

Aus der Klinik für Anästhesiologie / Abteilung für Transfusionsmedizin

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

**Der Einfluss des Cholesteringehaltes von
Thrombozytenmembranen auf deren
Membraneigenschaften und Funktionsfähigkeit**

Dissertation

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

vorgelegt von

Anna Bettina Elisabeth Kern
aus Bonn

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernd Engelmann
Priv. Doz. Dr. Christoph Bidlingmaier
Prof. Dr. Erhard Hiller

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2015

Eidesstattliche Versicherung

Kern, Anna Bettina Elisabeth

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 22.10.2015

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Thrombozyten	1
1.2 Ultrastruktur der Thrombozyten	1
1.3 Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten	2
1.3.1 GPIIb-IIIa	3
1.3.2 GPIb-V-IX	3
1.3.3 P-Selektin	3
1.4 Thrombozytenfunktion	4
1.4.1 Adhäsion	5
1.4.2 Aktivierung	5
1.4.3 Aggregation	6
1.5 Die Geschwindigkeit des Blutflusses und deren Einfluss auf die Plättchenadhäsion und Aggregation	7
1.6 VWF und seine Interaktion mit dem GPIb/V/IX-Rezeptorkomplex bei hohen Scherraten	7
1.7 Thrombozyten-Kollagen Interaktion	8
1.8 Thrombozytäre Mikropartikel	9
1.8.1 Charakterisierung und Membranzusammensetzung von thrombozytären Mikropartikeln	9
1.8.2 Entstehung von Mikropartikeln	10
1.8.3 Mikropartikel in Hämostase und Thrombose	11
1.8.4 Mikropartikel und ihre Rolle bei verschiedenen Erkrankungen	11
1.9 Cholesterin, <i>lipid rafts</i> und die Bedeutung in der Thrombozytenmembran	12
1.9.1 Cholesterin und dessen Einfluss auf die Plättchenfunktion	12
1.9.2 Charakterisierung von <i>lipid rafts</i>	13
1.9.3 <i>Lipid rafts</i> und ihre Funktion in der Thrombozytenmembran	13
2. Fragestellung	16
3. Material und Methoden	18
3.1 Blutspender	18
3.2 Herstellung und Präparation der Plasma- bzw. Blutproben	18
3.2.1 Blutentnahme	18
3.2.2 Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP)	18

3.2.3 In vitro-Inhibition von Gerinnungs- und Aktivierungsschritten	18
3.2.4 Veränderung des Cholesteringehaltes von Thrombozytenmembranen	19
3.2.4.1 Herstellung von Methyl-beta-Cyclodextrin/Cholesterinkomplexen	19
3.2.5 Präparation des PRP für die Experimente	20
3.3 Thrombozytenmikroskopie mit Flusskammer als experimentelles	
Strömungsmodell	20
3.3.1 Aufbau der Flusskammer	20
3.3.2 Mikroskopaufbau	21
3.3.3 Reflektions-Interferenz-Kontrast Mikroskopie	22
3.3.4 Fluoreszenzmikroskopie	23
3.3.5 Durchführung der Strömungsexperimente	23
3.3.5.1 Strömungsexperimente über VWF	24
3.3.5.2 Strömungsexperimente über Kollagen	24
3.3.6 Bildanalyse	25
3.4 Viskosimeter	26
3.4.1 Nutzung des Viskosimeters zur Generierung einer definierten	
Wandschubspannung	26
3.4.2 Scherung von PRP und weitere Analyse der Proben	26
3.5. Durchflusszytometrie	27
3.5.1 Fluoreszenzfarbstoff markierte Oberflächenantikörper	27
3.5.1.1. Verwendete Antikörper	28
3.5.2 Präparation und Analyse der Proben nach Scherung	28
3.6 Thrombingenerierungs-Test (TDT [®] , Thrombin Dynamics Test)	29
3.6.1 Messung der Thrombingenerierung	29
3.7 Statistische Auswertung	30
4. Ergebnisse	31
4.1. Adhäsion von Thrombozyten an VWF unter arteriellen Flussbedingungen	31
4.2 Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung an Kollagenfasern vom Typ I	
unter arteriellen Flussbedingungen	35
4.3 Durchflusszytometrische Untersuchung des PRP nach Scherung	39
4.3.1 Plättchenanzahl und -größe sowie Rezeptorverteilung auf der Zellmembran	
.....	41
4.3.2 Mikropartikelanzahl und -größe, sowie Rezeptorverteilung auf der	
Mikropartikelmembran	43

4.3.3 Plättchenaktivierung durch Scherung	45
4.3.3.1 Anzahl CD62P+ Plättchen	46
4.3.3.2 Durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) CD41+ Plättchen.....	47
4.4 Messung der Thrombingenerierungskapazität im TDT	49
5. Diskussion	51
5.1 Einfluss der Cholesterindepletion bzw. –anreicherung auf die Adhäsion von Thrombozyten und <i>tether</i> -Bildung an VWF unter arteriellen Strömungsbedingungen.....	51
5.1.1 Thrombozyten mit cholesterindepletierter, bzw. cholesterinbeladener Zellmembran zeigen intakte Interaktion mit einer VWF-beschichteten Oberfläche mit Unterschieden je nach Behandlung und Flussgeschwindigkeit. .	51
5.1.2 Veränderte Dynamik der <i>tether</i> -Bildung durch Cholesterindepletion bzw. - anreicherung der Thrombozytenmembran	53
5.2 Einfluss der Cholesterindepletion bzw. –anreicherung auf die Bildung von Mirkopartikeln	54
5.3 Änderung der Rezeptorverteilung und –dichte des GPIIb- und GPIIb-IIIa- Rezeptors auf Plättchen und Mikropartikeln durch Modifizierung des Cholesteringehaltes der Zellmembran	56
5.4 Einfluss der Cholesterindepletion bzw. –anreicherung auf die Aktivierbarkeit von Thrombozyten durch Einwirkung von Scherkräften.....	57
5.5 Einfluss der Cholesterindepletion bzw. –anreicherung auf die Thrombozytenandhäsion und Aggregatbildung an Kollagenfasern vom Typ I unter arteriellen Strömungsbedingungen	58
5.6 Beeinflussung der Thrombingenerierungskapazität der Thrombozyten durch Veränderung des Cholesteringehaltes der Plättchenmembran.....	59
6. Zusammenfassung.....	61
7. Literaturverzeichnis	63
8. Anhang	70
8.1 Abkürzungsverzeichnis	70
8.2 Einheiten	71
9. Danksagung.....	72

1. Einleitung

1.1 Thrombozyten

Thrombozyten, oder Blutplättchen, sind mit einem Durchmesser von durchschnittlich 2 μm die kleinsten Zellen im zirkulierenden Blutkreislauf. Sie werden im Knochenmark aus ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, durch Zytoplasmaabschnürungen gebildet. Thrombozyten besitzen im Gegensatz zu vielen anderen Blutzellen keinen Zellkern und haben eine durchschnittliche Lebensdauer von 7 bis 10 Tagen. Danach werden sie als gealtert erkannt und im retikulären System von Leber und Milz abgebaut. Bei einem gesunden Erwachsenen zirkulieren normalerweise 150.000 bis 400.000 Thrombozyten/ μl Blut im Kreislauf. Um die abgebauten Thrombozyten zu ersetzen, werden täglich ca. 35.000 bis 40.000 Plättchen/ μl Blut neu gebildet. Das entspricht etwa 20% der Gesamtblutplättchenzahl.¹

1.2 Ultrastruktur der Thrombozyten

Thrombozyten haben eine komplexe Ultrastruktur. Die verschiedenen Zellkompartimente können aufgrund ihrer Funktion und Struktur in vier verschiedene Bereiche eingeteilt werden:² die periphere Zone, die strukturelle Zone, die Zone der Zellorganellen und das Membransystem.

Die **periphere Zone** wird von der Zytoplasmamembran gebildet, die aus einer Phospholipiddoppelschicht besteht. In diese Doppelschicht sind Glykoproteine, Proteine und Mukopolysaccharide eingelagert, welche die sogenannte Glykokalix bilden. Außerdem finden sich Bereiche, die besonders reich an Sphingolipiden und Cholesterin sind und deshalb als „*lipid rafts*“ bezeichnet werden (siehe auch Kapitel 1.9). In diesen Zonen finden sich vermehrt Oberflächenrezeptoren, die bei der Adhäsion und Aktivierung der Plättchen eine wichtige Rolle spielen. Die **strukturelle Zone** ist aus Mikrotubuli, Aktinfilamenten und anderen Strukturproteinen zusammengesetzt, die sich direkt unter der Zytoplasmamembran befinden. Diese Substanzen geben den Thrombozyten ihre typische diskoide Ruheform. Werden die Plättchen aktiviert, so sind sie auch am Gestaltwandel und der Ausbildung von Pseudopodien beteiligt.³

Im Zytoplasma der Thrombozyten befindet sich die **Zone der Organellen**. Die Organellen der Thrombozyten setzen sich vor allem aus Glykogenspeichern, Mitochondrien und Speichergranula zusammen. Es finden sich drei verschiedene Granulatypen: **α -Granula**, ***dense bodies*** und **Lysosomen**.

Die **α -Granula** sind zahlenmäßig am häufigsten. Sie werden für die Thrombozytenvermittelte inflammatorische Reaktion und die Gerinnung (Adhäsion, Aggregation und Chemotaxis) benötigt. Um diese Funktionen zu erfüllen sind in den α -Granula zahlreiche Substanzen wie Koagulationsfaktoren, Adhäsionsproteine, Zytokine, sowie verschiedenste Enzyme enthalten. Bei Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Exozytose der α -Granula durch Fusion der Granulamembran mit der Plättchenmembran.⁴

Die ***dense bodies*** tragen ihren Namen Aufgrund ihrer elektronenoptisch dichten Inhaltsstoffe. Sie speichern niedrig-molekulare Stoffe wie Calcium, Serotonin, Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP). Diese Stoffe werden bei Aktivierung an die Oberfläche der Thrombozyten sezerniert, aktivieren andere zirkulierende Plättchen und verstärken dadurch die Aggregation.⁵

Die **Lysosomen** enthalten vor allem hydrolytische Enzyme wie Kollagenasen und Elastasen und ähneln damit Lysosomen anderer Zellen. Damit es zu deren Degranulation kommt, bedarf es starker prokoagulatorischer Stimuli durch Thrombine oder Kollagen.

Zusätzlich zur Plasmamembran besitzen Thrombozyten ein **Membransystem** welches sich aus zwei Komponenten zusammensetzt: zum einen aus dem offenen kanalikulären System, welches mit der Plasmamembran verbunden ist, zum anderen aus dem dichten tubulären System. Das offene kanalikuläre System dient zur Vergrößerung der Membranoberfläche nach Plättchenaktivierung, außerdem der Sekretion und Endozytose.⁶ Im dichten tubulären System befindet sich der Hauptspeicherort für freie Calciumionen (Ca^{2+}).

1.3 Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten

In die Thrombozytenmembran sind zahlreiche Rezeptoren integriert, welche die Interaktion mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren, Endothelzellen und Leukozyten vermitteln. Der größte Anteil dieser Rezeptoren besteht aus Glykoproteinen. Aufgrund ihrer Molekülstruktur lassen sie sich in vier Gruppen einteilen: leuzinreiche Glykoproteine, Selektine, Integrine und Rezeptoren vom Typ der Immunglobuline.

Auf drei thrombozytenspezifische Glykoproteine bzw. Rezeptorkomplexe, die für die Plättchenfunktion eine Rolle spielen und in dieser Arbeit vermehrt Erwähnung finden, wird im Folgenden näher eingegangen. Ihre Funktion innerhalb des Gerinnungssystems wird weiter unten beschrieben.

1.3.1 GPIIb-IIIa

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, das auch Glykoprotein IIb-IIIa (GP IIb-IIIa) genannt wird, gehört zur Gruppe der Integrine. Es ist ein transmembranärer Rezeptor, der eine intrazelluläre Verbindung zum Zytoskelett und einen extrazellulären Anteil besitzt.⁷ Mit 40.000-80.000 Kopien pro Thrombozyt ist es der häufigste Rezeptor an der Membranoberfläche. Er konnte jedoch auch in thrombozytären α -Granula und auf Mikropartikeln nachgewiesen werden.⁸ Nach Thrombozytenaktivierung wird der Rezeptor durch *inside-out signaling* vermehrt an der Thrombozytenoberfläche exprimiert und durch Konformationsänderung verstärkt bindungsfähig.

Die GPIIb-Domäne des Rezeptors kann mit dem Antikörper CD41 markiert werden.

1.3.2 GPIb-V-IX

Der GPIb-V-IX-Rezeptorkomplex gehört zur Gruppe der leuzinreichen Glykoproteine. Pro Thrombozyt sind ca. 20.000-25.000 Rezeptorkopien vorhanden, die gleichmäßig auf der Thrombozytenoberfläche verteilt sind.⁹ GPIb ist der Bindungspartner für den von Willebrand Faktor (VWF) und besitzt außerdem Thrombinbindungsstellen.

Die GPIb-Domäne des Rezeptors kann mit dem Antikörper CD42b markiert werden.

1.3.3 P-Selektin

Das P-Selektin gehört zur Gruppe der Selektine. Das integrale membrangebundene P-Selektin ist in den α -Granula der Thrombozyten sowie in den Weibel-Palade Körperchen von Endothelzellen gespeichert. Auf der Membranoberfläche eines ruhenden Thrombozyten wird P-Selektin nur in einem geringen Maße exprimiert, es finden sich ca. 800 Kopien des Rezeptors pro Thrombozyt. Der Hauptspeicherort für P-Selektin sind die α -Granula. Kommt es zu einer Aktivierung der Thrombozyten, verschmelzen die α -Granula mit der äußeren Thrombozytenmembran und das P-Selektin erscheint an der Plättchenoberfläche. Im aktivierten Zustand sind ca. 10.000 bis 13.000 Moleküle an der äußeren Thrombozytenmembran nachweisbar. Das auf der

Zelloberfläche freigesetzte P-Selektin trägt zur Adhäsion der Thrombozyten an Neutrophile und Monozyten bei, indem es an den dort exprimierten P-Selectin Glycoprotein Ligand (PSGL-1) bindet.¹⁰ Zudem wird die Größe und Stabilität von Thrombozytenaggregaten durch P-Selektin mitbestimmt, da die Zellen sich nach der Bildung eines Thrombus durch P-Selektin miteinander verbinden.¹¹

Aufgrund der raschen und aktivierungsabhängigen Rezeptorexpression von P-Selektin ist es ein geeigneter Marker um den Aktivierungszustand von Thrombozyten zu quantifizieren.

P-Selektin kann mit dem Antikörper CD62P markiert werden.

1.4 Thrombozytenfunktion

Die Hauptaufgabe der Thrombozyten ist es, die Integrität des Gefäßsystems aufrecht zu erhalten und einen Blutverlust im Falle einer Verletzung zu minimieren. Diesen Prozess erleichtert eine physiologische Eigenschaft des Blutes, die dazu führt, dass sich in einer laminaren, arteriellen Strömung die Erythrozyten durch die axiale Migration in die Mitte eines Gefäßlumens bewegen, während die Thrombozyten an den Rand gedrückt werden und sich dadurch in der Nähe des Gefäßendothels konzentrieren.^{12,13}

Unter physiologischen Bedingungen stellen intakte Endothelzellen der Gefäßwand eine Isolierschicht gegen das umliegende Gewebe dar. Sie wirken der Thrombozytenanhaftung und Thrombusbildung aktiv entgegen, indem sie antithrombogene und vasoaktive Substanzen freisetzen, zum Beispiel Stickstoffmonoxid oder Prostacyclin. Außerdem verfügen sie über eine negative Oberflächenladung, die zu einer Abstoßung der ebenfalls negativ geladenen Thrombozyten führt.¹⁴

Im Subendothel befinden sich jedoch zahlreiche prothrombogene Substanzen, die bei Schädigung des Gefäßendothels freigesetzt oder freigelegt werden und so mit dem zirkulierenden Blut in Kontakt kommen. Ein Kontakt der zirkulierenden, inaktiven Thrombozyten mit diesen Substanzen führt zur Aktivierung der Plättchen, die dann durch die Bildung eines hämostatischen Pfropfes einem Blutverlust so schnell wie möglich versuchen entgegenzuwirken. Die Bildung eines Plättchenaggregats ist ein hochkomplexer Prozess, der sich aus verschiedenen Phasen zusammensetzt, die eng miteinander verknüpft sind. Die Thrombozyten adhären, verändern ihre Form

(*shape change*), breiten sich aus (*spreading*), sezernieren gespeicherte Inhaltsstoffe und bilden schließlich ein Plättchenaggregat.

1.4.1 Adhäsion

An der Stelle der verletzten Endothelschicht der Gefäßwand werden verschiedene Strukturen des subendothelialen Bindegewebes freigelegt: Proteoglykane, Kollagen Typ I, III und IV, Entactin, Laminin und Fibulin. Diese Komponenten der extrazellulären Matrix präsentieren Bindungsstellen für Adhäsionsproteine wie VWF, Fibrinogen und Fibronectin, die für die Interaktion der Thrombozyten mit dem subendothelialen Bindegewebe verantwortlich sind. Daneben existieren Glykoproteine auf der Thrombozytenmembran, welche direkt mit dem exponierten Kollagen interagieren. Dazu gehören Integrin- $\alpha_2\beta_1$ (GPIa-IIa) und Glykoprotein VI. Die im Blutfluss strömenden Thrombozyten werden durch den Kontakt mit den genannten Proteinen und Glykoproteinen abgefangen (*tethering*) und haften transient (*rolling*) bis es zu einer stabilen Adhäsion und Aggregatbildung kommt. Die Adhäsion wird dabei durch die vorherrschenden Strömungsbedingungen beeinflusst. Bei Strömungsbedingungen, die relativ hohe Scherraten von 1500s^{-1} und darüber erzeugen, ist das initiale Abfangen und Anhaften der Thrombozyten entscheidend von dem thrombozytären Membranglykoprotein $\text{Ib}\alpha$ (GPIb α) und seinem Liganden VWF abhängig. Bei niedrigeren Scherraten reichen andere Plasmaproteine wie Fibrinogen oder das Kollagen der Gefäßwand für die Thrombozytenadhäsion aus.¹⁵⁻¹⁷ Eine detaillierte Darstellung der Effekte des Blutflusses auf die Plättchenadhäsion und Aggregation findet sich weiter unten in den Kapiteln 1.5, 1.6 und 1.7.

1.4.2 Aktivierung

Werden Thrombozyten aktiviert, durchlaufen sie zahlreiche Veränderungen bis es schließlich zur Plättchenaggregation kommt. Sie verändern ihre Form (*shape change*) und die Ausrichtung ihrer Membranphospholipide. Außerdem setzen sie die in ihren Granula gespeicherten Inhaltsstoffe frei, die wiederum an der Hämostase und Wundheilung beteiligt sind.

Damit Thrombozyten aktiviert werden und einen Gestaltwandel (*shape change*) durchlaufen, bedarf es eines adäquaten Stimulus. Die größte physiologische Relevanz haben hier Kollagen, VWF, Thrombin, ADP, Arachidonsäure und Epinephrin. Die

wichtigsten Adhäsionssubstrate der subendothelialen Matrix sind Kollagen und VWF. Es gibt noch weitere Substanzen, die im Bereich einer Gefäßverletzung gebildet und sezerniert werden und die Aktivierung sowie den Gestaltwandel der Thrombozyten induzieren. Thrombin wird auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten gebildet. ADP wird von Erythrozyten oder aus den dichten Granula aktivierter Plättchen sezerniert. Arachidonsäure wird ebenfalls von aktivierten Plättchen freigesetzt. Für alle diese Thrombozytenagonisten existieren an der Plättchenoberfläche spezifische Rezeptoren. Einige dieser Substanzen führen durch Interaktion mit Membranrezeptoren zur Plättchenaktivierung. Andere interagieren mit Proteinen, welche an ionenpermeable Kanäle der Thrombozytenmembran gekoppelt sind und den Einwärtsstrom von Ca^{2+} regulieren. Das Ergebnis dieser Vielzahl an gleichzeitig ablaufenden biochemischen Prozessen ist der thrombozytäre Gestaltwandel. Die Thrombozyten verändern ihre diskoidale Form, die sekretorischen Granula werden zentralisiert und es bilden sich Pseudo- bzw. Filopodien aus.³ Diese zahlreichen Veränderungen laufen innerhalb weniger Sekunden nach Aktivierung der Thrombozyten ab und dienen unter anderem dazu, die Membranoberfläche der Thrombozyten zu vergrößern, damit sich die Thrombozyten optimal auf einer exponierten subendothelialen Matrix ausbreiten können. Hierbei können die Thrombozyten ihre Oberfläche von durchschnittlich $8 \mu\text{m}^2$ im nicht aktivierten Zustand auf bis zu $13 \mu\text{m}^2$ vergrößern.

1.4.3 Aggregation

Nachdem die Interaktion der Thrombozyten mit einer verletzten Gefäßwand zur Plättchenadhäsion- und Aktivierung geführt hat, kommt es zur Aggregation. Die haftenden Thrombozyten binden lösliche, adhäsive Proteine an ihrer Membran und bilden so eine reaktive Oberfläche, an die sich weitere Thrombozyten anlagern können. Dieser Amplifikationsprozess läuft innerhalb sehr kurzer Zeit (Sekunden bis wenige Minuten) ab und führt zum Verschluss des verletzten Gefäßes durch einen Plättchenthrombus. Zur Förderung der Aggregation und zur Bildung eines stabilen Thrombus spielt das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (GP IIb-IIIa) eine entscheidende Rolle. Das Integrin ändert durch *inside-out signaling* und Konformationsänderung die Affinität zu seinen Liganden und bindet im Plasma enthaltene lösliche Adhäsionsmoleküle, vor allem Fibrinogen, Fibronectin und VWF.¹⁸ In der primären Aggregationsphase ist die anfängliche GP IIb-IIIa-Fibrinogen-Interaktion noch reversibel. In der sekundären

Aggregationsphase geht diese Bindung durch Sekretion von thrombozytären Granula-Inhaltsstoffen in eine irreversible Bindung über. Wie unter 1.4.1 erwähnt, ist bei höheren Scherraten jedoch die GPIb-VWF-Interaktion für ein primäres Anhaften der Thrombozyten unbedingt erforderlich. Die GP IIb-IIIa-Fibrinogen-Interaktion genügt hier nicht, um eine effiziente Adhäsion und Aggregation zu erreichen.¹⁵⁻¹⁷ (weitere Informationen in Kapitel 1.6)

1.5 Die Geschwindigkeit des Blutflusses und deren Einfluss auf die Plättchenadhäsion und Aggregation

Blut zirkuliert mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gefäßsystem, abhängig von dem Blutdruck, der Viskosität des Blutes und dem Durchmesser der Gefäße.

