

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und
Zelltherapeutika
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Institutsleitung: Dr. med. Johannes Fischer

$\alpha_{IIb}\beta_3$ -abhängige Plättchenadhäsion an mutierten und
Wildtyp-von Willebrand-Faktor bei unterschiedlichen
Scherraten

Dissertation

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

vorgelegt von
Vivian Bleyer
(2022)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Im Kontext der in westlichen Ländern sehr häufigen Koronaren Herzkrankheit (KHK) kann die Entstehung von arteriellen Thrombosen ein zentrales Merkmal der Pathogenese dieser Erkrankung sein.

In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen zweier spezieller Polymorphismen auf die Hämostase untersucht werden, die den von-Willebrand-Faktor und das Thrombozyten-Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ betreffen, wobei das besondere Augenmerk auf den Phenylalanin/Tyrosin-Polymorphismus (F2561-/ Y2561-Variante) des von-Willebrand-Faktors gelegt wurde.

Mittels lasermikroskopischer Beobachtung von fluoreszierenden Thrombozyten konnten Qualität und Quantität der Thrombozytenadhäsion auf unterschiedlichen von-Willebrand-Faktor-Präparaten beurteilt werden. Dass die dokumentierte Thrombozytenadhäsion zweifelsfrei durch die Interaktion des von-Willebrand-Faktors mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ bedingt war, wurde im Vorfeld mit Antikörper-Experimenten belegt.

In Versuchen mit Probandenblut des Merkmals HPA-1a1a für das Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ stellte sich heraus, dass auf immobilisiertem F2561-vWF (Wildtyp) eine höhere Adhäsion zu registrieren war, als auf der Y2561-Variante dieses Gerinnungsfaktors.

Dieses Resultat kann die ursprüngliche These, dass für den von Hellermann et al. [9] wahrgenommenen Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten eines Myokardinfarktes bei unter 55-jährigen Frauen und dem Vorliegen der Y2561-Variante des von-Willebrand-Faktors bei diesen Patientinnen ein erhöhtes Risiko arterieller Thrombosen ursächlich war, nicht unterstützen.

Weiterhin ließen die Versuchsergebnisse die Vermutung aufkommen, dass unter einer höheren Scherrate von 1000 s^{-1} , wie sie beispielsweise in Koronararterien auftritt, eine Thrombozytenadhäsion auf mutiertem von-Willebrand-Faktor geringer war.

Die Untersuchung des Einflusses ansteigender Scherraten zeigte für die F2561-Variante des von-Willebrand-Faktors im Gegensatz zu der Y2561-vWF-Variante ein etwa gleichbleibendes Maß an Thrombozytenadhäsion, somit unterstreicht dieser Versuchsausgang seine erhaltene physiologische Funktion der Blutungsstillung.

Summary

In the western world, Coronary Artery Disease (CAD, or Coronary Heart Disease, CHD) is a common illness. Arterial embolism can occur as a central aspect in its pathogenesis.

This dissertation was designed to explore the impact of two specific polymorphisms in haemostaseologic function, concerning von Willebrand Factor and Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ that is located on the surface of thrombocytes. The polymorphism of phenylalanin/tyrosine (Y2561F) of vWF was examined with particular attention, as it may increase the rate of arterial embolism due to an increased adhesion rate of thrombocytes.

Using a laser scanning microscope, quality and quantity of thrombocyteadhesion could be studied by detecting fluorescent thrombocytes adhered to varying preparations containing the different versions of von Willebrand Factor.

In advance, we established certain proof of thrombocyte-mediated adhesion by interaction with the Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ using specific antibodies in our experimental design.

In experiments with our subjects' blood with the HPA-1a1a allele of Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ we found a higher level of adhesion on immobilised F2561-vWF (wildtype) than on immobilised Y2561-vWF.

These results can not support the thesis of Hellermann et al. [9], context to our experiments, stating a correlation between an increased rate of myocardial infarction due to higher risk of arterial embolism in women aged under 55 years carrying the Y2561-vWF variant.

Additionally, our experimental results suggest that under higher shear rates of 1000 s^{-1} , as common in coronary arteries, even less thrombocyteadhesion on mutated von Willebrand Factor (Y2561) can be found, not offering an explanation for higher risk of arterial embolism as a basis for myocardial infarction.

For the F2561-variant of von Willebrand Factor (in contrast to Y2561-vWF) our experiments showed that increasing shearrates induced a nearly constant degree of thrombocyteadhesion; the experiments therefore demonstrate its preserved physiologic function in haemostasis.

I. Abkürzungsverzeichnis

BSA	bovines Serum-Albumin
CAD	<i>Coronary Artery Disease</i>
CHD	<i>Coronary Heart Disease</i>
Cover Area	Maß für die durch Thrombozyten besetzte Fläche (entspricht der Anzahl der Pixel, in μm)
GP	Glycoprotein
LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i>
kb	Kilo-Basenpaare = 1000 Basenpaare
kDa	Kilo Dalton = 1000 Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
m	Meter
	- μm Mikrometer (= 10^{-6} m)
	- nm Nanometer (= 10^{-9} m)
MI	Myokardinfarkt
min	Minuten
s⁻¹	inverse Sekunden, Einheit für die Scherrate (s. Anhang)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
vWF	von Willebrand Faktor
	- F2561-vWF Wildtyp des von Willebrand Faktors
	- Y2561- vWF polymorphe Variante des von Willebrand Faktors
σ	Standardabweichung (in Prozent)

II. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Einführung	1
1.2 Thrombozyten und Hämostase im Rahmen der Koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts	2
1.3 Von-Willebrand-Faktor und F/Y 2561-Polymorphismus	4
1.4 Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und seine Varianten HPA-1a und HPA-1b	6
1.5 Interaktion des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ und des von-Willebrand-Faktors bei unterschiedlichen/hohen Scherraten	7
1.6 Ziele und Fragestellungen	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Material	9
2.1.1 Verwendete Reagenzien	9
2.1.2 Verwendete Einwegmaterialien	9
2.1.3 Verwendete Geräte	10
2.2 Methoden	11
2.2.1 Blutentnahme	11
2.2.2 Vorbereitung der Blutproben	11
2.2.3 Flusskammer	11
2.2.4 Experimente am <i>Laser Scanning Microscope</i>	14
2.2.5 Validierungsversuche mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -spezifischen Antikörper	15
2.2.6 Unterschiedliche Scherraten	15
2.2.7 Probandenversuche	16
2.2.8 Einstellungen am LSM	16
2.2.9 Auswertung der Versuche und Statistik	16
3. Ergebnisse	18
3.1 Evaluationsversuche mit Wilate	18
3.2 Versuche mit der F2561-Variante des vWF	19
3.3 Versuche mit der Y2561-Variante des vWF	22
3.4 Einfluss unterschiedlicher Scherraten	23
3.4.1 Plättchenadhäsion an Wilate	23
3.4.2 Plättchenadhäsion an die Varianten F2561 und Y2561 des vWF	25
3.5 Einfluss von Abciximab auf die Plättchenadhäsion an verschiedene	

vWF-Präparate bei unterschiedlichen Scherraten	26
3.5.1 Wilate	27
3.5.2 F2561-vWF	27
3.5.3 Y2561-vWF	28
3.6 Probandenversuche	30
4. Diskussion	33
4.1 Interpretation der Ergebnisse und Einordnung in die Literatur	33
4.1.1 Integrin α IIb β 3	33
4.1.2 Die polymorphe Variante des vWF	35
4.1.3 Unterschiedliche Scherraten	36
5. Literaturverzeichnis	38
6. Anhang	42

1. Einleitung

Diese experimentelle Arbeit befasst sich insbesondere mit der Interaktion der polymorphen Y2561-Variante des von-Willebrand-Faktors und dem Plättchenrezeptor, Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, welches in unterschiedlichen Varianten im Rahmen des HPA-1-Polymorphismus vorliegen kann.

Auf Grund erster Vorarbeiten am Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Heinrich-Heine-Universität galt es zu untersuchen, ob die genannte von-Willebrand-Faktor-Variante eine veränderte Thrombozytenadhäsion hervorrufen kann, die im Rahmen der Koronaren Herzkrankheit – speziell in Verbindung mit der prothrombotischen HPA-1b/1b-Variante – zu Myokardinfarkten prädisponieren könnte.

Im ersten Kapitel dieser Dissertation wird der fachliche Hintergrund aufgearbeitet. Es folgen die Ausführungen zum experimentellen Teil der Arbeit im zweiten Kapitel und die Ausarbeitung der Versuchsergebnisse im dritten Kapitel. Die anschließende Diskussion im vierten Teil wird die Ergebnisse in die Literatur einordnen. Die Zusammenfassung im fünften Kapitel wird einen Überblick über die gesamte Arbeit geben.

1.1 Einführung

Im Rahmen des Forschungsprojektes des Sonderforschungsbereiches 612 an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf erfolgte die genauere Untersuchung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$, eines Plättchenrezeptors, dessen Ligand unter anderem der von-Willebrand-Faktor ist.

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ vermittelt nach seiner Aktivierung die Plättchenadhäsion und -aggregation und ist somit in der primären Hämostase von zentraler Bedeutung. Es wurde gezeigt, dass eine spezielle genetisch determinierte Variante dieses Rezeptors, HPA-1b oder auch PI^{A2} , eine erhöhte Thrombogenität der Thrombozyten hervorrufen und damit als separater Risikofaktor für ein vorzeitiges Auftreten des Myokardinfarkts bei Patienten mit nachgewiesener koronarer Herzerkrankung (KHK) wirksam werden kann [1, 5].

Neben der weiteren Untersuchung der verschiedenen Varianten des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ im Rahmen des HPA-1-Polymorphismus wird sich diese experimentelle Arbeit auch mit der Interaktion der polymorphen Y2561-Variante des von-Willebrand-Faktors und dem Plättchenrezeptor (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) befassen.

Der von-Willebrand-Faktor ist ein für die primäre Hämostase unverzichtbarer Gerinnungsfaktor. Er mediiert die initiale Plättchenadhäsion (beispielsweise an freiliegender extrazellulärer Matrix) sowie die folgende Plättchenaggregation.

Hellermann et al. beschrieben 2007 das Y2561-Allel des von-Willebrand-Faktor-Gens, welches eine veränderte Proteinsequenz des reifen Gerinnungsfaktors in der Nähe seiner Bindungsstelle zum Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ hervorruft und nach Studienergebnissen einen Risikofaktor für wiederholte Myokardinfarkte bei Frauen unter 55 Jahren darstellt [9].

Auf dieser Grundlage entstand die Arbeitshypothese, dass eine solche von-Willebrand-Faktor-Variante ähnlich wie die HPA-1b-Variante des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ eine erhöhte Thrombogenität induzieren und die Plättchenadhäsion und -aggregation verstärken könnte. Die Entstehung arterieller Thrombosen im Rahmen der Koronaren Herzkrankheit könnte somit begünstigt werden.

Der HPA-1b/1b-Variante kommt keine Bedeutung bei der Bildung der für Myokardinfarkte pathogenetisch wichtigen Atherosklerose zu. Ihr Einfluss zeigt sich nach einer Endothelverletzung, beispielsweise durch die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques. Es entsteht eine thrombogene Oberfläche, die den Gerinnungsvorgang initiiert und somit eine arterielle Thrombose hervorrufen kann. Erst an dieser Stelle können sich die prothrombotisch veränderten Eigenschaften der HPA-1b-Variante bemerkbar machen. Es besteht also keine direkte Verbindung zwischen dem Genotyp und der Koronaren Herzkrankheit, eher ist die gesteigerte Thrombogenität dieser Rezeptorvariante als verbindendes Element zwischen der Atherosklerose und dem einen Myokardinfarkt auslösenden Moment anzusehen [2, 3, 4, 5]. Das Vorhandensein des HPA-1b Allels (HPA-1a1b- oder HPA-1b1b-Genotyp) ist somit zwar ein Risikofaktor für arterielle Thrombosen, nicht aber an der Entstehung der Artherosklerose selbst beteiligt [5].

1.2 Thrombozyten und Hämostase im Rahmen der

Koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts

Die Thrombozyten sind während der sogenannten Thrombopoese entstandene Zytoplasma-Abschnürungen der Megakaryozyten, die sich im Knochenmark des Menschen befinden. Mit einem Durchmesser von 2-4 μm sind sie die kleinsten Zellbestandteile des menschlichen Blutes und haben eine Lebensdauer von circa 10 Tagen. Im Blut eines gesunden Menschen sind etwa 200.000-300.000 Thrombozyten in einem Mikroliter Blut zu finden.

Die Aufgaben der auch als Blutplättchen bezeichneten Zellabschnürungen liegen in der Adhäsion und in der Aggregation; beide Vorgänge werden zur Stillung einer Blutung benötigt [10]. Die Thrombozyten nehmen an der primären Hämostase teil, wobei sie mittels

der nach einer Aktivierung ausgeschütteten Mediatoren wie zum Beispiel Thrombin und Adenosindiphosphat (ADP) auch die sekundäre, plasmatische Hämostase beeinflussen.

Der physiologische Vorgang der Blutgerinnung kann im Rahmen einer Koronaren Herzkrankheit das myokardinfarkt-auslösende Moment werden. Grundlegend in der Pathogenese der KHK ist die Atherosklerose, welche aus in die Intima der Blutgefäße eingelagerten Lipiden besteht, um die während eines Prozesses, an dem unter anderem Monozyten und Makrophagen beteiligt sind, eine den Lipidkern abdichtende Fibrinkapsel entsteht [11]. Derartige Strukturen können das Gefäßlumen insbesondere von kleineren Arterien, wie beispielsweise den Koronararterien, stark einengen. An diesen Engstellen entstehen höhere Strömungsgeschwindigkeiten des Blutes und infolgedessen auch höhere Scherraten am Endothel [12].

Im Falle einer Plaqueruptur werden die Lipide und die Extrazelluläre Matrix der Gefäßwand im Blutgefäß freilegt und bieten den mit dem Blutfluss vorüberfließenden Thrombozyten, die sich im Zuge der axialen Migration [13] in der Nähe des Endothels aufhalten, eine thrombogene Oberfläche [14]. Sogleich kommt es zur Thrombozytenadhäsion und -aggregation, sodass ein Thrombus entsteht, der das Gefäßlumen nun vollständig verlegen und den Blutfluss und damit den Sauerstofftransport in die dahinterliegenden Abschnitte unterbinden kann. Bei längerer Unterbrechung der Blutzufuhr führt dies zu einer Nekrose des abhängigen Gewebes, also beispielsweise zu einem Myokardinfarkt [15].

Vor diesem Hintergrund wird die Bedeutung der funktionellen Integrität des vWF und seiner Rezeptoren für einen regelrechten Ablauf der Hämostase erkennbar.

Im Falle der HPA-1b-Variante des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ und möglicherweise auch des Y2561-Allels des vWF sind eine gesteigerte Thrombozytenadhäsion und -aggregation zu vermuten, deren Einfluß sich in der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit bzw. des Myokardinfarkts niederschlägt. Wie in der Literatur belegt [9] sind beide Varianten als Risikofaktor im Rahmen dieser Erkrankungen anzusehen, wenn auch in unterschiedlichen Populationen. Mit dem Hintergrundwissen, dass allein in Deutschland 20 % der Todesfälle durch die Folgen der Koronaren Herzkrankheit bedingt sind [15], wird die potentielle Bedeutung beider Polymorphismen, die die Pathogenese beider Erkrankungen negativ beeinflussen könnten, noch deutlicher.

1.3 Von-Willebrand-Faktor und F/Y 2561-Polymorphismus

Der von-Willebrand-Faktor ist ein potentieller Ligand des Integrins $\alpha_{11b}\beta_3$ der Thrombozyten und mit mehr als 10.000 kDa das größte Protein im Blut des Menschen [24].

Das humane vWF-Gen (Genbezeichnung: VWF) ist auf dem Chromosom 12 lokalisiert, wobei zusätzlich ein Pseudogen auf Chromosom 22 existiert [25]. Das Gen besteht aus 178 kb, besitzt 52 Exons und mehrere repetitive Sequenzen. Es wird als das komplexeste Gen unter den Genen für Gerinnungsfaktoren beschrieben [25].

Die Synthese des vWF erfolgt im Gefäßendothel und in den Megakaryozyten. Dort entsteht zunächst der prä-pro-vWF, ein sogenanntes *precursor polypeptide*, eine Vorstufe des vWF, die aus 2813 Aminosäuren zusammengesetzt ist, wovon 12 zu einem Signalpeptid, 751 zum vWF-pro-Peptid und 2050 zum reifen vWF zählen. Intrazellulär erfolgt danach der enzymatische Zuschnitt und die weitere Prozessierung, sodass der pro-vWF gebildet wird, der zunächst im endoplasmatischen Retikulum dimerisiert [26]. Die entstandenen Dimere formen im Golgi-Apparat über Disulfidbrücken Multimere und werden im Folgenden sowohl in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen als auch in der α -Granula der Thrombozyten gespeichert [24, 26]. Ferner wird ein Teil des erzeugten vWF kontinuierlich in das Blut sezerniert.

