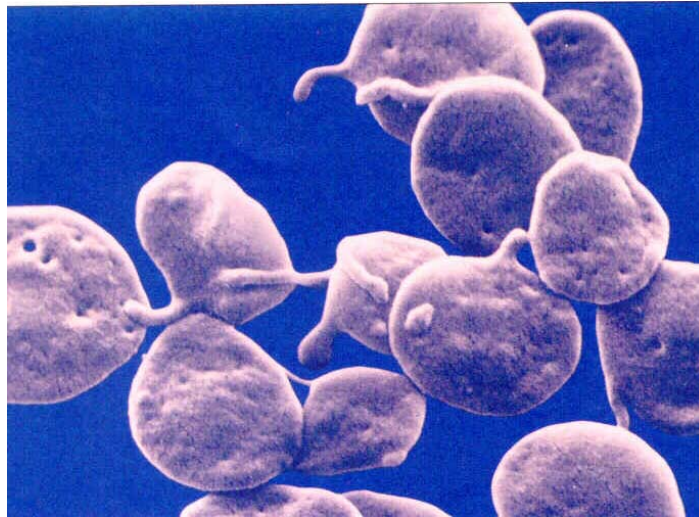


**Kollagenrezeptor  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin auf humanen und tierischen  
Thrombozyten:  
Heterogenität und ihre Bedeutung**



INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Claudia Weiken

Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. G. Bein

Eingereicht über das Institut für Biochemie und Endokrinologie,  
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität

Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. W. Schoner

**Kollagenrezeptor  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin auf humanen und tierischen  
Thrombozyten:  
Heterogenität und ihre Bedeutung**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
Claudia Weiken  
Tierärztin aus Mettmann

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr.h.c. B. Hoffmann

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Bein

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Schoner

Tag der mündlichen Prüfung: letzter Tag: 04.07.2003

Meinem Vater und meiner Mutter,  
in Dankbarkeit

# I Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Fragestellung.....	2
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1	Thrombozyten.....	3
	2.1.1 Humane Thrombozyten: Morphologie.....	3
	2.1.2 Tierische Thrombozyten.....	3
2.2	Integrine.....	5
	2.2.1 Allgemeines.....	5
	2.2.2 Thrombozytäre Integrine.....	7
2.3	Integrin $\alpha_2\beta_1$ .....	8
	2.3.1 Allgemeines.....	8
	2.3.2 Struktureller Aufbau des Integrins $\alpha_2\beta_1$ .....	9
	2.3.3 Funktionelle Aspekte des thrombozytären Integrins $\alpha_2\beta_1$ .....	13
	2.3.3.1 Mechanismen der Kollagenbindung und Signaltransduktion.....	14
	2.3.3.2 Ablauf der primären Hämostase .....	17
	2.3.4 Antithrombozytäre Therapie.....	19
	2.3.4.1 Erhöhung der zyklischen Nukleotide.....	19
	2.3.4.2 Interaktion mit dem Arachidonsäuremetabolismus .....	19
	2.3.4.3 Interaktion mit Aktivierungsrezeptoren.....	20
	2.3.4.4 Hemmung der Aggregation.....	20
	2.3.4.5 Hemmung der Adhäsion.....	21
2.4	Heterogenität des $\alpha_2$ -Integrins.....	22
	2.4.1 Allgemeines .....	22
	2.4.2 Missense Mutation – Entstehung von Alloantigenen.....	22
	2.4.2.1 Br-Allel (HPA-5).....	22
	2.4.2.2 Sit-Allel (HPA-13).....	24
	2.4.2.3 Durch thrombozytäre Alloantikörper induzierte Krankheitsbilder.....	24
	2.4.2.4 Neonatale Alloimmunthrombozytopenie (NAIT).....	24
	2.4.2.5 Posttransfusionale Purpura (PTP).....	25
	2.4.2.6 Refraktärzustand nach Transfusion.....	25

2.4.3	Silent Mutation.....	25
2.4.3.1	<i>Position 807</i> .....	26
2.4.3.2	<i>Position 873</i> .....	26
2.4.3.3	<i>Position 837</i> .....	26
2.4.3.4	<i>Kopplung der Mutationen</i> .....	26
2.4.3.5	<i>Funktionelle und klinische Bedeutung der Mutationen</i> .....	27
2.4.4	Zellarten – Funktionsunterschiede.....	30
2.4.5	Monoklonale Antikörper – Erkennung verschiedener Subpopulationen.....	31
<b>3</b>	<b>Material</b> .....	<b>33</b>
3.1	Reagenzien.....	33
3.2	Primer.....	34
3.3	Antikörper.....	34
3.4	Sonstige Materialien.....	35
3.5	Geräte.....	35
3.6	Untersuchungsmaterial, Probenkollektiv.....	36
<b>4</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>37</b>
4.1	Genotypische Untersuchungen.....	37
4.1.1	DNA-Isolierung aus Vollblut.....	37
4.1.2	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	37
4.1.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	38
4.1.3.1	<i>Genotypisierung des GPIa C807T Polymorphismus mit Hilfe sequenzspezifischer PCR (PCR-SSP)</i> .....	38
4.1.3.2	<i>Genotypisierung des GPIa A1648G Polymorphismus mit Hilfe eines Restriktionsverdau (RFLP)</i> .....	39
4.1.4	Agarosegel-Elektrophorese .....	40
4.1.5	Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen.....	41
4.1.6	Sequenzierung.....	42
4.2	Phänotypische Untersuchungen.....	44
4.2.1	Durchflußzytometrie.....	44
4.2.1	Thrombozytenisolierung für Durchflußzytometrie.....	44

4.2.3.	Durchflußzytometrie mit isolierten Thrombozyten.....	45
4.2.4.	Durchflußzytometrie mit Vollblut.....	45
4.2.5.	Markierung von Thrombozyten.....	46
4.2.6.	Immunpräzipitation.....	47
4.2.7.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	48
4.2.8.	Westernblot.....	49
4.3	Funktionelle Untersuchungen.....	51
4.3.1	Thrombozytenisolierung für Adhäsionstest.....	51
4.3.2	Thrombozyten-Adhäsionstest.....	52
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>54</b>
5.1	Molekulargenetische Untersuchungen.....	54
5.1.1	Genotypisierung an Position 807.....	54
5.1.2	Genotypisierung an Position 1648.....	57
5.2	Phänotypisierung humaner Thrombozyten mit verschiedenen mAk gegen GPIa.....	59
5.2.1	Durchflußzytometrische Untersuchungen.....	59
5.2.2	Immunochemische Untersuchungen.....	60
5.3	Phänotypisierung tierischer Thrombozyten mit den mAk Gi9 bzw. Gi14.....	61
5.3.1	Durchflußzytometrische Untersuchungen.....	61
5.3.2	Immunochemische Untersuchungen.....	63
5.4	GPIa/IIa – Expression auf humanen Thrombozyten verschiedener Genotypen.....	64
5.5	Untersuchungen zur Heterogenität der GPIa/IIa - Expression auf humanen Thrombozyten definiert durch verschiedene monoklonale Antikörper.....	67
5.5.1	Expressionsstudie mit Hilfe isolierter Thrombozyten.....	67
5.5.2	Durchflußzytometrische Untersuchungen mit Vollblut.....	68
5.6	Untersuchungen zur Heterogenität der GPIa/IIa - Expression auf caninen Thrombozyten.....	70

5.7	Einfluß der mAk Gi9 und Gi14 auf die Thrombozytenfunktion.....	72
5.7.1	Funktionelle Untersuchungen mit humanen Thrombozyten.....	72
5.7.2	Funktionelle Untersuchungen mit caninen Thrombozyten.....	75
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>90</b>
	<b>Summary.....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>106</b>
<b>11</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>108</b>
11.1	Selbstständigkeitserklärung.....	108
11.3	Tabellen.....	109

# 1 Einleitung

Thrombozyten als kleinste korpuskuläre Bestandteile des Blutes sind hauptverantwortlich für den Beginn bzw. den Ablauf hämostatischer Vorgänge nach Eintritt von Gefäßwandverletzungen. Die hierfür auf der Zelloberfläche exprimierten Moleküle dienen neben Interaktionen mit der Gefäßwand, anderen Zellen bzw. löslichen Faktoren auch der Aggregation und Aktivierung von Thrombozyten über verschiedenste Signaltransduktionsmechanismen. Einer der wichtigsten dieser Oberflächenrezeptoren auf Blutplättchen ist neben dem von Willebrand Faktor-Rezeptor GPIb/V/IX und dem Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa der Kollagenrezeptor GPIa/IIa, auch als Integrin  $\alpha_2\beta_1$  bezeichnet (Übersicht: Shattil et al., 1994). Er wird in sehr geringem Maße auf der Zelloberfläche exprimiert und dient der Adhäsion an Kollagen, sowie über verschiedene Stoffwechselwege der Aktivierung von Thrombozyten. Dieses Molekül betreffende Untersuchungen der letzten 15 Jahre haben nicht nur zu Erkenntnissen über die Funktion dieses Rezeptors geführt, sondern auch dessen Heterogenität gezeigt. Mit Hilfe molekularbiologischer Untersuchungen konnten verschiedene Mutationen im Bereich des die  $\alpha_2$ -Untereinheit kodierenden Gens entdeckt werden. Zwei dieser Mutationen bewirken aufgrund des geänderten Basentriplets eine Veränderung der Aminosäuresequenz des Polypeptids, während die restlichen Polymorphismen stumme Mutationen darstellen. Desweiteren zeigten sich Unterschiede bzgl. seiner Funktion in Abhängigkeit der exprimierenden Zelle und seiner variierenden Oberflächendichte auf humanen Thrombozyten. Letztere konnte mit dem Polymorphismus an Position 807 der cDNA in Verbindung gebracht werden. Studien bzgl. des Zusammenhangs zwischen der Oberflächendichte und einem weiteren  $\alpha_2$ -Polymorphismus an Position 1648 zeigten uneinheitliche Ergebnisse. Da die das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  betreffenden Untersuchungen in der Hauptsache beim Menschen durchgeführt wurden, ist über die Präsenz verschiedener Formen von Heterogenität beim Tier sehr wenig bekannt.

Aufgrund ihrer bedeutenden Rolle beim Ablauf der primären Hämostase gelangten Adhäsionsmoleküle, wie z.B. die Glykoproteine GPIb/V/IX und GPIa/IIa, nach erfolgreichem klinischen Einsatz von GPIIb/IIIa-Antagonisten bei der Therapie akuter Myokardinfarkte, immer mehr in den Mittelpunkt von Überlegungen bzgl. der Entwicklung weiterer antithrombozytär wirkender Substanzen. Bisher veröffentlichte Daten stellen die Entwicklung eines gegen den von Willebrand Faktor-Rezeptor GPIb/V/IX gerichteten

Antikörpers dar, dessen Einsatz im Tiermodell in vivo vielversprechende Ergebnisse zeigte. Weiterführende bzw. auf das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  ausgedehnte Studien mit Hilfe geeigneter Tiermodelle, welche weitere Erkenntnisse über einen möglichen therapeutischen oder prophylaktischen Einsatz von Antagonisten gegen diese Adhäsionsmoleküle ermöglichen, sind an dieser Stelle von großer Bedeutung.

### **1.1 Fragestellung**

Als ein Ziel dieser Arbeit soll ein möglicher Zusammenhang zwischen der schwankenden Dichte des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  auf der Thrombozytenoberfläche verschiedener Individuen und den Polymorphismen an Position 807 bzw. 1648 des  $\alpha_2$ -Gens dargestellt werden. Hierzu sollen Blutspender an beiden Positionen genotypisiert werden, um anschließend die Expression des Rezeptors unter Einsatz monoklonaler, gegen die  $\alpha_2$ -Untereinheit gerichteter Antikörper am Durchflußzytometer in Abhängigkeit vom Genotyp vergleichen zu können.

Um die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen untersuchen sowie die Auswirkungen verschiedener Antikörper auf die Thrombozytenadhäsion darstellen zu können, soll im Rahmen dieser Arbeit ein funktioneller Test etabliert werden. Dieser soll reproduzierbare Ergebnisse liefern, im Gegensatz zur Verwendung von Radioaktivität keine besonderen technischen Anforderungen an das Labor stellen sowie durch seine einfache Handhabung evtl. auch in der Diagnostik einsetzbar sein. Mit Hilfe dieses etablierten Tests soll im Anschluß die funktionelle Bedeutung der monoklonalen Antikörper Gi9 und Gi14 auf die Thrombozytenadhäsion beim Menschen untersucht werden.

Da GPIa/IIa eine bedeutende Rolle bei der primären Hämostase spielt, wäre der Einsatz eines inhibierenden Antikörpers gegen dieses Molekül im Rahmen einer antithrombozytären Therapie durchaus denkbar. Um die funktionelle Bedeutung der Antikörper auch in vivo darstellen zu können, sollen als ein weiteres Ziel dieser Arbeit Untersuchungen zur Etablierung eines Tiermodells durchgeführt werden. Hierzu soll die Reaktivität der monoklonalen Antikörper Gi9 und Gi14 mit verschiedenen Säugerthrombozyten mit Hilfe einer durchflußzytometrischen Analyse aus Vollblut untersucht werden. Sollte eine Tierart die entsprechende Reaktivität mit den Antikörpern zeigen, so soll im Anschluß versucht werden, mögliche, beim Menschen detektierte Polymorphismen auch bei dieser Tierart nachzuweisen. Diese Ergebnisse dürften für die Interpretation späterer in vivo Daten von Bedeutung sein.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Thrombozyten

#### 2.1.1 Humane Thrombozyten: Morphologie

Thrombozyten sind mit 2-4  $\mu\text{m}$  Durchmesser und einer Dicke von 0,5  $\mu\text{m}$  die kleinsten korpuskulären Bestandteile des zirkulierenden Blutes. Sie werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet und mit einer täglichen Erneuerungsrate von ca. 20% ins periphere Blut abgegeben. Nach einer durchschnittlichen Lebensdauer von 7-10 Tagen werden die Blutplättchen im retikuloendothelialen System der Leber und Milz abgebaut. Ihre physiologische Zahl im peripheren Blut beträgt beim Menschen ca.  $150-300 \times 10^9/\text{l}$ .

Thrombozyten werden auch als anukleäre Zellen bezeichnet, da sie sowohl beim Menschen, als auch bei höheren Säugetieren keine Zellkerne beinhalten, sondern, wenn überhaupt, nur Kernfragmente aufweisen. Dies macht eine eigene Proteinbiosynthese nicht bzw. nur sehr reduziert möglich.

Im Ruhezustand zeigen Blutplättchen eine typisch diskoidale Form mit einer Oberfläche von durchschnittlich 8  $\mu\text{m}^2$ . Im Rahmen der Thrombozytenaktivierung kommt es zur Ausbildung von Pseudopodien, welche eine Oberflächenvergrößerung auf 13  $\mu\text{m}^2$  bewirken und den Zellen eine dendritische Form verleihen.

Auf der Zelloberfläche besitzen Blutplättchen verschiedenste Moleküle, die als Rezeptoren für Agonisten bzw. als Adhäsionsproteine fungieren. Charakteristisch sind ebenfalls die verschiedenen Formen der Speichergranula im Zellinneren, welche z.T. niedermolekulare Verbindungen wie z.B. ADP oder  $\text{Ca}^{2+}$ , aber auch hydrolytische Enzyme bzw. Proteine verschiedenster Funktionen (Adhäsion, Aggregation, Chemotaxis) beinhalten und somit zur Funktion der Thrombozyten beitragen (Übersicht: Gawaz, 1999).

#### 2.1.2 Tierische Thrombozyten

Canine Thrombozyten weisen, ebenso wie die Zellen anderer höherer Säugetiere, große Ähnlichkeiten mit den kernlosen Blutplättchen des Menschen auf. Sie haben bei einer Dicke von 0,5  $\mu\text{m}$  einen mittleren Durchmesser von 2,2–3,7  $\mu\text{m}$ , können jedoch in ihrer Größe und Form deutlich variieren. Generell lassen sich sowohl diskoidale, als auch sphärische Formen nachweisen, wobei erstere deutlich überwiegen. Nach einer durchschnittlichen Reifungsdauer

der Megakaryozyten von 3-4 Tagen werden die Thrombozyten mit einer Zahl von  $300-500 \times 10^9/l$  in das periphere Blut abgegeben. Ihre durchschnittliche Halbwertszeit beträgt 2-5 Tage (Jain et al., 1975).

Die Thrombozyten des Kaninchens sind mit  $1-3 \mu m$  ähnlich groß wie die des Hundes, weisen allerdings im Blutausschlag rötlich-blaue Granula auf. Auch hier sind zT. deutlich größere Formen zu finden. Ihre Zellzahl im peripheren Blut beträgt ca.  $350-600 \times 10^9/l$ .

Die Thrombozyten der Ratte hingegen sind, ebenso wie die der Maus, mit einem Durchmesser von  $1 \mu m$  deutlich kleiner als die des Menschen. Allerdings können auch hier besonders im peripheren Blut deutliche Größenunterschiede festgestellt werden. Die Zellzahl variiert in Abhängigkeit vom Geschlecht zwischen  $600-1000 \times 10^9/l$  (Übersicht: Sanderson et al., 1981).

## 2.2 Integrine

### 2.2.1 Allgemeines

Integrine sind eine Gruppe von transmembranen Glykoproteinen, die auf verschiedensten Zellen exprimiert werden und als wichtige Adhäsionsrezeptoren auf der Zelloberfläche fungieren (Hynes et al., 1987). Von ihrer chemischen Struktur her handelt es sich um Heterodimere, deren größere  $\alpha$ - und kleinere  $\beta$ - Untereinheit nicht kovalent miteinander assoziiert sind (Übersicht Hynes et al., 1992). Mittlerweile sind etwa 20 verschiedene Integrine bekannt, die sich in jeweils unterschiedlichen Kombinationen aus den bisher beschriebenen 8  $\beta$ - bzw. 16  $\alpha$ -Ketten zusammensetzen (Hynes und Bader, 1997).

Die Unterteilung der Integrine erfolgte anfänglich aufgrund der gemeinsamen  $\beta$ -Untereinheiten in drei verschiedene Subfamilien ( $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, und  $\beta_3$ -), wobei die erste Gruppe die sogenannten VLA-Integrine (very late activation) beinhaltet. Der  $\beta_2$ -Subfamilie sind die Leukozyten-Adhäsionsmoleküle (Leucam, z.B. LFA-1, Mac-1) zugeordnet, die Gruppe der  $\beta_3$ -Integrine beinhaltet Zytoadhäsine, wie z.B. GPIIb/IIIa. Von dieser Art der Unterteilung wird jedoch heute eher Abstand genommen, da mittlerweile einige  $\alpha$ -Untereinheiten beschrieben wurden, die mit mehreren verschiedenen  $\beta$ -Ketten assoziiert sein können (Übersicht: Hemler, 1991).

Die beiden Untereinheiten der Integrine zeigen einen ähnlichen strukturellen Aufbau. Sie bestehen in der Regel aus einem maximal 50 Aminosäuren umfassenden cytoplasmatischen Teil am Carboxylende des Peptids, der mit Anteilen des Cytoskeletts in Verbindung steht, und einem kurzen, hydrophoben, transmembranen Segment, welches die Zellmembran einfach durchspannt. Der extrazelluläre Anteil der beiden Ketten stellt mit einem Molekulargewicht von über 100 kD für die  $\alpha$ - bzw. mindestens 75 kD für die  $\beta$ -Untereinheit den größten Teil des Moleküls dar. Diese beiden extrazellulären Segmente formen im Bereich des N-terminalen Endes gemeinsam den funktionellen, ligandbindenden Teil des Integrins (Hynes et al., 1992). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten diesen Bereich als einen globulären Kopf, welcher über zwei stielähnliche Ausläufer mit der Lipiddoppelschicht der Zellmembran verbunden ist (Carrel et al., 1985, Kelly et al., 1987, Nermut et al., 1988).

Bei Betrachtung der  $\alpha$ - Untereinheit unterscheidet man Integrine, welche aus einer einzigen, großen extrazellulären Kette bestehen bzw. jene, die sich aus einer posttranslational durch Splicing entstandenen leichten (etwa 25-30 kD) und einer schweren Kette über eine Disulfidbrückenbindung zusammensetzen. Die erste dieser beiden Varianten weist ein zusätzliches Segment von etwas 180 Aminosäuren auf, enthält drei Metallionenbindungsstellen und interagiert mit verschiedenen Sequenzen der Liganden. Die zweite Variante der  $\alpha$ -Untereinheit hingegen besitzt dieses eingefügte Segment nicht, weist vier Metallionenbindungsstellen auf und erkennt die häufig in Liganden vorkommende Aminosäuresequenz RGD (z.B. Fibronectin-Rezeptor  $\alpha_5\beta_1$ ) (Hynes et al., 1992).

Funktionell gesehen stellen Integrine eine Familie von Oberflächenrezeptoren dar, die auf den verschiedensten Zellen die Adhäsion an extrazelluläre Matrix vermitteln bzw. teilweise auch zur Interaktion und Adhäsion der Zellen untereinander beitragen. Das führt dazu, daß Integrine an den verschiedensten physiologischen sowie pathologischen Prozessen im Organismus beteiligt sind, so z.B. bei der Thrombozytenadhäsion und -aggregation, bei der Gewebeentwicklung und -differenzierung, Leukozytenadhäsion und -migration, sowie bei Krebszellwachstum und Metastasierung (Übersicht: Hynes et al., 1987, Hynes et al., 1992).

Die Gruppe der Integrine interagiert mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Liganden, was z.T. auf die Kombination der jeweiligen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten miteinander zurückgeführt wird. Interessant ist, daß ein Integrin durchaus mehrere verschiedene Liganden binden kann. Umgekehrt kann auch ein einzelner Ligand durch mehrere Integrine auf der Zelloberfläche gebunden werden. Generell werden auf den einzelnen Zellen mehrere verschiedene Integrine exprimiert (Hynes et al., 1992).

## 2.2.2 Thrombozytäre Integrine

Bisher sind auf Thrombozyten fünf verschiedene Integrine beschrieben worden, die mit ihren spezifischen Liganden in der folgenden Tabelle aufgeführt sind (Tabelle 2.1). Alle dienen der Adhäsion bzw. Aggregation der Thrombozyten und sind somit für die Hämostase von großer Bedeutung.

<b>Integrin</b>	<b>Nomenklatur (GP)</b>	<b>RGD-Sequenz</b>	<b>Ligand</b>
$\alpha_2\beta_1$	GPIa/IIa	Keine Erkennung	Kollagen
$\alpha_5\beta_1$	GPIc/IIa	Erkennung	Fibronectin
$\alpha_6\beta_1$	GPIc'/IIa	Keine Erkennung	Laminin
$\alpha_{IIb}\beta_3$	GPIIb/IIIa	Erkennung	Fibrinogen, von Willebrand Faktor, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin
$\alpha_v\beta_3$	VnR $\alpha$ /IIIa	Erkennung	Vitronectin, Fibrinogen, von Willebrand Faktor, Thrombospondin, Fibronectin, Osteopontin, Kollagen

**Tabelle 2.1: Aufstellung verschiedener thrombozytärer Integrine**

Bisher bekannte Integrine auf der Thrombozytenoberfläche, angegeben mit Nomenklatur des Integrins, sowie des „platelet membran glycoprotein complex“. Aufgeführt sind weiter die spezifischen Liganden und die Erkennung der ligandeigenen RGD-Sequenz (Kunicki et al., 1992, Hynes et al., 1992).

## 2.3 Integrin $\alpha_2\beta_1$

### 2.3.1 Allgemeines

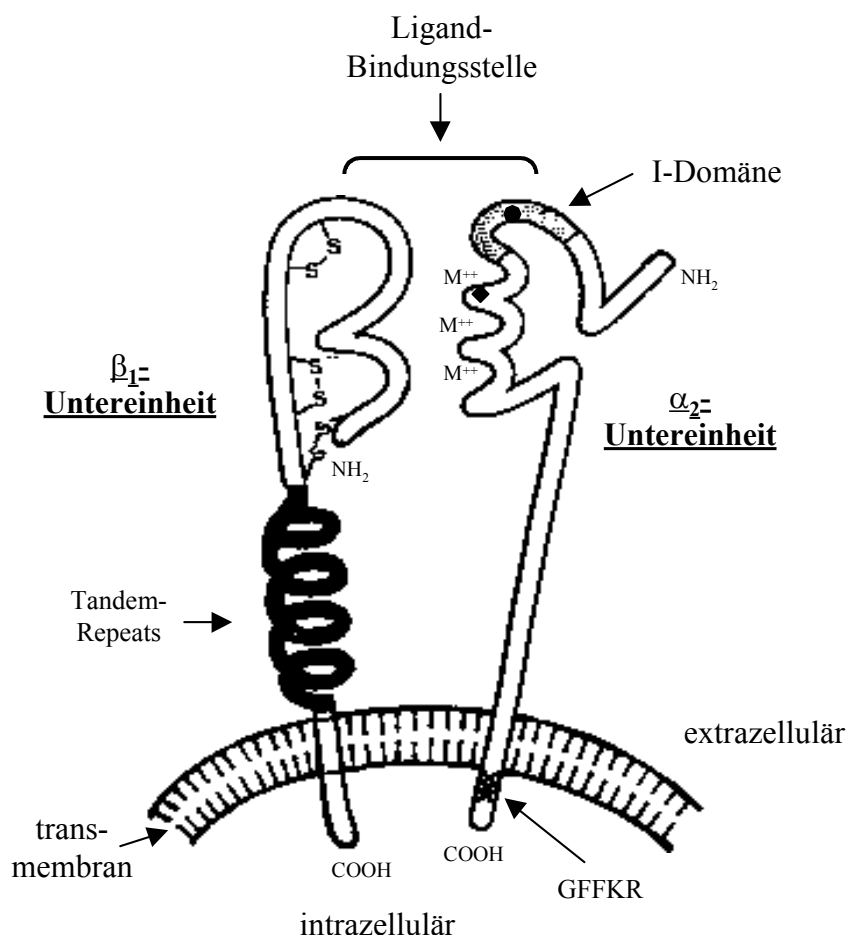
Das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  wurde als erstes von Kunicki et al. 1981 als ein heterodimerer Komplex auf der Oberfläche von Thrombozyten beschrieben. Mittlerweile ist bekannt, daß das Molekül nicht nur auf Blutplättchen, sondern auch auf zahlreichen anderen Zellen, wie zum Beispiel reifen Megakaryozyten, Epithelzellen, Fibroblasten oder aktivierten T-Lymphozyten, exprimiert werden kann (Übersicht: Santoro et al., 1995). Dies hat dazu geführt, daß für die immuno- bzw. physiochemisch identischen Moleküle verschiedene Bezeichnungen existieren. So wird das Integrin nach seinen Untereinheiten neben  $\alpha_2\beta_1$  auch allgemein als CDw49b/CD29 bezeichnet, während man auf Thrombozyten von GPIa/IIa („Platelet membran glycoprotein complex Ia/IIa“) spricht. Auf aktivierten T-Lymphozyten wird das Molekül aufgrund des zeitlichen Verlaufs seiner Expression nach Antigenkontakt als „Very late activation antigen“ (VLA-2) bezeichnet (Pischel et al., 1988). Takada et al. beschreiben 1988 das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  erstmals auf Fibroblasten und bezeichnen es als Extrazellulären Matrix Rezeptor Klasse II (ECMR II).

Im Vergleich zu anderen Integrinen auf der Zelloberfläche wird  $\alpha_2\beta_1$  in nur geringem Umfang exprimiert. Während zum Beispiel für GP IIb/IIIa etwa 40.000 – 80.000 Komplexe pro Zelle nachgewiesen werden können (Wagner et al., 1996), beschreibt Pischel 1987 für GPIa/IIa eine Moleküldichte von nur durchschnittlich 1.800 pro Thrombozyt. Interessant ist hierbei eine deutliche Varianz der Oberflächendichte zwischen einzelnen Individuen.

Das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  ist in Abhängigkeit vom Zelltyp in der Lage, mit verschiedenen Liganden zu interagieren. So dient es zum Beispiel auf Thrombozyten als Hauptkollagenrezeptor (Staatz et al., 1989, Saelmann et al. 1994), während es im Gegensatz dazu auf Epithelzellen sowohl Kollagen, als auch Laminin binden kann (Elices et al., 1989, Chan et al., 1993). Die Ligandspezifität ist also deutlich von der Art der exprimierenden Zelle abhängig.

## Struktureller Aufbau des Integrins $\alpha_2\beta_1$

Der thrombozytäre Kollagenrezeptor  $\alpha_2\beta_1$  entspricht als heterodimeres, transmembranes Glykoprotein dem strukturellen Aufbau der Integrine. Dieser wird in Abbildung 2.1 modellhaft dargestellt.



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  :

Die dunkle Region der  $\beta_1$ -Untereinheit stellt die cysteinhaltigen Tandem-Repeats dar. Die Disulphidbindungen am N-terminalen Ende sind nur symbolisch eingezeichnet. Der schattierte Bereich der  $\alpha_2$ -Untereinheit stellt die I-Domäne dar, in deren Bereich sich die beiden Mutationen (HPA-5:♦ / Position 807:•) befinden. An den mit  $M^{++}$  gekennzeichneten Bereichen befinden sich die Metallionenbindungsstellen. (Abb. modifiziert nach Santoro et al., 1995)

Seine kleinere  $\beta_1$ -Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 130 kD (nicht reduziert) bzw. 110 kD (reduziert) und wird laut Zhang et al., 1988 auf dem Chromosom 10 codiert.

Typisch für den Aufbau der Integrin-Ketten ist der mit 40 Aminosäuren sehr kleine cytoplasmatische Teil am carboxylterminalen Ende des Peptids (Argraves et al., 1987). Durch Interaktion mit Komponenten des thrombozytären Zytoskeletts, wie z.B. mit dem

aktinbindenden Protein  $\alpha$ -Aktinin (Otey et al., 1990) bzw. mit Talin (Tapley et al., 1989), scheint diese Region die Adhäsion von zellulären Strukturen an extrazelluläre Matrix in bestimmten Bereichen der Zellmembran, sogenannten „focal contacts“, zu vermitteln (Hynes et al 1992).

Zwei, durch alternatives Splicing entstandene Varianten der cytoplasmatischen Region sind von Altruda et al., 1990 (Präsenz eines Stop-Codons am 5'Ende bewirkt eine Verkleinerung der cytoplasmatischen Region) bzw. von Languino et al., 1992 (Insertion eines 116 bp langen Stücks zwischen die, die cytoplasmatische Region codierenden Exons) beschrieben worden. Die funktionelle Bedeutung dieser Varianten ist allerdings unbekannt.

Der kurze, hydrophobe transmembrane Teil der  $\beta_1$ -Untereinheit ist gerade lang genug, um die Lipiddoppelschicht der Zellmembran einfach zu durchspannen (Santoro et al., 1995).

Die extrazelluläre Region besteht aus 778 Aminosäuren (Argraves et al., 1987) und stellt den größten Teil der  $\beta$ -Kette dar. Sie beinhaltet 56 gut konservierte Cysteinreste, wovon 31 gebündelt in vier hintereinandergeschalteten, sich wiederholenden Segmenten, sogenannten „Tandem-Repeats“, zu finden sind (Calvete et al., 1991). Durch die daraus resultierende große Anzahl von Disulfidbrücken in diesem Bereich entsteht die, für das C-terminale Ende der extrazellulären Region typische Schleifenstruktur des Moleküls.

Auch am aminoterminalen Ende des Peptids zeigt sich eine durch vermehrte Disulfidbrücken hervorgerufene, stark gefaltete Tertiärstruktur. Vergleicht man verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten miteinander, so fällt auf, daß in diesem Bereich eine etwa 45 kD große, gut konservierte Region existiert. Man geht davon aus, daß diese in Verbindung mit einer Region der  $\alpha$ -Kette den ligandbindenden Teil des Integrins bildet.

Die größere Untereinheit des Integrins, die  $\alpha_2$ -Untereinheit, hat ein Molekulargewicht von 165 kD (reduziert) bzw. von 160 kD (nicht reduziert) und wird auf dem langen Arm des Chromosom 5 an Position 23-31 codiert (Jaspers et al., 1991). Vergleicht man die Sequenzen für dieses Gen von Mensch und Maus, so wird eine Homologie von teilweise 90% deutlich. In bestimmten Bereichen, wie z.B. der sogenannten I-Domäne, wird dies noch überschritten (Santoro et al., 1995).

Die  $\alpha$ -Kette besteht aus insgesamt 1181 Aminosäuren, wobei auch hier der extrazelluläre Teil sehr stark überwiegt (Takada und Hemler, 1989).

Der cytoplasmatische Teil der  $\alpha_2$ -Untereinheit umfaßt 27 Aminosäuren. Dicht an der Zellmembran gelegen befindet sich eine hochkonservierte Sequenz (GFFKR), während der restliche Teil der Aminosäuren deutlich variiert. Die Vermutung, daß dieser Sequenz eine wichtige funktionelle Bedeutung bei der Ligandbindung bzw. bei den daran anschließenden intrazellulären Abläufen zukommt (Chan et al., 1992) wird durch Untersuchungen von Kawaguchi und Mitarbeitern 1993 bzw. von Kassner et al. 1994 unterstützt. So zeigte sich, daß eine fast vollständige Deletion der cytoplasmatischen Region inklusive der GFFKR-Sequenz zu einem totalen Verlust der Bindungsaktivität führte. Deletionen der letzten 10-13 Aminosäuren am carboxyterminalen Ende hingegen hatten keinen Einfluß auf die Funktion (Kawaguchi et al., 1993, Kassner et al., 1994)

Der hydrophobe, transmembrane Teil der  $\alpha_2$ -Kette ist mit 22 Aminosäuren sehr kurz und durchspannt die Lipiddoppelschicht der Zellmembran nur einfach (Santoro et al., 1995).

Die extrazelluläre Domäne der  $\alpha_2$ -Untereinheit stellt mit 1103 Aminosäuren den größten Teil des Peptids dar. Sie besteht, im Gegensatz zu einigen anderen  $\alpha$ -Ketten, aus einer einzigen schweren Kette.

Charakteristisch für diese Untereinheit ist die siebenfache Wiederholung von Segmenten mit ähnlichen (Ähnlichkeit ca. 30%) Aminosäuresequenzen. Sie bestehen aus jeweils 28-41 Aminosäuren, die als „Repeats“ bezeichnet werden. Zwischen diesen einzelnen Repeats liegen Abschnitte von etwa 23-32 Aminosäuren. Die Repeats V, VI und VII enthalten jeweils die Sequenzen D x D/N x G(G) x x D, welche deutliche Ähnlichkeiten zu sogenannten „EF-hand motifs“ verschiedenster Kalzium- bzw. Magnesium-bindender Proteine, so z.B. Calmodulin oder Thrombospondin, aufweisen (Takada und Hemler, 1989).

Charakteristisch für die  $\alpha_2$ -Untereinheit ist die Präsenz eines 191 Aminosäuren umfassenden Abschnitts, welcher zwischen den Repeats II und III lokalisiert ist. Dieser wird als „inserted domain“ oder „interactive domain“, kurz I-Domäne, bezeichnet. Sie ähnelt in ihrer Tertiärstruktur stark der kollagenbindenden A-Domäne des von Willebrand Faktors bzw. des Cartilago Matrix Proteins. Aufgrund dieser Homologien wurde schon 1989 von Takada und Hemler eine Beteiligung dieser Region an der Ligandbindung postuliert. Kamata et al.

konnten 1994 diese Vermutung bestätigen, indem sie durch Mutationen im Bereich der I-Domäne (D<sup>151</sup> und D<sup>254</sup>) eine Aufhebung der Kollagenbindung erreichten. Gleichzeitig lokalisierten sie die Bindungsstelle inhibierender Antikörper im Bereich der I-Domäne (Aminosäure 173-259). Auch die Expression rekombinanter I-Domänen, welche eine magnesium- bzw. manganabhängige Kollagenbindung ermöglichten, verdeutlicht die Bedeutung dieses Segmentes in der  $\alpha_2$ -Untereinheit (Tuckwell et al., 1995; Estavillo et al., 1999).

Am N-terminalen Ende der I-Domäne befindet sich die sogenannte MIDAS („metal-ion-dependent adhesion site“), welche durch die Anordnung dreier Seitenketten (Aminosäurereste Ser<sup>153</sup>, Ser<sup>155</sup> und Asp<sup>254</sup>) in Kombination mit drei Wassermolekülen eine oktaedrische Vertiefung für zweiwertige, bei der Kollagenbindung essentielle, Metallionen (Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>) bildet (Emsley et al., 1997). An dieser oberflächlich gelegenen Stelle der I-Domäne bindet Kollagen mit seiner dreifach helikalen Struktur und interagiert über eine Glutaminsäurehaltige Seitenkette mit dem gebundenen Metallion (Kamata et al., 1999). Eine bedeutende Rolle bei der Kollagenbindung spielen die Aminosäuren Asp<sup>151</sup>, Thr<sup>221</sup> und Asp<sup>254</sup> in diesem Bereich, deren Mutation die Funktion des Rezeptors verhindert.

