

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Christian Weber



**Vergleich bekannter und Entwicklung neuer
therapeutischer Ansätze zur Hemmung der
Interaktion von thrombozytärem Glykoprotein VI mit
atherosklerotischem Plaque**

Dissertation

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

vorgelegt von

Janina Maria Jamasbi

aus München

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Alexander Faußner

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil.
Bernhard F. Becker

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

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2017

Eidesstattliche Versicherung

Jamasbi, Janina Maria

Name, Vornamen

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

**Vergleich bekannter und Entwicklung neuer therapeutischer
Ansätze zur Hemmung der Interaktion von thrombozytärem
Glykoprotein VI mit atherosklerotischem Plaque**

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.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	3
2.1	<i>Thrombozytenfunktion</i>	3
2.2	<i>Arterielle Thrombose</i>	3
2.3	<i>Atherothrombose nach Ruptur oder Erosion atherosklerotischer Plaques</i>	6
2.3.1	Entstehung atherosklerotischer Plaques.....	6
2.3.2	Plaque-Ruptur und -Erosion	6
2.3.3	Atherothrombose	8
2.4	<i>Derzeit verwendete antithrombozytäre Substanzen</i>	9
2.5	<i>GPVI – Der wesentliche Kollagen-Rezeptor in der Atherothrombose</i>	11
2.5.1	GPVI-Struktur und GPVI-Expression	11
2.5.2	GPVI-Signaltransduktion	14
2.5.3	GPVI-Defekte und GPVI-Depletion	14
2.5.4	GPVI als neuer antithrombotischer Angriffspunkt.....	15
3	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	21
4	Materialien und Methoden	23
4.1	<i>Materialien</i>	23
4.1.1	Antikörper, Hemmsubstanzen, Peptide und Chemikalien	23
4.1.2	Puffer und Lösungen	26
4.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	26
4.1.4	Geräte und Software.....	27
4.2	<i>Methoden</i>	29
4.2.1	Blutentnahmen	29
4.2.2	Herstellung der atherosklerotischen Plaquehomogenate	29
4.2.3	Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen	29
4.2.4	Thrombozytenaggregation unter arteriellen Flussbedingungen.....	31
4.2.5	Analyse der GPVI-Fc- und Thrombozytenbindung an Plaque und Kollagen durch hochauflösende bildgebende Verfahren	35
4.2.6	Analytische Ultrazentrifugation zur Charakterisierung von GPVI-Fc-Komplexen.....	38

4.2.7	Bestimmung der <i>in vitro</i> Verschlusszeit mit dem „platelet function analyzer“ PFA-200.....	39
4.2.8	Statistik.....	39
5	Ergebnisse	41
5.1	<i>Wirkung von GPVI-Fc und GPVI-Antikörpern auf die Plaque- und Kollagen- induzierte Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen</i>	<i>41</i>
5.1.1	Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Thrombozyten- aggregation durch GPVI-Fc.....	41
5.1.2	Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Thrombozyten- aggregation durch GPVI-Antikörper	44
5.1.3	Hemmung von dimerem thrombozytären GPVI mit m-Fab-F	46
5.2	<i>Wirkung von GPVI-Fc und GPVI-Antikörpern auf die Plaque- und Kollagen- induzierte Thrombozytenaggregation unter arteriellen Strömungsbedingungen.....</i>	<i>47</i>
5.2.1	Validierung der Methode.....	47
5.2.2	Einfluss von GPVI-Fc, BLO8-1 und 5C4 auf die Thrombozytenadhäsion und - aggregation an humanes atherosklerotisches Plaque unter arteriellen Strömungsbedingungen	52
5.3	<i>Entschlüsselung des Mechanismus der scherabhängigen Hemmung der Plaque- induzierten Thrombozytenaggregation durch GPVI-Fc</i>	<i>56</i>
5.3.1	GPVI-Fc-Bindung und Thrombozytenaggregatbildung an Plaque bei niedriger und hoher Scherrate	56
5.3.2	Echtzeitmessung der Thrombozytenadhäsion/-aggregation und der GPVI- Fc-Bindung an Plaque und Kollagen durch DIC- und Fluoreszenz- Videomikroskopie bei maximaler Vergrößerung	57
5.3.3	3-dimensionale Darstellung der Thrombozytenaggregation mit Zwei- Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie unter Strömungsbedingungen	60
5.3.4	Hochauflösende Darstellung der Interaktionsstellen von GPVI-Fc und Thrombozyten mit Plaquematerial und Kollagen mittels SIM.....	61
5.3.5	Aufklärung des Mechanismus der Scherabhängigkeit der GPVI-Fc-Wirkung	63
5.4	<i>Verbesserung der inhibitorischen Effizienz von GPVI-Fc durch anti-Fc-Antikörper- vermittelte Quervernetzung von GPVI-Fc</i>	<i>66</i>
5.4.1	Herstellung von quervernetzten GPVI-Fc-Komplexen.....	66

5.4.2	Hemmung der statischen Thrombozytenaggregation durch quervernetztes GPVI-Fc.....	67
5.4.3	Hemmung der durch Plaque und Kollagen induzierten Thrombozytenaggregation durch quervernetztes GPVI-Fc unter Strömungsbedingungen	68
5.4.4	Analyse der quervernetzten und unvernetzten GPVI-Fc-Komplexe mittels analytischer Ultrazentrifugation	73
5.4.5	Analyse der Bindung von Thrombozyten und GPVI-Fc-Komplexen mittels hochauflösender mikroskopischer Verfahren	75
5.4.6	Bestätigung des Mechanismus der Quervernetzung.....	78
5.4.7	Auswirkung von quervernetztem GPVI-Fc auf die Blutungszeit	80
6	Diskussion	82
6.1	<i>Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation.....</i>	<i>82</i>
6.2	<i>Vergleich der antithrombotischen Wirkung von GPVI-Antikörpern und GPVI-Fc.....</i>	<i>83</i>
6.3	<i>Scherabhängigkeit der GPVI-Fc-Wirkung</i>	<i>85</i>
6.4	<i>Klinische Relevanz der scherabhängigen Wirkung von GPVI-Fc im Vergleich zur Hemmung durch GPVI-Antikörper</i>	<i>86</i>
6.5	<i>Erhöhung der antithrombotischen Effizienz von GPVI-Fc durch Antikörpervermittelte Quervernetzung.....</i>	<i>87</i>
7	Klinische Relevanz	90
7.1	<i>Entwurf von klinischen Studien mit GPVI-Fc und GPVI-Antikörpern</i>	<i>90</i>
7.2	<i>Weiterentwicklung quervernetzter GPVI-Fc-Komplexe für einen möglichen klinischen Gebrauch</i>	<i>91</i>
8	Zusammenfassung	92
9	Summary	95
10	Literaturverzeichnis.....	97
11	Appendix	i
11.1	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>i</i>
11.2	<i>Videoverzeichnis</i>	<i>v</i>
12	Danksagung	viii

1 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Anti-human-Fc IgG	gegen den Fc-Teil von humanem IgG gerichtete IgG Antikörper
Anti-human-Fc Fab2	gegen den Fc-Teil von humanem IgG gerichtete Fab2 Antikörper
AA	„amino acid“, Aminosäure
ASS	Acetylsalicylsäure, Aspirin®
AUZ	analytische Ultrazentrifugation
CRP	„collagen-related peptide“
COX	Cyclooxygenase
DAPT	„Dual anti-platelet therapy“, duale antithrombozytäre Therapie
DIC-Mikroskopie	“differential interference contrast microscopy“, differentielle Interferenzkontrast-Mikroskopie
Fab2	F(ab) ₂ -Fragment
Fc	“fragment crystallizable“, Fc-Teil eines Antikörpers
Fc*IgG	mit anti-human-Fc IgG Antikörpern markiertes Fc-Kontrollprotein (unvernetzt)
Fc*IgG-XL	mit anti-human-Fc IgG Antikörpern quervernetztes Fc-Kontrollprotein
Fc*Fab2	mit anti-human-Fc Fab2 Antikörpern markiertes Fc-Kontrollprotein (unvernetzt)
Fc*Fab2-XL	mit anti-human-Fc Fab2 Antikörpern quervernetztes Fc-Kontrollprotein
FcR γ	Fc-Rezeptor gamma Kette
GP	Glykoprotein
GPO	Glycin-Prolin-Hydroxyprolin
GPVI	Glykoprotein VI
GPVI-Fc	rekombinantes dimeres Glykoprotein VI-Fc Fusionsprotein
GPVI-Fc*IgG	mit anti-human-Fc IgG Antikörpern markiertes GPVI-Fc (unvernetzt)
GPVI-Fc*IgG-XL	mit anti-human-Fc IgG Antikörpern quervernetztes GPVI-Fc

Abkürzungsverzeichnis

GPVI-Fc*Fab2	mit anti-human-Fc Fab2 Antikörpern markiertes GPVI-Fc (unvernetzt)
GPVI-Fc*Fab2-XL	mit anti-human-Fc Fab2 Antikörpern quervernetztes GPVI-Fc
GPVI-Fc*Fab	mit anti-human-Fc Fab Antikörpern gesättigtes GPVI-Fc (unvernetzt)
GPIb	Glykoprotein Ib
HSA	Humanes Serumalbumin
IgG	Immunglobulin G
ITAM	„immunoreceptor tyrosine-based activation motif“, Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes aktivierendes Motiv
LDL	“low density lipoprotein“, Lipoprotein niedriger Dichte
MEA	“multiple electrode aggregometry“, Impedanzaggregometrie
min	Minuten
MW	Mittelwert
NA	numerische Apertur
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	„percutaneous coronary intervention“, Perkutane koronare Intervention
RT	Raumtemperatur
SD	„standard deviation“, Standardabweichung
s bzw. sek	Sekunden
SIM	„structured illumination microscopy“, Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung
STED-Mikroskopie	„stimulated emission depletion“-Mikroskopie
TPLSM	“two-photon laser scanning microscopy“, Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie
TRAP	Thrombin-Rezeptor aktivierendes Peptid
TxA ₂	Thromboxan A ₂
vWF	von Willebrand Faktor

2 Einleitung

2.1 Thrombozytenfunktion

Thrombozyten sind die kleinsten (2-4 μm) Zellen im Blutkreislauf, deren Hauptfunktion darin besteht, die vaskuläre Integrität aufrecht zu erhalten und nach Gefäßwanddefekten den Blutaustritt in umliegendes Gewebe zu verhindern. Im gesunden Gefäßsystem zirkulieren Thrombozyten in inaktivem Zustand, ohne miteinander, mit anderen Zellen oder mit dem intakten Gefäßendothel zu interagieren. Kommt es jedoch zu einer Arterienverletzung, bei der die schützende Endothelschicht durchbrochen wird, werden die Thrombozyten durch Komponenten der extrazellulären Matrix aktiviert und es bildet sich ein Thrombus, der den Gefäßwanddefekt verschließt (Arterielle Thrombose). Dagegen kommt es nach Ruptur oder Erosion atherosklerotisch veränderter Arterien zu einer intraluminalen Thrombusbildung, was als Atherothrombose bezeichnet wird und fatale Folgen wie Myokardinfarkt oder ischämischen Schlaganfall haben kann.¹

2.2 Arterielle Thrombose

Nach der Verletzung einer gesunden Arterie ist die Ausbildung eines thrombozyten- und fibrinreichen Thrombus für den Verschluss des Gefäßwanddefektes essentiell, um massiven Blutverlust zu verhindern. Die Thrombusbildung setzt sich zusammen aus der Thrombozytenadhäsion an die geschädigte Gefäßwand, der anschließenden Thrombozytenaggregation und der Fibrinbildung, die den Thrombozytenpfropfen stabilisiert². Der erste Schritt der Thrombozytenverlangsamung und Adhäsion an die extrazelluläre Matrix der verletzten Arterie ist abhängig von der Wechselwirkung des von Willebrand Faktors (vWF) mit dem thrombozytären Glykoprotein (GP) Ib-V-IX-Komplex. Dieser Vorgang spielt insbesondere bei hohen Scherbedingungen, wie sie in Arteriolen oder stenosierten Arterien vorkommen, eine wichtige Rolle^{3,4}. Plasma vWF erfährt eine scherinduzierte Konformationsänderung, die ihm die Bindung an subendotheliales Kollagen ermöglicht⁵. Die Wechselwirkung von thrombozytärem GPIb und kollagengebundenem vWF ist durch eine schnelle "on- und off- Rate" charakterisiert, wodurch es nur zu einer transienten, aber keiner festen Thrombozytenbindung kommt. Diese transiente Interaktion ermöglicht eine stabile Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen durch die zwei thrombozytären Kollagenrezeptoren Glykoprotein VI (GPVI) und Integrin $\alpha_2\beta_1$ ^{3,4}. Während das Integrin $\alpha_2\beta_1$ vor allem die Thrombozytenadhäsion an Kollagen vermittelt, ist GPVI als signalweiterleitender Rezeptor von entscheidender Bedeutung für die Thrombozytenaktivierung durch Kollagen^{4,6}. Die Stimulation von thrombozytärem GPVI führt zur Aktivierung von Integrinen, zur Freisetzung der positiven "feedback"-Mediatoren Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan A_2 (Tx A_2),

zum Gestaltwandel (“shape change”) der Thrombozyten und zur Transformation der Zelloberfläche in einen pro-koagulatorischen Zustand⁷. Durch “inside-out-signalling” erfahren die Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$ eine Konformationsänderung von einem niedrig affinen Zustand zu einem Zustand hoher Affinität, was eine Ligandenbindung ermöglicht. Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist verantwortlich für die Thrombozytenaggregation, indem es Fibrinogen, das als Brückenmolekül zwischen den einzelnen Thrombozyten dient, bindet⁸. Als positive “feedback”-Mediatoren verstärken freigesetztes ADP und TxA_2 die Thrombozytenaktivierung durch Kollagen und aktivieren zirkulierende Thrombozyten, wodurch diese in den wachsenden Thrombus rekrutiert werden. ADP wird aus den dichten Granula der Thrombozyten freigesetzt und stimuliert die Thrombozytenaggregation über die thrombozytären G-Protein-gekoppelten Rezeptoren $P2Y_1$ und $P2Y_{12}$. TxA_2 wird aus Arachidonsäure durch Umwandlung durch die Cyclooxygenase-1 und Thromboxan-Synthase gebildet und aktiviert die Prostaglandin-Rezeptoren TP_α und TP_β auf der Thrombozytenoberfläche. Die Stimulation dieser G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führt zu einer intrazellulären Signalweiterleitung und einer Verstärkung der Thrombozytenaggregation und Sekretion^{9,10}. Der Ablauf der Thrombozytenadhäsion und -aggregation ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Neben der Kollagen-stimulierten Thrombozytenaktivierung und -aggregation, induziert Tissue Faktor, der an Stellen der vaskulären Verletzung exponiert wird, die Bildung von Thrombin, das die Protease-aktivierten Rezeptoren 1 und 4 auf der Thrombozytenoberfläche stimuliert und somit die Thrombozytenaktivierung verstärkt. Zudem transformiert Thrombin Fibrinogen in Fibrin, das durch Netzbildung die gebildeten Aggregate stabilisiert und sie am Ort der Gefäßverletzung verankert².