Erhöhte Blutwerte für vWF sind beispielsweise mit Lupus erythematodes, thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura, tiefer Venenthrombose oder cerebrovaskulären Erkrankungen assoziiert [27]. In Akut-Phase-Situationen steigt der vWF an. Die Höhe des Blutwertes soll mit der klinischen Stärke von beispielsweise ischämischen cerebrovaskulären Erkrankungen korrelieren [27] und dient als ein Kriterium für Atherosklerose oder thromboembolische Komplikationen. Außerdem wurden erhöhte vWF-Werte als Risikofaktor für rezidivierende Myokardinfarkte identifiziert [28].

Nicht klar ist, ob eine erhöhte Konzentration an von-Willebrand-Faktor bei vorliegender atherosklerotischer Gefäßschädigung zu einem erhöhten Risiko für thromboembolische Komplikationen führt, oder ob die Gefäßschädigungen durch erhöhte Thrombinwerte ihrerseits für die gesteigerten vWF-Werte sorgen [27].

Weitere Diskussion bereitet die Tatsache, dass „normale“ Werte für den vWF im Bereich von 40-240% des Wertes für die allgemeine Bevölkerung zu finden sind. Dies ist bedingt durch die Beeinflussung der Blutwerte für von-Willebrand-Faktor durch die ABO-Blutgruppe, das Alter, eine Schwangerschaft oder zum Beispiel eine vorangegangene Akute-Phase-Reaktion [29].

Die 272 amino-terminalen Aminosäuren bilden mit dem Gerinnungsfaktor VIII einen Komplex [24]; somit ist der vWF nicht nur in die primäre Hämostase (über seine Interaktion mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$), sondern als Trägerprotein für den Faktor VIII auch in die sekundäre plasmatische Blutgerinnung involviert [30]. Außerdem wird die Clearance des Faktor VIII durch die Bindung zum von-Willebrand-Faktor beschränkt und damit die Halbwertszeit des Faktor VIII verlängert [30]. Der reife vWF besteht aus meist identischen aneinander geschlossenen funktionellen Domänen, denen unterschiedliche Aufgaben zukommen [26]. Dementsprechend kann die A1-Domäne sowohl Kollagen als auch den für die Plättchenadhäsion unter hohen Scherraten besonders wichtigen GP 1b α -Rezeptor (aus dem membranären GP 1b-IX-V-Komplex) binden. Seine wesentliche RGD-Sequenz, einem nach der alten Nomenklatur an den Stellen 1744 bis 1746 gelegenen Bindungsmotiv [17, 31], ermöglicht dem von-Willebrand-Faktor eine stabile Bindung an das eingangs beschriebene Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Im Plasma kann der vWF in zwei Formen vorliegen: Zum Einen als Knäuel mit einem Durchmesser von 200-300nm (*coiled form*), zum Anderen in einer gestreckten und auf Grund seiner Größe bis zum 2 μ m langen Form (*uncoiled form*). Je größer ein Multimer, desto effektiver seine hämostatische Wirkung, denn große Multimere sind funktionell multivalent, da sie in der gestreckten Form, die viele funktionelle Domänen freilegt, mehrere Funktionen im Rahmen der Blutgerinnung erfüllen können [30]. Gleichwohl legt die gestreckte Form auch die Schnittstellen zur Spaltung des vWF durch die Metalloproteinase ADAMTS-13 frei und eröffnet damit den Abbau dieses Gerinnungsfaktors [32].

Eine Hypothese besagt, dass der vWF zum Beispiel durch hohe Scherkräfte, wie sie in kleinen Arterien und Arteriolen oder in Gefäßen vorkommen, deren Durchmesser durch Atherosklerose-Plaques verkleinert ist, „ent-coiled“ werden und damit eine Thrombozytenadhäsion unter hohen Scherraten durch mehrere freigelegte funktionelle Domänen begünstigen könnte [30].

Auch im Gen des vWF treten Polymorphismen auf. Hellermann und Schneppenheim et al. berichteten über den Polymorphismus F2561Y, dem eine Mutation des vWF-Gens an der Stelle 7932 zu Grunde liegt. Hier wird Thymin gegen Adenin ausgetauscht, sodass an der Stelle 2561 des reifen vWF ein Ersatz von Phenylalanin durch Tyrosin stattfindet [33]. Dieser Aminosäure-Austausch liegt in der C1-Domäne in unmittelbarer Nähe der RGD-Bindungssequenz, also der Bindungsstelle des vWF an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ [9], wodurch eine Einflussnahme auf die Ligandenbindung mit nachfolgendem Einwirken auf die Hämostase nicht auszuschließen ist.

1.4 Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und seine Varianten HPA-1a und HPA-1b

Jeder Thrombozyt besitzt im Durchschnitt ca. 80.000 Kopien des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ [16].

Circa 80 % dieser Rezeptoren finden sich auf der Membranoberfläche der Thrombozyten und circa 20 % im der Membran angeschlossenen kanalikulären System und auf den α -Granula [2].

Integrine sind transmembranäre Proteine, die aus jeweils einer nicht-kovalent verbundenen α - und β -Untereinheit bestehen und demzufolge als Heterodimer auftreten [17]. Beide Untereinheiten weisen zusätzlich zu ihrer transmembranären Domäne einen extrazellulären NH_2 -terminalen Anteil und einen zytoplasmatischen terminalen Anteil auf [18]. Ihre Funktion liegt in der Regulierung der Genexpression und des Wachstums, des Überlebens und der Differenzierung der von ihnen besetzten Zellen [19].

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ jedoch ist spezifisch für das megakaryozytäre System [18] und ist das häufigste sowie funktionell wichtigste Integrin der Thrombozyten [20]. Es vermittelt Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin sowie der von-Willebrand-Faktor sind Liganden des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins. Insbesondere mit Letzterem kann es eine stabile Bindung im Rahmen der primären Hämostase bei erhöhten Scherraten eingehen.

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ trägt häufig Polymorphismen, welche als stabile DNA-Sequenz-Variationen zu verstehen sind [2], die mit einer Häufigkeit von mindestens 1 % als Genvariation auftreten.

Grundlage der hier näher zu untersuchenden Varianten ist ein Polymorphismus im Gen der β_3 -Untereinheit des Integrins, durch welchen an der Stelle 1565 Cytosin durch Thymin ersetzt ist. Diese Gensequenz-Variation drückt sich durch eine veränderte Proteinsequenz aus, mit der Folge, dass die spätere β_3 -Untereinheit des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ an der Stelle 33 entweder die Aminosäure Leucin (HPA-1a) oder die Aminosäure Prolin (HPA-1b) trägt [2]. Der HPA-1b-Variante wird eine erhöhte Thrombogenität zugeschrieben [5]. Vermittelt durch ein erhöhtes *Outside-In-Signaling* kommt es u.a. zu vermehrter Adhäsion und Aggregation. Weiterhin ist das *Spreading* der Thrombozyten gesteigert, es wird eine erniedrigte Blutungszeit beobachtet [7, 21, 22] und die vWF-Sekretion aus der α -Granula ist angehoben [7].

Die Ursache dieser gesteigerten Rezeptorsignale der Plättchen beruht auf einer irregulär verlaufenden Aktivierung und Deaktivierung von zelleigenen Phosphatasen und Kinasen [21, 23].

1.5 Interaktion des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ und des von-Willebrand-Faktors bei unterschiedlichen/hohen Scherraten

In den Arterien und Venen sind je nach Gefäßdurchmesser unterschiedliche Flussgeschwindigkeiten des Blutes zu erwarten. Die Flussgeschwindigkeit wiederum steht in direktem Verhältnis zur Scherrate, eines Ausdrucks der Reibung zwischen den in einzelnen Schichten angeordneten Bestandteilen des Blutes [30]. Je höher die Scherrate in einem Gefäß ist, desto geringer ist die Möglichkeit zur Zelladhäsion beispielsweise an die Gefäßwand [12].

Eine Scherrate von 100 s^{-1} entspricht venösen Bedingungen, während eine Scherrate von mehr als 1000 s^{-1} in kleinen Arterien oder Arteriolen auftritt. Scherraten von mehr 1500 s^{-1} liegen der mikrovaskulären Zirkulation zu Grunde [34].

Die höchsten Scherraten treten am Endothel der Gefäße auf. In diesem Bereich finden sich auch die Thrombozyten; im Rahmen der axialen Migration halten sich die Erythrozyten und Leukozyten eher in der Gefäßmitte auf. Unter diesen Bedingungen können die Thrombozyten am schnellsten Kontakt zum Endothel aufnehmen und beispielsweise Gefäßverletzungen als Erste detektieren [35].

Der im Rahmen dieser Arbeit besonders zu behandelnden Interaktion zwischen dem vWF und dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ geht unter hohen Scherraten zunächst die Interaktion zwischen der A1-Domäne des vWF und dem GP1b α -Rezeptor, der auf der Thrombozytenmembran im GP 1b-IX-V-Komplex zu finden ist, voraus. Im ersten Schritt der Hämostase nehmen die Plättchen durch diese Bindung Kontakt zum Endothel auf, allerdings handelt es sich dabei nur um eine instabile Bindung.

Im weiteren Verlauf dieser Bindung zwischen vWF und dem GP1b α -Rezeptor (an sogenannten *Discrete Adhesion Points* mit einer Fläche von $0,05\text{-}0,25 \mu\text{m}^2$ [35]) formen sich sogenannte *Tethers*, welche als Thrombozytenmembran-Ausziehungen zu verstehen sind, die durch die weiter bestehenden Scherraten in Richtung des Blutstroms in die Länge gezogen werden können.

Infolge der Bindung des vWF an den GP 1b α -Rezeptor werden die bereits angesprochenen *Outside-In*-Signale initiiert, welche zur Aktivierung der Thrombozyten und zur nun irreversiblen Bindung zwischen vWF und dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ beitragen [17, 21]. Diese stabile Bindung ist Grundlage von Thrombozytenadhäsion und -aggregation [36].

Auch in diesem Vorgang spiegelt sich die unter hohen Scherraten immer größer werdende Bedeutung des vWF wider, da er über die Bindung an GP 1b α die Thrombozyten aus dem

Blutfluss abbremst und der Bindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, welches eine kleine Ligandenbindungsrate aufweist, zugänglich macht [17, 37].

Die vWF-Ligandenbindung verursacht also eine *Outside-In*-Signalkaskade, die eine Konformationsänderung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ hervorruft, die ihrerseits eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt, die die Thrombozytenadhäsion steuert.

Unabhängig von der zu Grunde liegenden Scherrate sind somit sowohl der GP1b α -Rezeptor als auch das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ grundsätzlich wichtig für eine Thrombozytenadhäsion und -aggregation am vWF. Damit kann die relevante Bedeutung des vWF bei hohen Scherraten besonders herausgestellt werden [34, 36, 38].

1.6 Ziele und Fragestellungen

In dieser Arbeit werden der vWF und einer seiner Rezeptoren, das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, näher untersucht. Beide Aktionspartner zeigen bestimmte Polymorphismen, von denen hier jeweils einer näher erforscht werden soll.

Grundlegend ist die Frage, ob es einen Unterschied im Adhäsionsverhalten der Thrombozyten unter den beiden Rezeptorvarianten HPA-1a und HPA-1b mit dem Ligand vWF, der seinerseits als F2561Y-Variante vorliegt, gibt.

Weiterhin ist es Ziel des Projekts, unter diesen Umständen die Auswirkung unterschiedlicher, sowohl venöser als auch arterieller, Scherraten auf das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten zu untersuchen.

2. Material und Methoden

Grundlage der Versuchsanordnung ist die Verwendung einer Flusskammer, in der in einem durch sie hindurch geführten Blutstrom verschiedene Scherraten simuliert wurden.

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Reagenzien

<u>Reagenz</u>	<u>Hersteller, Ort</u>
Vollblut	Eigenblut (V. Bleyer, HPA-1a1b), Spenderblut (HPA-1a1a)
Wilate	Octapharma, Langenfeld, Deutschland
F2561-vWF	Labor Schneppenheim, Hamburg, Deutschland
Y2561-vWF	Labor Schneppenheim, Hamburg, Deutschland
BSA (<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine), einprozentig	Sigma GmbH, Taufkirchen
PBS Puffer (Phosphate Buffer Solution)	Serag-Wiessner GmbH & Co. KG, Naila
Aqua destillata	Braun, Melsungen, Deutschland
Abciximab (= ReoPro®)	Centocor, Malvern, USA Eli Lilly, Indianapolis, USA
Mepacrin, gelöst in PBS Puffer, Konzentration 10 µM	Sigma GmbH, Taufkirchen
Desinfektionsmittel (Kodan®)	Norderstedt, Deutschland
Edisonite Schnellreiniger	Merz Pharma GmbH & Co. KGaA, Frankfurt/Main

2.1.2 Verwendete Einwegmaterialien

<u>Material</u>	<u>Hersteller, Ort</u>
Deckgläser 24x50 mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde

Vacutainer, Tri-Natrium-Citrat	BD, Franklin Lakes, USA
Butterfly Blutabnahmesystem	BD, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Schraubröhrchen (Falcon 50 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Spritzen (5ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Perfusorspritzen (50 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland

2.1.3 Verwendete Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller, Ort</u>
Systemex	Systemex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland
Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Perfusorpumpe	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
LSM (<i>Laser Scanning Microscope</i>) Axiovert 100 M	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland
Computer	Siemens, Berlin und München, Deutschland
Bildprogramme - AIM, LSM 510	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen
Statistikprogramme - Makro - Microsoft Excel 2010	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen Microsoft, Redmond, USA
Image J (Bildverarbeitung/Auswertung)	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Flusskammer	Dr. V. Stoldt, IHHTM, Universität Düsseldorf
Rollschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

2.2 Methoden

2.2.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte unter sterilen, aseptischen Voraussetzungen.

Nach der Säuberung der Punktionsstelle in der Fossa cubitalis wurde circa 30 Sekunden gewartet, bis das Desinfektionsmittel verdunstet war. Darauf folgte die Punktion einer Cubitalvene mittels einer Butterfly-Kanüle. Das Blut wurde über das mitgelieferte Schlauchsystem direkt in Tri-Natrium-Citrat-gefüllte Vacutainer-Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 4,5ml geleitet, wobei das vom Hersteller vorgegebene Mischungsverhältnis zwischen Citrat und Blut durch eine regelrechte Füllhöhe des Röhrchens eingehalten wurde. Das erste befüllte Röhrchen wurde verworfen, um eine fehlerhafte Plättchen- und Gerinnungsfaktor-Menge auf Grund der durch die Punktion ausgelösten initialen Hämostase auszuschließen.

2.2.2 Vorbereitung der Blutproben

Für Versuche am *Laser Scanning Microscope* mussten die erhaltenen Blutproben untersucht und weiterbehandelt werden.

Analyse des Blutes / Blutbild

Zunächst wurde das gewonnene Blut auf seine Bestandteile hin untersucht, dabei war besonders die Thrombozytenzahl von Bedeutung, die in der späteren Auswertung ein Kriterium im Rahmen der Adhäsion wurde. Die Analyse erfolgte vollautomatisch mit Hilfe des Sysmex.

Anfärbung mit Mepacrin

Das erhaltene Vollblut wurde mit 10 μ M Mepacrin angefärbt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rollschüttler in Bewegung gehalten.

Mepacrin ist ein makroskopisch gelber Farbstoff, der in den α -Granula der Thrombozyten fluoresziert. Es beeinflusst die Funktion der Thrombozyten nicht [39].

Durch diese farbliche Markierung können die Thrombozyten in den folgenden Experimenten lasermikroskopisch durch ihre Fluoreszenz erfasst werden.

2.2.3 Flusskammer

Die in diesen Versuchen verwendete Flusskammer bestand aus mehreren Einzelteilen (s. Abb.1):

Den Boden bildete eine rechteckige aus Metall hergestellte Fassung in die ein mit thrombogener Substanz beschichtetes Deckglas (Kantenlänge 24*50 mm) eingelegt wurde. Auf dem Metallboden wurde mittels vier Schrauben in den Ecken der Kammer ein Plexiglasblock befestigt, welcher ein durch eine eingelassene Gummilippe begrenztes Areal aufwies. Mittels fester Verschraubung des Ober- und Unterteils wurde so der Blutfluss durch das von Gummilippen umgebene Feld realisiert. Das Blut trat auf der einen Seite der Kammer durch eine eingebaute Kanüle ein und auf der anderen Seite durch eine baugleiche Vorrichtung wieder aus.

