

# **Rezeptorpolymorphismen und Östrogen als Modifikatoren der Thrombozytenfunktion**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Sebastian Schröder  
aus Olpe

Gießen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Klinische Chemie, Klinische Immunologie  
und Humangenetik

Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Bein

Gutachter: Prof. Dr. Stracke

Tag der Disputation: 11.12.2007

# REZEPTORPOLYMORPHISMEN UND ÖSTROGEN ALS MODIFIKATOREN DER THROMBOZYTENFUNKTION.....I

|                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 EINLEITUNG .....</b>                                                                                  | <b>1</b>  |
| <b>2 LITERATURÜBERSICHT.....</b>                                                                           | <b>2</b>  |
| <b>2.1 Thrombozyten .....</b>                                                                              | <b>2</b>  |
| 2.1.1 Morphologie und Funktion.....                                                                        | 2         |
| 2.1.2 Hämostase und Thrombozyten .....                                                                     | 3         |
| 2.1.3 Mechanismen der Adhäsion und Thrombozytenaktivierung.....                                            | 6         |
| 2.1.4 Mechanismen der Aggregation.....                                                                     | 10        |
| 2.1.5 Rezeptoren der Thrombozytenmembran .....                                                             | 11        |
| 2.1.6 Nomenklatur der Polymorphismen von Thrombozytenrezeptoren .....                                      | 12        |
| <b>2.2 Rolle der Thrombozyten in Arteriosklerose und Thrombose.....</b>                                    | <b>14</b> |
| 2.2.1 Rolle der Blutplättchen in der Bildung des akuten Verschlusses.....                                  | 14        |
| 2.2.2 Rolle der Blutplättchen in der Entwicklung der Arteriosklerose .....                                 | 15        |
| <b>2.3 Integrine.....</b>                                                                                  | <b>19</b> |
| 2.3.1 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ .....                                                                 | 22        |
| 2.3.1.1 Klinische Bedeutung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ .....                                      | 24        |
| 2.3.1.2 Polymorphismen des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ .....                                           | 25        |
| 2.3.2 Integrin $\alpha_2\beta_1$ .....                                                                     | 27        |
| 2.3.2.1 Funktion und Defekt des Integrins $\alpha_2\beta_1$ .....                                          | 29        |
| 2.3.2.2 Polymorphismen von $\alpha_2\beta_1$ und ihre klinische Bedeutung.....                             | 30        |
| <b>2.4 Östrogene und Thrombozyten .....</b>                                                                | <b>32</b> |
| <b>3 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....</b>                                                                | <b>35</b> |
| <b>4 MATERIAL UND METHODEN .....</b>                                                                       | <b>36</b> |
| <b>4.1 Spender und Probengewinnung.....</b>                                                                | <b>36</b> |
| 4.1.1 Beschreibung der Spenderpopulation.....                                                              | 36        |
| 4.1.2 Gewinnung des Untersuchungsmaterials.....                                                            | 36        |
| <b>4.2 DNA-Isolierung .....</b>                                                                            | <b>37</b> |
| <b>4.3 Genotypisierung .....</b>                                                                           | <b>37</b> |
| 4.3.1 Typisierung des $\alpha_2$ -Integrin C <sub>807</sub> T Dimorphismus mit sequenzspezifischer PCR ... | 37        |
| 4.3.2 Typisierung des $\alpha_2$ -Integrin G <sub>1648</sub> A Dimorphismus mittels PCR-RFLP .....         | 38        |
| 4.3.3 Typisierung des $\beta_3$ -Integrin T <sub>196</sub> C Dimorphismus mittels PCR-RFLP .....           | 38        |
| 4.3.4 Agarose-Gel-Elektrophorese .....                                                                     | 39        |
| <b>4.4 Thrombozyten Aggregation .....</b>                                                                  | <b>39</b> |
| 4.4.1 Probenaufbereitung.....                                                                              | 39        |
| 4.4.2 Aggregationsmessung.....                                                                             | 40        |

|                                                                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.5 Adhäsionstest.....                                                                                                      | 40        |
| 4.6 Statistische Auswertung .....                                                                                           | 42        |
| <b>5 ERGEBNISSE .....</b>                                                                                                   | <b>43</b> |
| 5.1 Genotypen von Polymorphismen der Integrine $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ .....                            | 43        |
| 5.2 Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von Rezeptorpolymorphismen .....                                                | 47        |
| 5.2.1 ADP als Induktor der Aggregation.....                                                                                 | 47        |
| 5.2.2 Wirkung von 17 $\beta$ -Estradiol auf die Thrombozyten-Aggregation .....                                              | 50        |
| 5.2.3 Einfluss des HPA-1 Systems auf die Thrombozytenaggregation.....                                                       | 51        |
| 5.2.4 Adrenalin als Induktor der Aggregation.....                                                                           | 53        |
| 5.3 Ergebnisse der Thrombozytenadhäsion .....                                                                               | 55        |
| 5.3.1 Adhäsion an Fibrinogen .....                                                                                          | 55        |
| 5.3.2 Wirkung von 17 $\beta$ -Estradiol auf die Adhäsion.....                                                               | 56        |
| 5.3.3 Einfluss des HPA-1b Phänotyp auf die Thrombozyten-Adhäsion.....                                                       | 57        |
| 5.3.4 Adhäsion an Kollagen .....                                                                                            | 58        |
| 5.3.5 Einfluss des Integrin $\alpha_2\beta_1$ C <sub>807</sub> T-Dimorphismus auf die Thrombozyten-Adhäsion.                | 60        |
| <b>6 DISKUSSION .....</b>                                                                                                   | <b>61</b> |
| 6.1 Polymorphismen des Fibrinogen-Rezeptors und ihr Einfluss auf die<br>Thrombozytenfunktion.....                           | 61        |
| 6.1.1 Kann die Aggregationsmessung funktionelle Unterschiede hervorgerufen durch den<br>HPA-1 Polymorphismus erfassen?..... | 62        |
| 6.1.2 Thrombozytenaktivierung und andere Funktionsuntersuchungen .....                                                      | 66        |
| 6.1.3 Bedeutung des HPA-1 Polymorphismus als kardiovaskulärer Risikofaktor.....                                             | 69        |
| 6.2 Einfluss von $\alpha_2$ Polymorphismen auf die Thrombozytenfunktion .....                                               | 72        |
| 6.3 <i>In vitro</i> Effekte von 17 $\beta$ -Estradiol auf die Thrombozytenfunktion.....                                     | 74        |
| <b>7 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>                                                                                              | <b>77</b> |
| <b>8 SUMMARY .....</b>                                                                                                      | <b>78</b> |
| <b>9 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>                                                                                         | <b>79</b> |
| <b>10 ANHANG .....</b>                                                                                                      | <b>93</b> |
| 10.1 Abbildungsverzeichnis .....                                                                                            | 93        |
| 10.2 Tabellenverzeichnis .....                                                                                              | 94        |
| 10.3 Abkürzungsverzeichnis.....                                                                                             | 94        |
| 10.4 Eidesstattliche Erklärung.....                                                                                         | 96        |
| 10.5 Danksagung.....                                                                                                        | 97        |
| 10.6 Lebenslauf.....                                                                                                        | 98        |

# 1 Einleitung

Ischämische Gefäßerkrankungen sind eine Hauptursache von Morbidität und Mortalität vor allem in den entwickelten westlichen Ländern. Geschlechtsunterschiede spielen eine Rolle bei thromboembolischen Erkrankungen. Schon früh wurde erkannt, dass Frauen vor der Menopause im Vergleich zu Männern eine geringere Prävalenz für koronare Herzkrankheit (KHK) aufweisen. Dieser Geschlechtsunterschied war der Grund für die Vermutung, dass Östrogene einen protektiven Effekt gegen KHK haben.

Die Hauptfunktion von Thrombozyten ist die primäre Blutstillung. Sie spielen aber auch eine zentrale Rolle in der Entwicklung und der Progression von arteriosklerotischen Plaques und beim akuten Gefäßverschluss. Thrombozyten besitzen auf der Zelloberfläche eine Vielzahl von Glykoproteinen (GP), welche unter anderem die Adhäsion an extrazelluläre Matrixbestandteile und die Aggregation von Thrombozyten vermitteln. Die wichtigen Rezeptoren für Fibrinogen und Kollagen gehören zur Rezeptor-Familie der Integrine.

Der Fibrinogenrezeptor Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb/IIIa) ist das mengenmäßig am häufigsten vorkommende Membranglykoprotein der Blutplättchen und besitzt eine elementare Funktion in der Thrombozytenaggregation. Beim Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  handelt es sich um eines der am stärksten polymorphen Moleküle auf der Thrombozytenoberfläche. Das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  fungiert auf Thrombozyten als Kollagenrezeptor (GPIa/IIa) und ist für die Adhäsion, den initialen Schritt der primären Hämostase, verantwortlich. Auch das für das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  kodierende Gen existiert in verschiedenen Allelen. Einige dieser Polymorphismen besitzen eine funktionelle Bedeutung und scheinen als genetische Risikofaktoren an der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit beteiligt zu sein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen gesunde weibliche und männliche Blutspender auf Polymorphismen der Thrombozyten-Rezeptoren für Fibrinogen und Kollagen genotypisiert werden. Der Einfluss dieser Polymorphismen auf die Thrombozytenfunktion wird dann in Versuchen zu Aggregation und Adhäsion untersucht. Weiter ist die *in vitro* Wirkung von Östrogen auf die Thrombozytenfunktion Gegenstand dieser Arbeit. Damit soll zur Aufklärung nicht-genomischer Steroidhormonwirkungen beigetragen werden.

## 2 Literaturübersicht

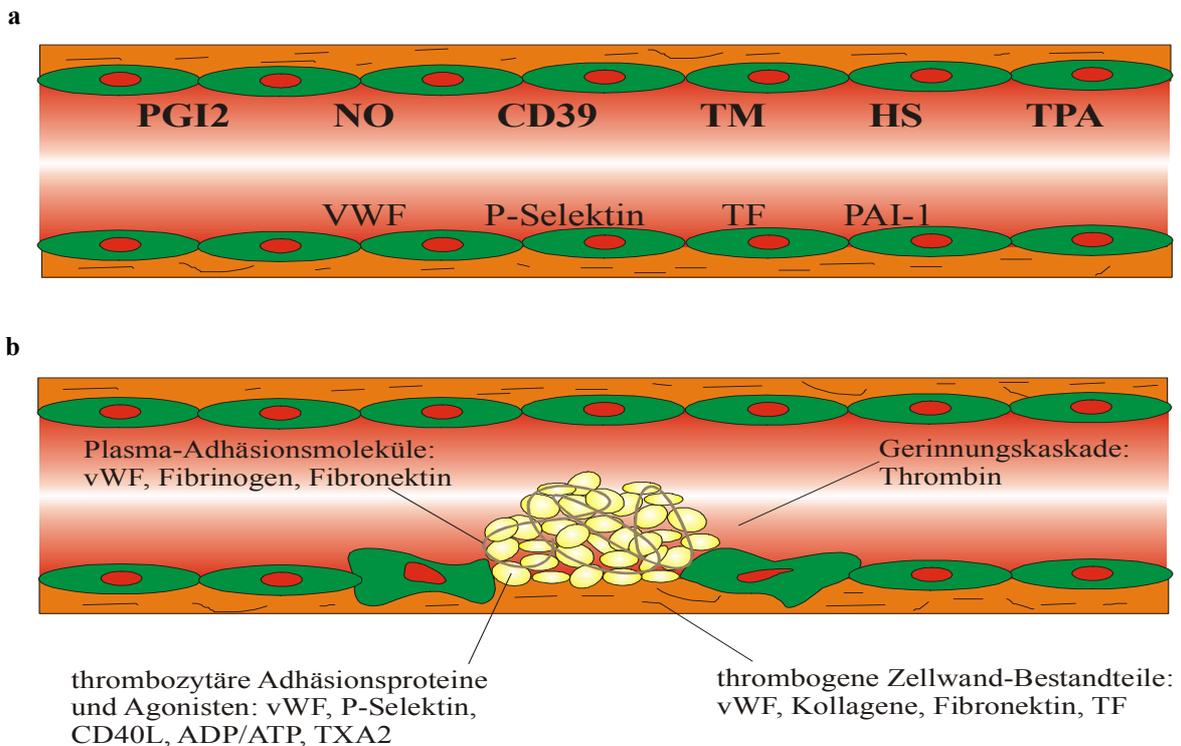
### 2.1 Thrombozyten

#### 2.1.1 Morphologie und Funktion

Humane Thrombozyten (Blutplättchen) sind kernlose Plasmafragmente von Megakaryozyten (Knochenmarkriesenzellen), die im Längsdurchmesser 1-3  $\mu\text{m}$  groß sind und eine Dicke von 0,5-0,75  $\mu\text{m}$  aufweisen. Im nicht aktivierten Zustand besitzen sie eine typisch diskoide Gestalt mit einer durchschnittlichen Oberfläche von 8  $\mu\text{m}^2$ . Die physiologische Thrombozytenzahl im peripheren Blut beträgt zwischen 150000 und 300000 pro  $\mu\text{l}$  Blut. Die Lebensdauer der Plättchen im Blut liegt zwischen fünf und zehn Tagen, dann werden sie im Retikuloendothelialen System abgebaut (Gawaz, 1999). Thrombozyten tragen auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl spezifischer Rezeptoren, welche die Rolle der Plättchen in Hämostase und Thrombose vermitteln und regulieren (z.B.  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ , GPIb und GPVI). Aktivierte Plättchen durchgehen einen Formwandel (*shape change*), sie werden zunächst kugelig und bilden dann stachelartige Fortsätze (Pseudopodien) aus. An Oberflächen breiten sie sich aus (*spreading*). Bei diesen Vorgängen spielt die Reorganisation des Zytoskeletts eine Rolle (Übersicht: Fox, 1993). Dabei vergrößert sich die Oberfläche auf bis zu 13  $\mu\text{m}^2$  durch „Ausstülpung“ des so genannten offenen kanalikulären Systems. Die Thrombozyten enthalten Mitochondrien, Glykogenvesikel, Lysosomen, dichte Granula und  $\alpha$ -Granula (Übersicht: White & Clawson, 1980). In den elektronendichten Granula sind ADP,  $\text{Ca}^{2+}$  und Serotonin gespeichert, Stoffe die für die Aktivierung essentiell sind. Die  $\alpha$ -Granula enthalten eine Reihe von Proteinen, die verschiedenste biologische Funktionen beeinflussen: Adhäsion, Aggregation, Chemotaxis, Proliferation, Inflammation und Koagulation. Dazu zählen Fibrinogen, Fibronectin, die Gerinnungsfaktoren V und XI, von Willebrand-Faktor (vWF), Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ , Thrombospondin und Plättchenfaktor 4 (Übersicht McNicol & Israels, 1999). Der Inhalt der Granula wird nach Aktivierung der Thrombozyten ausgeschüttet (Übersicht Reed et al., 2000) und fördert zusammen mit gebildetem Thromboxan die Thrombozytenaggregation und die Vasokonstriktion. Die Aktivierung erfolgt durch den Kontakt mit extrazellulären Matrixmolekülen in der Region einer Gefäßverletzung oder durch lösliche Agonisten.

## 2.1.2 Hämostase und Thrombozyten

Die Hämostase ist das physiologische Zusammenspiel von Blutzellen, Gefäßwand, Plasmaproteinen und niedrigmolekularen Substanzen mit dem Ziel eine Blutung zum Stillstand zu bringen. Es wird unterschieden zwischen der primären und der sekundären Hämostase. Dem Endothel kommt eine Schlüsselrolle zu in der Wahrung des Gleichgewichtes zwischen Blutfluss und schneller Thrombusformation als Antwort auf eine Verletzung (siehe Abbildung 1). Dies geschieht durch Kontrolle des Gefäßtonus und Synthese von sowohl Inhibitoren als auch Aktivatoren von Blutplättchen und Gerinnung (Übersicht: Gross & Aird, 2000).



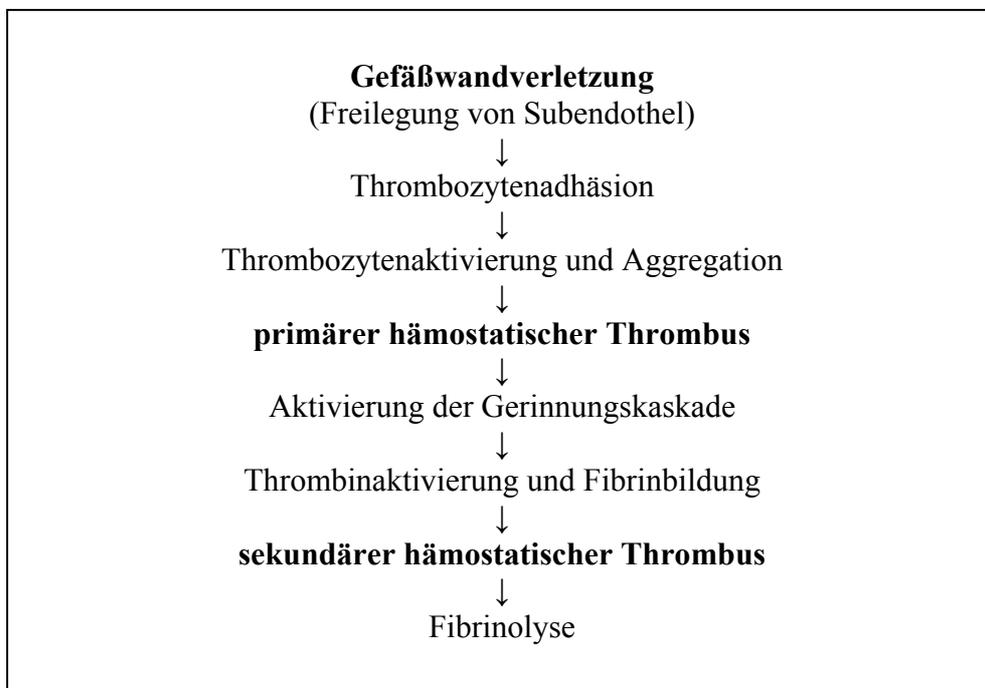
### Abbildung 1: Endotheliale Integrität und Gefäßläsion

**a** Normales Gefäß mit ungestörtem Blutfluss. Antithrombotische Substanzen: Prostazyklin ( $\text{PGI}_2$ ), NO, Ekto-ADPase (CD39), Thrombomodulin (TM), Heparansulfat (HS), TPA (*tissue plasminogen activator*) und prothrombotischen Moleküle: vWF, P-Selektin, *Tissue Factor* (TF), Plasminogen-Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) liegen in einem Gleichgewicht vor. **b** Gefäßverletzung mit Exposition von Thrombozyten mit thrombogenen Substanzen des Subendothels und konsekutiver Bildung von Thrombozytenaggregaten. Thromboxan  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ), CD40 Ligand (CD40L).

In einem normalen Gefäß (**a**) mit ungestörtem Blutfluss liegen die von den Endothelzellen produzierten antithrombotischen und prothrombotischen Moleküle in einem Gleichgewicht vor, in dem die antithrombotischen Substanzen dominieren. Prostazyklin und NO inhibieren die Plättchenaktivierung durch Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen von cAMP und

cGMP. CD39 ist eine Ekto-ADPase, die den Thrombozytenagonisten ADP degradiert. Thrombomodulin verändert die Substratspezifität von Thrombin und verringert so die Stimulation von Plättchen durch diesen Agonisten. Heparansulfat ist an der Inaktivierung von Thrombin beteiligt. Der *tissue plasminogen activator* trägt zur Plasminbildung bei. Thrombogene Substanzen wie vWF und P-Selektin vermitteln die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten, *tissue factor* startet die Gerinnungskaskade die zur Bildung von Fibrin führt und Plasminogen-Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) verhindert die Bildung von Plasminogen. Am Ort einer Gefäßverletzung (**b**) kommt es zur Exposition von Thrombozyten mit thrombogenen Substanzen des Subendothels. Die Entzündungsreaktion und metabolische Veränderungen verringern die Fähigkeit des Endothels antithrombogene Substanzen zu synthetisieren und stimulieren die Freisetzung von Thrombozytenagonisten und Aktivatoren der Blutgerinnung. Es kommt zur Bildung von Thrombozytenaggregaten.

Der wichtigste Auslöser für die Bildung eines hämostatischen Thrombus nach traumatischer Verletzung ist der Verlust des Endothels als Barriere zwischen subendothelialen Matrixkomponenten und dem fließenden Blut.



**Abbildung 2: primäre und sekundäre Hämostase**

Die thrombozytäre Antwort auf dieses Ereignis gliedert sich in drei schnell aufeinander folgende Komponenten: Adhäsion, Aktivierung und Aggregation (Abb. 2: primäre und sekundäre Hämostase).

Die Schritte der primären Hämostase sind die Verengung des Blutgefäßes, die Thrombozytenadhäsion an Proteine der verletzten Gefäßwand und die Thrombozytenaggregation. Durch die komplexen Interaktionen von autonomem Nervensystem, Gefäßmuskelzellen und Mediatoren wie Serotonin, Stickstoffmonoxid, Noradrenalin und Epinephrin kontrahiert das Blutgefäß lokal an der verletzten Stelle innerhalb von Sekunden. Thrombozyten adhären an subendotheliale Proteine, die in Folge der Läsion frei liegen. Die Thrombozytenaggregation entsteht durch die Vernetzung über Fibrinogen und von Willebrand-Faktor (vWF) (weißer Thrombus). In der sekundären Hämostase kommt es durch die Aktivierung verschiedener plasmatischer und zellulärer Faktoren zur Fibrinbildung und Quervernetzung des monomeren Fibrins.

Die genauen Mechanismen über die Zell-Zell Interaktionen und Reaktionen der plasmatischen Gerinnungsfaktoren mit Blutzellen, insbesondere mit Thrombozyten und Monozyten die Hämostase regulieren sind nur unzureichend bekannt (Übersicht: May et al., 1999). Adhärente und aktivierte Thrombozyten sind zum Beispiel in der Lage durch Umstrukturierung in ihrer Zellmembran Moleküle zu exponieren, die „gerinnungsaktive“ Anheftungsstellen für Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren darstellen (Ziesenis et al., 2001). Auf diesem Weg wird eine lokale Amplifikation der Gerinnungskaskade ermöglicht. Im Kontakt mit Leukozyten vermögen adhärente und aktivierte Thrombozyten die Gerinnung über die Freisetzung und Aktivierung intravaskulären Thromboplastins auszulösen (Müller et al., 2003). Nachfolgend kommt es in der gemeinsamen Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Gerinnungssystems zur Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin, welches dann Fibrinogen in Fibrin überführt.

Die Fibringerinnung erstellt ein stabiles dreidimensionales Maschenwerk aus Fibrinfäden, in dem Blutzellen, vor allem Erythrozyten, eingeschlossen werden und so den „roten Thrombus“ bilden.

Während der Heilungsphase wird der hämostatische Thrombus durch Fibrinolyse wieder abgebaut. Denn neben der Minimierung des Blutverlustes bei einer Gefäßverletzung hat die Blutstillung auch die Reparatur des Gefäßes zum Ziel.

### 2.1.3 Mechanismen der Adhäsion und Thrombozytenaktivierung

Die Adhäsion von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand ist der erste Schritt der primären Hämostase. Unterschieden wird die primäre Adhäsion, Adhäsion noch ruhender Thrombozyten, von der sekundären Adhäsion, der Anlagerung schon aktivierter Thrombozyten an die subendothelialen Strukturen. Die primäre Adhäsion führt zur Formveränderung, Spreizung und Aktivierung der adhärenen Blutplättchen mit nachfolgender Sekretion von Granulainhaltsstoffen und Aggregatbildung. Die Adhäsion der Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand wird durch eine Reihe thrombozytärer membranständiger Glykoproteine (GP) gesteuert. Grundlegend für den Adhäsionsvorgang ist die Erkennung spezifischer Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix. Die wichtigsten Struktur- und Adhäsionsproteine der extrazellulären Matrix sind die Kollagene (Sixma et al., 1997), wobei Kollagen Typ I und III am häufigsten vorkommen. Kollagen-Rezeptoren auf Thrombozyten können allgemein in zwei Gruppen klassifiziert werden: Direkte und indirekte Kollagen-Rezeptoren. Zu den direkten Rezeptoren gehören Integrin  $\alpha_2\beta_1$  und GPVI. Ein indirekter Kollagen-Rezeptor ist der GPIb/V/IX -Komplex, der mit vWF interagiert, welcher wiederum an Kollagen bindet (Übersicht: Clemetson & Clemetson, 2001).

Die Hauptkomponente der nicht-kollagenen Adhäsionsproteine bilden Laminine und Fibronectin. Blutplättchen exprimieren einen Laminin-Rezeptor,  $\alpha_6\beta_1$ , der sie ebenso wie  $\alpha_2\beta_1$  an diese Glykoproteinfamilie adhären lässt. Die biologische Relevanz dieser Interaktion ist noch unklar. Fibronectin welches auch im Plasma vorkommt unterstützt Adhäsion und Spreizung der Plättchen durch Interaktion mit  $\alpha_5\beta_1$  und aktiviertem  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Beumer et al., 1994).

Da die Blutplättchenadhäsion unter arteriellen Strömungsbedingungen stattfindet, somit hohe Scherkräfte herrschen, muss die initiale Kontaktaufnahme zirkulierender Thrombozyten schnell und stabil erfolgen. Nur so können die Plättchen entgegen der Blutströmung an der Stelle der Endothelläsion haften bleiben. Die Bindung von GPIIb/IIIa an die A1-Domäne des vWF ist der wichtigste Schritt der Kontaktaufnahme (Savage et al., 1996). Die Bedeutung der über den vWF vermittelten Bindung wächst mit zunehmender Flussgeschwindigkeit. Der an Kollagen gebundene vWF ermöglicht im ersten Schritt den Plättchen einen nahen Kontakt zur Oberfläche. So entsteht die erste Schicht von Thrombozyten, welche die Endothelläsion bedeckt. Später hat der vWF auch Bedeutung in der Bindung von Plättchen untereinander, wenn sich im Laufe des Thrombuswachstums weitere Schichten von Plättchen anlagern.

Diese Kontaktaufnahme ist wiederum durch GPIb vermittelt, während in der Phase der Aggregation der vWF über das aktivierte Integrin  $\alpha_{1b}\beta_3$  die Thrombozyten verbindet. Endothelzellen und aktivierte Thrombozyten sezernieren den vWF, er kommt plasmatisch und in den oberflächlichen Schichten des Subendothels an Kollagenfibrillen haftend vor. Die Bedeutung der Interaktion von GPIb mit vWF zeigt sich bei Patienten mit einem angeborenem Funktionsdefekt des vWF (von-Willebrand-Jürgens-Syndrom) oder seines Rezeptors GPIb (Bernard-Soulier-Syndrom). Die Patienten leiden unter einer erhöhten Blutungsneigung.

Die Kontaktaufnahme über vWF bewirkt keine irreversible Adhäsion der Thrombozyten. Vielmehr wird ein enger Kontakt mit der Oberfläche eingegangen, der die Stabilisierung der Adhäsion über weitere Adhäsionsrezeptoren erst möglich macht (Savage et al., 1998). Hierbei spielen die thrombozytären Kollagenrezeptoren  $\alpha_2\beta_1$  und GPVI die tragende Rolle.

Nach dem herkömmlichen „*two-step, two-site*“-Modell binden Thrombozyten zuerst über Integrin  $\alpha_2\beta_1$  an Kollagen, dann werden sie über die Interaktion von Kollagen mit einem zweiten Rezeptor namentlich GPVI aktiviert (Kehrel B et al., 1998). Ein neues Modell stellt diese feste Reihenfolge in Frage und schlägt vor, dass  $\alpha_2\beta_1$  oder GPVI zuerst Kollagen binden können, der jeweilig andere Rezeptor kurz darauf bindet und die Affinität von  $\alpha_2\beta_1$  über eine Signaltransduktion erhöht wird (Übersicht: Watson et al., 2000). Sowohl  $\alpha_2\beta_1$  als auch GPVI sind beteiligt an der Generierung intrazellulärer Signale, die eine Aktivierung des Plättchens bewirken. Integrin  $\alpha_2\beta_1$  zeigt eine höhere Affinität für Kollagene nach der Plättchenaktivierung, was neben der Funktion bei der initialen Adhäsion eine Beteiligung bei der nächsten Phase, der sekundären Adhäsion und Spreizung (*spreading*) wahrscheinlich macht (Monnet et al., 2000). Andere Arbeitsgruppen gewichten die Rolle von GPVI noch stärker und sehen die Aktivierung durch GPVI als entscheidenden Schritt der Adhäsion an, der die Bindung durch  $\alpha_2\beta_1$  erst möglich macht (Nieswandt et al., 2001). Der genaue Mechanismus der Adhäsion an Kollagen, die Interaktionen zwischen den Kollagenrezeptoren und die nachfolgende Signaltransduktion sind derzeit Gegenstand der Forschung.

Eine verminderte Expression von GPVI geht einher mit einer milden Blutungstendenz und mit einer reduzierten Funktion der Adhäsion an Kollagen und der folgenden Aggregation (Moroi et al., 1989). Ähnliches trifft für das Integrine  $\alpha_2\beta_1$  zu, das an anderer Stelle ausführlich besprochen wird.

Die Signalfunktion von GPVI, das zur Immunglobulin Superfamilie gehört, ist an die  $\gamma$ -Untereinheit des Fc-Rezeptors gebunden. Dieser Teil des Fc-Rezeptors enthält ein Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungs Motiv (ITAM). Mit diesem Motiv reagiert

unter anderem die Tyrosinkinase SYK und es kommt zur Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$ 2 (Watson & Gibbins, 1998). Auch über  $\alpha_2\beta_1$  kann es zu einer Aktivierung von SYK mit nachfolgender Phosphorylierung der Phospholipase C $\gamma$ 2 kommen (Keely & Parise, 1996). Um eine regulierte Thrombusformation zu gewährleisten und einen unkontrollierten Gefäßverschluss zu verhindern scheinen Plättchen einen Mechanismus zu besitzen, der die durch Kontakt mit Kollagen ausgelöste Antwort dämpfend reguliert. Diese Hemmung läuft über PECAM-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*), auch als CD31 bekannt (Falati et al., 2006). PECAM-1 ist ein Mitglied der Inhibitor-Rezeptorenfamilie und besitzt ein ITIM (Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Inhibierungs Motiv) (Patil et al., 2001). Neben dem Kollagen gibt es eine Reihe weiterer Stimuli die eine Aktivierung von Thrombozyten fördern. Am Ort der Gefäßläsion gebildete oder als Folge der Adhäsion von Thrombozyten selbst ausgeschüttete Agonisten reagieren mit Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran und durch ein komplexes intrazelluläres Signalnetz mit verschiedenen Enzymen, Substraten und Co-Faktoren werden die Plättchen aktiviert.

Adenosindiphosphat (ADP) ist ein schwacher Agonist der von Gefäßzellen und aktivierten Plättchen ausgeschüttet, Formveränderung und eine reversible Aggregation induziert. Zusätzlich löst er die Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> aus und verstärkt die Reaktion auf andere Agonisten. Das Hormon Epinephrin, dessen Plasma Konzentrationen Stress abhängig schwanken, ist ebenfalls in der Lage Plättchenaggregation zu induzieren. Das von stimulierten Plättchen synthetisierte Eikosanoid Thromboxan A<sub>2</sub> aktiviert genauso wie ADP und Epinephrin über spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben transmembranösen Domänen (Tabelle 1). Durch Veränderungen der Phospholipidorientierung im Bereich der Plasmamembran kommt es im Bereich eines Plättchenaggregates zu gesteigerter Thrombinbildung. Neben der Fibrinbildung spielt die Serinprotease  $\alpha$ -Thrombin auch eine Rolle in der Aktivierung von Plättchen.

Über als PARs (*G protein-linked protease-activated receptors*) bezeichnete Moleküle kommt es zur Bildung von *second messengers* (Sambrano et al., 2001).

Drei Enzymkomplexe spielen eine wesentliche Rolle in der Signalübertragung durch G-Proteine: die Phospholipase C, die Phospholipase A<sub>2</sub> und die Adenylatzyklase. Alle diese Enzyme sind mit der Bildung von *second messengers* wie Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>), Diacylglycerol (DG), Thromboxan A<sub>2</sub> (einem Produkt der Arachidonsäure) und cAMP an der Regulation der Konzentration des freien intrazellulären Ca<sup>2+</sup> beteiligt. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über Rezeptoren mit ihren entsprechenden Liganden und den zugehörigen Signalwegen.

**Tabelle 1: Rezeptoren, Liganden und Signalwege bei der Thrombusbildung**

| <u>Phase der Antwort</u>     | <u>Substrate, Agonisten, Liganden</u> | <u>Rezeptoren</u>                        | <u>Signalwege</u>                                |
|------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <u>Initiation</u>            |                                       |                                          |                                                  |
| Kontaktaufnahme und Adhäsion | vWF                                   | GPIb/V/IX                                | PI 3-K u.a. (?)                                  |
|                              | Kollagen                              | $\alpha_2\beta_1$ , GPVI-FcR $_{\gamma}$ | SYK/PLC $_{\gamma}$                              |
|                              | Fibrinogen, Fibrin                    | $\alpha_{IIb}\beta_3$                    | SYK/pp125 <sup>FAK</sup>                         |
|                              | Fibronektin                           | $\alpha_5\beta_1$                        | ?                                                |
|                              | Laminin                               | $\alpha_6\beta_1$                        | ?                                                |
| <u>Weiterführung</u>         |                                       |                                          |                                                  |
| Aktivierung                  | $\alpha$ -Thrombin                    | PAR1, PAR4                               | G $_q$ , G $_{12}$ , G $_i$ /Rho, PLC $_{\beta}$ |
|                              |                                       | GP Ib/V/IX                               | ?                                                |
|                              | ADP                                   | P2Y $_1$                                 | G $_q$ , (G $_{12}$ )/Rho, PLC $_{\beta}$        |
|                              |                                       | P2Y $_{12}$                              | G $_{12}$ /Adenylatzyklase (?)                   |
|                              | Thromboxan A $_2$                     | TP                                       | G $_q$ , G $_{12}$ /Rho, PLC $_{\beta}$          |
|                              | Epinephrin                            | $\alpha_{2A}$                            | G $_{12}$ /Adenylatzyklase (?)                   |
| Aggregation                  |                                       |                                          |                                                  |
|                              | Fibrinogen, vWF, Fibronektin          | $\alpha_{IIb}\beta_3$ (aktiviert)        | SHC                                              |
| <u>Stabilisierung</u>        |                                       |                                          |                                                  |
|                              | P-Selektin                            | PSGL-1, GP Ib/V/IX                       | ?                                                |
|                              | Ephrin B1                             | EPH Kinase (A4/B1)                       | LYN, FYN                                         |
|                              | CD40 Ligand                           | $\alpha_{IIb}\beta_3$ (aktiviert)        | ?                                                |
|                              | GAS6                                  | AXL                                      | PI 3-K, PLC $_{\beta}$                           |
| <u>Inhibierung</u>           |                                       |                                          |                                                  |
|                              | PECAM-1                               | PECAM-1                                  | SHP2                                             |
|                              | PGI $_2$                              | IP                                       | G $_s$ /Adenylatzyklase (?)                      |

?: unbekannt, AXL: AXL Rezeptor Tyrosinkinase, EPH: Ephrin-Rezeptor, FYN: *shrinkage-activated tyrosine kinase*, GAS6: *growth rest-specific 6*, LYN: Tyrosinkinase (Genname: *v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral-related oncogene homolog*), PECAM: *platelet-endothelial cell adhesion molecule*, PGI $_2$ : Prostaglandin I $_2$  (Prostazyklin), PI 3-K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, PL: Phospholipase, PSGL: Selektin-P Ligand (auch SELPG), SHC: *Src homology domain-containing transforming protein*, SHP2: *small heterodimer protein*.