### 2.3.3 Funktionelle Aspekte des thrombozytären Integrins $\alpha_2\beta_1$

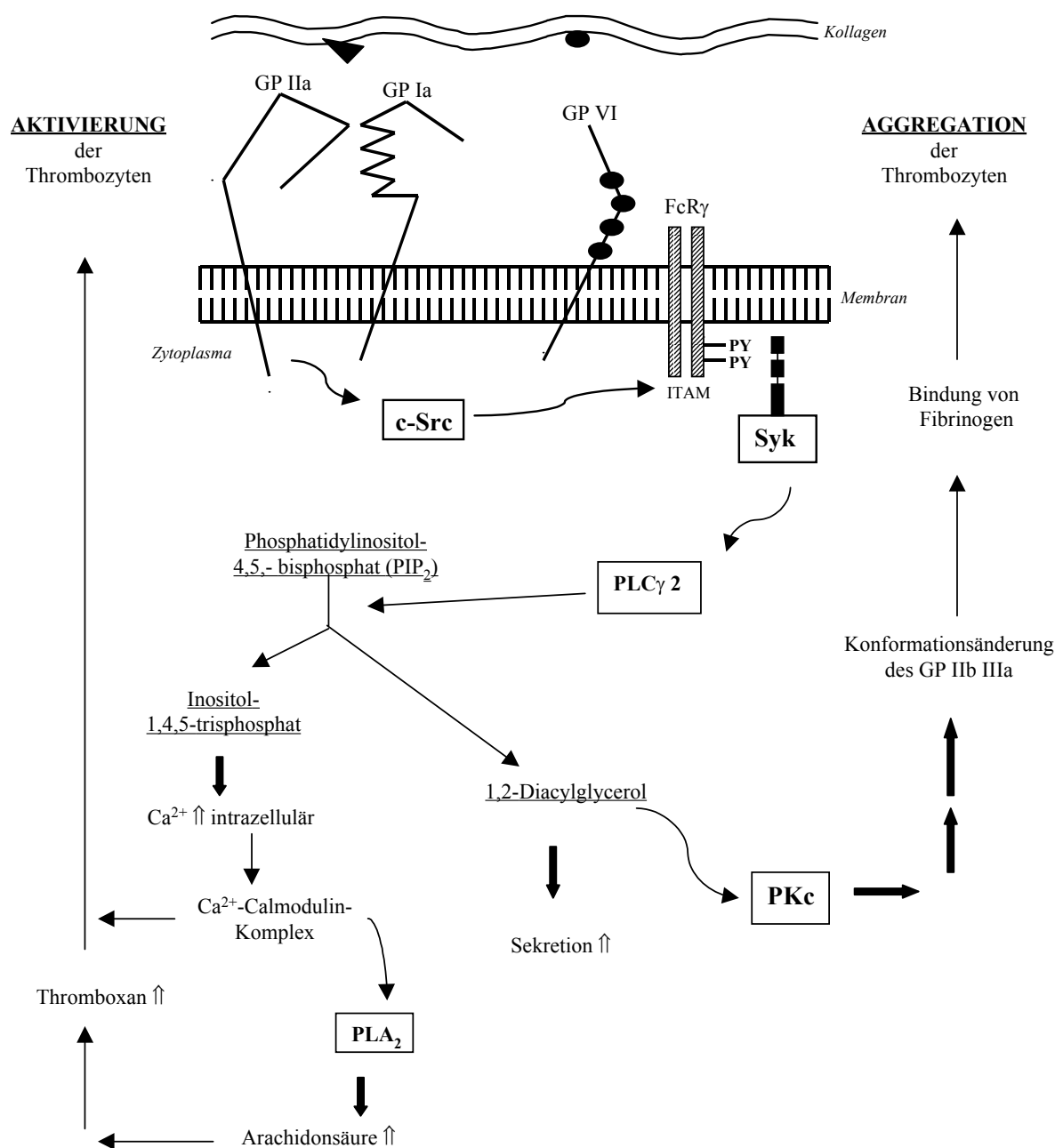
Die funktionelle Bedeutung des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  auf Thrombozyten wurde durch die Darstellung einzelner klinischer Fälle verdeutlicht. So beschreiben Nieuwenhuis et al. 1985 einen Patienten mit deutlich verlängerter Blutungszeit, dessen Thrombozyten keinerlei Reaktion auf Kollagen zeigten. Mit Hilfe von zweidimensionaler Elektrophorese konnte eine stark verminderte bis ganz fehlende Expression von GPIa auf den Thrombozyten nachgewiesen werden, was die bedeutende Rolle dieses Moleküls bei der Kollagenbindung und der anschließenden Signaltransduktion verdeutlicht. Ähnliche Beobachtungen konnten auch von Kehrel et al. 1988 bei einer Patientin mit haemorrhagischer Diathese gemacht werden. Ein von Handa et al. 1995 beschriebener Fall eines 66-jährigen Patienten mit verlängerter Blutungszeit und fehlender Antwort der Thrombozyten auf Kollagen zeigte ein vollständiges Fehlen der GPIaIIa-Expression auf Thrombozyten, wofür die vorliegende myeloproliferative Grunderkrankung verantwortlich gemacht wurde. Erstaunlicherweise war die Expression des Moleküls auf T-Lymphozyten nach deren Aktivierung nicht beeinträchtigt. Ein von Deckmyn et al. 1990 beschriebener Patient mit starker Blutungsneigung und fehlender Reaktion der Thrombozyten mit Kollagen aufgrund von Autoantikörpern gegen GPIa unterstreicht ebenfalls die Bedeutung des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  als Kollagenrezeptor auf Thrombozyten im Rahmen der Hämostase.

### *2.3.3.1 Mechanismen der Kollagenbindung und Signaltransduktion*

Der genaue Ablauf der Kollagenbindung und die sich anschließenden Stoffwechselmechanismen, welche zur Aktivierung der Thrombozyten und zur anschließenden Aggregation führen, sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch angenommen, daß daran neben dem Integrin  $\alpha_2\beta_1$  mindestens ein weiterer Kollagenrezeptor beteiligt ist. Mehrere Untersuchungen verdeutlichten, daß dem von Sugiyama et al. 1987 erstmals an Hand eines Patienten mit ITP (idiopathic thrombocytopenic purpura) mit deutlich verminderter Antwort auf Kollagen beschriebenen Molekül GPVI neben GPIaIIa eine ebenfalls bedeutende Rolle bei der Kollagenbindung zukommt. So zeigten Keely und Mitarbeiter 1996, daß nicht alle Phosphorylierungsvorgänge als Folge der Bindung an Kollagen durch spezifische Antikörper gegen GPIaIIa verhindert werden können. Sie legten die Vermutung nahe, daß das mit dem Fc $\gamma$  II Rezeptor (Fc $\gamma$ IIR) einen stabilen Komplex eingehende GPVI (Tsuji et al. 1997) einen deutlichen Beitrag am Ablauf der Aktivierungsprozesse leistet und daß nur beim Vorliegen beider Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche eine maximale Antwort auf Kollagen in Form von Aktivierung und Aggregation der Plättchen möglich ist.

Bei Untersuchungen der Phosphorylierungsvorgänge nach Kollagenbindung zeigte sich, daß bei Blutplättchen mit fehlendem GPVI eine stark verminderte Aktivität der Proteintyrosinkinase syk mit nachfolgender Verminderung der Phospholipase C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) vorliegt, während die Aktivität der Proteintyrosinkinase c-Src gleichbleibend ist (Ichinohe et al., 1997). Gleichzeitig zeigten Asselin und Mitarbeiter 1997, daß durch spezifische Liganden für GPVI eine selektive Aktivierung von syk und PLC $\gamma$ 2 bewirkt werden kann.

Diese Erkenntnisse ermöglichten Watson et al. 1998 und 1999 die Entwicklung des sogenannten „two site, two step“-Modells, welches im Folgenden in die Gesamtabläufe der Kollagenbindung einbezogen und mit diesen in Abbildung 2.2 verdeutlicht werden soll.



**Abbildung 2.2: Signaltransduktion nach Kollagenbindung**

Dargestellt sind die an der Kollagenbindung beteiligten Glykoproteine GPIa/IIa, sowie der GPVI/Fc $\gamma$ R-Komplex. Durch die Interaktion mit Kollagen erfolgt die Phosphorylierung und somit Aktivierung der Enzyme c-Src, Syk und Phospholipase $\gamma$ 2. Die anschließende Umsetzung von PIP $_2$  zu IP $_3$  und 1,2-Diacylglycerol führt über die Thromboxanbildung, die Sekretion von thrombozytärer Granula und Konformationsänderung des fibrinogenbindenden GPIIb/IIIa zur Aktivierung bzw. Aggregation der Thrombozyten.

Die primäre Bindung von Thrombozyten an Kollagen erfolgt durch Interaktion mit der ligandbindenden Stelle des Integrins  $\alpha_2\beta_1$ , wodurch eine Aktivierung der Proteintyrosinkinase c-Src erreicht wird (Ichinohe et al., 1997).

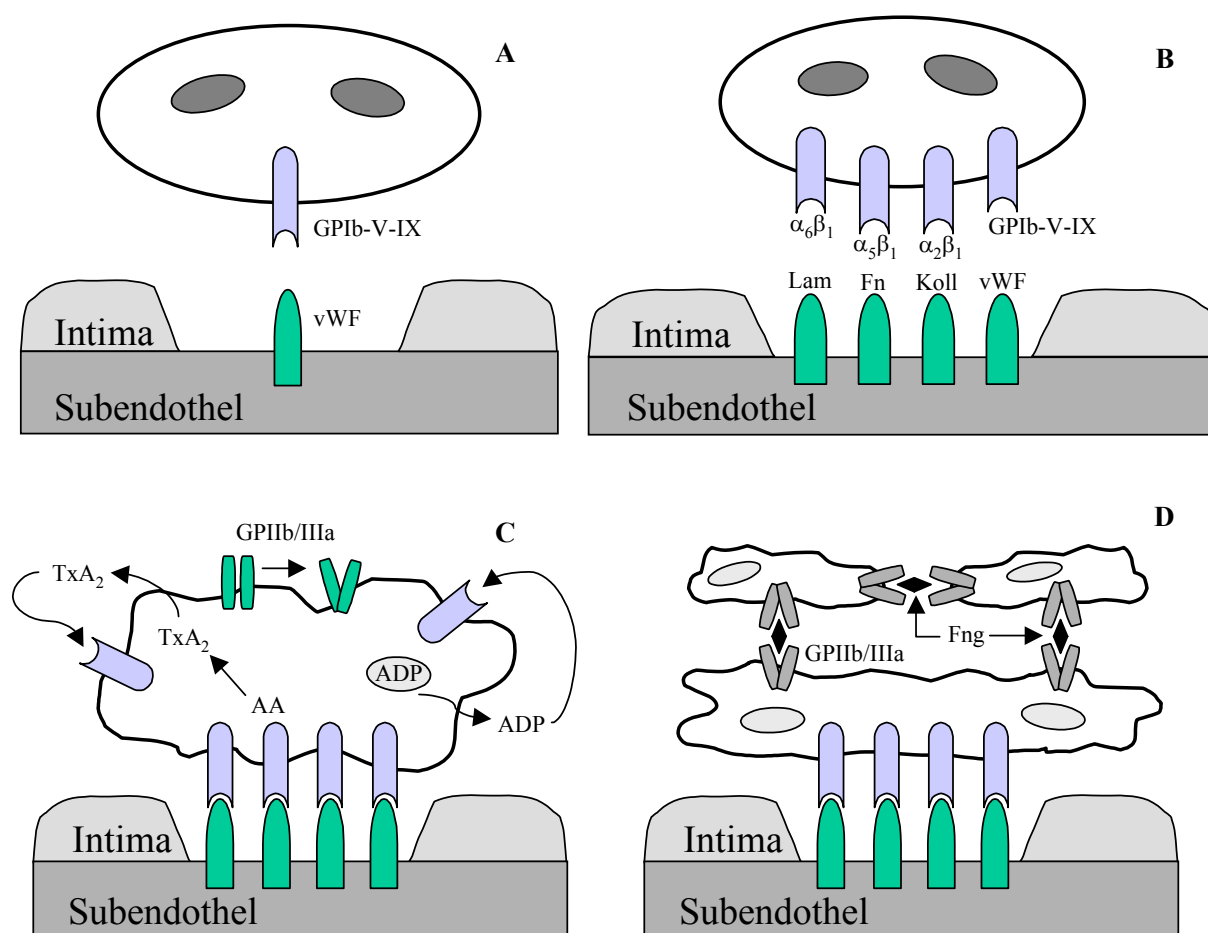
Nach der Bindung an  $\alpha_2\beta_1$  kommt es zur Annäherung des Kollagens an den Komplex GPVI/Fc $\gamma$ R, sowie zu einer gleichzeitigen Affinitätssteigerung, sodaß eine Interaktion zwischen GPVI/Fc $\gamma$ R und Kollagen begünstigt wird (Watson et al., 1999). Nach erfolgter Bindung kommt es zur Phosphorylierung zweier konservierter Tyrosinreste des sogenannten ITAMs (immunreceptor tyrosin-based activation motif) im cytoplasmatischen Teil des Fc $\gamma$ R durch die Proteinkinase c-Src. Hierdurch wird die Bindung an zwei Src-homologen Domänen (SH2) der Tyrosinkinase Syk ermöglicht (Poole et al., 1997). Dies resultiert in einer Phosphorylierung und somit einer Aktivierung der Tyrosinkinase Syk, welche im Anschluß daran, ebenfalls durch Phosphorylierung, die Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) bewirkt (Monnet et al., 2000).

Die aktivierte Phospholipase C $\gamma$ 2 katalysiert die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$ ) in 1,2-Diazylglyzerol und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$ ), welche als second messenger bei der Signaltransduktion von Bedeutung sind (Watson et al., 1999). Die Entstehung von Inositol-1,4,5-triphosphat bewirkt den Anstieg der intrazellulären Ca $^{2+}$ -Konzentration durch Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Reticulum. Durch Bindung an Calmodulin entsteht ein Ca $^{2+}$ -Calmodulin-Komplex, welcher die Aktivierung des Enzyms Phospholipase A $_2$  (PLA $_2$ ) zur Folge hat. Durch die aktivierte PLA $_2$  kommt es zur vermehrten Freisetzung von Arachidonsäure und daraus resultierend im weiteren Verlauf zu einer gesteigerten Thromboxanfreisetzung. Neben der direkten Aktivierung über den Ca $^{2+}$ -Calmodulin-Komplex erfolgt nun die Aktivierung der Thrombozyten auch über die Thromboxanrezeptoren der Zellen (Übersicht: Sixma et al., 1997).

Das bei der Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$ ) durch PLC $\gamma$ 2 ebenfalls entstehende 1,2-Diazylglyzerol bewirkt zum einen eine vermehrte Sekretion thrombozytärer, proaggregatorischer Granulaspeicherstoffe. Darüber hinaus kommt es durch 1,2-Diazylglyzerol zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKc), welche zu einer Serin- bzw. Threoninphosphorylierung der IIIa-Untereinheit des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa führt. Die somit vorliegende Aktivierung des GPIIb/IIIa-Komplexes durch Konformationsänderung resultiert in einer Bindung von Fibrinogen und hat damit die Aggregation der Thrombozyten zur Folge.

### 2.3.3.2 Ablauf der primären Hämostase

Um die Funktion des Kollagenrezeptors im Gesamtgeschehen der Hämostase einordnen zu können, soll an dieser Stelle der Ablauf der Blutgerinnung kurz aufgeführt werden. Generell kann hierbei nach der zeitlichen Abfolge in primäre und sekundäre Hämostase unterteilt werden: bei ersterer entsteht nach Adhäsion der Thrombozyten an einen Endotheldefekt und anschließender Aggregation ein primärer hämostatischer, plättchenreicher aber faserarmer Thrombus. Dieser wird nach Aktivierung der Gerinnungskaskade im Rahmen der sekundären Hämostase durch Einlagerung von Fibrin verfestigt und stellt somit den sekundären, stabileren und faserreicheren Thrombus dar.



**Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Primären Hämostase**

**A: Adhäsion – Kontaktphase:** Erste instabile Interaktion der Thrombozyten mit dem Subendothel über GPIb-V-IX und von Willebrand Faktor (vWF). **B: Adhäsion – Stabilisierungsphase:** Stabilisierung durch Interaktion der Matrixproteine mit den entsprechenden Rezeptoren: Lam=Laminin, Fn=Fibronectin, Koll=Kollagen, vWF= von Willebrand Faktor;  $\alpha_6\beta_1$ =Lamininrezeptor,  $\alpha_5\beta_1$ =Fibronectinrezeptor,  $\alpha_2\beta_1$ =Kollagenrezeptor, GPIb-V-IX= von Willebrand Rezeptor. **C: Aktivierung:** Ablauf von Stoffwechselfvorgängen mit Freisetzung von ADP (Adenosindiphosphat) und  $TxA_2$  (Thromboxan  $A_2$ ) führen zur Aktivierung der Thrombozyten. GPIIb/IIIa= Fibrinogenrezeptor. **D: Spreizung und Aggregation:** Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa und Bindung von Fibrinogen (Fng) führt zur Aggregation der sphärisch geformten Thrombozyten. (modifiziert nach Gawaz, 1999)

Da die Bedeutung des Kollagenrezeptors nur im Verlauf der primären Hämostase zum Tragen kommt, soll hier auch nur auf diesen Teil näher eingegangen werden. Abbildung 2.3 zeigt die im folgenden beschriebenen Abläufe schematisch.

Das Gesamtgeschehen der primären Hämostase kann grob in die beiden Schritte Adhäsion und Aggregation unterteilt werden (Ruggeri et al., 1994), welche in ihrem zeitlichen Verlauf weiter differenziert werden können.

Eine kritische Rolle bei der ersten Kontaktaufnahme der Thrombozyten mit dem Endotheldefekt spielt der von Willebrand Faktor (Tschopp et al., 1974), welcher als polymeres Molekül eine Brücke zwischen den im Subendothel befindlichen Matrixproteinen, so z.B. Kollagen, und dem GPIb/IX/V-Komplex auf Thrombozyten bilden kann. Diese erste, schnelle Adhäsion ist besonders beim Auftreten hoher Scherkräfte, wie sie in kleinen Arterien oder Arteriolen vorherrschen, von großer Bedeutung (Ruggeri et al., 1997; Savage et al., 1998). Untersuchungen von Moroi et al. 1996 zeigten, daß der Ablauf dieser Adhäsion in zwei Phasen unterteilt werden kann. In der ersten Phase, die auch als Kontaktphase bezeichnet wird, ist die Dichte des von Willebrand Faktors noch gering, so daß die entstehende Bindung nur schwach ausgebildet ist. In der folgenden Stabilisierungsphase nimmt die Dichte des von Willebrand Faktors durch Ablagerung aus dem Plasma oder durch Sekretion bereits aktivierter Thrombozyten zu, so daß auch die Verbindung zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix stabilisiert wird. Die eigentliche Adhäsion der Thrombozyten und somit stabile Bindung an das Subendothel jedoch erfolgt in dieser Phase durch Interaktion der verschiedenen Matrixproteine mit den entsprechenden Rezeptoren, wie z.B. Kollagen mit GPIa/IIa.

In Bereichen mit geringerer Fließgeschwindigkeit erfolgt eine Adhäsion der Thrombozyten häufig ohne Mitwirkung des von Willebrand Faktors direkt über Bindung der Matrixproteine an die speziellen Oberflächenrezeptoren (Sixma et al., 1995, 1997).

Aufgrund der Interaktionen zwischen Oberflächenrezeptoren und Liganden erfolgt die Induktion sekundärer Mechanismen, welche über verschiedenste Formen der Signaltransduktion zur Aktivierung der Thrombozyten und somit im Rahmen der Spreizung zu deren Formveränderung von discoid nach dendritisch führen. Darüberhinaus erfolgt im Rahmen dieser Prozesse nach Aktivierung der Proteinkinase C eine Serin/Threoninphosphorylierung am Fibrinogenrezeptor (GPIIb/IIIa) (Shattil et al., 1998). Der somit aktivierte Rezeptor bindet Fibrinogen als Brückenmolekül zwischen weiteren Thrombozyten, so daß als Resultat dieser Aggregation der primäre plättchenreiche Gefäßthrombus entsteht.

### 2.3.3 Antithrombozytäre Therapie

Betrachtet man die im vorangegangenen beschriebenen Mechanismen der primären Hämostase, so lassen sich fünf verschiedene Angriffsbereiche für die antithrombozytäre Therapie unterscheiden (Gawatz, 1999), welche im Folgenden kurz aufgeführt werden sollen.

#### 2.3.3.1 Erhöhung der zyklischen Nukleotide

Durch Erhöhung der zyklischen Nukleotide cAMP bzw. cGMP im Cytoplasma der Thrombozyten erfolgt eine vermehrte Bindung von intrazellulär vorliegendem  $\text{Ca}^{2+}$ . Der dadurch verminderte zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel resultiert in einer verminderten Sekretion der thrombozytären Granula und somit in einer reduzierten Aktivierung und Aggregation der Blutplättchen.

Dieser Effekt kann zum einen durch die Aktivierung der Adenylatzyklase mit Hilfe der Prostaglandine  $\text{PGE}_1$  (Alprostadi<sup>®</sup>) oder  $\text{PGI}_2$  (Epoprostenol<sup>®</sup>), bzw. auch durch Aktivierung der Guanylylzyklase (z.B. durch Nitratderivate) erreicht werden. Zum anderen führt auch die Hemmung der Phosphodiesterase, welche den Abbau von cAMP katalysiert (z.B. durch Theophyllin, Dipyrimidazol / Perisantin<sup>®</sup>) zu einer Akkumulation der zyklischen Nukleotide (Diener et al., 2000).

#### 2.3.3.2 Interaktion mit Arachidonsäuremetabolismus

Die Interaktion mit dem Arachidonsäuremetabolismus zählt zu den klassischen Ansatzpunkten der antithrombozytären Therapie, wobei hier, direkt oder indirekt, eine Verminderung der Thromboxan  $\text{A}_2$ -Wirkung erreicht werden soll. Thromboxan  $\text{A}_2$  wirkt zum einen vasokonstriktorisch, zum anderen bewirkt es über den spezifischen Thromboxanrezeptor auf der Plättchenoberfläche die Sekretion thrombozytärer Granula und trägt so zur Aggregation der Thrombozyten bei.

Als häufigstes Therapeutikum wird in diesem Bereich die Acetylsalicylsäure (Aspirin<sup>®</sup>) eingesetzt, welche durch Acetylierung eines Serins am N-terminalen Ende der Cyclooxygenase die irreversible Blockade dieses Enzyms bewirkt und somit die Bildung von Zykloendoperoxid  $\text{PGG}_2$  verhindert (Paciaroni et al., 2000). Die nachfolgende Synthese von Thromboxan  $\text{A}_2$ , welche durch das Enzym Thromboxansynthetase katalysiert wird, ist somit ebenfalls nicht mehr möglich. Substanzen wie Ozagrel hemmen als Inhibitoren der Thromboxansynthetase direkt diesen letzten Schritt der Thromboxan  $\text{A}_2$ -Synthese. Als weitere Möglichkeit der Interaktion mit dem Arachidonsäuremetabolismus sei die Antagonisierung des Thromboxanrezeptors durch Ridogrel oder Nidogrel genannt.

### 2.3.3.3 Interaktion mit Aktivierungsrezeptoren

Thienopyridine, wie z.B. Ticlopidin (Tiklyd<sup>®</sup>) oder Clopidogrel (Plavix<sup>®</sup>), wirken nach Metabolisierung in der Leber über eine irreversible Blockade des ADP-Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche aktivierend auf die Adenylatzyklase, was zu einem intrazellulären Anstieg der cAMP-Konzentration führt. Der dadurch erniedrigte Ca<sup>2+</sup>-Spiegel im Zytoplasma bewirkt eine verminderte Sekretion der thrombozytären Granula und somit eine verminderte Aggregationsbereitschaft und Aktivierung der Thrombozyten.

Die Hemmung des Thrombinrezeptors, welcher an aktivierende G-Proteine gekoppelt ist und über Stoffwechselmechanismen zur Aktivierung der Plättchen führt, aber auch die Blockade des Serotoninrezeptors mit Ketaserin, die eine Aktivierung der Phospholipase C und somit die Synthese von Inositol-1,4,5-Triphosphat bzw. 1,2-Diazylglyzerol verhindert, stellen weitere Ansatzpunkte zur antithrombozytären Therapie dar.

### 2.3.3.4 Hemmung der Aggregation

Eine relativ neue Gruppe antithrombozytärer Therapeutika umfaßt Inhibitoren des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa, welcher in aktiviertem Zustand Fibrinogen als Brückenmolekül bindet und somit die Aggregation der Thrombozyten bewirkt. Durch Blockade dieses letzten Schrittes der Thrombusbildung können vorangegangene proaggregatorische Wege ebenfalls beeinträchtigt werden, was die Effizienz dieser Therapeutika verdeutlicht (Mascelli et al., 1999). Bei der ersten, von Coller entwickelten und 1994 zugelassenen Substanz Abciximab (ReoPro<sup>®</sup>) handelt es sich um einen modifizierten, murinen Antikörper gegen GPIIb/IIIa, dessen komplementbindender Fc-Teil entfernt und dessen konstanter Bereich des Fab-Teils zwecks Minimierung der immunogenen Reaktion gegen humane Sequenzen ausgetauscht worden sind (Coller et al., 1995; Tchong et al., 1994). Im caninen Tiermodell wurde die Fähigkeit dieses Moleküls, eine schnelle Reperfusion nach ischämischen Zuständen zu erreichen, bzw. einer erneuten Stenose effektiv entgegenzuwirken, deutlich (Gold et al., 1988).

In der Zwischenzeit sind weitere GPIIb/IIIa-Antagonisten im klinischen Einsatz, so z.B. das zyklische Heptapeptid Integrilin (Eptifibatid<sup>®</sup>), welches über die RGD-Sequenz ebenfalls kompetitiv an den Rezeptor bindet, oder die nicht peptidischen Substanzen Tirofiban (Aggrestat<sup>®</sup>) und Lamifiban, die über geometrische und Oberflächenladungs-Eigenschaften sehr selektiv mit GPIIb/IIIa interagieren.

Alle Substanzen binden, im Gegensatz zu Fibrinogen, auch am nicht aktivierten Rezeptor, wodurch dieser aktiviert und zur Fibrinogenbindung befähigt wird. Bei niedrigen Wirkspiegeln haben diese Therapeutika also durchaus einen proaggregatorischen Effekt. Darüberhinaus können Interaktionen mit anderen Oberflächenrezeptoren (Mac-1, Vitronectinrezeptor  $\alpha_v\beta_3$ ) Vorgänge wie z.B. Migration, Adhäsion oder Proliferation verschiedener Zellarten beeinflussen. Desweiteren ist besonders für ReoPro® das vereinzelte Auftreten unerwünschter Blutungen nach Eingriffen bzw. hochgradiger Thrombopenien bekannt (Jubelirer et al., 1999).

#### *2.3.3.5 Hemmung der Adhäsion*

Ein neu ins Augenmerk gerückter Ansatzpunkt für antithrombozytär wirkende Pharmaka stellt die Blockade der für die Adhäsion der Thrombozyten notwendigen Rezeptoren GPIIb/IIIa und GPIa/IIa durch Antikörper dar. Die somit deutlich verminderte Adhäsion der Blutplättchen an geschädigtes Endothel resultiert in einer deutlich verminderten Thrombusbildung. Untersuchungen diesbezüglich wurden bisher mit einem stark die Interaktionen zwischen von Willebrand Faktor und GPIIb/IIIa inhibierenden und von Kageyama und Mitarbeitern 1997 entwickelten Antikörper im Meerschweinchen-Tiermodell durchgeführt (Ikeda et al., 2000). Es zeigte sich eine deutliche Verlängerung der ischämischen Verschlusszeit in Abhängigkeit zur Dosis, wobei im Vergleich zu dem GPIIb/IIIa-Inhibitor Lamifiban die Blutungszeit im effektiven Dosisbereich nicht signifikant verlängert war. Diese Ergebnisse lassen ansatzweise die mögliche Bedeutung dieser Substanzgruppe für einen prophylaktischen bzw. therapeutischen Einsatz erkennen.

Ob auch der Einsatz inhibierender Substanzen gegen GPIa/IIa auf Thrombozyten ähnliche Resultate zeigt, ist bisher noch nicht bekannt.

## 2.4 Heterogenität des $\alpha_2$ -Integrins

### 2.4.1 Allgemeines

Als Heterogenität des  $\alpha_2$ -Integrins soll hier die Verschiedenartigkeit dieser Untereinheit in vier verschiedenen Bereichen dargestellt werden. Hierunter fällt zum einen das Auftreten von missense Mutationen, welche eine Tertiärstrukturveränderung des Moleküls zur Folge haben. Im Gegensatz dazu stehen Mutationen, die ohne Strukturänderungen einhergehen, wohl aber eine Veränderung der Expressionsdichte bewirken. Eine weitere Form von Heterogenität findet sich in Funktionsunterschieden, welche aufgrund der Expression des Moleküls auf verschiedenen Zellen entstehen. Als viertes sei noch die These erwähnt, daß mit Hilfe monoklonaler Antikörper verschiedene Subpopulationen des  $\alpha_2$ -Integrins detektiert werden können. Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Formen der Heterogenität findet im Folgenden statt.

### 2.4.2 Missense Mutation –Entstehung von Alloantigenen

Missense Mutationen sind durch Basenaustausch entstandene Veränderungen eines Basentriplets, welche während der Translation eine Änderung der Aminosäuresequenz und somit der Tertiären Struktur des Proteins zur Folge haben. Für die  $\alpha_2$ -Untereinheit codierende Gen sind bisher zwei dieser Missense Mutationen beschrieben worden: das Br- und das Sit-Allel, welche hier bzgl. ihrer funktionellen und klinischen Bedeutung näher beschrieben werden sollen.

#### 2.4.2.1 Br-Allel (HPA 5)

Die erstmalige Publikation des Br<sup>a</sup>- Allels, sowie des antithetischen Allels Br<sup>b</sup> erfolgte 1988 bzw. 1989 im Zusammenhang mit dem Auftreten von Neonataler Alloimmunthrombozytopenie (NAIT) durch Kiefel und Mitarbeiter. Weitere Untersuchungen dieser Antigene verdeutlichten ihre Lokalisation auf der  $\alpha_2$ -Untereinheit des thrombozytären Kollagenrezeptors (Santoso et al., 1989). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß sowohl Br<sup>a</sup>, als auch Br<sup>b</sup> nicht nur auf Thrombozyten exprimiert werden, sondern auch auf aktivierten T-Lymphozyten (Santoso et al., 1989b), sowie auf Endothelzellen (Giltay et al., 1989) zu finden sind. Die Aufdeckung eines einzigen Polymorphismus an Position 1648 des Gens als verantwortliche Veränderung zur Entstehung der Br-Alloantigene erfolgte 1993 durch die Arbeitsgruppe Santoso (Santoso et al., 1993b) und wurde 1994 von Simek et al. bestätigt.

Demzufolge liegt dem auf Exon 13 lokalisierten Polymorphismus ein Basenaustausch von A ( $Br^a$ ) nach G ( $Br^b$ ) zugrunde, sodaß das codierende Triplet von AAG nach GAG verändert wird. Der daraus resultierende Aminosäureaustausch an Position 505 des Polypeptids (Glutaminsäure anstelle von Lysin) führt zu Strukturveränderungen der  $\alpha_2$ -Untereinheit zwischen der ersten und zweiten metallionenbindenden Stelle des Moleküls.

Die Vererbung der Br-Allele erfolgt autosomal codominant; ihre Genfrequenz in der Kaukasischen Bevölkerung wird mit 0,8890 für  $Br^b$  und 0,1110 für  $Br^a$  angegeben (Santoso et al., 1989; 1993).

Ein Unterschied zwischen  $Br^a$ - und  $Br^b$ - Trägern, welcher auf eine funktionelle Bedeutung der beiden Allele schließen lassen würde, ist bisher nicht bekannt. So beschreiben Santoso und Mitarbeiter 1993, daß die Adhäsionsfähigkeit der Thrombozyten von  $Br^a$ - bzw.  $Br^b$ - Individuen an fibrilläres Kollagen in etwa gleich ist.

Aufgrund der funktionellen Bedeutung des Glykoproteins GPIa/IIa bei der Hämostase wurde in einer Studie (Kroll et al., 2000) der Zusammenhang zwischen der Entstehung und dem Verlauf von akutem Myokardinfarkt bzw. Koronarer Gefäßkrankheit und der Präsenz der beiden Br-Allele untersucht. Bei Betrachtung der Gesamtstudie konnte eine Assoziation und somit ein Einfluß des Polymorphismus auf beide Erkrankungen ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der sogenannten „Gruppe niedrigen Risikos“, d.h. Patienten mit einer hohen ApoAI / ApoB-Ratio und / oder Nicht- bzw. Exraucher, zeigte bei Koronarer Gefäßkrankheit im Vergleich zur Kontrollgruppe eine vermehrte Präsenz des Genotyps  $Br^b/Br^b$ , wodurch ein protektiver Einfluß des  $Br^a$ -Allels postuliert werden kann.

Klinische Bedeutung haben die Br-Alloantigene insbesondere im Rahmen der Immunisierung, die z.B. bei den Krankheitsbildern der Neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (NAIT), der Posttransfusionalen Purpura (PTP) oder auch des Refraktärzustandes nach Transfusion von Thrombozytenkonzentraten zum Ausdruck kommt (siehe hier auch 2.4.2.4 - 2.4.2.6).

#### 2.4.2.2 *Sit-Allel (HPA 13)*

Das Sit-Allel, auch als Human Platelet Alloantigen 13 (HPA 13) bezeichnet, wurde erstmals 1997 von Santoso et al. im Zusammenhang mit einem Fall von schwerer NAIT beschrieben. Bei diesem auf Exon 20 lokalisierten Polymorphismus handelt es sich um einen Basenaustausch an Position 2531 von C (Sit<sup>a</sup>) nach T (Sit<sup>b</sup>). Der daraus resultierende Austausch der Aminosäure Threonin gegen Methionon an Position 799 des Polypeptids ist begleitet von einer Änderung der Tertiärstruktur. Klinisch gesehen spielt das Sit-Allel im Rahmen einer Alloimmunisierung in einigen Fällen eine Rolle bei der Entstehung von NAIT. Funktionelle Untersuchungen zeigten eine verminderte, durch Kollagen induzierte Aggregation Sit<sup>a</sup>-positiver Thrombozyten, wohingegen die Adhäsion an immobilisiertes Kollagen jedoch normal ist (Santoso et al., 1999).

#### 2.4.2.3 *Durch thrombozytäre Alloantikörper induzierte Krankheitsbilder*

Zu den wichtigsten, durch Alloantikörper gegen Thrombozytenantigene hervorgerufenen Krankheitsbildern gehören die im Folgenden dargestellte Neonatale Alloimmunthrombozytopenie (NAIT), die posttransfusionelle Purpura (PTP) und der Refraktärzustand nach Transfusion.

#### 2.4.2.4 *Neonatale Alloimmunthrombozytopenie (NAIT)*

Bei der Neonatalen Alloimmunthrombozytopenie, kurz NAIT, handelt es sich um eine durch maternale Alloantikörper gegen paternale Antigene kindlicher Zellen hervorgerufene Thrombozytopenie des Neonaten, die im Gegensatz zum Morbus haemolyticus neonatorum auch im Rahmen der ersten Gravidität auftreten kann. Thrombozytenwerte von durchschnittlich  $30 \times 10^9$  Zellen/l führen in der Regel bei 9 von 10 Fällen zu haemorrhagischen Diathesen, die sich z.B. in intrazerebralen oder gastrointestinalen Blutungen widerspiegeln (Müller-Eckhardt et al., 1989). Anti-Br<sup>a</sup> mit 19% der Fälle scheint neben Anti-Zw<sup>a</sup> (26%) die zweit häufigste Ursache für die NAIT in der deutschen bzw. französischen Bevölkerung zu sein (Kaplan et al., 1991). Betrachtet man den Verlauf der Erkrankung, so ist dieser im Allgemeinen bei einer Immunisierung gegen Br schwächer ausgeprägt, da hier nur weniger als 50% der Fälle mit Thrombozytopenie klinisch auffällig werden (Kaplan et al., 1991).