Im Inneren eines Gefäßes fließt das Blut mit einer größeren Geschwindigkeit als in der Nähe einer Gefäßwand. Dieser Unterschied schafft einen Scher-Effekt zwischen nebeneinander strömenden Flüssigkeitsschichten, der am größten an der Gefäßwand ist. Ein Maß, um diese Strömungsverhältnisse zu beschreiben, ist die Scherrate. Die Scherrate wird in inversen Sekunden (s^{-1}) angegeben und ist direkt proportional zum Scherstress (angegeben in Newton/m^2) und umgekehrt proportional zur Viskosität der Flüssigkeit (gemessen in $\text{Newton/m}^2 \cdot s$ oder Pascal). Die Zugkraft, die der Plättchenadhäsion und Aggregation entgegensteht, steigt mit dem Scherstress. Das bedeutet, dass die Effekte hoher Scherkräfte auf die Thrombusbildung eher in Arterien, hier vor allem in Arteriolen, und weniger in Venen relevant sind. Die Scherraten reichen unter physiologischen Bedingungen in kleinen Arteriolen und Arteriolen der Mikrozirkulation von etwa 470 bis $4.700 s^{-1}$ mit einem Mittelwert von $1.700 s^{-1}$.¹⁹ Bei pathologischen Veränderung, wie zum Beispiel bei Stenosen durch artherosklerotisch veränderte Gefäße, können die Scherraten sehr viel höhere Werte erreichen, bis zu 20.000 bis $40.000 s^{-1}$.²⁰

1.6 VWF und seine Interaktion mit dem GPIIb/IIIa-Rezeptorkomplex bei hohen Scherraten

Die Mechanismen der Plättchenadhäsion und Aggregation sind bei unterschiedlichen Scherraten von verschiedenen Rezeptoren und Liganden abhängig. Bei Scherraten bis etwa $1000 s^{-1}$, wie sie zum Beispiel in größeren Arterien vorkommen, wird dieser

Prozess vor allem von Komponenten der subendothelialen Matrix induziert, die bei einer Verletzung der Gefäßwand exponiert werden. Hier spielt zwar die Aktivierung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Rezeptors und seines Liganden Fibrinogen eine Rolle, aber auch die Interaktion von Kollagen mit dem GPVI und dem Integrin $\alpha_2\beta_1$ oder die Matrixproteine Fibronectin und Laminin.^{21,22} Jedoch ist der VWF bereits ebenso in diesem Scherratenbereich aktiv. Umso mehr die Scherraten sich etwa 1500 s^{-1} annähern, desto mehr ist die Adhäsion allein abhängig von der Interaktion des GPIb/V/IX Rezeptor-Komplexes mit an die subendotheliale Matrix gebundenem VWF.^{21,22} Die Bindung zwischen GPIb α und der A1 Domäne des VWF ist die wichtigste, die in der Lage ist, auch bei extrem hohen Flussgeschwindigkeiten und Scherraten $>50.000\text{ s}^{-1}$ Thrombozyten an einer adhäsiven Oberfläche kurzzeitig festzuhalten (*tethering*). Die Bindung ist jedoch reversibel und verursacht keine permanente Adhäsion.¹⁵ Sie hält die Thrombozyten vielmehr in engem Kontakt mit der Oberfläche bis andere Liganden und Rezeptoren nach Aktivierung der Plättchen eine stabile Adhäsion und Aggregation bewirken.¹⁶ Bei Scherraten über 10.000 s^{-1} , wie sie nur unter pathologischen Bedingungen zustande kommen, zum Beispiel in stark stenosierte Arterien, läuft die Adhäsion und Aggregation nur noch über den GPIb/V/IX Rezeptor-Komplex und über lösliche und an die Oberfläche gebundene VWF Multimere ab. Die Bindung findet auch ohne eine Aktivierung der Plättchen oder eine Interaktion mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Rezeptor statt.²³

1.7 Thrombozyten-Kollagen Interaktion

Kollagen ist die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix des Menschen und hat unter anderem die wichtige Aufgabe, die Integrität und Elastizität der Gefäßwände aufrecht zu erhalten, die zu etwa 20 bis 40% aus Kollagen bestehen.²⁴ Kommt es zu einer Verletzung der Gefäßwand, wird das in der subendothelialen Matrix enthaltene Kollagen exponiert und führt so durch die Interaktion mit spezifischen thrombozytären Membranrezeptoren zu einer Plättchenaktivierung. Wie unter 1.3 erwähnt, findet die direkte Interaktion mit Kollagen eher bei niedrigeren Scherraten um 1000 s^{-1} statt. Hier spielen vor allem zwei Rezeptoren eine Rolle: das Glykoprotein VI und das Integrin $\alpha_2\beta_1$ (auch GPIa/IIa genannt).^{25,26}

Es wird vermutet, dass bei der Kollagen-induzierten Gerinnselbildung beide Rezeptoren zusammenwirken. Das Integrin $\alpha_2\beta_1$ ist hierbei eher für die stabile

Plättchenadhäsion zuständig und kann mit fibrillärem als auch mit löslichem Kollagen interagieren.²⁷ Der GPVI-Rezeptor bindet lediglich an fibrilläres Kollagen und induziert die weitere Thrombozytenaktivierung, Sekretion und Aggregation mittels Aktivierung weiterer Signaltransduktionskaskaden.²⁸⁻³⁰

1.8 Thrombozytäre Mikropartikel

Erstmals wurden aus Blutplasma stammende Mikropartikel 1967 als „Plättchenstaub“ beschrieben und für einen Vorgang verantwortlich gemacht, der die Thrombin-Generierung in plättchenarmem Plasma unterstützt.³¹ Weitere Studien zeigten, dass viele im Blut vorkommenden Zellen, unter ihnen Thrombozyten, Endothelzellen, Leukozyten und Erythrozyten, kleine Zellfragmente (0,1 – 1µm) ihrer Zellmembran abscheiden, die dann im Blutkreislauf zirkulieren. Thrombozytäre Mikropartikel bilden mit ungefähr 70-90% den größten Anteil.³²⁻³⁴

1.8.1 Charakterisierung und Membranzusammensetzung von thrombozytären Mikropartikeln

Da Mikropartikel von verschiedenen Zellen abstammen, wurde ihre Zugehörigkeit vorwiegend über ihre Oberflächenantigene bestimmt. Diejenigen, die mit anti-CD41 oder anti-CD42b gekennzeichnet werden konnten, wurden als Plättchen-Mikropartikel bezeichnet.^{8,35} CD41 positive Mikropartikel haben einen Durchmesser von unter einem Mikrometer und exprimieren typischerweise anionische Phospholipide auf ihrer Zelloberfläche.³⁶ Jedoch scheinen Plättchen-Mikropartikel eine relativ heterogene Gruppe von Teilchen zu sein. Eine Studie verglich die Membranzusammensetzung von Thrombozyten mit der von Mikropartikeln. Es zeigte sich, dass die Membran von Mikropartikeln sowohl aus Plasma- als auch aus Granulamembranen bestand.³⁷ Bei der Zusammensetzung der Lipide in der Membran konnten jedoch Unterschiede festgestellt werden, je nachdem mit Hilfe welches Agonisten die Mikropartikel generiert wurden. Getestet wurden Thrombin, Kollagen, Thrombin und Kollagen kombiniert und Calciumionophor A23187. Außerdem konnte im Vergleich zu Thrombozytenmembranen ein tendenziell erhöhter Cholesteringehalt in Mikropartikelmembranen nachgewiesen werden, was auf einen erhöhten Gehalt von *lipid rafts* hindeuten könnte. In einer Studie von Dean *et al.*³⁸ wurden Mikropartikel, die durch Aktivierung von Thrombozyten entstanden sind, nach ihrer Größe in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Daten zeigen, dass die

unterschiedlichen Größen-Klassen der Mikropartikel sich signifikant sowohl in der Anzahl an Membranrezeptoren, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, als auch in ihrem Verhalten in funktionalen Test unterscheiden.

1.8.2 Entstehung von Mikropartikeln

Auf welche Weise Mikropartikel (MP) gebildet werden, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Zuerst war man der Annahme, dass Mikropartikel hauptsächlich von aktivierten Plättchen stammen, da sie vermehrt gebildet werden, wenn Thrombozyten mit starken physiologischen Agonisten, wie zum Beispiel Thrombin oder Kollagen stimuliert werden.³⁹ Aber auch die Einwirkung von Scherkräften auf Blutplättchen führte zu einer vermehrten Generierung von Mikropartikel.^{40,41} In einer Arbeit von Reiniger *et al.* konnte ein passiver, scherabhängiger Mechanismus gezeigt werden, bei dem die Bildung von Mikropartikeln ohne vorherige Aktivierung der Thrombozyten alleine durch die Interaktion von VWF mit seinem Liganden GPIIb erfolgte.⁴² Ein Anstieg der Mikropartikel-Anzahl war auch in Plättchenkonzentraten,⁴³ nach Exposition gegenüber Komplement-bindenden Proteinen⁴⁴ oder nach Induktion von Apoptose⁴⁵ zu beobachten. Die beschriebenen Mechanismen ließen sich alle aus *in vitro* Experimenten ableiten. Die Entstehung von Mikropartikeln wurde also eher unter simulierten „pathologischen“ Bedingungen untersucht.

Jedoch ist auch bei Gesunden immer eine gewisse Anzahl an Mikropartikeln nachweisbar, wobei die Plättchen dieser Personen nicht in besonderem Maße aktiviert sind.⁴⁶ Die Anzahl an Mikropartikeln wird scheinbar auf einem bestimmten Niveau gehalten. Dies lassen wenige Studien zur Halbwertszeit von Mikropartikeln vermuten. Nachdem man Mäusen bzw. Hasen Mikropartikel intravenös verabreicht hatte, wurden diese sehr schnell wieder aus dem Blutkreislauf eliminiert.^{47,48}

Dies legt die Vermutung nahe, dass es auch andere Mechanismen gibt, die zur Mikropartikelentstehung beitragen. Eine Hypothese besagt, dass CD41-positive Mikropartikel bei gesunden Individuen kontinuierlich von Megakaryozyten gebildet werden. Demnach würde es zwei Populationen von Mikropartikeln geben: zum einen Mikropartikel, die von Blutplättchen abstammen (platelet microparticles, PMPs) und zum anderen Mikropartikel, die von Megakaryozyten gebildet werden (megakaryocyte-derived microparticles, MKMPs). In einer Studie von Flaumenhaft *et al.*⁴⁹ wird die direkte Visualisierung der Mikropartikelbildung an Maus-Megakaryozyten und humanen, aus Nabelschnurblut isolierten, Megakaryozyten in

Zellkultur gezeigt. Diese Megakaryozyten bildeten CD41-positive Mikropartikel, welche sich von PMPs unterscheiden, da auf ihrer Oberfläche keine Marker vorhanden sind, die auf eine Fusion mit Granula hindeuten (CD62P oder LAMP-1) oder eine Degradation des Zytoskeletts anzeigen (degradiertes Filamin A). Diese Eigenschaften hatten auch die Mehrheit der PMPs, die im Blut gesunder Personen gefunden wurden.

1.8.3 Mikropartikel in Hämostase und Thrombose

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass Mikropartikel eine prokoagulatorische Wirkung besitzen und auf diese Weise zur Hämostase beitragen.^{31,50,51} Es wurden ihnen verschiedene Eigenschaften zugeschrieben, die diese gerinnungsfördernde Wirkung erklären können. So wurde gezeigt, dass Plättchen-Mikropartikel Rezeptoren tragen, die eine hohe Affinität zu anderen Faktoren der Gerinnung haben,⁵² Phosphatidylserin exprimieren,⁵³ Aktivitätsmarker wie CD63 und P-Selektin auf ihrer Oberfläche tragen,⁵⁴ und mittels *tissue factor* zur Thrombusbildung beitragen.^{55,56} Diese Ergebnisse legen einen Einfluss von Plättchen-Mikropartikeln auf die Hämostase nahe.

Allerdings werden Plättchen-Mikropartikeln nicht nur prokoagulatorisch wirkende Eigenschaften zugeschrieben.⁵⁷ In einer Arbeit von Berckmans et al.³⁴ wird postuliert, dass Mikropartikel bei Gesunden ständig eine geringe Menge von Thrombin produzieren, was wiederum zur Aktivierung von Protein C führt, also insgesamt einen antikoagulatorischen Effekt hat. Ob Plättchen-Mikropartikel in ihrer physiologischen Funktion nun mehrheitlich prokoagulatorisch oder antikoagulatorische Eigenschaften haben, ist noch nicht geklärt.

1.8.4 Mikropartikel und ihre Rolle bei verschiedenen Erkrankungen

Bisher wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, welche die Rolle von Mikropartikeln bei einer Vielzahl von Erkrankungen beschreiben. Hierzu gehören zum Beispiel Erkrankungen, die das Herz-Kreislaufsystem betreffen. So wurde bei instabiler Angina pectoris,⁵⁸ nach Myokardinfarkt,⁵⁹ nach Apoplex⁶⁰ und bei Vorhofflimmern⁶¹ eine erhöhte Anzahl von Mikropartikeln nachgewiesen. Auch vier entscheidende Risikofaktoren, die an der Entstehung einer koronaren Herzkrankheit beteiligt sind (Adipositas, arterieller Hypertonus, Hypercholesterinämie und Insulinresistenz) gehen mit einer erhöhten Anzahl von Mikropartikeln einher.⁶²⁻⁶⁵ In einigen Studien wurde

nicht nur eine erhöhte Mikropartikelanzahl an sich festgestellt, sondern diese auch als Ursache für thrombembolische Komplikationen angesehen, zum Beispiel bei Patienten mit Urämie,⁶⁶ nach Herzinfarkt oder bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit.⁵⁴

Ist hingegen die Bildung von Mikropartikeln defekt, führt dies zu einer Blutungsneigung. So ist zum Beispiel der Castamans Defekt,⁶⁷ ein isoliertes Defizit in der Fähigkeit Plättchen-Mikropartikel auszubilden, mit einer Blutungsneigung assoziiert. Patienten mit dem Scott-Syndrom,⁶⁸ einer seltenen autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung, leiden aufgrund von mangelnder Fähigkeit Plättchen-Mikropartikel auszubilden ebenfalls an einer Blutungsneigung.

Eine ausführliche Zusammenfassung der klinischen Relevanz von Mikropartikeln bei den oben genannten und weiteren Erkrankungen findet sich im Review-Artikel „Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes“ von Italiano *et al.*³⁹

1.9 Cholesterin, *lipid rafts* und die Bedeutung in der Thrombozytenmembran

1.9.1 Cholesterin und dessen Einfluss auf die Plättchenfunktion

In den 1970er und frühen 1980er Jahren wurden erste Studien durchgeführt, die zeigten, dass der Cholesteringehalt und die Plättchenfunktion bei einigen Dyslipoproteinämien verändert sind.⁶⁹⁻⁷² Bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie fanden sich erhöhte Werte von freiem Cholesterin in den Thrombozyten^{71,72} sowie eine erhöhte Sensitivität *in vitro* gegenüber Substanzen, welche die Gerinnung fördern, wie Epinephrin, Kollagen und ADP.⁷³ Um auszuschließen, dass andere Effekte diese Hyperreaktivität der Thrombozyten bei einer genetisch bedingten Hyperlipoproteinämie bedingen, wurden weitere Versuche an normalen Thrombozyten durchgeführt. Die Plättchen gesunder Spender wurden mit cholesterinreichen Liposomen inkubiert, was zu einer ähnlichen Hyperreaktivität der Thrombozyten wie bei den Kranken führte.⁷⁴ Entsprechend konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass ein erniedrigter Cholesteringehalt der Thrombozyten eine erniedrigte Reaktivität gegenüber Epinephrin und ADP zur Folge hatte.^{75,76} Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass Cholesterin eine entscheidende Rolle in der frühen Phase der Plättchenaktivierung spielt. Wahrscheinlich beeinflussten

Änderungen des Cholesteringehaltes der Thrombozytenmembran die Organisation der *lipid rafts* und damit Funktion der Blutplättchen. Zu dieser Zeit war jedoch die Vorstellung von *lipid rafts* noch nicht entwickelt und eine Verbindung zu diesen speziellen Membrandomänen wurde in den Studien nicht hergestellt.

1.9.2 Charakterisierung von *lipid rafts*

Die Theorien zur Existenz von *lipid rafts* wurden erstmals in einem Review von Singer und Nicolson 1972 zusammengefasst, in dem diese speziellen Membranareale als „fluides Mosaik“ bezeichnet wurden.⁷⁷ *Lipid rafts* sind eine dynamische Ansammlung von Cholesterin und Glycerosphingolipiden innerhalb der Membrandoppelschicht. In frühen Beschreibungen wurde sie vor allem über ihre Eigenschaft als unlösliche Areale einer Zellmembran definiert, die gegenüber nicht ionischen Detergentien resistent sind.⁷⁸ Sie werden deshalb auch als *detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched domains* (DIGs) oder als *detergent-resistant membranes* (DRMs) bezeichnet.

Allerdings haben zahlreiche nachfolgende Experimente gezeigt, dass *lipid rafts* keine definierte, starre Struktur in einer Zellmembran darstellen. Vielmehr sind sie eine heterogene Ansammlung von Domänen, mit unterschiedlicher Lipid- und Proteinzusammensetzung. Hieraus leitet sich auch die Definition des Keystone Symposiums of Lipid Rafts and Cell Function von 2006 ab: „Lipid Rafts sind kleine (10-200 nm), heterogene, höchst dynamische, sterol- und sphingolipid-angereicherte Domänen, die zelluläre Prozesse kompartimentieren. Kleine rafts können sich manchmal stabilisieren um größere Plattformen durch Protein-Protein und Protein-Lipid-Interaktionen zu bilden.“⁷⁹ Diese Plattformen sind für zahlreiche Zellfunktionen notwendig. Hierzu gehören zum Beispiel das intrazelluläre Sortieren von Rezeptoren und Proteinen,^{80,81} die Signaltransduktion⁸² und die Zellmigration.⁸³ *Lipid rafts* wurden bisher vornehmlich an der Zelloberfläche beschrieben und charakterisiert, sie sind aber auch Teil von Vesikel-Membranen innerhalb der Zelle, von Phagosomen und des Golgi-Apparats.^{84,85}

1.9.3 *Lipid rafts* und ihre Funktion in der Thrombozytenmembran

Auch in Thrombozyten wurden *lipid rafts* identifiziert und ihre Funktion in verschiedenen Studien untersucht. Ihnen werden zahlreiche Funktionen im Prozess der Hämostase und Thrombose zugeschrieben, von der initialen Adhäsion bis hin zur

Gerinnung und Thrombusbildung.⁸⁶ Aufgrund des erhöhten Cholesterin-Gehaltes der *lipid rafts* werden sie in der Literatur auch als cholesterinreiche Domänen (cholesterol-rich domains, CRDs) bezeichnet.

So sind beispielsweise der **GPVI-Rezeptor**, ein spezieller Kollagen-Rezeptor, und seine Signaluntereinheit FcR γ *lipid raft* assoziiert. Studien von Ezumi *et al.*⁸⁷ und Wonerow *et al.*⁸⁸ zeigten, dass GPVI in *lipid rafts* ruhender Thrombozyten stark angereichert ist und auch durch Vernetzung des Rezeptors nicht beeinflusst wird. Im Widerspruch dazu zeigte eine Studie von Locke *et al.*,⁸⁹ dass GPVI nicht immer gleichbleibend *raft*-assoziiert ist, sondern sich nur nach Stimulation der Thrombozyten dort anreichert. Außerdem wurde gezeigt, dass die Lokalisation von GPVI von der Assoziation mit FcR γ abhängt. Bei GPVI-Mutanten, die nicht in der Lage waren sich mit FcR γ zu verbinden, reichte sich GPVI auch nach der Rezeptorvernetzung mit Kollagen nicht in *lipid rafts* an. Wiederum widersprüchlich zu diesem Ergebnis fanden Wonerow *et al.*⁸⁸ eine gleichmäßige Verteilung von phosphoryliertem FcR γ an der Thrombozytenmembran stimulierter Plättchen. Obwohl die Ergebnisse in manchen Punkten widersprüchlich sind, so zeigen doch alle Arbeiten einen Einfluss von Cholesterindepletion und *lipid rafts* auf die GPVI-induzierte Signalkaskade. Dass Cholesterindepletion die Signalkaskade nach einer erfolgten Aktivierung von GPVI durch Kollagen stört, geht auch aus einer Studie von van Lier *et al.*⁹⁰ hervor. Hier wurde gezeigt, dass die Kollagen-stimulierte Aggregatbildung, das intrazelluläre Ca²⁺-Signal, sowie die folgende Sekretion von ADP und Thromboxan A₂ (TxA₂) durch Cholesterindepletion der Thrombozytenmembran deutlich abgeschwächt werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in einer früheren Studie von Grgurevich *et al.*⁹¹

Ob auch der **GPIIb-IIIa-Rezeptorkomplex** *raft*-assoziiert ist, konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Wonerow *et al.*⁸⁸ nahmen an, dass sich die Mehrzahl des GPIIb-IIIa außerhalb von *lipid rafts* befindet, und dass die Signalvermittlung über $\alpha_{IIb}\beta_3$ nicht *lipid raft*-assoziiert ist. Dies bestätigen Daten von Heijnen *et al.*,⁹² die mittels Immunelektronenmikroskopie erhoben wurden. Hier zeigte sich der größere Anteil des β_3 -Integrins außerhalb von CRDs. Allerdings war das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelte *spreading* durch Cholesterindepletion gestört, was eine funktionelle Beteiligung von $\alpha_{IIb}\beta_3$ an *raft*-abhängiger Signaltransduktion nahelegt.

In einer Studie von Shrimpton et al.⁹³ zeigte sich wiederum, dass ein kleiner Teil des auf der Zellmembran vorhandenen $\alpha_{IIb}\beta_3$ nach Zentrifugation entlang eines Zuckergradienten in der „raft-Fraktion“ zu finden war. Die relativen Anteile innerhalb und außerhalb der „raft-Fraktion“ änderten sich jedoch durch Aktivierung nicht.

Obwohl in dieser Studie eine Assoziation von *lipid rafts* mit dem GPIIb-IIIa nicht gefunden wurde, zeigte sich jedoch eine Assoziation des **GPIb-V-IX-Rezeptorkomplexes** mit CRDs. Etwa 10-15% der Rezeptoren zeigten sich *raft*-assoziiert. Dieser Anteil verdreifachte sich, wenn die Plättchen mit VWF aktiviert wurden, nicht jedoch durch eine Aktivierung mit ADP. Nach Auseinanderbrechen der *lipid rafts* durch Cholesterindepletion zeigte sich eine abgeschwächte VWF/Ristocetin-induzierte Aggregation. Auch konnten Cholesterin-depletierte Thrombozyten an einer beschichteten Oberfläche mit VWFdA1 nicht adhären.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von van Lier et al.,⁹⁰ die zeigen konnten, dass Cholesterin-depletierte Plättchen sehr wohl an einer mit VWF beschichteten Oberfläche adhären. Auch war die maximale VWF/Ristocetin-induzierte Aggregation durch Cholesterindepletion der Thrombozyten nicht verändert. In dieser Studie konnte ebenfalls eine reduzierte Oberflächenexpression von **CD63** (Tetraspanin) und **P-Selektin** nach Cholesterindepletion beobachtet werden. Dies deutet auf eine reduzierte Sekretion von α -Granula hin, die auch in vorangegangenen Studien nachgewiesen werden konnte.⁸⁸

In einer Studie von Heijnen et al.⁹² konnte gezeigt werden, dass CRDs in Thrombozyten hoch dynamische Membranareale darstellen und während der Adhäsion an Fibrinogen, VWF oder Kollagen in der Zellperipherie, das heißt an den ausgebildeten Filopodien, akkumulieren. Es konnte ebenfalls eine Anreicherung von CD63 und c-Src in diesen Membranarealen festgestellt werden.

In einer späteren Studie bestätigte sich, dass *lipid rafts* hoch dynamische Membranareale sind, die ihre Zusammensetzung ändern, je nachdem auf welcher Oberfläche die Thrombozyten adhären. Bei Adhäsion an VWF kam es zu einer Anreicherung von GPIIb in *lipid rafts*, bei Adhäsion an Kollagen zu einer Anreicherung von GPVI.⁹⁴ Diese Eigenschaft der Thrombozytenmembran deutet auf eine wichtige Rolle der *lipid rafts* bei der Signaltransduktion bei Adhäsion hin.

