

Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika
und Hämostaseologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

ehem. Leiter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Wolfgang Schramm

jetziger Leiter: Prof. Dr. med. Reinhard Henschler

Entstehung von Mikropartikeln und Tethern aus Thrombozyten - Identifizierung eines neuen biophysikalischen Mechanismus

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hannah Schumann
aus München

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Armin J. Reininger

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Ioannis Mylonas
Priv. Doz. Dr. med. Florian Weis

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2012

Entstehung von Mikropartikeln und Tethern aus Thrombozyten - Identifizierung eines neuen biophysikalischen Mechanismus

| | |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis | 1 |
| Abbildungsverzeichnis | 4 |
| Glossar | 5 |
| | |
| 1. Einleitung - Relevante Grundlagen der primären und sekundären Hämostase .. | 8 |
| 1.1. Einfluss der Hämodynamik auf die Hämostase | 8 |
| 1.2. Thrombozyten – Morphologie und Funktion | 9 |
| 1.2.1. Morphologie | 9 |
| 1.2.2. Thrombozytenfunktion | 10 |
| 1.2.2.1. Adhäsion und Aggregation | 10 |
| 1.2.2.2. Zelladhäsion unter Vollblutströmung | 12 |
| 1.2.2.3. Aktivierung des Gerinnungssystems | 12 |
| 1.2.2.4. Aktivierung von Thrombozyten | 13 |
| 1.3. Thrombozytäre Membranglykoproteine | 14 |
| 1.3.1. An VWF bindende Membranrezeptoren | 14 |
| 1.3.1.1. Der Thrombozytenrezeptor GPIIb/IIIa | 14 |
| 1.3.1.2. Der Thrombozytenrezeptor Integrin α IIb β 3 | 15 |
| 1.3.1.3. Zusammenspiel von konstitutivem GPIIb und aktivierbarem Integrin α IIb β 3 | 16 |
| 1.3.2. Thrombozytäre Kollagenrezeptoren | 16 |
| 1.4. Translokation von Thrombozyten auf reaktiven Oberflächen | 17 |
| 1.5. Mikropartikel | 17 |
| 1.5.1. Definition und Charakterisierung | 17 |
| 1.5.2. Entstehungsmechanismen | 18 |
| 1.5.3. Mikropartikel und Hämostase | 18 |
| 1.5.4. Thrombozytäre Mikropartikel im Rahmen verschiedener Erkrankungen | 19 |
| 1.5.5. Membranproteine und Membranlipide auf Mikropartikeln | 20 |
| 1.6. Die extrazelluläre Matrix, insbesondere Kollagen | 21 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1.7. | Beeinflussung der Interaktion von Thrombozyten mit von Willebrand Faktor durch Scherkräfte | 22 |
| 1.8. | Korrelation von Tissue Factor Vorkommen und Thrombogenität | 23 |
| 2. | Zielsetzung | 25 |
| 3. | Material und Methodik | 26 |
| 3.1. | Probengewinnung | 26 |
| 3.1.1. | Entnahme der Blutproben | 26 |
| 3.1.2. | Verwendete Antikoagulanzen | 26 |
| 3.1.3. | Probenweiterverarbeitung | 27 |
| 3.2. | Flusseexperimente | 28 |
| 3.2.1. | Versuchsaufbau | 28 |
| 3.2.2. | Beschichtung der Glasoberflächen | 30 |
| 3.2.3. | Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM) | 31 |
| 3.2.4. | Aufbau des Mikroskops | 33 |
| 3.2.5. | Datenaquisition | 33 |
| 3.2.6. | Prinzip des Flusseperiments | 34 |
| 3.2.7. | Ablauf des Flusseperiments | 36 |
| 3.2.8. | Durchflusszytometrische Auswertung | 37 |
| 3.2.9. | Fixierung der Proben | 38 |
| 3.3. | Analyse von Tethern und Mikropartikeln mit konfokaler Laserscanning-mikroskopie | 39 |
| 3.4. | Herstellung und Weiterverarbeitung von fixierten Proben für elektronenmikroskopische Auswertungen | 40 |
| 3.4.1. | Rasterelektronenmikroskopie | 40 |
| 3.4.2. | Transmissions-Immun-Elektronenmikroskopie | 40 |
| 4. | Ergebnisse | 42 |
| 4.1. | Plättchenadhäsion via Discrete Adhesion Points (DAPs) | 42 |
| 4.2. | Die Kinetik der Tetherbildung | 43 |
| 4.3. | Tether- und Mikropartikelentstehung aus Thrombozyten | 48 |
| 4.4. | Zusammenwirken von VWF A1-Domäne und GPIIb α als Voraussetzung für Spreading | 53 |
| 4.5. | VWF-vermittelte Tetherbildung an Kollagenfibrillen | 53 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.6. | Verteilung von GPIIb α auf DAPs und Tethern | 54 |
| 4.7. | Adhäsionsrezeptoren und prokoagulatorische Moleküle auf Plättchen, DAPs und Tethern | 60 |
| 4.8. | Scherkraftinduzierte Bildung von Mikropartikeln | 64 |
| 5. | Diskussion | 67 |
| 5.1. | Discrete Adhesion Points (DAPs) als „Quantum Unit“ der Plättchenadhäsion sowie der Mikropartikel- und Tetherentstehung | 67 |
| 5.2. | DAPs und Tether verändern die Kraftgrößen der Thrombozytenadhäsion | 68 |
| 5.2.1. | Kräfte diagramm der Mikropartikel- und Tetherentstehung | 68 |
| 5.2.2. | Veränderung der Rezeptordichte innerhalb der DAPs | 71 |
| 5.3. | Die Tetherentstehung findet unabhängig vom zytoskelettären F-Aktin statt | 72 |
| 5.4. | Die hämodynamisch induzierte Mikropartikel- und Tetherbildung ist einzig von GPIIb und VWF abhängig | 74 |
| 5.5. | Mikropartikel in der Zirkulation – besondere Strömungseigenschaften aufgrund ihrer Größe | 74 |
| 5.6. | Tissue Factor auf Thrombozyten, Mikropartikeln und Tethern | 75 |
| 5.7. | Klinische Relevanz, Forschungsstand und potentielle Therapieoptionen | 76 |
| 5.7.1. | Pathologische Wirkung thrombozytärer Mikropartikel | 76 |
| 5.7.2. | Klinische Relevanz der prokoagulatorischen Aktivität von Mikropartikeln .. | 77 |
| 5.7.3. | Mikropartikel fungieren als Vektoren zwischen Zellen | 77 |
| 5.7.4. | Mikropartikel als Parameter – Korrelation der Anzahl von Mikropartikeln mit der Schwere von Erkrankungen | 78 |
| 5.7.5. | Probleme der Forschung an Mikropartikeln | 78 |
| 5.7.6. | Nächste Schritte der Forschung | 79 |
| 6. | Zusammenfassung | 80 |
| | Literaturverzeichnis | 82 |
| | Abkürzungsverzeichnis | 93 |
| | Danksagung | 94 |
| | Curriculum vitae | 95 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----------|
| 1 - Aufbau des Flussexperimentes | 29 |
| 2 - Prinzip der Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie | 32 |
| 3 - Schematische Darstellung des Blutstromes | 35 |
| 4 - Die Kinetik der Tetherbildung | 44/45 |
| 5 - DAPs, Mikropartikel und Tether | 46 |
| 6 - Plättchentranslokation über dA1VWF bzw. VWF | 47 |
| 7 - Scanning-elektronenmikroskopische Analyse von Mikropartikeln und Tethern .. | 51/52 |
| 8 - VWF-vermittelte Tetherbildung an Kollagenfibrillen | 54 |
| 9 - Verteilung von GPIb auf Tethern und DAPs (Polyvinylformaldehyd-beschichtete Gitter) | 56/57 |
| 10 - Verteilung von GPIb auf Tethern, DAPs und im OCS (Melamin-beschichtete Oberfläche) | 59/60 |
| 11 - Konfokalmikroskopische Analyse von GPIb und F-Aktin | 61/62/63 |
| 12 - Konfokalmikroskopische Analyse von TF auf Thrombozyten und Tethern | 64 |
| 13 - Durchflusszytometrische Auswertung scherkraftinduziert gebildeter Mikropartikel .. | 66 |
| 14 - Kräftediagramm der Mikropartikel- und Tetherentstehung | 70 |

Glossar

Buffy Coat: Nach Zentrifugation lagern sich Leukozyten und Thrombozyten zwischen den absedimentierten Erythrozyten und dem darüberliegenden Plasma als eigene, weißliche Schicht ab. Diese wird im Englischen „buffy coat“, im Deutschen Leukozytenmanschette genannt.

DAP (Discrete Adhesion Point): Von unserer Arbeitsgruppe zum ersten Mal entdeckte und beschriebene Funktionseinheit eines Thrombozyten mit $0,1 \mu\text{m}^2$ großer Membranfläche, die etwa 70-100 GPIIb α -Rezeptoren umfasst und als eine Art Anker für die Thrombozytenadhäsion unter Fluss fungiert; bei hohen Scherkräften kann dadurch die Tether- und Mikropartikelbildung aus Plättchen initiiert werden.

Filopodien: Filopodien sind aktiv von einer Zelle gebildete Membranausstülpungen. Sie dienen unter anderem der Zellmigration und entstehen durch Aktinpolymerisation des Zytoskeletts. Filopodien können von verschiedenen Zellen des Blutes, z.B. von Leukozyten und Thrombozyten, gebildet werden. Filopodien sind eine Unterform von Pseudopodien, die allgemein Plasmaausstülpungen von Zellen bezeichnen.

Hämostaseologie: Dies ist ein von Rudolf Marx 1957 geprägter Begriff, der die Lehre vom „Stehen- und Steckenbleiben des Blutes“ bezeichnet. Die funktionierende Hämostase wird durch die zellulären Bestandteile des Blutes, die Plasmaproteine, das Endothel und die Strömung des Blutes aufrechterhalten und reguliert. So entsteht ein Gleichgewicht, das sowohl eine Blutung wie eine Thrombose, effektiv verhindert.

Lipid Rafts: Lipid Rafts sind Mikrodomänen von Zellmembranen mit einem Durchmesser von etwa 50 nm, die einen hohen Anteil von Cholesterin enthalten. Wichtige Rollen spielen „lipid rafts“ für den Membrantransport und die Zusammensetzung von Proteinen innerhalb der Membran. Eine essentielle Beteiligung bei der Signaltransduktion von Zellen wurde ebenfalls nachgewiesen. (Biró et al. 2005, Simons und Toomre)

Mikropartikel: Mikropartikel sind von Zellen abgesonderte Membrankorpuskel von etwa 0,1–0,9 µm Durchmesser, die z.B. von Endothelzellen, Leukozyten oder Thrombozyten stammen können. In der vorliegenden Arbeit ist, wenn nicht anderweitig erwähnt, von thrombozytären Mikropartikeln die Rede. Sie können auf unterschiedliche Weise entstehen. Ein neuartiger biophysikalischer Mechanismus der Mikropartikelbildung konnte in unseren Experimenten identifiziert werden und wird im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt.

Plättchenarmes Plasma: Durch Zentrifugation von Blut mit 1070g für 15 Minuten kann plättchenarmes Plasma hergestellt werden. Vom englischen Wort „platelet-poor-plasma“ wird die Abkürzung PPP übernommen.

Plättchenreiches Plasma: Durch Zentrifugation von Blut mit 170g für 15 Minuten erhielten wir plättchenreiches Plasma. Dieses wird auch als PRP, Abkürzung des englischen Worts „platelet-rich-plasma“, bezeichnet.

Puffer: Puffer sind wässrige Elektrolytlösungen, die durch ihre Pufferkapazität in der Lage sind, den pH-Wert in bestimmten Bereichen konstant zu halten. In den vorgestellten Experimenten wurden plasmaosmolare Lösungen mit einem pH-Wert von 7,40 - entweder PBS (Phosphate buffered saline) oder HBSS (Hepes buffered saline solution) - verwendet.

RICM: Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie ist eine optische Methode zur quantitativen Darstellung des Membrankontaktes von Zellen an einer Glasoberfläche. Durch Interferenzfarben bzw. -graustufen lassen sich die Membrankontakte mit bis zu 4-12 Nanometer Abstand vom Glas quantifizieren, ohne dass eine Färbung der Proben notwendig ist. Wir konnten dadurch DAPs sowie die scherkraftinduzierte Mikropartikel- und Tetherentstehung direkt sichtbar machen.

Spreading: Als Spreading wird das aktive flächenhafte Ausbreiten von Thrombozyten nach Stimulation bezeichnet.

Tether: Tether sind schlauchförmige Membranausziehungen, die durch hohe Scherkräfte passiv aus einer Zelle - in unserem Fall Thrombozyten - herausgezogen werden. Sie haben nur ein Drittel des Durchmessers von Filopodien, von denen sie streng abzugrenzen sind.

Tissue Factor (TF): Tissue Factor wird im deutschen auch Gewebsthrombokinase genannt. Er löst durch die Bindung an Faktor VII den extrinsischen Weg des Gerinnungssystems aus.

Thrombozyten: Thrombozyten sind 1,5-3,5 µm große, kernlose, diskoide Zellen, die von Megakaryozyten im Knochenmark gebildet werden, anschließend circa 8-12 Tage im Blut zirkulieren und zuletzt in der Milz abgebaut werden. Sie sind unter anderem verantwortlich für die primäre Hämostase, das heißt für die erste Abdichtung von Defekten des Endothels oder der gesamten Gefäßwand. Sie werden auch als Blutplättchen bezeichnet.

Von Willebrand Faktor (VWF): VWF ist ein Plasmaprotein, das bei hohen Scherraten für die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen unabdingbar ist. Die Bildung findet in Endothelzellen und Megakaryozyten statt. Das Fehlen oder der Defekt dieses Plasmaproteins, z.B. im Rahmen eines von Willebrand-Jürgens-Syndroms, führt zu erhöhter Blutungsneigung.

1. Einleitung - Relevante Grundlagen der primären und sekundären Hämostase

1.1. Einfluss der Hämodynamik auf die Hämostase

Bis heute ist nicht vollständig geklärt, wie die 1967 von Wolf (Wolf) entdeckten und damals als „Plättchenstaub“ bezeichneten Mikropartikel in vivo entstehen und welche Rolle ihnen in der Zirkulation zukommt. Mittlerweile weiß man, dass Mikropartikel aus verschiedenen Zellen, unter anderem aus Thrombozyten, Endothelzellen und Leukozyten gebildet werden können, dass unter physiologischen und pathologischen Bedingungen jedoch die Mikropartikel thrombozytären Ursprungs vorherrschen. (Horstman und Ahn; Joop et al.; Berckmans et al.) In der Vergangenheit konnte bereits festgestellt werden, dass thrombozytäre Mikropartikel durch den Einfluss von Scherkräften entstehen können (Miyazaki et al.), jedoch war bislang nicht klar, über welchen Mechanismus dies erfolgt und welche Strukturen daran beteiligt sind. Vor allem sind weder die Eigenschaften von Mikropartikeln noch deren potentielle Mitwirkung an der Entstehung von Thromben aufgeklärt.

In der vorliegenden Dissertation wird die Identifizierung eines bislang nicht bekannten biophysikalischen Mechanismus der Entstehung thrombozytärer Mikropartikel vorgestellt. Die Abklärung des Entstehungsprozesses von Mikropartikeln wird ein tieferes Verständnis ihrer Eigenschaften und ihrer Bedeutung als physiologische oder pathologische Faktoren der Hämostase ermöglichen.

Die Integrität des Gefäßendothels ist Voraussetzung für einen normalen Blutfluss. Sie wird dauerhaft von den im Blut zirkulierenden Thrombozyten überwacht. (Ruggeri 2002) Bereits im 19. Jahrhundert wurde die Alteration der Gefäßwand und damit des Endothels von Rudolf Virchow als einer der entscheidenden Faktoren für eine Thromboseentstehung erkannt. Die beiden weiteren Faktoren der bis heute gültigen Virchowschen Trias sind die Veränderung des Blutes und seiner Viskosität, heutzutage wohl als Hyperkoagulabilität zu interpretieren, sowie eine Störung der Blutströmung. Unter physiologischen Bedingungen herrscht im Blutkreislauf ein Gleichgewicht zwischen pro- und antikoagulatorisch wirkenden Faktoren in Form plasmatischer, zellulärer sowie vaskulärer Komponenten. Wird dieses Gleichgewicht verschoben, entsteht entweder eine Neigung zu Blutungen, der hämorrhagischen Diathese, oder zu Thrombenbildung

innerhalb der Gefäße.

Die physiologische Rolle der Plättchen liegt in der Blutungsstillung, sie sind aber auch an der Atherosklerose von Arterien (Massberg et al.) sowie thromboembolischen Ereignissen beteiligt und können so zu kardio- oder zerebrovaskulären Erkrankungen beitragen. Besonders in den westlichen Industrienationen stellen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems seit langem die häufigste Todesursache dar, mittlerweile trifft dies auch weltweit zu. Insbesondere ischämische Herzerkrankungen tragen zu dieser dramatischen Entwicklung bei. (WHO 18; WHO 54) Inwieweit thrombozytäre Mikropartikel im Rahmen dieser kardiovaskulären Erkrankungen ursächlich beteiligt sind, ist nicht geklärt.

1.2. Thrombozyten – Morphologie und Funktion

1.2.1. Morphologie

Thrombozyten zirkulieren für 8-12 Tage im Blut in einer physiologischen Konzentration von 150000-350000/ μl . Ihr Abbau erfolgt im retikuloendothelialen System der Milz. Sie sind mit 1,5-3,5 μm Durchmesser die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes, es handelt sich um anukleäre Zellen. Die äußere Oberfläche eines Plättchens ohne OCS (offenes kanalikuläres System) beträgt durchschnittlich 8 μm^2 . Nach Aktivierung kommt es zu einer Formänderung („shape change“) und danach zur Extrusion von Filopodien. Eine vollständige Ausbreitung eines Thrombozyten auf einer thrombogenen Oberfläche nennt man Spreading, wodurch die Gesamtoberfläche auf über 15 μm^2 erhöht werden kann.

Ein Thrombozyt kann in vier Zonen eingeteilt werden: die periphere Zone, die strukturelle Zone, die Zone der Organellen sowie das Membransystem. Für die passive Entstehung von Mikropartikeln durch Scherkräfte spielen die periphere Zone und die strukturelle Zone eine entscheidende Rolle.

In der peripheren Zone liegen die für die Mikropartikelbildung mittels DAP oder die Plättchenaggregation entscheidenden, transmembranösen Rezeptoren (GPIIb, Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$). Durch das zur Verfügung stellen der Phospholipide des äußeren Membranblattes für verschiedene Komplexe von Gerinnungsfaktoren ermöglichen Thrombozyten - aber auch thrombozytäre Mikropartikel – außerdem das beschleunigte Ablaufen der Gerinnungskaskade. (Jy et al. 1995)

Die strukturelle Zone enthält verschiedene Strukturproteine. Dazu gehören unter anderem submembranöse Filamente, Mikrotubuli und Mikrofilamente. Aus kurzen Aktinfilamenten, Spektrin, Talin, Vinkulin und Aktinbindungsproteinen sowie einem „dystrophin-related-protein“ ist das Membranskelett aufgebaut, wobei Aktin und Aktinbindungsproteinen die entscheidende Rolle zukommt. Sie stabilisieren die Zellen im ruhenden Zustand. Nach Aktivierung von Thrombozyten findet die Formveränderung durch Aktinpolymerisation statt. Das für die Verlinkung der einzelnen Aktinfilamente zuständige Aktinbindungsprotein ist auch verantwortlich für die Verbindung des Membranskeletts mit der Zellmembran. (Andrews und Fox 1991; Andrews und Fox 1992).

Filamin und Talin, zwei Linkerproteine, spielen eine wesentliche Rolle bei der Signaltransduktion der Rezeptoren GPIIb und Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$: Filamin verankert den GPIIb-V-IX Rezeptorkomplex am submembranösen Zytoskelett. Der zytoplasmatische Teil des GPIIb α wird durch Filamin A an Aktinfilamente gebunden. Diese Verbindung ist essentiell für die Interaktion mit VWF. (Nakamura et al.) Talin ist ein Aktinbindungsprotein, das die Aktivierung des Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ und damit seine Funktion entscheidend beeinflusst. (Coller und Shattil; Petrich et al.) Welche Rolle die Zytoskelettproteine oder Linker-Proteine bei der scherinduzierten Bildung von Tethern und Mikropartikeln haben, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Die α -Granula, die in der Zone der Organellen vorkommen, speichern spezifische Proteine, wie z.B. Plättchenfaktor III, Thrombospondin, Fibrinogen und von Willebrand Faktor (VWF). Dieser VWF kann an die Umgebung abgegeben werden und fungiert damit als plasmatischer VWF. Unter anderem auf diese Weise werden Bindungen von Thrombozyten an Kollagen und die Aggregation von Thrombozyten untereinander ermöglicht.

1.2.2. Thrombozytenfunktion

1.2.2.1. Adhäsion und Aggregation

Die im Blut zirkulierenden Thrombozyten lagern sich bei auftretender Gefäßläsion an den Defekt an um ihn zu verschließen, dadurch die Integrität des Endothels zu wahren, und einen geregelten Blutfluss zu ermöglichen. Diese essentielle Rolle der Thrombozyten bei der Behebung von Endothelläsionen wird durch die Prozesse der Adhäsion und Aggregation sichergestellt. Unter physiologischen Bedingungen reagieren Thrombozyten

auf den Kontakt mit einer geschädigten Gefäßwand und den dadurch freigelegten thrombogenen Proteinen zunächst mit dem initialen Anhaften von noch nicht aktivierten Thrombozyten (transiente Adhäsion), gefolgt von einer Aktivierung der Thrombozyten, die zu einer permanenten Adhäsion führt. Eine wesentliche Rolle spielt dabei das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Durch weitere Stimulation der Thrombozyten, zum Beispiel über die Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin $\alpha\text{2}\beta\text{1}$, kommt es zur Aggregation, dem Anhaften von Thrombozyten aneinander. Die Brückenbildung zwischen den einzelnen Thrombozyten erfolgt wiederum über das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ und Fibrinogen als Ligand. An der aktivierten Thrombozytenoberfläche kommt es zu einer zusätzlichen Aktivierung der plasmatischen Gerinnung. (Reininger und Spannagl)

Bei sehr geringen Scherraten, wie sie im venösen Gefäßbereich vorherrschen, ist eine direkte Interaktion von Thrombozyten über Integrin $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ und Glykoprotein VI mit Kollagen oder eine Bindung von Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ an Fibrinogen möglich. Bei höheren Scherraten, wie sie im arteriellen Bereich vorkommen, wird ein initiales Haften ausschließlich über den Rezeptorkomplex GPIb-V-IX vermittelt, der an immobilisierten von Willebrand-Faktor, zum Beispiel der extrazellulären Matrix, bindet. Der GPIb-Rezeptor kann allerdings auch bereits bei niedrigen Scherraten die Thrombozytenadhäsion vermitteln. Eine Bindung an subendotheliales Kollagen wird durch vorherige Bindung des plasmatischen von Willebrand-Faktors an dieses Kollagen ermöglicht. (Savage et al. 1996; Ruggeri 1993)

Man nimmt heutzutage an, dass Thrombozyten nach der ersten Adhäsion an Endothelläsionen aktiviert werden. Dies führt dazu, dass die Bindung von adhäsiven Proteinen, also Fibrinogen und VWF, an Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ und damit die Aggregation mehrerer Blutplättchen untereinander ermöglicht wird. (Savage et al. 2001; Ruggeri et al. 1999). Das Anhaften weiterer Thrombozyten aus der Strömung an die bereits adhärenen Plättchen erfordert immer eine vorherige Bindung von plasmatischem VWF an die Oberfläche der immobilisierten Thrombozyten. Erst dadurch wird eine neue „Ankerstelle“ für die fließenden Thrombozyten geschaffen. Auch die initialen Schritte der Plättchenadhäsion an die extrazelluläre Matrix, speziell an Kollagen, sind - mit Ausnahme von sehr niedrigen Scherraten - immer von VWF abhängig. (Savage et al. 1998) Die Aggregation der Thrombozyten wird durch die Interaktion aktivierter Plättchen mittels Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ bestimmt. Ein neuer, vollständig reversibler Prozess der Agglutination nicht aktivierter Thrombozyten bei sehr hohen Scherraten (über 15000 s^{-1}) wird ausschließlich durch den im Plasma vorhandenen von Willebrand Faktor sowie immobilisierten VWF vermittelt. (Ruggeri et al. 2006)

1.2.2.2. Zelladhäsion unter Vollblutströmung

Die Ausbildung stabiler Verbindungen zwischen zirkulierenden Blutzellen, wie z.B. Thrombozyten oder Leukozyten, und der Gefäßwand setzt spezielle Adhäsionsmechanismen voraus, die imstande sind, den mechanischen Kräften standzuhalten, die durch den Blutfluss im Gefäßsystem erzeugt werden. Dabei verwenden Plättchen und Leukozyten einen ähnlichen Mechanismus um eine effiziente Zelladhäsion zu erreichen. Sie benutzen dazu jedoch unterschiedliche Rezeptoren und Liganden. (Springer; Ruggeri 1997). Die Adhäsion kann dabei sowohl an stimuliertem Endothel als auch an subendothelialen Strukturen erfolgen.

Zu Beginn der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion ermöglichen Rezeptor-Liganden Interaktionen mit sehr schneller Bindungskinetik ein erstes Anhaften. Diese Bindungen sind reversibel und führen dadurch zu einer Rollbewegung der Leukozyten und Thrombozyten über die Oberfläche. Dadurch wird die Fortbewegungsgeschwindigkeit verlangsamt, und erlaubt somit Bindungen mit langsamerer Kinetik, wie z.B. Integrinen, ihre Liganden zu erfassen und eine feste Zelladhäsion zu gewährleisten. (Lawrence und Springer; Savage et al. 1996) Dieser Mechanismus des initialen Rollens findet bei Leukozyten zwischen den an den Endothelzellen exprimierten Selektinen (P-, L-, und E-Selektin) und den entsprechenden leukozytären Rezeptoren, insbesondere P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1), statt. (Zarbock und Ley) Bei Thrombozyten wird dies über ihren Rezeptor GPIIb und seine Bindung an VWF gewährleistet.

1.2.2.3. Aktivierung des Gerinnungssystems

Plättchen tragen entscheidend zum Fortlaufen der Gerinnungskaskade, insbesondere des intrinsischen System, bei, indem sie ihre Phospholipidoberfläche für die Bildung des Tenase-Komplexes (IXa-VIIIa-Ca²⁺-Phospholipid) sowie des Prothrombinasekomplexes (Xa-Va-Ca²⁺-Phospholipid) zur Verfügung stellen. Dies konnte mittlerweile auch für Mikropartikel gezeigt werden. (Jy et al. 1995) Polyphosphate sind in den dichten Granula der Thrombozyten enthalten. (Ruiz et al.) Es konnte gezeigt werden, dass dieses thrombozytäre Polyphosphat ein prokoagulatorisch und proinflammatorisch wirkender Mediator ist. Das Polymer aus Orthophosphateinheiten stellt die Oberfläche dar, die die Fibrinbildung aktivierter Thrombozyten triggert und so die primäre mit der sekundären

Hämostase verbindet. (Müller F. et al.)

Durch die Freisetzung von aktivierenden Substanzen aus Endothelläsionen, insbesondere Tissue Factor, findet parallel zur Plättchenadhäsion auch eine Aktivierung der Gerinnungskaskade statt. Die Aktivierung des intrinsischen und extrinsischen Gerinnungssystems führt zur Bildung von Thrombin auf den Membranen von Thrombozyten und Endothelzellen. Thrombin verstärkt über positive Feedback-Mechanismen durch die Aktivierung der Faktoren V und VIII die Gerinnung, und führt so zu einem weiteren Anstieg der Thrombinkonzentration und damit zu einer weiteren Plättchenrekrutierung durch deren Aktivierung. Thrombozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der schnellen, explosionsartigen Freisetzung von Thrombin, dem sogenannten „thrombin burst“. Die Thrombingenerierung wird in drei Phasen eingeteilt. Zunächst findet die Initiierungsphase, „initiation phase“, statt. Nachdem zellgebundener TF an Faktor VII bindet, wird dieser aktiviert. Dieser TF/VIIa Komplex wiederum aktiviert Faktor X und Faktor IX. Der an der TF-tragenden Zelle verbleibende Faktor Xa kann mit Faktor Va die Bildung kleiner Mengen Thrombin initiieren. In der „priming phase“ bindet ein kleiner Teil des initial gebildeten Thrombins an Thrombozyten, die durch Bindung an der extrazellulären Matrix zum Teil bereits aktiviert sind. Durch die Bindung des Thrombins wiederum kommt es zu einer weiteren, gesteigerten Aktivierung der Thrombozyten, es scheint ein synergistischer Effekt der beiden Agonisten vorzuliegen. Aus dieser „priming phase“ geht ein aktivierter Thrombozyt, der in der Lage ist, die Faktoren Va, VIIIa und XIa rasch zu binden, hervor. (Monroe et al.) Daran schließt sich die Ausbreitungsphase „propagation phase“ an, während der mehr als 96% des Thrombins entsteht. (Mann et al.) Nach mehreren Aktivierungsschritten, an denen die Faktoren Xa, IXa/VIIIa und Va beteiligt sind, generiert der an der Thrombozytenoberfläche liegende Faktorenkomplex Xa/Va, den „thrombin burst“ zur Bildung eines Fibrinclots. (Monroe et al.) Voraussetzung für die beschriebene Thrombinentstehung ist die Exprimierung von Phosphatidylserinen auf dem äußeren Membranblatt der aktivierten Thrombozyten.

1.2.2.4. Aktivierung von Thrombozyten

Eine Aktivierung von Thrombozyten kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Physiologisch geschieht dies z.B. durch Thrombin, Kollagen, ADP, Adrenalin oder Endoperoxide. Auch das Einwirken von hohen Scherkräften kann zu einer Aktivierung führen. (Sakariassen et al.; Ruggeri 1993)

Durch diese Aktivierung der Blutplättchen werden wiederum verschiedene Prozesse ausgelöst. Dazu gehören z.B. der Einstrom von Kalziumionen, ein Formwandel der Zellen („shape change“), die Translokation von membranständigen Glykoproteinen, eine Aktivierung des Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Komplexes, die Plättchenaggregation und die Sekretion von Substanzen aus verschiedenen Granula. Aber auch die Bildung von Mikropartikeln kann Folge einer Plättchenaktivierung sein. So führt z.B. eine Plättchenstimulierung durch Komplement Proteine C5b-9 zur Freisetzung von Mikropartikeln, die eine erhöhte Konzentration an Rezeptoren für den Gerinnungsfaktor Va besitzen, und zudem eine erhöhte Prothrombinaseaktivität aufweisen. (Sims et al. 1988)

Relevant für die von uns durchgeführten Experimente ist, dass in vitro durch die Zugabe von Prostaglandin E_1 (PGE_1) die Aktivierung der Thrombozyten verhindert wird.

1.3. Thrombozytäre Membranglykoproteine

1.3.1. An VWF bindende Membranrezeptoren

1.3.1.1. Der Thrombozytenrezeptor GPIIb α

Der thrombozytäre Membranrezeptor GPIIb α ist Teil des Rezeptorkomplexes GPIIb-IX-V und wird in der CD Klassifikation der Merkmalsgruppe CD 42b zugeordnet. Von dieser liegen auf der Oberfläche eines Thrombozyten etwa 25000 Kopien vor. (Lopez) Diese sind auf den externen und den internen Membranen (offenes kanalikuläres System) der Thrombozyten gleichmäßig verteilt. (White et al.) Auch auf thrombozytären Mikropartikeln konnte dieser Rezeptor nachgewiesen werden. (Piccin et al.) Der GPIIb α Anteil dieses Komplexes bindet an die A1 Domäne des VWF. Der GPIIb-V-IX Rezeptorkomplex tritt aber nicht mit dem plasmatischen VWF in Interaktion. (Ruggeri 1991; Ruggeri 1995). Nach vorherrschender Meinung muss zunächst eine Konformationsänderung bzw. Streckung oder Aktivierung des im Plasma in „geknäuelter“ Form vorliegenden VWF durch Scherkräfte oder Immobilisation an Oberflächen stattfinden, bevor eine ausreichende Bindung an GPIIb α erfolgt. Diese Bindung stellt den ersten Schritt der Adhäsion von Thrombozyten im Rahmen der primären Hämostase dar.

