuffer enthält 1/10 der Tyrode-Stocklösung: 1 M HEPES, 1 M MgCl₂, 2 M CaCl₂.

2.1.4 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Zentrifuge, Universal 30 RF	Andreas Hettich GmbH & CoKG, Tuttlingen
Inkubator, Heraeus, B6120	Thermo Elektron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Tube Rotator	VWR International GmbH, Darmstadt
96-Well Platte, schwarz	NUNC™, Roskilde, Dänemark
Sysmex k-4500	Sysmex Deutschland, Norderstedt
Fluoroskan, Ascent Typ 2.6	Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, Zeiss Axiovet 100 M (Stativ) LSM 510, (Scanmodul)	Carl Zeiss, Oberkochen
Laser Mikroskop: Axio Observer D1 Kamera: Farbe Axio Cam ERC 5s	Carl Zeiss, Oberkochen
Computer, Scenic Pro M7	Siemens-Nixdorf, Augsburg
Vacutainer® Natrium-Citrat (Konz. 0,129 M)	BD, New Jersey, USA
BD Vacutainer® Safety- Lok™ Blood Blood Collection Set (21 G)	BD, New Jersey, USA
Kolbenhub-Pipetten (Eppendorf Reference: 0,1-1 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Maxipipette, 20-300 µl	GILSON®, Frankreich

Pipettenspitzen, Tip One®	STARLAB, Hamburg
Reaktionsgefäß, schwarz, 1,5 ml	neoLab®, Heidelberg
Reagiergefäß (Microtube), 1,5 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Falcon Tubes, 50 ml	BD, New Jersey, USA
CELLSTAR® Tubes 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Tubes, 12 ml	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Chamberslide, 2-Well	LAB-TEK®, Naperville, USA
Pasteur-Plastik Pipetten, 3 ml	Ratiolab GmbH, Dreieich

Tabelle 3: Listung verwendeter Geräte

2.1.5 Probanden und Statistik

Die Auswahl der Probanden erfolgte aus der Blutspenderkartei der Blutspendezentrale und aus Mitarbeitern des Universitätsklinikums Düsseldorf. Im Vorfeld waren alle Blutspender im Hinblick auf den HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ typisiert worden.

Für das Zielexperiment wurden insgesamt 12 Blutspender (biologische Variabilität $n=6$ je homozygote Genvariante) ausgewählt, die eigenen Angaben zufolge gesund waren und 14 Tage vor dem Blutspendetermin keiner pro- bzw. antikoagulatorisch wirkenden Medikation unterlagen. Das Spenderkollektiv bestand aus 6 Männern und 6 Frauen. Unter den HPA-1b/1b-Trägern waren 5 Männer im Alter zwischen 47-53 Jahren und eine Frau im Alter von 35 Jahren. Bei den HPA-1-a/1a-Trägern waren 4 Frauen und 2 Männer. 4 Frauen und 1 Mann waren 24 Jahre alt. Ein Mann war 26 Jahre alt.

Nach ausführlicher Aufklärung wurde gemäß den Empfehlungen der Helsinki-Erklärung schriftlich das Einverständnis des jeweiligen Spenders festgehalten. Die Zustimmung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der HHU für diese Versuchsreihe liegt vor (11.09.2001; AZ:1864).

Die im Text geschilderten und in den graphischen Darstellungen abgebildeten Daten des Zielexperiments sind das statistische Ergebnis aus jeweils 12 (biologische Variabilität $n=6$ pro homozygotem Genotyp) unabhängigen identisch ablaufenden Versuchsreihen mit mindestens 3-4 Replikaten je Spenderblut. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Zum Nachweis der Signifikanz der Unterschiede beider Versuchsreihen wurde der *student's t-test* verwendet ($n=25$). Die Signifikanz der Unterschiede zweier Testreihen wurde bei

einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als gesichert angenommen. Alle statistischen Berechnungen der Daten erfolgten mit dem IBM-Statistikprogramm SPSS und mit dem Windows Excel Programm. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Windows Excel Programm.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsvorbereitung und Ablauf

2.2.1.1 Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Fibrinogen und mit Fibronectin

Die Mikrotiterplatte (96er-Well Platten, schwarz) wird mit in PBS-Puffer (pH 7,3) verdünnten Fibrinogen- und Fibronectinlösungen in einer Konzentration von jeweils 50 µg/ml nach einem festgelegten und in Tabelle 4 dargestellten Pipettierschema beschickt.

Dazu werden die Wells der Reihen 1, 3, 5 und 7 von A-D mit je 200 µl der Fibrinogenlösung und von E-H mit je 200 µl der Fibronectinlösung befüllt. Eine anschließende komplette Abdeckung mit Alufolie schließt Verunreinigungen aus und sichert den Lichtschutz. Die so präparierte Well Platte wird 1 Stunde bei 37° Celsius inkubiert. Nach der Inkubation wird der am Boden des Wells adhärenierte Fibrinogen- und Fibronectinbelag dreifach mit PBS-Puffer (pH 7,3) gewaschen. Dazu wird nach der Inkubation die überstehende Flüssigkeit in den Wells abgegossen, der Fibrinogen- bzw. Fibronectin-Bodensatz erneut mit PBS-Puffer überschichtet und abgegossen. Die Entfernung von Flüssigkeitsresten geschieht nach jedem der 3 Waschgänge vorsichtig durch sogenanntes „Abklopfen“.

Die beschichteten Wells werden nach der Reinigung mit jeweils 200µl 1%iger BSA-Lösung versetzt, ebenso die bisher noch leeren Wells der Reihen 2, 4, 6 und 8 von A-H als Negativkontrolle. Es erfolgt eine weitere Inkubation für 1 Stunde bei 37° Celsius.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	FG	BSA	FG	BSA	FG	BSA	FG	BSA
B	FG	BSA	FG	BSA	FG	BSA	FG	BSA
C	FG	BSA	FG	BSA	FG	BSA	FG	BSA
D	FG	BSA	FG	BSA	FG	BSA	FG	BSA
E	FN	BSA	FN	BSA	FN	BSA	FN	BSA
F	FN	BSA	FN	BSA	FN	BSA	FN	BSA
G	FN	BSA	FN	BSA	FN	BSA	FN	BSA
H	FN	BSA	FN	BSA	FN	BSA	FN	BSA

Tabelle 4: Pipettierschema Hauptversuch der 96Well Platte

Peptid 1
Peptid 2
FG: Fibrinogen
FN: Fibronectin
BSA: Bovines Serumalbumin

2.2.1.2 Blutentnahme

Für die Experimente wird ausschließlich Blut verwendet, welches homozygot für die Leucin 33 bzw. Prolin 33 Variante des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors ist. Am Versuchstag wird dem jeweiligen Probanden mittels Punktion der Vena mediana cubiti 36 ml Blut verteilt auf 8 Citratröhrchen à 4,5 ml entnommen (siehe 2.1.4).

Durch die Venenpunktion und die daraus resultierende Gefäßläsion wird im Gewebe der Tissue Faktor (Faktor III) freigesetzt. Dieser aktiviert die Gerinnungskaskade (Balasuramian, 2002; Falati, 2002; Saha et al., 2015). Für die Thrombozytenpräparation der geplanten Experimente sind jedoch nur die Thrombozyten verwendbar, die nicht schon im Vorfeld prothrombotisch wirksamen Stoffen ausgesetzt waren. Folglich wird das Erstblut aus dem ersten Citratröhrchen nur zur Bestimmung der Thrombozytenanzahl im Vollblut sowie nach erster Zentrifugation im Plättchenreichen Plasma (PRP) verwendet. Die Thrombozytenanzahl wird an einem Sysmex Messgerät bestimmt.

2.2.1.3 Thrombozytenpräparation

2.2.1.3.1 Thrombozyten-Waschprotokoll

Nach Bestimmung der Anzahl an Thrombozyten im Vollblut des ersten Citratröhrchens werden alle 8 Röhrchen inklusive des ersten 10 min bei 1100 rpm auf Stufe „soft“ (reduziertes Bremsen) in einer Hettich Zentrifuge zentrifugiert. Der PRP-Überstand aller 8 Röhrchen wird mit einer zur Menge des Überstandes passenden 3 ml Messpipette abgenommen und zur Verhinderung einer möglichen vorzeitigen Aktivierung der Thrombozyten an Glas jeweils in Plastikreagenzgläser überführt.

Das PRP von Röhrchen 1 wird separiert und dient jetzt zur Bestimmung der Anzahl an Thrombozyten des PRP am Sysmex. Das PRP der restlichen 7 Röhrchen wird dem weiteren Versuchsprozedere unterworfen. Dazu wird das PRP eines jeden Röhrchens im Verhältnis 1:1 mit PBS-Puffer (pH 6,5) gemischt. Der PRP-Überstand der 7 Röhrchen aller 12 Probanden wies ein Intervall von 1,5-2,2 ml PRP pro Citratröhrchen auf. Die Ausbeute an Thrombozyten der einzelnen Röhrchen eines Patienten zeigte untereinander keine messbaren Unterschiede. Eine zusätzliche Applikation von 20 µl Apyrase unterbindet als Spalter des thrombozytenaktivierenden ADP eine unerwünschte vorzeitige Aktivierung in Form einer Aggregation. Die Lösungen werden nun 6 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Es entsteht ein Sediment aus Thrombozyten, das Pellet. Der Überstand wird verworfen.

Das Pellet wird mit 250 µl Tyrodepuffer und einer Ruhezeit von 20 min resuspendiert. Alle 7 Suspensionen werden zur Bestimmung der Thrombozytenzahl der nun gewaschenen Thrombozyten vereinigt. Zur Bestimmung am Sysmex werden aus der vereinigten Suspension 8 µl mit 112 µl PBS-Puffer (pH 7,3) in einem 1,5 ml Gefäß gemischt. Bei den Vorversuchen hat sich die 1:15 Verdünnung im Hinblick auf die notwendige Thrombozytenanzahl als sinnvoll und zielführend erwiesen. Die ermittelte Thrombozytenanzahl dient als Normierungsgrundlage für spätere Versuchsansätze.

2.2.1.3.2 Thrombozytenfärbung und Peptidzugabe

Im Hinblick auf die Signifikanz der durchzuführenden Fluoreszenzmessungen wurde ebenfalls aufgrund von Vorarbeiten in den jeweiligen Versuchsansätzen mit einer Thrombozytenanzahl von nicht weniger als $50 \times 10^3 / \mu\text{l}$ gearbeitet.

In den einzelnen Versuchsansätzen wird die Thrombozyten-Suspension mit PBS-Puffer (pH 7,3) auf die gewählte Thrombozytenzahl von $50 \times 10^3 /\mu\text{l}$ in einem Gesamtvolumen von 500 μl eingestellt.

Pro Versuchsansatz werden 2 x 500 μl dieser so eingestellten Thrombozyten-suspension benötigt, die in der Folge jeweils in zwei schwarze 1,5 ml Reaktions-gefäße überführt werden.

Initial erfolgt die Applikation von je 1 μl CMFDA-Lösung (5%ig in DMSO) in das jeweilige Reaktionsgefäß. Es schließt sich eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur in einem Rotator an.

Danach erfolgt die Zugabe von 120 μM der Peptide 1 und 2 in PBS-Puffer (pH 7,3) getrennt in jedes Reaktionsgefäß. Die Proben werden erneut 30 min bei Raumtemperatur in dem Rotator bewegt.

2.2.1.4 Thrombozytenadhäsion

Die bereits vorbereitete 96-Well Platte (s. 2.2.1.1) wird nach Inkubation 3-mal mit PBS (pH 7,3) (siehe 2.2.1.1) gewaschen und abgeklopft.

Die einzelnen Versuchsansätze werden jeweils in ein 20 ml lichtundurchlässiges Reaktionsgefäß mit 3,6 ml Tyrodepuffer und 4 μl CaCl_2 (2 M) überführt und sorgfältig durchmischt. CaCl_2 aktiviert Thrombozyten. Der Tyrodepuffer stellt ein adhäsionsfreundliches Milieu dar. Der Inhalt der beiden Proben wird zügig auf die Platte nach dem Schema in Tabelle 4 pipettiert, 200 μl pro Well. Danach wird die Platte mit Alufolie abgedeckt und 30 min im Inkubator bei 37° Celsius inkubiert, um eine adäquate Adhäsion der gefärbten Plättchen an den unterschiedlich beschichteten Wells zu gewährleisten.

2.2.1.5 Messung am Fluoroskan

Um eine Verfälschung (falsch positiv) der Ergebnisse bei der photometrischen Messung am Fluoroskan durch nicht adhärierte Thrombozyten in der Tyrodelösung auszuschließen, werden diese nach der Inkubation durch erneutes und abschließendes Waschen der 96-Well Platte entfernt.

In der Folge werden die Wells jeweils mit 200 μl PBS-Puffer (pH 7,3) aufgefüllt. Die Platte wird in das Gerät eingeführt und der Messvorgang gestartet.

Einstellungen am Fluoroskan:

- Programm: Ascent Software Version 2.6
- Gerät: Fluoroskan Ascent 2.6
- Messungstyp: Scanning
- Aufnahmezeit: 60 ms
- Extinktion: 485 nm
- Emission: 527 nm
- Temperatur: 23,2° Celsius

2.2.2 Darstellung Adhäsionsverhalten mittels Lasermikroskopie

Um das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten der jeweiligen HPA-1-Variante darzustellen, werden zunächst Plättchen entsprechend dem Thrombozyten-Waschprotokoll (s. 2.2.1.3.1) präpariert.

Gleichzeitig zum Waschvorgang werden in der Zwischenzeit vier Doppelkammerobjektträger hälftig mit einer Fibrinogen-Beschichtung und einer BSA-Beschichtung versehen. Zwei Objektträger werden dazu mit je 1 ml Fibrinogenlösung (50 µg/ml), die vier Kammern der beiden restlichen Objektträger mit je 1 ml einer 1 %igen BSA-Lösung beschickt. Alle vier Objektträger werden nun 60 min bei 37°C inkubiert. Danach wird der Überstand aller Objektträger vorsichtig von der entstandenen Beschichtung entfernt. Danach folgt für die beiden mit Fibrinogen beschichteten Objektträger eine weitere halbstündige Inkubation (37°C) mit zusätzlich je 1 ml der 1 %igen BSA-Lösung. Diese zweite Beschichtung dient zur Stabilisierung der Fibrinogen-Beschichtung (vgl. 2.2.4.2). Entsprechend werden Doppelkammerobjektträger mit einer Fibronektinschicht (50 µg/ml) versehen.

Während der Inkubationsvorgänge werden acht 1,5 ml Tubes für einen jeweiligen Versuchsansatz mit einem Gesamtvolumen von 240 µl unterschiedlichen Inhalts vorbereitet. Die Proben 1-4 erhalten $50 \times 10^3/\mu\text{l}$ Thrombozyten der HPA-1a-Variante in PBS (pH 7,3). Davon werden die Proben 1 und 3 mit Peptid 1a beschickt, die Proben 2 und 4 mit dem Wirkpeptid Peptid 2a. Für beide Peptide wird dem Zielexperiment entsprechend, die angepasste Konzentration von 60 µM gewählt.

Deshalb erhalten die Proben 5-8 die gleiche Anzahl der gewaschenen Plättchen der HPA-1b-Variante in PBS (pH 7,3). Die Proben 5 und 7 werden mit Peptid 1a, 6 und 8 werden mit Peptid 2a beschickt.

Die Proben werden zur gleichmäßigen Durchmischung bei Raumtemperatur für 15 min in einem Rotator bewegt. Danach erfolgt die Zugabe von jeweils umgerechnet 1 µg/ml FIAsH-Farbstofflösung und unter Bewegung eine weitere Inkubation von jetzt 45 min ebenfalls bei Raumtemperatur in obigem Rotator (vgl. 2.2.1.3.2). Nach Beendigung der Rotation werden die Inhalte der Versuchsansätze jeweilig getrennt in 20 ml fassende lichtgeschützte Reaktionsgefäße überführt, welche 1,8 ml Tyrodewaschpuffer enthalten (vgl. 2.2.1.4). Entsprechend wird das gleiche Schema für die Versuchsreihe mit Fibronektin verwendet.

Die so erhaltenen Ansätze werden nach erneuter sorgfältiger Durchmischung gemäß des in Tabelle 5 bzw. Tabelle 6 dargestellten Pipettierschemas auf die Kammern verteilt, und zwar je 1 ml pro Kammer und pro Ansatz.

HPA-1a	HPA-1a	HPA-1b	HPA-1b
FG T1	FG T2	FG T5	FG T6
BSA T3	BSA T4	BSA T7	BSA T8

Tabelle 5: Pipettierschema der 4 Chamberslides, Ansatz stat. Adhäsion auf FG

T: Tube
Peptid 1a
Peptid 2a
 BSA: Bovines Serumalbumin
 FG: Fibrinogen
 FN: Fibronektin

HPA-1a	HPA-1a	HPA-1b	HPA-1b
FN T1	FN T2	FN T5	FN T6
BSA T3	BSA T4	BSA T7	BSA T8

Tabelle 6: Pipettierschema der 4 Chamberslides, Ansatz stat. Adhäsion auf FN

T: Tube
Peptid 1a
Peptid 2a
BSA: Bovines Serumalbumin
FG: Fibrinogen
FN: Fibronectin

Nach 30-minütiger Inkubation bei 37° Celsius werden die Überstände abpipettiert. Jede Kammer wird anschließend 3-mal vorsichtig mit PBS-Puffer (pH 7,3) gewaschen, sodass der Belag gleichmäßig und intakt erhalten bleibt.

Nach Entfernung der Kammerwände werden die Objektträger durch das LSM betrachtet und ausgewertet (514 nm Ex., 530-600 nm Em., Argon-Laser).

2.2.3 Vorversuche

2.2.3.1 Bestimmung der Inkubationszeiten von FIAsH und Peptid 1 & 2

Die FIAsH-Färbung ermöglicht in diesen Experimenten die Detektion von Proteinen (bzw. Peptiden) durch spezifische Fluoreszenzmarkierung.

FlasH (Fluorescein Arsenical Hairpin Binder) liegt inaktiv in einem Komplex gebunden an Ethandithiol vor und ist in der Lage, die Zellmembranen inaktiviert zu überwinden. Wird ein Protein/Peptid mit einer Tetracysteinsequenz (CCPGCC) markiert, kann der Fluorophor FIAsH binden und es kommt zur Reaktion. Es entsteht eine grüne Fluoreszenz, die entsprechend am Fluoroskan gemessen und am LSM (Filter eingestellt: 514 nm Ex., 530 - 600 nm Em.) sichtbar gemacht werden kann (Irtegun et al., 2011a). Die molekulare Masse von FIAsH beträgt, im Gegensatz zum etablierten Farbstoff CMFDA mit etwa 0,4 kDa, hier 0,7 kDa (Hoffmann et al., 2010a, 2005).

Initial wurden in Form einer Zeitreihe im Hinblick auf das Fluoreszenzsignal die Inkubationszeiten für FIAsH und Peptid optimiert. Dazu wird das Fluoreszenzsignal von gewaschenen Thrombozyten mittels statischer Adhäsion

auf Fibrinogen und Fibronectin im Vergleich zu einer Negativkontrolle nach unterschiedlichen und gleichzeitigen FIAsH- und Peptidinkubationszeiten bei feststehender Peptid- (60 µM) und FIAsH-Konzentration (1 µg/ml) am Fluoroskan gemessen. Das optimale Zeitfenster zu den angestrebten und aussagekräftigsten Inkubationszeiten für FIAsH und Peptid wurde der Literatur (Dimitriou et al., 2009; Hoffmann et al., 2010) und persönlichen Laborprotokollen mit vergleichbaren Fragestellungen (K. C. Huynh, M. Eberhard) entnommen. Die Inkubationszeiten wurden deshalb mit 5, 15 und 30 min für das Peptid und mit 30, 45 und 60 min für FIAsH entsprechend gesetzt. Insgesamt ergaben sich 9 verschiedene Inkubationsansätze (vgl.Tab.7).

Ansatz	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
t (min)	5/30	5/45	5/60	15/30	15/45	15/60	30/30	30/45	30/60

Tabelle 7: Schema Inkubationsansätze

<p>Peptid 1a FIAsH</p>

2.2.3.2 Nachweis der Peptidinternalisierung mittels FIAsH-Labeling

Die Durchlässigkeit der Thrombozytenmembran für die zwei im Versuch eingesetzten Peptide wird lasermikroskopisch an gewaschenen Thrombozyten untersucht. Diese speziellen Peptide 1a und 2a tragen, wie bereits oben beschrieben, eine zusätzliche Erkennungssequenz für den grün fluoreszierenden Farbstoff FIAsH.

Für das Prozedere ist es wichtig, am Boden der verwendeten Objektträger eine möglichst gleichmäßige und intakte Fibrinogenschicht zu erhalten. Etwaige Fehlstellen werden zur Sicherheit mit Milchpulver (10%ig gelöst in PBS (pH 7,3) geschlossen.

Dazu werden zunächst alle vier Kammern von 2 Doppelkammerobjektträgern (*chamberslides*) mit 1ml einer Fibrinogenlösung (50 µg/ml) beschickt. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei 37°C setzt sich Fibrinogen ab. Der Überstand wird mittels einer Pipette so abgenommen, dass die entstandene Fibrinogenschicht

nicht beschädigt wird. Alle vier Kammern werden nun vorsichtig mit je 1ml Milchpulverlösung (10%ig) zur Schließung potentieller Löcher in der Fibrinogenschicht versehen. Nach einer weiteren Inkubation (37°C) für 30 min wird auch dieser Überstand vorsichtig entfernt.

Während dieser Inkubationsvorgänge werden in der Zwischenzeit vier 1,5 ml-Tubes (Reaktionsgefäße) vorbereitet, davon zwei für eine 5-minütige und zwei für eine 30-minütige Peptidinkubation. Die beiden Ansätze werden synchronisiert, das heißt in der Weise angesetzt, dass beide Ansätze zur gleichen Zeit enden. Im Vorhinein werden dazu die gewaschenen Thrombozyten in PBS (pH 7,3) aufgenommen und jedes der vier Tubes mit $50 \times 10^3 / \mu\text{l}$ Thrombozyten beschickt. Zwei Tubes, eines aus dem 5-minütigen Ansatz (II) und eines aus dem 30-minütigen Ansatz (IV), erhalten zusätzlich $60 \mu\text{M}$ eines Peptids, das die Erkennungssequenz für FIAsH trägt. Die beiden restlichen Tubes (2 und 4) dienen als Negativkontrolle.