Modifiziert nach Ruggeri, 2002.

## 2.1.4 Mechanismen der Aggregation

Aggregation bezeichnet den Vorgang der Koadhäsion mehrerer Thrombozyten, der zur Verbindung zwischen den Thrombozyten führt und die schnelle Ausbildung eines hämostatischen Thrombus ermöglicht. Voraussetzung für die Aggregation ist die Aktivierung der Blutplättchen. Infolge der Adhäsion oder durch lösliche Agonisten, wie ADP oder Thrombin kommt es zur Bildung von Signalfaktoren (*second messenger*), die wiederum eine Reihe von metabolischen Veränderungen induzieren (Sixma et al., 1995 und 1997). Die gemeinsame Endstrecke dieser aktivierenden Prozesse ist der Anstieg der intrazellulären Konzentration von freiem  $\text{Ca}^{2+}$ . Eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bedingt mit steigender Konzentration folgende Funktionszustände des Thrombozyten: Fibrinogenrezeptoraktivierung, Arachidonsäurefreisetzung, Formveränderung und Sekretion. Die Thrombozytenaggregation wird durch den Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Komplex vermittelt. Der aktivierte  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Komplex bindet lösliche Adhäsionsproteine: Fibrinogen, vWF und Fibronectin auf der Oberfläche bereits adhärenter Thrombozyten. Diese bilden dann das Substrat an das sich weitere Blutplättchen binden.

Es werden zwei Phasen der Aggregation unterschieden: die primäre und die sekundäre Aggregation. In der primären Phase der Aggregation bilden sich Fibrinogenbrücken aus, über welche die Thrombozyten locker und noch reversibel miteinander verbunden sind. Die sekundäre Aggregation tritt nach Aggregationsbeginn mit zeitlicher Verzögerung ein. Sie beginnt nachdem der Thrombozyt Granulainhaltsstoffe freisetzt. Die Sekretion von aggregationsfördernden Mediatoren wie ADP und Thromboxan  $\text{A}_2$  führt durch Aktivierung und Rekrutierung von noch zirkulierenden Blutplättchen und durch Förderung der Fibrinbildung letztendlich zur Konsolidierung der Plättchenthromben. Bei Patienten mit Defekten in den Speichergranula (*storage pool deficiency*) ist die sekundäre Aggregationsphase vermindert oder fehlt völlig. Folge ist eine erhöhte Blutungsneigung (Rao, 1998). Neue Untersuchungen zeigen, dass CD40-Ligand (CD154) eine Rolle spielt in der Bindung von Fibrinogen an  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  im Rahmen der sekundären Aggregation. CD40-Ligand wurde auf der Oberfläche aktivierter Plättchen gefunden und war in der Lage Endothelzellen zu aktivieren. CD40L trägt zur Stabilität arterieller Thromben bei (Andre et al., 2002). Es wird zudem eine Beteiligung von CD40-Ligandem und seinem Rezeptor CD40 in der Pathogenese der Arteriosklerose beschrieben (Übersicht Lutgens & Daemen, 2002 und Lutgens et al., 2007). Hier könnte eine Verbindung vorliegen zwischen Blutplättchen und der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques.

## 2.1.5 Rezeptoren der Thrombozytenmembran

Die Mechanismen der Hämostase und Thrombose erfordern ein enges Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, Endothel, plasmatischen Gerinnungsfaktoren und Strukturen der extrazellulären Matrix. Adhäsionsvorgänge spielen dabei eine wesentliche Rolle. Sie werden durch eine große Zahl von Rezeptoren reguliert. Gemäß ihrer Molekülstruktur werden die thrombozytären Membranglykoproteine in folgende Gruppen unterteilt: Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Immunoglobulintyp (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: Rezeptoren der Thrombozytenmembran**

| <u>Rezeptor</u>                                  | <u>Liganden</u>            | <u>Funktion</u>               |
|--------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| <u>Integrine</u>                                 |                            |                               |
| $\alpha_2\beta_1$                                | <u>Synonym</u><br>GPIa/IIa | Kollagen, Laminin             |
| $\alpha_5\beta_1$                                | GPIc/IIa                   | Fibronektin                   |
| $\alpha_6\beta_1$                                | GPIc'/IIa                  | Laminin                       |
| $\alpha_{IIb}\beta_3$                            | GPIIb/IIIa                 | Fibrinogen, Fibronektin, vWF  |
| $\alpha_v\beta_3$                                | $\alpha_v$ /IIIa           | Vitronektin                   |
| <u>Leuzinreiche Glykoproteine</u>                |                            |                               |
| GPIb/V/IX<br>GPIV                                | vWF                        | Initiation der Adhäsion       |
| <u>Selektine</u>                                 |                            |                               |
| P-Selektin                                       | PSGL-1                     | Adhäsion von Leukozyten       |
| <u>Immunglobulinähnliche Adhäsionsrezeptoren</u> |                            |                               |
| ICAM-2                                           |                            |                               |
| PECAM-1                                          | PECAM-1                    | Thrombozyten-Endothel Kontakt |
| JAM-A                                            | JAM-A, JAM-B, LFA-1        | Thrombozyten, Leukozyten und  |
| JAM-C                                            | JAM-C, JAM-B, Mac-1        | Endothel-Interaktionen        |
| GPVI (-FcR <sub>v</sub> )                        | Kollagen                   | Adhäsion                      |

Tabelle 2 stellt eine Auswahl der wichtigsten Rezeptoren dar (Übersicht Andrews & Berndt, 2004; Mandell & Parkos, 2005 und Weber et al., 2007). Die Gruppe der Integrine wird im Kapitel 2.3 noch ausführlich behandelt. Speziell wird die Form und Funktion der Integrine  $\alpha_2\beta_1$  und  $\alpha_{IIb}\beta_3$  beschrieben.

## 2.1.6 Nomenklatur der Polymorphismen von Thrombozytenrezeptoren

Die Bezeichnungen für Polymorphismen von Thrombozytenrezeptoren werden in der Literatur nicht einheitlich benutzt. Aus historischer Sicht wurden zuerst Alloantigensysteme beschrieben, wie zum Beispiel  $PI^A$  (van Loghem et al., 1959), die verantwortlich sind für eine Reihe klinisch relevanter Erkrankungen wie Neonatale Alloimmune Thrombozytopenie (NATP), nach Thrombozytentransfusion auftretende Purpura (PTP) und die Zerstörung transfundierter Thrombozyten (Kunicki und Newmann, 1986). Bei ihrer Entdeckung wurden die Alloantigene nach dem Patienten (z.B. Ko, Br) benannt, von dem man das Alloantiserum gewann, mit dem man das jeweilige Alloantigen nachweisen konnte (Santoso & Kiefel, 2001). Die verschiedenen Antigenensysteme wurden später dann in die HPA (*Human Platelet Alloantigen*) Nomenklatur aufgenommen.

Nach und nach wurden die zellulären Oberflächenstrukturen auf der die Alloantigensysteme beruhen erforscht. So zum Beispiel, dass sich das  $PI^A$  Antigen auf einer Untereinheit des  $\beta_3$  Integrins befindet (Newmann et al., 1985). Daraufhin kam es zur Entdeckung des Genpolymorphismus der dieses Alloantigenensystem hervorruft (Newmann et al., 1989). Der Austausch eines einzigen Basenpaares in den kodierenden Genen (Punktmutation, SNP = *Single Nucleotide Polymorphism*) ist in vielen Fällen für die Strukturpolymorphismen der thrombozytären Membranrezeptoren verantwortlich (Mueller-Eckhart et al., 1990; Metcalfe et al., 2003).

In jüngerer Vergangenheit hat sich, nach bekannt werden der Bedeutung der verschiedensten Genpolymorphismen für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit, das wissenschaftliche Interesse bezüglich der Thrombozytenrezeptorpolymorphismen von den Immunthrombozytopenien hin zur Erforschung ihrer Bedeutung als kardiovaskuläre Risikofaktoren gewandelt. In der Literatur werden daher häufig die älteren Antigen-Bezeichnungen neben der HPA-Nomenklatur und den Bezeichnungen für SNPs oder die respektiven Aminosäuresubstitutionen benutzt.

Die Tabelle 3 gibt eine Zusammenfassung über die verwendeten Bezeichnungen. Die in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen sind in Fettdruck hervorgehoben.

| Gen/Protein                 | Name                            | Nukleotid-Substitution                           | Aminosäure-Substitution  |
|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------|
| $\beta_3$                   | <b>HPA-1a (PI<sup>A1</sup>)</b> | <b>T<sub>196</sub></b>                           | <b>Leu<sub>33</sub></b>  |
|                             | <b>HPA-1b (PI<sup>A2</sup>)</b> | <b>C<sub>196</sub></b>                           | <b>Pro<sub>33</sub></b>  |
|                             | HPA-4a (Yuk <sup>b</sup> )      | G <sub>526</sub>                                 | Arg <sub>143</sub>       |
|                             | HPA-4b (Yuk <sup>a</sup> )      | A <sub>526</sub>                                 | Gln <sub>143</sub>       |
|                             | HPA-6a (Ca <sup>b</sup> )       | A <sub>1564</sub>                                | Gln <sub>489</sub>       |
|                             | HPA-6b (Ca <sup>a</sup> )       | G <sub>1564</sub>                                | Arg <sub>489</sub>       |
|                             | HPA-7a (Mo <sup>b</sup> )       | G <sub>1317</sub>                                | Ala <sub>407</sub>       |
|                             | HPA-7b (Mo <sup>a</sup> )       | C <sub>1317</sub>                                | Pro <sub>407</sub>       |
|                             | HPA-8a (Sr <sup>b</sup> )       | T <sub>2004</sub>                                | Cys <sub>636</sub>       |
| HPA-8b (Sr <sup>a</sup> )   | C <sub>2004</sub>               | Arg <sub>636</sub>                               |                          |
| HPA-10a (La <sup>b</sup> )  | A <sub>281</sub>                | Gln <sub>62</sub>                                |                          |
| HPA-10b (La <sup>a</sup> )  | G <sub>281</sub>                | Arg <sub>62</sub>                                |                          |
| HPA-11a (Gro <sup>b</sup> ) | A <sub>1996</sub>               | His <sub>633</sub>                               |                          |
| HPA-11b (Gro <sup>a</sup> ) | G <sub>1996</sub>               | Arg <sub>633</sub>                               |                          |
| $\alpha_{IIb}$              | HPA-3a (Bak <sup>a</sup> )      | T <sub>2622</sub>                                | Ile <sub>843</sub>       |
|                             | HPA-3b (Bak <sup>b</sup> )      | G <sub>2622</sub>                                | Ser <sub>843</sub>       |
|                             | HPA-9a (Max <sup>b</sup> )      | A <sub>2603</sub>                                | Met <sub>837</sub>       |
| HPA-9b (Max <sup>a</sup> )  | G <sub>2603</sub>               | Val <sub>837</sub>                               |                          |
| GPIb                        | HPA-2a (Ko <sup>b</sup> )       | C <sub>524</sub>                                 | Thr <sub>145</sub>       |
|                             | HPA-2b (Ko <sup>a</sup> )       | T <sub>524</sub>                                 | Met <sub>145</sub>       |
|                             | HPA-12a (ly <sup>a</sup> )      | A <sub>141</sub>                                 | Glu <sub>15</sub>        |
|                             | HPA-12b (ly <sup>b</sup> )      | G <sub>141</sub>                                 | Gly <sub>15</sub>        |
| $\alpha_2$                  | <b>HPA-5a (Br<sup>b</sup>)</b>  | <b>G<sub>1648</sub></b>                          | <b>Glu<sub>505</sub></b> |
|                             | <b>HPA-5b (Br<sup>a</sup>)</b>  | <b>A<sub>1648</sub></b>                          | <b>Lys<sub>505</sub></b> |
|                             | HPA-13a (Sit <sup>b</sup> )     | T <sub>2531</sub>                                | Met <sub>799</sub>       |
|                             | HPA-13b (Sit <sup>a</sup> )     | C <sub>2531</sub>                                | Thr <sub>799</sub>       |
|                             | <b>C<sub>807</sub>T</b>         | <b>C<sub>807</sub></b><br><b>T<sub>807</sub></b> | <b>stumm</b>             |

Tabelle 3: Thrombozytenrezeptorpolymorphismen

## **2.2 Rolle der Thrombozyten in Arteriosklerose und Thrombose**

Ischämische Gefäßerkrankungen sind eine Hauptursache von Morbidität und Mortalität vor allem in den entwickelten westlichen Ländern, spielen aber auch weltweit eine zunehmende Rolle. (Balter, 1999; Yusuf et al., 2001 (a) und (b)). Koronare Herzerkrankung (Übersicht: Rauch et al., 2001), zerebrovaskuläre Krankheiten (Übersicht: del Zoppo 1998), und chronische arterielle Verschlusskrankheit der Extremitäten (AVK) (Übersicht: Matsagas et al., 2002) sind Manifestationen von Gefäßerkrankungen denen pathogenetisch Arteriosklerose des jeweiligen Stromgebietes zu Grunde liegt. Die Arteriosklerose ist ursächlich für Veränderungen im Gefäßbett mit konsekutiver Stenosierung des Lumens.

### **2.2.1 Rolle der Blutplättchen in der Bildung des akuten Verschlusses**

Thrombozyten bilden den zentralen Angelpunkt in der Pathophysiologie des thrombotischen Gefäßverschlusses. Die Bildung von Thromben durch Plättchen im Rahmen der koronaren Herzerkrankung ist als Ursache von instabiler Angina oder Myokardinfarkt weitgehend anerkannt (Übersicht: Rauch et al., 2001). Am Ort einer rupturierten arteriosklerotischen Plaque kommt es durch die Blutplättchenaggregation und Thrombusbildung zum akuten Gefäßverschluss. Das sich entwickelnde akute Koronarsyndrom umfasst ein klinisches Spektrum akuter oder rasch fortschreitender Symptome, das von der instabilen Angina pectoris über den nicht-transmuralem Myokardinfarkt bis hin zum transmuralen Myokardinfarkt reicht. Die pathogenetische Bedeutung von Plättchenthromben bei der arteriellen Verschlusskrankheit und dem ischämischen Schlaganfall ist weniger klar. In Fällen in denen es sich nicht um embolische Verschlüsse handelt wird im Allgemeinen auch bei der arteriellen Verschlusskrankheit von einer thrombotischen Genese auf der Basis von arteriosklerotischen Veränderungen ausgegangen (Matsagas et al., 2002). Welche Rolle Thrombozyten in der Pathogenese zerebraler Ischämien bilden bedarf weiterer Klärung (Übersicht: del Zoppo, 1998 und Zhang et al., 2001). Grundsätzlich sind die gleichen Mechanismen die einen schnellen Verschluss einer blutenden Wunde ermöglichen; die Adhäsionsfähigkeit, die Fähigkeit der Thrombozyten auf Stimuli mit schneller Aktivierung zu reagieren und letztendlich die Aggregation, auch für die Bildung eines Thrombus im Rahmen eines ischämischen Gefäßverschluss verantwortlich. Obwohl die gleichen Mechanismen zum Tragen kommen, sind die Umgebung und Umstände doch verschiedene. Genaue Erkenntnisse über diese Unterschiede könnten neue Ansätze in der anti-thrombotischen Therapie eröffnen,

die weniger als bisherige Therapien mit der normalen Hämostase interferieren. Die Zusammensetzung einer arteriosklerotischen Plaque unterscheidet sich von der einer normalen Arterienwand. Zudem gibt es Unterschiede im Aufbau verschiedener Plaques, die sowohl den Inhalt thrombogener Substanzen wie Thromboplastin und Kollagen betreffen, als auch die Stabilität der Plaque (Fuster et al., 1999). Lokale Dysfunktion des Endothels in Verbindung mit einer Entzündungsreaktion sind weitere die Thrombogenität erhöhende Faktoren. Thrombusformation findet unter erhöhten Scherkräften schneller statt (Übersicht: Turitto & Hall, 1998). Am Ort arteriosklerotischer Läsionen und Plaque kommt es zu Einengung des Lumens und Erhöhung der Flussgeschwindigkeit mit daraus folgender Steigerung der Scherkräfte. Hohe Scherkräfte verstärken die Plättchenadhäsion und Aktivierung vermittelt über die Interaktion zwischen vWF und GPIIb.

### 2.2.2 Rolle der Blutplättchen in der Entwicklung der Arteriosklerose

Die Entwicklung der Arteriosklerose ist ein komplexes multifaktorielles Geschehen. Verschiedene Risikofaktoren (siehe Tabelle 4) beeinflussen die Entstehung und Progression von arteriosklerotischen Läsionen wobei deren Relevanz sich in den verschiedenen Gefäßprovinzen unterscheidet (Übersicht: Espinola-Klein et al., 2002).

| <b>Tabelle 4: Faktoren assoziiert mit Arteriosklerose und koronarer Herzkrankheit</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <u>Faktoren mit starker genetischer Komponente</u>                                    |
| Erhöhtes LDL/VLDL                                                                     |
| Erniedrigtes HDL                                                                      |
| Erhöhtes Lipoprotein(a)                                                               |
| Hypertonie                                                                            |
| Diabetes mellitus                                                                     |
| Homozysteinämie                                                                       |
| Geschlecht (männlich)                                                                 |
| <u>Umweltfaktoren</u>                                                                 |
| Lipidreiche Diät                                                                      |
| Rauchen                                                                               |
| Mangelnde körperliche Betätigung                                                      |
| Infektionserreger (Chlamydia pneumoniae?)                                             |

Nach der *response to injury*-Hypothese stellt die Endothelläsion den initialen Faktor arteriosklerotischer Umbauvorgänge dar. Durch verschiedene Noxen kann das Endothel in seiner Funktion geschädigt werden. Sowohl die Sekretion von Gefäßtonus regulierenden Substanzen als auch die Barrierefunktion des Endothels wird gestört. Die intimale Lipideinlagerung (*fatty streak*) ausgelöst durch vermehrt eindringendes LDL ist eine der ersten pathologisch sichtbaren Veränderungen im Bereich der Arterienwand (Napoli et al., 1997). Durch das in seiner Integrität geschädigte Endothel wird das Gerinnungssystem lokal aktiviert und es kommt zur Aktivierung und Proliferation von Monozyten (Monozytenchemotaxis). Auf der Oberfläche des stimulierten Endothels werden vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert, über die Monozyten adhären und danach in die Intima der Gefäßwand einwandern (Transmigration). In der Intima können sie durch verschiedene Substanzen, besonders durch Lipoproteine und glykosylierte Proteine, stimuliert werden. Es kommt zur Makrophagendifferenzierung und Phagozytose von LDL. Besonders oxidiertes LDL (oLDL) hat eine toxische Wirkung, es bewirkt eine verstärkte Aktivierung von Endothel-, glatten Muskelzellen und Makrophagen. Die unregulierte Aufnahme von oLDL führt zur Bildung von Schaumzellen. Die Entwicklung einer lokalen Entzündung bedingt die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Die glatten Muskelzellen proliferieren und sezernieren vermehrt Matrixproteine (Übersicht: Lusa, 2000). Es bildet sich eine Läsion mit fibrotischer Kappe und einem lipidreichen nekrotischen Kern, entstanden durch Zelluntergang von Makrophagen. Nachfolgend kommt es zu einer Rarefizierung des Endothels und vermehrt lagern sich Thrombozyten ab. Über verschiedene Stufen entwickelt sich eine komplexe Plaque, die mit Kalzifikation und Ulzeration einhergehen kann. Die Rolle der Blutplättchen beschränkt sich aber nicht nur auf die Reaktion auf schon fortgeschrittene arteriosklerotische Läsionen oder gar schon rupturierte Plaque. Vielmehr muss die Bedeutung der Plättchen für die Entstehung arteriosklerotischer Veränderungen diskutiert werden. Das beginnt damit, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder Rauchen mit einer erhöhten basalen Aktivierung und Hyperaggregabilität zirkulierender Blutplättchen assoziiert sind (Übersicht: Carr, 2001 und Li et al., 2001). Besonders im Bereich von veränderten Scherkräften, etwa im Bereich von Gefäßaufzweigungen (z.B. Karotisgabel) oder Gefäßstenosen, könnte ein kurzfristiger Kontakt aktivierter Thrombozyten mit dem Endothel, durch Freisetzung von thrombozytären inflammatorischen Faktoren, zur Aktivierung der Endothelzellen führen und die Monozytenmigration begünstigen (Gawaz et al., 1998). Aktivierte Thrombozyten sind in der Lage die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen zu verändern.

Durch Freisetzung potenter zytokinähnlicher Substanzen (Interleukin-1, CD40 Ligand) werden Endothel und glatte Muskelzellen zur Sekretion von chemotaktischen Substanzen wie dem *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) angeregt. Das Endothel exprimiert vermehrt ICAM-1, welches einen wesentlichen Rezeptor für die Monozytenadhäsion darstellt (Gawaz et al., 2000). Thrombozyten die sich auf einer entwickelnden arteriosklerotischen Plaque anheften vermögen die Progression der Plaque auf verschiedene Arten zu beeinflussen. Durch Freisetzung von Adhäsionsmolekülen, wie P-Selektin, das auf der Thrombozytenmembran verstärkt exprimiert wird oder durch Bindung plasmatischer Moleküle wie dem Fibrinogen, schaffen Thrombozyten ein reaktives Milieu für die Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten. Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie dem *platelet-derived growth factor* (PDGF) bewirkt Zellmigration und Proliferation glatter Muskelzellen.

Wiederkehrende Infektionen stehen in Verdacht die Entwicklung von Arteriosklerose, über die Auslösung von Entzündungsreaktionen zu fördern (Übersicht: Willerson, 2002). Thrombozyten interagieren mit verschiedenen Bakterien und bakteriellen Produkten. Über an Bakterien gebundene Antikörper oder direkt über bestimmte Bakterienantigene erfolgt eine Fc $\gamma$ RIIIA vermittelte Aktivierung von Plättchen (Sjöbring et al., 2002). Über diesen Mechanismus könnte die Entstehung oder die Progression von arteriosklerotischen Veränderungen durch Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten entscheidend beeinflusst werden.

Die familiäre Disposition als Risikofaktor für Gefäßerkrankungen ist ein hinlänglich bekannter Faktor. Unter diesem Dach vereinen sich eine große Zahl von genetischen Einzelfaktoren, die die Prognose des Individuums zu beeinflussen vermögen. Alle Aspekte der thrombozytären Antwort auf Gefäßveränderung oder Gefäßverletzung sind möglicherweise beeinflusst durch genetische Varianten der Proteine, die in großer Zahl an den Prozessen der Adhäsion, Aktivierung und Aggregation beteiligt sind. Einige Thrombozytenpolymorphismen sind mit einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert. (Bray, 2000). Auf die Relevanz von Polymorphismen der Integrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und  $\alpha_2\beta_1$  als Risikofaktor für vaskuläre Erkrankungen wird in den jeweiligen Kapiteln (2.3.1.2 und 2.3.2.2) eingegangen.

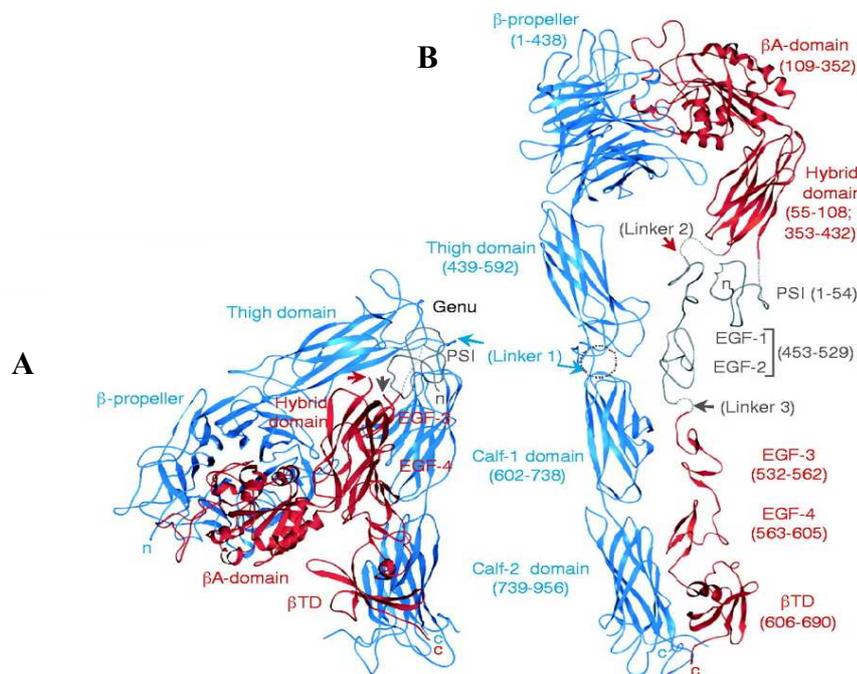
Geschlechtsunterschiede spielen eine Rolle bei thromboembolischen Erkrankungen. Schon früh (Kannel et al., 1976) wurde erkannt, dass Frauen im Vergleich zu Männern eine geringere Prävalenz für koronare Herzkrankheit (KHK) aufweisen. Bei der koronaren

Herzerkrankung ergibt die Geschlechtsverteilung männlich zu weiblich das Verhältnis zwei bis drei zu eins. Das männliche Geschlecht gilt als Risikofaktor einer koronaren Herzerkrankung. Dieser Geschlechtsunterschied war der Grund für die Vermutung, dass Östrogene einen protektiven Effekt gegen KHK haben (Übersicht: Nathan & Chaudhuri, 1997). Dafür spricht auch, dass das Erkrankungsrisiko von Frauen vor der Menopause verglichen mit Frauen nach der Menopause differiert. Während junge Frauen im Hinblick auf die Atherogenese geschützt sind, wird der Unterschied für die KHK bezüglich der Morbidität verglichen mit Männern mit dem Alter kleiner (Vogels et al., 1999).

Die möglichen Wirkmechanismen über die Östrogen seine vasoprotektive Wirkung ausübt werden im Kapitel 2.4 besprochen.

## 2.3 Integrine

Die Integrine sind eine Gruppe von transmembranen Glykoproteinen, die auf verschiedenen Zellen als wichtige Rezeptoren für die Adhäsion von Zellen an extrazelluläre Matrixproteine sowie von Zellen untereinander dienen. Als Adhäsionsmoleküle spielen sie eine bedeutende Rolle bei der Embryonalentwicklung, Hämostase, Wundheilung, Metastasierung und immunologischen Abwehrmechanismen (Übersicht: Hynes, 1992). Integrine sind das Ziel effektiver Therapeutika gegen Thrombose und Entzündung.



**Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der extrazellulären Domäne von  $\alpha_v\beta_3$ .**

(A) Zeichnung der Kristallgitterstruktur von  $\alpha_v\beta_3$  ( $\alpha_v$  blau,  $\beta_3$  rot). (B) Modell der extrazellulären Domäne von  $\alpha_v\beta_3$  in gestreckter Form. Die globulären Köpfe ( $\beta$ -propeller und  $\beta$ A-domain) bilden zusammen die Ligandenbindungsstelle. An die beiden Schwänze würden sich im komplettem Integrin die transmembrane und die zytoplasmatische Domäne anschließen. An der mit „Genu“ bezeichneten Stelle befindet sich eine bewegliche Region, die Konformationsänderungen des Integrins ermöglicht. (Xiong et al., 2001)

Integrine sind heterodimere Moleküle, die sich aus zwei nichtkovalent-gebundenen Untereinheiten zusammensetzen, wobei die jeweils größere als  $\alpha$ - (120-180 kD) und die kleinere als  $\beta$ -Untereinheit (90-110 kD) bezeichnet wird. Sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Kette bestehen aus einer großen aminoterminalen extrazellulären Domäne, einem kleinen transmembranösen und einem carboxyterminalen zytoplasmatischen Teil. Anhand von

Kristallgitter-Analysen konnten Teile der Struktur verschiedener Integrine aufgeklärt werden. Abbildung 3 zeigt das Ergebnis einer der vollständigsten Kristallstrukturanalysen, die Struktur der extrazellulären Domäne des Integrins  $\alpha_V\beta_3$ . Die N-terminalen Segmente von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit bilden den „Kopf“ des Integrins, von dem aus zwei parallele „Beine“ ausgehen. Der sogenannte  $\beta$ -Propeller von  $\alpha_V$ , eine aus sieben sich wiederholenden homologen Bereichen (Repeats) bestehende Domäne, und die  $\beta$ A-Domäne von  $\beta_3$  bilden den Kopf des Integrins. Die  $\beta$ A-Domäne, eine der Adhäsions-Domäne des von Willebrand Faktor verwandte Struktur entspringt aus der sogenannten Hybrid-Domäne. Der  $\beta_3$  Schwanz besteht aus einer PSI (für Plexin, Semaphorin und Integrin) Domäne, vier EGF (*epidermal growth factor*) Domänen und einer  $\beta$ T-Domäne ( *$\beta$ -tail*). Der lineare Teil von  $\alpha_V$  setzt sich aus drei  $\beta$ -Faltblatt Domänen zusammen (*thigh, calf 1, calf 2*). Xiong und Mitarbeiter bestätigten Ergebnisse vorangegangener Arbeiten und vervollständigt das Bild der Struktur von Integrinen im Allgemeinen (Xiong et al., 2001). Einige Untereinheiten besitzen durch alternatives Spleißen zahlreiche Isoformen mit unterschiedlichen zytosolischen Domänen. Die Subklassifizierung der Integrine erfolgt anhand der  $\beta$ -Kette, die sich mit einer spezifischen  $\alpha$ -Kette paart. Die bekannten 8  $\beta$ - und 18  $\alpha$ -Untereinheiten bilden zusammen 24 verschiedene Integrine (Übersicht: Hynes, 2002). Die Ligandenbindungsstelle besteht aus Anteilen der beiden Untereinheiten. Die Mehrzahl der Liganden sind extrazelluläre Matrixproteine zum Beispiel Kollagen und Laminin. Lösliche Liganden wie das Fibrinogen vermitteln Zell-Zell Aggregation und einige Integrine erkennen Membranproteine der Immunoglobulin-Superfamilie (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1) und sind für direkte Zell-Zell Kontakte verantwortlich.

Meist erkennt ein Integrin mehr als einen Liganden und ein Ligand kann von mehreren verschiedenen Integrinen gebunden werden.

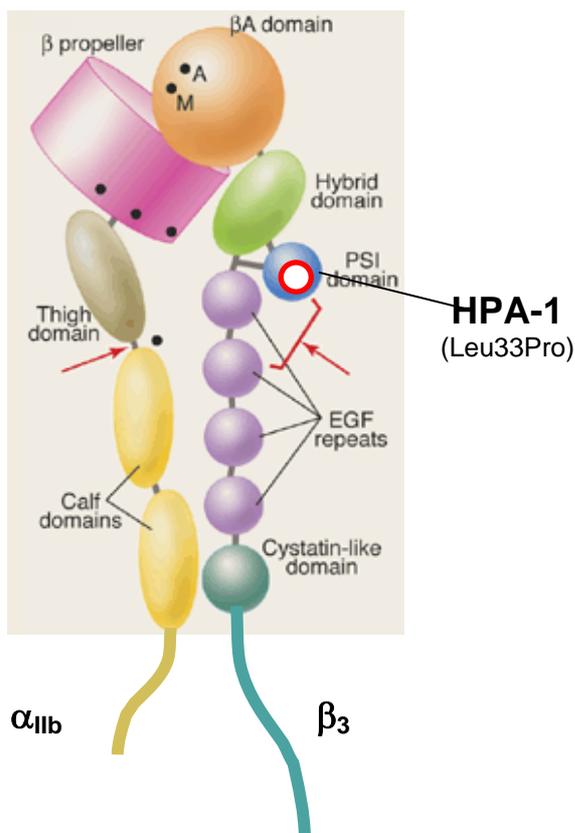
Die Erkennung der Liganden oder Gegenrezeptoren erfolgt über spezifische Aminosäuresequenzen. Die erste identifizierte Sequenz dieser Art ist das Arg-Gly-Asp (RGD) Peptid, welches in Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen und weiteren Ligandenmolekülen vorkommt. RGD ist die Erkennungssequenz für  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und alle  $\alpha_V\beta$  Integrine. Die Wechselwirkung zwischen einem Integrin und seinen Liganden kann von der Umgebung der Bindungsstelle im Liganden und vom Aktivierungsgrad des Integrinmoleküls beeinflusst werden. Die Bindung von Liganden erfordert die Anwesenheit millimolarer Konzentrationen an divalenten Kationen wie zum Beispiel  $\text{Ca}^{2+}$ .

Zusätzlich zur Funktion der Bindung von Liganden der extrazellulären Matrix oder von zellulären Gegenrezeptoren verbinden Integrine diese extrazellulären Kontakte mit dem Zytoskelett der Zelle. Integrine haben einen zytoplasmatischen Anteil, der in der Regel mit dem Mikrofilamentsystem der Zelle in Verbindung steht. Diese zytoplasmatische Domäne spielt nicht nur eine Rolle als rein mechanische Verbindung, sondern beeinflusst in starkem Maße die Funktion der Integrine. Es liegen Beweise vor, dass über diese Interaktion der Aktivierungszustand des Integrins reguliert werden kann und in umgekehrter Richtung Veränderungen innerhalb der Zelle induziert werden. Das Konzept der Regulation der Integrin-Funktion durch intrazelluläre Interaktion wird im Allgemeinen als *inside-out signaling* bezeichnet und somit vom sogenannten *outside-in signaling*, welches die Signalübertragung in das Zellinnere beschreibt, unterschieden (Übersicht: Hynes, 1992 und 2002). Integrine übertragen Signale in die Zelle, welche die Organisation des Zytoskeletts regulieren, Signalkaskaden aktivieren und Zellzyklus sowie Genexpression modulieren. Umgekehrt wird die Aktivität der extrazellulären Domäne reguliert durch Bindungsereignisse der zytoplasmatische Domäne, die dann Konformationsänderungen über die Plasmamembran hinweg auslösen.