1.3.1.2. Der Thrombozytenrezeptor Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

Neben der Interaktion mit GPIb ist VWF auch in der Lage an das aktivierte Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ zu binden. (Ruggeri 1993; Ruggeri 1995) Der Rezeptor kommt in einer Anzahl von etwa 80000 Exemplaren pro Thrombozyt vor. Ebenso konnte dessen Existenz auf thrombozytären Mikropartikeln gezeigt werden. (George et al.)

Die Interaktion von noch zirkulierenden mit schon adhärennten Thrombozyten erfolgt initial ebenfalls über GPIb-VWF-Interaktion, gefolgt von Bindung aktivierter Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Rezeptoren auf benachbarten Plättchen mit Fibrinogen als Brückenglied. Für das Spreading der Thrombozyten ist ebenfalls Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ erforderlich. Der Rezeptor kann an Fibrinogen, Fibronectin und eine Arg-Gly-Asp Sequenz des VWF binden. (Savage et al. 1998; Plow et al.) Proteine wie Fibrinogen oder VWF können allerdings erst nach aktivierungsabhängiger Konformationsänderung des Rezeptors gebunden werden. (Gawaz et al.)

Das Fehlen oder eine mangelnde Funktion des Rezeptors werden als Glanzmannsche Thrombasthenie bezeichnet. Dabei ist nicht nur das Spreading gestört, sondern auch das Wachstum eines Thrombus. Letzteres liegt daran, dass durch Fehlen des Rezeptors die physiologische Brückenbildung mit Fibrinogen oder VWF zwischen den aggregierenden aktivierten Thrombozyten unterbleibt. Ohne diese Bindung kann somit keine stabile Verbindung zwischen benachbarten Thrombozyten hergestellt werden und somit keine für einen Wundverschluss ausreichende Aggregatbildung erfolgen. Deshalb geht die Erkrankung mit einer erhöhten, zum Teil schwerwiegenden Blutungsneigung einher. (Nurden und Nurden)

Eine wesentliche Beteiligung des Rezeptors an bestimmten Vorgängen kann ausgeschlossen werden, wenn der untersuchte Prozess nach der Zugabe des Chelators EDTA (5 mM) zum entnommenen Blut weiterhin unverändert fortbestehen kann, da EDTA ein Chelator ist, der divalente Kationen (z.B. Ca^{2+}) binden kann. Die folglich geringen, extrazellulären Konzentrationen von freien divalenten Kationen sind nicht vereinbar mit einer regelrechten Integrinfunktion, da ein Einstrom von Kalziumionen in die Zelle für die Signalkaskade und die Aktivierungsprozesse der Zelle essentiell ist. (Ginsberg et al.) Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ kann mit Anti CD 41 Antikörpern markiert werden.

1.3.1.3. Zusammenspiel von konstitutivem GPIb und aktivierbarem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

Aus den oben beschriebenen Ausführungen geht hervor, dass eine adäquate Thrombozytenreaktion auf eine Verletzung der Gefäßwand nur durch ein enges Zusammenwirken der beiden beteiligten Rezeptoren möglich ist. Das initiale Abbremsen der Thrombozyten unter Fluss mit hoher Scherrate erfolgt über die Bindung der A1-Domäne des VWF an den GPIb Rezeptor der Thrombozyten. Dies wiederum erlaubt das Haften von Thrombozyten auch bei sehr hohen Scherraten, unter welchen keine direkte Adhäsion von Thrombozyten an Fibrinogen mehr möglich ist. (Savage et al. 1996) Glykoprotein Iba ist zwar innerhalb der Bindung an VWF in der Lage hohen Scherraten standzuhalten, kann aber durch seine hohe Dissoziationsrate keine langfristig stabilen Bindungen eingehen. Die schnelle initiale Bindung kann allerdings Plättchen langsamer über Oberflächen translozieren lassen und somit die Bindung von Liganden mit langsamerer Kinetik, wie z.B. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, ermöglichen. Es muss also nach der ersten Adhäsion über GPIb mit VWF für eine stabile Abdichtung einer Gefäßläsion eine weitere Bindung von aktiviertem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ an seine Liganden erfolgen. Nur so kann es zum permanenten Anhaften und auch zu konsekutivem Spreading der Thrombozyten kommen. (Reininger und Spannagl)

1.3.2. Thrombozytäre Kollagenrezeptoren

Für die Bindung von Thrombozyten an Kollagen sind auf der Oberfläche von Thrombozyten ebenfalls spezielle Membranrezeptoren vorhanden. Die zwei entscheidenden Rezeptoren für die direkte Interaktion mit Blutplättchen sind das Glykoprotein VI und das Integrin $\alpha\text{2}\beta\text{1}$. Um deren Bindung an Kollagen im Blutfluss zu ermöglichen, muss, wie bei Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, eine vorangegangene Verlangsamung der Plättchen in der Blutströmung durch die Interaktion von GPIb mit VWF stattgefunden haben. (Chen und Lopez)

Thrombozyten können auch über VWF vermittelt an Kollagen binden. Mit der A3 Domäne bindet plasmatischer VWF spezifisch an Kollagenfibrillen. (Farndale) Nach Öffnung der VWF-A1-Domäne durch die Immobilisation und Streckung des VWF können anschließend Plättchen daran über ihren GPIb Rezeptor binden. Dieses Anlagern des

plasmatischen VWF an Kollagenfibrillen ist auch die Voraussetzung für einen Wundverschluss bei hohen Scherraten in der Blutströmung.

1.4. Translokation von Thrombozyten auf reaktiven Oberflächen

Ebenso wie Leukozyten konnten auch Thrombozyten dabei beobachtet werden, wie sie über Oberflächen rollen und zwar sowohl in vitro, (Savage et al. 1996; Yuan et al.) als auch über geschädigtes Endothel in vivo. (Kulkarni et al.) Dieses Rollen von Plättchen über die extrazelluläre Matrix, Endothel oder auch über die Oberfläche von bereits gebildeten Thromben wird ebenfalls von der A1-Domäne des VWF in Interaktion mit GPIIb α vermittelt.

Das Rollen der Zellen ist typischerweise keine gleichmäßige Fortbewegung, sondern nach einer kurzen Phase des Anhaltens folgt eine schnelle Translokation bis zur nächsten Interaktion der Liganden und somit zu einer erneuten kurzen Phase der Adhäsion. (Miura et al.) Man geht davon aus, dass durch das langsame Rollen erst eine Liganden-Rezeptor-Interaktion ermöglicht wird wenn diese eine langsame Kinetik aufweist. (Lawrence und Springer; Savage et al. 1996)

1.5. Mikropartikel

1.5.1. Definition und Charakterisierung

Mikropartikel sind kleine, etwa 0,1-0,9 μ m (Heijnen et al.) große, membranumschlossene Zellfragmente. Im Blut zirkulierende Mikropartikel können aus verschiedenen Zellen entstehen. So zum Beispiel aus Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten und Leukozyten. Den mit 70–90 % größten Anteil stellen dabei die Mikropartikel thrombozytären Ursprungs. (Horstman und Ahn; Joop et al.; Berckmans et al.)

1.5.2. Entstehungsmechanismen

Es wurden bereits mehrere Mechanismen beschrieben durch die Mikropartikel thrombozytären Ursprungs entstehen können. Zumeist läuft dies im Rahmen der Plättchenaktivierung ab. Dafür wurden in ex vivo Versuchen verschiedene Agonisten, so z.B. Calciumionophor A23187, ADP mit Kollagen und Thrombin verwendet. (Sims et al. 1989) Ebenfalls wurden mittlerweile direkt von Megakaryozyten gebildete Mikropartikel per Videomikroskopie nachgewiesen. (Flaumenhaft et al.)

Es konnten aber auch Mikropartikel in vitro generiert werden bei deren Entstehung die Thrombozyten nicht aktiviert wurden. Dies gelang durch Experimente, in denen Scherkräfte auf die Blutplättchen einwirken. (Holme et al. 1997; Miyazaki et al.) Teilweise wurden dafür Kegel-Platte-Viskosimeter verwendet, in denen Scherkräfte durch Rotation zweier glatter Flächen gegeneinander erzeugt werden. (Miyazaki et al.; Sakariassen et al.) Solche Experimente erlaubten allerdings bisher keine direkte Beobachtung darüber, wie Mikropartikel gebildet werden und welche Strukturen an ihrer Entstehung beteiligt sind.

In der vorliegenden Dissertation werden Versuche vorgestellt, in denen ebenfalls thrombozytäre Mikropartikel durch den Einfluss von Scherkräften unter direkter Visualisierung in Echtzeit generiert wurden. Es wird der Nachweis erbracht, dass ein biophysikalischer, schergesteuerter Mechanismus mit alleiniger Interaktion von VWF mit GPIb zur Entstehung von Mikropartikeln führen kann.

1.5.3. Mikropartikel und Hämostase

Bereits in den 1950er Jahren gab es Hinweise, dass in plättchenarmem Plasma eine prokoagulatorische Wirkung existiert. Demnach ging man davon aus, dass diese nicht an zelluläre Bestandteile des Blutes gebunden ist. (O'Brien) 1967 gelang es Wolf diesen subzellulären Bestandteil erstmals näher zu beschreiben. Er konnte durch Ultrazentrifugationsschritte zeigen, dass in Plasma, in Serum und in deren Fraktionen prokoagulatorische kleine Teilchen vorhanden sind. Ebenfalls konnte er feststellen, dass sie thrombozytären Ursprungs, dennoch aber klar von intakten Plättchen zu unterscheiden waren. Er bezeichnete seinen Fund als thrombozytären Staub. (Wolf)

Für die prokoagulatorische Wirkung von Mikropartikeln gibt es zahlreiche Hinweise. (Wolf; O'Brien; Blajchman; Jy et al. 1992; Piccin et al.) Ist nur eine unzureichende

Mikropartikelbildung möglich, dann kann eine ungenügende Blutstillung und somit eine hämorrhagische Diathese die Folge sein. (Weiss et al.; Zwaal et al.) Auch wegen ihrer Fähigkeit Gerinnungsfaktoren (Gilbert et al.) zu binden und Phosphatidylserin, (Haga et al.; van der Zee et al.) Adhäsionsrezeptoren (Heijnen et al.) und möglicherweise Tissue Factor (Biró et al. 2003; Scholz et al.; Müller I. et al.) zu exprimieren, wird angenommen, dass sie bei der Blutgerinnung und der Thrombusbildung eine Rolle spielen. Auf Mikropartikeln konnten jedoch sowohl pro- als auch antikoagulatorisch wirkende Proteine nachgewiesen werden. (Tans et al.; Steppich et al.) Inwieweit Mikropartikel in die physiologische Hämostase eingreifen und inwieweit und auf welche Weise sie bei pathologischen Prozessen, insbesondere der Thrombusbildung, eine Rolle spielen, bleibt zu klären.

1.5.4. Thrombozytäre Mikropartikel im Rahmen verschiedener Erkrankungen

Bei zahlreichen Krankheiten wurde bereits eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Anzahl von thrombozytären Mikropartikeln im Blut nachgewiesen. Eine geringe Anzahl zirkulierender thrombozytärer Mikropartikel ist auch im Plasma gesunder Probanden enthalten. (Brogan et al.)

Mikropartikel finden sich nicht nur bei inflammatorischen Gefäßerkrankungen in erhöhter Konzentration. (Lee et al.) Auch bei Patienten mit Sichelzellanämie, (Tomer et al.) systemischem Lupus Erythematoses (Pereira et al.), Thalassämie (Pattanapanyasat et al.), Vorhofflimmern (Choudhury et al.) sowie nach Myokardinfarkt (Morel et al.) konnte dies gezeigt werden. Im Rahmen einer Malariainfektion mit zerebraler Beteiligung (Combes et al.), bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und Urämie (Ando et al.), sowie bei schwangeren Patientinnen mit Präeklampsie (Meziani et al.) konnten erhöhte Mikropartikelkonzentrationen im Plasma nachgewiesen werden. Es ist jedoch bisher nicht klar, auf welchem Weg die Mikropartikel in diesen pathologischen Situationen entstehen.

In etlichen Studien fanden sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Thromboseneigung und erhöhten Mikropartikelzahlen. (Pereira et al.; Tomer et al.; Morel et al.; Ando et al.) Krankheitszustände, die zu einer Plättchenaktivierung führen, können ebenfalls mit einer erhöhten Anzahl zirkulierender Mikropartikel einhergehen. (Holme et al. 1994) Dazu gehört beispielsweise eine instabile Angina Pectoris. (Singh et al.) Bei Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie „ [...] werden [die in

erhöhter Anzahl zirkulierender thrombozytärer Mikropartikel] als einer der Hauptgründe für das erhöhte Thromboserisiko dieser Patienten angesehen.“ (Nieuwland und Sturk)

„Im Rahmen vieler Erkrankungsbilder findet sich eine erhöhte Anzahl thrombozytärer Mikropartikel, deren Vorkommen mit einer erhöhten Rate thromboembolischer Komplikationen einhergeht. In Anbetracht der Fähigkeiten thrombozytärer Mikropartikel prokoagulatorisch zu wirken, Zellen zu aktivieren und höchstwahrscheinlich auch Entzündungen aufrechtzuerhalten, kann die Intervention bei exzessiver Mikropartikelausschüttung einen therapeutischen [oder präventiven] Angriffspunkt darstellen.“ (Nieuwland und Sturk)

Ein Krankheitsbild, das mit erniedrigten Zahlen thrombozytärer Mikropartikel einhergeht, ist das 1979 erstbeschriebene Scott Syndrom. (Sims et al. 1989) Bei dieser seltenen, autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung, kann ein bei der Mikropartikelbildung entscheidendes lipidtransportierendes Enzym, die Lipid-Scramblase, nicht gebildet werden, was wiederum zu einer geringeren Mikropartikelbildung und dadurch zu einer verminderten Aktivierung von Faktor X und Prothrombin führt. So kommt es zu einer ausgeprägten Blutungsneigung. Die verminderte Aktivierung von Faktor X und Prothrombin begründet sich auf der geringeren Expressierung von Phosphatidylserinen. (Weiss et al.; Zwaal et al.)

Ein klinisch ähnliches Krankheitsbild, der Castaman Defekt, geht mit einer normalen Verteilung von Phosphatidylserin, aber ebenfalls mit einer deutlich reduzierten Fähigkeit der Mikropartikelbildung einher. (Castaman et al.)

1.5.5. Membranproteine und Membranlipide auf Mikropartikeln

Sowohl endotheliale, als auch thrombozytäre Mikropartikel enthalten bioaktive Lipide. (Iwamoto et al.; Leeuwenberg et al.) Diese können mit Hilfe von Mikropartikeln als Vektoren zwischen verschiedenen Zellen ausgetauscht werden. So ist es möglich, dass durch Integration bioaktiver Lipide in die Membran der empfangenden Zelle deren Membranfunktionen beeinflusst werden. (Barry et al. 1997) Die Membranen der Mikropartikel setzen sich unter anderem aus folgenden Bestandteilen zusammen: Phosphatidylcholin und Sphingomyelin auf dem nach außen gerichteten Membranblatt und Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin auf dem nach innen gerichteten Membranblatt. Verschiedene Enzyme beeinflussen und erhalten das bestehende Gleichgewicht der Lipidverteilung der Zellmembranen. Dazu gehören Gelsolin,

Aminophospholipid-Translokase, Floppase, Scramblase und Calpain. Diese Enzyme spielen bei der Mikropartikelentstehung durch Thrombozytenaktivierung eine wichtige Rolle. (Rosing et al.; Diaz und Schroit) Die asymmetrische Verteilung der Membranlipide wird bei einer Aktivierung der Thrombozyten nicht mehr aufrecht erhalten. So werden dann Phospholipide an der Membranoberfläche exprimiert, was wiederum zu einer Prothrombinaktivierung führt. (Farndale) Zudem kann ein sogenannter Membran Flip-Flop, also der aktive Austausch der Bestandteile zwischen den nach innen und den nach außen gerichteten Membrananteilen, vollzogen werden. (Piccin et al.) Eine Studie, die die Membranzusammensetzung der Lipide von Mikropartikeln mit denen von Thrombozyten verglich, fand heraus, dass die Mikropartikelmembran eine Zusammensetzung der thrombozytären Plasma- sowie Granulamembranen darstellt. Geringe, aber signifikante Unterschiede in der Lipidzusammensetzung zeigten sich je nachdem mit welchem Agonisten (Thrombin, Kollagen, Thrombin und Kollagen oder Calciumionophor A23187) die Mikropartikel generiert wurden. Eine leichte Tendenz zu einem höheren Cholesteringehalt der Mikropartikelmembran im Vergleich zur Thrombozytenmembran könnte auf eine höhere Dichte von Lipid Rafts hindeuten. (Biró et al. 2005)

Ebenfalls enthalten Mikropartikel Proteine, die eine biologische Aktivität besitzen. (Nomura et al. 1994) So konnten die thrombozytären Membranrezeptoren Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ und GPIb auf Mikropartikeln nachgewiesen werden, ebenso wie P-Selektin und TF. (Abrams et al., Macey et al.)

1.6. Die extrazelluläre Matrix, insbesondere Kollagen

Die unter der Endothelzellschicht liegende extrazelluläre Matrix besteht im Wesentlichen aus Kollagen und elastischen Fibrillen, die in eine aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Wasser bestehende Substanz eingebettet sind. Sie gewährleistet die Stabilität der Blutgefäße. Der wichtigste stabilisierende Bestandteil ist Kollagen vom Typ I und Typ III. Kollagen als Hauptkomponente der im Subendothel enthaltenen Strukturen ist in der Lage freie VWF-Multimere zu binden. (Savage et al. 1999; Pareti et al.) Über diesen Mechanismus ist auch die von uns neu entdeckte Tetherbildung an Kollagenfibrillen zu erklären.

Thrombozyten besitzen auch spezifische Kollagenrezeptoren wie das Glykoprotein VI sowie das Integrin $\alpha\text{2}\beta\text{1}$, die nach Bindung an Kollagenfibrillen eine Aktivierung der Thrombozyten bewirken. (Farndale)

1.7. Beeinflussung der Interaktion von Thrombozyten mit von Willebrand Faktor durch Scherkräfte

Von Willebrand Faktor (VWF) ist ein multimeres Glykoprotein das sowohl in plasmatischer als auch in subendothelial gebundener Form vorkommt. In unseren Versuchen diente es als reaktive Oberflächenbeschichtung, die mit den unter Vollblutströmung vorbeifließenden Thrombozyten über deren GPIIb-Rezeptoren interagiert. Bei hohen Scherraten und Kollagenbeschichtung reicht die Bindungsstärke von GPIIb und Integrin $\alpha 2\beta 1$ nicht zur Abbremsung schnell bewegter Thrombozyten aus. Diese Rolle übernimmt der plasmatische VWF, der zunächst an Kollagen bindet und in der Folge den Adhäsionsvermittler für die Thrombozyten darstellt (s.u.).

VWF wird in Megakaryozyten und Endothelzellen synthetisiert und in den endothelialen Weibel-Palade-Körperchen oder den thrombozytären α -Granula gespeichert. Außerdem kommt VWF im Plasma und in der subendothelialen Matrix an Kollagen Typ VI (Reininger und Spannagl) gebunden vor. Sämtlicher in den α -Granula der Thrombozyten gespeicherter VWF wurde in den Megakaryozyten synthetisiert und wird nicht, wie es bei vielen anderen Proteinen üblich ist, aus dem Plasma aufgenommen. Die α -Granula der Thrombozyten stellen ein isoliertes Kompartiment dar, deren gespeicherte Stoffe nur durch Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt werden können. (Fernandez et al.; Koutts et al.) Somit spielt dieser in den Thrombozyten gespeicherte VWF für den hier vorgestellten biophysikalischen, passiven Weg der Mikropartikelentstehung keine Rolle.

Als größtes Plasmaprotein liegt VWF in Größen zwischen 540 kDa (als Dimer) und 10000 kDa vor. (Ruggeri 1998) Vor allem die hochmolekularen VWF Moleküle, etwa ab 6000 kDa, spielen eine entscheidende Rolle in der Hämostase. (Ruggeri und Savage) Die deutliche Varianz beruht auf der unterschiedlichen Anzahl von Multimeren. Von diesen enthält jedes einzelne Bindungsstellen zur Interaktion mit Kollagen und Plättchen. Letztere können entweder mit den Rezeptoren GPIIb oder dem Integrin $\alpha 11\beta 3$ an VWF binden. Im Blut liegt VWF in Form von globulären Molekülknäueln vor, die aber durch Scherbelastung im Blutfluss und an der Wand der Blutgefäße fadenförmig ausgezogen werden und so eine Länge von bis zu 1300 nm erreichen können. (Fowler und Fretto; Siedlecki et al.) Auf diese Weise können weitere entscheidende Domänen, vor allem die A1 Domäne, für die Ligandenbindung freigelegt werden.

Sowohl unter physiologischen Bedingungen, als auch in vitro bindet VWF nach Beschädigung des Endothels sehr rasch an das in den freigelegten subendothelialen

Strukturen enthaltene Kollagen. (Weiss; Farndale et al.) Er ermöglicht die Verlangsamung von Thrombozyten aus der schnellen Blutströmung durch die Interaktion seiner A1 Domäne (VWFA1) mit dem thrombozytären Rezeptor Glykoprotein Iba. (Savage et al. 1996) Für die Bindung an Kollagen der Typen I und III ist die A3 Domäne des VWF verantwortlich. (Lankhof et al.) VWF ist zum einen selbst in der subendothelialen Matrix enthalten, zum anderen bindet plasmatischer VWF nach Endothelverletzungen an die freigelegten Kollagenfibrillen der Typen I und III. Neben der Interaktion mit GPIb ist VWF ebenfalls imstande Bindungen mit dem thrombozytären Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ einzugehen. Als verantwortliche Region für diese Bindung wurde eine Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD)-Sequenz innerhalb der C1 Domäne des VWF identifiziert. (Berliner et al.) So kann im Anschluss an die erste Adhäsion mittels GPIb und der Verlangsamung der Thrombozyten aus dem Blutstrom diese Verbindung zwischen der RGD-Sequenz des VWF und des thrombozytären Membranrezeptors Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ eingegangen werden.

Das in unseren Versuchen verwendete homodimere rekombinante Fragment des VWF (dVWFA1) beinhaltet einen Teil der D3 Domäne, sowie die gesamte A1 Domäne, innerhalb der die Bindungsstelle an den Plättchenrezeptor GPIb lokalisiert ist. (Azuma et al.) Eine Interaktion mit dem Membranrezeptor Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ kommt somit aufgrund des Fehlens der C1 Domäne nicht vor.

1.8. Korrelation von Tissue Factor Vorkommen und Thrombogenität

Tissue Factor wird als wichtiges Regulationsprotein der Hämostase, aber auch der Thrombenbildung angesehen. (Nemerson; Rapaport und Rao; Fuster et al.) Er ist der auslösende Faktor des extrinsischen Gerinnungssystems. Dabei fungiert TF als Rezeptor für den Faktor VII und ist in der Lage Faktor IX und X zu aktivieren und deren enzymatische Aktivität mehr als tausendfach zu erhöhen. (Nemerson; Rapaport und Rao; Fuster et al.; Drake et al.) Für den Faktor VII der Gerinnungskaskade stellt er einen essentiellen Kofaktor dar, ohne den keine subsequente Aktivierung weiterer Faktoren stattfinden kann.

Gegenspieler zu TF ist Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI). Er wirkt auf zwei verschiedene Weisen antikoagulatorisch: zum einen durch Blockade von Faktor Xa, zum anderen durch Inhibierung der TF Aktivität durch Komplexbildung.

TF kann von fast allen in atherosklerotischen Läsionen vorhandenen Zellen, z.B. Endothelzellen und Makrophagen, produziert und exprimiert werden. Wenn normale Strö-

mungsbedingungen herrschen, wird TF nicht ins Blut abgegeben oder auf den Zelloberflächen zugänglich gemacht. Allerdings wird er z.B. im Rahmen von Gefäßläsionen exprimiert und löst in der Kombination mit aggregierenden Thrombozyten die Gerinnung - bis zur Fibrin- und Thrombusbildung - aus. (Reininger et al. 2010; Badimon et al.) Auch konnte bereits festgestellt werden, dass TF in hoher Konzentration in Läsionen des menschlichen Gefäßsystems vorkommt und dass es eine positive Korrelation zwischen der Thrombogenität und dem TF-Gehalt dieser Areale gibt. (Toschi et al.) Mittlerweile konnte TF auch in atherosklerotischen Plaques mittels immunhistochemischer Analysen nachgewiesen werden. (Wilcox et al.; Drake et al.; Annex et al.) Einigen Forschungsgruppen gelang der Nachweis von TF auf aktivierten Thrombozyten und thrombozytären Mikropartikeln. (Müller I. et al.; Scholz et al.) Welche Rolle dem dort lokalisierten TF im Gerinnungssystem zukommt ist bisher nicht ausreichend geklärt.

Die Bedeutung des extrinsischen Systems der Gerinnung für die Hämostase verdeutlicht die schwere Blutungssymptomatik von Patienten, die den sehr seltenen Mangel an Faktor VII aufweisen.

2. Zielsetzung

Unter arteriellen Strömungsbedingungen fließen Thrombozyten in großer Zahl in der Nähe der Endothelzellschicht, während Erythrozyten durch einen Prozess, der axiale Migration genannt wird, in der Mitte des Blutstromes fließen. (siehe auch Abb. 3) Nach Beschädigung des Endothels bindet VWF sehr rasch an die freigelegten subendothelialen Strukturen durch Interaktion seiner A1 Domäne (VWFA1) mit dem Thrombozytenrezeptor GPIb. Diese Bindung ermöglicht das Abstoppen von Thrombozyten aus schnellen Blutströmungen, sie hat jedoch eine kurze Halbwertszeit und kann selbst keine irreversible Bindung ermöglichen. So kommt es durch die wirkenden Kräfte im Blutstrom zur Translokation von Thrombozyten über immobilisierten VWF bis Rezeptoren wie GPVI oder Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ mit ihren jeweiligen Liganden interagieren. Diese können eine irreversible Bindung eingehen, sowie Spreading und Aggregation vermitteln.

Unter dem Einfluss von Scherkräften können Mikropartikel aus Thrombozyten durch einen Mechanismus im Blut entstehen, der von der GPIb-VWF Interaktion abhängt. Wegen ihrer Fähigkeit Gerinnungsfaktoren zu binden und Phosphatidylserin, sowie Adhäsionsrezeptoren und möglicherweise Tissue Factor zu exprimieren, wird angenommen, dass sie an Prozessen der Blutgerinnung und der Thrombusbildung beteiligt sind.

Bis jetzt gab es allerdings keinen Nachweis oder gar eine direkte Visualisierung der stattfindenden Prozesse oder eine Erklärung dafür, wie Mikropartikel und Tether aus Thrombozyten durch den Einfluss hoher Scherraten entstehen, und wie diese die Entstehung von Thromben beeinflussen können.

Hier stellen wir die Ergebnisse aus ex-vitro Flussexperimenten dar. Diese wurden mit Hilfe der Reflexions Interferenz Kontrast Mikroskopie (Curtis; Kloboucek et al.) direkt sichtbar gemacht und in Echtzeit per Video aufgezeichnet. Diese Aufnahmen zeigen in quantifizierbarer Weise die Mechanismen, die den Beginn der Interaktion zwischen GPIb α und immobilisiertem VWF charakterisieren, und darüber hinaus, wie diese Bindung die Mikropartikel- und Tetherbildung aus Thrombozyten durch den Einfluss der Scherkraft ermöglicht.

3. Material und Methodik

3.1. Probengewinnung

3.1.1. Entnahme der Blutproben

Die Entnahme venösen Blutes erfolgte an gesunden, freiwilligen Probanden, die mindestens 10 Tage zuvor keine die Blutgerinnung oder die Thrombozytenfunktion beeinflussenden Medikamente eingenommen hatten. Nach Punktion einer Cubitalvene wurde zum Ausschluss von Störfaktoren durch Aktivierung der Gerinnung oder Aktivierung der Thrombozyten die ersten zwei abgenommenen Milliliter jeder Blutentnahme nur für die Zellzählung verwendet. Das Blut wurde durch vorsichtiges, langsames Ziehen am Spritzenstempel entnommen, um eine Plättchenaktivierung und mechanische Zerschering der Erythrozyten und anderer Zellen zu vermeiden. Die Antikoagulanzen (siehe unten) waren zuvor bereits in die Entnahmespritze eingefüllt worden. Durch vorsichtiges Schwenken der Spritze nach vollendeter Abnahme wurde das Antikoagulans mit dem Blut vermischt. Anschließend wurde das Blut bei 37°C bis zum Beginn der Durchführung jedes Versuches aufbewahrt.

Alle an der Studie teilnehmenden Personen hatten nach ausführlicher Aufklärung schriftlich in die Studienbedingungen eingewilligt. Sämtliche Experimente, die menschliche Proben enthalten, wurden gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die entsprechenden Versuchsprotokolle wurden von den zuständigen Komitees gesichtet und genehmigt.

3.1.2. Verwendete Antikoagulanzen

Als Antikoagulanzen wurden entweder Natriumcitrat oder 1,6 mg/ml EDTA oder der Thrombininhibitor D-Phenylalanyl-L-Propyl-L-Arginin Chlormethyl Keton Dichlorid (PPACK; 93 µM; Hematological Technologies, Essex Junction, VT, USA), verwendet. Bezüglich der Entstehung von Mikropartikeln und Tethern ergaben alle drei verwendeten Antikoagulanzen in unseren Experimenten die gleichen Resultate. (Die Ergebnisse diesbezüglich werden hier nicht vorgestellt)

Für bestimmte Experimente wurden zusätzlich zu PPACK noch Prostaglandin E₁

(PGE₁, 10 µM; Sigma, St. Louis, MO, USA), EDTA (5 mM) und Apyrase (ATPase, 1,5 U/ml; Sigma, St. Louis, MO, USA) in die Spritze vorgefüllt, um bei der Blutentnahme und im Verlauf des Flussexperimentes eine Aktivierung der Thrombozyten auszuschließen.

3.1.3. Probenweiterverarbeitung

Für einige Experimente war es notwendig, die vorhandenen Plasmaproteine (z.B. VWF) zu entfernen. Deshalb wurde das Blut einer so genannten „Waschprozedur“ in vier Zentrifugationsschritten unterzogen. Nach Zentrifugation des Blutes mit 1550g wurde das Plasma vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, ohne dabei zu Nahe an die zwischen Plasma und Erythrozytenschicht gelegene Leukozytenmanschette zu gelangen. Dies hätte zur Folge, dass die sedimentierten Zellen durch den Sog nach oben gezogen und ebenfalls abpipettiert würden. Im Anschluss wurde exakt die entnommene Menge Plasma durch Tyrode-Puffer (pH-Wert 6,5) ersetzt und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Zu diesem Puffer wurde im ersten und zweiten Waschschrift jeweils 5 U/ml Apyrase zugefügt, im dritten Waschschrift nur noch 1,25 U/ml, um eine Aktivierung der Thrombozyten während des Waschvorgangs zu verhindern. Nach dem vierten und letzten Zentrifugationsschritt wurde das entnommene Plasma durch Tyrode-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 ohne Zugabe von Apyrase ersetzt. Diese Reduktion der Apyrasekonzentrationen wurde durchgeführt um die Möglichkeit einer adäquaten Plättchenaktivierung während der Experimente zu gewährleisten. Aus selbigem Grund musste im letzten Schritt Calciumchlorid in einer Endkonzentration von 1 mM beigegeben werden. Um die Viskosität des gewaschenen Blutes in einem physiologischen Bereich zu halten wurde zusätzlich bovines Albumin (Bovine Serum Albumin, BSA) in einer Konzentration von 6,5 mg/ml zugefügt.

In dem organischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöstes Cytochalasin D (4 µM Endkonzentration; Sigma, St. Louis, MO, USA) wurde bei Versuchsreihen zur Untersuchung des Aktinskeletts zu bereits antikoaguliertem Blut jeweils 10 Minuten vor Durchführung jedes Experiments zugefügt.