Nach dem gleichzeitigen Ende beider Ansätze (30 min und 5 min) werden die Thrombozyten aus Ansatz 1 (5 min) auf die Kammern 1 und 2 eines Objektträgers und die aus Ansatz 2 (30 min) entsprechend auf die Kammern des 2. Objektträgers aufgetragen und durch erneute einstündige Inkubation bei 37°C zur Adhäsion gebracht. Dazu wird Kammer 1 des mit Fibrinogen beschichteten Objektträgers 1 mit 1 ml von Tube 1 befüllt, Kammer 2 mit der reinen Thrombozyten-Suspension aus Tube 2. Der zweite Objektträger wird dementsprechend in der ersten Kammer aus Tube 3 beschickt und in der 2. Kammer aus Tube 4.

Nach Ende der Adhäsionszeit werden die Kammern mit $1000 \mu\text{l}$ FIAsH-Farbstofflösung ($1 \mu\text{g/ml}$) eingefärbt und ein drittes Mal für jetzt 45 min bei 37°C in einer schwarzen lichtgeschützten Box inkubiert. Lichtschutz ist erforderlich, um photoenergetische Wechselwirkungen mit dem stark lichtempfindlichen FIAsH-Farbstoff zu vermeiden.

Nach Abschluss dieser letzten Inkubation werden die Zellen sofort ohne Zeitverlust unter dem Laser-Mikroskop (Ex. 514nm; Argon-Laser) auf Fluoreszenz untersucht.

Die zur Auswertung herangezogene Signalstärke der gemessenen Fluoreszenz wird um das Signal der Hintergrundfluoreszenz durch unspezifische Cysteinbindungen schwacher Selektivität korrigiert. Dies geschieht durch

„Leermessungen“ ohne Peptid nur mit FIAsH markierten Thrombozyten unter gleichen Versuchsbedingungen (Crivat et al., 2011; Stroffekova et al., 2001).

2.2.3.3 Exogene Applikation von N-Ethylmaleinimid (NEM) an FIAsH markierte HEK 293 Zellen

HEK 293 („Human Embryonic Kidney Cells“) wurden im eigenen Institut mit dem $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor transfektiert, der in der α -Untereinheit das sogenannte *cyan fluorescent protein* Gen (CFP) trägt. Deshalb konnte in dieser Vorversuchsreihe direkt auf diese schon etablierte Zellreihe zugegriffen werden.

Initial wurden zwei *chamberslides* zur Beschichtung vorbereitet (vgl. 2.2.2). Ein Objektträger wurde mit Fibrinogen beschichtet (50 $\mu\text{g/ml}$), der andere mit 10%-iger Milchpulverlösung (60 min, 37°C Zellkultur-Inkubator 5% CO_2).

Das gesamte Kulturmedium mit den HEK 293 Zellen einer gefüllten 24-Wellplatte wurde vollständig entnommen und in einem Zentrifugen-Reagenzglas vereinigt, zusätzlich mit der entsprechenden Menge PBS Puffer (pH 7,3) aufgefüllt und anschließend 7 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und der Zelniederschlag in einem Milliliter PBS erneut wieder aufgenommen.

Jeweils 100 μl der gewonnenen Zellsuspension wurde für Ansatz 1 ohne NEM auf zwei schwarze 1,5 ml Gefäße (1 und 3) verteilt und mit FIAsH Farbstoff (1 $\mu\text{g/ml}$) und Peptid 1a (30 μM) versetzt. Die restliche Zellsuspension wurde für den zweiten Ansatz mit 2 mM NEM versetzt und auf einem Rotator bewegt. Danach erfolgte die Zugabe von einem Milliliter PBS (pH 7,3) mit einer erneuten sich anschließenden Zentrifugation (7 min, 1100 rpm). Der Überstand wurde wieder verworfen und die Zellen jetzt in 600 μl PBS-Puffer aufgenommen. Je 100 μl dieser mit NEM versetzten Zellsuspension wurden auf die Reaktionsgefäße 2 und 4 verteilt und mit FIAsH Farbstoff (1 $\mu\text{g/ml}$) und Peptid 1a (30 μM) beschickt.

Beide Ansätze wurden anschließend für mindestens 120 min auf einem Rotator bei 37°C bewegt.

Im Anschluss wurden 20 μl von Reaktionsgefäß 1 (Ansatz ohne NEM) und 2 (Ansatz mit NEM) auf jeweils eine Kammer des ersten, mit Fibrinogen beschichteten Objektträgers aufgetragen.

Dementsprechend wurden 20 µl von Reaktionsgefäß 3 in Kammer 1 des mit Milchpulver beschichteten Objektträgers und 20 µl von Reaktionsgefäß 4 in Kammer 2 aufgetragen. Nach 2 min wurden die Kammerwände vorsichtig entfernt und der Zellbereich mit einem Deckgläschen versehen. Die Objektträger wurden, so präpariert, umgehend am LSM betrachtet und ausgewertet (514 nm Ex., 530-600 Em., Argon- Laser).

2.2.3.4 Aggregometrie zur Bestimmung der Peptidkonzentration

2.2.3.4.1 Messprinzip

Zur Bestimmung der effektivsten Peptidkonzentration für den Hauptversuch wurde das Prinzip der Aggregometrie verwendet. Mit Hilfe eines Zweikanal-Aggregometers wurde zweimal turbidimetrisch der jeweils thrombozytäre Gestaltwandel („shape change“) für die HPA-1a und HPA-1b Variante, die Zeitspanne zu dessen Beginn („lagtime“) und die unmittelbar folgende Thrombozytenaggregation im PRP bestimmt. Es handelt sich um eine photometrische Messmethode, bei der die Veränderung der Lichttransmission gemessen wird. Das Prinzip beruht auf einem durch das PRP tretenden Lichtstrahl, der anschließend auf eine Photozelle auftrifft. Ein angeschlossener optischer Schreiber dokumentiert in Schritt eins die Basaloszillation. Diese entsteht dadurch, dass die Suspension diskoider Thrombozyten kontinuierlich durch einen Rührstab gerührt wird. Nach Zugabe eines Thrombozyten-Agonisten in Schritt zwei nimmt die Lichttransmission als Maß für den thrombozytären Gestaltwandel zunächst ab. Als Agonisten dienen hier Epinephrin (5 µM), ADP (5 µM), fibrilläres Kollagen (10 µM/ml) und Arachidonsäure (0,5 mM). Dann aber steigt die Lichttransmission durch Abnahme der optischen Dichte an einzelnen korpuskulären Teilchen infolge von Aggregatbildung wieder an. Die weiter fortschreitende Aggregation führt letztendlich zu einer Blockade des Magnetrührstabs und zu einem sich dann nicht mehr verändernden gleichbleibend höchsten Transmissionswert. Diese beschriebene Änderung der Lichttransmission (y-Achse) wird im zeitlichen Verlauf (x-Achse) oszillographisch in Form einer Kurve für den jeweiligen Agonisten aufgezeichnet.

Das Messergebnis aller Agonisten (Arachidonsäure)-Durchläufe wird in dieser Arbeit in Form einer Dosis-Wirkungs-Kurve dargestellt. Es wird die Lichttransmission als Maß für die Aggregation in %, bezogen auf eine Leermessung mit

NaCl auf der y-Achse als Endpunktmessung, gegen die verschiedenen Peptidkonzentrationen auf der x-Achse aufgetragen.

2.3.3.4.2 Durchführung

Initial wurde eine Konzentrationsreihe der Peptide in PRP hergestellt. Die Anzahl an Thrombozyten in jedem Ansatz betrug $2,5 \times 10^5 / \mu\text{l}$. Die Peptide wurden bei Raumtemperatur in den jeweiligen Konzentrationsansätzen 30 min lang inkubiert. Insgesamt wurden zur Bestimmung der optimalen Peptidkonzentration für die jeweilige Genvariante 13 Versuchsansätze erstellt, jeweils 6 unterschiedliche Konzentrationen für die 2 Peptide zuzüglich einer Leerprobe. Jeder Versuch wurde 3-mal durchgeführt. Versuchsansatz 1 (Leerprobe) diente der Negativkontrolle ohne Peptidzugabe. Versuchsansatz 2 und 3 enthielten eine Peptidkonzentration von 90 μM . Die PRP-Suspension 2 wurde mit Peptid 1, die Suspension 3 mit Peptid 2 beschickt. Nach dem gleichen Prinzip wurden nun die anderen Ansätze hergestellt. Ansatz 4 (Peptid 1) und Ansatz 5 (Peptid 2) enthielten jeweils 120 μM , die Ansätze 6 (Peptid 1) und 7 (Peptid 2) 240 μM . Nach dem gleichen Prinzip wurden die anderen Ansätze vorbereitet. So wurden im letzten Schritt die Suspensionen 12 (Peptid 1) und 13 (Peptid 2) mit 600 μM Peptid beschickt.

Danach wurden jeweils die verschiedenen Ansätze für 10 min gemessen. Es wurden 4 Küvetten (Vol. 200 μl) mit 196 μl der jeweiligen Thrombozyten-Suspension luftblasenfrei befüllt. Nach Zugabe von 4 μl des jeweiligen Agonisten in eines der 4 Gefäße wurden die Messungen gestartet (modifiziert: Labor Gerinnung UKD Routine).

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Nachweis der Peptidpenetration in die Thrombozyten

Vor Beginn der Untersuchungen muss sichergestellt sein, dass die exogen applizierten Peptide in dem vorgegebenen Experimentalmilieu tatsächlich die Thrombozytenmembran passieren können und in das Zellinnere gelangen.

Wie schon an anderer Stelle erwähnt, erlaubt die FLAsH-Methode u.a. Rückschlüsse auf einen vom Zelläußeren durch die Zellmembran zum Zellinneren erfolgten Proteintransport durch Detektion von spezifischen Peptiden und Proteinen, die eine Erkennungssequenz für die Bindung von FLAsH tragen. Wird ein Protein mit dieser Peptidsequenz markiert, kann es sich an den Fluorophor FLAsH binden. Es entsteht eine grüne Fluoreszenz, die entsprechend am Lasermikroskop (LSM) sichtbar gemacht werden kann (514nm Ex., 530- 600 nm Em.).

Zur Validierung und Abstimmung der Versuchsparameter wurde eine Zeitreihe erarbeitet zur Bestimmung der im Hinblick auf das Fluoreszenzsignal am besten geeigneten Inkubationszeiten für Peptid und FLAsH (vgl. 2.2.3.1). Dazu wurden neun unterschiedliche Inkubationsansätze gleicher Konzentration, aber mit jeweils wechselnden Inkubationszeiten für Peptid und FLAsH gefahren. Die Peptidkonzentration wurde auf 60 μM festgelegt (Dimitriou et al., 2009), die des Farbstoffs auf 1 $\mu\text{g/ml}$ und die Thrombozytenzahl auf $50 \times 10^3/\mu\text{l}$ eingestellt. Die gewählten Grenzen der Inkubationszeiten für FLAsH und Peptid wurden der Literatur entnommen (Hoffmann et al., 2010; Stroffekova et al., 2001).

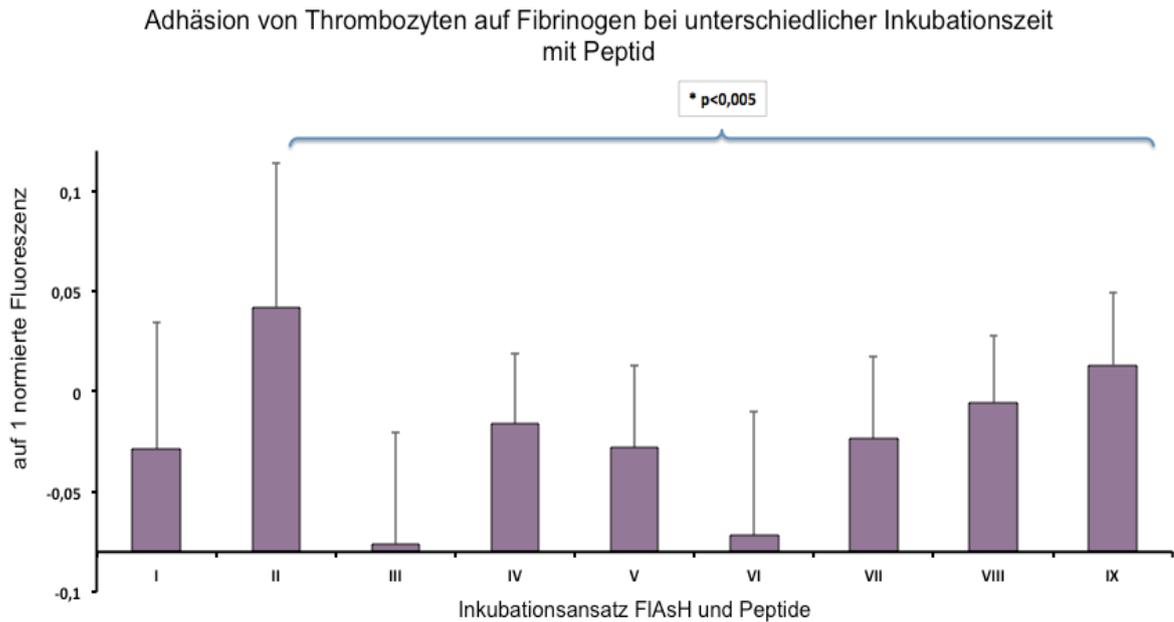


Abb. 3: Adhäsion von Thrombozyten auf FG bei unterschiedlicher Inkubationszeit mit Peptid

Statische Adhäsion auf FG (50 $\mu\text{M}/\text{ml}$) von Peptid 1a (60 μM) und FIAsH (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelten Thrombozyten in unterschiedlichen Inkubationsansätzen. X-Achse Inkubationsansätze I- IX (vgl. Tabelle 7); y-Achse relative Fluoreszenz, $p < 0,05^*$; $n = 8$, gemessen am Fluoroskan

Die Ergebnisse dieses Protokolls sind in Abbildung 3 dargestellt.

Sie belegen für Ansatz II (Peptid 5 Minuten / FIAsH 45 Minuten) und für Ansatz IX (Peptid 30 Minuten / FIAsH 60 Minuten) positive relative Fluoreszenzen. Der Wert der relativen Fluoreszenz stellt ein Maß für die Adhäsion der Zellen dar, je höher dieser ist, desto mehr Zellen sind adhären und desto mehr Zellen haben in diesem Fall das Peptid aufgenommen. Die Inkubationszeiten aus den Ansätzen II und IX stehen in dem vorgegebenen Experimentalansatz für die größte Anzahl adhärenter Zellen. Eine ausreichend hohe Fluoreszenz innerhalb der Thrombozyten lässt auf eine Internalisierung des Peptids schließen, eine Grundvoraussetzung des Ziel-experiments. Negative relative Fluoreszenz ergab sich hier durch stark divergierende Rohwerte im Vergleich zur Negativkontrolle. Auf der Grundlage des Inkubationsprotokolls wurden deshalb gemäß Ansatz II und IX behandelte Thrombozyten zur weiteren Auswertung unter dem Lasermikroskop der Reihe nach betrachtet. Die folgenden Bilder zeigen exemplarisch Thrombozyten des Ansatzes IX (vgl. FIAsH Methodik).

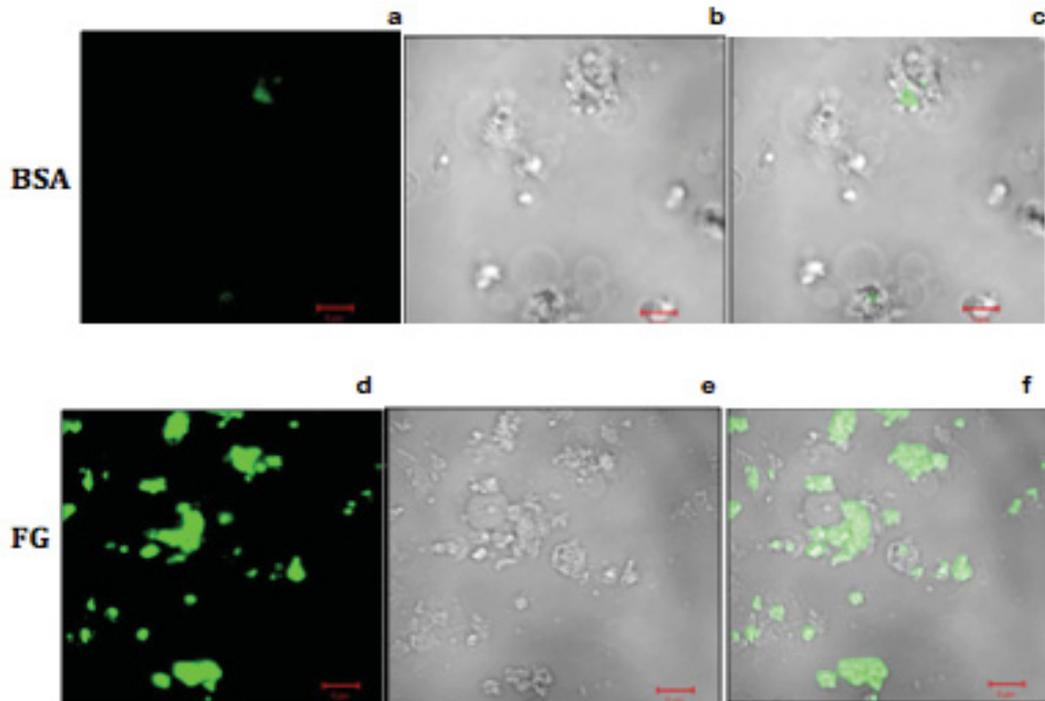


Abb. 4: Adhärenente FIASH-markierte Thrombozyten nach Behandlung gemäß Ansatz IX

Lasermikroskopische Aufnahmen von FIASH (1 $\mu\text{g/ml}$) gefärbten und mit Peptid 1a (60 μM) inkubierten Thrombozyten auf BSA (a-c) und auf FG (d-f) (Ansatz IX: 30min Peptid/60min FIASH); (LSM 51, 100fach) a,d -> Laser („laser“); b,e -> Durchlicht („phase“); c,f ->Überlagerung („meshed“)

Abbildung 4 zeigt repräsentativ eine Bildserie gewaschener Thrombozyten auf einem mit Fibrinogen (50 $\mu\text{g/ml}$) (d-f) beschichteten Deckgläschen. Die Thrombozyten sind adhärenent und weisen in der Art ihrer Ausbreitung und Anheftung ein sogenanntes *spreading* auf.

Bilder a-c zeigen, als Negativkontrolle, gefärbte Thrombozyten auf BSA. Es ist keine signifikante Fluoreszenz auszumachen. Auf den Bildern d und f hingegen sieht man eine deutliche Fluoreszenz der mit Peptid 1a inkubierten Zellen. Im Überlagerungsbild f erkennt man eine signifikante Fluoreszenz innerhalb der Thrombozyten. Gemäß Ansatz II behandelte Thrombozyten zeigten sich hinsichtlich ihrer Fluoreszenz für diesen experimentalen Ansatz nicht stabil signifikant.

Für das Zielexperiment wurde deshalb letztendlich die Peptidinkubationszeit auf 30 min (Ansatz IX) festgesetzt. Die hohe Fluoreszenz aus Ansatz II (Peptid 5 min) könnte möglicherweise u.a. durch eine bereits extrazellulär erfolgte Reaktion zwischen FIASH und an der Thrombozytenoberfläche gebundenes Peptid, welches nicht durch Waschvorgänge entfernt worden ist, entstanden sein. Grundsätzlich

verbessert die geeignetere längere Inkubationszeit von Ansatz IX die Signifikanz der Auswertung, indem sie einer größeren auswertbaren Menge an Peptid den Eintritt in die Thrombozyten ermöglicht.

3.1.2 Einfluss der Applikation von NEM auf die Hintergrundfluoreszenz von FIAsh

Es ist bekannt, dass FIAsh sich unter bestimmten Umständen auch an andere Cysteinstrukturen, unter anderem an der Zellmembran, hier allerdings unspezifisch mit geringerer Affinität, binden kann (Stroffekova et al., 2001). Deshalb wurden unter gleichen Versuchsbedingungen an institutseigenen HEK 293 Zellen (vgl. 2.2.3.3) weitere LSM-Bilder unter zusätzlicher Applikation eines von Maleinsäure abgeleiteten Imids, des N-Ethylmaleinimids (NEM), angefertigt. NEM reagiert bei pH-Werten von 6,5 bis 7,5 spontan mit Sulfhydrylgruppen. Die Applikation von NEM soll in diesem Experiment vorhandene Cysteingruppen blockieren, die neben der sicheren und gewünschten Peptid-FIAsh-Fluoreszenz zusätzlich mit FIAsh interagieren könnten.

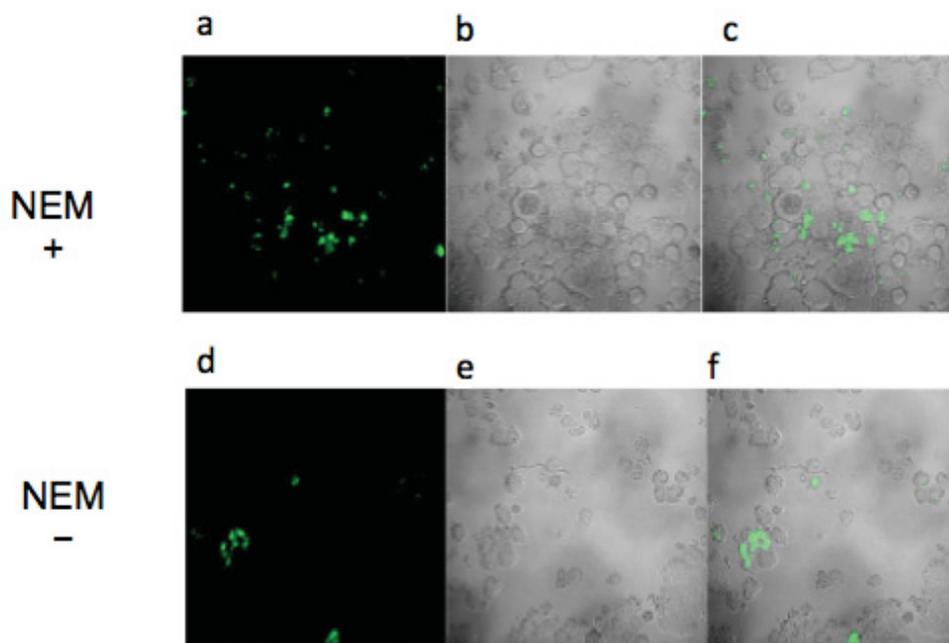


Abb. 5: Lasermikroskopische Darstellung von FIAsh gefärbten HEK 293 Zellen mit bzw. ohne vorheriger NEM Inkubation

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von FIAsh (1 µg/ml) gefärbten HEK 293 Zellen: Bilder a-c mit NEM (2 mM) Inkubation, Bilder d-f ohne NEM Inkubation (LSM 510, 40fach); Bilder a, d -> *laser*; Bilder b, e -> *phase*; Bilder c, f -> *meshed*

Die Bilder a-c in Abbildung 5 zeigen, dass unter den gewählten Experimentalbedingungen die mit NEM behandelten HEK 293 Zellen eine intra- und extrazelluläre Fluoreszenz aufweisen. Darüberhinaus sind die Signale hier außerhalb der Zellen deutlicher als innerhalb. Die Bilder d-f dagegen zeigen eine nahezu vollständige intrazelluläre Fluoreszenz.