Der Blutstrom durch die Kammer konnte mit Hilfe einer Pumpe in unterschiedlicher Geschwindigkeit an die Kammer angelegt werden. Somit konnten die zu untersuchenden Scherraten über dem beschichteten Deckglas genau eingestellt werden.

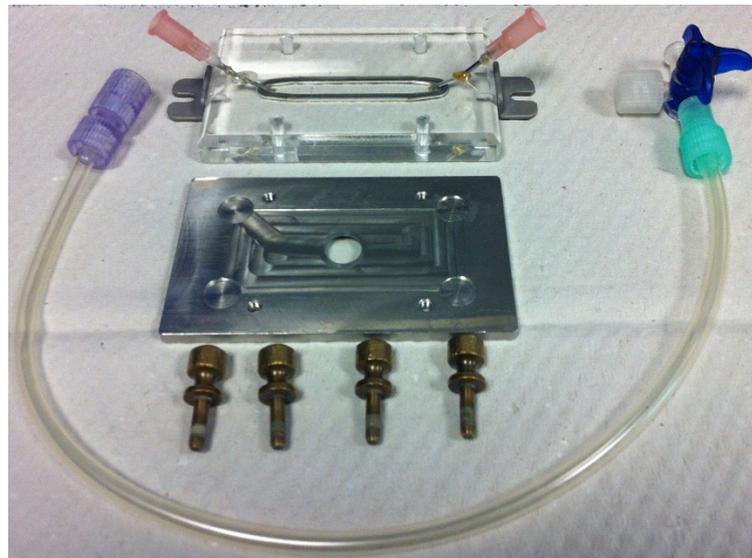


Abb. 1: Die Flusskammer in Einzelteilen

Die Beschichtung der Deckgläser

Um die Experimente verfälschende Oberflächen-Unreinheiten auszuschließen, wurden alle verwendeten Deckgläser zunächst kurz mit einem Bunsenbrenner abgeflammt und zum Abkühlen auf einem Gitter gelagert.

Die Beschichtung der Deckgläser erfolgte für die Experimente zur Evaluation des Systems zunächst mit Wilate (vWF-Konzentrat von Blutspendern), danach wurden die vWF-Varianten F2561 und Y2561 verwendet.

Es wurde jeweils ein Tropfen mittig auf den Objektträger aufgebracht, sodass die Beschichtung im späteren Belichtungsfenster des Lasermikroskops lag.

Anschließend folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten im Wärmeschrank bei 37°C, bis der noch feuchte Objektträger schließlich in die gereinigte, trockene Flusskammer eingesetzt und diese verschraubt werden konnte. Um unspezifische Thrombozytenadhäsion, also nicht Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -abhängige Adhäsion an anderen Strukturen der Flusskammer, zu minimieren, wurde die experimentelle Vorrichtung mit einprozentiger BSA-Lösung gespült und die restliche Luft aus der Kammer entfernt. Dadurch konnte die Gefahr einer Verwirbelung des Blutflusses um Luftblasen innerhalb der Kammer vermieden werden.

Wilate

Wilate ist ein von der Firma Octapharma aus menschlichem Plasma hergestelltes Präparat, welches von-Willebrand-Faktor und den Gerinnungsfaktor VIII enthält. Es dient zur Therapie des von-Willebrand-Syndroms und der Hämophilie A.

In diesem Versuchsaufbau wurde es in einer Verdünnung von 1:43 verwendet. Verglichen mit physiologischen Verhältnissen handelt es sich dabei um eine erhöhte Konzentration; der Proteingehalt ist circa um das Dreifache gegenüber dem Normalwert erhöht.

Weitere Bestandteile sind laut Herstellerangaben Natriumchlorid, Glyzin, Saccharose, Natriumcitrat, Calciumchlorid und Wasser als Lösungsmittel.

Varianten F2561 und Y2561 des vWF

Beide Varianten wurden von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schneppenheim aus Hamburg zur Verfügung gestellt.

Bei der F2561-Variante handelt sich um rekombinant hergestellten Wildtyp von Willebrand Faktor.

Die Proteinanalyse ergab für diesen Stoff eine Proteinaktivität von 106 % bei einer Antigenkonzentration von 121 %.

Die Y2561-Variante des vWF ist ebenfalls ein rekombinantes vWF-Präparat; hier erfolgte in der C1-Domäne der Austausch von Phenylalanin gegen Cytosin.

Die Proteinanalyse dieses Präparates ergab eine Proteinaktivität von 57 % bei einer Antigenkonzentration von 107 %.

BSA (*Bovine Serum Albumine*)

Das Bovine Serum Albumin ist ein aus Rinderplasma gewonnenes Albumin, welches im Versuchsaufbau zur Spülung der Flusskammer diente. Es hat die Funktion eine

unspezifische Adhäsion der Plättchen an thrombogene Oberflächen der Flusskammer (z.B. an freie Glasflächen) zu verhindern. In diesem Versuchsaufbau wurde es in 1 %iger Konzentration (verdünnt mit Aqua dest.) verwendet.

2.2.4 Experimente am *Laser Scanning Microscope*

Eingesetzt wurde ein *Laser Scanning Microscope*. Die fertig zusammengebaute Flusskammer konnte an einer Vorrichtung auf dem Objektträgertisch des Mikroskops befestigt werden, was ein Verrutschen während des Fokussierens verhinderte. Außerdem wurde zur Orientierung eine Markierung an der Flusskammer angebracht, damit das Blut in allen Experimenten immer in der gleichen Richtung durch die Flusskammer lief.

Zum Mikroskopieren wurde das Objektiv 40x 1,3 Oil Plan Neofluar gewählt, auf das zur besseren Auflösung Immersionsöl aufgetropft wurde.

Eine weitere Markierung der Flusskammer lag in der Mitte des belichteten Areal des Objektträgers; so wurde sichergestellt, dass in jedem Experiment der gleiche Abschnitt der Flusskammer untersucht wurde. Dementsprechend war es in allen Experimenten möglich, den Blutfluss stets an der gleichen Stelle der Flusskammer zu erfassen.

An die Kanüle der rechten Seite der Flusskammer wurde eine mit dem inkubierten Blut befüllte Spritze ohne Stempel angesteckt.

Mittels eines Verbindungsschlauches wurde über die Kanüle der linken Seite der Flusskammer über eine Pumpe ein genau einstellbarer Sog an Flusskammer angelegt, der in der Flusskammer selbst eine bestimmte Strömungsgeschwindigkeit hervorrufen konnte. Da die Strömungsgeschwindigkeit in direktem Zusammenhang mit der Scherrate steht, konnte mit Hilfe der Formel

$$\gamma = \frac{6 \times Q}{b \times h^2}$$

(γ = Scherrate [s^{-1}], Q = Flussrate [ml/s], b = Breite der Flusskammer (16mm), h = Höhe der Flusskammer (250 μ m))

auf die Scherrate am Deckglas innerhalb der Flusskammer zurückgeschlossen werden. Es wurde mit Scherraten von 50 s^{-1} , 100 s^{-1} , 500 s^{-1} , 1000 s^{-1} und 4000 s^{-1} gearbeitet.

Anschließend konnten die Experimente begonnen werden: Der Argonlaser wurde zugeschaltet und die Pumpe gestartet.

Nach 30 Sekunden Vorlaufzeit wurde an ersten fluoreszierenden Thrombozyten die Fokusebene endgültig scharf gestellt und anschließend der erste Bildstapel erfasst. Dabei wurden im 0,7-sekündlichen Abstand zehn Bilder aufgenommen, somit entstanden

Bildstapel von 4,5 μm Höhe. Im weiteren Verlauf wurden so im minütlichen Abstand jeweils neun weitere Bildstapel aufgenommen (vgl. Abb.2).

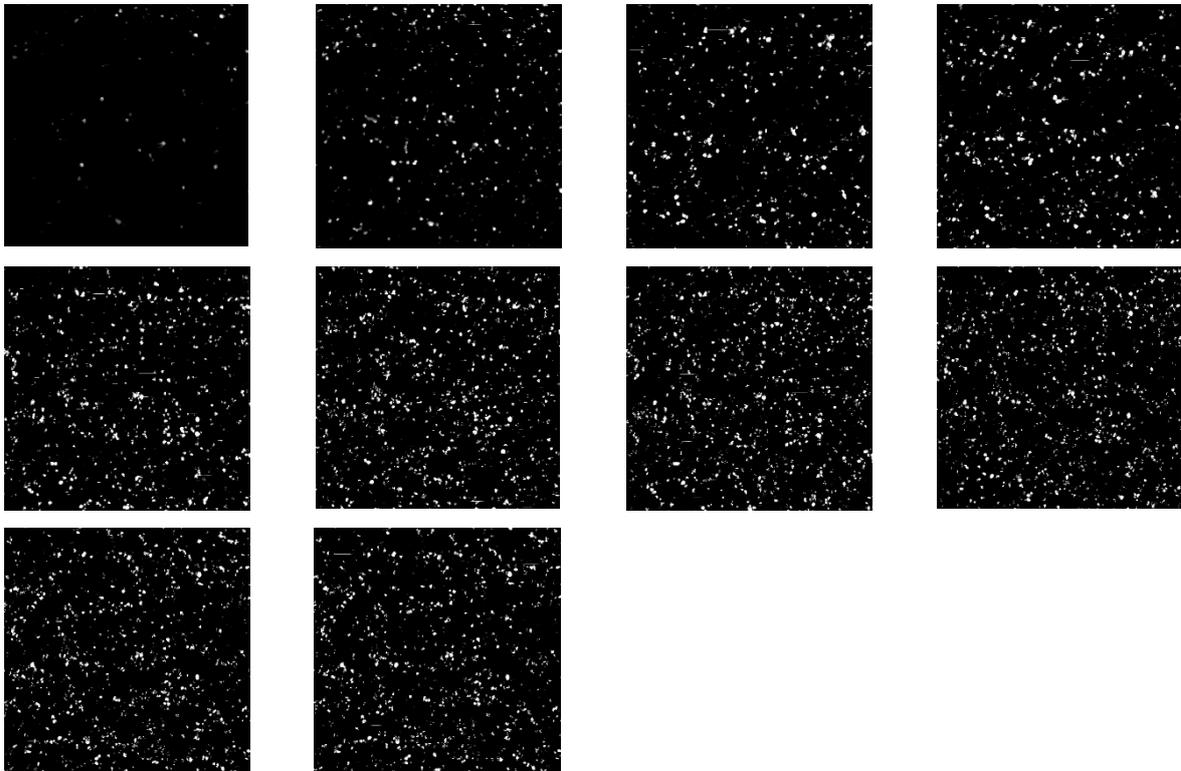


Abb. 2: Exemplarische Darstellung jeweils eines der 10 Bilder eines Stapels (Beschichtung mit Wilate, Scherrate 500 s^{-1})

2.2.5 Validierungsversuche mit dem Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -spezifischen Antikörper

Zur Beweisführung, dass die während der Versuche beobachtete Thrombozytenadhäsion tatsächlich auf das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ zurückzuführen war, musste dieser Rezeptor spezifisch geblockt werden. Dazu wurde dem verwendeten, mit Mepacrin inkubierten Citrat-Vollblut, drei Minuten vor Beginn eines Experimentes der Antikörper Abciximab hinzugefügt. Dabei handelt es sich um einen für das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ spezifischen, kompetitiven, monoklonalen, chimären Antikörper [17], der den Rezeptor in seiner Ligandenbindung blockiert.

2.2.6 Unterschiedliche Scherraten

Mittels verschiedener Eingaben an der Pumpe wurden die unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten eingestellt um die verschiedenen Scherraten in den Gefäßen zu

simulieren. Eine Scherrate von 100 s^{-1} ist in venösen Gefäßen anzunehmen, 500 s^{-1} entsprachen früh-arteriellen und 1000 s^{-1} arteriellen Bedingungen.

In der Mikrozirkulation werden Scherraten von etwa 1500 s^{-1} vorausgesetzt, jedoch können die Scherraten in stenosierten Gefäßen, wie zum Beispiel in durch Atheroskleroseplaques verengten Koronararterien, überdies auf viel höhere Werte ansteigen. In einer kurzen Serie von Experimenten wurden hierzu Versuche bei einer Scherrate von 4000 s^{-1} durchgeführt.

2.2.7 Probandenversuche

Zunächst wurden Experimente mit meinem eigenen Blut (heterozygot für den HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ veranlagt, also HPA-1a1b) zur Evaluation des Systems ausgeführt. Nachdem die Standardabweichungen für Versuche mit Wilate in einem akzeptablen Bereich von circa 10 % lagen und die Standardabweichungen in den Versuchen mit den F2561-Y-polymorphen vWF-Varianten nicht mehr verbessert werden konnten, erfolgte die Durchführung der Probandenversuche. Das Einverständnis der entsprechenden Probanden wurde schriftlich festgehalten, anschließend wurde Blut aus einer Cubitalvene entnommen. Es wurde nur Material von Probanden verwendet, die das Merkmal HPA-1a1a des $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Polymorphismus trugen. Unter den insgesamt sechzehn Probanden befanden sich sieben Frauen und neun Männer im Alter von 23 bis 63 Jahren. Das Ethikvotum (Aktenzeichen: Studiennummer 1864) der Universität Düsseldorf lag vor.

2.2.8 Einstellungen am LSM

Micro: Plan Neofluar 40x/1.3 Oil

Amplifier Offset: -2

Detector Gain: 626

Amplifier Gain: 1,5

2.2.9 Auswertung der Versuche und Statistik

Die aufgenommenen Bilder wurden mit Hilfe des Computerprogramms AIM akquiriert, das eine Datei über alle Versuche anlegte. Die spätere Auswertung erfolgte über das Programm ImageJ. Dazu wurden jeweils zwei Bilder eines minütlichen Scans mittels eines Makros (s. Anhang) gegeneinander verrechnet. Das Programm detektierte die von Thrombozyten besetzte Fläche (Summe der Pixel, im weiteren Verlauf als *Cover Area* bezeichnet) und drückte sie für jeden einzelnen Scan numerisch aus. Diese Cover Area wurde in der

endgültigen Auswertung und der graphischen Darstellung mit der Thrombozytenzahl des Probanden in Relation gesetzt (relative *Cover Area*).

Da die aufgenommenen Bilder eines Stapels Momentaufnahmen zum Zeitpunkt der Bildentstehung wiedergeben, wurden kurzfristig adhärierte und anschließend wieder gelöste Thrombozyten automatisch mit in die Auswertung aufgenommen. Bei sehr geringer *Cover Area* konnte sich dadurch ein stärker schwankender Pixel-Wert ergeben.

Die Auswahl der zu verrechnenden Bilder in jedem Bildstapel erfolgte separat. Es wurden zwei aufeinander folgende Bilder, die am besten fokussiert waren, verwendet. So konnte immer eine einheitliche Fokussierebene zur Auswertung herangezogen werden.

Diese Ebene lag je nach Fortschritt in der Versuchszeit und dem Ausmaß der Adhäsion und Thrombenbildung auf unterschiedlichen Höhen des Bildstapels.

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurde mit Microsoft Excel (2010) durchgeführt; es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen für die einzelnen Scans berechnet und das Ausmaß und die Veränderungen der von Thrombozyten besetzten Fläche (immer in Relation zur Thrombozytenzahl) graphisch festgehalten.

3. Ergebnisse

3.1 Evaluationsversuche mit Wilate

Zunächst wurden einige Versuche zur Erprobung der Funktionstüchtigkeit des Systems durchgeführt. Dazu wurde ein mit Wilate beschichtetes Deckglas in die Flusskammer eingesetzt und eine intermediäre Scherrate von 500 s^{-1} gewählt. Es zeigte sich wie in Abb. 3 dargestellt eine über die Versuchszeit kontinuierlich ansteigende Thrombozytenadhäsion mit vereinzelter Thrombenbildung bis eine Fläche (in Relation zur Thrombozytenzahl relative *Cover Area*) von 324,5 Pixeln besetzt war. Während der mikroskopischen Beobachtung über die Versuchszeit hinaus ließ sich kein weiterer Anstieg der adhärierenden Thrombozyten vermerken.

Insgesamt liegt den Versuchsergebnissen eine Standardabweichung zwischen 9,7 % und 13,5 % pro Erfassung eines Bildstapels zu Grunde.

Zur Bestätigung, dass die Thrombozytenadhäsion an Wilate durch das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ vermittelt war, wurden Versuche mit einer Deckglasbeschichtung nur mit BSA angefertigt. In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Mepacrin-fluoreszenzmarkierte und antikoagulierte Vollblut drei Minuten vor dem Versuchsbeginn mit Abciximab (ReoPro®) vermischt und dessen Adhäsion auf Wilate gemessen. In beiden Versuchsreihen zeigten sich nahezu keine anhaftenden Thrombozyten (vgl. Abb. 4). Somit konnte das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ als Mediator der Wilate (vWF)-vermittelten Plättchenadhäsion vorausgesetzt werden.