2. Fragestellung

Thrombozyten erfüllen im Kreislauf vielfältige Funktionen, die über ein komplexes System von Proteininteraktionen, Sezernierung von Botenstoffen und Strukturveränderungen funktionieren. In diesem komplexen System werden auch dem Cholesterin der thrombozytären Zellmembran verschiedenste Funktionen zugeschrieben. Es hält die Zellmembran flexibel und beweglich, es reichert sich in *lipid rafts* an und trägt wesentlich zur Organisation und Funktionalität der Zellmembran bei.⁹⁵ Durch die Anreicherung in *lipid rafts* nimmt es auch Einfluss auf das *clustering* bestimmter Membranrezeptoren oder auf das transmembranöse *signaling*.⁹⁶

Dass der Cholesteringehalt der Zellmembran die Aggregation von Thrombozyten beeinflusst, wurde bereits untersucht; allerdings waren die Ergebnisse nicht immer übereinstimmend.^{90,93} Welchen Einfluss der Cholesteringehalt der Zellmembran auf die Bildung von Mikropartikeln hat, ist bisher unklar. Bei gesunden Menschen ist immer eine gewisse Zahl an Mikropartikeln nachweisbar.⁴⁶ Es gibt verschiedenste Erkrankungen, bei denen es zu einer deutlichen Erhöhung der Mikropartikelzahl kommt. Welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, ist ebenfalls nicht abschließend geklärt. Ein Mechanismus der Mikropartikelentstehung, der als gesichert angesehen wird, ist die Thrombozytenaktivierung. Hinweise dafür, dass hierbei Cholesterin eine Rolle spielt, ergeben sich aus einer Studie von Heijnen et al.⁹² In dieser Studie konnte bei aktivierten Thrombozyten ein erhöhter Cholesteringehalt in den sich ausbildenden Filopodien nachgewiesen werden. Auch in den durch Aktivierung entstandenen Mikropartikeln zeigte sich in einer Studie von Biró *et al.* ein tendenziell höherer Cholesteringehalt als in der Thrombozytenmembran.³⁷

Eine anderer Mechanismus der Mikropartikelentstehung ist die rein passive Entstehung durch hohen *shear stress*, der im arteriellen Gefäßsystem des Menschen und vor allem bei pathologischen Zuständen vorkommen kann.⁴² Bei der passiven Entstehung von Mikropartikeln kommt es durch Interaktion mit VWF zur Ausbildung von *discrete adhesion points* (DAPs), welche die Blutplättchen während des Flusses abbremsen und so zur *tether*-Bildung führen. Ob der Cholesteringehalt hierbei eine

Rolle spielt, oder ob intakte *lipid rafts* sogar Voraussetzung für eine funktionierende *tether*-Bildung sind, wurde bisher noch nicht untersucht.

Da die Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien teilweise widersprüchlich sind, soll in der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht werden, ob der Cholesteringehalt der Thrombozytenmembran Einfluss nimmt auf die Interaktion mit VWF und die Aggregation an Kollagen. Weiterhin soll geklärt werden, ob auch die Mikropartikelbildung beeinflusst wird. In diesem Zusammenhang soll ebenfalls untersucht werden, ob die Expression bestimmter Membranrezeptoren der Thrombozyten durch den Cholesteringehalt der Zellmembran beeinflusst wird und dadurch Veränderungen in Mikropartikelbildung, Adhäsion und Aggregation erklärt werden können.

3. Material und Methoden

3.1 Blutspender

Es wurde das Blut von gesunden, freiwilligen Spendern untersucht, die über 18 Jahre alt waren. Diese hatten 14 Tage vor der Blutentnahme keine Medikamente eingenommen, welche die Thrombozytenaggregation hemmen oder anderweitig auf Thrombozyten einwirken. Die Blutentnahme erfolgte nach schriftlichem Einverständnis der Probanden und in Übereinkunft mit der lokalen Ethikkommission.

3.2 Herstellung und Präparation der Plasma- bzw. Blutproben

3.2.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion einer Kubitalvene des Spenders. Das Blut wurde langsam durch eine Stahlkanüle in eine Spritze gesaugt. Je nachdem für welches Experiment das Blut verwendet wurde, waren in der Spritze Antikoagulanzen und andere, die Thrombozytenaktivierung hemmende Substanzen enthalten. Sofort nach der Blutentnahme wurde das Blut durch leichtes Schwenken mit den in der Spritze enthaltenen Inhaltsstoffen vermischt und die Probe so rasch wie möglich weiter verarbeitet.

3.2.2 Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP)

Zur Herstellung von PRP wurde das Blut vorsichtig von der Blutentnahmespritze in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt und bei 170g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mittels einer Pipette abgesaugt, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde, dass keine Erythrozyten mit aufgesaugt wurden. Auf diese Weise konnten das Plasma und die Thrombozyten weitgehend von den Erythrozyten getrennt werden und als plättchenreiches Plasma weiterverwendet werden.

3.2.3 In vitro-Inhibition von Gerinnungs- und Aktivierungsschritten

Um die Aktivierung und Gerinnung der Thrombozyten in vitro zu hemmen, wurden den Blutproben bei der Entnahme je nach Experiment verschiedene Substanzen hinzugefügt. Diese greifen auf unterschiedliche Weise in die Gerinnungskaskade und die Aktivierung der Thrombozyten ein:

D-Phenylalanyl-L-Propyl-L-Arginin Chlormethylketon (PPACK) ist ein direkter Thrombininhibitor. Die Blutgerinnung wird auf der Ebene der Thrombingenerierung blockiert.

Natriumcitrat (NC) und **Ethyldiamintetraacetat (EDTA)** sind beides Calciumchelatoren. Diese Substanzen binden das im Blut enthaltene Calcium, welches dann nicht mehr für die Gerinnungskaskade zur Verfügung steht.

Apyrase ist ein Enzym aus der Gruppe der Hydrolasen. Es dient zur Hydrolyse des während der Präparation der Blutproben freigesetzten ADPs, so dass eine vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten verhindert wird.

Tirofiban ist ein GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonist und kann so das Anhaften an thrombogenen Oberflächen und das *spreading* der Thrombozyten verhindern.

Prostaglandin E1 ist ein Gewebshormon aus der Gruppe der Eicosanoide. Es kommt natürlicherweise im menschlichen Körper vor und hat verschiedene Wirkungen auf den Organismus. In Hinblick auf die Blutgerinnung steigert es rezeptorvermittelt den Gehalt der Thrombozyten an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und verhindert so die Bildung von ADP und damit die Aktivierung der Blutplättchen.

3.2.4 Veränderung des Cholesteringehaltes von Thrombozytenmembranen

Zur Veränderung des Cholesteringehaltes von Thrombozytenmembranen wurde die Substanz Methyl-beta-Cyclodextrin (MbCD) verwendet.⁹⁷ MbCD ist ein zyklisches Heptasaccharid in dessen hydrophobem Hohlraum unpolare, hydrophobe Gastmoleküle, wie zum Beispiel Cholesterin, eingelagert werden können.⁹⁸ In zahlreichen Versuchsreihen erwies sich MbCD, im Gegensatz zu anderen Cyclodextrinen, als am besten geeignet für die Herstellung wasserlöslicher Cholesterin/Cyclodextrinkomplexe. Außerdem bildete es den stabilsten Komplex mit Cholesterin bei dem größten Cholesterin/Cyclodextrin Verhältnis. Es wurde gezeigt, dass MbCD in der Lage ist, selektiv sowohl Cholesterin aus Zellmembranen herauszulösen, als auch das im Molekül enthaltenen Cholesterin an Zellmembranen abzugeben.^{90,99,100}

3.2.4.1 Herstellung von Methyl-beta-Cyclodextrin/Cholesterinkomplexen

5 g MbCD (Sigma) wurde in 25 ml H₂O (Aqua ad iniectabilia; Braun) gelöst und auf 60 °C erwärmt. 150 mg Cholesterin (99%; Sigma) wurde in 3 ml 100%igem Ethanol gelöst und tropfenweise unter Rühren zur MbCD-Lösung gegeben. Nach

fünfstündigem Rühren bei 60 °C wurde die klare Lösung mit H₂O auf 39 ml aufgefüllt, durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und bei -80 °C aufbewahrt. Die fertige Lösung hatte damit eine Cholesterinkonzentration von 10 mM und eine MbCD- Konzentration von 100 mM.

3.2.5 Präparation des PRP für die Experimente

Aus Vollblut gewonnenes PRP wurde im Verhältnis 10:1 mit 100mM Methyl-β-Cyclodextrin Lösung bzw. mit 100mM MbCD/10mM Cholestrinkompex-Lösung vermischt und bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Für die Experimente mit nativem PRP wurde dies im Verhältnis 10:1 mit HbSS-Pufferlösung vermischt um den gleichen Verdünnungsgrad zu erreichen.

Wurde Vollblut für die Experimente benötigt, so wurde das PRP nach der Inkubation mit der entsprechenden MbCD-Lösung, bzw. nach dem Hinzugeben von Pufferlösung kurz vor dem Experiment wieder mit den Erythrozyten vermischt.

3.3 Thrombozytenmikroskopie mit Flusskammer als experimentelles Strömungsmodell

In dieser Arbeit diente ein Mikroskopaufbau mit Flusskammer als *ex-vivo* Strömungsmodell, anhand dessen die Thrombozyten unter möglichst physiologischen Bedingungen in Echtzeit beobachten werden konnten. Auf diese Weise konnte bei verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten und an verschiedenen Oberflächen das Adhäsions- und Aggregationsverhalten der Thrombozyten verfolgt werden.

3.3.1 Aufbau der Flusskammer

Die verwendete Parallel-Platten-Flusskammer ist ein Mikroskopeinsatz, der sich in der Objektebene des Mikroskops befindet.¹⁰¹ Die Kammer besteht aus einer Plexiglasplatte mit einem Ein- und Auslauf, durch den das Blut auf der einen Seite in die Kammer hinein und auf der anderen Seite wieder hinaus geleitet werden kann (siehe Abb. 3.1). Auf die Plexiglasplatte wird eine Silikonfolie mit einer Dicke von 127 µm aufgebracht. In dieser Folie ist ein schmaler Kanal (Länge 30 mm, Breite 2 mm) ausgeschnitten, der den Ein- und Auslauf der Plexiglasplatte miteinander verbindet. Auf die Silikonfolie wird kurz vor dem Experiment ein beschichtetes Glasdeckplättchen montiert, das mit Hilfe eines Metallrahmens an der Plexiglasplatte befestigt wird. So besteht der Kanal durch den das Vollblut fließt aus der

Plexiglasplatte, der Silikonfolie und dem Glasdeckplättchen. Die Kanaldicke, -Länge und -Breite wird durch die Silikonfolie bestimmt.

An die Flusskammer wurde eine Spritzensaugpumpe (Pump 33, Harvard Apparatus) angeschlossen welche die Flussgeschwindigkeit reguliert, mit der das Blut durch die Kammer strömt. Eine Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus ist in Abb. 3.2 zu sehen.

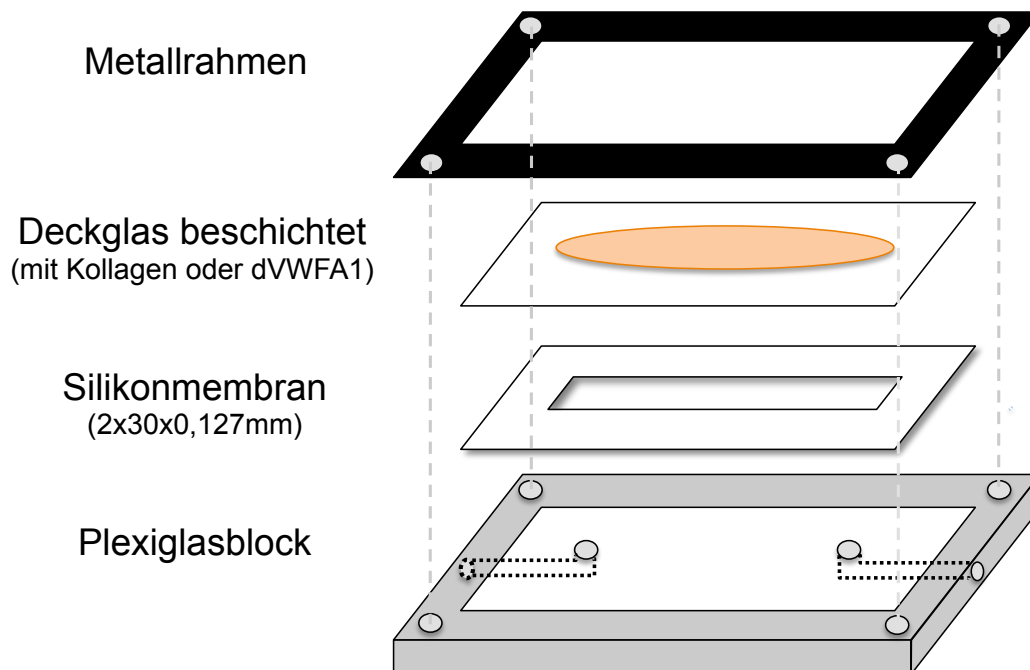


Abb. 3.1: Aufbau der Parallel-Platten-Flusskammer. Auf den Plexiglasblock mit den seitlichen Bohrkanälen für Zu- und Ablauf wird die 127 μ m dicke Silikonmembran aufgebracht. Das eingeschnittene Rechteck in der Membran bildet die Seitenwände und bestimmt so die Höhe, Länge und Breite des Flusskanals. Auf die Silikonmembran wird das beschichtete Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und anschließend der Plexiglasblock mit dem Metallrahmen mit Hilfe von vier Schrauben verschraubt. Abbildung modifiziert nach [102].

3.3.2 Mikroskopaufbau

Für die Flussexperimente wurde ein Lichtmikroskop (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss) mit verschiedenen Aufbauten verwendet. Je nach gewünschter Bilddarstellung konnten Lichtfilter, Objektive und Lichtquellen gewechselt werden.

Um eine Echtzeitregistrierung der Flussexperimente zu ermöglichen, wurde eine Videokamera auf das Mikroskop aufmontiert; je nach Bedarf wurde eine Schwarz-Weiß-Kamera (B/W-CCD-Camera, Modell Nr. AVT-BC 71, AVT-Horn) oder eine Farbkamera (3 CCD Color Video Camera, Exwave HAD DSP; Sony) verwendet. Um

eine noch bessere Vergrößerung des Bildes zu erreichen, befand sich zwischen Mikroskop und Kamera ein verstellbares Vergrößerungsobjektiv.

Die Kamera war an einen Bildschirm (Trinitron, Super fine pitch, Sony) und an einen DVD Video Recorder (LQ-MD800, Panasonic) angeschlossen. So konnte das von der Kamera aufgezeichnete Bild während des Experimentablaufs auf dem Bildschirm beobachtet werden. Gleichzeitig war es möglich die Daten für die spätere Bildverarbeitung und Analyse auf DVD festzuhalten.

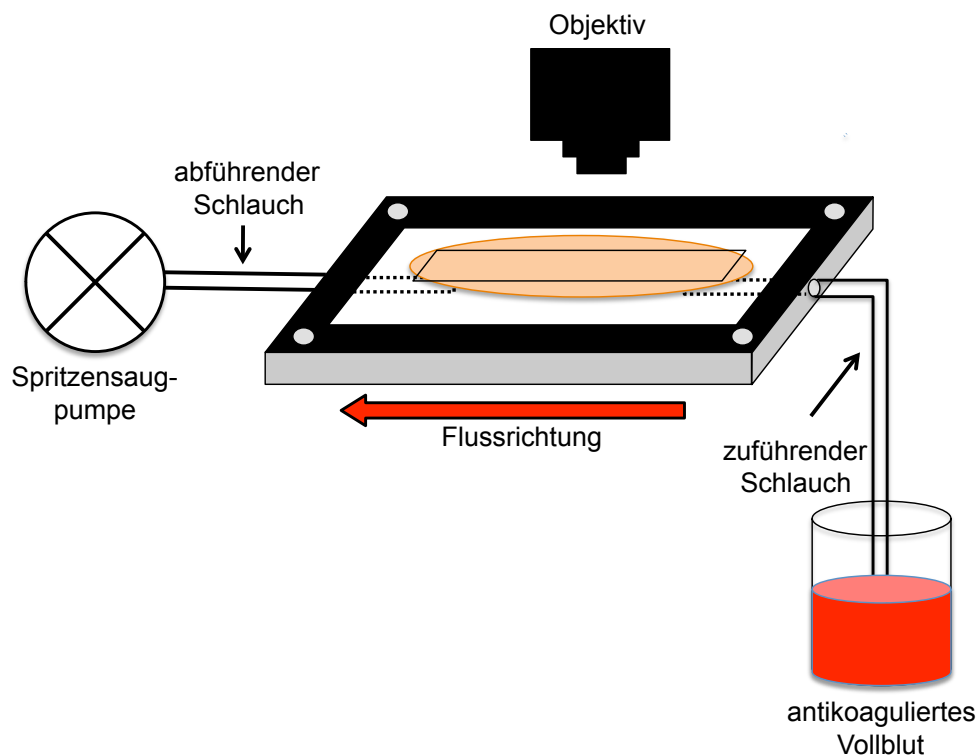


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit integrierter Parallel-Platten-Flusskammer. Gezeigt ist der Behälter mit antikoagulierte Vollblut, in den der zuführende Schlauch getaucht ist. In der Flusskammer befindet sich das beschichtete Deckglas (Beschichtung in orange dargestellt). Über den abführenden Schlauch ist die Flusskammer mit der Spritzenaugpumpe verbunden, die das Blut durch die Flusskammer und damit auch über die beschichtete Oberfläche des Deckglases befördert. Abbildung modifiziert nach [103].

3.3.3 Reflektions-Interferenz-Kontrast Mikroskopie

Eine in dieser Arbeit verwendete Technik ist die Bilddarstellung mittels Reflektions-Interferenz Kontrast Mikroskopie (RICM). Es ist ein lichteoptisches Verfahren, mit dessen Hilfe man aus dem Interferenzbild der von an einem Objekt reflektierten Strahlen polarisierten Lichts das Höhenprofil über dem Substrat rekonstruieren kann.

Im vorliegenden Fall wird das Kontaktgebiet zwischen einer mit VWF beschichteten Oberfläche und der Thrombozytenmembran dargestellt, wobei der Abstand der Zellen von der beschichteten Oberfläche in Interferenzfarben angezeigt wird. Das Licht, das von dem mit Substrat beschichteten Deckglas reflektiert wird, interferiert mit dem Licht, welches von den Membranen der Thrombozyten reflektiert wird, die sich in großer Nähe zur, oder in Interaktion mit der beschichteten Oberfläche befinden. Je dunkler das abgebildete Areal, desto größer die Nähe des Thrombozyten zum beschichteten Deckglas.

Da für die Bildaufzeichnung eine Schwarz-Weiß-Kamera verwendet wurde, entsprachen die Interferenzfarben hier einer Grau-Skala. Die Farbe Schwarz entsprach dem Abstand zweier Oberflächen von 4 bis 12 nm und die Farbe Weiß einem Abstand von 20 bis 30 nm. Mehr als 30 nm von der beschichteten Oberfläche entfernte Strukturen wurden nicht mehr scharf abgebildet. Aufgrund des Verfahrens wurde weder ein Einfärben noch Markieren der Zellen benötigt.^{104,105}

3.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Eine andere in dieser Arbeit verwendete Technik ist die Fluoreszenzmikroskopie. Dafür werden die zu untersuchenden Objekte mit einem fluoreszierenden Stoff angefärbt und mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Die so angeregten Flurochrome emittieren ein Licht, welches langwelliger ist, als das anregende Licht. Das emittierte Licht kann dann optisch vom Licht anderer Wellenlänge getrennt werden und es werden nur Strukturen sichtbar, die das Flurochrom in sich tragen.

3.3.5 Durchführung der Strömungsexperimente

Für alle Strömungsexperimente wurde PRP wie unter 3.2.5 beschrieben präpariert und kurz vor dem Flussversuch wieder mit den Erythrozyten vermischt. Die Experimente wurden bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Wegen des physiologischen Prinzips der axialen Migration wurden die Erythrozyten während des Flusses eher in die Mitte des Flusskanals gedrückt und die Thrombozyten an die Außenflächen des Flusskanals. Auf diese Weise kamen die Blutplättchen in Kontakt mit dem beschichteten Glasdeckplättchen und konnten in Echtzeit beobachtet werden. Die Flussdauer betrug ca. 2-4 Minuten. Alle Flüsse wurden auf DVD festgehalten und anschließend analysiert.

3.3.5.1 Strömungsexperimente über VWF

In diesem Experiment die Interaktion der Thrombozyten mit einer VWF beschichteten Oberfläche gezeigt. Um die Aktivierung der Thrombozyten und weitere Interaktionen mit der Oberfläche wie *spreading* und Aggregation zu unterbinden, wurden dem Spenderblut folgende Substanzen hinzugefügt: entweder Natriumcitrat (1:10, Sarstedt) oder PPACK (93 μ M; Bachem) und folgende weitere Substanzen: Apyrase (1.5 ATPase U/ml; Sigma), Prostaglandin E1 (10 μ M; Sigma), EDTA (5mM, Sigma) und Tirofiban (Aggrastat[®], MSD Sharp & Dohme, 16 μ l/mlPlasma)

Zur Beschichtung des in die Flusskammer eingesetzten Deckgläschens wurde die rekombinante dimere A1 Domäne des Willebrand Faktors (dVWFA1) gewählt (20 μ g/ml, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Zaverio M. Ruggeri, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA). Dieses homodimere VWF-Fragment enthält Teile der D3 Domäne mit Disulfid-Brücken zwischen den Ketten und die vollständige A1 Domäne. Es wurden 75 μ l der Lösung auf die Deckgläser im Bereich des späteren Flusskanals aufgetragen und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur mindestens eine Stunde inkubiert.

Die Interaktion der Thrombozyten mit den beschichteten Deckgläsern wurde mittels RCM dargestellt. Als Objektiv wurde ein *Plan-Neofluar 63x/1.25 Oil Ph3 Antiflex Objektiv* (Carl Zeiss) verwendet, als Lichtquelle eine 50W Quecksilberdampfampe.

3.3.5.2 Strömungsexperimente über Kollagen

In diesem Experiment wurde das Adhäsions- und Aggregationsverhalten sowie das *spreading* der Thrombozyten an Kollagenfasern verfolgt. Für die Experimente wurden die Blutproben deshalb ausschließlich mit Natriumcitrat (0,106 M; 1:10 S-Monovette 10 ml, Sarstedt) antikoaguliert. Für die Beschichtung der Deckgläser wurden 150 μ l einer Kollagenlösung aus fibrillärem Typ I Kollagen (equine tendon; Horm-Chemie) verwendet. Die mit Kollagen Typ I beschichteten Deckgläser wurden ebenfalls in einer feuchten Kammer mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Hierfür wurden die Thrombozyten kurz vor Beginn der Perfusion mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mepacrine, (scbio, 10 μ M) versetzt. Mepacrine ist eine Substanz, welche über den Serotonintransporter der Blutplättchen in deren *dense bodies* aufgenommen wird und diese anfärbt. Der

Fluoreszenzfarbstoff wird bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Die Thrombozyten konnten so mittels eines *Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil Objektivs* (Carl Zeiss) visualisiert werden. Als Lichtquelle diente eine 50W Quecksilberdampflampe. Durch diese Art der Darstellung waren auf dem erzeugten Bild nur die grün leuchtenden Thrombozyten vor einem schwarzen Hintergrund sichtbar, die Beschichtung aus Kollagenfasern wurde ausgeblendet.

3.3.6 Bildanalyse

Die Digitalisierung und Analyse der Echtzeit-Videoaufnahmen erfolgte *off-line* mit Hilfe des *Matrox Inspector Software Packages* (Matrox Electronic Systems Ltd.) und des Programms *Metamorph* (Universal Imaging).

Um eine Kalibrierung bei unterschiedlichen Vergrößerungen durch die verschiedenen Objektive vorzunehmen, wurde bei entsprechender Einstellung des Mikroskops eine Mikrometerplatte untergelegt. Das Bild der Platte wurde nach der Digitalisierung am Computer ausgemessen und die Anzahl der Pixel in μm umgerechnet.

Zur quantitativen Auswertung der adhärennten und aggregierten Thrombozyten auf der mit Kollagen beschichteten Oberfläche wurden je 5 Gesichtsfelder pro Minute aus einem 5 Minuten dauernden Flussexperiment herangezogen. Die Bilder wurden mit dem 40x Objektiv und einem Zoom von 0,36 aufgezeichnet. Die einzelnen Gesichtsfelder erhielt man durch langsames, mäanderartiges Lenken des Objektivs über den beschichteten Teil der Flusskammer. Die aufgezeichneten Bilder wurden dann „*off-line*“ in eine binäre Form konvertiert und in jedem Gesichtsfeld die Anzahl der Aggregate und die von ihnen eingenommene Fläche mittels *blob counting* bestimmt. Die von Aggregaten bedeckte Fläche wurde in „% bedeckte Fläche“ in Bezug auf das gesamte Bild angegeben. Eine von Thrombozyten zusammenhängend belegte Fläche wurde ab einer Größe von $48 \mu\text{m}^2$ als Aggregat gewertet, das entspricht etwa einer Fläche von 4-8 aneinander gelagerten Thrombozyten.