Diese Beobachtung lässt zunächst den Schluss zu, dass es mit Blockierung der Cysteingruppen durch NEM neben der spezifischen Bindung an das Peptid auch zu einer zusätzlichen unspezifischen Bindung kommt.

Ohne Behandlung mit NEM sind in den Bildern d-f dagegen die Signale sogar extrazellulär fast verschwunden und weit stärker auf das Zellinnere beschränkt. Trotz fehlender Blockierung freier Cysteinmotive an der intra-, aber vor allem an der extrazellulären Seite der Zellmembran, bleibt dennoch eine stärkere Fluoreszenzantwort durch FIAsH bestehen (a-c).

Dieses Ergebnis sichert den geforderten Nachweis ab, dass die Peptide die Zellwand penetrieren und FIAsH die intrazelluläre Lage von Peptiden ohne eine zusätzliche Blockierung von Störfaktoren adäquat detektieren kann. Eine störende „Fremdfluoreszenz“ durch Bindung von FIAsH an andere Cysteinstrukturen ist demnach vernachlässigbar gering. Somit ist mit den Ergebnissen der geschilderten Voruntersuchungen (vgl. Abb. 3 & 4) eine grundsätzliche Voraussetzung für das Hauptexperiment gegeben. Das Versuchsprotokoll zur lasermikroskopischen Darstellung der statischen Adhäsion von FIAsH gefärbten Thrombozyten muss nicht durch eine vorangegangene NEM Behandlung ergänzt werden.

3.1.3 Ermittlung der geeignetsten Peptidkonzentration mittels Aggregometrie

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen die Ergebnisse als Dosis-Wirkungskurven für die HPA-1a-Variante (vgl. Abb. 6) und für die HPA-1b-Variante (vgl. Abb. 7). Dabei sind auf der x-Achse die verwendeten Peptidkonzentrationen in μM gegen die Aggregationsleistung (Endpunkte) auf der y-Achse aufgetragen. Gemessen wurde jeweils die maximale Veränderung der Lichttransmission in % am Aggregometer nach 10-minütiger Versuchsdauer. Den zur Auswertung herangezogenen Messwerten lag ein Mittelwert aus jeweils drei Messungen pro Thrombozyten-Variante zugrunde. Die verwendete Thrombozytenzahl im PRP betrug dabei $250 \times 10^3/\mu\text{l}$.

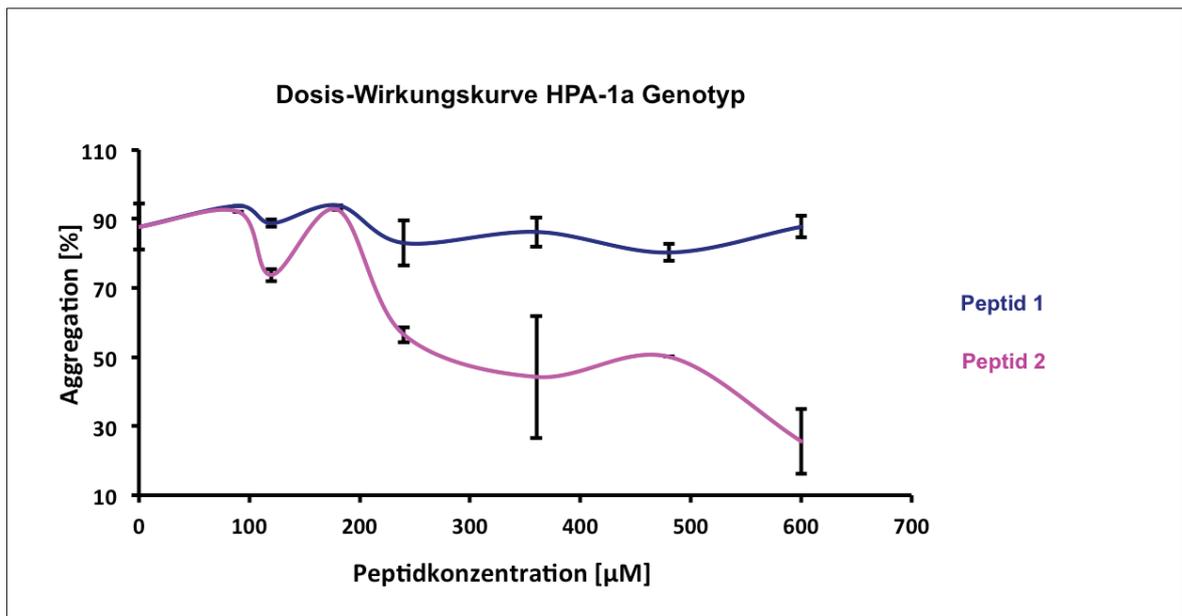


Abb. 6: Dosis-Wirkungs-Kurve β_3 -mimetischer Peptide bei der HPA-1a-abhängigen Thrombozytenaggregation

Dargestellt ist die maximale Lichttransmission als Aggregationsleistung (%) am Aggregometer (Endpunktmessung) von Thrombozyten der HPA-1a-Variante in PRP ($250 \times 10^3/\mu\text{l}$) nach Applikation von Peptid 1 (blaue Kurve) und Peptid 2 (rosa Kurve) in unterschiedlichen Konzentrationen (x-Achse); n=3 unabhängige Ansätze, $p < 0,05^*$

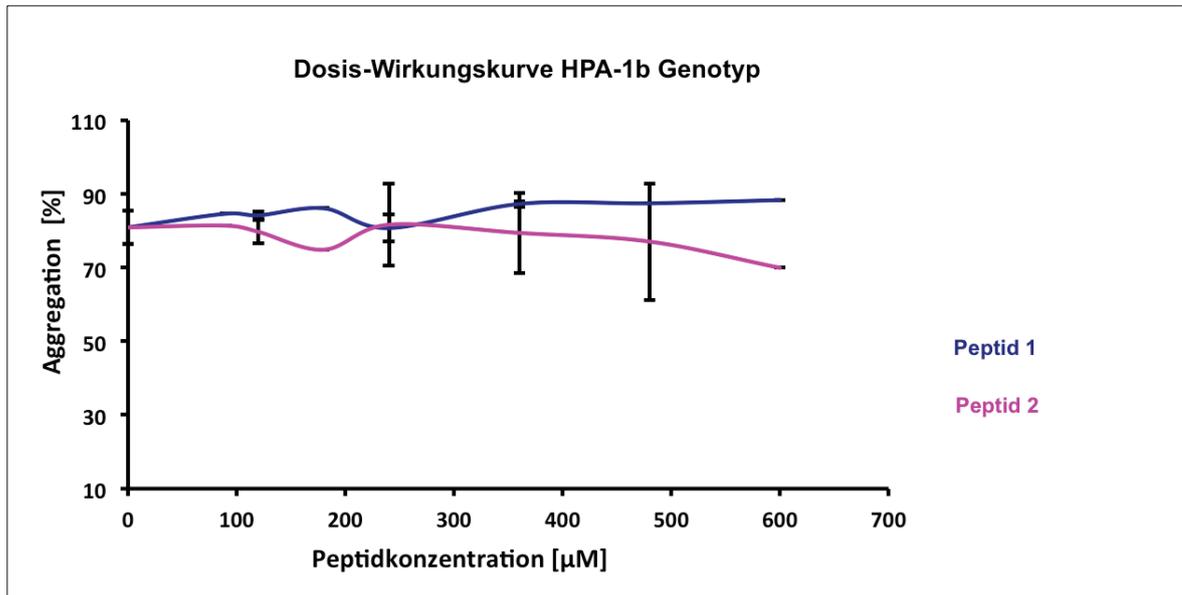


Abb. 7: Dosis-Wirkungs-Kurve β_3 -mimetischer Peptide bei der HPA-1b-abhängigen Thrombozytenaggregation

Dargestellt ist die maximale Lichttransmission als Aggregationsleistung (%) am Aggregometer (Endpunktmessung) von Thrombozyten der HPA-1b-Variante in PRP ($250 \times 10^3/\mu\text{l}$) nach Applikation von Peptid 1 (blaue Kurve) und Peptid 2 (rosa Kurve) in unterschiedlichen Konzentrationen (x-Achse); n=3 unabhängige Ansätze, $p < 0,05^*$

In beiden Diagrammen zeigen die Kurvenverläufe in rosa die Ergebnisse für das β_3 -mimetische Peptid, das die Bindungsstelle für Kindlin-3 abbildet (P2/ Wirkpeptid), die blauen Kurvenverläufe die jeweiligen Ergebnisse für das Kontrollpeptid (P1/ Peptid nur mit Tat-Sequenz).

Beide Genvarianten weisen im Rahmen der Messgenauigkeit (vgl. Abb. 6 & 7, blau) für das Kontrollpeptid mit einem Mittelwert von $84 \pm 6\%$ annähernd gleiche Aggregationswerte auf. Sie zeigen sich dabei unabhängig von den in den Versuchsbedingungen gewählten Konzentrationen.

Ein völlig unterschiedliches Aggregationsverhalten zeigen die beiden Genvarianten jedoch in den Inkubationsversuchen mit dem Wirkpeptid. Abbildung 6 mit den Dosis-Wirkungskurven für den HPA-1a-Genotyp weist folgendes deutliches Ergebnis auf. Ausgehend von einem gleich hohen Aggregationsniveau von $84 \pm 6\%$ für Wirk- und Kontrollpeptid nimmt die Aggregation mit steigender Konzentration des Wirkpeptids um mehr als 50% ab und erreicht bei der größten Wirkpeptidkonzentration ($600 \mu\text{M}$) einen Aggregationswert von unter 30%. Dagegen lässt sich aus Abbildung 7 mit Dosis-Wirkungs-Kurven für den HPA-1b-Genotyp entnehmen, dass die Aggregationswerte mit steigender Konzentration des Wirkpeptids nur gering um maximal 10% abnehmen ($600 \mu\text{M}$).

Die Analyse der Dosis-Wirkungskurve aus Abbildung 6 zeigt neben dem auswertbaren Verlauf der einzelnen Kurven deutlich den bei $360 \mu\text{M}$ vorherrschenden größten Einfluss der applizierten Peptide auf das Aggregationsverhalten beider Varianten. Bei Peptidkonzentrationen um $120 \mu\text{M}$ fand sich kein signifikanter Unterschied von Thrombozyten beider Genvarianten untereinander. Deshalb wurde für die weiterführenden Experimente, bezogen auf eine Thrombozytenzahl von $250 \times 10^3/\mu\text{l}$, die Konzentration von $360 \mu\text{M}$ gewählt. Ob die Schwankungen der Kindlin-3 HPA-1a-Kurve ($\pm 10\%$) für die ersten drei Konzentrationen ($90 - 120 - 180 \mu\text{M}$) zusätzliche Deutungsrelevanz besitzen oder in die Messtoleranz der Versuchsbedingungen fallen, kann allein durch diese Versuchsreihe nicht entschieden werden.

Die Klärung der Frage ändert jedoch nichts an dem grundsätzlich sicheren Ergebnis, dass die Thrombozyten-Aggregation nach Applikation des Wirkpeptids (β_3 -mimetisches Peptid für Kindlin-3 Bindungsstelle) für die in der Literatur als unauffällig eingestufte Genvariante HPA-1a abnimmt, während sie für die Variante

HPA-1b unabhängig von den gewählten Peptidkonzentrationen auf dem Anfangsniveau verbleibt.

3.2 Hauptversuch

3.2.1 Statische Adhäsion von Thrombozyten des Leu33/Pro33-Polymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ nach Applikation β_3 -mimetischer Peptide

Dargestellt ist jeweils das auf 1 normierte und am Fluoroskan gemessene Fluoreszenzsignal (y-Achse) adhärenter, mit Peptid 1 (Kontrollpeptid) und mit Peptid 2 (Wirkpeptid) vorbehandelter Thrombozyten. Detektionsfarbstoff ist CMFDA. Abbildung 8 zeigt das normierte Fluoreszenzsignal in Form eines Balkendiagramms als Maß der statischen Adhäsion auf Fibrinogen, Abbildung 9 das entsprechende Signal auf Fibronectin. Die Angabe der relativen Fluoreszenz reduziert die interindividuelle Variation der Rohwerte.

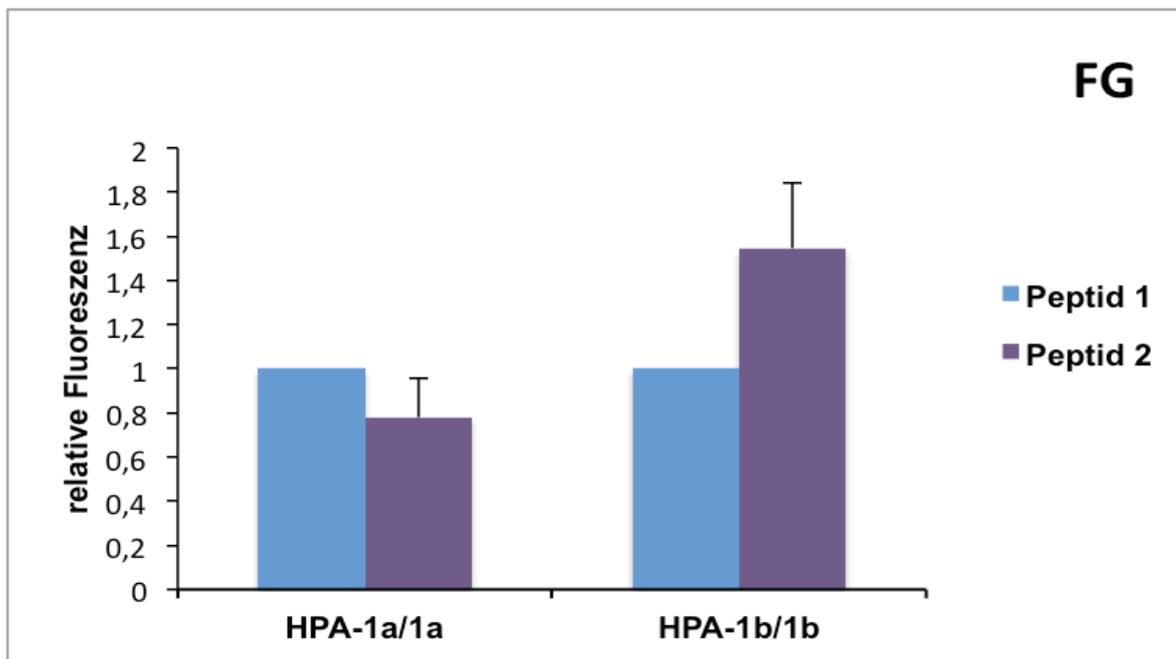


Abb. 8: Statische Adhäsion auf Fibrinogen (Zieluntersuchung)

Relative Fluoreszenz gegen Peptid 1 (auf 1) normiert als Maß der statischen Adhäsion. CMFDA markierte Thrombozyten wurden nach vorheriger Inkubation mit Peptid 1 (blauer Balken) bzw. Peptid 2 (lila Balken) (c:120 μ M) auf FG (50 μ g/ml) zur Adhäsion gebracht. Biol. Variabilität n=6; $p < 0,05^*$; gemessen am Fluoroskan

Die Ergebnisse, die in Abbildung 8 dargestellt sind, lassen folgende Aussagen zu. Das erste und augenfälligste Ergebnis ist der deutliche Unterschied, den die beiden Varianten des HPA-1-Polymorphismus nach Applikation des β_3 -mimetischen Peptids für die Bindungsstelle von Kindlin-3 zeigen. Die statische

Thrombozytenadhäsion der HPA-1a-Variante nimmt unter Kindlin-3 gegenüber dem Kontrollpeptid (P1/Tat-Sequenz) mit einer Reduktion um 22% deutlich ab, und zwar für beide Liganden genau gleich.

Die Adhäsion der HPA-1b-Variante nimmt im Gegensatz dazu nicht ab, sondern mit einer Steigerungsrate von über 50% (FG) noch deutlicher zu.

Die Thrombozyten beider Varianten reagieren also völlig gegensätzlich. Allerdings zeigen die Liganden der HPA-1b-Variante im Unterschied zu exakt gleichen Reduktionswerten (-22%) der Liganden der HPA-1a-Variante statistisch signifikante unterschiedliche Steigerungsraten, und zwar auf Werte von 130% für

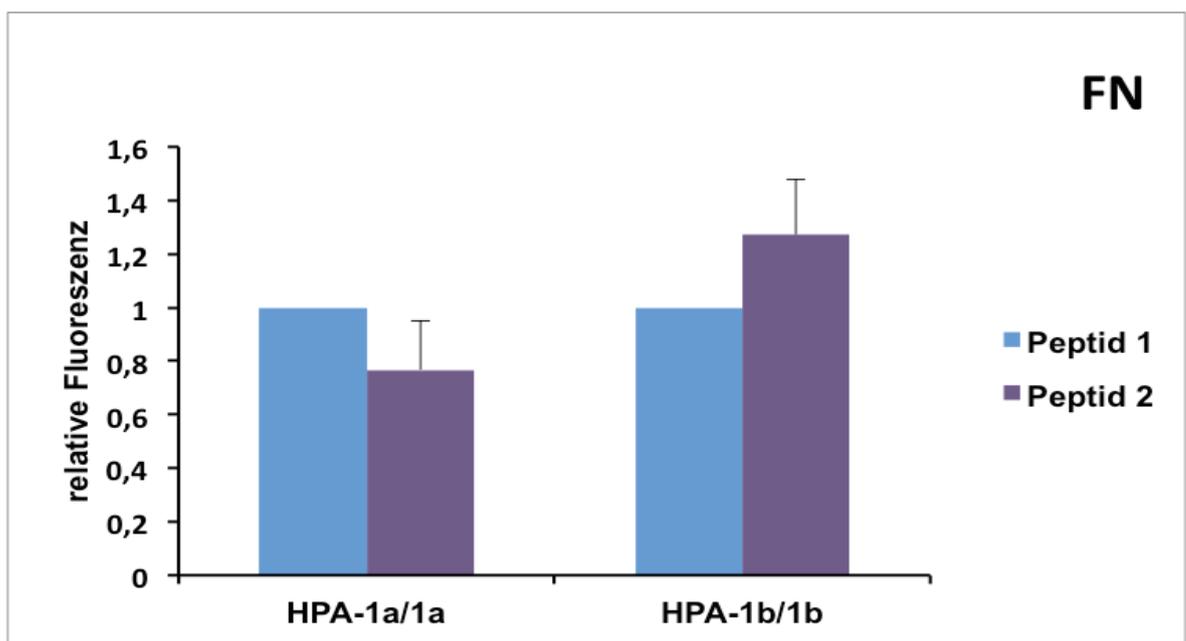


Abb. 9: Statische Adhäsion auf Fibronectin (Zieluntersuchung)

Relative Fluoreszenz gegen Peptid 1 (auf 1) normiert als Maß der statischen Adhäsion. CMFDA markierte Thrombozyten wurden nach vorheriger Inkubation mit Peptid 1 (blauer Balken) bzw. Peptid 2 (lila Balken) (c:120 μ M) auf FN (50 μ g/ml) zur Adhäsion gebracht. Biol. Variabilität n=6; $p < 0,05^*$; gemessen am Fluoroskan

Fibronectin und 156% für Fibrinogen. Die gemessenen Werte werfen zu beantwortende Fragen auf, die die Wirkfähigkeit von Kindlin-3 bei Thrombozyten der HPA-1b-Variante und ihrem möglicherweise prothrombotischen Charakter betreffen.

Die Signifikanz, die den dargestellten Ergebnissen zu Grunde liegt, erlaubt deshalb eine umfassende Diskussion über Umfang und Richtung zukünftiger Untersuchungen. Gleiche Tendenzen finden sich bereits bei den vorangegangenen Messungen am Aggregometer (vgl. 3.1.3).

3.2.2 Lasermikroskopie

3.2.2.1 Lasermikroskopische Darstellung von Thrombozyten nach Peptidbehandlung auf BSA

Neben quantitativer Auswertung der Fluoreszenz in unseren Versuchen zur statischen Adhäsion erfolgte im folgenden Schritt die lasermikroskopische Darstellung des Adhäsionsverhaltens von mit Peptid behandelten Thrombozyten beider Genvarianten auf den Liganden Fibrinogen, Fibronektin und BSA (Negativkontrolle). Die Bildblöcke stehen repräsentativ für eine selektive Auswahl an lasermikroskopischen Bildern. In ihrer Gesamtheit unterstützen die Bilder nach Auswertung das Ergebnis des Zielexperiments.

Gewaschene Thrombozyten wurden diesbezüglich (vgl. 2.2.2) mit dem jeweiligen Peptid (1a: Block 1, 3 & 5) (2a: Block 2, 4, & 6) und FIAsH (1 µg/ml) inkubiert und auf den o.g. Liganden zur Adhäsion gebracht.