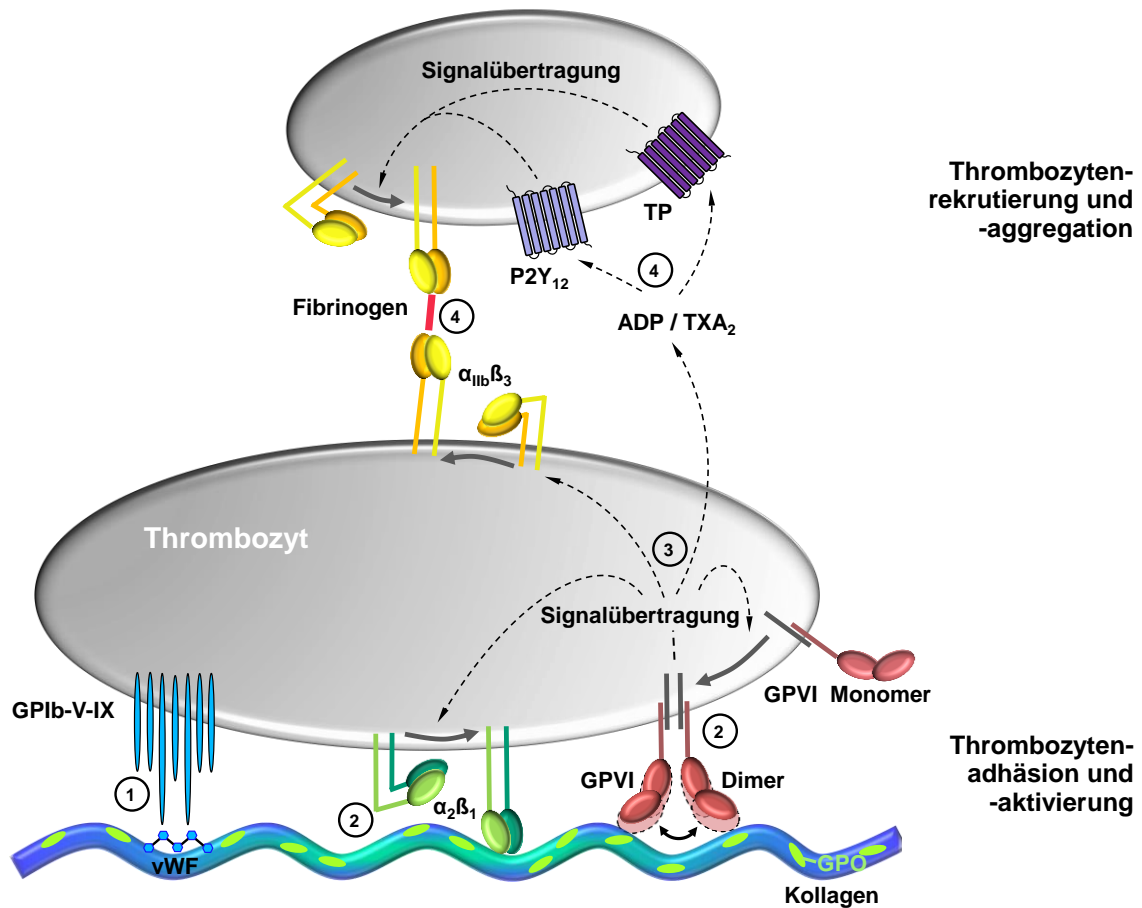


Abbildung 1: Mechanismus der Thrombozytenadhäsion und -aggregation an Kollagen nach Arterienverletzung

1. Thrombozyten werden durch die transiente Bindung von GPIb an immobilisiertem vWF auf Kollagen abgebremst. 2. Stabile Adhäsion der Thrombozyten durch Bindung von Integrin $\alpha_2\beta_1$ und GPIV an Kollagen. Während der Thrombozytenaktivierung werden GPIV-Dimere aus Monomeren gebildet. 3. GPIV-abhängige Signalübertragung führt zur Thrombozytenaktivierung. Dadurch kommt es zum „inside-out-signalling“ der thrombozytären Integrin-Rezeptoren ($\alpha_{11b}\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$), deren Transformation in einen hoch affinen Zustand für ihre Liganden und zur Freisetzung von sekundären Agonisten (vor allem ADP und TxA₂). 4. Thrombozytenaggregation vermittelt durch die Bindung von Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ an Fibrinogen. ADP und TxA₂ verstärken die anfängliche Thrombozytenaktivierung durch Kollagen durch Stimulation der P2Y₁₂- und TP-Rezeptoren, wodurch ruhende Thrombozyten aktiviert und in einen wachsenden Thrombus rekrutiert werden. GPO = Glycin-Prolin-Hydroxyprolin; GPIV = Glykoprotein VI; ADP = Adenosindiphosphat; TxA₂ = Thromboxan A₂

2.3 Atherothrombose nach Ruptur oder Erosion atherosklerotischer Plaques

2.3.1 Entstehung atherosklerotischer Plaques

Atherosklerotische Plaques werden in der Intima gebildet. Diese ist in gesunden Arterien eine dünne, hauptsächlich aus extrazellulärer Matrix bestehende, innere Gefäßwandschicht. In atherosklerotisch veränderten Gefäßen ist die Intima jedoch aufgrund über jahre- bzw. jahrzehntelanger kontinuierlicher entzündlicher, thrombotischer und fibrotischer Prozesse drastisch verdickt. Endotheliale Dysfunktion und subendotheliale Anhäufung von „low density lipoprotein“ (LDL) an arteriellen Prädilektionsstellen führen zur Einwanderung von zirkulierenden Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten in die Intima. Auch glatte Muskelzellen bewegen sich von der Media in die Intima und verwandeln dabei ihren kontraktilen in einen Kollagen-synthetisierenden Phänotyp. Kollagenfasern zeigen während der Plaqueentwicklung einen verstärkten Umsatz, da sowohl die Kollagensynthese als auch der Kollagenabbau erhöht ist. In fortgeschrittenen Plaques sind Lipide, Schaumzellen, nekrotische Zelltrümmer und extrazelluläre Matrix angereichert.^{11,12} Atherosklerotische Läsionen entwickeln sich vor allem an arteriellen Verzweigungspunkten, äußeren Bereichen von Gefäßverzweigungen und an inneren Bereichen von Gefäßkrümmungen. An diesen Prädilektionsstellen der arteriellen Gefäße ist das Endothel niedrigen Scherraten und gestörten Strömungsverhältnissen ausgesetzt, was zu seiner Dysfunktion führt¹¹.

2.3.2 Plaque-Ruptur und -Erosion

In frühen Stadien der Atherosklerose sind die Läsionen im Wesentlichen stabil und asymptomatisch. Nach Läsionsprogression jedoch können stabile koronare Plaques aufgrund konstriktiven fibrotischen Wachstums obstruktiv werden und stabile Angina Pectoris hervorrufen. Instabile Plaques können rupturieren, was zu akutem Koronarsyndrom oder Myokardinfarkt führen kann¹³.

Sowohl eine Plaque-Ruptur als auch die Erosion der Endothelschicht über dem Plaque führen durch die Freisetzung zahlreicher prothrombogener Substanzen zu einer Atherothrombose, wobei das Ausmaß und der Schweregrad der Folgen unterschiedlich sein können. Nicht alle Plaque-Rupturen und -Erosionen verursachen ein akutes Koronarsyndrom oder einen Schlaganfall, viele dieser Ereignisse sind asymptomatisch, führen jedoch zu einer Progression der atherosklerotischen Läsionen und zur Gefäßverengung¹¹.

Post mortem Studien an Patienten, die nach kardiovaskulären Ereignissen verstorbenen sind, zeigten, dass rupturierte Plaques sich von erodierten Plaques morphologisch unterscheiden^{11,13}.

Rupturgefährdete vulnerable Plaques haben einen großen, lipidreichen nekrotischen Kern, der von einer dünnen fibrösen Kappe bedeckt ist (<65 µm, Läsionen werden auch als "thin-cap fibroatheroma" bezeichnet). Die fibröse Kappe ist in der Regel mit Makrophagen infiltriert und es fehlt an glatten Muskelzellen^{11,13,14}. Dies führt zu einer Verringerung der Kollagen-Synthese (hauptsächlich Kollagen Typ I und III) durch glatte Muskelzellen und einem vermehrten Kollagenabbau durch Matrix-Metalloproteinasen, die von Makrophagen und Schaumzellen stammen, und darausfolgend zu einer Verdünnung der fibrösen Kappe^{11,15,16}. Neovaskularisation und Blutungen innerhalb des Plaques erhöhen zudem die Vulnerabilität der Läsion^{11,13,14}.

Wenn die fibröse Kappe eines „thin-cap fibroatheroma“ reißt (Plaque-Ruptur), wird der thrombogene lipidreiche Plaquekern sowie die subendotheliale Matrix dem fließenden Blut exponiert, was die Thrombusbildung auslöst^{11,13,14}. Es gibt zwei Prädilektionsstellen für eine Ruptur innerhalb exzentrischer Plaques: Die entzündete Plaqueschulter, an welcher der endotheliale Scherstress niedrig ist und in der Makrophagen akkumulieren, und die Stelle, an der die Stenose am stärksten ausgeprägt ist und wo der endotheliale Scherstress am höchsten ist. Bei Ruptur der letzteren wurde ein Zusammenhang mit körperlicher Anstrengung nachgewiesen^{17,18}.

Als Plaque-Erosion wird das Fehlen des Endothels über dem Plaque bezeichnet, wobei ein nach Erosion gebildeter Thrombus in direktem Kontakt mit der Intima steht^{11,13,14}. Plaques, die erodieren, unterscheiden sich morphologisch von solchen, die rupturieren. Dabei ist es schwierig, erosionsgefährdete Plaques von stabilen Läsionen zu unterscheiden, da die Intima dieser Plaques meistens reich an glatten Muskelzellen und Proteoglykanen und arm an Lipiden ist^{13,14,19}. Darüber hinaus neigen erodierte Plaques dazu, exzentrisch im Gefäß zu liegen und weniger entzündet zu sein als rupturierte Plaques^{14,19}. Es wurde gezeigt, dass Hyaluronan und das Proteoglykan Versican an der Plaque/Thrombus-Berührungsstelle bei erodierten Plaques akkumuliert vorkommen¹⁹. Diese Hyaluronan-Versican-Matrix könnte die Thrombusbildung nach Plaque-Erosion fördern¹⁹, wobei die Dermatansulfat-Seitenkette des Versicans die Thrombozytenadhäsion zu stimulieren scheint²⁰. Zusätzlich wirkt Versican synergistisch mit Kollagen bei der Stimulierung der Thrombozytenaggregation^{19,20}.

In einer Metaanalyse waren Plaque-Rupturen die Hauptursache für koronare Thrombosen mit mehr als 70% aller untersuchten Fälle. Zudem scheint es geschlechtsspezifische Unterschiede zu geben, da Plaque-Rupturen bei Männern häufiger auftraten als bei Frauen (76% vs. 55%)¹³. Patienten, bei denen Plaque-Erosionen auftreten, sind häufig jünger als solche mit Plaque-Rupturen. So wurden bei Frauen unter 50 Jahren mehr als 80% der Thromben durch Plaque-Erosion verursacht²¹. Die Embolisations-Rate ist

im Falle einer Erosion höher als nach Plaque-Ruptur (74% vs. 40%²¹). Darüber hinaus wird Plaque-Erosion mit dem Auftreten von koronaren Vasospasmen assoziiert²¹ und auch mit Rauchen, vor allem bei prämenopausalen Frauen, aber nicht bei Männern¹³.

2.3.3 Atherothrombose

Plaque-Ruptur und -Erosion führen zur Bildung eines luminalen Thrombus (Atherothrombose). Nach der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques werden Plaquebestandteile dem Blutstrom ausgesetzt, wobei fibrilläres Kollagen Typ I und III^{22, 23} und Plaque Tissue Faktor die thrombogensten Plaquekomponenten darstellen²⁴. Desweiteren enthalten Plaques verschiedene andere Thrombozyten-adhäsive oder Thrombozyten-aktivierende Proteine und Lipide wie vWF, Laminin, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin, Fibrinogen, Fibrin, Lysophosphatidsäure und oxidiertes LDL²⁵⁻²⁷, die mit dem Blut in Kontakt kommen und die Thrombozytenadhäsion und -aktivierung stimulieren können. Der Beitrag der einzelnen Plaquekomponenten zur thrombotischen Reaktion nach Plaque-Ruptur wird jedoch kontrovers diskutiert^{1,22}. Kollagen und Tissue Faktor sind in atherosklerotischen Läsionen angereichert^{22,28}, wobei sich die Struktur der Kollagene vom Typ I und Typ III innerhalb der Läsion durch Metalloproteinase-abhängige Degradierung verändert, was möglicherweise für die erhöhte Fähigkeit des Plaques, die Thrombusbildung zu stimulieren (Plaquethrombogenität), mitverantwortlich ist^{22,23}. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Matrix-Metalloproteinase-2, ein Kollagen abbauendes Enzym, die Thrombozytenablagerung auf Kollagen unter Strömungsbedingungen erhöht und dass die in humanen Karotis-Plaques vorhandene Matrix-Metalloproteinase-2 die Thrombozytenaktivierung fördert^{29,30}. Daher ist es nicht überraschend, dass, verglichen mit normalen, nicht atherosklerotisch veränderten Arterien, die Thrombozytenablagerung auf humanen atherosklerotischen Koronararterien drastisch erhöht ist²², und dass in Mäusen die thrombotische Reaktion auf eine Verletzung atherosklerotischer Karotiden viel höher ist als auf eine Verletzung gesunder Karotiden³¹.

Es wurde gezeigt, dass die Thrombusbildung, induziert durch humane atherosklerotische Plaques, hauptsächlich in zwei aufeinanderfolgenden Schritten verläuft: Der ersten, sehr schnellen Phase der GPVI-vermittelten Thrombozytenadhäsion und -aggregation an Plaque-Kollagen folgt eine zweite, langsamere Phase, in welcher der Plaque Tissue Faktor die Blutgerinnung mit Thrombin- und Fibrinbildung induziert²⁴. Da frühere Studien gezeigt haben, dass die erste schnelle Phase der Plaque-induzierten Thrombusbildung durch GPVI-Blockade gehemmt werden konnte, jedoch nicht durch Hemmung des Tissue Faktors im Plaque²⁴, liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf dem ersten Schritt der GPVI-vermittelten, Plaque-Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation und deren Hemmung.

Im Gegensatz zu Studien mit isolierten Kollagenfasern unter Strömungsbedingungen, bei denen nachgewiesen wurde, dass das Integrin $\alpha_2\beta_1$ die Thrombozytenadhäsion an Kollagen vermittelt und synergistisch mit GPVI die Thrombozytenaggregatbildung auf Kollagenfasern bewirkt³²⁻³⁴, war das Integrin $\alpha_2\beta_1$ nicht an der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation beteiligt. Die Aggregation an Plaque war ausschließlich von GPVI abhängig^{23,35}.

Während also arterielle Thrombosen in nicht-atherosklerotischen Gefäßen wahrscheinlich von beiden thrombozytären Kollagen-Rezeptoren, GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$, abhängen, ist bei der Atherothrombose nach Plaqueverletzung GPVI der alleinige, die Thrombozytenaggregation auslösende Kollagen-Rezeptor²⁴.

2.4 Derzeit verwendete antithrombozytäre Substanzen

Atherothrombose kann zu einer Okklusion von Blutgefäßen entweder am Ort der Gefäßverletzung oder nach Embolisierung durch den gebildeten Thrombus stromabwärts im Blutkreislauf führen. Somit kann eine Atherothrombose einen Myokardinfarkt oder einen ischämischen Schlaganfall hervorrufen^{3,10}. Für die Sekundärprävention von Thrombosen bei kardio- und zerebrovaskulären Erkrankungen sind deshalb thrombozytenhemmende Arzneimittel unverzichtbar. Einige der derzeit verwendeten Thrombozytenaggregationshemmstoffe und deren Wirkmechanismen sind im Folgenden kurz aufgeführt:

Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin[®]) ist die am längsten verwendete antithrombozytäre Substanz und ein irreversibler Hemmstoff der Cyclooxygenase (COX), der durch die Acetylierung der COX die Prostaglandinbildung blockiert. Niedrig dosierte ASS hemmt selektiv die COX-1 und TxA₂-Bildung in Thrombozyten für deren gesamte Lebensdauer, da Thrombozyten als kernlose Zellen nicht in der Lage sind, neue COX zu synthetisieren^{36,37}. Durch die Hemmung der TxA₂-Produktion wird die Verstärkung der Thrombozytenaktivierung reduziert. Niedrig dosierte ASS wird als Standardtherapie zur Sekundärprävention von Atherothrombose nach Myokardinfarkt angewendet³⁸.

Überraschenderweise wurde gezeigt, dass ASS die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation unter arteriellen Strömungsbedingungen bei einer Scherrate von 1500/s nicht beeinflusste, was im Gegensatz zu Ergebnissen in gerührtem Blut stand, bei denen ASS die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation inhibierte³⁹.

Neben ASS sind P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten die weitverbreitetsten Thrombozytenaggregationshemmer. P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten reduzieren die Thrombozytenaggregation durch die Blockade des thrombozytären ADP-Rezeptors P2Y₁₂, wodurch die Verstärkung der Thrombozytenaktivierung beeinträchtigt wird. Die in dieser Dissertation verwendeten Substanzen Ticagrelor und Cangrelor sind direkte und reversible P2Y₁₂-

Rezeptor Hemmstoffe^{36,37,40}, wohingegen Clopidogrel, Ticlopidine, und Prasugrel zuerst in der Leber in ihre aktiven Metaboliten umgewandelt werden müssen, bevor sie den P2Y₁₂-Rezeptor irreversibel blockieren^{36,37,40}.

Für die Sekundärprävention von kardiovaskulären Erkrankungen bei Patienten mit vorangegangenem Myokardinfarkt etablierte sich eine duale antithrombozytäre Therapie ("dual anti-platelet therapy", DAPT) mit ASS und einem P2Y₁₂-Antagonisten, obwohl mit dieser Therapie das Blutungsrisiko erhöht ist⁴¹. Eine Studie, bei der Hochrisikopatienten mit früherem Herzinfarkt für über ein Jahr mit einer DAPT mit ASS und Ticagrelor behandelt wurden, zeigte, dass das Risiko für schwerwiegende unerwünschte kardiovaskuläre Ereignisse im Vergleich zur alleinigen ASS-Gabe signifikant verringert wurde⁴². Die Zahlen für den primären Endpunkt (zusammengefasst aus kardiovaskulärem Tod, Myokardinfarkt oder Schlaganfall) in der Gruppe, in der ASS alleine verabreicht wurde, waren: 9,04% = 578 Patienten (von 7067 Patienten) im Vergleich zu der ASS + Ticagrelor-Gruppe: 7,77% = 487 Patienten (von 7045 Patienten, $p = 0,004$); für einen ischämischen Schlaganfall 1,65% = 103 Patienten im Vergleich zu 1,28% = 78 Patienten ($p = 0,06$); für Myokardinfarkt 5,25% = 338 Patienten im Vergleich zu 4,53% = 285 Patienten ($p = 0,03$). Der zwar vorhandene, jedoch geringe Nutzen dieser DAPT ging mit einem erhöhten Blutungsrisiko einher. Schwere Blutungen traten mit der Kombination von Ticagrelor und ASS häufiger auf als mit ASS alleine: ASS + Ticagrelor-Gruppe: 2,30% = 115 Patienten (von 6958 Patienten, $p < 0,001$) im Vergleich zu 1,06% = 54 Patienten (von 6996 Patienten)⁴².