3.2. Flussexperimente

3.2.1. Versuchsaufbau

Die in den Strahlengang des Mikroskops eingebrachte Kammer ist folgendermaßen aufgebaut: sie besteht aus einer Grundfläche aus Plexiglas, in der sich zwei Bohrungen für Zu- und Abfluss befinden. Eine Silikonauflage von 127 µm Dicke mit einem zentralen Ausschnitt in der Form des späteren Flusskanals wird über den Ein- und Ausflussöffnungen positioniert. Anschließend wird ein mit VWF oder mit Kollagen beschichtetes Deckglas als thrombogene Oberfläche auf die Silikonauflage gelegt und über eine Metallfassung mit dem Gegenstück aus Plexiglas verschraubt, so dass sich ein geschlossenes System ergibt. Die an den Querseiten der Kammer befindlichen Öffnungen für Zu- und Ablauf werden mit Schlauchverbindern angeschlossen. Der Zulaufschlauch wird zunächst mit Puffer gefüllt, wobei unbedingt auf eine luftblasenfreie Füllung zu achten ist. Dies beruht auf der Beobachtung, dass über die beschichtete Oberfläche bewegte Luftblasen diese beschädigen oder gar ablösen können. Anschließend wird der gefüllte Schlauch abgeklemmt und direkt in das vorbereitete Blut eingetaucht. Der Ablaufschlauch wird ebenfalls für die Versuche mit Puffer gefüllt, um eine gleichmäßige Ansaugfunktion der Pumpe und somit eine gleichmäßige Fließgeschwindigkeit des Blutes über die thrombogene Oberfläche zu ermöglichen. Dies führt zu einer weiteren Artefaktminimierung. Das eine Ende des mit Puffer gefüllten Schlauches wird direkt in die entsprechende Öffnung in der Strömungskammer eingebracht, das andere Ende wird mit einer 50 ml Perfusorspritze verbunden. Das Blut wird über eine Pumpe (Harvard Apparatus, Boston, MA, USA) aus einem Reservoir durch das Schlauch-Kammersystem gesaugt. Bis unmittelbar vor dem Start jedes Versuches bleibt auch der Ablaufschlauch abgeklemmt, um ein unkontrolliertes Fließen des Puffers in den Schläuchen zu vermeiden. Die Flussexperimente finden in einer beheizten Plexiglaskammer bei 37 °C statt.

Abbildung 1

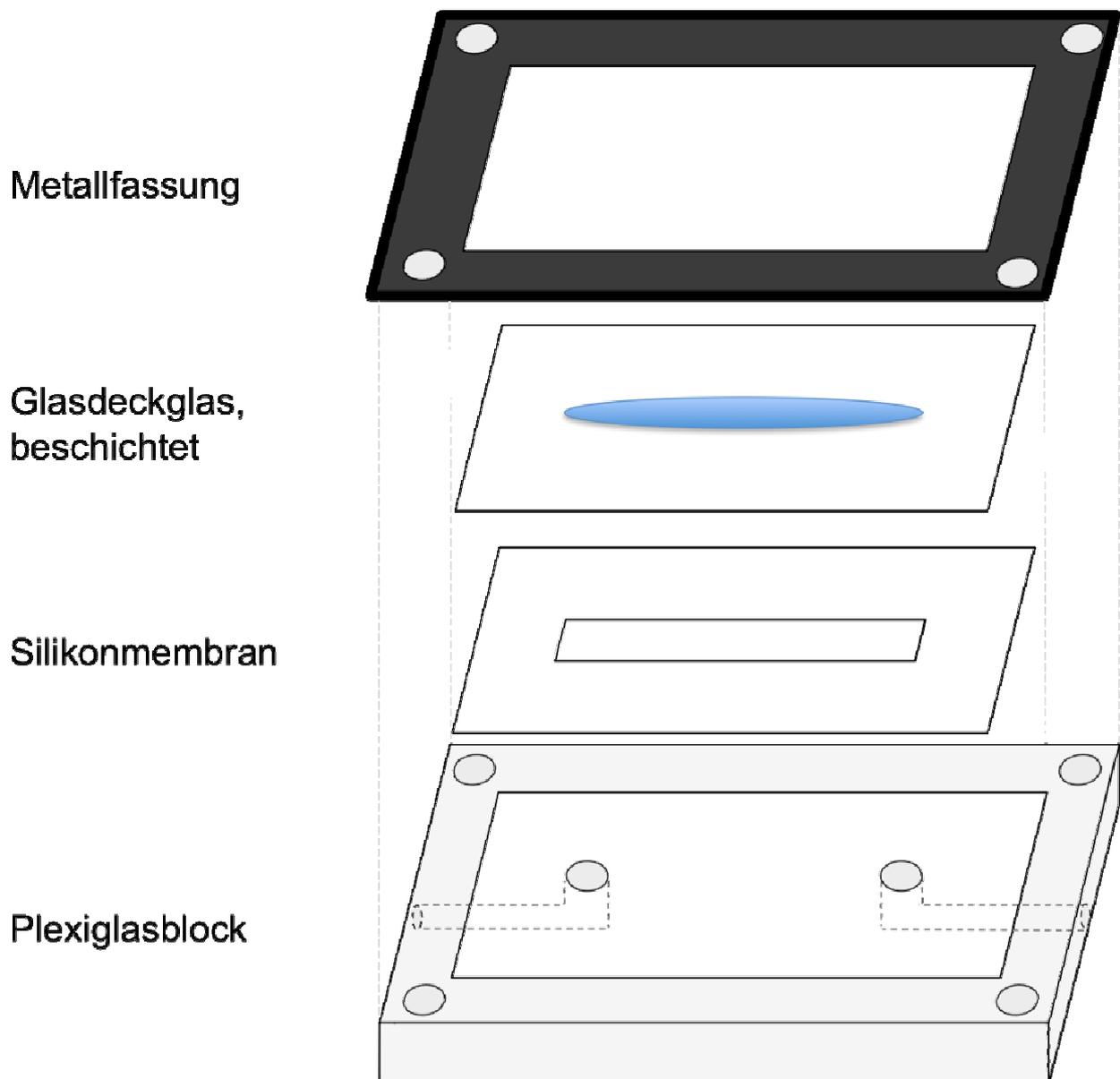


Abbildung 1 zeigt eine Darstellung der Flusskammer. Der Plexiglasblock mit den seitlichen Bohrungen für Zu- und Ablaufschlauch bildet die Basis. Darauf wird die 127 µm dicke Silikonmembran gelegt, die später die Seitenwände des Flusskanals bildet. Auf diese wiederum wird das Glasdeckglas mit der thrombogenen Oberfläche aufgebracht und mit der Metallfassung verschraubt.

3.2.2. Beschichtung der Glasoberflächen

Jedes der verwendeten Deckgläser (Corning Labware & Equipment Cover Glass, No. 1 ½ 24 x 50 mm) wurde zuerst mit einem feuchten, fusselreien Kimwipe-Papiertuch von Hand gereinigt, um sämtliche Staubpartikel zu entfernen. Für die Beschichtungen wurden verschiedene thrombogene Substanzen verwendet:

- rekombinanter multimerer VWF (Wildtyp);
- rekombinante, dimere A1 Domäne des VWF.

Mittels *Drosophila Melanogaster* Zellen wurde dieser spezielle Anteil des VWF in einem Kulturmedium hergestellt. Die beiden Ketten dieses homodimeren Teilstücks sind wie bei multimerem VWF ebenfalls durch Disulfidbrücken miteinander verbunden, wodurch sich die Bindungsfähigkeit deutlich erhöht. (Azuma et al.)

Beide Varianten des VWF wurden vor den Versuchen in Puffer gelöst. Jeweils 75 µl einer 20 µg/ml konzentrierten d-A1 Lösung wurden auf ein Deckglas, in den Bereich des späteren Flusskanals, aufgebracht und anschließend in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde inkubiert. Dadurch kam es zu einer Adsorption des Proteins an die Glasoberfläche. Nicht gebundenes Protein wurde unmittelbar vor dem Flussversuch mit Pufferlösung abgespült. Die Beschichtung mit multimerem VWF erfolgte auf die gleiche Art und Weise.

Mit Hilfe von radioaktiv markierten monoklonalen anti-VWFA1-Fab-Molekülen (NMC-4) wurde die Oberflächendichte des am Glas adsorbierten dVWFA1 bestimmt. Bei einer Konzentration der VWF-Lösung von 10 oder 20 µg/ml ergab sich eine Beschichtung auf dem Deckglas von 60 bis 85% der Ausgangskonzentration. Diese Ergebnisse stammen aus zwei unterschiedlichen Versuchsreihen, die an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt wurden. Im Sättigungszustand konnten pro 0,05 µm² Fläche 125 gebundene NMC-4 Fab-Moleküle gemessen werden (Durchschnitt aus drei Versuchsreihen). Die Analyse von 80000-fach vergrößerten transmissionselektronenmikroskopischen Bildern ergab 0,05 µm² als kleinste Flächenausdehnung eines DAP. Wenn man von einer homogenen Verteilung der 25000 GPIIb Rezeptoren auf der thrombozytären Membranoberfläche (im Durchschnitt ca. 8 µm²) ausgeht, so ergibt sich eine Anzahl von etwa 150 Rezeptoren pro 0,05 µm². Somit entspricht die Rezeptordichte dieser Fläche sehr genau der Oberflächendichte der VWF-Beschichtung.

Für Kollagenbeschichtungen wurden 150 µl einer Kollagenlösung aus fibrillärem Kollagen Typ I aufgetragen (aus Rindersehne, säurelöslich; Sigma, St. Louis, MO, USA;

oder aus Pferdesehne, Horm-Chemie; Nycomed, München, Deutschland). Unter mikroskopischer Sichtkontrolle wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Kollagenfibrillen nicht zu dicht aneinander lagen, um eine adäquate Interaktion der Thrombozyten mit den Kollagenfibrillen zu ermöglichen. Die Adsorption in einer feuchten Kammer erfolgte ebenfalls für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur.

3.2.3. Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM)

RICM ist eine Methode, die ohne Färbung den Membrankontakt adhätierender Zellen an Glasoberflächen quantitativ darzustellen vermag. Das Prinzip beruht auf der Reflexion des Lichtstrahls an der Grenzfläche von Glas und der daran haftenden Zellmembran. Durch die geringe Phasenverschiebung bei der Lichtbrechung kommt es zu Interferenzen, die zur Kontrastverstärkung genutzt werden und außerdem ein direktes Maß für den Abstand der Membran von der Glasoberfläche darstellen (siehe Abb. 2). (Kloboucek et al.) Diese werden durch die Technik der RICM in verschiedene Amplituden oder Intensitätsunterschiede umgesetzt, die dann das topographische Profil der beobachteten Zelle darstellen.

Wie in der gezeigten Abbildung zu sehen ist, kommt es durch das verwendete Immersionsöl zu einer optischen Kopplung des Deckglases mit dem Objektiv, da die Brechungsindizes angeglichen werden. So kommt es zu keiner weiteren Beugung der Lichtstrahlen. (Parthasarathy und Groves)

Abbildung 2

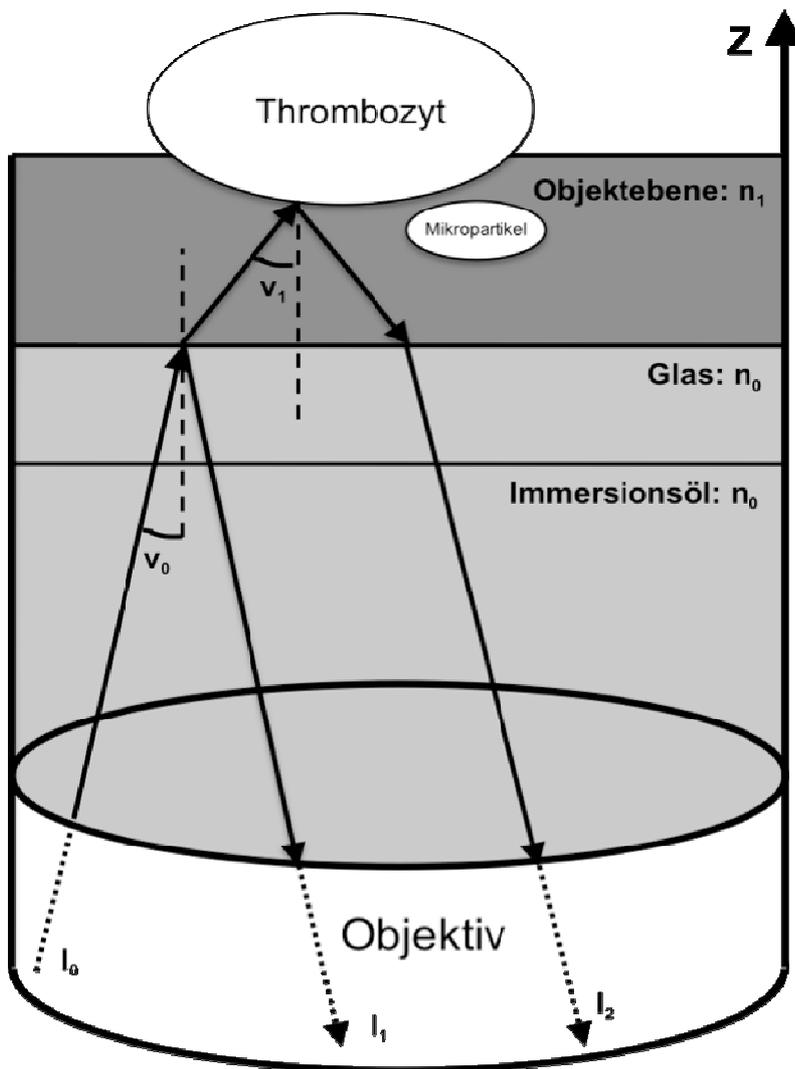


Abbildung 2 stellt das Prinzip der Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie dar. Es zeigt, wie der Lichtstrahl an der Glasoberfläche und an der Plättchenmembran reflektiert wird. Das einfallende monochromatische Licht wird mit I_0 angegeben. Die Angaben I_{1-3} beziehen sich auf die unterschiedlich abgelenkten ausfallenden Lichtstrahlen. V_{0-2} bezeichnen jeweils den Winkel des einfallenden Lichts. Die verschiedenen optischen Schichten werden mit n_{0-2} nummeriert. Modifiziert nach (Wiegand et al.)

Diese Technik erfordert keinerlei Anfärbung der Zellen. Sie stellt die Kontaktfläche zwischen der Zellmembran und der beschichteten Glasoberfläche dar, indem sie den Abstand der beiden mit Interferenzfarben abbildet. In unseren Experimenten interferierten die von der Glasoberfläche und der Plättchenoberfläche reflektierten Lichtstrahlen miteinander. (Curtis; Kloboucek et al.) Da die Experimente mit einer schwarz/weiß Videokamera aufgezeichnet wurden, werden die Abstände zwischen Glasoberfläche und Plättchen oder Mikropartikeln in Graustufen dargestellt. Dabei werden mit schwarz nullter Ordnung Membranabstände von 4 bis 12 nm dargestellt. Weiß erscheinen Membranabstände zur Oberfläche von 20-30 nm. Teilchen mit mehr als 30 nm Abstand

von der Glasoberfläche werden nicht mehr abgebildet. (Kloboucek et al.)

Die RICM-Technik erlaubt die Unterscheidung zwischen zwei verschiedenen Arten der Adhäsion:

- zum einen fokale Adhäsionen, „focal contacts“, die an bestimmten Stellen den kleinsten Abstand zwischen Zelle und Oberfläche darstellen und mit schwarzer nullter Ordnung abgebildet werden; diese bilden die fest adhärierenden Bereiche einer Zelle;
- zum anderen die in verschiedenen Graustufen dargestellten nahen Kontakte, „close contacts“, in Form größerer, flexiblerer und etwas weiter von der Oberfläche entfernter Membranbereiche. (Izzard und Lochner 1976; Izzard und Lochner 1980)

Von den zwei verschiedenen Kontaktarten wurde an den fokalen Adhäsionen weit mehr geforscht, (Burridge et al.) da man davon ausgeht, dass in diesen Bereichen die entscheidenden Vorgänge der Zellinteraktionen stattfinden. Beide Adhäsionsbereiche der Membran können dynamisch ineinander übergehen.

3.2.4. Aufbau des Mikroskops

Die Beleuchtung erfolgte mit einer 50 W Quecksilberlampe und gekreuzten Polarisationsfiltern zur Erzeugung von Reflexions-Interferenz-Kontrasten. Eine $\lambda/4$ Platte im Objektiv reduzierte zusätzlich das Streulicht. Als Objektiv wurde ein Plan-Neofluar 63x/1,25 Öl-Immersion Ph3 Antiflex Objektiv (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. Die Bodenplatte der Flusskammer diente bei den Experimenten als Objektträger. Es wurde entweder ein inverses Mikroskop (Axiovert BSM; Carl Zeiss, Jena, Deutschland), oder eines mit Epiillumination (Axioskop 2 Plus; Carl Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. Die Bilddarstellung erfolgte mit einer schwarz-weiß CCD Kamera (Pulnix, JAI Inc., San Jose, CA, USA) über einen Monitor bei gleichzeitiger Beobachtungsmöglichkeit mit dem Binokular aufgrund eines geteilten Strahlenganges.

3.2.5. Datenaquisition

Die Videoaufnahmen in Echtzeit wurden mittels CCD Kamera und Videorekorder (DXC-390 bzw. SVO-9500MD Sony, Ichinomiya, Japan) auf S-VHS Videokassetten aufgezeichnet, kontinuierlich nummeriert und systematisch geordnet. Die Auswertung der Bilder wurde mit dem Bildanalyse Programm Metamorph (Universal Imaging, West

Chester, PA, USA) durchgeführt. (Savage et al. 1996)

3.2.6. Prinzip des Flussexperiments

In den Blutströmungen im Gefäßsystem oder in vitro wirken immer hydrodynamische Kräfte auf die sich fortbewegenden Zellen ein. Dabei seien insbesondere Scherkräfte genannt, die durch unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten benachbarter Flüssigkeitsschichten entstehen. Besonders hoch sind die Wandscherkräfte, d.h. die Scherkräfte in der Nähe der Endothelzellschicht, am geringsten dagegen die in der Mitte des Blutstroms. Wandscherraten können mathematisch als lineare Funktion folgender Parameter definiert werden (Nichols und O'Rourke)

$$\text{Scherspannung} = \mu(du/dx)$$

du stellt die Geschwindigkeitsdifferenz zweier benachbarter Strömungsschichten in axialer Richtung dar

dx bezeichnet die Dicke einer einzelnen Strömungsschicht

μ gibt die Viskosität der strömenden Flüssigkeit wieder

Eine graphische Darstellung (Abb. 3) zeigt die unterschiedlich schnell fließenden Flüssigkeitsschichten und die damit verbundenen unterschiedlichen Scherraten innerhalb eines arteriellen Gefäßes:

Abbildung 3

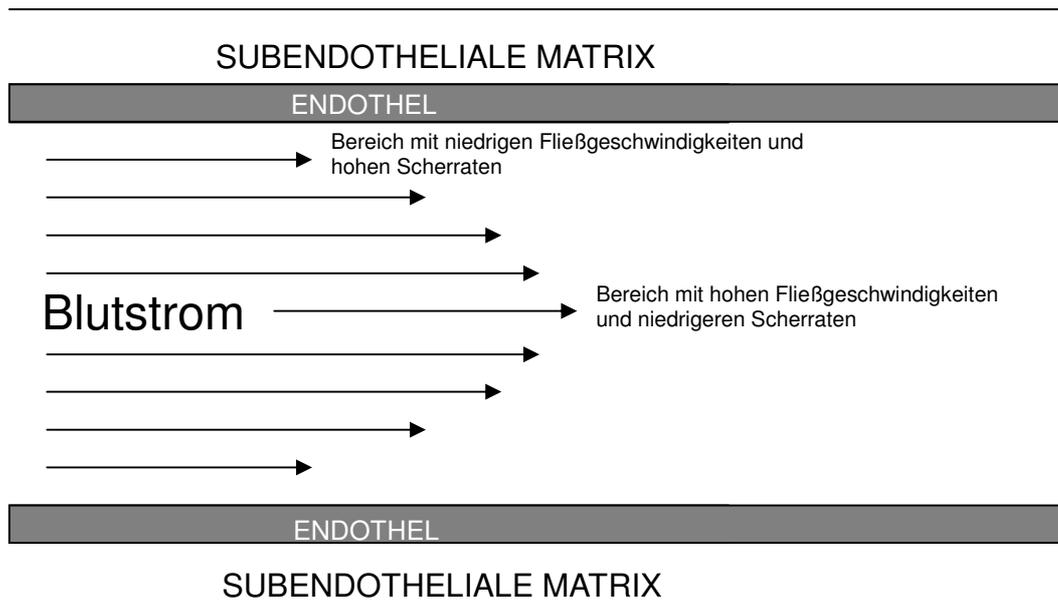


Abbildung 3

Schematische Abbildung des Blutstroms innerhalb eines arteriellen Gefäßes unter Miteinbeziehung der Scherraten. Modifiziert nach (Gordon und Lowe)

Wandscherraten spielen besonders in Gefäßen mit hohen Fließgeschwindigkeiten und kleinem Gefäßdurchmesser eine wichtige Rolle. Darunter fallen insbesondere Arteriolen oder stenosierte Gefäße. So kann z.B. die 90% Okklusion einer Koronararterie Scherraten von $20000\text{-}40000\text{ s}^{-1}$ zur Folge haben. (Mailhac et al.; Siegel et al.; Bluestein et al.) Dies wäre das 100-fache der in nicht stenosierten Koronararterien vorkommenden Werte. (Strony et al.) Neuere Arbeiten beschreiben sogar maximale Scherraten im Bereich von $425000\text{ bis }610000\text{ s}^{-1}$. (Bark und Ku) Durch den hydrodynamischen Mechanismus der Axial-Migration konzentrieren sich die Erythrozyten als Zellmasse in der axialen Gefäßmitte, während an der Gefäßwand ein erythrozytenfreier Plasmasaum zurückbleibt. In diesem sind Thrombozyten und Leukozyten angereichert und die Thrombozyten fließen in hoher Konzentration in einem nur Mikrometer schmalen Plasmasaum in unmittelbarer Endothelnähe. (Goldsmith und Mason; Goldsmith et al.) Somit befinden sich die Thrombozyten, rein strömungsbedingt, bereits in unmittelbarer Nähe von reaktiven Oberflächen, die durch Gefäßwandverletzungen entstehen können. Auch die Interaktion

der Thrombozytenrezeptoren mit den an der Gefäßwand immobilisierten Liganden ist erst dadurch räumlich möglich.

3.2.7. Ablauf des Flussexperiments

Nach vollständigem Aufbau des KammerSystems und der sonstigen Komponenten insbesondere der Pumpen, der Kamera sowie der Videoaufzeichnung, sowie der genauen Fokussierung des Mikroskops auf das beschichtete Deckglas, wird die Pumpe mit dem gewünschten Volumenstrom gestartet. Über diesen ist die Scherrate bei gegebener Flusskammerdimension vorgegeben.

Der von einer Plexiglaskammer umgebene Mikroskoptisch wird über eine Heizung auf konstante 37°C erwärmt und hält dadurch das Blut und die Flusskammer ebenfalls auf physiologischer Temperatur. Während eines Versuches können verschieden große Vergrößerungsfaktoren eingestellt werden, um damit entweder einen Gesamtüberblick oder eine genaue Detailabbildung der Zellen zu erreichen. Um den Maßstab und damit die Größe der Zellen genau zu ermitteln wurden zu einem vorangegangenen Zeitpunkt mit einer Strichplatte (kleinste Einheit 10 µm) die einzelnen möglichen Vergrößerungsfaktoren ebenfalls über das Videosystem aufgezeichnet, um so exakte Größenangaben der gezeigten Abbildungen machen zu können.

Nachdem das gesamte Blut durch die Kammer geflossen ist wird die Pumpe gestoppt, die Schläuche abgeklemmt und anschließend das Flusssystem vorsichtig in seine Einzelteile auseinander gebaut. Einzig das verwendete Deckgläschen wird nicht erneut verwendet und verworfen. Nach gründlicher Reinigung unter klarem Wasser ohne weitere Detergenzien kann ein weiteres Flussexperiment unmittelbar im Anschluss durchgeführt werden. Sollte eine weitere Analyse der Ablagerungen auf der Glasoberfläche erfolgen, wurde unter laufenden Flussbedingungen eine Perfusionsfixierung mit Glutaraldehyd oder Paraformaldehyd durchgeführt.

3.2.8. Durchflusszytometrische Auswertung

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf Signalen, die Zellen beim Passieren eines Laserstrahls abgeben. Dabei wird die Zellgröße über das Vorwärtsstreulicht (forward scatter), die Granularität über das Seitwärtsstreulicht (side scatter) angezeigt. Um weitere Zelleigenschaften detektieren zu können, werden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenantigene markiert. So kann durch die spezifische Antigen-Anfärbung eine weitere Differenzierung der Zellen erfolgen. Die Darstellung erfolgt in einem zweidimensionalen Diagramm, in denen zwei Zelleigenschaften gegeneinander aufgetragen sind. Zum Beispiel können die Zellen nach Größe und Granularität, oder nach Größe und Lichtemission des markierten Antikörpers sortiert werden. Innerhalb dieser Darstellungen kann dann eine einzelne Zellpopulation, in unseren Experimenten v.a. thrombozytäre Mikropartikel, durch ein spezielles Messfenster isoliert und weiter analysiert werden. Wie bereits durch andere Forschungsgruppen beschrieben, ist es trotz der sehr geringen Größe der Mikropartikel möglich, sie mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu detektieren. (Lindahl et al.; Miyazaki et al.; Heijnen et al.) Dazu führten wir vor den eigentlichen Messungen Kalibrierungen mit speziellen, fluoreszierenden „microbeads“, d.h. 0,1 µm Durchmesser kleinen Kügelchen (FluoSpheres® Fluorescent Microspheres, Molecular Probes, Oregon, USA/Leiden, Niederlande), durch. So konnte von uns ein Messfenster definiert werden, in dem zelluläre Partikel derselben Größe wie diese „microbeads“ erkannt werden.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde das in der Perfusorspritze gesammelte Blut nach jedem Versuch vorsichtig geschwenkt, um es mit dem zuvor in den Schläuchen enthaltenen Puffer zu mischen. Anschließend wurde es für die Zentrifugation in entsprechende Röhrchen gefüllt und bei 170g für 15 Minuten zentrifugiert. Das so erhaltene PRP wurde abpipettiert und jeweils mit zwei verschiedenen Antikörpern für mindestens eine Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Um durchflusszytometrisch zwischen den verschiedenen Antikörpern differenzieren zu können mussten sie mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, die durch unterschiedliche Wellenlängen aktiviert werden, konjugiert werden. Um einen Thrombozyten oder ein Zellteil thrombozytären Ursprungs als solches zu erkennen verwendeten wir an Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ bindendes Anti CD 41 oder das gegen GPIb α gerichtete Anti CD 42b (Immunotech, Marseille, Frankreich). Diese waren jeweils mit dem orangefarbenen fluoreszierenden Phykoerythrin konjugiert. Als zweiter Antikörper wurde mit FITC (Fluorescein Isothiozyanat), einem grün fluoreszieren-

den Farbstoff, konjugierter Anti-Tissue Factor-Antikörper (American Diagnostics, Stamford, CT, USA) verwendet. Die Inkubation wurde mit einer Endkonzentration von 15 µl/ml PRP (Anti CD 41- und Anti CD 42b-Antikörper) bzw. 38 µl/ml PRP (Anti-TF-Antikörper) durchgeführt. Für die jeweils verwendeten Konzentrationen gab es keine Normwerte. Es war somit notwendig eine für unser Labor, unsere Anwendung und den jeweils verwendeten Antikörper optimale Konzentration zu finden. Meist liegt die benötigte Konzentration im Bereich zwischen 0,25 und 20 µg/ml. (Michelson et al.)

Nach Ablauf einer Stunde wurde die Messung mit einem Durchflusszytometer der Firma Beckman Coulter durchgeführt. Als Besonderheit der Messung verwendeten wir als Auslösesignal nicht wie üblicherweise den Vorwärts-Scatter, sondern die Fluoreszenz. Dies ermöglichte uns selbst Mikropartikeln noch zu detektieren, deren Größe bereits unter der Wellenlänge des verwendeten Lichts lag. Als Analogie dazu kann man sich vorstellen, dass Sterne im Nachthimmel nur durch ihr Leuchten und nicht durch ihre Größe erkennbar sind. Bei der größengetriggerten Messmethode machten wir die Erfahrung, dass die kleinsten Teilchen, die für uns relevanten Mikropartikel, zum Großteil nicht erfasst werden konnten.

3.2.9. Fixierung der Proben

Für die konfokale Laserscanningmikroskopie sowie für die Elektronenmikroskopie, die außerhalb der Flusskammer durchgeführt wurden, mussten die Thrombozyten und Mikropartikel zuerst fixiert werden. Die von uns entdeckte scherkraftinduzierte Entstehung von Tethern und Mikropartikeln aus Thrombozyten war jedoch ein sehr schneller, von der Strömungsgeschwindigkeit abhängiger Prozess, der eine besondere Fixierung der Proben für weitere Analysen verlangte. Deshalb musste die Fixierung so durchgeführt werden, dass der Blutfluss mit der gleichen Geschwindigkeit und den gleichen Scherraten auch unmittelbar vor den Fixierungsprozessen aufrecht erhalten werden konnte. Nur so war es möglich den Entstehungsmechanismus von Tethern und Mikropartikeln in der realen Form zu fixieren und ihn detailgetreu und exakt abzubilden.

Dies gelang, indem wir während des Flussexperiments eine Spritze mit circa 5 ml einer Fixierungslösung, entweder gepufferte 4%ige Paraformaldehydlösung oder für elektronenmikroskopische Bilder gepufferte 2%ige Glutaraldehydlösung, bereithielten. Kurz bevor das in den Zulaufschlauch fließende Blut zur Neige ging, wurde sehr schnell die Fixierungslösung in das Reagenzglas, in dem sich der Zulaufschlauch befindet,

eingbracht. Es musste beachtet werden, dass keine Luft in den Zulaufschlauch gelang, um ein Abtragen der interagierenden Zellen zu vermeiden. So war keine Unterbrechung des Blutflusses nötig, sondern die Fixierlösung wurde mit dem Sog in die Kammer eingezogen und fixierte die Zellen unmittelbar während des Kammerdurchflusses bei der Interaktion mit der beschichteten Oberfläche. Die interagierenden Thrombozyten wurden förmlich eingefroren wenn die Fixierungslösung die Flusskammer in ausreichender Konzentration erreichte.

Nachdem die Plättchen fixiert waren wurde die Pumpe sofort gestoppt, um ein Ablösen der Plättchen oder eine andersartige Artefaktbildung zu verhindern. Anschließend wurde die Flusskammer sehr vorsichtig auseinander gebaut und das Glasdeckglas mit den fixierten Thrombozyten für mindestens 10 Minuten in eine Petrischale mit Fixierungslösung gelegt. Durch vorsichtige kreisende Bewegungen konnten die noch anhaftenden Erythrozyten langsam abgelöst werden. Nach der Fixierungszeit konnte das Deckglas aus der Lösung entnommen, vorsichtig mit PBS (Phosphatgepufferte 0,9% Natriumchlorid-Lösung; pH-Wert 7,4) gewaschen und weiterverarbeitet – z.B. mit Antikörpern inkubiert – werden.