#### 2.4.2.5 Posttransfusionale Purpura (PTP)

Posttransfusionale Purpura, kurz PTP, ist eine Erkrankung, bei der es etwa fünf bis zehn Tage nach Transfusion von Vollblut, Erythrozytenkonzentrat oder Frischplasma zu einer meist ausgeprägten Thrombozytopenie ( $10 \times 10^9$  Zellen/l) mit gastrointestinalen oder urogenitalen Blutungen kommt (Müller-Eckhardt, 1986; Christie et al., 1991). Die ursächliche Immunisierung gegen Fremdalloantigene, hier sind besonders  $PI^{A1}$ ,  $PI^{A2}$ ,  $Bak^a$  aber auch  $Br^a$  zu nennen, erfolgt meist in Form vorangegangener Schwangerschaften bzw. Transfusionen und führt nach weiterer Transfusion zu einem Abbau der autologen Thrombozyten (Christie et al., 1991). Der genaue Mechanismus der Erkrankung ist allerdings noch nicht geklärt.

#### 2.4.2.6 Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusion

Bei dem sogenannten Refraktärzustand nach Transfusion von Thrombozytenkonzentraten handelt es sich um einen durch vermehrten Abbau der Spenderthrombozyten bedingten Zustand der Thrombozytopenie. Auch hier erfolgt die Immunisierung durch vorangegangene Schwangerschaften bzw. Bluttransfusionen. Bei dieser Form der Erkrankung kommt es jedoch, ganz im Gegensatz zur PTP, zum Abbau homologer Thrombozyten.

### 2.4.3 Silent Mutation – Varianz der Expression

Unter Silent Mutationen, die auch als „Nonsense oder Stumme Mutationen“ bezeichnet werden, versteht man Änderungen einzelner Basentriplets eines Gens durch Austausch einer Base. Da hierbei häufig die dritte Base eines Triplets betroffen ist, bleibt die Punktmutation ohne Einfluß auf die codierte Aminosäure und somit, im Gegensatz zur Misense Mutation, auch ohne Einfluß auf die Tertiärstruktur des Polypeptids. Für das, die  $\alpha_2$ -Untereinheit codierende Gen sind die im Folgenden beschriebenen Silent Mutationen an Position 807, Position 873 und Position 837 von Interesse, wobei ersterer die überwiegende Bedeutung zukommt.

#### 2.4.3.1 Position 807:

Die von Kunicki et al. 1997 erstmals beschriebene Stumme Mutation an Position 807 ist auf Exon 7 des die  $\alpha_2$ -Untereinheit codierenden Gens lokalisiert. An dieser Stelle erfolgt ein Basenaustausch von Cytosin nach Thymin, was eine Änderung des Triplets von TTC nach TTT bewirkt. Die durch dieses Basentriplett codierte Aminosäure Phenylalanin ( $^{224}\text{Phe}$ ) und somit auch die Tertiärstruktur des Polypeptids bleiben unverändert.

Die Genfrequenz dieses Polymorphismus wurde von Rainer und Mitarbeitern 1998 untersucht und ergibt eine Verteilung von C: 0,664 und T: 0,336.

#### 2.4.3.2 Position 873:

Ebenfalls von Kunicki et al. 1997 erstmals beschrieben wurde der Basenaustausch an Position 873. Bei dieser auf Exon 8 des  $\alpha_2$ -codierenden Gens lokalisierten Mutation wird Adenin gegen Guanin ausgetauscht, was eine Änderung des Triplets von ACA nach ACG bewirkt. Die entsprechende Aminosäure Threonin ( $^{246}\text{Thr}$ ) ändert sich jedoch nicht.

#### 2.4.3.3 Position 837:

Dieser von Rainer et al. 1998 erstmals beschriebene und von Kritzik 1989 bestätigte Basenaustausch von Cytosin nach Thymin an Position 837 liegt ebenfalls auf Exon 8 und resultiert in folgender Veränderung des Triplets: GCC / GCT. Auch hier bleibt die durch dieses Triplet kodierte Aminosäure ( $^{234}\text{Ala}$ ) unverändert.

#### 2.4.3.4 Kopplung der Mutationen:

Untersuchungen von Kunicki und Mitarbeitern 1997 ergaben Hinweise, die auf eine Kopplung der Polymorphismen an den Positionen 807 und 873 schließen ließen. Diese konnten von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden (Rainer et al., 1998; Kritzik et al., 1998). So bilden 807C und 873G bzw. 807T und 873A jeweils ein Allel.

Eine weiterer Zusammenhang wurde zwischen der Silent Mutation an Position 807 und der Missense Mutation an Position 1648 festgestellt. So ist Br<sup>a</sup> (1648A) immer mit 807C gekoppelt.

Darüber hinaus wurde eine Kopplung dieser drei Polymorphismen mit der Stummen Mutation an Position 837 postuliert, was die Formulierung dreier verschiedener Allele zur Folge hatte: Allel 1: (807T / 837T / 873A / Br<sup>b</sup>), Allel 2: (807C / 837T / 873G / Br<sup>b</sup>) und Allel 3: (807C / 837C / 873G / Br<sup>a</sup>) (Kritzig et al., 1998).

#### 2.4.3.5 Funktionelle und klinische Bedeutung der Mutationen

Bestimmungen der Dichte des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrins auf der Thrombozytenoberfläche zeigten eine deutliche Varianz in den Zahlenangaben: So beschreiben Pischel et al. 1987 eine Dichte von 1800 Molekülen/Zelle, während Coller et al. 1989 nur ca 800 Moleküle/Zelle nachweisen können. Eine von Kunicki et al. 1993 angefertigte Studie zu diesem Phänomen zeigt eine deutliche, bis zu vierfache Varianz der Oberflächendichte zwischen einzelnen Individuen, die mit einer bis zu 20-fach veränderten Bereitschaft zur Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen Typ I einhergeht.

Kunicki et al. gelang es schließlich 1997, einen Zusammenhang zwischen dieser Varianz und den beiden Stummen Mutation an Position 807 bzw. 873 nachzuweisen. So zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein des Allels 807T, welches mit 873A gekoppelt ist, und einer deutlich höheren Dichte von  $\alpha_2\beta_1$  auf der Thrombozytenoberfläche. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Vorhandensein des Allels 807C, gekoppelt mit 873G, eine geringe Rezeptordichte. Heterozygote Individuen wiesen mittlere Werte auf. Diese Aussage konnte unter anderem von Corral et al. 1999a mit folgenden Zahlen bestätigt werden: C807C-homozygot:  $2600 \pm 846$  Moleküle/Zelle, T807T-homozygot:  $6622 \pm 2167$  Moleküle/Zelle, bzw. C807T heterozygote Individuen:  $3967 \pm 198$  Moleküle/Zelle.

Versuche, einen Zusammenhang zwischen der variierenden Oberflächendichte und dem Polymorphismus an Position 1648 (Br-Allel) herzustellen, zeigten differierende Ergebnisse: während Kunicki et al. 1993 einen Zusammenhang deutlich ausschlossen, zeigten Corral et al. 1999(b) Hinweise, daß die Varianz der Rezeptordichte neben C807T auch durch das Br-Allel beeinflusst sein könnte. Eine eindeutige Klärung des Sachverhaltes erfolgte bisher jedoch noch nicht.

Interessant ist, daß diese Varianz in der Oberflächendichte des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrins nicht nur auf Thrombozyten, sondern auch auf aktivierten T-Lymphozyten und Monozyten zu finden ist (Corral et al., 1999a).

Funktionell gesehen zeigen Individuen mit hoher Rezeptordichte (807T-homozygot) sowohl unter statischen Bedingungen, als auch bei Zuständen, die den Scherkräften in arteriellen Gefäßen nachempfunden wurden, eine deutlich größere Bereitschaft zur Adhäsion an Kollagen I als 807C-homozygote Individuen. Die Geschwindigkeit und Intensität der

Adhäsion von GPIa/IIa an Kollagen korreliert also mit der Rezeptordichte und ist somit abhängig vom Genotyp (807C oder T) (Kritzik et al., 1998).

Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Tatsache, daß fibrilläres Kollagen als Hauptbestandteil subendotheler Matrix deutlich zur Thrombusbildung beiträgt, lag die Frage nach dem Zusammenhang der Oberflächendichte des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrins und einem möglichen Risiko für die Entstehung thrombotischer Erkrankungen bzw. Erkrankungen mit erhöhter Blutungsneigung nahe.

Nachdem eine Untersuchung von Moshfegh et al. 1999 an Patienten mit akutem Myokardinfarkt erste Hinweise auf einen solchen Zusammenhang lieferte, zeigte eine von Santoso et al. 1999 durchgeführte Studie an einem Gesamtkollektiv von 2237 Patienten mit Koronarer Gefäßkrankheit bzw. Myokardinfarkt keinen Einfluß der höheren Rezeptordichte (807T-hetero- bzw. homozygote Individuen) auf die Entstehung bzw. den Verlauf der Erkrankungen des Gesamtkollektivs. Bei Betrachtung der Patienten unterhalb des Durchschnittsalters von 62 Jahren allerdings wurde eine starke Assoziation zwischen dem Auftreten von Myokardinfarkt und der Präsenz des T-Allels deutlich. Dieser Zusammenhang zeigte sich besonders bei Patienten im Alter von 49 Jahren und jünger.

In einer deutlich kleineren, japanischen Studie bei 210 Patienten mit Myokardinfarkt hingegen finden sich keine Hinweise auf ein gesteigertes Risiko durch die Präsenz des Allels 807T (Morita et al., 2001).

Ein ähnliches Ergebnis präsentierte eine Untersuchung von Patienten mit Schlaganfall (Carlsson et al., 1999), bei der ebenfalls eine deutlich erhöhte Präsenz des <sup>807</sup>T-Allels in der Gruppe jüngerer Patienten (50 Jahre und jünger) festzustellen war. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß das Vorhandensein eines 807T-Allels (gekoppelt mit 873A) und die daraus resultierende gesteigerte Dichte des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrins auf der Thrombozytenoberfläche bei jüngeren Patienten mit thrombotischen Erkrankungen durchaus einen hereditären Risikofaktor darstellen kann, während bei älteren Patienten eher andere, erworbene Risikofaktoren, wie z.B. Übergewicht, Rauchen o.ä. überwiegen.

Untersuchungen an Patienten mit Typ I der von Willebrand Krankheit, einer relativ häufig auftretenden, vererbten Blutungsstörung mit quantitativem Verlust des von Willebrand Faktors, zeigten im Vergleich zum Kontrollkollektiv eine deutlich erhöhte Genfrequenz des 807C-Allels mit daraus resultierender geringer Dichte des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrins auf der

Thrombozytenoberfläche. Die damit verminderte Effizienz der Plättchenadhäsion an Kollagen und somit gesteigerte Blutungsneigung scheint die Ursache für bisher nicht erklärbare Varianz klinischer Symptome bei Patienten mit ähnlichen Laborparametern zu sein (Di Paola et al., 1999).

Im Rahmen einer Studie bei Patienten mit Retinopathie als Sekundärerkrankung bei Diabetes mellitus Typ II konnte der Einfluß des vorhandenen Genotyps auf die Häufigkeit dieser Erkrankung gezeigt werden. So scheint die Präsenz des 807T / 873A-Allels einen Risikofaktor bei der Entstehung dieser Form der Retinopathie darzustellen (Matsubara et al., 2000).

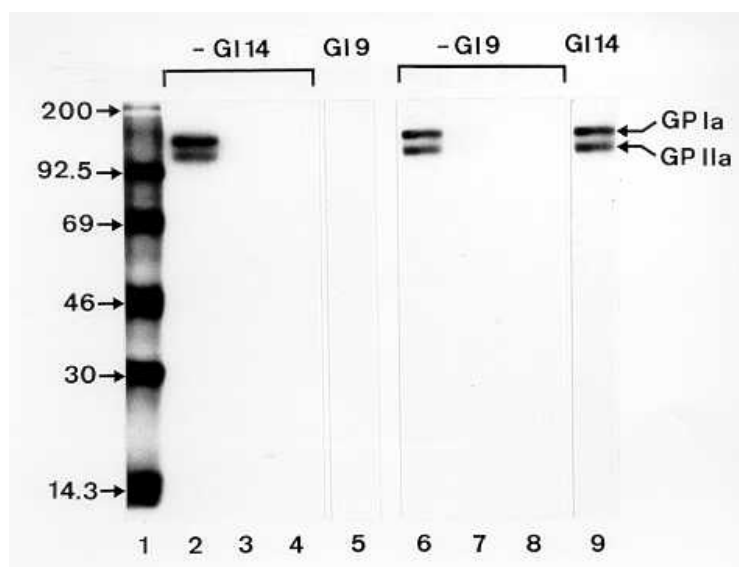
#### 2.4.4 Zellarten – Funktionsunterschiede

Diese Form der Heterogenität wird durch Unterschiede in der Ligandspezifität des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrins in Abhängigkeit vom Zelltyp zum Ausdruck gebracht. So wurde anfänglich nur Kollagen als spezifischer Ligand für diesen Rezeptor sowohl auf Thrombozyten (Nieuwenhuis et al., 1985; Staatz et al., 1989), als auch auf Fibroblasten (Takada et al., 1988; Kunicki et al., 1988) und humanen Melanomzellen (Kramer et al., 1989) beschrieben. Untersuchungen von Elices et al. 1989 jedoch zeigten, daß  $\alpha_2\beta_1$ , exprimiert auf Zellen der humanen Melanomzelllinie LOX, nicht nur mit Kollagen, sondern auch mit Laminin interagieren kann, während diese Fähigkeit auf Thrombozyten und Fibroblasten nicht vorzuliegen scheint. Eine Bindung von Laminin durch das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  konnte ebenfalls auf Endothelzellen nachgewiesen werden (Languino et al., 1989). Untersuchungen von Chan und Mitarbeitern 1993 zu diesen Beobachtungen bestätigten die Aussagen und zeigten die Präsenz dreier verschiedener Funktionsstadien des Integrins  $\alpha_2\beta_1$ . Die als sogenannte O-Form bezeichnete Variante wird auf undifferenzierten Zellen, wie z.B. Erythroleukämischen Zellen der Linie K562, exprimiert und bindet weder Kollagen noch Laminin. Die nur mit Kollagen interagierende C-Form wird auf Thrombozyten und Fibroblasten exprimiert. Eine dritte funktionelle Variante des Rezeptors ist die auf Endothelzellen und teilweise auf Epithelzellen zu findende CL-Form, welche sowohl Kollagen, als auch Laminin binden kann. Als Ursachen für das Auftreten der verschiedenen Funktionsformen des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrins sind nach Chan und Mitarbeitern Strukturunterschiede bzw. eine variierende Oberflächendichte des Rezeptors auszuschließen. Vielmehr wird eine Prägung des Bindungsverhaltens durch die exprimierenden Zellen postuliert.

Interessanterweise lassen sich sowohl die O-, als auch die C- Form durch Bindung eines aktivierenden, gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit gerichteten, Antikörpers in die Kollagen und Laminin bindende CL-Form konvertieren. Hierfür werden direkte Konformationsänderungen nach Bindung des Antikörpers, sowie eine Beeinflussung des Stoffwechsels verantwortlich gemacht.

### 2.4.5 Monoklonale Antikörper – Erkennung verschiedener Subpopulationen

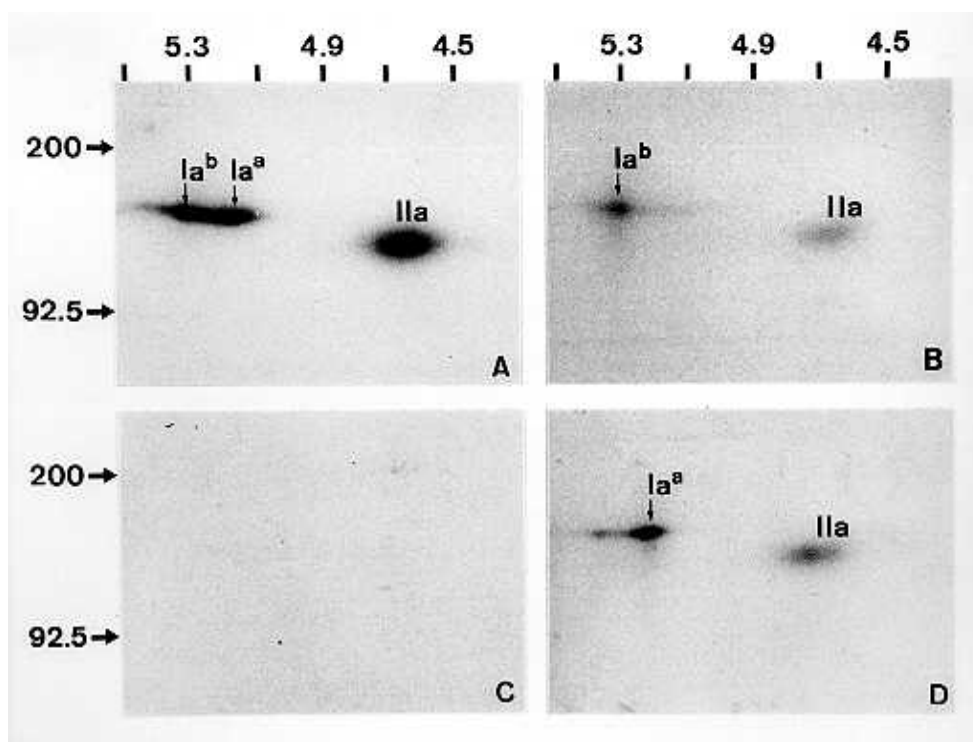
Weiterführende, bisher noch nicht publizierte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe im Rahmen der Immunpräzipitation humaner Thrombozyten mit zwei gegen die  $\alpha_2$ -Untereinheit gerichteten monoklonalen Antikörpern lassen vermuten, daß eine Erkennung verschiedener  $\alpha_2$ -Subpopulationen möglich ist. Abbildung 2.4 zeigt die Ergebnisse der eindimensionalen Elektrophorese: während nach vorangegangener dreimaliger Präzipitation mit dem Antikörper Gi14 keine Immunpräzipitation mit dem mAk Gi9 mehr möglich war, zeigten sich im umgekehrten Fall bei vorangegangener Präzipitation mit Gi9 deutlich spezifische Banden für GPIa/IIa bei angeschlossener Präzipitation mit Gi14. Die in Abbildung 2.5 dargestellten Ergebnisse einer zweidimensionalen Elektrophorese zeigen, daß mit Hilfe von Gi14 zwei Varianten des GPIa-Moleküls (GPIa<sup>a</sup> und GPIa<sup>b</sup>) detektiert werden können, während Gi9 nur mit einer  $\alpha_2$ -Subpopulation interagiert. Darüber hinaus bestätigen sich hier die oben beschriebenen Beobachtungen, denn Gi14 zeigt in der 2-D-Elektrophorese spezifische Präzipitate trotz vorangegangener Präzipitation mit Gi9.



**Abbildung 2.4: Eindimensionale Elektrophorese nach Immunpräzipitation humaner Thrombozyten im SDS-Page**

GPIa/IIa läßt sich sowohl mit Gi14, als auch mit Gi9 bei der jeweils ersten Präzipitation (Bahn 2 bzw. Bahn 6) darstellen. Bei der an die vorangegangene Präzipitation mit Gi14 angeschlossenen Immunpräzipitation mit Gi9 zeigen sich keine spezifischen Banden (Bahn 5). Bei vorangegangener Präzipitation mit Gi9 können bei anschließender Präzipitation mit Gi14 spezifische Banden für das Molekül GPIa/IIa detektiert werden.

Aus diesem Grund postulieren wir das Vorliegen von  $\alpha_2$ -Subpopulationen als weitere Form der Heterogenität des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin, welche mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern detektiert werden können. Bei diesen beiden  $\alpha_2$ -Subpopulationen (GPIa<sup>a</sup> und GPIa<sup>b</sup>) handelt es sich aufgrund der verschiedenen isoelektrischen Punkte wahrscheinlich nur um unterschiedliche Glykosylierungsgrade der GPIa-Untereinheit. Die Rolle dieser heterogenen Glykosylierungsprozesse ist bisher jedoch nicht bekannt.



**Abbildung 2.5: Zweidimensionale Elektrophorese nach Immunpräzipitation humaner Thrombozyten**

**A:** Für das Molekül GPIa/IIa spezifische Präzipitation mit Gi14, deutlich darstellbar die beiden GPIa-Subpopulationen GPIa<sup>a</sup> und GPIa<sup>b</sup>. **B:** Spezifisches Ergebnis der Präzipitation von GPIa/IIa mit Gi9. **C:** Nach vorangegangener Präzipitation mit Gi14 ist eine Präzipitation mit Gi9 nicht mehr möglich. **D:** Detektion der Subpopulationen GPIa<sup>a</sup> mit Gi14 nach vorangegangener Präzipitation mit Gi9.

## 3 Material

### 3.1 Reagenzien

- ACD-Formula A (NPBI, Reende, Niederlande)
- Agarose *Seakem GTG* (Biozym, Hess. Oldendorf)
- Agarose *Ultra pure Agarose* (Gibco, Paisley, Scotland)
- Aqua dest. (groß) (Baxter, Unterschleißheim)
- Aqua dest. für PCR-Ansätze (Braun, Melsungen)
- DNA Polymerase *AmpliTaq Gold™* (Perkin Elmer, Vaterstätten)
- DNA Polymerase *Gene Amp. XL PCR-Kit* (Perkin Elmer, Vaterstätten)
- DNA Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK)
- *ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents* (Amersham, Braunschweig)
- Essigsäure (Merck, Darmstadt)
- Endonuclease *Mnl I* (New England Biolabs, Frankfurt)
- Ethidiumbromid (10 mg/ml) (Gibco, Paisley, Scotland)
- Ethylalkohol absolut (Riedel-de Haën, Seelze)
- Glycin (Roth, Karlsruhe)
- HCl (Merck, Darmstadt)
- Isopropanol (Riedel-de Haën, Seelze)
- Laufpuffer *rotiphorese® SDS-PAGE* (Roth, Karlsruhe)
- Leupeptin (Sigma, Deisenhofen)
- Methanol (Riedel-de Haën, Seelze)
- NaCl (Roth, Karlsruhe)
- NaOH (Merck, Darmstadt)
- Natriumacetat (Merck, Darmstadt)
- NB2-Puffer (New England Biolabs, Frankfurt)
- Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)
- PBS (10x, mit  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) (Gibco, Paisley, Scotland)
- PBS (10x, ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) (Gibco, Paisley, Scotland)
- Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF; Sigma)
- Prostaglandin  $\text{E}_1$  (Serva, Heidelberg)
- Rinderalbumin Serva, Heidelberg
- SDS Ultra Pure (Roth, Karlsruhe)
- Standard *RPN 800* (Amersham, Braunschweig)
- Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (Bio Rad, München)
- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva, Heidelberg)
- Tris (Roth, Karlsruhe)
- Triton X-100 (Sigma, Steinheim)
- Tritriplex (EDTA) (Merck, Darmstadt)
- TSR (ABI PRISM Applied Biosystems, Warrington, UK)
- Tween 20 (Merck, Darmstadt)
- Ultrapure dNTP Set (Pharmacia Biotech, Heidelberg)

### 3.2 Primer

Pr. Nr.	Rich- tung	Sequenz 5' -----3'	Position: GP Ia
#55	R	- GGT TGC ATT GATCAA TCA CAG C -	949 - 928
#56	V	- CAG ACA TCC CAA TAT GGT GGG G -	771 - 790
#92	V	- GAC AGC CCA TTA ATA AAT GTC TCC TCT G -	Intron
#96	R	- CCT TGC ATA TTG AAT TGC TAC G -	827 - 807
#97	R	- CCT TGC ATA TTG AAT TGC TAC A -	827 - 807
#102	R	- CCA TCA TGT ATT CAC CGT CAG -	914 - 893
#103	V	- GTG GGG TTA ATT CAG TAT GCC A -	679 - 700
HGH I	V	- CAG TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A -	/
HGH II	R	- ATC CAC TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C -	/
#41m	V	- GTA CAT GAG TGA CCT AAA GAA AGA GG -	1593-1618
#42m	R	- GAC CTC TCA TGG AAA ATG GCA GTA CAC -	Intron

Tabelle 3.1: Verwendete Primer

### 3.3 Antikörper

Monoklonaler Antikörper :	Konzentration Stammlösung:	Antigen	Herkunft:
Gi 9	1 mg / ml	GP Ia	Dr.Santoso, Gießen
Gi 14	1 mg / ml	GP Ia	
Mouse- IgG	1 mg / ml		
VLA 5	1 mg / ml	CD 49e	CLB, Amsterdam, Niederlande
A <sub>1</sub> A <sub>5</sub>	1 mg / ml	GP IIa	Dr. Hemler, Boston, Amerika

Tabelle 3.2: Verwendete monoklonale Antikörper

- Fluorescein markierte Kaninchen Anti Maus IgG (RAM-FITC) (Dako, Hamburg)
- Zellkulturüberstand von Myelomazellen 8.653 (Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Gießen)

### 3.4 Sonstige Materialien

- Nitrozellulose *Hybond ECL* (Amersham, Braunschweig)
- Polystyrolröhrchen 12 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- Reaktionsgefäße silikonisiert 0,65ml (Sorenson, West salt Lake City, USA)
- Reaktionsgefäße silikonisiert 1,7ml (Sorenson, West salt Lake City, USA)
- Röntgenfilm (Sterling Diagnostic Imaging, Inc. Newark, USA)
- *Strip Ease Tubes* 200µl (Robbins Scientific, USA)

### 3.5 Geräte

- Analysenwaage (groß) *Mettler PJ 6000* (Mettler-Toledo, Giessen)
- Analysenwaage (klein) *Mettler AE 100S* (Mettler-Toledo, Giessen)
- Blot-Kammer (Keutz, Reiskirchen)
- Durchflußzytometer I *Cytoron Absolute* (Ortho-Clinical Diagnostic, Neckargmünd)
- Durchflußzytometer II *FACS Calibur* (Becton Dickinson, San Jose, USA)
- Elektrophoresekammern (Keutz, Reiskirchen)
- Magnetrührer *IKA-Combimag RCO* (IKA Works, Wilmington, USA)
- Magnetrührer/Heizplatte *IKAMAG Ret* (IKA Works, Wilmington, USA)
- Mischer *IKA MS2 Minishaker* (IKA Works, Wilmington, USA)
- *pH-Meter PHM 61* Laboratory pH Meter (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)
- Photodokumentations-System (INTAS)
- Photometer *Tecan SLT* (SLT, Crailsheim)
- Polaroid-Filme (Polaroid, St.Albans/Hertfordshire, UK)
- *QIAvac 6S manifold* (Qiagen, Hilden)
- Rotator *Fisher-Roto-Rack* (Fisher Scientific Corp. USA)
- SDS-Kammern (Keutz, Reiskirchen)
- Sequenzer *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer* (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- Sofortbildkamera Quick Shooter *QSP* (IBI, Connecticut, USA)
- Stromquelle Consort E 443 (Keutz, Reiskirchen)
- *Sysmex* (Medical Electronics GmbH, Hamburg)
- Thermoblock *Biometra Trio* (Biotron, Göttingen)
- Thermocycler *Gene Amp PCR System 2400* (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- UV-Lampe *IBI Model UVI 400M* (IBI, Connecticut, USA)
- Vakuumzentrifuge (Keutz, Reiskirchen)
- Wasserbad (groß) (GFL, Hannover)
- Wasserbad (klein) (GFL, Hannover)
- Zentrifuge (groß) *Hettich Rotanta /TRC* (Hettich, Tuttlingen)
- Zentrifuge (klein) *Biofuge A* (Heraeus, Hanau)

### **3.6 Untersuchungsmaterial, Probenkollektiv**

Für die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen wurden gesunden, sowohl männlichen, als auch weiblichen Blutspendern aus dem Spenderkollektiv des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Giessen Blutproben zwischen 5 und 45 ml entnommen und durch Zusatz von Citrat (Konzentration: 22 g/l; Verhältnis 1:6) bzw. Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Endkonzentration: 2,69 mM) ungerinnbar gemacht.

Die caninen Blutproben zur Isolierung genomischer DNA wurden aus dem Patientengut der Tierklinik Drs. Schrot, Biebesheim, sowie der Gerichtlichen und Medizinischen Veterinärklinik I der Justus-Liebig-Universität Gießen gewonnen. Für die Blutabnahme zur Thrombozytenisolierung wurden uns freundlicherweise Hunde aus dem Blutspenderkollektiv der Gerichtlichen und Medizinischen Veterinärklinik I zur Verfügung gestellt.

Für die Gewinnung von Kaninchen- und Rattenblutproben standen heparinisierte Versuchstiere der Klinik für Innere Medizin der Universität Gießen zur Verfügung. Hierbei wurden 1.5 ml Vollblut durch die Zugabe von 0,25 ml ACD ungerinnbar gemacht.

## 4 Methoden

### 4.1. Genotypische Untersuchungen

#### 4.1.1 DNA-Isolierung aus Vollblut

Die DNA-Isolierung aus Vollblut wurde nach dem Prinzip der Salzfällung (Miller *et al.*, 1988) mit Hilfe des *Puregene™ DNA Isolation Kits* (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, USA) durchgeführt (siehe Angaben des Herstellers). Bei dieser Methode wurden erst die Erythrozyten und die kernhaltigen Zellen lysiert und evtl. vorhandene, kontaminierende RNA durch Zugabe von RNase abgebaut. Im Weiteren wurden die nukleären und zytoplasmatischen Proteine durch Salzlösung ausgefällt. Die im Überstand enthaltene DNA wurde durch Zugabe von 100% Isopropanol präzipitiert und nach Waschen mit 70% Ethanol in einer DNA-Konservierungszusätze enthaltenden, gepufferten Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gelöst.

Als Probenmaterial für die DNA-Isolierung wurden 5 ml humanes EDTA-Blut, sowie 1,3 ml canines EDTA-, bzw. ACD-Blut verwendet.

#### 4.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der gelösten DNA wurde mit Hilfe des UV-Spektralphotometers bestimmt. Der bei 260nm gemessene Wert der optischen Dichte ( $OD_{260}$ ) entsprach dem Extinktionsmaximum der enthaltenen Nukleinsäuren, der bei 280nm ermittelte Wert  $OD_{280}$  dem der Proteine. Durch Bestimmung des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  konnte die Kontamination der DNA-Probe mit Proteinen ermittelt werden. Werte unter 1,8 ließen auf eine deutliche Verunreinigung der Probe schliessen. Bei einer Verdünnung der DNA von 1:20 mit Aqua dest. entsprach ein  $OD_{260}$  von 0,1 einer DNA-Konzentration von 100 $\mu$ g/ml.

### 4.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde als spezifische, molekularbiologische Nachweismethode für DNA-Fragmente eingesetzt. Hierbei wurden kleine Mengen an DNA mit Hilfe ausgewählter Primer *in vitro* vervielfältigt. Grundsätzlich bestand ein Reaktionszyklus aus 3 verschiedenen Schritten:

- *Denaturierung* der Doppelstrang-DNA bei 96°C, wodurch diese in zwei Einzelstränge aufgetrennt wurden.
- *Annealing*, d.h. Anlagerung zugegebener Oligonucleotide spezifischer Sequenz (Primer) an die jeweils komplementären Einzelstränge. Sie fungierten als Startmoleküle für die folgende DNA-Synthese.
- *Extension*, bei der mit Hilfe der DNA-Polymerase, einem aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aequatus* stammenden Enzym, komplementäre Nucleotide entlang der Einzelstränge in 5'-3'-Richtung angelagert wurden.

Am Ende eines Reaktionszyklus stand die selektive Verdopplung des von den spezifischen Primern flankierten DNA-Fragments. Für die Optimierung der jeweiligen Amplifikation wurde die Zahl der Zyklen und die Zeiten bzw. die Temperaturen der einzelnen Zyklusschritte variiert. Die vorgeschaltete Inkubation (10' 96°C) diente der Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Vaterstetten). Alle PCR-Ansätze wurden in Strip Ease-Tubes mit dem Gene-Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer, Vaterstetten) durchgeführt.

#### 4.1.3.1 Genotypisierung des GPIa C807T Polymorphismus mit Hilfe Sequenzspezifischer PCR (PCR-SSP)

Die Genotypisierung des GPIa C807T Dimorphismus erfolgte mit Hilfe einer von unserer Arbeitsgruppe entwickelten sequenzspezifischen PCR (Santoso et al., 1999), bei der ein gemeinsamer Vorwärtsprimer (#92) und zwei allelspezifische Rückwärtsprimer (#96/C bzw. #97/T) verwendet wurden (Tabelle 3.2). Zusätzlich wurde bei beiden Primern ein 809A>C Mismatch eingesetzt, um die Spezifität der Hybridisierung zu erhöhen. Zur Kontrolle des jeweiligen PCR-Ansatzes wurde ein Primerpaar zum Nachweis von HGH (Human Growth Hormon) mitgeführt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte im 1,8% TBE Gel .

## Protokoll

- PCR-Ansatz (25 µl):
 

Aqua dest.	10,25 µl
10x Taq-Puffer	2,5 µl
dNTP (jedes dNTP 0,125 mmol/l)	2,5 µl
Primer #92V (5 µmol/l)	1,25 µl
Primer #96 /#97 R (5 µmol/l)	1,25 µl
Primer HGH I (1,25 µmol/l)	2,5 µl
Primer HGH II (1,25 µmol/l)	2,5 µl
AmpliTaq Gold (5 U/µl)	0,25 µl
Genomische DNA	1,5 µl
  
- Programm Thermocycler :
  - a) Aktivierung der Taq-Gold : 96 °C — 10 Min.
  - b) 35 Reaktionszyklen jeweils bestehend aus :
 

Denaturierung:	93 °C — 50 Sec.
Annealing:	57 °C — 30 Sec.
Extension:	72 °C — 15 Sec.
  - c) Elongation: 72 °C — 10 Min.  
Halt: 25 °C — unendlich
  
- Zur Detektion wurden 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl Probenpuffer versehen und auf ein 1,8% TBE-Gel aufgetragen.
- Als Standard diente MW 6: 1 µl Standard, 9 µl Aqua.dest. und 2 µl Probenpuffer mischen.
- Nach Auftrennung bei 120V für ca. 30 Minuten wurden die PCR-Produkte unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert.

## Reagenzien

---

Ultrapure dNTP Set (Pharmacia Biotech, Heidelberg)  
 10x Taq-Puffer (Perkin Elmer, Vaterstetten)  
 AmpliTaq Gold (Perkin Elmer, Vaterstetten)  
 Primer (MWG Biotech, Ebersberg) Sequenzen siehe 3.3  
 Reagentien zur Detektion: siehe 4.1.4

---

### 4.1.3.2 Genotypisierung des GPIa A1648G Polymorphismus mit Hilfe eines Restriktionsverdau ( RFLP)

Die genotypische Differenzierung des GPIa A<sup>1648</sup>G Dimorphismus erfolgte unter Verwendung der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP). Hierbei erhielt man mit Hilfe der sequenzspezifischen Primer #41m und #42m (Tabelle 3.2) ein Produkt mit einer Länge von 285 bp. Dieses Produkt wurde im anschließenden Verdau bei 37°C durch Zugabe der Endonuklease Mnl I in verschiedene Fragmente geschnitten, welche im 3% TAE-Gel bei 240nm sichtbar gemacht wurden. Die Länge der einzelnen Fragmente variierte in Abhängigkeit vom Genotyp, wodurch eine Differenzierung der verschiedenen Allele möglich wurde.

## Protokoll

- PCR-Ansatz (25 µl):
 

Aqua bidest.	25,6 µl
10x Taq-Puffer	5,0 µl
dNTP (jedes dNTP 0,125 mmol/l)	8,0 µl
Primer #41m (V) (5 µmol/l)	3,0 µl
Primer #42m (R) (5 µmol/l)	3,0 µl
AmpliTaq Gold (10 U/µl)	0,4 µl
Genomische DNA	5,0 µl
  
- Programm Thermocycler :a) Aktivierung der Taq-Gold : 96 °C — 10 Min.  
 b) 35 Reaktionszyklen jeweils bestehend aus :
 

Denaturierung:	94 °C — 20 Sec.
Annealing:	62 °C — 30 Sec.
Extension:	72 °C — 40 Sec.

 c) Elongation: 72 °C — 10 Min  
 Halt: 25 °C — unendlich
  
- Für den Verdau wurden 7µl PCR-Produkt, 1 µl NEB<sub>2</sub>-Puffer, 1 µl BSA (10x) und 1 µl Mnl I in ein 0,65 ml Reaktionsgefäß pipettiert.
- Inkubation über Nacht (mind. 4 Std.) bei 37°C im Thermoblock.
- Zur Detektion wurde der Verdau mit 2 µl Probenbuffer versehen und auf ein 3% TAE-Gel aufgetragen. Als Standard diente MW 5: 1 µl Standard, 9 µl Aqua.dest. und 2 µl Probenpuffer mischen.
- Auftrennen bei 120V für ca. 30 Minuten und Sichtbarmachung im UV-Licht, Photodokumentation.