Andere therapeutisch eingesetzte Arzneimittel zur Behandlung und Prävention akuter kardialer Ereignisse sind die Fibrinogen-Rezeptor-Antagonisten Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban, die intravenös appliziert werden und die Thrombozytenaggregation durch die Blockierung des thrombozytären Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und somit dessen Bindung an Fibrinogen hemmen^{36,37}. Eine Studie zur Evaluierung der Effektivität und Sicherheit einer Behandlung von Schlaganfallpatienten mit Abciximab wurde wegen des ungünstigen Nutzen-Risiko-Profiles von Abciximab frühzeitig beendet, weil die Behandlung von akutem ischämischen Schlaganfall mit Abciximab keinen Benefit im Vergleich zur Placebo-Gruppe brachte und das Risiko für symptomatische und fatale intrakranielle Blutungen erhöht war⁴³.

Auch Phosphodiesterase-Inhibitoren wie Dipyridamol und Cilostazol, die zu einer Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch eine Erhöhung von zyklischem Adenosinmonophosphat führen, sind zugelassene Arzneimittel zur sekundären Prävention von transienten ischämischen Attacken und Schlaganfall und zur Behandlung der Claudicatio intermittens. Seit kurzem stehen auch Antagonisten des hauptsächlich thrombozytären Thrombin-Rezeptors (Protease-aktivierter Rezeptor-1) zur Verfügung (Vorapaxar)³⁶.

Obwohl mit den derzeit zugelassenen Thrombozytenaggregationshemmstoffen die Behandlung von cardio- und zerebrovaskulären Erkrankungen verbessert wurde, ist das Auftreten von Atherothrombosen immer noch ein Problem, zumal eine Verbesserung der antithrombotischen Wirksamkeit mit einer Erhöhung des Blutungsrisikos einhergeht⁴⁴⁻⁴⁶. Aufgrund dessen ist die Entwicklung neuer antithrombotischer Substanzen, die optimalerweise nur die pathologische Thrombusbildung effizient inhibieren, ohne die Hämostase zu beeinflussen, von essentieller Bedeutung. Ein vielversprechender therapeutischer Ansatz wird in dieser Dissertation untersucht.

2.5 GPVI – Der wesentliche Kollagen-Rezeptor in der Atherothrombose

2.5.1 GPVI-Struktur und GPVI-Expression

GPVI (60-65 kDa) ist ein Typ I Transmembranglykoprotein und ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie^{4,47-49}. Für GPVI sind drei humane Isoformen bekannt: „platelet GPVI isoform 1 precursor“ mit 620 AA: NP_001077368.2; „platelet GPVI isoform 2 precursor“ mit 339 AA: NP_057447.5 \triangleq UniProtKB - Q9HCN6; „platelet GPVI isoform 3 precursor“ mit 321 AA: NP_001242946.2. Das thrombozytäre GPVI-Protein entspricht dem „platelet GPVI isoform 2 precursor“, bestehend aus 339 Aminosäuren (UniProtKB - Q9HCN6), und ist folgendermaßen aufgebaut: Zwei extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen (D1 und D2), welche die Kollagen-Bindungsstellen (183 AA) und eine einzelne N-Glykosylierungsstelle an der AA 92⁴⁸ enthalten, folgt ein Threonin- und Serin-reicher (AA 240-250⁴⁸), Mucin-ähnlicher Stiel, 19 AA bilden die Transmembran-Domäne und 51 AA den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors^{44,50,51}. Der transmembrane Teil von GPVI ist nicht-kovalent mit der Fc-Rezeptor- γ -Kette (FcR γ) verbunden, die als signalübertragende Untereinheit von GPVI dient^{6,52-55}. Das FcR γ -Homodimer besteht aus zwei kovalent gebundenen Fc- γ -Ketten, die je ein für die Signalübertragung entscheidendes ITAM („immunoreceptor tyrosin-based activation motif,“) enthalten^{6,56}. Eine schematische Abbildung der Struktur des GPVI-Dimers ist in Abbildung 2 dargestellt.

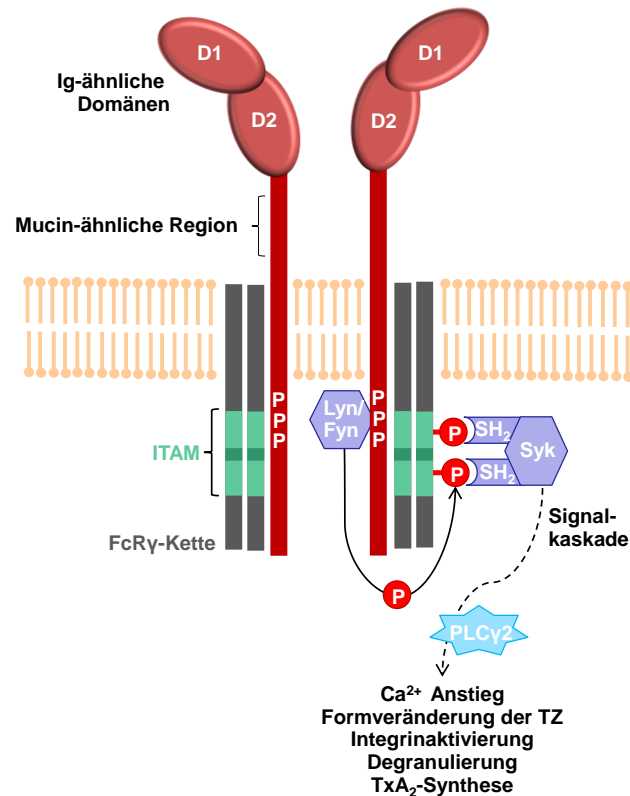


Abbildung 2: Schematische Darstellung der GPVI-Struktur (Dimer) und der GPVI-vermittelten Signaltransduktion

FcR γ -Kette = Fc-Rezeptor- γ -Kette; Ig = Immunglobulin; ITAM = Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes aktivierendes Motiv bestehend aus zwei YxxL/I Sequenzen (Y = Tyrosin, L = Leucin, I = Isoleucin, x = beliebige AA), die durch 6-8 AA voneinander getrennt sind; PPP = Prolin-reiche Region; Lyn/Fyn = Src-Familie Tyrosinkinasen Lyn und Fyn; Syk = Tyrosinkinase Syk mit ihren Src-homology 2 Domänen; PLC γ 2 = Phospholipase Cy2; TxA $_2$ = Thromboxan A $_2$.

Dimeres GPVI erkennt hauptsächlich aneinander gereichte Glycin-Prolin-Hydroxyprolin (GPO) Motive, aber auch andere Peptidsequenzen in den Kollagenfasern^{34,51,57}.

Außer an Kollagen bindet thrombozytäres GPVI auch an Laminin, Fibronectin, Vitronectin, Adiponektin und Fibrin, wobei die physiologische Bedeutung der Bindung von GPVI an diese Liganden für die Thrombusbildung spärlich dokumentiert ist⁵⁸⁻⁶². Nicht-physiologische Liganden von GPVI sind das Schlangentoxin Convulxin und "collagen-related peptide" (CRP), ein quervernetztes, tripelhelikales Peptid, das aus GPO-Wiederholungen besteht und die Kollagen-Tripelhelix nachahmt^{63,64}.

GPVI wird nur auf Thrombozyten und deren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, exprimiert⁴, wobei die Expression von der Assoziation mit der FcR γ -Kette abhängig ist^{54,55}. Auf Thrombozyten gesunder Menschen befinden sich zwischen 6,000 und 10,000⁶⁵ GPVI-Rezeptoren pro Zelle, wobei GPVI sowohl als Monomer, als auch in dimerer Form vorliegen kann⁶⁶⁻⁶⁸ (siehe Schema in Abbildung 1). Auf ruhenden Thrombozyten überwiegt die monomere Form⁶⁹, aber während der durch vWF, CRP oder Thrombin induzierten

Thrombozytenaktivierung nimmt die Bildung der dimeren Form zu, wobei GPVI-Dimere aus Monomeren rekrutiert werden^{68,69}. Außerdem clustern GPVI-Dimere in speziellen hydrophoben Membranbereichen, den so genannten "lipid rafts", was zu einer hohen lokalen GPVI-Dimeren-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche führt⁷⁰. Von zentraler Bedeutung ist, dass nur dimeres, jedoch nicht monomeres GPVI mit hoher Affinität an Kollagen bindet^{66,69}.

Die GPVI-Expression auf der Thrombozytenoberfläche kann verringert werden, was als negativer Rückkopplungsmechanismus der GPVI-vermittelten Thrombozytenaktivierung dienen könnte. Eine GPVI-Verminderung kann entweder durch Metalloproteinase-abhängiges Abspalten der Ektodomäne („shedding“) von GPVI oder durch GPVI-Internalisierung erfolgen⁷¹. GPVI-shedding kann durch Ligandenbindung, aber auch durch den Faktor Xa oder durch hohe Scherkräfte induziert werden. Dies führt zur Freisetzung eines löslichen, ~ 55 kDa schweren GPVI-Fragments, wobei ein ~ 10 kDa schweres Fragment in der Membran zurückbleibt^{32,72,73}. GPVI-Antikörper sind auch in der Lage eine GPVI-Depletion von der Thrombozytenoberfläche zu induzieren, was beispielsweise für den monoklonalen Antikörper JAQ-1, der gegen murines GPVI gerichtet ist, berichtet wurde⁷⁴, und was auch bei einigen Patienten mit GPVI-Autoantikörpern beobachtet wurde⁴⁷. Allerdings zeigten nicht alle getesteten GPVI-Antikörper diese Effekte⁷⁵. Obwohl auch die alleinige Antikörperbindung an thrombozytäres GPVI ohne nachfolgende Thrombozytenaktivierung für eine GPVI-Abnahme auf der Thrombozyten-Oberfläche ausreichen könnte^{74,76}, ergaben andere Studien, dass eine GPVI-induzierte Signaltransduktion sowohl für die Abspaltung der GPVI-Ektodomäne als auch für eine GPVI-Internalisierung notwendig ist⁷¹. Es wurde gezeigt, dass GPVI-shedding von der Aktivierung bestimmter Enzyme, nämlich den ADAM-Metalloproteinasen, abhängig ist. Dabei waren *in vitro* vor allem ADAM 10 und 17 von Bedeutung, wobei *in vivo* eine dritte, noch undefinierte Proteinase involviert zu sein scheint⁷⁷.

Interessanterweise zeigten Patienten mit akutem Koronarsyndrom, transitorischen ischämischen Attacken und Schlaganfällen eine erhöhte Oberflächenexpression von GPVI auf Thrombozyten, die mit einem schlechteren klinischen Ergebnis assoziiert war⁷⁸⁻⁸⁰. In einer weiteren Studie war lösliches GPVI im Plasma bei akutem Schlaganfall erhöht ($21,5 \pm 9,1$ ng/ml lösliches GPVI in Schlaganfallpatienten vs. $19,7 \pm 8,1$ ng/ml in der Kontrollgruppe; $p = 0,0168$)⁸¹. Im Gegensatz dazu waren in einer anderen Studie die Plasmakonzentrationen von löslichem GPVI bei Schlaganfallpatienten im Vergleich zu Patienten ohne ischämische Vorkommnisse geringer ($5,9 \pm 2,3$ µg/l lösliches GPVI vs. 8 ± 4 µg/l, $p = 0,013$)⁸². Diese Diskrepanz könnte an Unterschieden in den Nachweismethoden von löslichem GPVI liegen⁸¹⁻⁸³.

2.5.2 GPVI-Signaltransduktion

Nach Ligandenbindung und Vernetzung von GPVI/FcR γ durch multivalente Liganden, clustert GPVI in "lipid rafts"⁸⁴ und die Tyrosinkinase der Src-Familie Lyn und Fyn, die mit ihren Src Homologie 3 (SH3)-Domänen an die Prolin-reiche Region des zytoplasmatischen Teils von GPVI gebunden sind, induzieren die Phosphorylierung von zwei Tyrosinen innerhalb des ITAM der FcR γ -Kette⁸⁵. Die Tyrosinkinase Syk bindet anschließend mit ihren Tandem SH2-Domänen an das phosphorylierte ITAM der FcR γ -Kette, wobei Syk durch Lyn tyrosinphosphoryliert und zusätzlich autophosphoryliert wird, was zu deren Aktivierung führt. Syk leitet Signale in komplexer Weise zu nachgeschalteten Signalenzymen und Adapterproteinen wie LAT ("linker of activated T cells"), SLP76 ("lymphocyte cytosolic protein 2"), Btk (Bruton Tyrosinkinase), PI-3-Kinase (Phosphoinositid-3-Kinase), PLC γ 2 (Phospholipase C γ 2) und PKC (Proteinkinase C) weiter, was schließlich zur Erhöhung des zytosolischen Ca²⁺, zur Formveränderung der Thrombozyten durch Reorganisation des Zytoskeletts, zur Aktivierung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, zur Degranulation und zur TxA₂-Bildung führt.^{6,56,86,87} (siehe auch Schema in Abbildung 2)

2.5.3 GPVI-Defekte und GPVI-Depletion

Patienten mit seltenen genetischen oder erworbenen GPVI-Defekten zeigen eine beeinträchtigte Thrombozytenaktivierung durch Kollagen und weisen in der Regel nur eine leichte Blutungsstörung auf⁸⁸. Typischerweise wird bei GPVI-Defekten keine oder eine extrem beeinträchtigte Thrombozytenaggregation nach Stimulation durch Kollagenfasern oder andere GPVI-Agonisten in thrombozytenreichem Plasma oder gewaschenen Thrombozyten beobachtet⁸⁸. Die GPVI-bezogenen Abnormalitäten beim Menschen beinhalten angeborene Defekte, bei denen GPVI entweder nicht exprimiert oder in einer dysfunktionalen Form (Mutationen im *GP6*-Gen) exprimiert ist, und erworbene GPVI-Mangelzustände, die durch GPVI-Autoantikörper oder GPVI-Signaltransduktionsstörungen ausgelöst werden⁸⁸⁻⁹⁰.

Um die Rolle von GPVI in der Hämostase und Thrombose zu erforschen, wurden die Auswirkungen einer GPVI-Defizienz in verschiedenen Tiermodellen untersucht. Sowohl GPVI-defiziente Mäuse, bei denen das *GP6*-Gen ausgeschaltet wurde, als auch FcR γ -Kette defiziente Mäuse, die GPVI nicht exprimieren können, oder Tiere, die mit einem GPVI-Antikörper behandelt wurden, um eine GPVI-Depletion auf der Thrombozytenoberfläche zu induzieren, zeigten eine verminderte Thrombozytenreaktion auf Kollagen sowohl unter statischen als auch unter Flussbedingungen und nur eine moderate Verlängerung der Blutungszeit⁷. In Kombination mit reduzierter Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Expression oder in Kombination mit Thrombozytenaggregationshemmstoffen (ASS) zeigten GPVI-defiziente Mäusen jedoch

stark verlängerte Blutungszeiten⁹¹. Auch bei Patienten können GPVI-Defekte die normale Hämostase beeinträchtigen und je nach klinischem Hintergrund schwere Blutungen hervorrufen⁸⁸.

2.5.4 GPVI als neuer antithrombotischer Angriffspunkt

Die Feststellung, dass der thrombozytäre GPVI-Rezeptor eine Hauptrolle im Mechanismus der Atherothrombose spielt, während er wenig oder keinen Einfluss auf die normale Hämostase hat, macht GPVI zu einem interessanten Angriffsmolekül für neue antithrombotische Therapien. Die Hemmung von GPVI könnte vorrangig die durch atherosklerotisches Plaquematerial induzierte Thrombose hemmen^{23,35}, da bei der normalen Hämostase die GPVI-Hemmung wahrscheinlich durch den alternativen Kollagen-Rezeptor, das Integrin $\alpha_2\beta_1$, teilweise kompensiert werden kann^{33,34}. Darüber hinaus ist GPVI als Angriffsziel für antithrombotische Substanzen hoch spezifisch, da GPVI nur auf Thrombozyten und deren Vorläuferzellen exprimiert wird und somit andere Zellen unbeeinflusst bleiben und daher potentielle Nebenwirkungen vermieden werden⁴⁴. Die GPVI-Kollagen-Interaktion kann entweder durch Besetzung von spezifischen Bindungsstellen auf Kollagen mit GPVI-Mimetika wie beispielsweise rekombinantem GPVI-Fc (Abbildung 3 und S. 16 ff) gehemmt werden, oder thrombozytäres GPVI kann direkt durch blockierende Antikörper inhibiert werden (Abbildung 3). Während GPVI-Antikörper systemische Thrombozytenaggregationshemmer sind, wirkt GPVI-Fc wahrscheinlich lokal am Ort der Plaque-Ruptur und -Erosion wobei zirkulierende Thrombozyten unverändert bleiben^{44,92}.