3.3. Analyse von Tethern und Mikropartikeln mit konfokaler Laserscanningmikroskopie

Nach der Fixierung wurden die Proben für die konfokale Laserscanningmikroskopie mit folgenden Präparationsschritten vorbereitet: Sie wurden mit primären, monoklonalen Antikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation mit einem sekundären, an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelten Antikörper. Dieser Inkubationsschritt musste im Dunkeln stattfinden um die Fluoreszenzfarbstoffe nicht ausbleichen zu lassen. Die von uns verwendeten Antikörper gegen CD 41 (Integrin α IIb), CD42a (GPIIb α) und CD14 (Markierung von Monozyten) wurden von Immunotech (Marseille, Frankreich), die monoklonalen Antikörper gegen Tissue Factor von der Firma American Diagnostics (Stamford, CT, USA) hergestellt. Die Antikörper gegen AK-3 (GPIIb α , IgG1) wurden freundlicherweise von M.C. Behrendt zur Verfügung gestellt. Das mit Rhodamin konjugierte Phalloidin zur Darstellung der Aktinfilamente stammte von Pharmingen (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), der monoklonale Anti-Aktin Antikörper (Klon 4) von ICN Biomedicals (Irvine, CA, USA) und FITC- und Cy3-konjugierte sekundäre Antikörper von Nordic (Tilburg, Niederlande) oder

Jackson (West Grove, PA, USA). Nachdem die überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper nach Beendigung der Inkubationszeit mit PBS abgewaschen wurden, wurden die Proben mit dem Schnelleindeckmittel Entellan® (Merck Chemicals, USA) auf gläserne Objektträger (Merck, Darmstadt, Deutschland) befestigt und nach dem Aushärten mit einem konfokalen Mikroskop LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei 63-facher Primärvergrößerung (Zeiss 63 Antiflex Objektiv und Plan-Apochromat 63/1.4 Öl DIC Objektiv) analysiert.

Um den F-Aktin Gehalt der Thrombozyten und Tether zu untersuchen wurden die fixierten Proben mit 0,2% Triton-X-100 permeabilisiert und für eine Stunde mit einem Anti-Aktin Antikörper und anschließend mit einem Cy3 markierten, sekundären Antikörper eine weitere Stunde inkubiert. Letzterer war ein lapiner, also ein vom Kaninchen stammender Antikörper der an Maus Antigene bindet.

3.4. Herstellung und Weiterverarbeitung von fixierten Proben für elektronenmikroskopische Auswertungen

3.4.1. Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die auf den Deckgläschen fixierten Proben verwendet. Nach Entwässerung in Ethanollösungen aufsteigender Konzentrationen (bis 100%) wurde eine Trocknung über den kritischen Punkt mit Kohlendioxid (CO₂) durchgeführt. Die Beschichtung erfolgte mit Kohlenstoff. Um die Proben in das Rasterelektronenmikroskop (JSM-6300F, JEOL, Tokio, Japan) einbringen zu können, musste mit einem Glasschneider noch das Glasdeckplättchen auf eine Größe von etwa 5 × 5 mm zurechtgeschnitten werden.

3.4.2. Transmissions-Immun-Elektronenmikroskopie

Für die Transmissions-Immun-Elektronenmikroskopie wurden Partikelpräparate und dünne Gefrierschnitte der an dVWFA1 gebundenen und fixierten Plättchen und Tether hergestellt.

Für ultradünne Gefrierschnitte der Proben wurden die Strömungsexperimente mit melaminbeschichteten Deckgläschen durchgeführt, auf denen zusätzlich wie zuvor

beschrieben dVWFA1 aufgebracht wurde. Nach Perfusionsfixierung wurde der Melaminfilm mit den daran haftenden Thrombozyten von der Glasoberfläche abgezogen und in 10%iger Gelatine eingelegt, eisgekühlt und in 1 mm³ große Stücke geschnitten. Diese Stücke wurden bei 4°C für 24 Stunden in 2,3 molarer Saccharoselösung eingelegt und im Anschluss mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Später wurden die so präparierten Proben bei -120°C in 50 nm dicke Schnitte mit einem Ultracut S Ultramicrotom (Leica, Reichert Division, Wien, Österreich) zugeschnitten. Diese Gefrierschnitte wiederum wurden auf spezielle mit Polyvinylformaldehyd überzogenen Elektronenmikroskopiegitter (Formvar®) aufgelegt, und mit primären Antikörpern, sowie in einem zweiten Schritt mit Protein A, welches an 10 nm kleine Goldpartikel gebunden war, inkubiert. Die so immunmarkierten Gefrierschnitte wurden mit Uranyl-Acetat in Methyl-Zellulose-Uranyl-Acetat gegengefärbt, und mit einem JEOL 1200CX Elektronenmikroskop untersucht.

Partikelpräparate für die elektronenmikroskopische Auswertung erhielten wir, indem das karbonüberzogene, mit einem Polyvinylformaldehyd beschichtete (Formvar®) Gitter beim Zusammenbau der Kammer direkt in den Strömungskanal eingebracht wurde, und das Flusseperiment wie gewohnt durchgeführt wurde. Nach der Perfusionsfixierung mit einer Mischung aus 2%igem Paraformaldehyd und 0,2%igem Glutaraldehyd in 0,1 molarem PBS wurden die Gitter mit den darauf fixierten Plättchen zunächst mit primären Antikörpern, und nach deren Inkubation mit Protein A, welches an 10 nm kleine Goldpartikel gebunden war, erneut inkubiert. Die Partikelpräparate wurden wie die Gefrierschnitte mit Uranyl-Acetat in Methyl-Zellulose-Uranyl-Acetat gegengefärbt. Die Analysen der so präparierten Proben konnten in einem JEOL 1200CX Elektronenmikroskop durchgeführt werden.

Für die Transmissions-Immun-Elektronenmikroskopie wählten wir bei den Flusseperimenten Scherraten zwischen 10000 und 30000 s⁻¹.

4. Ergebnisse

4.1. Plättchenadhäsion via Discrete Adhesion Points (DAPs)

Die bereits beschriebene axiale Migration des Blutstroms ermöglichte in unseren Versuchen die Interaktion zwischen den beschichteten Oberflächen und den daran vorbei fließenden Thrombozyten. Wir konnten dabei beobachten, dass bei Experimenten, in denen die Scherraten zwischen 2000 s^{-1} - entsprechend einer normalen Arteriole - und 40000 s^{-1} - entsprechend einer stenosierten Koronararterie – betrug (Mailhac et al.; Bathe und Kamm; Wootton et al.), die Thrombozyten, oder im Verlauf auch die gebildeten Tether, nur über einen sehr kleinen Membranbereich mit der Oberfläche in Kontakt standen (siehe Abb. 5 B und C und 6 A). Dieser Befund stand im Gegensatz zur bisherigen Meinung, dass nicht aktivierte Thrombozyten mit der kompletten, basalen Membranfläche an eine Oberfläche adhären. Die DAP-Bereiche wurden mit RICM schwarz abgebildet und entsprachen somit einem Abstand der Zellmembran von der mit VWF beschichteten Oberfläche von 4-12 nm. In den direkt angrenzenden Bereichen stellte sich die Zellmembran hellgrau oder weiß dar, entsprechend einer Oberflächendistanz von mehr als 20 nm. (Kloboucek et al.)

Innerhalb dieser schwarz abgebildeten Bereiche fand die Interaktion der thrombozytären Membranrezeptoren GPIIb/IIIa mit den distalen A1-Domänen des VWF statt. Sie sind der Ausgangspunkt der scherkraftinduzierten Bildung von Tethern und Mikropartikeln. Die Anhaftung der vollständig aktivierungsblockierten Thrombozyten wurde nur über die Bindung der GPIIb/IIIa Rezeptoren innerhalb der DAPs vermittelt. GPIIb/IIIa ist ein Rezeptor, der keine Voraktivierung für seine Ligandenbindung benötigt. Die Aktivierung der Thrombozyten durch die über GPIIb/IIIa-Signalkaskaden vermittelte Aktivierung wurde durch die Inhibition jeglicher Plättchenaktivierung verhindert.

Wir konnten in unseren Experimenten zwei relevante Funktionen der DAPs beobachten:

- Bei den rollenden Bewegungen, mit denen sich manche Thrombozyten auch ohne Tetherbildung über die dVWFA1-Oberfläche fortbewegten, dienten die beschriebenen DAPs als Drehpunkte bei Überschlags- oder Rotationsbewegungen der Thrombozyten (siehe Abb. 6 A). Auf diese Art bewegten sich die Thrombozyten rollend mit dem Blutfluss voran.

- Durch das feste Anhaften der Zellmembran in den Bereichen der DAPs wurden bei hohen Scherraten Membranschläuche aus den Thrombozyten gezogen. Sie waren die Ausgangspunkte der Tetherentstehung und damit auch Ausgangspunkt der scherkraftinduzierten, biophysikalischen Entstehung thrombozytärer Mikropartikel.

4.2. Die Kinetik der Tetherbildung

Abbildung 4 zeigt, dass die Anzahl der Thrombozytenkontakte, der Translokationen und der Tetherbildung sowohl von der Beschichtungskonzentration als auch von der Scherrate abhing. Bei niedrigen Scherraten und niedriger Konzentration kam es zu einer hohen Anzahl von kurzzeitigen Kontakten der Blutplättchen, Translokationen und Tetherbildung waren nur geringfügig vorhanden. Bei gleicher Beschichtung und höheren Scherraten reduzierte sich die Anzahl dieser Kontakte deutlich.

Tether konnten, wenn auch in geringer Zahl, auch bei niedrigen Scherraten mit niedriger Beschichtungskonzentration entstehen. Bei gleicher Konzentration und höheren Scherraten gelang nur in geringem Maße der Nachweis von Tethern. Die Ursache hierfür lag höchstwahrscheinlich in der funktionell niedrigen Konzentration von Liganden der GPIIb Moleküle - der niedrigen dVWFA1-Beschichtung -, durch die es zu keiner ausreichenden Anzahl an Bindungen kommen konnte, um den höheren Scherkräften stand zu halten.

Auffallend war auch, dass bei hohen Beschichtungskonzentrationen die Anzahl der Tether mit der Scherrate zunimmt. Gleichzeitig war die Anzahl der kurzzeitigen Kontakte signifikant niedriger. Somit entstanden bei gleicher Anzahl an Interaktionen relativ gesehen mehr Tether. Dies war auf die höheren Kräfte zurückzuführen, die auf die Thrombozytenmembranen einwirken. War der Tether mittels eines DAPs fest auf der Oberflächenbeschichtung verankert, „zogen“ diese hohen Scherkräfte den Tether förmlich aus der Zelle heraus.

In Abbildung 4 C ist zu sehen wie sich DAPs und Thrombozyten mit dem Blutstrom fortbewegten. Bewegte sich ein Thrombozyt schneller voran als der verankerte Membrananteil, dann entstanden Tether. In Teil D der Abbildung wird die lineare Korrelation der Tetherlänge mit der Zeit dargestellt. Je länger ein mit einem DAP verankerter Thrombozyt mit dem Blutstrom fortgetragen wurde, desto länger wurde der Tether und zwar unabhängig von der bereits erreichten Länge (bis 30 μm). Aufgrund der Linearität der Korrelation lässt sich schließen, dass die wirkenden Kräfte, zum einen die Scherkräfte in Flussrichtung, zum anderen die innerhalb der Zelle entgegenwirkenden

Kräfte (Zellmembran, Zytoskelett), sich nicht mit der Länge des Tethers und nicht mit der Größe des verbleibenden Thrombozyten verändern.

Abbildung 4

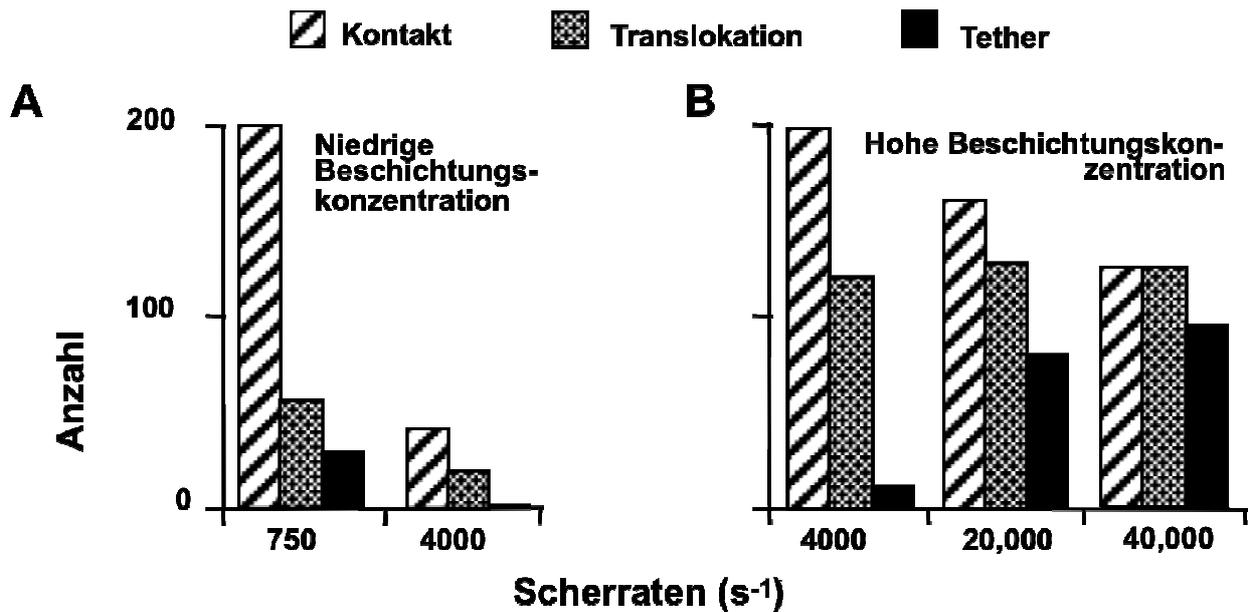


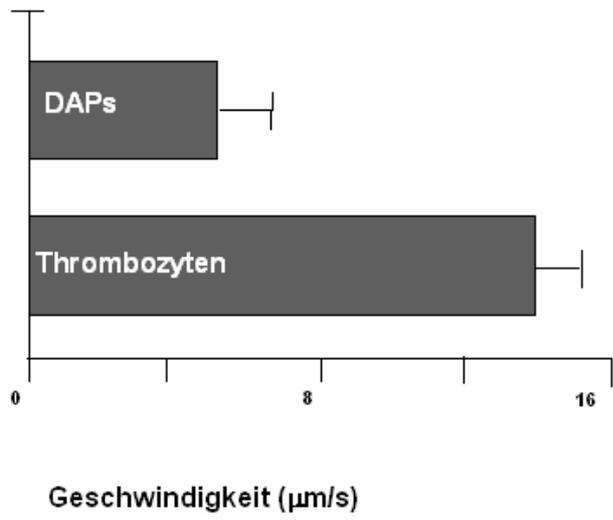
Abbildung 4: Die Kinetik der Tetherbildung:

(A-B) Eine gewaschene Blutzellsuspension (Thrombozytenanzahl, 11000 /µl) wurde über immobilisierten dVWFA1 bei niedrigen, 1 µg/ml (A) oder hohen, 20 µg/ml (B) Beschichtungskonzentrationen perfundiert. Die jeweiligen Scherraten sind in den Diagrammen eingezeichnet. Ein „Kontakt“ beschreibt ein Plättchen, das für mindestens 0,033 Sekunden mit der reaktiven Oberfläche interagiert. „Translokation“ beschreibt einen Thrombozyten, der sich mindestens um einen halben Zelldurchmesser pro Sekunde und damit langsamer fortbewegte als die frei fließenden Plättchen. Unter „Tether“ werden diejenigen Plättchen erfasst, die mit Hilfe von DAPs ein oder mehrere Tether ausbildeten.

(C) zeigt die Geschwindigkeiten, mit denen sich die interagierenden Thrombozyten, sowie die DAPs an denen sie verankert waren, fortbewegten. (D) veranschaulicht die Kinetik der Tetherentstehung und -längenentwicklung bei dVWFA1 Konzentrationen von 20 µg/ml und Scherraten von 40000 s⁻¹.

Modifiziert nach (Reininger et al. 2006)

C



D

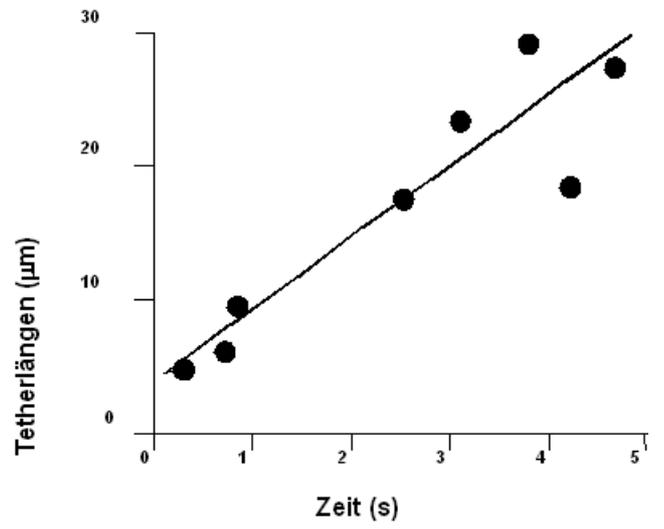


Abbildung 5

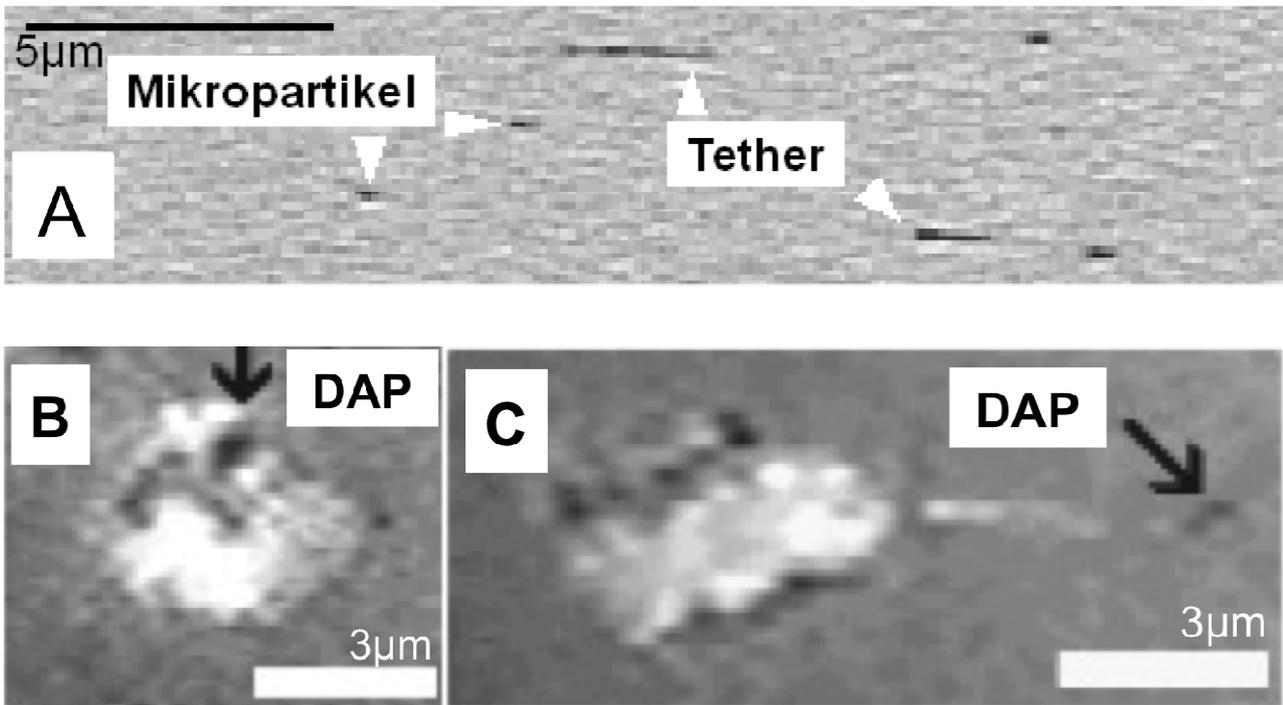


Abbildung 5

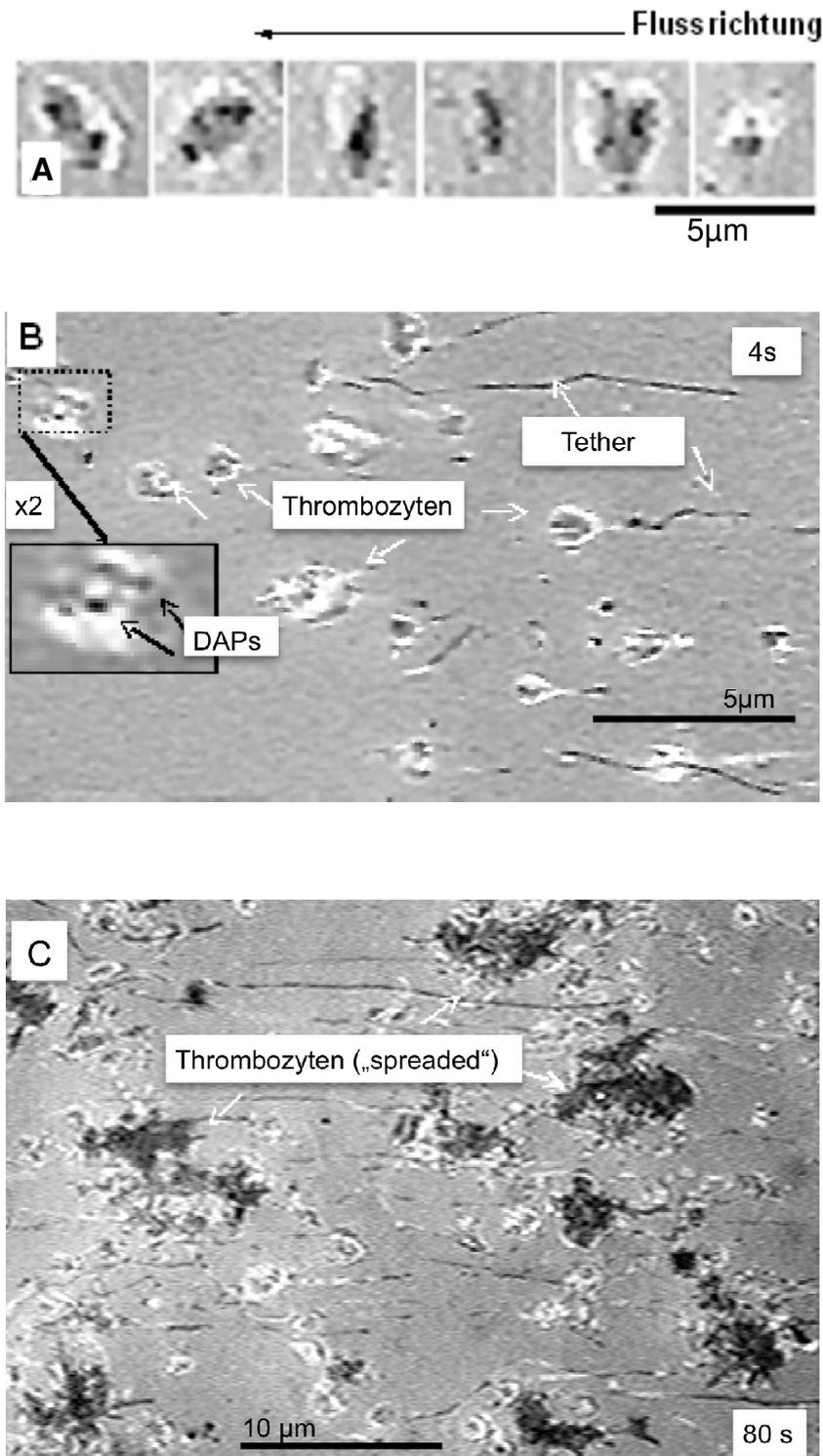
(A) Die Abbildung zeigt eine gewaschene Suspension von Blutzellen mit erniedrigten Thrombozytenkonzentrationen (11000 Thrombozyten / μl), die bei Scherraten von 40000 s^{-1} über eine dVWFA1 beschichtete Oberfläche strömten. Einzelne Mikropartikel und abgetrennte Tether translozierten über die Oberfläche.

(B) Eine gewaschene Blutzellsuspension mit 230000 Thrombozyten / μl wurde mit Scherraten von 4000 s^{-1} über dVWFA1 perfundiert. Es ist ein DAP im peripheren Bereich der Zellmembran zu erkennen.

(C) Mit Scherraten von 1000 s^{-1} wurde eine gewaschene Blutzellsuspension (270000 Thrombozyten / μl) über dVWFA1 perfundiert. Wieder ist ein DAP deutlich zu erkennen, diesmal am stromaufwärts gelegenen Ende des Tethers, aber erneut auch im peripheren Bereich des Zellkörpers.

Modifiziert nach (Reininger et al. 2006)

Abbildung 6



4.3. Tether- und Mikropartikelentstehung aus Thrombozyten

Wenn innerhalb des Blutstromes Scherraten von über 1000 s^{-1} wirkten, konnten die DAPs trotzdem den Scherkräften eine Zeit lang standhalten. Diese Zeitspanne ist begrenzt durch die Halbwertszeit der GPIb-VWF Bindung, sowie die Anzahl der simultan bindenden Rezeptoren im Bereich eines DAP. Dadurch konnte zunächst kurzzeitig ein so interagierendes Plättchen in seiner Position gehalten werden. Schließlich bewegte sich jedoch der Thrombozyt aufgrund der wirkenden Scherkräfte weiter in Flussrichtung, während der Membrananteil des DAPs noch fest adhärierte. Durch diesen Mechanismus wurden dünne Membranschläuche, die so genannten Tether, aus den Thrombozyten herausgezogen.

Im Rasterelektronenmikroskop (siehe Abb. 7 B-E) konnte man feine Membranschläuche erkennen, die aus nicht aktivierten Plättchen herausragten. Die Unterscheidungskriterien dieser Tether von Filopodien aktivierter Plättchen sind einerseits der um die Hälfte geringere Durchmesser, andererseits eine Entstehungszeit, die bis zu siebenfach schneller ist als die Aktinpolymerisation, die der Filopodienbildung aktivierter Plättchen zu Grunde liegt (siehe Abb. 7 A bis C). In Abbildung 7 A ist zum Vergleich ein aktiviertes Blutplättchen mit zahlreichen Filopodien abgebildet, die sich in Länge, Größe und Verteilung auf der Zelle deutlich von den passiv gebildeten Tethern unterscheiden. Auch in Hinsicht auf die Flussrichtung unterschieden sie sich von Filopodien, da Tether immer in Flussrichtung verliefen, wobei der DAP stromaufwärts und der Thrombozyt stromabwärts lag. Kleine Abweichungen waren dabei möglich (siehe Abb. 6 B). Dahingegen sind Filopodien keine Folge aus einer direkten Interaktion von VWF und der Zellmembran, sondern formen sich in alle Richtungen, als kleine, frei bewegliche Membranausstülpungen aus dem Zellkörper.

Eine Tetherbildung konnte in unseren Versuchen nur beobachtet werden, wenn entweder niedrige Scherraten ($<1000 \text{ s}^{-1}$) mit niedrigen Konzentrationen der Oberflächenbeschichtung mit dVWFA1 (1 oder $5 \mu\text{g/ml}$) einher gingen, oder wenn umgekehrt die Blutplättchen bei höheren Beschichtungskonzentrationen ($10\text{-}20 \mu\text{g/ml}$) auch höheren Scherraten ($20000\text{-}40000 \text{ s}^{-1}$) ausgesetzt waren. In letzterem Fall wurden von weit mehr als 50% aller interagierenden Plättchen ein oder mehrere Tether gebildet (siehe Abb. 4 A und B).

Dem Blutstrom folgend bewegten sich die Plättchen stets in eine Richtung, auch die Tether zeigten generell in die gleiche Richtung, wenn auch kleine Abweichungen zur

Flussrichtung möglich waren. Knickbildungen innerhalb eines Tethers waren möglich wenn sich in dessen Mitte eine weitere Haftstelle mittels eines DAPs ausbildete, der wenig von der exakten Strömungsrichtung abwich (siehe Abb. 6 B). Die Kinetik der Tetherbildung verlief fast linear, bis es entweder zu einer Ablösung des Tethers und folglich zur Wiedereingliederung der Membran in den Thrombozyten, oder zum Abreißen des Thrombozyten und somit zur eigenständigen Fortbewegung des Tethers im Blutfluss kam (siehe Abb. 4 D).

Tether erreichten eine Länge von bis zu 30 μm . Sie entstanden sowohl bei Perfusionsversuchen über dA1VWF, als auch über multimeren VWF, als auch über Kollagen (siehe Abb. 7 E, 6 B und 8).

Bei Scherraten von 6000 s^{-1} und mehr konnte sich der Plättchenkörper vom Tether lösen (siehe Abb. 5 A). Der abgetrennte Thrombozyt bewegte sich dann unter Verlust der Membrananteile wieder mit dem Blutstrom fort. Der Tether blieb entweder an dem DAP, an dem er entstanden war, verankert, wodurch der restliche Tether im Blutstrom hin und her flottierte. Auf diese Weise konnten neue DAPs entstehen und der abgetrennte Tether konnte sich als einzelnes, schlauchartiges Plättchenteil durch die herrschenden Strömungen weiter über die Oberfläche mittels Rezeptorinteraktionen innerhalb der DAPs fortbewegen. Oder es war möglich, dass es zu einer Zerreißung im Bereich des Tethers kam (siehe Abb. 7 D und E). Bei Scherraten über 10000 s^{-1} erhöhte sich der Anteil der so abgetrennten Tether deutlich. Durch mehrere kleine Teilstücke eines Tethers, die nach Teilung eine sphärische Form bildeten, entstanden Mikropartikel. Diese waren entweder tropfen- oder kugelförmig. Der Durchmesser betrug 70–100 nm, was der Breite eines Tethers entsprach (siehe Abb. 5 A, sowie 7 D und E). Nach ihrer Entstehung bewegten sich die so gebildeten thrombozytären Mikropartikel entweder unabhängig von den Plättchen, aus denen sie hervorgegangen waren, über die VWF Oberfläche fort. Oder aber die GPIb/VWF Bindungen lösten sich nicht und die Mikropartikel blieben an die reaktive Oberfläche gebunden (siehe Abb. 5 A).

Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu denen, die Dopheide et al. (Dopheide et al.) machten. Die Forschungsgruppe berichtete, dass es in ihren Experimenten nicht vorkam, dass ein Plättchenkörper von dem aus ihm gebildeten Tether abgetrennt wurde. Ganz im Gegensatz dazu kam dies in unseren Versuchsreihen regelmäßig vor und stellte durch Ab- oder Durchtrennung von Tethern einen Mechanismus dar, durch den unter Bedingungen mit hohen Scherraten thrombozytäre Mikropartikel biophysikalisch entstanden sind. Diese Differenzen könnten zum einen an den unterschiedlichen Versuchsaufbauarten, zum anderen aber auch an der verwendeten

Beschichtung oder einer unterschiedlichen Beschichtungskonzentration liegen. Auch kommt die Verwendung unterschiedlicher Scherraten als Ursache in betracht, da die Abtrennung der Tether von den Blutplättchen auch in unseren Versuchen mit den verwendeten Scherraten korrelierte und bei höheren Scherraten wesentlich öfter vorkam. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die von Dopheide et al. verwendete und deutlich geringer auflösende Mikroskoptechnik eine klare Darstellung isolierter Tether einschränkte.

In unseren Experimenten kam es regelmäßig vor, dass ein mit der adhäsiven Oberfläche interagierender Thrombozyt mehrere, voneinander unabhängige DAPs auf seiner Membran ausbildete. So kam es dazu, dass unter Einfluss der auf das Blutplättchen wirkenden Scherkräfte mehrere Tether gleichzeitig aus dieser einen Zelle herausgezogen wurden (siehe Abb. 7 B und E). Meist waren die Tether dabei in etwa gleich lang.

Bei Scherraten zwischen 10000 s^{-1} und 40000 s^{-1} waren die Anteile der Thrombozyten, die Tether und Mikropartikel bildeten, am höchsten, und zwar in folgendem Verhältnis: 0,75 Mikropartikel : 1 abgetrennter Tether : 1 translozierender Thrombozyt. Da sowohl Tether als auch Mikropartikel jeweils den gleichen Durchmesser von etwa $0,1 \mu\text{m}$ oder weniger besaßen, unterschieden wir sie durch die Definierung der unterschiedlichen Längen, das heißt Mikropartikel waren kürzer und Tether länger als $0,5 \mu\text{m}$ (siehe Abb. 7 D und E).