Die Flüsse über VWF wurden im Hinblick auf die Zahl der haftenden Thrombozyten und die Zahl und Länge der gebildeten *tether* untersucht. Dazu wurden aus jedem Flussexperiment, die mit dem 63x Objektiv und einem Zoom von 0,36 aufgezeichnet wurden, zwei Sequenzen ausgewählt. Aus diesen zwei Sequenzen von circa 20 Sekunden wurden jeweils vier Bilder analysiert.

3.4 Viskosimeter

3.4.1 Nutzung des Viskosimeters zur Generierung einer definierten Wandschubspannung

Das in dieser Arbeit verwendete Kegel-Platte-Viskosimeter (Haake Rheovisco 1, Thermo Electron Corporation) ist eine besondere Form eines Rotationsviskosimeters, wobei der Rotationskörper die Form eines stumpfen Kegels hat. Das Viskosimeter wird normalerweise dazu genutzt, die dynamische Viskosität von Fluiden zu bestimmen, die in den Spalt zwischen Kegel und Platte eingebracht werden und einer bestimmten Wandschubspannung ausgesetzt werden. Diese gleichmäßig erzeugte Wandschubspannung wurde bei den Experimenten hier genutzt, um PRP einer definierten Schergeschwindigkeit auszusetzen und um damit die Bildung von Mikropartikeln bei unterschiedlichen Scherraten verfolgen zu können. Das verwendete Viskosimeter hatte einen Kegelwinkel von $0,5^\circ$ und einen Kegel-Platten-Abstand von $26\ \mu\text{m}$.

3.4.2 Scherung von PRP und weitere Analyse der Proben

Um Hämolyse zu vermeiden wurde im Kegel-Platte-Viskosimeter ausschließlich PRP verwendet. Die eingesetzten Proben wurden nativ belassen, mit Cholesterin angereichert, oder depletiert (Präparation der Proben siehe 3.2.5). Die angewendeten Schubspannungen betragen 10s^{-1} bzw. 10000s^{-1} und wurden über 360 Sekunden aufrechterhalten. Mit Hilfe eines im Viskosimeter integrierten Heizblocks wurden die Experimente bei einer Temperatur von $37\ ^\circ\text{C}$ durchgeführt, um temperaturabhängige Auswirkungen auf die Thrombozyten zu vermeiden. Pro Experiment wurden $500\ \mu\text{l}$ PRP in das Viskosimeter eingesetzt. Um ausreichend Probenmaterial zur generieren, wurden alle Experimente doppelt durchgeführt und das PRP aus beiden Durchläufen gesammelt und anschließend gepoolt. Zur weiteren Analyse stand so etwa $1000\ \mu\text{l}$ zur Verfügung. Die Proben wurden anschließend durchflusszytometrisch untersucht oder für den Thrombingenerierungs-Test verwendet.

Je nach weiteren Analyseverfahren wurden dem Blut bei Abnahme unterschiedliche Substanzen hinzugefügt. Diese sind bei den entsprechenden Versuchen beschrieben.

3.5. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Analyseverfahren, das es ermöglicht, Zellen in einer Suspension auf ihre physikalischen und biochemischen Eigenschaften hin zu untersuchen. Das Messprinzip beruht darauf, dass jede Zelle das fokussierte Licht eines Laserstrahls passiert und von diesem erfasst wird. Das von der Zelle reflektierte Licht wird gestreut und von Detektoren aufgenommen, die es in ein elektronisches Signal umwandeln. Die Zelle streut das Licht in verschiedene Richtungen. Je nachdem in welchem Winkel es gemessen wird, erhält man unterschiedliche Informationen. Das Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Light Scatter - FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und wird vor allem von der Größe, bzw. dem Volumen einer Zelle beeinflusst. Das Seitwärtsstreulicht (engl. Side Scatter – SSC), das im Rechten Winkel zum einfallenden Licht gebrochen wird, hängt neben der Größe auch stark von der Granularität, der Dichte und der äußeren Form der Zelle ab. In einem Durchflusszytometer können auf diese Weise tausende Zellen pro Sekunde erfasst werden. So ergibt sich die Analyse der in einer Probe vorhandenen Zellpopulationen aus vielen Einzelmessungen.

Um die untersuchten Zellen noch genauer zu charakterisieren, können sie vor der Messung im Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, die nur an bestimmte Zellstrukturen binden. Diese Fluoreszenzfarbstoffe werden dann mit Licht angeregt und die Emission der Farbstoffe gemessen.

3.5.1 Fluoreszenzfarbstoff markierte Oberflächenantikörper

In der Thrombozytendurchflusszytometrie werden mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Oberflächenantikörper verwendet. Mit den verschiedenen Antikörpern können unterschiedliche Strukturen der Thrombozyten angefärbt werden.

Um die Anzahl der Thrombozyten zu bestimmen, wird ein Antikörper benötigt, der vom Aktivierungszustand der Thrombozyten unabhängig ist und zur Erkennung der Zellpopulation dient. Zudem gibt es Oberflächenproteine, die je nach Funktionszustand der Plättchen ihre Anzahl und Konformation ändern. Wird also gleichzeitig ein Antikörper verwendet, der gegen aktivierungsabhängige Rezeptorproteine gerichtet ist, so kann man zusätzlich Aussagen über den Aktivierungsgrad der Thrombozyten treffen.

Die gemessene Fluoreszenzstärke spiegelt die Rezeptordichte auf den Thrombozyten wieder und erfasst sehr sensitiv kleine Veränderungen der Oberflächenmarker.

Das von uns verwendete Gerät enthielt vier verschiedene Detektoren (FL 1 – 4), sodass eine gleichzeitige Erfassung von bis zu vier verschiedenen Oberflächenmarkern möglich war. Zur Erkennung eines Teilchens wird normalerweise der FSC als Trigger genutzt. Um jedoch auch kleinste Teilchen bis zu einer Größe von 100 Nanometern Durchmesser sicher zu detektieren, wurde in unseren Experimenten das Fluoreszenzsignal des ersten Kanals (FL1) als Trigger gewählt.

3.5.1.1. Verwendete Antikörper

Alle in den Experimenten verwendete Antikörper waren mit dem selben Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert.

Anti-CD 41: Monoklonaler IgG1 Maus-Antikörper gegen humanes CD 41, FITC-konjugiert, IM 1756U (Immunotech)

Anti-CD 42b: Monoklonaler IgG1 Maus-Antikörper gegen humanes CD 42b, FITC-konjugiert, IM 0648U (Immunotech)

Anti-CD 62P: Monoklonaler IgG1 Maus-Antikörper gegen humanes CD 62P, FITC-konjugiert A 51079 (Immunotech)

3.5.2 Präparation und Analyse der Proben nach Scherung

Das Spenderblut wurde bei Gewinnung mit PPACK (93 μ M; Bachem) antikoaguliert. In der einen Gruppe wurde Apyrase (1.5 ATPase U/ml; Sigma), Prostaglandin E1 (10 μ M; Sigma), EDTA (5mM, Sigma) und Tirofiban (Aggrastat[®], 16 μ l/ml Plasma; MSD Sharp & Dohme) zum Spenderblut hinzu gegeben, in der anderen Gruppe wurde nur mit PPACK antikoaguliert. Diese Vergleichsgruppe sollte den Aktivierungszustand der Thrombozyten zeigen, wenn diese nicht mit zusätzlichen Substanzen blockiert werden.

Um den Cholesteringehalt der Thrombozytenmembran zu verändern wurde das PRP wie unter 3.2.5 beschrieben behandelt. Zu den Nativ-Proben wurde die entsprechende Menge HbSS-Puffer hinzu gegeben.

Das PRP wurde dann Schubspannungen von 10s⁻¹, bzw. 10000s⁻¹ im Kegel-Platte-Viskosimeter ausgesetzt und anschließend im Durchflusszytometer (Coulter Epics XL; Beckman Coulter) weiter untersucht. Dazu wurden die Proben vorher mit den entsprechenden Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern inkubiert. 10 μ l einer PRP-

Probe wurden mit 1 μ l Antikörper-Lösung vermischt, dann 30 Minuten im Dunklen inkubiert und anschließend zur weiteren Analyse mit Pufferlösung verdünnt.

3.6 Thrombingenerierungs-Test (TDT[®], Thrombin Dynamics Test)

Der Thrombin Dynamics Test misst den Verlauf der Thrombingenerierung in einer Plasmaprobe. Die Thrombingenerierung und Thrombinabnahme wird als das endogene Thrombinpotential (ETP) ausgedrückt. Das ETP bestimmt die Thrombinmenge, die zu jedem Zeitpunkt von der Aktivierung bis zur Inhibition von Thrombin in einer Plasmaprobe vorhanden ist. In der Erfassung der Bildung und Inhibition des Thrombins kann somit eine Aussage über den jeweiligen Gerinnungszustand einer Plasmaprobe getroffen werden und ist damit ein Maß für die Summe aller vorliegenden pro- und antikoagulatorischen Prozesse. Der Gerinnungstest spiegelt nicht nur den Auswerteparameter Fläche und Kurve sondern auch den Beginn der Thrombinbildung, den Zeitpunkt der maximalen Thrombingenerierung, sowie die maximale Thrombinbildungsgeschwindigkeit wieder.¹⁰⁶

3.6.1 Messung der Thrombingenerierung

Die Messung der Thrombingenerierung in PRP wurde in einem automatisierten *random access coagulation analyzer* (ACL 9000; Instrumentation Laboratory (IL)) durchgeführt. Optische Signale wurden von dem Gerät bei einer Wellenlänge von 405 nm erkannt. Die Gerinnung wurde durch 25 mM CaCl₂ in Kombination mit niedrigen Konzentrationen von rekombinatem Tissue Factor (1,44 ng/ml, PT reagent Recombiplastin; IL) gelöst in barbitone Puffer (pH 7,4; Diagnostica Stago) initiiert. Thrombozyten und Mikropartikel aus den Proben dienten als Phospholipidquelle.

Die Thrombinbildung wurde anhand der Umwandlung des chromogenen Substrats H-D-CHG-Ala-Arg-pNa · 2AcOH ($K_M = 15,9 \mu\text{M}$) gemessen, welches in einer Konzentration von 250 μM eingesetzt wurde (Pentapharm).

Die Fibrinpolymerisation in der Probe wurde mittels eines Fibrinpolymerisationsinhibitors (H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH · AcOH; Pentapharm) unterbunden, sodass die optische Messung nicht durch Fibrinpolymere gestört wurde. Die Zeit der maximalen Umwandlungsgeschwindigkeit des chromogenen Substrats wurde als Gerinnungszeit angesehen.

Das für die Messung verwendete Spenderblut wurde bei Entnahme mit Natriumcitrat (0,106M; 1:10 S-Monovette 10ml, Sarstedt) antikoaguliert; weiterhin wurde Apyrase (1.5 ATPase U/ml; Sigma), Prostaglandin E1 (10 μ M; Sigma) und Tirofiban (Aggrastat[®], MSD Sharp & Dohme, 16 μ l/ml Plasma) hinzu gegeben. Um die Thrombozytenmembranen mit Cholesterin anzureichern, oder ihnen Cholesterin zu entziehen, wurde vorgegangen wie oben beschrieben (siehe 3.2.5). Das PRP wurde dann Schubspannungen von 10s^{-1} , bzw. 10000s^{-1} im Kegel-Platte-Viskosimeter ausgesetzt und danach für den TDT verwendet.

3.7 Statistische Auswertung

Diskrete Variablen wurden als Häufigkeit und Prozentsatz angegeben. Quantitative Variablen wurden je nach Erfordernis als Mittelwert und Standardabweichung bzw. als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Formale Vergleiche wurden für quantitative Variablen mittels des Student t Tests berechnet.

Für alle Tests wurde statistische Signifikanz für einen zweiseitigen P-Wert $< 0,05$ angenommen.

Alle Berechnungen erfolgten mittels Microsoft Excel und STATA 12.0 SE (StataCorp).

4. Ergebnisse

4.1. Adhäsion von Thrombozyten an VWF unter arteriellen Flussbedingungen

Um die primäre, transiente Adhäsion an VWF in Abhängigkeit des membranösen Cholesteringehaltes der Thrombozyten zu untersuchen, wurde ein Flussexperiment unter arteriellen Strömungsbedingungen durchgeführt. Antikoaguliertes Vollblut wurde über eine mit dVWFA1 beschichtete Oberfläche perfundiert. Die eingestellte Scherrate von 5000s^{-1} entspricht einer schnellen arteriellen Strömung an verengten Stellen im arteriellen Stromgebiet, eine Scherrate von 10.000s^{-1} wird nur an stark stenosierten Arterien erreicht. Da ausschließlich die Interaktion mit VWF zugelassen werden sollte, wurden alle anderen Gerinnungsschritte blockiert (siehe 3.3.5.1.). Das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten und deren Eigenschaft *tether* zu bilden wurde untersucht.

Bei allen Flussexperimenten konnte eine Interaktion der Thrombozyten mit der beschichteten Oberfläche beobachtet werden. Die Thrombozyten adhärten, rollten und bildeten *tether* aus (siehe Abb. 4.1). Die prinzipielle Thrombozytenfunktion blieb also in allen Gruppen erhalten. Eine erfolgreiche Blockierung der Aggregation konnte ebenfalls sichergestellt werden, da die Thrombozyten nur transient an der Oberfläche hafteten und keine Aggregate ausbildeten.

Durch die anschließende quantitative Bildanalyse wurden jedoch Unterschiede in der Adhäsion und *tether*-Bildung deutlich. Zu beiden Flussgeschwindigkeiten wurden aus zwei unterschiedlichen Flussexperimenten jeweils 8 Bilder analysiert.

Bei einer Scher-Rate von 5000 s^{-1} ergab die Auszählung der Thrombozyten auf den ausgewählten Bildausschnitten in der Kontrollgruppe durchschnittlich 190 (SD 50,2; SEM 12,6) haftende Plättchen an der Oberfläche wohingegen es nach Cholesterin-Depletion nur 158 (SD 20,2; SEM 5,1) waren, bzw. 135 (SD 26,0; SEM 6,3) nach Cholesterin-Anreicherung. (siehe Abb. 4.2 A)

Dieses Verhältnis änderte sich bei einer Flussgeschwindigkeit von 10.000s^{-1} . Hier waren in der Kontrollgruppe am wenigsten haftende Plättchen zu finden, im Durchschnitt nur 20 (SD 7,3; SEM 1,8) pro Bildausschnitt, gefolgt von der Cholesterin-angereicherten Gruppe mit 32 Plättchen (SD 11,6; SEM 2,9). Am meisten haftende Plättchen waren in der Cholesterin-depletierten Gruppe zu finden (71; SD 7,1; SEM 1,8). (siehe Abb. 4.2 B)

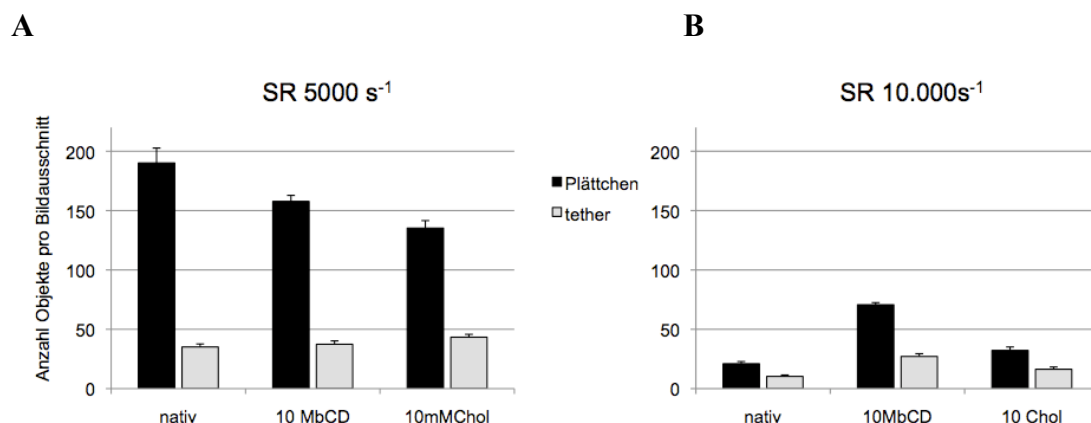


Abb. 4.2: Einfluss der Cholesterin-Depletion bzw. -Anreicherung auf das Anhaften der Plättchen und die Ausbildung von *tethers* auf einer VWF-beschichteten Oberfläche. Vollblut wurde in einer „Paralle-Platten-Flusskammer“ mit einer Scherrate von 5000s^{-1} (A) bzw. 10.000s^{-1} (B) für ca. 6 min bei 37°C über mit dVWFA1 beschichtete Deckgläschen perfundiert. Es wurden zwei unabhängige Flussversuchsreihen mit Blut zwei verschiedener Spender durchgeführt. Aus den aufgezeichneten Versuchen wurden zwei Sequenzen ausgewählt, aus denen jeweils vier Bilder analysiert wurden. Die angegebenen Zahlen sind Durchschnittswerte der insgesamt 16 ausgewerteten Bildausschnitte, $\text{MW} \pm \text{SEM}$. $n = 2$.

Um die gebildeten *tether* genauer zu untersuchen wurden sie ausgezählt und vermessen. Bei einer Scher-Rate von 5000s^{-1} unterschied sich die Anzahl der auf einem Bildausschnitt durchschnittlich ausgezählten *tether* kaum (35 nativ vs. 37 Cholesterin-depletiert, bzw. 40 Cholesterin-angereichert). Die *tether*-Anzahl pro haftendem Plättchen war also in den behandelten Gruppen höher (durchschnittlich 1 *tether* pro 5,5 native Plättchen vs. 1 *tether* pro 4,2 Cholesterin-depletierte Plättchen, bzw. 1 *tether* pro 3,5 Cholesterin-angereicherte Plättchen). Die ausgebildeten *tether* waren in den behandelten Gruppen jedoch mehrheitlich kürzer (2-3 μm) als die in der Kontrollgruppe (3-4 μm). Vor allem sehr lange *tether* über 11 μm waren in der Kontrollgruppe fast doppelt so häufig zu finden (9,3% vs. 5,9% MbCD, bzw. 3,6% MbCD+Chol). (siehe Abb. 4.3 A)

Bei einer Scher-Rate von 10.000s^{-1} war die *tether*-Anzahl pro haftendem Plättchen in allen Gruppen in etwa gleich (durchschnittlich 1 *tether* pro 2,0 native Plättchen vs. 1

tether pro 2,6 Cholesterin-depletierte Plättchen, bzw. 1 *tether* pro 2,0 Cholesterin-angereicherte Plättchen). In der Kontrollgruppe bildeten sich insgesamt wieder mehrheitlich längere *tether* aus, aber auch in der Cholesterin-angereicherten Gruppe waren vermehrt längere *tether* vorhanden (3-5 μm). *Tether* über 11 μm waren in der Kontrollgruppe jedoch nach wie vor am häufigsten zu finden (siehe Abb. 4.3 B).

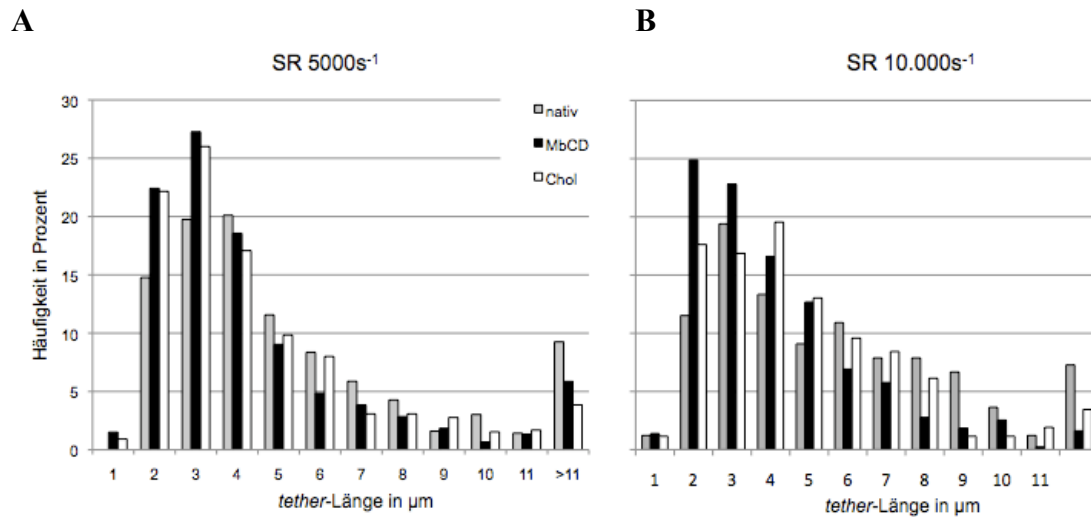


Abb. 4.3 Anzahl und Länge der ausgebildeten *tether* bei Fluss über eine VWF-beschichtete Oberfläche (SR 5000s⁻¹ (A) und SR 10.000s⁻¹ (B)). Die *tether*-Anzahl und Länge wurde auf jeweils 16 Bildausschnitten bestimmt. Diese stammen aus zwei unabhängigen Flussversuchsreihen mit Blut von zwei verschiedenen Spendern. Aus den aufgezeichneten Versuchen wurden zwei Sequenzen ausgewählt, aus denen jeweils vier Bilder analysiert wurden. Im dargestellten Diagramm ist die *tether*-Anzahl als Prozent der gesamten *tether*-Anzahl in der jeweiligen Gruppe angegeben.

4.2 Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung an Kollagenfasern vom Typ I unter arteriellen Flussbedingungen

Um nicht nur die primäre, transiente Adhäsion an VWF, sondern auch die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten in Abhängigkeit von deren membranösen Cholesteringehalt zu untersuchen, wurde ebenfalls die Interaktion mit Kollagen Typ I untersucht. Bei arteriellen Strömungsbedingungen (Scherrate 1500s^{-1}) wurde mit Natriumcitrat antikoaguliertes Vollblut für ca. 6 min über eine mit Kollagenfasern beschichtete Oberfläche perfundiert. Die Thrombozyten wurden kurz vor dem Flussexperiment mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mepacine angefärbt. Auf diese Weise konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie die Adhäsion und die darauf folgende Aggregation der Thrombozyten an Kollagen visualisiert werden. Eine Minute nach Beginn der Perfusion zeigten sich erste anhaftende Thrombozyten, die in der Gruppe der unbehandelten Thrombozyten bereits kleine Aggregate bildeten. In den behandelten Gruppen adhärten die Thrombozyten zwar, die Bildung der ersten größeren Aggregate dauerte aber wesentlich länger. Nach einer Flussdauer von 5 min waren diese Unterschiede noch deutlicher sichtbar (siehe Abb. 4.4).

Dieser Eindruck bestätigte sich in der quantitativ durchgeführten Bildanalyse des Flussexperiments. Die von Aggregaten eingenommene Fläche nach 1, 2, 3, 4 und 5 Minuten variierte je nach Behandlung der Blutprobe (siehe Abb. 4.5). Bei dem mit Nativ-Blut durchgeführten Flussversuch zeigte sich nach 5 Minuten eine durchschnittliche Aggregat-Belegung der Bildfläche von 38 Prozent. Die Belegung unterschied sich signifikant von der durchschnittlichen Belegung der behandelten Proben. Die durch Aggregate belegte Fläche war hier etwa halb so groß (20 Prozent Cholesterin depletiert bzw. 17 Prozent Cholesterin angereichert). Die Cholesterin-depletierten und die Cholesterin-angereicherten Proben entwickelten sich sehr ähnlich, die von Aggregaten bedeckte Fläche bei den Cholesterin-depletierten Proben war jedoch insgesamt etwas größer.