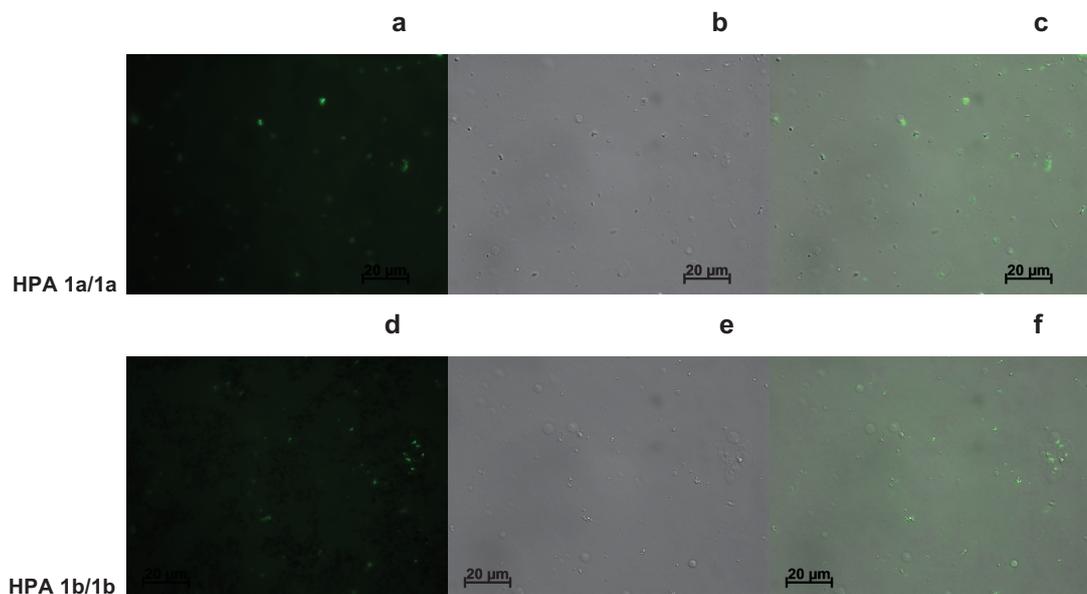


Abb. 10: Block 1 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten nach Applikation von Peptid 1a auf BSA, Negativkontrolle

Lasermikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion auf BSA (Negativkontrolle) gewaschener Thrombozyten nach Applikation von Peptid 1a (120 µM) und FIAsH (1 µg/ml) Inkubation. (Argon-Laser ERC 5s, 50fach) a,b->laser; b,e-> phase; c,f->meshed

Die Bildreihe der Blöcke 1 und 2 dienen als Negativkontrolle. Thrombozyten sollen hier kein der Natur angenähertes Milieu für eine adäquate Adhäsion vorfinden (vgl. Methodik). In der Zusammenschau von Block 1 und 2 finden sich erwartungsgemäß lediglich vereinzelte adhärenente, aber noch abgerundete Zellen, die kein *spreading* aufweisen (a-l).

Die höhere beobachtete Anzahl an adhäsiven Thrombozyten der HPA-1b-Variante in Block 1 (d-f) könnte bereits hier auf den generell prothrombotischen Charakter hinweisen.

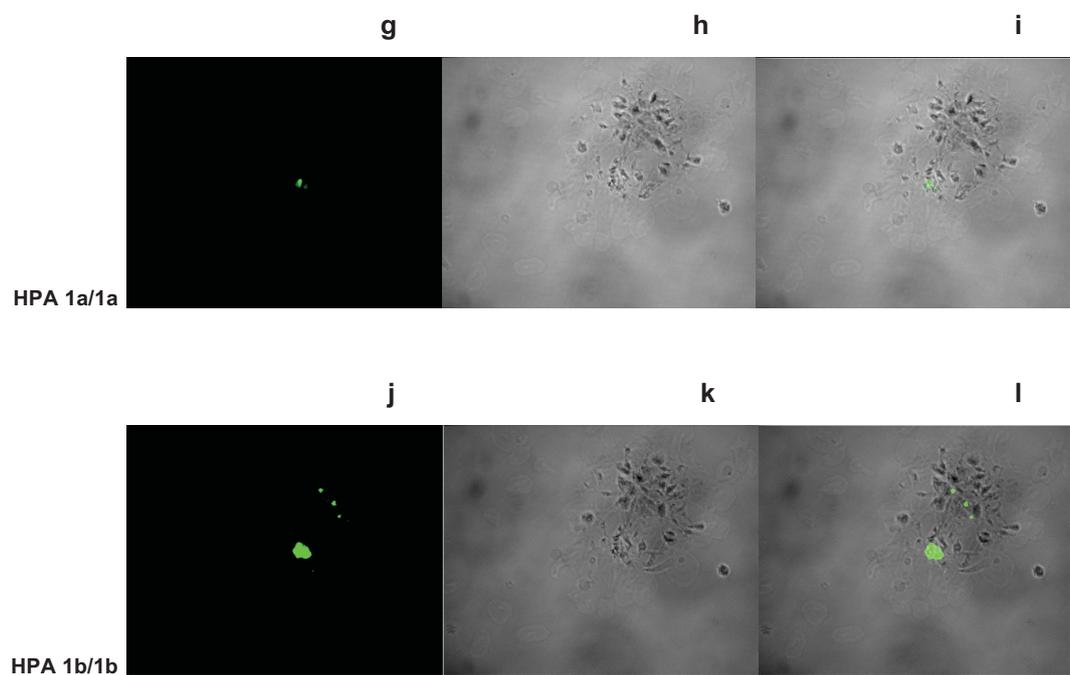


Abb. 11: Block 2 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten nach Applikation von Peptid 2a auf BSA, Negativkontrolle

Lasermikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion auf BSA (Negativkontrolle) gewaschener Thrombozyten nach Applikation von Peptid 2a (120 μ M) und FIAsH (1 μ g/ml) Inkubation. (Argon-Laser ERC 5s, 50fach) g,j-> *laser*; h,k-> *phase*; i,l-> *meshed*

3.2.2.2 Lasermikroskopische Darstellung von Thrombozyten nach Peptidbehandlung auf FG

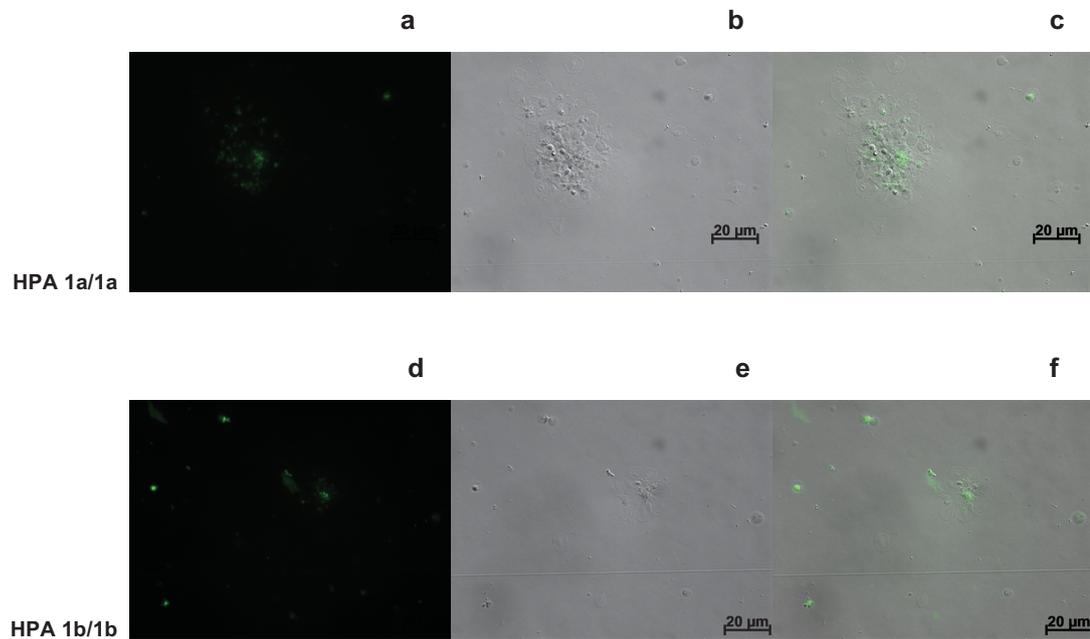


Abb. 12: Block 3 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten nach Applikation von Peptid 1a auf FG

Lasermikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion auf Fibrinogen (50 µg/ml) gewaschener Thrombozyten nach Applikation von Peptid 1a (120 µM) und FIASH (1 µg/ml) Inkubation. (Argon-Laser ERC 5s, 50fach) a,b->laser; b,e-phase; c,f->meshed

Block 3 (Abb. 12) zeigt mit dem Kontrollpeptid (Peptid mit Tat-Sequenz) behandelte Thrombozyten auf mit Fibrinogen (50 µg/ml) beschichtetem Untergrund, Block 4 (Abb.13) dementsprechend die statische Adhäsion für Thrombozyten, die mit dem β_3 -mimetischen Peptid für die Bindungsstelle von Kindlin-3 vorbehandelt wurden. Im Vergleich zur Negativkontrolle ist vor allem in Block 4 ein deutliches *spreading* zu erkennen.

Im Vergleich zwischen Thrombozyten beider Genvarianten nach P1-Behandlung (Block 3) findet sich eine annähernd gleiche Fluoreszenz und keine verstärkte Adhäsion im Durchlicht. Das Kontrollpeptid hat auf Zellen beider Varianten keinen sichtbaren Einfluss.

Vergleicht man jedoch das Adhäsionsverhalten von Zellen einer Genvariante untereinander (a-c vs. g-i/ d-f vs. j-l), so fällt ein deutlicher Unterschied auf. Block 4 (Abb. 13) zeigt eine generell höhere Adhäsion für beide Genvarianten bei

Thrombozyten nach Inkubation mit Peptid 2a. Bei der HPA-1-a-Variante (g) ist eine geringere Fluoreszenz zu erkennen als bei der HPA-1b-Variante (j). Im Durchlicht (h) finden sich sichtbar weniger adhärenente Zellen. Die Thrombozyten der HPA-1b-Variante (j) zeigen größere Fluoreszenz auf Fibrinogen und damit die verstärkte Adhäsion nach Internalisierung des Peptids.

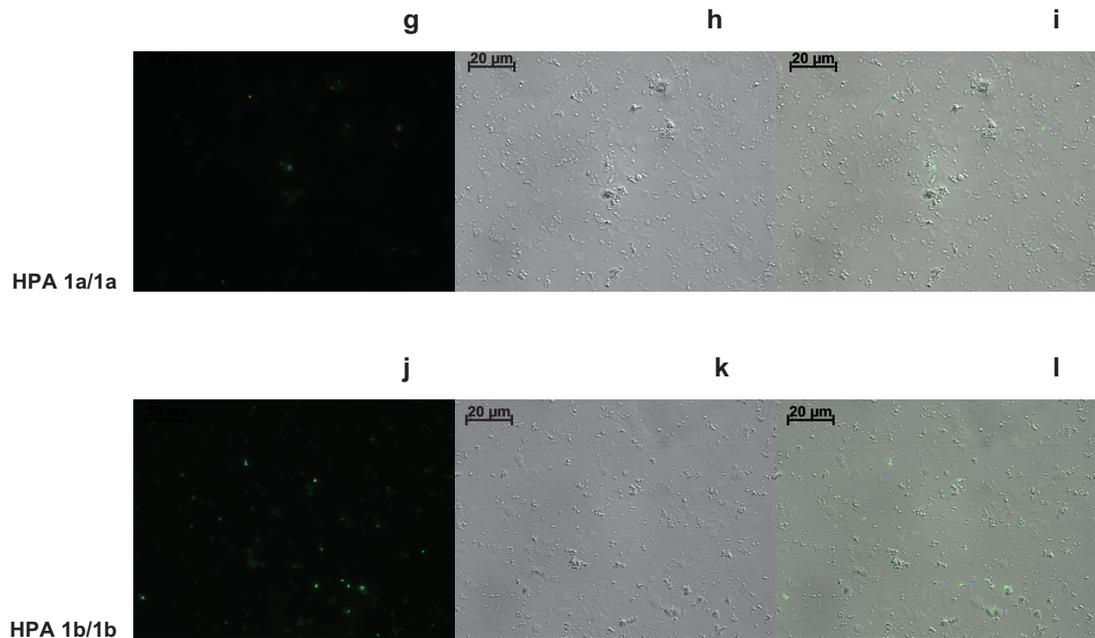


Abb. 13: Block 4 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten nach Applikation von Peptid 2a auf FG

Lasermikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion auf Fibrinogen (50 µg/ml) gewaschener Thrombozyten nach Applikation von Peptid 2a (120 µM) und FIAsh (1 µg/ml) Inkubation. (Argon-Laser ERC 5s, 50fach) g,j-> *laser*; h,k-> *phase*; i,l-> *meshed*

3.2.2.3 Lasermikroskopische Darstellung von Thrombozyten nach Peptidbehandlung auf FN

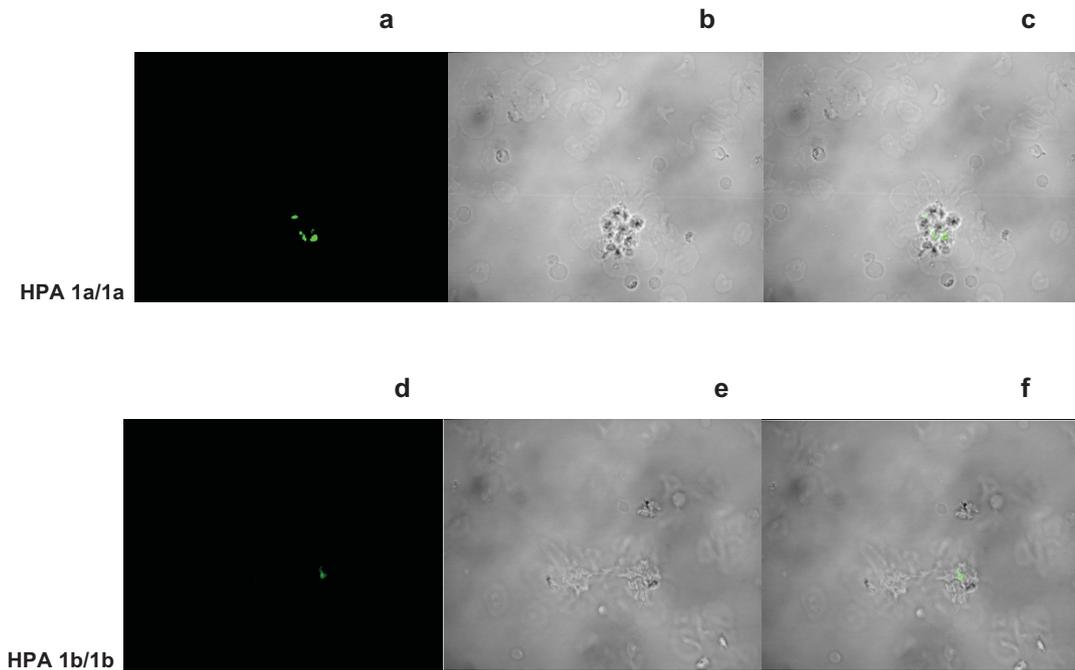


Abb. 14: Block 5 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten nach Applikation von Peptid 1a auf FN

Lasermikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion auf Fibronektin (50 µg/ml) gewaschener Thrombozyten nach Applikation von Peptid 1a (120µM) und FIASH (1 µg/ml) Inkubation. (Argon-Laser ERC 5s, 50fach) a,b->laser; b,e-phase; c,f->meshed

Die abgebildeten Fluoreszenzen (Block 5 & 6) (Abb. 14 & 15) von behandelten Thrombozyten auf Fibronektin (50µg/ml) zeigen die gleichen Tendenzen wie Block 3 und 4. Im Vergleich zwischen Thrombozyten beider Genvarianten nach P1-Behandlung (Block 5) findet sich ebenfalls eine annähernd gleiche Fluoreszenz und keine verstärkte Adhäsion im Durchlicht. Das Kontrollpeptid hat auch hier auf Zellen beider Varianten keinen sichtbaren Einfluss. Ein *spreading* ist auch hier vor allem in Block 6 zu erkennen, wenn auch verdeckt durch Thrombozyten-Aggregate.

Im Vergleich der Bildreihen in Block 6 fällt auch hier wieder ein Unterschied der Thrombozyten beider Genvarianten auf Fibronektin nach Behandlung mit dem Wirkpeptid (P2a) auf. Man sieht mehr gefärbte Zellen bei der HPA-1b-Variante (j & l). Es gibt hier mehr adhärenente Zellen, die das Peptid internalisiert haben.

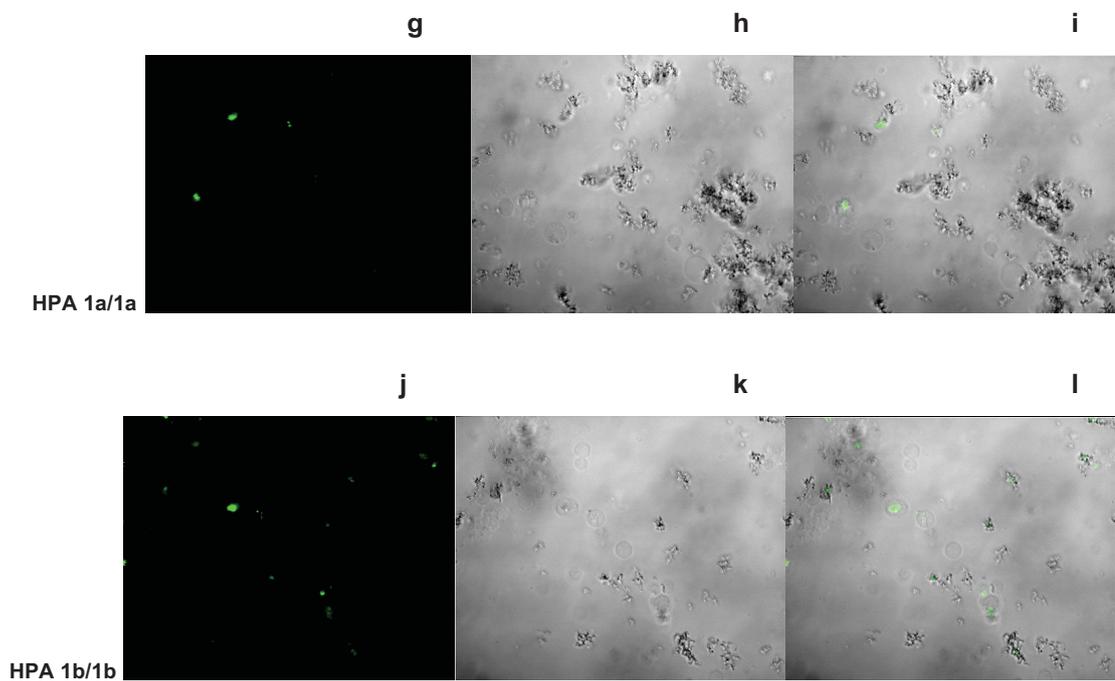


Abb. 15: Block 6 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion von gewaschenen Thrombozyten nach Applikation von Peptid 2a auf FN

Lasermikroskopische Darstellung der statischen Adhäsion auf Fibronectin (50 µg/ml) gewaschener Thrombozyten nach Applikation von Peptid 2a (120 µM) und FIAsh (1 µg/ml) Inkubation. (Argon-Laser ERC 5s, 50fach) g,j-> *laser*; h,k-> *phase*; i,l-> *meshed*

4 Diskussion

Erkrankungen des Gefäßsystems sind weiterhin die vorherrschende Ursache für Morbidität und Mortalität in Industriestaaten. Die vertiefende Aufschlüsselung molekularer und pathophysiologischer Mechanismen bietet neue diagnostische und in der Folge therapeutische Strategien zur Prävention und Behandlung vaskulärer Ereignisse. Der Einsatz interferierender mimetischer Peptide stellt eine Möglichkeit zur selektiven Pharmakotherapie dar.

4.1 Methodenvalidierung

Dem Zielexperiment voran stand ein Prozess der Etablierung eines reproduzierbaren und auswertbaren Versuchsprotokolls zur Einschleusung und Detektion mimetischer Peptide in die Thrombozyten.

4.1.1 FIAsH-Labeling

Zunächst musste als Grundvoraussetzung geprüft werden, ob die synthetisierten Peptide die Zellmembran von Thrombozyten überwinden (vgl. Abb. 4). Der Nachweis der Penetration ist mit dem Farbstoff FIAsH gelungen, der nur gebunden an ein dem Peptid angekoppeltes Tetracysteinmotiv Fluoreszenz zeigt (Hoffmann et al., 2010a; Irtegun et al., 2011).

Zur Lagebestimmung der Peptide (intra- oder extrazellulär) kann die FIAsH Methodik allein keine ausreichenden Schlüsse zulassen. FIAsH ist in seiner Bindung an das Peptid trotz hoher Affinität wie andere Wirkstoffe auch nicht gänzlich spezifisch. Es kann sich, wenn auch in weit geringerem Maße, an andere Cysteine intra- sowie extrazellulär binden. Deshalb wurden in ersten Experimenten vorbereitend die Versuchsbedingungen so gewählt, dass ein mögliches „Überstrahlen“ der intrazellulären Fluoreszenz durch unspezifische extrazelluläre Fluoreszenz überprüft und falls nötig minimiert werden konnte (vgl. Abb. 4). Durch Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz mittels „NEM-Absättigung“ an HEK 293 Zellen konnte gezeigt werden, dass hier keine signifikante unspezifische FIAsH-Markierung stattfindet. Es zeigte sich sogar bei Zellen nach NEM-Behandlung ein unspezifischeres Signal als ohne NEM. Etwaige Fehlsignale sind gegenüber dem weit stärkeren intrazellulären Fluoreszenzsignal vernachlässigbar gering und stören deshalb grundsätzliche Aussagen zur Signifikanz der Ergebnisse und deren Schlussfolgerungen nicht. FIAsH eignete sich unter den gegebenen

Versuchsbedingungen als Hilfsmittel zur Beurteilung der Peptidlokalisation und für lasermikroskopische Darstellungsversuche. Die Protokollerweiterung um eine NEM-Inkubation vor der FIAsH-Färbung war somit nicht notwendig.

4.1.2 Aggregometrie

Um signifikante Aussagen zur statischen Adhäsion nach Applikation β_3 -mimetischer Peptide an Thrombozyten beider Genvarianten des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins treffen zu können, ist es zur Optimierung des Zielexperiments notwendig, im Vorfeld die Peptidkonzentration zu bestimmen, die unter den gegebenen Bedingungen den größten Einfluss auf das Aggregationsverhalten für beide Varianten aufweist. Diese Untersuchungen wurden mittels PRP beider Varianten des HPA-1-Polymorphismus durchgeführt.