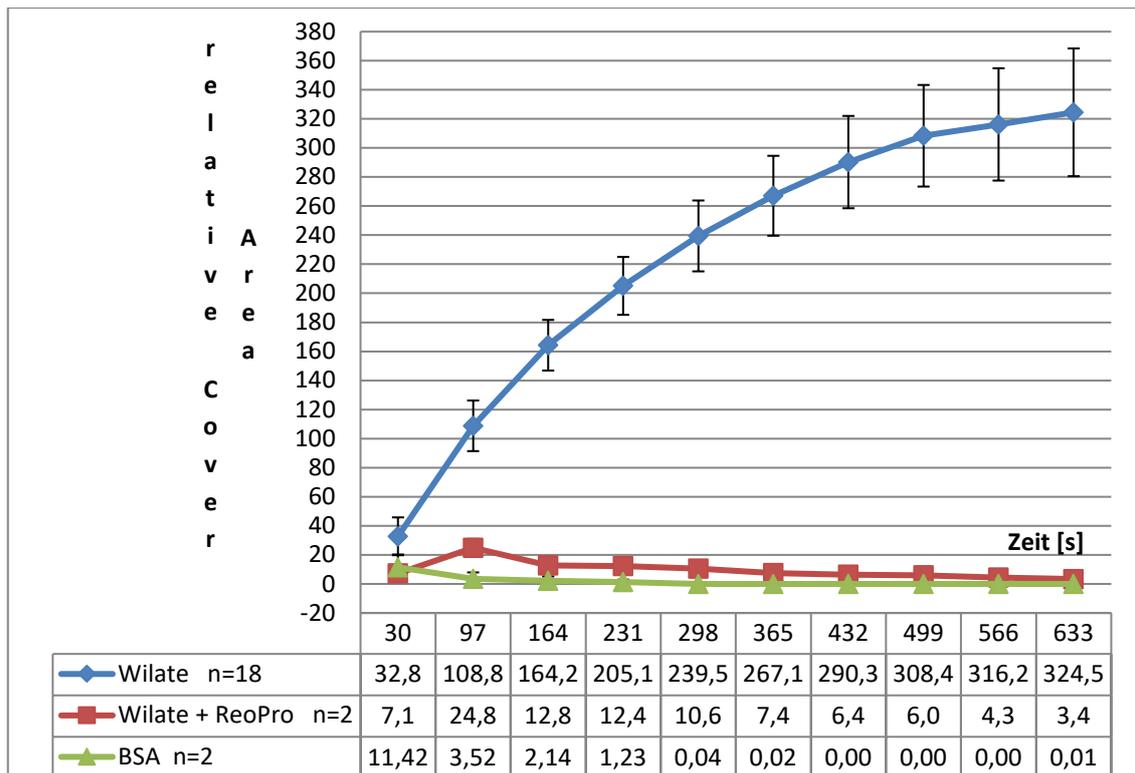


Abb. 3: Plättchenadhäsion an Wilate, Wilate mit Abciximab und BSA bei einer Scherrate von 500 s⁻¹

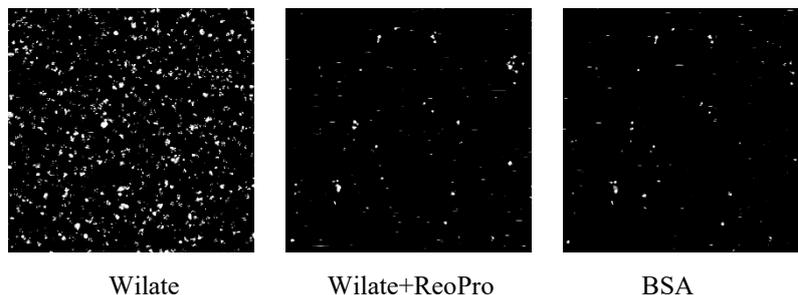


Abb. 4: Aufnahme nach 633 Sekunden bei unterschiedlicher Beschichtung, Scherrate 500 s⁻¹

3.2 Versuche mit der F2561-Variante des vWF

Nachdem die Versuchsergebnisse zur Plättchenadhäsion auf Wilate vorlagen, und der Versuchsaufbau validiert war, wurden Experimente mit der F2561-Variante des vWF angeschlossen. Es wurde untersucht, inwiefern sich die Thrombozytenadhäsion an den unterschiedlichen vWF-Varianten unterscheidet.

Die Scherrate wurde bei 500 s⁻¹ belassen und das vWF-Präparat zunächst unverdünnt angewendet. Die verwendete Antigenkonzentration lag somit bei 121%, die Proteinaktivität bei 106%.

Die graphische Darstellung der thrombozytenbesetzten Fläche (Abb. 5) ergab einen ähnlichen Kurvenverlauf wie bei den vorherigen Ergebnissen mit Wilate. Es fiel allerdings eine Stagnation der Adhäsion bei etwa 109 Pixeln (relative *Cover Area*) auf, dies entsprach

etwa 66 % der Adhäsion auf Wilate. Ferner war zum Ende der Versuchszeit eine geringe Abnahme der von Thrombozyten besetzten Fläche zu dokumentieren, wofür ein beginnendes Abreißen gebildeter Thromben als ursächlich anzusehen war. Beim Betrachten der einzelnen Bildstapel fielen zusätzlich gegenüber den vorherigen Versuchen mit Wilate optisch eine eher inhomogenere Verteilung und eine vermehrte Thrombenbildung auf. Die Standardabweichung in dieser Versuchsanordnung lag durchschnittlich bei etwa 37 %.

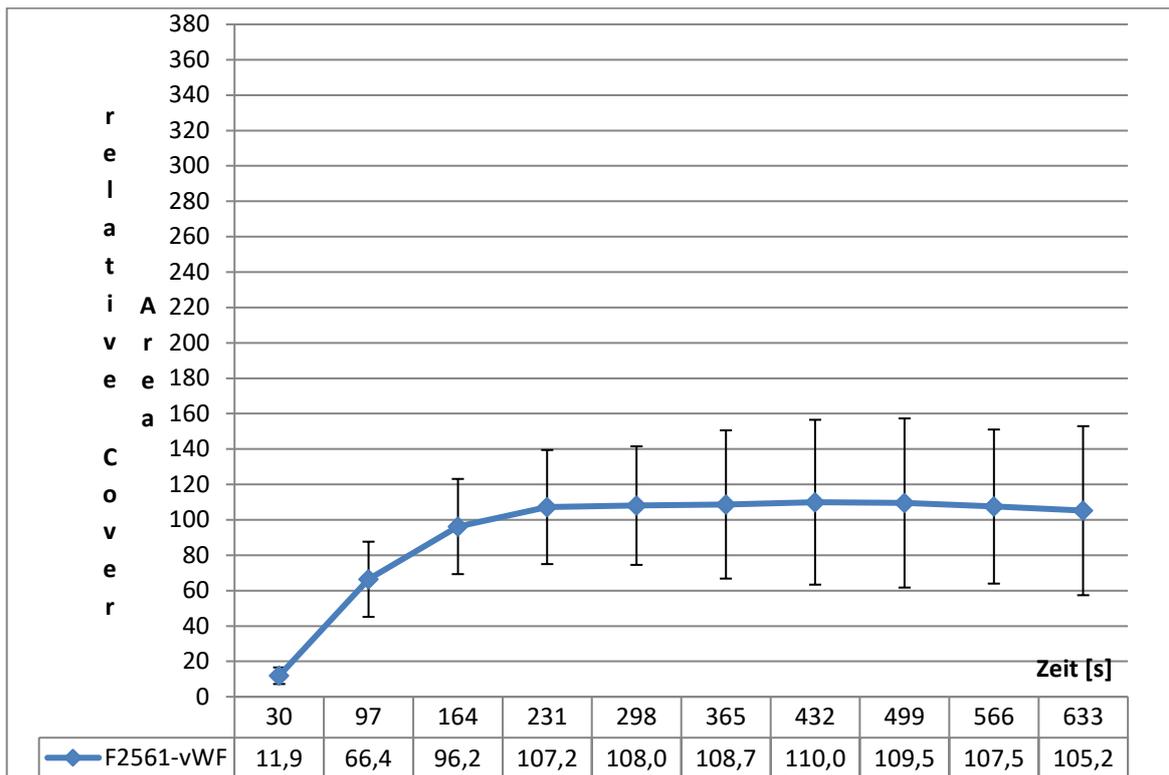


Abb. 5: Plättchenadhäsion an F2561-vWF bei einer Scherrate von 500 s⁻¹

Um die Vergleichbarkeit zur Y2561-Variante des vWF zu erhalten, wurden weitere Versuche mit dem F2561-vWF herangezogen, nun aber mit zur Y2561-Variante angeglichenen Proteinaktivität von circa 55 %. Dazu musste das F2561-vWF-Präparat zur Hälfte mit PBS Puffer verdünnt werden. Daraus abgeleitet war für das F2561-vWF-Präparat eine Proteinaktivität von 53 % anzunehmen, während die Y2561-Variante eine Proteinaktivität von 57 % gezeigt hatte.

In der folgenden Versuchsreihe war eine gegenüber den Versuchen mit der Verwendung der unverdünnten Variante erhöhte Thrombozytenadhäsion zu sehen, die nach dem vierten gescannten Bildstapel ihr Maximum von 180,9 Pixeln (relative *Cover Area*) erreicht hatte. Bis zum Ende der Versuchszeit ging die von Thrombozyten besetzte Fläche etwa auf 91,5%

(also 159,1 Pixel) des Maximums zurück, was auf ein nun stärkeres Abreißen der adhärenierten Thrombozyten und Thromben zurückzuführen war.

Auch in dieser Versuchsreihe waren erhöhte Standardabweichungen von circa 40 % zu verzeichnen.

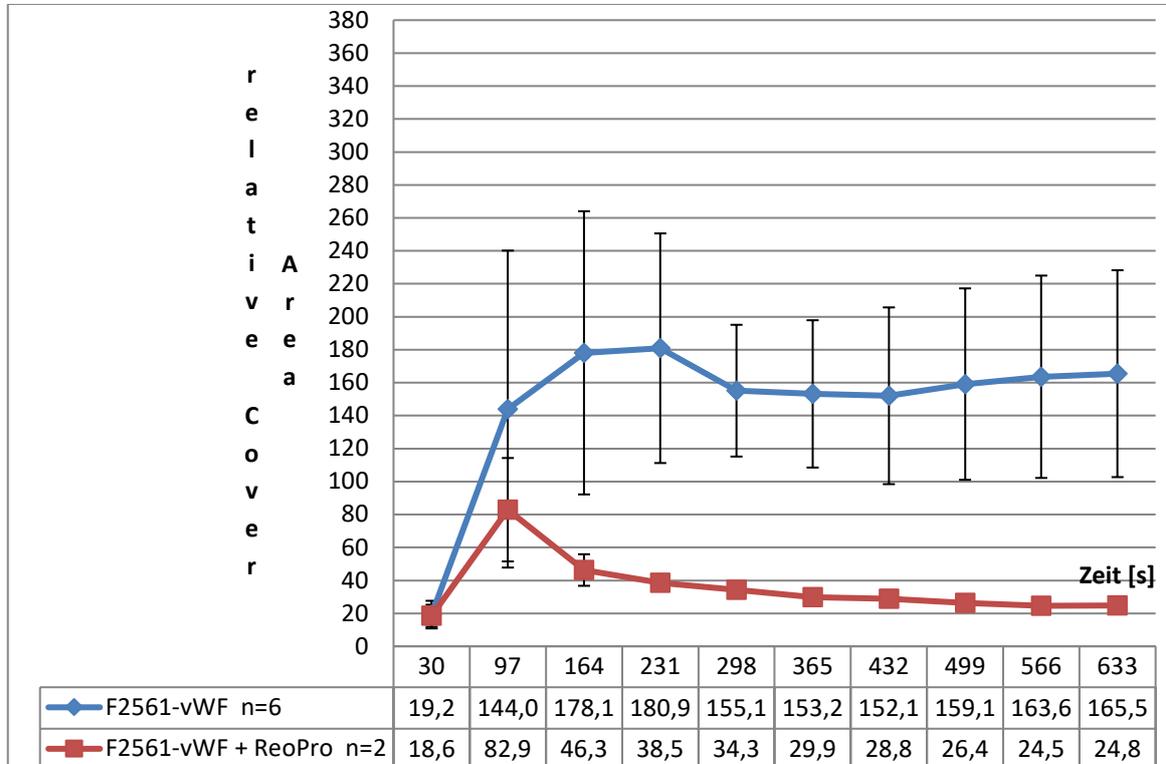


Abb. 6: Plättchenadhäsion an aktivitätsangereicherten F2561-vWF mit und ohne Abciximab bei einer Scherrate von 500 s^{-1}

Zur Beweisführung, dass auch in diesem Versuchsaufbau eine Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelte Thrombozytenadhäsion vorlag, wurde dem Mepacrin-gefärbten, antikoagulierten Vollblut wiederum drei Minuten vor Versuchsbeginn der Antikörper Abciximab hinzugefügt. Die graphische Darstellung zeigte eine im Vergleich zum Versuchsaufbau ohne Abciximab um 85% verminderte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelte Plättchenadhäsion mit einem initialen *Peak* von 82,9 Pixeln (relative *Cover Area*) nach 97 Sekunden. Bis zum Ende der Versuchszeit wurde ein Teil der Thrombozyten (und Thromben) wieder abgerissen, sodass sich die von Thrombozyten besetzte Fläche in der Gegenwart von Abciximab dann auf 29,9% reduzierte. Der beschriebene Peak könnte auf einer Bindung des F2561-vWF mit dem GP $1b\alpha$ -Rezeptor begründet sein, die, wie in Kapitel 1.6 erläutert, der stabilen Plättchenadhäsion mittels des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ vorausgeht und nur transientser Art ist. Auch in dieser Versuchsreihe wurde somit die Spezifität der Plättchenadhäsion für das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ demonstriert (Abb. 6).

3.3 Versuche mit der Y2561-Variante des vWF

In einem weiteren Versuch wurde die Beschaffenheit der Thrombozytenadhäsion auf Y2561-vWF untersucht und mit den vorausgehenden Versuchsergebnissen verglichen.

In diesem Falle wurden Deckgläser mit einer Beschichtung aus Y2561-vWF in die Flusskammer eingesetzt, die Scherrate wurde weiterhin bei 500 s^{-1} gehalten.

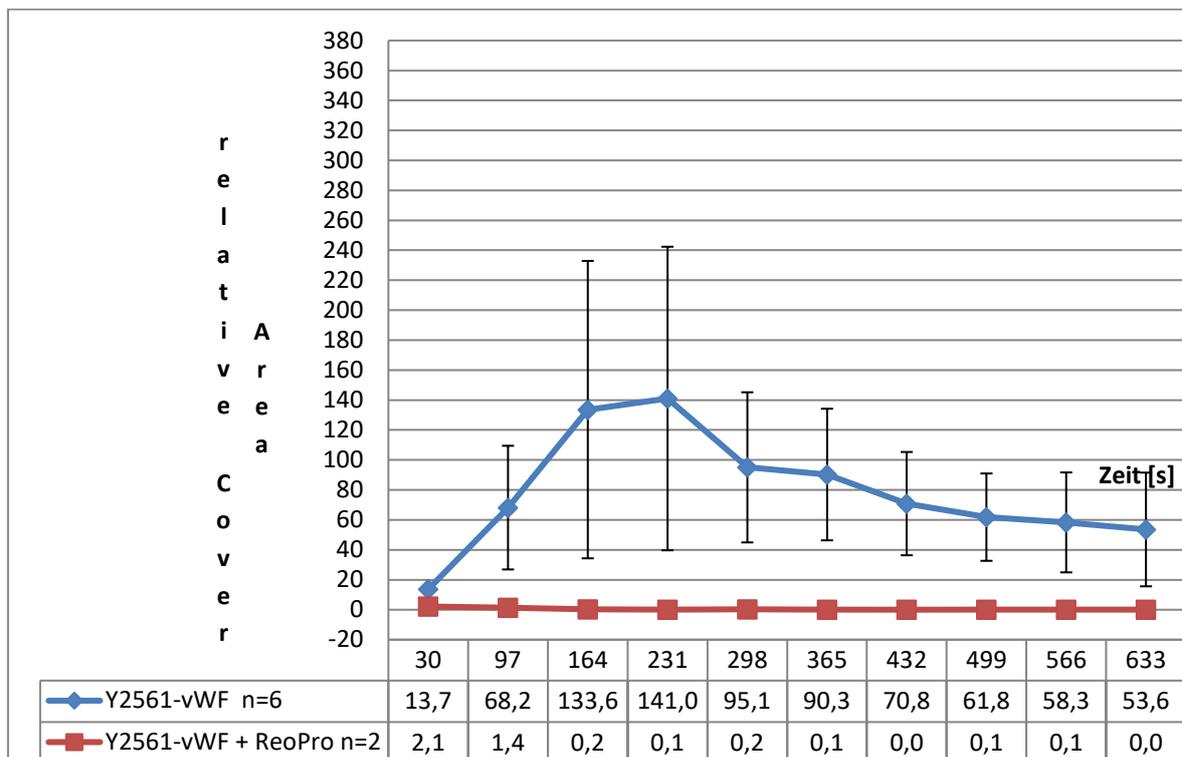


Abb. 7: Plättchenadhäsion an Y2561-vWF bei einer Scherrate von 500 s^{-1} mit und ohne Abciximab

Die im Vergleich zu Wilate um 56,7 % und im Vergleich zum F2561-vWF um 21,5 % geringere Thrombozytenadhäsion erreichte nach einem kurzen, steilen Anstieg ihren höchsten Wert mit 141,0 Pixeln (relative *Cover Area*) nach Erhalten des vierten Bildstapels nach 231 Sekunden. Bis zum letzten Scan nach 633 Sekunden Versuchszeit wurde die von Thrombozyten besetzte Fläche auf 53,6 Pixel und damit auf ungefähr ein Viertel (23,2%) ihres vorherigen Maximums reduziert, was ebenfalls durch das Abreißen von Plättchen und gebildeten Thromben begründet war. Auch hier waren hohe Standardabweichungen um durchschnittlich 54,6 % zu finden (Abb. 7).