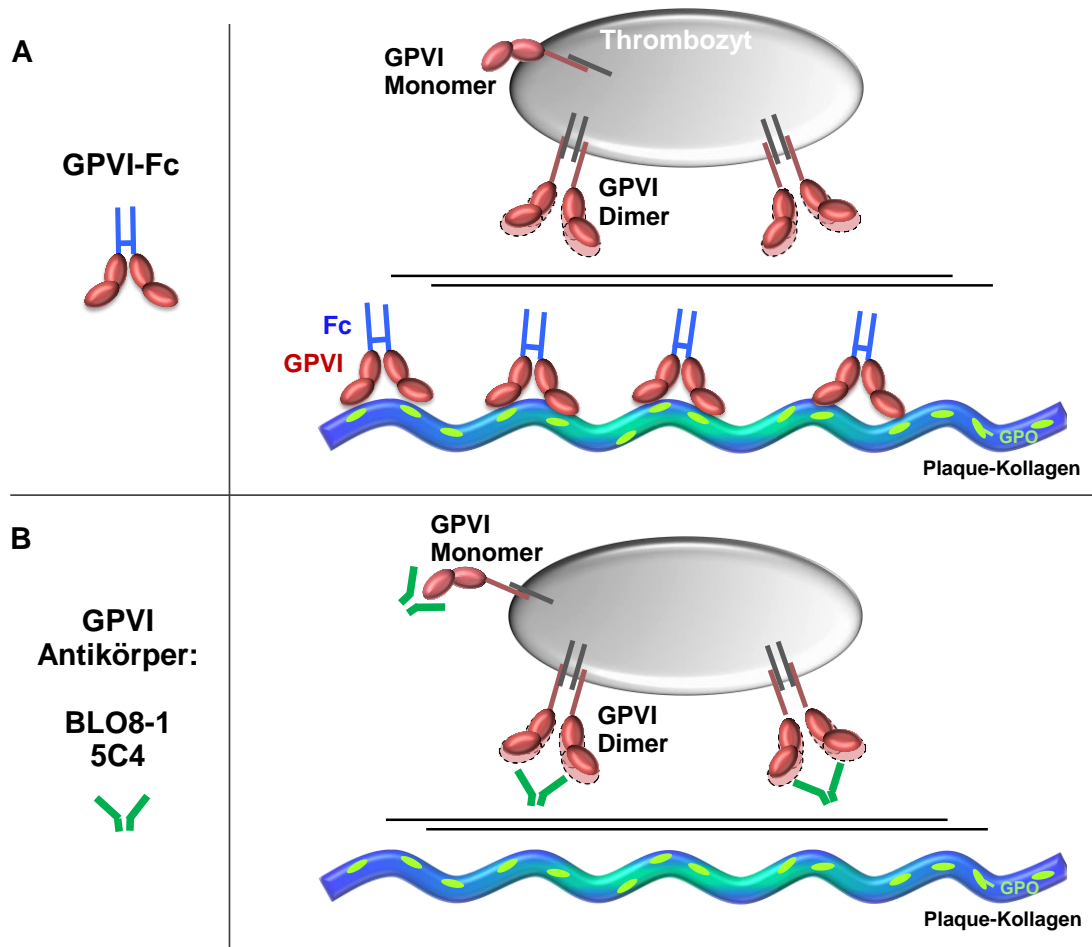


Abbildung 3: Wirkungsweise von löslichem dimerem GPVI-Fc und GPVI-Antikörpern

(A) GPVI-Fc bindet an exponierte GPO-Bindungsstellen von Plaque-Kollagen nach Plaque-Ruptur, wodurch GPVI-Bindungsstellen vor Thrombozyten abgeschirmt werden. **(B)** GPVI-Antikörper binden GPVI-Monomere und -Dimeren auf der Oberfläche zirkulierender Thrombozyten, wodurch die Thrombozyten-Kollagen-Wechselwirkung nach Plaque-Ruptur inhibiert wird. GPO = Glycin-Prolin-Hydroxyprolin; GPVI = Glykoprotein VI; Fc = Fc-Region von IgG

GPVI-Fc ist ein lösliches, dimeres, ~ 150 kDa schweres rekombinantes Fusionsprotein⁹³. Es besteht aus dem extrazellulären Teil des humanen GPVI (AA 21-269 der 339 AA des thrombozytären GPVI Isoform 2 Precursor Proteins; die ersten 20 AA stellen das Signalpeptid dar, welches abgespalten wird) mit drei Aminosäurevarianten: AA 219 P → S, AA 237 E → K und AA 249 A → T (European patent specification application number: 03735562.5). Letztere wurden auch für thrombozytäres GPVI beschrieben (UniProtKB/Swiss-Prot: Q9HCN6.4) und sind auch in der bereits 1999 von Clemetson et al. klonierten AA-Sequenz von thrombozytärem GPVI enthalten⁴⁸. Die beiden extrazellulären GPVI-Domänen sind jeweils mit einer kurzen Linkersequenz (3 AA) an den Fc-Teil von humanem IgG1 (232 AA) gebunden, welcher kovalent über Disulfid-Brücken stabilisiert ist⁹³. Dadurch erhält das Protein eine dimere Struktur^{93,94} und weist eine hohe Bindungsaffinität für Kollagen Typ I und III auf^{94,66,69}.

Ein Vergleich der AA-Sequenz von GPVI-Fc und des thrombozytären GPVI Isoform 2 Precursor Proteins ist in Abbildung 4 dargestellt.

GPVI Isoform 2 Precursor	1	MSPSPALFC	LGLCLGRVPA	QSGPLPKPSL	QALPSSLVPL	EKPVTLRCCG	PPGVDLYRLE
GPVI-Fc	1	MSPSPALFC	LGLCLGRVPA	QSGPLPKPSL	QALPSSLVPL	EKPVTLRCCG	PPGVDLYRLE
GPVI Isoform 2 Precursor	61	KLSSRYQDQ	AVLFIPAMKR	SLAGRYRCSY	QNGSLWLSLPS	DQLELVATGV	FAKPSLSAQF
GPVI-Fc	61	KLSSRYQDQ	AVLFIPAMKR	SLAGRYRCSY	QNGSLWLSLPS	DQLELVATGV	FAKPSLSAQF
GPVI Isoform 2 Precursor	121	GPAVSSGGDV	TLQCQTRYGF	DQFALYKEGD	PAPYKNPERW	YRASFPITV	TAAHSGTYRC
GPVI-Fc	121	GPAVSSGGDV	TLQCQTRYGF	DQFALYKEGD	PAPYKNPERW	YRASFPITV	TAAHSGTYRC
GPVI Isoform 2 Precursor	181	YFSSRDPLY	WSAPSDPLEL	VVTGTSVTPS	RLPTEPPSPV	AEFSEATAEL	TVSFTNEVFT
GPVI-Fc	181	YFSSRDPLY	WSAPSDPLEL	VVTGTSVTPS	RLPTEPPSV	AEFSEATAEL	TVSFTNKVFT
GPVI Isoform 2 Precursor	241	TETSRITAS	PKESDSPAGP	ARQYYTKGNL	VRICLGAVIL	IILAGFLAED	WHSRRKRLRH
GPVI-Fc	241	TETSRITTS	PKESDSPAGP	ARQYYTKGNL	GRESKSCDKT	HTCPPCPAPE	LLGGPSVFLF
GPVI Isoform 2 Precursor	301	RGRAVQRPLP	PLPPLPLTRK	SNGGQDGGRQ	DVHSRGLCS		
GPVI-Fc	301	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV
GPVI-Fc	361	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	SRDELTKNQV
GPVI-Fc	421	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD	KSRWQQGNVF
GPVI-Fc	481	SCSVMHEALH	NHYTQKLSL	SPGK			

Aminosäuresequenz von GPVI-Fc: Extrazellulärer Teil des GPVI-Rezeptors Linkersequenz Fc-Teil von GPVI-Fc

Abbildung 4: Aminosäuresequenz des thrombozytären GPVI Isoform 2 Precursors im Vergleich zur Aminosäuresequenz von GPVI-Fc

Die ersten 269 AA (extrazellulärer Teil des GPVI-Rezeptors) von GPVI-Fc sind identisch mit der Sequenz des thrombozytären GPVI Isoform 2 Precursor Proteins (GPVI Isoform 2 Precursor, 339 AA). Der Fc-Teil (grün) von GPVI-Fc ist durch eine kurze Linkersequenz (orange) mit dem GPVI-Teil verbunden (rot). Die AA-Varianten (blau) in der Sequenz von GPVI-Fc sind für thrombozytäres GPVI beschrieben.

GPVI-Fc (Revacept[®]) wird derzeit zur Behandlung des akuten ischämischen Schlaganfalls in einer klinischen Studie getestet⁹⁵. In der klinischen Phase-1-Studie an gesunden Probanden konnte bereits gezeigt werden, dass einzelne intravenöse Applikationen von GPVI-Fc gut verträglich waren und keine Auswirkungen auf die systemische Hämostase hatten. Außerdem hemmte GPVI-Fc die *ex vivo* gemessene Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation dosisabhängig, wobei niedrige Dosen 48 Stunden und hohe Dosen sogar bis zu sieben Tage nach der Injektion wirksam waren⁹³.

Experimente in verschiedenen Tiermodellen bewiesen, dass mit GPVI-Fc nicht nur eine Atherothrombose, sondern auch die Progression atherosklerotischer Plaques verhindert werden konnte: Die erste *in vivo* Studie mit GPVI-Fc zeigte, dass GPVI-Fc die Thrombozytenadhäsion und -aggregation an der denudierten Arteria carotis in Mäusen verminderte⁹⁴. Zudem wurde in einem experimentellen Schlaganfallmodell in der Maus gezeigt, dass die Injektion von GPVI-Fc die Thrombusbildung reduzierte sowie das zerebrale Infarktvolume und das funktionelle Ergebnis verbesserte⁹⁶. In einer anderen Studie zeigte GPVI eine positive Wirkung auf die Progression atherosklerotischer Plaques: Dabei verbesserten GPVI-Fc-Injektionen die endotheliale Dysfunktion und reduzierten die Dicke der

Gefäßwand in atherosklerotischen Kaninchen⁹⁷. Darüber hinaus könnte GPVI-Fc auch protektiv wirken, indem es die Thrombozytenadhäsion an intakte atherosklerotische Gefäße verhindert (möglicherweise durch Hemmung der Interaktion von GPVI mit Fibronektin⁵⁸). Dies wurde nach vaskulärem Gentransfer von löslichem GPVI-Fc in die Karotis von atherosklerotischen Kaninchen gezeigt, was die Atheroprogression abschwächte⁵⁸. Zudem wurde die akute Thrombusbildung nach der Verletzung der Karotis von Kaninchen nach GPVI-Fc-Administration ohne Auswirkung auf die Blutungszeit reduziert⁹⁷. Auch in Mäusen war die Blutungszeit nach GPVI-Fc-Behandlung selbst in Kombination mit anderen Thrombozyten-aggregationshemmstoffen (ASS, Clopidogrel, Heparin, Dipyridamol) nicht verlängert⁹⁷.

Im Gegensatz zu den zuvor genannten positiven Auswirkungen von GPVI-Fc auf die Atherothrombose und Atheroprogression zeigte die Studie einer anderen Gruppe, welche die antithrombotische Wirksamkeit von GPVI-Fc mit GPVI-Antikörpern in 2 verschiedenen Thrombosemodellen in Mäusen verglich, dass GPVI-Fc nur eine begrenzte antithrombotische Wirksamkeit *in vivo* aufwies⁹⁸. In dieser Studie wurde eine Gefäßverletzung mit anschließender Thrombusbildung entweder durch Faden-Ligation der Arteria Carotis oder durch die Kompression der Aorta mit einer Zange induziert. Bei erstgenanntem Modell wurde den Mäusen neben humanem GPVI-Fc auch murines GPVI-Fc injiziert, wobei GPVI-Fc (4 mg/kg) in beiden Ansätzen die Thrombozytenaggregatbildung nicht hemmte. Im Gegensatz dazu konnte in Experimenten unter arteriellen Strömungsbedingungen *in vitro* eine Hemmung der Thrombozytenaggregation an Kollagen mit hohen GPVI-Fc-Konzentrationen (humanes GPVI-Fc in humanem Blut und humanes als auch murines GPVI-Fc in murinem Blut, 200 µg/ml) erreicht werden⁹⁸. Diese *in vitro* Ergebnisse stehen im Einklang mit Resultaten von Massberg et al., die mit weitaus höheren GPVI-Fc-Konzentrationen (800 µg/ml) ebenso eine Reduktion der Thrombozytenaggregation an Kollagen *in vitro* dokumentierten⁹⁴. Im Gegensatz dazu fanden Massberg et al. jedoch nach GPVI-Fc-Behandlung von Mäusen eine signifikante Hemmung der durch Karotisligation induzierten Thrombusbildung *in vivo*, wobei die injizierten Dosen sowie die Bioverfügbarkeit von GPVI-Fc bei der Studie von Grüner et al. und Massberg et al. vergleichbar waren^{94,98}. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanzen in den *in vivo* Experimenten beider Gruppen könnten Unterschiede in den entstandenen Läsionen nach Gefäßverletzung der Mäuse darstellen⁹⁸. Im Gegensatz zu GPVI-Fc waren GPVI-Antikörper in der Studie von Grüner et al. höchst effektiv und verhinderten in Mäusen sowohl die okklusive Thrombusbildung in der Aorta als auch die Thrombozytenaggregatbildung nach Karotis-ligation⁹⁸.

Auch in verschiedenen anderen Tierstudien erwies sich die Behandlung mit GPVI-Antikörpern als wirksame Strategie zur Verhinderung von Thrombosen mit keiner oder nur

leichter Verlängerung der Blutungszeit^{74,75,98,99}. Die Behandlung von Mäusen mit einer einmaligen Injektion von JAQ-1, einem monoklonalen Antikörper gegen murines GPVI, führte zur Depletion von GPVI auf zirkulierenden Thrombozyten mit nachfolgendem Langzeitschutz (mindestens 14 Tage) gegen Thrombosen, die durch intravenöse Injektionen von Kollagen und Epinephrin induziert wurden. Die Thrombozyten von JAQ-1-behandelten Mäusen reagierten *ex vivo* nicht auf die Aktivierung durch die GPVI-Liganden CRP, Kollagen und Convulxin und zeigten eine reduzierte Adhäsion an Kollagen in statischen Assays⁷⁴.

Die zuvor erwähnten Studien mit GPVI-Fc und GPVI-Antikörpern, besonders in Mäusen, trugen dazu bei, GPVI als antithrombotisches Zielmolekül zu identifizieren und brachten neue Einblicke in den möglichen Nutzen einer Anti-GPVI-Behandlung. Jedoch können diese Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragen werden. Außer Tieren mit gesunden Gefäßen wurden teilweise zwar auch atherosklerotische Tiere verwendet, bei denen die Gefäßverletzung an Stellen mit atherosklerotischen Läsionen induziert wurde, jedoch entwickeln Mäuse normalerweise keine Atherosklerose, es sei denn, sie werden genetisch modifiziert (Apolipoprotein E (ApoE)-defiziente oder LDL-Rezeptor-defiziente Mäuse) und mit Cholesterin-angereicherter Nahrung gefüttert. Tiermodelle der Atherothrombose haben allerdings ihre Grenzen und können eine Plaque-Ruptur im Menschen nicht adäquat nachahmen: Erstens sind Mäuse nicht in der Lage, instabile, vulnerable atherosklerotische Läsionen zu entwickeln¹⁰⁰ (obwohl dies kontrovers diskutiert wird^{101,102}). Zweitens gibt es keine spontanen Plaque-Rupturen mit anschließender luminaler Thrombose in atherosklerotischen Mäusen¹⁰⁰. Eine experimentelle endotheliale Denudation oder eine Plaque-Ruptur muss mechanisch, chemisch, durch Bestrahlung oder Ultraschall induziert werden^{31,103}. Drittens sind die Prädilektionsstellen der atherosklerotischen Plaqueentwicklung in Mäusen unterschiedlich, diese entwickeln beispielsweise keine atherosklerotischen Läsionen in den Koronararterien, welche beim Menschen eine der wichtigsten Ursachen für die akute Atherothrombose darstellen¹⁰⁴. Viertens unterscheiden sich murine Plaques von humanen Plaques in ihrer Zusammensetzung und Struktur, da murine Plaques innerhalb von Wochen entstehen, wohingegen sich humane Plaques über Jahrzehnte entwickeln^{100,105}. Darüber hinaus haben verschiedene Modelle der Gefäßverletzung, die bei atherosklerotischen Mäusen angewendet wurden, zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen geführt: Nach mechanischer, durch eine Nadel induzierte Plaque-Schädigung war die Rolle von GPVI bei der anschließenden Thrombusbildung weniger wichtig als nach einer Plaque-Ruptur, die durch Ultraschall induziert wurde^{31,103}.

Aus diesen Gründen und um der Situation einer Atherothrombose im Menschen so nah wie möglich zu kommen, wurde in dieser Dissertation mit humanem atherosklerotischen Plaquematerial gearbeitet. Zur Simulation einer Plaque-Ruptur mit anschließender

Thrombozytenaggregation wurden humane Plauehomogenate in einer Strömungskammer mit humanem Blut bei Arterien-typischen Scherraten perfundiert.

3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Da alle derzeit verwendeten antiatherothrombotischen Therapien ein erhöhtes Blutungsrisiko bergen und eine Erhöhung der antithrombotischen Effizienz mit einer weiteren Steigerung des Blutungsrisikos einhergeht⁴⁴, war das Ziel dieser Dissertation, neue antithrombotische Strategien zu testen und zu entwickeln, die ein positiveres Nutzen-Risiko-Profil aufweisen. Weil GPVI der wichtigste Kollagen-Rezeptor bei der Entstehung einer Atherothrombose ist, er jedoch nur eine geringe Rolle in der Hämostase spielt, ist der thrombozytäre GPVI-Rezeptor ein vielversprechender Angriffspunkt für die Entwicklung neuer antithrombotischer Medikamente. In dieser Dissertation sollte die effektivste und sicherste Strategie der GPVI-Hemmung definiert werden, wobei unterschiedliche, die GPVI-Kollagen-Interaktion hemmende Verbindungen verglichen werden sollten.