Als Kontrollexperiment zu unseren Versuchsreihen haben wir Vollblut mit Scherraten von 40000 s^{-1} über unbeschichtetes Glas, an das sich dann das Plasmafibrinogen anhaftet (Reininger et al. 2000), strömen lassen. Dabei zeigte sich in den Echtzeitaufnahmen keinerlei Tether- oder Mikropartikelentstehung. Auch in den per Durchflusszytometer analysierten Proben dieser Experimente zeigte sich kein Anstieg der Mikropartikelbildung im Vergleich zur Nativprobe.

Abbildung 7

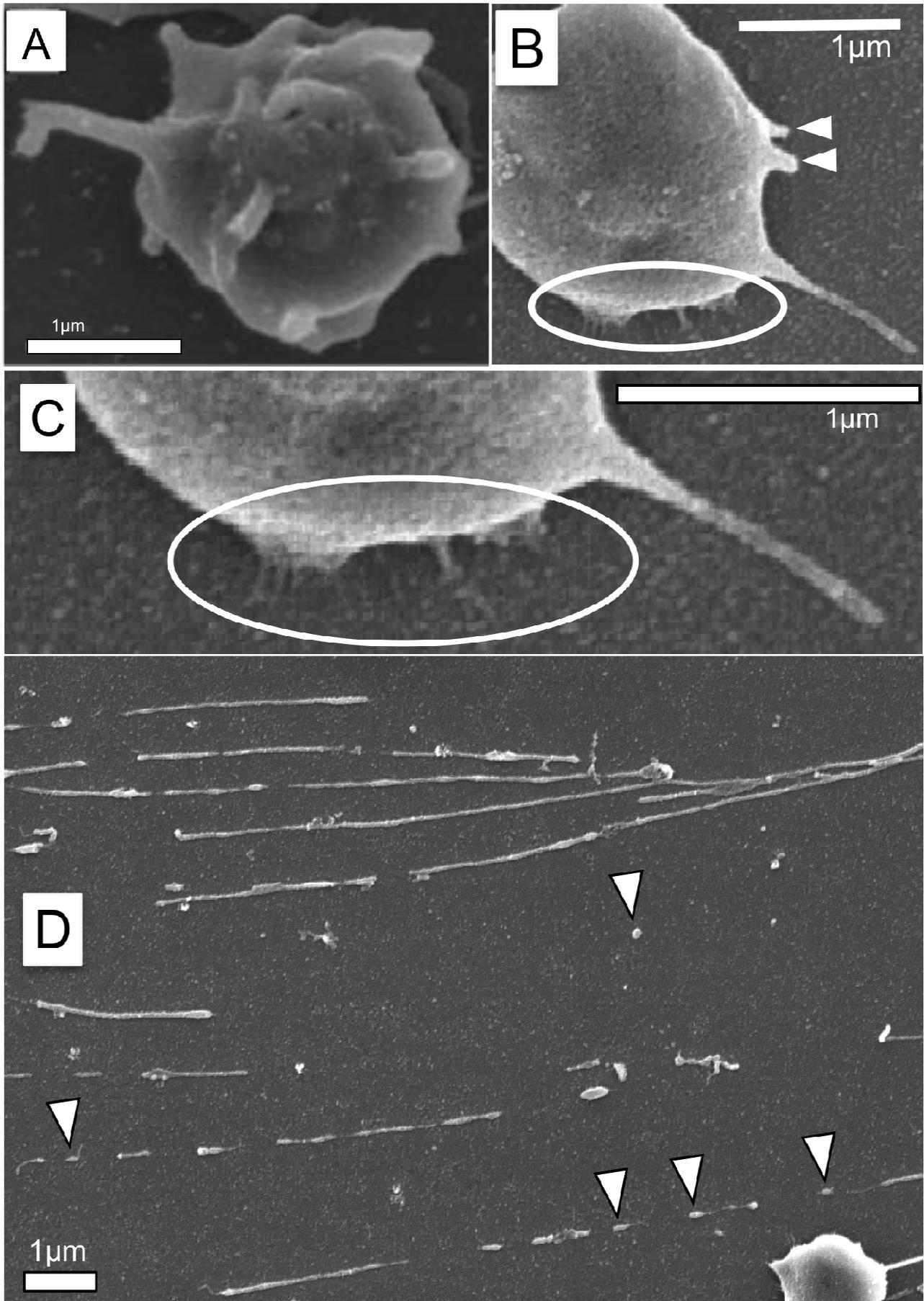


Abbildung 7

Scanning-elektronenmikroskopische Analyse von Mikropartikeln und Tethern:

Die Bilder (B) bis (E) wurden angefertigt, indem mit Natriumzitrat antikoaguliertes Blut (mit 250000 Thrombozyten / μl) über eine Beschichtung mit der rekombinanten A1 Domäne des VWF bei Scherraten von 30000 s^{-1} perfundiert wurde.

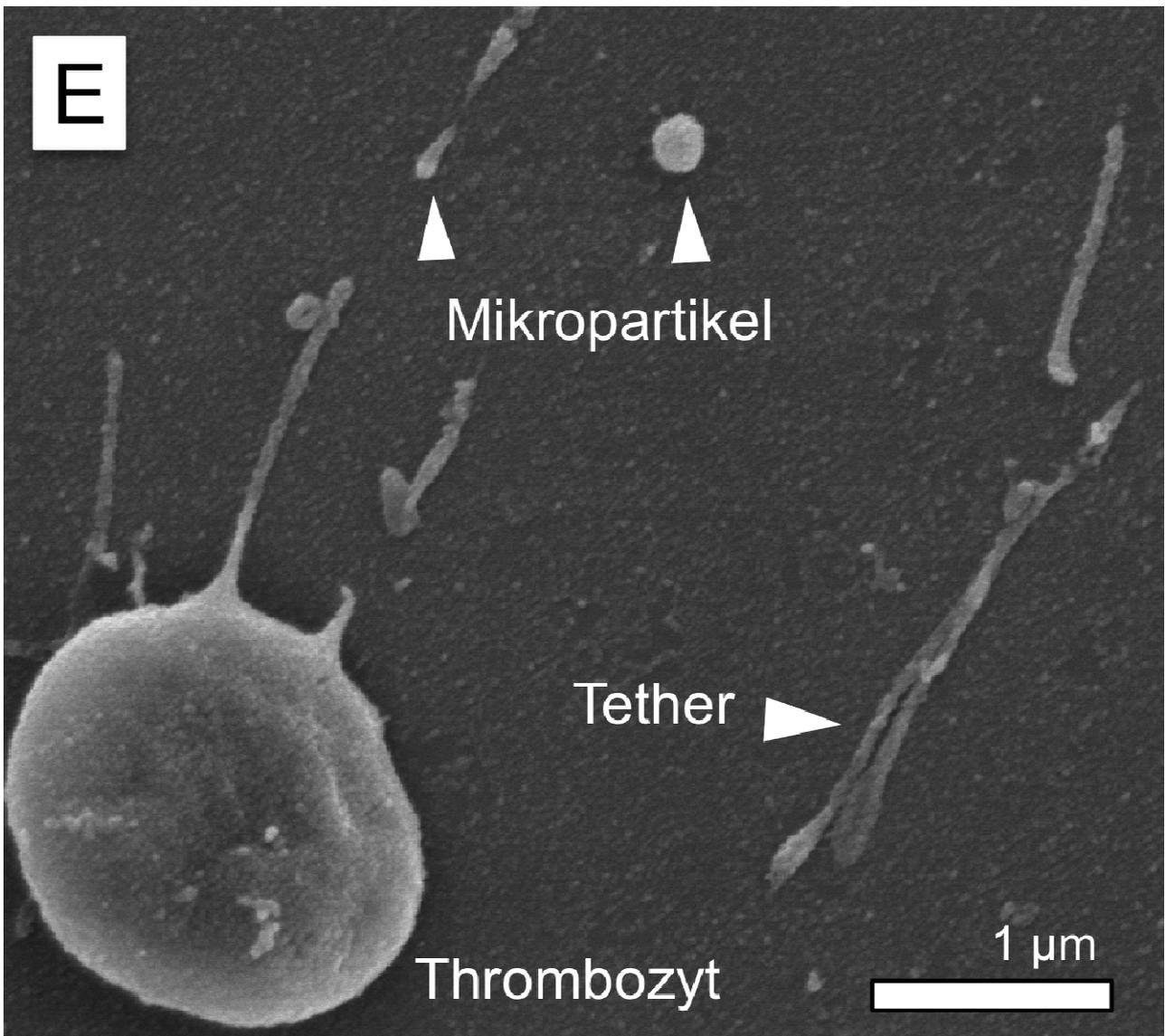
(A) zeigt eine Scanning-elektronenmikroskopische Aufnahme eines zum Vergleich dargestellten, aktivierten, perfusionsfixierten Thrombozyten. Es soll veranschaulicht werden, wie ein aktivierter Thrombozyt Filopodien in verschiedene Richtungen aktiv bildet, die sich in Form, Größe und Anzahl deutlich von den passiv gebildeten Tethern unterscheiden.

In (B) ist ein nicht aktiviertes, über GPIb an VWF adhärierendes Plättchen zu sehen. Es sind eine glatte Membranoberfläche und ein langer, schmaler Tether zu erkennen. Die zwei mit Pfeilen gekennzeichneten Membranausbuchtungen sind Tether am Beginn ihrer Entstehung.

(C) Vergrößerung eines in (B) markierten Bildausschnittes: es zeigt eine Vielzahl kleiner dünner Tether, die den Plättchenkörper an der reaktiven Oberfläche verankern.

(D-E) Einzelne Mikropartikel und von Plättchen abgetrennte Tether.

Modifiziert nach (Reininger et al. 2006)



4.4. Zusammenwirken von VWF A1-Domäne und GPIIb α als Voraussetzung für Spreading

Bei Flussversuchen mit nicht inhibierten Thrombozyten über multimerem, immobilisiertem VWF wurden die Thrombozyten nach der ersten Interaktion zwischen GPIIb α und immobilisiertem VWF in ihrer Vorwärtsbewegung verlangsamt. So konnte nach Aktivierung der Thrombozyten durch diese erste transiente GPIIb-VWF Bindung die nachfolgende, mit langsamerer Bindungskinetik ablaufende Integrin α IIb β 3 Interaktion mit VWF greifen. Dies ermöglichte die permanente Adhäsion von Thrombozyten an der mit VWF beschichteten Oberfläche und ihr flächiges Ausbreiten (Spreading).

Durch Blockierung eines der beiden Reaktionspartner der initialen Interaktion, also entweder von GPIIb α oder dVWFA1, mit einem spezifischen, monoklonalen Antikörper wurde die Anhaftung der Plättchen an VWF vollständig verhindert. Es kam nicht zu Spreading oder einer Aktivierung der Thrombozyten, da ohne die initiale Bindung von GPIIb und VWF die nachfolgenden Schritte nicht möglich waren. Sie ist essentielle Voraussetzung für die Bindung von Integrin α IIb β 3.

4.5. VWF-vermittelte Tetherbildung an Kollagenfibrillen

Auch wenn als Oberflächenbeschichtung Kollagen, ein Hauptbestandteil thrombogenen Materials der extrazellulären Matrix (Savage et al. 1998) sowie von arteriosklerotischen Plaques (Penz et al.) verwendet wurde, konnte die Bildung von Tethern beobachtet werden (siehe Abb. 8). Diese entstanden dabei nicht direkt durch die Interaktion zwischen Plättchen und VWF, sondern der im Plasma vorhandene VWF band an das freiliegende Kollagen, so dass anschließend die Plättchen mit dem auf diese Weise immobilisierten, plasmatischen VWF Verbindungen eingehen konnten. Ohne VWF als Zwischensubstrat z.B. in gewaschenem Blut war eine Mikropartikel- und Tetherbildung insofern nicht möglich.

Wie Abbildung 8 zeigt, kam es auch auf kollagenbeschichteten Deckgläsern zur Ausbildung von Tethern. Wir konnten allerdings weder optisch noch messtechnisch eine signifikante Bildung thrombozytärer Mikropartikel nachweisen.

Abbildung 8

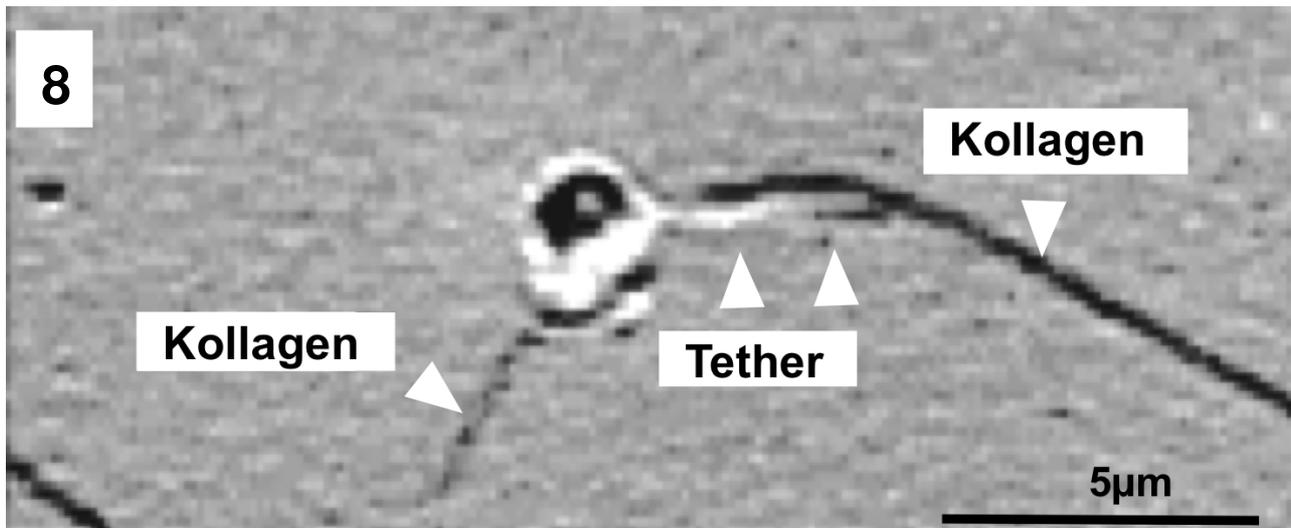


Abbildung 8

Eine gewaschene Blutsuspension unter Zugabe von 20 $\mu\text{g/ml}$ aufgereinigtem VWF, wurde über Kollagenfibrillen vom Typ I mit Scherraten von 40000 s^{-1} perfundiert. Die Anzahl der Thrombozyten in der Suspension wurde auf $11000/\mu\text{l}$ eingestellt, um die Interaktionen auf der thrombogenen Oberfläche zu reduzieren, und so eine bessere Visualisierung zu gewährleisten. Um eine Aktivierung der Plättchen zu verhindern wurde $10\text{ }\mu\text{M}$ PGE1 zugegeben. Gezeigt wird ein Thrombozyt, der durch einen Tether an einer Kollagenfibrille verankert ist. Die Interaktion erfolgte nach initialer Adhäsion von plasmatischem VWF an der Kollagenfibrille.

Modifiziert nach (Reininger et al. 2006)

4.6. Verteilung von GPIb α auf DAPs und Tethern

Die Morphologie der abgetrennten Tether und Mikropartikel in der Transmissions-Immun-Elektronenmikroskopie bestätigte die bereits mit Hilfe der Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie gesehenen Echtzeitaufnahmen: Knopfartige Ausstülpungen am oberen (stromaufwärts) gelegenen Ende zeigten die Lage der in der RICM beobachteten DAPs. Auch in den mittleren Abschnitten der Tether konnten teilweise solche Verbreiterungen nachgewiesen werden, was wiederum der Beobachtung entspricht, dass auch in der Tethermitte DAPs vorkamen (siehe Abb. 6 B). Bifurkationen von Tethern entstanden ebenfalls meistens an Punkten, an denen die Plättchenmembran mit der dVWFA1 Oberfläche interagiert, und somit ein DAP entstanden war (siehe Abb. 9 E).

Die Transmissions-Immun-elektronenmikroskopische Analyse der als Ganzes, d.h.

nicht geschnittenen, „whole-mount“ fixierten Präparate zeigte, dass die Verteilung von GPIIb/IIIa auf den Tethern nicht gleichmäßig war, sondern sich Bereiche mit hohen Konzentrationen des Rezeptors mit solchen mit niedrigeren oder nicht nachweisbaren abwechselten. Die mit Gold markierten GPIIb Rezeptoren waren vor allem im Bereich der peripheren, äußeren, unteren Enden der Tether nachzuweisen, also genau in den Kontaktbereichen mit der adhäsiven Oberfläche, den DAPs. Im Vergleich dazu konnte auf der entfernten Seite der Kontaktfläche eine geringere Dichte der Rezeptoren nachgewiesen werden (siehe Abb. 9 B, C und F sowie 10 B, C und F).

Abbildung 9

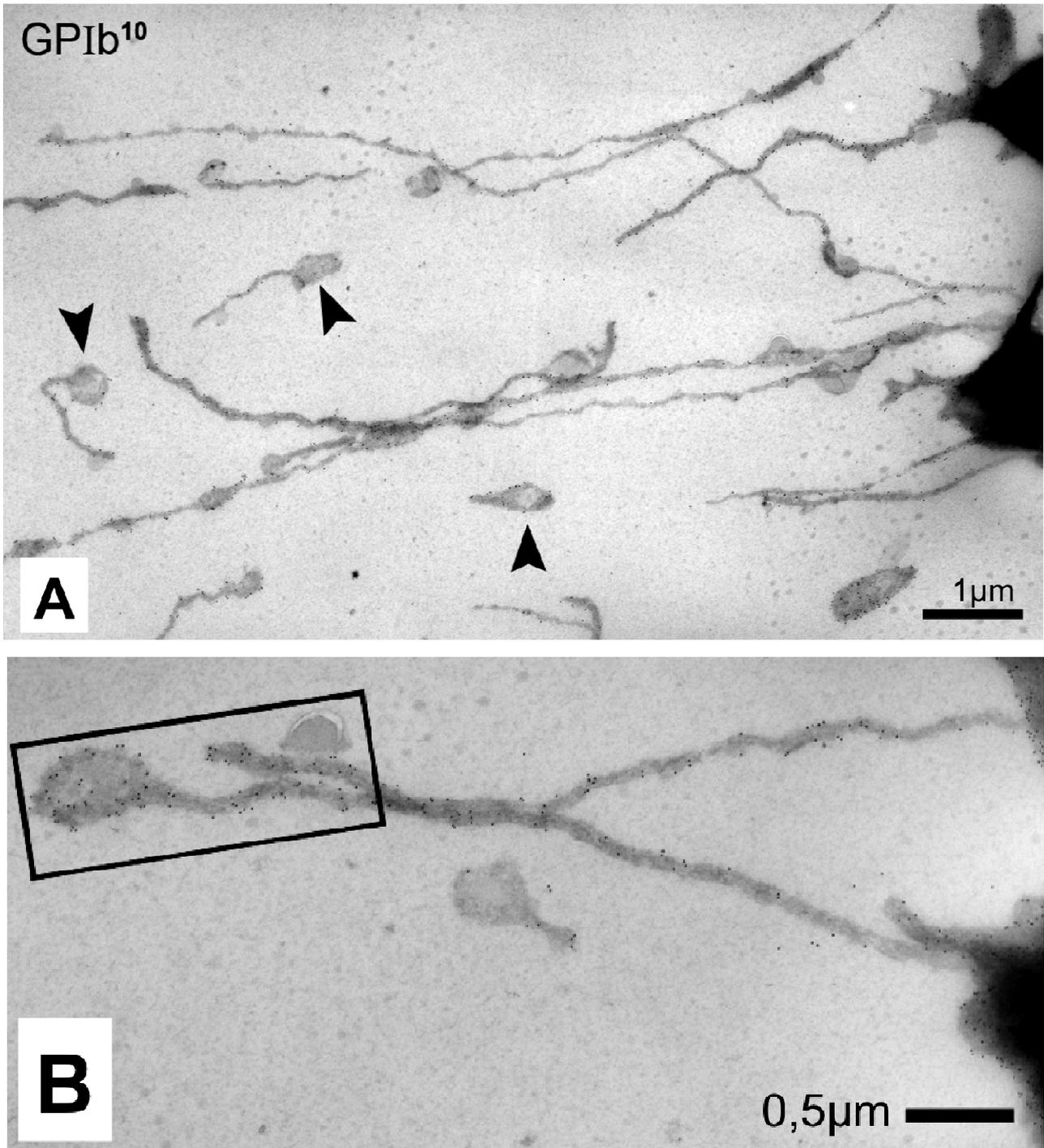
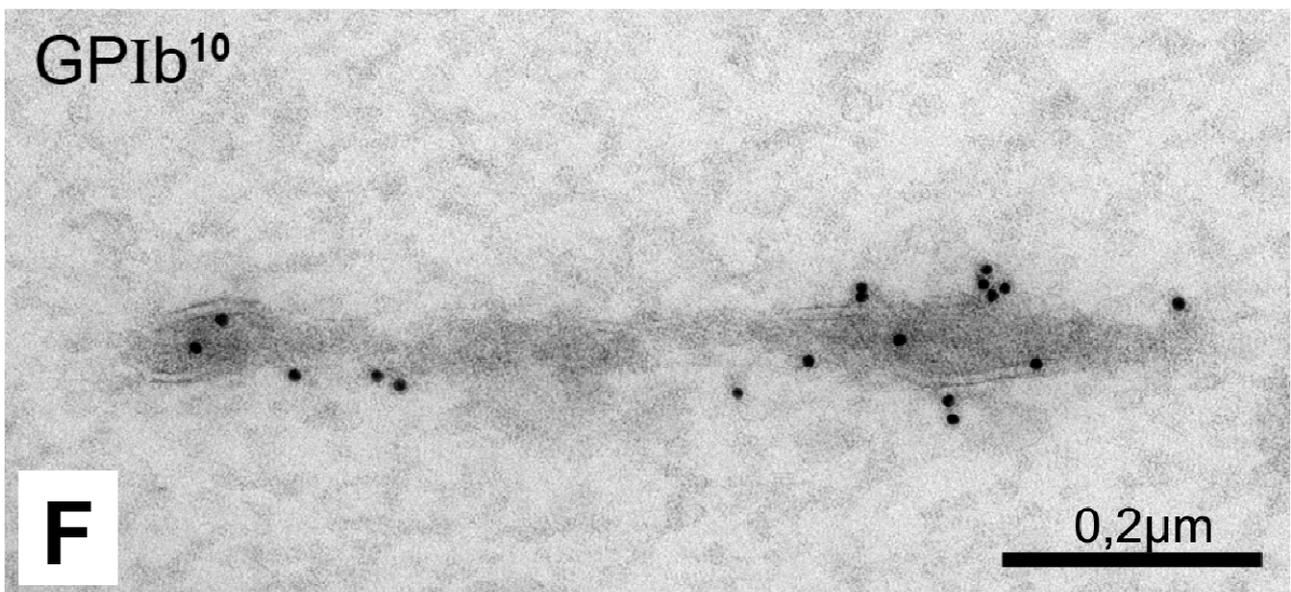
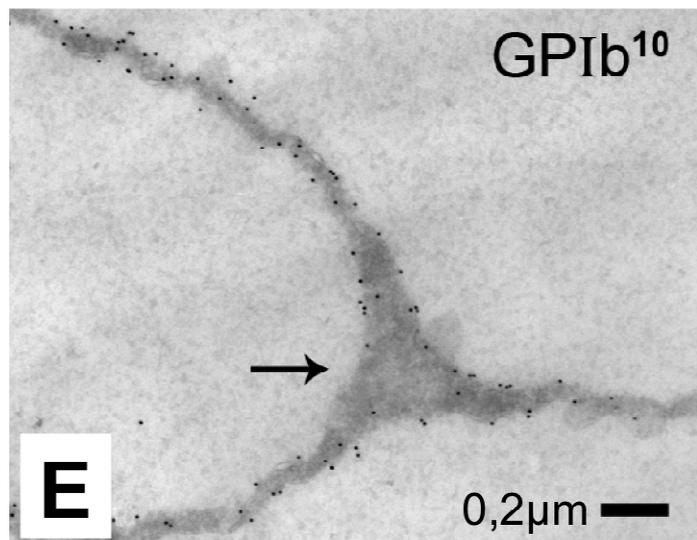
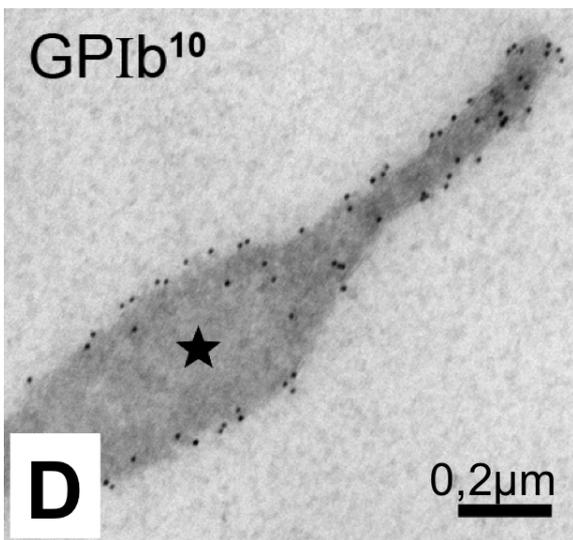
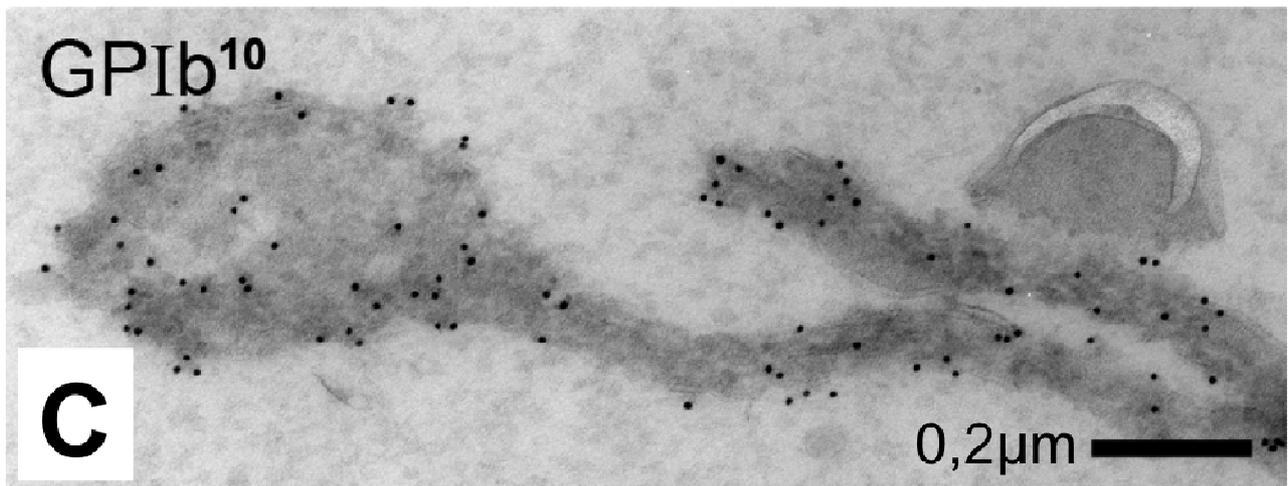


Abbildung 9

Mit Natriumzitat antikoaguliertes Blut wurde mit Scherraten von 30000 s^{-1} über EM-Gitter (als Partikelpräparate), die zuvor bereits mit rekombinanter VWFA1-Domäne beschichtet waren, perfundiert. Anschließend erfolgte eine Perfusionsfixierung. Die entnommenen Gitter wurden mit Anti-GPIb Antikörpern markiert, die dann wiederum mit an Protein A gebundenen 10 nm großen Goldpartikeln gekoppelt wurden (GPIb 10).

(A-C) Beispiele von verankerten Tethern, auf denen tubuläre und globuläre Domänen zu erkennen sind, wobei letztere die sogenannten DAPs darstellen (mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet). (B-D) Auf dem knopfartig aufgeweiteten Tetherende (DAP) ist vor allem peripher und nicht in den zentralen Bereichen der Rezeptor GPIb zu finden. (E) zeigt einen aufgespaltenen Tether, der auch im Bereich der Bifurkation (einem DAP ähnlichen Bereich) eine randständige GPIb Verteilung aufweist. (F) Auf diesem abgetrennten, tubulären Tether sind einzelne Bereiche mit sehr unterschiedlicher GPIb Verteilung zu sehen.

Modifiziert nach (Reininger et al. 2006)



Auch durch die Transmissions-Immun-elektronenmikroskopische Analyse von Schnitten fixierter Proben nach Perfusionsversuchen über melaminbeschichteten Deckgläsern (siehe Abb. 10 A-F) konnten die einzelnen markierten Rezeptorkomplexe

lokalisiert werden. Sie befanden sich zum Großteil in dem engen Zwischenraum zwischen der beschichteten Oberfläche und der abluminalen Membran des Thrombozyten, also genau in dem Bereich, in dem die Interaktion von GPIb und VWF stattfindet.

Diese Bereiche mit hoher GPIb Dichte sind höchstwahrscheinlich die Äquivalente der mit RICM als schwarz nullter Ordnung abgebildeten Bereiche, und damit würde es sich um DAPs handeln. Nicht nur im Bereich der DAPs, sondern auch auf den dünnen Tethermembranen und der Oberfläche der Thrombozyten konnte der Rezeptor GPIba nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 9 D-F und 10 D-F).

Ebenfalls war im offenen kanalikulären System der Thrombozyten eine hohe Rezeptordichte von GPIb erkennbar (siehe Abb. 10 A-C). Dies bewies zum einen die adäquate Funktion der Immunmarkierungen – eine zufällige Verteilung oder Artefakte sind mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. Zum anderen erklärt es auch, wie an ausgestülpten Tethern eine funktionell hohe Konzentration der GPIb Rezeptoren vorliegen kann. Das offene kanalikuläre System dient bei der Tetherbildung als Membranreservoir, aus denen die Zellmembran für die langen Membranschläuche „rekrutiert“ wird. Deshalb beinhaltet die Membran der Tether die gleichen Rezeptoren und Membranbestandteile, die die Membranen des offenen kanalikulären Systems charakterisieren.