## Reagenzien

---

Reagenzien zur PCR:	siehe 4.1.3.1
Reagenzien zur Detektion :	siehe 4.1.4

---

### 4.1.4 Agarosegel-Elektrophorese

Das Verfahren der Agarosegel-Elektrophorese wurde zur Darstellung von PCR-Produkten bzw. auch zu deren Aufreinigung zwecks späterem Einsatz bei der Sequenzierung verwendet. Hierbei kam es durch das Anlegen einer definierten Spannung zur Wanderung negativ geladener Nukleinsäurefragmente im elektrischen Feld. Aufgrund ihrer Größe und Ladung bewegten sich die einzelnen Fragmente unterschiedlich schnell zur Anode, sodaß eine analytische Auftrennung ermöglicht wurde. Die Elektrophorese wurde in einer neutralen, Ethidiumbromid enthaltenden Gelmatrix durchgeführt. Ethidiumbromid bindet unspezifisch an Nucleinsäuren und diente somit der Sichtbarmachung der einzelnen Fragmente im UV-Licht (254nm).

Die verwendete Agarose, sowie die Konzentration der Gelmatrix variierten in Abhängigkeit der Größe des PCR-Produkte.

### Protokoll

- Die entsprechende Agarosemenge im benötigten Volumen TBE- bzw. TAE-Puffer aufnehmen und durch Erhitzen auf dem Magnetprüher lösen. (50 ml 1% Gel: 0.5g Agarose).
- Kurz aufkochen lassen, anschließend 2,5µl (10mg/ml) Ethidiumbromid pro 25µl Gel zugeben.
- Flüssige Agarose blasenfrei in Gelschritten gießen, ca. 30 Minuten abkühlen lassen.
- 10 µl PCR-Produkt mit 2µl Probenpuffer versetzen und in die Geltaschen pipettieren.
- Als Standard: 1 µl Standard, 9 µl Aqua. bidest. und 2 µl Probenpuffer mischen.
- Auftrennen bei ca. 80-120V für etwa 0,5-1,5 Stunden.
- Sichtbarmachung im UV-Licht, Photodokumentation.

### Reagenzien

Tris-borat-EDTA (TBE)-Puffer (pH 8,0)	Tris	45 mM
	Borat	45 mM
	EDTA	1 mM
	A.bidest.	ad 1000 ml
Tris-acetat-EDTA (TAE)-Puffer (pH 7,2)	Tris	40 mM
	Eisessig	12 %
	EDTA	1 mM
	A.bidest.	ad 1000 ml
Probenpuffer	40% Saccharose-Lösung.	0,9 ml
	0,25% Bromphenolblau-Lösung	0.9 ml
	EDTA (0,5 M) Lsg. pH 8,0	0,1 ml
Ethidiumbromid (10mg/ml)		
Agarose	Ultra pure Agarose bzw. Seakem GTG Agarose	

#### 4.1.5 Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Die Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen (Seakem Agarose GTG) zwecks Aufreinigung für die Sequenzierung wurde nach dem modifizierten Prinzip der Silika-Matrix-Absorptionsmethode mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit*<sup>TM</sup> durchgeführt. Hierbei wurde das spezifische PCR-Produkt nach elektrophoretischer Auftrennung mit dem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Nach Zugabe von Solubilisationspuffer wurde die Agarose bei 50°C gelöst, mit absolutem Isopropanol versehen und unter Vakuum auf die QIAquick-Säulen pipettiert. Die an die Silika-Matrix der Säulen gebundene DNA wurde mit Puffer gewaschen. Anschließend wurde der restliche Puffer durch Zentrifugation entfernt. Nach Elution der aufgereinigten DNA mit 30 µl Aqua bidest. wurde die Konzentration der aufgereinigten Produkte mit Hilfe eines DNA Standards im Agarosegel geschätzt.

### Protokoll

- 100 µl Amplifikat auf ein 1% TBE-Gel (*Seakem GTG* Agarose) auftragen..
- Auftrennen bei ca.90 V für ca. 1-1.5 Stunden.
- Ausschneiden des Produktes im UV-Licht; auffangen der Gelblöckchen in silikonisierten Reaktionsgefäßen (1,7 ml).
- Die Geextraktion mit *Qiaquick Gel Extraction Kit*<sup>TM</sup> wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.
- Für die Konzentrationsbestimmung wurden 1 bzw. 2 µl Produkt mit 9 bzw. 8µl Aqua bidest.und 2 µl Probenpuffer versehen und auf ein 1% TBE-Gel aufgetragen. Als Standard diente MW7.
- Auftrennen bei ca. 90V für 1-1,5 Stunden; Sichtbarmachung bei UV-Licht.

### Reagenzien

---

*Qiagen Gel Extraktions Kit* (Qiagen, Hilden)

---

#### 4.1.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI PRISM<sup>TM</sup> Genetic Analyzer 310 unter Verwendung des Kettenabbruchprinzips nach Sanger (Sanger et al., 1977). Hierbei wurden in einer Sequenzierungsreaktion 4 verschiedene, markierte Desoxynucleotide (Abbruchnucleotide) durch die Polymerase AmpliTaqFS in die entstehenden Einzelstränge in 5'-3'-Richtung eingebaut. Die nach der Amplifikation überschüssigen, markierten Nucleotide wurden mit Ethanol gefällt. Die elektrophoretische Auftrennung der einzelnen fluoreszierenden Fragmente erfolgte nach vorangegangener Denaturierung mit Hilfe einer Glaskapillare. Hierbei kam es durch den auf eine Stelle fokussierten Argon-Laserstrahl (488nm) zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe. Das daraufhin von den Farbmolekülen emittierte Licht verschiedener Wellenlänge (525-605nm) gelangte über Spiegelsysteme zum Spektrograph, wo es in die Spektralfarben zerlegt wurde. Die Detektion erfolgte über das Pixelfeld der CCD-Kamera.

### Protokoll

- PCR-Ansatz (20 µl):
 

Term.ReadyReaktions Mix (Big Dye)	4,0 µl
Primer (5 µmol/l)	1,0 µl
Gereinigtes PCR-Produkt (≈ 120 ng/µl)	X µl
Aqua bidest.	X µl
Endvolumen:	20,0 µl

- Programm Thermocycler :
  - a) 25 Reaktionszyklen jeweils bestehend aus :
    - Denaturierung: 96 °C — 10 sec.
    - Annealing: 50 °C — 5 sec.
    - Extension: 60 °C — 4 min.
  - b) Halt: 25 °C — unendlich
  
- Für die Ethanolfällung wurden 80µl Aqua dest., 10 µl NaAcetat (3M, pH 4,6) und 250µl absoluter Ethylalkohol zu dem Amplifikat in ein silikonisiertes Reaktionsgefäß pipettiert.
- Zentrifugation (15 min, 15.000g) bei 4°C, Überstand entfernen.
- Waschen mit 250 µl Ethylalkohol, Zentifugation (5min, 15.000g) bei 4°C.
- Überstand entfernen, Trocknen des Pellets in der Vakuumzentrifuge.
- Resuspendieren in 25µl TSR-Puffer ("template suppression reagent").
- Denaturierung (2 min, 90°C), abkühlen lassen und Sequenzanalyse.

### Reagenzien

---

ABI PRISM *DNA Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Warrington)  
TSR Puffer (Applied Biosystems, Warrington)

---

## 4.2 Phänotypische Untersuchungen

### 4.2.1 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie wurde zur Messung der Expression von GPIa/IIa auf Thrombozyten herangezogen. Hierbei wurden die Thrombozyten zunächst mit spezifischen, monoklonalen Antikörpern und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörper markiert. Die markierten Zellen gelangten in die mit isotoner Hüllstromflüssigkeit gefüllte Durchflußzelle des Durchflußzytometers, wo sie in den Hüllstrom aufgenommen und durch dessen Geschwindigkeit einzeln im Zentralstrom aufgereiht wurden. Nach Passieren des fokussierten Laserstrahls (488nm) wurde das Streulicht (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht) bzw. das von den Fluoreszenzfarbstoffen nach Anregung emittierte Licht über eine Linse in ein optisches Detektionssystem weitergeleitet, für jede einzelne Zelle quantifiziert und, proportional zu Lichtintensität, in elektrische Impulse umgewandelt. Diese wurden dem Rechner zugeleitet und dort ausgewertet.

### 4.2.2 Thrombozytenisolierung für Durchflußzytometrie

Um eine Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden, wurden bei der Blutabnahme großlumige Dialylenadeln, vorgewärmte Probenröhrchen und ein maximaler Druck des venösen Staus von 40mmHg angewandt. Die Zugabe von PGE<sub>1</sub> sollte die Aggregation der Thrombozyten verhindern.

#### Protokoll

- Zur Blutabnahme je 4 Polystyrolröhrchen mit 10µl PGE I (Konz.: 0,35µg/ml) und 1,5 ml ACDE versehen und auf 37°C anwärmen.
- 9ml Vollblut über eine Dialylenadel dazutropfen lassen, vorsichtig mischen.
- In neue Polystyrolröhrchen umfüllen, mit Parafilm abdecken und in Schräglage 30 min. bei 37°C inkubieren.
- Zentrifugation: 20 min, 120g, obere Hälfte des PRP in sauberes Röhrchen pipettieren.
- 3 mal mit 5ml Waschpuffer A waschen (Zentrifugation: 10 min, 1200g)
- Einstellen der Thrombozytenzahl auf 10<sup>9</sup>/ml.
- 1:2 mit 2% Paraformaldehyd versetzen, 3 min bei RT (dunkel) inkubieren.
- 3 mal mit 5 ml PBS (1x) waschen (Zentrifugation: 10 min, 1200g).
- Einstellen der Thrombozytenzahl auf 10<sup>8</sup>/ml.

## Reagenzien

Waschpuffer A (pH 6,5)	EDTA	10 mM
	PBS (1x, mit Ca <sup>2+</sup> ,Mg <sup>2+</sup> )	500 ml
Paraformaldehyd 4%	Paraformaldehyd	0,4 g
	PBS (1x,ohne Ca <sup>2+</sup> ,Mg <sup>2+</sup> )	10 ml
	NaOH 3 M	300 µl
PBS (1x) pH 7,4	PBS (10x, mit Ca <sup>2+</sup> ,Mg <sup>2+</sup> )	1:10 verdünnt

### 4.2.3 Durchflußzytometrie mit isolierten Thrombozyten

#### Protokoll

- Zur primären Markierung werden 10<sup>8</sup> Thrombozyten in ein Reaktionsgefäß pipettiert und abzentrifugiert (2 min , 15.000g), Überstand absaugen.
- Pellet mit 50 µl primärem monoklonalem Antikörper (0,02 mg/ml) resuspendieren, Inkubation 30 min bei 37°C.
- 3 mal mit 500µl PBS (1x, pH 7,4) waschen, (Zentrifugation: 2 min, 15.000g), Überstand absaugen.
- 40µl sekundären Kaninchen-anti-Maus-Antikörpers (RAM-FITC, 1:20 verdünnt) zugeben, Inkubation 30 min bei RT (dunkel).
- 3 mal waschen mit PBS (Zentrifugation 2 min, 15.000g), Überstand absaugen.
- Pellet je nach Größe in 500- 2000 ml PBS resuspendieren und in kleine Glasröhrchen überführen.
- Messung am Durchflußzytometer *Cytoron Absolute* (Ortho Diagnostic Systems, Neckargmünd).

#### Reagenzien

PBS (1x, ohne Ca <sup>2+</sup> ,Mg <sup>2+</sup> )	siehe 4.2.2
Primäre monoklonale Antikörper	siehe 3.3
RAM-FITC (DAKO, Hamburg)	siehe 3.3

### 4.2.4 Durchflußzytometrie mit Vollblut

Die Bestimmung der Expression des GPIa/IIa-Komplexes auf der Thrombozytenoberfläche aus Vollblut wurde mit Hilfe des Testkits *Platelet GPIa*, welches uns zu Versuchszwecken von der Firma Biocytex, (Marseille, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt. Durch Erstellung einer Standardkurve mit Calibrierungs-Beads konnte die Zahl der Antigene auf der Thrombozytenoberfläche durch Umwandlung der Fluoreszenzintensität ermittelt werden.

Für diesen Test wurde ACD-Blut verwendet.

### Protokoll

- Probenvorbereitung: 50 µl Vollblut im Verhältnis 1:4 mit Probenpuffer (1x) mischen.
- Jeweils 20 µl verdünntes Probenmaterial zu 20 µl monoklonalem Antikörper (Gi9, Gi 14, und Überstand von 8.653) geben, gut mischen. Inkubation: 10 min RT.
- Zur Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten werden 20 µl FITC-markierte Anti-Maus-Antikörper zum Ansatz pipettiert. Gut mischen.
- Gleichzeitig werden 20 µl FITC-markierte Anti-Maus-Antikörper zu 40 µl Calibrierungs-Beads gegeben, ebenfalls gut mischen.
- Inkubation für 10 min bei RT (dunkel).
- 2 ml Probenpuffer zugeben und im Durchflußzytometer *FACS Calibur* (Becton Dickinson, San Jose, USA) messen.

### Reagenzien

---

Testkit *Platelet GPIa* (Biocytex, Marseille, Frankreich)

---

#### 4.2.5 Markierung von Thrombozyten

Die Markierung der Oberflächenproteine isolierter Thrombozyten erfolgte mit Biotin (*EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin*, Pierce, München), um eine Bindung von Streptavidin-Peroxidase und somit eine Detektion mit Hilfe von Chemilumineszenz zu ermöglichen. Die markierten Thrombozyten wurden anschließend in Anwesenheit von Leupeptin und PMSF als starke Proteaseinhibitoren lysiert. Die Aufreinigung (Precogn) des Thrombozytenlysates vor der Präzipitation mit spezifischen, monoklonale Antikörper erfolgte durch die Adsorption an Sepharose Beads. BSA, welches freie Bindungsstellen blockiert, und Humanes AB-Serum, welches unspezifische Bindungen verhindert, trugen zum Preclearn bei.

### Protokoll

- Zur Biotinmarkierung  $1,3 \times 10^6$  Thrombozyten/ml Waschpuffer A zu je 1 ml in Polystyrolröhrchen geben und auf Eis vorkühlen.
- 100 µl Biotin-Lösung (50mM) pro 1 ml Zellsuspension geben, 30 min auf Eis inkubieren.
- 5 ml Waschpuffer B zugeben, Inkubation: 10 min bei 4°C.
- 2 mal Waschen mit 5 ml Waschpuffer B (Zentrifugation: 10 min, 1200g).
- Zur Solubilisation Zellpellet in Solubilisationspuffer aufnehmen, 30 min bei 4°C inkubieren.
- Nach der Zentrifugation (30 min bei 4°C, 15.000g) 800 µl Lysat abnehmen.

#### Vorbereitung der Protein-A-Sepharose beads

- Zur Vorbereitung der Protein A Sepharose beads werden 1g beads in Wasser gequollen (30 min) und anschließend das restliche Wasser entfernt. 2 mal waschen mit IPB. 1:2 mit 20% Alkohol verdünnen und bei 4°C lagern.

### Preclearen

- Zu 600 µl Lysat werden 100 µl Protein A Sepharose beads (einmal mit 500 µl IPB vorgewaschen; Zentrifugation: 1 min bei 1200g), 20 µl humanes AB-Serum und 80 µl BSA (100 mg/ml) zugegeben; mischen.
- Nach 30 min Inkubation bei RT auf dem Rotator: Zentrifugation (1 min, 5000g).
- Überstand erneut auf 100 µl frische, vorgewaschene beads geben, 20 µl humanes AB-Serum zugeben und mischen. Inkubation: 30 min bei RT auf dem Rotator.
- 1 min 5000g zentrifugieren, Überstände poolen und scharf abzentrifugieren.
- Lysat weiterverarbeiten bzw. bei -70°C einfrieren.

### **Reagenzien**

---

Waschpuffer A	siehe 3.2.3	
Waschpuffer B (pH 7,4)	Tris	20 mM
	Glycin	5 mM
	EDTA	10 mM
	NaCl	140 mM
	Aqua bidest.	ad 1000 ml
Solubilisationspuffer	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
	Triton X-100	1 %
	Leupeptin	1 mM
	PMSF	1 mM
Protein-A-Sepharose-CL-4B-Beads beads (Pharmacia Biotech, Heidelberg.)		

---

### **4.2.6 Immunpräzipitation**

Bei der Immunpräzipitation wurden im Lysat befindliche, thrombozytäre Oberflächenproteine mit Hilfe spezifischer, monoklonaler Antikörper gebunden. Durch Zugabe eines sekundären Kaninchen-anti-Maus-IgGs entstanden Immunkomplexe, welche an das Protein A der Sepharose Beads binden. Nach mehrmaligem Waschen, bei dem die unspezifischen Proteine des Lysates entfernt wurden, erfolgte die Absprengung der spezifischen Immunkomplexe durch kurzes Aufkochen der Beads.

### **Protokoll**

- 150 µl biotinmarkiertes Thrombozytenlysate wird mit 5 µl monoklonalem Antikörper (1 mg/ml) über Nacht auf dem Rotator bei 4°C inkubiert.
- Zugabe von 5 µl Kaninchen-anti-Maus-IgG, Inkubation: 1h bei RT auf dem Rotator
- Kurz anzentrifugieren (15.000g), Überstand auf 50 µl vorgewaschene Protein A Sepharose beads geben, Inkubation auf dem Rotator (1h) bei RT.
- 5 mal waschen mit 500 µl IPB (1 min bei 5000g).
- Pellet in 40 µl Probenpuffer resuspendieren, 3 min kochen und anschließend 1 min scharf abzentrifugieren (15.000g).
- 30 µl Überstand abnehmen, bei -20°C einfrieren.

## Reagenzien

verwendete Antikörper: siehe 2.3

Immunpräzipitationspuffer (IPB) pH 7,4	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
	Triton X-100	1 %
Probenpuffer (non reduced)	Natriumdodecylsulfat (SDS)	70 mM
	Tris (pH 6,8)	0,6 M
	Glycerin	20 %
	Bromphenolblau	0,002 %
	Aqua bidest	1,9 ml

### 4.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) diente zum Auftrennen der mit Hilfe verschiedener Antikörper präzipitierten Proteine aufgrund ihrer Größe im elektrischen Feld. Hierzu wurde ein 5-prozentiges Sammelgel, sowie ein 7,5-prozentiges Trenngel verwendet, auf welches die Proben aufgetragen und bei 20 mA aufgetrennt wurden. Die Dauer der Auftrennung war abhängig von der Größe der Proteine und betrug durchschnittlich 5 Stunden.

#### Protokoll

- Zusammenbau der Glasplatten, Abdichten der Ränder mit 3% Agarosegel.
- Herstellung des Trenngels (7,5%)
 

Aqua bidest.	11,4 ml
Lösung L2	2,33 ml
Lösung L1	4,8 ml
Lösung L3	188 µl
TEMED	25 µl
Ammoniumpersulfat	625 µl
- Mit Stabpipette zwischen die Glasplatten pipettieren, 30 min polymerisieren lassen.
- Herstellung des Sammelgels (5%)
 

Aqua bidest.	6,8 ml
Lösung L1	2,0 ml
Lösung L4	1,25 ml
Lösung L3	100 µl
TEMED	15 µl
Ammoniumpersulfat	375 µl
- Sammelgel ebenfalls zwischen die Glasplatten pipettieren, Kamm plazieren und Gel ca. 30-45 min polymerisieren lassen.
- Für der Vorlauf Kamm und unteren Steg entfernen, Laufkammer mit Laufpuffer füllen und Gel einspannen. 50 µl Probenpuffer pro Geltasche auftragen und Gel über Nacht bei 10 mA äquilibrieren.
- Für den Gellauf: 30 µl Probe (siehe oben) in die leeren Geltaschen auftragen. Als Standard für das Molekulargewicht dient RPN 800 (30 µl Standard mit 30 µl Probenpuffer versetzt).
- Auftrennung im Sammelgel bei 15 mA, im Trenngel 20 mA. Dauer etwa 5 h.

## Reagenzien

Lösung L1	Acrylamid	4,2 M
	Bisacrylamid	51,8 mM
Lösung L2 (pH 8,8)	Tris	300 mM
	Aqua didest.	ad 1000ml
	Einstellung des pH mit 12 M HCl	
Lösung L3	Natriumdodecylsulfat (SDS)	34,7 mM
Lösung L4 (pH 6,8)	Tris	24,8 mM
	Aqua bidest.	ad 1000ml
	Einstellung des pH mit 1M HCl	
Probenpuffer (non reduced)	siehe 4.2.6	
Laufpuffer <i>rotiphorese</i> ® SDS-PAGE	1:10 verdünnt	

### 4.2.8 Westernblot

In dem an die elektrophoretische Auftrennung angeschlossenen Verfahren des Westernblots wurden die Proteine durch Anlegen einer Gleichspannung aus der Gelmatrix auf eine Nitrocellulosemembran (*Hybond-ECL*) übertragen. Durch Zugabe von Streptavidin-Peroxidase Konjugat, welches sich an das an die Proteine gebundene Biotin anlagert, und anschließendem Umsetzen des zugegebenen Substrats, konnten die Proteine mit Hilfe von Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

### Protokoll

- Nach der Elektrophorese das Gel zusammen mit der Nitrocellulosemembran 15 min in Transferpuffer äquilibrieren, übereinanderschieben und in der Blotkammer plazieren.
- Blotten bei 50 V und 200 mA für 4h im Kühlraum bei 4°C.
- Nach dem Blotten Nitrocellulosemembran 10 min in PBS (1x, ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) legen.
- Anschließend mindestens 1 h bei RT mit Blockierungslösung inkubieren (Rüttler).
- 30 min mit Konjugat inkubieren, Zeit genau einhalten; danach Konjugat absaugen.
- Nitrocellulose in ECL-Puffer waschen (3mal 15 sec, 1 mal 15 min, 4 mal 5 min).
- Die Lösungen ECL1 und ECL2 (*ECL-Western blotting detection system*<sup>TM</sup>) zu gleichen Teilen mischen und die Nitrocellulose zugeben, Inkubation: 1 min.
- Nitrocellulose auf Filterpapier trocknen und in der Filmcassette fixieren.
- Röntgenfilme verschieden lang exponieren (5 sec bis 15 min), Filme entwickeln.

## Reagenzien

Transferpuffer	Tris	20 mM
	Glycin	150 mM
	Aqua bidest.	ad 4 l
	Methanol	ad 5 l
PBS (1x, ohne Ca <sup>2+</sup> ,Mg <sup>2+</sup> )	PBS 10x 1:10 verdünnt	
Blockierungslösung	Transferpuffer	200 ml
	BSA	3 g
Konjugat	Blockierungslösung	90 ml
	Streptavidin-horseradish-Peroxidase	30 µl
ECL-Waschlösung (pH 7,4)	Tris	20 mM
	NaCl	154 mM
	Tween 20	0,05 %
	<i>EC-Western blotting detection system</i> <sup>TM</sup>	(Amersham, Braunschweig)

## 4.3 Funktionelle Untersuchungen

### 4.3.1 Thrombozytenisolierung für Adhäsionstest

Die Isolierung der Thrombozyten für die Durchführung funktioneller Untersuchungen sollte unter Vermeidung der Thrombozytenaktivierung erfolgen. Aus diesem Grund fanden auch hier wieder die schon in 3.2.2 beschriebenen Bedingungen der Blutabnahme Anwendung. Desweiteren wurden die Polystyrolröhrchen mit 1% BSA beschichtet, um eine mögliche Aktivierung der Thrombozyten durch Fremdoberflächenkontakt zu minimieren. Darüber hinaus wurden während der einzelnen Isolationsschritte sowohl Prostaglandin E<sub>1</sub>, welches die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten hemmt, als auch Apyrase, die durch Abspaltung des an Thrombozyten gebundenen Fibrinogens der Aggregation entgegenwirkt, zugeführt. Die zwischen den einzelnen Zentrifugationsschritten eingeführten Ruhephasen dienten zur Regenerierung der Thrombozyten.

#### Protokoll

- Zur Blutabnahme je 4 mit 1% BSA beschichtete Polystyrolröhrchen mit 1,5 ml ACD und 10 µl PGE<sub>1</sub> (Konz.: 0,35µg/ml) versehen und auf 37°C anwärmen.
- 9 ml Vollblut über eine Dialylenadel dazutropfen lassen, vorsichtig mischen.
- In neue Polystyrolröhrchen, ebenfalls vor Gebrauch mit 1% BSA beschichtet, umfüllen, mit Parafilm abdecken und in Schräglage 60 min bei 37°C inkubieren.
- Zentrifugation: 20 min, 120g; obere Hälfte des PRP in sauberes Röhrchen (ebenfalls mit 1% BSA beschichtet) pipettieren.
- Zugabe von 5 µl Apyrase, 10 µl PGE<sub>1</sub> und 111 µl ACD pro 1 ml PRP. Waschpuffer im gleichen Anteil wie PRP zugeben.
- pH-Wert überprüfen und bei Bedarf auf 6,5 mit ACD einstellen; PRP ruhen lassen (15min bei 37°C).
- Zentrifugation: 10 min, 1200g. Überstand absaugen.
- Zugabe von 2 ml Waschpuffer, 60 µl PGE<sub>1</sub> und 20 µl Apyrase zum Thrombozytenpellet. Mit Waschpuffer auf 6 ml auffüllen.
- Pellet ruhen lassen (15 min bei 37°C).
- Zentrifugation: 10 min, 1200g. Überstand absaugen.
- Waschvorgang insgesamt 3 mal wiederholen. Beim letzten Waschvorgang Zugabe von 2 ml Waschpuffer, 100 µl PGE<sub>1</sub> und 25 µl Apyrase zum Thrombozytenpellet, mit Waschpuffer auf 10 ml auffüllen; ruhen lassen (15min 37°C).
- Nach dem letzten Waschen Zellzahl auf  $5 \times 10^7$ /ml mit Puffer A einstellen.

## Reagenzien

Stock I	NaCl	2 M
	KCl	0,1 M
	Aqua bidest.	
Stock II	Zitronensäure	0.36 M
	Aqua bidest.	
Waschpuffer A (pH: 6,5)	Stock I	10 ml
	Stock II	20 ml
	MgCl <sub>2</sub> (199 mM)	2 ml
	CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	4 ml
	Glucose wasserfrei	180 mg
	BSA reinst	700 mg
	Aqua bidest.	ad 200 ml
Puffer A (pH 7,4)	NaCl	145 mM
	KCl	5 mM
	Hepes	10 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 mM
	Glucose wasserfrei	6 mM
	BSA reinst	0,2 %
	Aqua bidest.	ad 1 l
Apyrase (1000U/l)		
PGE <sub>1</sub> (0,35 µg/ml)		

### 4.3.2 Thrombozyten-Adhäsionstest

Dieser von Bellavite und Mitarbeitern erstmals 1994 beschriebene Test diente der funktionellen Untersuchung von Thrombozyten hinsichtlich ihrer Adhäsion an Kollagen. Hierfür wurden Flachboden-Mikrotiterplatten aus Polystyrol mit Kollagen Typ I in zwei verschiedenen Konzentrationen beschichtet. Als negative Kontrolle diente 1% BSA, welches unspezifische Bindungstellen blockiert.

Die Sichtbarmachung der Thrombozytenadhäsion an Kollagen erfolgte nach Waschen der Platten zum einen durch Phasenkontrastmikroskopie. Zum anderen wurde ein Enzymtest durchgeführt, bei dem nach Lyse der Thrombozyten mit Triton X-100 die Aktivität der Plättchen-Saure-Phosphatase mit Hilfe des Substrates p-Nitrophenylphosphat bei einer Wellenlänge von 405 nm quantitativ bestimmt werden konnte. Die Höhe der Extinktion war proportional zur Zahl der adhärennten Thrombozyten.

## Protokoll

### Vorbereiten der Mikrotiterplatte:

- 96-well-Mikrotiterplatte (Flachboden) mit je 100 µl/Vertiefung BSA 1%, Kollagen TypI (10µg/ml) bzw. Kollagen TypI (20µg/ml) beschichten.
- Inkubation über Nacht bei 4°C.
- 1 Stunde vor Gebrauch: Blocken mit 100 µl BSA 1% für mindestens 1h bei 4°C.
- Unmittelbar vor Gebrauch: 2 mal waschen der Platte mit 200µl NaCl 0,9% pro Vertiefung.
- Zugabe von 25µl Puffer A+ pro Vertiefung. Aufwärmen der Platte: 10 min bei 37°C.

### Vorbereitung der Thrombozyten:

- Präinkubation der Thrombozyten mit verschiedenen gereinigten, monoklonalen Antikörpern: 30 min bei 37°C (Antikörper-Endkonzentration: 10 µg/ml).

### Adhäsionstest:

- 50 µl warme Thrombozytensuspension pro Vertiefung zugeben.
- Als thrombozytenfreien Leerwert 50 µl Puffer A statt Thrombozytensuspension zugeben.
- Inkubation: 60min bei 37°C (Brutschrank).
- 2 mal vorsichtiges Waschen mit 200µl PBS (1x, mit Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>) pro Vertiefung.

### Phasenkontrastmikroskopie:

- Zugabe von 200µl PBS (1x, mit Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>) pro Vertiefung.
- Mikroskopie

### Enzymatische Reaktion:

- Entfernen der 200µl PBS
- Zugabe von 150 µl Citratpuffer pro Vertiefung
- Inkubation: 60min bei RT (dunkel)
- Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 100µl 2N NaOH pro Vertiefung
- Photometrische Messung der Extinktion gegen einen thrombozytenfreien Leerwert bei 405nm.

## Reagenzien

Puffer A (pH 7,4)	siehe 3.3.1	
Puffer A+ (pH 7,4)	Puffer A	
	MgSO <sub>4</sub>	3 mM
	CaCl <sub>2</sub>	3 mM
Citratpuffer (pH 5,4)	Zitronensäure	0,1 M
	Triton X-100	0,1 %
	p-Nitrophenylphosphat	5 mM
	Aqua bidest	
NaOH 2N	NaOH	2 M
	Aqua bidest	

## 5 Ergebnisse

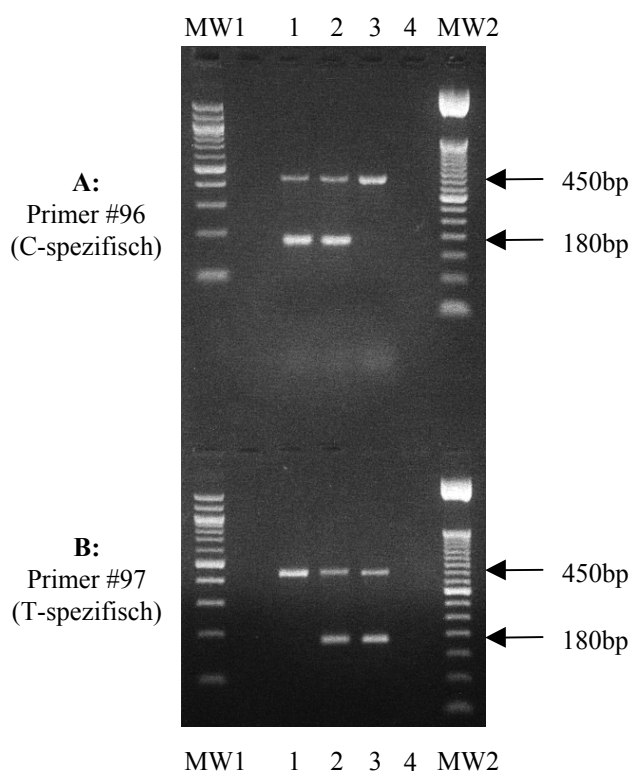
### 5.1 Molekulargenetische Untersuchungen

Um Gruppen verschiedener Genotypen für weitere, funktionelle Untersuchungen aufstellen zu können, wurde von 50 ausgewählten, gesunden Blutspendern Leukozyten-DNA aus Vollblut isoliert und diese bzgl. der GPIa- Polymorphismen an Position 807 und 1648 untersucht.

#### 5.1.1 Genotypisierung an Position 807

Die Genotypisierung des C>T-Polymorphismus an Position 807 erfolgte mit Hilfe der von der Arbeitsgruppe Santoso 1999b entwickelten sequenzspezifischen PCR (PCR-SSP), welche hier geringfügig modifiziert wurde (siehe 4.1.3.1). Die Verwendung allelspezifischer Primer, welche sich jeweils in der Base an Position 807 unterschieden, ermöglichte eine Differenzierung zwischen Trägern des 807C-bzw. des 807T-Allels.

Die Abbildung 5.1 zeigt das Ergebnis der allelspezifischen PCR dreier ausgewählter Individuen verschiedenen Genotyps. Während in der Abbildung 5.1A das 184bp lange Produkt nach Amplifikation mit dem für 807C spezifischen Primer dargestellt wird, zeigt Abbildung 5.1B das, mit dem Primer spezifisch für 807T amplifizierte Produkt. Das auf allen Bahnen sichtbare, 450bp lange Produkt stellt die HGH-Kontrolle dar.



**Abbildung 5.1: Ergebnisse der Genotypisierung an Position 807 mit sequenzspezifischer PCR (PCR-SSP)**

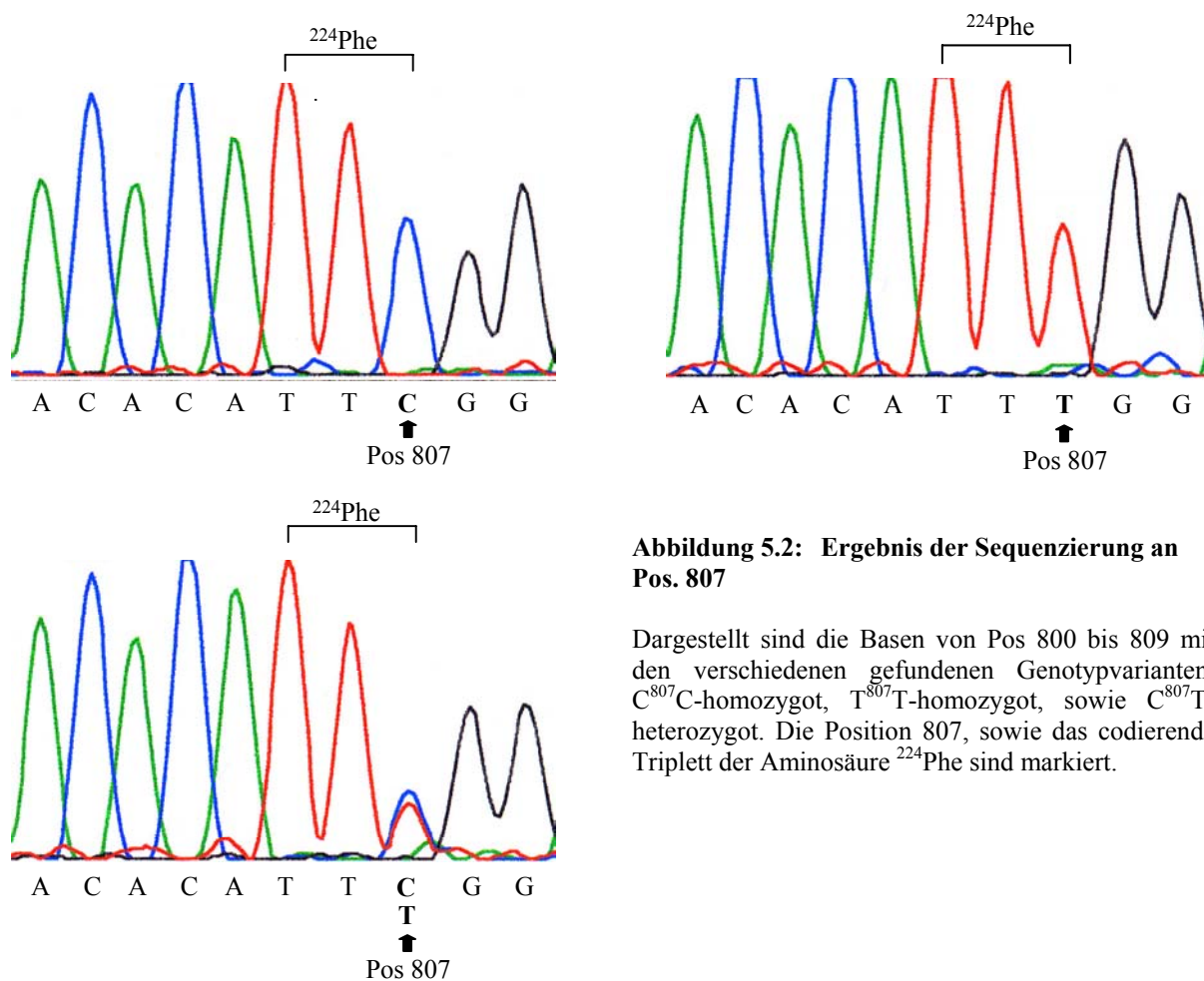
Abbildung 5.1A zeigt die 180bp großen PCR-Produkte nach Amplifikation mit dem für 807C spezifischen Primer #96; in Abbildung 5.1B hingegen sind die PCR-Produkte (180bp) nach Amplifikation mit dem für 807T spezifischen Primer #97 dargestellt.