Das erste Ziel war es, das Thrombozyten-hemmende Potential zweier GPVI-Antikörper (5C4 und BLO8-1) mit dem von rekombinantem dimeren GPVI-Fc sowohl in statischen Testverfahren der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation als auch in Experimenten unter arteriellen Flussbedingungen zu vergleichen. Um die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation unter arteriellen Strömungsbedingungen messen zu können, musste zunächst ein neues Flusskammersystem etabliert werden, in dem die Thrombozytenadhäsion und -aggregation an humanem Plaquehomogenat über eine Zeitspanne einfach und zuverlässig gemessen werden konnte.

Die ersten Resultate des Vergleiches der Hemmwirkung von GPVI-Antikörpern und GPVI-Fc führte zum nächsten Ziel, zur Erschließung des Mechanismus der scherabhängigen Hemmung der Thrombozytenaggregatbildung durch GPVI-Fc. Zur Mechanismusaufklärung sollten verschiedene, zum Teil neuartige mikroskopische Methoden eingesetzt werden, um hochauflösend, teilweise auch in Echtzeitmessungen, gleichzeitig Plaque oder Kollagen, fluoreszenzmarkierte Thrombozyten und GPVI-Fc sichtbar zu machen.

Aus den im ersten Teil dieser Dissertation erlangten Ergebnissen ergab sich die zweite Fragestellung: Lässt sich die Läsions-Selektivität von GPVI-Fc mit dem vollen GPVI-inhibitorischen Potential von GPVI-Antikörpern vereinen? Die inhibitorische Wirkung von GPVI-Fc sollte also nach Möglichkeit soweit erhöht werden, dass eine den GPVI-Antikörpern ähnlich starke Hemmung der Thrombozytenaggregation erreicht wird und dies unabhängig von den Strömungsbedingungen. Diese Verstärkung des inhibitorischen Potentials sollte vor allem durch eine Oligomerisierung der GPVI-Domänen von dimerem GPVI-Fc durch anti-Fc-Antikörper-vermittelte Quervernetzung von GPVI-Fc-Molekülen versucht werden.

Die in dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse und Methoden bilden den Hauptbeitrag zu folgenden Publikationen, die im Elsevier-Verlag erschienen sind:

- *J Am Coll Cardiol.* 65(22):2404-15 (2015) Differential inhibition of human atherosclerotic plaque-induced platelet activation by dimeric GPVI-Fc and anti-GPVI antibodies. Functional and imaging studies. **Janina Jamasbi**, Remco T.A. Megens, Mariaelvy Bianchini, Götz Münch, Martin Ungerer, Alexander Faussner, Shachar Sherman, Adam Walker, Pankaj Goyal, Stephanie Jung, Richard Brandl, Christian Weber, Reinhard Lorenz, Richard Farndale, Natalie Elia, Wolfgang Siess
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2015.03.573>
Impact factor: 17.759
- *JACC Basic Transl Sci.* 1(3):131-42 (2016) Cross-linking GPVI-Fc by anti-Fc antibodies potentiates its inhibition of atherosclerotic plaque- and collagen-induced platelet activation. **Janina Jamasbi**, Remco T.A. Megens, Mariaelvy Bianchini, Kerstin Uhland, Götz Münch, Martin Ungerer, Shachar Sherman, Alexander Faussner, Richard Brandl, Christine John, Johannes Buchner, Christian Weber, Reinhard Lorenz, Natalie Elia, Wolfgang Siess
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.03.008>
Impact factor noch nicht vorhanden, da neues Journal zugehörig zu *J Am Coll Cardiol.*

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Antikörper, Hemmsubstanzen, Peptide und Chemikalien

Primärantikörper/Fusionsproteine

Anti-human GPVI	5C4 (Fab-Fragment eines monoklonalen, GPVI-blockierenden Ratten IgG-Antikörpers)	AdvanceCOR GmbH (Martinsried, Deutschland)
	BLO8-1 (GPVI-blockierender rekombinanter humaner Einzeldomänen-Antikörper)	GlaxoSmithKline (Brentford, Middlesex, Großbritannien)
	m-Fab-F (Fab-Fragment eines rekombinanten monoklonalen humanen GPVI-Dimer-blockierenden Antikörpers)	Produziert wie zuvor beschrieben ⁶⁷
Rekombinantes GPVI-Fc Fusionsprotein	Revacept [®] (RP-15-260805)	AdvanceCOR GmbH (Martinsried, Deutschland).
Anti-Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$	Abciximab (ReoPro [®] , Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers gegen Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$)	Janssen Biologics B.V. (Leiden, Niederlande)
	FITC-konjugierter anti-human CD41 Maus Antikörper	Invitrogen/life technologies (Frederick, MD, USA).
Anti-Kollagen	Polyklonaler Kollagen Typ I Kaninchen Antikörper	Rockland (Limerick, PA, USA)
	Polyklonaler Kollagen Typ III Kaninchen Antikörper	Rockland (Limerick, PA, USA)

Sekundärantikörper

anti-human-Fc	Ziegen anti-human-Fc IgG	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
	Ziegen PE-konjugierter anti-human-Fc IgG	eBioscience (San Diego, CA, USA)
	Ziegen Alexa Fluor [®] 594-konjugierter anti-human-Fc IgG	Dianova (Hamburg, Deutschland)
	Ziegen Alexa Fluor [®] 488-konjugierter anti-human-Fc IgG	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)

	Ziegen anti-human-Fc Fab2	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
	Ziegen PE-konjugierter anti-human-Fc Fab2	Invitrogen/life technologies (Frederick, MD, USA)
	Ziegen Alexa Fluor [®] 488-konjugierter anti-human-Fc Fab2	Invitrogen/life technologies (Frederick, MD, USA)
Anti-Kaninchen-IgG	Ziegen Alexa Fluor [®] 405-konjugierter anti-Kaninchen IgG	Life Technologies (Eugene, OR, USA)
Anti-Maus-IgG	Esel Dylight [®] 488-konjugierter anti-Maus IgG	Abcam (Cambridge, Großbritannien)

Kontroll-Antikörper/-Proteine

IgG1 kappa Ratten Isotyp Kontroll-Antikörper	Abcam (Cambridge, Großbritannien)
Fc-Kontrollprotein (Fc-Teil von humanem IgG1)	AdvanceCOR GmbH (Martinsried, Deutschland)

Labeling Kits

Zenon [®] Alexa Fluor [®] 405 Kaninchen IgG labeling Kit	Life Technologies (Eugene, OR, USA)
Zenon [®] Alexa Fluor [®] 594 Kaninchen IgG labeling Kit	Life Technologies (Eugene, OR, USA)
Zenon [®] Alexa Fluor [®] 594 Human IgG labeling Kit	Life Technologies (Eugene, OR, USA)

Chemikalien

Acetylsalicylsäure (Multiplate [®] ASS Reagenz)	Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)
Acetylsalicylsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Adenosin 3-phosphat 5-phosphat (ADP)	Biopool (Wicklow, Irland)
Cangrelor (AR-C69931MX, P2Y ₁₂ -Antagonist)	Astra-Zeneca R&D Charnwood (Loughborough, Großbritannien)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

DiOC6	Life Technologies (Eugene, OR, USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Fluoro-Gel Einbettungsmedium	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA)
Glyzin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (Hepes)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Humanes Serumalbumin (HSA, Katalog #: A1653)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kollagen (Horm [®])	Takeda (Linz, Österreich)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Mannitol	Riedel-de Haën AG (Seelze, Deutschland)
Mepacrine	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
ProLong [®] Diamond Einbettungsmedium	Life Technologies (Eugene, OR, USA)
Refludan [®] (Recombinantes Lepirudin)	Celgene (Windsor, Großbritannien)
RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser, $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonist)	Bachem AG (Bubendorf, Schweiz)
Sucrose	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ticagrelor (AR-C126532XX, P2Y ₁₂ -Antagonist)	Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA)
TRAP (SFLLRN, Protease-aktivierter Rezeptor-1-Agonist)	Bachem AG (Bubendorf, Schweiz)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Biomol (Hamburg, Deutschland)

4.1.2 Puffer und Lösungen

Dialysepuffer *	150 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 7,4
Fixationspuffer *	4% PFA in PBS; 5 mM EDTA
HSA *	HSA 4%, HSA 0,5% oder HSA 0,1% in PBS
Natriumchlorid 0,9%	B.Braun (Melsungen, Deutschland)
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Puffer C *	20 mM Hepes; 138 mM NaCl; 2,9 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 0,36 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
Puffer R (Kontrollpuffer für GPVI-Fc) *	1% Sucrose; 4% Mannitol in PBS; pH 7,4
SKF-Puffer	Takeda (Linz, Austria)
TRIS-Glyzin-Puffer *	0,1 M TRIS; 0,1 M Glyzin; pH 7,5
Waschpuffer *	HSA 0,1% in PBS; 6,5 µg/ml Refludan®
	* Eigene Herstellung

4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Butterflykanülen (19-Gauge)	Intermedica GmbH (Mainz, Deutschland)
Falcon® Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Sarsted (Nümbrecht, Deutschland)
Glasdeckgläschen	Deckgläser 24 x 60 mm, No.1,5H, Menzel-Gläser GmbH (Braunschweig, Deutschland)
	Präzisionsdeckgläser 24 x 60 mm, No.1,5H, Paul Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen, Deutschland).
Kollagen/ADP-Kartuschen und Kollagen/Epinephrin-Kartuschen für PFA-200	Siemens Healthcare (Erlangen, Deutschland)
Multiplate®-Testzellen	Dynabyte Medical (München, Deutschland)
Objektträger	26 x 76 mm, Menzel-Gläser GmbH (Braunschweig, Deutschland)
Plastik Spritzen (10 ml, 20 ml, 50 ml Spritzenvolumen)	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Silikonschlauch (Innen Φ: 1,5 mm; Außen Φ: 3,5 mm; Wandstärke: 1 mm)	Wagner & Munz GmbH (München, Deutschland)
S-Monovette® 3,8 ml 9NC/PFA (0,129 mol/l gepuffertes Natriumcitrat; pH 5,5)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

sticky-Slide I 0,1 Luer (Kanalvolumen: 25 μ l, Länge: 50 mm, Breite: 5 mm, Höhe: 100 μ m)	ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland)
sticky-Slide I 0,2 Luer (Kanalvolumen: 50 μ l, Länge: 50 mm, Breite: 5 mm, Höhe: 200 μ m)	

4.1.4 Geräte und Software

Inkubator	WTB Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Innovance [®] PFA-200 System	Siemens Healthcare (Erlangen, Deutschland)
Kamera	CoolSNAP HQ2 CCD camera, Photometrics (Tucson, AZ, USA)
Mikroskope	ELYRA PS.1 Mikroskop, Carl Zeiss MicroImaging (Jena, Deutschland) Leica SP5IIMP Zwei-Photonen-Laser- Scanning-Mikroskop (Mannheim, Deutschland) Leica SP8 STED 3X Mikroskop (Wetzlar, Deutschland) Nikon Eclipse TE2000-E invertiertes Fluoreszenzmikroskop (Tokyo, Japan)
pH-Meter	HI2211 pH/ORP meter, Hanna Instruments (Voehringen, Deutschland)
Spritzensaugpumpe	LEGATO 270, Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA)
Vortex	REAX top, Heidolph (Kehlheim, Deutschland)
Waagen	BP2100S und R160P, Sartorius (Goettingen, Deutschland)
Wasseraufreinigungssystem	Milli Q Direct Q 16, Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Widerstandsaggregometer	Multiplate [®] , Dynabite Medical (München, Deutschland)
Huygens Professional 15.10 Software- Paket	Scientific Volume Imaging (Hilversum, the Netherlands)

ImagePro Premier 3D Version 9.1	Media Cybernetics Inc. (Rockville, MD, USA)
Leica LasX (1.8) Software	Leica microsystems GmbH (Mannheim, Deutschland)
NIS-element 3.2	Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
SigmaStat 3.5-Programm-Paket	Systat software Inc. (Point Richmond, CA, USA)
ZEN Software	Carl Zeiss MicroImaging (Jena, Deutschland)

4.2 Methoden

4.2.1 Blutentnahmen

Blut wurde von gesunden freiwilligen Spendern erhalten, die seit mindestens 2 Wochen keine die Thrombozytenfunktion beeinflussenden Arzneimittel eingenommen hatten, gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität München und in Übereinstimmung mit den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen in der Erklärung von Helsinki. Das Blut wurde durch Venenpunktion entnommen, wobei für die Blutentnahme eine 20-Gauge-Nadel und eine Plastikspritze verwendet wurde, die 1/10 des Spritzenvolumens rekombinantes Lepirudin enthielt (gelöst in 0,9% NaCl; finale Konzentration im Blut ~200 U/ml; 13 µg/ml). Die ersten 2 ml des Blutes wurden verworfen. Aggregationsmessungen und Flussexperimente wurden zwischen 20 Minuten und 4 Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt. Für Experimente mit dem PFA-200-Gerät wurde Citrat-antikoaguliertes Blut verwendet, das in speziellen Monovetten (S-Monovette 9NC/PFA 3,8 ml), die 0,38 ml gepuffertes Natriumcitrat (0,129 mol/l; pH 5,5) enthielten, abgenommen wurde.

4.2.2 Herstellung der atherosklerotischen Plauehomogenate

Atherosklerotisches Plauegewebe wurde von Patienten mit Karotisstenose nach Endarterektomie durch Herrn Prof. Brandl (Praxis für Gefäßchirurgie und Venenmedizin am Marienplatz, München) zur Verfügung gestellt. Nach der Entnahme wurde das Plauematerial sofort tiefgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 80°C gelagert^{24,106}. Den Untersuchungen mit humanem Plauegewebe stimmten die Patienten gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität München und in Übereinstimmung mit den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen in der Erklärung von Helsinki zu. Die Plaueproben wurden abgewogen, mit einem Skalpell zerkleinert und mit Glaspotter und Pistill in Dialysepuffer homogenisiert (Endkonzentration: 100 mg Feuchtgewicht/ml). Um Patientenunterschiede zu minimieren wurden Pools aus 5 verschiedenen Plaues hergestellt und in Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C aufbewahrt. Für diese Dissertation wurden mehrere Plaue-Pools (n = 6) verwendet. Die Plauehomogenate wurden für Thrombozytenaggregationsstudien (MEA) entweder unverdünnt eingesetzt oder im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt.

4.2.3 Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen

Die Thrombozytenaggregation im Blut wurde mittels Impedanzaggregometrie ("multiple electrode aggregometry", MEA) unter Verwendung eines Multiplate[®]-Gerätes, wie zuvor beschrieben¹⁰⁷, nach einem kürzlich modifizierten Protokoll¹⁰⁸, bestimmt.

4.2.3.1 Vergleich der Wirkung von GPVI-Antikörpern mit GPVI-Fc mittels MEA

Die Blutproben wurden mit GPVI-Antikörpern, GPVI-Fc oder den jeweiligen Kontrollen bei 37°C für 3 min ohne Rühren vorinkubiert¹⁰⁸. Die Endkonzentrationen in der Testküvette betragen 42 nM (0,5 µg/ml) bis 833 nM (10 µg/ml) für BLO8-1, 2,5 nM (0,125 µg/ml) bis 25 nM (1,25 µg/ml) für 5C4 und 21 nM (3,125 µg/ml) bis 333 nM (50 µg/ml) für GPVI-Fc. Als Kontrollen wurden für GPVI-Fc und 5C4 äquimolare Konzentrationen von humanem Fc und IgG1 verwendet. Als Kontrolle für BLO8-1 wurde ein TRIS-Glyzin-Puffer verwendet. Je nach Messung wurden den Blutproben verschiedene Stimuli zugesetzt, das Rühren der Probe wurde gestartet und der Anstieg des elektrischen Widerstandes kontinuierlich für 5 oder 10 min aufgezeichnet. Als Stimuli dienten Plaquehomogenat (833 µg/ml), Horm[®]-Kollagen (0,5 µg/ml), ADP (5 µM) oder TRAP (15 µM). Der Mittelwert von zwei unabhängigen Bestimmungen wird in willkürlich gewählten "Aggregationseinheiten" über die Zeitdauer (AU*min, kumulative Aggregationswerte) angegeben. Die Werte für die Kollagen- und Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation gemessen nach 5 min waren 343 ± 145 AU*min (MW \pm SD, n = 24) und 238 ± 71 AU*min (MW \pm SD, n = 29).

Um eine optimale Absättigung der GPVI-Bindungsstellen am Plaque-Kollagen mit GPVI-Fc zu erreichen, wurde neben der Zugabe von GPVI-Fc zum Blut, GPVI-Fc in verschiedenen Konzentrationen (109, 219, 437, 875, 1750 µg/ml) auch direkt mit Plaquehomogenat für 3 min bei Raumtemperatur (RT) vorinkubiert, bevor die Mischungen zu den Blutproben in die MEA-Küvetten transferiert wurden. In einer weiteren Versuchsreihe wurde dieser experimentelle Ansatz modifiziert, indem mit der höchsten GPVI-Fc-Konzentration die Inkubationszeit mit Plaquehomogenat auf 30 min verlängert wurde und die Inkubationstemperatur auf 37°C erhöht wurde.