Dazu wurde jeweils eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, deren Analyse Schlussfolgerungen zur Thrombozytenaggregation vor und nach der Behandlung mit β_3 -mimetischen Peptiden erlaubt.

Neben der Festsetzung der geeignetsten Peptidkonzentration für das Hauptexperiment fällt beim Vergleich für die Thrombozyten der HPA-1a-Variante nach Applikation von mimetischen Peptiden für die Bindungsstelle von Kindlin-3 generell ein stärkerer Einfluss der Wirkpeptide (P2) auf die Aggregationsleistung auf. Ab Konzentrationen von über 240 μM reduziert sich die Fähigkeit zur Aggregation bereits auf 60%, mit Steigerung der Konzentration an Wirkpeptid sinkt sie bei 600 μM sogar auf 30% (vgl. Abb. 6). Thrombozyten der HPA-1b-Variante zeigen hier nach Behandlung mit Peptid 2 zwar ebenfalls eine Reduktion der Aggregationsleistung, diese wiederum aber in einem viel geringeren Umfang mit einer maximalen Reduktion der Aggregationsleistung um 10% bei 600 μM (vgl. Abb. 7). Zudem findet sich bei Thrombozyten der HPA-1b-Variante bei steigender Peptidkonzentration von Peptid 2 eine annähernd stetige und insgesamt geringe Abnahme der maximalen Aggregationsleistung. Bei Thrombozyten der HPA-1a-Variante kommt es ab Konzentrationen von 180 μM zu einer stark differierenden Abnahme der Aggregationsleistung.

Auch unter Berücksichtigung der Standardabweichungen sprechen die gemessenen Rohwerte dafür, dass eine Blockade der Bindung von Kindlin-3 an der β_3 -Untereinheit des Integrins sich auf die Thrombozytenaggregation der HPA-1a-Variante stärker auswirkt als auf die der HPA-1b-Variante.

Das Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass unabhängig von Kindlin-3 zusätzliche komplexe Mechanismen bestehen, die die Thrombozytenaggregation der prokoagulatorisch eingestuft HPA-1b-Variante einschränken.

Möglicherweise geschieht dies durch eine Konformationsänderung der β_3 -Untereinheit, sodass Kindlin-3 hier nicht in vollem Umfang wirken kann (Jallu et al., 2012). Dementsprechend kommt es auch für hohe Konzentrationen an β_3 -mimetischen Peptiden im Vergleich zur HPA-1a-Variante zu einer geringeren Einschränkung der Aggregationsleistung. Übereinstimmend dazu findet sich das gleiche Phänomen beim Zielversuch (vgl. Abb. 8 & 9).

Ausgehend von der geringen Einschränkung der Aggregationsleistung besonders bei hohen Konzentrationen an β_3 -mimetischem Peptid bei der HPA-1b-Variante lassen die Ergebnisse auch einen weiteren Interpretationsansatz zu. Je höher man die Konzentration an Wirkpeptid wählt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Hemmung der Bindung von Kindlin-3 an der β_3 -Untereinheit des $\alpha_{11b}\beta_3$ -Integrin-Rezeptors und desto mehr „Fremdprotein“ befindet sich im Zytoplasma. Quantitative Veränderungen an Proteinen jeglicher Art, hier in Form eines Überangebotes eines möglichen Peptid-Kindlin-Komplexes bzw. einer Reduktion von wirkfähigem Kindlin-3, könnten nicht nur Einfluss auf die Kindlin-3 abhängigen Signalkaskaden, sondern auch auf die Zellhomöostase/Zellintegrität haben und somit andere Zellaktionen beeinflussen. Harburger et al. (2009) schreiben diesbezüglich, dass die Überexpression von Kindlin-2, der Kindlin-3 Isoform in CHO Zellen, eine gestörte Integrin-Aktivierung zur Folge hat (Lai-Cheong et al., 2010).

Möglich ist auch, dass ein bereits gebundenes und damit bereits wirkfähiges Kindlin-3 bei Thrombozyten der HPA-1b-Variante vorliegt, sodass ein angestrebter Effekt des mimetischen Peptids nicht greifen kann.

4.1.3 Mimetische Peptide

Es ist nach Applikation der Peptide nicht auszuschließen, dass der Aufnahmeprozess der Peptide als solcher in die Integrität einer komplexen Zellmembran eingreift und schon dadurch eine Aktivierung der Thrombozyten verursachen kann. Einige Studien berichten über eine mögliche Thrombozyten-Aktivierung des HIV1-Tat-Proteins über die RGD-Bindungsdomäne am $\alpha\beta_3$ -Rezeptor und über das C-C-Motiv des CCR3-Chemokinrezeptors (CCF/Y und SYXR Motiv). Für eine Tat-Peptid-getriggerte Thrombozyten-Aktivierung sind jedoch beide Interaktionspartner nötig (Wang et al., 2011). Die verwendeten Peptide tragen weder das RGD-Motiv noch Bindungsstellen für den Chemokinrezeptor CCR3. Eine Aktivierung der Thrombozyten über diesen Weg kann also ausgeschlossen werden. Vertiefende eigene und institutsinterne Untersuchungen unter anderem mit Hilfe von FACS-Analysen bestätigen, dass sowohl das Kontrollpeptid als auch das Wirkpeptid die Thrombozyten nicht aktivieren (Nguyen, 2016). Im Inkubationsprotokoll (vgl. 2.2.1.4) wurde, dem Gedankengang einer unspezifischen Störung der Zellintegrität durch die Peptidinternalisierung folgend, für das Zielexperiment festgesetzt, dass initial der etablierte Farbstoff CMFDA und in einem zweiten Schritt die Peptide zur Inkubation gebracht werden. Ein nicht gewünschter möglicher Einfluss der Peptide auf eine optimale Färbung durch CMFDA wurde auf diese Weise minimiert.

Ferner wurden weitere Untersuchungen zur Abklärung institutsintern durchgeführt. Diese dienen der Sicherung verschiedener, grundlegender Voraussetzungen zur Validität des Zielexperiments. Neben FACS-Analysen, die eine erfolgreiche Internalisierung der Peptide zusätzlich bestätigen, brachten vertiefende Western-Blot-Untersuchungen den Nachweis der spezifischen Bindung des mimetischen Peptids für die Bindungsstelle von Kindlin-3 an seinen angestrebten Bindungspartner Kindlin-3 (Nguyen, 2016).

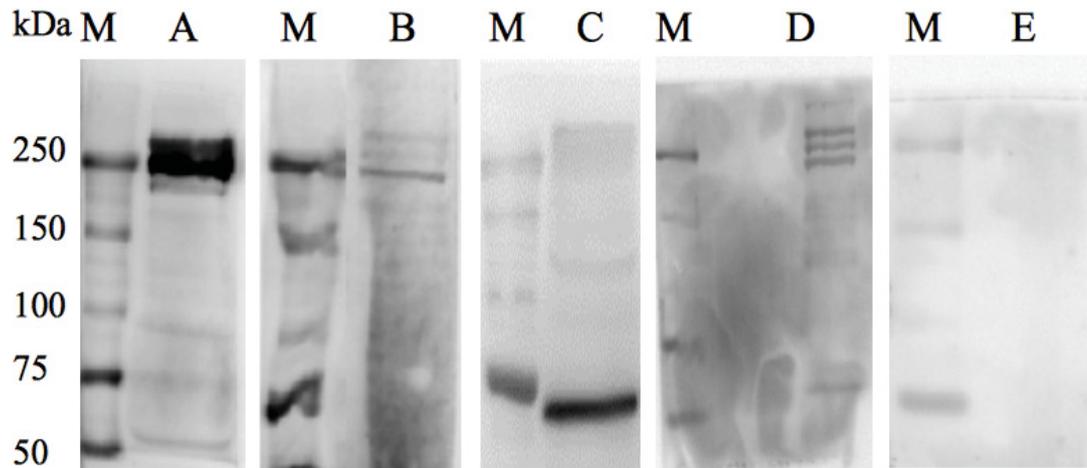


Abb. 16: Western-Blot-Nachweis der spezifischen Bindung von den synthetischen Peptiden mit Talin bzw. Kindlin

Plättchen-Lysate wurden einer SDS-PAGE unterzogen und auf Nitrozellulosemembranen aufgetrennt. M: Molekularer Marker. (A) polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Talin-1 (B) biotinyliertes Peptid für die Talin-Bindungsstelle, (C) polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Kindlin-3, (D) biotinyliertes Peptid für Kindlin-Bindungsstelle und (E) Biotin-markiertes Peptid mit TAT-Sequenz als primärer Antikörper; Anti-Kaninchen-Antikörper wurde als sekundärer Antikörper verwendet (Nguyen, 2016).

Um zu bestätigen, dass es zu einer spezifischen Bindung zwischen den synthetischen Peptiden und Talin bzw. Kindlin in Thrombozyten kommt, wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt. Ein Lysat aus gewaschenen Thrombozyten wurde auf einer Nitrozellulosemembran aufgetrennt. β_3 -mimetische Peptide, die der Talin- bzw. Kindlin-Bindungsstelle entsprechen, wurden mit Biotin konjugiert und als primäre Antikörper zum Nachweis von Talin bzw. Kindlin verwendet. Kontrollexperimente wurden unter Verwendung von einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der an Talin (Abcam) und Kindlin-3 (Millipore) (primäre Antikörper) bindet, durchgeführt. Wie in der Abbildung 16 dargestellt, wurde eine einzige Bande bei 270 kDa-Molekulargewichtsmarker, entsprechend dem Molekulargewicht von Talin, in der Reihe A und B abgebildet.

Membranen, die mit Peptiden für die Kindlin-Bindungsstelle (D) und dem polyklonalen Kaninchen-Anti-Kindlin-Antikörper (C) untersucht wurden, zeigten eine Bande zwischen 75 kDa und 50 kDa, was dem Molekulargewicht von Kindlin entspricht. Bei den Kontrollversuchen (direkt mit anti-Kaninchen-Sekundärantikörper inkubiert) wurde keine spezifische Bande beobachtet. In einem anderen Kontrollexperiment konnte auch keine Bande beobachtet werden,

wenn die Peptid-enthaltende TAT-Sequenz nur als primärer Antikörper (E) verwendet wurde. Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse die spezifische Bindung der synthetischen β_3 -mimetischen Peptide für beide Adaptorproteine (Kindlin und Talin).

4.2 Versuche zur statischen Adhäsion

4.2.1 Einführung

Ziel der Arbeit war zum einen, den Einsatz mimetischer Peptide als experimentelles *tool* generell zu überprüfen und zu etablieren, zum anderen darauf basierend als Hauptexperiment das statische Adhäsionsverhalten von Thrombozyten in Relation zum HPA-1 Polymorphismus des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors auf Fibrinogen und Fibronectin nach Applikation β_3 -mimetischer Peptide für die Bindungsstelle von Kindlin-3 zu untersuchen. Dabei ließ sich nach vorangegangener experimenteller Etablierung der Methode nachweisen, dass sich *in vitro* nach Applikation der mimetischen Peptide tatsächlich Unterschiede der statischen Adhäsion von Thrombozyten auf den Liganden Fibrinogen und Fibronectin zeigen (vgl. Abb. 8 & 9). Diese Unterschiede konnten auch laser-mikroskopisch nachgewiesen werden. Hier zeigten sich mehr gefärbte adhärenente Zellen bei Thrombozyten der HPA-1b-Variante nach Behandlung mit Peptid 2 (vgl. Abb. 13 & 15).

Es fand sich folglich nicht nur ein Effekt β_3 -mimetischer Peptide auf die Adhäsion von Thrombozyten generell, sondern es ließen sich darüber hinaus sogar Unterschiede im Adhäsionsverhalten von Thrombozyten der zwei HPA-1-Genvarianten untereinander nachweisen.

Nach Applikation β_3 -mimetischer Peptide für die Bindungsstelle von Kindlin-3 zeigten die mit dem Wirkpeptid (Peptid 2/2a) behandelten Thrombozyten der prothrombotischen HPA-1b-Variante auf Fibrinogen und Fibronectin ein deutlich gesteigertes Adhäsionsverhalten, ganz im Gegensatz zur inversen Reaktion der HPA-1a-Variante mit einer unter den gleichen Versuchsbedingungen für beide Liganden reduzierten Adhäsion (vgl. Abb. 8 & 9).

4.2.2 Statisches Adhäsionsverhalten in Abhängigkeit auf den immobilisierten Liganden Fibrinogen und Fibronectin

Fibrinogen erwies sich für beide Varianten erwartungsgemäß als potenterer Ligand für die statische Thrombozytenadhäsion als Fibronectin. Es konnten (bezogen auf die Rohwerte) auf Fibrinogen stärkere Fluoreszenzen detektiert werden (vgl. Abb. 8 & 9) (Loncar et al., 2007; McCarty et al., 2004; Shattil and Newman, 2004; Vijayan et al., 2005). Genvariantenspezifische Unterschiede zwischen Fibrinogen und Fibronectin nach Applikation mimetischer Peptide fanden sich nicht.

4.2.3 Statisches Adhäsionsverhalten in Abhängigkeit vom HPA-1-Polymorphismus

Die Ergebnisse und Beobachtungen zu den genvariantenspezifischen Unterschieden des HPA-1-Polymorphismus erscheinen auf den ersten Blick überraschend, nimmt man doch bisher für den Normalfall, d.h. für drei Viertel der Bevölkerung, generell an, dass das Adaptorprotein Kindlin-3 maßgeblich an dem Aktivierungsprozess des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins beteiligt ist und zur Thrombusstabilität beiträgt (Kahner et al., 2012). Eine fehlende Genexpression von Kindlin-3 in Knockout-Mäusen führt bei diesen sogar zu schweren letalen Blutungen (Malinin et al., 2010).

Daraus lassen sich zusammen mit den hier vorgestellten experimentellen Ergebnissen mehrere Schlüsse ziehen.

Zunächst ist festzustellen, dass es erwartungsgemäß bei Thrombozyten der HPA-1a-Variante als „Normalfall“ nach Inhibition der Bindung von Kindlin-3 am Integrin-Rezeptor zu einem verminderten Adhäsionsverhalten kommt (Nguyen, 2016). Anders und im Ausmaß überraschend deutlich verhält es sich mit den Thrombozyten der prothrombotischen HPA-1b-Variante in den *in vitro*-Experimenten. Es ergibt sich für unsere Untersuchungsreihe somit die Schlussfolgerung, dass Kindlin-3 nicht eindimensional als direkter Aktivator seines Bindungspartners (Integrin- $\alpha_{IIb}\beta_3$) zu verstehen ist, sondern eher als regulierender Protagonist in einem durchaus komplexeren Umfeld weiterer Signalproteine (im Zuge des *signaling*). Eine Hemmung von Kindlin-3 mittels mimetischer Peptide führt bei der HPA-1b-Variante zu einer verstärkten Adhäsion (+30% FN/+56% FG), bei Thrombozyten der HPA-1a-Variante zum entgegengesetzten Verhalten mit schwächerer Ausprägung (-22% FN/FG). Auf molekularer Ebene scheinen die

Thrombozyten der beiden Genvarianten also unterschiedlich auf Kindlin-3 direkt oder auf durch Kindlin-3 ausgelöste Folgereaktionen anzusprechen.

4.2.4 Deutungsansätze

Es sind dazu folgende Hypothesen im Kontext der aktuellen Forschung zur Unterscheidung beider Genvarianten denkbar:

- 1) Die β_3 -Untereinheit zeigt strukturelle Unterschiede auf, welche die Kindlin-3 Bindung/Wirkung beeinflussen.
- 2) Es bestehen regulatorische Unterschiede, die die Kindlin-3 Wirkung indirekt oder direkt beeinflussen, z.B. in Form von Veränderungen beteiligter *microRNA* (miRNA) oder durch zusätzlich beteiligte Interaktionspartner wie Talin und ADAP bezüglich des *Integrin-signalings*.

4.2.4.1 Änderung der Konformation

Die β_3 -Untereinheit des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors der HPA-1b-Variante kann in ihrer Konformation derart verändert sein, dass Kindlin-3 mit höherer Affinität im Vergleich zur HPA-1a-Variante binden kann. Obwohl die Pro33-Mutation in der Primärstruktur der β_3 -Sequenz von der zytosolischen β_3 -Untereinheit entfernt ist, ist eine Veränderung der Tertiärstruktur in Thrombozyten für die β_3 -Untereinheit der HPA-1b-Variante denkbar. Die Leu33-Substitution modifiziert das strukturelle Gleichgewicht der drei β_3 -Domänen (Jallu et al., 2012). Daraus würde in unseren Versuchen eine niedrigere Bindungsaffinität zum synthetischen Peptid resultieren. Es ist denkbar, dass generierte Konzentrationsveränderungen von Kindlin-3 durch das mimetische Peptid eine zusätzliche Rolle spielen. Klapproth et al. (2015) postulieren bei Mäusen, die nur 5% der Wildtyp-Menge (WT-Menge) von Kindlin-3 exprimieren, dass diese normal altern und weder anämisch sind noch unter lebensbedrohlichen Spontanblutungen leiden (vgl. Moser et al., 2008). Dennoch zeigt das Blut von Mäusen *in vitro* mit 10%- und 5%igem Level an Kindlin-3 deutlich verlängerte Blutungszeiten und eine bereits ab 50% beginnende fortschreitende Verminderung der Integrin-Funktion. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass 5 bis 10% der WT-Menge an Kindlin-3 bei Thrombozyten ausreichen, um die basale hämostatische Funktion zu unterstützen, aber diese nicht ausreicht, um die Thrombozytenfunktion unter Scherstress (hämostatischem Stress) zu erhalten. Eine provozierte Konzentrationsminderung an wirkfähigem

Kindlin-3 an der β_3 -Untereinheit mit Hilfe von mimetischen Peptiden in unserer Untersuchungsreihe könnte folglich bei Thrombozyten der HPA-1a-Variante durch ausreichendes Abfangen an wirkfähigem Kindlin-3 insbesondere das Adhäsionspotential von Thrombozyten unter Scherstress erniedrigen. Eine provozierte Konzentrationsminderung an wirkfähigem Kindlin-3 kann zusätzlich natürlich auch andere Wirkungsorte von Kindlin-3 beeinflussen und darüber die Adhäsionsfähigkeit einschränken. Wie in 4.1.2 bereits angesprochen, könnte die β_3 -Untereinheit, bedingt durch die Pro33-Mutation, durch Konformationsänderung eine höhere Bindungsaffinität zu Kindlin-3 oder eine bereits erfolgte Bindung aufweisen. Durch Zugabe des mimetischen Peptids könnte unter dieser Annahme Integrin-unabhängig wirkendes Kindlin-3 abgefangen werden. Die Blockierung anderer Signalwege würde dann die erhöhte Adhäsionsfähigkeit bei Thrombozyten der HPA-1b-Variante erklären.

4.2.4.2 Interaktionspartner

Ein zusätzlicher Einfluss, der auf anderen Signalwegen die Adhäsion verstärkt, z.B. durch regulierende miRNA prätranslational oder auch posttranslational (im Cytosol als Cofaktor), ist nicht auszuschließen (Cui and Wang, 2015; Lindsay and Edelstein, 2016; Provost, 2017; Wojciechowska et al., 2017).

4.2.4.2.1 Einfluss der *Micro RNA*

Diese nichtkodierende RNA-Subklasse gilt als wichtiger Transkriptions- und posttranskriptioneller Regulator der Genexpression, also als "Feinabstimmer" der translationalen Ausgabe von *messengerRNA* (mRNA). Untersuchungen weisen unter anderem Konzentrationsunterschiede von miRNAs auf bei Patienten mit Erkrankungen, die das Gefäßsystem betreffen (Denli et al., 2004; Small et al., 2010). Bei Thrombozyten von Diabetikern konnte man am Beispiel der miRNA-223 zeigen, dass miRNA-223 FVIIIa direkt und Kindlin-3 indirekt in seiner Funktion beeinflusst. Darüber hinaus finden sich bei miRNA-233-Knockoutmäusen kürzere Blutungszeiten, größere FeCl₃-induzierte Thromben, eine größere Empfindlichkeit gegenüber niedrigen Dosen von Thrombin und eine beeinträchtigte Gerinnsel-Retraktion. Das *spreading* der Thrombozyten zeigte sich diesbezüglich u.a. deutlich erhöht (Elgheznawy et al., 2015; Lindsay and Edelstein, 2016; Willeit et al., 2013a, 2013b). Geht man davon aus, dass es Unterschiede der HPA-1b-Variante auch auf Ebene der miRNA gibt und diese miRNA als negativer

Regulator fungiert, so könnte es auch bei eingeschränkter Wirkung von Kindlin-3 und bei gleichzeitig erniedrigter Konzentration an miRNA zu einer erhöhten Integrin-Aktivierung in Thrombozyten der HPA-1b-Variante kommen (vgl. Knockoutmäuse). Diese Schlussfolgerung widerspricht nicht der weiterhin gültigen Vorstellung, dass Kindlin-3 ein limitierender regulierender Faktor im Verlauf der Aktivierung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins ist (Karaköse et al., 2010).

4.2.4.2.2 Einfluss auf das *signaling*

Der Einsatz des interferierenden mimetischen Peptids kann unterschiedliche Auswirkungen auf die bidirektionale Signaltransduktion haben. Ein gestörtes *Inside-out-signaling*, folglich also eine verminderte oder erhöhte Affinitätszunahme von Liganden der ECM (vWF, FG, FN, elastische Fasern) für den $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor bzw. ein gestörtes Integrinclustering kann resultieren. Alle funktionellen Reaktionen von hämatopoetischen Zellen, einschließlich die der Thrombozyten und Leukozyten, die von einem *Inside-out signaling* abhängen, erfordern eine normale Expression und Funktion von Kindlinen. Die direkte Wechselwirkung von Kindlinen und dem β -tail ist für diese Prozesse entscheidend (Larjava et al., 2008; Ma et al., 2008; Moser et al., 2009; Svensson et al., 2009).