Die Längenstandards befinden sich auf Bahn MW1 (MW VI) bzw. MW2 (Gibco BRL 50bp DNA Ladder). Bahn 1, 2 und 3 zeigen den C807C-homozygoten, den C807T-heterozygoten, bzw. den T807T-homozygoten Genotyp; Bahn 4 dient als negative Kontrolle (Aqua bidest.).

Die jeweils in allen Bahnen vorhandene Bande von 450bp stellt die HGH-Kontrolle dar.

Die Untersuchung der Spender ergab eine Verteilung von 38% C807C-homozygoten (n=19), 20 % T807T-homozygoten (n=10), sowie 42% C807T-heterozygoten (n=21) Individuen.

Die Sequenzierung ausgewählter Spender zur Überprüfung der Typisierung zeigte Übereinstimmung mit den Ergebnissen der PCR-SSP. In Abbildung 5.2 sind die Sequenzen der C807C-, bzw T807T-homozygoten, sowie der C807T-heterozygoten Individuen dargestellt.



**Abbildung 5.2: Ergebnis der Sequenzierung an Pos. 807**

Dargestellt sind die Basen von Pos 800 bis 809 mit den verschiedenen gefundenen Genotypvarianten: C<sup>807</sup>C-homozygot, T<sup>807</sup>T-homozygot, sowie C<sup>807</sup>T-heterozygot. Die Position 807, sowie das codierende Triplet der Aminosäure <sup>224</sup>Phe sind markiert.

Um das eventuelle Vorhandensein des Polymorphismus C807T auf Thrombozyten des Hundes zu untersuchen, wurde genomische DNA aus caninem Vollblut isoliert und ebenfalls mit Hilfe der PCR-SSP untersucht. Es ließ sich jedoch bei allen untersuchten DNA-Proben des Hundes kein PCR-Amplifikat nachweisen.

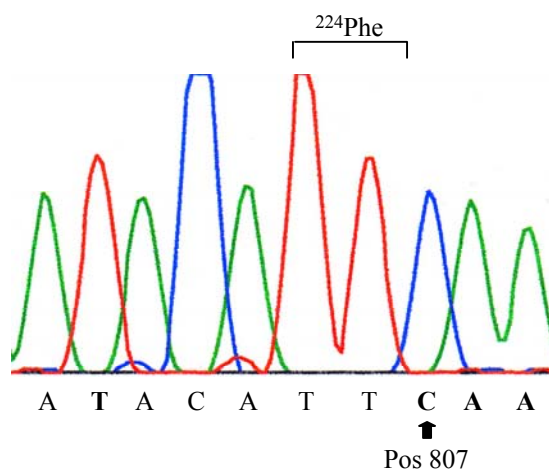
Aus diesem Grund wurde die Sequenzierung des Exons 7, auf welchem sich der Polymorphismus C807T befindet, aus caninem DNA-Material angeschlossen. Für den Ansatz wurden 5µl genomische DNA (entspricht etwa 400-600ng), 0,5 µmol/ml je Primer, 800µmol dNTP, 1,25mM MgCl<sub>2</sub>, 15,1µl 3,3xPuffer, sowie 2U rTth DNA Polymerase eingesetzt. Die Primersequenzen sowie die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 5.1 zusammengefaßt.

Primer	Sequenz: (5' .....3')	Position:	PCR-Bedingungen		
			Denat.	94°C	30''
#103 V	GTG GGG TTA ATT CAG TAT GCC A	679 - 700	Anneal.	57°C	1'
#102 R	CCA TCA TGT GAT TCA CCG TCA G	914 - 893	Polym.	72°C	4'

**Tabelle 5.1: Primersequenzen und PCR-Bedingungen für die Sequenzierung der Position 807**

Die Ansätze wurden eingangs 1' bei 94°C denaturiert und nach 35 Zyklen für 10' bei 72°C gehalten. Anschließend verblieben sie bei 4°C.

16 der 20 eingesetzten caninen DNA-Proben ließen sich eindeutig sequenzieren. Alle Sequenzen zeigten, wie in Abbildung 5.3 dargestellt, einen C807C-homozygoten Genotyp.



**Abbildung 5.3: Ergebnis der Sequenzierung caniner DNA an Position 807**

Dargestellt sind die Basen 800-809 des Exons 7 auf dem GPIa codierenden Gen. Alle untersuchten caninen Proben zeigten den hier dargestellten C807C-homozygoten Genotyp. Sowohl die Position 807, als auch das die Aminosäure <sup>224</sup>Phe codierende Basentriplett sind markiert. Die im Vergleich zur humanen DNA variierenden Basen sind fett gedruckt.

Eine vergleichende Übersicht der humanen sowie caninen Sequenzen für Exon 7 und einem Teil des angrenzenden Introns sind in Abbildung 11.1 im Anhang dargestellt.

### 5.1.2 Genotypisierung an Position 1648 :

Die Genotypisierung an Position 1648 wurde mit Hilfe einer Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP) durchgeführt (siehe 4.3.1.2), welche erstmals 1995 von Unkelbach et al. beschrieben und 2000 von Carl et al. modifiziert wurde.

Hierbei wurde das nach Amplifikation mit spezifischen Primern erhaltene 285bp lange Produkt mit Hilfe des Restriktionsenzym Mnl I geschnitten. Durch den Basenaustausch an Position 1648 von A nach G bot sich bei Trägern des G-Allels eine zusätzliche Schnittstelle für dieses Enzym, wodurch zwei kürzere Produkte (33bp und 136bp) anstelle des 169bp langen Stücks (A-Allel) entstanden. Eine Differenzierung zwischen den Trägern der G-bzw. A-Allele wurde somit ermöglicht. Das Prinzip dieser Genotypisierung ist in Abbildung 5.4A dargestellt, während Abbildung 5.4 B das Ergebnis der Genotypisierung dreier ausgewählter Individuen (A1648A-, A1648G-, und G1648G-Genotyp) zeigt.

Die Analyse der 50 ausgewählten Blutspender ergab eine Verteilung von 72% (n=36) G1648G-homozygoten, 6% (n=3) A1648A-homozygoten, sowie 22% (n=11) A1648G-heterozygoten Individuen.

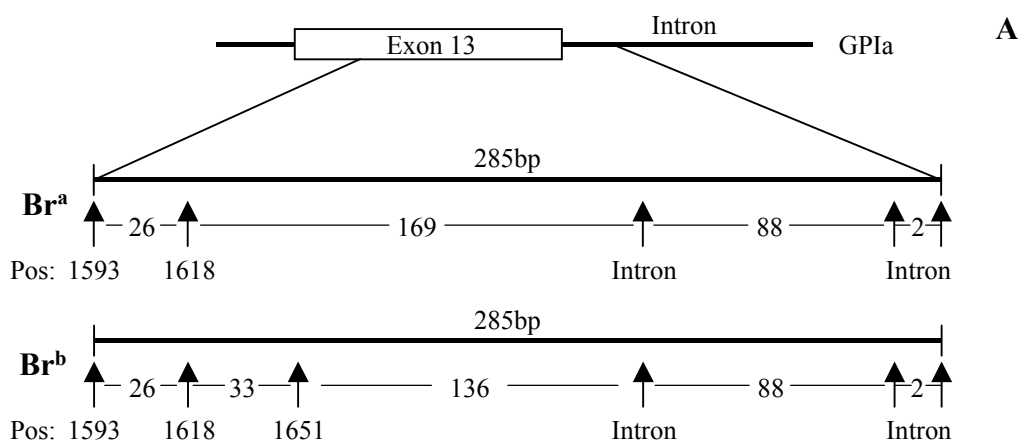
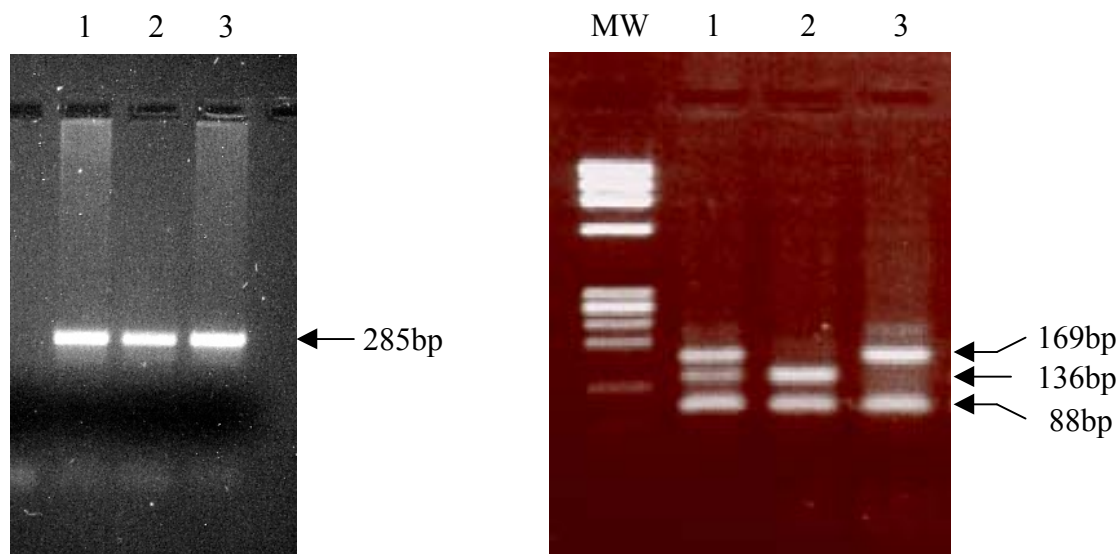


Abbildung 5.4: Genotypisierung des A<sub>1648</sub>G Polymorphismus mit Hilfe der RFLP-PCR

#### A: Prinzip der Genotypisierung:

Das nach Amplifikation mit spezifischen Primern erhaltene 285bp umfassende Produkt wird mit dem Restriktionsenzym Mnl I inkubiert. Die Schnittstellen dieses Enzyms (Erkennungssequenz: N(6)GAGG↑) sind mit ↑ gekennzeichnet. Durch den Basenaustausch von A nach G an Position 1648 entsteht bei Br<sup>b</sup>-positiven Individuen (G) eine neue Schnittstelle, wodurch zwei kürzere Produkte (33bp und 136bp) entstehen und somit eine Differenzierung ermöglicht wird



**B: Ergebnis der Genotypisierung:**

Genomische DNA wird, wie in 4.1.3.2 beschrieben, amplifiziert, mit dem Restriktionsenzym Mnl I verdaut und die Produkte auf ein 3% Agarosegel aufgetragen. Das Bild links zeigt die 285bp langen, unverdauten Produkte dreier Individuen, während das Bild rechts die Produkte nach der Inkubation mit Mnl I darstellt: Bahn 1 = A1648G - heterozygotes ( $Br^{a/b}$ ), Bahn 2 = G1648G - homozygotes ( $Br^{b/b}$ ), und Bahn 3 = A1648A - homozygotes ( $Br^{a/a}$ ) Individuum. Als MW wird der Molekulargewichtsstandard MW V bezeichnet.

Die Untersuchung verschiedener caniner DNA-Proben mit Hilfe der RFLP-Analyse brachte kein Ergebnis, da die Amplifikation von spezifischem Produkt mit dieser Methode nicht möglich war.

Auch der im Anschluß an die RFLP-PCR durchgeführte Versuch der Sequenzierung caniner DNA-Proben im Exon 13 zur Detektion des Br-Polymorphismus beim Hund zeigte keine Resultate. Die Amplifikation eines spezifischen Produktes war auch hier nicht möglich.

Zusammenfassend können aufgrund der Genotypisierung 50 ausgewählter humaner DNA-Proben folgende 6 Allelgruppen mit den entsprechenden Verteilungen dargestellt werden

<b>Position 807</b>	<b>Position 1648</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Verteilung %</b>
CC	GG	12	24
CT	GG	14	28
TT	GG	10	20
CC	AG	4	8
CT	AG	7	14
CC	AA	3	6

**Tabelle 5.2:** Verteilung der Allelgruppen bei Typisierung 50 ausgewählter Blutspender

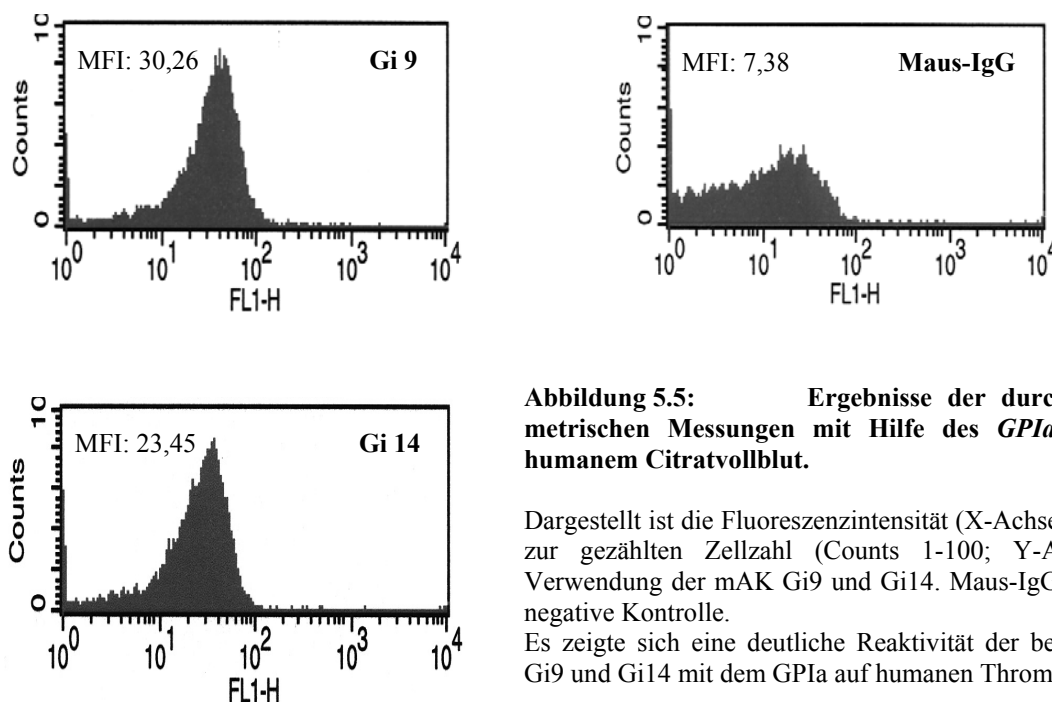
Eine Kopplung des Allels 1648A mit 807T wurde bei keinem Individuum gefunden.

## **5.2 Phänotypisierung humaner Thrombozyten mit verschiedenen mAk gegen GPIa**

Zur Überprüfung der Reaktivität verschiedener mAk gegen die GPIa-Untereinheit des GPIa/IIa-Komplexes, wurden sowohl durchflußzytometrische, als auch immunochemische Untersuchungen durchgeführt. Getestet wurden hier die von unserer Arbeitsgruppe entwickelten mAk Gi9 und Gi14.

### **5.2.1 Durchflußzytometrische Untersuchungen**

Um nachzuweisen, ob die mAk Gi9 und Gi14 an humane Thrombozyten binden, wurde ein Indirekter Fluoreszenztest aus Citratblut am Durchflußzytometer durchgeführt (siehe 4.2.2). In Abbildung 5.5 sind beispielhaft die Ergebnisse der FACS-Analyse mit humanen Thrombozyten dargestellt: während die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bei Reaktion der Thrombozyten mit normalem, monoklonalem Maus-IgG negative Werte ergab, zeigten sowohl Gi9, als auch Gi14 eine weitaus stärkere MFI und somit eine deutliche Reaktivität mit humanen Thrombozyten.



**Abbildung 5.5:** Ergebnisse der durchflußzytometrischen Messungen mit Hilfe des *GPIa Kits* aus humanem Citratvollblut.

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität (X-Achse) in Bezug zur gezählten Zellzahl (Counts 1-100; Y-Achse) bei Verwendung der mAK Gi9 und Gi14. Maus-IgG diente als negative Kontrolle.

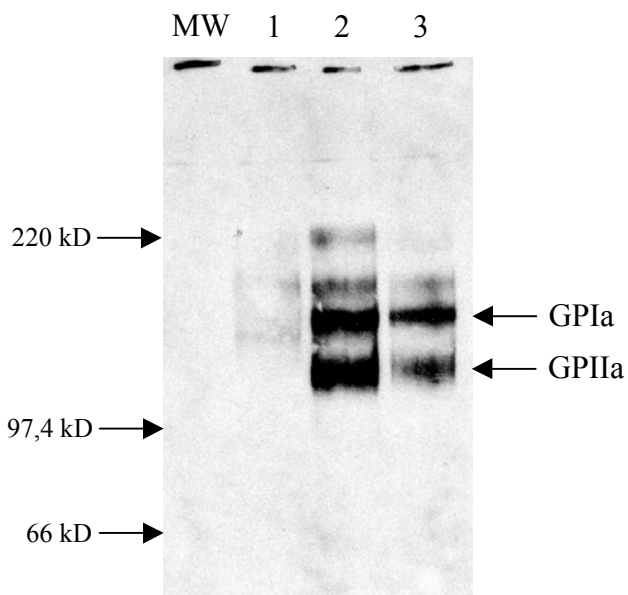
Es zeigte sich eine deutliche Reaktivität der beiden mAK Gi9 und Gi14 mit dem GPIa auf humanen Thrombozyten.

### 5.2.2 Immunochemische Untersuchungen:

Zur Bestätigung der durchflußzytometrischen Ergebnisse bzw. zur Detektion der Antigenstrukturen, gegen welche die verwendeten Antikörper gerichtet sind, wurde die Immunpräzipitation mit biotinmarkierten, humanen Thrombozyten durchgeführt. Die Präzipitation der in 100µl Thrombozytenlysat befindlichen Antigene erfolgte durch Zugabe von 5µl Gi9 bzw. Gi14 (jeweils 1mg/ml). Der Zellkulturüberstand 8653 diente hierbei als negative Kontrolle (siehe 4.2.5 – 2.4.7).

Abbildung 5.6 zeigt das Ergebnis der Immunpräzipitation humaner Thrombozyten mit Gi9 und Gi14. Die in Bahn 2 und Bahn 3 deutlich sichtbaren Banden bei einem relativen Molekulargewicht von etwa 160 bzw. 130 kD entsprechen den beiden Untereinheiten GPIa und GPIIa des Integrins auf humanen Thrombozyten.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse und somit die Reaktivität der mAk Gi9 und Gi14 gegen GPIa/IIa konnten mit Hilfe der Immunpräzipitation bestätigt werden.



**Abbildung 5.6: Immunpräzipitation humaner, biotinmarkierter Thrombozyten durch Gi9 bzw. Gi14.**

Die Präzipitation antigener Strukturen biotinylierter Thrombozyten erfolgte mit den mAk Gi9 (Bahn 2) und Gi14 (Bahn 3). Als negative Kontrolle diente der Zellkulturüberstand 8653 (Bahn 1). Nach Auftrennung über 7,5% SDS-PAGE unter nichtreduzierten Bedingungen erfolgte die Detektion mit Hilfe von Chemilumineszenz. Als Standard (MW) wurde RPN 756 (Fa. Amersham) verwendet.

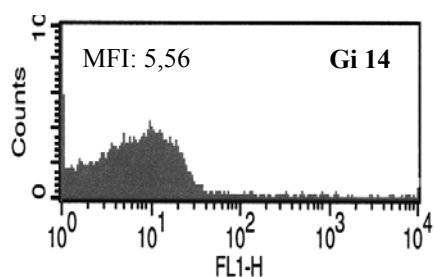
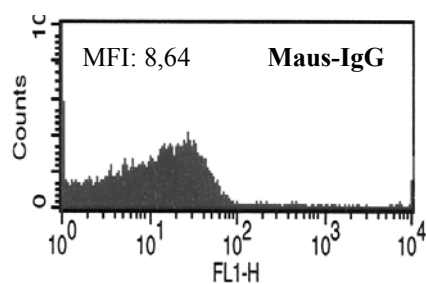
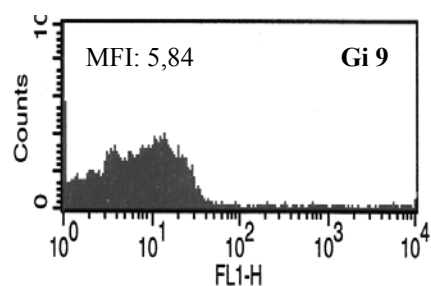
### 5.3 Phänotypisierung tierischer Thrombozyten mit den monoklonalen Antikörpern Gi9 bzw. Gi14

Um für weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit Aufschluß über die Reaktivität der monoklonalen Antikörper Gi9 bzw. Gi14 gegenüber tierischen Thrombozyten zu erhalten, wurden sowohl durchflußzytometrische, als auch immunchemische Untersuchungen mit tierischem Blut durchgeführt.

#### 5.3.1 Durchflußzytometrische Untersuchungen

Die unter 5.2.1 beschriebenen FACS-Analysen wurden mit Citratblut von Ratte, Kaninchen und Hund als Vertreter verschiedener Labortierspezies durchgeführt (siehe 4.2.4).

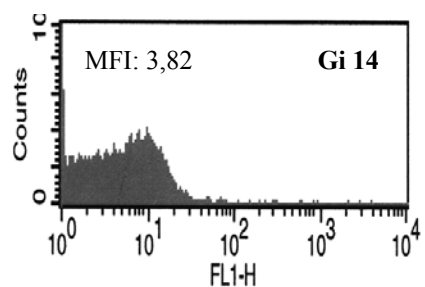
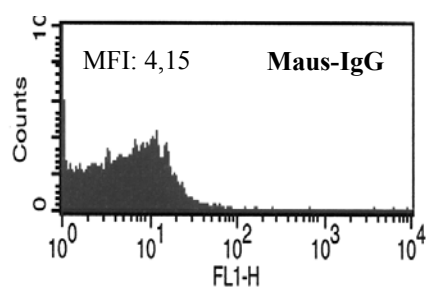
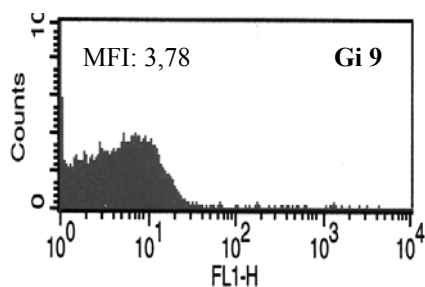
Die Ergebnisse dieser durchflußzytometrischen Untersuchungen sind beispielhaft in Abbildung 5.7A-C dargestellt. Während Thrombozyten von Ratte und Kaninchen keine Reaktion mit den eingesetzten mAk zeigten, reagierten canine Thrombozyten sowohl mit Gi9, als auch Gi14.



**Abbildung 5.7: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchung aus tierischem Citratvollblut**

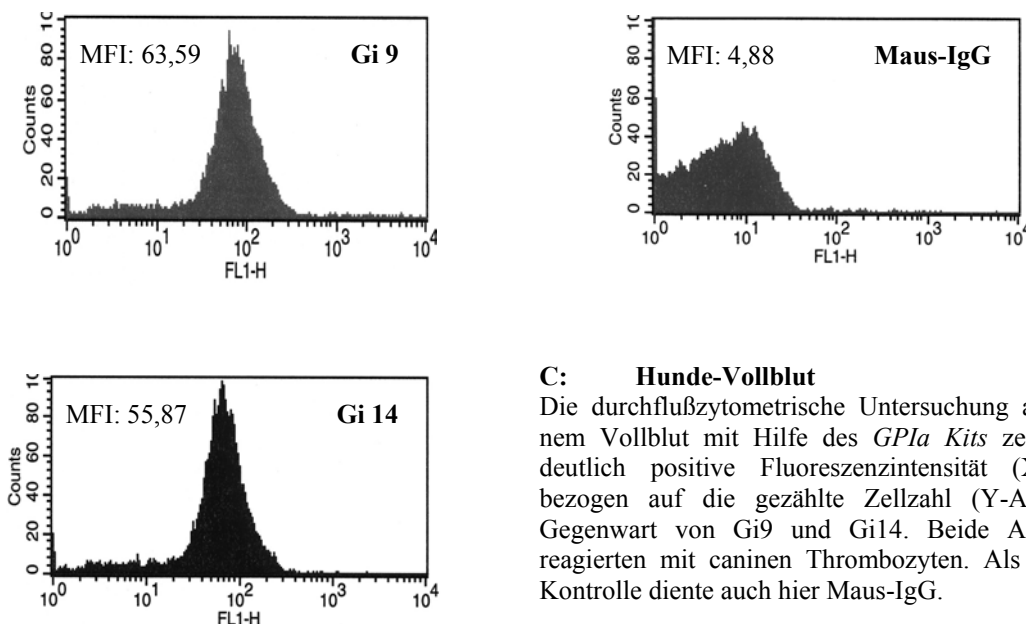
**A: Kaninchen-Vollblut**

Darstellung der Fluoreszenzintensität (X-Achse) in Bezug zur gezählten Zellzahl (Y-Achse) in Gegenwart von Gi9 bzw. Gi14. Maus-IgG = negative Kontrolle  
Es zeigt sich keine Reaktivität der Antikörper mit Thrombozyten des Kaninchens.



**B: Ratten-Vollblut**

Die Durchführung der FACS-Analyse aus Vollblut der Ratte zeigte Fluoreszenzintensitäten (X-Achse) in Gegenwart von Gi9 bzw. Gi14, welche denen der negativen Kontrolle (Maus-IgG) glichen. Beide Antikörper reagieren nicht mit den Thrombozyten der Ratte.



### C: Hunde-Vollblut

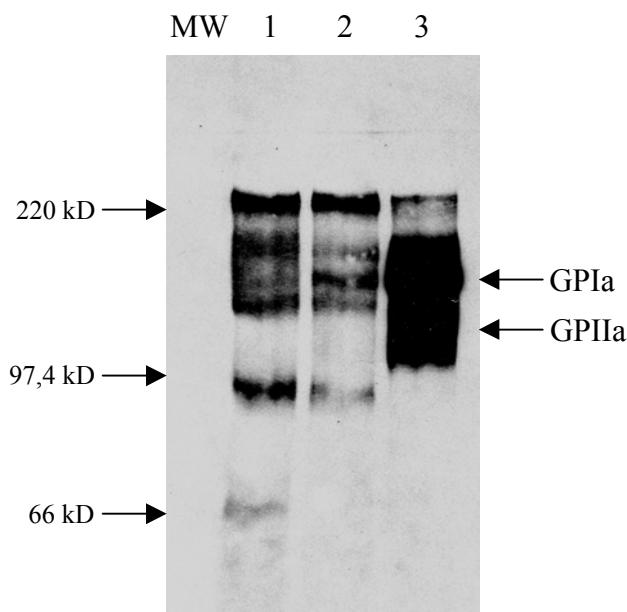
Die durchflußzytometrische Untersuchung aus caninem Vollblut mit Hilfe des *GPIa Kits* zeigte eine deutlich positive Fluoreszenzintensität (X-Achse) bezogen auf die gezählte Zellzahl (Y-Achse) in Gegenwart von Gi9 und Gi14. Beide Antikörper reagierten mit caninen Thrombozyten. Als negative Kontrolle diente auch hier Maus-IgG.

### 5.3.2 Immunochemische Untersuchungen

Die Bestätigung der im Rahmen der FACS-Analyse erlangten Ergebnisse wurde auch bei caninen Thrombozyten mit Hilfe der Immunpräzipitation durchgeführt (siehe 4.2.5–4.2.7).

Die in Abbildung 5.8 dargestellten Ergebnisse zeigen die Präzipitation des caninen GPIa/IIa-Komplexes durch die mAk Gi9 und Gi14. Der Antikörper Gi14 (Bahn 3) präzipitierte wie erwartet zwei verschiedene Banden mit einem relativen Molekulargewicht von 160 (GPIa-Untereinheit) bzw. 130 kD (GPIIa-Untereinheit). Im Vergleich dazu präzipitierte der mAk Gi9 nur die GPIa Untereinheit (Bahn 2). Der als negative Kontrolle eingesetzte Zellkulturüberstand 8653 detektierte zwei unspezifische Banden mit den jeweiligen Molekulargewichten von etwa 150 kDa, bzw. 190 kDa.

Generell zeigte sich auch mit Hilfe der Immunpräzipitation eine deutliche Reaktivität der mAk Gi9 und Gi14 mit caninen Thrombozyten.



**Abbildung 5.8: Immunpräzipitation caniner Thrombozyten durch Gi9 bzw. Gi14**

Die Präzipitation antigener Strukturen im biotinylierten Thrombozytenlysate erfolgte durch die mAk Gi9 (Bahn 2) und Gi14 (Bahn 3). Nach Auftrennung im 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgels unter nichtreduzierten Bedingungen wurden die Glykoproteine durch Chemilumineszenz detektiert. Als negative Kontrolle diente der Zellkulturüberstand 8653 (Bahn 1). WM= Rainbow coloured protein weight standard RPN 756 (Fa. Amersham)

Eine Immunpräzipitation aus Thrombozytenlysate der Ratte bzw. des Kaninchens wurde aufgrund der fehlenden Reaktivität beider Antikörper gegenüber diesen Zellen in der Durchflußzytometrie nicht durchgeführt.

#### **5.4 GPIIb/IIIa - Expression auf humanen Thrombozyten verschiedener Genotypen**

Um die Expression des GPIIb/IIIa - Komplexes in Abhängigkeit unterschiedlicher Allele an den Positionen 807 bzw. 1648 zu untersuchen, wurden Thrombozyten von verschiedenen, typisierten Individuen (insgesamt 6 verschiedene Allelgruppen; siehe 5.1) isoliert, gewaschen und fixiert (siehe 4.2.3). Nach dem Einstellen der Zellzahl auf  $10^8$ /ml und der Inkubation mit dem mAk Gi14 wurden die Thrombozyten mit fluoresceingekoppeltem Kaninchen-anti-Maus-IgG markiert und im Durchflußzytometer gemessen (siehe 4.2.4). Als negative Kontrolle dienten sowohl der mAk Anti-VLA5 (Anti-CDw49e), als auch der Zellkulturüberstand 8653.

Die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchungen aller 6 verschiedener Allelgruppen sind in Tabelle 11.2 (Anhang) zusammengefaßt.

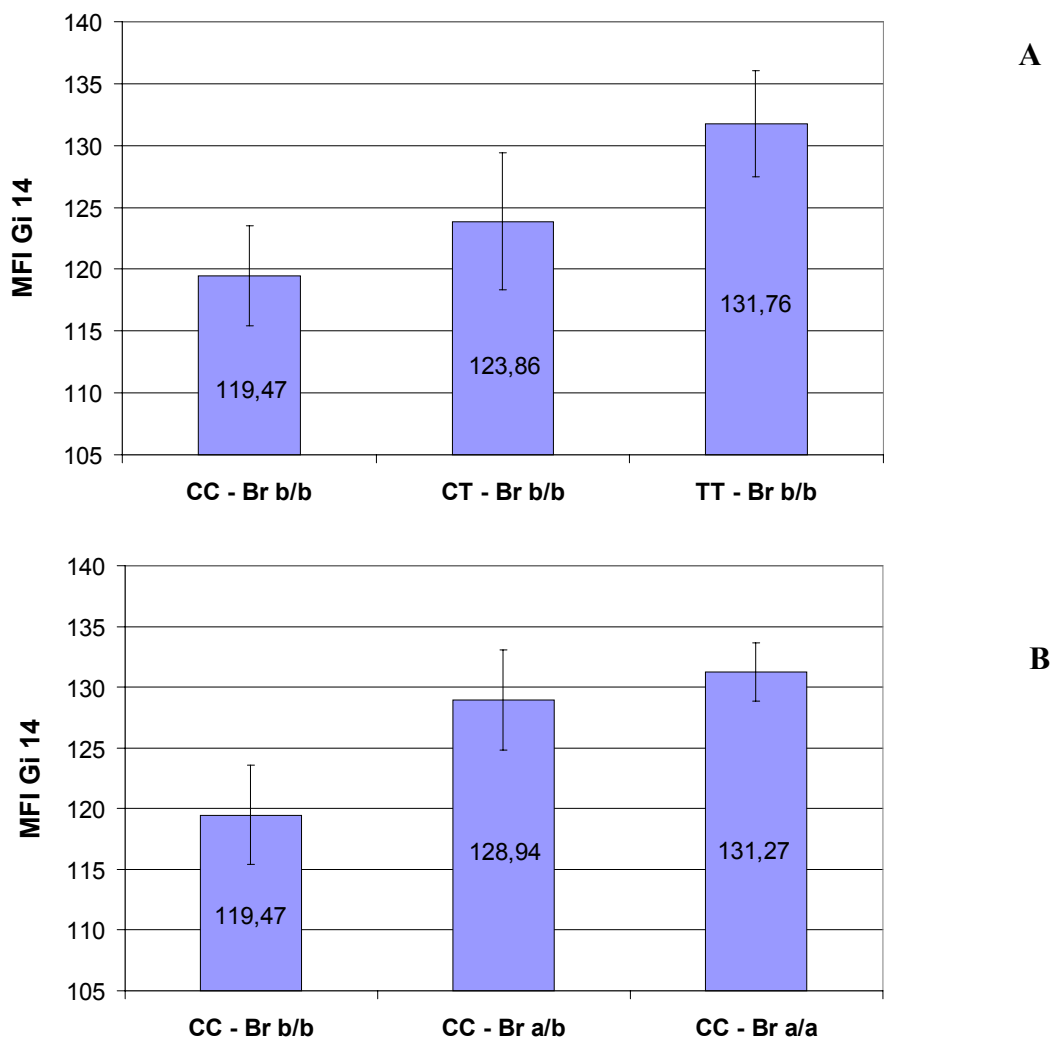
Der mAk Gi14 reagierte mit den Thrombozyten aller 44 untersuchten Individuen, wobei die Fluoreszenzstärke deutlich variierte. Beim Vergleich der MFI-Werte der einzelnen Individuen zeigte sich eine deutlich erhöhte Mittlere Fluoreszenzintensität sowohl bei Trägern des 807T-, als auch des 1648A-Allels. So ergab die statistische Berechnung mit Hilfe des t-Tests eine signifikante Erhöhung der MFI bei T807T-homozygoten Individuen im Vergleich zu C807C-homozygoten ( $p = <0,001$ ), bzw. C807T-heterozygoten ( $p = 0,002$ ) Spendern. Darüberhinaus zeigte sich, daß auch die Anwesenheit des 1648A-Allels die Expression des GPIa/IIa-Komplexes auf der Thrombozytenoberfläche positiv beeinflusste. Die Zahlenwerte der statistischen Berechnung finden sich in Tabelle 5.3 zusammengefaßt.

Die schwächste GPIa/IIa-Expression zeigten Individuen mit dem Genotyp C807C / G1648G, die höchste Expression auf Thrombozyten besitzen Träger mit dem Genotyp T807T / G1648G. Diese Beobachtungen sind in der Abbildung 5.9 dargestellt. Graphik A verdeutlicht den Anstieg der MFI in Gegenwart eines 807T-Allels, während Graphik B den Anstieg der MFI aufgrund der Präsenz eines 1648A-Allels darstellt.

<b>Genotyp 807</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Genotyp 1648</b>
CC / CT:	0,056	GG
CT / TT:	0,002	
CC / TT:	< 0,001	

<b>Genotyp 1648</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Genotyp 807</b>
GG / AG:	0,016	CC
GG / AA	0,001	
AG / AA	0,041	

**Tabelle 5.3:** Darstellung der statistischen Ergebnisse des t-Tests



**Abbildung 5.9: Variabilität der Expressionsdichte von GPIa/IIa in Abhängigkeit des Genotyps untersucht mit dem monoklonalen Antikörper Gi14**

Graphik A: Expression von GPIa/IIa in Abhängigkeit vom vorliegenden Genotyp, gemessen am Durchflußzytometer. Graphik A zeigt die steigende MFI in Gegenwart eines 807T Allels bei gleichem <sup>1648</sup>G - Genotyp. Die statistische Auswertung mit Hilfe des t-Tests ergab für folgende Vergleiche der MFI die Werte: C807C / C807T:  $p=0,056$ , C807C / T807T:  $p<0,001$ , C807T / T807T:  $p=0,002$

In Graphik B hingegen ist die steigende Expressions in Gegenwart des 1648A-Allels bei gleichem C807C-Genotyp dargestellt. Der Vergleich der MFI Werte mit Hilfe des t-Tests zeigte eine deutliche Signifikanz: G1648G / A1648G:  $p=0,016$ , G1648G / A1648A:  $p=0,001$ , A1648G / A1648A:  $p=0,041$ .

Die angegebenen Zahlenwerte stellen die Mittelwerte der MFI dar. Die Standardabweichung (s) wurde mit Hilfe der Balken eingezeichnet.