Viele Integrine sind nicht konstitutiv aktiv, sondern werden oft in einem inaktiven Zustand auf der Zelloberfläche exprimiert, in dem sie weder Liganden binden noch Signale übertragen. Dass es sich dabei um einen biologisch wichtigen Regulationsmechanismus handelt wird am Beispiel des auf Thrombozyten vorkommenden Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  auch bekannt als GPIIb/IIIa deutlich. Bei einer ständigen Aktivierung dieses Integrins würde es mit seinem Hauptliganden Fibrinogen reagieren und es käme zu Thrombozytenaggregation und Thrombenbildung. Es gibt verschiedene Modelle über allosterische Veränderungen im Integrinmolekül, die mit Änderungen im Aktivierungszustand einhergehen. So können Konformations-Änderungen sowohl in der Kopfregion, die die Ligandenbindungsstelle direkt betreffen, als auch ein Abknicken in der Beinregion, wie es Abbildung 3 zeigt, die Bindungsaffinität der Integrine regulieren (Übersicht: Hynes, 2002).

### 2.3.1 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist das mengenmäßig am häufigsten vorkommende Membranglykoprotein der Blutplättchen (1-2 % des Gesamtproteingehalts). Pro Thrombozyt werden 40000-60000 Moleküle exprimiert (Sims et al., 1991), wobei 80 % gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt und die restlichen 20 % im offenen kanalikulären System und den  $\alpha$ -Granula gespeichert sind.



**Abbildung 4: Modell des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$**

Benannt sind die 12 Domänen des extrazellulären Anteils des Moleküls. Der Kopf des Integrins besteht aus einer sieben-blättrigen Propeller-Domäne von  $\alpha_{IIb}$  ( $\beta$  Propeller) und einer vWF A(dhesive) Domäne der  $\beta$ -Untereinheit ( $\beta$ A domain). Schwarze Punkte geben die Position von Kationen-Bindungsstellen wieder. Mit M bezeichnet ist das sogenannte MIDAS-Motiv (*metal ion-dependent adhesion site*). Regionen mit großer Beweglichkeit befinden sich in beiden Untereinheiten des Heterodimers (rote Pfeile).

HPA-1 bezeichnet die Position des Aminosäureaustausch Leu33Pro der verantwortlich ist für die Epitop-Bildung von HPA-1a und HPA-1b.

(Modifiziert  $\alpha_v\beta_3$  nach Humphries & Mould, 2001)

Die Gene die  $\alpha_{IIb}$  und  $\beta_3$  kodieren befinden sich auf Chromosom 17q21 (Thornton et al., 1999). Das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist ein Heterodimer bestehend aus der plättchenspezifischen Integrin-Untereinheit  $\alpha_{IIb}$  und der auf verschiedenen Zelltypen vorkommenden  $\beta_3$ -Untereinheit. Im Zusammenhang mit Thrombozyten wird das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  auch häufig als Glykoprotein GPIIb/IIIa bezeichnet. Die  $\beta_3$ -Kette von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  besitzt ein Molekulargewicht von 90 kD; die  $\alpha_{IIb}$ -Kette ist 145 kD schwer und besteht aus einer großen (*heavy chain*, 125 kD) und einer kleinen (*light chain*, 23 kD) Untereinheit, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Calvete et al., 1989). Das gesamte Heterodimer besteht aus 12 Domänen, die in Abbildung 4 bezeichnet sind. Die PSI (für Plexin, Semaphorin und Integrin) Domäne enthält an Position 33 den Aminosäureaustausch auf dem das HPA-1 System beruht.

Der Kopf des Integrins besteht aus einer sieben-blättrigen Propeller-Domäne von  $\alpha_{IIb}$  und einer vWF ähnlichen Domäne der  $\beta$ -Untereinheit. In dieser Region befinden sich auch mehrere Kationen-Bindungsstellen.

Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bindet Fibrinogen, aber auch vWF, Fibronectin und Vitronectin. Über  $\alpha_{IIb}\beta_3$  aggregieren Thrombozyten (Fibrinogenbrücken) oder sie adhären an Fibrinogen-beschichtete Oberflächen.

Ruhende, unstimulierte Thrombozyten besitzen  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Rezeptoren auf ihrer Membranoberfläche in einer inaktiven Konformation. Diese Konformation erlaubt jedoch die Adhäsion an Fibrinogen, das an eine Oberfläche gebunden ist (Savage & Ruggeri, 1991). Auch ohne vorausgegangene Thrombozytenaktivierung kann ein irreversibler Kontakt an immobilisiertes Fibrinogen entstehen (Farrell & Thiagarajan, 1994). Die Fähigkeit zur Aggregation erhalten Thrombozyten erst, wenn durch eine Stimulierung und ein *inside-out-signaling*  $\alpha_{IIb}\beta_3$  eine andere Konformation annimmt (Sims et al., 1991 und Shattil et al., 1992). Erst nach der Konformationsänderung ist Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in der Lage gelöstes Fibrinogen zu binden. Die Aktivierung wird ausgelöst über G-Protein gekoppelte Rezeptoren im Falle von Thrombin, ADP oder Epinephrin. Der GPIb/V/IX-Komplex vermittelt die durch von-Willebrand-Faktor stimulierte Aktivierung und Kollagen aktiviert Thrombozyten über die Rezeptoren GPVI und  $\alpha_2\beta_1$ .

Die Fibrinogen-Bindungsstelle wird zusammen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette geformt (Calvete et al., 1992) und erkennt die Aminosäuresignalsequenzen RGD und KQAGDV des Fibrinogenmoleküls. Fibrinogen besteht aus drei Polypeptidketten,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette, die ein Dimer bilden. Das carboxyterminale Ende der  $\gamma$ -Kette enthält die Dodekapeptidsequenz KQAGDV während sich in der  $\alpha$ -Kette zweimal die RGD Sequenz findet. Die Bindung der Liganden ist abhängig von divalenten Kationen und wird durch  $Ca^{2+}$  gefördert. Nach der Bindung des Liganden lagern sich  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptoren innerhalb der Thrombozytenmembran zusammen und bilden einen sogenannten Cluster (Sims PJ et al., 1991).

### 2.3.1.1 Klinische Bedeutung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$

Die ersten Hinweise, dass  $\alpha_{IIb}\beta_3$  an der Fibrinogenbindung beteiligt ist, kamen von Studien eines Krankheitsbildes, das als Thrombasthenie Glanzmann beschrieben ist. Dieser seltenen autosomal rezessiv vererbaren Erkrankung liegt eine pathologische Thrombozytenaggregation zugrunde. Die Diagnose wird gestellt, wenn bei dem betroffenen Patienten eine mucocutane Blutungstendenz und verlängerte Blutungszeit bei normaler Plättchenzahl vorliegt. Im Aggregationstest kann durch die Agonisten ADP, Kollagen und Epinephrin keine Thrombozytenaggregation ausgelöst werden. Zusätzlich ist eine mangelnde Retraktion des Blutgerinnsels zu beobachten. Ursächlich ist ein quantitativer oder qualitativer Defekt des Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Komplexes (Übersicht: George et al., 1990). Die Thrombasthenie Glanzmann wurde vor Entdeckung der  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Mutationen in drei Kategorien unterteilt. Bei Typ I fehlt  $\alpha_{IIb}\beta_3$  fast vollständig (< 5 %), bei Typ II ist es reduziert auf 10-20 % der normalen Menge, und bei Typ III wird es in nahezu normaler Menge (50-100 %), jedoch mit einem qualitativem Defekt exprimiert. Die Vielzahl der zugrunde liegenden Mutationen bedingt die Heterogenität des Krankheitsbildes. Heute sind für  $\alpha_{IIb}$  und  $\beta_3$  über 20 genetische Defekte beschrieben, die Ursache der Thrombasthenie Glanzmann sind. Die Mehrheit dieser Defekte verursacht eine Typ I Thrombasthenie Glanzmann (French & Collier, 1997).

Durch die Blockierung des Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  besteht die Möglichkeit die Thrombozytenaggregation selektiv zu hemmen und damit der Bildung von blutplättchenreichen Thromben in einem frühen Stadium entgegenzuwirken (Übersicht: Nurden & Nurden, 2003).

Die Entwicklung potenter Aggregationshemmer in Form der so genannten GPIIb-IIIa-Antagonisten (Abciximab, Eptifibatide und Tirofiban) hat das Spektrum der zur Verfügung stehenden antithrombozytären Substanzen erweitert und die Behandlung akuter Koronarsyndrome und die Effektivität von Koronarintervention in jüngster Zeit entscheidend verbessert (Übersicht: Nguyen & Harrington, 2003). Ihre klinische Wirksamkeit wurde in mehreren groß angelegten, randomisierten Doppelblindstudien belegt (Kong et al., 2003).

### 2.3.1.2 Polymorphismen des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$

Bei  $\alpha_{IIb}\beta_3$  handelt es sich um eines der am stärksten polymorphen Moleküle auf der Thrombozytenoberfläche.

Es ist eine Reihe von Alloantigensystemen auf beiden Untereinheiten des Moleküls bekannt. (Santoso & Kiefel, 1998.). Alloantigene sind genetisch determinierte molekulare Varianten von Proteinen oder Kohlenhydraten, die von normalen Individuen immunologisch erkannt werden, wenn sie den ihnen fehlenden Alloantigenen ausgesetzt werden. Auf der  $\alpha_{IIb}$ -Untereinheit wurden zwei humane Plättchen-Alloantigene (HPA-3a/b und HPA-9W) entdeckt. Bis jetzt konnten auf der  $\beta_3$ -Untereinheit des Rezeptors acht Alloantigensysteme (HPA-1, -4, -6, -7, -8, -10, -11 und Oe<sup>a</sup>) identifiziert werden (Santoso et al., 2002). Das bekannteste und klinisch wichtigste Allele der  $\beta_3$ -Untereinheit kodiert Leu<sub>33</sub> (HPA-1a; alte Nomenklatur: Pl<sup>A1</sup> oder Zw<sup>a</sup>) und Pro<sub>33</sub> (HPA-1b; alte Nomenklatur: Pl<sup>A2</sup> oder Zw<sup>b</sup>), mit den Genfrequenzen 0,85 und 0,15 in der weißen Bevölkerung. Ursächlich ist der Basenaustausch Cytosin-Thymidin an Position 196 in Exon 2 des  $\beta_3$  Gens (Newman et al., 1989). In der Literatur wird für diesen Polymorphismus, vor allem wenn um es um eine mögliche funktionelle Bedeutung geht noch häufig die Bezeichnung Pl<sup>A</sup> benutzt. Mehr und mehr findet aber konsensgemäß die aktuelle Nomenklatur HPA-1 Verwendung.

Dementsprechend werden in dieser Arbeit hauptsächlich die Bezeichnung HPA-1a oder HPA-1b verwandt, auch wenn es konsequenter wäre von der genomischen Basis auszugehen und somit die Bezeichnung C<sub>196</sub>T Polymorphismus des  $\beta_3$ -Gens zu verwenden.

Plättchen-Alloantigene können die Bildung von Alloantikörpern induzieren, dieses kann vorkommen während Schwangerschaft, Transfusion oder Transplantation. Die entstandenen Alloantikörper binden an die entsprechenden Plättchen-Alloantigene, mit der Folge einer verkürzten Thrombozyten-Lebensdauer durch verfrühten Abbau im retikuloendothelialen System. Die resultierende Alloimmun-Thrombozytopenie kann sich in Syndromen äußern wie der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (NAIT), der posttransfusionellen Purpura oder Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusion (Übersicht: Warkentin & Smith, 1997).

In den letzten Jahren berichteten zahlreiche Arbeitsgruppen, dass Polymorphismen von  $\beta_3$  nicht nur immunologische Relevanz haben, sondern auch Risikofaktoren für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung seien (Bray, 2000). Individuen mit dem HPA-1b Phänotyp scheinen ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen zu haben. Viele Untersuchungen mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen wurden durchgeführt, um die

Beziehung zwischen HPA-1b Phänotyp und vaskulärem Risiko zu evaluieren. Eine Meta-Analyse (Di Castelnuovo et al., 2001) von 34 Studien fand zusammenfassend eine schwache aber signifikante Assoziation des HPA-1b Phänotyps mit kardiovaskulären Erkrankungen. Insbesondere in Subgruppen mit jüngeren Patienten und bei Patienten mit Restenose nach Stent-Behandlung wurde eine deutliche Assoziation gefunden.

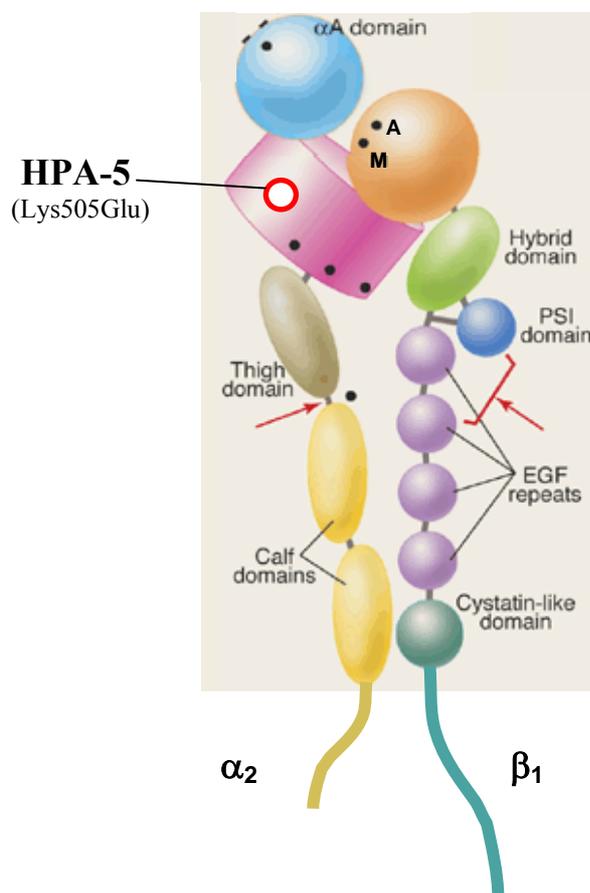
In Folge dieser Assoziationsstudien untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen auch den direkten Einfluss von HPA-1 auf die Thrombozytenfunktion. Auch hier sind die Ergebnisse kontrovers. Zum Beispiel finden einige Arbeitsgruppen eine erhöhte Aggregabilität bei Plättchen mit dem HPA-1b Phänotyp (Feng et al., 2001 und Theodoropoulos et al., 2001) während andere Untersucher diese Erhöhung nicht beobachten konnten (Bennet et al., 2001 und Cadroy et al., 2001).

Über den Einfluss der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Polymorphismen auf die Integrin-Signaltransduktion gibt es noch wenige Erkenntnisse. Diskutiert wird ein Effekt des HPA-1b-Allels, der das *outside-in signaling* verstärkt (Vijayan et al., 2000).

### 2.3.2 Integrin $\alpha_2\beta_1$

Das  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermittelt die Adhäsion vieler verschiedener Zelltypen mit der extrazellulären Matrix und wird abhängig von der Zellart als GPIIb/IIIa (Thrombozyten), ECMR2 (Fibroblasten), VLA2 (Leukozyten) und allgemein auch als CD49b/CD29 bezeichnet (Santoro & Zutter, 1995)

Zudem fungiert  $\alpha_2\beta_1$  als Rezeptor für das Echovirus 1 (Bergelson et al., 1992).



**Abbildung 5: Modell des Integrins  $\alpha_2\beta_1$**

Benannt sind die Domänen des extrazellulären Anteils des Moleküls. Der Kopf des Integrins besteht aus einer sieben-blättrigen Propeller-Domäne von  $\alpha_2$  ( $\beta$  Propeller, rosa Zylinder) in die eine vWF-ähnliche Adhäsionsdomäne inseriert ist (blauer Ball) und einer vWF A(dhesive) Domäne der  $\beta$ -Untereinheit (orange Ball). Schwarze Punkte geben die Position von Kationen-Bindungsstellen wieder. Mit M bezeichnet ist das sogenannte MIDAS-Motiv (*metal ion-dependent adhesion site*). Regionen mit großer Beweglichkeit befinden sich in beiden Untereinheiten des Heterodimers (rote Pfeile).

HPA-5 bezeichnet die Position des Aminosäureaustausch Lys505Glu in der Kationen bindenden Region von  $\alpha_2$ , der verantwortlich ist für die Epitop Bildung von HPA-5b (Br<sup>a</sup>) und HPA-5a (Br<sup>b</sup>).

(Modifiziert  $\alpha_v\beta_3$  nach Humphries & Mould, 2001)

Das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  besteht aus den Untereinheiten  $\alpha_2$  und  $\beta_1$  (siehe Abbildung 5). Der N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit von  $\alpha_2\beta_1$  enthält sieben sich wiederholende homologe Bereiche (Repeats), die eine sieben-blättrige Propellerstruktur bilden (Emsley et al., 2000). Diese Struktur hat mehrere Calciumionen-Bindungsstellen. Zwischen dem ersten und zweiten Repeat befindet sich eine sogenannte I-Domäne (inserted), die auch A-Domäne (für

Adhäsion) genannt wird. Im Komplex mit einem Magnesiumion ist diese Domäne die Bindungsstelle für Kollagen (Depraetere et al., 1997).

Die Kollagenerkennung erfolgt im oberen Teil der I-Domäne. Erkannt wird ein spezifisches Kollagenmotiv, das in Versuchen als das Hexapeptid GFOGER identifiziert werden konnte (Emsley et al., 2000).

In der  $\beta$ -Untereinheit liegt N-terminal eine der I-Domäne sehr ähnliche Struktur, die  $\beta$ -I/A Domäne. Sie besitzt ebenfalls Kationenbindungsstellen (MIDAS) und ist vermutlich über ihre Verbindung zur Hybriddomäne an der Übertragung von Konformationsänderungen beteiligt (Übersicht: Hynes, 2002).

Die Spezifität des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrins für bestimmte Liganden ist abhängig von der Zellart (Übersicht: Hemler et al., 1990). Auf Thrombozyten dient  $\alpha_2\beta_1$  als Kollagenrezeptor, auf Endothelzellen als Rezeptor für Kollagen und Laminin (Languino et al., 1989).

Auf Thrombozyten vermittelt  $\alpha_2\beta_1$  im Rahmen der primären Hämostase die  $Mg^{2+}$ -abhängige Adhäsion an verschiedene Arten von Kollagen. Von den 18 bekannten Kollagentypen kommen in der Gefäßwand die Typen I, III, IV, V, VI, VIII und selten XI vor. Die Kollagene können unterteilt werden in die reaktiven Kollagentypen I, II, III und IV, die weniger reaktiven Kollagentypen VI und VIII, sowie Kollagentyp V, das nur unter statischen Bedingungen eine Plättchenadhäsion auslöst. Die reaktiven Kollagentypen ermöglichen Adhäsion und Aggregatbildung unter hohen Scherkräften (1500/s) während die Gruppe der weniger reaktiven Kollagene nur bis zu 800/s Adhäsion und Bildung von Plättchenaggregaten auslöst (Saelman et al., 1994 und Übersicht: Sixma et al., 1997).

Die Anzahl der  $\alpha_2\beta_1$  Moleküle auf Thrombozyten gesunder Individuen schwankt zwischen 1000 und 3000 Molekülen. Diese unterschiedliche Expression korreliert direkt mit der Bindungsfähigkeit an Kollagen (Kunicki et al., 1993) Die Expression des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrins wird über die Aktivität des  $\alpha_2$ -Gens gesteuert, da die  $\beta_1$ -Untereinheit konstant in hoher Rate produziert wird (Zutter et al., 1992)

### 2.3.2.1 Funktion und Defekt des Integrins $\alpha_2\beta_1$

Bei einer Patientin mit einer hämorrhagischen Diathese, bedingt durch fehlende Adhäsion ihrer Thrombozyten an Kollagen, wurde erstmals eine stark verminderte Expression der  $\alpha_2$ -Untereinheit auf der Thrombozytenmembran nachgewiesen (Nieuwenhuis et al., 1985) und in Folge die Bedeutung des  $\alpha_2\beta_1$ -Komplex für die Adhäsion an Kollagen erkannt.

Ein ähnlicher Defekt wurde 1988 bei einer weiteren Patientin beschrieben. Nach Einsetzen der Menopause verschwand bei dieser Patientin die Blutungsneigung, es normalisierte sich die Thrombozytenadhäsion an Kollagen und die Expression von  $\alpha_2$  lag im Normbereich (Kehrel et al., 1988). Bei einigen Patienten mit einer hämorrhagischen Diathese und normaler  $\alpha_2\beta_1$ -Expression wurden Antikörper gegen die  $\alpha_2$ -Untereinheit gefunden (Deckmyn et al., 1994). Knock-out Mäuse für das  $\alpha_2$ -Integrin Gen entwickeln sich normal und sind fertil. Die Plättchenzahl ist normal und es ließen sich keine Veränderungen der Blutungszeit beobachten. Die Thrombozyten dieser Mäuse zeigen aber Veränderungen in der Interaktion mit Kollagen. Die Kollagen induzierte Aggregation und die Adhäsion an fibrilläres Kollagen ist kaum verändert, lediglich auf lösliches Kollagen reagierten die  $\alpha_2$  defizienten Thrombozyten schlechter als der Wildtyp. Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu der allgemein anerkannten Bedeutung des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  als essentielles Molekül in der Hämostase und lassen GPVI als wichtigeren thrombozytären Kollagenrezeptor erscheinen (Holtkötter et al., 2002). Allerdings waren auch Knock-out Mäuse für das für GPVI kodierende Gen phänotypisch normal, gesund und fertil. Sie zeigten zudem eine normale Blutungszeit. Auch ließen sich bei Patienten mit Antikörpern gegen GPVI nur eine leicht erhöhte Blutungstendenz zeigen bei allerdings stark vermehrter Expression des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin (Kato et al., 2003). Insgesamt also kooperieren  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin und Glykoprotein VI bei der Vermittlung einer effektiven Adhäsion der Plättchen an Kollagen (Kunicki, 2004).

### 2.3.2.2 Polymorphismen von $\alpha_2\beta_1$ und ihre klinische Bedeutung

Die Expression von  $\alpha_2\beta_1$  auf der Plättchenoberfläche schwankt bei gesunden Individuen zwischen weniger als 1000 bis zu 3000 Molekülen pro Blutplättchen. Diese Schwankungen korrelieren mit dem Auftreten von gekoppelten Polymorphismen in der kodierenden Region des  $\alpha_2$ -Gens (Kunicki et al., 1997; Kritzik et al., 1998). Das Gen für  $\alpha_2$  befindet sich auf Chromosom 5 (Takada & Hemler, 1989). Es können vier Allele definiert werden: Allel 1 (807T/1648G/2531C) ist assoziiert mit erhöhter Expression des Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , während die Allele 2 (807C/1648G/2531C) und 3 (807C/1648A/2531C) mit einer verminderten Expression dieses Rezeptors assoziiert sind. Die Gen-Frequenzen dieser drei Allele in der kaukasischen Bevölkerung sind: Allel 1, 0,394; Allel 2, 0,529; und Allel 3, 0,076. Ein sehr seltenes Allel 4 (807C/1648A/2531T) wird mit einer Gen-Frequenz  $< 0,01$  gefunden (Übersicht: Santoso & Kunicki, 2001; Santoso et al., 1999(a)). Nur zwei der dieses Allelsystem bildenden Punktmutationen haben auch einen Aminosäureaustausch zur Folge. Diese beiden Dimorphismen A<sub>1648</sub>G (Lys<sub>505</sub>Glu) und C<sub>2531</sub>T (Thr<sub>799</sub>Met) sind verantwortlich für die Ausbildung der Alloantigene HPA-5 (Br<sup>a</sup>/Br<sup>b</sup>) (siehe Abb. 5) und HPA-12bw (Sit<sup>a</sup>) (Santoso et al., 1993 und Santoso et al., 1999(a)). Doch kann keiner der beiden Dimorphismen die Expressions-Unterschiede erklären, da die Allele 1 und 2 sich unabhängig von diesen beiden Dimorphismen unterscheiden. Allel 1 und 2 unterscheiden sich nur durch den C<sub>807</sub>T-Dimorphismus. Bei dem C<sub>807</sub>T-Dimorphismus handelt es sich um eine stumme Mutation, die keinen Aminosäureaustausch bewirkt, aber mit einer Schwankung der Integrin  $\alpha_2\beta_1$ -Dichte auf Thrombozyten korreliert.

Bei Untersuchungen der Regulator-Region des  $\alpha_2$ -Gens wurden zwei weitere Dimorphismen, C<sub>-52</sub>T (Jacquelin et al., 2001(a)) und C<sub>-92</sub>G (Jacquelin et al., 2001(b)), gefunden, die nicht mit den Allelen 1 und 2 gekoppelt sind. Die Sequenzen T<sub>-52</sub> und G<sub>-92</sub> haben in einer typischen kaukasischen Population die Genfrequenzen 0,35 beziehungsweise 0,15. Das Vorhandensein eines einzelnen Allels korreliert mit einer reduzierten Dichte des  $\alpha_2\beta_1$  Integrins auf Thrombozyten, während die Kombination T<sub>-52</sub>/G<sub>-92</sub> einen zusätzlichen negativen Einfluss auf die Gentranskription hat, wie anhand von transfizierten humanen Megakaryozyten-Zelllinien gezeigt werden konnte. Die Polymorphismen des  $\alpha_2$ -Gens gehen also einher mit Schwankungen der Rezeptordichte. Da die Anzahl der Rezeptoren aber direkt mit der Fähigkeit der Thrombozyten zur Adhäsion verknüpft ist folgert daraus die biologische Wichtigkeit dieser Polymorphismen.

In einer Reihe von Studien wurde die Bedeutung des C<sub>807</sub>T-Dimorphismus für Arterienerkrankungen evaluiert. Die erste Arbeit zu diesem Thema beschreibt eine Korrelation zwischen Allel 1 (T<sub>807</sub>; hohe Rezeptordichte) und Myokardinfarkt (Mosfegh et al., 1999). In einer größeren Studie mit 2237 angiographisch untersuchten männlichen Patienten wurde eine Assoziation zwischen Allel 1 (T<sub>807</sub>) und Myokardinfarkt bei jungen Patienten beobachtet (Santoso et al., 1999(b)). In einer weiteren Studie konnte eine Assoziation gefunden werden zwischen Allel 1 (T<sub>807</sub>) und erhöhter kardiovaskulärer Mortalität bei starken Raucherinnen (Roest et al., 2000). Zusätzlich wurde auch eine signifikante Assoziation bei jungen Schlaganfallpatienten (Carlsson et al., 1999) und bei Patienten mit diabetischer Retinopathie (Matsubara et al., 2000) beobachtet. Allerdings waren einige Studien (Croft et al., 1999 und Morita et al., 2001) nicht in der Lage eine Assoziation zwischen Allel 1 (T<sub>807</sub>) und Myokardinfarkt zu zeigen.

Der Lys<sub>505</sub>Glu Aminosäureaustausch in der  $\alpha_2$ -Untereinheit ist verantwortlich für die Bildung der Epitope HPA-5b und HPA-5a, die eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von alloimmunthrombozytopenischen Syndromen spielen (Übersicht: Warkentin & Smith, 1997). In einer großen Studie konnte ein Zusammenhang festgestellt werden zwischen koronarer Herzerkrankung und dem HPA-5 System in einer Patienten-Untergruppe mit geringem Risikoprofil. In dieser Population waren HPA-5a-homozygote Individuen überrepräsentiert. Diese Befunde lassen vermuten, dass HPA-5 einen qualitativen Effekt auf die Funktion von  $\alpha_2\beta_1$  hat, der unabhängig von Effekten der Expression von  $\alpha_2\beta_1$  durch den C<sub>807</sub>T-Dimorphismus ist (Kroll et al., 2000).

## 2.4 Östrogene und Thrombozyten

Östrogene spielen eine wichtige Rolle in Entwicklung, Wachstum und Differenzierung der weiblichen sekundären Geschlechtsmerkmale, in der Reproduktion und im Zellmetabolismus. Das wichtigste an der Regulation dieser Prozesse beteiligte Östrogen ist das 17 $\beta$ -Östradiol (Übersicht: Pavao & Traish, 2001; Nussey & Whithead, 2001).

Klassisch üben die Östrogene ihre Hormonwirkung über die Beeinflussung der Genexpression aus. Östradiol gelangt in die Zielzelle durch passive Diffusion und bindet dann an intrazelluläre Östrogenrezeptoren (Berg et al., 2002). Sowohl der Östrogenrezeptor  $\alpha$  als auch der später beschriebene Rezeptor  $\beta$  (Mosselman et al., 1996) gehören zur Familie der Steroidhormonrezeptoren und fungieren als Transkriptionsfaktoren. Im Komplex mit Östrogen binden sie an die Kontrollregion von Zielgenen und modifizieren die Transkription des Gens.

Allerdings gibt es auch schnelle sogenannte nicht-genomische Effekte von Östrogenen in verschiedenen Geweben (Chen et al., 1999). Über die genauen Mechanismen dieser nicht-genomischen Effekte ist jedoch noch wenig bekannt.

Dem Östradiol werden verschiedene Einflussmöglichkeiten auf die Hämostase zugeschrieben. Dabei müssen pathophysiologisch Ereignisse im arteriellen System (Vogels et al., 1999) von venösen Ereignissen (Übersicht: Winkler, 1997) unterschieden werden.

Im Folgenden soll vor allem die Wirkung von Östrogen auf die Hämostase und als kardioprotektiver Faktor untersucht werden. Wie schon beschrieben, unterscheidet sich die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei Männern und Frauen signifikant (Barrett-Connor, 1997). Prämenopausale Frauen haben eine niedrige Inzidenz für arteriosklerotische Erkrankungen, die dann aber nach der Menopause ansteigt (Vogels et al., 1999). Daraus lassen sich die Faktoren: Östrogene, Abwesenheit von Testosteron und genetische Unterschiede zwischen Mann und Frau als Einflussgrößen auf die Arteriosklerose ableiten. Östradiol wird deshalb gemeinhin als kardioprotektiver Faktor angesehen (Übersicht: Mendelsohn & Karas, 1999).

Dem gegenüber stehen allerdings neue Erkenntnisse aus Studien zur präventiven Hormonersatztherapie bei Frauen nach den Wechseljahren (WHI und HERS II). Bei Frauen die mit Hormonen behandelt wurden, nahmen die Herz-Kreislaufkrankungen nicht ab, sondern zum Teil sogar zu und das relative Thromboembolierisiko stieg an, verglichen mit

Patientinnen die nur ein Scheinmedikament einnahmen (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, 2002; Grady et al., 2002; Hulley et al., 2002).

Östrogene vermögen sowohl über die Regulation der Genexpression, als auch auf nicht-genomischen Wegen ihre Wirkung auf das kardiovaskuläre System zu entfalten.

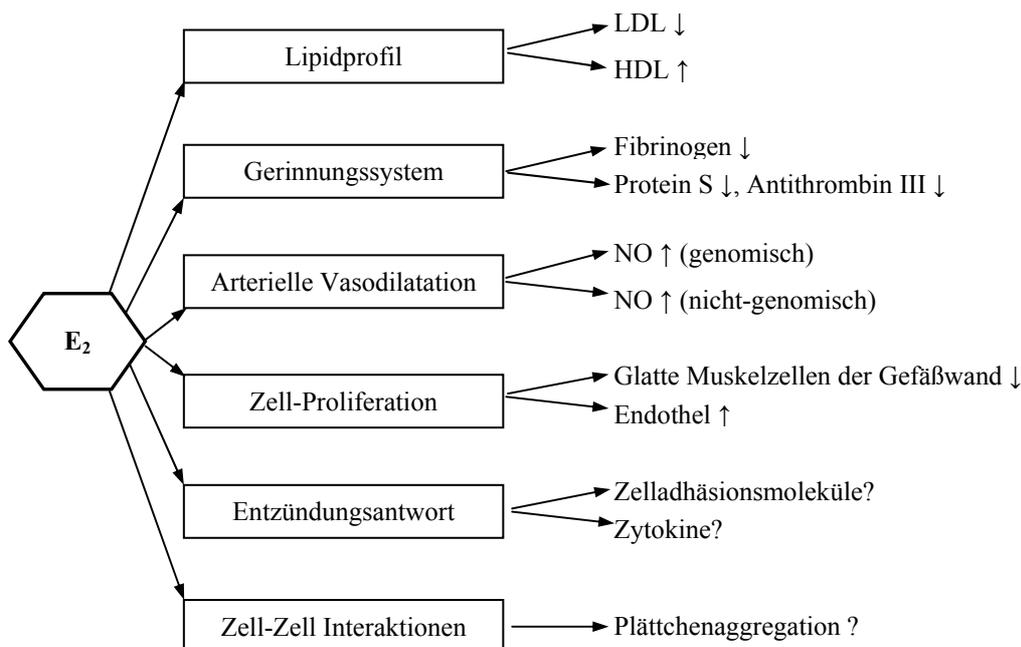
Gemeinhin anerkannt ist die positive Beeinflussung des Lipidprofils, die in vielen Studien beim Menschen und im Tiermodell gezeigt werden konnte. Östrogene bewirken eine signifikante Senkung des atherogenen LDL und eine Erhöhung des HDL im Plasma (PEPI Trial: The writing group for the PEPI Trial, 1995). Östrogene regulieren weitere Gene, deren Produkte eine Bedeutung für die Hämostase und die Pathophysiologie der Arteriosklerose haben. Darunter sind einige der in der Leber synthetisierten Proteine des Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systems. Zum Beispiel ist die Fibrinogenkonzentration im Plasma unter Östrogen-therapie erniedrigt (Nabulsi et al., 1993). Eine Reihe von Möglichkeiten der Beeinflussung der Vasomotion durch  $17\beta$ -Estradiol wird diskutiert (Übersicht: Joswig et al., 1999), wie zum Beispiel mögliche Effekte von  $17\beta$ -Estradiol auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System oder die Induktion von endothelialer NO-Synthetase.

In jüngerer Zeit mehren sich die Erkenntnisse über Steroidhormon-Wirkungen, denen nicht-genomische Mechanismen zu Grunde liegen (Übersicht: Wehling, 1997). Diese nicht-genomischen Mechanismen werden oft auch als schnelle Mechanismen bezeichnet, da sie im Vergleich zum klassischen Mechanismus schneller ihre Wirkung entfalten. Ein Beispiel für eine nicht-genomische Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol ist die schnelle (innerhalb von fünf Minuten) Aktivierung der endothelialen NO-Synthetase mit nachfolgender Gefäßdilatation. Es konnte gezeigt werden, dass keine Transkription stattfand, aber die Östrogenwirkung durch den Östrogenrezeptor  $\alpha$  vermittelt wird (Chen et al., 1999). In den glatten Muskelzellen der Gefäßwand aktiviert Östrogen über einen NO-abhängigen Mechanismus Calcium abhängige Kaliumkanäle und es kommt zur Relaxation der Muskelzelle (White et al., 1995).