4.2.3.2 Analyse der Wirkung von quervernetztem GPVI-Fc mittels MEA

In Experimenten, bei denen der Effekt von quervernetztem GPVI-Fc auf die Thrombozytenaggregation getestet werden sollte, wurde GPVI-Fc (Endkonzentrationen in der Testküvette von 6,6 nM bis 333 nM) entweder mit oder ohne anti-human-Fc IgG oder anti-human-Fc Fab2 in äquimolaren Konzentrationen für 10 min bei RT in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen vorinkubiert und anschließend zu den Blutproben gegeben, die bei 37°C für 3 min ohne Vorrühren in den Testküvetten aufgewärmt worden waren. Als Kontrollen wurden gegen humanes Fc-gerichtete IgG oder Fab2 Antikörper verwendet, entweder alleine oder nach Inkubation mit äquimolaren Konzentrationen von humanem Fc. Als Stimuli wurden Plaquehomogenat (333 µg/ml) oder Kollagen (0,1 bis 0,5 µg/ml) verwendet. Die Kollagen-konzentration wurde so gewählt, dass ähnliche Aggregationswerte wie nach Plaque-Stimulation erreicht wurden.

4.2.4 Thrombozytenaggregation unter arteriellen Flussbedingungen

Um die Situation der Plaque-Ruptur mit anschließender Thrombozytenaktivierung *in vivo* zu simulieren, wurde Plaquehomogenat oder Kollagen mit Hirudin-antikoaguliertem humanen Blut bei arteriellen Flussgeschwindigkeiten perfundiert.

4.2.4.1 Beschichtung von Deckgläschen mit atherosklerotischem Plaquehomogenat

Zur Beschichtung der Glasdeckgläschen mit Plaquematerial wurde Homogenat mit PBS im Verhältnis von 1:20 verdünnt und gevortext. Die Plaquesuspension (100 µl) wurde 30 min bei RT stehen gelassen, damit sich sehr große Plaquepartikel am Boden der Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße absetzen konnten. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, je 4 µl davon auf Glasdeckgläschen pipettiert, die zuvor mit Isopropanol (70%) gereinigt worden waren, und über eine Fläche von ca. 5 mm x 7 mm ausgestrichen. Die beschichteten Deckgläschen wurden bei RT getrocknet und über Nacht bis zum Experiment bei 4°C aufbewahrt.

4.2.4.2 Beschichtung von Deckgläschen mit Kollagen

Nach Verdünnung von Horm[®]-Kollagen in SKF-Puffer wurden je 3 µl der Verdünnung (20 oder 100 µg/ml) auf mit Isopropanol (70%) gereinigte Glasdeckgläschen pipettiert und über eine Fläche von ca. 5 mm x 7 mm ausgestrichen. Bis zur Verwendung wurden die beschichteten Deckgläschen in einer feuchten Kammer bei 4°C gelagert.

4.2.4.3 Durchführung der Flusskammerexperimente

Für Flusskammerexperimente wurden mit Plaquehomogenat oder Horm[®]-Kollagen beschichtete Glasdeckgläschen in Flusskammern (0,1 Luer oder 0,2 Luer ibidi sticky-Slides) montiert, die zuvor mit humanem Serumalbumin (HSA, 4% in PBS) behandelt worden waren. Die Flusskammern wurden auf dem Objektisch eines Fluoreszenzmikroskops befestigt (TE2000-E, Nikon), das mit einer Inkubationskammer (37°C) ausgestattet war. Die Flusskammern wurden mit einer Spritzensaugpumpe verbunden, zunächst mit PBS gespült und darauffolgend mit 4% HSA in PBS durchströmt, um freie unspezifische Bindungsstellen auf den Glasdeckgläschen zu blockieren. Anschließend wurden die Flusskammern mit Hirudin-antikoaguliertem Blut bei verschiedenen Arterien-typischen Strömungsgeschwindigkeiten (Scherraten 550/s, 600/s, 1100/s oder 1500/s) perfundiert.

4.2.4.4 Berechnung der Flussraten

Um die gewünschten Scherraten (550/s, 600/s, 1100/s oder 1500/s) zu erhalten, wurden die anzuwendenden Flussraten mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Flussrate (ml/min)} = (\text{Scherrate (1/s)} \times \text{Kammerhöhe (mm)}^2 \times \text{Kammerweite (mm)}) / 100^{109}$$

Dabei war die Kammerhöhe 109 μm bzw. 209 μm bei der Verwendung von 0,1 Luer bzw. 0,2 Luer sticky-Slides. Die von der ibidi-GmbH angegebene Kammerhöhe für 0,1 Luer bzw. 0,2 Luer sticky-Slides beträgt 100 bzw. 200 μm , jedoch muss die Höhe der Klebeschicht der sticky-Slides mit in die Kammerhöhe einberechnet werden, die laut Hersteller 50 μm beträgt. Da jedoch die Glasdeckgläschen sehr fest auf die sticky slides montiert wurden, wurde die Kammerhöhe mikroskopisch ausgemessen. Sie betrug $109 \pm 2 \mu\text{m}$ ($n = 10$) bzw. $209 \pm 2 \mu\text{m}$ ($n = 10$). Diese Werte wurden in die Berechnung der Flussrate einbezogen. Die Kammerweite betrug 5 mm.

4.2.4.5 Präparation der Blutproben für Flusskammerexperimente

Humanes Blut wurde zur Thrombozytenfärbung mit Mepacrin (10 μM) oder DiOC6 (1 μM) für 5 min bei 37°C vorinkubiert und danach weitere 5 min mit BLO8-1, 5C4, GPVI-Fc oder Kontrollproteinen inkubiert.

In Experimenten, bei denen sowohl die Cyclooxygenase-1 als auch der P2Y₁₂-Rezeptor blockiert wurden, wurde ASS (1 mM) während der Blutentnahme zum Blut hinzugefügt (vorgelegt in der Blutentnahmespritze, gelöst in Puffer C), wohingegen die P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten AR-C69931MX (1 μM) oder AR-C126532XX (5 μM) für 5 min in ASS enthaltendem Blut vorinkubiert wurden.

Um eine Quervernetzung von GPVI-Fc über deren Fc-Teile zu erzielen, wurde GPVI-Fc mit äquimolaren Konzentrationen von anti-human-Fc IgG (gegen humanes Fc gerichtete IgG Antikörper) oder anti-human-Fc Fab2 (gegen humanes Fc gerichtete Fab2 Antikörper) für 10 min bei RT in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen inkubiert. Die Mischungen wurden in einer Endkonzentration von 50 μg GPVI-Fc/ml (333 nM) dem Blut vor der Perfusion beigefügt. Humanes Fc (333 nM), das ebenfalls mit äquimolaren Konzentrationen von anti-human-Fc IgG oder anti-human-Fc Fab2 inkubiert wurde, diente als Kontrolle. Sollte nur die Thrombozytenadhäsion ohne anschließende Aggregation untersucht werden, wurde das Blut entweder mit Abciximab (20 $\mu\text{g/ml}$) oder mit RGDS (1 mM) für 10 min bei 37°C vorinkubiert, um das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ zu blockieren.

4.2.4.6 Analyse und Quantifizierung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation an atherosklerotisches Plauehomogenat oder Kollagen unter arteriellen Strömungsbedingungen

Die Thrombozytenadhäsion und -aggregation an Plauematerial oder Kollagen wurde in Echtzeit mittels Fluoreszenzmikroskopie (Exzitation: 485/25 nm, Emission: 528/38 nm, Detektion der mit Mepacrine oder DiOC6 gefärbten Thrombozyten) mit Hilfe eines 10x Objektivs (NA 0,4) mit einem Nikon TE2000E Mikroskop und einer CoolSNAP HQ2 CCD Videokamera kontinuierlich (1 Bild/sek oder 1 Bild/5 sek) aufgenommen. Die entstandenen Videos wurden mit Hilfe der NIS-element 3.2 Software quantitativ ausgewertet, indem nach Abzug des Hintergrundes in jedem Bild und nach Setzen eines adäquaten Fluoreszenzschwellenwertes die mit Thrombozyten bedeckte Bildfläche gemessen wurde. Dabei entsprach ein Wert von 1,0 "Flächenbedeckung mit Thrombozyten" der Bedeckung der gesamten Bildfläche. Der Bereich der Bildfläche betrug 669 µm x 896 µm. Die in den Graphen angegebenen Werte ergeben sich aus dem Mittelwert (MW) + Standardabweichung (SD) (gemessen jede sek oder alle 5 sek) von n Experimenten mit Blut von verschiedenen Spendern. Experimente, bei denen die Wirkung von 5C4 und BLO8-1 mit der von GPVI-Fc bei verschiedenen Scherraten verglichen wurde, wurden in Duplikaten durchgeführt.

4.2.4.7 Vorinkubation von GPVI-Fc mit Plauehomogenat beschichteten Deckgläschen

In Experimenten, in denen die Wirkung von GPVI-Fc nach Zugabe zum Blut mit der von GPVI-Fc nach Vorinkubation mit Plauehomogenat unter Strömungsbedingungen verglichen wurde, wurden mit Plaue beschichtete Deckgläschen entweder mit Puffer R (Kontrolle), hohen äquimolaren Konzentrationen von Fc (34 µg in 40 µl = 850 µg/ml) oder GPVI-Fc (100 µg in 40 µl = 2500 µg/ml) für 5 min bei 37°C inkubiert, bevor die Deckgläschen in die Flusskammern eingebaut und bei einer Scherrate von 550/s mit Blut perfundiert wurden. Bei diesen Versuchen waren die GPVI-Fc-Konzentrationen bei der Vorinkubation von GPVI-Fc auf Plaue 50-fach höher als die finalen Konzentrationen von GPVI-Fc nach direkter Zugabe zum Blut.

4.2.4.8 Simultane Messung der Kinetik der Bindung von Thrombozyten und GPVI-Fc an Plauehomogenat

Für den Vergleich der Bindungskinetik von DiOC6-markierten Thrombozyten (Exzitation: 485/25 nm) und PE-markiertem GPVI-Fc (Exzitation: 560/25 nm) unter niedriger (550/s) und hoher Scherrate (1100/s), wurde ein Nikon TE2000-E Mikroskop mit einem Emissionsfilter Quad-Set F66-888 (DAPI/FITC/Cy3/Cy5) und ein 10x Objektiv (NA 0,4) verwendet. Für die Fluoreszenz-Markierung von GPVI-Fc kamen PE-gekoppelte anti-human-Fc Antikörper (Verhältnis GPVI-Fc: Antikörper = 200:1) zum Einsatz, die mit GPVI-Fc in Eppendorf-

Mikroreaktionsgefäßen für 10 min bei RT vor Zugabe zum Blut inkubiert wurden. Die Kinetik der Bindung von Thrombozyten und GPVI-Fc an Plaquehomogenat wurde kontinuierlich mittels Videomikroskopie aufgezeichnet und die mit Thrombozyten und GPVI-Fc bedeckte Fläche wie unter 4.2.4.6 beschrieben ausgewertet.

4.2.4.9 Bestimmung der Bindungskinetik von quervernetztem und unvernetztem GPVI-Fc an Kollagenfasern unter Strömungsbedingungen

Um fluoreszenzmarkiertes, unvernetztes GPVI-Fc zu erhalten, wurde GPVI-Fc mit PE-gekoppelten anti-human-Fc Fab2 Antikörpern in einem Verhältnis von 20:1 in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen für 10 min bei RT inkubiert (GPVI-Fc*Fab2). Zur Herstellung und Sichtbarmachung von quervernetztem GPVI-Fc wurde GPVI-Fc mit unmarkierten anti-human-Fc Fab2 Antikörpern, die 10% PE-konjugiertes anti-human-Fc Fab2 enthielten, in einem molaren Verhältnis von 1:1 in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen gemischt und für 10 min bei RT inkubiert (GPVI-Fc*Fab2-XL). Die Mischungen wurden mit einer finalen GPVI-Fc-Konzentration von 333 nM vor der Perfusion von Kollagen bei einer Scherrate von 600/s dem Abciximab enthaltenden Blut beigegeben. Die Bindung von fluoreszierendem GPVI-Fc (unvernetzt oder quervernetzt) an die Kollagenfasern (Exzitation: 560/25 nm, Emission: 605/35 nm) wurde mit Hilfe eines 10x Objektivs (NA 0,4) kontinuierlich aufgenommen (1 Bild/sek) und die fluoreszierende Fläche wurde mittels der NIS-element 3.2 Software nach adäquater Schwellensetzung quantifiziert.

4.2.4.10 Vergleich der Wirkung von GPVI-Fc*Fab mit GPVI-Fc*Fab2-XL

Zur Überprüfung des Mechanismus der Antikörper-induzierten Quervernetzung von GPVI-Fc wurden Experimente nach Inkubation von GPVI-Fc mit anti-human-Fc Fab2 und anti-human-Fc Fab Antikörpern (die nicht in der Lage sind, GPVI-Fc quervernetzen) durchgeführt. Dazu wurde GPVI-Fc (0,6 µM) entweder mit Zenon[®] labeling Reagenz (anti-human-Fc Fab-Alexa Fluor[®] 594, 1,8 µM) (GPVI-Fc*Fab) vorinkubiert, oder GPVI-Fc (0,6 µM) wurde mit äquimolaren Mengen von anti-human-Fc Fab2 Antikörpern für 5 min bei RT vorinkubiert (GPVI-Fc*Fab2-XL). Die Mischungen wurden anschließend auf mit Plaquehomogenat oder Kollagen beschichtete Deckgläschen pipettiert und für 5 min bei 37°C inkubiert, bevor sie mit Blut bei einer Scherrate von 600/s perfundiert wurden. Im Falle der anschließenden Analyse der Proben durch "structured illumination microscopy" (SIM) wurden äquimolare Mengen an PE-markiertem anti-human-Fc Fab2 für die GPVI-Fc-Quervernetzung verwendet und die Proben wurden nach der Perfusion mit Blut, wie in 4.2.5.3 beschrieben, fixiert und die Thrombozyten gefärbt.

4.2.5 Analyse der GPVI-Fc- und Thrombozytenbindung an Plaque und Kollagen durch hochauflösende bildgebende Verfahren

Um die Bindung von GPVI-Fc (sowohl unvernetzt, als auch in quervernetzten Komplexen) und die Adhäsion/Aggregation von Thrombozyten an Plaque oder Kollagen hochauflösend sichtbar machen zu können, wurden vier verschiedene Mikroskope verwendet: Das Nikon TE2000-E Mikroskop diente zur Echtzeitmessung der Thrombozytenadhäsion/-aggregation und der GPVI-Fc-Bindung an Plaque und Kollagen unter Strömungsbedingungen. Zur 3-dimensionalen Aufnahme der Aggregation an Plaque unter Strömungsbedingungen wurde mit einem Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop gearbeitet. Um fixierte Flusskammerpräparate detaillierter analysieren zu können, aber auch zur Darstellung von gefärbten Präparaten ohne vorherige Blutperfusion, wurde ein hochauflösendes ELYRA-Mikroskop verwendet. Ein „stimulated emission depletion“ (STED)-Mikroskop wurde zur Sichtbarmachung der Bindung von GPVI-Fc-Komplexen an Kollagen in höchstmöglicher Auflösung benutzt.

4.2.5.1 Fluoreszenz-Mikroskopie und differentielle Interferenzkontrast (DIC)-Mikroskopie von GPVI-Fc und Thrombozyten

Mit dem Nikon TE2000-E Mikroskop wurden die Kollagenfasern, das Plaquehomogenat und die Thrombozytenadhäsion/-aggregation mittels differentieller Interferenzkontrast (DIC)-Mikroskopie sichtbar gemacht und in Bezug zur Bindung von PE-markiertem GPVI-Fc an die Kollagenfasern und den Plaque (Exzitation: 560/25 nm, Emissionsfilter Quad-Set F66-888 (DAPI/FITC/Cy3/Cy5)) untersucht. Dazu wurde ein 100x Öl-Objektiv (NA 1,4) verwendet und die Thrombozyten- und GPVI-Fc-Bindung an Plaque oder Kollagen wurde kontinuierlich durch Videomikroskopie aufgezeichnet (1 Bild (DIC und Fluoreszenz)/2 oder 5 sek). Für die Fluoreszenzmarkierung von GPVI-Fc wurden PE-gekoppelte anti-human-Fc Antikörper (Verhältnis GPVI-Fc : Antikörper = 200:1) eingesetzt, die mit GPVI-Fc in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen für 10 min bei RT vor Zugabe zum Blut inkubiert wurden.

4.2.5.2 Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (TPLSM) der Thrombozytenaggregation an Plaquehomogenat in Anwesenheit von GPVI-Fc

Zur 3-dimensionalen Echtzeitmessung der Thrombozytenaggregatbildung an Plaquehomogenat wurde ein Leica SP5IIMP Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop, ausgestattet mit einem Ti:Sa gepulsten Laser (770 nm) und einem 63x Öl-Objektiv (NA 1,4), verwendet. Die spektralen Einstellungen wurden so gewählt, dass die Detektionseffizienz maximiert und ein Durchscheitern zwischen den Kanälen vermieden wurde. Die detektierten Fluoreszenzsignale ergaben sich aus der Autofluoreszenz der Plaquekomponenten (410 - 490 nm), den markierten Thrombozyten (DiOC6: 510-532 nm), und aus GPVI-Fc, das mit Alexa Fluor[®] 594-gekoppelten anti-human-Fc Antikörpern in einem molaren Verhältnis

von 20:1 (Verhältnis GPVI-Fc : Antikörper) markiert wurde (601-634 nm). Markiertes GPVI-Fc wurde vor der Perfusion über Plauehomogenat dem Blut beigegeben. Um die Gesamtauflösung zu verbessern, wurde zusätzlich ein optischer Zoom angewendet. Die 3-dimensionale Bilderfassungsrate war 0,08 – 0,15 Hz, abhängig von der z-Schrittgröße und z-Tiefe des betrachteten Volumens (einzelne xy-Bildrate, 4-6 Hz). Zur 3D-Aufarbeitung wurden das Huygens Professional 15.10 Software-Paket und die Leica LasX (1.8) Software verwendet.