Aufgrund der Ergebnisse konnte folgende Reihenfolge der einzelnen Genotypen anhand ihrer steigenden Expression des GPIa/IIa-Komplexes aufgestellt werden: C807C – G1648G (Mittelwert der MFI: 119,47), C807T – G1648G (Mittelwert der MFI: 123,86), C807C – A1648G (Mittelwert der MFI: 125,93), C807T – A1648G (Mittelwert der MFI: 128,94), C807C – A1648A (Mittelwert der MFI: 131,27) und T807T – G1648G (Mittelwert der MFI: 131,76) (vergleiche Tabelle 11.1, Anhang).

## 5.5 Untersuchungen zur Heterogenität der GPIaIIa - Expression auf humanen Thrombozyten definiert durch verschiedene monoklonale Antikörper

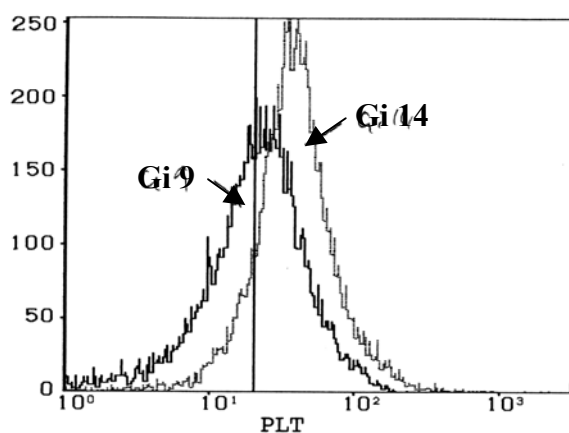
### 5.5.1 Expressionsstudie mit Hilfe isolierter Thrombozyten

Um den Zusammenhang zwischen der Heterogenität in der GPIa/IIa-Expression und den verschiedenen monoklonalen Antikörpern zu untersuchen, wurde die unter 5.4 beschriebene durchflußzytometrische Analyse isolierter Thrombozyten auch unter Verwendung des mAk Gi9 durchgeführt. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 11.1 (Anhang) zusammengefaßt.

Auch bei dieser Untersuchung zeigte sich eine deutliche Reaktivität des Antikörpers mit den Thrombozyten aller Individuen. Die schon mit Gi14 festgestellte Varianz der Bindungsstärke in Abhängigkeit vom Genotyp konnte auch hier beobachtet werden.

Bei Betrachtung der jeweiligen Bindungsintensität von Gi9 bzw. Gi14 bei dem gleichen Individuum zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der MFI. So war bei allen 44 untersuchten Individuen, unabhängig vom Genotyp, eine stärkere Bindung isolierter Thrombozyten durch Gi14 im Vergleich zu Gi9 zu verzeichnen (Vergleich siehe Tabelle 11.1, Anhang).

Abbildung 5.10 zeigt beispielhaft die unterschiedliche Fluoreszenzintensität von Gi9 und Gi14 bei gleichem Individuum.



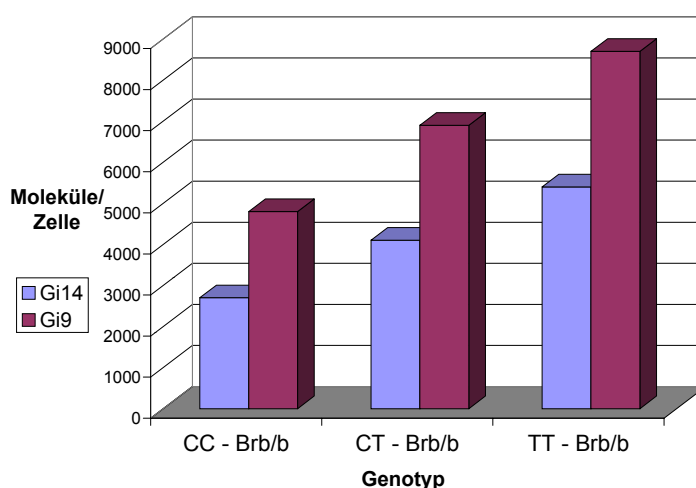
**Abbildung 5.10:** Vergleich der Fluoreszenzintensitäten (MFI) der mAkGi9 und Gi14 bei gleichem Individuum

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität (X-Achse) in Bezug zur Zellzahl (Y-Achse) bei Verwendung der mAk Gi9 bzw. Gi14.

### 5.5.2 Durchflußzytometrische Untersuchung mit Vollblut

Um den Einfluß der Thrombozytenisolierung auf die Expression des GPIa/IIa-Komplexes zu untersuchen, wurden eine direkte Messung aus Vollblut mit Hilfe des GPIa Kits der Firma Biocytex, Marseille, durchgeführt (siehe 4.2.4). Hierbei wurden die Thrombozyten im verdünnten Vollblut direkt mit Gi9 bzw. Gi14 inkubiert, anschließend mit fluoresceingekoppeltem Sekundärantikörper markiert und am Durchflußzytometer gemessen.

Auch mit dieser Methode zeigte sich eine Bindung humaner Thrombozyten durch beide Antikörper. Die Stärke der Bindung und daraus resultierend die Oberflächendichte des GPIa/IIa-Komplexes auf den Thrombozyten variierte in Abhängigkeit des vorliegenden Genotyps.

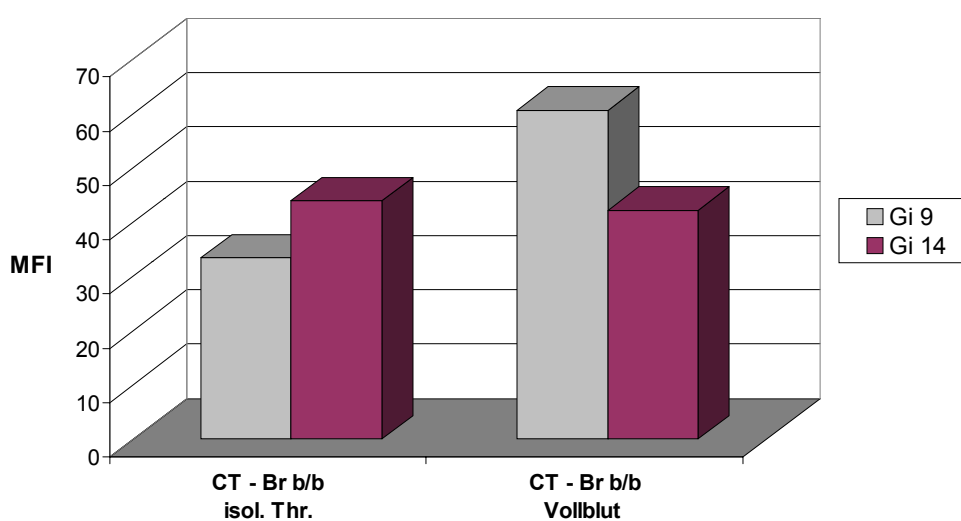


**Abbildung 5.11: Graphische Darstellung der Ergebnisse Durchflußzytometrischer Untersuchungen aus Vollblut.** Vergleich der berechneten Oberflächendichte des GPIa/IIa-Komplexes auf Thrombozyten in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper. Dargestellt sind hier repräsentative Ergebnisse von jeweils einem Individuum des entsprechenden Genotyps aus einem Kollektiv von 79 Proben, die in Zusammenarbeit mit der Fa. Biocytex, Marseille, untersucht wurden. Es zeigt sich, unabhängig vom Genotyp, eine deutlich stärkere Bindung der Thrombozyten durch Gi9, welche in einer erhöhten, berechneten Oberflächendichte resultiert.

Beim Vergleich der Bindungsintensität (MFI) nach Inkubation mit den mAk Gi9 bzw. Gi14 bei gleichem Individuum zeigte sich bei allen von uns untersuchten Proben (n=9) unter Verwendung von Vollblut eine stärkere Bindung der Thrombozyten durch Gi9. Diese Beobachtungen konnten im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Firma Biocytex, Marseille, bestätigt werden. Hierbei wurde die Expression des GPIa/IIa-Komplexes auf Thrombozyten aus Vollblut bei 79 Individuen mit der gleichen Methode unabhängig untersucht. Bei allen Proben konnte die deutlich stärkere Bindung der Blutplättchen in Vollblut durch Gi9 bestätigt werden. (siehe Anhang, Abbildung 11.2)

Abbildung 5.12 zeigt die Varianz der MFI von Gi9 bzw. Gi14 in Abhängigkeit der angewandten Methode und somit des eingesetzten Untersuchungsmaterials: Bei der Verwendung von isolierten Thrombozyten reagiert der mAk Gi14 stärker als Gi9 (MFI Gi14 > MFI Gi9), während sich das Verhältnis bei der Messung mit Vollblut gegenteilig darstellt (MFI Gi9 > Gi14).

Vergleicht man die MFI-Werte von Gi14 beider Untersuchungsmaterialien miteinander, so ist die Varianz gering, wohingegen sich beim Vergleich der MFI-Werte von Gi9 ein starker Unterschied zeigt.



**Abbildung 5.12: Graphische Darstellung der variierenden Bindungsintensität von Gi9 bzw. Gi14 in Abhängigkeit vom verwendeten Untersuchungsmaterial**

Dargestellt sind hier die Ergebnisse eines Individuums repräsentativ für die Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit. Während bei einem Kollektiv von 44 Proben bei isolierten Thrombozyten eine deutlich stärkere Bindung durch Gi14 festzustellen war, zeigte sich im Gegensatz dazu bei durchflußzytometrischen Messungen aus Vollblut eine stärkere Bindung der Thrombozyten durch Gi9 (n=88).

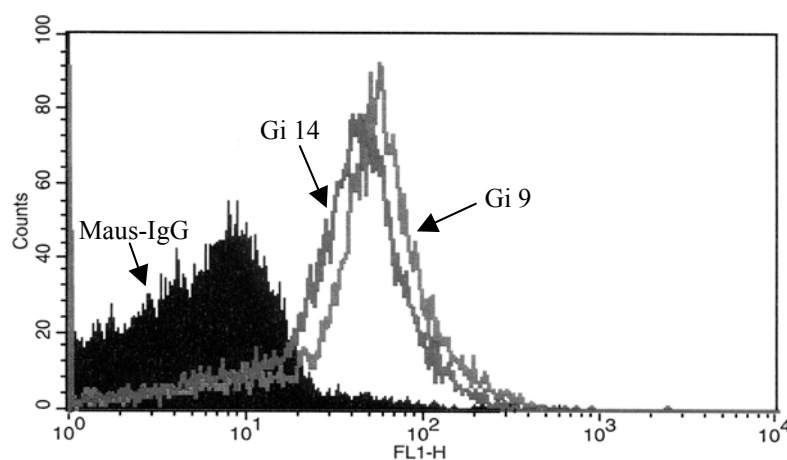
## 5.6 Untersuchungen zur Heterogenität der GPIa/IIa -Expression auf caninen Thrombozyten

Um aufzuklären, ob die beim Menschen gefundene Expressionsvariabilität des GPIa/IIa-Komplexes auch auf caninen Thrombozyten existiert, wurde die unter 5.1 beschriebene Typisierung der Polymorphismen C807T bzw. A1648G auch beim Hund durchgeführt.

Zur Überprüfung einer eventuell vorhandenen Varianz in der Expression von GPIa/IIa auf caninen Thrombozyten dienten Blutproben von sechs verschiedenen Blutspenderhunden der Inneren Klinik I der Kleintiere, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die Untersuchung mit Hilfe der Durchflußzytometrie aus Vollblut ergab, daß sowohl der mAk Gi9, als auch Gi14 mit caninen Thrombozyten reagierte. Bei Vergleich der jeweiligen Bindungsintensität von Gi9 und Gi14 bei gleichem Individuum zeigte sich eine stärkere Bindung der Thrombozyten durch Gi9. Es gilt also auch bei Verwendung von caninem

Vollblut: MFI Gi9 > MFI Gi14.



**Abbildung 5.13:** Darstellung der verschieden starken Bindungsintensitäten an canine Thrombozyten, ausgedrückt durch die Fluoreszenz (X-Achse), in Gegenwart der beiden mAk Gi9 und Gi14 bei gleichem Individuum.

Die Quantifizierung der GPIa/IIa-Dichte auf der Oberfläche caniner Thrombozyten ergab eine relativ geringe Variabilität zwischen den einzelnen Individuen. Es zeigte sich jedoch ein Unterschied der GPIa/IIa-Dichte bei gleichem Individuum in Abhängigkeit vom verwendeten mAk (Gi9 oder Gi14). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 5.4.

	<b>Hund 1</b>		<b>Hund 2</b>		<b>Hund 3</b>		<b>Hund 4</b>		<b>Hund 5</b>		<b>Hund 6</b>	
	<b>Gi 9</b>	<b>Gi 14</b>	<b>Gi 9</b>	<b>Gi 14</b>	<b>Gi 9</b>	<b>Gi 14</b>	<b>Gi 9</b>	<b>Gi 14</b>	<b>Gi 9</b>	<b>Gi 14</b>	<b>Gi 9</b>	<b>Gi 14</b>
MFI	69,22	59,62	57,01	54,91	65,36	59,40	69,95	54,28	90,96	70,12	60,83	45,13
Mol./ Zelle	2700	2310	2050	2070	2250	2200	2400	2100	3100	2700	2200	1750

**Tabelle 5.4:** Ergebnisse der FACS-Analyse mit caninem Citratvollblut: MFI und Rezeptordichte in Abhängigkeit vom verwendeten monoklonalen Antikörper

## 5.7 Einfluss der mAk Gi9 und Gi14 auf die Thrombozytenfunktion

### 5.7.1 Funktionelle Untersuchungen mit humanen Thrombozyten

Um den Einfluß der mAk Gi9 und Gi14 auf die Thrombozytenfunktion zu untersuchen, wurde ein von Bellavite und Mitarbeitern 1994 beschriebener Adhäsionstest an Kollagen Typ I etabliert und durchgeführt (siehe 4.3).

Nach schonender Isolierung der Thrombozyten aus Citratvollblut unter Zugabe von Prostaglandin PGE<sub>1</sub>, ACD und Apyrase wurde die Zellzahl auf  $5 \times 10^7$ /ml eingestellt und die Thrombozyten mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern präinkubiert. Die anschließende Adhäsion erfolgte in mit Kollagen vorbeschichteten Mikrotiterplatten. Als Kontrolle dienten sowohl NaCl, als auch der gegen den GPIIb/IIIa – Komplex gerichtete mAk Gi5.

Die Thrombozytenadhäsion an Kollagen Typ I, welches in den Konzentrationen von 10µg/ml und 20µg/ml eingesetzt wurde, konnte optisch unter dem Phasenkontrastmikroskop, sowie quantitativ über den Nachweis der thrombozytären Sauren Phosphatase detektiert werden. Als negative Kontrolle wurden die Mikrotiterplatten mit 1% BSA beschichtet.

Bei der photometrischen Messung zeigte sich eine deutliche Bindung der mit NaCl präinkubierten Thrombozyten an Kollagen, sowohl bei einer Konzentration des Kollagens von 10µg/ml, als auch von 20µg/ml (siehe Tab.11.2). Eine Thrombozytenadhäsion an BSA wurde nicht beobachtet.

Ein dem BSA ähnliches Bild zeigte sich in Gegenwart des mAk Gi9: nach Präinkubation der Thrombozyten mit Gi9 fehlte eine Bindung an Kollagen bei beiden Konzentrationen fast vollständig. Im Gegensatz dazu zeigten die mit den Antikörpern Gi14 bzw. Gi5 vorinkubierten Thrombozyten eine normale Adhäsion an Kollagen. Diese Beobachtungen ließen sich bei allen untersuchten Spendern feststellen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse erfolgte in Tabelle 11.2 (Anhang).

Tabelle 5.5 zeigt die prozentuale Hemmung der Thrombozytenadhäsion an Kollagen, sowohl bei einer Konzentration von 10µg/ml, als auch 20µg/ml, durch Präinkubation mit den verschiedenen monoklonalen Antikörpern. (siehe auch Tabelle 11.2, Anhang):

	Kollagen Typ I (10µg/ml)			Kollagen Typ I (20 µg/ml)		
	<b>Gi 9</b>	<b>Gi 14</b>	<b>Gi 5</b>	<b>Gi 9</b>	<b>Gi 14</b>	<b>Gi 5</b>
Bindung [%]	3,6 %	42,6 %	118 %	7,4 %	48 %	110 %
Hemmung [%]	96,4 %	57,4 %	keine	92,6 %	52 %	keine

**Tabelle 5.5:** Hemmung der Adhäsion humaner Thrombozyten an Kollagen Typ I in Gegenwart verschiedener mAk

Die Photographien in Abbildung 5.14 zeigen die Adhäsionsfähigkeit humaner Thrombozyten an BSA und Kollagen Typ I im Phasenkontrastmikroskop. Die vorliegende Hemmung der Thrombozytenadhäsion an Kollagen durch Gi9 ist auch hier deutlich erkennbar.



**Abbildung 5.14A**

1% BSA

humane Thrombozyten präinkubiert mit NaCl

(neg.Kontrolle)



**Abbildung 5.14B**

Kollagen 10 $\mu$ g/ml

humane Thrombozyten präinkubiert mit NaCl

(pos Kontrolle)



**Abbildung 5.14C**

Kollagen 10 $\mu$ g/ml

humane Thrombozyten präinkubiert mit Gi9 (0,02mg/ml)

**Abbildung 5.11:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Adhäsion humaner Thrombozyten an BSA bzw. Kollagen Typ I

### 5.7.2 Funktionelle Untersuchungen mit caninen Thrombozyten

Um die Wirkung der monoklonalen Antikörper auf die Kollagenadhäsion caniner Thrombozyten zu untersuchen, wurde der Adhäsionstest unter gleichen Bedingungen (siehe 5.7.1) bei sieben verschiedenen Blutspenderhunden durchgeführt. Die Ergebnisse der photometrischen Extinktionsmessungen sind in Tabelle 11.3 (Anhang) zusammengefaßt.

Bei der Auswertung zeigte sich sowohl in den Kontrollveruchen, als auch nach Präinkubation caniner Thrombozyten mit Gi14 und Gi5 eine deutliche Adhäsion an Kollagen Typ I, unabhängig von der eingesetzten Konzentration (10µg/ml bzw. 20µg/ml). Im Gegensatz dazu führte die Präinkubation mit dem mAk Gi9, ähnlich wie bei humanen Thrombozyten, zu einer starken Verminderung der Kollagenadhäsion.

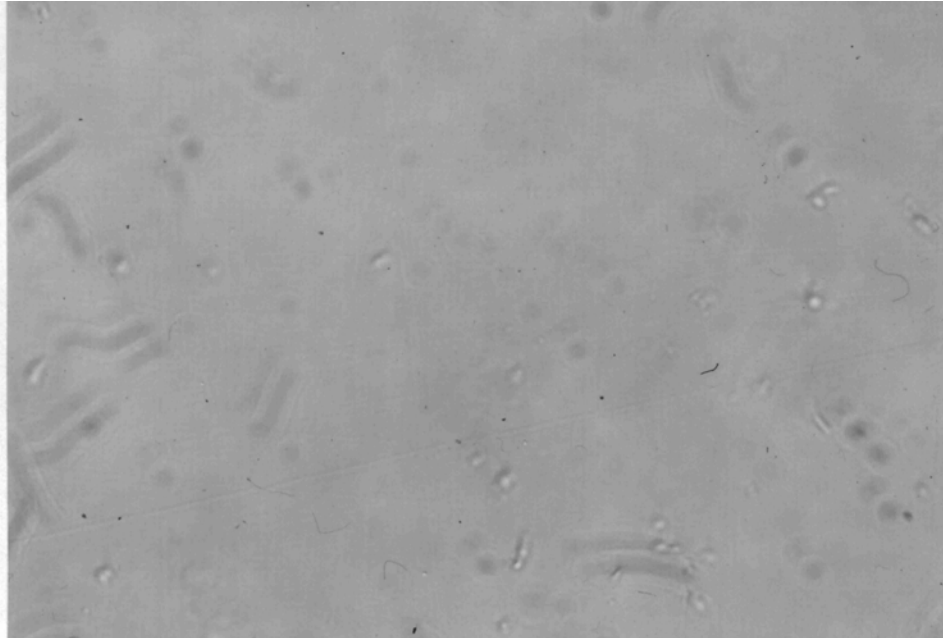
Tabelle 5.6 zeigt die prozentuale Hemmung der Thrombozytenadhäsion an Kollagen Typ I in Abhängigkeit der Gegenwart verschiedener monoklonaler Antikörper.

	Kollagen Typ I (10µg/ml)			Kollagen Typ I (20 µg/ml)		
	<b>Gi 9</b>	<b>Gi 14</b>	<b>Gi 5</b>	<b>Gi 9</b>	<b>Gi 14</b>	<b>Gi 5</b>
Bindung [%]	10,5 %	107,5 %	111 %	14,4 %	104 %	108 %
Hemmung [%]	89,5 %	Keine	keine	85,6 %	keine	keine

**Tabelle 5.6:** Darstellung der Bindungsintensität (%) caniner Thrombozyten in Gegenwart verschiedener monoklonaler Antikörper, verglichen mit der positiver Kontrolle (mit NaCl vorinkubierte Thrombozyten).

Diese Ergebnisse zeigen, daß der mAk Gi9 eine deutlich inhibierende Wirkung auf die Kollagenadhäsion sowohl humaner, als auch caniner Thrombozyten hat.

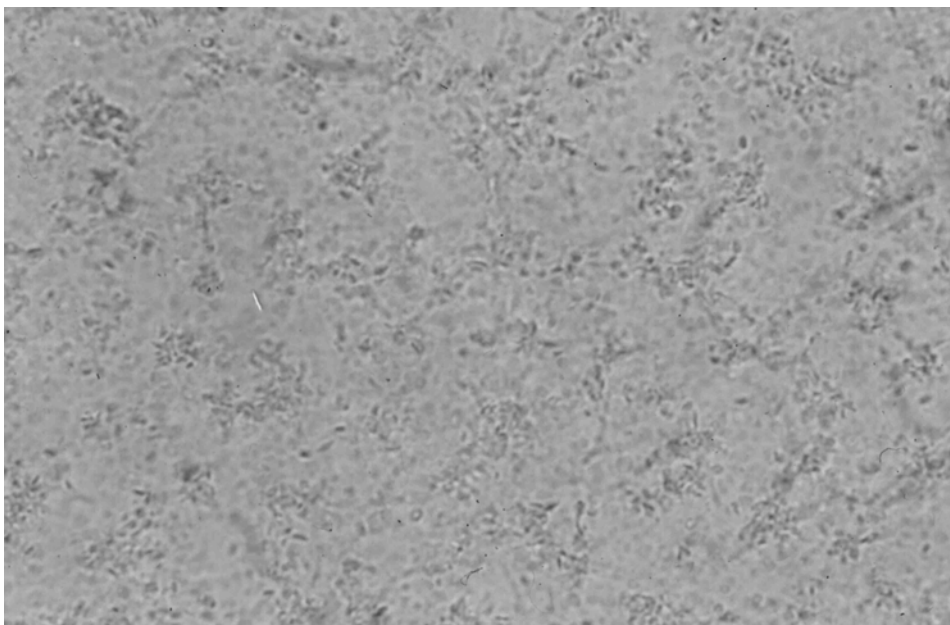
Die Photographien der Abbildung 5.15 zeigen die Adhäsion caniner Thrombozyten an 1%iges BSA oder Kollagen Typ I in Gegenwart verschiedener mAk.



**Abbildung 5.15A**

1 % BSA

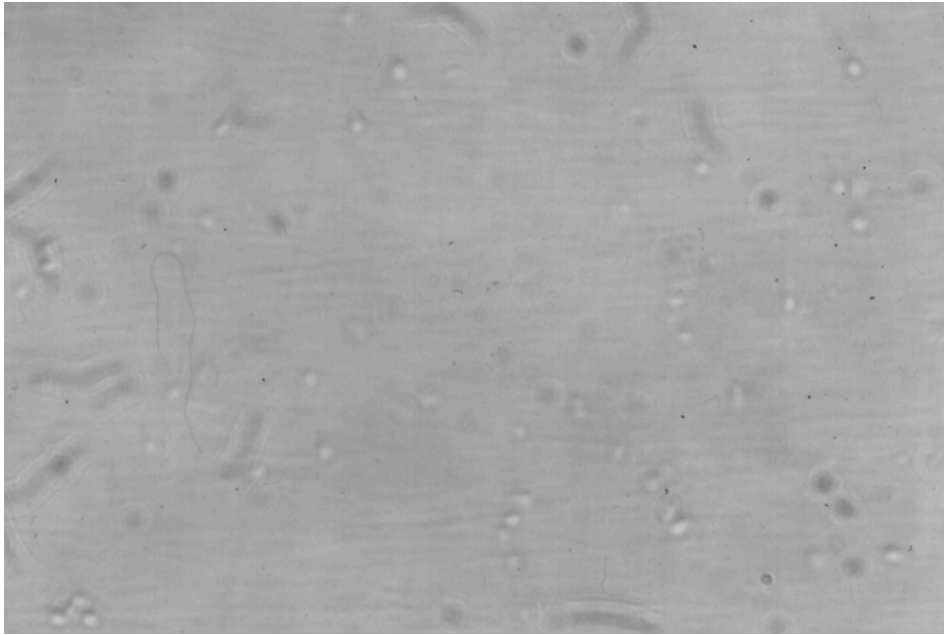
canine Thrombozyten  
präinkubiert mit  
NaCl  
(neg. Kontrolle)



**Abbildung 5.15B**

Kollagen 10µg/ml

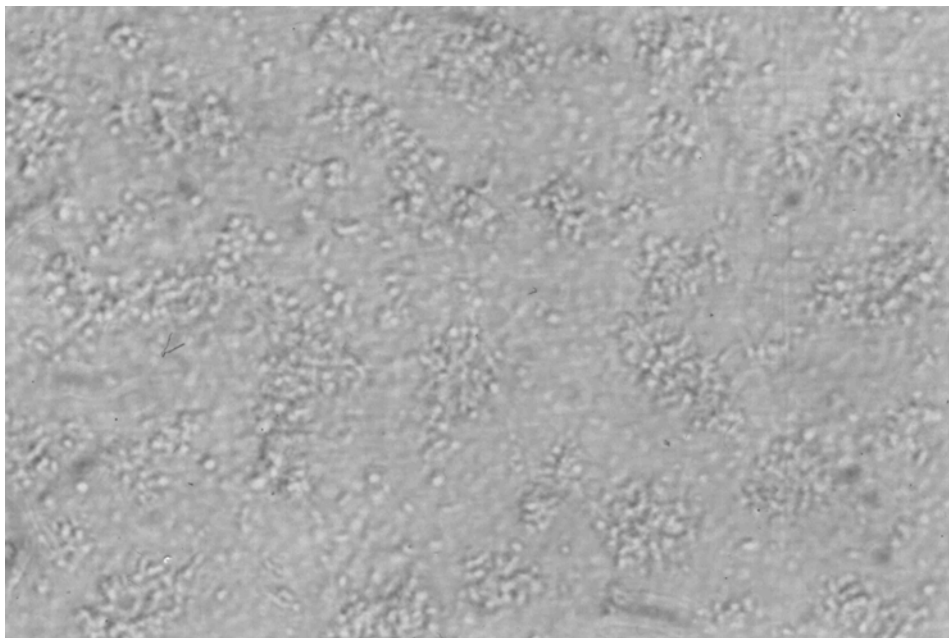
canine Thrombozyten  
präinkubiert mit  
NaCl  
(pos. Kontrolle)



**Abbildung 5.15C**

Kollagen 10µg/ml

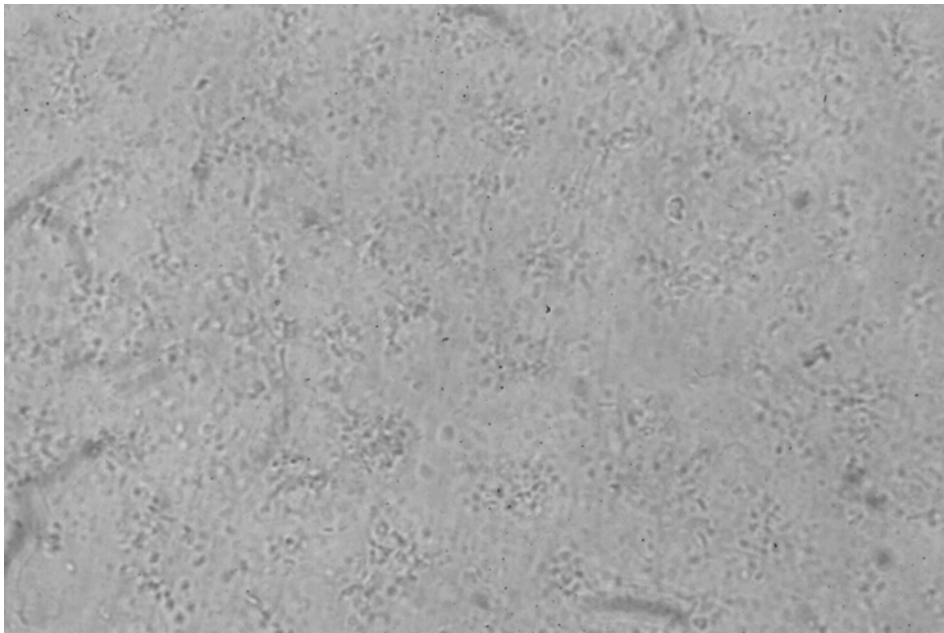
canine Thrombozyten  
präinkubiert mit Gi9  
(0,02mg/ml)



**Abbildung 5.15D**

Kollagen 10µg/ml

canine Thrombozyten  
präinkubiert mit Gi14  
(0,02mg/ml)



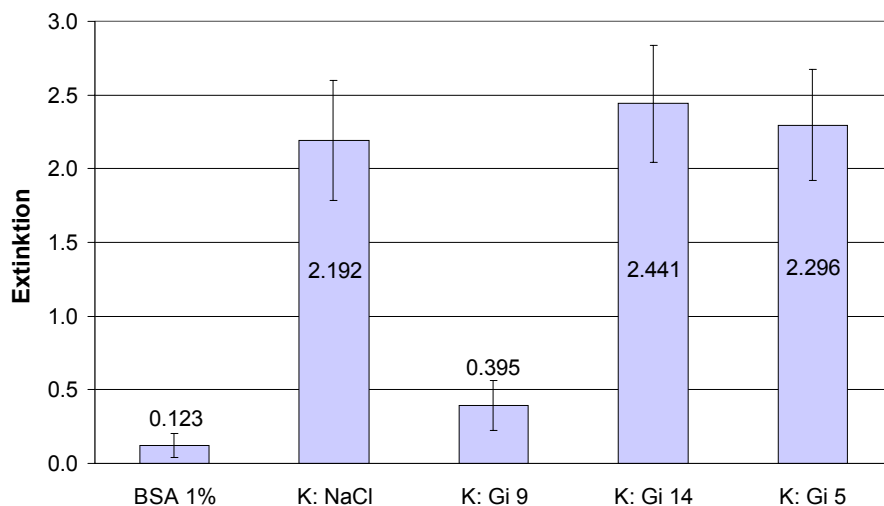
**Abbildung 5.15E**

Kollagen 10 $\mu$ g/ml

canine Thrombozyten  
präinkubiert mit Gi5  
(0,02mg/ml)

**Abbildung 5.15 A-E:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Adhäsion caniner Thrombozyten an Kollagen in Gegenwart verschiedener Antikörper

Das Adhäsionsverhalten caniner Blutplättchen in Gegenwart der mAk Gi9, Gi14 und Gi5 ist in Abbildung 5.16 graphisch dargestellt.



**Abbildung 5.16: Graphische Darstellung der Adhäsion caniner Thrombozyten an Kollagen**

Quantifizierung der Bindungsstärke durch die photometrische Messung der Sauren Phosphatase-Aktivität (X-Achse) nach Lyse der Thrombozyten und Zugabe des Substrates p-Nitrophenylphosphat.

Dargestellt ist die Stärke der Adhäsion caniner Thrombozyten an Kollagen Typ I (10µg/ml) nach Präinkubation mit NaCl (K: NaCl) bzw. verschiedenen monoklonalen Antikörpern (K: Gi9, K: Gi14, K: Gi5). Die Zahlenangaben stellen die Mittelwerte der gemessenen Extinktionen dar. Als negative Kontrolle der Adhäsion diene 1%BSA.

Die deutlich verminderte Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen in Gegenwart von Gi9 wird deutlich, ebenso wie die verstärkte Bindung in Gegenwart von Gi14.

## 6 Diskussion

Der Glykoproteinkomplex GPIa/IIa hat im Rahmen der frühen Phase der primären Hämostase als Hauptkollagenrezeptor auf Thrombozyten eine große Bedeutung. Fallberichte haben gezeigt, daß eine verminderte bzw. fehlende Expression dieses Integrins auf der Plättchenoberfläche bzw. die Blockade des Moleküls durch spezifische Antikörper schwere Störungen der Thrombozytenfunktion hervorrufen können, die mit einer Verlängerung der Blutungszeit und deutlich klinischer Symptomatik einhergehen. Dies wird besonders am Beispiel einer von Kehrel et al. 1988 beschriebenen Patientin deutlich, die aufgrund fehlender GPIa/IIa Expression eine hämorrhagische Diathese entwickelte. Nach Eintritt der Menopause jedoch wurde der GPIa/IIa-Rezeptor in diesem Fall wieder exprimiert, sodaß die Blutungssymptomatik vollständig verschwand.

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zur Dichte des nur in geringer Zahl auf der Thrombozytenoberfläche exprimierten GPIa/IIa-Komplexes zeigten deutlich variierende Ergebnisse. Während Kunicki et al. 1993 eine Varianz von 968 – 2874 Moleküle/Thrombozyt feststellte, zeigte Corall et al. 1999b bei verschiedenen Individuen eine Oberflächendichte von 2600 – 6622 Molekülen/Thrombozyt. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dieser Variabilität und dem 1997 erstmals beschriebenen Polymorphismus an Position 807 des  $\alpha_2$ -Gens konnte von Kunicki und Mitarbeitern 1997 gezeigt werden. So ergab sich bei Trägern des 807T-Allels eine deutlich erhöhte Expression auf der Thrombozytenoberfläche.

Der Einfluß des von Kiefel et al. 1988 erstmals publizierten A1648G Dimorphismus des  $\alpha_2$  Gens (Br) auf die Rezeptordichte ist in diesem Zusammenhang bisher noch unklar. Während Kunicki und Mitarbeiter eine solche Assoziation ausschlossen, konnten Corral und Mitarbeiter 1999 eine erhöhte Expression des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  auf der Thrombozytenoberfläche sowohl bei 807T-Trägern, als auch in Gegenwart des 1648A-Allels darstellen. Die weitere Klärung dieses Sachverhaltes sollte ein Ziel dieser Arbeit sein.

Um Gruppen von Probanden verschiedenen  $\alpha_2$ -Genotyps aufstellen zu können, erfolgte die Typisierung 50 ausgewählter Blutspender aus der Spenderdatei unseres Institutes sowohl an Position 807, als auch an Position 1648. Die Verteilung der einzelnen Genotypen im gesamten Kollektiv wich in seinen prozentualen Angaben nur geringfügig von den bisher publizierten

Daten (Rainer et al., 1998; Santoso et al., 1999; Corall et al., 1999b) ab. Die bisher beschriebenen Kopplungen der beiden Polymorphismen konnten im Rahmen dieser Typisierung bestätigt werden. So zeigte sich das 1648A-Allel immer gekoppelt mit dem <sup>807</sup>C-Allel, während das 1648G-Allel sowohl mit dem 807C-Allel, als auch mit dem 807T-Allel gekoppelt vorliegen konnte (Kritzig et al., 1998).

Die Überprüfung der Reaktivität verschiedener mAk, welche gegen die  $\alpha_2$ -Untereinheit des humanen Glykoproteins GPIa/IIa gerichtet sind, war für die Untersuchungen bzgl. der GPIa/IIa-Expression und -Funktion erforderlich. Aufgrund der einfacheren Durchführung und des deutlich geringeren Materialbedarfs wurde als Screening die Bindungsfähigkeit der Antikörper Gi9 und Gi14 an humane Thrombozyten mit Hilfe eines indirekten Fluoreszenztests aus Citratvollblut am Durchflußzytometer gemessen. Es zeigte sich eine deutliche Reaktivität beider Antikörper mit den getesteten Blutplättchen. Im Anschluß daran erfolgte die Überprüfung der Ergebnisse mit Hilfe der Immunpräzipitation biotinylierter Thrombozyten durch die beiden Antikörper. Die Reaktivität beider Antikörper mit GPIa/IIa auf humanen Thrombozyten bestätigte sich mit dieser Methode. Demnach konnten sowohl Gi9, als auch Gi14 für die Expressionsstudie verwendet werden.