Über die Versuchszeit hinaus stabilisierte sich das Ausmaß der Plättchenadhäsion etwa auf Höhe des nach 633 Sekunden gemessenen Levels.

Die Untersuchung der Spezifität der Thrombozytenadhäsion für das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ fiel in dieser Versuchsreihe sehr deutlich aus. Die Adhäsion der Plättchen auf Y2561-vWF wurde

in Anwesenheit von Abciximab über die gesamte Versuchszeit nahezu vollständig blockiert, wobei auch hier die im Vergleich höchsten Werte (maximal 2,1 Pixel relative *Cover Area*) für die relative *Cover Area* während der ersten 97 Sekunden auszumachen waren.

Insgesamt konnte unter einer Objektträgerbeschichtung mit Wilate die höchste Thrombozytenadhäsion vermerkt werden, der F2561-vWF zeigte in beiden aufgeführten Konzentrationen ein mittleres Maß an Plättchenadhäsion. Die geringste thrombogene Wirkung in diesem Versuchsaufbau ging von dem Y2561-vWF-Präparat aus.

3.4 Einfluss unterschiedlicher Scherraten

Ein Ziel der Arbeit, den Einfluss der Scherrate auf die Plättchenadhäsion zu untersuchen, wurde in dieser Versuchsreihe näher beleuchtet.

Es wurde die Thrombozytenadhäsion unter den Scherraten 50 s^{-1} (als Repräsentant der venösen Verhältnisse), 500 s^{-1} (intermediär oder früharteriell, auftretend in großen Arterien) und 1000 s^{-1} (zur Simulation der arteriellen Verhältnisse) bei Deckglasbeschichtungen jeweils mit Wilate sowie den beiden vWF-Varianten F2561 und Y2561 verglichen.

3.4.1 Plättchenadhäsion an Wilate

Unterschiedliche Scherraten hatten bei der Versuchsanordnung mit Wilate einen Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion. Wie im Kapitel 3.1 dargestellt, ergab sich bei der graphischen Darstellung des Adhäsionsverhaltens bei einer Scherrate von 500 s^{-1} ein bogenförmiger Kurvenverlauf mit einem stetigen Anstieg der von Thrombozyten besetzten Fläche (relative *Cover Area*). Eine Scherrate von 50 s^{-1} hatte ebenfalls eine kontinuierliche Zunahme der Plättchenadhäsion zur Folge, allerdings ist der Kurvenverlauf hier eher als Gerade zu beschreiben. Nach 633 Sekunden wurde etwa ein Drittel (32,8%) der Adhäsion (106,4 Pixel relative *Cover Area*) unter einer Scherrate von 500 s^{-1} erreicht.

In der Simulation der arteriellen Strömungsverhältnisse (Scherrate von 1000 s^{-1}) ergab sich eine unregelmäßig verlaufende Kurve mit einem Adhäsionsmaximums bei 218,3 Pixel nach 97 Sekunden, welches in etwa während einer Plateauphase bis 231 Sekunden gehalten wurde. Danach wurde ein Adhäsionsniveau auf 68,7 % (durchschnittlich 149,9 Pixel) des Kurvenmaximums beibehalten, welches 46,2 % der Adhäsion unter einer Scherrate von 500 s^{-1} (nach 633 Sekunden) entspricht (Abb. 8).

Hieraus lässt sich ableiten, dass die Deckglasbeschichtung mit Wilate unter intermediären, früh-arteriellen Scherraten eine höhere Thrombozytenadhäsion verursachte als unter

arteriellen Scherraten. Die geringste von Thrombozyten behaftete Fläche ergab sich unter venösen Scherraten.

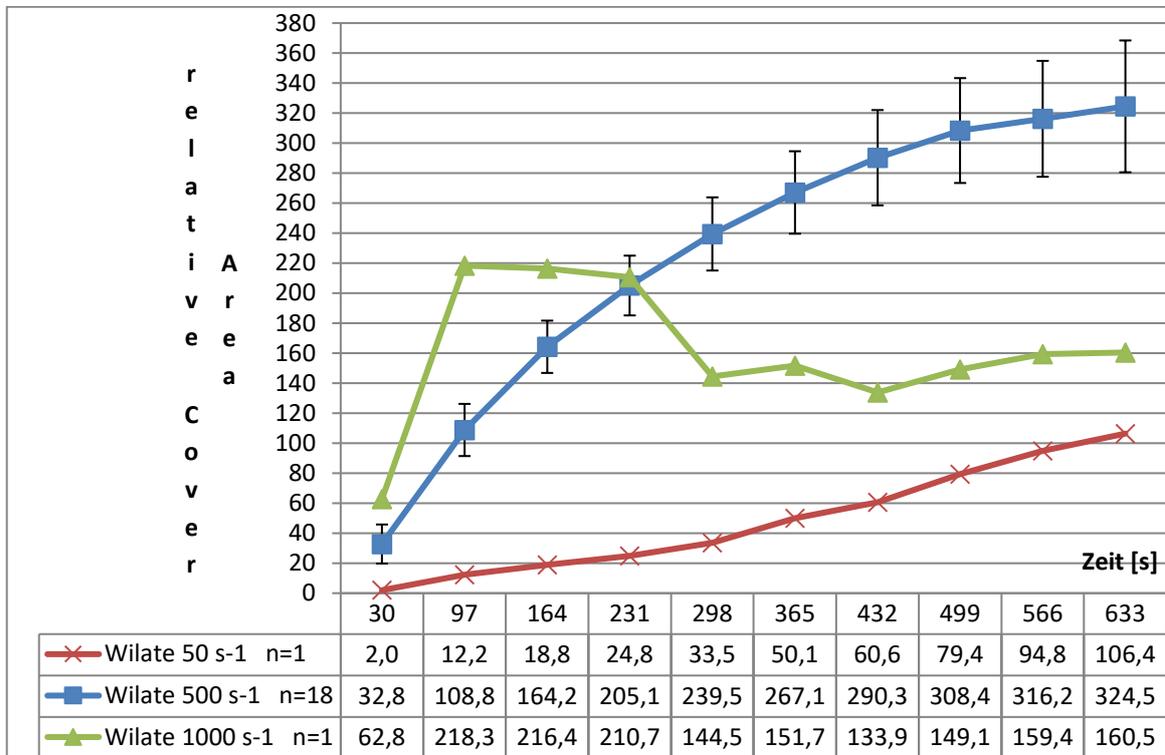


Abb. 8: Plättchenadhäsion an Wilate bei unterschiedlichen Scherraten

3.4.2. Plättchenadhäsion an die Varianten F2561 und Y2561 des vWF

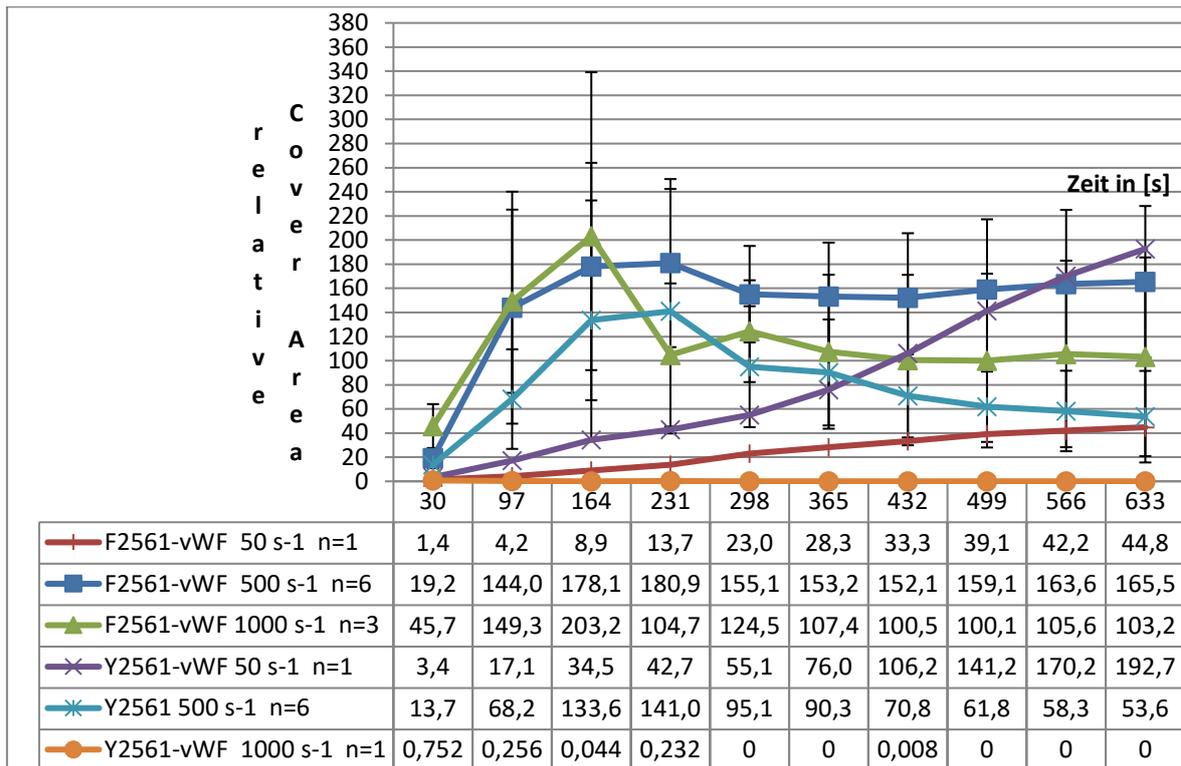


Abb. 9: Plättchenadhäsion an F2561- und Y2561-vWF bei unterschiedlichen Scherraten

Die Versuchsergebnisse mit dem in geringerer Konzentration verwendeten F2561-vWF (Antigenkonzentration: 61,5%, Proteinaktivität: 53%) zeigten bei einer Scherrate von 500 s⁻¹ eine erhöhte Thrombozytenadhäsion gegenüber den Versuchen mit dem unverdünnten (Antigenkonzentration: 121%, Proteinaktivität: 106%) Präparat.

Da dem aktivitätsangeglichenen F2561-vWF-Präparat nahezu die gleiche Proteinaktivität (53 %) zuzuschreiben war wie dem Y2561-vWF-Präparat (Proteinaktivität 57 %) und damit durch die Verdünnung eine bessere Vergleichbarkeit der Stoffe erzielt wurde, wurden alle weiteren Versuche nun mit der verdünnten Form des F2561-vWF unternommen.

Unterschiedliche Scherraten riefen in den Versuchen mit der F2561-Variante des vWF unterschiedliche Adhäsionsniveaus hervor (vgl. Abb. 9). Während bei einer Scherrate von 50 s⁻¹ eine nahezu lineare - wenn auch vergleichsweise sehr geringe - Zunahme der Thrombozytenadhäsion auf 44,9 Pixel (relative *Cover Area*) beobachtet werden konnte, zeigte die graphische Darstellung der Plättchenadhäsion bei einer Scherrate von 1000 s⁻¹ einen unregelmäßigen Kurvenverlauf: Nach 164 Sekunden Versuchszeit wurde die höchste relative Adhäsionsfläche (203 Pixel) erreicht, was an einem *Peak* im Kurvenverlauf sichtbar wurde. Danach kam es erneut zum wiederum noch stärkeren Abreißen von Thrombozyten und Thromben als bei einer Scherrate von 500 s⁻¹, sodass das initiale Adhäsionsniveau von

203 Pixel zum Ende der Versuchszeit nach 633 Sekunden auf 52,5% (106,6 Pixel relative *Cover Area*) minimiert wurde.

Anders als in den Experimenten mit Wilate und F2561-vWF, war bei einer Deckglasbeschichtung mit Y2561-vWF bei der geringsten getesteten Scherrate von 50 s^{-1} die meiste Plättchenadhäsion zu messen. Der entsprechende Kurvenverlauf zeigte eine stetige Zunahme der Thrombozytenadhäsion auf 192,7 Pixel (relative *Cover Area*) und überstieg dabei nach 298 Sekunden das Adhäsionsmaximum an F2561-vWF (44,9 Pixel) und nach 432 Sekunden das Adhäsionsmaximum an Wilate (106,4 Pixel). Nach 633 Sekunden war demnach eine nahezu doppelt so hohe Adhäsionsdichte wie an Wilate zu verzeichnen.

Unter einer Scherrate von 1000 s^{-1} jedoch war auf Y2561-vWF entgegen der Erwartung nahezu keine Thrombozytenadhäsion zu messen.

Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass eine Deckglasbeschichtung mit Y2561-vWF unter einer Scherrate von 50 s^{-1} eine etwa doppelt so hohe Thrombozytenadhäsion hervorrief wie an Wilate und eine viermal so hohe Thrombozytenadhäsion wie an F2561-vWF. Allen Stoffen war jedoch ein stetiger, nahezu linearer Anstieg der Adhäsionsdichte gemeinsam. Eine Scherrate von 1000 s^{-1} verursachte in der graphischen Darstellung der Plättchenadhäsion jeweils auf Wilate und F2561-vWF einen ähnlichen Kurvenverlauf mit Ausbildung eines Adhäsionsmaximums, welches sich bei Wilate als *Plateau* in den ersten 231 Sekunden und bei F2561-vWF als *Peak* nach 164 Sekunden darstellte.

Unter arteriellen Bedingungen war die meiste Adhäsion in der Versuchsreihe mit Wilate zu messen (relative *Cover Area* von 218,3 Pixel), die Geringste in Versuchen mit Y2561-vWF (relative *Cover Area* nahezu 0 Pixel).

3.5 Einfluss von Abciximab auf die Plättchenadhäsion an verschiedene vWF-Präparate bei unterschiedlichen Scherraten

Da abhängig von der Scherrate unterschiedliche Mechanismen der Hämostase zum Tragen kommen, war die Ausführung weiterer Experimente mit Abciximab, dieses Mal unter den bereits getesteten Scherraten von 50 s^{-1} und 1000 s^{-1} , nahe liegend.

3.5.1 Wilate

Unter einer Scherrate von 50 s^{-1} wurde die anfängliche Thrombozytenadhäsion an Wilate von 106 Pixel nach 633 Sekunden auf einen Wert von 26 Pixel gesenkt. Die verbleibende Restadhäsion könnte Ausdruck unspezifischer Bindungen oder auf die transiente Bindung an GP 1b α zurückzuführen sein.