Abbildung 10

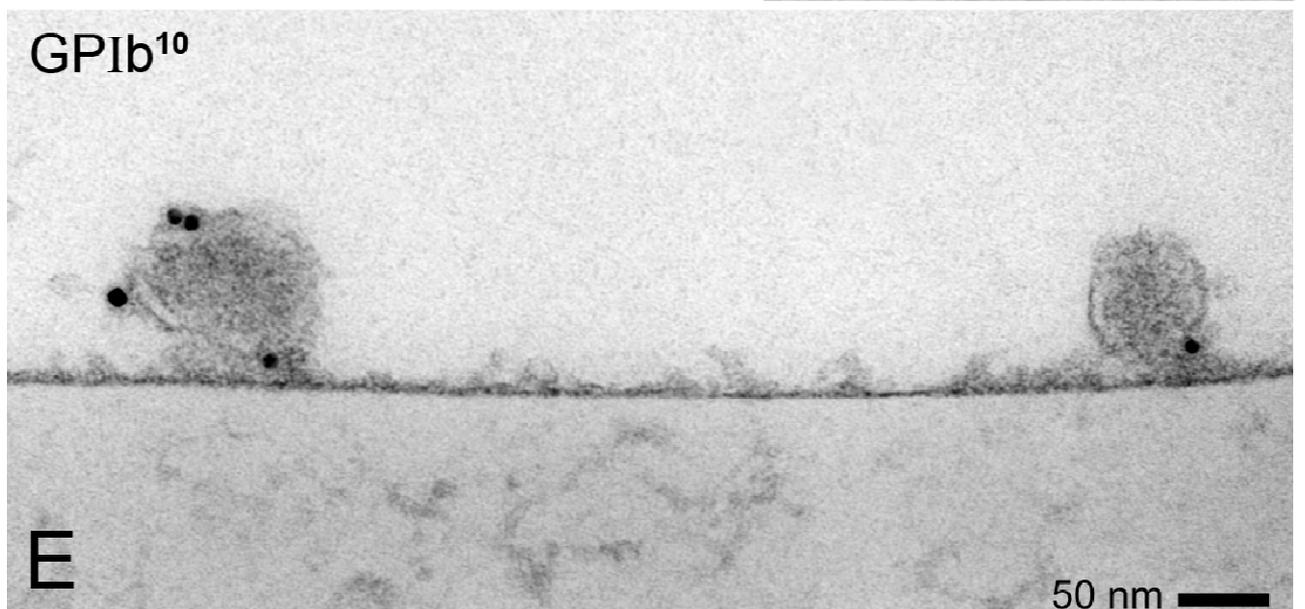
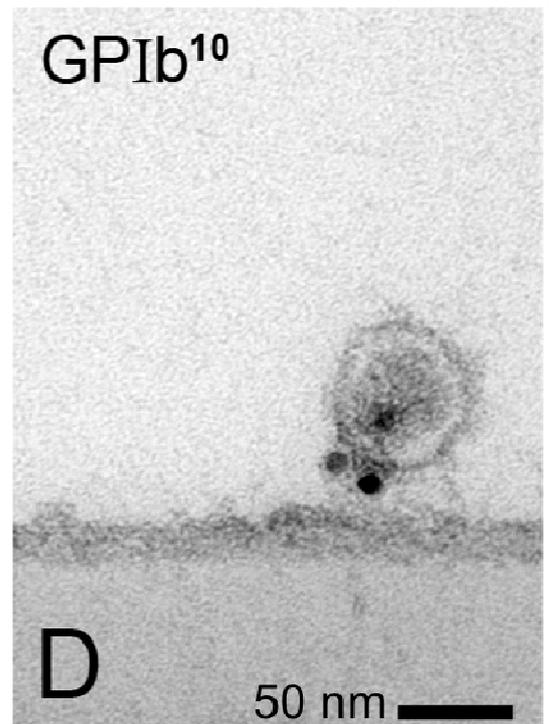
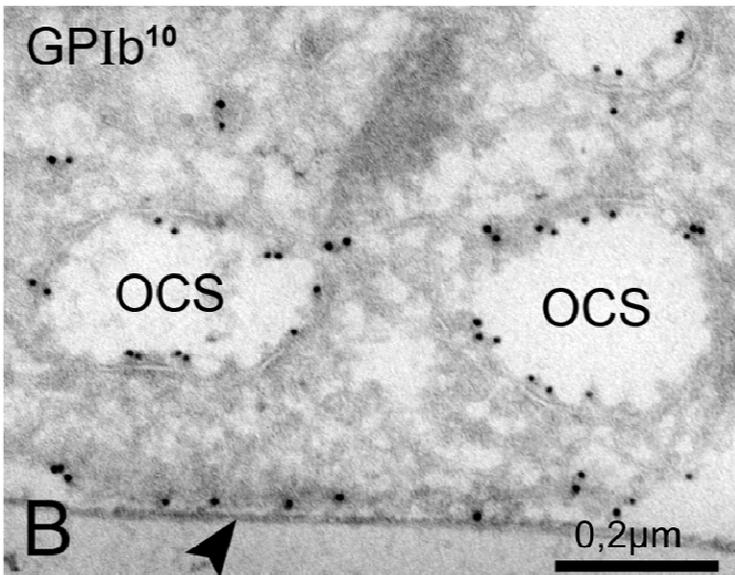
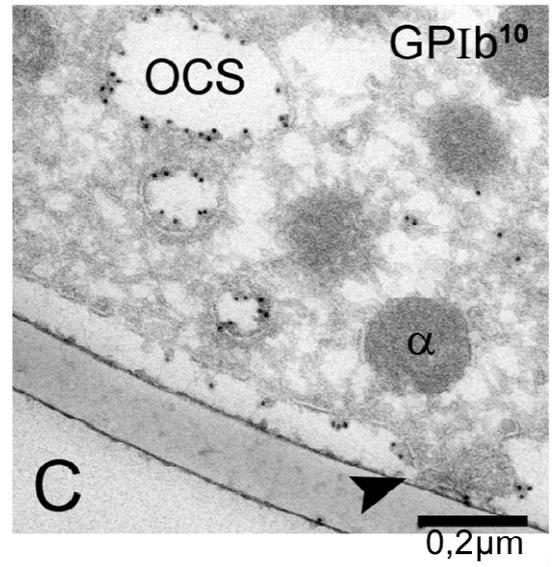
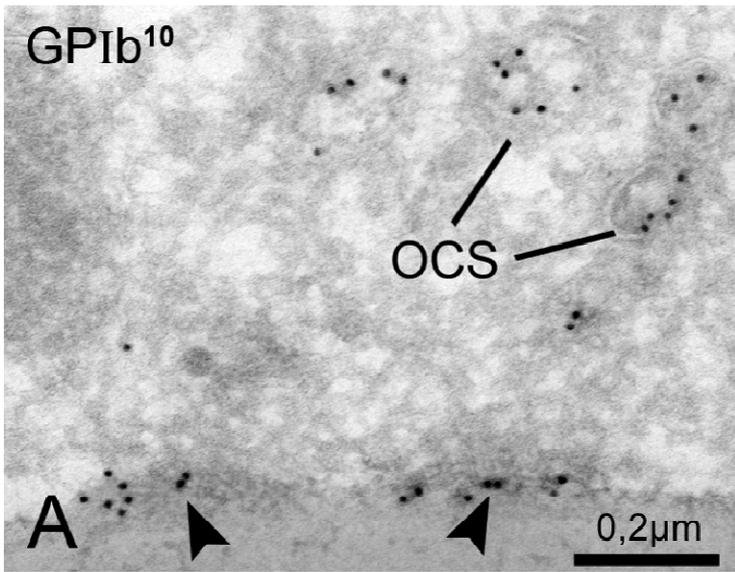
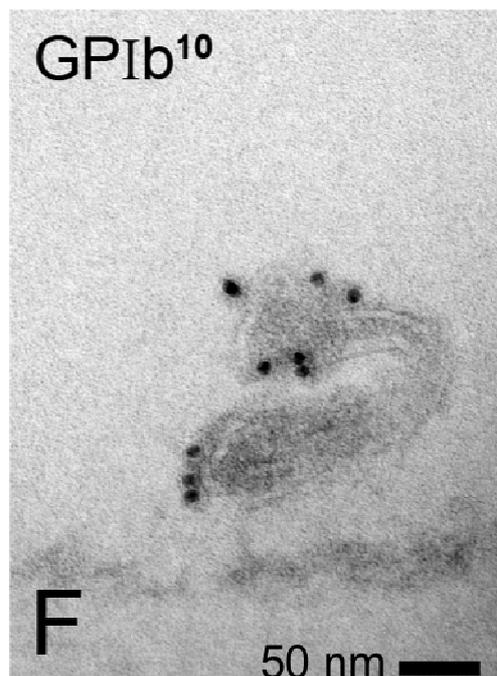


Abbildung 10

Transmissions-Immun-elektronenmikroskopische Analyse von Tethern und angeschnittenen DAPs: Die Flussexperimente wurden über melaminbeschichteten Deckgläsern, auf denen zusätzlich dVWFA1 aufgebracht wurde, durchgeführt. Die Immunmarkierungen entsprechen den im Text zu Abbildung 9 beschriebenen. Auf den Bildern sind DAPs verschiedener Größen (**A-C**) sowie quer angeschnittene Tether (**D-F**), die an der dVWFA1 Domäne haften, zu sehen.

(**A-B**) Im Querschnitt erscheinen die DAPs als dunklere Membranbereiche die sich in direktem Kontakt zur reaktiven Oberfläche befinden. In diesen Anteilen der Membranen ist eine sehr hohe Konzentration von GPIb vorhanden, die Rezeptorkomplexe sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Auch im offenen kanalikulären System kann GPIb nachgewiesen werden. (**C**) Ein DAP liegt an der reaktiven Oberfläche direkt an, während sich der Rest der Membran davon abhebt. Es handelt sich um einen gerade neu entstehenden Tether. (**D-F**) Darstellung von GPIb auf quer angeschnittenen Tethern.

Modifiziert nach (Reininger et al. 2006)



4.7. Adhäsionsrezeptoren und prokoagulatorische Moleküle auf Plättchen, DAPs und Tethern

GPIb α konnte nicht nur im Bereich der Plättchenkörper, sondern auch auf den Membranen der Tether und Mikropartikel nachgewiesen werden (siehe Abb. 9 A-F). Dies bietet eine Erklärung dafür, dass es möglich ist, dass Tether und Mikropartikel weiter mit der mit VWF beschichteten Oberfläche interagieren, und sich weiter über sie fortbewegen, obwohl sie bereits von den Thrombozyten, aus denen sie entstanden waren, abgetrennt wurden (siehe Abb. 7 D).

Ebenfalls konnte - wenn auch in geringem Ausmaß - Tissue Factor auf den konfokalmikroskopischen Bildern (siehe Abb. 12) nachgewiesen werden. Wie zu erwarten war, konnte auch das Vorhandensein von Integrin α IIb β 3 mit durchflusszytometrischen Analysen gezeigt werden. (Daten nicht veröffentlicht)

F-Aktin, das in unstimulierten Thrombozyten das Zytoplasma ausfüllt, und damit die Zellmembran stabilisiert, konnte mittels Immunfluoreszenzmarkierung in den Plättchenkörpern dargestellt werden. Teilweise konnte es auch in schmalen Abschnitten der Tether sowie in deren knopfartigen Erweiterungen nachgewiesen werden (siehe Abb. 11 A und B).

In Mikropartikeln und Tethern, die aus zuvor mit Cytochalasin D inkubierten

Thrombozyten entstanden waren, war es nicht möglich Aktin nachzuweisen (siehe Abb. 11 C-D). Durch die Zugabe von Cytochalasin D wurde die Aktinpolymerisation in den Zellen verhindert.

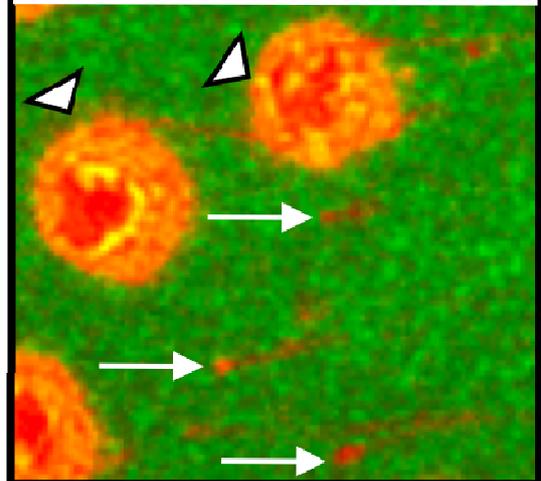
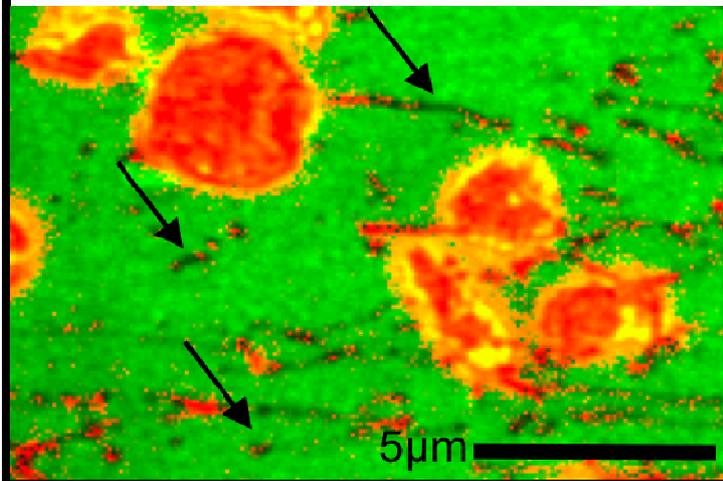
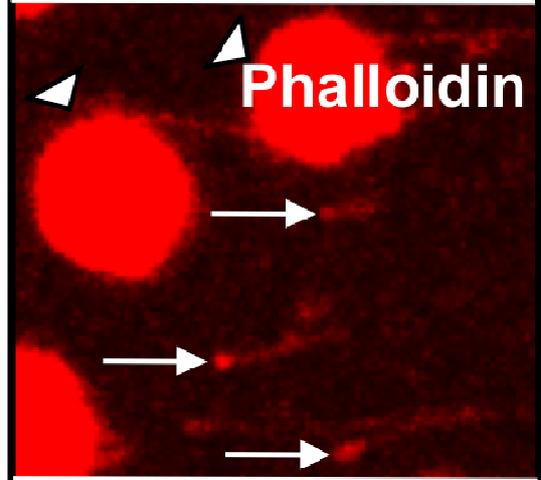
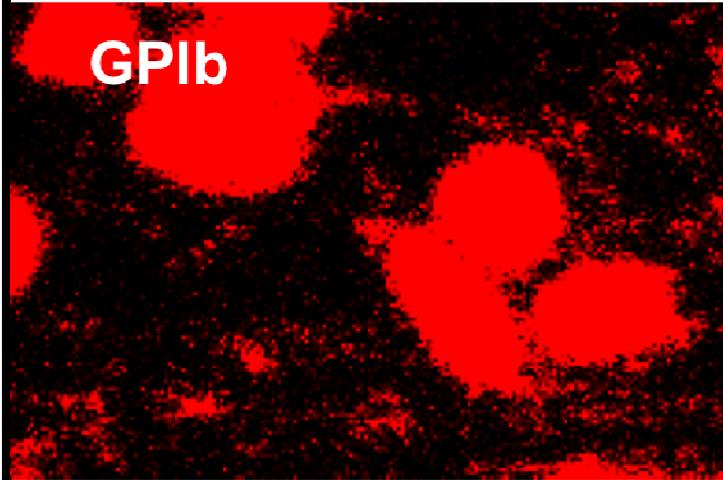
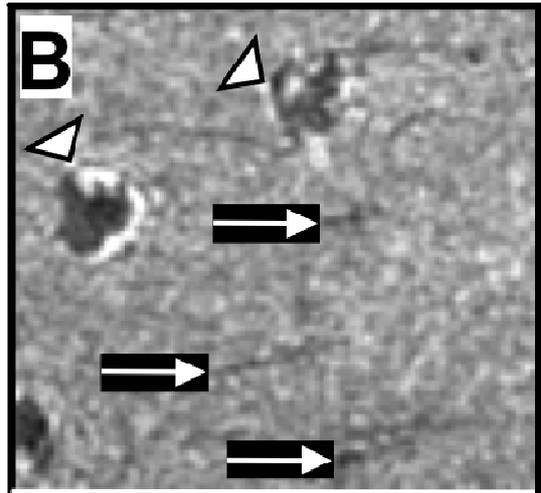
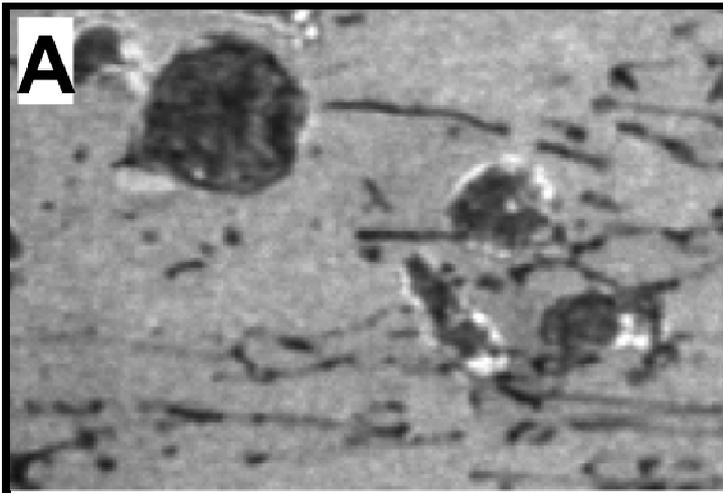
Abbildung 11

Immunfluoreszenzbasierte konfokale Mikroskopie: Analyse von GPIb und F-Aktin in perfusionsfixierten Thrombozyten, Tethern und Mikropartikeln:

Wie bereits beschrieben wurde Blut über eine mit immobilisiertem dVWFA1 beschichtete Oberfläche perfundiert. Es wurden Scherraten von 30000 oder 40000 s^{-1} gewählt.

Modifiziert nach (Reininger et al. 2006)

(A-B) Die zwei obersten schwarz/weißen Bilder wurden mit RICM aufgenommen, die Bilder der mittleren und unteren Reihe wurden mit Immunfluoreszenzmarkierter, konfokaler Mikroskopie erstellt, wobei die linke Spalte **(A)** mit Anti GPIb, die rechte Spalte **(B)** mit Phalloidin (zur Darstellung von F-Aktin) markiert wurde. Bei den beiden Bildern der untersten Reihe handelt es sich um eine Übereinanderlagerung der zwei Bildarten. Die weißen Pfeile zeigen auf Tether und Mikropartikel, wohingegen die Pfeilspitzen Thrombozyten markieren. Mit Phykoerythrin (PE) gekoppelte Antikörper gegen GPIb **(A)** zeigen an der Membranoberfläche vorhandene Rezeptoren. Es stellen sich einige Abschnitte von Tethern und Mikropartikeln dar, an denen kein GPIb nachweisbar ist (schwarze Pfeile). Dies impliziert eine heterogene Verteilung der Rezeptoren, was auf eine Umverteilung in Form von Rezeptorbündelung (Clustering) schließen lässt. Die gewonnenen Erkenntnisse stimmen mit denen aus der Transmissions-Immun-EM (Abbildungen 9 und 10) überein. **(B)** PE Fluoreszenzmarkierungen mit Phalloidin, zur Darstellung von F-Aktin, zeigen trotz niedriger Signalintensitäten eine Übereinstimmung der angefärbten Bereiche mit den in der RICM zu erkennenden Mikropartikeln und Tethern.



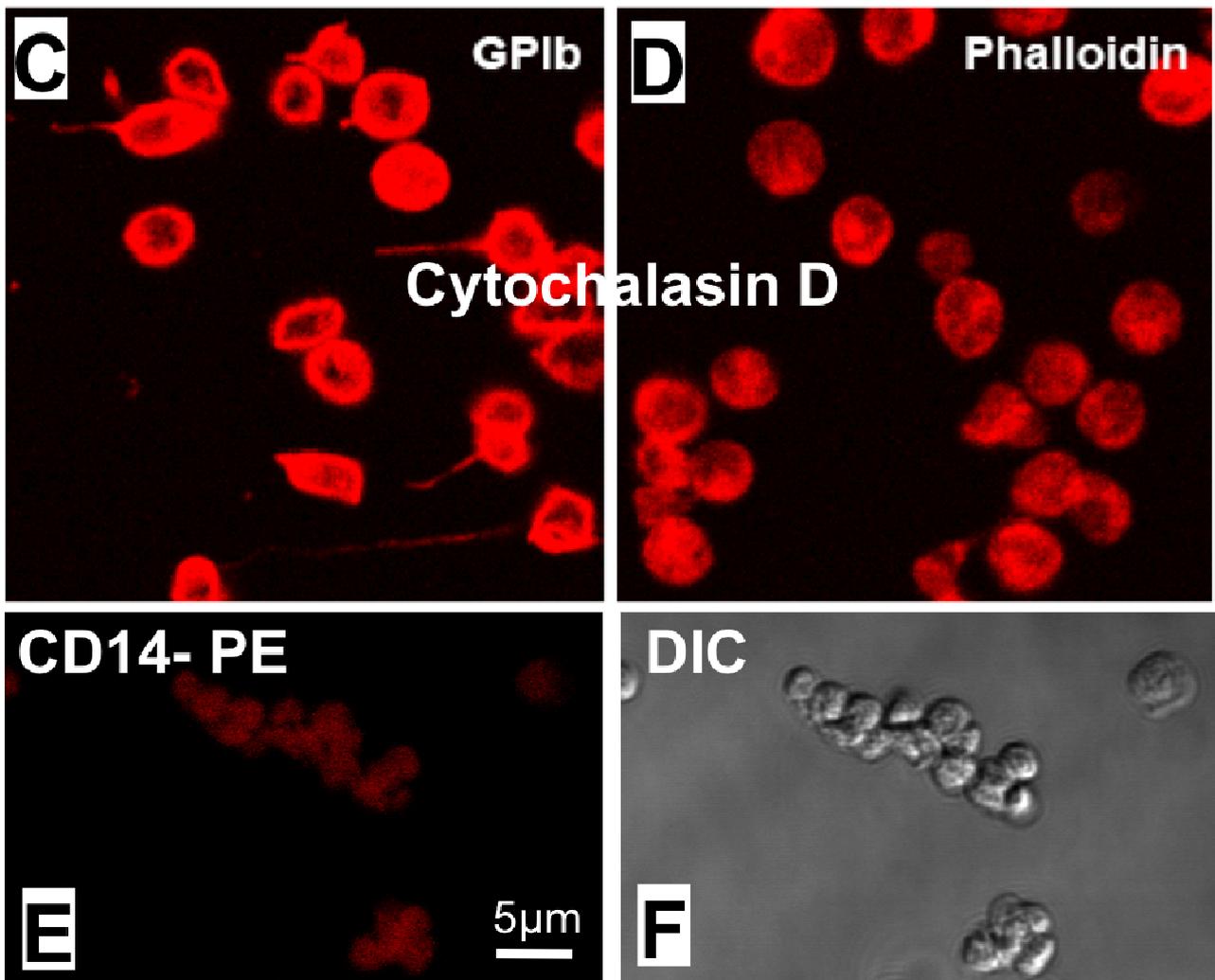


Abbildung 11
(C und D)

Auf mit Cytochalasin D behandelten Thrombozyten und deren Tethern und Mikropartikeln ist GPIb (Cy3) deutlich zu erkennen (C). Dahingegen kann die Markierung von F-Aktin mit Phalloidin (Rhodamin) (D) nur im Zellkörper und nicht in den Tethern nachgewiesen werden. (E) Der spezifische Monozytenmarker CD14 konnte auf Thrombozyten, Tethern und Mikropartikeln nicht gefunden werden. Sie zeigten nur ein leichtes unspezifisches Signal. (F) zeigt ein Differential-Interferenz-Kontrast Bild (DIC) des in (C-E) gezeigten Sichtfeldes.

Modifiziert nach (Reininger et al. 2006)

Zur Kontrolle der Antikörpermarkierungen führten wir zum Vergleich auch Markierungen mit dem Monozytenmarker CD 14 durch. Dieser konnte in sehr geringem Ausmaß auf Plättchen, Tethern und Mikropartikeln nachgewiesen werden. Dies wurde von uns aber aufgrund der sehr geringen Intensität als unspezifisches Signal, und nicht als tatsächlich vorliegende monozytäre Antigene auf Thrombozyten gewertet.

Die Markierung der Proben mit Anti-TF Antikörpern zeigte eine, wenn auch geringe,

Fluoreszenz auf Plättchen, Tethern und Mikropartikeln (siehe Abb. 12 A und B). Aufgrund zahlreicher durchgeführter Versuche und bestätigender Hinweise in der Literatur (Arbeiten der Forschungsgruppe von Andy Weyrich) gehen wir jedoch davon aus, dass es sich bei den Immunmarkierungen um einen Nachweis geringer Mengen TF auf Thrombozyten und den aus ihnen hervorgehenden Strukturen handelt.

Abbildung 12

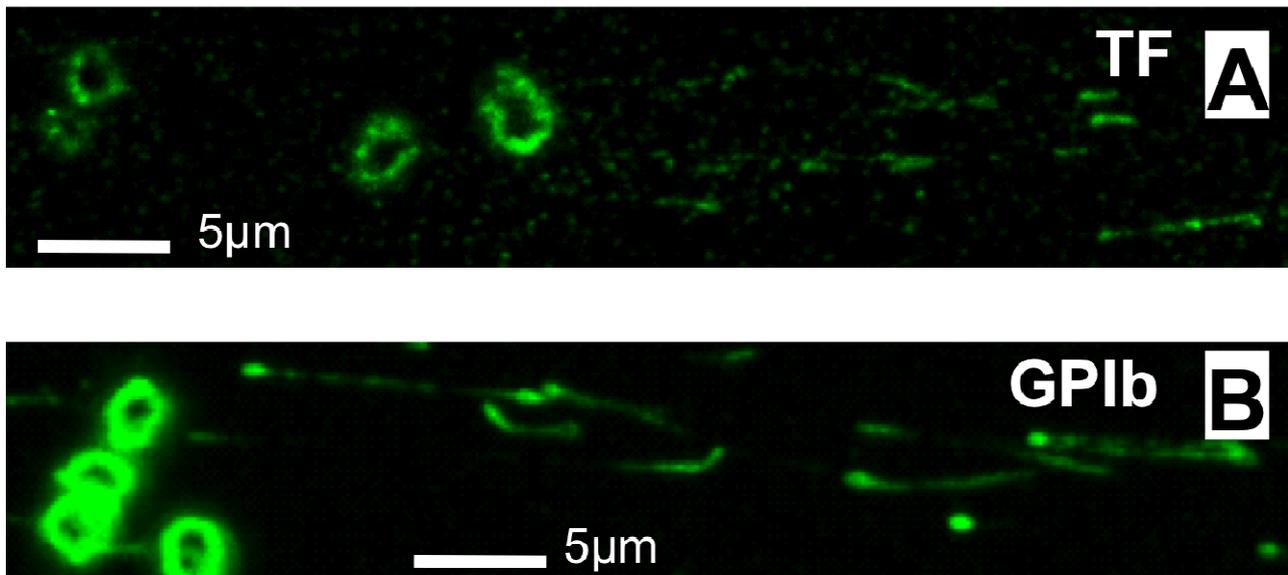


Abbildung 12

Vergleichende Fluoreszenzmarkierung von Thrombozyten sowie deren Tethern und Mikropartikeln mit Fluorescein-Isothiocyanat markierten Antikörpern gegen GPIb (**B**) sowie gegen Tissue Factor (**A**). Ein stärkeres Fluoreszenzsignal für GPIb (**B**) im Vergleich zu dem für TF (**A**) ist deutlich zu erkennen.

Modifiziert nach (Reininger et al. 2006)

4.8. Scherkraftinduzierte Bildung von Mikropartikeln

Auch in nativen Blutproben gesunder Probanden ist eine geringe Anzahl von Mikropartikeln enthalten. (Bretelle et al.) Gerade deshalb war es für die quantitativen Analysen der Mikropartikelentstehung unter Vollblutströmung essentiell, die Ergebnisse mit solchen von Analysen aus Nativblut zu vergleichen.

Der Nachweis erfolgte neben den bereits beschriebenen visuellen Darstellungen auch durchflusszytometrisch. Dabei konnten wir feststellen, dass die Anzahl der

gemessenen Thrombozyten und Mikropartikel über mehrere Stunden stabil war. Die in den Flussexperimenten über immobilisiertem VWF gebildeten Mikropartikel konnten nach dem Versuch jeweils in dem durch die Kammer geflossenen Blut gesammelt werden. Aufgrund des Versuchsaufbaus war das verwendete Vollblut nach Durchführung des Experiments in geringer Menge mit Puffer verdünnt. Dies wurde durch Hinzufügen von exakt der gleichen Menge desselben Puffers zu dem nativen Vergleichsblut ausgeglichen.

Bei der durchflusszytometrischen Auswertung mittels Fluoreszenzmarkierungen der Thrombozyten und Mikropartikel zeigten sich folgende Veränderungen: Während die Anzahl der Thrombozyten sich nach Durchführung der Experimente nur geringfügig änderte, nahm die Zahl der Mikropartikel deutlich zu. Sie betrug nach Durchfluss durch die Strömungskammer für je eine Minute 5,3 bis 8,6 mal soviel wie die Ausgangswerte der Mikropartikel in nativem Blut. Diese Bandbreite der unterschiedlichen Werte ergab sich vor allem dadurch, dass zur Detektierung der Mikropartikel zwei verschiedene Antikörper verwendet wurden, zum einen Antikörper gegen GPIIb, zum anderen solche gegen Integrin α IIb β 3 (siehe Abb. 13).

Bereits vor Durchführung der Experimente lagen deutlich unterschiedliche Ausgangswerte von Mikropartikeln vor, während sich die Werte nach Perfusion nur innerhalb eines Prozentpunktes unterschieden. Grund dafür könnten die interindividuellen Schwankungen oder die Verwendung unterschiedlicher Rezeptor-Antikörper sein.

Abbildung 13

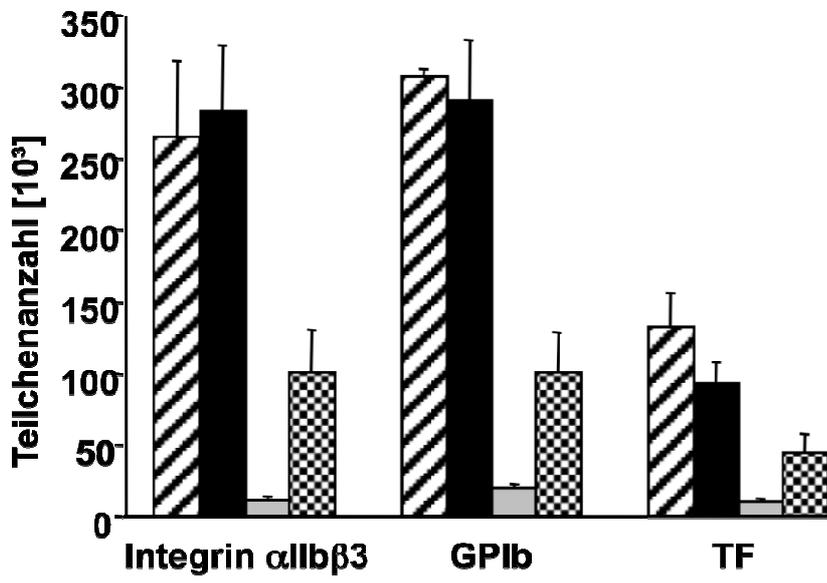


Abbildung 13

Durchflusszytometrische Analyse der scherkraftinduzierten Bildung prokoagulatorischer Mikropartikel: In dem mit Natriumzitat antikoagulierten Blut erhöhte sich die Anzahl der Mikropartikel, aber nicht die der Plättchen nach Fluss über die dVWFA1 beschichtete Oberfläche mit Scherraten von 30000 s^{-1} . Die FACS Analysen wurden nach Zentrifugation des Blutes mit PRP durchgeführt. Durch Markierung von Integrin αIIbβ3 oder GPIb wurden die Mikropartikel identifiziert, zur weiteren Analyse erfolgte eine Markierung mit Anti-TF-Antikörpern. Die Anzahl der Mikropartikel, die TF auf ihrer Membran enthielt, betrug etwa die Hälfte aller thrombozytären Mikropartikel. Modifiziert nach (Reininger et al. 2006)

-  Thrombozytenanzahl vor Kammerdurchfluss
-  Thrombozytenanzahl nach Kammerdurchfluss
-  Mikropartikelanzahl vor Kammerdurchfluss
-  Mikropartikelanzahl nach Kammerdurchfluss

Vor den Flussexperimenten zeigte annähernd die Hälfte aller Blutplättchen geringe Mengen von Tissue Factor auf ihrer Oberfläche, nach Fluss ergab sich eine leicht geringere, jedoch nicht signifikant unterschiedliche Anzahl (siehe Abb. 13). Die Anzahl der Tissue Factor tragenden Mikropartikel betrug nach Kammerdurchfluss die 4,4-fache Menge der zuvor gemessenen Werte. Insgesamt konnte auf 44% der GPIb- oder Integrin αIIbβ3-tragenden und damit thrombozytären Mikropartikel ebenfalls Tissue Factor nachgewiesen werden.

5. Diskussion

5.1. Discrete Adhesion Points (DAPs) als „Quantum Unit“ der Plättchenadhäsion sowie der Mikropartikel- und Tetherentstehung

Unsere Experimente ermöglichten die kleinste strukturelle und funktionelle Einheit der Plättchenadhäsion an immobilisiertem VWF bei sehr schnellen Strömungsgeschwindigkeiten zu definieren, die wir als DAP (Discrete Adhesion Point) bezeichneten. Diese morphologische Region ist der Bereich, der im Rahmen der Interaktion eines Thrombozyten mit von Willebrand Faktor die kleinste Entfernung zu den adhäsiven Oberflächen besitzt, und damit den Bereich darstellt, der für die Bindung eines Plättchens an reaktiven Gefäßoberflächen verantwortlich ist.