Ohne vorangegangenes *Inside-out signaling* bzw. Agonisten-induzierten Stimulus befindet sich der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor im Ruhekonformationszustand und besitzt eine niedrige Affinität gegenüber Liganden wie löslichem Fibrinogen und Fibronectin. Immobilisiertes Fibrinogen sowie Fibronectin sind jedoch beide in der Lage, am $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor direkt ein *Outside-in signaling* auszulösen (Coller, 2015, 1987). Die Beeinflussung von Kindlin-3 betrifft auf Grund u.a. dieser Annahme dann auch das *Outside-in-signaling*. In Darstellungsversuchen zur statischen Adhäsion zeigen Moser et al. (2008), dass es bei gewaschenen Thrombozyten Kindlin-3-defizienter Mäuse auf Fibrinogen zu einem gestörten *spreading* kommt. Dies äußert sich u.a. in einer gestörten Ausbildung von Lamellipodien (Ma et al., 2008). Der Abzug an wirkfähigem Kindlin-3 in unseren Versuchen und einer dadurch implizierten gestörten zytoskelettalen Reorganisation nach Bindung an Fibrinogen bzw. Fibronectin würde sich dann in einer fehlenden Möglichkeit zur Verstärkung der intrinsischen Stabilität von Thrombozyten in ihrer Umgebung äußern. Eine nicht optimale Verankerung der Thrombozyten könnte in unseren Versuchen dazu geführt haben, dass die Thrombozyten der HPA-1a-Variante eine reduzierte

Adhärenz zeigen, möglicherweise auch durch die nötigen Waschvorgänge getriggert (vgl 3.2.2). Für weiterführende Versuche ist deshalb eine Darstellung von Kindlin-3 zusammen mit ausgewählten zytoskelettalen Proteinen von Interesse (Versuche mit Phalloidin-Antikörper-Färbung (Qu et al., 2011).

4.2.4.2.3 Einfluss von Talin

Das angesprochene komplexe Umfeld verschiedener Mediatoren der Integrin-Aktivierung wird von weiteren Adaptorproteinen bestimmt.

Talin ist ein essentieller Protagonist im Zuge der Thrombusformierung und galt lange als exklusiver Mediator im Prozess des *Inside-out signalings* (Tadokoro et al., 2003; Wegener et al., 2007). Talin und Kindlin-3 binden mit gleicher Affinität an unterschiedlichen Stellen der β_3 -Untereinheit, dem membranproximalen NPXY-Motiv (Talin) und dem distalen NIXY-Motiv (Kindlin-3) (Kahner et al., 2012; Moser et al., 2008; Yates et al., 2012). Talin bindet somit ebenfalls an der zytoplasmatischen β_3 -Untereinheit und verbindet das $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrin mit dem Aktin-Zytoskelett.

Die Integrin-Aktivierung wird durch die gleichzeitige Bindung der N-terminalen FERM (four-point-one-protein/ezrin/radixin/moesin)-Domäne von Talin (Talin-FERM) an die innere Membranoberfläche und den β_3 -*tail* ausgelöst (Song et al., 2012). Diese FERM-Domäne findet sich auch bei Kindlin-3 (Ussar et al., 2006). Allerdings unterscheidet sich diese FERM-Domäne um eine „PH-Domäne“ innerhalb der F2 Domäne („*pleckstrin homology*“) (Karaköse et al., 2010) (vgl Abb. 16). Kindlin-3 und Talin binden jeweils über ihre F3-Subdomänen (Phosphotyrosin (PTB)-Bindung) bzw. über diese spezifische Subdomäne mit der höchsten Affinität. Im Fall von Talin ist die F3-Domäne unabdinglich für die Integrin-Aktivierung (Campbell and Ginsberg, 2004; Shi et al., 2007).

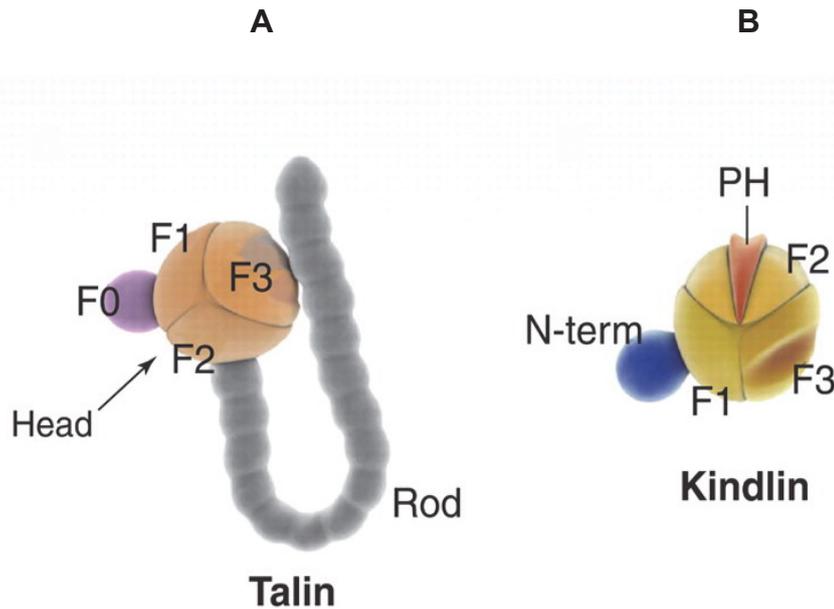


Abb. 17: Integrin-aktivierende Proteine Talin und Kindlin

Schematische Darstellung der Integrin-aktivierenden Proteine Talin (A) und Kindlin (B). Die FERM-Domänen sind als Kugeln dargestellt, die in drei Subdomänen F1 bis F3 unterteilt sind. Kindline enthalten zusätzlich eine *pleckstrin homology* (PH)-Domäne, die in die F2-Subdomäne inseriert ist. Die Domänengrößen sind nicht maßstäblich, und Talin wird zur Vereinfachung als Monomer dargestellt (modifiziert nach Moser et al., 2009).

Der Knockout des Talin-Gens im Mausmodell setzt die Aktivierbarkeit des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins ebenso außer Kraft wie die Fähigkeit zur Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung (Brakebusch and Fässler, 2003; Nieswandt et al., 2007). Es wird bisher angenommen, dass beide Proteine wichtige Bestandteile der Signalkaskade zur Rekrutierung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins sind. *In vitro* formen Kindlin, Talin und die β_3 -Untereinheit im Zuge der Integrin-Aktivierung einen ternären Molekülkomplex (Bledzka et al., 2013a; Yates et al., 2012). Sie können jedoch unabhängig voneinander agieren (Kahner et al., 2012). Beide sind allein in der Lage, $\alpha_{IIb}\beta_3$ in Thrombozyten adäquat zu aktivieren (Moser et al., 2009).

Die Bindung von Talin am β_3 -*tail* wird in einigen Studien als letzter Schritt im Zuge der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung und Ligandenbindung definiert (Calderwood et al., 2013; Nieswandt et al., 2007; Tadokoro et al., 2003). *In vitro* scheint die Talin-FERM allein ausreichend, die Aktivierung von gereinigtem $\alpha_{IIb}\beta_3$ zu bewirken, für Kindlin-3 trifft dies *in vitro* nicht zu (Ye et al., 2013, 2010). *In vivo* beeinträchtigt jedoch der Kindlin-3-Mangel die Leukozytenadhäsion/-extravasation und produziert phäno-

typisch dysfunktionelle Thrombozyten ähnlich der Glanzmann-Thrombasthenie, und das trotz Anwesenheit normaler Mengen an Talin (Malinin et al., 2010, 2009). Ausgeschlossen ist in dem Zusammenhang jedoch nicht, dass Kindlin-3 zusätzlich die Wirkentfaltung von Talin oder anderer Proteine, die am Prozess der Aktivierung von Thrombozyten generell beteiligt sind, inhibieren oder im Sinne eines Regulators aktivieren kann. In transfektierten CHO Zellen führt *SiRNA* („small-interfering-RNA“)-Knockdown von endogenem Kindlin-2 zur Beeinträchtigung der Talin-induzierten $\alpha_{11b}\beta_3$ -Aktivierung und verkürzt darüber hinaus die $\alpha\beta_3$ -vermittelte Adhäsion und Migration von Endothelzellen. Hier ist Kindlin-2 bereits als Coaktivator identifiziert (Ma et al., 2008; Montanez et al., 2008).

Es ist allgemein und vereinfachend anerkannt, dass die Wechselwirkungen von Talin-H („Talin Head“-Domäne) mit dem Membran-proximalen Bereich der β_3 -Untereinheit interagiert und im Folgenden mit der initiierten Dissoziation der α_{11b} - und β_3 -Untereinheit (*active state/high affinity state*) endgültige intrazelluläre Schritte der Integrin-Aktivierung in die Wege leitet (Anthis et al., 2010; Cram et al., 2003; H Brown et al., 2002; Kim et al., 2003; Liu et al., 2000; Ratnikov et al., 2005). Andererseits scheint der distale Membranbereich, der Bereich in dem Kindlin-3 vorrangig interagiert, die Integrin-Aktivierung indirekt zu regulieren (Ni et al., 2017; Ye et al., 2013). Bennett (2015) hat ein für unser Ergebnis passendes vereinfachtes Modell erarbeitet (Abbildung 18). Bei diesem Modell gibt Kindlin-3 die Bindungsstelle für Talin frei.

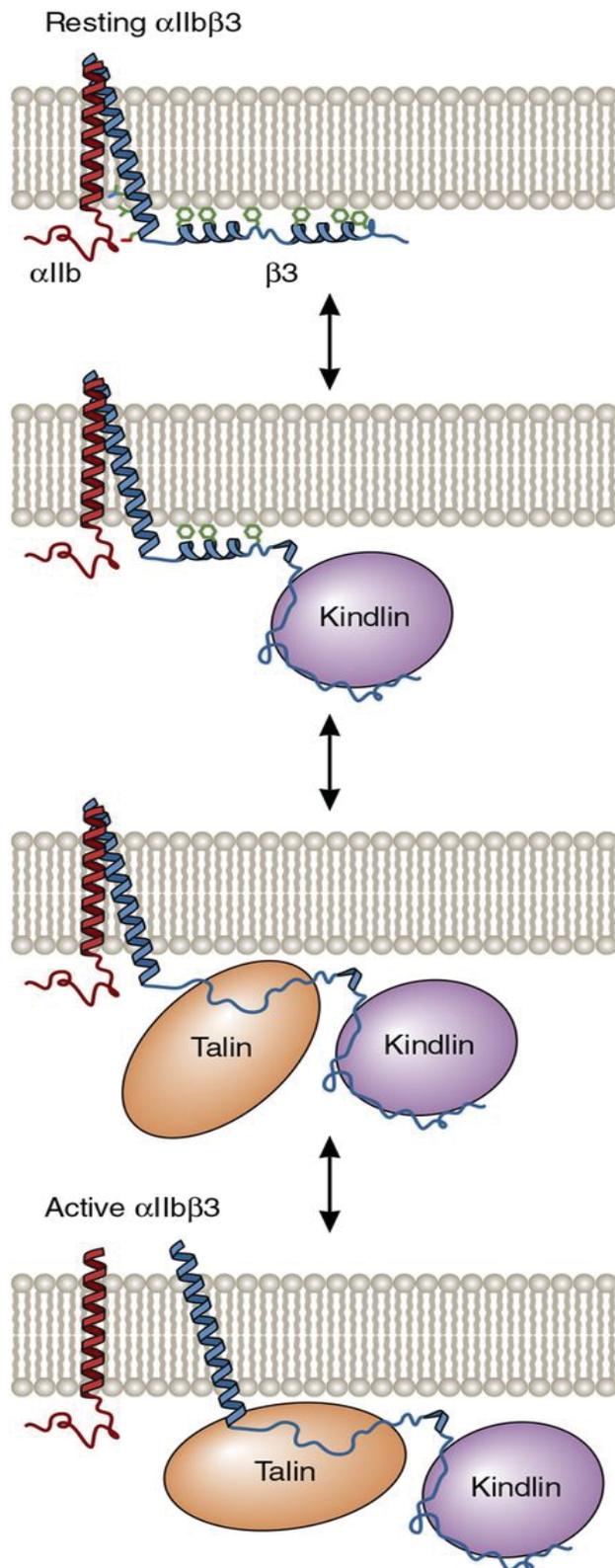


Abb. 18: Talin und Kindlin als kooperative Partner

Schematische Darstellung eines möglichen Modells einer kooperativen Bindung am β3 -zytoplasmatischen *tail* von Kindlin im 1. Schritt und Talin im 2. Schritt im Zuge der $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung (Bennett, 2015).

In ruhenden Thrombozyten interagieren die zwei distalen Helices des β_3 -zytoplasmatischen *tails* mit der Lipid-Doppelschicht und sind in diesem Zustand nicht in der Lage, Talin oder Kindlin-3 zu binden, da die Membran ihren Zugang zur β_3 -Untereinheit behindert. Allerdings ermöglicht die dynamische tertiäre Struktur der zytoplasmatischen β_3 -Untereinheit, die Bindungsmotive für die beiden Adaptorproteine nach Stimulus zugänglich zu machen (Metcalf et al., 2010). Wie im Modell dargestellt, kann dann die Kindlin-3-Bindung am distalen β_3 -*tail* stattfinden. Danach wird der Membran-proximale β_3 -Anteil von der Membran freigegeben. Eine Bindung von Talin wird nun erst möglich. Im weiteren Aktivierungsvorgang bewirkt die Talin-FERM-Bindung die Trennung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Heterodimers. Kindlin-3 könnte nach diesem Modell folglich die Bindung von Talin an das Integrin durch einen kooperativen Mechanismus fördern (Bledzka et al., 2013b; Moser et al., 2009; Shattil et al., 2010; Theodosiou et al., 2016). Dieser Erklärungsansatz ließe auf Grund der Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit für die Thrombozyten der HPA-1a-Variante die Schlussfolgerung zu, dass der Einsatz β_3 -mimetischer Peptide eine eingeschränkte Talin-abhängige Integrin-Aktivierung verursacht. Möglicherweise ist die Talin-Bindungsstelle bei Thrombozyten der HPA-1b-Variante schon für die Bindung von Talin freigegeben.

Weiterführende Untersuchungen in unserem Institut haben in Experimenten zur statischen Adhäsion diesbezüglich gezeigt, dass β_3 -mimetische Peptide für die Bindungsstelle von Talin auf Fibronectin bei nicht Gen-selektierten Thrombozyten eine im ähnlichen Maß reduzierte Adhäsion aufweisen (24% +/- 2%) (vgl. Abb. 8). Aufbauende FACS-Analysen bestätigen den inhibierenden Einfluss β_3 -mimetischer Peptide für die Bindungsstelle von Kindlin-3 bzw. Talin auf die Adhäsionsfähigkeit bei nicht Gen-selektierten Thrombozyten (Nguyen, 2016). Deshalb erscheint es mit Blick auf die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen unterschiedlichen Reaktionsweisen der Thrombozyten beider Genvarianten im Fall des Kindlin-3 sinnvoll und unabdingbar, diesen Vergleich auch mit β_3 -mimetischen Peptiden für die Bindungsstelle von Talin durchzuführen (im weiterführenden Schritt im gleichen Inkubationsansatz). Auch im Fall des Talins ist die prokoagulatorische HPA-1b-Variante in die Untersuchungen miteinzubeziehen.

4.2.4.2.4 Einfluss von ADAP

Im Zusammenhang der Integrinaktivierung spielt ein weiteres Adaptorprotein eine Rolle. ADAP („adhesion and degranulation-promoting adaptor protein“) ist ein auf das hämatopoetische System beschränktes 120/130 kDa („alternatively spliced“) Funktionsprotein (da Silva et al., 1997; Jarvis et al., 2012; Togni et al., 2012). Neben verschiedenen Wirkzellen wie T-Lymphozyten und Thrombozyten (Jarvis et al., 2012; Kasirer-Friede et al., 2014; Kliche et al., 2012) besitzt ADAP eine Vielzahl von Bindungspartnern (Thiere et al., 2016). In T-Lymphozyten bildet es zum Beispiel mit SKAP55 („Src kinase-associated phosphoprotein 55“) einen Komplex, der im Zuge der T-Zell-Rezeptoraktivierung am *Inside-out-signaling* beteiligt ist und somit auch an der Zelladhäsion (Griffiths et al., 2001; Kliche et al., 2012, 2006).

Auch in Thrombozyten ist ADAP neueren Erkenntnissen zufolge Bestandteil der Signalkaskade der $\alpha_{11b}\beta_3$ -Rezeptor-Aktivierung. Es wirkt hier zusammen mit den Adaptorproteinen Kindlin-3 und Talin. Kasirer-Friede et al. (2014) konnten zeigen, dass ADAP Bindungsstellen für diese beiden Proteine besitzt. Ein Fehlen von ADAP in Zellen hat Einfluss auf die Talin-abhängige Integrin-Aktivierung über die β_3 -Untereinheit. Es wird hier auch anhand von CHO Zellen, die u.a. mit dem $\alpha_{11b}\beta_3$ -Rezeptor, Talin, Kindlin-3 und ADAP transfektiert wurden, aufgezeigt, dass ein Talin-Integrin-Komplex die Wirkung von Kindlin-3 am Integrin mit ermöglicht. Diese Wirkung äußert sich dann in einer verstärkten Ligandenbindung an das $\alpha_{11b}\beta_3$ -Integrin im Sinne eines verstärkten *Inside-out signalings*.

ADAP ist folglich ein weiteres Trägerprotein, das einen regulierenden Bindungspartner von Kindlin-3 bzw. Talin darstellt. Durch die Einbeziehung von ADAP in den Prozess der Aktivierung des $\alpha_{11b}\beta_3$ -Integrins wird eine zusätzliche Komponente der Signaltransduktion definiert, bei der Kindlin-3 interagiert. In Konsequenz scheint Kindlin-3 auf mehreren Ebenen der $\alpha_{11b}\beta_3$ -Integrin-Rezeptoraktivierung eine Rolle zu spielen, auch unabhängig von der β_3 – Untereinheit. So könnte Kindlin-3 indirekt über ADAP die Talin-abhängige Integrin-Aktivierung beeinflussen. Eine Blockierung der Signalkaskade über die β_3 – Untereinheit durch das mimetische Peptid könnte eine verstärkte Wirkung von Kindlin-3 über den ADAP-Signalweg implizieren.

Die Komplexität der Interaktion zwischen Talin, Kindlin-3, ADAP und in zweiter Instanz der β_3 -Untereinheit gilt es genauer aufzuschlüsseln. Die Ergebnisse dieser Arbeit fordern zudem den weiteren Vergleich von Thrombozyten beider Genvarianten.

5 Ausblick & Schlussfolgerung

Die herausragende Stellung von Kindlin-3 im Wirkungsfeld von Zelladhäsion, Zellmigration und Zellüberleben ist offensichtlich. Neuere Publikationen bestätigen die Sonderstellung von Kindlin-3. Nahm man initial noch an, dass Kindlin-3 ein selektiv exprimiertes Protein der hämatopoetischen Zellreihe ist, so fanden unter anderem Bialkowska et al. (2010) heraus, dass Kindlin-3 auch in Endothelzellen vorhanden ist. Dort ist es eng assoziiert mit Strukturen, die an der Zelladhäsion beteiligt sind (Plow et al., 2016; Rognoni et al., 2016).

Untersuchungen an soliden Tumorzellen von Melanomen und Mammakarzinomen beschreiben eine progressive Metastasenbildung (Sossey-Alaoui et al., 2014). Auf genetischer Ebene fanden sich diesbezüglich Hypermethylierungen und diverse Deletionen als Auslöser einer verminderten Expression von Kindlin-3 in eben diesen Tumorzellen. Phänotypisch äußerte sich das Fehlen von Kindlin-3 in einer herabgesetzten und einer teilweise Talin-abhängigen Integrin-Aktivierung. Diese gestörte Tumorzelladhäsion führte dann im folgenden Schritt zu einer gesteigerten Tumorzellmigration und allogener Gewebsinvasion. Kindlin-3 scheint somit zusätzlich als Tumorsuppressorgen zu wirken (Delyon et al., 2015; Djaafri et al., 2014). Andere Daten legen nahe, dass Kindlin-3 für die CML-K562- Proliferation (Chronisch-Myeloischen-Leukämie Zelllinie K562) und die Tumorbildung durch Regulation der c-Myc-Proteinexpression erforderlich ist (Qu et al., 2015). Auch in Erythrozyten ist es Träger der Integrität der Membranstabilität und wirkt hier Integrin-unabhängig, da reife Erythrozyten keine Integrine auf ihrer Zellmembran tragen. Eine fehlende Expression von Kindlin-3 in Erythrozyten generiert eine abnorme Zellkonfiguration (Krüger et al., 2008; Pasini et al., 2006).

Diese neueren Beobachtungen unterstreichen die besondere Position von Kindlin-3 in Zelladhäsionsprozessen von verschiedensten Zellpopulationen generell und von Thrombozyten im Speziellen. Auch sprechen die Ergebnisse für viele zusätzliche Prozesse, an denen Kindlin-3 beteiligt ist, und unterstreichen die Multidimensionalität des Kindlin-3 im komplexen Ablauf der Hämostase (Plow et al., 2016; Sossey-Alaoui et al., 2014).

Dass die Familie der Kindline (1-3) als Garanten an einer intakten Zellintegrität maßgeblich beteiligt ist, wird mit Blick auf die Krankheiten deutlich, die ihr Fehlen verursacht. So birgt ein Defizit die Gefahr von Infektion, Osteoporose, Dermatose und im Falle von Thrombozyten die der Blutung (Herz et al., 2006; Lai-Cheong et al., 2010; Malinin et al., 2010, 2009; Moser et al., 2009). Schließlich finden sich Kindline nicht nur zytosolisch/membranständig, sie werden auch im Zellkern und an Zell-Zell-Übergängen exprimiert, wo sie Integrin-unabhängige Funktionen aufweisen, die fast völlig unerforscht sind (Karaköse et al., 2010; Moser et al., 2008).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Kindline nicht nur Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen darstellen, sondern darüber hinaus schon die Richtung vorgeben, in der zukünftige Untersuchungen erfolgsversprechend sind. Das gilt auch für die Methode zum Einsatz β_3 -mimetischer Peptide. Es wäre somit sinnvoll, das Spenderkollektiv für weitere Versuche dieser Art und darauf aufbauende Untersuchungen zu vergrößern.

Mit dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, Kindlin-3 als ein Schlüsselprotein in der Unterscheidung der Thrombozyten des Leu33/Pro33-Polymorphismus zu identifizieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben einen Unterschied zwischen den Thrombozyten der HPA-1a- und prothrombotischen HPA-1b-Variante. Es erscheint folgerichtig, diesen Unterschied, an dem Kindlin-3 auf Grund unserer Ergebnisse maßgeblich beteiligt ist, weiter vertiefend in vorgegebener Richtung zu beleuchten.