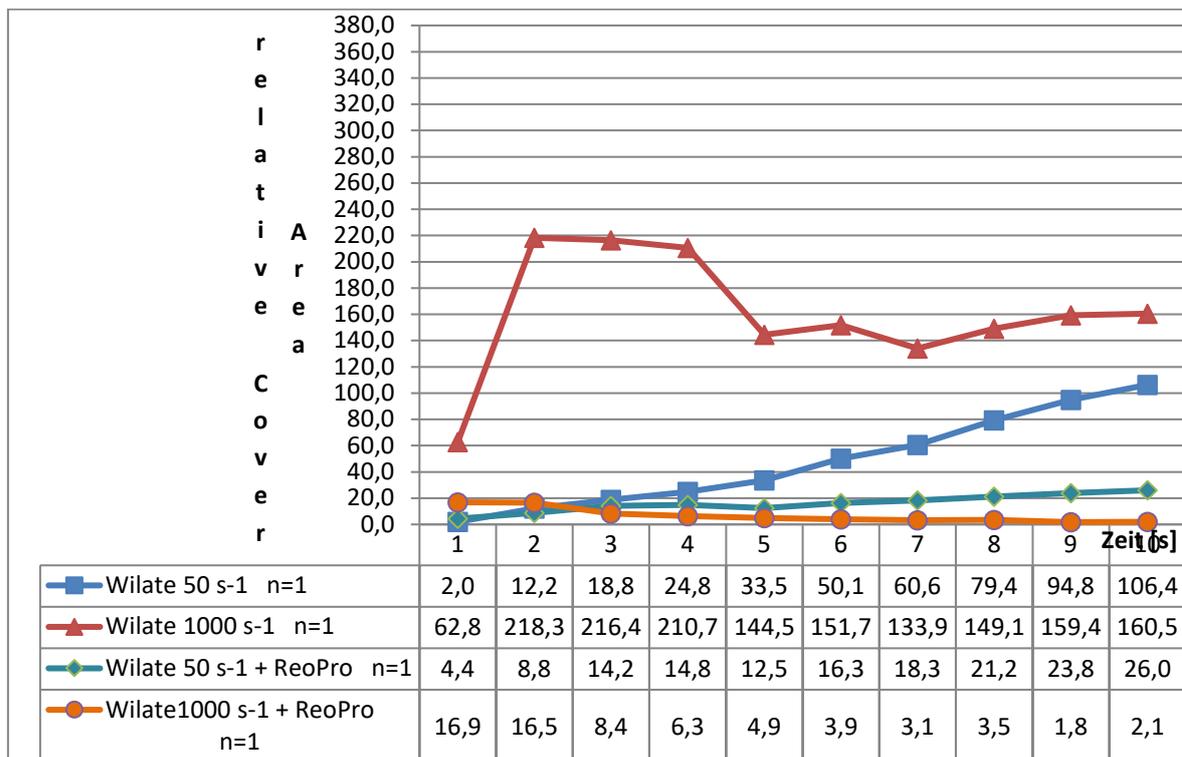


Abb. 10: Plättchenadhäsion an Wilate mit und ohne Abciximab bei unterschiedlichen Scherraten

Bei einer Scherrate von 1000 s^{-1} zeigte sich die Inhibition der Plättchenadhäsion eindeutiger; hier bestand nur noch 1,3 % (2 Pixel) der ursprünglichen Thrombozytenadhäsion an Wilate. Damit konnte davon ausgegangen werden, dass bei diesen Scherraten größtenteils das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in die Plättchenadhäsion involviert war (vgl. Abb.10).

3.5.2 F2561-vWF

Die Hemmung der Thrombozytenadhäsion mit Abciximab fiel unter den Scherraten von 50 s^{-1} und 1000 s^{-1} unterschiedlich hoch aus (s. Abb. 11).

Ohne Abciximab zeigte der Kurvenverlauf unter einer Scherrate von 1000 s^{-1} für die Thrombozytenadhäsion einen unregelmäßigen Verlauf mit einem Adhäsionsmaximum bei 203 Pixel (relative *Cover Area*) nach 164 Sekunden Versuchszeit. Mit Abciximab ergab sich bei dieser Scherrate nach einer initialen Plateauphase von 47 Pixeln ebenfalls bis zur 164.

Sekunde der Versuchszeit eine unzweifelhafte Inhibition der Thrombozytenadhäsion auf 1,5 Pixel relative *Cover Area*.

Die Reduktion der Thrombozytenadhäsion unter einer Scherrate von 50 s^{-1} verlief jedoch weniger anschaulich: Während der ersten 365 Sekunden stieg die von Thrombozyten besetzte Fläche bei der Vermischung des antikoagulierten Vollblutes mit dem Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Antikörper auf 72,6 Pixel sogar stärker an, um im weiteren Verlauf bis zum Versuchsende bei 633 Sekunden schließlich auf 46,8 % der Adhäsion (42,0 Pixel relative *Cover Area*) bei unbehandeltem antikoaguliertem Vollblut abzufallen.

Möglicherweise ist dieses Phänomen mit einem sehr niedrigen zu Grunde liegenden Adhäsionsniveau, welches Schwankungen infolgedessen weniger offensichtlich macht, zu erklären; eine Beteiligung des GP 1b α -Rezeptors konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden. Denkbar wäre zusätzlich eine Interaktion des rekombinant hergestellten F2561-vWF mit thrombogenen Oberflächen der Flusskammer.

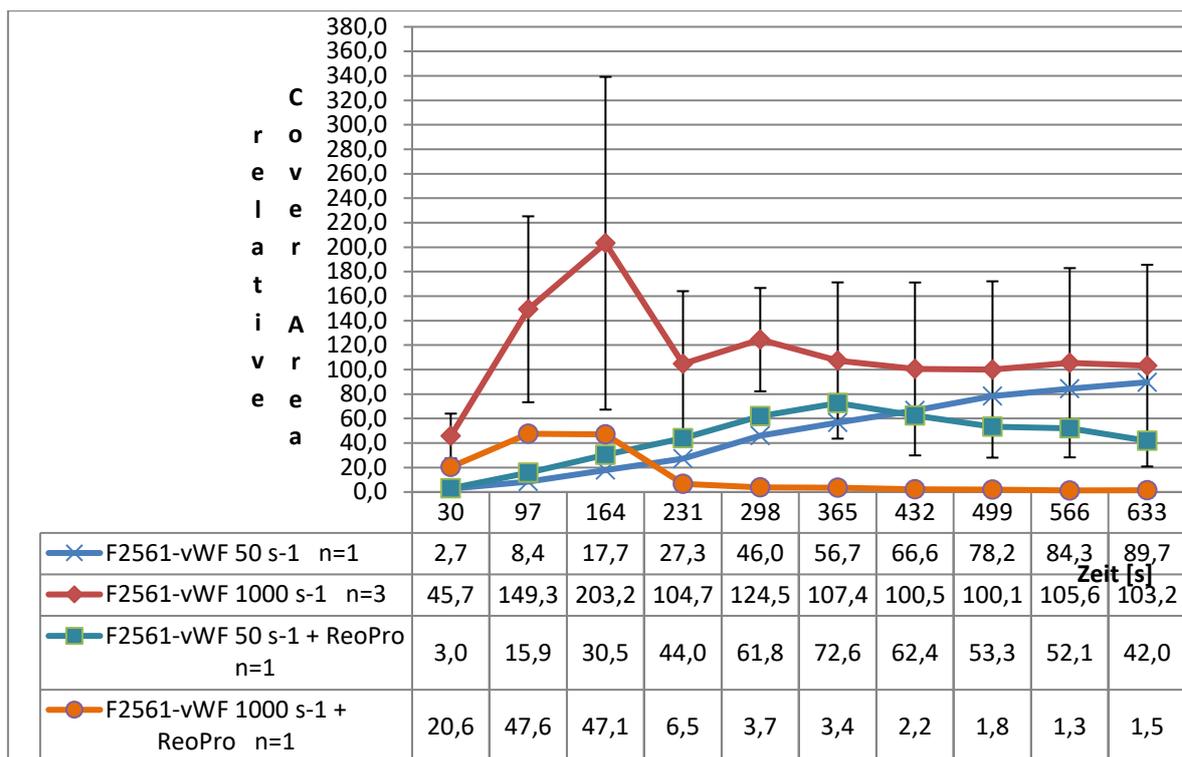


Abb. 11: Plättchenadhäsion an F2561-vWF mit und ohne Abciximab bei unterschiedlichen Scherraten

3.5.3 Y2561-vWF

Bei einer Scherrate von 50 s^{-1} wurde die Thrombozytenadhäsion an Y2561-vWF durch einen stetig ansteigenden Kurvenverlauf dargestellt. Unter einer Inhibition mit Abciximab wurde

die Adhäsionsdichte auf 0,41 % (0,7 Pixel) minimiert, womit das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ als Mediator der Thrombozytenadhäsion belegt war.

Wie bereits im Kapitel 3.4.2 dokumentiert, konnte der polymorphe vWF bei einer Scherrate von 1000 s^{-1} nahezu keine Adhäsion bewirken. Damit war eine mögliche Inhibition der Plättchenadhäsion nicht beurteilbar (s. Abb. 12).

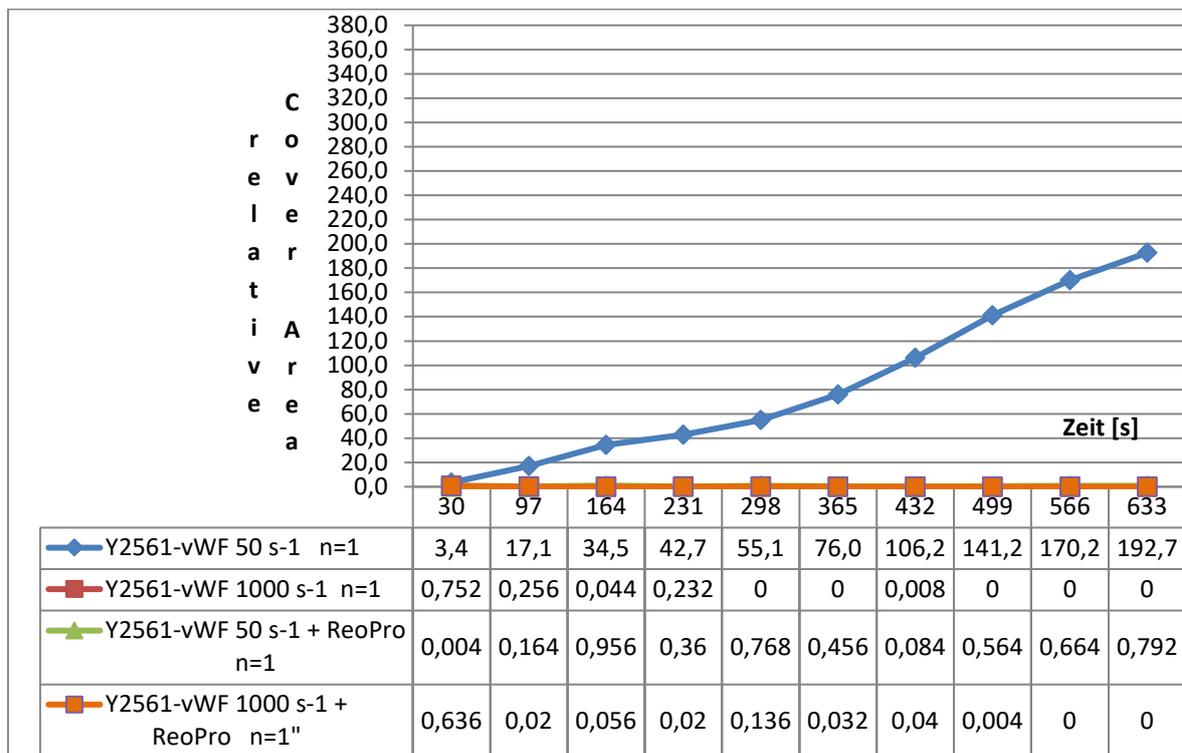


Abb. 12: Plättchenadhäsion an Y2561-vWF mit und ohne Abciximab bei unterschiedlichen Scherraten

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass Abciximab die Thrombozytenadhäsion auf Wilate und F2561-vWF unter einer arteriellen Scherrate von 1000 s^{-1} besonders wirksam hemmte. Hier war die Beteiligung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ bei der Thrombozytenadhäsion an von-Willebrand-Faktor also stark ausgeprägt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe waren somit mit den in der Literatur gefundenen Darstellungen kongruent. Die Verwendung von Abciximab in der Versuchsreihe mit F2561-vWF bei einer Scherrate von 1000 s^{-1} zeigte eine anfängliche Plateauphase mit vorübergehender Thrombozytenadhäsion, die sich zum Ende der Versuchszeit wieder löste.

Unter venösen Strömungsverhältnissen schien die Bedeutung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ zwar weniger ausgeprägt, aber dennoch wesentlich. Auf Wilate und Y2561-vWF erfolgte eine Hemmung der Thrombozytenadhäsion, auf F2561-vWF konnte nur eine Inhibition auf 46 % erreicht werden.

3.6 Probandenversuche

Im Anschluss an diese Versuche wurde Probandenblut untersucht. Hier wurden letztendlich nur Thrombozyten mit der HPA-1a-Variante des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ verwendet, da die in den Evaluationsversuchen hohen Standardabweichungen eine sinnvolle Untersuchung der Unterschiede im Adhäsionsverhalten zwischen den Integrin-Varianten HPA-1a und HPA-1b nicht erlaubten. Es erfolgte eine Untersuchung der Adhäsionsunterschiede bei unterschiedlichen Scherraten mit den zwei beschriebenen von-Willebrand-Faktor-Präparaten.

Getestet wurden eine venöse Scherrate von 100 s^{-1} und eine arterielle Scherrate von 1000 s^{-1} (vgl. Abb. 13).

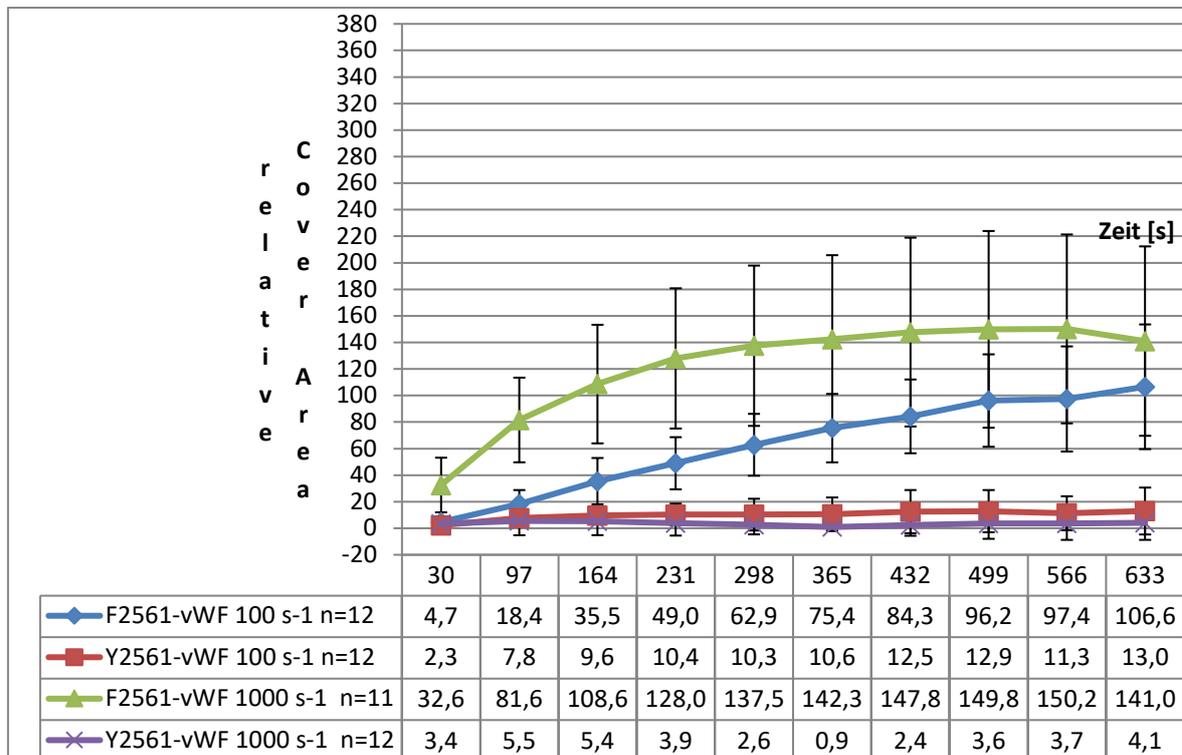


Abb. 13: Plättchenadhäsion an die vWF-Varianten F2561 und Y2651 bei unterschiedlichen Scherraten

Die beiden vWF-Varianten wiesen bei einer Scherrate von 100 s^{-1} ein unterschiedliches Verhalten auf:

Während die Thrombozytenadhäsion in den Versuchen mit dem F2561-vWF kontinuierlich auf einen Wert von 106 Pixeln anstieg und damit ein ähnliches Verhalten wie in den vorherigen Versuchen aufwies, stagnierte die Plättchenadhäsion auf Y2561-vWF frühzeitig auf sehr geringem Niveau (durchschnittlich 12,4 Pixel). Dies steht im Gegensatz zu den

Ergebnissen der vorherigen Versuche unter einer Scherrate von 50 s^{-1} , in denen die Thrombozytenadhäsion auf Y2651-vWF über die Versuchszeit einen stetigen, steileren Anstieg auf 192,7 Pixel relative *Cover Area* erfuhr.