Abbildung 10 C zeigt den Beginn einer Tetherentstehung. Durch die Verankerung eines kleinen Membrananteils innerhalb eines DAPs und das Einwirken der hydrodynamischen Strömung des Blutes auf den Thrombozyten ergibt sich ein Mechanismus, der durch Dehnen der Membran Tether, und schließlich bei Auseinanderreißen der Zellmembran, Mikropartikel entstehen lässt (siehe Abb. 7 D und E). Dieses Phänomen tritt insbesondere bei hohen Scherraten auf, also vor allem in Gefäßen, die bereits pathologisch verändert sind.

Für die Bildung von Tethern in Bereichen mit geschädigtem Endothel und somit freiliegenden, subendothelialen Strukturen ist die Bindung von VWF an GPIIb/IIIa Voraussetzung. Um Tether bei Scherraten von 10000 s^{-1} nachweisen zu können, muss die Dichte des aufgetragenen VWF auf der Glasoberfläche in etwa 1000 Moleküle pro μm^2 betragen, um eine Thrombozytenadhäsion in unseren Strömungsexperimenten zu ermöglichen. Dies entspricht etwa 50 VWF-Molekülen auf einer Fläche von 0,05 bis 0,1 μm^2 – was der durchschnittlichen Kontaktfläche eines DAPs entspricht.

Wenn man annimmt, dass 25000 GPIIb/IIIa Rezeptoren (Lopez) gleichmäßig auf der Oberfläche eines ruhenden Thrombozyten mit einem maximalen Durchmesser von etwa 4-5 μm (errechnet für ein vollkommen ausgebreitetes Plättchen, ohne Membranoberfläche im offenen kanalikulären System) verteilt sind (White et al.), enthält ein DAP von 0,05 bis 0,1 μm^2 somit etwa 60-100 GPIIb/IIIa Moleküle. Diese Anzahl kann durch Zusammenlagerung (Clustering) von Rezeptoren noch erhöht werden. Die Plättchenadhäsion würde durch eine erhöhte Rezeptordichte begünstigt. (Ruggeri et al. 1999)

Die errechnete Anzahl von GPIIb/IIIa Rezeptoren in einem DAP ist gut vereinbar mit

der funktionellen Dichte von VWFA1, die benötigt wird, um Thrombozyten bei hohen Blutfließgeschwindigkeiten abzubremsen. In einem Stromgebiet, in dem Scherraten von 40000 s^{-1} vorherrschen, kann ein DAP Kräften bis zu 160 pN standhalten, was demnach pro Bindung 1,6 pN entsprechen würde, wenn man von 100 gleichzeitig ausgebildeten Bindungen ausgeht. Dieser Wert wiederum rangiert in der gleichen Größenordnung wie die Bindungsstärken zwischen 6,5 pN und 8,8 pN, die für eine einzelne GPIIb/IIIa-VWF Bindung ermittelt wurden. Die genannten Vergleichswerte stammen aus einer Publikation von Arya et al., in denen die Kräfte bestimmt wurden, die nötig sind, um mit VWF überzogene Perlen von GPIIb/IIIa exprimierenden ovariellen Zellen chinesischer Hamster zu lösen. (Arya et al.)

Bei den Strömungsexperimenten über mit Kollagen beschichteten Oberflächen konnten wir zwar eine deutliche Bildung von Tethern, jedoch keine signifikante Entstehung von Mikropartikeln beobachten. Grund dafür könnte zum Beispiel die geringe Konzentration von Kollagenfasern als reaktive Oberfläche sein, die jedoch notwendig ist um mikroskopische Analysen durchführen zu können. Auch ist es möglich, dass zwar eine relevante Mikropartikelbildung stattfindet, diese aber aufgrund der Verwendung nur geringer Mengen Blut und aufgrund des zwischengeschalteten Schrittes des plasmatischen VWF nicht signifikant ist, da nicht genug Interaktionen zwischen den Thrombozyten und Kollagen stattfinden.

5.2. DAPs und Tether verändern die Kraftgrößen der Thrombozytenadhäsion

5.2.1. Kräftediagramm der Mikropartikel- und Tetherentstehung

Abbildung 14 zeigt die Veränderung der wirkenden Kräfte im Rahmen der Mikropartikelentstehung. F_s stellt die Scherkraft dar, die bei der initialen Interaktion an den am DAP angehafteten Thrombozyten angreift. Der Kraftvektor entsteht aus der Scherkraft, die auf der x-Achse aufgetragen ist und dem Vektor der y-Achse. Letzterer ergibt sich aus dem Drehmoment, das auf den Plättchenkörper einwirkt.

Durch DAPs und Tetherbildung ändert sich das Drehmoment und damit auch die Kraft, die in der y-Achse wirkt. Somit ändert sich der Winkel in dem der Kraftvektor auf die interagierenden Zellen wirkt, er greift die Zelle dadurch in anderer Richtung an. Die parallel zur x-Achse wirkende Scherkraft erhält eine größere Bedeutung, die Rotationsbewegung der Zelle ist weniger bedeutend. Dadurch wird die Zelle direkter mit dem Blutstrom

bewegt, dies begünstigt die Tetherbildung.

Nach der Bindung der Zelle an einem DAP wirken somit zunächst starke Rotationskräfte, die auch bei der Translokation der Zellen eine entscheidende Rolle spielen (siehe Abb. 6 A). Nach der Entstehung von Tethern werden diese Rotationskräfte relativ geringer, die Scherkräfte parallel zur Flussrichtung erhalten mehr Bedeutung, die y-Komponente des Kraftvektors ist geringer.

Sobald der Plättchenkörper von dem verankerten DAP getrennt ist entfällt das Drehmoment. Der Kraftvektor verläuft parallel zur x-Achse.

Abbildung 14

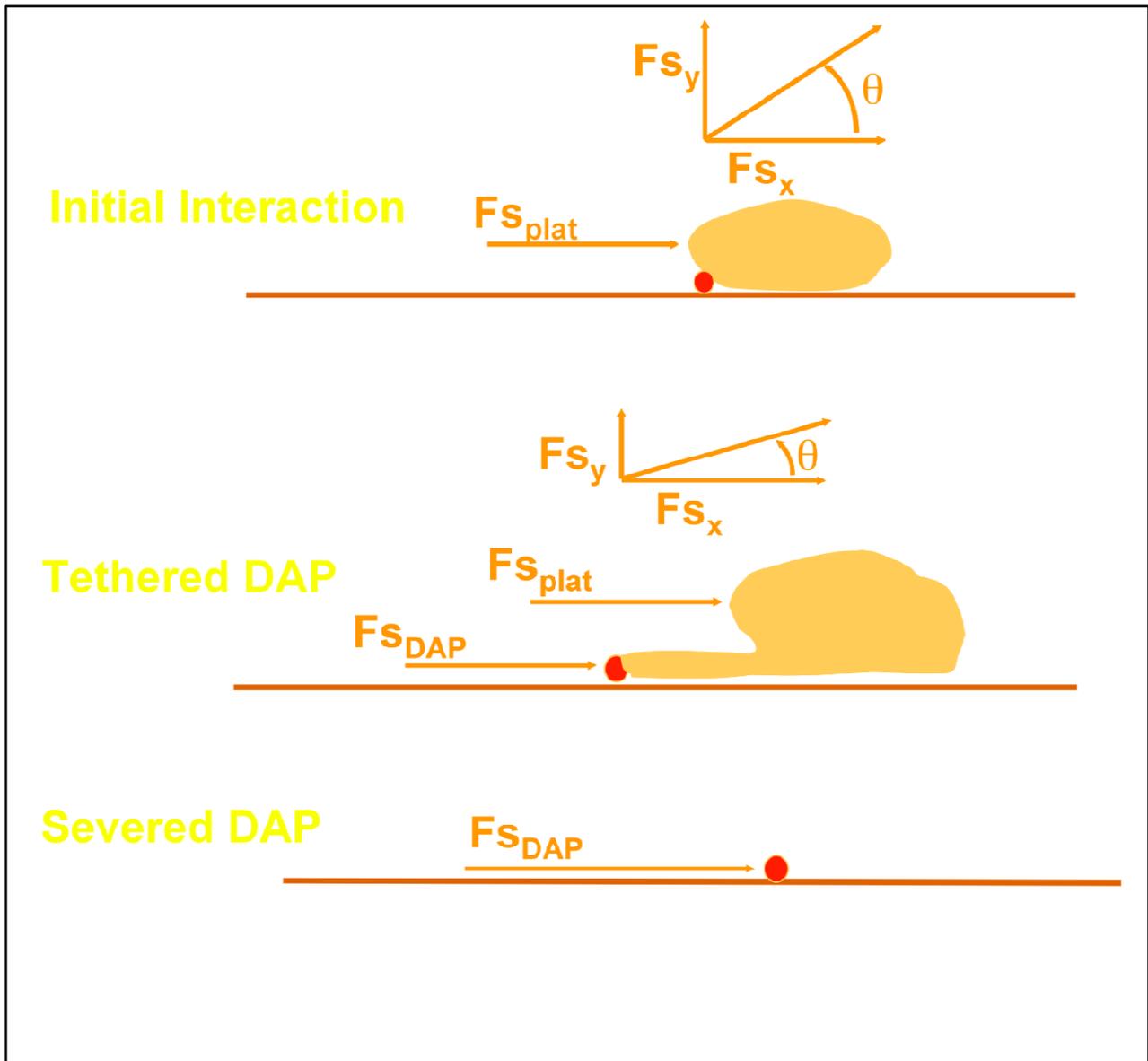


Abbildung 14

Im Rahmen der Tether- und Mikropartikelentstehung wirkt jeweils ein Kraftvektor auf die Zelle, der sich aus dem Drehmoment und der wirkenden Scherkraft ergibt. Dieser verändert sich durch Verankerung der Zelle an einem DAP (Initial Interaction), Tetherbildung (Tethered DAP) und auch durch Mikropartikelentstehung nach Abtrennung des Tethers (Severed DAP). Mit Abnahme des Drehmoments wird der Kraftvektor zur x-Achse geneigt.
(Nach Reininger AJ, nicht publiziert)

5.2.2. Veränderung der Rezeptordichte innerhalb der DAPs

Die Verteilung der hohen Adhäsionskräfte über mehrere Bindungen könnte eine Voraussetzung dafür sein, dass Plättchen unter arteriellen Flussgeschwindigkeiten adhären können. DAPs stellen dabei die strukturelle Einheit dar, innerhalb derer die Koordination der multivalenten GPIIb α -VWF Interaktionen stattfinden. Die zusammenwirkenden Adhäsionskräfte von einem oder mehreren DAPs können so den dynamischen Fließkräften zumindest zeitweise standhalten und ein im Blutstrom fließendes Plättchen für einige Zeit an einem Ort gebunden halten (siehe Abb. 6 A). Wenn die hydrodynamischen Kräfte stärker sind als diejenigen, welchen ein oder mehrere DAPs standhalten können, wird der Thrombozyt mit dem Strom mitgetragen, wenn es nicht zuvor schon an einer anderen Stelle ebenfalls zu einem weiteren adhäsiven Kontakt zwischen dem Plättchen und der VWF-Oberfläche gekommen ist. So kann sich ein Thrombozyt rollend über die mit VWF beschichtete Oberfläche fortbewegen, was sowohl bei niedrigen, als auch bei hohen Scherraten auftritt.

Alternativ zu der rollenden Fortbewegung kann es zur Bildung von Tethern kommen, wenn jedoch die wirkenden Scherkräfte die Dehnfähigkeit der Thrombozytenmembran übersteigen, dann erfolgt der Abriss oder die Zerreißung des Tethers und es können Mikropartikel entstehen.

Es ist nicht klar, ob die maximale Bindungsfähigkeit eines Plättchens an VWF nur innerhalb bestimmter Bereiche, also innerhalb der oben beschriebenen DAPs, liegt, oder ob prinzipiell an jeder Stelle der Membran durch Verlagerung der entsprechenden GPIIb α Rezeptoren ein Funktionsbereich eines DAPs entstehen kann. Eine mögliche Erklärung für das vermehrte Vorkommen dieser Rezeptoren innerhalb eines DAPs wäre, dass diese keine feste Verankerung am Zytoskelett der Zelle besitzen und die DAPs deshalb eine selektiv erhöhte prozentuale Verteilung der aneinander gelagerten GPIIb α Moleküle besitzen. Diese Umverteilung von Bindungsproteinen, die auch als Rezeptorclustering bezeichnet wird, wurde bereits zuvor als Ursache für eine erhöhte Bindungskapazität an VWF beschrieben. (Fox; Englund et al.) Bei diesem Rezeptorclustering handelt es sich um ein Zusammenlagern mehrerer Rezeptoren in einem bestimmten Bereich der Plasmamembran, bei der die zelluläre Integrität jedoch gewahrt wird. Dies reduziert die Kräfte, die auf eine einzelne Bindung einwirken. Auch kann die in den elektronenmikroskopischen Bildern gezeigte hohe Dichte von Rezeptorkomplexen im offenen kanalikulären System der Thrombozyten ein Reservoir darstellen, mit dem im

Bedarfsfall die Rezeptorendichte erhöht werden kann.

Es ist auch möglich, dass die Zugkräfte, die auf die Rezeptoren innerhalb der DAPs einwirken, auch auf jene Membrananteile verteilt werden, die nicht durch Aktin stabilisiert werden. Deshalb müssen höhere Scherraten als 6000 s^{-1} erreicht werden, damit Tether aus den Plättchen herausgezogen werden, da dann die wirkenden Scherkräfte die elastische Nachgiebigkeit der Membran übertreffen. Da sich für die Tetherbildung die Zellmembran des Thrombozyten vom Zytoskelett lösen muss, begünstigt das Rezeptorclustering somit die Trennung des Thrombozyten von dem aus ihm entstehenden Tether und somit auch die Bildung thrombozytärer Mikropartikel. Wenn sich jedoch zuvor die Ligandenbindungen innerhalb des DAPs diskonnektieren, dann kann es nicht zu dieser Abtrennung aus der Zelle kommen, der Tether löst sich dann von der adhäsiven Oberfläche ab und wird wieder in den Zellkörper des Thrombozyten integriert.

Wir haben beobachtet, dass die Tether- und Mikropartikelbildung neben den Scherkräften auch stark von der jeweiligen Beschichtungskonzentration der reaktiven Oberfläche abhängt. So kann es sein, dass bei manchen Kontakten in der kurzen Zeit der Interaktion nicht genügend Bindungen innerhalb eines DAPs eingegangen werden können, und so den wirkenden, starken Scherkräften nicht standgehalten werden kann und sich der Thrombozyt deshalb auf der adhäsiven Oberfläche weiter fortbewegt.

5.3. Die Tetherentstehung findet unabhängig vom zytoskelettären F-Aktin statt

Von großem Interesse ist die Rolle, die das Zytoskelett bei der Tetherbildung spielt. Anhand von Erythrozyten wurde bereits das Zusammenspiel von Zellmembranen und dem Zytoskelett der jeweiligen Zelle untersucht. Man geht davon aus, dass die Membran über das Zytoskelett gleitet und später aufgrund des starren Zytoskeletts rupturiert oder vollständig disloziert wird. (Hochmuth et al.) Die Entstehung von Tethern aus rollenden Plättchen setzt weder Veränderungen der Aktin- noch der mikrotubulären Strukturen des Zytoskeletts voraus. Auch ist sie unabhängig von der Mobilisierung von Kalziumionen und anderen Mechanismen oder Folgen der Thrombozytenaktivierung. (Dopheide et al.)

Das Ausdehnen der Membran in Form von Tethern mag dazu dienen, die Belastung auf spezielle Bindungen zu reduzieren, und damit die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass rollende Zellen stabile Bindungen eingehen können. (Dopheide et al.) Auch wenn sie morphologisch ähnlich sind, sind die durch passive Kräfte entstehenden Tether klar von Filopodien zu unterscheiden, die durch einen aktiven Prozess mittels intrazellulärer

Aktinpolymerisation in aktivierten Plättchen entstehen. Die äußere Oberfläche von inaktiven Plättchen ist glatt. Die auf ihnen im aktivierten Zustand zu findenden Pseudopodien kommen nicht auf ruhenden Zellen vor. (George und Colman)

Wir konnten in den entstandenen Tethern mittels Phalloidin geringe Mengen von F-Aktin nachweisen (siehe Abb. 11 B). Die Geschwindigkeit, mit der die Tether aus den Thrombozyten entstehen, ist jedoch mit 1 μm pro 50 bis 150 ms in etwa sieben Mal so schnell, wie die Geschwindigkeit, in der F-Aktin polymerisieren kann. (Pollard et al.) Die Experimente sprechen daher für einen unabhängig von F-Aktin stattfindenden Prozess.

Diese Annahme wird auch dadurch erklärt, dass bei Verhinderung der Aktinpolymerisation und -depolymerisation durch Cytochalasin D die Tetherbildung in gleichem Ausmaß stattfindet. Im Gegensatz zu Versuchen ohne Cytochalasin D erhöhte sich die maximale Tetherlänge jedoch nach Cytochalasin D Behandlung um das 3-fache bei vergleichbaren Zeitintervallen. Es handelt sich also ebenfalls um einen Hinweis darauf, dass F-Aktin dem Längenwachstum von Tethern entgegenwirkt. F-Aktin kann zwar auch in DAPs nachgewiesen werden, aber die verhältnismäßig geringe Konzentration in Tethern führt dazu, dass deren Entstehung, vermutlich durch die fehlende Starrheit des Zytoskeletts, begünstigt wird.

Hingegen war die Bildung von Mikropartikeln unter dem Einfluss von Cytochalasin D rückläufig. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Cytochalasin D die Anteile der Membran, die innerhalb der Zelle nicht mit dem Zytoskelett verbunden sind, erhöht. Da das Ablösen von Tethern und damit auch die Mikropartikelentstehung vermehrt an Stellen stattfindet, an denen die Scherkräfte an Membrananteilen mit Verbindung zum Zytoskelett wirken können, verhält sich dies nach Cytochalasin D Exposition umgekehrt. In unseren Versuchen zeigte sich allerdings, dass auch nach Zugabe von Cytochalasin D die Größe der entstehenden Mikropartikel unverändert blieb. Demnach scheint diese unabhängig von der Integrität des Zytoskeletts zu sein, sondern hauptsächlich von dem Durchmesser des Membrananteils des DAPs abzuhängen, durch den der Mikropartikel aus dem Thrombozyten herausgelöst wird.

5.4. Die hämodynamisch induzierte Mikropartikel- und Tetherbildung ist einzig von GPIb und VWF abhängig

Die Bildung von Tethern in Abhängigkeit einer GPIb α -VWF Interaktion und die detaillierte Visualisierung der Entstehung von Tethern und Mikropartikeln durch Scherkräfte in Echtzeit wurde von uns zum ersten Mal beschrieben (Reininger und Ruggeri). Wir führten eine weitere Analyse per konfokaler Mikroskopie und Elektronenmikroskopie durch. Es war zuvor nicht klar, dass im Rahmen der Tetherbildung auch ein biophysikalischer Mechanismus der Mikropartikelentstehung stattfindet. Die Entstehung von Mikropartikeln ist vollkommen von der Interaktion zwischen GPIb α und VWF abhängig. Von einer Aktivierung der Plättchen und deren Aggregation ist sie hingegen unabhängig. Die passive, biofluidmechanische Entstehung von Mikropartikeln ist klar zu differenzieren von einer Entstehung von Mikropartikeln durch biochemische Stimuli. Daher stimmen die von uns ermittelten Daten mit denen anderer Arbeitsgruppen (Haga et al.) überein: Die Tetherbildung nach Bindung an die A1 Domäne des VWF resultiert spezifisch aus der Interaktion mit GPIb α , da durch eine Blockierung dieser Bindung mit einem Anti-GPIb α -Antikörper die Tether- und Mikropartikelbildung komplett verhindert werden konnte. So zeigte die Perfusion von Plättchen über immobilisiertem VWF in Anwesenheit blockierender Antikörper, dass die Entstehung von Tethern ausschließlich von der VWF–GPIb α , und nicht von Integrin α IIb β 3 abhängt. (Dopheide et al.) Dies deckt sich mit der von uns gemachten Beobachtung, dass Tetherbildung auch stattfindet wenn EDTA als Antikoagulans verwendet wird. Da dieses divalente Kationen bindet, die somit für die Bindung nicht zur Verfügung stehen, wäre eine Integrin α IIb β 3 abhängige Tetherbildung unter diesen Versuchsbedingungen nicht möglich.

5.5. Mikropartikel in der Zirkulation – besondere Strömungseigenschaften aufgrund ihrer Größe

Die Bildung von Mikropartikeln in vivo kann zur Ablagerung von prokoagulatorischen Zellteilen auf reaktivem Gefäßendothel führen. Die Wahrscheinlichkeit, dass zirkulierende Mikropartikel in den Wirbelbildungen des Blutstroms, die vermehrt an bereits atherosklerotisch veränderten Endothelbereichen vorkommen, akkumulieren, könnte so das weitere Fortschreiten einer bereits vorhandenen

Arteriosklerose begünstigen. (Holme et al. 1997) Dadurch kann das Risiko einer thrombotischen Komplikation bei bereits bestehenden Schädigungen des Endothels weiter erhöht werden. Die in unseren Experimenten deutliche Mikropartikelbildung bei hohen Scherraten und damit in Bereichen mit verengten Gefäßabschnitten könnte ebenfalls dazu beitragen, dass in genau diesen Bereichen die pathologische Verengung weiter fortschreitet. Aufgrund der geringen Größe der Mikropartikel und deren adhäsiven Eigenschaften würden sie nicht mit dem Blutstrom fortgetragen werden, auch dann nicht, wenn außergewöhnlich hohe Scherraten in hochgradig stenosierte Koronararterien vorliegen würden. (Holme et al. 1997) So hätten sie einen größeren Einfluss auf die bereits für weitere prothrombotische Komplikationen prädestinierten Stellen. Eine Akkumulation von thrombozytären Mikropartikeln in diesen Bereichen könnte aber auch dazu beitragen, dass in Bereichen des Gefäßsystems, in denen Wirbelbildungen vorkommen, wie auch an Gefäßbifurkationen, atherosklerotische Veränderungen erst entstehen können. (Barry et al. 1998)

Auf diese Weise könnten DAPs über die Mikropartikelbildung die adhäsiven und prokoagulatorischen Eigenschaften von Thrombozyten beeinflussen und z.B. im Rahmen einer pathologischen Thrombusbildung eine entscheidende Rolle spielen.

5.6. Tissue Factor auf Thrombozyten, Mikropartikeln und Tethern

Ob der Tissue Factor, den wir in geringen Maßen auf Plättchen und Mikropartikeln nachweisen konnten, in einer aktiven, entschlüsselten Form, oder in einer verschlüsselten Form vorlag, und ob er damit einen Einfluss auf die Thrombingenerierung hatte, konnte mit den von uns verwendeten Antikörpern nicht unterschieden werden. Im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen konnten wir nicht feststellen, welchen Ursprungs der von uns nachgewiesene TF ist. (Falati et al.; Del Conde et al.) Es gibt verschiedene Studien zu dem auf thrombozytären Mikropartikeln bzw. Thrombozyten gefundenen TF.

Eine Forschungsgruppe untersuchte den Transfer zwischen Plättchen und Monozyten und fand heraus, dass thrombozytären Mikropartikeln dabei eine Vektorfunktion zukommt. In Anwesenheit thrombozytärer Mikropartikel (im Mittel 16% davon TF-positiv) erhöhte sich die Anzahl TF-positiver Monozyten signifikant. Eine entscheidende Rolle scheint dabei CD 62P (P-Selektin) zuzukommen, da unter Blockierung dieses Glykoproteins mit einem spezifischen Antikörper keine Zunahme TF-positiver Monozyten nachgewiesen werden konnte. (Scholz et al.)

Eine andere Forschungsgruppe fand heraus, dass ein Großteil des plasmatischen TFs in den im Plasma vorhandenen Mikropartikeln enthalten ist. Den wichtigsten Anteil vertraten dabei Mikropartikel thrombozytären Ursprungs. Dieser aus den α -Granula und dem offenen kanalikulären System der Thrombozyten stammende TF leistet nach ihren Erkenntnissen einen relevanten Beitrag der Gesamtaktivität von TF im Blut. (Müller I. et al.)

TF-pre-mRNA konnte von Schwertz et al. in ruhenden Thrombozyten nachgewiesen werden. Die Expression von TF dieser nicht aktivierten Thrombozyten war nicht relevant. Nach Aktivierung exprimierten die Zellen sowohl TF-m-RNA als auch das bioaktive TF-Protein. Nachdem in Mausmodellen (Knockout-Mäusen), in denen die TF Expression (Chou et al.) bzw. die VWF und Fibrinogen Expression (Ni et al.) vermindert waren, der Nachweis einer nur instabilen Thrombenbildung gelang, vermutet die Arbeitsgruppe einen relevanten Beitrag von thrombozytärem TF am Wachstum und an der Stabilisierung von Thromben. (Schwertz et al.)

Der Nachweis von TF in Thrombozyten gelang in den beschriebenen Studien jeweils in aktivierten Thrombozyten oder Mikropartikeln, in unseren Experimenten handelt es sich jedoch um einen biophysikalischen Mechanismus und damit um nicht aktivierte Thrombozyten. Inwieweit sich damit der sehr geringe Nachweis von TF auf Thrombozyten, Tethern und Mikropartikeln erklärt, bleibt offen.

5.7. Klinische Relevanz, Forschungsstand und potentielle Therapieoptionen

5.7.1. Pathologische Wirkung thrombozytärer Mikropartikel

Unsere Experimente lassen darauf schließen, dass Bereiche des Gefäßsystems, in denen sowohl hohe Scherraten, als auch immobilisierter VWF vorkommen, die Generierung von prokoagulatorischen Mikropartikeln durch GPIIb α -VWF Interaktionen triggern können. Dies wäre z.B. in stenosierten Koronararterien, die durch Plaquebildung weiter verengt sind, der Fall. Insbesondere herrschen diese Bedingungen in den Gefäßsystemen von Patienten mit einer bereits bestehenden kardiovaskulären Erkrankung, z.B. solche mit koronaren Herzerkrankungen. Durch prokoagulatorische Mikropartikel aus Thrombozyten würde sich das Risiko einer Eskalation der Erkrankung z.B. in Form eines Infarktes noch erhöhen. Aus diesem Grund könnte die Intervention bei der Entstehung dieser Mikropartikel ein Baustein sein, um die Gefährdung durch

kardiovaskuläre Erkrankungen - den häufigsten Todesursachen in der Welt – zu verringern.

5.7.2. Klinische Relevanz der prokoagulatorischen Aktivität von Mikropartikeln

Mikropartikel scheinen einerseits eine entscheidende, prokoagulatorische Rolle bei der Pathogenese diverser Erkrankungen zu spielen. Andererseits spricht einiges dafür, dass unter anderem Patienten mit autoimmuner Thrombozytopenie von der prokoagulatorischen Aktivität der zirkulierenden Mikropartikel profitieren, was eine Erklärung dafür sein könnte, dass diese Patienten trotz sehr niedriger Thrombozytenzahlen im Blut ein noch relativ niedriges Blutungsrisiko besitzen. (Jy et al. 1992; Piccin et al.) Mittlerweile werden isolierte Mikropartikel auch als Ersatz für Thrombozytenkonzentrate in klinischen Studien mit thrombozytopenischen Patienten getestet. (Blajchman)

5.7.3. Mikropartikel fungieren als Vektoren zwischen Zellen

Man nimmt an, dass Mikropartikel auch als Vektoren fungieren können, die über Liganden-Rezeptorverbindungen Informationen weitergeben können. So konnte bereits gezeigt werden, dass es nach Interaktion von thrombozytären Mikropartikeln mit Leukozyten oder Monozyten zu einer Veränderung der Expressierung von Adhäsionsmolekülen und zur Veränderung der Ausschüttung von Interleukinen gekommen ist. (Nomura et al. 2001) Dies kann die Zellfunktionen maßgeblich beeinflussen, die klinische Relevanz diesbezüglich ist bisher jedoch noch nicht geklärt.

Entscheidend können dabei auch die besonderen Flusseigenschaften von Mikropartikeln sein. So können sie durch ihre kleine Größe auch Stellen im Gefäßsystem erreichen, an die größere Zellen nicht gelangen können. Auch das beschriebene Verhalten in Wirbelbildungen kann dazu führen, dass Mikropartikel durch Interaktionen mit verschiedenen Zellen zu Veränderungen der Zellfunktionen beitragen könnten, die anderweitig an bestimmten Stellen nicht verfügbar wären.

5.7.4. Mikropartikel als Parameter – Korrelation der Anzahl von Mikropartikeln mit der Schwere von Erkrankungen

Auch als kennzeichnend für bestimmte Krankheitsaktivitäten oder -risiken haben sich Mikropartikel bereits herausgestellt. So konnte gezeigt werden, dass im Rahmen von ausgeprägtem Hypertonus die Anzahl der Mikropartikel mit dem Ausmaß des Bluthochdrucks korrelierte. (Preston et al.) Auch konnte festgestellt werden, dass die Diagnose einer venösen Thrombose mit der Anzahl der im Blut vorhandenen Mikropartikel - zusammen mit dem Niveau von D-Dimeren und P-Selektin - korreliert. (Rectenwald et al.) So ergibt sich die Möglichkeit, dass eine frühe Diagnosestellung erleichtert wird, was die Prognose einer Erkrankung positiv beeinflussen kann.

5.7.5. Probleme der Forschung an Mikropartikeln

Es bestehen Schwierigkeiten bei der Vergleichbarkeit und damit auch der Interpretation von Studien: Bisher wird keine einheitliche Methode zur Gewinnung von Mikropartikeln verwendet. So variieren z.B. allein die Zentrifugationsschritte sehr stark. Dies wiederum verhindert oder erschwert die Analyse ansonsten vergleichbarer, quantitativer Studien. In unseren Experimenten konnten wir feststellen, dass durch die Waschprozedur des Blutes die Mikropartikelanzahl deutlich erhöht wurde. Dies zeigt, dass unterschiedliche methodische Ansätze und Verfahren hier sehr leicht zu unterschiedlichen Resultaten führen können, was eine einheitliche Bewertung der erzielten Ergebnisse oft sehr erschwert. Perspektivisch müssen einheitliche Kriterien der Mikropartikelgewinnung gefunden werden, um so einheitliche Kriterien zu erhalten, die für diagnostische oder therapeutische Zwecke verwendet werden können.

Auch sind in den zahlreichen Publikationen sehr unterschiedliche Definitionen eines Mikropartikels in Bezug auf dessen Größe angegeben. Diese deutlichen Differenzen erschweren die Forschung und die Vergleichbarkeit der Arbeiten. Im Gegensatz zu Versuchsreihen anderer Forschungsgruppen, in denen ein Mikropartikel als ein Teilchen definiert ist, welches kleiner ist als ein Plättchen, haben wir die Grenzen bei unserer durchflusszytometrischen Auswertung auf 0,1 µm Durchmesser festgelegt.

5.7.6. Nächste Schritte der Forschung

Es bleibt zu untersuchen, welche Rolle die antikoagulatorisch wirkenden Proteine auf Mikropartikeln haben, inwieweit diese eine Rolle spielen und ob ein bestimmter Mechanismus existiert, mithilfe dessen die jeweils pro- oder antikoagulatorisch wirkenden Proteine exprimiert werden können. Es wird zu erforschen sein, inwieweit prokoagulatorische Mikropartikel klinisch relevant sind und ob es möglich wird, einen neuen Therapieansatz für Patienten mit erhöhter Thromboseneigung bzw. auch einer erhöhten Blutungsneigung zu finden. Ein möglicher Ansatz ist die Blockierung des Rezeptors GPIIb/IIIa, was konsekutiv zu einer Reduktion einer Thrombophilie durch Reduktion der thrombozytären Mikropartikel führen könnte.