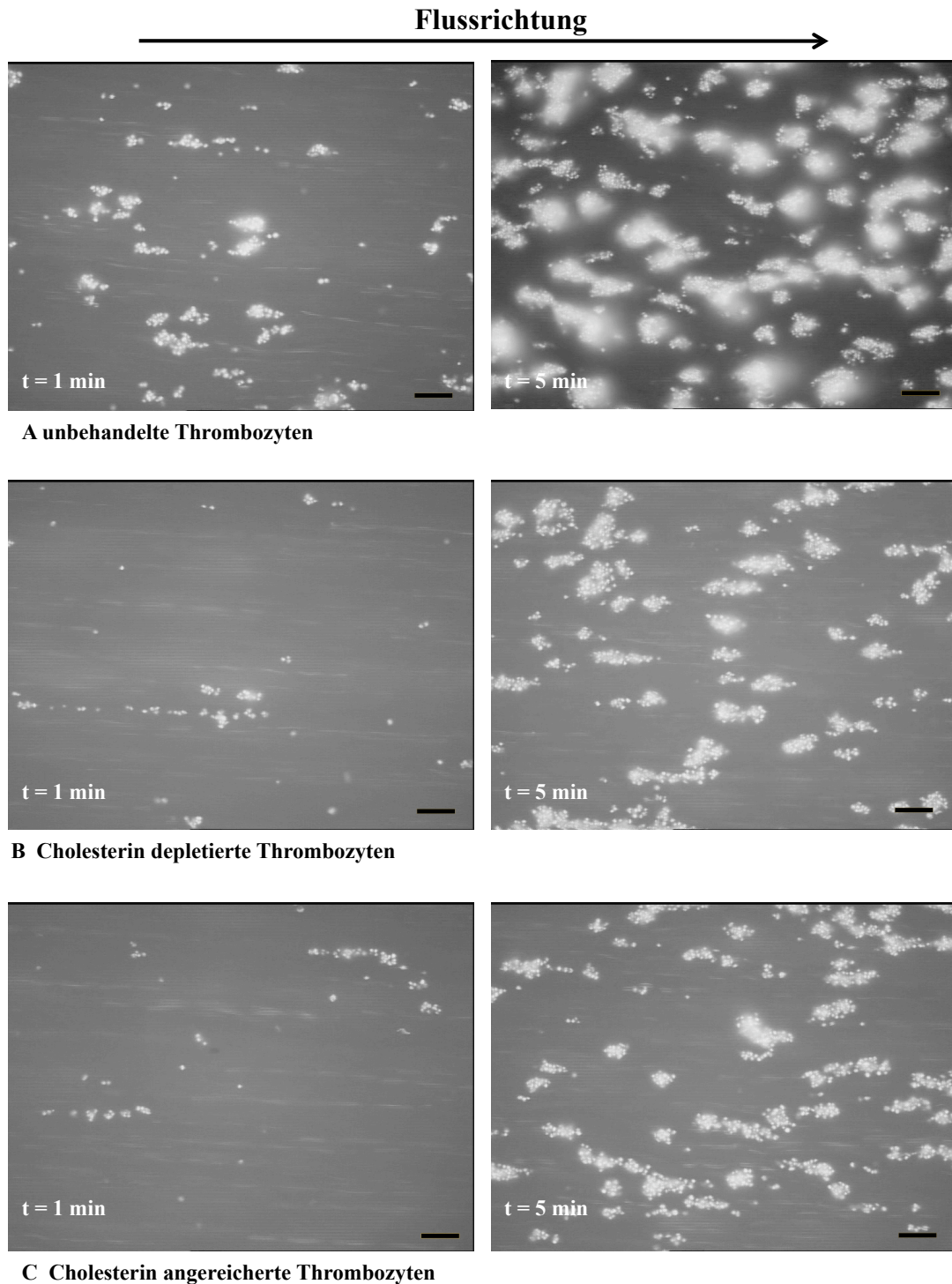


Abb 4.4 A-C Thrombozyten in antikoaguliertem Vollblut adhären und aggregieren an Kollagenfasern unter arteriellen Flussbedingungen ($SR\ 1500\ s^{-1}$). Mit Natirumcitrat antikoaguliertes Blut wurde in einer „Parallel-Platten-Flusskammer“ mit einer Scherrate von $1500\ s^{-1}$ für ca. 6 min bei $37^\circ\ C$ über mit Kollagenfasern vom Typ I beschichtete Deckgläschen perfundiert. Die Thrombozyten wurden kurz vor dem Flussexperiment mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mepacrine angefärbt. Die fluoreszierenden Thrombozyten erscheinen hier weiß vor einem dunklen Hintergrund. Die Abbildungen sind repräsentativ für drei unabhängige Flussversuchsreihen mit Blut drei verschiedener Spender. Eine Längeneinheit (schwarzer Balken im Bild) entspricht $20\ \mu m$.

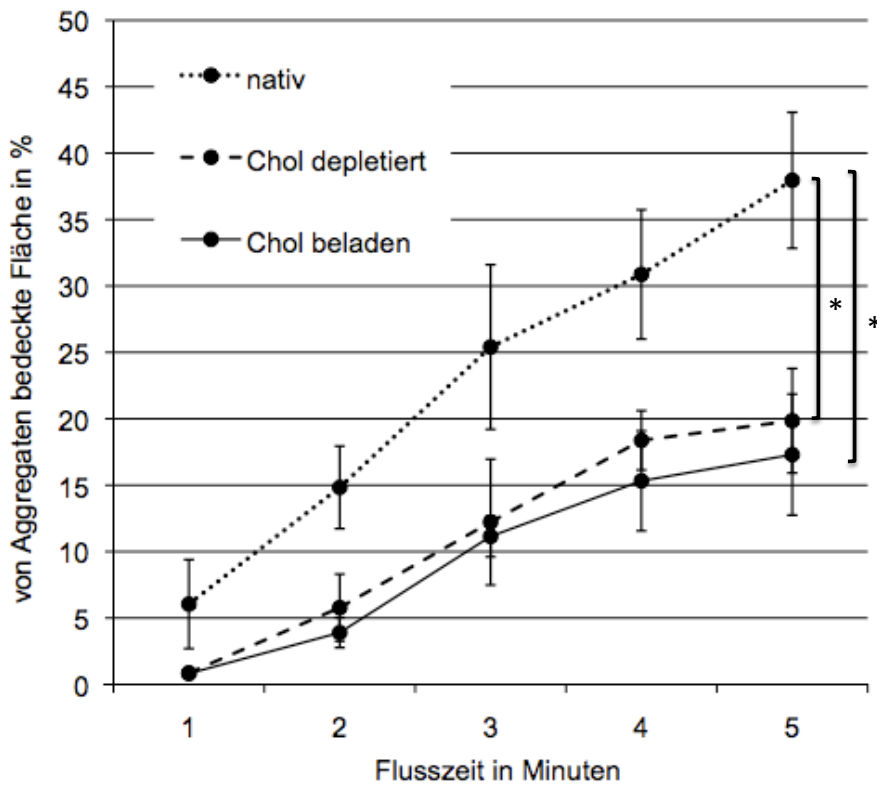


Abb. 4.5 Von Thrombozytenaggregaten belegt Fläche bei Fluss über eine mit Kollagenfasern beschichtete Oberfläche. Dargestellt ist die von Thrombozytenaggregaten bedeckte Fläche in Prozent in Bezug auf die gesamte ausgewertete Bildfläche. Flussdauer: 5 Minuten, SR: 1500s^{-1} . Ausgewertet wurden 5 Bildausschnitte pro Minute; $\text{MW} \pm \text{SEM}$; * $p < 0,05$. ($n = 3$)

Der Unterschied in der mit Aggregaten bedeckten Fläche zwischen behandelten und nicht behandelten Proben, zeigt sich auch deutlich in der Anzahl der nach einer Minute haftenden Aggregate. In der Nativ-Gruppe hatten sich während einer Minute Flussdauer durchschnittlich 26 Aggregate in einem ausgewerteten Bildausschnitt gebildet; hiervon waren einige bereits größer als $400\ \mu\text{m}^2$. Auch in Bezug auf die Anzahl der haftenden Aggregate entwickelten sich die Cholesterin-depletierten und die Cholesterin-angereicherten Proben ähnlich. Die Anzahl der Aggregate nach einer Minute war wesentlich geringer im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe (6 Aggregate in der Cholesterin-depletierten Gruppe, bzw. 5 Aggregate in der Cholesterin-angereicherten), außerdem wiesen alle Aggregate eine Größe unter $400\ \mu\text{m}^2$ auf. Nach 3 bzw. 5 min Flusszeit stieg die Zahl der haftenden Aggregate in den behandelten Gruppen an und überstieg sogar die der unbehandelten Gruppe. Die Aggregate waren aber deutlich kleiner und nahmen dadurch eine kleine Fläche ein (siehe Tab. 4.1).

	Aggregatgröße	nativ		MbCD		Chol	
		bedeckte Fläche in μm^2	Häufigkeit	bedeckte Fläche in μm^2	Häufigkeit	bedeckte Fläche in μm^2	Häufigkeit
Min 1	bis 400 μm^2	3120,2	24,2	585,1	6,1	551,1	5,0
	bis 800 μm^2	737,6	1,4	29,0	0,1	29,1	0,1
	bis 1600 μm^2	384,7	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
	bis 3200 μm^2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	bis 6400 μm^2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	größer	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Min 3	bis 400 μm^2	5565,8	33,5	5255,0	34,3	5161,5	37,2
	bis 800 μm^2	3602,5	6,5	1792,5	3,2	1411,2	2,6
	bis 1600 μm^2	4147,2	3,7	978,5	0,9	840,3	0,8
	bis 3200 μm^2	2671,1	1,3	370,9	0,2	232,7	0,1
	bis 6400 μm^2	1437,8	0,3	253,3	0,1	232,4	0,1
	größer	555,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Min 5	bis 400 μm^2	2977,3	18,1	6765,3	43,5	6582,5	42,7
	bis 800 μm^2	2878,3	5,1	3749,4	6,9	3211,3	5,8
	bis 1600 μm^2	4866,3	4,2	2060,7	2,1	1414,9	1,3
	bis 3200 μm^2	5950,6	2,5	1074,6	0,5	1017,8	0,5
	bis 6400 μm^2	4304,3	0,9	404,6	0,1	0,0	0,0
	größer	5887,6	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0

Tab. 4.1 Anzahl und Größe von Thrombozytenaggregaten bei Fluss über eine mit Kollagenfasern beschichtete Oberfläche nach 1, 3 und 5 Minuten: Angegeben ist die relative Häufigkeit der auf den ausgewerteten Bildern dargestellten Aggregate und die Fläche, die sie einnehmen. SR 1500s⁻¹. n= 3. Pro Minuten wurden aus jedem Flussexperiment 5 Bildausschnitte ausgewertet (entspricht insgesamt 15 Bildern).

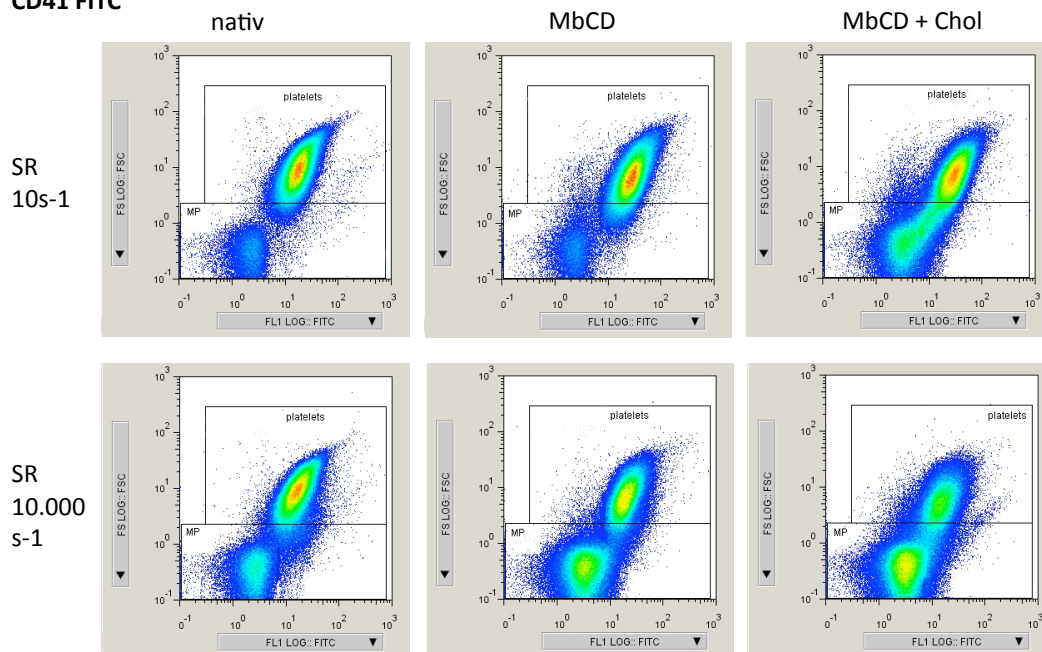
4.3 Durchflusszytometrische Untersuchung des PRP nach Scherung

Um die Thrombozyten- und Mikropartikelanzahl der Proben vor und nach Scherung zu messen, wurden die Proben durchflusszytometrisch untersucht. Auf diese Weise konnte nicht nur die Anzahl der Teilchen bestimmt werden, sondern auch die Expression und die relative Verteilung thrombozytenspezifischer Rezeptoren auf der Plättchen- und Mikropartikeloberfläche sowie der Aktivierungszustand der Thrombozyten. Um die rein mechanische, passive Generierung von Mikropartikeln mit der unter Aktivierung vergleichen zu können, wurden in einigen Experimenten sowohl PRP-Proben gemessen, bei welchen eine Aktivierung verhindert wurde, als auch PRP-Proben, bei welchen eine Aktivierung durch Scherung zugelassen wurde.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen in *Dot-Plot* Bildern dargestellt (Abb 4.6). Gezeigt ist die Markierung der Thrombozyten mit zwei verschiedenen Antikörpern (CD41 und CD42b). Gemessen wurden sowohl die Effekte von Scherung als auch die Effekte von Cholesterindepelktion, bzw. -anreicherung der Thrombozytenmembran:

A

CD41 FITC



B

CD42b FITC

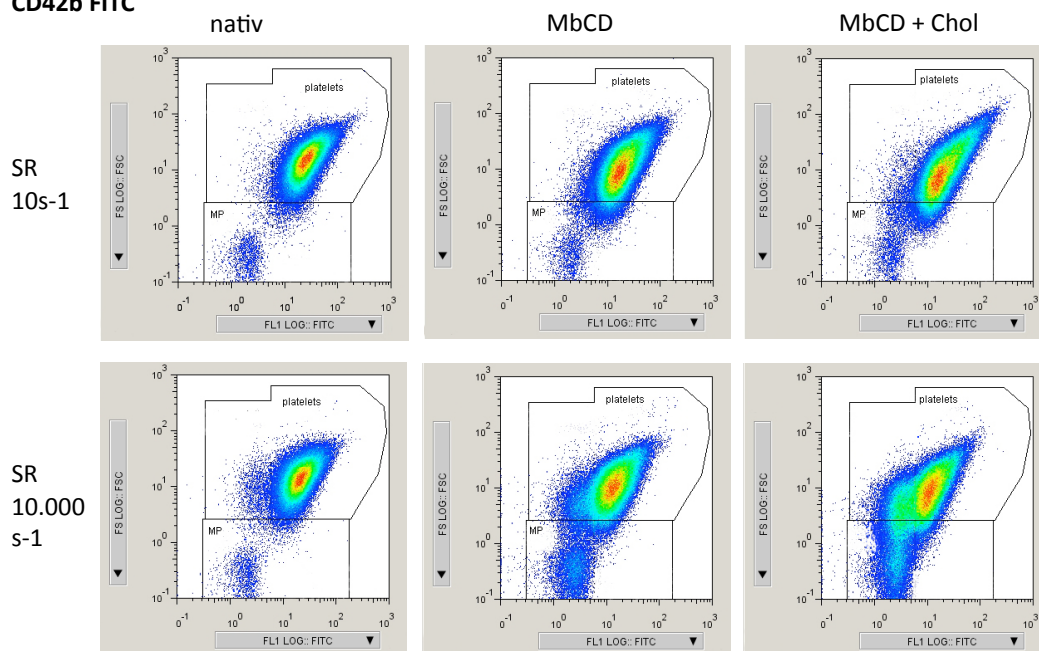


Abb. 4.6 Abhängigkeit der Mikropartikelgenerierung vom Cholesteringehalt der Thrombozytenmembran: Durchflusszytometrische Analyse von drei verschieden behandelten PRP-Proben (nativ, Cholesterindepletion und Cholesterinanreicherung) nach Scherung mit $10s^{-1}$ und $10.000 s^{-1}$. Die Proben wurden mit zwei unterschiedlichen thrombozytenspezifischen Antikörpern markiert: CD41 FITC – AK (A) und CD42b FITC – AK (B). Durch Scherung kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Mikropartikel, der durch vorherige Cholesterinanreicherung der Thrombozytenmembranen am deutlichsten ausfällt. Dargestellt sind Dot-Plot-Bilder die mittels des Computer-Programms FloJo generiert wurden.

4.3.1 Plättchenanzahl und -größe sowie Rezeptorverteilung auf der Zellmembran

Die Anzahl der CD41+ Plättchen blieb in der nativen Gruppe unabhängig von der Scherrate konstant. In der Gruppe der Cholesterin-depletierten Plättchen sank die Zahl der CD41+ Plättchen nach Scherung mit $10.000s^{-1}$ im Vergleich zur Scherung mit $10s^{-1}$ signifikant ab. Zudem war die Anzahl der CD41+Plättchen in der Cholesterin-beladenen Gruppe signifikant vermindert im Vergleich zur Plättchenzahl der nativen Gruppe nach Scherung mit $10.000s^{-1}$ (siehe Abb. 4.7 A).

In der Gruppe der Cholesterin-beladenen Plättchen war eine Reduktion der CD41+ Plättchen sowohl durch Scherung mit $10s^{-1}$ als auch durch Scherung mit $10.000s^{-1}$ zu beobachten, dieser Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant.

Die Anzahl der CD42b+ Plättchen blieb in der nativen Gruppe ebenfalls konstant, unabhängig von der Scherrate. In den behandelten Gruppen zeigten sich insgesamt dieselben Tendenzen, wie bei den CD41-markierten Plättchen. Die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant. (siehe Abb. 4.7 B)

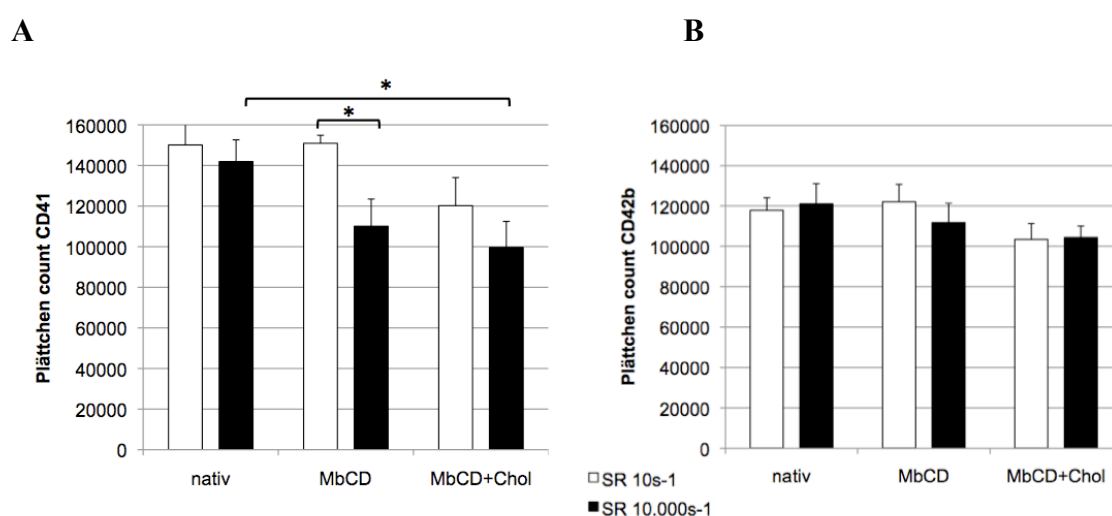


Abb. 4.7 (A) Anzahl CD41+ Plättchen nach Scherung mit $10s^{-1}$ und $10.000s^{-1}$. (B) Anzahl CD42b+ Plättchen nach Scherung mit $10s^{-1}$ und $10.000s^{-1}$. Proben: PRP (unbehandelt (nativ), Cholesterin-depletiert (MbCD) und Cholesterin-angereichert (MbCD+Chol)). MW \pm SEM. * $p < 0,05$. (n=5)

Um die Plättchen weiter zu charakterisieren, wurde deren mittlere Größe ausgewertet, gemessen durch den forward-scatter (FSC) gegen den side-scatter (SSC). Es zeigte sich eine Reduktion des Plättchenvolumens durch Cholesterin-Depletion und Cholesterin-Beladung. In allen Gruppen wurde durch die Einwirkung hoher Scherkräfte das Plättchenvolumen zusätzlich reduziert. Diese Verhältnisse zeigen

sich, unabhängig davon ob die Plättchen mit Anti-CD41 oder Anti-CD42b markiert wurden (siehe 4.8 A und B).

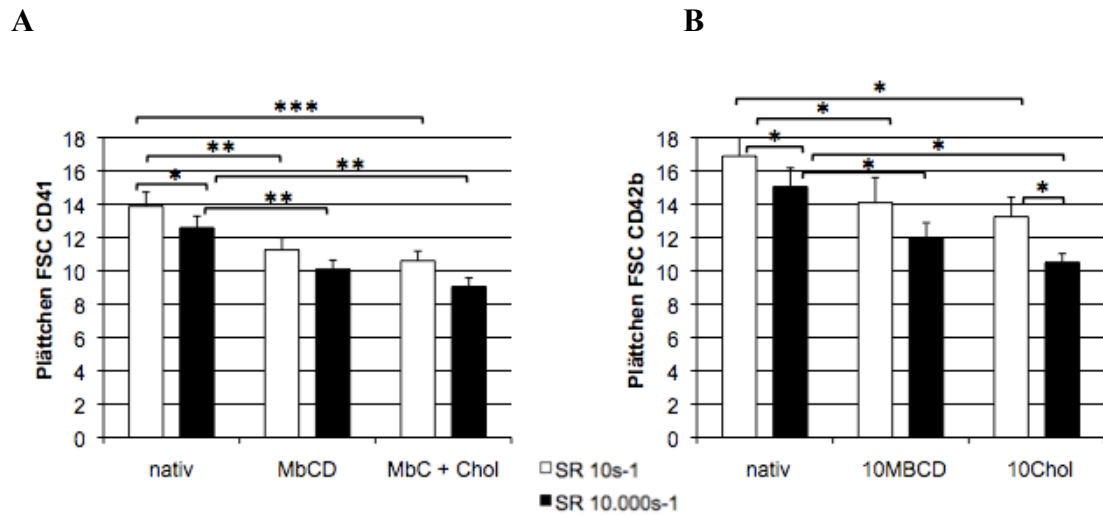


Abb. 4.8 (A) Größe CD41+ Plättchen nach Scherung mit 10s⁻¹ und 10.000s⁻¹. (B) Größe CD42b+ Plättchen nach Scherung mit 10s⁻¹ und 10.000s⁻¹. Proben: PRP (unbehandelt (nativ), Cholesterin-depletiert (MbCD) und Cholesterin-angereichert (MbCD+Chol)). MW±SEM. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. (n=5)

Die mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity = MFI) ist abhängig von der Rezeptordichte und wurde ebenfalls ausgewertet. Je höher die Rezeptordichte auf der Oberfläche der Thrombozyten, desto höher ist auch die MFI. In allen untersuchten Gruppen war ein Abfall der MFI festzustellen, nachdem die Thrombozyten sehr hohen Scherkräften ausgesetzt waren. Allerdings war ein signifikanter Abfall der Fluoreszenzintensität bei den mit CD41 markierten Plättchen nur für die Cholesterin-beladene Gruppe nachweisbar. Bei den mit CD42b markierten Plättchen war dies sowohl für die Gruppe der Cholesterin-beladenen als auch für die Gruppe der Cholesterin-depletierten der Fall.