In der hier vorliegenden Versuchsreihe erreichte die Plättchenadhäsion an die Y2561-Variante des vWF lediglich 11,6% der Adhäsion an F2561-vWF. Überdies traten auch in dieser Versuchsreihe für beide Stoffe hohe Standardabweichungen von etwa 44% (F2561-vWF) und 102% (Y2561-vWF) auf.

Weiterhin wurde das Verhalten der beiden vWF-Varianten unter arteriellen Bedingungen untersucht.

Wiederum stagnierte die Thrombozytenadhäsion auf Y2561-vWF auf in diesem Fall noch niedrigerem Niveau (ca. 3,6 Pixel durchschnittlich) als bei den vorherigen Versuchen mit einer Scherrate von 100 s^{-1} . Das durchschnittliche Maß der Adhäsion wurde bereits nach 30 Sekunden erreicht und variierte im weiteren Versuchsverlauf nur wenig.

Die sehr geringen, schwankenden Werte ergeben sich hier aus einzelnen, kurzfristig adhärerten und anschließend wieder gelösten Thrombozyten, welche im Sinne der Auswertungskriterien (s. Kapitel 2.2.8) nicht als stabile Adhäsion gewertet werden konnten. Die bisherige Vermutung, die geprüfte von-Willebrand-Faktor-Mutation habe unter hohen Scherraten eine gesteigerte Thrombozytenadhäsion zur Folge, konnten die vorliegenden Versuchsergebnisse nicht unterstützen. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die hier getestete arterielle Scherrate für den zu Grunde liegenden Sachverhalt noch zu niedrig gewählt war (vgl. Diskussion, Kapitel 4.1.3).

Die über die Versuchszeit durch Plättchenadhäsion auf F2561-vWF bedeckte Fläche zeigte graphisch dargestellt einen bogenförmigen Verlauf bis zu einem Höchstwert von 150,2 Pixel relative *Cover Area*, wobei sich zum Ende der Versuchszeit wiederum Thrombozyten und gebildete Thromben ablösten, sodass nach 633 Sekunden ein Wert von 141 Pixel relative *Cover Area* erreicht wurde. Im Vergleich zu den Evaluationsversuchen mit F2561-vWF und Blut des Merkmals HPA-1a1b ist hier ein Adhäsionszuwachs von 40,9% festzustellen.

Die Standardabweichungen dieser Versuchsreihe waren durchschnittlich bei 47% (vWF-WT) und 266% (vWF-Y2561) angesiedelt.

Zusammenfassung

Entgegen der Erwartungen verursachte eine Objektträgerbeschichtung mit dem Y2561-vWF vor allem bei höheren Scherraten keine erhöhte Thrombozytenadhäsion. Gegenüber dem F2561-vWF betrug sie sogar nur 11,6% unter einer venösen Scherrate von 100 s^{-1} und 0,3% unter einer arteriellen Scherrate von 1000 s^{-1} . Es ließ sich bezüglich der arteriellen Simulation jedoch festhalten, dass die Plättchenadhäsion auf Y2561-vWF - unter dem Einfluss hoher Standardabweichungen - in Verbindung mit der homozygoten HPA-1a1a-Variante des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ eine höhere Plättchenadhäsion verursachte, als in der Interaktion mit der heterozygoten HPA-1a1b-Variante des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. Außerdem war eine etwa zehnfach höhere Thrombozytenadhäsion bei Verwendung einer Scherrate von 50 s^{-1} und Vollblut der heterozygoten Rezeptorvariante gegenüber einer Scherrate von 100 s^{-1} in Verbindung mit der homozygoten Rezeptorvariante festzuhalten.

4. Diskussion

In diesem Kapitel sollen die im Kapitel 3 vorgelegten Ergebnisse interpretiert und in den thematischen Hintergrund eingeordnet werden.

4.1 Interpretation der Ergebnisse und Einordnung in die Literatur

4.1.1 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Die Beteiligung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ an der Thrombozytenadhäsion an Varianten des vWF wurde mit Hilfe des beschriebenen kompetitiven Antikörpers Abciximab bei unterschiedlichen Scherraten demonstriert.

Wie in der Literatur erläutert [12, 38, 40] und hier präsentiert, ist das Integrin demnach in der Lage eine stabile Bindung zwischen dem von-Willebrand-Faktor und den Thrombozyten einzurichten.

Prinzipiell ist in diesem Versuchsaufbau auf Grund der erlangten Ergebnisse immer von einer Beteiligung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auszugehen, jedoch lassen die im Ergebnisteil geschilderten *Peaks* zu Beginn der Versuchszeit der Antikörper-Experimente bei einer Scherrate von 500 s^{-1} und 1000 s^{-1} mit F2561-vWF sowie bei einer Scherrate von 500 s^{-1} mit Wilate auch auf eine Beteiligung eines anderen Rezeptors schließen.

Hier käme der GP $1b\alpha$ -Rezeptor in Betracht, ein Rezeptor mit großer Bindungs- und kleinerer Dissoziationsrate [41], der wie bereits im Kapitel 1.6 vorgetragen für die Thrombozytenadhäsion unter hohen Scherraten essentiell ist [35, 41]. Durch die Ermöglichung der schnellen Ligandenbindung werden Thrombozyten aus dem Blutfluss abgebremst und können sich nun nur noch mit einem Bruchteil der ursprünglichen Flussgeschwindigkeit weiterbewegen. Mit Hilfe dieses Vorgangs stehen sie nun dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, welches eine niedrige Bindungsrate besitzt, zur irreversiblen Bindung zu Verfügung [17, 41].

Da das im Adhäsionsvorgang konsekutiv angesprochene Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in dieser Versuchsanordnung jedoch kompetitiv mit Abciximab inhibiert war, konnte die stabile Thrombozytenadhäsion an dieser Stelle nicht etabliert werden, woraufhin sich die initial gebundenen Plättchen wieder lösten.

Die Erkenntnis, dass unter anwachsenden Scherraten die einleitende Bindung zwischen von-Willebrand-Faktor und dem GP $1b\alpha$ -Rezeptor zum Abbremsen der Thrombozyten wesentlich ist, würde somit unter dieser Annahme gestützt, da das Auftreten eines Peaks bei der geringeren venösen Scherrate von 50 s^{-1} nicht zu beobachten war.

Ferner könnte die anfangs erhöht gemessene Thrombozytenadhäsion Ausdruck unspezifischer, nur temporärer Adhäsion sein.

Angesichts der ausgesprochen hohen Standardabweichungen in den Evaluationsversuchen mit beiden vWF-Varianten wurde die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens der beiden HPA-1-Varianten des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ nicht mehr durchgeführt. Ein sinnvoller Vergleich von Versuchsergebnissen schien auf dieser Grundlage unmöglich.

Interaktion des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit Wilate

Das Therapeutikum Wilate enthält von-Willebrand-Faktor und den Gerinnungsfaktor VIII in gegenüber den physiologischen Verhältnissen stark erhöhter Konzentration.

Eine Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelte Thrombozytenadhäsion auf Deckgläsern, die mit diesem Stoff beschichtet waren, konnte in jeder Versuchsreihe nachgewiesen werden, wobei die meiste Adhäsion bei einer Scherrate von 500 s^{-1} zu notieren war. Unter einer Scherrate von 50 s^{-1} zeigte die graphische Darstellung der Thrombozytenadhäsion auf Wilate und den F2561-vWF über die Zeit einen nahezu deckungsgleichen Verlauf. Auch bei einer Scherrate von 1000 s^{-1} konnten die Versuche mit Wilate ähnliche Ergebnisse erzielen wie die Versuche mit F2561-vWF.

Interaktion des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit dem F2561-vWF

Der F2561-vWF rief unter früharteriellen Bedingungen (Scherrate von 500 s^{-1}) das höchste Maß an Thrombozytenadhäsion hervor, unter den hier mit einer Scherrate von 1000 s^{-1} simulierten arteriellen Bedingungen, welche laut der zu Grunde liegenden Hypothese höher hätte sein sollen, wurde jedoch nur eine um ca. 33% geringere Thrombozytenadhäsion entfaltet.

Ergänzend muss hinzugefügt werden, dass das höchste Maß der Thrombozytenadhäsion unter höheren Scherraten bereits nach 231 Sekunden Versuchszeit erreicht wurde. Bei einer Verletzung des arteriellen Systems, durch die in einer kürzeren Zeitspanne ein größerer Blutverlust entstehen würde, kann also ein zügiger eine Blutstillung erwirkt werden.

Interaktion des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit dem Y2561-vWF

Insgesamt haben Experimente mit der polymorphen Variante Y2561 des vWF nicht die Arbeitshypothese basierend auf den Forschungsergebnissen von Hellermann et al. (2007) [9] bestätigt, die das Y2561-Allel des von-Willebrand-Faktors als neu erkannten

Risikofaktor für einen Myokardinfarkt bei Frauen unter 55 Jahren darstellten, in deren Folge im Vergleich in den Experimenten mit F2561-vWF eine höhere Thrombozytenadhäsion erwartet wurde.

Diese These ist auf Grund der hier vorliegenden Versuchsergebnisse zumindest bei Personen mit dem HPA-1a1a und dem HPA-1a1b-Merkmal im Rezeptorpolymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ nicht haltbar, zusätzlich musste ein noch niedrigeres Adhäsionsniveau für das HPA-1a1b-Merkmal (Cover Area 0,1292 Pixel zu 3,6 Pixel bei HPA-1a1a, Scherrate 1000 s^{-1}) dokumentiert werden.

Bei einer Scherrate von 1000 s^{-1} , wie sie in kleinen Arterien, zum Beispiel den Koronararterien vorherrscht, blieben jedoch nahezu keine Thrombozyten stabil am immobilisierten von-Willebrand-Faktor haften.

Da selbst transiente Plättchenadhäsion, wie sie beispielsweise über den GP 1b α -Rezeptor vermittelt wird, nicht festzustellen war, könnte dies als fehlende Interaktion mit beiden für die Thrombozytenadhäsion relevanten Rezeptoren aufgefasst werden.

Eine Bindung der polymorphen Variante des vWF an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist dennoch möglich und bewiesen, da bei einer Scherrate von 50 s^{-1} eine deutliche Thrombozytenadhäsion ermittelt wurde. Dass sie unter allen verwendeten Stoffen hier am höchsten ausfiel, könnte zudem in den Struktureigenschaften des rekombinant hergestellten von-Willebrand-Faktors begründet liegen.

4.1.2 Die polymorphe Variante des vWF

Schneppenheim et al. stellten im Jahr 2011 Überlegungen zu den Auswirkungen unterschiedlicher Mutationen des von-Willebrand-Faktor-Gens an [42].

Der in der Y2561-Variante begründete Aminosäureaustausch erfolgt in unmittelbarer Nähe des RGD-Bindungsmotivs in der C1-Domäne des vWF. Wie zuvor erläutert handelt es sich dabei um die für die Ligandenbindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ wichtige Proteinsequenz des vWF an den Stellen 1744-1746.

Eine Mutation in der Primärstruktur von Proteinen kann eine Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur zur Folge haben. In diesem Fall nimmt die Tertiärstruktur des Proteins sowie seine Anhäufung in eine Multimer-Form Einfluss auf die Funktion des von-Willebrand-Faktors. Wäre durch eine Mutation die räumliche Struktur des von-Willebrand-Faktors verändert, hätte dies Auswirkung auf seine Funktionen im Rahmen der Hämostase, beispielsweise wären ein Defizit in der Rezeptorbindung (an das GP 1b oder das Integrin

$\alpha_{IIb}\beta_3$) oder ein Defekt der Scherraten-induzierten Wirkung des von-Willebrand-Faktors vorstellbar. In der jüngst veröffentlichten Arbeit von Schneppenheim et al. konnte an Hand der Versuchsergebnisse eher ein „*gain of function*“ für die Y2561-Variante des vWF angenommen werden [47].

Die unserer Arbeit zu Grunde liegende These, dass die Y2561-Variante des vWF eine erhöhte Plättchenadhäsion verursacht und damit eine erhöhte Gefahr für arterielle Thrombosen darstellt, welche in der Folge Myokardinfarkte herbeiführen können, beruht auf der zuvor beschriebenen Studie von Hellermann et al. aus dem Jahr 2007 [9]. Hier wurde bei unter 55-jährigen Frauen mit wiederholtem Myokardinfarkt ein gehäuftes Auftreten des genannten von-Willebrand-Faktor-Merkmals entdeckt. Eine Assoziation mit einer KHK war nicht nachweisbar. Somit könnte die vorliegende Variante zu einer prothrombotischen Eigenschaft führen, die das vorzeitige Eintreten eines Infarktes zur Folge hat.

4.1.3 Unterschiedliche Scherraten

Die unter höheren Scherraten von und beobachtete geringere Adhäsion auf Y2561-vWF ist möglicherweise mit einem physiologischen Phänomen erklärbar. Wie bereits dargelegt, wird die Interaktion des von-Willebrand-Faktors mit dem GP 1b α -Rezeptor zur Initiation der Hämostase bei höheren Scherraten immer wichtiger. Hierbei handelt es sich zwar um eine instabile Bindung, diese ist jedoch in der Lage das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ bei der Etablierung der dauerhaften Thrombozytenadhäsion zu unterstützen. Wenn die veränderte Struktur des von-Willebrand-Faktors bei höheren Scherraten kein *Uncoiling* mehr zulässt und dementsprechend seine vielen Kontaktstellen nicht freigelegt werden, kann eine bei hohen Scherraten besonders wichtige Rezeptorbindung zum GP 1b α nur in eingeschränktem Maße eingegangen und die nachfolgende stabile Bindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ somit verhindert werden.

Weiterhin wäre für das von Savage et al. und das in den dieser Arbeit zugehörigen Versuchen beschriebene Phänomen des Thrombozyten-*Rolling* [37] möglicherweise auch die unter diesen Scherraten instabile Bindung zwischen der A1-Domäne des vWF und dem GP 1b α -Rezeptor ursächlich. Abgebremste Blutplättchen werden durch die hohen Scherkräfte wieder gelöst und könnten mit einem anderen GP1b α -Rezeptor eine neue Kopplung über den vWF eingehen. Die stabile und irreversible Adhäsion der aktivierten Thrombozyten über das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ bleibt somit mangels ausreichender Ligandenbindungszeit aus.

Dem steht jedoch entgegen, dass die Thrombozytenadhäsion unter dem Einfluss hoher Scherraten auch ohne eine vorherige Aktivierung der Plättchen [40], zum Beispiel durch Thromboxan und Adenosindiphosphat [36], mittels der Bindung an den von-Willebrand-Faktor eingeleitet werden kann.

Obwohl der von-Willebrand-Faktor bis zu einer Scherrate von weniger als 1000 s^{-1} in seiner geckoilten und ab etwa 1000 s^{-1} in der gestreckten, funktionell multivalenten Form vorliegen soll [45], besteht die Möglichkeit, dass die in dieser Versuchsanordnung gewählten Scherraten zu niedrig für eine Aktivierung dieses Mechanismus und zu hoch für eine kompetente Ligandenbindung seitens des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ gewählt waren [46].

Im Bereich von Scherraten um $50\text{-}40.000\text{ s}^{-1}$ ist mit der Ausbildung der in der Einführung erläuterten *Discrete Adhesion Points* (DAPs) zu rechnen, deren Membranabschnitt nach der Bindung eines Liganden in Richtung des Blutflusses in die Länge gezogen werden kann (Ausbildung der *Tethers*). Dabei ist von Bedeutung, dass das Elastizitätsmodul der Thrombozytenmembran erst ab einer Scherrate von 6000 s^{-1} überwunden wird [35]. Dies legt nahe, dass einmal gebundene Thrombozyten im hier verwendeten Versuchsaufbau nur durch einen Bindungsverlust mit den entsprechenden Oberflächenrezeptoren wieder freigegeben werden können, weniger aber durch das Abreißen der o.g. *Tethers*. Für die hier durchgeführte Versuchsreihe bedeutet dies, dass das besonders in den Versuchen mit F2561-vWF vorgestellte Abreißen von Thrombozyten und Thromben durch eine nicht ausreichend stabile Rezeptorbindung bedingt sein könnte.

In den o.g. Daten von Schneppenheim et al. zeigten sich bei Scherraten um 500 s^{-1} noch keine relevanten Unterschiede in der Thrombozytenadhäsion zwischen der Y2561- und der F2561-Variante des vWF. Bei Scherraten ab 1800 s^{-1} wurde jedoch eine erhöhte Thrombozytenadhäsion bei Vorliegen von Y2561-vWF merklich.

Diese Resultate werden durch die Versuchsergebnisse unserer Arbeit nicht gestützt. Ursächlich könnten hier die deutlich geringere Fallzahl, sehr hohe Standardabweichungen innerhalb der Versuchsreihen sowie auch unterschiedliche Methoden (Flusskammer vs. BioFlux-System) sein [47].