Die Variation der  $\alpha_2\beta_1$ -Expression auf humanen Blutplättchen in Abhängigkeit des vorliegenden Genotyps wurde mit Hilfe eines indirekten Immunfluoreszenztests an isolierten Thrombozyten 44 verschiedener Individuen unter Verwendung des mAk Gi14 am Durchflußzytometer gemessen. Bei Vergleich der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) konnte in Gegenwart des 807T-Allels eine deutlich höhere Dichte des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  auf der Thrombozytenoberfläche festgestellt werden. Die jeweiligen Unterschiede in der MFI zwischen Individuen des C807C-, C807T-, und T807T-Genotyps waren nach statistischer Berechnung mit Hilfe des Student-t-Tests signifikant (CC/CT:  $p = 0,056$ , CT/TT:  $p = 0,002$ , CC/TT:  $p = <0,001$ ).

Desweiteren stellte sich heraus, daß eine höhere Oberflächendichte des GPIa/IIa-Komplexes, unabhängig vom 807T-Allel, auch durch die Präsenz des 1648A-Allels hervorgerufen werden kann. Die von uns durchgeführten Untersuchungen zeigten eine signifikante Erhöhung der  $\alpha_2\beta_1$ -Expression in Gegenwart eines ( $p = 0,016$ ) oder zweier 1648A-Allele ( $p = 0,001$ ).

Anhand unserer Studie konnte die Aussage von Kunicki und Mitarbeitern 1993 widerlegt werden, welche eine ursächliche Beteiligung des 1648A-Allels an der gesteigerten Expression des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  ausschloß.

Die Dichte des GPIa/IIa-Komplexes auf der Thrombozytenoberfläche wird somit sowohl durch den Polymorphismus an Position 807, als auch durch den Polymorphismus an Position 1648 des  $\alpha_2$ -Gens beeinflusst. Über die genauen Mechanismen, welche zur gesteigerten Expression des GPIa/IIa-Komplexes auf der Plättchenoberfläche führen, ist bisher nichts bekannt. Allerdings lassen die vorliegenden Daten vermuten, daß es sich um zwei unabhängige Regulationsmechanismen handelt.

Als weiterführende Untersuchungen zur Variabilität der  $\alpha_2\beta_1$ -Expression auf humanen Blutplättchen wurden isolierte Thrombozyten aller 44 Individuen auch mit dem mAk Gi9 am Durchflußzytometer gemessen. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine deutliche Varianz der Mittleren Fluoreszenzintensität MFI in Abhängigkeit vom vorliegenden Genotyp. Die oben beschriebenen Schlußfolgerungen konnten also auch unter Verwendung des zweiten Antikörpers eindeutig bestätigt werden. Diese Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern zeigt deutlich, daß die beobachtete Varianz in der MFI tatsächlich abhängig ist vom vorliegenden Genotyp. Daß es sich bei diesem Phänomen um eine zufällige Beobachtung in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper handelt, konnte somit ausgeschlossen werden. Letzteres war bei den bisher zu diesem Thema publizierten Arbeiten nicht möglich, da jeweils nur ein einziger Antikörper (hauptsächlich 6F1) für die Untersuchungen verwendet wurde.

Vergleichende Betrachtungen der Fluoreszenzintensitäten beider Antikörper bei ein und demselben Individuum zeigten differierende Ergebnisse. Bei allen 44 Individuen waren die MFI-Werte nach Bindung der isolierten Thrombozyten durch Gi14 deutlich höher als nach Bindung durch Gi9. Diese Beobachtungen konnten unabhängig vom vorliegenden Genotyp aufgestellt werden und zeigten, daß die Stärke der Bindung an humane Thrombozyten durchaus abhängig ist vom verwendeten Antikörper.

Vergleicht man jedoch die MFI-Werte der Untersuchungen isolierter Thrombozyten mit den Ergebnissen des Indirekten Fluoreszenztests aus humanem Citratvollblut, so zeigte sich hier ein gegenteiliges Verhältnis der Fluoreszenzwerte: Die Untersuchungen aus Vollblut ergaben eine deutlich stärkere Bindung der Thrombozyten durch Gi9.

Betrachtet man die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden für jeweils denselben Antikörper, so wird deutlich, daß die MFI-Werte für Gi14, unabhängig vom verwendeten Material, annähernd gleich sind ( $MFI_{\text{isolierte Thrombozyten}} / MFI_{\text{Vollblut}}$ : 43,8 / 42,2). Die Werte der

Mittleren Fluoreszenzintensität für Gi9 hingegen zeigen eine starke Varianz zwischen den beiden Untersuchungsmethoden ( $MFI_{\text{isolierte Thrombozyten}} / MFI_{\text{Vollblut}}: 33,5 / 60,7$ ).

Durch diese Ergebnisse wird deutlich, daß bei Verwendung verschiedener Antikörper auch die Art des untersuchten Materials eine bedeutende Rolle spielt. Es liegt die Vermutung nahe, daß durch den Vorgang der Thrombozytenisolation Epitope, gegen welche der Antikörper Gi9 gerichtet ist, so verändert werden, daß nach Ablauf der Präparation nur noch eine deutlich schwächere Bindung möglich ist (Tuckwell et al., 2000). Im Gegensatz dazu scheint das durch Gi14 gebundene Epitop im Rahmen der Präparation kaum bzw. gar nicht beeinflusst zu werden, wodurch auch die Bindungsintensität annähernd gleich bleibt.

Diese Erkenntnisse sind im Hinblick auf die Diagnostik von großer Bedeutung. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß das Adhäsionsverhalten humaner Thrombozyten in Abhängigkeit vom vorliegenden Genotyp und somit von der Oberflächendichte des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  deutlich variiert. So ist bei erhöhter Rezeptordichte (807T-Allel) eine deutlich schnellere Bindung der Thrombozyten an Kollagen nachzuweisen, als bei niedriger Rezeptordichte (807C-Allel) (Kritzig et al., 1998). Studien unserer Arbeitsgruppe haben darüberhinaus gezeigt, daß die erhöhte Dichte des Kollagenrezeptors auf Blutplättchen einen hereditären Risikofaktor für das vermehrte Auftreten von Myokardinfarkt bei jüngeren Patienten (62 Jahre und jünger) darstellt. Dieses konnte auch im Rahmen einer Studie von Carlsson und Mitarbeitern 1999 für das Auftreten von Schlaganfall bei jüngeren Patienten (jünger als 50 Jahre) gezeigt werden. Im Gegensatz dazu scheint eine reduzierte Oberflächendichte des Glykoproteins GPIa/IIa auf Thrombozyten die Ursache für die bisher nicht geklärte variierende Ausprägung der Blutungssymptomatik bei Patienten mit der von Willebrand Krankheit Typ I zu sein (Di Paolo et al., 1999). So scheint das 807C-Allel für eine stärkere Blutungsneigung der Patienten verantwortlich zu sein.

Aufgrund dieser bedeutenden Rolle des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  ist die Quantifizierung des Moleküls auf der Thrombozytenoberfläche diagnostisch von Bedeutung. Verwendet man die im Rahmen unserer Untersuchungen aus Citratvollblut gemessenen Fluoreszenzintensitäten zur Berechnung der absoluten Rezeptordichte, so ergeben sich z.T. deutlich variierende MFI-Werte für ein und dasselbe Individuum in Abhängigkeit vom eingesetzten Antikörper. Für das oben aufgeführte Beispiel ergab der Wert für Gi9 2900 Moleküle/Zelle, während die MFI für Gi14 nur einen Wert von 2500 Moleküle/Zelle ergab. Dies ist in Anbetracht der generell geringen Expression dieses Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche eine hochgradige Varianz.

Mit Hilfe der hier durchgeführten durchflußzytometrischen Untersuchungen ließ sich demnach zeigen, daß die absolute Dichte des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  auf der Thrombozytenoberfläche neben der Beeinflussung durch den Genotyp sowohl abhängig ist von der Präparation des verwendeten Untersuchungsmaterials, als auch von dem im Rahmen der Tests eingesetzten Antikörper. Um bei diagnostischen Untersuchungen vergleichbare, quantitative Aussagen über die absolute Dichte des Rezeptors auf der Zelloberfläche machen zu können, sollten standardisierte Methoden verwendet und diese, sowie der verwendete Antikörper, bei einem Vergleich der Zahlenwerte angegeben werden.

Neben der quantitativen Bestimmung des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  auf der Thrombozytenoberfläche ist es von Bedeutung, die Funktion dieses Moleküls in vitro einfach und repräsentativ überprüfen zu können. Dies gilt sowohl für die Diagnostik, als auch für wissenschaftliche Untersuchungen, wie z.B. die Wirkung verschiedener Antikörper auf die Thrombozytenfunktion.

Die früher häufig angewandten Methoden zur Überprüfung der Adhäsionsfähigkeit von Thrombozyten an spezifische Liganden erfolgten unter Einsatz von  $^{51}\text{Cr}$  oder  $^{111}\text{In}$  (Bellavite et al., 1994). Da die Verwendung radioaktiven Materials jedoch besondere Anforderungen sowohl an das Labor, als auch an das Personal stellt, wurden in den letzten Jahren nicht radioaktive Markierungen als Alternativen entwickelt. So beschreiben Wang und Mitarbeiter 1998 zum Beispiel die Markierung der Thrombozyten mit Calcein, welches man mit Hilfe eines „Fluoreszenzreaders“ detektieren kann.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Etablierung eines funktionellen Adhäsionstests nach Bellavite und Mitarbeitern (1994), bei dem Flachbodenmikrotiterplatten aus Polystyrol mit Kollagen beschichtet wurden. Die erfolgte Adhäsion konnte bei diesem Test mit zwei verschiedenen Methoden detektiert werden: zum einen mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie, welche eine photographische Dokumentation der Thrombozytenadhäsion erlaubte. Mit Hilfe der anschließenden Messung der Sauren Phosphatase-Aktivität bei 405nm nach Lyse der Blutplättchen mit Triton X konnte die Quantifizierung der Thrombozytenadhäsion erfolgen. Vorteil dieses Tests ist, daß er nicht nur für Kollagen, sondern für

verschiedene Liganden verwendet werden kann und keine besonderen technischen Anforderungen an das Labor stellt.

Eine für alle funktionellen Adhäsionstests notwendige Grundvoraussetzung ist die Isolierung ruhender Thrombozyten aus Citratvollblut. Um eine Aktivierung der Blutplättchen im Rahmen der Isolierung zu vermeiden, wurden bei unserem Test Inhibitoren, so zum Beispiel Prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>), ACD und Apyrase, zugegeben. Darüberhinaus wurden im Rahmen der Etablierung zusätzliche Maßnahmen, wie das Beschichten aller Polystyrol-Röhrchen mit 1% BSA, die Blutabnahme in auf 37°C vorgewärmte Röhrchen und die Einführung der Ruhezeiten der Thrombozyten zwischen den einzelnen Waschschritten im Brutschrank bei 37°C getroffen.

In dieser Arbeit konnten wir somit eine funktionelle Methode etablieren, mit deren Hilfe nicht nur die Adhäsionsfähigkeit von Thrombozyten an verschiedene Liganden bestimmt, sondern auch die Wirkung verschiedener monoklonaler Antikörper auf die Thrombozytenadhäsion an ein bestimmtes Matrixprotein genauer untersucht werden kann.

Aufgrund der Bedeutung der verschiedenen thrombozytären Glykoproteine beim Ablauf der primären Hämostase wurden Überlegungen angestellt, den therapeutischen Einsatz inhibierenden Substanzen gegen diese Integrine zur Reduktion der thrombozytären Adhäsions- und Aggregationsbereitschaft in Erwägung zu ziehen. Mit den Untersuchungen von Coller und Mitarbeitern 1995, welche erstmals einen monoklonalen Antikörper als Inhibitor gegen den Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche einsetzten und eine Hemmung der Aggregation zeigen konnten, rückte eine neue Gruppe antithrombozytärer Therapeutika in den Mittelpunkt der Forschung.

Der anfänglich von Coller et al. verwendete murine Antikörper 7E3 wurde durch starke Modifikation seiner Struktur zur Reduktion der Antigenität „humanisiert“ und unter dem Namen Abciximab<sup>®</sup> (ReoPro<sup>®</sup>) therapeutisch bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt erfolgreich eingesetzt.

Vorteil dieser Art der antithrombozytären Therapie ist die spezifische Hemmung der Plättchenaggregation, welche besonders bei einer akuten Thrombose wichtig ist. Während Fibrinogen nur an aktivierte GPIIb/IIIa-Rezeptoren bindet, kann ReoPro<sup>®</sup> auch mit nicht aktivierten Fibrinogenrezeptoren interagieren und diese dadurch in einen aktivierten Zustand

überführen. In geringeren Dosen hat ReoPro<sup>®</sup> somit eine unerwünschte, proaggregatorische Wirkung. Darüber hinaus können Interaktionen mit anderen Zelloberflächenrezeptoren (Vitronektinrezeptor, Mac-1) auftreten, welche eine antiproliferative Wirkung hervorrufen bzw. in einer reduzierten Monozytenadhäsion resultieren können (Übersicht: Gawaz, 1999). Desweiteren sind vereinzelt Fälle von ausgeprägten Thrombozytopenien nach Gabe von ReoPro<sup>®</sup> beschrieben worden (Berkowitz et al., 1996, Jubelirer et al., 1999).

In der Zwischenzeit wurden weitere GPIIb/IIIa-Antagonisten unter Reduzierung der Antigenität und Erhöhung der Thrombozytenspezifität entwickelt und klinisch getestet, so z.B. das zyklische Heptapeptid Eptifibatide<sup>®</sup> (Integrelin<sup>®</sup>) oder auch die nicht peptidischen Moleküle Tirofiban<sup>®</sup> (Aggrestat<sup>®</sup>), Lamifiban<sup>®</sup> oder Lotrafiban<sup>®</sup>. Letztere interagieren selektiv mit dem thrombozytären Fibrinogenrezeptor, ohne andere Oberflächenrezeptoren zu beeinflussen. In vivo-Untersuchungen im Meerschweinchenmodell zeigten jedoch, daß bei Einsatz dieser Therapeutika nicht nur, wie gewünscht, die ischämische Verschußzeit, sondern auch im Bereich einer therapeutischen Dosierung die Blutungszeit deutlich verlängert ist (Ikeda et al., 2000).

Auf der Suche nach neuen Möglichkeiten der antithrombozytären Therapie unter Reduktion der Nebenwirkung, wurden Überlegungen angestellt, in ganz frühe Schritte der primären Hämostase einzugreifen. So wurden kürzlich Inhibitoren gegen das Glykoprotein GPIb/V/IX als Rezeptor für den von Willebrand Faktor zur Blockade der Thrombozytenadhäsion entwickelt (Kageyama et al., 1997). Im Meerschweinchenmodell zeigte sich, daß der eingesetzte Antikörper effektiv die Adhäsion inhibierte und somit die ischämische Verschußzeit verlängerte, im Bereich der therapeutischen Dosis jedoch keine Verlängerung der Blutungszeit hervorrief, ganz im Gegensatz zu dem Medikament Lamifiban<sup>®</sup> (Ikeda et al., 2000). Ergebnisse klinischer Studien über den therapeutischen Einsatz von GPIb/V/IX-Inhibitoren liegen allerdings noch nicht vor.

Ob durch den Einsatz inhibierender Antikörper gegen das Glykoprotein GPIa/IIa, welches im zeitlichen Ablauf der primären Hämostase zwischen den Glykoproteinen GPIb/V/IX und GPIIb/IIIa steht, eine ähnliche Wirkung erzielt werden kann, ist bisher noch nicht bekannt. Um dieser Frage nachgehen zu können, wurden als ein weiteres Ziel dieser Arbeit Untersuchungen zur Entwicklung eines Tiermodells durchgeführt. Hierbei sollte zunächst die

Reaktivität der beiden, gegen das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  gerichteten mAk Gi9 und Gi14 mit Thrombozyten von Ratte, Kaninchen und Hund als Vertreter verschiedener Labortierspezies überprüft werden. Der aus diesem Grund durchgeführte indirekte Immunfluoreszenztest aus Citratvollblut zeigte, daß sowohl Gi9, als auch Gi14, nur mit caninen Thrombozyten, nicht aber mit den Blutplättchen von Ratte oder Kaninchen reagierten. Somit konnten diese beiden Tierspezies zur weiteren Verwendung für die Entwicklung eines Tiermodells ausgeschlossen werden.

Um diese Ergebnisse bestätigen zu können, wurde im Anschluß an die durchflußzytometrischen Untersuchungen eine Immunpräzipitation caniner Thrombozyten sowohl mit Gi9, als auch mit Gi14 durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei beiden Antikörpern eine deutliche Reaktion mit dem GPIa/IIa-Komplex des Hundes. Diese Beobachtungen ließen auf eine starke strukturelle Ähnlichkeit des caninen Integrins  $\alpha_2\beta_1$  mit dem auf humanen Thrombozyten befindlichen Molekül schließen.

Die Eignung der Spezies Hund als Labortier zur Entwicklung eines therapeutisch einsetzbaren, inhibierenden Antikörpers gegen GPIa/IIa im Tiermodell, konnte aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse eindeutig gezeigt werden.

Im Hinblick auf die Entwicklung eines Tiermodells war es wichtig, neben der Reaktivität der entsprechenden Antikörper das Vorliegen der beim Menschen beschriebenen Formen der Heterogenität des GPIa/IIa-Komplexes auf caninen Thrombozyten zu untersuchen, um so mögliche Einflüsse auf spätere Ergebnisse, wie z.B. eine deutlich variierende Oberflächendichte, abschätzen zu können. Dies sollte als ein weiteres Ziel dieser Arbeit ansatzweise durchgeführt werden.

Aus diesem Grund wurde die genomische DNA zwanzig verschiedener Hunde unterschiedlicher Rasse isoliert und mit Hilfe der beim Menschen eingesetzten Methoden an den Positionen 807 und 1648 des  $\alpha_2$ -Gens typisiert. Diese Untersuchungen brachten jedoch mit caniner DNA kein Ergebnis, da nach Amplifikation mit den verwendeten Primern kein spezifisches Produkt nachweisbar war. Bei der im Anschluß daran durchgeführten Sequenzierung des Exon 7 des  $\alpha_2$ -Gens konnten 16 der 20 Proben eindeutig ausgewertet und als homozygote Träger des 807C-Allels identifiziert werden. Das Vorliegen eines Polymorphismus an dieser Position konnte somit ausgeschlossen werden.

Die Bedeutung der zusätzlich bei der Sequenzierung im Exon 7 gefundenen 13 Mutationen, von denen sechs mit einer Änderung der Aminosäuresequenz einhergehen (siehe Anhang, Abbildung 11.1), wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Eine Typisierung des Polymorphismus an Position 1648 des  $\alpha_2$ -Gens war weder mit Hilfe der beim Menschen verwendeten PCR-RFLP, noch mit Hilfe der Sequenzierung des Exon 13 möglich. Eine Aussage über das Vorliegen einer Mutation an dieser Stelle konnte somit nicht getroffen werden.

Vergleicht man diese Ergebnisse und berücksichtigt die Molekülzahlen von 1700 bis 2700 Rezeptoren/caninem Thrombozyt, so liegt die Vermutung nahe, daß beim Hund, ebenso wie bei verschiedenen Säugetieren, so z.B. Maus, Rind oder mehreren Affenspezies (Baboon, Makacke) die beiden Allele 807C und 1648A jeweils gekoppelt vorliegen (Rainer et al., 1998).

Weitere Untersuchungen zur Heterogenität des GPIa/IIa-Komplexes auf der Oberfläche caniner Thrombozyten mit Hilfe der Durchflußzytometrie zeigten eine deutliche Varianz der MFI-Werte in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper. Auch hier waren die Ergebnisse mit Gi9 deutlich höher als mit Gi14. Die beim Menschen in vitro festgestellte Varianz in der gemessenen  $\alpha_2\beta_1$ -Expression, abhängig vom eingesetzten Antikörper, ließ sich auch beim Hund darstellen. Auch hier liegt die Vermutung nahe, daß durch den Vorgang der Thrombozytenisolation Epitope, gegen welche der mAk Gi9 gerichtet ist, so verändert werden, daß nur noch eine deutlich schwächere Bindung möglich ist (Tuckwell et al., 2000).

Neben der Überprüfung der Reaktivität beider Antikörper mit dem caninen Integrin  $\alpha_2\beta_1$  war es von großem Interesse, die funktionelle Bedeutung von Gi9 und Gi14 sowohl auf humane, als auch auf canine Thrombozyten und deren Adhäsion an Kollagen in vitro zu untersuchen. Hierfür wurde bei beiden Spezies das Adhäsionsverhalten isolierter, nicht aktivierter Thrombozyten an Kollagen Typ I unter statischen Bedingungen in Gegenwart von Gi9 und Gi14 mit Hilfe des etablierten Funktionstests untersucht und verglichen.

Die Ergebnisse der Adhäsionstests mit humanen Thrombozyten zeigten nach Präinkubation mit Gi9 eine sehr starke Hemmung der Adhäsion an Kollagen Typ I, verglichen mit der

positiven Kontrolle (NaCl). Die mittlere Bindung in Gegenwart dieses Antikörpers betrug 5,5%. Im Vergleich dazu wurde die Kollagenbindung humaner Blutplättchen durch Gi14 nur schwach gehemmt (Bindung : 45,3%).

Die Untersuchungen zur Adhäsionsfähigkeit caniner Thrombozyten an Kollagen in Gegenwart verschiedener Antikörper zeigten bei Präinkubation der Blutplättchen mit Gi9 eine deutliche Hemmung der Adhäsion. Die mittlere Bindung in Gegenwart dieses Antikörpers lag bei 12,5%. Somit zeigte Gi9 eine deutlich hemmende Wirkung auf das Adhäsionsverhalten sowohl humaner, als auch caniner Thrombozyten.

Im Gegensatz dazu konnte nach Präinkubation der Hundethrombozyten mit Gi14 eine gesteigerte Adhäsion (mittlere Bindung: 105,75%) an Kollagen festgestellt werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß durch die Gegenwart des mAk Gi14 eine spezifische Aktivierung der caninen Blutplättchen hervorgerufen wird. Demnach ist Gi14, im Gegensatz zu Gi9, zur Entwicklung eines effektiven Inhibitors des Glykoproteins GPIa/IIa nicht geeignet.

Die Erkenntnisse über die funktionelle Bedeutung des polymorphen GPIa/IIa-Komplexes als Kollagenrezeptor, sowie die inhibierende Wirkung von Gi9 auf die Thrombozytenadhäsion an Kollagen stellen eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung eines Tiermodells zur Überprüfung der in vivo-Wirkung dieses monoklonalen Antikörpers auf dem Weg zum klinischen Einsatz im Rahmen der antithrombozytären Therapie dar. Weitere Untersuchungen, welche die funktionelle Bedeutung von Gi9 auch unter Fließbedingungen zeigen, ebenso wie die Durchführung von Tests in vivo müssen in Zukunft folgen.

## 7 Zusammenfassung

Thrombozyten haben mit ihren Adhäsionsmolekülen, sogenannten Integrinen, eine zentrale Bedeutung beim Ablauf der Blutgerinnung. So trägt besonders auch das Glykoprotein GPIa/IIa als Hauptkollagenrezeptor auf Thrombozyten neben anderen Molekülen, z.B. dem GPIb/V/IX als Rezeptor des von Willebrand Faktors, zur Adhäsion von Blutplättchen an geschädigte Endothelmatrix, sowie zu deren Aktivierung und Aggregation bei. Fallberichte haben gezeigt, daß eine mangelnde bzw. fehlende Expression dieses GPIa/IIa-Komplexes, sowie dessen Blockade durch spezifische Antikörper mit zT. gravierenden Gerinnungsstörungen einhergehen.

Das Glykoprotein GPIa/IIa, welches auch als Integrin  $\alpha_2\beta_1$  bezeichnet wird, besteht aus zwei Untereinheiten, die nicht kovalent miteinander verbunden sind. Der ligandbindende Teil dieses Moleküls liegt im Bereich der sogenannten I-Domäne, einer hochkonservierten Struktur, die der substratbindenden Region des vWF-Rezeptors stark ähnelt. Bei genetischen Untersuchungen der  $\alpha_2$ -Untereinheit konnte in dieser I-Domäne eine stumme Mutation an der Position 807C>T nachgewiesen werden, welche die Oberflächendichte des GPIa/IIa beeinflussen. Ein weiterer Polymorphismus (A1648G), der mit einer Änderung der Aminosäuresequenz und somit der Tertiärstruktur des Moleküls einhergeht, konnte ebenfalls detektiert werden. Ob auch diese Mutation einen Einfluß auf die Oberflächendichte des Moleküls auf Thrombozyten hat, war bisher nicht geklärt. Da Studien an Patienten mit Myokardinfarkt sowie Schlaganfall zeigen, daß eine gesteigerte Expression von GPIa/IIa auf der Plättchenoberfläche mit einem erhöhten Risiko für jüngere Patienten einhergeht, ist die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Oberflächendichte des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  und dem Vorliegen bestimmter Allele von diagnostischer Bedeutung. Zu diesem Zweck wurde bei 50 gesunden Blutspendern die DNA aus Leukozyten isoliert und mit Hilfe einer sequenzspezifischen PCR (PCR-SSP) an Position 807 genotypisiert. Die Untersuchung des Polymorphismus an Position 1648 erfolgte mit Hilfe der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalyse durch das Enzym Mnl I im Anschluß an eine spezifische PCR. Nach erfolgter Genotypisierung wurden die Thrombozyten 44 verschiedener Spender aus Citratvollblut isoliert und die Expression des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  mit Hilfe der monoklonalen Antikörper Gi9 und Gi14, welche spezifisch gegen die  $\alpha_2$ -Untereinheit des GPIa/IIa-Komplexes gerichtet sind, am Durchflußzytometer gemessen. Hierbei konnte gezeigt werden, daß die Oberflächendichte des Kollagenrezeptors sowohl beim Vorliegen

eines 807T-Allels (bei konstantem 1648G), als auch beim Vorliegen eines 1648A-Allels (bei konstantem <sup>807</sup>C) deutlich anstieg. Somit wird die Expression des GPIa/IIa-Komplexes sowohl durch die Mutation an Position 807, als auch durch den Polymorphismus an Position 1648 beeinflusst. Über die genauen Regulationsmechanismus ist bisher nichts bekannt.

Weiter konnte gezeigt werden, daß die Messung der Oberflächendichte darüber hinaus sowohl vom eingesetzten Ak, als auch von der verwendeten Untersuchungsmethode abhängig ist. So war die Bindungsintensität bei FACS-Analysen mit isolierten Thrombozyten unter Verwendung von Gi9 schwächer als bei Einsatz von Gi14 (n=44). Wurden die Messungen jedoch direkt aus Citratvollblut durchgeführt (n=88), zeigte sich eine deutlich stärkere Bindung der Thrombozyten durch Gi9, verglichen mit Gi14. Diese Ergebnisse waren unabhängig vom vorliegenden Genotyp. Es liegt die Vermutung nahe, daß durch den Vorgang der Thrombozytenisolation Epitope, gegen welche der Antikörper Gi9 gerichtet ist, so verändert werden, daß nach Ablauf der Präparation nur noch eine deutlich schwächere Bindung möglich ist. Demnach ist es besonders für die Diagnostik von großer Bedeutung, beim Vergleich quantitativer Aussagen über die Oberflächendichte des GPIa/IIa-Rezeptors Angaben zum eingesetzten Antikörper bzw. zur angewandten Untersuchungsmethode zu machen.

Um die Interaktion des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  mit Kollagen bzw. den Einfluß verschiedener monoklonaler Antikörper auf die Thrombozytenadhäsion untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein funktioneller Test in Anlehnung an Bellavite et al. 1994 etabliert. Dieser ermöglicht reproduzierbare, quantitative Aussagen über die Interaktion der Thrombozyten mit verschiedenen Liganden und stellt, im Gegensatz zu Tests unter Verwendung von <sup>51</sup>Cr, geringere technische Anforderungen an das Labor. Für diesen Test wurden Thrombozyten verschiedener Spender unter Vermeidung einer Aktivierung isoliert, teils mit mAk präinkubiert und in einer Zellzahl von  $5 \times 10^7$  auf mit Kollagen beschichtete Flachboden-Mikrotiterplatten aus Polystyrol gegeben. Nach Inkubation bei 37°C erfolgte die Detektion der Thrombozytenadhäsion zum einen durch Phasenkontrastmikroskopie, zum anderen quantitativ durch Messung der Saure-Phosphatase-Aktivität nach Lyse der Plättchen und Zugabe des Substrates p-Nitrophenylphosphat.

Bei der Untersuchung acht verschiedener Spender zeigte sich eine deutliche Inhibition der Thrombozytenadhäsion durch Gi9, während dieser Effekt in Gegenwart von Gi14 deutlich geringer war. Weiterführende Untersuchungen in Richtung eines möglichen Einsatzes von Gi9 als effektiver Inhibitor der Thrombozytenadhäsion im Rahmen einer antithrombozytären Therapie erscheinen durch diese Ergebnisse sinnvoll.

Um die inhibitorische Wirkung dieses Antikörpers auch *in vivo* überprüfen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zur Etablierung eines Tiermodells durchgeführt. Hierzu erfolgte als erstes die Überprüfung der Reaktivität der monoklonalen Antikörper Gi9 und Gi14 mit Thrombozyten von Ratte, Kaninchen und Hund. Diese wurde direkt aus Citratvollblut im Durchflußzytometer durchgeführt und zeigte eine deutliche Reaktivität beider Antikörper mit caninen Thrombozyten, was durch Immunpräzipitation bestätigt werden konnte. Eine Bindung der Antikörper an Blutplättchen von Ratte und Kaninchen konnte nicht beobachtet werden, sodaß diese Tierarten von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden.

Der Einsatz caniner Thrombozyten im Funktionstest zeigte bei allen sieben Individuen eine sehr starke Inhibierung der Kollagenadhäsion durch den mAk Gi9. Gi14 jedoch hatte, anders als beim Menschen, keinen inhibierenden Einfluss auf die Interaktion von GPIa/IIa mit Kollagen. Neben diesen Erkenntnissen ist es in Hinblick auf die Interpretation der Ergebnisse späterer *in-vivo*-Daten von Bedeutung, Aussagen über evtl. vorliegende, beim Menschen gefundene, Polymorphismen und deren Einfluß auf die Oberflächendichte des Rezeptors beim Hund machen zu können. Genotypisierungen der caninen Leukozyten-DNA mit Hilfe der beim Menschen verwendeten SSP-PCR bzw. RFLP zeigten keine verwertbaren Ergebnisse. Die durchgeführte Sequenzierung des Exon 7 (Position 807) 20 verschiedener Proben war in 16 Fällen auswertbar und zeigte den Genotyp C807C. Eine Sequenzierung des Exon 13 (Position 1648) war nicht möglich. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse quantitative Bestimmungen der Integrin-Oberflächendichte an sechs Hunden mit Hilfe der FACS-Analyse aus Citratvollblut, postulieren wir das Vorliegen der beiden Allele 807C und 1648A, wie dies auch bei anderen Säugetieren (Maus, Rind, verschiedenen Affen) der Fall ist (Rainer et al., 1998). Ob die bei der Sequenzierung zusätzlich gefundenen 13 Mutationen, von denen sechs zu einem Aminosäureaustausch führen, eine funktionelle Bedeutung haben, ist nicht bekannt.

Die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse stellen eine wichtige Voraussetzung für weiterführende Untersuchungen zur Überprüfung der funktionellen Bedeutung der Thrombozytenadhäsion und deren Beeinflußung durch den monoklonalen Antikörper Gi9 dar. Weitere Tests, welche die Wirkung von Gi9 sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* genauer darstellen, müssen in Zukunft folgen. Die Eignung der Tierart Hund zur Etablierung eines hierfür geeigneten Tiermodells konnte eindeutig gezeigt werden.

## Summary

Platelets and their adhesion molecules, the so-called integrins, play a central role in hemostasis. One major collagen receptor on platelets is the glycoprotein GPIa/IIa that promotes together with other platelet glycoproteins, such as the von Willebrand's receptor GPIb/V/IX, the adhesion of platelets to damaged endothelial tissue and subsequent platelet activation. Case reports did show that either an impaired expression or an antibody-mediated suppression of the GPIa/IIa complex go along with a severe coagulation disorder.

GPIa/IIa, also called integrin  $\alpha_2\beta_1$ , consists of two non-covalently linked subunits. The ligand-binding subunit is located in the I-domain, a highly conserved structure that displays similarities to the corresponding region of the vWF receptor.

Genetic studies of the  $\alpha_2$ -subunit revealed the presence of a silent mutation at position 807 (C>T) in the I-domain that was found to be associated with the surface density of GPIa/IIa molecules. A second polymorphism (A1648G) that changes the aminoacid sequence and tertiary structure of the molecule was also detected. Whether or not this second polymorphism alters the surface density of GPIa/IIa molecules is not known. With respect to studies identifying an increased expression of GPIa/IIa as risk-factor in young patients suffering from myocardial infarction or brain strokes, the investigation of different alleles that impact on the surface expression of integrin  $\alpha_2\beta_1$  is of diagnostic importance. Consequently, we purified DNA from 50 healthy blood donors and analysed the polymorphism at position 807 by means of sequence-specific PCR (PCR-SSP). The second polymorphism at position 1648 was investigated by means of restriction-fragment length polymorphism (RFLP) analysis with the enzyme Mnl I after PCR. The surface expression of integrin  $\alpha_2\beta_1$  on citrate-anticoagulated platelets of 44 genotyped individuals were quantitated by flow cytometry employing the monoclonal antibodies Gi9 and Gi14 that specifically react with the  $\alpha_2$  subunit of the GPIa/IIa complex. Results revealed an increased expression of the collagen receptor in the presence of the 807T allele (among 1648G individuals) as well as in presence of the 1648A allele (among 807C individuals). These data suggest that both polymorphism 807 and 1648 influence the expression of GPIa/IIa. The molecular mechanisms being involved are not known so far.

Furthermore we showed that the surface density varied depending on the used monoclonal antibody and the preparation of the platelets. With isolated platelets, Gi9 showed a weaker binding compared to Gi14 as determined by flow cytometry (n=44). In contrast, Gi9 displayed a stronger binding to platelets compared to Gi14 if citrate-anticoagulated whole

blood was investigated (n=88). These results were independent of the  $\alpha_2$  polymorphisms. They suggest that the platelet isolation procedure alters epitopes being recognized by Gi9 leading to an impaired binding at the end of the preparation. These findings highlight the importance of indicating the used antibody and the used test procedure in order to obtain comparable results.

To study the interaction of  $\alpha_2\beta_1$  integrin with collagen and to investigate the impact of different monoclonal antibodies on platelet adhesion we established a functional test related to a procedure published by Bellavite et al. 1994. This procedure allows reliable quantification of the interaction of platelets with different ligands and is less lab-intensive in contrast to the radioactive  $^{51}\text{Cr}$  procedure. Isolated platelets from different donors, either native or after preincubation with monoclonal antibodies, are added at a concentration of  $5 \times 10^7$  on a collagen-coated flat bottom polystyrene microtiter plate. After incubation at  $37^\circ\text{C}$ , the adhesion can be analysed by phase-contrast microscopy and quantitated by measurement of acid phosphatase activity after platelet lysis and subsequent addition of the enzyme substrate p-nitrophenylphosphate.

Analysis of eight independent individuals showed that Gi9 is a much more potent inhibitor of platelet adhesion when compared to Gi14. These results encourage further studies of Gi9 as effective inhibitor of platelet adhesion with clinical implications. In order to confirm the inhibitory effects of Gi9 *in vivo* we performed additional experiments that allow the establishment of an animal model. First, we investigated the reactivity of Gi9 and Gi14 with rat, rabbit and canine platelets. Both antibodies reacted with canine platelets from citrate-anticoagulated whole-blood as shown by flow cytometry and independently confirmed by immune precipitation. In contrast, no specific reactivity with rat and rabbit platelets was detected indicating that these species are not suitable for further studies.

Employing canine platelets in the functional assay showed a strong suppression of platelet adhesion mediated by Gi9 in all seven cases. Contrary to the use of human platelets, Gi14 was not able to inhibit the interaction of canine GPIa/IIa with collagen. With respect to the interpretation of the results it would be additionally useful to make statements regarding the presence of human  $\alpha_2$  polymorphisms and surface expression of GPIa/IIa within this animal model. However, attempts to determine the canine polymorphisms by means of the human PCR-SSP and RFLP assays failed. DNA sequencing of exon 7 (position 807) in 20 samples provided reliable data in 16 cases and showed in all cases the genotype C807. DNA sequencing of exon 13 (position 1648) was not possible. With respect to the quantitative flow cytometry data obtained in citrate anticoagulated whole-blood from six dogs we postulate the presence

of both alleles 807C and 1648A in accordance with published data employing other mammals (mouse, cow, different monkeys; Rainer et al. 1998). Whether the additionally detected 13 mutations, which lead to an amino acid exchange in six cases are of functional importance is not known.