Thrombozyten nehmen eine zentrale Rolle in der Hämostase ein und besitzen eine große Bedeutung für die Pathogenese von Arteriosklerose und koronarer Herzkrankheit (Übersicht: Ruggeri, 2002). Es liegen indirekte und direkte Beweise dafür vor, dass Geschlechtshormone die Blutplättchenfunktion zu beeinflussen vermögen. Die Wirkung von Geschlechtshormonen auf die Thrombozyten könnte Erklärungen für die Geschlechtsunterschiede bei Gefäßerkrankungen liefern. Seit vielen Jahren gibt es Hinweise auf die Beeinflussung der Thrombozytenfunktion durch Sexualhormone (Johnson et al., 1975). Diese konnten aber nicht mit dem klassischen Model der Wirkungsweise der Steroidhormone in Einklang gebracht

werden. Thrombozyten stellen aber als kernlose Zellen ein ideales Untersuchungsobjekt für die nicht-genomischen Wirkungen von Steroiden dar. Noch ist unklar, wie genau diese nicht-genomischen Wirkungen vermittelt werden, im Gespräch sind die Beteiligung der klassischen Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  und Östrogenrezeptoren in der Zellmembran.

Nachdem der Östrogenrezeptor  $\beta$  zuerst in humanen Megakaryozyten gefunden wurde (Tarantino et al., 1994), fand man ihn danach auch in Thrombozyten (Khetawat et al., 2000 und Nealen et al., 2001). Erst kürzlich konnte der Östrogenrezeptor  $\alpha$  in Thrombozyten nachgewiesen werden (Jayachandran & Miller, 2003). In unterschiedlichen Versuchen wurde die Wirkung von Östrogen auf die Plättchenfunktion getestet. Einige Studien zeigen, dass die Zugabe von  $17\beta$ -Estradiol *in vitro* die Thrombozyten-Aggregation vermindert (Haque et al., 2000 und Bar et al., 2000), allerdings zum Teil nur unter Verwendung unphysiologisch hoher Hormonkonzentrationen. Die verminderte Aggregation wird durch eine erhöhte NO-Synthese in den mit  $17\beta$ -Estradiol behandelten Thrombozyten erklärt (Nakano et al., 1998). Aber es wurde nicht in allen Studien eine Inhibition der Thrombozyten-Aggregation beobachtet (Miller et al., 1995 und Huch et al., 1987). Kürzlich konnte eine Regulation der Bildung von *second messengers* durch Östrogen gezeigt werden. In ADP stimulierten Plättchen bindet  $17\beta$ -Estradiol an den Östrogenrezeptor und inhibiert die Bildung von  $IP_3$  und den Abbau von cAMP (Maccarrone et al., 2002). Die Abbildung 6 gibt einen Überblick über Wirkungen von  $17\beta$ -Estradiol im Bezug auf Hämostase und Arteriosklerose.



**Abbildung 6: Genomische und nicht-genomische Wirkungen von  $17\beta$ -Estradiol ( $E_2$ )**

### 3 Fragestellung und Zielsetzung

Ischämische Gefäßerkrankungen sind eine Hauptursache von Morbidität und Mortalität vor allem in den entwickelten westlichen Ländern. Eine Vielzahl von Faktoren, genetische Prädisposition (Polymorphismen), Umwelt und Geschlecht, beeinflussen das Risiko an einer kardiovaskulären Erkrankung zu leiden.

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklung und der Progression von arteriosklerotischen Plaques und beim akuten Gefäßverschluss. Sie besitzen eine Vielzahl von Plättchenglykoproteinen, welche unter anderem die Adhäsion an extrazelluläre Matrixbestandteile und die Aggregation vermitteln. Der Fibrinogenrezeptor Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist das mengenmäßig am häufigsten vorkommende Membranglykoprotein der Blutplättchen und besitzt eine elementare Funktion in der Thrombozytenaggregation. Das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  fungiert auf Thrombozyten als Kollagenrezeptor und ist für die Adhäsion, den initialen Schritt der primären Hämostase, verantwortlich. Beide Glykoproteine,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und  $\alpha_2\beta_1$ , sind polymorph. Einige dieser Polymorphismen besitzen eine funktionelle Bedeutung und scheinen als genetische Risikofaktoren an der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit beteiligt zu sein.

Diese Untersuchung soll klären, ob die Polymorphismen C<sub>807</sub>T und G<sub>1648</sub>A (Integrin  $\alpha_2$ ) und T<sub>196</sub>C (Integrin  $\beta_3$ ) die Funktion der Thrombozyten beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen gesunde Blutspender auf die besagten Polymorphismen der Thrombozyten-Rezeptoren für Kollagen und Fibrinogen genotypisiert werden.

Die Thrombozytenfunktion wird durch zwei verschiedene Methoden geprüft, um die Adhäsions- und Aggregations-Phasen der Thrombozyten nach verschiedenen Stimuli zu untersuchen.

Weiter ist die *in vitro* Wirkung von Östrogen auf die Thrombozytenfunktion Gegenstand dieser Arbeit. Den Östrogenen werden eine Vielzahl von Wirkungen auf die Hämostase und in der Entwicklung der Arteriosklerose zugeschrieben. Es soll überprüft werden ob es durch 17 $\beta$ -Estradiol zu einer Beeinflussung der Thrombozytenfunktion kommt. Damit soll zur Aufklärung nicht-genomischer Steroidhormonwirkungen beigetragen werden.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Spender und Probengewinnung**

#### **4.1.1 Beschreibung der Spenderpopulation**

114 weibliche Blutspender wurden per Fragebogen befragt und einer Genotypisierung für Thrombozytenmerkmale unterzogen.

Ausgewählt für den Thrombozytenaggregationstest und den Adhäsionstest wurden 22 weibliche Spender. Es handelte sich um gesunde Frauen im Alter von 22 bis 34 Jahren (im Durchschnitt  $26,7 \pm 4,5$  Jahre).

Der Thrombozytenaggregationstest wurde auch mit den Proben von 15 männlichen, gesunden Thrombozytenspendern im Alter von 20 bis 42 Jahren (im Durchschnitt  $30,7 \pm 8,5$  Jahre) durchgeführt.

Alle Spender erklärten schriftlich ihr Einverständnis für die Blutentnahme.

Vor der Durchführung der Funktionsuntersuchungen haben die Probanden 10 Tage keine Acetylsalicylsäure oder andere nicht-steroidale Antiphlogistika eingenommen und am Tag der Untersuchung nicht geraucht. Die Blutentnahmen fanden zwischen 7 und 9 Uhr morgens statt. Alle Blut- und Thrombozytenspender waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen als Spender der Blutbank des Institutes für Immunologie und Transfusionsmedizin, Gießen registriert.

#### **4.1.2 Gewinnung des Untersuchungsmaterials**

Die Blutentnahme für die DNA-Isolierung erfolgte in EDTA-Röhrchen (Monovette; Sarstedt, Nümbrecht). Die Venenpunktion für Thrombozytenaggregation und Adhäsion wurde mit einer großlumigen Kanüle (16 G) ohne langes Stauen durchgeführt. Die ersten 5 ml Blut wurden verworfen. Das Blut wurde dann in speziell präparierte Röhrchen getropft. Für den Aggregationstest kam als Antikoagulant 0.1 M Natriumcitrat zur Anwendung (Verhältnis 1:9). Die Probengewinnung für den Adhäsionsassay erforderte BSA (1%; Serva, Heidelberg) beschichtete Polystyrolröhrchen (Sarstedt) gefüllt mit 1,5 ml ACD (NPBI-Biotrans, Dreieich) und 10  $\mu$ l PGE<sub>1</sub> (3,6 $\mu$ g/ml; Serva, Heidelberg) je 9 ml Blut.

## 4.2 DNA-Isolierung

Die Isolierung genomischer DNA aus Blutzellen der Spenderindividuen erfolgte mit Hilfe des Genra *PureGene-Kits* (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf). Die in 300  $\mu$ l EDTA (50 mM) antikoaguliertem Vollblut enthaltenen Erythrozyten wurden durch Zugabe von 900  $\mu$ l *RBC Lysis Solution* 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zentrifugation (13000 x g, 20 s) wurde der Überstand bis auf 10-20  $\mu$ l abgenommen. Das Pellet wurde durch Vortexen im Restüberstand gelöst. Danach wurden die im Pellet enthaltenen Leukozyten durch Zugabe von 300  $\mu$ l *Cell Lysis Solution* lysiert. Im Anschluss erfolgte eine RNase Behandlung durch Inkubation (30 min, 37 °C) mit 1,5  $\mu$ l RNase A Lösung. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Probe wurde einer Proteinfällung mittels 100  $\mu$ l *Protein Precipitation Solution* unterzogen. Nach Zentrifugation (13000 x g, 3 min) wurde der Überstand zu 300  $\mu$ l absolutem Isopropanol (100 %) zugegeben und bei 13000 x g für 1 min erneut präzipitiert. Nach dem Waschen mit 300  $\mu$ l Ethanol (70 %) wurde die DNA in 100  $\mu$ l Aqua dest. (Braun, Melsungen) über Nacht bei Raumtemperatur gelöst. Die Reinheit und Konzentration der isolierten DNA wurde durch photometrische Messung bei 260 und 280 nm bestimmt.

## 4.3 Genotypisierung

### 4.3.1 Typisierung des $\alpha_2$ -Integrin C<sub>807</sub>T Dimorphismus mit sequenzspezifischer PCR

Die Genotypanalyse des C<sub>807</sub>T Dimorphismus von  $\alpha_2$  erfolgte mittels einer allel-spezifischen PCR (*polymerase chain reaction*). Es wurde 1  $\mu$ l genomische DNA mit 24  $\mu$ l Reaktionsgemisch bestehend aus 11,25  $\mu$ l Aqua dest. (Braun), 2,5  $\mu$ l Reaktionspuffer (10x; Perkin Elmer, Boston, USA), 2,5  $\mu$ l dNTP (1,25 mM pro dNTP; Pharmacia Biotech, Freiburg) je 1,25  $\mu$ l des Vorwärtsprimers (5  $\mu$ M; MWG Biotech, Ebersberg) (5'-GACAGCCCATTAATAAATGTCTCCTCTG-3') und des sequenzspezifischen Rückwärtsprimers (5  $\mu$ M; MWG Biotech) (5'-CCTTGCATATTGAATTGCTACG-3' oder 5'-CCTTGCATATTGAATTGCTACA-3'), je 2,5  $\mu$ l HGH I (1,25  $\mu$ M; MWG Biotech,) (CAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3') und HGH II (1,25  $\mu$ M; MWG Biotech) (ATCCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3') und 0,25  $\mu$ l AmpliTaq Gold (5 U/ $\mu$ l, Perkin Elmer) versetzt. Die PCR erfolgte in der PCR Express von Hybaid (Heidelberg). Nach einem Vorlauf (96 °C, 10 min) startete die aus 34 Zyklen bestehende PCR. Ein Zyklus besteht

aus 3 Schritten: Denaturierung (96 °C, 50 s), Annealing (57 °C, 30 s) und Primerextension (72 °C, 15 s). Abschließend erfolgte ein Nachlauf (72 °C, 10 min) und Abkühlung auf 4 °C. Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgte bei 4 °C oder -20 °C.

### **4.3.2 Typisierung des $\alpha_2$ -Integrin G<sub>1648A</sub> Dimorphismus mittels PCR und Restriktions Fragment Längen Polymorphismus (RFLP)**

Die PCR wurde durchgeführt mit 5 µl DNA, unter Zugabe von 25,6 µl Aqua dest. (Braun), 5 µl Reaktionspuffer (10x; Perkin Elmer), 8 µl dNTP (1,25 mM pro dNTP; Pharmacia Biotech), je 5 µl Vorwärtsprimer (5 µM; MWG Biotech) (5'-GTACATGAGT GACCTAAAGAAAGAGG-3') und Rückwärtsprimer (5 µM; MWG Biotech) (5'-GACCTCTCATGGAAAATGGCAGTACAC-3') mit 0,4 µl AmpliTaq Gold (5 U/µl; Perkin Elmer). Die PCR Reaktion fand in PCR-Express von Hybaid statt. Nach einem Vorlauf (96 °C, 10 min) folgten 36 Zyklen in folgender Form: Denaturierung (94 °C, 20 s), Annealing (62 °C, 30 s) und Primerextension (72 °C, 40 s). Nach Ablauf der gesamten 36 Zyklen wurde die Temperatur für 10 min auf 72 °C gehalten und anschließend bis zur Entnahme der Proben auf 4 °C abgekühlt.

Die Produkte der PCR wurden zur Untersuchung des G<sub>1648A</sub> Dimorphismus einer Restriktions Fragment Längen Polymorphismus (RFLP) Analyse unterzogen. Zu diesem Zweck wurden 7 µl PCR-Produkt mit 1 µl BSA (10mg/ml), 1µl Puffer (1x NEBuffer 2) und 1 µl Restriktionsenzym Mnl I (2,5 U/µl) (New England Biolabs, Schwalbach) über Nacht bei 37 °C verdaut. Der Verdau erfolgte im Trio-Thermoblock von Biometra (Göttingen).

### **4.3.3 Typisierung des $\beta_3$ -Integrin T<sub>196C</sub> Dimorphismus mittels PCR-RFLP**

Die PCR wurde durchgeführt mit 2 µl DNA, unter Zugabe von 30,6 µl Aqua dest. (Braun), 5 µl Reaktionspuffer (10x; Perkin Elmer), 8 µl dNTP (1,25 mM pro dNTP; Pharmacia Biotech), je 2 µl Vorwärtsprimer (5 µM; MWG Biotech) (5'-CTGCAGGAGGTAGAG AGTCGCCATAG-3') und Rückwärtsprimer (5 µM; MWG Biotech) (5'-CTCCTCAGAC CTCCACCTTGCTCT-3') mit 0,4 µl AmpliTaq Gold (5 U/µl; Perkin Elmer). Nach einem Vorlauf (96 °C, 10 min) folgten 36 Zyklen mit den Bedingungen: Denaturierung (94 °C, 20

s), Annealing (62 °C, 30 s) und Primerextension (72 °C, 40 s). Nach Ablauf der gesamten 36 Zyklen wurde die Temperatur für 5 min auf 72 °C gehalten und anschließend bis zur Entnahme der Proben auf 4 °C abgekühlt. 8 µl PCR-Produkt mit 1µl NEB 4 Puffer und 1 µl Restriktionsenzym ScrF I (1 U/µl) (New England Biolabs, Schwalbach) wurden über Nacht bei 37 °C verdaut (siehe oben).

#### **4.3.4 Agarose-Gel-Elektrophorese**

Die Analyse der PCR-Produkte und der Restriktionsfragmente wurde mit Hilfe der Elektrophorese-Technik bewerkstelligt.

Für ein 1,8 %iges Gel wurden 900 mg Agarose (Gibco BRL, Karlsruhe) in 50 ml TBE-Puffer (44,6 mM Tris, 44,5 mM Borsäure und 1 mM EDTA) durch Erhitzen (ca. 100 °C) auf einem Magnetrührer gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 45 °C und Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid (Gibco BRL) wurde das Gel in einen Schlitten gegossen. Die Produkte der PCR bzw. des Verdaus wurden mit Aqua dest. (Braun) und Loading Buffer (0,05 % Bromphenolblau, 40 % Saccarose, 0,5 M EDTA pH 8) vermennt in eine Geltasche aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Elektrophoresekammern (Keutz, Reiskirchen) in TBE-Puffer bei einer angelegten Spannung von 90 Volt für 30-50 min. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht (IBI Kodak) sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Kamerasystems und angeschlossenem Drucker (Digit Store, Intas) dokumentiert.

Um die Größe der PCR-Produkte und Restriktionsfragmente zu bestimmen, wurden als Molekulargewichtsstandard Phi-X-174-HAEIII Fragmente (Invitrogen, Karlsruhe) und 100 bp Ladder (New England Biolabs) verwendet.

### **4.4 Thrombozyten Aggregation**

#### **4.4.1 Probenaufbereitung**

Die Probenröhrchen wurden für 15 min bei 37 °C schräg gestellt, danach wurden sie zentrifugiert (100 x g, 25 min; Rotixa A, Hettich, Tuttlingen) und damit das plättchenreiche Plasma (PRP) gewonnen. Das als Überstand zu sehende PRP wurde abgehoben und die Thrombozytenkonzentration mittels eines Zellcounters (Sysmex F-820; Sysmex Medical Electronics, Hamburg) ermittelt. Das Sediment wurde einem weiteren Zentrifugationsschritt (1200 x g, 10 min; Rotixa A) unterzogen. Der Überstand aus plättchenarmen Plasma wurde

abgehoben und benutzt um die Zellzahl des PRP auf  $3 \times 10^5$  Thrombozyten pro  $\mu\text{l}$  einzustellen.

#### **4.4.2 Aggregationsmessung**

Die Messung der Thrombozytenaggregation, basierend auf dem Prinzip der Turbidimetrie, wurde im APACT Aggregometer (LABOR Vertriebsgesellschaft, Ahrensburg) durchgeführt. Zuerst wurde eine mit 500  $\mu\text{l}$  plättchenarmen Plasma gefüllte Aggregationsküvette in das Gerät eingesetzt, um die Transmission auf 100 % zu eichen. Im nächsten Schritt wurde eine mit PRP gefüllte Küvette benutzt, um die Transmission auf 0 % zu setzen. Nach der Eichung wurde die Messung begonnen. Die Thrombozyten wurden während der Messung mittels eines Magnetrührers mit konstanter Geschwindigkeit in der Messküvette in Bewegung gehalten. Alle Messungen fanden bei 37 °C statt. Die Messungen zur Klärung des Einflusses von Estradiol bestanden aus zwei Schritten. Zuerst wurde durch eine Titrationsreihe des Agonisten die niedrigste Agonistenkonzentration bestimmt, bei der die maximale Aggregation noch mehr als 60 % betrug. Als Agonisten wurden Adrenalin (3,0-5,4  $\mu\text{mol/l}$ , Epinephrine Reagent Sigma, Taufkirchen) und ADP (2,5-5,0  $\mu\text{mol/l}$ , Sigma) verwendet. In Schritt zwei wurden die Messküvetten 3 min lang mit verschiedenen Östrogenkonzentrationen ( $10^{-8}$  mol/l,  $10^{-9}$  mol/l,  $10^{-10}$  mol/l und  $10^{-11}$  mol/l) des Östrogens 17 $\beta$ -Estradiol in einer wasserlöslichen Form (Cyclodextrin-encapsulated- 17 $\beta$ -estradiol; Sigma) inkubiert. Danach wurde die Messung gestartet und der Agonist in der in Schritt eins ermittelten Konzentration zugegeben. Die Messung dauerte für Adrenalin 8 und für ADP 6 min. Im Verlauf der Messung wurde computerunterstützt (APACT Application-Professional 1.4; PASS Engineering, Bonn) eine Kurve der Aggregation generiert, aus der dann die maximal erreichte Aggregation berechnet wurde.

#### **4.5 Adhäsionstest**

Die Blutproben wurden nach der Entnahme in neue BSA beschichtete Röhrchen gefüllt und bei 37 °C 1 h lang ruhen gelassen. Danach wurde zentrifugiert (120 x g, 20 min; Rotixa AP, Hettich, Tuttlingen) und aus dem Überstand 2 ml PRP abgehoben und in ein Röhrchen gegeben mit 2 ml Waschpuffer (pH 6,5; besteht aus: 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 36 mM Zitronensäure, 1,99 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Glucose und 0,35 % BSA), 20  $\mu\text{l}$  PGE<sub>1</sub> (Serva), 10  $\mu\text{l}$  Apyrase (1000 U/ml; Sigma, Taufkirchen) und 222  $\mu\text{l}$  ACD (NPBI-Biotrans)

leicht gemischt und ruhen gelassen (37 °C, 15 min). Alle verwendeten Puffer wurden auf 37 °C vorgewärmt.

Danach folgte dreimal folgender Schritt: Zentrifugation (1200 x g, 10 min; Rotixa AP, Hettich), Überstand abgießen und Pellet resuspendieren in 2 ml Waschpuffer, 60 µl PGE<sub>1</sub> und 20 µl Apyrase; dann ruhen lassen (37 °C, 15 min). Im Anschluss an die dritte Wiederholung wurde zentrifugiert (1200 x g, 10 min; Rotixa AP, Hettich), der Überstand abgegossen und das Pellet aufgelöst in 2 ml PBS pH 6,5 (PAA Laboratories, Linz, Österreich) 20 µl PGE<sub>1</sub> und 5 µl Calcein (2,5 µM; Sigma, Taufkirchen). Nach 15 min bei 37 °C im Dunkeln im Schüttelwasserbad wurden 10 ml Waschpuffer dazu pipettiert. Danach folgten 10 min bei 37 °C und Zentrifugation (1200 x g, 10 min; Rotixa AP, Hettich). Der Überstand wurde abgeschüttet und das Pellet resuspendiert in 2 ml Waschpuffer und 100 µl PGE<sub>1</sub>. Es wurden 7,9 ml Waschpuffer hinzugefügt, der Ansatz stehen gelassen (37 °C, 10 min) und zentrifugiert (1200 x g, 10 min; Rotixa AP, Hettich). Das Pellet wurde in 1 ml Waschpuffer (w/o: ohne MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub>; besteht aus: 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 36 mM Zitronensäure, 5 mM Glucose und 0,35% BSA) resuspendiert und ein Aliquot von 10µl abgenommen, um die Thrombozytenzahl am Zellcounter (Sysmex F-820) zu bestimmen. Zum Ansatz wurden 10 ml Waschpuffer (w/o) und 100 µl PGE<sub>1</sub> zugegeben und ruhen gelassen (37 °C, 10 min). Danach schloss sich die Zentrifugation 10 min bei 1200 x g an und das Pellet wurde in Tyrode-Puffer (pH 7,35; besteht aus: 135 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,35 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM Hepes, 5,5 mM Glucose und 0,35% BSA) resuspendiert und die Thrombozytenkonzentration auf 10<sup>8</sup>/ml eingestellt.

Eine 96 Loch Elisa-Platte (F-Form, Microlon, hohe Bindungskapazität; Greiner, Frickenhausen) wurde mit Fibrinogen (aus humanem Plasma; Calbiochem, Schwalbach) beziehungsweise Kollagen (Typ I, aus humaner Plazenta; Sigma) in einer Konzentration von je 5 µg/ml beschichtet (2 h Inkubation bei 37° C). Danach wurde die Platte mit PBS (PAA Laboratories) gewaschen und mit 100 µl BSA (1%; Serva, Heidelberg) blockiert. Vor Zugabe der Thrombozyten wurde die BSA-Lösung abgeschüttet und die Platte getrocknet. Die Adhäsion der Thrombozyten an extrazelluläre Matrix (Fibrinogen, Kollagen) wurde getestet auf den Einfluss von Östrogenen und Antikörpern. Dazu wurden 150 µl markierte Thrombozyten (1 x 10<sup>8</sup>/ml), versetzt mit 7 µl MgCl<sub>2</sub> (200 mM), 43 µl Tyrode Puffer und 150 µl der zu testenden Substanz. Als Testsubstanzen kamen zur Anwendung: 17β-Estradiol (Cyclodextrin-encapsulated-17β-estradiol; Sigma, Taufkirchen)

Monoklonale Antikörper Gi 3 gegen  $\alpha_{11b}\beta_3$  (10  $\mu\text{g/ml}$ ; Heinrich et al., 1985) und Gi 9 gegen  $\alpha_2\beta_1$  (10  $\mu\text{g/ml}$ ; Santoso et al., 1993) sowie PBS als Negativkontrolle. Die Ansätze wurden 30 min bei 37 °C inkubiert. Jeder Ansatz wurde auf 3 Vertiefungen verteilt und dann 30 min bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert. Die Zellsuspension wurde abgekippt und die Platte dreimal mit je 200  $\mu\text{l}$  PBS/well gewaschen. Dann wurden 60  $\mu\text{l}$  Lyse-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 5 mM EDTA, 20  $\mu\text{g/ml}$  Trypsininhibitor und 1 % Nonidet P40) pro Vertiefung zugegeben und 10 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde für die Messung der Fluoreszenz auf eine schwarze Mikrotiterplatte (Flouro Nunc Module, Maxisorp Surface; Nunc, Wiesbaden) überführt. Die Fluoreszenzmessung fand im Microplate Fluorescence Reader FL<sub>x</sub>800 (Bio-Tek Instruments; Bad Friedrichshall) statt. Die Messergebnisse wurden mit der Software *KCjunior* (Bio-Tek Instruments) erfasst und archiviert.

## 4.6 Statistische Auswertung

Für den Vergleich von nicht-normal-verteilten Daten zweier Gruppen wurde der nichtparametrische Wilcoxon Test verwendet. Bei Vergleichen mit mehreren Gruppen kamen die Varianzanalysen Kruskal-Wallis Test und Friedman Two-Way Anova zur Anwendung. Signifikanz wurde angenommen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 0,05. Die Berechnungen wurden unter SPSS für Windows durchgeführt. Es erfolgte eine statistische Beratung im Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Genotypen von Polymorphismen der Integrine $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$

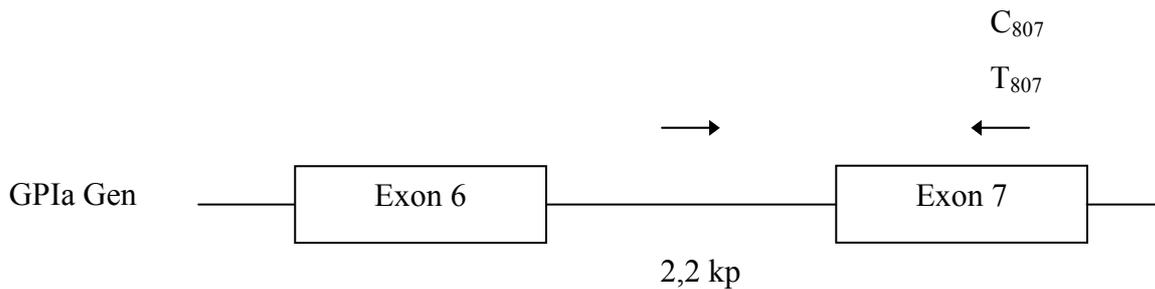
Um die Dimorphismen C<sub>807</sub>T und G<sub>1648</sub>A von  $\alpha_2\beta_1$  und den  $\alpha_{IIb}\beta_3$  T<sub>196</sub>C (HPA-1) Dimorphismus zu bestimmen wurde anhand der DNA von 114 weiblichen Spenderinnen eine Genotypanalyse durchgeführt. Dabei kamen sequenzspezifische PCR und Analyse von Restriktionsfragmentlängen zum Einsatz.

Die Tabelle 5 zeigt eine Übersicht der absoluten und prozentualen Genotypverteilung der Polymorphismen C<sub>807</sub>T und G<sub>1648</sub>A des  $\alpha_2$ -Integrins und des Polymorphismus T<sub>196</sub>C des  $\beta_3$ -Integrins.

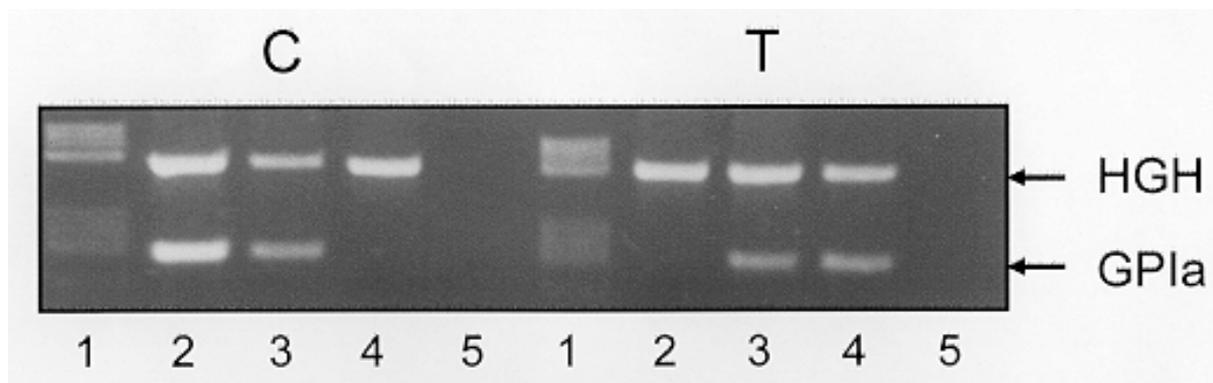
**Tabelle 5: Genotypverteilung**

| Integrin $\alpha_2$              |      |      |      |
|----------------------------------|------|------|------|
| Dimorphismus C <sub>807</sub> T  | CC   | CT   | TT   |
| Absolut                          | 43   | 52   | 19   |
| Prozent                          | 37,7 | 45,6 | 16,7 |
| Dimorphismus G <sub>1648</sub> A | GG   | GA   | AA   |
| Absolut                          | 93   | 20   | 1    |
| Prozent                          | 81,6 | 17,5 | 0,9  |
| Integrin $\beta_3$               |      |      |      |
| Dimorphismus T <sub>196</sub> C  | TT   | TC   | CC   |
| Absolut                          | 82   | 29   | 3    |
| Prozent                          | 71,9 | 25,4 | 2,6  |

Um das Merkmal C<sub>807</sub>T zu erfassen kam eine sequenzspezifische PCR zur Anwendung. Bei diesem Prinzip sind pro Individuum 2 PCR-Ansätze notwendig, um den Genotyp zu bestimmen. In beiden Ansätzen ist das Primerpaar HGH I + HGH II vorhanden, das als Kontrolle fungiert. Das entsprechende Produkt ist als Positivkontrolle für die PCR bei der Gel-Elektrophorese als Bande bei ca. 500 Bp sichtbar. Die Ansätze unterscheiden sich im Rückwärtsprimer (siehe Abbildung 7), der eine Allelspezifität aufweist. Liegt an der Stelle 807 des  $\alpha_2$  Gens die Base Cytosin so wird nur im Ansatz mit dem Rückwärtsprimer 96R ein Produkt amplifiziert. Mit dem Rückwärtsprimer 97R wird dagegen ein Produkt amplifiziert, wenn die Base Thymin vorliegt.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der sequenzspezifischen PCR zur Untersuchung des  $\alpha_2$ -Integrin C807T Dimorphismus.** Vorwärtsprimer (→), Rückwärtsprimer (←).



**Abbildung 8: Produkte der sequenzspezifischen PCR**, beispielhaft für drei Individuen. Die GPIa ( $\alpha_2$ -Integrin) Banden repräsentieren das allelspezifische Produkt und die HGK Banden fungieren als interne Kontrolle (Bahnen 1 zeigen den mitgeführten Molekulargewichtsstandard). Erkennbar sind die Genotypen: CC homozygot (Bahnen 2), CT heterozygot (Bahnen 3) und TT homozygot (Bahnen 4).

Dementsprechend ergibt sich das aus Abbildung 8 erkennbare Bild bei der Gel-Elektrophorese. Möglich sind die drei Genotypen CC, CT und TT. Das Ergebnis der Analyse ist aus Tabelle 5 ersichtlich, die sich daraus ergebenden Allelfrequenzen stellen sich gemäß dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wie folgt dar: p (C) 0,61 und q (T) 0,39.

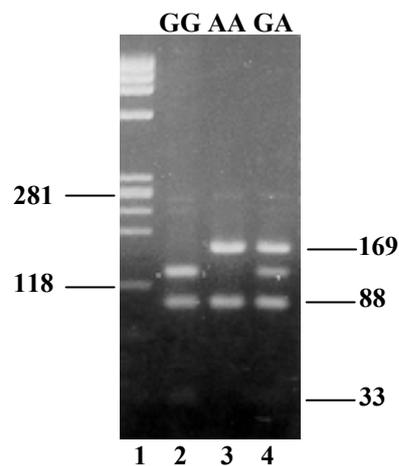
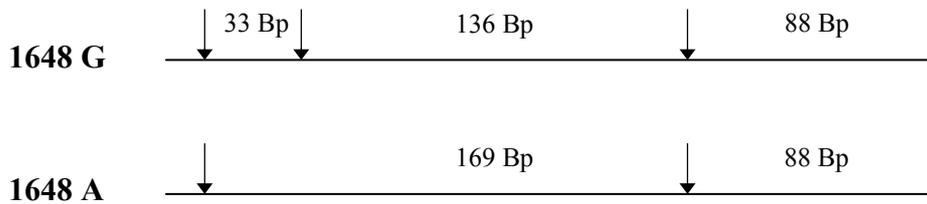
Die Genotypisierung der Dimorphismen  $G_{1648}A$  (des  $\alpha_2$  Gens) und  $T_{196}C$  (des  $\beta_3$  Gens) basiert auf dem Prinzip PCR-RFLP. Hier wird im ersten Schritt die zu untersuchende Genregion mittels PCR vervielfältigt. Durch Gel-Elektrophorese wird der Erfolg der PCR überprüft, erwartet werden Produkte mit der Größe 285 Bp (für  $\alpha_2$   $G_{1648}A$ ) und 338 Bp (für  $\beta_3$   $T_{196}C$ ). Im zweiten Schritt wird das PCR-Produkt mit einem speziell gewählten Restriktionsenzym verdaut. Durch den Basenaustausch des Dimorphismus verändert sich eine möglich Schnittstelle für die benutzte Endonuclease und es resultieren verschiedene Fragmente wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist.