Die Fluoreszenzintensität nahm bei einer geringen Scherrate von 10s⁻¹ durch Behandlung mit MbCD (mit und ohne Cholesterinbeladung) bei den mit CD41 markierten Plättchen eher zu. Bei den mit CD42b markierten Plättchen war eine Abnahme zu beobachten. (siehe Abb. 4.9 A und B).

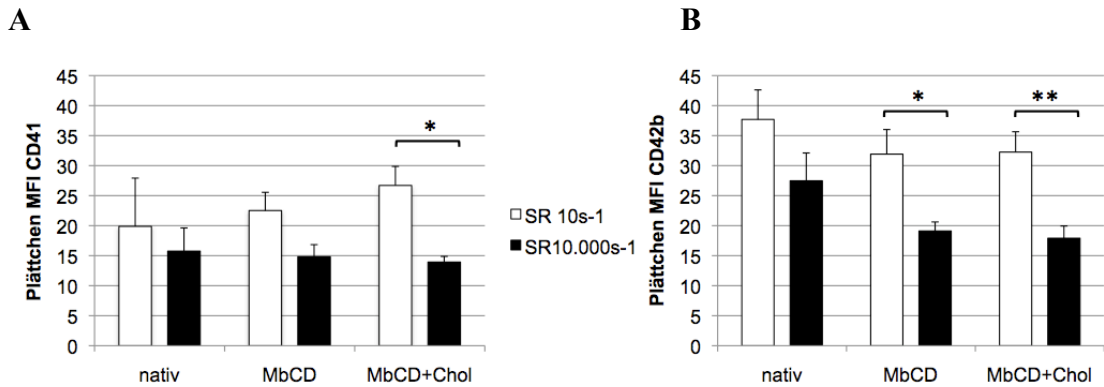


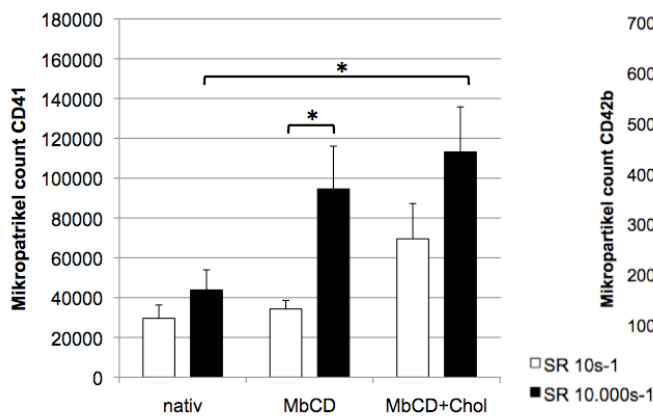
Abb. 4.9 (A) Mittlere Fluoreszenzintensität CD41+ (A) und CD42b+ (B) Plättchen nach Scherung mit 10s^{-1} und 10.000s^{-1} . Proben: PRP (unbehandelt (nativ), Cholesterin-depletiert (MbCD) und Cholesterin-angereichert (MbCD+Chol)). MW \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (n=5)

4.3.2 Mikropartikelanzahl und -größe, sowie Rezeptorverteilung auf der Mikropartikelmembran

Die Zunahme von Mikropartikeln durch passive Scherkräfte wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben.⁴² Auch in unseren Experimenten nahm die Anzahl der CD41+ und CD42b+ Mikropartikel durch hohe Scherkräfte zu. Insgesamt war die Anzahl detektierter CD41+ Mikropartikel im Vergleich zu den CD42b+ etwa um ein vierfaches höher.

Ohne die Thrombozyten hohen Scherkräften auszusetzen, blieb die Mikropartikel-Anzahl in der unbehandelten und Cholesterin-depletierten Gruppe relativ konstant. Durch die Cholesterinbeladung der Thrombozytenmembran stieg die Anzahl der Mikropartikel jedoch auch ohne dass sie zuvor hohen Scherkräften ausgesetzt waren. Dies war sowohl an der Anzahl CD41+ als auch CD42b+ Mikropartikel nachweisbar. In der Gruppe der Cholesterin-depletierten Thrombozyten entstanden jedoch durch hohe Scherkräfte deutlich mehr Mikropartikel als in der unbehandelten Gruppe. Die größte Anzahl an Mikropartikeln war in der Gruppe der Cholesterin-beladenen Thrombozyten zu finden. Allerdings stieg deren Anzahl durch die Einwirkung hoher Scherkräfte nicht so stark an wie in der Cholesterin-depletierten Gruppe, da der Ausgangswert an sich schon höher lag. (siehe Abb. 4.10 A und B)

A



B

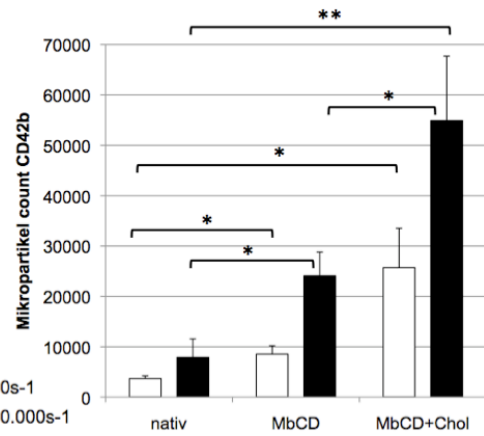
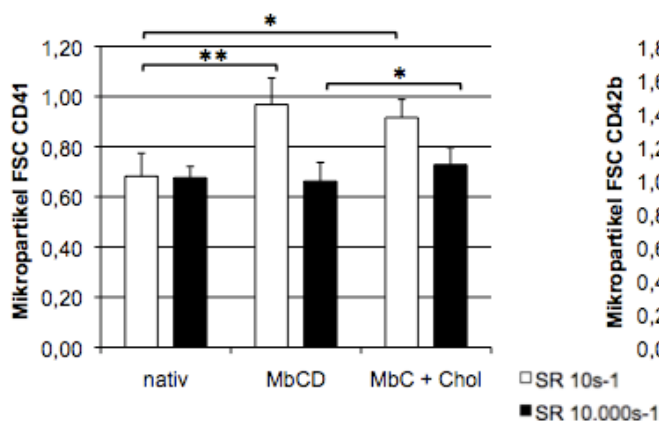


Abb. 4.10 (A) Anzahl CD41+ Mikropartikel nach Scherung mit 10s⁻¹ und 10.000s⁻¹. (B) Anzahl CD42b+ Mikropartikel nach Scherung mit 10s⁻¹ und 10.000s⁻¹. Proben: PRP (unbehandelt (nativ), Cholesterin-depletiert (MbCD) und Cholesterin-angereicht (MbCD+Chol)). MW±SEM. * p < 0,05, ** p < 0,01. (n=5)

Die Größe der Mikropartikel war in der unbehandelten Gruppe konstant, unabhängig davon, ob die Thrombozyten vorher hohen Scherkräften ausgesetzt waren oder nicht. In den behandelten Gruppen ergab sich ein anderes Bild. Die Mikropartikel, die sich schon vor dem Einwirken hoher Scherkräfte gebildet hatten, waren im Durchschnitt größer als die der unbehandelten Gruppe. Nach Scherung mit 10.000s⁻¹ hatten sie jedoch etwa die selbe Größe wie die der unbehandelten Gruppe. (siehe Abb. 4.11 A und B)

A



B

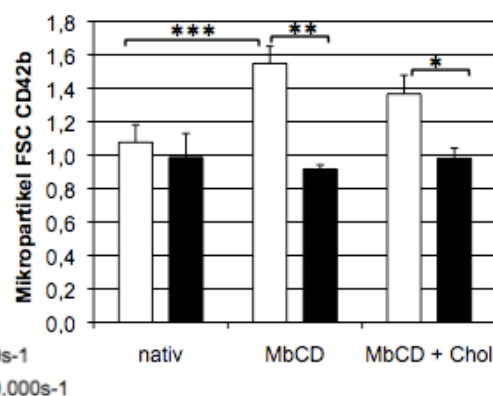


Abb. 4.11 (A) Größe CD41+ Mikropartikel nach Scherung mit 10s⁻¹ und 10.000s⁻¹. (B) Größe CD42b+ Mikropartikel nach Scherung mit 10s⁻¹ und 10.000s⁻¹. Proben: PRP (unbehandelt (nativ), Cholesterin-depletiert (MbCD) und Cholesterin-angereicht (MbCD+Chol)). MW±SEM. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. (n=5)

Die mittlere Fluoreszenzintensität der Mikropartikel war in der unbehandelten Gruppe unabhängig von dem Einwirken von Scherkräften konstant.

Die CD41-Rezeptoren auf der Mikropartikeloberfläche nahmen durch die Cholesterin-Beladung der Thrombozytenmembran signifikant zu im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Die Anzahl der CD41+ Oberflächenrezeptoren wurde jedoch durch die Einwirkung hoher Scherkräfte auf das Niveau der unbehandelten Gruppe gesenkt. (siehe Abb. 4.12 A)

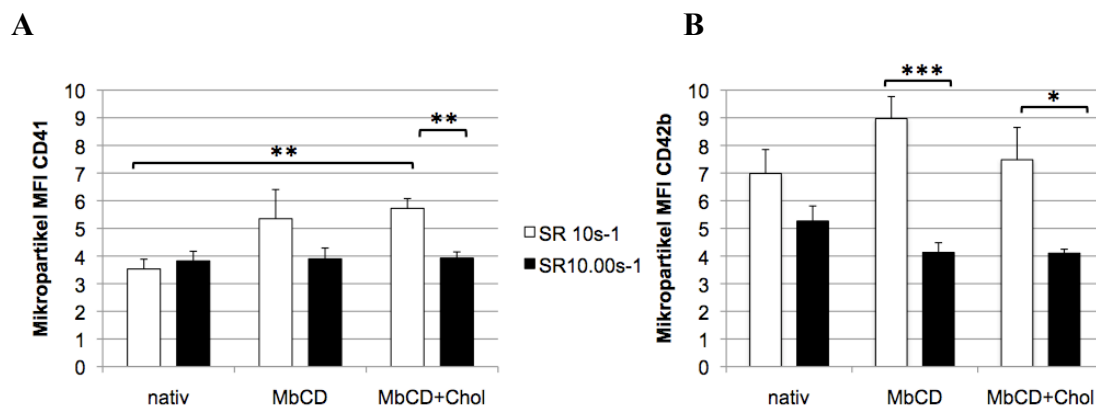


Abb. 4.12 Mittlere Fluoreszenzintensität CD41+ (A) und CD42b+ (B) Mikropartikel nach Scherung mit 10s⁻¹ und 10.000s⁻¹. Proben: PRP (unbehandelt (nativ), Cholesterin-depletiert (MbCD) und Cholesterin-angereichert (MbCD+Chol)). MW±SEM. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. (n=5)

Die Anzahl der CD42b+ Oberflächenrezeptoren waren ohne die Einwirkung hoher Scherkräfte konstant, unabhängig von einer Veränderung des Cholesteringehaltes der Thrombozytenmembranen. Durch die Scherung mit 10.000s⁻¹ nahm die Rezeptoranzahl in den behandelten Gruppen jedoch signifikant ab. (siehe Abb. 4.12 B)

4.3.3 Plättchenaktivierung durch Scherung

Um zu überprüfen, ob eine Aktivierung der Thrombozyten durch Zugabe von Apyrase, PGE₁, EDTA und Tirofiban zusätzlich zu PPACK erfolgreich verhindert werden konnte, wurden ebenfalls Proben gemessen, die nur PPACK enthielten.

Sie wurden mit einem Antikörper gegen CD62P inkubiert. CD62P gilt als Aktivitätsmarker von Thrombozyten. Er befindet sich im ruhenden Plättchen hauptsächlich in den α-Granula und wird verstärkt exprimiert, wenn die α-Granula bei Aktivierung des Thrombozyten mit der äußeren Zellmembran verschmelzen und deren Inhalt nach außen sezerniert wird.

Außerdem wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der CD41+ Plättchen in der blockierten mit denen in der nicht blockierten Gruppe verglichen. Da durch Aktivierung der Plättchen die GPIIb-IIIa-Rezeptoren vermehrt an der Oberfläche exprimiert werden, lässt sich aus einer Zunahme der Fluoreszenzintensität eine vermehrte Aktivierung der Plättchen ableiten.

4.3.3.1 Anzahl CD62P+ Plättchen

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Anzahl CD62P+ Plättchen durch Scherung mit $10.000s^{-1}$ im Vergleich zu $10s^{-1}$ in der nativen wie auch in der MbCD-behandelten Gruppe, unabhängig davon ob die Aktivierung der Thrombozyten unterbunden wurde, oder nicht. In der Gruppe der Cholesterin-beladenen Thrombozyten war kein signifikanter Anstieg nachweisbar. Allerdings war die Anzahl CD62P+ nativer Thrombozyten nach Scherung mit $10.000s^{-1}$ in der blockierten Gruppe signifikant niedriger, als in der nicht blockierten Gruppe. In den mit MbCD bzw. MbCD + Chol behandelten Gruppen war dieser Unterschied nicht signifikant.

In der Gruppe der blockierten Proben war nach Scherung mit $10s^{-1}$ die Anzahl der CD62P+ Plättchen mit Cholesterin-Beladung am höchsten und auch signifikant höher als in der nativen Gruppe. Auch nach Scherung mit $10.000s^{-1}$ war dieser Unterschied signifikant. Allerdings stieg die Anzahl der CD62P+ Plättchen in der mit Cholesterin beladenen Gruppe durch Scherung mit $10.000s^{-1}$ im Vergleich zu $10s^{-1}$ nicht an.

In der nicht blockierten Gruppe war die Anzahl der CD62+ Plättchen nach Scherung mit $10.000s^{-1}$ in der Cholesterin-beladenen Gruppe signifikant niedriger als in der nativen Gruppe (siehe Abb. 4.13)

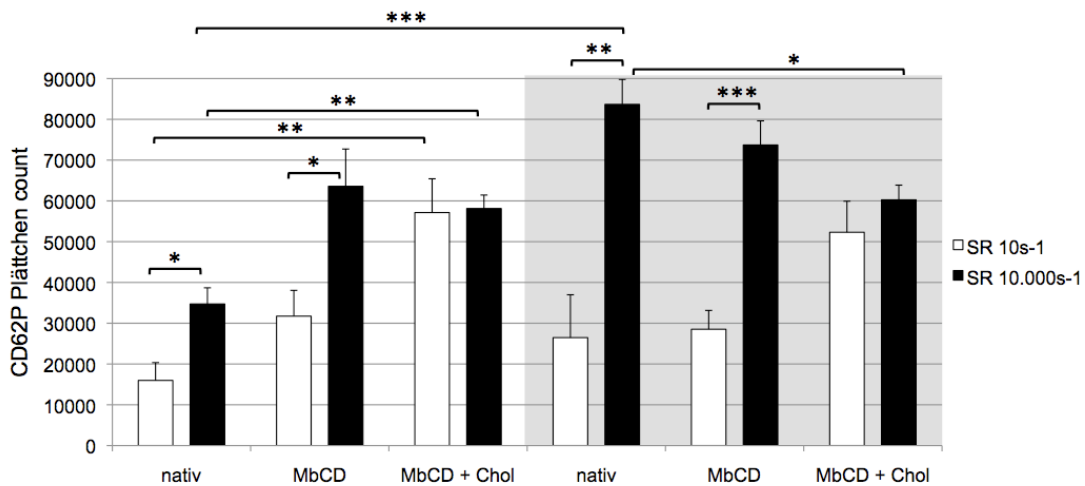


Abb. 4.13 Anzahl CD62P+ Plättchen nach Scherung mit 10s⁻¹ und 10.000s⁻¹ mit und ohne Blockierung der Aktivierung, Messungen ohne Blockierung der Thrombozyten sind im grau hinterlegten Bereich dargestellt. Proben: PRP (unbehandelt (nativ), Cholesterin-depletiert (MbCD) und Cholesterin-angereichert (MbCD+Chol)). MW±SEM. * p < 0,05 , ** p < 0,01, *** p < 0,001. (n=4)

4.3.3.2 Durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) CD41+ Plättchen

Die Unterschiede der Fluoreszenzintensität CD41+ Plättchen innerhalb der blockierten Gruppe wurden bereits weiter oben im Text beschrieben (Kapitel 4.3.1). Im Folgenden werden die Unterschiede zwischen einer Inhibierung der Aktivierung und einer Zulassung der Aktivierung deutlich gemacht.

Die Fluoreszenzintensität konnte durch die Inhibierung der Thrombozytenaktivierung in der Gruppe der nativen und Cholesterin-depletierten Thrombozyten signifikant gesenkt werden. Dies konnte sowohl nach Scherung mit 10s⁻¹ als auch nach Scherung mit 10.000s⁻¹ nachgewiesen werden. Die Unterschiede in der Cholesterin-beladenen Gruppe blieben knapp über einem Signifikanzniveau von p<0,05; auch hier war die Fluoreszenzintensität durch Inhibierung der Thrombozytenaktivierung deutlich geringer. Jedoch weisen die Messungen eine hohe Standardabweichung auf (siehe Abb. 4.14).

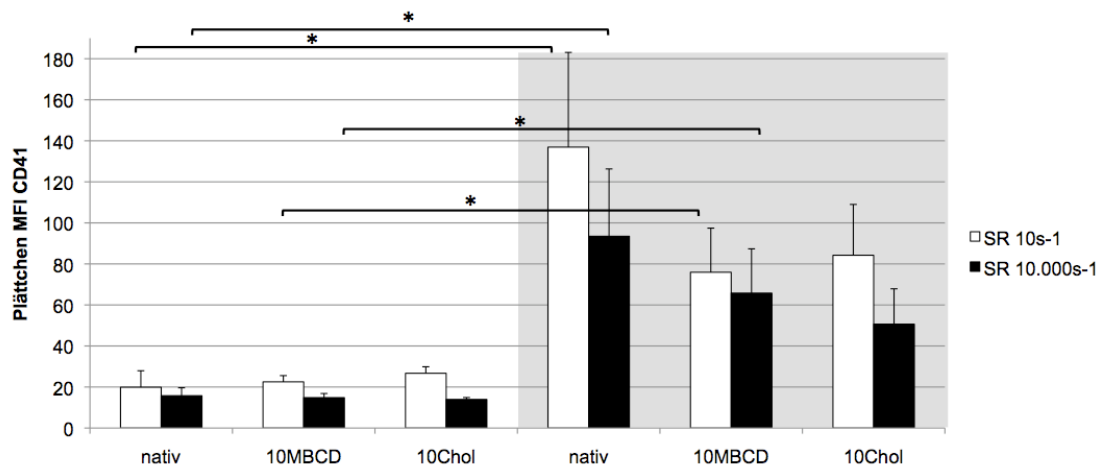


Abb. 4.14 Mittlere Fluoreszenzintensität CD41+ Plättchen nach Scherung mit $10s^{-1}$ und $10.000s^{-1}$ mit und ohne Blockierung der Aktivierung, Messungen ohne Blockierung der Thrombozyten sind im grau hinterlegten Bereich dargestellt. Proben: PRP (unbehandelt (nativ), Cholesterin-depletiert (10MBCD) und Cholesterin-angereichert (10Chol)). MW \pm SEM. * p < 0,05. (n=5)

4.4 Messung der Thrombingenerierungskapazität im TDT

Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass durch die Scherung von Thrombozyten prokoagulante Mikropartikel gebildet werden, welche die Gerinnung fördern.⁴² Um den Gerinnungszustand der Plasmaproben zu untersuchen, wurde ein Thrombin-Generierungstest durchgeführt. Es wurde sowohl der Einfluss des Cholesteringehaltes der Thrombozytenmembranen, als auch der Einfluss von Scherkräften auf die Gerinnung getestet. Je schneller eine Probe die maximale Thrombingenerierung erreicht hatte, desto gerinnungsaktiver war sie.

Die Experimente wurden in zwei unterschiedlichen Verdünnungsstufen durchgeführt (Verdünnung 1: 1 zu 39, Verdünnung 2: 1 zu 78), um eine zu hohe Menge an prokoagulatorischen Substanzen und damit einen Substratmangel zu erkennen. Da sich in beiden Verdünnungsstufen ähnliche Ergebnisse zeigten, war jedoch nicht von einem Mangel an Substrat auszugehen.

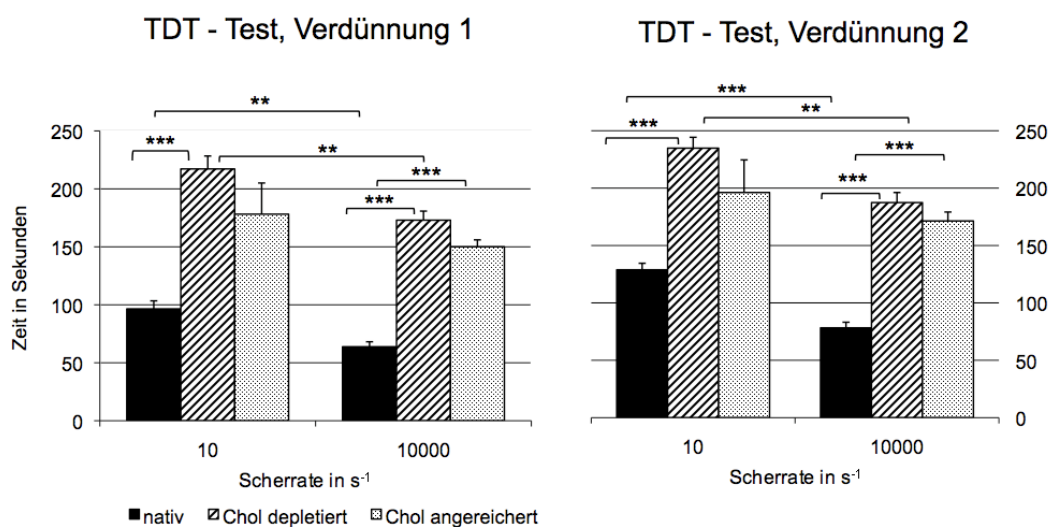


Abb. 4.15 Veränderung der Gerinnungszeit durch Cholesterindepletion bzw. Anreicherung und Scherung der Thrombozyten. Gemessen wurde die Gerinnungszeit nach Zugabe von Calciumionen (25mM) und tissue factor (1,44 ng/ml) zu PRP (unbehandelt (nativ), Cholesterindepletiert und Cholesterin-angereichert), welches zuvor unterschiedlichen Scherraten in einem Kegel-Platten-Viskosimeter ausgesetzt war. Die Zeit bis zum maximalen Thrombingenerierung ist in Sekunden angegeben und wurde in zwei unterschiedlichen Verdünnungsstufen gemessen (Verdünnung 1 = 1:39, Verdünnung 2 = 1:78). MW±SEM. ** p < 0,01. *** p < 0,001 (n=5)

Sowohl bei den nativen als auch bei den Cholesterin-depletierten Proben war durch Scherung eine signifikante Verkürzung der Thrombin-Generierungszeit zu

beobachten (nativ: von 97 auf 64 sec; MbCD-behandelt: von 217 auf 173 sec). Bei den mit Cholesterin beladenen Thrombozyten verkürzte sich die Thrombin-Generierungszeit durch Scherung ebenfalls von 178 auf 150 sec, dieser Unterschied war aber nicht signifikant.

Im Vergleich zu den nativen Proben waren die behandelten Proben in der Geschwindigkeit der maximalen Thrombin-Generierung jedoch insgesamt verlangsamt. Während ohne vorherige Scherung die maximale Thrombingenerierung bei den nativen Proben bereits nach 97 sec erreicht war, dauerte es bei den Cholesterin-beladenen Proben 178 sec und bei den Cholesterin-depletierten Proben am längsten (217 sec). Allerdings konnte die Zeit bis zur maximalen Thrombingenerierung durch Scherung bei den Cholesterin-depletierten Proben stärker verkürzt werden (um 44 sec), als es in der nativen Gruppe (um 33 sec). Am wenigsten Einfluss hatte die Scherung auf die Cholesterin-beladene Gruppe. Hier wurde der Zeitpunkt der maximalen Thrombin-Generierung lediglich um 28 sec beschleunigt. Die beschriebenen Effekte mit den dazugehörigen Zeitangaben beziehen sich auf die Verdünnung 1., bei Verdünnung 2 waren ähnliche Ergebnisse zu beobachten (siehe Abb. 4.15).