4.2.5.3 Fixierung und anschließende Thrombozytenfärbung von Flusskammerpräparaten

Um die Flusskammerpräparate, die mit Hilfe eines Nikon TE2000-E Mikroskops hergestellt worden waren, anschließend mittels SIM betrachten zu können, mussten diese unter Strömungsbedingungen fixiert und die Thrombozyten nochmals angefärbt werden. Die Präparate wurden 3 bis 5 min nach Start der Blutperfusion zur Fixierung in der Flusskammer für 5 min mit Fixationspuffer (4% PFA in PBS, 5 mM EDTA) überströmt. Da die Färbung der Thrombozyten mit DiOC6 zu schwach war und während der anschließenden Betrachtung der Präparate im ELYRA-Mikroskop schnell ausbleich, wurden die Präparate nach der Fixierung zuerst mit einem anti-CD41 Primärantikörper (1:200-Verdünnung in Waschpuffer), und darauffolgend mit einem DyLight[®] 488-konjugierten Sekundärantikörper (1:100-Verdünnung in Waschpuffer) für je 2 min inkubiert. Nach der Fixierung und zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Präparate für 1-3 min mit Waschpuffer überströmt. Um eine Vermischung von Blut mit PFA und dem Waschpuffer mit den einzelnen Färbelösungen zu vermeiden, wurde zwischen den einzelnen zu durchspülenden Lösungen eine winzige Luftblase im Schlauch aufgenommen. Die Flusskammern wurden anschließend mit Fluoro-Gel oder Prolong[®] Diamond Einbettungsmedium befüllt.

4.2.5.4 Kollagenfärbung für Flusskammerexperimente

Um Kollagenstrukturen im Plauehomogenat sichtbar zu machen und auch um Horm[®]-Kollagen anzufärben, wurden mit Plauehomogenat oder Kollagen beschichtete Glasdeckgläschen mit anti-Kollagen Typ I und Typ III Primärantikörpern (5 µg/ml) für 15 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert, nachdem unspezifische Bindungsstellen auf den Deckgläschen mit 4% HSA in PBS blockiert wurden. Nach dem Waschen der Präparate mit 0,5% HSA in PBS wurden diese mit Alexa Fluor[®] 405-konjugierten Sekundärantikörpern (10 µg/ml) behandelt und für 10 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die gefärbten Deckgläschen auf die Flusskammern geklebt.

4.2.5.5 SIM-Bildgebung der GPVI-Fc (unvernetzt oder quervernetzt)-Bindung und Thrombozytenadhäsion an Plaque und Kollagen

Um eine höhere optische Auflösung der Fluoreszenz (≈ 100 nm) als mit dem Nikon TE2000-E Mikroskop zu erreichen, wurden Flusskammerpräparate, wie unter 4.2.5.3 beschrieben, fixiert und mit Hilfe eines ELYRA PS.1 Mikroskops analysiert. Dünne (150-200 nm) z-Schnitte hochauflösender Bilder wurden für jeden Fluoreszenzkanal aufgenommen. Die entstandenen Bilder wurden mit Hilfe der ZEN Software analysiert. Zur 3D-Aufarbeitung wurde die ImagePro Premier 3D v9.1 Software verwendet.

4.2.5.5.1 SIM der GPVI-Fc-Bindung und Thrombozytenadhäsion an Plaquehomogenat oder an Kollagen nach Blutperfusion

Zur Untersuchung der GPVI-Fc-Bindung an Plaquehomogenat wurde GPVI-Fc zur Fluoreszenzmarkierung mit Alexa Fluor[®] 594-konjugierten anti-human-Fc Antikörpern in einem molaren Verhältnis von 100:1 (GPVI-Fc : Antikörper) in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen für 10 min bei RT inkubiert und kurz vor Beginn der Perfusion dem Abciximab enthaltenden Blut beigegeben. Zur Analyse der GPVI-Fc-Bindung an Kollagen wurde GPVI-Fc mit PE-konjugierten anti-human-Fc IgG Antikörpern in einem molaren Verhältnis von 200:1 (GPVI-Fc : Antikörper) angefärbt, bevor es vor der Perfusion über Kollagen dem RGDS enthaltenden Blut beigegeben wurde. Nach der Perfusion wurden die Präparate, wie unter 4.2.5.3 beschrieben, fixiert und die Thrombozyten wurden gefärbt.

4.2.5.5.2 Vergleich der Bindung von quervernetztem und unvernetztem GPVI-Fc und Thrombozyten an Kollagen nach Blutperfusion mittels SIM

GPVI-Fc wurde mit anti-human-Fc IgG oder Fab2 Antikörpern entweder in einem molaren Verhältnis von 20:1 (unvernetztes GPVI-Fc) in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen für 10 min bei RT inkubiert oder in einem molaren Verhältnis von 1:1, um quervernetztes GPVI-Fc zu erhalten. In beiden Ansätzen enthielten die unmarkierten Antikörper 10% PE-konjugierte anti-human-Fc Antikörper (IgG oder Fab2). Die Mischungen wurden dem Abciximab enthaltenden Blut vor der Perfusion mit einer finalen Konzentration von GPVI-Fc von 333 nM beigegeben. In einigen Experimenten, bei denen nur die Thrombozytenadhäsion an Kollagen untersucht wurde, wurde dem Blut nur unmarkiertes GPVI-Fc beigemischt. Nach der Perfusion wurden die Präparate, wie unter 4.2.5.3 beschrieben, fixiert und die Thrombozyten gefärbt.

4.2.5.5.3 Färbung von Kollagen mit quervernetztem und unvernetztem GPVI-Fc für SIM

Kollagen wurde direkt mit fluoreszenzmarkiertem GPVI-Fc (quervernetzt oder unvernetzt) inkubiert. Dazu wurde GPVI-Fc mit Alexa Fluor[®] 488-konjugierten anti-human-Fc IgG oder anti-human-Fc Fab2 Antikörpern für 10 min entweder in einem molaren Verhältnis von 1:1

inkubiert, um GPVI-Fc quervernetzen, oder in einem Verhältnis von 10:1 gemischt, um GPVI-Fc anzufärben, ohne es quervernetzen. Kollagen-beschichtete Deckgläschen wurden anschließend für 20 min bei RT mit quervernetztem oder unvernetztem GPVI-Fc (666 nM) inkubiert, bevor die Präparate mit PFA 4% fixiert und in Fluoro-Gel zur weiteren Analyse mit SIM eingebettet wurden.

4.2.5.6 Stimulated emission depletion (STED)-Mikroskopie zur Analyse der Bindung von quervernetztem und unvernetztem GPVI-Fc an Kollagen

Um die Bindung von quervernetztem und unvernetztem GPVI-Fc an Kollagen mit höchstmöglicher Auflösung zu visualisieren (<100 nm), wurde neben der unter 4.2.5.5.3 beschriebenen Analyse mit SIM auch nanoskopische STED-Mikroskopie mittels eines Leica SP8 STED 3X Mikroskops angewendet. Kollagen-beschichtete Glasdeckgläschen wurden simultan mit anti-Kollagen Typ I und Typ III Antikörpern (0,5 µg/10 µl pro Präparat = 333 nM) und mit GPVI-Fc (0,5 µg/10 µl = 333 nM), das entweder quervernetzt oder unvernetzt war, für 20 min bei RT inkubiert. Dazu wurden die anti-Kollagen-Antikörper zuvor direkt mit Zenon[®] Alexa Fluor[®] 594 Fab angefärbt und GPVI-Fc wurde mit Alexa Fluor[®] 488-konjugierten anti-human-Fc IgG oder anti-human-Fc Fab2 Antikörpern entweder in einem molaren Verhältnis von 1:1 (GPVI-Fc : Antikörper) zur GPVI-Fc-Quervernetzung oder in einem molaren Verhältnis von 10:1 für das unvernetzte GPVI-Fc inkubiert. Nach dem Waschen und Fixieren der Präparate mit 4% PFA, wurden sie in Prolong[®] Diamond Medium eingebettet. 3D STED-Bildgebung wurde mit Hilfe eines 100x Öl-Objectivs (NA 1,4) vorgenommen. Bildrekonstruktionen wurden unter Verwendung des LAS X Software-Paketes und Dekonvolution mit Hilfe des Huygens Professional Software-Paketes (15.10) durchgeführt.

4.2.6 Analytische Ultrazentrifugation zur Charakterisierung von GPVI-Fc-Komplexen

Zur Abschätzung des Molakulargewichts der quervernetzten GPVI-Fc-Komplexe mittels analytischer Ultrazentrifugation wurden folgende Proben hergestellt: Um GPVI-Fc mit anti-Fc-Antikörpern zu sättigen, wurde ein GPVI-Fc : Antikörper -Verhältnis von 10:1 gewählt: GPVI-Fc (2,5 µM; 375 µg/ml) wurde mit Alexa Fluor[®] 488-konjugierten anti-human-Fc Fab2 Antikörpern (0,25 µM) oder Alexa Fluor[®] 488-konjugierten anti-human-Fc IgG Antikörpern (0,25 µM) inkubiert (GPVI-Fc*Fab2 bzw. GPVI-Fc*IgG). Für die Quervernetzung von GPVI-Fc wurde GPVI-Fc (0,4 µM; 60 µg/ml) mit Alexa Fluor[®] 488-konjugierten anti-human-Fc Fab2 Antikörpern (0,4 µM) oder Alexa Fluor[®] 488-konjugierten anti-human-Fc IgG Antikörpern (0,4 µM) in einem Verhältnis von 1:1 für 10 min bei RT inkubiert (GPVI-Fc*Fab2-XL, GPVI-Fc*IgG-XL). Anschließend wurde mit HSA 0,5% in PBS ein Probenvolumen von 0,5 ml

eingestellt. Die Sedimentation der Proben wurde mit einer analytischen Ultrazentrifuge (ProteomLab XL-A) gemessen.

4.2.7 Bestimmung der *in vitro* Verschlusszeit mit dem „platelet function analyzer“ PFA-200

Die PFA-200-Vorrichtung ist eine Weiterentwicklung des Thrombostat-Systems, das die Situation in einem verletzten Blutgefäß und somit die primäre Hämostase simuliert und das für die Messung der Blutungszeit *in vitro* etabliert wurde^{110,111}. Somit ist es möglich, Thrombozytenfunktionsstörungen zu erkennen und Effekte antithrombozytärer Substanzen auf die Hämostase zu bestimmen. Das Gerät saugt Citrat-antikoaguliertes Blut (0,8 ml pro Probe) unter konstantem Vakuum aus einem Vorratsbehälter durch eine Kapillare und ein kleines Loch in einem Membranfilter, der mit Kollagen/ADP oder Kollagen/Epinephrin beschichtet ist. Der Kontakt der Thrombozyten mit der Kollagenbeschichtung führt zur Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten, wobei ADP und Epinephrin eine weitere Aktivierung der Thrombozyten verursachen. Die Thrombozytenaggregation an der Membran führt im Laufe der Zeit zum Verschluss der Membranöffnung und somit zum Anhalten des Blutstromes, was mittels Drucksensoren gemessen wird. Die Zeit von Beginn der Messung bis zur vollen Okklusion der Membranöffnung wird gemessen und als "*in vitro* Verschlusszeit" angegeben.

4.2.8 Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) von Experimenten mit Proben von verschiedenen Blutspendern (n) angegeben. Bei Konzentrations-Wirkungs-Reihen wurde die Aggregation unter Zugabe der spezifischen Inhibitoren (GPVI-Fc, BLO8-1, 5C4) in % der Aggregation unter entsprechenden Kontrollbedingungen (Fc-Kontrollprotein, TRIS-Glycin-Puffer bzw. IgG1) desselben Spenders angegeben. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde das SigmaStat 3.5-Programm-Paket verwendet. Bei jeder Inhibitor-Konzentration wurde der Unterschied zur parallel gemessenen Kontrolle mit dem zweiseitigen gepaarten t-Test (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) oder, falls die Voraussetzungen hierfür nicht gegeben waren, mit dem Mann-Whitney U-Test (§: $p < 0,05$; §§: $p < 0,01$; §§§: $p < 0,001$) analysiert. Ergebnisse mehrerer, parallel geführter experimenteller Bedingungen wurden mit verbundener Varianz-Analyse mit sekundären Paar-Vergleichen nach Student-Newman-Keuls (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) analysiert. Falls die Voraussetzungen hierfür nicht gegeben waren, wurden multiple Konditionen mit Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis bzw. Friedman analysiert, gefolgt von sekundären Paarvergleichen nach Tukey (§: $p < 0,05$; §§: $p < 0,01$; §§§: $p < 0,001$). Fluss-Experimente wurden mittels dreifacher Varianzanalyse mit der Scherrate, dem Inhibitor und der Zeit als

unabhängige Faktoren analysiert. Sekundäre Paar-Vergleiche innerhalb eines Faktors wurden nach der Methode von Holm-Sidak (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Wirkung von GPVI-Fc und GPVI-Antikörpern auf die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen

Die Thrombozytenaggregation im Blut wurde mit Plaquehomogenat oder mit Horm[®]-Kollagen, das aus equinem Kollagen Typ I und Typ III^{4,112,113} besteht, stimuliert. Auch Plaque enthält hauptsächlich Typ I und Typ III Kollagene^{23,35}.

5.1.1 Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch GPVI-Fc

Zuerst wurde der Effekt von GPVI-Fc auf die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation im Blut unter statischen Bedingungen getestet. Diese Aggregation ist vor allem abhängig von der thrombozytären Freisetzung von ADP und TxA₂, die in der gerührten stimulierten Blutprobe akkumulieren³⁹. Neben Experimenten, bei denen GPVI-Fc mit Blut vorinkubiert und anschließend mit Plaque stimuliert wurde, wurden Experimente durchgeführt, bei denen Plaquehomogenat direkt mit GPVI-Fc vorinkubiert wurde. Dabei waren die GPVI-Fc-Konzentrationen 35-fach höher als nach Zugabe von GPVI-Fc zum Blut, die finalen GPVI-Fc-Konzentrationen im Blut waren jedoch identisch. Dieser Ansatz wurde vorgenommen, um alle potentiellen GPVI-Bindungsstellen für GPVI-Fc an Kollagen maximal abzusättigen. Der Versuchsaufbau dieser MEA („multiple electrode aggregometry“)-Experimente ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

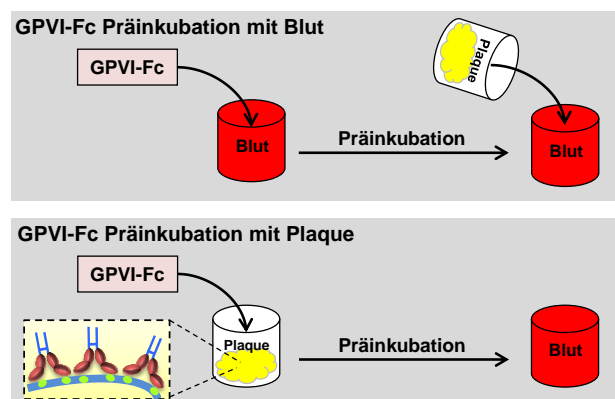


Abbildung 5: Schematischer Versuchsaufbau der MEA-Experimente mit GPVI-Fc

Die Aggregationsmessungen zeigten, dass GPVI-Fc die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation verzögerte. In GPVI-Fc behandelten Proben war eine Verlängerung der „lag time“ festzustellen, d.h. der Zeit bis zum Beginn der Aggregation

(Abbildung 6). Die Aggregationswerte (AU) am Ende der Messung wurden allerdings durch GPVI-Fc nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 6 A). In Plaque-stimulierten Proben stieg nach Zugabe der Proteine zum Blut die "lag time" von 65 ± 19 sek (Fc-Kontrollprotein) auf 119 ± 23 sek ($n = 6$; $p < 0,001$) mit GPVI-Fc ($50 \mu\text{g/ml}$; 300 nM) an, und nach vorheriger Inkubation der Proteine mit Plaquehomogenat von 72 ± 20 sek (Fc-Kontrollprotein) auf 134 ± 25 sek ($n = 6$; $p < 0,001$) mit GPVI-Fc (Abbildung 6 B). In Kollagen-stimulierten Proben stieg die "lag time" von 77 ± 20 sek (Fc-Kontrollprotein) auf 124 ± 19 sek ($n = 6$; $p < 0,001$) mit GPVI-Fc ($50 \mu\text{g/ml}$; 300 nM) an (Abbildung 6 B).