Ergebnisse

|                   | PCR-Produkt (Bp) | Enzym  | Fragmente (Bp)      |
|-------------------|------------------|--------|---------------------|
| $\alpha_2$ 1648 G | 285              | Mnl I  | 136, 88, 33, 16, 12 |
| $\alpha_2$ 1648 A |                  |        | 169, 88, 16, 12     |
| $\beta_3$ 196 T   | 338              | ScrF I | 214, 78, 46         |
| $\beta_3$ 196 C   |                  |        | 137, 78, 77, 46     |

**Tabelle 6: RFLP-Analyse**

Die Abbildungen 9 und 10 zeigen schematisch die Schnittstellen der Restriktionsenzyme und die resultierenden Fragmente. In der Gel-Elektrophorese wird der Fragment-Polymorphismus sichtbar



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der RFLP-Analyse des  $\alpha_2$  G1648A Dimorphismus (oben) und Produkte des Restriktionsenzymverdaus (unten)**



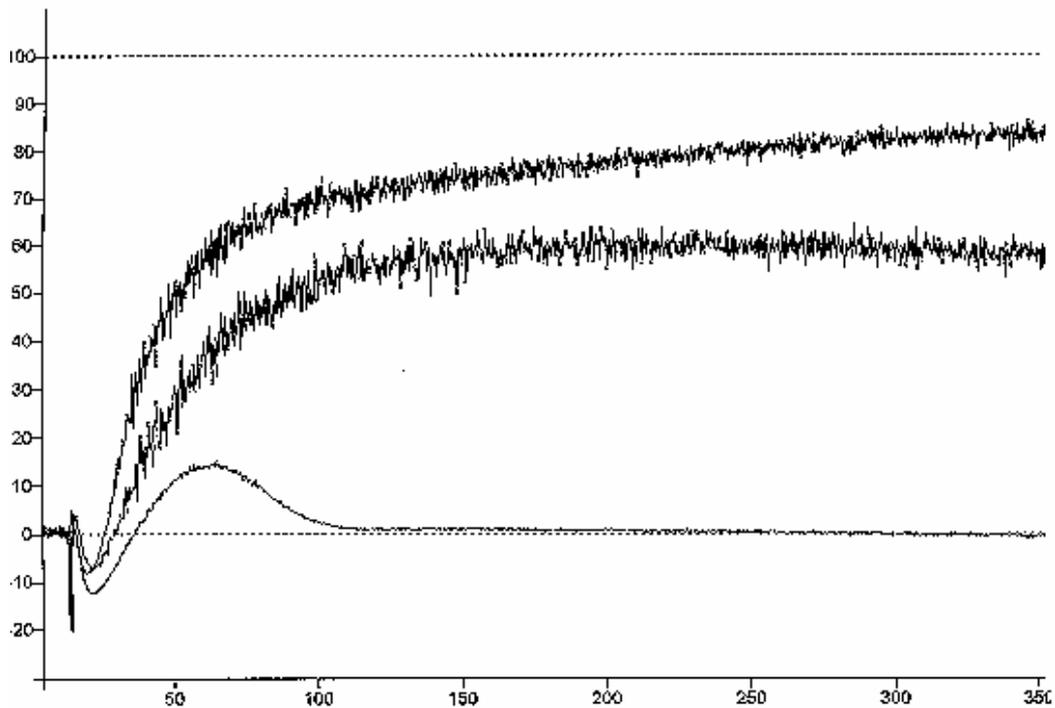
(n = 116) und T807G1648 (n = 90). Dieses Ergebnis stimmt mit bisherigen Entdeckungen (Kroll et al., 2000) überein.

## **5.2 Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von Rezeptorpolymorphismen**

Die benutzte Methode zur Testung der Thrombozytenaggregation (turbimetrisches Verfahren nach Born) basiert auf der Eigenschaft, dass die optische Dichte einer Partikelsuspension abhängig ist von der Partikelanzahl. Nach Zugabe des Plättchenagonisten ADP oder Adrenalin zu plättchenreichem Plasma setzte die Aggregation der Plättchen ein, die in der Meßküvette durch einen Rührmechanismus in Bewegung gehalten wurden. Durch die Bildung großer Plättchenaggregate verringerte sich die Partikelzahl in der Suspension, wodurch die Lichttransmission zunahm. Diese wurde fortlaufend photometrisch registriert und in Form einer Kurve aufgezeichnet. Die Lichtdurchlässigkeit der Suspension stellt somit ein Maß für die Aggregabilität der Thrombozyten dar. Die Aggregation wurde in Prozent der maximalen Aggregation angegeben. Dieser Wert wurde durch Eichung mit plättchenarmen Plasma; Lichttransmission gleich 100 % im Vergleich zu plättchenreichem Plasma Transmission 0% festgelegt.

### **5.2.1 ADP als Induktor der Aggregation**

Abbildung 11 zeigt beispielhaft die Kurvenverläufe für drei verschiedene ADP-Konzentrationen. 10-15 Sekunden nach Beginn der Messung wurde der Induktor in die Messküvette pipettiert. Dieses Ereignis wurde als negativer Ausschlag aufgezeichnet. Danach folgte der für ADP stimulierte Thrombozyten typische *shape change*. Diese Formveränderung der Plättchen ist in der Aggregationskurve als Abnahme der Lichttransmission zu erkennen. Danach stieg die Aggregationskurve an, wobei zwischen primärer reversibler und sekundärer irreversibler Aggregation unterschieden werden kann, da bei 1,0  $\mu\text{M}$  ADP im Vergleich zu 2,5 und 5,0  $\mu\text{M}$  ADP die Aggregation im weiteren Verlauf wieder rückläufig war (Deaggregation).



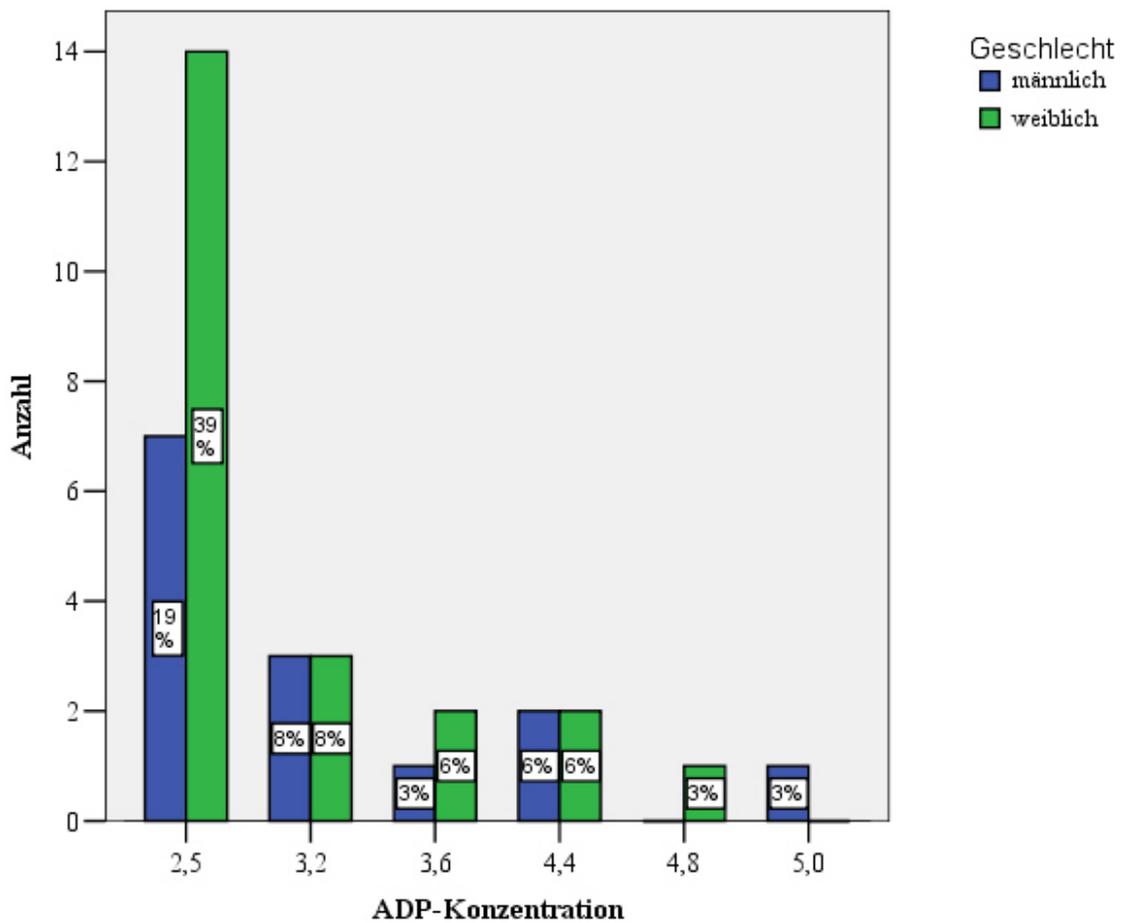
**Abbildung 11: ADP induzierte Thrombozytenaggregation in PRP**

Mit verschiedenen Konzentrationen (2,5  $\mu\text{M}$ , 3,2  $\mu\text{M}$ , 3,6  $\mu\text{M}$ , 4,0  $\mu\text{M}$ , 4,4  $\mu\text{M}$ , 4,8  $\mu\text{M}$ , 5,0  $\mu\text{M}$ ) des Agonisten ADP wurden die Thrombozyten stimuliert, um die minimale ADP-Konzentration zu bestimmen, bei der die Aggregation noch mindestens 60 % betrug. Anhand dieser Titrationsmessung wurde für jedes Individuum die ADP-Konzentration bestimmt, auf welche die Thrombozyten mit wenigstens 60 % Aggregation reagieren. Die Titration wurde durchgeführt, um interindividuelle Unterschiede in der Plättchenaggregation auszuschalten. So diente eine standardisierte Aggregationsreaktion als Basis für die Untersuchung des Einfluss von Estradiol auf die Thrombozytenfunktion. Die Ergebnisse sind aufgeschlüsselt nach Geschlecht in Tabelle 7 zu sehen. Tendenziell wurden bei Plättchen von weiblichen Spendern geringere ADP-Konzentrationen benötigt, um eine mindestens 60%ige Aggregation auszulösen, dieser Unterschied ist aber nicht statistisch signifikant.

Die Abbildung 12 gibt die absolute und prozentuale Verteilung der ADP-Schwellenkonzentration für Männer und Frauen wieder.

|                 | ADP Konzentration |
|-----------------|-------------------|
| Frauen (n = 22) | 3,0 ± 0,7 µmol/l  |
| Männer (n= 15)  | 3,2 ± 0,9 µmol/l  |
| Gesamt (n = 36) | 3,1 ± 0,8 µmol/l  |

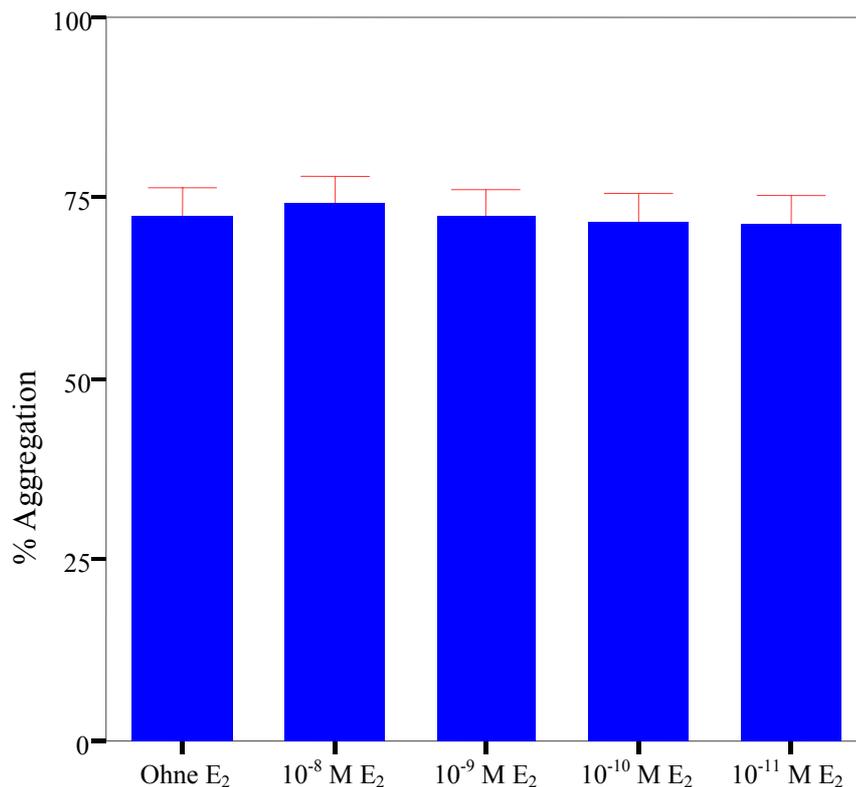
**Tabelle 7: ADP-Schwellenkonzentration** (Niedrigste durchschnittlich benötigte ADP Konzentration, um eine Aggregation von wenigstens 60 % zu erreichen.)



**Abbildung 12: ADP-Schwellenkonzentration** (Absolute und prozentuale Verteilung aufgeschlüsselt nach Geschlecht)

### 5.2.2 Wirkung von 17 $\beta$ -Estradiol auf die Thrombozyten-Aggregation

Durch die individuell gewählte minimale ADP Konzentration war es möglich eine relativ uniforme Reaktion bei allen Spendern zu erzeugen. Diese Konzentration, respektive die damit verbundene Reaktion, war Basis für die Untersuchung des Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol auf die Aggregationsfähigkeit der Plättchen. Nach drei Minuten Inkubation mit 17 $\beta$ -Estradiol ( $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  und  $10^{-11}$  mol/l) wurde die Aggregation durch die wie beschrieben ermittelte ADP-Konzentration (siehe Kapitel 5.2.1) gestartet. Untersucht wurden 14 männliche und 22 weibliche Spenderinnen. Abbildung 13 beschreibt das Ergebnis dieses Versuches. Aufgetragen ist die mittlere Aggregation in Bezug auf die verwendete Estradiolkonzentration. Die Inkubation mit 17 $\beta$ -Estradiol hatte keinen Einfluss auf die Aggregation. Die nicht signifikanten Unterschiede der mittleren Aggregation beruhen auf normalen Schwankungen der Aggregationsmessung.

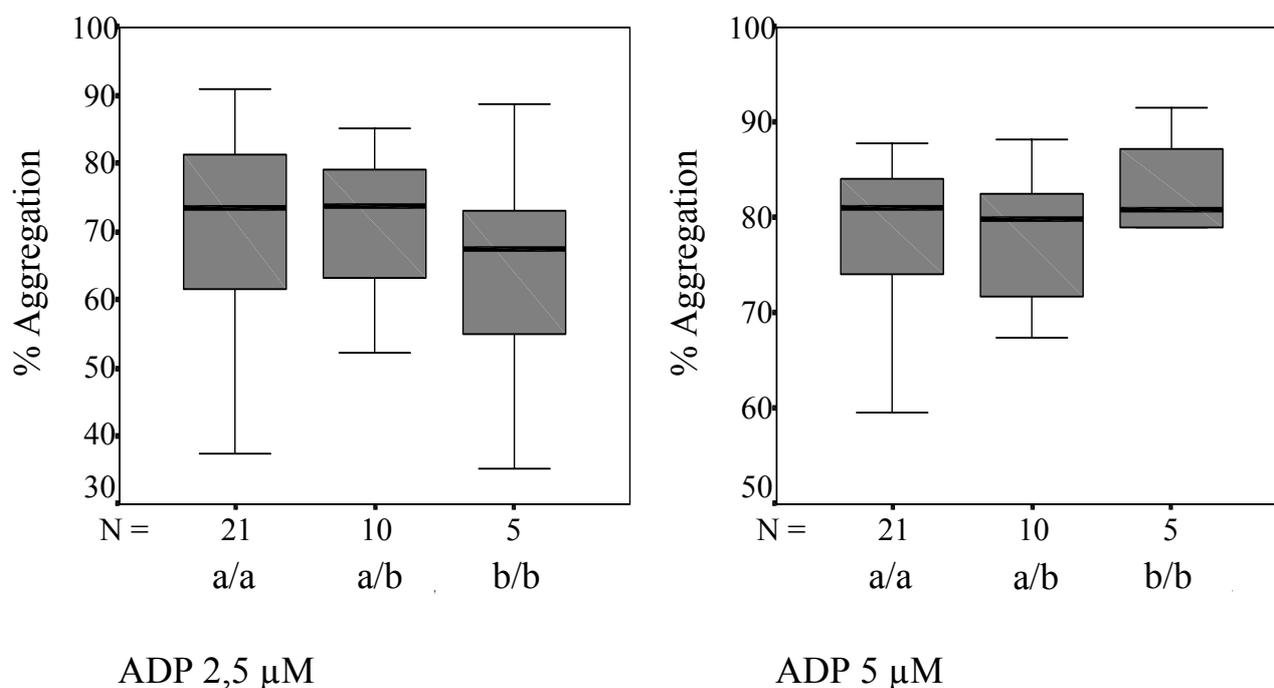


**Abbildung 13: Effekt von 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) auf die ADP induzierte Plättchenaggregation in plättchenreichem Plasma.**

Balken zeigen die Mittelwerte (N=36) der Aggregationsmessung, Fehlerbalken zeigen 95 % Konfidenzintervall des Mittelwerts.

### 5.2.3 Einfluss des HPA-1 Systems auf die Thrombozytenaggregation

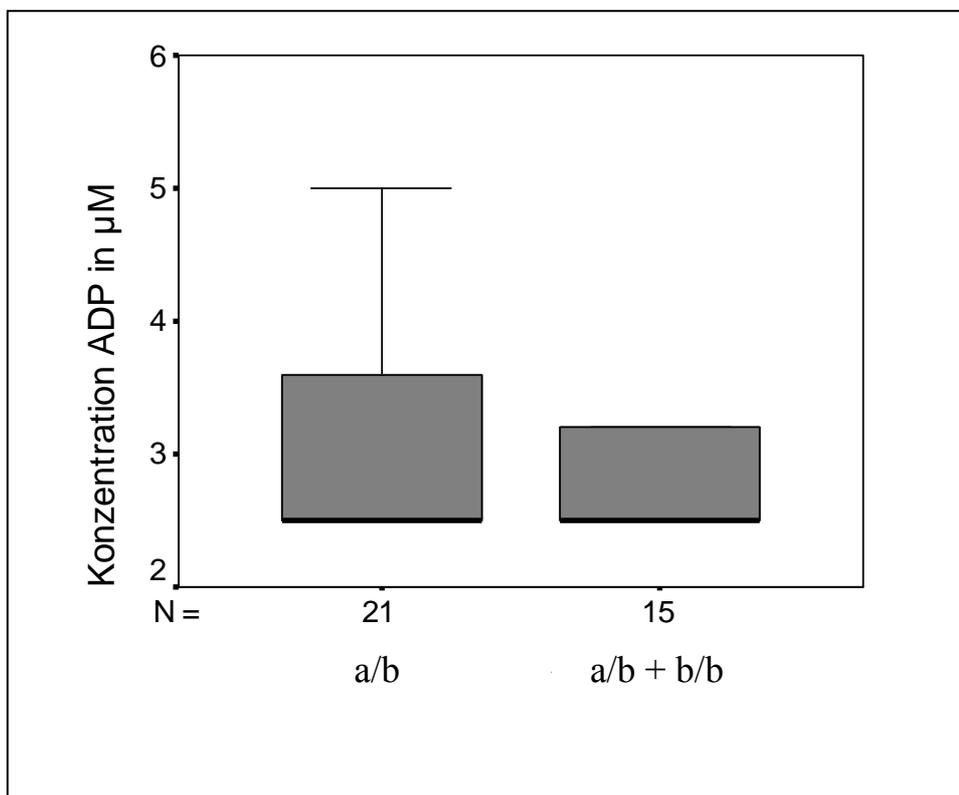
Verglichen wurde auch die Reagibilität der Thrombozyten in Bezug auf das HPA-1 System. Alle Spenderindividuen waren auf dieses Merkmal hin untersucht worden. Die Ergebnisse für eine Stimulation der Thrombozyten mit ADP 2,5 und 5,0  $\mu\text{M}$  sind in Abbildung 14 dargestellt. Es zeigte sich, dass unabhängig vom Genotyp alle Individuen vergleichbar auf die jeweils verwendete Agonistenkonzentration reagierten. Es lässt sich kein Genotyp abhängiger Unterschied in der Aggregationsantwort bei Stimulierung mit ADP 2,5  $\mu\text{M}$  beziehungsweise 5  $\mu\text{M}$  erkennen.



**Abbildung 14: ADP induzierte Thrombozyten-Aggregation in Abhängigkeit von HPA-1.**

Das Box-Plot Diagramm gibt den Median (schwarzer Balken) und die Minima ( $\perp$ ) und Maxima ( $\top$ ) der Aggregation wieder. Nicht signifikant.

Um die Reagibilität von Plättchen zu bewerten kann man wie in Abbildung 14 gezeigt die Aggregationsantwort auf eine standardisierte Agonistenkonzentration messen. Eine andere Möglichkeit besteht darin die individuelle Schwellenkonzentration des Agonisten zu bestimmen mit der eine zuvor festgelegte Aggregationsantwort auslösbar ist. Die auszulösende Aggregation wurde mit 60 Prozent festgelegt. Abbildung 15 stellt die ADP-Schwellenkonzentration in Abhängigkeit vom HPA-1 System dar. Es lässt sich kein HPA-1 abhängiger Unterschied in der Sensitivität auf ADP erkennen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder bei der Induktion mit definierten ADP Konzentrationen noch bei der Bestimmung der ADP Schwellenkonzentration ein Unterschied in der Aggregabilität zwischen HPA-1a und HPA-1b Thrombozyten zu sehen ist.

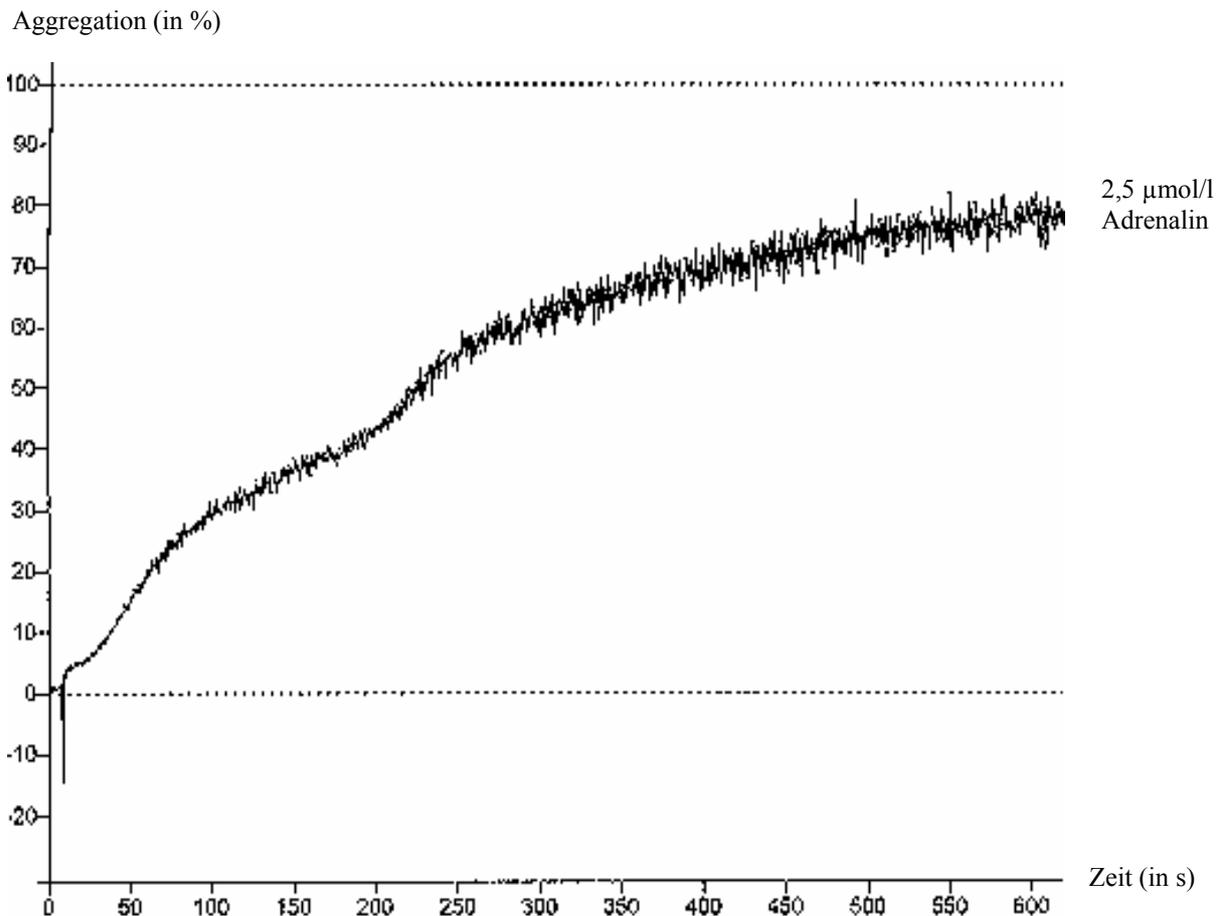


**Abbildung 15: ADP-Schwellenkonzentration in Abhängigkeit von HPA-1.**

Das Box-Plot Diagramm gibt den Median (schwarzer Balken) und die Minima (⊥) und Maxima (⌣) der Aggregation wieder. Nicht signifikant.

### 5.2.4 Adrenalin als Induktor der Aggregation

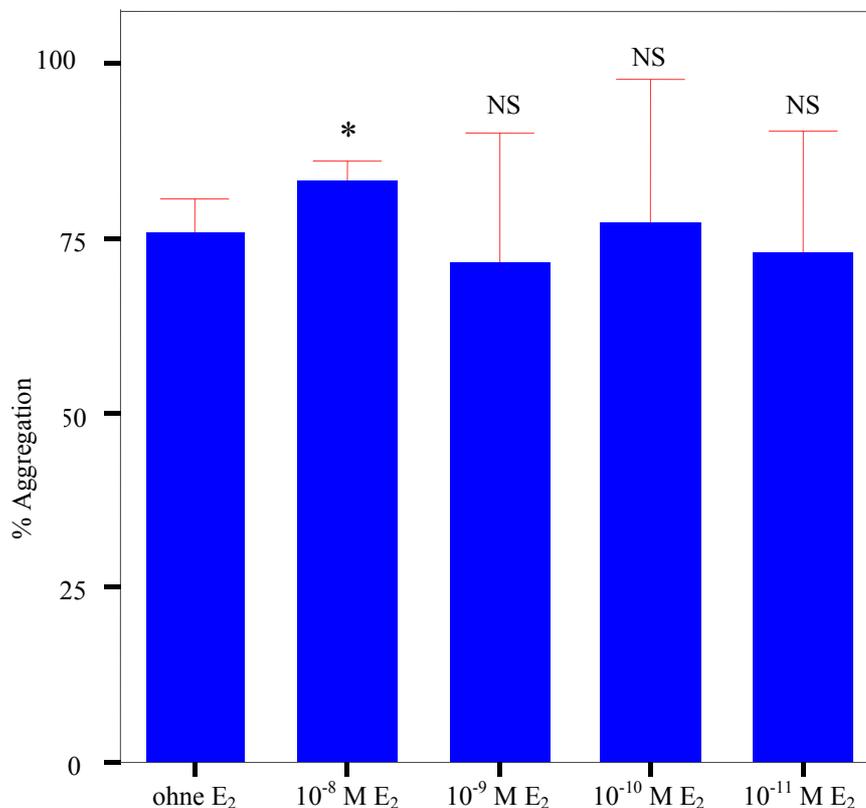
Aggregationsuntersuchungen mit dem Agonisten Adrenalin wurden mit den Proben der 15 männlichen Spender durchgeführt. Abbildung 16 zeigt den typischen Kurvenverlauf der durch Adrenalin ausgelösten Aggregation. Dieser ist charakterisiert durch das Fehlen des *shape change* und den biphasischen Verlauf, der begründet ist in Ausschüttung von endogenem ADP aus thrombozytären Speichergranula.



**Abbildung 16: Adrenalin (2,5 µmol/l) induzierte Thrombozytenaggregation in PRP**

Die Aggregation induziert durch Adrenalin erwies sich wesentlich weniger stabil in ihrer Reproduzierbarkeit, im Vergleich zu ADP induzierter Aggregation. Von 15 getesteten Individuen zeigten nur 9 eine adäquate Reaktion auf Adrenalin in den verwandten Konzentrationen. Aus diesem Grund wurden keine Aggregationsversuche in der Gruppe der weiblichen Spender mit dem Agonisten Adrenalin durchgeführt. Mit verschiedenen Konzentrationen (2,5 µM, 3,0 µM, 3,4 µM, 3,8 µM, 4,2 µM, 4,6 µM, 5,0 µM, 5,4 µM) des

Agonisten Adrenalin wurden die Thrombozyten stimuliert, um die niedrigste Adrenalin-Konzentration zu bestimmen, bei der die Aggregation noch mindestens 60 % betrug. Diese Konzentration lag bei durchschnittlich  $3,5 (\pm 0,7) \mu\text{mol/l}$ . Die Konzentration betrug für HPA-1a/a Individuen  $3,6 (\pm 0,8)$  und für die Gruppe HPA-1a/b + HPA1b/b Individuen  $3,4 (\pm 0,6) \mu\text{mol/l}$  ( $P = 0,79$ ). Die jeweilige Konzentration wurde im Folgenden dann benutzt, um den Effekt von  $17\beta$ -Estradiol ( $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  und  $10^{-11}$  mol/l) auf die Thrombozytenfunktion zu prüfen. Die Adrenalin induzierte Aggregation unter Zugabe von  $17\beta$ -Estradiol zeigt, wie in Abbildung 17 dargestellt, bei der höchsten Estradiol-Konzentration ( $10^{-8}$  mol/l) einen signifikanten Anstieg der Aggregation im Vergleich zu unbehandelten Thrombozyten.



**Abbildung 17: Effekt von  $17\beta$ -Estradiol ( $E_2$ ) auf die Adrenalin induzierte Thrombozytenaggregation in plättchenreichem Plasma.**

Balken zeigen die Mittelwerte ( $N=9$ ) der Aggregationsmessung, Fehlerbalken zeigen 95 % Konfidenzintervall des Mittelwerts. \* ( $P < 0,05$ ); NS (nicht signifikant)

Aufgetrennt nach HPA-1 System scheint der proaggregatorische Effekt von Estradiol ( $10^{-8}$  mol/l) bei HPA-1b positiven Individuen (mittlere Aggregation  $84\% \pm 3,5$ ) etwas stärker ausgeprägt zu sein als beim HPA-1a Phänotyp ( $82\% \pm 4$ ), bei der geringen Fallzahl ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied ( $P = 0,62$ ).

### 5.3 Ergebnisse der Thrombozytenadhäsion

Bei dem Adhäsionstest für Thrombozyten handelt es sich im Gegensatz zum Thrombozytenaggregationstest um einen Test in einem stationären System. Die Bindung gewaschener Thrombozyten an eine mit Fibrinogen beziehungsweise mit Kollagen beschichtete Mikrotiterplatte wurde erfasst. Eine definierte Menge Thrombozyten, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein markiert waren, wurde auf die Mikrotiterplatte (jeweils pro Vertiefung) gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation wurde die Zellsuspension abgeschüttet und die gebundenen Zellen lysiert. Dann wurde die Fluoreszenz im Zellysate gemessen. Durch den Vergleich zwischen den Messwerten und dem Maß der Fluoreszenz, der bei der definierten Menge von Thrombozyten ermittelt wurde, ließ sich Zahl der gebundenen Thrombozyten errechnen. Die Adhäsion wurde für die Thrombozyten von 22 Frauen getestet.

#### 5.3.1 Adhäsion an Fibrinogen

Zur Bestätigung der Leistungsfähigkeit des Testsystems wurden in einer Subpopulation die Thrombozyten mit einem für den Fibrinogenrezeptor spezifischen Antikörper inkubiert. Der Antikörper Gi 3 erkennt und inhibiert Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Heinrich et al., 1985). Der Adhäsionstest erfasste, die erwartete Hemmung der Adhäsion an Fibrinogen. Abbildung 18 stellt diese Wirkung dar.

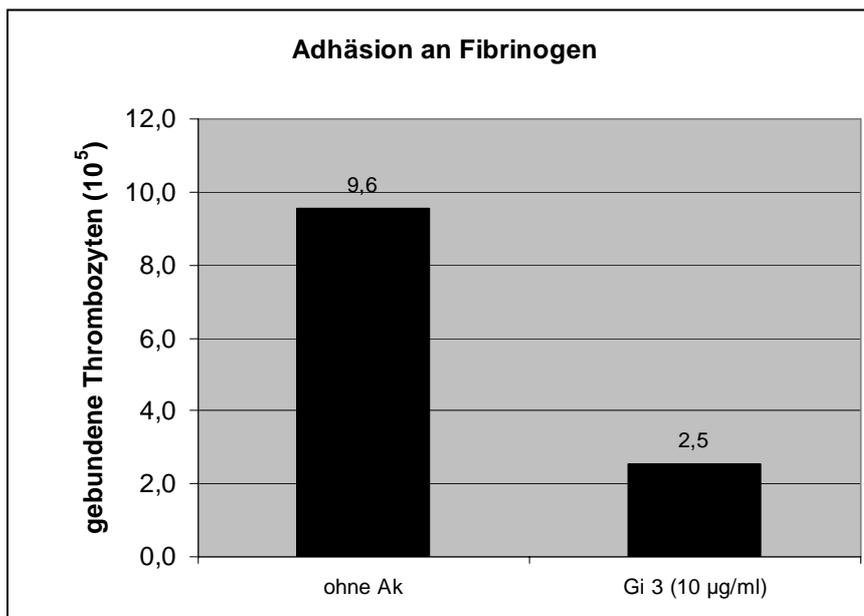
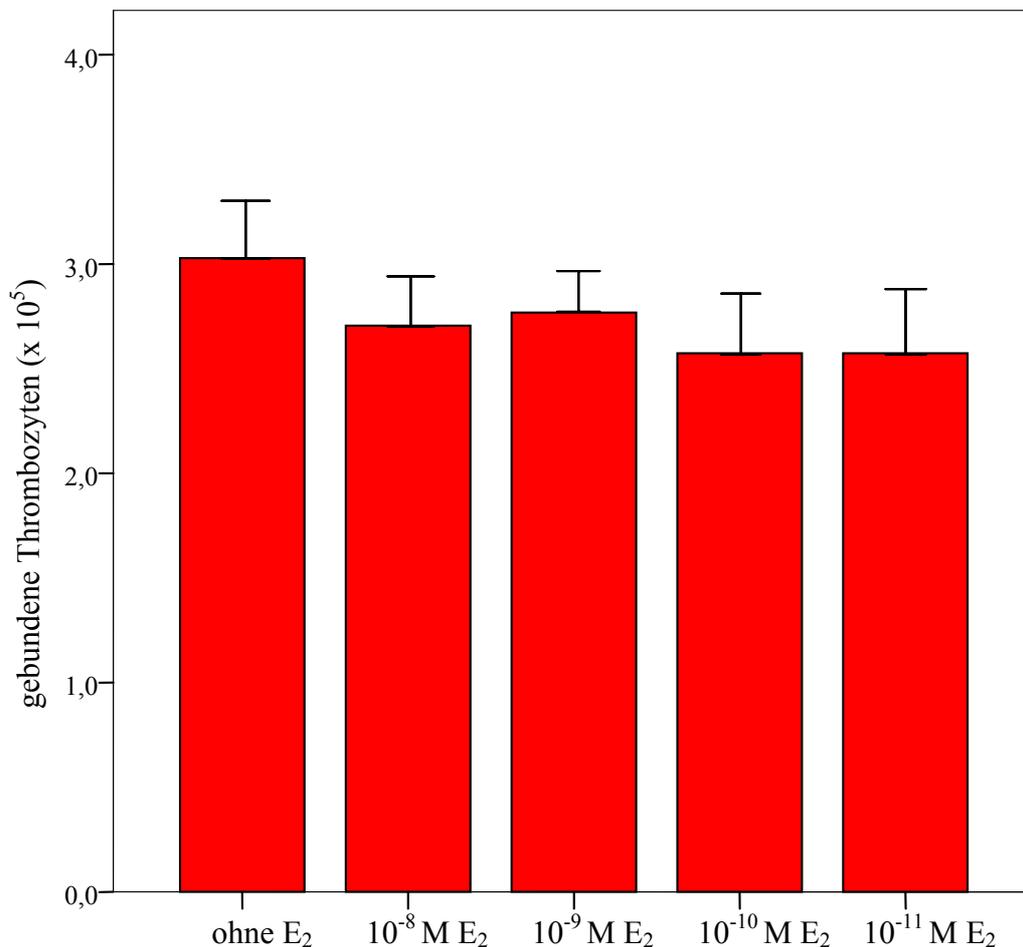


Abbildung 18: Hemmung der Adhäsion gewaschener Thrombozyten durch Gi 3

### 5.3.2 Wirkung von 17 $\beta$ -Estradiol auf die Adhäsion

Im folgenden Versuch wurden die Thrombozyten 30 Minuten mit verschiedenen Estradiolkonzentrationen ( $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  und  $10^{-11}$  mol/l) bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte wie beschrieben die Adhäsion an die mit Fibrinogen beschichtete Platte und die anschließende Messung der Fluoreszenz. Abbildung 19 zeigt die Anzahl der durchschnittlich gebundenen Thrombozyten in Relation zur eingesetzten Konzentration von 17 $\beta$ -Estradiol. Es zeigt sich bei der statistischen Auswertung (Friedman Two-Way Anova), dass Östrogen die Thrombozytenfunktion signifikant ( $p < 0,0001$ ) verändert. Es kommt zu einer Verminderung der gebundenen Thrombozyten. Ein statistischer Unterschied zwischen den verschiedenen Östrogenkonzentrationen ließ sich nicht zeigen.