The results of this study provide an important precondition for the development of an animal model to investigate the effects of Gi9 on platelet adhesion in vivo. Further tests investigating the in vitro and in vivo efficacy of Gi9 are necessary. Our findings clearly indicate the suitability of the species dog to develop such an animal model.

## 8. Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ACD	Acidcitratdextrose
ADP	Adenosin-Diphosphat
Ak	Antikörper
Apo AI	Apolipoprotein A <sub>1</sub>
Apo B	Apolipoprotein B
bp	Basenpaare
Br	= HPA 5 (Human Platelet Alloantigen 5)
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL 1, 2	Eigenname der Puffer aus dem <i>ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents</i> , Fa. Amersham, Braunschweig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FcγR	Fcγ-Rezeptor
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
g	Gramm
g	Gravitationsbeschleunigung
HGH	Human Growth Hormon
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPB	Immunpräzipitationspuffer
ITAM	Immunreceptor tyrosin-based activation motif
ITP	Idiopathische Thrombozytopenische Purpura
kD	Kilodalton
l	Liter
LOX	Eigenname einer bestimmten Zelllinie humaner Melanomzellen
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
M, mol	mol (Molekulare Einheit der Stoffmenge)
mAk	monoklonaler Antikörper

MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minuten
n	nano ( $10^{-9}$ )
NAIT	Neonatale Alloimmunthrombozytopenie
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCR-SSP	sequenzspezifische PCR
PGE <sub>1</sub>	Prostaglandin E <sub>1</sub>
PGI <sub>1</sub>	Prostaglandin I <sub>1</sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC $\gamma$ 2	Phospholipase $\gamma$ 2
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PRP	Plättchereiches Plasma
PTP	Posttransfusionale Purpura
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sit	= HPA 13 (Human Platelet Alloantigen 13)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
U	Units
vWF	von Willebrand Faktor
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )

## 9 Literaturverzeichnis

Altruda F, Cervella P, Tarone G, Balzac F, Stefanuto G, Silengo L: A human  $\beta_1$  integrin subunit with a unique cytoplasmic domain generated by alternative RNA processing. *Gene* 1990; 95: 261-266

Argraves WS, Suzuki S, Arai H, Thompson K, Pierschbacher MD, Rouslathi E: Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. *J Cell Biol* 1987; 105: 1183-1190

Asselin J, Gibbins JM, Achison M, Lee YH, Morton LF, Farndale RW, Barnes MJ, Watson SP: A collagen like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase  $C\gamma_2$  in platelets independent of the integrin  $\alpha_2\beta_1$ . *Blood* 1997; 89: 1235-1242

Bellavite P, Andrioli G, Guzzo P, Arigliano P, Chirumbolo S, Manzato F, Santonastaso C: A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. *Anal Biochem* 1994; 216: 444-450

Berkowitz SD, Harrington RA, Rund MM, Tchong JE: Acute profound Thrombocytopenia after c7E3 Fab (Abciximab) therapy. *Circulation* 1997, 95, 4: 809-813

Calvete JJ, Henschen A, Gonzales-Rodriguez J: Complete localization of the intrachain disulphide bonds and the N-glycosylation points in the  $\alpha$ -subunit of human platelet glycoprotein IIb. *Biochem* 1989; 261: 561-568

Carl B, Kroll H, Bein G, Santoso S: B-lymphoblastoid cell lines as a source of reference DNA for human platelet and neutrophil antigen genotyping. *Transfusion* 2000; 40(1): 62-68

Carlson LE, Santoso S, Spitzer C, Kessler C, Greinacher A: The  $\alpha_2$  gene 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 of the development of stroke in younger patients. *Blood*, 1999; 93: 3583-3586

Carrell NA, Fitzgerald LA, Steiner B, Erickson HP, Phillips DR: Structure of human platelet membrane glycoprotein IIb and IIIa as determined by electron microscopy. *J Biol Chem* 1985; 260: 1743-1749

Chan BMC, Hemler ME: Multiple functional forms of the integrin VLA-2 can be derived from a single  $\alpha_2$  cDNA Clone: Interconversion of forms induced by an anti- $\beta_1$  antibody. *J Cell Biol* 1993; 120: 537-543

Christie DJ, Pulkrabek S, Putnam JL, Slatkoff ML, Pishel KD: Posttransfusion purpura due to alloantibody reactive with glycoprotein Ia/IIa (anti HPA-5b). *Blood* 1991; 77: 2785-2789

Coller BS, Beer JH, Scudder LE, Steinberg MH: Collagen-platelet interactions: Evidence for a direct interaction of collagen with platelet GPIa/IIa and an indirect interaction with platelet GPIIb/IIIa mediated by adhesive proteins. *Blood* 1989; 74: 182-192

Coller BS: Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 1995; 92: 2373-2380

Corral J, González-Conejero R, Rivera J, Ortuño F, Apricio P, Vicente V: Role of the 807C/T polymorphism in platelet GP Ia collagen receptor expression and function. *Thromb Haemost* 1999a; 81: 951-956

Corral J, Rivera J, González-Conejero R, Vincente V: The number of platelet glycoprotein Ia molecules is associated with the genetically linked 807C/T and HPA-5 polymorphisms. *Transfusion* 1999b; 39:372-378

Deckmyn H, Chew SL, Vermynen J: Lack of platelet response to collagen associated with an autoantibody against glycoprotein Ia: a novel cause of acquired qualitative platelet dysfunction. *Thromb Haemost* 1990; 64(1): 74-79

Di Paolo J, Frederici AB, Mannucci PM, Canciani MT, Kritzik M, Kunicki JT, Nugent D: Low platelet  $\alpha_2\beta_1$  levels in type I von Willebrand disease correlate with impaired platelet function in a high shear stress system. *Blood* 1999; 93: 3578-3582

Diener HC: Stroke prevention: antiplatelet and antithrombotic therapy. *Haemostasis* 2000; 30: 14-26

Elices MJ, Hemler ME: The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 9906-9910

Emsley J, King SL, Bergelson JM, Liddington RC: Crystal structure of the I-domain from integrin  $\alpha_2\beta_1$ . *J Biol Chem* 1997; 272: 28512-28517

Estavillo D, Ritchie A, Diacovo TG, Cruz MA: Funktional analysis of a recombinant glycoprotein Ia/IIa (Integrin  $\alpha_2\beta_1$ ) I domain that inhibits platelet adhesion to collagen and endothelial matrix under flow conditions. *J Biol Chem* 1999; 274: 35921-35926

Gawaz M: *Das Blutplättchen*. 1999; Thieme Verlag : 54-79

Giltay JC, Brinkmann HJM, Vlekke A, Kiefel V, van Mourik JA, van dem Borne AEGKr: The platelet glycoprotein Ia-IIa-associated Br-alloantigen system is expressed by cultured endothelial cells. *Br J Haematol* 1989; 75: 557-560

Gold HK, Collier BS, Yasuda T, Saito T, Fallon JT, Guerrero JL, Leinbach RC, Ziskind AA, Collen D: Rapid and sustained coronary artery recanalization with combined bolus injection of recombinant tissue-type plasminogen activator and monoclonal antiplatelet GPIIb/IIIa antibody in a canine preparation. *Circulation* 1988; 77: 670-677

Handa M, Watanabe K, Kawai Y, Kamata T, Koyama T, Nagai H, Ikeda Y: Platelet unresponsiveness to collagen: Involvement of glycoprotein Ia-IIa ( $\alpha_2\beta_1$  integrin) deficiency associated with a myeloproliferative disorder. *Thromb Haemost*. 1995; 73: 521-528

Hemler MH: Structure and functions of VLA proteins and related integrins. In: *Receptors for extracellular matrix*, Hrsg. McDonald JA, Mecham RP. Academic Press, San Diego, California 1991; S.255-87

Hynes RO: Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48: 549-554

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

Hynes RO, Bader BL: Targeted mutations in integrins and their ligands: their implications for vascular biology. *Thromb. Haemost.* 1997; 78: 83-87

Ichinohe T, Takayama H, Ezumi Y, Arai M, Yamamoto N, Takahashi H, Okuma M: Collagen-stimulated activation of syk but not c-Src is severely compromised in human platelets lacking membrane glycoprotein VI. *J Biol Chem* 1997; 272: 63-68

Ikeda Y, Handa M, Murata M, Goto S: A new approach to antiplatelet therapy: inhibitor of GPIIb/IIIa-vWF interaction. *Haemostasis* 2000; 30(suppl 3) 44-52

Jain NC: A scanning electron microscopic study of platelets of certain animal species. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 33: 501-507

Jaspers M, Marynen P, Aly MS, Cuppens H, Hiliker C, Cassiman JJ: Localization of the gene encoding the  $\alpha_2$ -subunit of the VLA-2 receptor to chromosome 5q23-31. *Somatic Cell Mol Genet* 1991; 17: 505-511

Jubelirer SJ, Koenig BA, Bates MC: Acute profound thrombocytopenia following C7E3 Fab (abciximab) therapy: case reports, review of the literature and implications for therapy. *Am J Hematol* 1999; 61: 205-208

Kageyama S, Yamamoto H, Nagano M, Arisaka H, Kayahara T, Yoshimoto R: Anti-thrombotic effects and bleeding risk of AJvW-2, a monoclonal antibody against human von Willebrand Factor. *Br J Pharmac* 1997; 122: 165-171

Kaplan C, Morel-Kopp MC, Kroll H, Kiefel V, Schlegel N, Chesnel N, Müller-Eckhardt C: HPA-5b (Br<sup>a</sup>) neonatal alloimmune thrombocytopenia: clinical and immunological analysis of 39 cases. *Br J Haematol* 1991; 78: 425-429

Kassner PD, Kawaguchi S, Hemler ME: Minimum alpha chain cytoplasmic tail sequence needed to support integrin-mediated adhesion. *J Biol Chem* 1994; 269: 19859- 19867

Kamata T, Puzon W, Takada Y: Identification of putative ligand binding sites within I domain of integrin  $\alpha_2\beta_1$  (VLA-2, CD49b/CD29). *J Biol Chem* 1994; 269: 9659-9663

Kamata T, Liddington R, Takada Y: Interaction between collagen and the  $\alpha_2$  I-domain of the integrin  $\alpha_2\beta_1$ . *J Biol Chem* 1999; 274: 32108-32111

Kawaguchi S, Hemler ME: Role of the  $\alpha$ -subunit cytoplasmic domain in regulation of adhesive activity mediated by the integrin VLA-2. *J Biol Chem* 1993; 268: 16279-16285

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: 26668-26676

Kehrel B, Balleisen L, Kokott R, Mesters R, Stenzinger W, Clemetson KJ, van de Loo J: Deficiency of intact thrombospondin and membrane glycoprotein Ia in platelets with defective collagen-induced aggregation and spontaneous loss of disorder. *Blood* 1988; 4: 1074-1078

Kelly T, Molony L, Burridge K: Purification of two smooth muscle glycoproteins related to integrin. Distribution in cultured chicken embryo fibroblasts. *J Biol Chem* 1987; 262: 17189-17199

Kiefel V, Santoso S, Katzmann B, Müller-Eckhardt C: A new Platelet-specific alloantigen Br<sup>a</sup>. Report of 4 cases with neonatal alloimmune thrombozytopenia. *Vox Sang* 1988; 54: 101-106

Kiefel V, Santoso S, Katzmann B, Müller-Eckhardt C: The Br<sup>a</sup> / Br<sup>b</sup> Alloantigen System of Human Platelets. *Blood* 1989; 8: 2219-2223

Kiefel V, Shechter Y, Atias D, Kroll H, Santoso S, Müller-Eckhardt C: Neonatal alloimmune thrombozytopenia due to anti- Br<sup>b</sup> (HPA-5a). *Vox Sang* 1991; 60: 244-245

Kramer RH, Marks N: Identification of integrin collagen receptors on human melanoma cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 4684-4688

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: 392-396

Kritzik M, Savage B, Nugent DJ, Santoso S, Ruggeri ZM, Kunicki TJ: Nucleotide polymorphism in the  $\alpha_2$  gene multiple alleles that are associated with differences in platelet  $\alpha_2\beta_1$  density. *Blood* 1998; 92: 2382-2388

Kunicki TJ, Nugent DJ, Staats SJ, Orzechowski RP, Wayner EA, Carter WG: The human fibroblast class II extracellular matrix receptor mediates platelet adhesion to collagen and is identical to the platelet glycoprotein Ia-IIa complex. *J Biol Chem* 1988; 263: 4516-4519.

Kunicki TJ, Newman PJ: The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood* 1992; 80: 1386-1404

Kunicki TJ, Orzechowski R, Annis D, Honda Y: Variability of integrin  $\alpha_2\beta_1$  activity on human platelets. *Blood* 1993; 82: 2693-2703

Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nugent D: 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: 1939-1943

Languino LR, Gehlsen KR, Wayner E, Carter WG, Engvall E, Ruoslati E: Endothelial cells use  $\alpha_2\beta_1$  integrin as a laminin receptor. *J Cell Biol* 1989; 109: 2455-2462

Languino LR, Ruoslati E: An alternative form of the  $\beta_1$  integrin subunit with a variant cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 1992; 267: 7116-7120

Mascelli MA, Nakada MT: Pharmacological properties of abciximab. *Hämostaseologie* 1999; 19: 101-107

- Matsubara Y, Murata M, Maruyama T, Handa M, Yamagata N, Watanabe G, Saruta T, Ikeda Y: Association between diabetic retinopathy and genetic variations in  $\alpha_2\beta_1$  integrin, a platelet receptor for collagen. *Blood*, 2000; 95: 1560-1564
- Monnet E, Sizaret P-Y, Arbeille B, Fauvel-Laféve F: Different role of Platelet Glycoprotein GPIa/IIa in platelet contact and activation induced by Type I and Type III collagens. *Thromb Res* 2000; 98; 423-433
- Morita H, Kurihara H, Imai Y, Sugiyama T, Hamada C, Sakai E, Mori M, Nagai R: Lack of association between the glycoprotein C807T polymorphism and myocardial infarction in Japanese. *Thromb Haemost* 2001; 85: 226-230
- Moroi M, Jung SM, Shinmyozu K, Tomiyama Y, Ordinas A, Diaz-Ricart M: Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: The involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. *Blood* 1996; 88: 2081-2092
- Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, Lammle B, Beer JH, Liechti-Gallati S, Meyer BJ: Association of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case control study. *Lancet* 1999; Jan 30; 353 (9150): 351-354
- Müller-Eckhardt C: Posttransfusion Purpura. *Br J Haematol* 1986; 64; 419-424
- Müller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A, Kroll H, Weisheit M, Schmidt S, Müller-Eckhardt G, Santoso S: 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet* 1989; 1: 363-366
- Nermut MV, Green Eason P, Yamada SS, Yamada KM: Electron microscopy and structural model of human fibronectin receptor. *EMBO J* 1988; 7: 4093-4099
- Nieuwenhuis HK, Akkermann JWN, Houdijk WPM, Sixma JJ: Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature* 1985; 318: 470-472
- Otey CA, Pavalko FM, Burridge K. An interaction between  $\alpha$ -actinin and the  $\beta_1$  integrin subunit in vitro. *J Cell Biol* 1990; 111: 721- 729
- Paciaroni M, Gallai V: Antiplatelet agents for stroke prevention. *Cerebrovasc Dis* 2000; 10/4: 36-39
- Pischel KD, Hemler ME, Huang C, Bluestein HG, Woods VL Jr: Use of the monoclonal antibody 12F1 to characterize the differentiation antigen VLA-2. *J Immunol* 1987; 138: 226-231
- Pischel KD, Bluestein HG, Woods Jr VL: Platelet glycoproteins Ia, Ic, and IIa are physico-chemically indistinguishable from the very late activation antigens adhesion-related proteins of lymphocytes and other cell types. *J Clin Invest* 1988; 81: 505-513
- Rainer AP, Aramaki KM, Teramura G, Gaur L: Analysis of the platelet glycoprotein Ia ( $\alpha_2$  integrin) allele frequencies in three north american populations reveals genetic association between nucleotide 807C/T and amino acid 505 Glu/Lys (HPA-5) dimorphisms. *Thromb Haemost* 1998; 80: 449-456

Ruggeri ZM: Mechanism initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost* 1997; 78: 611-616

Ruggeri ZM: New insights into the mechanism of platelet adhesion and aggregation. *Sem in Hematol* 1994; 31: 229-239

Saelmann EUM, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HFG, Sage EH, Williams S, McKeown L, Gralnick HR, Sixma JJ: Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa ( $\alpha_2\beta_1$ -integrin). *Blood* 1994; 83: 1244-1250

Sanderson JH, Phillips CE: *An atlas of Laboratory animal hematology*. Clarendon Press 1981: 2-307

Santoro SA, Zutter MM: The  $\alpha_2\beta_1$  integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost* 1995; 74: 813-821

Santoso S, Kiefel V, Müller-Eckhardt C: Immunological characterization of the new platelet alloantigen system Br<sup>a</sup> / Br<sup>b</sup>. *Br J Haematol* 1989a; 72: 191-198

Santoso S, Kiefel V, Müller-Eckhardt C: Human platelet alloantigens Br<sup>a</sup> / Br<sup>b</sup> are expressed on the very late activation antigen 2 (VLA-2) of T-Lymphocytes. *Hum Immunol* 1989b; 25: 237-246

Santoso S, Kalb R, Kiefel V, Müller-Eckhardt C, Newman PJ: The human alloantigen Br(a)/Br(b) is associated with Lys<sup>505</sup> (AAG) / Glu<sup>505</sup> (GAG) polymorphism of GPIa (Abstract). *Thromb Haemost* 1993a; 69(6): 1191, 2317

Santoso S, Kalb R, Walka M, Kiefel V, Müller-Eckhardt C, Newman PJ: The human platelet 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* 1993b; 92: 2427-2432

Santoso S, Amrhein J, Sachs U, Müller-Eckhardt C, Kiefel V: Single point mutation in glycoprotein Ia responsible for the formation of a new human platelet alloantigen (sit) involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, 1997; 90: 261a (abstract)

Santoso S, Amrhein J, Hofmann HA, Sachs UJH, 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 affects collagen-induced aggregation. *Blood*, 1999a; 94: 4103-4111

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* 1999b; 93: 2449-2453

Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM: Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998; 94: 657-666.

Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge Js: Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6:695-704

Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N: Integrin signaling: The platelet Paradigm. *Blood* 1998; 91: 2645-2657

Sixma JJ, Van Zanten GH, Saelmann EUM, Verkleij M, Lankhof H, Nieuwenhuis HK, de Groot PG: Platelet adhesion to collagen. *Thromb Haemost* 1995; 74:454-459

Sixma JJ, van Zanten HG, Huizinga EG, van der Plas MR, Verkley M, Wu Y, Gros P, de Groot PG: Platelet adhesion to collagen: an update. *Thromb Haemost* 1997; 78: 434-438

Staatz W, Rajpara SM, Wayner EA, Carter WG, Santoro SA: The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the  $Mg^{++}$ -dependent adhesion of platelets to collagen. *J Cell Biol* 1989; 108: 1917-1924

Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, Uchino H: A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 1987; 69: 1712-1720

Takada Y, Wayner EA, Carter WG, Santoro SA: The extracellular matrix receptors, ECMR II and ECMR I, for collagen and fibronectin correspond to VLA-2 and VLA-3 in the VLA family of heterodimers. *J Cell Biochem* 1988; 37: 385-393

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

Tapley P, Horwitz AF, Buck CA, Burridge K, Duggan K, Hirst R, Rohrschneider L: Analysis of the avian fibronectin receptor (integrin) as direct substrate for pp60<sup>v-src</sup>. *Oncogene* 4, 325-333

Tcheng JE, Ellis SG, George BS, Kereiakes DJ, Kleiman NS, Talley JD, Wang AL, Weisman HF, Califf RM, Topol EJ: Pharmacodynamics of chimeric glycoprotein IIb/IIIa integrin antiplatelet Fab 7E3 in high-risk coronary angioplasty. *Circulation* 1994; 90: 1757-1764

Tschopp TB, Weiss HJ, Baumgartner HR: Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von Willebrand's disease. *J. Lab Clin Med* 1974; 83: 296-300.

Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, Takayama H: A novel association of Fc receptor  $\gamma$ -chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem* 1997; 272: 23528-23531

Tuckwell D, Calderwood DA, Green LJ, Humphries MJ: Integrin  $\alpha 2$  I-domain is a binding site for collagen. *J Cell Science* 1995; 108: 1629-1637

Unkelbach K, Kalb R, Santoso S, Kroll H, Mueller-Eckhardt C, Kiefel V: Genomic RFLP typing of human platelet alloantigens Zw(PI<sup>A</sup>), Ko, Bak and Br (HPA-1, 2, 3, 5). *Br J Haematol* 1995; 89: 169-176

Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weismann HF, Collier BS, Jordan AE: Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantitation of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 1996; 88: 907-914

Wang R, Newman PJ: Adhesive and signaling properties of a naturally occurring allele of glycoprotein IIIa with an amino acid substitution within the ligand binding domain – The Pen<sup>a</sup>/Pen<sup>b</sup> platelet allo genetic epitopes. *Blood* 1998; Nov 1; 92/93, 3200-3207.

Watson SP, Gibbins J: Collagen receptor signaling in platelets extending the role of the ITAM. *Immun Today* 1998; 19: 260-264

Watson SP: Collagen receptor signaling in platelets and megacaryocytes. *Thromb Haemost* 1999; 82: 365-37

Zhang Y, Saison M, Spaen M, De Strooper B, Van Leuven F, David G, Van den Berghe H, Cassiman JJ: Mapping of the fibronectin receptor beta subunit gene to chromosome 10. *Somat Cell Mol Genet* 1988; 14: 99-104

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. G. Bein, Leiter des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin der JLU Gießen, möchte ich mich für das Interesse an meiner Arbeit, seine Motivation, sowie die Erstellung des Gutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. Schoner, Leiter des Instituts für Biochemie und Endokrinologie der JLU Gießen, danke ich für fachliche Kritik, die Vertretung meiner Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin, sowie für die Erstellung des Gutachtens.

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Betreuer Herrn Dr. Sentot Santoso für die Überlassung dieses interessanten Themas, sowie seine engagierte und geduldige Betreuung während der gesamten Zeit der Arbeit. Ohne seine hilfreiche Unterstützung wäre diese Arbeit sicher nicht zustande gekommen.

Besonderer Dank gilt auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Santoso, die durch ihre Hilfsbereitschaft eine stets motivierende Arbeitsatmosphäre geschaffen haben. Vor allem möchte ich Frau Monika Stuchlik, Frau Bettina Carl, Frau Silke Werth und Frau Olga Eva, sowie Frau Christine Hofmann danken, die mir durch eine exzellente Einarbeitung bei der Erlernung und Durchführung der Experimente sehr behilflich waren und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Bei Frau Dr. Anette Bohnert, Frau Dr. Karin Kissel, sowie Herrn Matthias Hecker möchte ich mich für fruchtbare Diskussionen und motivierende Gespräche bedanken. Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Holger Hackstein für seine Geduld und seine Motivation. Allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin danke ich für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Den Mitarbeitern der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik I, Innere Krankheiten der Kleintiere, und hier besonders Herrn Dr. Moritz, danke ich für die Überlassung der Hundeblutproben, sowie für ihre Hilfe bei der Blutentnahme.

Schließlich möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie und insbesondere bei meinen Eltern bedanken, die mich fortwährend in vielerlei Hinsicht unterstützt und motiviert haben und somit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

# 11 Anhang

## 11.1: Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und 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 Stellen 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, den

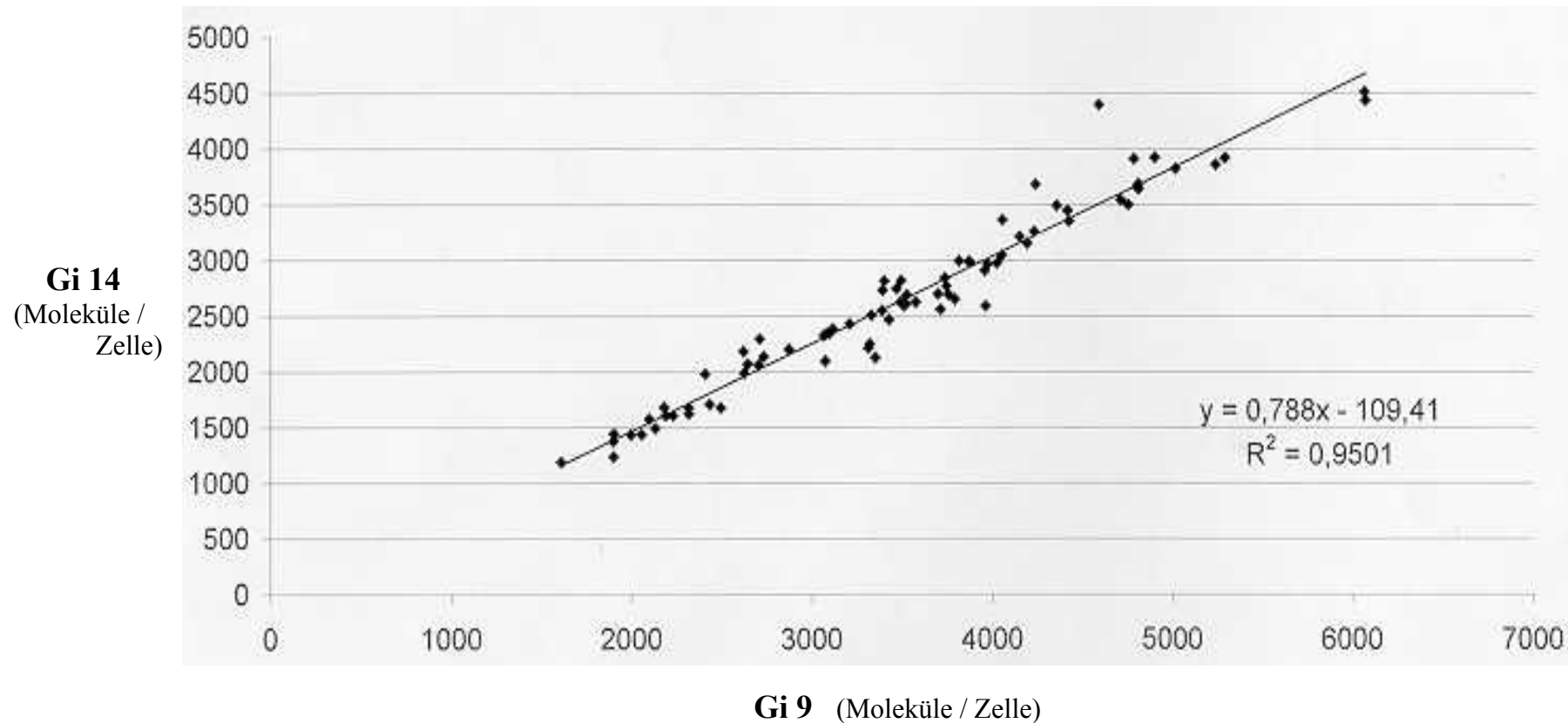
Claudia Weiken

## 11.2 Tabellen

	Pos 724		Pos 777
<b>HUMAN :</b>	5'...TTG AAC ACA TAT AAA ACC AAA GAT GAA ATG ATT GTA GCA ACA TCC CAG ACA TCC -3'		
	Leu	Asn Thr Tyr Lys Thr Lys Asp Glu Met Ile Val Ala Thr Ser Gln Thr Ser	
			EXON 7
<b>CANIN :</b>	5'...CTG AAC ACT TTC AAA ACC AAA GCT GAA ATG ACT GAA GCA ACA TCC CAG ACA TAC -3'		
	Leu	Asn Thr <u>Phe</u> Lys Thr Lys <u>Ala</u> Glu Met <u>Thr</u> <u>Glu</u> Ala Thr Ser Gln Thr <u>Tyr</u>	
		Pos 807	
		<b>T</b>	
<b>HUMAN :</b>	5'- CAA TAT GGT GGG GAC CTC ACA AAC ACA TTC GGA GCA ATT CAA TAT GCA AG ...3'		Pos 827
	His	Tyr Gly Gly Asp Asp Leu Asn Thr Phe Gly Ala Ile Gln Tyr Ala	
			EXON 7
<b>CANIN :</b>	5'- CAA TAT GGT GGA GAC CTC ACA AAT ACA TTC AAA GCA ATT CAA TAT GCA AA ...3'		
	His	Tyr Gly Gly Asp Asp Leu Asn Thr Phe <u>Lys</u> Ala Ile Gln Tyr Ala	
<b>HUMAN :</b>	5'- gta agt ttt ggt gct aat agg cca atg ttt tca taa tgt aaa aca tta tat tta tgt....3'		
			INTRON
<b>CANIN :</b>	5'- gta agt <u>tat</u> <u>gat</u> <u>gac</u> aat <u>aac</u> cca <u>ata</u> ttt tga taa <u>aat</u> aga <u>agt</u> <u>gct</u> tat <u>aag</u> <u>taa</u> ...3'		

**Abbildung 11.1: Ergebnis der Sequenzierung humaner bzw. caniner DNA**

Darstellung der Sequenzen des die  $\alpha_2$ -Untereinheit kodierenden Gens im Bereich des Exons 7 mit benachbartem Intron. Vergleich der Sequenzen bei Mensch und Hund



**Abbildung 11.2: Oberflächendichte des Glykoproteins GPIIb/IIIa auf Thrombozyten in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper**  
 Dargestellt sind hier die bei 79 gesunden Spendern gemessenen Oberflächendichten des Glykoproteins GPIIb/IIIa in Abhängigkeit vom eingesetzten Antikörper. Die Expression des Moleküls wurde aus Citratvollblut unter Verwendung der beiden monoklonalen Antikörper Gi9 und Gi14 am Durchflußzytometer gemessen (siehe 4.2.4) und mit Hilfe einer erstellten Eichkurve quantifiziert. Es zeigt sich deutlich, daß die Quantifizierung mit Gi9 immer höhere Werte ergab, als mit Gi14. Die Untersuchung wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Fa. Biocytex, Marseille, durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei der Fa. Biocytex für die Überlassung dieser Abbildung bedanken.

Genotyp:	CC –Br <sup>b</sup> /Br <sup>b</sup>		CT –Br <sup>b</sup> /Br <sup>b</sup>		TT –Br <sup>b</sup> /Br <sup>b</sup>		CC –Br <sup>a</sup> /Br <sup>b</sup>		CT –Br <sup>a</sup> /Br <sup>b</sup>		CC –Br <sup>a</sup> /Br <sup>a</sup>	
	GI 9 [MFI]	Gi 14 [MFI]	GI 9 [MFI]	Gi 14 [MFI]	GI 9 [MFI]	Gi 14 [MFI]	GI 9 [MFI]	Gi 14 [MFI]	GI 9 [MFI]	Gi 14 [MFI]	GI 9 [MFI]	Gi 14 [MFI]
	111,1	114,0	113,2	115,9	123,7	127,6	114,4	123,3	116,5	133,2	117,3	128,5
	108,9	112,7	118,5	122,2	124,1	132,2	120,7	129,6	116,9	124,0	122,5	132,8
	114,9	119,5	118,5	122,8	111,7	124,2	106,6	124,3	122,1	128,3	119,4	132,5
	113,9	120,8	114,8	119,9	121,2	132,0	116,6	125,9	123,0	131,7	/	/
	112,8	123,7	118,0	123,3	125,6	128,6	/	/	119,4	128,3	/	/
	113,4	123,1	119,8	127,2	127,1	132,0	/	/	107,5	133,6	/	/
	115,8	125,6	109,0	117,0	127,4	134,9	/	/	116,4	123,5	/	/
	114,7	118,9	115,4	128,4	127,0	139,3	/	/	/	/	/	/
	118,0	118,0	118,0	128,6	127,3	135,4	/	/	/	/	/	/
	112,9	118,4	124,5	133,3	122,1	131,4	/	/	/	/	/	/
Mittelwert [MFI]	113,67	119,47	116,97	123,86	123,72	131,76	114,56	125,78	117,40	128,94	119,73	131,27
Standardabweichung (s)	2,51	4,08	4,07	5,51	4,42	4,28	5,92	2,77	5,12	4,13	7,60	2,40

Tabelle 11.1: Auswertung der FACS-Analysen mit humanen, aus Vollblut isolierten Thrombozyten

Genotyp	BSA 1%				Kollagen I (10 µg/ml)				Kollagen I (20 µg/ml)			
	NaCl	Gi 9	Gi 14	Gi 5	NaCl	Gi 9	Gi 14	Gi 5	NaCl	Gi 9	Gi 14	Gi 5
CT/Br <sup>b/b</sup>	0,002	0,063	/	/	1,293	0,177	/	/	0,918	0,234	/	/
CC/Br <sup>b/b</sup>	0,019	0,050	/	/	2,289	0,313	/	/	0,68	0,340	/	/
	0,027	0,036	/	/	2,117	0,098	/	/	2,469	0,074	/	/
TT/Br <sup>b/b</sup>	0,179	0,331	0,385	/	1,606	0,336	2,005	2,173	1,730	0,337	2,011	1,745
TT/Br <sup>b/b</sup>	0,328	0,585	0,569	/	2,423	0,523	1,024	2,250	2,377	0,813	1,055	2,012
TT/Br <sup>b/b</sup>	0,299	0,620	0,634	/	2,401	0,477	1,198	2,516	2,691	0,763	1,069	2,126
CT/Br <sup>b/b</sup>	0,202	0,378	0,325	/	2,170	0,440	0,880	2,031	2,414	0,401	1,038	1,900
CC/Br <sup>b/b</sup>	0,230	0,304	0,384	/	2,087	0,543	1,205	2,144	2,408	0,467	1,416	2,122
Mittelwert	0,161	0,296	0,459	/	2,048	0,363	1,262	2,223	1,961	0,429	1,318	1,981
s	+/- 0,129	+/- 0,233	+/- 0,134	/	+/- 0,554	+/- 0,163	+/- 0,436	+/- 0,182	+/- 0,770	+/- 0,251	+/- 0,613	+/- 0,161
Bindung [ % ]					/	3,6 %	42,6 %	118 %	/	7,4 %	48 %	110 %
Hemmung [ % ]					/	96,4 %	57,4 %	keine	/	92,6 %	52 %	keine

**Tabelle 11.2: Ergebnisse des Adhäsionstests mit humanen Thrombozyten**

Darstellung der Extinktionen nach Inkubation der Thrombozyten mit Kollagen Typ I und quantitativer Detektion der Adhäsion unter Nachweis der Saure Phosphatase Aktivität nach Zugabe des Substrates  $\rho$ -Nitrophenylphosphat. Die Berechnung der Bindung erfolgte unter Subtraktion der entsprechenden NaCl-Werte mit Hilfe des Dreisatzes. Die Berechnung der Hemmung erfolgte durch:  $100 - \text{Bindung} (\%)$ .

	BSA 1%				Kollagen I (10 µg/ml)				Kollagen I (20 µg/ml)			
Probe	NaCl	Gi 9	Gi 14	Gi 5	NaCl	Gi 9	Gi 14	Gi 5	NaCl	Gi 9	Gi 14	Gi 5
1	0,005	0,029	0,078	/	2,400	0,067	2,703	2,593	2,552	0,110	2,610	2,623
2	0,124	0,314	0,540	/	1,272	0,431	1,594	1,484	1,341	0,405	1,752	1,466
3	0,119	0,227	0,379	/	2,281	0,411	2,337	2,371	2,512	0,392	2,474	2,359
4	0,147	0,221	0,211	/	2,293	0,958	2,438	2,340	2,358	1,105	2,364	2,312
5	0,283	0,234	0,318	/	2,372	0,323	2,680	2,240	2,491	0,275	2,677	2,292
6	0,079	0,093	0,127	/	2,409	0,608	2,659	2,530	2,519	0,636	2,696	2,599
7	0,102	0,131	0,129	/	2,319	0,467	2,675	2,507	2,007	0,487	2,750	2,513
Mittelwert	0,123	0,178	0,255	/	2,192	0,395	2,441	2,296	2,254	0,487	2,475	2,309
s	+/- 0,084	+/- 0,098	+/- 0,166	/	+/- 0,409	+/- 0,168	+/- 0,399	+/- 0,376	+/- 0,445	+/- 0,318	+/- 0,346	+/- 0,395
Bindung [ % ]					/	10,5 %%	107,5 %	111 %	/	14,4 %	104 %	108 %
Hemmung [ % ]					/	89,5 %	keine	keine	/	85,6 %	keine	keine

**Tabelle 11.3: Ergebnisse des Adhäsionstests mit caninen Thrombozyten**

Darstellung der Extinktionen nach Adhäsion der caninen Thrombozyten an Kollagen Typ I und quantitativer Detektion durch Nachweis des Sauren Phosphatase Aktivität mit Hilfe des Substrates  $\rho$ -Nitrophenylphosphat. Die Berechnung der prozentualen Bindung der Thrombozyten in Abhängigkeit vom zugegebenen Antikörper wurde unter Subtraktion des entsprechenden NaCl-Wertes mit Hilfe des Dreisatzes berechnet.