6. Zusammenfassung

Seit ihrer Entdeckung 1967 (Wolf) wurden erhöhte Mikropartikelkonzentrationen im Blut bei vielen Erkrankungen nachgewiesen, die von Krebs bis akutem Myokardinfarkt reichen. Trotz der hohen Aktualität und Relevanz besonders thrombozytärer Mikropartikel konnte ihr Entstehungsmechanismus in vivo nicht geklärt werden. In vitro wurden verschiedene biochemische und physikalische Auslöser für eine aktive Mikropartikelbildung aus unterschiedlichen Zellen beschrieben. In der vorgelegten Arbeit wird nun erstmals ein passiver, scherabhängiger Mechanismus der Entstehung von Mikropartikeln sowie Tethern aus Thrombozyten unter Blutfluss aufgezeigt, der alleinig von der Bindung des Thrombozytenrezeptor GPIIb an seinen Liganden von Willebrand Faktor abhängig ist. Wir konnten außerdem erstmalig zeigen, dass diese Interaktion auf die kleinste strukturelle und funktionelle Einheit der Thrombozytenmembran, die sogenannten Discrete Adhesion Points (DAPs), konzentriert ist.

Unter Vollblutströmung binden die Thrombozyten reversibel an immobilisierten VWF und es werden, abhängig von der Höhe der Scherkraft, Mikropartikel und Tether ohne Aktivierung der Thrombozyten als Membranfragmente generiert. Ebenso wie die Ausgangszelle besitzen sie Thrombozytenrezeptoren, wie GPIIb und Integrin $\alpha IIb\beta 3$, über die sie an VWF und andere thrombogene Strukturen binden können.

Die Kinetik der Tetherbildung ist abhängig von der Scherrate sowie von der Beschichtungskonzentration der reaktiven Oberfläche. Die biophysikalische Entstehung von Tethern findet unabhängig von einer Aktinpolymerisation oder einer –depolymerisation statt, dies konnte in Versuchsreihen mit Cytochalasin D ermittelt werden.

In Flussexperimenten mit Kollagen als reaktive Oberfläche zeigte sich ebenfalls eine relevante Tetherbildung. Eine signifikante Mikropartikelbildung konnte nicht nachgewiesen werden. Die Interaktion zwischen GPIIb und Kollagen wird dabei über den plasmatischen VWF vermittelt.

Tissue Factor konnte von uns morphologisch in geringer Menge in passiv entstandenen, nicht aktivierten Thrombozyten, Tethern und Mikropartikeln nachgewiesen werden. Die gerinnungsaktive Wirkung von scherabhängig generierten Mikropartikeln konnte ebenfalls gezeigt werden. (Reininger et al. 2006)

Bei zahlreichen Erkrankungen konnten thrombozytäre Mikropartikel nachgewiesen werden, bei einer Vielzahl dieser Beispiele konnten sie bereits als Marker der Krankheitsaktivität oder als Verlaufsparemeter definiert werden.

Inwieweit thrombozytäre Mikropartikel therapeutisch eingesetzt werden können und sie einen Angriffspunkt für mögliche neue Medikamente zur Behandlung einer thrombotischen bzw. hämorrhagischen Gerinnungsstörung darstellen muss weitere klinisch-experimentelle Forschung ergeben.

Literaturverzeichnis

- Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. "Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans." *Blood* 1990; 75 (1): 128-38.
- Ando M, Iwata A, Ozeki Y, Tsuchiya K, Akiba T, Nihei H. "Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients" *Kidney Int.* 2002; 62 (5): 1757-6.
- Andrews RK, Fox JE. "Identification of a region in the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex that binds to purified actin-binding protein." *J. Biol. Chem.* 1992; 267 (26): 18605-11.
- Andrews RK, Fox JE. "Interaction of purified actin-binding protein with the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex." *J. Biol. Chem.* 1991; 266 (11): 7144-7.
- Annex BH, Denning SM, Channon KM, Sketch MH, Stack RS, Morrissey JH, Peters KG. "Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes" *Circulation* 1995; 91 (3): 619-22.
- Arya M, Anvari B, Romo GM, Cruz MA, Dong JF, McIntire LV, Moake JL, López JA. "Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers" *Blood* 2002; 99 (11): 3971-77.
- Azuma H, Hayashi T, Dent JA, Ruggeri ZM, Ware J. "Disulfide bond requirements for assembly of the platelet glycoprotein Ib-binding domain of von Willebrand factor" *J. Biol. Chem.* 1993; 268 (4): 2821-27.
- Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, Fuster V, Berrozpe M, Chesebro JH, Badimon L. "Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions" *Circulation* 1999; 99 (14): 1780-87.
- Bark DL, Ku DN. "Wall shear over high degree stenoses pertinent to atherothrombosis." *J. Biomech.* 2010; 43 (15): 2970-77.
- Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. "Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles" *J Clin. Invest.* 1997; 99 (9): 2118-27.
- Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. "Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles" *J Clin. Invest.* 1998; 102 (1): 136-44.
- Bathe M, Kamm RD. "A fluid-structure interaction finite element analysis of pulsatile blood flow through a compliant stenotic artery" *J. Biomech. Eng.* 1999; 121 (4): 361-69.
- Berckmans RJ, Neuwland R, Böing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. "Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation" *Thromb. Haemost.* 2001; 85 (4): 639-46.

- Berliner S, Niiya K, Roberts JR, Houghten RA, Ruggeri ZM. "Generation and characterization of peptide-specific antibodies that inhibit von Willebrand factor binding to glycoprotein IIb-IIIa without interacting with other adhesive molecules. Selectivity is conferred by Pro1743 and other amino acid residues adjacent to the sequence Arg1744-Gly1745-Asp1746" *J. Biol. Chem.* 1988; 263 (16): 7500-05.
- Biró E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R. "Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner." *J. of Thromb. and Haemost.* 2003; 1 (12): 2561-68.
- Biró E, Akkerman JW, Hoek FJ, Gorter G, Pronk LM, Sturk A, Nieuwland R. „The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions." *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3 (12): 2754-63.
- Blajchman MA. "Substitutes and alternatives to platelet transfusions in thrombocytopenic patients." *J. of Thromb. and Haemost.* 2003; 1 (7): 1637-41.
- Bluestein D, Niu L, Schoephoerster RT, Dewanjee MK. "Fluid mechanics of arterial stenosis: relationship to the development of mural thrombus." *Ann. Biomed. Eng.* 1997; 25 (2): 344-56.
- Bretelle F, Sabatier F, Desprez D, Camoin L, Grunebaum L, Combes V, D'Ercole C, Dignat-George F. "Circulating microparticles: a marker of procoagulant state in normal pregnancy and pregnancy complicates by preeclampsia or intrauterine growth retardation." *Thromb. and Haemost.* 2003; 89 (3): 486-92.
- Brogan PA, Shah V, Brachet C, Harnden A, Mant D, Klein N, Dillon MJ. "Endothelial and platelet microparticles in vasculitis of the young." *Arthritis & Rheumatism* 2003; 50 (3): 927-36.
- Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. "Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton." *Ann. Rev. Cell Biol.* 1988; 4: 487-525.
- Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F. "Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation." *British Journal of Haematology* 1997; 96 (3): 458-63.
- Chen J, Lopez JA. "Interactions of platelets with subendothelium and endothelium." *Microcirculation* 2005; 12 (3): 235-46.
- Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B. "Hematopoietic cell- derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation." *Blood* 2004; 104 (10): 3190-97.
- Choudhury A, Chung I, Blann AD, Lip GY. "Elevated platelet microparticle levels in nonvalvular atrial fibrillation: relationship to p-selectin and antithrombotic therapy." *Chest* 2007; 131 (3): 809-15.
- Coller BS, Shattil SJ. „The GPIIb/IIIa (integrin α IIb β 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend." *Blood* 2008; 112 (8): 3011-25.

- Combes V, Coltel N, Faille D, Wassmer SC, Grau GE. "Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier." *Int. J. Parasitol.* 2006; 36 (5): 541-46.
- Curtis AS. "The Mechanism of Adhesion of Cells to Glass. A Study by Interference Reflection Microscopy." *J. Cell Biol.* 1964; 20 (2): 199-215.
- Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. "Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation." *Blood* 2005; 106 (5): 1604-11.
- Diaz C, Schroit AJ. "Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry." *J. Membr. Biol.* 1996; 151 (1): 1-9.
- Dopheide SM., Maxwell MJ., Jackson SP. "Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor." *Blood* 2002; 99 (1): 159-67.
- Drake TA., Morrissey JH., Edgington TS. "Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis." *Am. J. Pathol.* 1989; 134 (5): 1087-97.
- Englund GD, Bodnar RJ, Li Z, Ruggeri ZM, Du X. "Regulation of von Willebrand factor binding to the platelet glycoprotein Ib-IX by a membrane skeleton-dependent inside-out signal." *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (20): 16952-59.
- Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B. "Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin." *J. Exp. Med.* 2003; 197 (11): 1585-98.
- Farndale RW. "Collagen-induced platelet activation." *Blood Cells Mol. Dis.* 2006; 36 (2): 162-65.
- Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, de Groot PG. "The role of collagen in thrombosis and hemostasis." *J. of Thromb. and Haemost.* 2004; 2 (4): 561-73.
- Fernandez MF, Ginsberg MH, Ruggeri ZM, Batlle FJ, Zimmerman TS. "Multimeric structure of platelet factor VIII/von Willebrand factor: the presence of larger multimers and their reassociation with thrombin-stimulated platelets." *Blood* 1982; 60 (5): 1132-38.
- Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M, Italiano JE. "Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles." *Blood* 2009; 113 (5): 1112-21.
- Fowler WE, Fretto LJ. "Electron Microscopy of Von Willebrand Factor." *Coagulation and Bleeding Disorders. The Role of Factor VIII and von Willebrand Factor.* Ed.: Zimmerman TS, Ruggeri ZM; New York, USA: Dekker, 1989; 181-93.
- Fox JE. "Linkage of a membrane skeleton to integral membrane glycoproteins in human platelets. Identification of one of the glycoproteins as glycoprotein Ib." *J. Clin. Invest.* 1985; 76 (4): 1673-83.

- Fuster V, Fallon JT, Nemerson Y. "Coronary thrombosis." *Lancet* 1996; 348 (Suppl. 1): s7-10.
- Gawaz MP, Loftus JC, Bajt ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH. "Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions." *J. Clin. Invest.* 1991; 88 (4): 1128-34.
- George JN, Colman RW. "Overview of Platelet Structure and Function." *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Ed. Colman RW., Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2001; 381-86.
- George JN, Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N, Newman PJ. "Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery." *J. Clin. Invest.* 1986; 78 (2): 340-48.
- Gilbert GE, Sims PJ, Wiedmer T, Furie B, Furie BC, Shattil SJ. "Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII." *J. Biol. Chem.* 1991; 266 (26): 17261-68.
- Ginsberg MH, Lightsey A, Kunicki TJ, Kaufmann A, Marguerie G, Plow EF. "Divalent cation regulation of the surface orientation of platelet membrane glycoprotein IIb. Correlation with fibrinogen binding function and definition of a novel variant of Glanzmann's thrombasthenia." *J. Clin. Invest.* 1986; 78 (4): 1103-11.
- Goldsmith HL, Mason SG. "Axial Migration of particles in poiseuille flow." *Nature* 1961; 200: 1095-96.
- Goldsmith HL, Cokelet GR, Gaehtgens P. "Robin Fahraeus: evolution of his concepts cardiovascular physiology." *Am. J. Physiol.* 1989; 257 (3 Pt 2): H1005-H1015.
- Gordon D, Lowe O, *Clinical Blood Rheology*, Volume 1, S. 14, 1988, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Haga HJ, Slack SM, Jennings LK. "Comparison of shear stress-induced microparticle formation and phosphatidylserine expression in presence of alpha2bbeta3 antagonists." *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2005; 41 (3): 363-71.
- Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. "Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derives from exocytosis of multivesicular and alpha-granules." *Blood* 1999; 94 (11): 3791-99.
- Hochmuth RM, Wiles HC, Evans EA, McCown JT. "Extensional flow of erythrocyte membrane from cell body to elastic tether. II. Experiment." *Biophys. J.* 1982; 39 (1): 83-89.
- Holme PA, Orvim U, Hamers MJ, Solum NO, Brosstad FR, Barstad RM, Sakariassen KS. "Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis." *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17 (4): 646-53.

- Holme PA, Solum NO, Brosstad F, Røger M, Abdelnoor M. "Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting." *Thromb. Haemost.* 1994; 72 (5): 666-71.
- Horstman LL, Ahn YS. "Platelet microparticles: a wide-angle perspective." *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1999; 30 (2): 111-42.
- Iwamoto S, Kawasaki T, Kambayashi J, Ariyoshi H, Monden M. "Platelet microparticles: a carrier of platelet-activating factor?" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 218 (3): 940-44.
- Izzard CS, Lochner LR. "Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique" *J. Cell Science* 1976; 21 (1): 129-59.
- Izzard CS, Lochner LR. "Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility: an interference-reflexion study" *J. Cell Science* 1980; 42 (1): 81-116.
- Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, Berkhout J, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. "Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms." *Thromb. Haemost.* 2001; 85 (5): 810-20.
- Jy W, Horstman LL, Arce M, Ahn YS. "Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias." *J. Lab. Clin. Med.* 1992; 119 (4): 334-45.
- Jy W, Horstman LL, Wang F, Duncan RC, Ahn YS. "Platelet factor 3 in plasma fractions: its relation to microparticle size and thromboses." *Thromb. Res.* 1995; 80 (6): 471-82.
- Kloboucek A, Behrisch A, Faix J, Sackmann E. "Adhesion-induced receptor segregation and adhesion plaque formation: A model membrane study." *Biophys. J.* 1999; 77 (4): 2311-28.
- Koutts J, Walsh PN, Plow EF, Fenton JW 2nd, Bouma BN, Zimmerman TS. "Active release of human platelet factor VIII-related antigen by adenosine diphosphate, collagen, and thrombin." *J. Clin. Invest.* 1978; 62 (6): 1255-63.
- Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F, Jackson SP. "A revised model of platelet aggregation." *J. Clin. Invest.* 2000; 105 (6): 783-91.
- Lankhof H, van Hoeij M, Schiphorst ME, Bracke M, Wu YP, Ijsseldijk MJ, Vink T, de Groot PG, Sixma JJ. "A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III." *Thromb. Haemost.* 1996; 75 (6): 950-58.
- Lawrence MB, Springer TA. "Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins." *Cell* 1991; 65 (5): 859-73.
- Lee YJ, Jy W, Horstman LL, Janania J, Reyes Y, Kelley RE, Ahn YS. "Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias." *Thromb. Res.* 1993; 72 (4): 295-304.

- Leeuwenberg JF, Smeets EF, Neefjes JJ, Shaffer MA, Cinek T, Jeunhomme TM, Ahern TJ, Buurman WA. "E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro." *Immunology* 1992; 77 (4): 543-49.
- Lindahl TL, Festin R, Larsson A. "Studies of fibrinogen binding to platelets by flow cytometry: an improved method for studies of platelet activation." *Thromb. Haemost.* 1992; 68 (2): 221-25.
- Lopez JA. "The platelet glycoprotein Ib-IX complex." *Blood Coagul. Fibrinolysis* 1994; 5 (1): 97-119.
- Macey MG, Wolf SI, Lawson C. "Microparticle formation after exposure of blood to activated endothelium under flow." *Cytometry A*. 2010; 77 (8): 761-8.
- Mailhac A, Badimon JJ, Fallon JT. "Effect of an eccentric severe stenosis on fibrin(ogen) deposition on severely damaged vessel wall in arterial thrombosis." *Circulation* 1994; 90 (2): 988-96.
- Mann KG, Butenas S, Brummel K. "The Dynamics of Thrombin Formation." *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23 (1): 17-25.
- Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. „A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation“ *J. Exp. Med.* 2002; 196 (7): 887–96.
- Meziani F, Tesse A, David E, Martinez MC, Wangesteen R, Schneider F, Andriantsitohaina R. "Shed membrane particles from preeclamptic women generate vascular wall inflammation and blunt vascular contractility." *Am. J. Pathol.* 2006; 169 (4): 1473-83.
- Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, Furman MI. "Flow Cytometry" Platelets. Ed.: Michelson AD; San Diego, USA: Academic Press, 2002; 297-315.
- Miura S, Li CQ, Cao Z, Wang H, Wardell MR, Sadler JE. "Interaction of von Willebrand factor domain A1 with platelet glycoprotein Iba1(1-289). Slow intrinsic binding kinetics mediate rapid platelet adhesion." *J. Biol. Chem.* 2000; 275 (11): 7539-46.
- Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, Komiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S. "High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles." *Blood* 1996; 88 (9): 3456-64.
- Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. „Platelets and Thrombin Generation.“ *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22 (9): 1381-89.
- Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. "Elevated levels of procoagulant microparticles in a patient with myocardial infarction, antiphospholipid antibodies and multifocal cardiac thrombosis." *Thromb. J.* 2005; 3: 15.
- Müller F, Mutch N, Schenk W, Smith S, Esterl L, Spronk H, Schmidbauer S, Gahl W., Morrissey J, Renné T. "Platelet Polyphosphates Are Proinflammatory and Procoagulant Mediators In Vivo" *Cell* 2009; 139 (6): 1143–56.

- Müller I, Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K, Engelmann B. "Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets." *FASEB Journal* 2003; 17 (3): 476-78.
- Nakamura F, Pudas R, Heikkinen O, Permi O, Kilpeläinen I, Munday A, Hartwog J, Stossel T, Ylänne J. "The structure of the GPIb–filamin A complex" *Blood* 2006; 107 (5): 1925-32.
- Nemerson Y. "Tissue factor and hemostasis." *Blood* 1988; 71 (1): 1-8.
- Ni H, Denis CV, Subbarao S, Degen JL, Sato TN, Hynes RO, Wagner DD. "Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen." *J. Clin. Invest.* 2000; 106 (3): 385-392.
- Nichols WW, O'Rourke MF. "McDonald's Blood flow in arteries theoretical, experimental and clinical principles." Third Edition, Lea & Febiger, Philadelphia, London, 1990.
- Nieuwland R, Sturk A. "Platelet- Derived Microparticles" *Platelets*. Ed.: Michelson AD; San Diego, USA: Academic Press, 2002; 255-65.
- Nomura S, Komiyama Y, Miyake T, Miyazaki Y, Kido H, Suzuki M, Kagawa H, Yanabu M, Takahashi H, Fukuhara S. et al. "Amyloid beta-protein precursor-rich platelet microparticles in thrombotic disease." *Thromb. Haemost.* 1994; 72 (4): 519-22.
- Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J. "High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells." *Atherosclerosis* 2001; 158 (2): 277-87.
- Nurden P, Nurden AT. "Congenital disorders associated with platelet dysfunctions." *Thromb. Haemost.* 2008; 99 (2): 253-63.
- O'Brien JR. "The platelet-like activity of serum." *Br. J. Haematol.* 1955; 1 (2): 223-28.
- Pareti FI, Niiya K, McPherson JM, Ruggeri ZM. "Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III." *J. Biol. Chem.* 1987; 262 (28): 13835-41.
- Parthasarathy R, Groves JT. "Optical techniques for imaging membrane topography." *Cell Biochem. Biophys.* 2004; 41 (3): 391-414.
- Pattanapanyasat K, Gonwong S, Chaichompoo P, Nulsri E, Lerdwana S, Sukapirom K, Siritanaratkul N, Fucharoen S. "Activated platelet-derived microparticles in thalassaemia." *Br. J. Haematol.* 2007; 136 (3): 462-71.
- Penz S, Reininger AJ, Brandl R, Goyal P, Rabie T, Bernlochner I, Rother E, Goetz C, Engelmann B, Smethurst PA, Ouwehand WH, Farndale R, Nieswandt B, Siess W. "Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI." *FASEB J.* 2005; 19 (8): 898-909.
- Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, Pérez C, Sáez C, Panes O, Matus V, Mezzano D. "Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state." *Thromb. Haemost.* 2006; 95 (1): 94-99.

- Petrich BG, Marchese P, Ruggeri ZM, Spiess S, Weichert RA, Ye F, Tiedt R, Skoda RC, Monkley SJ, Critchley DR, Ginsberg MH. "Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis." *J. Exp. Med.* 2007; 204 (13): 3103-11.
- Piccin A, Murphy WG, Smith OP. "Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications." *Blood Rev.* 2007; 21 (3): 157-71.
- Plow EF, McEver RP, Collier BS, Woods VL, Marguerie GA, Ginsberg MH. "Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets." *Blood* 1985; 66 (3): 724-27.
- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. "Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells." *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* 2000; 29: 545-76.
- Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G, Ahn YS. "Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles." *Hypertension* 2003; 41 (2): 211-17.
- Rapaport SI, Rao LV. "Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation." *Arterioscler. Thromb.* 1992; 12 (10): 1111-21.
- Rectenwald JE, Myers DD, Hawley AE, Longo C, Henke PK, Guire KE, Schmaier AH, Wakefield TW. "D-dimer, P-selectin, and microparticles: novel markers to predict deep venous thrombosis. A pilot study." *Thromb. Haemost.* 2005; 94 (6): 1312-17.
- Reininger AJ, Agneskirchner J, Bode PA, Spannagl M, Wurzinger LJ. "c7E3 Fab inhibits low shear flow modulated platelet adhesion to endothelium and surface-absorbed fibrinogen by blocking platelet GP IIb/IIIa as well as endothelial vitronectin receptor--results from patients with acute myocardial infarction and healthy controls." *Thromb. Haemost.* 2000; 83 (2): 217-23.
- Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM. "Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress." *Blood* 2006; 107 (9): 3537-45.
- Reininger AJ, Bernlochner I, Penz SM, Ravanat C, Smethurst P, Farndale RW, Gachet C, Brandl R, Siess W. "A 2-step mechanism of arterial thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques." *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010; 55 (11): 1147-58.
- Reininger AJ, Ruggeri ZM. "Dynamic platelet-surface interaction and formation of membrane microparticles mediated by von Willebrand Factor interaction with glycoprotein Iba." *Thrombosis and Haemostasis Suppl.* July 2001., abstr. OC912, 2001.
- Reininger AJ, Spannagl M. "Interaktion des von Willebrand Faktors mit Thrombozyten und der Gefäßwand." *J. Lab. Med.* 2004; 28 (6): 514-20.
- Rosing J, Speijer H, Zwaal RF. "Prothrombin activation on phospholipid membranes with positive electrostatic potential." *Biochemistry* 1988; 27 (1): 8-11.

- Ruggeri ZM. "Platelets in atherothrombosis." *Nature Medicine* 2002; 8 (11): 1227-34.
- Ruggeri ZM. "Structure and biosynthesis of the von Willebrand factor." *Von Willebrand Factor and the mechanisms of platelet function*. Ed.: Ruggeri ZM; Berlin/Heidelberg, Deutschland: Springer Verlag, 1998; 33–77.
- Ruggeri ZM. "The platelet glycoprotein Ib-IX complex." *Prog. Hemost. Thromb.* 1991; 10: 35-68.
- Ruggeri ZM. "Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation." *Thromb. Haemost.* 1993; 70 (1): 119-23.
- Ruggeri ZM. "The role of von Willebrand factor and fibrinogen in the initiation of platelet adhesion to thrombogenic surfaces." *Thromb. Haemost.* 1995; 74 (1): 460-63.
- Ruggeri ZM. "Von Willebrand factor." *J. Clin. Invest.* 1997; 99 (4): 559-64.
- Ruggeri ZM, Dent JA, Saldivar E. "Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood." *Blood* 1999; 94 (1): 172-78.
- Ruggeri ZM, Savage B. "Biological functions of von Willebrand factor." *Von Willebrand Factor and the mechanisms of platelet function*. Ed.: Ruggeri ZM; Berlin/Heidelberg, Deutschland: Springer Verlag, 1998; 79–109.
- Ruggeri ZM, Orje JN, Habermann R, Federici AB, Reininger AJ. "Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress." *Blood* 2006; 8 (6): 1903-10.
- Ruiz FM, Lea CR, Oldfield E, Docampo R. "Human dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes." *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (43): 44250-57.
- Sakariassen KS, Holme PA, Orvim U, Barstad RM, Solum NO, Brosstad FR. "Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation in native human blood." *Thromb. Res.* 1998; 92 (6, Suppl. 2): S33-S41.
- Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. "Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor." *Cell* 1996; 84 (2): 289-97.
- Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. "Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow." *Cell* 1998; 94 (5): 657-66.
- Savage B, Cattaneo M, Ruggeri ZM. "Mechanisms of platelet aggregation." *Curr. Opin. Hematol.* 2001; 8 (5): 270-76.
- Savage B, Ginsberg MH, Ruggeri ZM. "Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow." *Blood* 1999; 94 (8): 2704-15.
- Scholz T, Temmler U, Krause S, Heptinstall S, Lösche W "Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P." *Thromb. Haemost.* 2002; 88 (6): 1033-38.
- Schwartz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE,

- Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich AS. "Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets." *J. Exp. Med.* 2006; 203 (11): 2433-40.
- Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. "Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor." *Blood* 1996; 88 (8): 2939-50.
- Siegel JM, Markou CP, Ku DN, Hanson SR. "A scaling law for wall shear rate through an arterial stenosis." *J. Biomech. Eng.* 1994; 116 (4): 446-51.
- Simons K, Toomre D. "Lipid rafts and signal transduction." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000; 1 (1): 31-39.
- Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. "Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity." *J. Biol. Chem.* 1988; 263 (34): 18205-12.
- Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. "Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity." *J. Biol. Chem.* 1989; 264 (29): 17049-57.
- Singh N, Gemmell CH, Daly PA, Yeo EL. "Elevated platelet-derived microparticle levels during unstable angina." *Can. J. Cardiol.* 1995; 11 (11): 1015-21.
- Springer TA. "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." *Cell* 1994; 76 (2): 301-14.
- Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, Kastrati A, Schömig A, Ott I. "Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction." *Thromb. Haemost.* 2005; 93 (1): 35-39.
- Strony J, Beaudoin A, Brands D, Adelman B. "Analysis of shear stress and hemodynamic factors in a model of coronary artery stenosis and thrombosis." *Am. J. Physiol.* 1993; 265 (5 Pt 2): H1787-H1796.
- Tans G, Rosing J, Thomassen MC, Heeb MJ, Zwaal RF, Griffin JH. "Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles." *Blood* 1991; 77 (12): 2641-48.
- Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. "Thrombogenesis in sickle cell disease." *J. Lab. Clin. Med.* 2001; 137 (6): 398-407.
- Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernández-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. "Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques." *Circulation* 1997; 95 (3): 594-99.
- van der Zee PM, Biró E, Ko Y, de Winter RJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R. "P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction." *Clin. Chem.* 2006; 52 (4): 657-64.

- Weiss HJ. "Flow-related platelet deposition on subendothelium." *Thromb. Haemost.* 1995; 74 (1): 117-22.
- Weiss HJ, Vicic WJ, Lages BA, Rogers J. "Isolated deficiency of platelet procoagulant activity." *Am. J. Med.* 1979; 67 (2): 206-13.
- White JG, Krumwiede MD, Escolar G. "Glycoprotein Ib is homogeneously distributed on external and internal membranes of resting platelets." *Am. J. Pathol.* 1999; 155 (6): 2127-34.
- WHO health statistics 2008, Part 1 Ten highlights in health statistics, http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Part1.pdf, Seite 18, Geneva, World Health Organisation, 2008.
- WHO health statistics 2008, Part 2, Global health indicators; Mortality and burden of disease, http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Table1_Mort.pdf, Seite 54, Geneva, World Health Organisation, 2008.
- Wiegand G, Jaworek T, Wegner G, Sackmann E. "Studies of Structure and Local Wetting Properties on Heterogeneous, Micropatterned Solid Surfaces by Microinterferometry." *J. Colloid Interface Sci.* 1997; 196 (2): 299-312.
- Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. "Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1989; 86 (8): 2839-43.
- Wolf P. "The nature and significance of platelet products in human plasma." *Br. J. Haematol.* 1967; 13 (3): 269-88.
- Wootton DM, Markou CP, Hanson SR, Ku DN. "A mechanistic model of acute platelet accumulation in thrombogenic stenoses." *Ann. Biomed. Eng.* 2001; 29 (4): 321-29.
- Yuan Y, Kulkarni S, Ulsemer P, Cranmer SL, Yap CL, Nesbitt WS, Harper I, Mistry N, Dopheide SM, Hughan SC, Williamson D, de la Salle C, Salem HH, Lanza F, Jackson SP. "The von Willebrand factor-glycoprotein Ib/V/IX interaction induces actin polymerization and cytoskeletal reorganization in rolling platelets and glycoprotein Ib/V/IX-transfected cells." *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (51): 36241-51.
- Zarbock A, Ley K. „Neutrophil adhesion and activation under flow.“ *Microcirculation* 2009; 16 (1): 31-42.
- Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. "Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids." *Biochim. Biophys. Acta* 2004; 1636 (2-3): 119-28.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| CD | Cluster of Differentiation, Einteilung immunphänotypischer Oberflächenmerkmale verschiedener Zellen |
| DAP | Discrete Adhesion Point |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EM | Elektronenmikroskopie |
| Fab | Fragment antigen binding, der Antigen-bindende Anteil eines Antikörpers |
| FACS | fluorescent activated cell sorter, Durchflusszytometer |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| GP | Glykoprotein |
| HBSS | Hepesgepufferte Natriumchlorid 0,9% Lösung |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| OCS | offenes kanalikuläres System |
| PE | Phykoerythrin |
| PGE ₁ | Prostaglandin E ₁ |
| PSGL-1 | P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 |
| RICM | Reflexions Interferenz Kontrast Mikroskopie |
| PBS | Phosphatgepufferte Natriumchlorid 0,9% Lösung |
| PPP | plättchenarmes Plasma |
| PRP | plättchenreiches Plasma |
| TF | Tissue Factor, Gewebsthrombokinase |
| VWF | von Willebrand Faktor |

Danksagung

Hiermit möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Armin J. Reininger für die Bereitstellung des spannenden Themas, die Leitung des Projekts, sowie die geleistete große Unterstützung vom Beginn bis zur Vollendung dieser Arbeit bedanken.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Ph.D. M.D. Zaverio M. Ruggeri und seinen Mitarbeitern des Scripps Research Instituts, La Jolla, CA, USA für die erbrachten Vorarbeiten zu dieser Arbeit, sowie für die freundliche Bereitstellung des rekombinanten von Willebrand Faktors, den wir für unsere Experimente verwenden konnten.

Auch möchte ich Herrn Ph.D. Harry Heijnen sehr für die Auswertung der fixierter Proben und die Erstellung und Zurverfügungstellung der transmissions-elektronenmikroskopischen Bilder danken.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schramm für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Zudem bedanke ich mich bei den Verantwortlichen des Promotionsstudiengangs Förderung für Forschung und Lehre der LMU, durch welches das Forschungsprojekt wissenschaftlich und finanziell unterstützt wurde.

Allen bereitwilligen Spendern, ohne deren Blut ich keine Versuche hätte durchführen können, bin ich ebenfalls zu Dank verpflichtet.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für die große Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

München, Februar 2012

Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Hannah Schumann

geboren am 29.08.1981 in München

Schulbildung

09/1987-08/1991 Grundschule in München
09/1991-06/2000 Rupprecht-Gymnasium, München
09/1997-06/1998 Auslandsaufenthalt an der Kimball Union Academy, NH, USA
06/2000 Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/2000-04/2007 Studium der Humanmedizin, LMU München
09/2001-03/2002 Teilnahme am Austauschprogramm der LMU in Alicante, Spanien
04/2006-02/2007 Praktisches Jahr:
 University of Nairobi, Kenia (Chirurgie)
 Universidad de Buenos Aires, Argentinien (Innere Medizin)
 Dr. von Haunersches Kinderspital, München (Pädiatrie)
04/2007 Approbation als Ärztin

Promotion

12/2003 – 08/2007 Experimentelle Doktorarbeit in der Hämostaseologie, bei Prof. Dr.
 Reininger als Stipendiatin im Rahmen des Promotionsstudiengangs
 „Molekulare Medizin“, Förderung für Forschung und Lehre der LMU
05/2006 Publikation in „Blood“, 1. Mai 2006, Vol. 107 „Mechanism of platelet
 adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under
 high shear stress“

Arbeitsverhältnisse

08/2007 – 04/2011 Assistenzärztin in der I. Kinderklinik des Klinikums Augsburg,
und seit 02/2012 akademisches Lehrkrankenhaus der LMU
05/2011 – 01/2012 Auslandseinsatz für „Ärzte ohne Grenzen“ (Niger)