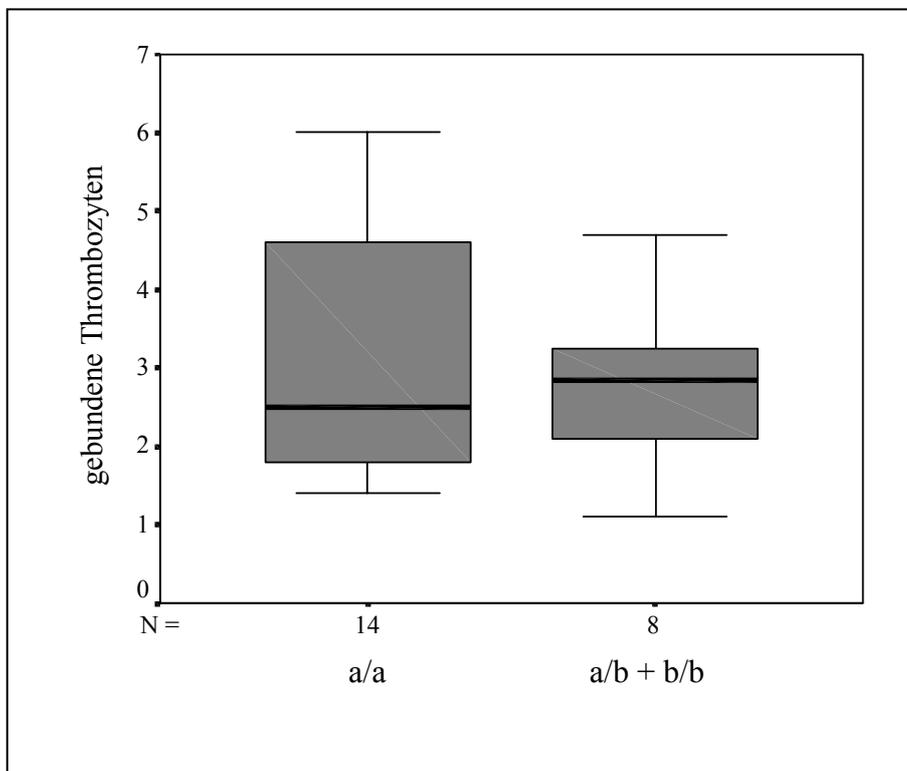


**Abbildung 19: Effekt von 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) auf die Adhäsion gewaschener Thrombozyten an Fibrinogen (5  $\mu$ g/ml).**

Die Zugabe von Estradiol inhibiert die Adhäsion der Thrombozyten an Fibrinogen ( $p < 0,001$ )  
Balken zeigen Mittelwerte (N=22), Fehlerbalken weisen den Standardfehler des Mittelwerts aus.

### 5.3.3 Einfluss des HPA-1b Phänotyp auf die Thrombozyten-Adhäsion

Die Adhäsion gewaschener Thrombozyten an Fibrinogen wurde gemessen und im Hinblick auf einen möglichen Einfluss des HPA-1b Phänotyp auf die Bindungsfähigkeit der Thrombozyten an Fibrinogen ausgewertet. Die Abbildung 20 gibt das Ergebnis der Adhäsionsuntersuchung aufgeschlüsselt nach HPA-1 wieder. Die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney U Test ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.



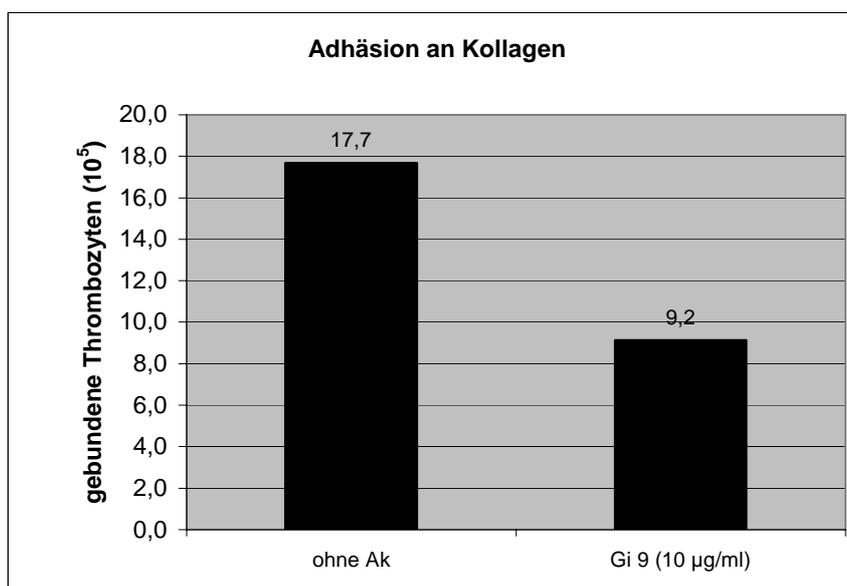
**Abbildung 20: Adhäsion gewaschener Thrombozyten an Fibrinogen (5 µg/ml) in Abhängigkeit von HPA-1.**

Das Box-Plot Diagramm gibt den Median (schwarzer Balken) und die Minima (⊥) und Maxima (⌊) der gebundenen Thrombozyten ( $\cdot 10^5$ ) wieder. Nicht signifikant.

### 5.3.4 Adhäsion an Kollagen

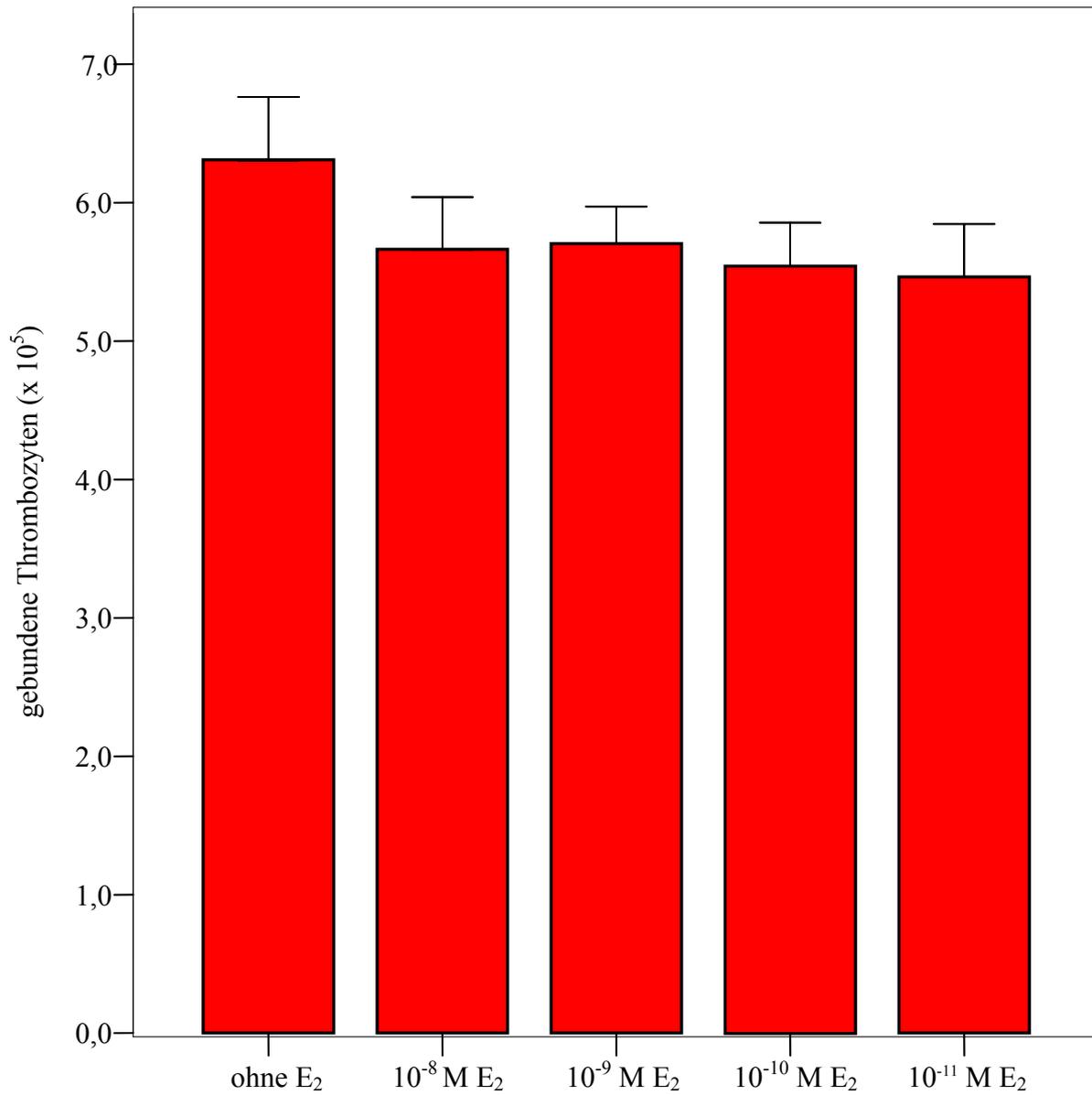
Um die Beeinflussbarkeit der Adhäsion an Kollagen zu prüfen wurde der Antikörper Gi 9 verwandt. Gi 9 ist ein inhibitorischer Antikörper des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin Komplexes. (Santoso et al., 1993).

In Abbildung 21 ist die Adhäsion an Kollagen in Gegenwart und Abwesenheit von Gi 9 zu sehen.



**Abbildung 21: Hemmung der Adhäsion gewaschener Thrombozyten durch Gi 9**

Wie schon für Fibrinogen wurde auch die Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen unter dem Einfluss von  $17\beta$ -Estradiol geprüft. Dafür wurden die Thrombozyten vor der Adhäsion 30 Minuten mit vier verschiedenen Estradiolkonzentrationen ( $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  und  $10^{-11}$  mol/l) bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach erfolgte wie beschrieben die Adhäsion an die mit Kollagen beschichtete Platte und die anschließende Messung der Fluoreszenz. Abbildung 22 zeigt die Anzahl der durchschnittlich gebundenen Thrombozyten in Relation zur eingesetzten Konzentration von  $17\beta$ -Estradiol. Es zeigt sich bei der statistischen Auswertung (Friedman Two-Way Anova), dass Östrogen die Thrombozytenfunktion signifikant ( $p < 0,0001$ ) verändert. Es kommt zu einer Verminderung der gebundenen Thrombozyten. Ein statistischer Unterschied zwischen den verschiedenen Östrogenkonzentrationen ließ sich nicht zeigen.

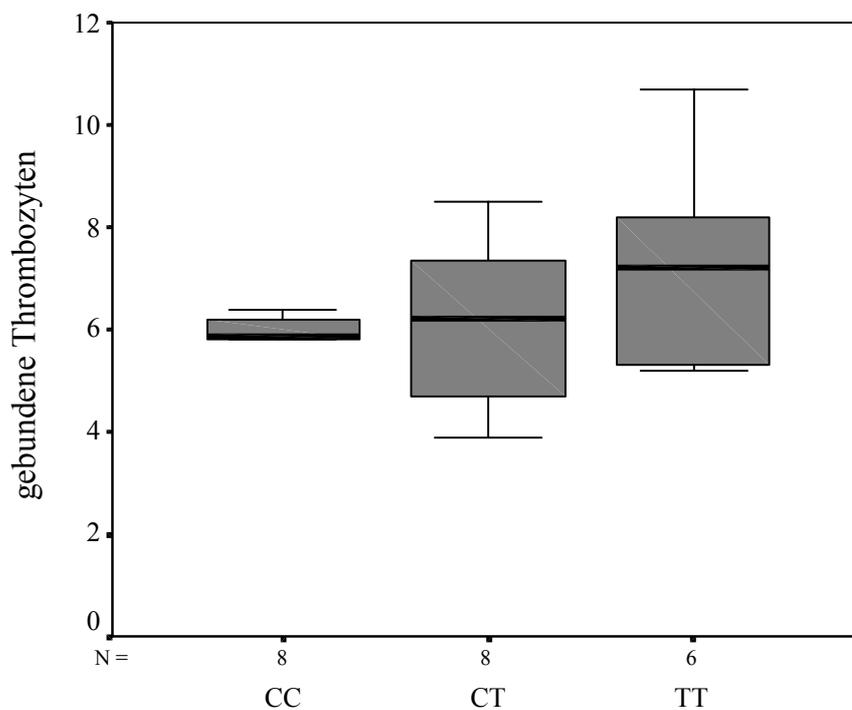


**Abbildung 22: Effekt von 17β-Estradiol (E<sub>2</sub>) auf die Adhäsion gewaschener Thrombozyten an Kollagen (5 µg/ml).**

Die Zugabe von Estradiol inhibiert die Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen ( $p < 0,001$ )  
Balken zeigen Mittelwerte (N=22), Fehlerbalken weisen den Standardfehler des Mittelwerts aus.

### 5.3.5 Einfluss des Integrin $\alpha_2\beta_1$ C<sub>807</sub>T-Dimorphismus auf die Thrombozyten-Adhäsion

Die Adhäsion gewaschener Thrombozyten an Kollagen wurde gemessen und im Hinblick auf einen möglichen Einfluss des  $\alpha_2\beta_1$  C<sub>807</sub>T-Dimorphismus auf die Bindungsfähigkeit der Thrombozyten an Kollagen ausgewertet. Die Abbildung 23 gibt das Ergebnis der Adhäsionsuntersuchung aufgeschlüsselt nach Genotypen wieder. Die statistische Auswertung mit dem Kruskal-Wallis Test ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.



**Abbildung 23: Adhäsion gewaschener Thrombozyten an Kollagen (5 µg/ml) in Abhängigkeit vom  $\alpha_2\beta_1$  C<sub>807</sub>T-Dimorphismus.**

Das Box-Plot Diagramm gibt den Median (schwarzer Balken) und die Minima (⊥) und Maxima (⊓) der gebundenen Thrombozyten ( $\cdot 10^5$ ) wieder.

## 6 Diskussion

In dieser Studie wurden gesunde weibliche und männliche Blutspender auf Polymorphismen der Thrombozyten-Rezeptoren für Fibrinogen und Kollagen genotypisiert. Der Einfluss dieser Polymorphismen auf die Thrombozytenfunktion wurde in Versuchen zu Aggregation und Adhäsion untersucht. Weiter war die Wirkung von Östrogen *in vitro* auf die Thrombozytenfunktion im Zusammenhang mit Rezeptorpolymorphismen Gegenstand dieser Arbeit.

Es herrscht derzeit ein großer Klärungsbedarf über die Rolle verschiedener Polymorphismen von Thrombozyten-Oberflächenrezeptoren als prädisponierende Faktoren für plaquetäre Hyperreaktivität und ihre Wichtigkeit als Risikofaktoren in der Entwicklung von Arteriosklerose.

### 6.1 Polymorphismen des Fibrinogen-Rezeptors und ihr Einfluss auf die Thrombozytenfunktion

Die meisten akuten koronaren Ereignisse resultieren aus der Bildung von plättchenreichen Thromben nach der Rupturierung einer arteriosklerotischen Plaque (Fuster et al., 1999). Die Thrombozytenaggregation erfolgt über die Bindung von Fibrinogen an die aktivierte Form des Thrombozyten Fibrinogen-Rezeptors, dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Glykoprotein IIb/IIIa). Plättchenadhäsionsmoleküle sind polymorph. Der HPA-1 Polymorphismus auf dem  $\beta_3$  Integrin ist seit langer Zeit im Gespräch als Risikofaktor für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit. Im Jahre 1996 berichtete eine Fall-Kontroll-Studie von einer höheren Prävalenz des HPA-1b Phänotyp bei Patienten mit KHK im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Weiss et al., 1996). Seitdem wurden sowohl Studien publiziert, die diese Beobachtung stützen als auch Untersuchungen, die dieses Ergebnis nicht bestätigen konnten.

Zu diesen Beobachtungen stellt sich die Frage, ob der Polymorphismus von  $\beta_3$  direkte funktionelle Konsequenzen hat und welche Mechanismen für das möglicherweise erhöhte Risiko der HPA-1b Träger verantwortlich sind. In verschiedenen Ansätzen wurde ein möglicher Einfluss des Polymorphismus auf die Thrombozytenfunktion untersucht. Allerdings sind auch die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen sehr heterogen. Sehr häufig wurde die Thrombozyten-Aggregation auf einen Einfluss des HPA-1 Polymorphismus hin untersucht.

### **6.1.1 Kann die Aggregationsmessung funktionelle Unterschiede hervorgerufen durch den HPA-1 Polymorphismus erfassen?**

Das gängigste Verfahren zur Testung der Aggregabilität von Blutplättchen ist die Aggregationsmessung nach Born (Born, 1964). Die Plättchenaktivierung und die darauf folgende Aggregation kann durch viele Agonisten z. B. ADP, Epinephrin, Thrombin oder Kollagen ausgelöst werden.

In einer großen Untersuchung wurden 1999 im Rahmen der *Framingham Offspring Study* die Thrombozyten von 1422 Testpersonen mit Epinephrin beziehungsweise ADP stimuliert. Es wurde die Schwellenkonzentration des Agonisten bestimmt, bei der eine mindestens 50prozentige Aggregation zu beobachten war. Dieser Wert stellt ein Maß für die Aggregabilität der Thrombozyten dar. Es zeigte sich, dass bei einer Stimulation mit Epinephrin die Gruppe der HPA-1b heterozygoten und homozygoten Individuen im Vergleich zu HPA-1a homozygoten eine niedrigere Schwellenkonzentration aufwies. Die gleiche Auswertung hinsichtlich der ADP induzierten Aggregation ließ keinen signifikanten Unterschied erkennen (Feng et al., 1999).

In der Zusammenschau verschiedener Experimente wurden Plättchen von HPA-1b positiven Individuen in ihrer Reaktion auf Agonisten der Aggregation beschrieben als: sensibler (Michelson et al., 2000 und Theodoropoulos et al., 2001), ebenso sensibel (Cadroy et al., 2001; Bennett et al., 2001 und Corral et al., 1997) oder weniger sensibel (Lasne et al., 1997) verglichen mit Blutplättchen von HPA-1a Trägern.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Plättchenaggregation durch den Agonisten ADP induziert. Es wurden zwei verschiedene Ansätze benutzt. Zum einen wurde für jedes Individuum die Schwellenkonzentration von ADP bestimmt, bei der eine mindestens 60prozentige Aggregation ausgelöst werden konnte (Feng et al., 1999), zum anderen wurde die durch zwei gebräuchlichen ADP-Konzentrationen (2,5  $\mu$ M und 5 $\mu$ M) erzeugte Thrombozytenaggregation gemessen (Cadroy et al., 2001). Die Auswertung bezüglich des HPA-1 Polymorphismus ließ keinen Unterschied in der Aggregabilität der Thrombozyten erkennen.

Auch bei der Benutzung des Agonisten Epinephrin war kein HPA-1 assoziierter Effekt auf die Aggregation zu beobachten gewesen.

Was für mögliche Ursachen gibt es für derart heterogene Ergebnisse? Es handelt sich bei der Aggregometrie zwar um eine sehr weit verbreitete und gebräuchliche Methode zur Funktionsuntersuchung von Thrombozyten, aber es gibt eine große Menge von Variablen, die die Aggregationsmessung zu beeinflussen vermögen oder zumindest die Vergleichbarkeit der verschiedenen Untersuchungen einschränken.

Grundlegend für die Vergleichbarkeit der verschiedenen Funktionsstudien ist die Zusammensetzung und Größe der Spenderpopulation. So unterscheiden sich die Untersuchungen in der Herkunft der untersuchten Individuen und auch in der Wahl des Geschlechts. In manchen Studien wurden bewusst nur Männer oder Frauen in die Studie eingeschlossen (Cadroy et al., 2001), in anderen auch beide Geschlechter gemeinsam betrachtet (Michelson et al., 2000). Ob das Geschlecht einen Einfluss auf die in der turbimetrischen Aggregationsmessung erfasste Thrombozytenfunktion hat, ist nicht eindeutig geklärt (Haque et al., 2000). Deutlich ist der Unterschied in der Größe der untersuchten Population und speziell in der Anzahl der getesteten HPA-1b homozygoten Spender. Bei den meisten Untersuchungen wurden 20 bis 100 Individuen untersucht, lediglich im Rahmen der *Framingham Offspring Study* war ein großes Kollektiv von über 1400 Individuen Gegenstand der Untersuchung. Thrombozyten mit dem Phänotyp HPA-1bb waren wegen der geringeren Prävalenz des HPA-1b Phänotyps oft nicht verfügbar (Cadroy et al., 2001 und Theodoropoulos et al., 2001).

Die Genfrequenzen für die Allele des HPA-1 Polymorphismus unterscheiden sich in verschiedenen ethnischen Gruppen (Mojaat et al., 1999). In der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte ergeben sich die Genfrequenzen 0,85 für HPA-1a und 0,15 für HPA-1b. Dies stimmt überein mit den in der Literatur beschriebenen Genfrequenzen 0,82-0,88 (HPA-1a) und 0,18-0,12 (HPA-1b) in der kaukasischen Bevölkerung. Die Untersuchung von Cadroy und Mitarbeitern (Cadroy et al., 2001) in Südfrankreich an zufällig ausgewählten männlichen weißen Probanden ergab dagegen eine Genfrequenz von 0,25 für HPA-1b. Entweder liegt dieser Unterschied in der Population dieser Region begründet oder durch die kleine Stichprobe ( $n = 40$ ) kam es zu einer verzerrten Darstellung der Genotypverteilung.

Natürlich vermindert ein derartiger Unterschied die Vergleichbarkeit bei einem realen Unterschied in der Verteilung der Genotypen. In einem solchen Fall wäre es denkbar, dass in dieser Population ein weiterer Faktor, zum Beispiel ein anderer Polymorphismus eines Thrombozytenrezeptors die Entwicklung dieser Verteilung begünstigt hat und auch die Funktion der Blutplättchen beeinflusst.

Das Alter der Probanden beeinflusst die Reaktion der Thrombozyten auf die Zugabe des Agonisten (Vilen et al., 1989), weshalb in dieser Arbeit auf eine in den verglichenen Gruppen sich entsprechende Altersverteilung geachtet wurde.

Äußere Einflüsse wurden in allen Untersuchungen versucht so gering wie möglich zu halten. Allen Studien ist gemein, dass die Probanden mindestens 10 Tage vor der Blutentnahme keine Medikamente eingenommen hatten, die die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen. Weitere Faktoren wie Rauchen, Technik der Blutentnahme und Zeit bis zur Verarbeitung der Probe haben Einfluss auf die Thrombozytenfunktion. Rauchen ist ein bewiesener Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (Übersicht: Ambrose & Barua, 2004), der unmittelbare Effekt auf Thrombozyten ist allerdings nur ungenau bekannt. Speziell unter welchen Bedingungen Rauchen einen Einfluss auf die *in vitro* Plättchenfunktion hat ist nur unzureichend erforscht (Brockmann et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit hatten rauchende Probanden am Tag der Blutentnahme noch nicht geraucht. Vergleichbare Funktionsstudien verfahren ebenso (Cadroy et al., 2001 und Theodoropoulos et al., 2001) oder aber testeten ausschließlich Nichtraucher (Frey et al., 2003). Die hier benutzte Technik der Blutentnahme ohne langes Stauen entspricht den anerkannten Standards für Thrombozyten-Funktionstests; die sofortige Verarbeitung der Probe war gewährleistet.

Eine weitere Variable des Aggregationstest ist der verwendete Agonist. Die am häufigsten verwendeten Agonisten der Thrombozytenaggregation waren ADP und Epinephrin. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde vor allem ADP benutzt, ein starker Agonist der Aggregation, der eine gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse gewährleistet. Bei der Verwendung von Epinephrin reagierte eine beträchtliche Zahl von Probanden nicht oder nicht adäquat auf den Stimulus. Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen über das Auftreten von so genannten *Non-Responders* in der gesunden Bevölkerung (Choi, 2002). Die genaue Ursache dieses Phänomens ist unklar.

Die Ergebnisse der Aggregationsversuche mit Epinephrin dieser Arbeit sind, ob der kleinen Fallzahl und eines möglichen Selektionsfehlers durch die *Non-Responders*, sicherlich mit Vorsicht zu interpretieren.

Nach der Wahl des Agonisten spielt auch eine Rolle wie die Aggregabilität definiert wird. Das übliche Vorgehen bei der Messung der Thrombozytenaggregation im Aggregometer besteht darin, die zu testenden Thrombozyten mit ADP in einer Konzentration zwischen 1  $\mu$ M

und 10  $\mu\text{M}$  zu stimulieren. Es wurden zwei verschiedene ADP Konzentrationen verwendet, eine niedrige (2,5  $\mu\text{M}$ ) und eine mittlere (5  $\mu\text{M}$ ) Konzentration, um die Aggregation zu induzieren. Mit der Idee dass vor allem bei höheren Konzentrationen ein geringer Unterschied in der Empfindlichkeit auf einen Aggregationsreiz überdeckt werden kann, titrierten einige Arbeitsgruppen den Agonisten, um die Schwellenkonzentration zu bestimmen mit der eine definierte Aggregationsantwort zu erreichen war (Feng et al., 1999).

Andere Arbeitsgruppen untersuchten immer nur auf jeweils eine Weise die Aggregation in Abhängigkeit vom HPA-1 Polymorphismus. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Versuchsansätze benutzt, um auch einen möglichen methodischen Effekt zu untersuchen. Es ließ sich jedoch beide Male kein Unterschied in der Reaktion von HPA-1b zu HPA-1a Trägern feststellen.

Die turbimetrische Thrombozytenaggregometrie wird weiterhin der Standard unter den Thrombozyten-Funktionstests bleiben. Allerdings scheinen die üblicherweise benutzten Agonisten-Konzentrationen nicht optimal zu sein für die Erkennung von Blutplättchenhyperreagibilität. Der einzige signifikante HPA-1 abhängige Unterschied der Thrombozytenaggregation war bei Benutzung einer geringen Epinephrin-Konzentration beziehungsweise Bestimmung der Schwellenkonzentration für Epinephrin zu erkennen. Blutplättchen zeigen in ihrer Aktivierung eine Alles-oder-Nichts Reaktion (Frojmovic et al., 1994), was erklären könnte, warum bei der Benutzung starker Agonisten oder hoher Konzentrationen schwacher Agonisten ein möglicher HPA-1b abhängiger Unterschied nicht zu erkennen ist. Eine andere Einschränkung der traditionellen optischen Aggregationsmessung ist, dass sie nur so genannte Makroaggregate bestehend aus wenigstens 100 Plättchen zu detektieren vermag (Thompson et al., 1986), somit also Unterschiede in der Formierung von Mikroaggregaten nicht erkannt werden.

### 6.1.2 Thrombozytenaktivierung und andere Funktionsuntersuchungen

Als Folge der inkohärenten Ergebnisse der Aggregations-Untersuchungen versuchten viele Arbeitsgruppen mit anderen Testsystemen einem möglichen Einfluss des HPA-1 Polymorphismus auf die Blutplättchenfunktion auf die Spur zu kommen (Andrioli et al., 2000; Bennett et al., 2001; Cadroy et al., 2001; Michelson et al., 2000; Vijayan et al., 2000). Es fanden sowohl Testsysteme Verwendung, die ähnlich wie der Aggregationstest die globale Thrombozytenfunktion erfassen, als auch Methoden die sehr spezifisch die Interaktion von Fibrinogen mit dem Fibrinogenrezeptor untersuchen.

Bei der Prüfung der Thrombusformation in Vollblut durch Messung der Verschlusszeit im PFA-Instrument konnten Bennett und Kollegen (2001) keinen Unterschied zwischen HPA-1a und HPA-1b Blutplättchen feststellen. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Cadroy und Mitarbeitern (2001), die beschrieben, dass Individuen homozygot für HPA-1a eine längere Verschlusszeit, bei Induktion mit Kollagen-Epinephrin, als HPA-1b Träger hatten. Bei Induktion mit Kollagen-ADP aber war die Verschlusszeit bei HPA-1a homozygoten Testpersonen kürzer. Wurde das an ADP stimulierte Thrombozyten gebundene Fibrinogen gemessen, so fand eine Arbeitsgruppe (Michelson et al., 2000) eine verstärkte Fibrinogenbindung bei Thrombozyten mit dem HPA-1b Phänotyp, während eine andere Gruppe (Bennett et al., 2001) keinen derartigen Unterschied feststellen konnte.

Die Plättchen-Thrombusformation war erhöht bei HPA-1a homozygoten Individuen im Vergleich zu HPA-1ab heterozygoten Individuen, wenn Vollblut in einer Perfusionskammer über ein *tissue factor* beschichtetes Deckglas mit einer moderaten Schergeschwindigkeit ( $650^{-5}$ ) geleitet wurde. Unter anderen Flussbedingungen gab es keine Unterschiede in der Thrombusformation hinsichtlich des HPA-1 Polymorphismus (Cadroy et al., 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nach einem Testsystem gesucht, welches möglichst selektiv die Funktion des Fibrinogenrezeptors wiedergibt. Im stationären Adhäsionstest adhären unstimulierte Plättchen an auf eine Oberfläche gebundenes Fibrinogen und es kommt in Folge zum *spreading* und irreversibler Bindung der Plättchen (Savage & Ruggeri, 1991). Bei diesem Versuchsaufbau erfolgt sowohl der primäre Kontakt als auch die Bindung an den Liganden Fibrinogen mittels des Fibrinogenrezeptors  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Im Gegensatz zum Aggregationstest, in dem Agonisten eine Thrombozytenaktivierung bewirken und darauf die Bindung von Fibrinogen an aktiviertes Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  erfolgt, handelt es sich

beim statischen Adhäsionstest um einen ligandaktivierten Prozess. Der Vorteil einer Aktivierung durch den Liganden selbst ist, dass so zuvorderst die Funktion des Fibrinogenrezeptors beurteilt werden kann, da über ihn alle entscheidenden Schritte ablaufen, sowohl initiale Adhäsion und Aktivierung, als auch die Bindung. Somit haben Aggregations- und Adhäsionstest zwar eine gemeinsame Endstrecke, die Bindung an Fibrinogen, die vorausgehenden Schritte sind allerdings nicht vergleichbar. Bei der Aggregation bindet ADP an eigene Rezeptoren, spezifische G-Proteine (siehe Kapitel 2.1.3; Tabelle 1), und über als PARs (*G protein-linked protease-activated receptors*) bezeichnete Moleküle erfolgt die Transduktion des Signals. Innerhalb der Thrombozyten kommt es zur Bildung von *second messengers* (Sambrano et al., 2001) und dadurch zur Aktivierung. Jeder einzelne Schritt dieser Signalkette hat Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung und damit die Aggregabilität. In einer Aggregationsstudie (Fontana et al., 2003) wurde der polymorphe ADP Rezeptor P2Y<sub>12</sub> untersucht. Der Haplotyp H2 ist mit einer erhöhten Aggregabilität der Thrombozyten bei Induktion der Aggregation durch ADP assoziiert. Ebenso sind Varianten der Signalenzyme Phospholipase C (Cartwright et al., 1994) und Phospholipase A (Rendu et al., 1987) bekannt, die mit einer veränderten Aggregabilität der Thrombozyten einhergehen. Dies bedeutet, die bekannte Variabilität der Aggregationsantwort von Plättchen verschiedener Spender, kann auch in Unterschieden der an der Aktivierung beteiligten Enzyme begründet liegen.

Wird die Adhäsionsfähigkeit von ruhenden Blutplättchen im statischen Adhäsionstest untersucht, entfällt die oben beschriebene Signaltransduktion und es wird möglich eine bessere Aussage über die Funktion des Fibrinogenrezeptors zu treffen. So wurden bei Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie, einem qualitativen und/oder quantitativen Defekt des  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Integrins mit fehlender Thrombozytenaggregation, Mutationen von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  nachgewiesen, die unabhängig von der Rezeptorzahl mit einer verminderten Adhäsion an gebundenes Fibrinogen einhergehen (Grimaldi et al., 1998). Die Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen erfasst dem zu Folge funktionelle Unterschiede verursacht durch Mutationen des  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Gens. Unsere Ergebnisse zeigten (Kapitel 5.3.3) in der Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen keinen Unterschied zwischen HPA-1a und HPA-1b positiven Blutplättchen.