5. Literaturverzeichnis

- [1] T. V. Byzova and E. F. Plow, "The PIA2 allele and cardiovascular disease: the pro33 and con," *J. Clin. Invest.*, vol. 105, no. 6, pp. 697–698, Mar. 2000.
- [2] R. E. Scharf and R. B. Zotz, "Blood Platelets and Myocardial Infarction: Do Hyperactive Platelets Really Exist?*", *Transfus. Med. Hemotherapy*, vol. 33, no. 2, pp. 189–199, 2006.
- [3] R. B. Zotz and R. E. Scharf, "Platelet Receptor Polymorphisms and their Role in Cardiovascular Disease/Thrombozytäre Rezeptor-Polymorphismen und ihre Bedeutung bei kardiovaskulären Erkrankungen," *LaboratoriumsMedizin*, vol. 26, no. 11/12, pp. 584–593, Jan. 2002.
- [4] R. B. Zotz, M. Klein, H. P. Dauben, C. Moser, E. Gams, and R. E. Scharf, "Prospective analysis after coronary-artery bypass grafting: platelet GP IIIa polymorphism (HPA-1b/PIA2) is a risk factor for bypass occlusion, myocardial infarction, and death," *Thromb. Haemost.*, vol. 83, no. 3, pp. 404–407, Mar. 2000.
- [5] R. B. Zotz, B. R. Winkelmann, C. Müller, B. O. Boehm, W. März, and R. E. Scharf, "Association of polymorphisms of platelet membrane integrins α IIb β 3 (HPA-1b/PIA2) and α 2 β 1 (α 2807TT) with premature myocardial infarction," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 3, no. 7, pp. 1522–1529, 2005.
- [6] E. J. Weiss, P. F. Bray, M. Tayback, S. P. Schulman, T. S. Kickler, L. C. Becker, J. L. Weiss, G. Gerstenblith, and P. J. Goldschmidt-Clermont, "A Polymorphism of a Platelet Glycoprotein Receptor as an Inherited Risk Factor for Coronary Thrombosis," *N. Engl. J. Med.*, vol. 334, no. 17, pp. 1090–1094, Apr. 1996.
- [7] K. V. Vijayan and P. F. Bray, "Molecular Mechanisms of Prothrombotic Risk Due to Genetic Variations in Platelet Genes: Enhanced Outside-In Signaling Through the Pro33 Variant of Integrin β 3," *Exp. Biol. Med.*, vol. 231, no. 5, pp. 505–513, May 2006.
- [8] J. S. Bennett, F. Catella-Lawson, A. R. Rut, G. Vilaire, W. Qi, S. C. Kapoor, S. Murphy, and G. A. FitzGerald, "Effect of the PIA2 alloantigen on the function of β 3-integrins in platelets," *Blood*, vol. 97, no. 10, pp. 3093–3099, May 2001.
- [9] N. Hellermann, B. O. Boehm, W. Maerz, J. Rischewski, B. R. Winkelmann, R. B. Zotz, and R. Schneppenheim, "The Y2561 allele of a common polymorphism in the C1 domain of von Willebrand Factor appears as a novel risk factor myocardial infarction," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 5, no. 1, Aug. 2007.
- [10] H. Lippert, *Lehrbuch Anatomie*, 7th ed. München: Urban & Fischer Verlag / Elsevier GmbH, 2006.
- [11] B. Jj, F. V, C. Jh, and B. L, "Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease.," *Circulation*, vol. 87, no. 3 Suppl, pp. II3–16, Mar. 1993.
- [12] Z. M. Ruggeri and G. L. Mendolicchio, "Adhesion Mechanisms in Platelet Function," *Circ. Res.*, vol. 100, no. 12, pp. 1673–1685, Jun. 2007.
- [13] P. A. Aarts, S. A. van den Broek, G. W. Prins, G. D. Kuiken, J. J. Sixma, and R. M. Heethaar, "Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 8, no. 6, pp. 819–824, Nov. 1988.
- [14] E. Falk, "Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi.," *Br. Heart J.*, vol. 50, no. 2, pp. 127–134, Aug. 1983.
- [15] G. Herold, *Innere Medizin*, 2010th ed. Köln: Herold, 2010.

- [16] M. S. Williams and P. F. Bray, "Genetics of Arterial Prothrombotic Risk States," *Exp. Biol. Med.*, vol. 226, no. 5, pp. 409–419, May 2001.
- [17] J. Lefkovits, E. F. Plow, and E. J. Topol, "Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptors in Cardiovascular Medicine," *N. Engl. J. Med.*, vol. 332, no. 23, pp. 1553–1559, 1995.
- [18] S. J. Shattil and M. H. Ginsberg, "Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology.," *J. Clin. Invest.*, vol. 100, no. 1, pp. 1–5, Jul. 1997.
- [19] K. V. Vijayan, T. C. Huang, Y. Liu, A. Bernardo, J.-F. Dong, P. J. Goldschmidt-Clermont, B. R. Alevriadou, and P. F. Bray, "Shear stress augments the enhanced adhesive phenotype of cells expressing the Pro33 isoform of integrin $\beta 3$," *Febs Lett.*, vol. 540, no. 1–3, pp. 41–46, Apr. 2003.
- [20] G. Andrioli, P. Minuz, P. Solero, S. Pincelli, R. Ortolani, S. Lussignoli, and P. Bellavite, "Defective platelet response to arachidonic acid and thromboxane A2 in subjects with PLA2 polymorphism of $\beta 3$ subunit (glycoprotein IIIa)," *Br. J. Haematol.*, vol. 110, no. 4, pp. 911–918, 2000.
- [21] K. V. Vijayan, Y. Liu, W. Sun, M. Ito, and P. F. Bray, "The Pro33 Isoform of Integrin $\beta 3$ Enhances Outside-in Signaling in Human Platelets by Regulating the Activation of Serine/Threonine Phosphatases," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 23, pp. 21756–21762, Oct. 2005.
- [22] A. Undas, K. Brummel, J. Musial, K. G. Mann, and A. Szczeklik, "PLA2 Polymorphism of $\beta 3$ Integrins Is Associated With Enhanced Thrombin Generation and Impaired Antithrombotic Action of Aspirin at the Site of Microvascular Injury," *Circulation*, vol. 104, no. 22, pp. 2666–2672, Nov. 2001.
- [23] D. A. Law, L. Nannizzi-Alaimo, and D. R. Phillips, "Outside-in Integrin Signal Transduction $\alpha\beta$ -(GP IIb-IIIa) TYROSINE PHOSPHORYLATION INDUCED BY PLATELET AGGREGATION," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 18, pp. 10811–10815, Mar. 1996.
- [24] Z. M. Ruggeri, "von Willebrand factor.," *J. Clin. Invest.*, vol. 99, no. 4, pp. 559–564, Feb. 1997.
- [25] D. J. Mancuso, E. A. Tuley, L. A. Westfield, N. K. Worrall, B. B. Shelton-Inloes, J. M. Sorace, Y. G. Alevy, and J. E. Sadler, "Structure of the gene for human von Willebrand factor.," *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 33, pp. 19514–19527, Nov. 1989.
- [26] J. E. Sadler, U. Budde, J. C. J. Eikenboom, E. J. Favalaro, F. G. H. Hill, L. Holmberg, J. Ingerslev, C. A. Lee, D. Lillicrap, P. M. Mannucci, C. Mazurier, D. Meyer, W. L. Nichols, M. Nishino, I. R. Peake, F. Rodeghiero, R. Schneppenheim, Z. M. Ruggeri, A. Srivastava, R. R. Montgomery, A. B. Federici, and T. W. P. on V. W. D. Classification, "Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 4, no. 10, pp. 2103–2114, 2006.
- [27] J. H. Jansson, T. K. Nilsson, and O. Johnson, "von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death.," *Br. Heart J.*, vol. 66, no. 5, pp. 351–355, Nov. 1991.
- [28] C. Lacquemant, C. Gaucher, C. Delorme, G. Chatellier, Y. Gallois, M. Rodier, P. Passa, B. Balkau, C. Mazurier, M. Marre, and P. Froguel, "Association between high von Willebrand factor levels and the Thr789Ala vWF gene polymorphism but not with nephropathy in type I diabetes," *Kidney Int.*, vol. 57, no. 4, pp. 1437–1443, Apr. 2000.
- [29] A. M. Keightley, Y. M. Lam, J. N. Brady, C. L. Cameron, and D. Lillicrap, "Variation at the von Willebrand Factor (vWF) Gene Locus Is Associated With Plasma vWF:Ag Levels: Identification of Three Novel Single Nucleotide

- Polymorphisms in the vWF Gene Promoter,” *Blood*, vol. 93, no. 12, pp. 4277–4283, Jun. 1999.
- [30] Z. M. Ruggeri, “Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 1, no. 7, pp. 1335–1342, 2003.
- [31] H. J. Weiss, T. Hoffmann, A. Yoshioka, and Z. M. Ruggeri, “Evidence that the arg1744 gly1745 asp1746 sequence in the GPIIb-IIIa-binding domain of von Willebrand factor is involved in platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium,” *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 122, no. 3, pp. 324–332, Sep. 1993.
- [32] C. Baldauf, R. Schneppenheim, W. Stacklies, T. Obser, A. Pieconka, S. Schneppenheim, U. Budde, J. Zhou, and F. Gräter, “Shear-induced unfolding activates von Willebrand factor A2 domain for proteolysis,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 7, no. 12, pp. 2096–2105, 2009.
- [33] N. Treder, “Polymorphismus Phe/Tyr 2561 im Von-Willebrand-Faktor-Gen als Risikofaktor für Myokardinfarkt und koronare Herzkrankheit,” Aug. 2006 Dissertation aus der Klinik und Poliklinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologiedes Zentrums für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizindes Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
- [34] Z. M. Ruggeri, J. A. Dent, and E. Saldívar, “Contribution of Distinct Adhesive Interactions to Platelet Aggregation in Flowing Blood,” *Blood*, vol. 94, no. 1, pp. 172–178, Jan. 1999.
- [35] A. J. Reininger, H. F. G. Heijnen, H. Schumann, H. M. Specht, W. Schramm, and Z. M. Ruggeri, “Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress,” *Blood*, vol. 107, no. 9, pp. 3537–3545, May 2006.
- [36] T. L. Kiefer and R. C. Becker, “Inhibitors of platelet adhesion,” *Circulation*, vol. 120, no. 24, pp. 2488–2495, Dec. 2009.
- [37] B. Savage, E. Saldívar, and Z. M. Ruggeri, “Initiation of Platelet Adhesion by Arrest onto Fibrinogen or Translocation on von Willebrand Factor,” *Cell*, vol. 84, no. 2, pp. 289–297, Jan. 1996.
- [38] Z. M. Ruggeri, “Old concepts and new developments in the study of platelet aggregation,” *J. Clin. Invest.*, vol. 105, no. 6, pp. 699–701, Mar. 2000.
- [39] R. Loncar, R. B. Zotz, C. Sucker, A. Vodovnik, M. Mihalj, and R. E. Scharf, “Platelet adhesion onto immobilized fibrinogen under arterial and venous in-vitro flow conditions does not significantly differ between men and women,” *Thromb. J.*, vol. 5, p. 5, Apr. 2007.
- [40] S. Goto, Y. Ikeda, E. Saldívar, and Z. M. Ruggeri, “Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions,” *J. Clin. Invest.*, vol. 101, no. 2, pp. 479–486, Jan. 1998.
- [41] Z. M. Ruggeri, “Mechanisms initiating platelet thrombus formation.,” *Thromb. Haemost.*, vol. 78, no. 1, pp. 611–616, Jul. 1997.
- [42] R. Schneppenheim and U. Budde, “von Willebrand factor: the complex molecular genetics of a multidomain and multifunctional protein,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, no. 1, pp. 209–215, 2011.
- [43] D. A. Beacham, R. J. Wise, S. M. Turci, and R. I. Handin, “Selective inactivation of the Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) binding site in von Willebrand factor by site-directed mutagenesis.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 5, pp. 3409–3415, Feb. 1992.
- [44] J. F. W. Keuren, H. Ulrichs, M. A. H. Feijge, K. Hamulyak, H. Deckmyn, T. Lindhout, and J. W. M. Heemskerk, “Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and shear-dependent action of glycoprotein Iba stimulate platelet-dependent thrombin formation in stirred plasma,” *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 141, no. 5, pp. 350–358, Mai 2003.

- [45] J. A. Guerrero, M. Kyei, S. Russell, J. Liu, T. K. Gartner, B. Storrie, and J. Ware, "Visualizing the von Willebrand factor/glycoprotein Ib-IX axis with a platelet-type von Willebrand disease mutation," *Blood*, vol. 114, no. 27, pp. 5541–5546, Dec. 2009.
- [46] S. Goto, H. Sakai, M. Goto, M. Ono, Y. Ikeda, S. Handa, and Z. M. Ruggeri, "Enhanced Shear-Induced Platelet Aggregation in Acute Myocardial Infarction," *Circulation*, vol. 99, no. 5, pp. 608–613, Feb. 1999.
- [47] R. Schneppenheim, N. Hellermann, M. A. Brehm, U. Klemm, T. Obser, V. Huck, S. W. Schneider, C. V. Denis, A. Tischer, M. Auton, W. März, E.-R. Xu, M. Wilmanns, R. B. Zotz, "The von Willebrand factor Tyr2561 allele is a gain-of-function variant and a risk factor for early myocardial infarction," *Blood*, vol. 133, no. 4, pp. 356–365, Jan. 2019.

6. Anhang

1. Einheit der Scherrate: $[(\text{cm/s})/\text{cm}] = [\text{s}^{-1}]$

2. Formel für den Zusammenhang Scherrate-Pumpeneinstellung:

Für die Berechnung der Scherraten wurde folgende Formel verwendet:

$$\gamma = \frac{6 \times Q}{b \times h^2}$$

γ = Scherrate (s^{-1})

Q = Flussrate (ml/s)

b = Breite der Flusskammer (16mm)

h = Höhe der Flusskammer (Dichtungshöhe 250 μm)

Daraus ergaben sich folgende Scherraten:

Flussrate [ml/min]	Flussrate[ml/h]	Scherrate [s^{-1}]	Einstellung an der Pumpe [ml/h]
1			0,96
5	300	500	9,6
10	600	1000	19,2

3. Makro zur Auswertung der einzelnen Bildstapel:

```
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0018.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0019.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0018.tif", "0019.tif");
//run("Image Calculator...", "image1=0018.tif operation=AND image2=0019.tif create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0038.tif");
```

```

setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0039.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0038.tif", "0039.tif");
//run("Image Calculator...", "image1=0038.tif operation=AND image2=0039.tif create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0058.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0059.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0058.tif", "0059.tif");
//run("Image Calculator...", "image1=0058.tif operation=AND image2=0059.tif create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0078.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0079.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0078.tif", "0079.tif");
//run("Image Calculator...", "image1=0078.tif operation=AND image2=0079.tif create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0098.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0099.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");

```

```

imageCalculator("AND create", "0098.tif","0099.tif");
//run("Image Calculator...", "image1=0098.tif operation=AND image2=0099.tif create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0118.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0119.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0118.tif","0119.tif");
//run("Image Calculator...", "image1=0118.tif operation=AND image2=0119.tif create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0138.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0139.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0138.tif","0139.tif");
//run("Image Calculator...", "image1=0138.tif operation=AND image2=0139.tif create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0158.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0159.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0158.tif","0159.tif");
//run("Image Calculator...", "image1=0158.tif operation=AND image2=0159.tif create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0178.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");

```

```
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0179.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0178.tif", "0179.tif");
//run("Image Calculator...", "image1=0178.tif operation=AND image2=0179.tif create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0198.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
open("I:\\Bleyer\\110726-04\\0199.tif");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(1, 255);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("AND create", "0198.tif", "0199.tif");
//run("Image Calculator...", "image1=0198.tif operation=AND image2=0199.tif create");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
summarize");
```

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. R. E. Scharf für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und die konstruktive Kritik während der Versuchszeit.

Ein besonderer Dank richtet sich an Herrn PD Dr. med. R. B. Zotz für die Übernahme der weiteren Betreuung und damit die Möglichkeit zur Vollendung dieser Arbeit!

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. med. R. Lüthen für die Unterstützung und Bekräftigung zum Abschluss meiner Dissertation herzlich bedanken.

Herrn Dr. rer. nat. V. R. Stoldt möchte ich für die fundierte fachliche Unterstützung und die aufgebrachte Geduld ebenfalls großen Dank aussprechen.

Und selbstverständlich gilt ein riesiger Dank meiner Familie, die über Jahre meine Wünsche und Taten unterstützt und mich in der Verwirklichung meiner Ziele bekräftigt hat.