5. Diskussion

5.1 Einfluss der Cholesterindepletion bzw. -anreicherung auf die Adhäsion von Thrombozyten und *tether*-Bildung an VWF unter arteriellen Strömungsbedingungen

Um den Einfluss von Cholesterindepletion bzw. -anreicherung auf die Adhäsion von Thrombozyten und die *tether*-Bildung an einer VWF-beschichteten Oberfläche zu untersuchen, wurden Flussexperimente unter arteriellen Strömungsbedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Thrombozyten aller untersuchten Gruppen bei beiden getesteten Flussgeschwindigkeiten an einer beschichteten Oberfläche mit VWF transient haften, rollen und *tether* ausbilden. Es sollte die alleinige Interaktion des von Willebrand Faktors mit den GPIIb-IIIa-Rezeptoren von Thrombozyten untersucht werden. Eine permanente Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten konnte durch Zugabe von Antikoagulanzen und Blockierung der Aktivierung erfolgreich verhindert werden.

5.1.1 Thrombozyten mit cholesterindepletierter, bzw. cholesterinbeladener Zellmembran zeigen intakte Interaktion mit einer VWF-beschichteten Oberfläche mit Unterschieden je nach Behandlung und Flussgeschwindigkeit.

Obwohl die Thrombozyten sich bei der Interaktion mit VWF in ihren Eigenschaften an der beschichteten Oberfläche zu adhären, zu rollen und *tether* auszubilden ähnlich zu verhalten schienen, zeigten sich in der anschließenden quantitativen Bildanalyse jedoch Unterschiede. Bei einer SR von 5000s^{-1} waren in der unbehandelten Gruppe im Vergleich zu den behandelten Gruppen mehr haftende Thrombozyten pro Bildfläche sichtbar (190 vs. 158 bzw. 135). Bei einer SR von 10.000 s^{-1} war in der Cholesterin-depletierten Gruppe die Zahl der haftenden Thrombozyten am größten (71), gefolgt von der Cholesterin-beladenen Gruppe (32) und der unbehandelten Gruppe (20).

In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben, ob die Veränderung des Cholesteringehaltes von Plättchenmembranen die initiale Interaktion mit VWF beeinflusst. In einer Studie von van Lier *et al.* wurde gezeigt, dass die initiale Adhäsion bei einer SR von 800s^{-1} durch Cholesterindepletion nicht beeinträchtigt,

jedoch das anschließende *spreading* gestört war.⁹⁰ MbCD-Behandlung reduzierte dort die Geschwindigkeit, aber nicht das Ausmaß der VWF/Ristocetin-induzierten Aggregation. Shrimpton *et al.* beschrieben bei einer SR von 1500s^{-1} eine deutlich verminderte Interaktion mit einer mit der A1-Domäne des VWF beschichteten Oberfläche und eine deutlich verminderte VWF/ristocetin-induzierte Aggregation.⁹³ Obwohl im Gegensatz zur Studie von van Lier *et al.* unser Flusseperiment über eine mit der A1-Domäne des VWF beschichteten Oberfläche durchgeführt wurde und nicht mit dem kompletten VWF-Molekül, entsprachen unsere Ergebnisse diesen insgesamt eher als denen von Shrimpton *et al.* Hier wurde eine mit der A1-Domäne des VWF beschichtete Oberfläche mit PRP und nicht mit Vollblut perfundiert.

In den genannten Studien wurden lediglich die Effekte einer Cholesterin-Depletion getestet. Die mögliche Effekte einer Beladung der Thrombozytenmembranen mit Cholesterin wurde nicht untersucht, auch nicht der Einfluss unterschiedlicher Flussraten auf das Adhäsionsverhalten oder das Ausbilden von *tethern*.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Interaktion von GPIb mit VWF durch die Veränderung des Cholesteringehaltes der Thrombozytenmembran bei der getesteten niedrigeren Scherrate von 5000s^{-1} etwas beeinträchtigt wird, jedoch nicht stark vermindert ist. Unter „pathologischen“ Flussgeschwindigkeiten (10.000s^{-1}), wie sie an stark stenosierte Stellen im Gefäßsystem vorkommen, interagieren Cholesterin-depletierte Plättchen sogar vermehrt mit der beschichteten Oberfläche.

Dies könnte auf Veränderungen der Membranstruktur zurückzuführen sein. Bisherige Untersuchungen zu den Membraneigenschaften von Zellen mit unterschiedlichem Cholesteringehalt wurden hauptsächlich an Leukozyten und Endothelzellen durchgeführt. Hinweise auf eine „steifere“ Membran durch Cholesterindepletion ergaben sich aus einer Studie von Byfield *et al.*¹⁰⁷ an aortalen Endothelzellen von Rindern. In unserem Fall könnte die steifere Membran dazu führen, dass die Rolleigenschaften der Thrombozyten durch Cholesterindepletion verändert werden und die Thrombozyten vermehrt adhären, da sie nicht so schnell rollen können.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass die GPIb-vermittelte, initiale Anlagerung an die A1-Domäne des VWF nicht kritisch von dem Membrancholesteringehalt der Thrombozyten abhängt.

5.1.2 Veränderte Dynamik der *tether*-Bildung durch Cholesterindepletion bzw. -anreicherung der Thrombozytenmembran

Um die Interaktion der Plättchen mit VWF genauer zu analysieren, wurden neben der Anzahl haftender Plättchen auch die Anzahl und Länge der ausgebildeten *tether* analysiert. Dass *tether* und auch Mikropartikel allein durch passive Kräfte der Interaktion des GPIb mit VWF ohne Aktivierung der Thrombozyten entstehen können, wurde bereits beschrieben.^{23,42,108} Ob ein veränderter Cholesteringehalt der Thrombozyten Einfluss auf die *tether*-Bildung hat, wurde jedoch bislang noch nicht untersucht. Wie eine Studie von van Lier et al. beschrieb, ist die Ausbildung von Filopodien, die durch Aktivierung der Thrombozyten gebildet werden, durch Cholesterindepletion der Thrombozytenmembran nicht gestört.⁹⁴ In der von uns durchgeführten Studie wurde jedoch isoliert der Effekt auf die passive *tether*-Bildung ohne Aktivierung der Thrombozyten gezeigt.

Die Auswertungen ergaben, dass die *tether*-Bildung sowohl durch eine Cholesterindepletion als auch durch eine Cholesterinanreicherung der Zellmembran nicht beeinträchtigt war. Bei einer Scherrate von 5000s^{-1} bildeten die behandelten Thrombozyten pro haftendem Plättchen durchschnittlich sogar mehr *tether* aus, die jedoch mehrheitlich kürzer waren, als jene der nativen Kontrollgruppe.

Bei Einwirkung von höheren Scherkräften auf die Thrombozyten ($\text{SR } 10.000\text{s}^{-1}$) wurde deutlich, dass die Cholesterin-depletierten Thrombozyten nach wie vor mehrheitlich sehr kurze *tether* ausbildeten (um $2\mu\text{m}$), die Cholesterinbeladung der Thrombozytenmembran jedoch das vermehrte Auftreten längerer *tether* (um $4\mu\text{m}$) zur Folge hatte.

Diese Beobachtung könnte ebenfalls an dem bereits oben erwähnten Phänomen liegen, dass die Cholesterindepletion die MembranstEIFheit erhöht.¹⁰⁷ Zudem führte Cholesterindepletion von Rinder-Endothelzellen zu einer erniedrigten Lipiddiffusion innerhalb der Zellmembran und zu einer erhöhten Adhäsionsenergie zwischen Zellmembran und Zytoskelett, wie eine Studie von Sun *et al.* belegte.¹⁰⁹ Gegenteilige Effekte wurde bei Cholesterinanreicherung gefunden.

Eine Studie von Oh *et al.*¹¹⁰ an Leukozyten zeigte durch Cholesterinanreicherung der Zellmembran eine erhöhte *Tether*bildung und eine erhöhte Deformierbarkeit der Zelle insgesamt. Außerdem war ein stabileres Rollverhalten auf P-Selektin zu beobachten. Cholesterindepletion führte zu gegenteiligen Effekten.

Diese Ergebnisse sind gut mit den Beobachtungen in unseren Experimenten vereinbar. Cholesterindepletion führt zum vermehrten Auftreten von kurzen *tethern*, da die Membran steifer und die Adhäsionsenergie zwischen Membran und Zytoskeltett höher ist. Cholesterin-Anreicherung ermöglicht hingegen die Ausbildung längerer *tether* wegen einer flexibleren Membran und einer erniedrigten Adhäsionsenergie zwischen Zytoskelett und Zellmembran.

Da in unserem Experiment allein die Interaktion von VWFdA1 mit der GPIb-Domäne zugelassen wurde, ist davon auszugehen, dass die *tether*-Bildung tatsächlich rein passiv ohne Aktivierung der Thrombozyten stattgefunden hat und allein die Dynamik der Zellmembran und des Zytoskeletts für die Länge und Häufigkeit der *tether* verantwortlich war. Allerdings können andere Effekte durch die Veränderung des Cholesteringehaltes der Zellmembran nicht ausgeschlossen werden.

Der beobachtete Effekt wurde in unseren Experimenten erst bei der Einwirkung sehr hoher Scherkräfte auf die Thrombozyten sichtbar, was für eine Abhängigkeit der Effekte von der Stärke der Scherkraft spricht.

5.2 Einfluss der Cholesterindepletion bzw. –anreicherung auf die Bildung von Mikropartikeln

Da, wie unter 5.1.2 beschrieben, eine Veränderung der *tether* -Bildung je nach Cholesteringehalt der Thrombozytenmembran beobachtet werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass sich dies auch auf die Anzahl gebildeter Mikropartikel auswirken würde. Tatsächlich konnte in den mit Hilfe des Kegel-Platten-Viskosimeters durchgeführten Versuchen gezeigt werden, dass der Cholesteringehalt der Plättchenmembran auch die Entstehung von Mikropartikeln aus Thrombozyten beeinflusst.

Passend zu der Beobachtung, dass bei einer Scherrate von 10.000s^{-1} die Thrombozyten mit cholesterinagreicherter Membran längere *tether* ausbildeten, war auch nach Scherung der Thrombozyten bei 10.000s^{-1} im Kegel-Platte-Viskosimeter in dieser Gruppe die größte Mikropartikelanzahl nachweisbar.

Insgesamt wurden die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen deutlicher durch die Markierung mit CD42b als durch die Markierung mit CD41, sowohl in Bezug auf die Einwirkung von Scherkräften als auch durch die Veränderung des

Cholesteringehaltes der Thrombozytenmembran. Dies könnte daran liegen, dass die Expression des Rezeptors GPIb-V-IX weitgehend stabil ist in einem Versuchsaufbau in dem eine Aktivierung der Thrombozyten unterbunden wird. Obwohl viele Aktivierungsschritte der Thrombozyten unterbunden wurden, scheint durch die Veränderung des Cholesteringehaltes der Thrombozytenmembranen gemessen an der CD62P Expression trotzdem eine gewisse Aktivierung stattgefunden zu haben (siehe 5.4). Dies könnte wiederum eine Erklärung sein, warum die Markierung der Zellen mit CD42b „stabilere“ Ergebnisse lieferte als die mit CD41, da die Expression des mit CD41 markierten GPIIb-IIIa Rezeptorkomplexes vom Aktivitätszustand der Thrombozyten abhängt.

Obwohl die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen deutlicher sichtbar durch die Markierung mit CD42b wurden, konnten insgesamt um ein Vielfaches mehr CD41-positive als CD42b-positive Mikropartikel nachgewiesen werden, unabhängig von der Einwirkung von Scherkräften und dem Cholesteringehalt der Thrombozytenmembranen.

Dies könnte mit der Methode der von uns angewandten Mikropartikel-Detektion und mit der hohen Anzahl von GPIIb-IIIa Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche zusammenhängen. Die Wahrscheinlichkeit ein Teilchen mit Hilfe einer Fluoreszenz-getriggerten Messung zu erkennen ist höher, je häufiger der Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche vorkommt. Durch die hier angewandte Art der Messung wurden eventuell nicht alle Mikropartikel durch die Markierung mit Antikörpern gegen CD42b erkannt. Allerdings ist auch zu vermuten, dass tatsächlich deutlich mehr Mikropartikel nur CD41 markiert werden, da sie nur den GPIIb-IIIa Rezeptor tragen. Der GPIIb-IIIa Rezeptor ist deutlich häufiger auf der Thrombozytenmembran zu finden. Dies bedeutet, dass auch die Wahrscheinlichkeit höher ist einen solchen Rezeptor auf einem Mikropartikel zu finden, der sich aus einem Teil einer Thrombozytenmembran gebildet hat. Außerdem kommen GPIIb-IIIa-Rezeptoren auch auf den α -Granula der Thrombozyten vor und werden bei Exozytose der Granula vermehrt exprimiert.

Dass insgesamt weniger Plättchen durch die Markierung mit CD42b-Antikörpern gefunden wurden, konnte durch die ähnliche Gesamtplättchen-Anzahl ausgeschlossen werden, unabhängig davon ob CD42b- oder CD41-Antikörper eingesetzt wurden.

5.3 Änderung der Rezeptorverteilung und –dichte des GPIb- und GPIIb-IIIa-Rezeptors auf Plättchen und Mikropartikeln durch Modifizierung des Cholesteringehaltes der Zellmembran

Wie einleitend beschrieben (siehe 1.9.3) ist die Frage, ob der GPIb- und der GPIIb-IIIa-Rezeptor *lipid raft*-assoziiert sind und ob ihre Funktion von der Assoziation mit *lipid rafts* abhängt noch nicht vollständig geklärt. In unseren Experimenten versuchten wir deshalb anhand der durchflusszytometrischen Messung der mittleren Fluoreszenzintensität Rückschlüsse auf eventuelle Veränderungen der Rezeptordichte zu ziehen.

In allen Gruppen der mit CD42b markierten Zellen war eine Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität durch Einwirkung hoher Scherkräfte zu beobachten. Bei den mit CD42b markierten Thrombozyten und Mikropartikeln, deren Membran-Cholesteringehalt zuvor verändert worden war, zeigte sich nach Scherung mit 10.000s^{-1} sogar ein signifikanter Rückgang der Fluoreszenzintensität, was auf einen Rezeptorverlust hindeutet. Allerdings schienen die verbliebenen Rezeptoren in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt, da die Interaktion mit einer VWF-beschichteten Oberfläche weiterhin stattfand wie dies auch von van Lier et al. beschrieben wurde.⁹⁰ Diese Tatsache macht eine ausschließliche Assoziation des Rezeptors mit *lipid rafts* unwahrscheinlich, ebenso die Notwendigkeit der Intaktheit von *lipid rafts* für dessen Funktion.

Auch bei den mit CD41 markierten Zellen nahm die Fluoreszenzintensität durch Einwirken hoher Scherkräfte ab. Allerdings konnte in der Gruppe der Thrombozyten mit Cholesterin-angereicherter Membran vor dem Einwirken hoher Scherkräfte eine höhere mittlere Fluoreszenzintensität gemessen werden als in der nativ-Gruppe, die nach der Scherung der Thrombozyten mit 10.000s^{-1} wieder auf das Niveau der Cholesterin depletierten und nativen Gruppe absank. Dies könnte für eine verstärkte Expression des Rezeptors auf der Thrombozytenmembran durch Fusion von α -Granula mit der Zellmembran sprechen und damit für eine Aktivierung der Thrombozyten durch Cholesterinanreicherung der Zellmembran. Dasselbe Phänomen konnte auch bei der Messung der Mikropartikeln festgestellt werden.

Aus bisherigen Studien geht hervor, dass der GPIIb-IIIa-Rezeptor nicht *raft*-assoziiert ist.^{88,92} Insgesamt deuten unsere Ergebnisse ebenfalls darauf hin. Es ist eher von einer Beteiligung des Rezeptors an *raft*-abhängiger Signaltransduktion auszugehen.

5.4 Einfluss der Cholesterindepletion bzw. -anreicherung auf die Aktivierbarkeit von Thrombozyten durch Einwirkung von Scherkräften

Um den Aktivitätszustand der Thrombozyten und so auch den Erfolg einer Blockierung der Aktivierung zu beurteilen, wurde in der durchflusszytometrischen Analyse ein Antikörper gegen P-Selektin eingesetzt. In der nativen Gruppe zeigte sich, dass die Expression von P-Selektin nach Scherung mit 10.000s^{-1} in der blockierten Gruppe signifikant niedriger war als in der nicht blockierten Gruppe. Da P-Selektin bei der Aktivierung von Thrombozyten verstärkt aus den α -Granula sezerniert wird, ist also davon auszugehen, dass eine durch Scherung bedingte Aktivierung der Thrombozyten in der nativen Gruppe verhindert werden konnte. Wie P-Selektin wird auch der GPIIb-IIIa-Rezeptor bei Aktivierung vermehrt auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert. Da die durchschnittliche Plättchen-MFI in der blockierten Gruppe deutlich niedriger lag als in der nicht blockierten Gruppe, wies dies auf eine verminderte Expression des GPIIb-IIIa-Rezeptors und damit auf eine verminderte Plättchenaktivität hin.

Eine verminderte P-Selektin-Expression der Plättchen durch Cholesterindepletion, wie dies in einer Studie von van Lier *et al*⁹⁰ beschrieben wurde, konnte in unseren Versuchen nicht beobachtet werden.

Die divergierenden Ergebnisse zwischen unserer Studie und der von van Lier *et al.* könnten auf Unterschiede im Versuchsaufbau zurückzuführen sein. In der Studie von van Lier *et al.* wurden gewaschene Thrombozyten mit Kollagen stimuliert, und die P-Selektin-Expression vorher und nachher gemessen. In unseren Experimenten wurde die P-Selektin-Expression vor und nach Scherung von PRP gemessen.

In der Gruppe der cholesterinangereicherten Thrombozyten lag in unseren Experimenten die P-Selektin-Expression trotz Blockierung zahlreicher Gerinnungsschritte und ohne vorherige Scherung deutlich höher als in der nativen Gruppe. Die P-Selektin-Expression stieg durch Scherung auch nicht weiter an. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es durch Cholesterinbeladung der Thrombozytenmembran zu einer ungeordneten α -Granula-Sekretion ohne adäquaten Stimulus kommt.

Wie bereits für andere Zelltypen beschrieben,¹¹¹ scheinen *lipid rafts* bei der Regulation der Exocytose eine entscheidende Rolle zu spielen. Für Thrombozyten konnte dies bisher nicht eindeutig belegt werden. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass dies der Fall sein könnte. Ob dieser Mechanismus der „erleichterten“ Degranulation mit verantwortlich sein könnte für den bei Patienten mit Hypercholesterinämie generell erhöhten Aktivierungsstatus der Thrombozyten müssen weitere Studien klären.⁷³

5.5 Einfluss der Cholesterindepletion bzw. –anreicherung auf die Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung an Kollagenfasern vom Typ I unter arteriellen Strömungsbedingungen

In unseren Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl die Cholesterindepletion als auch die Cholesterinanreicherung der Thrombozytenmembran die Adhäsion und auch die Aggregatbildung an Kollagenfasern verlangsamt. Es war eine verzögerte Adhäsion zu beobachten und ein verlangsamtes Wachstum der sich bildenden Aggregate.

Im Hinblick auf die verminderte Aggregatbildung der Cholesterin-depletierten Thrombozyten an Kollagen stimmt unser Ergebnis mit der Literatur überein.^{90,91} Ob die Aggregationsfähigkeit an Kollagen von Thrombozyten, deren Zellmembran zuvor mit Cholesterin angereichert wurde, ebenfalls verändert ist, wurde bisher nicht untersucht.

Unsere Versuche ergaben, dass sowohl eine Cholesterindepletion als auch eine Cholesterinanreicherung der Zellen zu einer verminderten Aggregationsfähigkeit führt.

Dass sich keine gegensätzlichen Effekte bemerkbar machten, könnte daran liegen, dass eine Störung der *lipid rafts* alleine ausreicht, um eine effektive Aggregation zu verhindern, sei es durch zu viel oder zu wenig Cholesterin. Eine Erklärung für die ineffektive Aggregation könnte eine gestörte, ungeordnete Degranulation und Sekretion der Thrombozyten sein.

Van Lier et al.⁹⁰ stellten fest, dass die Cholesterindepletion von Thrombozytenmembranen eine verminderte Sekretion von ADP und TxA₂ zur Folge hatte. Außerdem wurde eine verminderte Expression von P-Selektin und CD63

beschrieben. Eine Studie von Grgurevich *et al.*⁹¹ zeigte ebenfalls eine Reduktion der ADP-Sekretion, die Expression von CD63 war jedoch nicht verändert.

Eine verminderte P-Selektin-Expression durch Cholesterindepletion konnte in unseren Versuchen nicht beobachtet werden. Allerdings legen unsere Ergebnisse (wie oben unter 5.4 beschrieben) nahe, dass es durch Cholesterinbeladung der Thrombozytenmembran zu einer ungeordneten α -Granula-Sekretion ohne adäquaten Stimulus kommt. Dies könnte dazu führen, dass eine effektive Aggregatbildung verhindert wird, da die Inhaltsstoffe der α -Granula schon zuvor ausgeschüttet wurden und im entscheidenden Moment nicht mehr zur Verfügung stehen. Auch das langsame Thrombus-Wachstum könnte durch eine gestörte Quervernetzung der Thrombozyten bei fehlendem P-Selektin erklärt werden, da es für die Größe und Stabilität eines Thrombus eine Rolle spielt.¹¹

5.6 Beeinflussung der Thrombingenerierungskapazität der Thrombozyten durch Veränderung des Cholesteringehaltes der Plättchenmembran

Wie bereits von Reiniger *et al.*⁴² vorgeschrieben, so konnte auch in unseren Experimenten gezeigt werden, dass durch Scherung des PRP prokoagulatorisch wirkende Mikropartikel gebildet werden, welche die Thrombinbildung im TDT beschleunigen. Durch Cholesterindepletion und Cholesterinbeladung der Thrombozytenmembran wurde die Thrombinentstehungszeit jedoch deutlich verlängert, durch Cholesterindepletion mehr als durch Cholesterinbeladung.

Obwohl die Thrombinentstehungszeit durch Cholesterindepletion am meisten verlängert wurde, so konnte sie durch Scherung der Probe mit 10.000s^{-1} signifikant verkürzt werden, wie dies auch bei den nativen Proben zu beobachten war. Hier korrelierte die erhöhte Anzahl an Mikropartikeln also mit einer Verkürzung der Gerinnungszeit. Diese Korrelation war in der Gruppe der cholesterinangereicherten Thrombozyten nicht nachweisbar. Die erhöhte Anzahl an Mikropartikeln führte also nicht generell zur einer Beschleunigung der Thrombingenerierung.

Es ist deshalb zu vermuten, dass die Entstehung von Thrombin durch andere Mechanismen gestört wird.

In der Gruppe der Cholesterin-beladenen Thrombozyten lief in den ungescherten Proben die Thrombingerierung etwas schneller ab als in den Cholesterin-depletierten Proben, vermutlich aufgrund der höheren Anzahl an Mikropartikeln. Dieser Effekt relativierte sich jedoch nach Scherung der Thrombozyten. Eine weitere Erhöhung der Mikropartikelanzahl führte hier nicht zu einer beschleunigten Gerinnung.

Die Beschleunigung der Thrombingerierung durch vorherige Scherung der Thrombozyten war in der Gruppe der cholesterindepletierten Plättchen noch erhalten, auch wenn die Thrombinbildung generell verlangsamt war.

6. Zusammenfassung

Im komplexen System der Funktionsweise von Thrombozyten werden auch dem Cholesterin der thrombozytären Zellmembran verschiedenste Funktionen zugeschrieben. Es hält die Zelle als wichtiger Membranbestandteil flexibel und beweglich und reichert sich bevorzugt in *lipid rafts* an. Durch die Anreicherung in diesen cholesterinreichen Domänen nimmt es Einfluss auf das clustering bestimmter Membranrezeptoren oder auf die transmembranöse Signalvermittlung und trägt auf diese Weise wesentlich zur Organisation und Funktionalität der Zellmembran bei.