In einer vergleichbaren Studie (Andrioli et al., 2000) konnte gezeigt werden, dass nicht nur ruhende Thrombozyten sondern auch mit ADP oder Thrombin stimulierte Blutplättchen beider Phänotypen gleichermaßen im Adhäsionstest reagierten. Allerdings zeigten HPA-1b

Plättchen im Vergleich mit HPA-1a positiven Thrombozyten eine geringere Adhäsion bei Simulation mit Arachidonsäure oder Thromboxan A<sub>2</sub>.

Einige Arbeitsgruppen versuchten die Schwierigkeiten der Beschaffung HPA-1b homozygoter Spender, die schließlich nur 2% der Population ausmachen (Mojaat et al., 1999), zu umgehen und wählten stabile  $\alpha_{IIb}\beta_3$  überexprimierende Zelllinien für ihre Funktionsuntersuchungen. Ein weiterer Vorteil sei, dass Faktoren wie Alter, Geschlecht, Rauchen oder andere unbekannte die Thrombozytenfunktion beeinflussenden Faktoren in einem Testsystem mit Transfektanten wegfallen und gezielt der Fibrinogenrezeptor untersucht wird (Vijayan et al., 2000). Aber auch die mit diesem Ansatz gewonnenen Ergebnisse sind widersprüchlich. Vijayan und Kollegen (2000) finden bei der Bindung von löslichem Fibrinogen an transfizierte *chinese hamster ovary* (CHO) Zellen keinen Unterschied zwischen HPA-1a beziehungsweise HPA-1b exprimierenden Zellen. Sie beobachten aber eine verstärkte Adhäsion der HPA-1b exprimierenden CHO-Zellen an immobilisiertes Fibrinogen. In vergleichbaren Experimenten mit humanen EBV transformierten B-Lymphozyten wurden keine Unterschiede zwischen HPA-1a und HPA-1b exprimierenden Zellen gefunden (Bennett et al., 2001).

### 6.1.3 Bedeutung des HPA-1 Polymorphismus als kardiovaskulärer Risikofaktor

Die Bildung eines Thrombus *in vivo* ist ein sehr komplexes Geschehen, das beeinflusst ist von vielen Faktoren, darunter die Gefäßumgebung, Flussgeschwindigkeit und die Reagibilität der Thrombozyten (Fuster et al., 1999). Deshalb ist es nicht überraschend, dass die Bedeutung eines einzelnen Faktors, so wie des Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Polymorphismus verantwortlich für das HPA-1 System, als Risikofaktor für koronare Herzerkrankung und Thrombose unsicher ist. Wenn das Vorliegen des HPA-1b Phänotyps direkt die Formation von koronaren Thromben beeinflusst, sollte sich dies auch in einem messbaren Effekt auf die Funktion der Thrombozyten widerspiegeln (Bennet et al., 2001).

Der Aufbau der vorliegenden *in vitro* Studie erlaubt keine direkte Aussage, ob der HPA-1b Phänotyp klinisch relevant ist oder nicht, da die untersuchte Population ausschließlich aus gesunden Testpersonen bestand und nur ein Teil der für die Bildung von Thromben verantwortlichen Mechanismen beleuchtet wird. Dennoch vermögen die erhobenen Daten helfen zu einem besseren Verständnis der molekularen Pathophysiologie des kardiovaskulären Risikos des HPA-1 Phänotyps zu gelangen.

In der vorliegenden Arbeit wurde analysiert ob der HPA-1 Polymorphismus einen Einfluß hat auf zwei bedeutende Thrombozytenfunktionen, die Adhäsion und die Aggregation. Die gewonnenen Ergebnisse unterstützen nicht die Hypothese der Hyperreagibilität des HPA-1b Phänotyp als möglichen kardiovaskulären Risikofaktor.

Die  $\beta_3$  Integrin-Untereinheit ist auch Teil des Vitronektin Rezeptors  $\alpha_v\beta_3$ , der in geringer Zahl auf Thrombozyten vorkommt und eine Adhäsion an Osteopontin (OPN) oder Vitronektin (VN) beschichtete Oberflächen vermitteln kann (Bennett et al., 1997). Es ist also auch denkbar, dass eine Störung von  $\alpha_v\beta_3$  verantwortlich sein könnte für die Assoziation von HPA-1b mit erhöhtem Infarktisiko. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Anwesenheit von HPA-1b keinen Effekt hat auf die Adhäsion von  $\alpha_v\beta_3$  an OPN oder VN. Dies deutet darauf hin, dass das HPA-1b die Funktion des  $\alpha_v\beta_3$  Integrin auch nicht beeinflusst (Bennett et al., 2001).

Die Entwicklung der Arteriosklerose ist ein multifaktorielles Geschehen. Die vielen bekannten Risikofaktoren lassen sich in zwei Gruppen einteilen: (1) die Faktoren, die nachweislich ursächlich beteiligt sind, und (2) jene Faktoren die mit kardiovaskulärem Risiko assoziiert sind, aber für die noch nicht oder nicht eindeutig ihre ursächliche Wirkung bewiesen ist (Yusuf et al., 2001(a)). Eben in der zweiten Gruppe lassen sich auch Faktoren

finden, deren Bedeutung als Risikofaktor für sich allein genommen nicht sehr groß ist, die erst in Kombination mit anderen Faktoren eine Rolle spielen.

Am Beispiel einer Familie mit einer auffallenden Anamnese von kardiovaskulären Ereignissen in jungen Jahren untersuchten Pontiggia und Mitarbeiter (2002) den kombinierten Einfluss von zwei *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs), HPA-1 Polymorphismus und den  $\alpha_2$  C807T Polymorphismus des Kollagenrezeptors. Bei Patienten homozygot für HPA-1b und für 807T konnte eine signifikant erhöhte prokoagulatorische Plättchenaktivität festgestellt werden.

In einer anderen Studie wurde die Auswirkung eines Polymorphismus in der Signalkette der Thrombozytenaktivierung untersucht. Der C825T Polymorphismus des GNB3 Gens, kodiert für die  $\beta_3$  Untereinheit eines G-Proteins, das die Signalübertragung vom Adrenorezeptor  $\alpha_{2A}$  vermittelt (Richardson & Robishaw, 1999). Personen mit dem 825CC Genotyp hatten eine verstärkte Plättchenaggregation gegenüber Trägern des 825T Allels. Dieser Effekt war noch ausgeprägter, bei HPA-1b Trägern zu beobachten. Der HPA-1 Polymorphismus allein jedoch war mit keiner Änderung der Thrombozytenaggregation assoziiert (Frey et al., 2003). Diese Befunde zeigen, dass zwei genetische Marker synergistisch zu einer erhöhten Plättchenaggregation beitragen zu vermögen, und kleine Funktionsunterschiede verursacht durch nur einen Faktor eventuell erst in der Kombination detektierbar werden.

Wegen der Komplexität der Integrinrezeptoren kann nicht ausgeschlossen werden, dass der HPA-1 Polymorphismus eventuell noch unbekannte Auswirkungen auch auf die Funktion des  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Rezeptors hat. Durch Kristallgitter-Strukturanalysen lassen sich neue Erkenntnisse über den Molekulaufbau gewinnen. Die PSI Domäne des Integrin  $\beta_3$ , beteiligt an der Integrin Aktivierung (Honda et al., 1995) beinhaltet den HPA-1 Polymorphismus. Es gibt Hinweise, dass dieser Aminosäureaustausch an Stelle 33 des Moleküls eine Konformationsänderung bewirkt, die möglicherweise einen Einfluss auf die Integrinaktivierung hat (Xiong et al., 2004).

Neben den vielen Funktionsuntersuchungen zum Thema der Beeinflussung der Thrombozytenfunktion durch den HPA-1 Polymorphismus wurden seit der initialen Assoziationsstudie (Weiss et al., 1996) eine Vielzahl von Studien durchgeführt, die die Rolle von HPA-1b Phänotyp als Risikofaktor für die Entwicklung von KHK untersuchten. Drei Meta-Analysen, die sich mit den zu dieser Fragestellung durchgeführten Studien beschäftigten kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Eine 34 Studien einschließende Meta-Analyse kam zu folgender Schlussfolgerung: Es gibt eine Assoziation zwischen HPA-1b und allgemeinem kardiovaskulären Risiko aber diese ist

in der Normalbevölkerung sehr schwach ausgeprägt. Hingegen in weniger heterogenen Gruppen, speziell Kohorten mit jüngeren Patienten oder in Untersuchungen über die Restenoserate nach Stentimplantation scheint die Assoziation stärker zu sein (Di Castelnuovo et al., 2001).

Die Auswertung von 12 Studien nach der semiparametrischen Bayes'schen Methode lässt eine Assoziation zwischen HPA-1b und Risiko für koronare Herzerkrankung erkennen (Burr et al., 2003). Wohingegen eine weitere Meta-Analyse von 26 Studien aus dem Zeitraum von 1996-1999 keine Assoziation findet zwischen HPA-1b und erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Myokardinfarktes (Zhu et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Rolle des HPA-1 Polymorphismus als kardiovaskulärer Risikofaktor ob derartig differierender Ergebnisse fraglich ist. Lediglich in weniger heterogenen Subgruppen und speziellen Kohorten scheint die Assoziation stärker zu sein. Zumal eine Reihe von Risikofaktoren bekannt sind, die eindeutigere Marker für das individuelle kardiovaskuläre Risiko sind (Yusuf et al., 2001(a)), ist zum derzeitigen Zeitpunkt eine HPA-1 Typisierung zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos in der Allgemeinbevölkerung nicht sinnvoll (Zhu et al., 2000).

## 6.2 Einfluss von $\alpha_2$ Polymorphismen auf die Thrombozytenfunktion

Am Ort einer Endothelläsion kommt kollagenreiche extrazelluläre Matrix mit dem Blutstrom und damit den zirkulierenden Blutplättchen in Kontakt. Das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  vermittelt die Thrombozytenadhäsion an Kollagen. Durch Sequenzanalysen des  $\alpha_2$  Genes wurden stumme (Kunicki et al., 1997) und nicht stumme (Santoso et al., 1993) Polymorphismen gefunden, die verantwortlich sind für strukturelle und funktionelle Änderungen des Rezeptors und für die Variabilität der Rezeptoranzahl auf der Thrombozytenoberfläche (Kunicki et al., 1997). Die unterschiedliche Expression von Integrin  $\alpha_2\beta_1$  auf der Thrombozytenoberfläche bei gesunden Individuen ist wie schon beschrieben (Kapitel 2.3.2), vor allem von den vier Allelen des  $\alpha_2$  Genes (Santoso et al., 1999(a)) abhängig. Angesichts der Bedeutung von Integrin  $\alpha_2\beta_1$  in der primären Hämostase (siehe auch Kapitel 2.1.3) scheint es logisch, dass genetische Unterschiede dieses Rezeptors das Risiko für KHK und akuten Infarkt zu beeinflussen vermögen. In mehreren Studien zeigte sich das 807T Allel des  $\alpha_2$  Gens assoziiert mit einem erhöhten Risiko für akute Koronarischämien, speziell bei Rauchern und Diabetikern (Moshfegh et al., 1999; Kroll et al., 2000; Roest et al., 2000). Weitere Untersuchungen fanden das 807T Allel überrepräsentiert bei jungen Patienten mit Myokardinfarkt und Schlaganfall (Santoso et al., 1999(b); Carlsson et al., 1999). Allerdings konnten andere Studien keine Korrelation zwischen der Anwesenheit des 807T Allels und erhöhtem Risiko akuter Thrombusbildung feststellen (Croft et al., 1999; Morita et al., 2001; Mikkelsen et al., 2002). Darüber hinaus war der C807T Polymorphismus in zwei großen Studien, in denen Patienten durch Koronarangioplastie mit Stentimplantation behandelt wurden, nicht mit einem erhöhten Risiko post-interventioneller thrombotischer Komplikationen assoziiert (Meisel et al., 2000; von Beckerath et al., 2001).

Für eine verstärkte Thrombenbildung im venösen System, die assoziiert ist mit Polymorphismen von  $\alpha_2\beta_1$ , gibt es keine Anhaltspunkte (Corral et al., 1999; Dinauer et al., 1999). Es ist typisch für die derzeit studierten Adhäsionsmoleküle auf Blutplättchen, dass Risikofaktoren für arterielle Thrombosen keinen Einfluss auf Ereignisse im venösen Stromgebiet zu haben scheinen (Übersicht: Kunicki, 2001).

In einer Reihe von Experimenten wurden Polymorphismen von  $\alpha_2$  auf ihren potentiellen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion hin getestet. Es konnte gezeigt werden, dass  $\alpha_2\beta_1$  durch verschiedene Agonisten, wie Thrombin oder ADP (*inside-outside-signalling*), aktiviert wird. Diese Aktivierung führt zu einer Änderung in der Affinität der Kollagenbindung.

Die Plättchen von Trägern des 807T Allels haben eine erhöhte  $\alpha_2\beta_1$  Rezeptordichte und zeigen verstärkte Adhäsionseigenschaften bei hohen Scherkräften (1500/s) (Kritzik et al., 1998). Bei der Analyse der Thrombozytenaktivierung und Aggregationsantwort nach Stimulation mit Kollagen fanden Corral und Kollegen (1999) keine Unterschiede hinsichtlich des C807T Polymorphismus. Bei Messung mit dem PFA-100 Gerät ließ sich kein C807T abhängiger Unterschied der Verschlusszeit erkennen. Luzak und Kollegen (Luzak et al., 2003) beobachteten eine vermehrte Adhäsion 807T homozygoter Plättchen unter statischen Bedingungen bei Stimulation der Plättchen mit ADP.

In Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindungsfähigkeit gewaschener, ruhender Thrombozyten an Kollagen gemessen. Es ergab sich (Kapitel 5.3.5) eine leichte aber nicht signifikante Tendenz der verstärkten Adhäsion bei Trägern des 807T Allels.

Um Klarheit über die Relevanz der  $\alpha_2$  Polymorphismen als Risikofaktoren zu gewinnen sind große, prospektive epidemiologische Studien nötig. Ebenso müssen zusätzliche *in vitro* Untersuchungen durchgeführt werden, um die funktionelle Bedeutung dieser Polymorphismen zu begreifen und so biologische Erklärungen für die klinischen Ergebnisse anbieten zu können (Übersicht: Kunicki, 2001).

### **6.3 *In vitro* Effekte von 17 $\beta$ -Estradiol auf die Thrombozytenfunktion**

In dieser Arbeit wurde in verschiedenen *in vitro* Experimenten der Effekt von 17 $\beta$ -Estradiol auf die Funktion von Thrombozyten untersucht. Die Inkubation von plättchenreichem Plasma (PRP) mit Estradiol in verschiedenen Konzentrationen zeigte keine Beeinflussung des Aggregationsverhaltens der Thrombozyten (Kapitel 5.2.2, Abb. 13) mit dem Induktor ADP. Die Epinephrin induzierte Aggregation zeigte einen Östrogen abhängigen Effekt lediglich bei der höchsten verwandten Estradiolkonzentration (Kapitel 5.2.4; Abb. 17).

Aber wir konnten eine deutliche Östrogen abhängige Verminderung der Adhäsion gewaschener, ruhender Thrombozyten an Fibrinogen beziehungsweise Kollagen beschichtete Oberflächen beobachten (Kapitel 5.3.2 und 5.3.4; Abb. 19 und 22). Diese Ergebnisse zeigen, in einem genau definierten experimentellen Modell, eine aktive Rolle von Östrogen in der Regulation der Plättchenfunktion.

Die Tatsache, dass Thrombozyten kernlose Zellen sind, aber Effekte durch Östrogene erfahren ließ sich lange Zeit nicht mit den traditionellen, nukleären Mechanismen der Steroidhormonwirkung (Übersicht: Gruber et al., 2002) in Einklang bringen. In den letzten Jahren mehren sich aber die Berichte darüber, dass Östrogene ihre Wirkung nicht nur auf Kernebene mittels Beeinflussung der Transkription ausüben, sondern auch in der Lage sind über alternative Signalwege die Zelle zu beeinflussen (Übersicht: Wehling, 1997). Dieser alternative Signalweg zeichnet sich vor allem durch seine schnelle Antwort aus und wird über die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  beziehungsweise ihnen verwandte Östrogenrezeptoren in der Zellmembran vermittelt (Watson et al., 1999).

Schon lange wird den Östrogenen eine kardioprotektive Wirkung zugeschrieben (Kanel et al., 1976; Bush, 1990 und Barret-Connor, 1997). Die Mechanismen mit denen Östrogene ihre Wirkung auf das kardiovaskuläre System entfalten sind vielfältig und nur unzureichend verstanden (Übersicht: Nathan & Chaudhuri, 1997). Die postulierte anti-arteriosklerotische Wirkung von Östrogen, die sich auch in der Hormonersatztherapie zu zeigen schien (Stampfer et al., 1991), wird in aktuellen Studien (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, 2002; Grady et al., 2002; Hulley et al., 2002; Anderson et al., 2004) zu diesem Thema sehr kritisch betrachtet. Im Vordergrund dieser Kritik stehen thromboembolische Komplikationen, wie sie schon aus epidemiologischen Studien zur Einnahme von oralen Kontrazeptiva (Übersicht: Stadel, 1981; Übersicht: Kujovich, 2004) bekannt waren.

Die Wirkung von Östrogenen auf humane Blutplättchen wurde in einer Reihe von Studien untersucht, die präsentierten Ergebnisse sind allerdings sehr heterogen. Dabei sind zu unterscheiden Untersuchungen der Thrombozytenfunktion bei Personen, die mit oralen Kontrazeptiva (Huch et al., 1987; Saleh et al., 1995; Norris et al., 1996) oder mit Östrogenen zur Hormonersatztherapie (Teede et al., 2001; Thijs et al., 2002) behandelt wurden, von Untersuchungen bei denen den Thrombozyten erst während der funktionellen Untersuchung (Moro et al., 2004; Miller et al., 1995; Bar et al., 2000; Nakano et al., 1998) Östradiol zugegeben wurde. Mit den nicht-genomischen Effekten von Östrogen kam eine neue Dimension der Östrogenwirkung ins Spiel. Deren Einfluss auf das kardiovaskuläre System und die Entwicklung von Arteriosklerose ist Gegenstand neuester Forschung. Thrombozyten, die eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Arteriosklerose und KHK einnehmen (Übersicht: Ruggeri, 2002), sind ein mögliches Ziel der nicht-genomischen Östrogenwirkung. Seitdem bei Blutplättchen die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  nachgewiesen wurden (Jayachandran & Miller, 2003; Khetawat et al., 2000), gelten sie sogar als ideales Studienobjekt für nicht-genomische Effekte von Estradiol (Moro et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche direkte Wirkungen von Östrogen auf die Thrombozytenfunktion untersucht. Die ADP induzierte Aggregation von mit Östrogen behandelten Thrombozyten zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollplättchen der gleichen Spender. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Huch et al., 1987; Miller et al., 1995). In einer Arbeit von Haque und Kollegen (2000) wurde die Thrombozytenaggregation in zwei verschiedenen Geräten registriert. Bei der Messung nach der turbimetrischen Methode, die auch in den vorher beschriebenen Experimenten Verwendung fand, ließ sich kein Einfluss von Östrogen auf die Aggregation erkennen. Unter Verwendung der so genannten *light scattering* Methode, die auch die Größe der gebildeten Aggregate berücksichtigt ließ sich ein inhibierende Wirkung von Östrogen auf die Aggregation nachweisen. Andere Studien zeigen, dass die Zugabe von  $17\beta$ -Estradiol *in vitro* die Thrombozyten-Aggregation, auch nach der turbimetrischen Methode gemessen, vermindert (Nakano et al., 1998; Bar et al., 2000; Boudoulas et al., 2001), aber zum Teil nur unter Verwendung unphysiologisch hoher Hormonkonzentrationen. Die verminderte Aggregation wird durch eine erhöhte NO-Synthese in den mit  $17\beta$ -Estradiol behandelten Thrombozyten erklärt (Nakano et al., 1998).

In einer anderen Arbeit wird die Inhibierung der Aggregation durch Östrogen als abhängig von dem HPA-1 Polymorphismus beschrieben. Boudoulas und Kollegen (2001) beschreiben einen inhibierenden Effekt von Östrogen auf die Thrombozytenaggregation der bei HPA-1b

Trägern stärker ausgeprägt ist. Dieselbe Arbeitsgruppe beschreibt in einer neuen Versuchsreihe allerdings sogar einen proaggregatorischen Effekt von Estradiol auf die Epinephrin induzierte Aggregation für HPA-1a homozygote Thrombozyten (Boudoulas et al., 2006). Allerdings wurden in diesen beiden Arbeiten im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung keine HPA-1b homozygoten Spender untersucht. Wir konnten bei hohen Konzentrationen einen stimulierenden Effekt von Estradiol auf die Aggregation beobachten, ohne allerdings eine Abhängigkeit vom HPA-1 System zu sehen.

In einer weiteren Arbeit zum Einfluss von  $17\beta$ -Estradiol auf die Thrombin induzierte Plättchenaggregation wurde Verstärkung der Aggregation durch  $17\beta$ -Estradiol beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass diese verstärkte Aggregation durch einen Östrogen Rezeptor  $\beta$  abhängigen Prozess mit nachfolgender Phosphorylierung von SRC Kinase und Aktivierung des  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Integrins vermittelt wird (Moro et al., 2004). Zusammenfassend wurde  $17\beta$ -Estradiol keine eindeutige Wirkung auf die Thrombozytenaggregation zugeschrieben. Der Grund für diese Diskrepanz mag darin beruhen, dass verschiedene methodische Ansätze gewählt wurden, einschließlich verschiedener Verfahren der Thrombozytenpräparation (z.B. gewaschene Plättchen, gefilterte Plättchen oder PRP). Die Studien unterscheiden sich in Geschlecht und Alter der Blutspender, der benutzten Östrogenkonzentration und der Dauer der Inkubation der Thrombozyten mit dem verwendeten Östrogen.

Die Adhäsion von Thrombozyten ist der erste Schritt der primären Hämostase. Die primäre Adhäsion führt zur Formveränderung, Spreizung und Aktivierung der adhärenen Blutplättchen mit nachfolgender Sekretion von Granulainhaltsstoffen und Aggregatbildung (Übersicht: Clemetson & Clemetson, 2001; Sixma et al., 1997). Im zweiten methodischen Ansatz dieser Arbeit wurde die Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol auf die Thrombozytenadhäsion untersucht. Im statischen Adhäsionstest hatte Östrogen in physiologischen Konzentrationen eine inhibierende Wirkung auf die Adhäsion von Thrombozyten an Fibrinogen beziehungsweise Kollagen beschichtete Oberflächen. Eine Arbeit, in der ein dynamisches Adhäsionsmodell verwendet wurde, zeigte eine verminderte Adhäsion von *in vitro* mit Östrogen inkubierten Thrombozyten an Fibronectin (Miller et al., 1995). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass  $17\beta$ -Estradiol einen nicht-genomischen Effekt auf die Thrombozytenfunktion hat, der vor allem in den initialen Schritten der Thrombozytenreaktion deutlich wird. Weitere Studien sind nötig, um die Gründe für die zum Teil widersprüchlichen Beobachtungen zu verstehen und die genauen Mechanismen der Beeinflussung der Thrombozytenfunktion durch Östrogene zu klären.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Polymorphismus T<sub>196</sub>C (HPA-1a und HPA-1b) des Fibrinogenrezeptors (Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) und des Polymorphismus C<sub>807</sub>T des Kollagenrezeptors (Integrin  $\alpha_2\beta_1$ ) auf die Thrombozytenfunktion untersucht. Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit war die Prüfung der Wirkung von 17 $\beta$ -Estradiol auf Thrombozyten *in vitro*.

Zu diesem Zweck wurden die Genotypen von 114 Spendern mittels PCR und RFLP bestimmt. Die Thrombozytenfunktion wurde durch zwei verschiedene Testsysteme geprüft. Zur Anwendung kamen ein Verfahren zur Bestimmung der Thrombozytenaggregation und eine Methode zur Testung der Adhäsion von Thrombozyten.

Zur Überprüfung der funktionellen Bedeutung des HPA-1 Polymorphismus wurde die Thrombozytenaggregation in PRP unter Verwendung des Agonisten ADP in den Konzentrationen 2,5  $\mu$ M und 5 $\mu$ M aufgezeichnet. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen HPA-1a und HPA-1b Trägern festgestellt werden. Auch bei der Bestimmung der Schwellenkonzentration von ADP ließ sich keine Abhängigkeit vom HPA-1 Polymorphismus beobachten. Bei der Untersuchung gewaschener, ruhender Thrombozyten im Adhäsionstest ließ sich ebenfalls kein Unterschied in der Fibrinogen-Rezeptor-vermittelten Adhäsion zwischen Thrombozyten von HPA-1a und HPA-1b Trägern nachweisen. Die von einigen Autoren beschriebene prokoagulatorische Aktivität bei HPA-1b Individuen konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Bei Trägern des 807T Allels des  $\alpha_2$  Gens ergab sich eine leichte aber nicht signifikante Tendenz einer verstärkten Adhäsion bei der Messung der Bindungsfähigkeit von Thrombozyten an Kollagen.

Die Inkubation von PRP mit 17 $\beta$ -Estradiol in physiologischen Konzentrationen zeigte keine Beeinflussung des Aggregationsverhaltens der Thrombozyten. Lediglich bei der höchsten verwandten Estradiol-Konzentration kam es zu einer Zunahme der Epinephrin induzierten Aggregation. Wir konnten jedoch eine deutliche Östrogen abhängige Verminderung der Adhäsion von Thrombozyten an Fibrinogen beziehungsweise an Kollagen beschichtete Oberflächen zeigen. Diese Ergebnisse deuten hin auf eine aktive Rolle von Östrogen in der Regulation der Blutplättchenfunktion.

## 8 Summary

In this study the influence of the polymorphisms T<sub>196</sub>C (HPA-1a and HPA-1b) of the fibrinogen receptor (integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) and C<sub>807</sub>T of the collagen receptor (integrin  $\alpha_2\beta_1$ ) on platelet function was analysed. Additionally, we investigated *in vitro* effects of 17 $\beta$ -oestradiol on platelets.

For this purpose we determined the genotypes of 114 donors using PCR and RFLP. Platelet function was tested by two different methods; platelet aggregation and platelet adhesion assays.

To test the functional influence of the HPA-1 polymorphism on platelet aggregation formation, we stimulated platelet rich plasma with the agonist ADP in different concentrations (2.5  $\mu$ M - 5 $\mu$ M). No significant difference in aggregation response between the HPA-1a and HPA-1b phenotype was observed. Similar result was obtained by determining the ADP threshold concentration.

Analysing washed, resting platelets in the adhesion assay using immobilised fibrinogen showed no significant difference between HPA-1a and -1b carriers. Thus, the prothrombotic activity of HPA-1b platelets reported by some authors can not be confirmed by this study.

Carriers of the 807T allele of the  $\alpha_2$  gene showed a light but not significant tendency towards an increased adhesion measuring the binding capacity of platelets on collagen.

Incubation of PRP with 17 $\beta$ -oestradiol in physiologic concentrations did not show an influence on thrombocyte aggregation. Only under the highest used oestradiol concentration we observed an increase of the epinephrine induced platelet aggregation. However, we could not show a clear oestrogen dependent decrease of platelet adhesion onto fibrinogen and collagen. These results indicate an active role of oestrogen in the regulation of platelet function.

## 9 Literaturverzeichnis

**Ambrose JA, Barua RS:** The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:1731-7.

**Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, Bonds D, Brunner R, Brzyski R, Caan B, Chlebowski R, Curb D, Gass M, Hays J, Heiss G, Hendrix S, Howard BV, Hsia J, Hubbell A, Jackson R, Johnson KC, Judd H, Kotchen JM, Kuller L, LaCroix AZ, Lane D, Langer RD, Lasser N, Lewis CE, Manson J, Margolis K, Ockene J, O'Sullivan MJ, Phillips L, Prentice RL, Ritenbaugh C, Robbins J, Rossouw JE, Sarto G, Stefanick ML, Van Horn L, Wactawski-Wende J, Wallace R, Wassertheil-Smoller S; Women's Health Initiative Steering Committee:** Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291:1701-12.

**Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagner DD:** CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism. *Nat Med* 2002; 8:247-52.

**Andrews RK, Berndt MC:** Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* 2004; 114:447-53.

**Andrioli G, Minuz P, Solero P, Pincelli S, Ortolani R, Lussignoli S, Bellavite P:** Defective platelet response to arachidonic acid and thromboxane A<sub>2</sub> in subjects with PI<sup>A2</sup> polymorphism of β<sub>3</sub> subunit (glycoprotein IIIa). *Br J Haematol* 2000; 110:911-8.

**Balter M:** AIDS now world's fourth biggest killer. *Science* 1999; 208:1101.

**Bar J, Lahav J, Hod M, Ben-Rafael Z, Weinberger I, Brosens J:** Regulation of platelet aggregation and adenosine triphosphate release in vitro by 17β-estradiol and medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women. *Thromb Haemost* 2000; 84:695-700.

**Barrett-Connor E:** Sex differences in coronary heart disease: why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation* 1997; 95:252-64.

**Bennett JS, Catella-Lawson F, Rut AR, Vilaire G, Qi W, Kapoor SC, Murphy S, FitzGerald GA:** Effect of the PI<sup>A2</sup> alloantigen on the function of β<sub>3</sub> integrins in platelets. *Blood* 2001; 97:3093-9.

**Bennett JS, Chan C, Vilaire G, Mousa SA, DeGrado WF:** Agonist-activated alpha v beta 3 on platelets and lymphocytes binds to the matrix protein osteopontin. *J Biol Chem* 1997; 272:8137-40.

**Berg J, Tymoczko J, Stryer L, Clarke ND:** *Biochemistry* -5<sup>th</sup> ed. WH Freeman and Company. 2002.

**Bergelson JM, Shepley MP, Chan BM, Hemler ME, Finberg RW:** Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science* 1992; 255:1718-20.

**Beumer S, IJsseldijk MJ, de Groot PG, Sixma JJ:** Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoproteins GP IIb/IIIa and VLA-5, and inhibition by heparin. *Blood* 1994; 84:3724-33.

**Born G:** Aggregation of platelet by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1964; 194:927-9.

**Boudoulas KD, Cooke GE, Roos CM, Bray PF, Goldschmidt-Clermont PJ:** The PIA polymorphism of glycoprotein IIIa functions as a modifier for the effect of estrogen on platelet aggregation. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125:112-5.

**Boudoulas KD, Montague CR, Goldschmidt-Clermont PJ, Cooke GE:** Estradiol increases platelet aggregation in PI(A1/A1) individuals. *Am Heart J* 2006; 152:136-9.

**Bray PF:** Platelet glycoprotein polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Curr Opin Hematol* 2000; 7:284-9.

**Brockmann MA, Beythien C, Magens MM, Wilckens V, Kuehnl P, Gutensohn K:** Platelet hemostasis capacity in smokers. In vitro function analyses with 3.2% citrated whole blood. *Thromb Res* 2001; 104:333-42.

**Burr D, Doss H, Cooke GE, Goldschmidt-Clermont PJ:** A meta-analysis of studies on the association of the platelet PIA polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of coronary heart disease. *Stat Med* 2003; 22:1741-60.

**Bush TL:** The epidemiology of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 592:263-71.

**Cadroy Y, Sakariassen K, Grandjean H, Thalamas C, Boneu B, Sié P:** The effect of platelet PI<sup>A</sup> polymorphism on experimental thrombus formation in man depends on blood flow and thrombogenic substrate. *Thromb Haemost* 2001; 85:1097-103.

**Calvete JJ, Henschen A, Gonzalez-Rodriguez J:** Complete localization of the intrachain disulfide bonds and the N-glycosylation points in the  $\alpha$ -subunit of human platelet glycoprotein IIb. *Biochem J* 1989; 261:561-8.

**Calvete JJ, Schäfer W, Mann K, Henschen A, González-Rodríguez J:** Localization of the cross-linking sites of RGD and KQAGDV peptides to the isolated fibrinogen receptor, the human platelet integrin glycoprotein IIb/IIIa. *Eur J Biochem* 1992; 206:759-65.

**Carlsson LE, Santoso S, Spitzer C, Kessler C, Greinacher A:** The  $\alpha_2$  coding sequence T<sub>807</sub>/A<sub>873</sub> of the platelet collagen receptor integrin  $\alpha_2\beta_1$  might be a genetic risk factor for the development of stroke in younger patients. *Blood* 1999; 93:3583-6.

**Carr ME:** Diabetes mellitus: A hypercoagulable state. *J Diabetes Complications* 2001; 15:44-54.

**Cartwright IJ, Hampton KK, Macneil S, Colvin BT, Preston FE:** A haemorrhagic platelet disorder associated with altered stimulus-response coupling and abnormal membrane phospholipid composition. *Br J Haematol* 1994; 88:129-36.

**Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW:** Estrogen receptor  $\alpha$  mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 1999; 103:401-6.

**Choi JW:** Incidence of nonresponsiveness to epinephrine in platelets from healthy humans. *Acta Haematol* 2002; 108:106-8.

**Clemetson KJ, Clemetson JM:** Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 2001; 86:189-97.

**Corral J, Gonzalez-Conejero R, Rivera J, Ortuno F, Aparicio P, Vicente V:** Role of the 807 C/T polymorphism of the  $\alpha 2$  gene in platelet GP Ia collagen receptor expression and function -- effect in thromboembolic diseases. *Thromb Haemost* 1999; 81:951-6.

**Croft SA, Hampton KK, Sorrel JA, Steeds RP, Channer KS, Samani NJ, Daly ME:** The GPIa C807T dimorphism associated with collagen receptor density is not a risk factor for myocardial infarction. *Br J Haematol* 1999; 106:771-6.

**Deckmyn H, Zhang J, Van Houtte E, Vermylen J:** Production and nucleotide sequence of an inhibitory human IgM autoantibody directed against platelet glycoprotein Ia/IIa. *Blood* 1994; 84:1968-74.

**Del Zoppo GJ:** The role of platelets in ischemic stroke. *Neurology* 1998; 51(suppl 3):9-14.

**Depraetere H, Wille C, Gansemann Y, Stanssens P, Lauwereys M, Baruch D, De Reys S, Deckmyn H:** The integrin  $\alpha 2\beta 1$  (GPIa/IIa)-I-domain inhibits platelet-collagen interaction. *Thromb Haemost* 1997; 77:981-5.

**Di Castelnuovo A, de Gaetano G, Donati MB, Iacoviello L:** Platelet Glycoprotein receptor IIIa polymorphism  $PI^{A1}/PI^{A2}$  and coronary risk: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 2001; 85(4):626-33.

**Dinauer DM, Friedman KD, Hessner MJ:** Allelic distribution of the glycoprotein Ia ( $\alpha 2$ -integrin) C807T/G873A dimorphisms among caucasian venous thrombosis patients and six racial groups. *Br J Haematol* 1999; 107:563-5.

**Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC:** Structural basis of collagen recognition by integrin  $\alpha 2\beta 1$ . *Cell* 2000; 101:47-56.

**Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Peth S, Kopp H, Victor A, Hafner G, Meyer J:** Manifestationen der Atherosklerose in verschiedenen Gefäßregionen. Gemeinsamkeiten und Unterschiede hinsichtlich Epidemiologie, Ätiologie und Prognose. *Med Klein* 2002; 97:221-8.

**Falati S, Patil S, Gross PL, Stapleton M, Merrill-Skoloff G, Barrett NE, Pixton KL, Weiler H, Cooley B, Newman DK, Newman PJ, Furie BC, Furie B, Gibbins JM:** Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood* 2006 ;107:535-41.

**Farrell DH, Thiagarajan P:** Binding of recombinant fibrinogen mutants to platelets. *J Biol Chem* 1994; 269:226-31.

**Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, O'Donnell CJ, Lipinska I, Sutherland PA, Mittleman M, Muller JE, D'Agostino RB, Levy D, Tofler GH:** Platelet glykoprotein IIIa Pl<sup>A</sup> polymorphism, fibrinogen, and platelet aggregability: The Framingham Heart Study. *Circulation* 2001; 104:140-4.

**Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, Schmitz C, Sutherland PA, Silbershatz H, D'Agostino RB, Muller JE, Myers RH, Levy D, Tofler GH:** Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PlA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1142-7.

**Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny JL, Aiach M, Gaussem P:** Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y<sub>12</sub> gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003; 108:989-95.

**Fox JE:** The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost* 1993; 70:884-93.

**French DL, Coller BS:** Hematologically important mutations: Glanzmann thrombasthenia. *Blood Cells Mol Dis* 1997; 23:39-51.

**Frey UH, Aral N, Müller N, Siffert W:** Cooperative effect of GNB3 825C>T and GPIIIa PI(A) polymorphisms in enhanced platelet aggregation. *Thromb Res* 2003; 109:279-86.

**Frojmovic MM, Mooney RF, Wong T:** Dynamics of platelet glycoprotein IIb-IIIa receptor expression and fibrinogen binding. II. Quantal activation parallels platelet capture in stir-associated microaggregation. *Biophys J* 1994; 67:2069-75.

**Fuster V, Fayad ZA, Badimon JJ:** Acute coronary syndromes: biology. *Lancet* 1999; 353(suppl 2):5-9.

**Garlichs CD, John S, Schmeisser A, Eskafi S, Stumpf C, Karl M, Goppelt-Struebe M, Schmieder R, Daniel WG:** Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation* 2001; 104:2395-400.

**Gawaz M:** Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1999; 1. Auflage: 4.

**Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schömig A, Neumann FJ:** Platelets induce alteration of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 2000; 148:75-85.

**Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K:** Activated platelets induce secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998; 98:1164-71.

**George JN, Caen JP, Nurden AT:** Glanzmann's thrombasthenia: The spectrum of clinical disease. *Blood* 1990; 75:1383-95.

**Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N; HERS Research Group:** Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002; 288:49-57.

**Grimaldi CM, Chen F, Wu C, Weiss HJ, Collier BS, French DL:** Glycoprotein IIb Leu214Pro mutation produces glanzmann thrombasthenia with both quantitative and qualitative abnormalities in GPIIb/IIIa. *Blood* 1998; 91:1562-71.

**Gross PL, Aird WC:** The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:463-78.

**Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC:** Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002; 346:340-52.

**Haque SF, Matsubayashi K, Izumu SI, Sugi T, Arai T, Kondo A, Makino T:** Sex difference in platelet aggregation detected by new aggregometry using light scattering. *Endocr J* 2000; 48:33-41.

**Heinrich D, Scharf T, Santoso S, Clemetson KJ, Mueller-Eckhardt C:** Monoclonal antibodies against human platelet membrane glycoproteins IIb-IIIa. Different effects on platelet function. *Thromb Res* 1985; 38:547-59.

**Hemler ME, Elices MJ, Chan BM, Zetter B, Matsuura N, Takada Y:** Multiple ligand binding functions for VLA-2 (alpha 2 beta 1) and VLA-3 (alpha 3 beta 1) in the integrin family. *Cell Differ Dev* 1990; 32:229-38.

**Holtkötter O, Nieswandt B, Smyth N, Müller W, Hafner M, Schulte V, Krieg T, Eckes B:** Integrin  $\alpha_2$ -deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *J Biol Chem* 2002; 277:10789-94.

**Honda S, Tomiyama Y, Pelletier AJ, Annis D, Honda Y, Orzechowski R, Ruggeri Z, Kunicki TJ:** Topography of ligand-induced binding sites, including a novel cation-sensitive epitope (AP5) at the amino terminus, of the human integrin beta 3 subunit. *J Biol Chem* 1995; 270:11947-54.

**Huch KM, Elam MB, Chesney CM:** Oral contraceptive steroid induced platelet coagulation hyperactivity: dissociation of in vivo and in vitro effects. *Thromb Res* 1987; 48:41-50.

**Hulley S, Furberg C, Barrett-Connor E, Cauley J, Grady D, Haskell W, Knopp R, Lowery M, Satterfield S, Schrott H, Vittinghoff E, Hunninghake D; HERS Research Group:** Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002; 288:58-66.

**Humphries MJ, Mould AP:** An anthropomorphic integrin. *Science* 2001; 294:316-7.

**Hynes RO:** Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25.

**Hynes RO:** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110:673-87.

**Jacquelin B, Tarantino MD, Kritzik M, Rozenshteyn D, Koziol JA, Nurden AT, Kunicki TJ:** Alle-dependent transcriptional regulation of the human integrin  $\alpha_2$  gene. *Blood* 2001(a); 97:1721-6.

**Jacquelin B, Rozenshteyn D, Kanaji S, Koziol JA, Nurden AT, Kunicki TJ:** Characterization of inherited differences in transcription of the human integrin  $\alpha_2$  gene. *J Biol Chem* 2001(b); 276:23518-24.

**Jayachandran M, Miller VM:** Human platelets contain estrogen receptor alpha, caveolin-1 and estrogen receptor associated proteins. *Platelets* 2003; 14:75-81.

**Johnson M, Ramey E, Ramwell PW:** Sex and age differences in human platelet aggregation. *Nature* 1975; 253:355-7.

**Joswig M, Hach-Wunderle V, Ziegler R, Nawroth PP:** Postmenopausal hormone replacement therapy and the vascular wall: Mechanisms of 17  $\beta$ -estradiol's effects on vascular biology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107:477-87.

**Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T:** Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med* 1976; 85:447-52.

**Kato K, Kanaji T, Russell S, Kunicki TJ, Furihata K, Kanaji S, Marchese P, Reininger A, Ruggeri ZM, Ware J:** The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood* 2003; 102:1701-7.

**Keely PJ, Parise LV:** The  $\alpha_2\beta_1$  integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase C $\gamma$ 2 in platelets. *J Biol Chem* 1996; 271:26668-76.

**Kehrel B, Balleisen L, Kokott R, Mesters R, Stenzinger W, Clemetson KJ, van de Loo J:** Deficiency of intact thrombospondin and membrane glycoproteine Ia in platelets with defective collagen-induced aggregation and spontaneous loss of disorder. *Blood* 1988; 71:1074-8.

**Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, Farndale RW, Okuma M, Barnes MJ:** Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand Factor do not. *Blood* 1998; 91:491-9.

**Khetawat G, Farady N, Nealen ML, Vijayan V, Bolton E, Noga SJ, Bray PF:** Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor  $\beta$  and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression. *Blood* 2000; 95:2289-96.

**Kong DF, Hasselblad V, Harrington RA, White HD, Tchong JE, Kandzari DE, Topol EJ, Califf RM:** Meta-analysis of survival with platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists for percutaneous coronary interventions. *Am J Cardiol.* 2003; 92:651-5.

**Kritzik M, Savage B, Nugent DJ, Santoso S, Ruggeri ZM, Kunicki TJ:** Nucleotide polymorphisms in the  $\alpha_2$  gene define multiple alleles that are associated with differences in platelet  $\alpha_2\beta_1$  density. *Blood* 1998; 92:2382-8.

**Kroll H, Gardemann A, Fechter A, Haberbosch W, Santoso S:** The impact of the Glycoprotein Ia collagen receptor subunit A<sub>1648</sub>G gene polymorphism on coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2000; 83:392-6.

**Kujovich JL:** Hormones and pregnancy: thromboembolic risks for women. *Br J Haematol* 2004; 126:443-54.

**Kunicki TJ:** The role of platelet collagen receptor (glycoprotein Ia/IIa; Integrin  $\alpha_2\beta_1$ ) polymorphisms in thrombotic disease. *Curr Opin Hematol* 2001; 8:277-85.

**Kunicki TJ:** Of men; why not mice? *Blood* 2004; 103:3251-2.

**Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nugent DJ:** Hereditary variation in platelet integrin  $\alpha_2\beta_1$  density is associated with two silent polymorphisms in the  $\alpha_2$  gene coding sequence. *Blood* 1997; 89:1939-43.

**Kunicki TJ and Newmann PJ:** The biochemistry of the platelet specific antigens. In: *Current studies in hematology and blood transfusion*. A. Hassig, editor. S. Karger, Basel 1986; 18-32.

**Kunicki TJ, Orchewski R, Annis D, Honda Y:** Variability of integrin  $\alpha_2\beta_1$  activity on human platelets. *Blood* 1993; 82:2693-703.

**Languino LR, Gehlsen KR, Wayner E, Carter WG, Engvall E, Ruoslahti E:** Endothelial cells use alpha 2 beta 1 integrin as a laminin receptor. *J Cell Biol* 1989; 109:2455-62.

**Li Y, Woo V, Bose R:** Platelet hyperactivity and abnormal Ca<sup>2+</sup> homeostasis in diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:1480-9.

**Lusis AJ:** Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233-41.

**Lutgens E, Daemen MJ:** CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12:27-32.

**Lutgens E, Lievens D, Beckers L, Donners M, Daemen M:** CD40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17:118-23.

**Luzak B, Golanski J, Rozalski M, Watala C:** Effect of the 807 C/T polymorphism in glycoprotein Ia on blood platelet reactivity. *J Biomed Sci* 2003; 10:731-7.

**Maccarrone M, Bari M, Battista N, Finazzi-Agro A:** Estrogen stimulates arachidonylethanolamide release from human endothelial cells and platelet activation. *Blood* 2002; 100:4040-8.

**Mandell KJ, Parkos CA:** The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57:857-67.

**Matsagas MI, Geroulakos G, Mikhailidis DP:** The role of platelets in peripheral arterial disease: therapeutic implications. *Ann Vasc Sur* 2002; 16:246-58.

**Matsubara Y, Murata M, Handa M, Yamagata N, Watanabe G, Saruta T, Ikeda Y:** Association between diabetic retinopathy and genetic variations in alpha2beta1 integrin, a platelet receptor for collagen. *Blood* 2000; 95:1560-4.

**May AE, Neumann FJ, Preissner KT:** The relevance of blood cell-vessel wall adhesive interactions for vascular thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1999; 82:962-70.

**McNicol A, Israels SJ:** Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res* 1999; 95:1-18.

**Meisel C, Cascorbi I, Herrmann A, Roots I, Laule M, Stangl V, Stangl K:** The platelet glycoprotein Ia C807T polymorphism as risk factor for coronary catheter interventions. *Blood* 2000; 96:2002-3.

**Mendelsohn ME, Karas RH:** The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999; 340:1801-11.

**Metcalf P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, De Haas M, Aster R, Shibata Y, Smith J, Kiefel V, Santoso S:** Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang* 2003; 85:240-5.

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

**Mikkelsson J, Perola M, Penttilä A, Karhunen PJ:** Platelet collagen receptor GPIa (C807T/HPA-5) haplotype is not associated with an increased risk of fatal coronary events in middle-aged men. *Atherosclerosis* 2002; 156:111-8.

**Miller ME, Thorpe SL, Dores GM:** Influence of hormones on platelet intracellular calcium. *Thromb Res* 1995; 77:515-30.

**Mojaat N, Halle L, Proulle V, Hmida S, Ben Hamed L, Boukef K, Kaplan C:** Gene frequencies of human platelet antigens in the Tunisian population. *Tissue Antigens* 1999; 54:201-4.

**Monnet E, Sizaret P, Arbeille B, Fauvel-Lafeve F:** Different role of platelet GP Ia/IIa in platelet contact and activation induced by type I and type III collagens. *Thromb Res* 2000; 98:423-33.

**Morita H, Kurihara H, Imai Y, Sugiyama T, Hamada C, Sakai E, Mori M, Nagai R:** Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and myocardial infarction in Japanese. *Thromb Haemost* 2001; 85:226-30.

**Moro L, Reineri S, Piranda D, Pietrapiana D, Lova P, Bertoni A, Graziani A, Defilippi P, Canobbio I, Torti M, Sinigaglia F:** Non-genomic effects of 17{beta}-estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor {beta} and Src kinase. *Blood* 2005; 105:115-21.

**Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K:** A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest* 1989; 84:1440-5.

**Mosfegh K, Willemin WA, Redondo M, Lämmle B, Beer JH, Liechti-Gallati S, Meyer BJ:** Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *Lancet* 1999; 353:351-4.

**Mosselman S, Polman J, Dijkema R:** ER $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters* 1996; 392:49-53.

**Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Santoso S:** Review and update of platelet alloantigen systems. *Transfus Med Rev* 1990; 4:98-109.

**Müller I, Klocke A, Alex M, Kotsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner KT, Engelmann B:** Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* 2003; 17:476-8.

**Nabulsi AA, Folsom AR, White A, Patsch W, Heiss G, Wu KK, Szklo M:** Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1993; 328:1069-75.

**Nakano Y, Oshima T, Matsuura H, Kajiyama G, Kambe M:** Effect of 17 $\beta$ -estradiol on inhibition of platelet aggregation in vitro is mediated by an increase in NO synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:961-7.

**Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W:** Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997; 100:2680-90.

**Nathan L, Chaudhuri G:** Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:477-515.

**Nealen ML, Vijayan KV, Bolton E, Bray PF:** Human platelets contain a glycosylated estrogen receptor beta. *Circ Res* 2001; 88:438-42.

**Newman PJ, Derbes RS, Aster RH:** The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989; 83:1778-81.

**Newmann PJ, Martin LS, Knipp MA, Kuhn RA:** Studies on the nature of the human platelet alloantigen, PIA1: Localisation to a 17.000-dalton polypeptide. *Mol Immunol* 1985; 22:719-29.

**Nguyen CM, Harrington RA:** Glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists: a comparative review of their use in percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiovasc Drugs* 2003; 3:423-36.

**Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fässler R:** Glycoprotein VI but not  $\alpha 2\beta 1$  integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001; 20:2120-30.

**Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, Sixma JJ:** Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature* 1985; 318:470-2.

**Norris LA, Devitt M, Bonnar J:** The role of thromboxane A<sub>2</sub> in increased whole blood platelet aggregation in oral contraceptive users. *Thromb Res* 1996; 81:407-17.

**Nurden AT, Nurden P:** GPIIb/IIIa antagonists and other anti-integrins. *Semin Vasc Med* 2003; 3:123-30.

**Nussey S, Whitehead S:** *Endocrinology. An integrated approach.* Bios Scientific Publishers Ltd. 2001.

**Patil S, Newman DK, Newman PJ:** Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 serves as an inhibitory receptor that modulates platelet responses to collagen. *Blood* 2001; 97:1727-32.

**Pavao M, Traish AM:** Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection. Localization and analyses of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . *Steroids* 2000; 66:1-16.

**PEPI Trial: The writing group for the PEPI Trial:** Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *JAMA* 1995; 273:199-208.

**Pontiggia L, Lassila R, Pederiva S, Schmid HR, Burger M, Beer JH:** Increased platelet-collagen interaction associated with double homozygosity for receptor polymorphisms of platelet GPIa and GPIIIa. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:2093-8.

**Rao AK:** Congenital disorders of platelet function: disorders of signal transduction and secretion. *Am J Med Sci* 1998; 316:69-76.

**Rauch U, Osende JJ, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH:** Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Int Med* 2001; 134:224-38.

**Reed GL, Fitzgerald ML, Polgar J:** Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood* 2000; 96:3334-42.

**Rendu F, Marche P, Hovig T, Maclouf J, Lebret M, Tenza D, Levy-Toledano S, Caen JP:** Abnormal phosphoinositide metabolism and protein phosphorylation in platelets from a patient with the grey platelet syndrome. *Br J Haematol* 1987; 67:199-206.

**Richardson M, Robishaw JD:** The  $\alpha 2A$ -adrenergic receptor discriminates between Gi heterotrimers of different betagamma subunit composition in Sf9 insect cell membranes. *J Biol Chem* 1999; 274:13525-33.

**Roest M, Banga JD, Grobbee DE, de Groot PG, Sixma JJ, Tempelman MJ, van der Schouw YT:** Homozygosity for 807T polymorphism in  $\alpha_2$  subunit of platelet  $\alpha_2\beta_1$  is associated with increased risk of cardiovascular mortality in high risk women. *Circulation* 2001; 102:1645-50.

**Ruggeri ZM:** Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; 8:1227-34.

**Saleh AA, Ginsburg KA, Duchon TA, Dorey LG, Hirata J, Alshameeri RS, Dombrowski MP, Mammen EF:** Hormonal contraception and platelet function. *Thromb Res* 1995; 78:363-7.

**Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR:** Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 2001; 413:74-8.

**Santoro SA, Zutter MM:** The  $\alpha_2\beta_1$  integrin: A collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost* 1995; 74:813-21.

**Santoso S, Amrhein J, Hofman HA, Sachs U, Walka MM, Kroll H, Kiefel V:** A point mutation Thr<sub>799</sub>Met on the  $\alpha_2$  integrin leads to the formation of new human platelet alloantigen Sit<sup>a</sup> and effects collagen-induced aggregation. *Blood* 1999(a); 94:4103-11.

**Santoso S, Kalb R, Walka M, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Newman PJ:** The human alloantigens Br<sup>a</sup> and Br<sup>b</sup> are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (integrin subunit  $\alpha_2$ ). *J Clin Invest* 1993; 92:2427-32.

**Santoso S, Kiefel V:** Human platelet-specific alloantigens: update. *Vox Sang* 1998; 74(suppl 2):249-53.

**Santoso S, Kiefel V:** Human platelet alloantigens. *Wien Klin Wochenschr* 2001; 113:806-13.

**Santoso S, Kiefel V, Richter IG, Sachs U, Rahman A, Carl B, Kroll H:** A functional platelet fibrinogen receptor with a deletion in the cysteine-rich repeat region of the  $\beta_3$  integrin: the Oe<sup>a</sup> alloantigen in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 2002; 99:1205-14.

**Santoso S, Kunicki TJ:** Platelet receptor polymorphisms and thrombotic risk. *Ital Heart J* 2001; 2:811-5.

**Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, Haberbosch W, Gardemann A:** Association of the platelet glycoprotein Ia C<sub>807</sub>T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood* 1999(b); 93:2449-53.

**Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM:** Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998; 94:657-66.

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

**Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM:** Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; 84:289-97.

**Shattil SJ, Cunningham M, Wiedmer T, Zhao J, Sims PJ, Brass LF:** Regulation of glycoprotein IIb/IIIa receptor function studied with platelets permeabilized by the pore-forming complement proteins C5b-9. *J Biol Chem* 1992; 267:18424-31.

**Sims PJ, Ginsberg MH, Plow EF, Shattil SJ:** Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoproteine IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1991; 266:7345-52.

**Sixma JJ, van Zanten HG, Huizinga EG, van der Plas RM, Verkley M, Wu YP, Gros P, de Groot PG:** Platelet adhesion to collagen: an update. *Thromb Haemost* 1997; 78:434-8.

**Sixma JJ, van Zanten HG, Saelman EU, Verkleij, Lankhof H, Nieuwenhuis HK, de Groot PG:** Platelet adhesion to collagen. *Thromb Haemost* 1995; 74:454-9.

**Sjöbring U, Ringdahl U, Ruggeri ZM:** Induction of platelet thrombi by bacteria and antibodies. *Blood* 2002; 100:4470-7.

**Stadel BV:** Oral contraceptives and cardiovascular disease (first of two parts). *N Engl J Med* 1981; 305:612-8.

**Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH:** Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med* 1991; 325:756-62.

**Takada Y, Hemler ME:** The primary structure of the VLA-2/collagen receptor alpha 2 subunit (platelet GPIa): homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain. *J Cell Biol* 1989; 109:397-407.

**Tarantino MD, Kunicki TJ, Nugent DJ:** The estrogen receptor is present in human megakaryocytes. *Ann NY Acad Sci* 1994; 714:293-6.

**Teede HJ, McGrath BP, Turner A, Majewski H:** Effects of oral combined hormone replacement therapy on platelet aggregation in postmenopausal women. *Clin Sci* 2001; 100:207-13.

**Theodoropoulos I, Christopoulos C, Metcalfe P, Dimitriadou E, Economopoulos P, Loucopoulos D:** The effect of human platelet alloantigen polymorphism on the in vitro responsiveness to adrenaline and collagen. *Brit J Haemat* 2001; 114:387-93.

**Thijs A, van Baal WM, van der Mooren MJ, Kenemans P, Drager AM, Huijgens PC, Stehouwer CD:** Effects of hormone replacement therapy on blood platelets. *Eur J Clin Invest* 2002; 32:613-8.

**Thompson NT, Scrutton MC, Wallis RB:** Particle volume changes associated with light transmittance changes in the platelet aggregometer: dependence upon aggregating agent and effectiveness of stimulus. *Thromb Res* 1986; 41:615-26.

**Thornton MA, Poncz M, Korostishevsky M, Yakobson E, Usher S, Seligsohn U, Peretz H:** The human platelet alphaIIb gene is not closely linked to its integrin partner beta3. *Blood* 1999; 94:2039-47.

**Turitto VT, Hall CL:** Mechanical factors affecting hemostasis and thrombosis. *Thromb Res* 1998; 92(suppl 2):25-31.

**Vijayan KV, Goldschmidt-Clermont PJ, Roos C, Bray PF:** The PI<sup>A2</sup> polymorphism of integrin  $\beta_3$  enhances outside-in signaling and adhesive functions. *J Clin Invest* 2000; 105:793-802.

**Vilen L, Jacobsson S, Wadenvik H, Kutti J:** ADP-induced platelet aggregation as a function of age in healthy humans. *Thromb Haemost* 1989; 61:490-2.

**Vogels EA, Lagro-Janssen AL, van Weel C:** Sex differences in cardiovascular disease: are women with low socioeconomic status at high risk? *Br J Gen Pract* 1999; 49:963-6.

**van Loghem JJ, Dormeijer H, van der Hart M:** Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw). *Vox Sang* 1959; 4:161-9.

**von Beckerath N, Koch W, Mehilli J, Bottiger C, Braun S, Schomig A, Kastrati A:** Glycoprotein Ia C807T polymorphism and risk of restenosis following coronary stenting. *Atherosclerosis* 2001; 156:463-8.

**Warkentin TE, Smith JW:** The alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfus Med Rev* 1997; 11:296-307.

**Watson CS, Norfleet AM, Pappas TC, Gametchu B:** Rapid actions of estrogens in GH3/B6 pituitary tumor cells via a plasma membrane version of estrogen receptor-alpha. *Steroids* 1999; 64:5-13.

**Watson SP, Berlanga O, Best D, Frampton J:** Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? *Platelets* 2000; 11:252-8.

**Watson SP, Gibbins J:** Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immunology Today* 1998; 19:260-4.

**Weber C, Fraemohs L, Dejana E:** The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:467-77.4

**Wehling M:** Specific nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:365-393.

**Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ:** A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for arterial thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334:1090-4.

**Willerson JT:** Systemic and local inflammation in patients with unstable atherosclerotic plaques. *Prog Cardiovasc Dis* 2002; 44:469-78.

**Winkler UH:** Thrombophilia and antithrombotic prevention in gynecology and obstetrics. *Internist* 1997; 38:650-7.

**White JG, Clawson CC:** Overview article: biostructure of blood platelets. *Ultrastruct Pathol* 1980; 1:533-58.

**White RE, Darkow DJ, Lang JL:** Estrogen relaxes coronary arteries by opening BK<sub>Ca</sub> channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res* 1995; 77:936-42.

**Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators:** Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women. *JAMA* 2002 ;288:321-333.

**Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA:** Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha_V\beta_3$ . *Science* 2001; 294:339-45.

**Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, Arnaout MA:** A novel adaptation of the integrin PSI domain revealed from its crystal structure. *J Biol Chem* 2004; 279:40252-54.

**Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S:** Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001(a);104:2746-53.

**Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S:** Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation* 2001(b); 104:2855-64.

**Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, Goussev A, Powers C, Ho KL, Morris D, Smyth SS, Coller BS, Chopp M:** Dynamic platelet accumulation at the site of the occluded middle cerebral artery and in downstream microvessels is associated with loss of microvascular integrity after embolic middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 2001; 912:181-94.

**Zhu MM, Weedon J, Clark LT:** Meta-analysis of the association of platelet glycoprotein IIIa P1A1/A2 polymorphism with myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2000; 86:1000-5.

**Zieseniss S, Zahler S, Müller I, Hermetter A, Engelmann B:** Modified phosphatidylethanolamine as active component of oxidized LDL promoting platelet prothrombinase activity. *J Biol Chem* 2001; 276:19828-35.

**Zutter MM, Fong AM, Krigman HR, Santoro SA:** Differential regulation of the  $\alpha_2\beta_1$  and  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin genes during megacaryocytotic differentiation of pluripotential K562 cells. *J Biol Chem* 1992; 267:20233-38.

## 10 Anhang

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Endotheliale Integrität und Gefäßläsion .....                                                   | 3  |
| Abbildung 2: primäre und sekundäre Hämostase .....                                                           | 4  |
| Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der extrazellulären Domäne von $\alpha_V\beta_3$ . .....              | 19 |
| Abbildung 4: Modell des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ .....                                                | 22 |
| Abbildung 5: Modell des Integrins $\alpha_2\beta_1$ .....                                                    | 27 |
| Abbildung 6: Genomische und nicht-genomische Wirkungen von $17\beta$ -Estradiol .....                        | 34 |
| Abbildung 7: Sequenzspezifische PCR des $\alpha_2$ -Integrin C807T Dimorphismus .....                        | 44 |
| Abbildung 8: Produkte der sequenzspezifischen PCR.....                                                       | 44 |
| Abbildung 9: RFLP-Analyse des $\alpha_2$ G1648A Dimorphismus und Restriktionsenzymverdau                     | 45 |
| Abbildung 10: RFLP-Analyse des $\beta_3$ T196C Dimorphismus und Restriktionsenzymverdau ..                   | 46 |
| Abbildung 11: ADP induzierte Thrombozytenaggregation in PRP .....                                            | 48 |
| Abbildung 12: ADP-Schwellenkonzentration.....                                                                | 49 |
| Abbildung 13: Effekt von $17\beta$ -Estradiol auf die ADP induzierte Aggregation.....                        | 50 |
| Abbildung 14: ADP induzierte Thrombozyten-Aggregation in Abhängigkeit von HPA-1.....                         | 51 |
| Abbildung 15: ADP-Schwellenkonzentration in Abhängigkeit von HPA-1. ....                                     | 52 |
| Abbildung 16: Adrenalin induzierte Thrombozytenaggregation in PRP .....                                      | 53 |
| Abbildung 17: Effekt von $17\beta$ -Estradiol auf die Adrenalin induzierte Aggregation .....                 | 54 |
| Abbildung 18: Hemmung der Adhäsion gewaschener Thrombozyten durch Gi 3 .....                                 | 55 |
| Abbildung 19: Effekt von $17\beta$ -Estradiol auf die Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen.....                | 56 |
| Abbildung 20: Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen in Abhängigkeit von HPA-1. ....                             | 57 |
| Abbildung 21: Hemmung der Adhäsion gewaschener Thrombozyten durch Gi 9 .....                                 | 58 |
| Abbildung 22: Effekt von $17\beta$ -Estradiol auf die Thrombozytenadhäsion an Kollagen.....                  | 59 |
| Abbildung 23: Thrombozytenadhäsion an Kollagen in Abhängigkeit von $\alpha_2\beta_1$ C <sub>807</sub> T..... | 60 |

## 10.2 Tabellenverzeichnis

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Rezeptoren, Liganden und Signalwege bei der Thrombusbildung .....         | 9  |
| Tabelle 2: Rezeptoren der Thrombozytenmembran .....                                  | 11 |
| Tabelle 3: Thrombozytenrezeptorpolymorphismen .....                                  | 13 |
| Tabelle 4: Faktoren assoziiert mit Arteriosklerose und koronarer Herzkrankheit ..... | 15 |
| Tabelle 5: Genotypverteilung .....                                                   | 43 |
| Tabelle 6: RFLP-Analyse .....                                                        | 45 |
| Tabelle 7: ADP-Schwellenkonzentration .....                                          | 49 |

## 10.3 Abkürzungsverzeichnis

|                 |                                        |
|-----------------|----------------------------------------|
| A               | Adenin                                 |
| ADP             | Adenosindiphosphat                     |
| AVK             | Arterielle Verschlußkrankheit          |
| Bp              | Basenpaare                             |
| BSA             | Bovines Serum Albumin                  |
| C               | Cytosin                                |
| cAMP            | cyklisches-Adenosinmonophosphat        |
| CD              | <i>Cluster of differentiation</i>      |
| CD40L           | CD40 Ligand                            |
| CHO             | <i>chinese hamster ovary</i>           |
| E2              | 17 $\beta$ -Estradiol                  |
| EDTA            | Ethylendiamintetraessigsäure           |
| G               | Guanin                                 |
| GP              | Glykoprotein                           |
| h               | Stunde                                 |
| HDL             | <i>high density lipoprotein</i>        |
| HPA             | <i>Human Platelet Alloantigen</i>      |
| ICAM            | <i>intercellular adhesion molecule</i> |
| IP <sub>3</sub> | Inositol-1,4,5-Triphosphat             |
| kD              | 10 <sup>3</sup> Dalton                 |
| KHK             | Koronare Herzkrankheit                 |

## Anhang

|                  |                                                    |
|------------------|----------------------------------------------------|
| LDL              | <i>low density lipoprotein</i>                     |
| min              | Minute                                             |
| NO               | Stickstoffmonoxid                                  |
| Nm               | Nanometer                                          |
| OPN              | Osteopontin                                        |
| PAI-1            | Plasminogen-Aktivator Inhibitor 1                  |
| PBS              | <i>phosphate buffered saline</i>                   |
| PCR              | <i>polymerase chain reaction</i>                   |
| PDGF             | <i>platelet-derived growth factor</i>              |
| PECAM            | <i>platelet-endothelial cell adhesion molecule</i> |
| PGE <sub>1</sub> | Prostaglandin 1                                    |
| PRP              | <i>platelet rich plasma</i>                        |
| RFLP             | Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus        |
| s                | Sekunde                                            |
| SNP              | <i>single nucleotide polymorphism</i>              |
| T                | Thymin                                             |
| TF               | <i>tissue factor</i>                               |
| TXA <sub>2</sub> | Thromboxan A <sub>2</sub>                          |
| VN               | Vitronektin                                        |
| vWF              | von Willebrand-Faktor                              |

## **10.4 Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, 20.08.2007

## 10.5 Danksagung

Herr Professor Dr. med. Gregor Bein danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Sentot Santoso für die Bereitstellung des Promotionsthemas, die freundliche Aufnahme und die reibungslose Integration in seine Arbeitsgruppe. Er hatte immer ein offenes Ohr für meine Probleme und aufgrund seiner exzellenten Fachkenntnisse eigentlich immer eine Lösung parat.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Olga Eva und vor allem bei Frau Silke Werth für die Einarbeitung in verschiedene molekularbiologische Techniken, für ihre Unterstützung bei einigen Versuchen und ihre schier unendliche Geduld bedanken.

Vielen Dank auch an Dr. Hartmut Kroll und die Belegschaft des Thrombozyten-Labors für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Bereitstellung von Geräten.

Danken möchte ich dem Team des Spendesaales für die Unterstützung bei der Gewinnung von Probenmaterial.

Ich bedanke mich ebenso bei allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin für das gute Arbeitsklima und die vielen zwischenmenschlichen Kontakte und wissenschaftlichen Anregungen.

Meinem Bruder verdanke ich den nötigen Ansporn zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Ganz herzlich und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir diese Arbeit ermöglichten, mich ständig unterstützen und aufmuntern und die ich sehr liebe.

## 10.6 Lebenslauf

### Persönlich Angaben

|               |                   |
|---------------|-------------------|
| Geburtsdatum  | 16. Dezember 1976 |
| Geburtsort    | Olpe              |
| Familienstand | Ledig             |

### Schulbildung

|            |                           |
|------------|---------------------------|
| 1983 –1987 | Grundschule in Eckenhagen |
| 1987 –1996 | Gymnasium in Bergneustadt |
| Jun 1996   | Abitur                    |

### Zivildienst

|                     |                                                                              |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Jul 1996 – Jul 1997 | St. Martinus Hospital Olpe<br>Pflegehelfer auf einer internistischen Station |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------|

### Universitätsausbildung

|                     |                                                                                                                              |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Okt 1997            | Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen                                              |
| Okt 1998 – Jul 1999 | Tutor der Lehrveranstaltung “Demonstration der Anatomie” am Institut für Anatomie an der Justus-Liebig-Universität in Gießen |

## Anhang

|                     |                                                                                                                           |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sep 1999            | Ärztliche Vorprüfung                                                                                                      |
| Aug 2000            | Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung                                                                                   |
| Feb 2002 – Jul 2002 | Austauschsemester mit “Erasmus-Stipendium” an der Universidad de Cádiz,<br>Spanien                                        |
| Okt 2002 – Jul 2003 | Studentische Hilfskraft am Institut für Physiologie an der Justus-Liebig-<br>Universität in Gießen                        |
| Sep 2003            | Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung                                                                                  |
| Okt 2003 – Feb 2004 | 1. Tertial des Praktischen Jahres: Chirurgie am Hospital Central, Universidad<br>Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentinien   |
| Feb 2004 – Jun 2004 | 2. Tertial des Praktischen Jahres: Innere Medizin am Hospital La Paz,<br>Universidad Autónoma, Madrid, Spanien            |
| Jun 2004 – Sep 2004 | 3. Tertial des Praktischen Jahres: Pädiatrie am Zentrum für Kinderheilkunde an<br>der Justus-Liebig-Universität in Gießen |
| Nov 2004            | Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung                                                                                  |

### **Ärztliche Tätigkeit**

|                     |                                                                                                                                                     |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Apr 2005 – Mai 2006 | Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums Aachen                                                                      |
| Seit Jun 2006       | „Médico Residente“ in der Abteilung für Innere Medizin des<br>Universitätskrankenhauses Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid,<br>Spanien |