Eine Differenzierung von Patienten mit dem prothrombotischen HPA-1b/1b-Allel als Risikofaktor erhöht dann mittelfristig die Wahrscheinlichkeit einer erfolgsversprechenden selektiven medikamentösen Therapie auf Ebene des Kindlin-3.

6 Literaturverzeichnis

- Anthis, N.J.**, Wegener, K.L., Critchley, D.R., Campbell, I.D., 2010. Structural Diversity in Integrin/Talin Interactions. *Struct. Lond. Engl.* 1993 18, 1654–1666. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.09.018>
- Baker-Groberg, S.M.**, Cianchetti, F.A., Phillips, K.G., McCarty, O.J.T., 2014. Development of a method to quantify platelet adhesion and aggregation under static conditions. *Cell. Mol. Bioeng.* 7, 285–290. <https://doi.org/10.1007/s12195-014-0328-9>
- Bennett, J.S.**, 2015. A little bit of kindlin goes a long way. *Blood* 126, 2535–2536. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-675454>
- Bennett, J.S.**, 2005. Structure and function of the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. *J. Clin. Invest.* 115, 3363–3369. <https://doi.org/10.1172/JCI26989>
- Bennett, J.S.**, Berger, B.W., Billings, P.C., 2009. The structure and function of platelet integrins. *J. Thromb. Haemost. JTH* 7 Suppl 1, 200–205. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03378.x>
- Bennett, J.S.**, Catella-Lawson, F., Rut, A.R., Vilaire, G., Qi, W., Kapoor, S.C., Murphy, S., FitzGerald, G.A., 2001. Effect of the PIA2 alloantigen on the function of β3 -integrins in platelets. *Blood* 97, 3093–3099. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.10.3093>
- Bialkowska, K.**, Ma, Y.-Q., Bledzka, K., Sossey-Alaoui, K., Izem, L., Zhang, X., Malinin, N., Qin, J., Byzova, T., Plow, E.F., 2010. The integrin co-activator Kindlin-3 is expressed and functional in a non-hematopoietic cell, the endothelial cell. *J. Biol. Chem.* 285, 18640–18649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085746>
- Bledzka, K.**, Smyth, S.S., Plow, E.F., 2013a. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$: from discovery to efficacious therapeutic target. *Circ. Res.* 112, 1189–1200. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300570>
- Bledzka, K.**, Smyth, S.S., Plow, E.F., 2013b. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$: from discovery to efficacious therapeutic target. *Circ. Res.* 112, 1189–1200. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300570>
- Bojesen, S.E.**, Tybjaerg-Hansen, A., Nordestgaard, B.G., 2003. Integrin beta3 Leu33Pro homozygosity and risk of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 1150–1157.

- Brakebusch, C.**, Fässler, R., 2003. The integrin-actin connection, an eternal love affair.
EMBO J. 22, 2324–2333. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg245>
- Brooks, H.**, Lebleu, B., Vivès, E., 2005. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics.
Adv. Drug Deliv. Rev. 57, 559–577. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.12.001>
- Bussel, J.B.**, Kunicki, T.J., Michelson, A.D., 2000. Platelets: New Understanding of Platelet Glycoproteins and Their Role in Disease.
ASH Educ. Program Book 2000, 222–240. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2000.1.222>
- Byzova, T.V.**, Plow, E.F., 2000. The PIA2 allele and cardiovascular disease: the pro33 and con.
J. Clin. Invest. 105, 697–698.
- Byzova, T.V.**, Plow, E.F., 1997. Networking in the hemostatic system. Integrin α IIb β 3 binds prothrombin and influences its activation. J. Biol. Chem. 272, 27183–27188.
- Calderwood, D.A.**, Campbell, I.D., Critchley, D.R., 2013. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 14, 503–517. <https://doi.org/10.1038/nrm3624>
- Calderwood, D.A.**, Shattil, S.J., Ginsberg, M.H., 2000. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling.
J. Biol. Chem. 275, 22607–22610. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900037199>
- Campbell, I.D.**, Ginsberg, M.H., 2004. The talin–tail interaction places integrin activation on FERM ground.
Trends Biochem. Sci. 29, 429–435. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.06.005>
- Cannon, C.P.**, 2003. Oral platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors--Part I.
Clin. Cardiol. 26, 358–364.
- Chew, D.P.**, Bhatt, D.L., Topol, E.J., 2001. Oral glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: why don't they work?
Am. J. Cardiovasc. Drugs Drugs Devices Interv. 1, 421–428.
- Cierniewski, C.S.**, Byzova, T., Papierak, M., Haas, T.A., Niewiarowska, J., Zhang, L., Cieslak, M., Plow, E.F., 1999. Peptide Ligands Can Bind to Distinct Sites in Integrin α IIb β 3 and Elicit Different Functional Responses.
J. Biol. Chem. 274, 16923–16932. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16923>

- Cluzel, C.**, Saltel, F., Lussi, J., Paulhe, F., Imhof, B.A., Wehrle-Haller, B., 2005. The mechanisms and dynamics of $\alpha\beta 3$ integrin clustering in living cells. *J Cell Biol* 171, 383–392. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503017>
- Coller, B.S.**, 2015. $\alpha\text{IIb}\beta 3$: structure and function. *J. Thromb. Haemost. JTH* 13, S17–S25. <https://doi.org/10.1111/jth.12915>
- Coller, B.S.**, 1987. Blood Elements at Surfaces: Platelets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 516, 362–379. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb33056.x>
- Cram, E.J.**, Clark, S.G., Schwarzbauer, J.E., 2003. Talin loss-of-function uncovers roles in cell contractility and migration in *C. elegans*. *J. Cell Sci.* 116, 3871–3878. <https://doi.org/10.1242/jcs.00705>
- Crazzolaro, R.**, Maurer, K., Schulze, H., Zieger, B., Zustin, J., Schulz, A.S., 2015. A new mutation in the KINDLIN-3 gene ablates integrin-dependent leukocyte, platelet, and osteoclast function in a patient with leukocyte adhesion deficiency-III. *Pediatr. Blood Cancer* 62, 1677–1679. <https://doi.org/10.1002/pbc.25537>
- Crivat, G.**, Tokumasu, F., Sa, J.M., Hwang, J., Wellems, T.E., 2011. Tetracysteine-Based Fluorescent Tags to Study Protein Localization and Trafficking in *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. *PLoS ONE* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022975>
- Cui, S.-Q.**, Wang, H., 2015. MicroRNA-144 inhibits the proliferation, apoptosis, invasion, and migration of osteosarcoma cell line F5M2. *Tumor Biol.* 36, 6949–6958. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3396-0>
- Da Silva, A.J.**, Li, Z., de Vera, C., Canto, E., Findell, P., Rudd, C.E., 1997. Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 7493–7498.
- Delyon, J.**, Khayati, F., Djaafri, I., Podgorniak, M.-P., Sadoux, A., Setterblad, N., Boutalbi, Z., Maouche, K., Maskos, U., Menashi, S., Lebbé, C., Mourah, S., 2015. EMMPRIN regulates $\beta 1$ integrin-mediated adhesion through Kindlin-3 in human melanoma cells. *Exp. Dermatol.* 24, 443–448. <https://doi.org/10.1111/exd.12693>
- Denli, A.M.**, Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., Hannon, G.J., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>

Di Castelnuovo, A., de Gaetano, G., Benedetta Donati, M., Iacoviello, L., 2005. Platelet glycoprotein IIb/IIIa polymorphism and coronary artery disease: implications for clinical practice. *Am. J. Pharmacogenomics Genomics-Relat. Res. Drug Dev. Clin. Pract.* 5, 93–99.

Dimitriou, A.A., Stathopoulos, P., Mitsios, J.V., Sakarellos-Daitsiotis, M., Goudevenos, J., Tsikaris, V., Tselepis, A.D., 2009. Inhibition of platelet activation by peptide analogs of the beta(3)-intracellular domain of platelet integrin alpha(IIb)beta(3) conjugated to the cell-penetrating peptide Tat(48-60). *Platelets* 20, 539–547. <https://doi.org/10.3109/09537100903324219>

Djaafri, I., Khayati, F., Menashi, S., Tost, J., Podgorniak, M.-P., Sadoux, A., Daunay, A., Teixeira, L., Soulier, J., Idbaih, A., Setterblad, N., Fauvel, F., Calvo, F., Janin, A., Lebbé, C., Mourah, S., 2014. A novel tumor suppressor function of Kindlin-3 in solid cancer. *Oncotarget* 5, 8970–8985.

Elgheznawy, A., Shi, L., Hu, J., Wittig, I., Laban, H., Pircher, J., Mann, A., Provost, P., Randriamboavonjy, V., Fleming, I., 2015. Dicer cleavage by calpain determines platelet microRNA levels and function in diabetes. *Circ. Res.* 117, 157–165. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305784>

Fagerholm, S.C., Lek, H.S., Morrison, V.L., 2014. Kindlin-3 in the immune system. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 3, 37–42.

Fassihi, H., Wessagowit, V., Jones, C., Dopping-Hepenstal, P., Denyer, J., Mellerio, J.E., Clark, S., McGrath, J.A., 2005. Neonatal diagnosis of Kindler syndrome. *J. Dermatol. Sci.* 39, 183–185. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2005.05.007>

Futaki, S., Goto, S., Suzuki, T., Nakase, I., Sugiura, Y., 2003. Structural variety of membrane permeable peptides. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4, 87–96.

Futaki, S., Ohashi, W., Suzuki, T., Niwa, M., Tanaka, S., Ueda, K., Harashima, H., Sugiura, Y., 2001. Stearylated arginine-rich peptides: a new class of transfection systems. *Bioconjug. Chem.* 12, 1005–1011.

Gawaz, M., Neumann, F.J., Schomig, A., 1999. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy. *Circulation* 99, E1–E11.

Ghosh, K., Kulkarni, B., Nair, S., Shetty, S., Mohanty, D., 2002. Human platelet alloantigen polymorphism in Glanzmann's thrombasthenia and its impact on the severity of the disease.
Br. J. Haematol. 119, 348–353.

Giancotti, F.G., Ruoslahti, E., 1999. Integrin signaling. Science 285, 1028–1032.

Ginsberg, M.H., Partridge, A., Shattil, S.J., 2005. Integrin regulation.
Curr. Opin. Cell Biol. 17, 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.010>

Gottschalk, K.E., Adams, P.D., Brunger, A.T., Kessler, H., 2002. Transmembrane signal transduction of the $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ integrin.
Protein Sci. Publ. Protein Soc. 11, 1800–1812.

Griffiths, E.K., Krawczyk, C., Kong, Y.-Y., Raab, M., Hyduk, S.J., Bouchard, D., Chan, V.S., Kozieradzki, I., Oliveira-dos-Santos, A.J., Wakeham, A., Ohashi, P.S., Cybulsky, M.I., Rudd, C.E., Penninger, J.M., 2001. Positive Regulation of T Cell Activation and Integrin Adhesion by the Adapter Fyb/Slap.
Science 293, 2260–2263. <https://doi.org/10.1126/science.1063397>

Grotto, R.M.T., Picelli, N., de Souza, L. do R., Silva, G.F., Ferrasi, A.C., Silveira, L.V. de A., Pardini, M.I. de M.C., 2015. Human Platelet Polymorphism can be a genetic marker associated with HIV/HCV coinfection.
J. Med. Virol. 87, 1677–1681. <https://doi.org/10.1002/jmv.24233>

Guo, Z., Peng, H., Kang, J., Sun, D., 2016. Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications.
Biomed. Rep. 4, 528–534. <https://doi.org/10.3892/br.2016.639>

H Brown, N., Gregory, S., Rickoll, W., I Fessler, L., Prout, M., A.H. White, R., W Fristrom, J., 2002. Talin Is Essential for Integrin Function in Drosophila.
Dev. Cell 3, 569–79. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00290-3)

Harburger, D.S., Bouaouina, M., Calderwood, D.A., 2009. Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects.
J. Biol. Chem. 284, 11485–11497. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809233200>

Harburger, D.S., Calderwood, D.A., 2009. Integrin signalling at a glance.
J. Cell Sci. 122, 159–163. <https://doi.org/10.1242/jcs.018093>

He, L., Watson, P.D., Jones, A.T., 2015. Visualizing Actin Architectures in Cells Incubated with Cell-Penetrating Peptides. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1324, 247–259. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2806-4_16

Herce, H.D., Garcia, A.E., Litt, J., Kane, R.S., Martin, P., Enrique, N., Rebolledo, A., Milesi, V., 2009. Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophys. J.* 97, 1917–1925. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.05.066>

Herz, C., Aumailley, M., Schulte, C., Schlötzer-Schrehardt, U., Bruckner-Tuderman, L., Has, C., 2006. Kindlin-1 Is a Phosphoprotein Involved in Regulation of Polarity, Proliferation, and Motility of Epidermal Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 281, 36082–36090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606259200>

Hoffmann, C., Gaietta, G., Bünemann, M., Adams, S.R., Oberdorff-Maass, S., Behr, B., Vilardaga, J.-P., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H., Lohse, M.J., 2005. A FIAsH-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat. Methods* 2, 171–176. <https://doi.org/10.1038/nmeth742>

Hoffmann, C., Gaietta, G., Zürn, A., Adams, S.R., Terrillon, S., Ellisman, M.H., Tsien, R.Y., Lohse, M.J., 2010a. Fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins in intact cells. *Nat. Protoc.* 5, 1666–1677. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.129>

Hoffmann, C., Gaietta, G., Zürn, A., Adams, S.R., Terrillon, S., Ellisman, M.H., Tsien, R.Y., Lohse, M.J., 2010b. Fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins in intact cells. *Nat. Protoc.* 5, 1666–1677. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.129>

Hynes, R.O., 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673–687.

Irtegun, S., Ramdzan, Y.M., Mulhern, T.D., Hatters, D.M., 2011a. ReAsH/FIAsH labeling and image analysis of tetracysteine sensor proteins in cells. *J. Vis. Exp. JoVE*. <https://doi.org/10.3791/2857>

Irtegun, S., Ramdzan, Y.M., Mulhern, T.D., Hatters, D.M., 2011b. ReAsH/FIAsH Labeling and Image Analysis of Tetracysteine Sensor Proteins in Cells. *J. Vis. Exp. JoVE*. <https://doi.org/10.3791/2857>

Ivanov, P., Komsa-Penkova, R., Ivanov, I., Konova, E., Kovacheva, K., Stoïkov, S., Popov, I., 2008. [High risk of recurrent spontaneous abortion during second trimester in women carriers of polymorphism A2 in platelet glycoprotein IIb/IIIa]. *Akush. Ginekol. (Sofia)* 47, 3–9.

Jallu, V., Poulain, P., Fuchs, P.F.J., Kaplan, C., de Brevern, A.G., 2012. Modeling and molecular dynamics of HPA-1a and -1b polymorphisms: effects on the structure of the $\beta 3$ subunit of the $\alpha \text{IIb}\beta 3$ integrin. *PloS One* 7, e47304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047304>

Jarvis, G.E., Bihan, D., Hamaia, S., Pugh, N., Ghevaert, C.J.G., Pearce, A.C., Hughes, C.E., Watson, S.P., Ware, J., Rudd, C.E., Farndale, R.W., 2012. A role for adhesion and degranulation-promoting adapter protein in collagen-induced platelet activation mediated via integrin $\alpha(2)\beta(1)$. *J. Thromb. Haemost. JTH* 10, 268–277. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04567.x>

Joo, S.-J., 2012. Mechanisms of Platelet Activation and Integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$. *Korean Circ. J.* 42, 295–301. <https://doi.org/10.4070/kcj.2012.42.5.295>

Jurk, K., Kehrel, B.E., 2005. [Platelets and the new comprehension of haemostasis]. *Hämostaseologie* 25, 39–49. <https://doi.org/10.1267/Hämo05010039>

Jurk, K., Schulz, A.S., Kehrel, B.E., Räßle, D., Schulze, H., Möbest, D., Friedrich, W.W., Omran, H., Deak, E., Henschler, R., Scheele, J.S., Zieger, B., 2010. Novel integrin-dependent platelet malfunction in siblings with leukocyte adhesion deficiency-III (LAD-III) caused by a point mutation in FERMT3. *Thromb. Haemost.* 103, 1053–1064. <https://doi.org/10.1160/TH09-10-0689>

Kahner, B.N., Kato, H., Banno, A., Ginsberg, M.H., Shattil, S.J., Ye, F., 2012. Kindlins, integrin activation and the regulation of talin recruitment to $\alpha \text{IIb}\beta 3$. *PloS One* 7, e34056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034056>

Karaköse, E., Schiller, H.B., Fässler, R., 2010. The kindlins at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 2353–2356. <https://doi.org/10.1242/jcs.064600>

Kasirer-Friede, A., Kang, J., Kahner, B., Ye, F., Ginsberg, M.H., Shattil, S.J., 2014. ADAP interactions with talin and kindlin promote platelet integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ activation and stable fibrinogen binding. *Blood* 123, 3156–3165. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-520627>

Kasirer-Friede, A., Ware, J., Leng, L., Marchese, P., Ruggeri, Z.M., Shattil, S.J., 2002. Lateral clustering of platelet GP Ib-IX complexes leads to up-regulation of the adhesive function of integrin alpha IIb beta 3.

J. Biol. Chem. 277, 11949–11956. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108727200>

Keller, T.C.S., Butcher, J.T., Broseghini-Filho, G.B., Marziano, C., DeLalio, L.J., Rogers, S., Ning, B., Martin, J.N., Chechova, S., Cabot, M., Shu, X., Best, A.K., Good, M.E., Simão Padilha, A., Purdy, M., Yeager, M., Peirce, S.M., Hu, S., Doctor, A., Barrett, E., Le, T.H., Columbus, L., Isakson, B.E., 2016. Modulating Vascular Hemodynamics With an Alpha Globin Mimetic Peptide (HbaX).

Hypertens. Dallas Tex 1979.

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08171>

Kim, M., Carman, C.V., Springer, T.A., 2003. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins.

Science 301, 1720–1725. <https://doi.org/10.1126/science.1084174>

Klapproth, S., Moretti, F.A., Zeiler, M., Ruppert, R., Breithaupt, U., Mueller, S., Haas, R., Mann, M., Sperandio, M., Fässler, R., Moser, M., 2015. Minimal amounts of kindlin-3 suffice for basal platelet and leukocyte functions in mice.

Blood 126, 2592–2600. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-639310>

Kliche, S., Breitling, D., Togni, M., Pusch, R., Heuer, K., Wang, X., Freund, C., Kasirer-Friede, A., Menasche, G., Koretzky, G.A., Schraven, B., 2006. The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1.

Mol. Cell. Biol. 26, 7130–7144. <https://doi.org/10.1128/MCB.00331-06>

Kliche, S., Worbs, T., Wang, X., Degen, J., Patzak, I., Meineke, B., Togni, M., Moser, M., Reinhold, A., Kiefer, F., Freund, C., Förster, R., Schraven, B., 2012. CCR7-mediated LFA-1 functions in T cells are regulated by 2 independent ADAP/SKAP55 modules.

Blood 119, 777–785. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-362269>

Kloeker, S., Major, M.B., Calderwood, D.A., Ginsberg, M.H., Jones, D.A., Beckerle, M.C., 2004. The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion.

J. Biol. Chem. 279, 6824–6833. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307978200>

Kössler, J., Steigerwald, U., Walter, U., 2009. [Anticoagulants of primary haemostasis]. Hämostaseologie 29, 274–278.

Krüger, M., Moser, M., Ussar, S., Thievensen, I., Lubber, C.A., Forner, F., Schmidt, S., Zanivan, S., Fässler, R., Mann, M., 2008. SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell* 134, 353–364. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.033>

Kuijpers, T.W., van de Vijver, E., Weterman, M.A.J., de Boer, M., Tool, A.T.J., van den Berg, T.K., Moser, M., Jakobs, M.E., Seeger, K., Sanal, O., Unal, S., Cetin, M., Roos, D., Verhoeven, A.J., Baas, F., 2009. LAD-1/variant syndrome is caused by mutations in FERMT3. *Blood* 113, 4740–4746. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-182154>

Lai-Cheong, J.E., Parsons, M., McGrath, J.A., 2010. The role of kindlins in cell biology and relevance to human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 595–603. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.10.015>

Lambrinoudaki, I., Armeni, E., Kaparos, G.J., Christodoulakos, G.E., Sergentanis, T.N., Alexandrou, A., Creatsa, M., Kouskouni, E., 2010. The frequency of early, spontaneous miscarriage associated with the leu33pro polymorphism of Glycoprotein IIIa: a pilot study. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 50, 485–490. <https://doi.org/10.1111/j.1479-828X.2010.01196.x>

Larjava, H., Plow, E.F., Wu, C., 2008. Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell–matrix adhesion. *EMBO Rep.* 9, 1203–1208. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.202>

Leebeek, F.W.G., Boersma, E., Cannon, C.P., van de Werf, F.J.J., Simoons, M.L., 2002. Oral glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors in patients with cardiovascular disease: why were the results so unfavourable. *Eur. Heart J.* 23, 444–457. <https://doi.org/10.1053/euhj.2001.2751>

Lefkowitz, R.J., Willerson, J.T., 2001. Prospects for cardiovascular research. *JAMA* 285, 581–587.

Legate, K.R., Wickström, S.A., Fässler, R., 2009. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 23, 397–418. <https://doi.org/10.1101/gad.1758709>

Liao, Z., Kato, H., Pandey, M., Cantor, J.M., Ablooglu, A.J., Ginsberg, M.H., Shattil, S.J., 2015. Interaction of kindlin-2 with integrin $\beta 3$ promotes outside-in signaling responses by the $\alpha V\beta 3$ vitronectin receptor. *Blood* 125, 1995–2004. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-603035>

Lindsay, C.R., Edelstein, L.C., 2016. MicroRNAs in Platelet Physiology and Function. *Semin. Thromb. Hemost.* 42, 215–222. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1570077>

Litjens, P.E.M.H., Kroner, C.I., Akkerman, J.W.N., Van Willigen, G., 2003. Cytoplasmic regions of the beta3 subunit of integrin alphaIIb beta3 involved in platelet adhesion on fibrinogen under flow conditions. *J. Thromb. Haemost. JTH* 1, 2014–2021.

Liu, S., Calderwood, D.A., Ginsberg, M.H., 2000. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 20), 3563–3571.

Liu, X.Y., Timmons, S., Lin, Y.Z., Hawiger, J., 1996. Identification of a functionally important sequence in the cytoplasmic tail of integrin beta 3 by using cell-permeable peptide analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11819–11824.