Dass der Cholesteringehalt der Zellmembran auch Einfluss auf die Bildung von Mikropartikeln hat, konnte in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden. Die Cholesterinbeladung führte zu einem höheren Anstieg der Mikropartikelanzahl als die Cholesterindepletion der Thrombozytenmembran. Durch die zusätzliche Einwirkung von Scherkräften im Kegel-Platten-Viskosimeter konnte die rein passive Generierung von Mikropartikeln noch erhöht werden. Hier waren die meisten Mikropartikel ebenfalls in der Gruppe der cholesterinbeladenen Thrombozyten zu finden.

Im TDT-Test spiegelte sich die höhere Anzahl von Mikropartikeln in der Gruppe der cholesterinbeladenen Thrombozyten in einer verkürzten Gerinnungszeit gegenüber den cholesterindepletierten Plättchen wider. Insgesamt zeigte sich die Thrombingenerierung durch Veränderung des Cholesteringehaltes der Plättchenmembranen jedoch verlangsamt.

Während eines Flussversuchs über VWFdA1 bildeten mit Cholesterin beladene Thrombozyten bei einer Scherrate von 10.000s^{-1} durchschnittlich längere *tether* aus als cholesterindepletierte Thrombozyten. Dies spricht dafür, dass der Cholesteringehalt die Flexibilität der Thrombozytenmembran insgesamt beeinflusst und damit auch die Adhäsion zum Zytoskelett, so wie es bereits für andere Zelltypen beschrieben wurde.

Cholesterinbeladene Thrombozyten exprimierten im ruhenden Zustand mehr P-Selektin als cholesterindepletierte Thrombozyten. Während die P-Selektin-Expression der cholesterindepletierten Plättchen durch das Einwirken von Scherkräften deutlich gesteigert wurde, kam es bei den cholesterinbeladenen Thrombozyten zu keinem weiteren Anstieg. Dies deutet auf eine gestörte Degranulation der Thrombozyten

durch Cholesterinbeladung hin, bzw. auf eine „Aktivierung“ der Thrombozyten trotz Blockierung der klassischen Aktivierungskaskaden.

Ob die bei uns unter experimentellen Bedingungen *in vitro* beobachteten Phänomene auch die generell erhöhte Aktivität der Thrombozyten von Patienten mit Hypercholesterinämie, sowie die bei dieser Erkrankung bestehende erhöhte Anzahl von Mikropartikeln erklären kann müssen weitere Studien klären.

7. Literaturverzeichnis

1. Morgenstern, E. Morphologie der Thrombozyten. In: Müller-Berghaus, G., ed. *Hämostaseologie*. Stuttgart: Springer; 1998:5-13.
2. George, J.N. Platelets. *Lancet*. 2000;355:1531-1539
3. Hartwig, J.H. The platelet: Form and function. *Semin Hematol*. 2006;43:S94-100
4. Blair, P., Flaumenhaft, R. Platelet alpha-granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009;23:177-189
5. Massini, P., Kaser-Glanzmann, R., Luscher, E.F. Movement of calcium ions and their role in the activation of platelets. *Thromb Haemost*. 1978;40:212-218
6. White, J.G., Clawson, C.C. The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system. *Am J Pathol*. 1980;101:353-364
7. Phillips, D.R., Charo, I.F., Parise, L.V., Fitzgerald, L.A. The platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex. *Blood*. 1988;71:831-843
8. George, J.N., Pickett, E.B., Saucerman, S., McEver, R.P., Kunicki, T.J., Kieffer, N., Newman, P.J. 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;78:340-348
9. Berndt, M.C., Ward, C.M., De Luca, M., Facey, D.A., Castaldi, P.A., Harris, S.J., Andrews, R.K. The molecular mechanism of platelet adhesion. *Aust N Z J Med*. 1995;25:822-830
10. Furie, B., Furie, B.C. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: Role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemost*. 1995;74:224-227
11. Merten, M., Thiagarajan, P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation*. 2000;102:1931-1936
12. Karnis, A., Goldsmith, H.L., Mason, S.G. Axial migration of particles in Poiseuille flow. *Nature*. 1963;200:159-160
13. Goldsmith, H.L., Cokelet, G.R., Gaetgens, P. Robin Fahraeus: Evolution of his concepts in cardiovascular physiology. *Am J Physiol*. 1989;257:H1005-1015
14. Stoltz, J.F. Vascular potential and thrombosis. *Thromb Res Suppl*. 1983;5:73-82
15. Savage, B., Saldivar, E., Ruggeri, Z.M. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. 1996;84:289-297
16. Savage, B., Almus-Jacobs, F., Ruggeri, Z.M. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*. 1998;94:657-666
17. Ruggeri, Z.M. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002;8:1227-1234
18. Payrastre, B., Missy, K., Trumel, C., Bodin, S., Plantavid, M., Chap, H. The integrin alpha IIb/beta 3 in human platelet signal transduction. *Biochem Pharmacol*. 2000;60:1069-1074

19. Tangelder, G.J., Slaaf, D.W., Arts, T., Reneman, R.S. Wall shear rate in arterioles in vivo: Least estimates from platelet velocity profiles. *Am J Physiol.* 1988;254:H1059-1064
20. Holme, P.A., Orvim, U., Hamers, M.J., Solum, N.O., Brosstad, F.R., Barstad, R.M., Sakariassen, K.S. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:646-653
21. Maxwell, M.J., Westein, E., Nesbitt, W.S., Giuliano, S., Dopheide, S.M., Jackson, S.P. Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation. *Blood.* 2007;109:566-576
22. Jackson, S.P., Nesbitt, W.S., Kulkarni, S. Signaling events underlying thrombus formation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2003;1:1602-1612
23. Ruggeri, Z.M., Orje, J.N., Habermann, R., Federici, A.B., Reininger, A.J. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood.* 2006;108:1903-1910
24. Barnes, M.J., Farndale, R.W. Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol.* 1999;34:513-525
25. Barnes, M.J., Knight, C.G., Farndale, R.W. The collagen-platelet interaction. *Curr Opin Hematol.* 1998;5:314-320
26. Farndale, R.W., Sixma, J.J., Barnes, M.J., de Groot, P.G. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2004;2:561-573
27. Savage, B., Ginsberg, M.H., Ruggeri, Z.M. Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow. *Blood.* 1999;94:2704-2715
28. Clemetson, K.J., Clemetson, J.M. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost.* 2001;86:189-197
29. Nieswandt, B., Watson, S.P. Platelet-collagen interaction: Is gpvi the central receptor? *Blood.* 2003;102:449-461
30. Moroi, M., Jung, S.M. Platelet glycoprotein vi: Its structure and function. *Thromb Res.* 2004;114:221-233
31. Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967;13:269-288
32. Horstman, L.L., Ahn, Y.S. Platelet microparticles: A wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999;30:111-142
33. Joop, K., Berckmans, R.J., Nieuwland, R., Berkhout, J., Romijn, F.P., Hack, C.E., Sturk, A. Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost.* 2001;85:810-820
34. Berckmans, R.J., Nieuwland, R., Boing, A.N., Romijn, F.P., Hack, C.E., Sturk, A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost.* 2001;85:639-646
35. George, J.N., Thoi, L.L., McManus, L.M., Reimann, T.A. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood.* 1982;60:834-840
36. Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., Sixma, J.J. Activated platelets release two types of membrane vesicles: Microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood.* 1999;94:3791-3799

37. Biro, E., Akkerman, J.W., Hoek, F.J., Gorter, G., Pronk, L.M., Sturk, A., Nieuwland, R. The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: A comparison with platelet membrane fractions. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2005;3:2754-2763
38. Dean, W.L., Lee, M.J., Cummins, T.D., Schultz, D.J., Powell, D.W. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb Haemost.* 2009;102:711-718
39. Italiano, J.E., Jr., Mairuhu, A.T., Flaumenhaft, R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr Opin Hematol.* 2010;17:578-584
40. 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;88:3456-3464
41. Chow, T.W., Hellums, J.D., Thiagarajan, P. Thrombin receptor activating peptide (sflrn) potentiates shear-induced platelet microvesiculation. *J Lab Clin Med.* 2000;135:66-72
42. Reininger, A.J., Heijnen, H.F., Schumann, H., Specht, H.M., Schramm, W., Ruggeri, Z.M. Mechanism of platelet adhesion to von willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood.* 2006;107:3537-3545
43. Bode, A.P., Orton, S.M., Frye, M.J., Udis, B.J. Vesiculation of platelets during in vitro aging. *Blood.* 1991;77:887-895
44. Wiedmer, T., Shattil, S.J., Cunningham, M., Sims, P.J. Role of calcium and calpain in complement-induced vesiculation of the platelet plasma membrane and in the exposure of the platelet factor va receptor. *Biochemistry.* 1990;29:623-632
45. Shcherbina, A., Remold-O'Donnell, E. Role of caspase in a subset of human platelet activation responses. *Blood.* 1999;93:4222-4231
46. Brogan, P.A., Shah, V., Brachet, C., Harnden, A., Mant, D., Klein, N., Dillon, M.J. Endothelial and platelet microparticles in vasculitis of the young. *Arthritis Rheum.* 2004;50:927-936
47. Flaumenhaft, R. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;36:182-187
48. Rand, M.L., Wang, H., Bang, K.W., Packham, M.A., Freedman, J. Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2006;4:1621-1623
49. Flaumenhaft, R., Dilks, J.R., Richardson, J., Alden, E., Patel-Hett, S.R., Battinelli, E., Klement, G.L., Sola-Visner, M., Italiano, J.E., Jr. Megakaryocyte-derived microparticles: Direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood.* 2009;113:1112-1121
50. O'Brien, J.R. The platelet-like activity of serum. *Br J Haematol.* 1955;1:223-228
51. Piccin, A., Murphy, W.G., Smith, O.P. Circulating microparticles: Pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007;21:157-171
52. Gilbert, G.E., Sims, P.J., Wiedmer, T., Furie, B., Furie, B.C., Shattil, S.J. Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor viii. *The Journal of biological chemistry.* 1991;266:17261-17268
53. Haga, J.H., Slack, S.M., Jennings, L.K. Comparison of shear stress-induced platelet microparticle formation and phosphatidylserine expression in presence of alpha i i i b e t a 3 antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;41:363-371

54. van der Zee, P.M., Biro, E., Ko, Y., de Winter, R.J., Hack, C.E., Sturk, A., Nieuwland, R. P-selectin- and cd63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clin Chem.* 2006;52:657-664
55. Biro, E., Sturk-Maquelin, K.N., Vogel, G.M., Meuleman, D.G., Smit, M.J., Hack, C.E., Sturk, A., Nieuwland, R. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2003;1:2561-2568
56. Muller, 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 J.* 2003;17:476-478
57. Tans, G., Rosing, J., Thomassen, M.C., Heeb, M.J., Zwaal, R.F., Griffin, J.H. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. *Blood.* 1991;77:2641-2648
58. Singh, N., Gemmell, C.H., Daly, P.A., Yeo, E.L. Elevated platelet-derived microparticle levels during unstable angina. *Can J Cardiol.* 1995;11:1015-1021
59. Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J.M., Toti, F. Elevated levels of procoagulant microparticles in a patient with myocardial infarction, antiphospholipid antibodies and multifocal cardiac thrombosis. *Thromb J.* 2005;3:15
60. Lee, Y.J., Jy, W., Horstman, L.L., Janania, J., Reyes, Y., Kelley, R.E., Ahn, Y.S. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thromb Res.* 1993;72:295-304
61. Choudhury, A., Chung, I., Blann, A.D., Lip, G.Y. Elevated platelet microparticle levels in nonvalvular atrial fibrillation: Relationship to p-selectin and antithrombotic therapy. *Chest.* 2007;131:809-815
62. Murakami, T., Horigome, H., Tanaka, K., Nakata, Y., Ohkawara, K., Katayama, Y., Matsui, A. Impact of weight reduction on production of platelet-derived microparticles and fibrinolytic parameters in obesity. *Thromb Res.* 2007;119:45-53
63. Deng, X.L., Cao, J. The concentration of platelet microparticles is increased in old patients with essential hypertension complicating with coronary heart disease. *Chin Med J (Engl).* 2012;125:2602
64. Suades, R., Padro, T., Alonso, R., Mata, P., Badimon, L. Lipid-lowering therapy with statins reduces microparticle shedding from endothelium, platelets and inflammatory cells. *Thromb Haemost.* 2013;110:366-377
65. Zhang, X., McGeoch, S.C., Johnstone, A.M., Holtrop, G., Sneddon, A.A., Macrury, S.M., Megson, I.L., Pearson, D.W., Abraham, P., De Roos, B., Lobley, G.E., O'Kennedy, N. Platelet-derived microparticle count and surface molecule expression differ between subjects with and without type 2 diabetes, independently of obesity status. *J Thromb Thrombolysis.* 2013
66. 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;62:1757-1763
67. 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. *Br J Haematol.* 1997;96:458-463
68. Weiss, H.J. Scott syndrome: A disorder of platelet coagulant activity. *Semin Hematol.* 1994;31:312-319

69. Carvalho, A.C., Colman, R.W., Lees, R.S. Clofibrate reversal of platelet hypersensitivity in hyperbetalipoproteinemia. *Circulation*. 1974;50:570-574
70. Corash, L., Andersen, J., Poindexter, B.J., Schaefer, E.J. Platelet function and survival in patients with severe hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*. 1981;1:443-448
71. Shattil, S.J., Bennett, J.S., Colman, R.W., Cooper, R.A. Abnormalities of cholesterol-phospholipid composition in platelets and low-density lipoproteins of human hyperbetalipoproteinemia. *J Lab Clin Med*. 1977;89:341-353
72. Shastri, K.M., Carvalho, A.C., Lees, R.S. Platelet function and platelet lipid composition in the dyslipoproteinemias. *Journal of lipid research*. 1980;21:467-472
73. Carvalho, A.C., Colman, R.W., Lees, R.S. Platelet function in hyperlipoproteinemia. *N Engl J Med*. 1974;290:434-438
74. Shattil, S.J., Anaya-Galindo, R., Bennett, J., Colman, R.W., Cooper, R.A. Platelet hypersensitivity induced by cholesterol incorporation. *J Clin Invest*. 1975;55:636-643
75. Insel, P.A., Nirenberg, P., Turnbull, J., Shattil, S.J. Relationships between membrane cholesterol, alpha-adrenergic receptors, and platelet function. *Biochemistry*. 1978;17:5269-5274
76. Hassall, D.G., Forrest, L.A., Bruckdorfer, K.R., Marenah, C.B., Turner, P., Cortese, C., Miller, N.E., Lewis, B. Influence of plasma lipoproteins on platelet aggregation in a normal male population. *Arteriosclerosis*. 1983;3:332-338
77. Singer, S.J., Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972;175:720-731
78. Lee, A.G., Birdsall, N.J., Metcalfe, J.C., Toon, P.A., Warren, G.B. Clusters in lipid bilayers and the interpretation of thermal effects in biological membranes. *Biochemistry*. 1974;13:3699-3705
79. Pike, L.J. Rafts defined: A report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of lipid research*. 2006;47:1597-1598
80. Simons, K., van Meer, G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*. 1988;27:6197-6202
81. Brown, D.A., Rose, J.K. Sorting of gpi-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*. 1992;68:533-544
82. Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., Seed, B. Membrane compartmentation is required for efficient t cell activation. *Immunity*. 1998;8:723-732
83. Manes, S., Mira, E., Gomez-Mouton, C., Lacalle, R.A., Keller, P., Labrador, J.P., Martinez, A.C. Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. *Embo J*. 1999;18:6211-6220
84. Gkantiragas, I., Brugger, B., Stuken, E., Kaloyanova, D., Li, X.Y., Lohr, K., Lottspeich, F., Wieland, F.T., Helms, J.B. Sphingomyelin-enriched microdomains at the golgi complex. *Mol Biol Cell*. 2001;12:1819-1833
85. Dermine, J.F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R.G., Desjardins, M. Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:18507-18512
86. Lopez, J.A., del Conde, I., Shrimpton, C.N. Receptors, rafts, and microvesicles in thrombosis and inflammation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005;3:1737-1744

87. Ezumi, Y., Kodama, K., Uchiyama, T., Takayama, H. Constitutive and functional association of the platelet collagen receptor glycoprotein vi-fc receptor gamma-chain complex with membrane rafts. *Blood*. 2002;99:3250-3255
88. Wonerow, P., Obergfell, A., Wilde, J.I., Bobe, R., Asazuma, N., Brdicka, T., Leo, A., Schraven, B., Horejsi, V., Shattil, S.J., Watson, S.P. Differential role of glycolipid-enriched membrane domains in glycoprotein vi- and integrin-mediated phospholipase cgamma2 regulation in platelets. *Biochem J*. 2002;364:755-765
89. Locke, D., Chen, H., Liu, Y., Liu, C., Kahn, M.L. Lipid rafts orchestrate signaling by the platelet receptor glycoprotein vi. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:18801-18809
90. van Lier, M., Verhoef, S., Cauwenberghs, S., Heemskerck, J.W., Akkerman, J.W., Heijnen, H.F. Role of membrane cholesterol in platelet calcium signalling in response to vwf and collagen under stasis and flow. *Thromb Haemost*. 2008;99:1068-1078
91. Grgurevich, S., Krishnan, R., White, M.M., Jennings, L.K. Role of in vitro cholesterol depletion in mediating human platelet aggregation. *J Thromb Haemost*. 2003;1:576-586
92. Heijnen, H.F., Van Lier, M., Waaijenborg, S., Ohno-Iwashita, Y., Waheed, A.A., Inomata, M., Gorter, G., Mobius, W., Akkerman, J.W., Slot, J.W. Concentration of rafts in platelet filopodia correlates with recruitment of c-src and cd63 to these domains. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003;1:1161-1173
93. Shrimpton, C.N., Borthakur, G., Larrucea, S., Cruz, M.A., Dong, J.F., Lopez, J.A. Localization of the adhesion receptor glycoprotein ib-ix-v complex to lipid rafts is required for platelet adhesion and activation. *J Exp Med*. 2002;196:1057-1066
94. van Lier, M., Lee, F., Farndale, R.W., Gorter, G., Verhoef, S., Ohno-Iwashita, Y., Akkerman, J.W., Heijnen, H.F. Adhesive surface determines raft composition in platelets adhered under flow. *J Thromb Haemost*. 2005;3:2514-2525
95. Simons, K., Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997;387:569-572
96. Bodin, S., Tronchere, H., Payrastre, B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1610:247-257
97. Christian, A.E., Haynes, M.P., Phillips, M.C., Rothblat, G.H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of lipid research*. 1997;38:2264-2272
98. Pitha, J., Irie, T., Sklar, P.B., Nye, J.S. Drug solubilizers to aid pharmacologists: Amorphous cyclodextrin derivatives. *Life sciences*. 1988;43:493-502
99. Kilsdonk, E.P., Yancey, P.G., Stoudt, G.W., Bangerter, F.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C., Rothblat, G.H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270:17250-17256
100. Waheed, A.A., Shimada, Y., Heijnen, H.F., Nakamura, M., Inomata, M., Hayashi, M., Iwashita, S., Slot, J.W., Ohno-Iwashita, Y. Selective binding of perfringolysin o derivative to cholesterol-rich membrane microdomains

- (rafts). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001;98:4926-4931
101. Usami, S., Chen, H.H., Zhao, Y., Chien, S., Skalak, R. Design and construction of a linear shear stress flow chamber. *Ann Biomed Eng.* 1993;21:77-83
 102. Schumann, H. Entstehung von mikropartikeln und tethern aus thrombozyten - identifizierung eines neuen biophysikalischen mechanismus München: LMU München; 2012.
 103. Penz, S. Aktivierung von thrombozyten durch humane artherosklerotische plaques: Mechanismen und inhibition. München: LMU München; 2008.
 104. Curtis, A.S. The mechanism of adhesion of cells to glass. A study by interference reflection microscopy. *The Journal of cell biology.* 1964;20:199-215
 105. Kloboucek, A., Behrisch, A., Faix, J., Sackmann, E. Adhesion-induced receptor segregation and adhesion plaque formation: A model membrane study. *Biophysical journal.* 1999;77:2311-2328
 106. Henckel, T., Hrsg: Bruhn, HD; Schambeck, CM; Hach-Wunderle, V. *Hämostaseologie für die praxis.* Stuttgart: Schattauer; 2007.
 107. Byfield, F.J., Aranda-Espinoza, H., Romanenko, V.G., Rothblat, G.H., Levitan, I. Cholesterol depletion increases membrane stiffness of aortic endothelial cells. *Biophysical journal.* 2004;87:3336-3343
 108. Dopheide, S.M., Maxwell, M.J., Jackson, S.P. Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von willebrand factor. *Blood.* 2002;99:159-167
 109. Sun, M., Northup, N., Marga, F., Huber, T., Byfield, F.J., Levitan, I., Forgacs, G. The effect of cellular cholesterol on membrane-cytoskeleton adhesion. *J Cell Sci.* 2007;120:2223-2231
 110. Oh, H., Mohler, E.R., 3rd, Tian, A., Baumgart, T., Diamond, S.L. Membrane cholesterol is a biomechanical regulator of neutrophil adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1290-1297
 111. Salaun, C., James, D.J., Chamberlain, L.H. Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic.* 2004;5:255-264

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CRD	choesterinreiche Domäne (<i>cholesterol rich domain</i>)
DIG	Detergentien-unlösliche Glycosphingolipid-angericherte Domäne (<i>detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched domain</i>)
DRM	Detergeniten-reiste Membran (<i>detergent-resistant membrane</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	Englisch
ETP	endogenes Thrombinpotential
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward light scatter</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GP	Glykoprotein
HbSS	Hepesgepufferte Natriumchlorid 0,9% Lösung (<i>Hepes buffered saline solution</i>)
IgG	Immunglobulin G
LAMP-1	Lysosmen-assoziiertes Membranprotein 1 (<i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>)
MbCD	Methyl-beta-Cyclodextrin
MFI	durchschnittliche Fluoreszenzintensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MKMP	von Megakaryozyten stammende Mikropartikel (<i>megakaryocyte-derived microparticle</i>)
MP	Mikropartikel
NC	Natriumcitrat
PGE ₁	Prostaglandin E ₁
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
RICM	Reflexions Interferenz Kontrast Mikroskopie

PMP	von Plättchen stammende Mikropartikel (<i>platelet-derived microparticle</i>)
PPACK	D-Phenylalanyl-L-Propyl-L-Arginine Chloromethylketon
PRP	plättchenreiches Plasma (<i>platelet rich plasma</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SR	Scherrate
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
TDT	Thrombingenerierungs-Test (<i>Thrombin Dynamics Test</i>)
TxA ₂	Thromboxan A ₂
VWF	von Willebrand Faktor
VWfA1	rekombinante dimere A-1 Domäne des VWF (<i>VWf dimeric A-1</i>)

8.2 Einheiten

µg	Mikrogramm
°	Grad
°C	Grad Celsius
g	Erdschwerebeschleunigung
g	Gramm
M	molar (= mol/l)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
µM	Mikromolar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
min	Minute
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
s ⁻¹	inverse Sekunden

9. Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Armin J. Reiningger für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas bedanken, sowie für die Betreuung während der Durchführung der Experimente und der Erstellung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Ph.D. M.D. Zaverio M. Ruggeri, der meine Arbeit sowohl mit relevanten Vorarbeiten als auch mit der Zurverfügungstellung des rekombinanten VWF unterstützt hat.

Zudem danke ich auch Dott. Mario Mazzucato in dessen Labor im Centro di Riferimento Oncologico di Aviano ich einige weiterführende Experimente nach Abschluss meiner Arbeit durchführen konnte.

Ich möchte auch allen Blutspendern danken, ohne deren bereitwilligen Einsatz die Versuchsdurchführung nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders danke ich meiner Mutter und Moritz für die große, andauernde Unterstützung in jeglicher Hinsicht.