Loncar, R., Stoldt, V., Hellmig, S., Zotz, R.B., Mihalj, M., Scharf, R.E., 2007. HPA-1 polymorphism of alphaIIb beta3 modulates platelet adhesion onto immobilized fibrinogen in an in-vitro flow system. *Thromb. J.* 5, 2. <https://doi.org/10.1186/1477-9560-5-2>

Lu, L., Lin, C., Yan, Z., Wang, S., Zhang, Y., Wang, S., Wang, J., Liu, C., Chen, J., 2016. Kindlin-3 Is Essential for the Resting $\alpha 4 \beta 1$ Integrin-mediated Firm Cell Adhesion under Shear Flow Conditions. *J. Biol. Chem.* 291, 10363–10371. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.717694>

Luo, B.-H., Carman, C.V., Springer, T.A., 2007. Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 619–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618>

Ma, Y.-Q., Qin, J., Wu, C., Plow, E.F., 2008. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins. *J. Cell Biol.* 181, 439–446. <https://doi.org/10.1083/jcb.200710196>

Ma, Y.-Q., Yang, J., Pesho, M.M., Vinogradova, O., Qin, J., Plow, E.F., 2006. Regulation of integrin alphaIIb beta3 activation by distinct regions of its cytoplasmic tails. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 6656–6662. <https://doi.org/10.1021/bi060279h>

Malinin, N.L., Plow, E.F., Byzova, T.V., 2010. Kindlins in FERM adhesion. *Blood* 115, 4011–4017. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-239269>

Malinin, N.L., Zhang, L., Choi, J., Ciocea, A., Razorenova, O., Ma, Y.-Q., Podrez, E.A., Tosi, M., Lennon, D.P., Caplan, A.I., Shurin, S.B., Plow, E.F., Byzova, T.V., 2009. A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies

in humans. *Nat. Med.* 15, 313–318. <https://doi.org/10.1038/nm.1917>

Massberg, S., Brand, K., Grüner, S., Page, S., Müller, E., Müller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., Nieswandt, B., Gawaz, M., 2002. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation.

J. Exp. Med. 196, 887–896.

McCarty, O.J.T., Zhao, Y., Andrew, N., Machesky, L.M., Staunton, D., Frampton, J., Watson, S.P., 2004. Evaluation of the role of platelet integrins in fibronectin-dependent spreading and adhesion. *J. Thromb. Haemost. JTH* 2, 1823–1833.

<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00925.x>

Metcalf, D.G., Moore, D.T., Wu, Y., Kielec, J.M., Molnar, K., Valentine, K.G., Wand, A.J., Bennett, J.S., DeGrado, W.F., 2010. NMR analysis of the alphaIIb beta3 cytoplasmic interaction suggests a mechanism for integrin regulation.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 22481–22486.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1015545107>

Meves, A., Stremmel, C., Gottschalk, K., Fässler, R., 2009. The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins.

Trends Cell Biol. 19, 504–513. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.07.006>

Michelson, A.D., Furman, M.I., Goldschmidt-Clermont, P., Mascelli, M.A., Hendrix, C., Coleman, L., Hamlington, J., Barnard, M.R., Kickler, T., Christie, D.J., Kundu, S., Bray, P.F., 2000. Platelet GP IIIa PI(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists.

Circulation 101, 1013–1018.

Montanez, E., Ussar, S., Schifferer, M., Bösl, M., Zent, R., Moser, M., Fässler, R., 2008. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins.

Genes Dev. 22, 1325–1330. <https://doi.org/10.1101/gad.469408>

Mory, A., Feigelson, S.W., Yarali, N., Kilic, S.S., Bayhan, G.I., Gershoni-Baruch, R., Etzioni, A., Alon, R., 2008. Kindlin-3: a new gene involved in the pathogenesis of LAD-III.

Blood 112, 2591. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-163162>

Moser, M., Legate, K.R., Zent, R., Fässler, R., 2009. The tail of integrins, talin, and kindlins.

Science 324, 895–899. <https://doi.org/10.1126/science.1163865>

Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M., Fässler, R., 2008. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat. Med.* 14, 325–330. <https://doi.org/10.1038/nm1722>

Nakazawa, T., Tadokoro, S., Kamae, T., Kiyomizu, K., Kashiwagi, H., Honda, S., Kanakura, Y., Tomiyama, Y., 2013. Agonist stimulation, talin-1, and kindlin-3 are crucial for $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK. *Exp. Hematol.* 41, 79–90.e1. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2012.09.011>

Nguyen, T.T.H., n.d. Role of kindlin and talin in the fibrillogenesis of fibronectin by platelet integrins exposed to fluid shear forces [WWW Document]. URL <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=36555> (accessed 1.3.17).

Ni, T., Kalli, A.C., Naughton, F.B., Yates, L.A., Naneh, O., Kozorog, M., Anderluh, G., Sansom, M.S.P., Gilbert, R.J.C., 2017. Structure and lipid-binding properties of the kindlin-3 pleckstrin homology domain. *Biochem. J.* 474, 539–556. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160791>

Nieswandt, B., Moser, M., Pleines, I., Varga-Szabo, D., Monkley, S., Critchley, D., Fässler, R., 2007. Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 204, 3113–3118. <https://doi.org/10.1084/jem.20071827>

Obergfell, A., Eto, K., Mocsai, A., Buensuceso, C., Moores, S.L., Brugge, J.S., Lowell, C.A., Shattil, S.J., 2002. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $[\alpha]\text{IIb}[\beta]3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 157, 265–275. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112113>

Pasini, E.M., Kirkegaard, M., Mortensen, P., Lutz, H.U., Thomas, A.W., Mann, M., 2006. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood* 108, 791–801. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-007799>

Petrich, B.G., Marchese, P., Ruggeri, Z.M., Spiess, S., Weichert, R.A.M., Ye, F., Tiedt, R., Skoda, R.C., Monkley, S.J., Critchley, D.R., Ginsberg, M.H., 2007. Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis. *J. Exp. Med.* 204, 3103–3111. <https://doi.org/10.1084/jem.20071800>

- Phillips, D.R.**, Nannizzi-Alaimo, L., Prasad, K.S., 2001. Beta3 tyrosine phosphorylation in alphaIIb beta3 (platelet membrane GP IIb-IIIa) outside-in integrin signaling. *Thromb. Haemost.* 86, 246–258.
- Plow, E.F.**, Das, M., Bialkowska, K., Sossey-Alaoui, K., 2016. Of Kindlins and Cancer. *Discov. Craiova Rom.* 4. <https://doi.org/10.15190/d.2016.6>
- Provost, P., 2017. The clinical significance of platelet microparticle-associated microRNAs. *Clin. Chem. Lab. Med.* 55, 657–666. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0895>
- Qu, H.**, Tu, Y., Shi, X., Larjava, H., Saleem, M.A., Shattil, S.J., Fukuda, K., Qin, J., Kretzler, M., Wu, C., 2011. Kindlin-2 regulates podocyte adhesion and fibronectin matrix deposition through interactions with phosphoinositides and integrins. *J. Cell Sci.* 124, 879–891. <https://doi.org/10.1242/jcs.076976>
- Qu, J.**, Ero, R., Feng, C., Ong, L.-T., Tan, H.-F., Lee, H.-S., Ismail, M.H., Bu, W.-T., Nama, S., Sampath, P., Gao, Y.-G., Tan, S.-M., 2015. Kindlin-3 interacts with the ribosome and regulates c-Myc expression required for proliferation of chronic myeloid leukemia cells. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/srep18491>
- Ratnikov, B.I.**, Partridge, A.W., Ginsberg, M.H., 2005. Integrin activation by talin. *J. Thromb. Haemost. JTH* 3, 1783–1790. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01362.x>
- Reiner, A.P.**, Siscovick, D.S., Rosendaal, F.R., 2001. Platelet glycoprotein gene polymorphisms and risk of thrombosis: facts and fancies. *Rev. Clin. Exp. Hematol.* 5, 262–287; discussion 311–312.
- Richard, J.P.**, Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V., Lebleu, B., 2003. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* 278, 585–590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209548200>
- Rizzuti, M.**, Nizzardo, M., Zanetta, C., Ramirez, A., Corti, S., 2015. Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide. *Drug Discov. Today* 20, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.017>

- Roberts, G.C.K.**, Critchley, D.R., 2009. Structural and biophysical properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Biophys. Rev.* 1, 61–69. <https://doi.org/10.1007/s12551-009-0009-4>
- Rognoni, E.**, Ruppert, R., Fässler, R., 2016. The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease. *J Cell Sci* 129, 17–27. <https://doi.org/10.1242/jcs.161190>
- Rojas, A.I.**, Ahmed, A.R., 1999. Adhesion receptors in health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* 10, 337–358.
- Rozman, P.**, Drabbels, J., Schipper, R.F., Doxiadis, I., Stein, S., Claas, F.H., 1999. Genotyping for human platelet-specific antigens HPA-1, -2, -3, -4 and -5 in the Slovenian population reveals a slightly increased frequency of HPA-1b and HPA-2b as compared to other European populations. *Eur. J. Immunogenetics Off. J. Br. Soc. Histocompat. Immunogenetics* 26, 265–269.
- Sabnis, H.**, Kirpalani, A., Horan, J., McDowall, A., Svensson, L., Cooley, A., Merck, T., Jobe, S., Hogg, N., Briones, M., 2010. Leukocyte adhesion deficiency-III in an African-American patient. *Pediatr. Blood Cancer* 55, 180–182. <https://doi.org/10.1002/pbc.22386>
- Scharf, R.**, Adams, H.A., Baumann, G., Cascorbi, I., Emmel, M., Fischer, D., Flohé, S., Fries, D., Gänsslen, A., Geiger, S., Heller, A., Hildebrand, F., Klar, E., Klippe, H.J., Lampl, L., Prange, H., Rolle, U., Sarrafzadeh, A., Standl, T., Schock Der Divi, S., 2016. Haemostasis in shock Part 3: General pathophysiology.
- Schmidt, S.**, Nakchbandi, I., Ruppert, R., Kawelke, N., Hess, M.W., Pfaller, K., Jurdic, P., Fässler, R., Moser, M., 2011. Kindlin-3-mediated signaling from multiple integrin classes is required for osteoclast-mediated bone resorption. *J. Cell Biol.* 192, 883–897. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007141>
- Schwartz, M.A.**, Ginsberg, M.H., 2002. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat. Cell Biol.* 4, E65–68. <https://doi.org/10.1038/ncb0402-e65>
- Shattil, S.J.**, Kim, C., Ginsberg, M.H., 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 288–300. <https://doi.org/10.1038/nrm2871>

Shattil, S.J., Newman, P.J., 2004. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets.
Blood 104, 1606–1615. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1257>

Shi, X., Ma, Y.-Q., Tu, Y., Chen, K., Wu, S., Fukuda, K., Qin, J., Plow, E.F., Wu, C., 2007. The MIG-2/integrin interaction strengthens cell-matrix adhesion and modulates cell motility.
J. Biol. Chem. 282, 20455–20466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611680200>

Simon, S.I., 2015. You've got to be kindlin!
Blood 125, 1855–1856. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-623843>

Small, E.M., Frost, R.J.A., Olson, E.N., 2010. MicroRNAs Add a New Dimension to Cardiovascular Disease. Circulation 121, 1022–1032.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.889048>

Song, X., Yang, J., Hirbawi, J., Ye, S., Perera, H.D., Goksoy, E., Dwivedi, P., Plow, E.F., Zhang, R., Qin, J., 2012. A novel membrane-dependent on/off switch mechanism of talin FERM domain at sites of cell adhesion.
Cell Res. 22, 1533–1545. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.97>

Sossey-Alaoui, K., Pluskota, E., Davuluri, G., Bialkowska, K., Das, M., Szpak, D., Lindner, D.J., Downs-Kelly, E., Thompson, C.L., Plow, E.F., 2014. Kindlin-3 enhances breast cancer progression and metastasis by activating Twist-mediated angiogenesis.
FASEB J. 28, 2260–2271. <https://doi.org/10.1096/fj.13-244004>

Stassen, J.M., Arnout, J., Deckmyn, H., 2004. The hemostatic system.
Curr. Med. Chem. 11, 2245–2260.

Stroffekova, K., Proenza, C., Beam, K.G., 2001. The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins.
Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol. 442, 859–866.

Sucker, C., Schmitz, M., Hetzel, G.R., Grabensee, B., Maruhn-Debowski, B., Ostojic, L., Scharf, R.E., Zotz, R.B., 2009. Are prothrombotic variants of platelet glycoprotein receptor polymorphisms involved in the pathogenesis of thrombotic microangiopathies? Clin. Appl. Thromb. Off. J. Int. Acad. Clin. Appl. Thromb. 15, 402–407. <https://doi.org/10.1177/1076029608316015>

Svensson, L., Howarth, K., McDowall, A., Patzak, I., Evans, R., Ussar, S., Moser, M., Metin, A., Fried, M., Tomlinson, I., Hogg, N., 2009. Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nat. Med.* 15, 306–312. <https://doi.org/10.1038/nm.1931>

Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., de Pereda, J.M., Ginsberg, M.H., Calderwood, D.A., 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302, 103–106. <https://doi.org/10.1126/science.1086652>

Takagi, J., Petre, B.M., Walz, T., Springer, T.A., 2002. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110, 599–511.

Theodosiou, M., Widmaier, M., Böttcher, R.T., Rognoni, E., Veelders, M., Bharadwaj, M., Lambacher, A., Austen, K., Müller, D.J., Zent, R., Fässler, R., 2016. Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *eLife* 5, e10130. <https://doi.org/10.7554/eLife.10130>

Thiere, M., Kliche, S., Müller, B., Teuber, J., Nold, I., Stork, O., 2016. Integrin Activation Through the Hematopoietic Adapter Molecule ADAP Regulates Dendritic Development of Hippocampal Neurons. *Front. Mol. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00091>

Togni, M., Engelmann, S., Reinhold, D., Schraven, B., Reinhold, A., 2012. The adapter protein ADAP is required for selected dendritic cell functions. *Cell Commun. Signal. CCS* 10, 14. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-10-14>

Tozer, E.C., Baker, E.K., Ginsberg, M.H., Loftus, J.C., 1999. A Mutation in the α Subunit of the Platelet Integrin α IIb β 3 Identifies a Novel Region Important for Ligand Binding. *Blood* 93, 918–924.

Ussar, S., Wang, H.-V., Linder, S., Fässler, R., Moser, M., 2006. The Kindlins: subcellular localization and expression during murine development. *Exp. Cell Res.* 312, 3142–3151. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.06.030>

Verdoia, M., Casseti, E., Schaffer, A., Giovine, G.D., Luca, G.D., 2015. Platelet glycoprotein IIIa Leu33Pro gene polymorphism and coronary artery disease: A meta-analysis of cohort studies. *Platelets* 26, 530–535. <https://doi.org/10.3109/09537104.2014.948839>

- Verran, J.**, Grey, D., Bennett, J., Lown, J.A., Erber, W.N., 2000. HPA-1, 3, 5 genotyping to establish a typed platelet donor panel. *Pathology (Phila.)* 32, 89–93.
- Vijayan, K.V.**, Bray, P.F., 2006. Molecular mechanisms of prothrombotic risk due to genetic variations in platelet genes: Enhanced outside-in signaling through the Pro33 variant of integrin beta3. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* 231, 505–513.
- Vijayan, K.V.**, Goldschmidt-Clermont, P.J., Roos, C., Bray, P.F., 2000. The PI(A2) polymorphism of integrin beta(3) enhances outside-in signaling and adhesive functions. *J. Clin. Invest.* 105, 793–802. <https://doi.org/10.1172/JCI6982>
- Vijayan, K.V.**, Liu, Y., Li, T.-T., Bray, P.F., 2004. Protein Phosphatase 1 Associates with the Integrin α IIb Subunit and Regulates Signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 33039–33042. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400239200>
- Vijayan, K.V.**, Liu, Y., Sun, W., Ito, M., Bray, P.F., 2005. The Pro33 isoform of integrin beta3 enhances outside-in signaling in human platelets by regulating the activation of serine/threonine phosphatases. *J. Biol. Chem.* 280, 21756–21762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500872200>
- Vivès, E.**, Brodin, P., Lebleu, B., 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 272, 16010–16017.
- Wagner, C.L.**, Mascelli, M.A., Neblock, D.S., Weisman, H.F., Collier, B.S., Jordan, R.E., 1996. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 88, 907–914.
- Wang, J.**, Zhang, W., Nardi, M.A., Li, Z., 2011. HIV-1 Tat-induced platelet activation and release of CD154 contribute to HIV-1-associated autoimmune thrombocytopenia. *J. Thromb. Haemost. JTH* 9, 562–573. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04168.x>
- Wegener, K.L.**, Partridge, A.W., Han, J., Pickford, A.R., Liddington, R.C., Ginsberg, M.H., Campbell, I.D., 2007. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 128, 171–182. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.048>

Weiss, E.J., Bray, P.F., Tayback, M., Schulman, S.P., Kickler, T.S., Becker, L.C., Weiss, J.L., Gerstenblith, G., Goldschmidt-Clermont, P.J., 1996. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 334, 1090–1094. <https://doi.org/10.1056/NEJM199604253341703>

WHO | The top 10 causes of death [WWW Document], n.d. WHO. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (accessed 12.6.17).

Willeit, P., Zampetaki, A., Dudek, K., Kaudewitz, D., King, A., Kirkby, N.S., Crosby-Nwaobi, R., Prokopi, M., Drozdov, I., Langley, S.R., Sivaprasad, S., Markus, H.S., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Kiechl, S., Mayr, M., 2013a. Circulating MicroRNAs as Novel Biomarkers for Platelet Activation Novelty and Significance. *Circ. Res.* 112, 595–600. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300539>

Willeit, P., Zampetaki, A., Dudek, K., Kaudewitz, D., King, A., Kirkby, N.S., Crosby-Nwaobi, R., Prokopi, M., Drozdov, I., Langley, S.R., Sivaprasad, S., Markus, H.S., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Kiechl, S., Mayr, M., 2013b. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circ. Res.* 112, 595–600. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300539>

Williams, M.S., Bray, P.F., 2001. Genetics of arterial prothrombotic risk states. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 226, 409–419.

Wojciechowska, A., Braniewska, A., Kozar-Kamińska, K., 2017. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Adv. Clin. Exp. Med. Off. Organ Wroclaw Med. Univ.* 26, 865–874. <https://doi.org/10.17219/acem/62915>

Xiao, T., Takagi, J., Collier, B.S., Wang, J.-H., Springer, T.A., 2004. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 432, 59–67. <https://doi.org/10.1038/nature02976>

Yates, L.A., Füzéry, A.K., Bonet, R., Campbell, I.D., Gilbert, R.J.C., 2012. Biophysical Analysis of Kindlin-3 Reveals an Elongated Conformation and Maps Integrin Binding to the Membrane-distal β -Subunit NPXY Motif. *J. Biol. Chem.* 287, 37715–37731. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.415208>

Ye, F., Hu, G., Taylor, D., Ratnikov, B., Bobkov, A.A., McLean, M.A., Sligar, S.G., Taylor, K.A., Ginsberg, M.H., 2010. Recreation of the terminal events in physiological integrin activation. *J. Cell Biol.* 188, 157–173. <https://doi.org/10.1083/jcb.200908045>

- Ye, F.**, Kim, C., Ginsberg, M.H., 2011. Molecular Mechanism of Inside-out Integrin Regulation. *J. Thromb. Haemost.* JTH 9, 20–25. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04355.x>
- Ye, F.**, Petrich, B.G., Anekal, P., Lefort, C.T., Kasirer-Friede, A., Shattil, S.J., Ruppert, R., Moser, M., Fässler, R., Ginsberg, M.H., 2013. The mechanism of kindlin-mediated activation of integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. *Curr. Biol. CB* 23, 2288–2295. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.050>
- Yee, D.L.**, Bray, P.F., 2004. Clinical and functional consequences of platelet membrane glycoprotein polymorphisms. *Semin. Thromb. Hemost.* 30, 591–600. <https://doi.org/10.1055/s-2004-835679>
- Yusuf, S.**, Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., Lisheng, L., INTERHEART Study Investigators, 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364, 937–952. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17018-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17018-9)
- Zhu, L.**, Yang, J., Bromberger, T., Holly, A., Lu, F., Liu, H., Sun, K., Klapproth, S., Hirbawi, J., Byzova, T.V., Plow, E.F., Moser, M., Qin, J., 2017. Structure of Rap1b bound to talin reveals a pathway for triggering integrin activation. *Nat. Commun.* 8, 1744. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01822-8>
- Zotz, R.B.**, Winkelmann, B.R., Müller, C., Boehm, B.O., März, W., Scharf, R.E., 2005. Association of polymorphisms of platelet membrane integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (HPA-1b/PIA2) and $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ (α2807TT) with premature myocardial infarction. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1522–1529. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01432.x>
- Zotz, R.B.**, Winkelmann, B.R., Nauck, M., Giers, G., Maruhn-Debowski, B., März, W., Scharf, R.E., 1998. Polymorphism of Platelet Membrane Glycoprotein IIIa: Human Platelet Antigen 1b (HPA-1b/PI A2) Is an Inherited Risk Factor for Premature Myocardial Infarction in Coronary Artery Disease. *Thromb. Haemost.* 79, 731–735.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. em. Dr. med. Rüdiger E. Scharf für die Bereitstellung des Themas und bei seinem sehr hilfsbereiten Laborteam bedanken.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Melanie Wiegand, mit der ich gemeinsam an diesem neuen Teilprojekt arbeiten durfte und ohne die ich diese Arbeit nie abgegeben hätte. Du hast mir nicht nur zu jeder Zeit wissenschaftlich sehr kompetent, sondern auch auf menschlicher Ebene immer zur Seite gestanden.

Ganz herzlich möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Herrn Dr. rer. nat. Volker Stoldt für seine wissenschaftliche Hilfestellung, seine motivierende Unterstützung und für seine ehrlichen Worte in verschiedenen Stadien der Arbeit bedanken.

Allem voran gilt aber mein größter Dank meiner lieben Familie. Meinen Eltern danke ich für den starken Rückhalt, ohne den ich das Projekt Promotion nicht beendet hätte. Bei meinen Geschwistern bedanke ich mich vor allem für ihre Motivation in Tiefphasen und ihren bedingungslosen Hilfestellungen jeglicher Art.