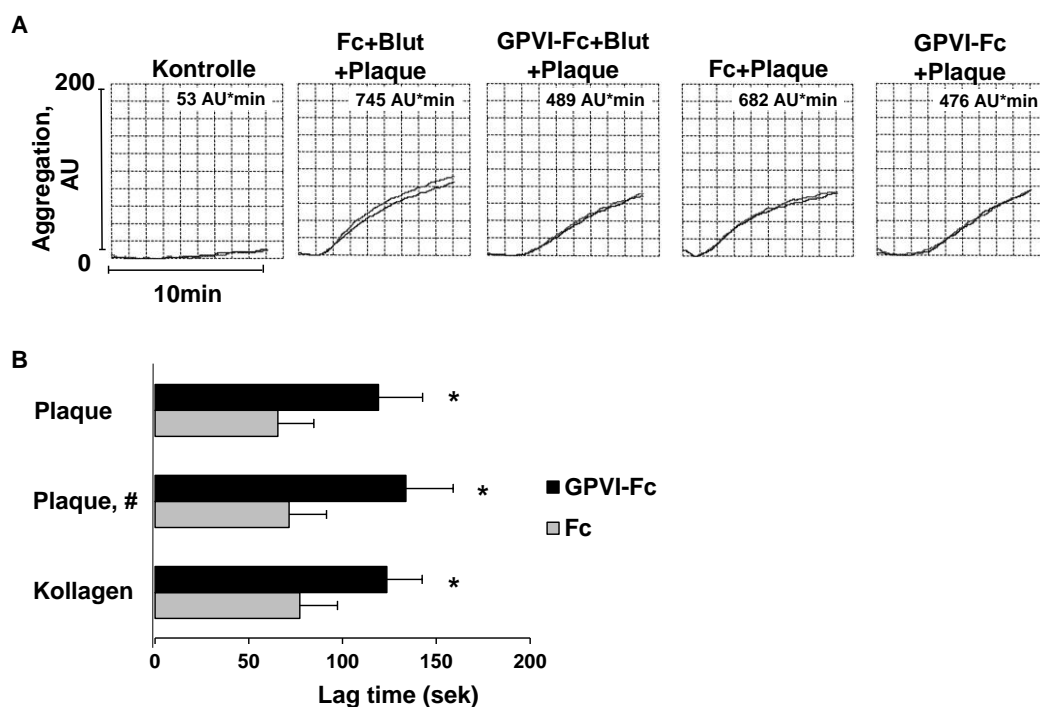


Abbildung 6: GPVI-Fc vermindert die statische Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation mit Kollagen oder Plaque durch Erhöhung der "lag-time"

(A) Repräsentative MEA-Kurven der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation im Blut. Kurven 1 bis 3: Blut wurde mit äquimolaren Konzentrationen (333 nM) von Fc ($16 \mu\text{g/ml}$) oder GPVI-Fc ($50 \mu\text{g/ml}$) vorinkubiert. Kurven 4 und 5: Plaque-Proben wurden mit einer 35-fach höheren äquimolaren Konzentration ($11,7 \mu\text{M}$) von Fc ($560 \mu\text{g/ml}$) oder GPVI-Fc ($1750 \mu\text{g/ml}$) für 3 min vorinkubiert, bevor sie zum Blut gegeben wurden. Es ergaben sich dieselben finalen Konzentrationen wie nach direkter Zugabe zum Blut. Die Zahlen zeigen die kumulative Aggregation ($\text{AU} \cdot \text{min}$) gemessen über 10 min . Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

(B) Graphische Darstellung der "lag time". Fc ($16 \mu\text{g/ml}$) oder GPVI-Fc ($50 \mu\text{g/ml}$) wurden im Blut (Plaque, Kollagen) oder mit Plaquematerial (Plaque, #) vorinkubiert und die Proben wurden mit Plaque oder Kollagen stimuliert. MW + SD, $n = 6$. *: $p < 0,05$ für GPVI-Fc vs. Fc mit zweiseitigem, gepaartem t -Test.

Die Kollagen-stimulierte Thrombozytenaggregation wurde nach GPVI-Fc-Behandlung des Blutes dosisabhängig maximal um 45% vermindert (Abbildung 7 A). Die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation wurde ebenfalls reduziert, maximal um 51% , wenn Blut mit GPVI-Fc vorbehandelt wurde (Abbildung 7 B). Erstaunlicherweise war die Hemmung nicht

signifikant stärker, wenn Plaque mit 35-fach höheren GPVI-Fc-Konzentrationen vorinkubiert wurde, bevor die Blutproben stimuliert wurden (Abbildung 7 C).

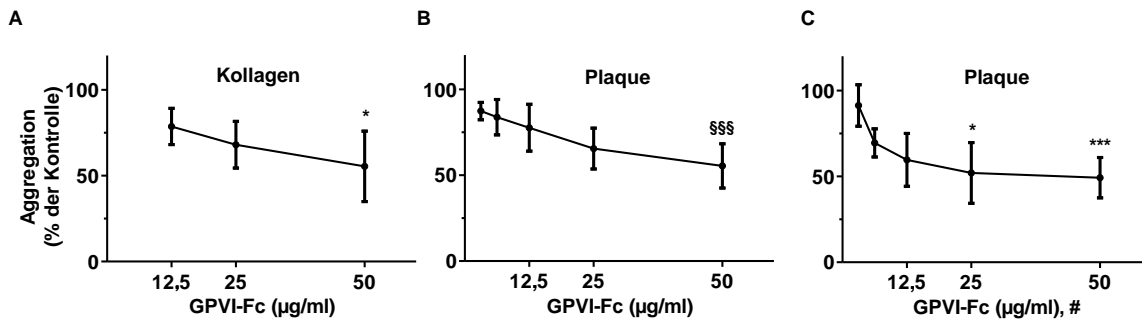


Abbildung 7: GPVI-Fc vermindert dosisabhängig die statische Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation mit Kollagen oder Plaque

(A und B) Blut wurde mit äquimolaren Konzentrationen (21, 42, 83, 167, 333 nM) von GPVI-Fc (3,1; 6,3; 12,5; 25; 50 µg/ml) oder Fc-Kontrollprotein in steigenden Konzentrationen präinkubiert, bevor es mit (A) Kollagen (0,5 µg/ml) oder mit (B) Plaque (833 µg/ml) für 5 min stimuliert wurde. (C) Plaque wurde mit äquimolaren Konzentrationen (0,7; 1,5; 3; 6; 12 µM) von GPVI-Fc (109, 219, 437, 875, 1750 µg/ml) oder Fc-Kontrollprotein für 3 min präinkubiert, bevor die Mischungen dem Blut beigegeben wurden, was dieselben finalen Konzentrationen (#) ergab wie in B. MW ± SD in % der zeitgleichen Fc-Kontrolle, n = 3-11. *: p<0,05; ***: p<0,001 für GPVI-Fc vs. zeitgleiche Kontrolle mit zweiseitigem, gepaartem t-Test bzw. §§§: p<0,001 mit Mann-Whitney U-Test. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

Selbst als die Präinkubationszeit von 3 min auf 30 min ausgedehnt wurde und statt bei RT bei 37°C inkubiert wurde, war die Hemmung mit GPVI-Fc nicht stärker (Abbildung 8). Auch hier waren die GPVI-Fc- und Fc-Konzentrationen bei der Präinkubation 35-fach höher als die Konzentrationen im Blut. Die finalen Konzentrationen im Blut waren jedoch in beiden Versuchsansätzen (Zugabe von GPVI-Fc zum Blut und Präinkubation von GPVI-Fc mit Plaque vor der Zugabe zum Blut) identisch.

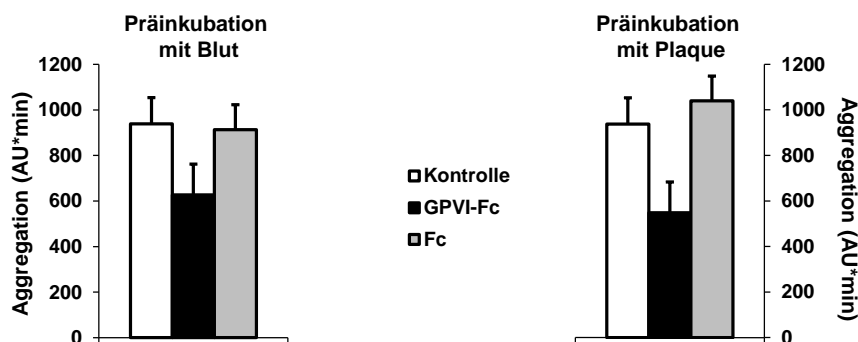


Abbildung 8: Präinkubation von Plaque mit einem Überschuss an GPVI-Fc hemmt die Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen nicht stärker als GPVI-Fc nach Zugabe zum Blut (Links) Blut wurde mit Puffer R (Kontrolle), äquimolaren Konzentrationen (333 nM) von GPVI-Fc (50 µg/ml) oder Fc-Kontrollprotein (17 µg/ml) für 3 min inkubiert, bevor es mit Plaquehomogenat (833 µg/ml) stimuliert wurde. (Rechts) Plaque wurde mit Puffer R (Kontrolle), äquimolaren Konzentrationen (11,7 µM) von GPVI-Fc (1750 µg/ml) oder Fc-Kontrollprotein (595 µg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert bevor die Aliquots zum Blut in die MEA-Küvetten transferiert wurden und die Aggregation gemessen wurde. Dargestellt sind kumulative Aggregationswerte (AU*min) gemessen über 10 min. MW + SD, n = 5. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

Die Hemmung durch GPVI-Fc war spezifisch, da GPVI-Fc bei Stimulation des Blutes mit ADP und TRAP die Thrombozytenaggregation nicht beeinflusste (Abbildung 9).

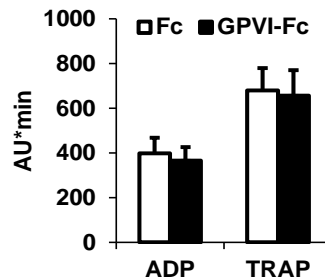


Abbildung 9: GPVI-Fc hat keinen Effekt auf die statische Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation mit ADP oder TRAP

Blut wurde mit äquimolaren Konzentrationen (333 nM) von GPVI-Fc (50 µg/ml) oder Fc-Kontrollprotein präinkubiert bevor es mit ADP (5 µM) oder TRAP (15 µM) für 5 min stimuliert wurde (MW + SD, n = 4). Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

5.1.2 Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch GPVI-Antikörper

Neben der Wirkung von GPVI-Fc auf die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation wurde der Effekt zweier GPVI-Antikörper mittels MEA getestet. Die GPVI-Antikörper BLO8-1 (10 µg/ml; 833 nM) und 5C4 (1,25 µg/ml; 25 nM) hemmten die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation konzentrationsabhängig fast vollständig (Abbildung 10). Die höchste Konzentration von BLO8-1 verminderte die Aggregation auf 12% der Kontrolle (n = 9) nach Plaque-Stimulation und auf 16% (n = 8) nach Kollagen-Stimulation, wobei die höchste Konzentration von 5C4 die Aggregation auf 7% der Kontrolle (n = 5) nach Plaque-Stimulation und auf 18% (n = 5) nach Kollagen-Stimulation reduzierte (Abbildung 10 B).

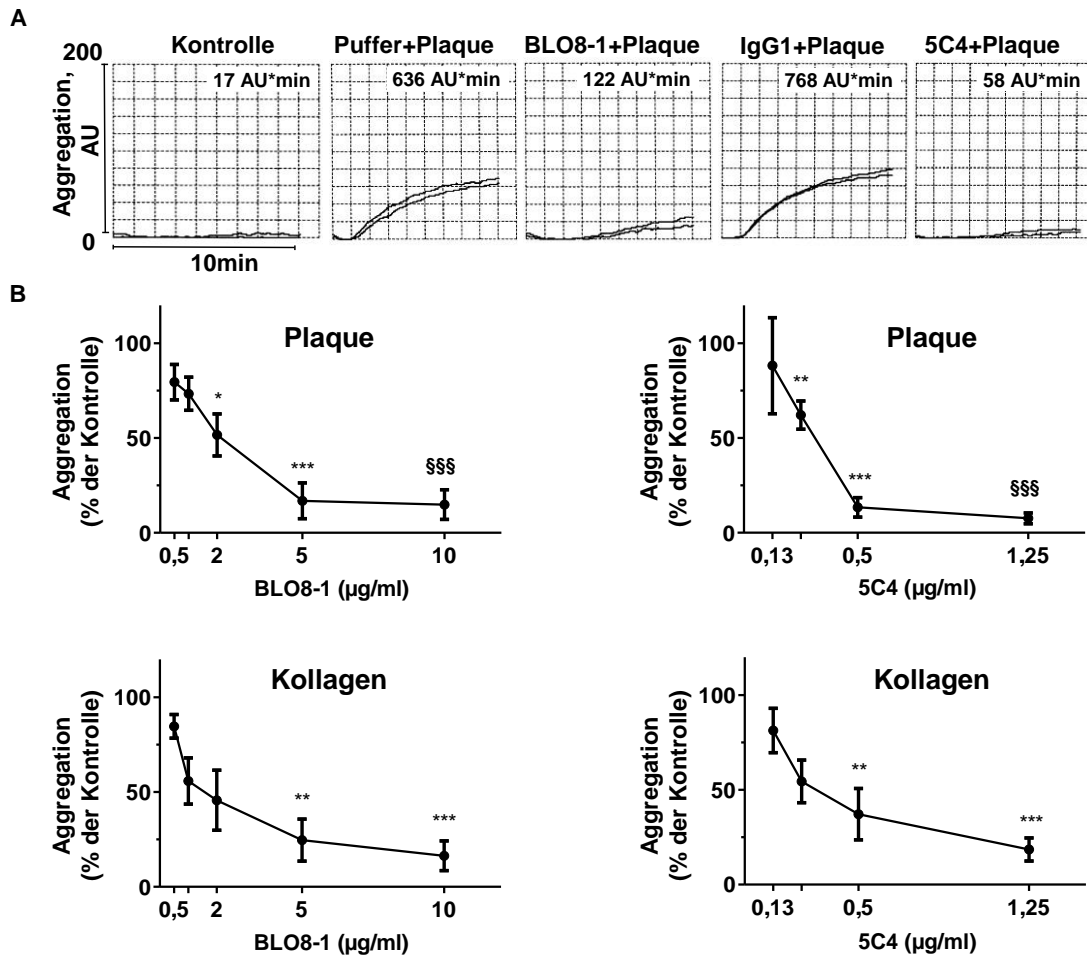


Abbildung 10: BLO8-1 und 5C4 hemmen die Plaque- und Kollagen-stimulierte statische Thrombozytenaggregation im Blut

(A) Repräsentative MEA-Kurven der Plaque (833 µg/ml)-induzierten Thrombozytenaggregation nach Präinkubation des Blutes mit BLO8-1 (10 µg/ml) oder 5C4 (1,25 µg/ml). Die Zahlen zeigen die kumulative Aggregation (AU*min) gemessen über 10 min. (B) Konzentrationsabhängigkeitskurven der Wirkung von BLO8-1 oder 5C4 auf die Plaque- und Kollagen (0,5 µg/ml)-induzierte Thrombozytenaggregation, gemessen über 5 min. MW ± SD in % der zeitgleichen Kontrolle, n = 3-9. *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001 für behandelte vs. Kontroll-Thrombozyten mit zweiseitigem, gepaartem t-Test bzw. §§§: p<0,001 mit Mann-Whitney U-Test. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

Die Hemmung mit den GPVI-Antikörpern war ebenfalls spezifisch, da weder BLO8-1 noch 5C4 die durch ADP und TRAP stimulierte Thrombozytenaggregation beeinflussten (Abbildung 11).

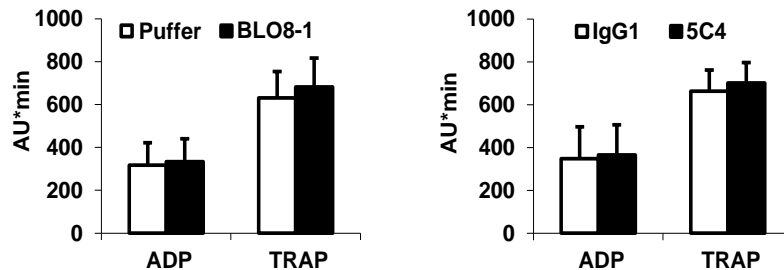


Abbildung 11: BLO8-1 und 5C4 haben keinen Effekt auf die statische Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation mit ADP oder TRAP

Blut wurde mit BLO8-1 (10 µg/ml) oder 5C4 (1,25 µg/ml) präinkubiert bevor es mit ADP (5 µM) oder TRAP (15 µM) für 5 min stimuliert wurde (MW + SD, n = 4). Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

5.1.3 Hemmung von dimerem thrombozytärem GPVI mit m-Fab-F

Da dimeres GPVI auf ruhenden Thrombozyten essentiell für die Bindung an Kollagen und für die Thrombozytenaktivierung ist⁶⁹, sollte selektiv die dimere Form von thrombozytärem GPVI gehemmt und dessen Auswirkung auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation untersucht werden. Dazu wurden MEA-Experimente mit m-Fab-F, einem Antikörper, der spezifisch gegen dimeres GPVI gerichtet ist, durchgeführt. Die Wirkung von m-Fab-F auf die Thrombozytenaggregation wurde sowohl mit der von 5C4 (das monomeres und dimeres GPVI blockiert) als auch mit dimerem GPVI-Fc verglichen.

m-Fab-F hemmte die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation weniger effektiv als 5C4 ($-64 \pm 11\%$ vs. $-86 \pm 8\%$; $p < 0,05$ mit gepaartem t-Test). Die Hemmung der Plaque-stimulierten Thrombozytenaggregation durch dimeres GPVI-Fc war $-53 \pm 17\%$ (Abbildung 12).

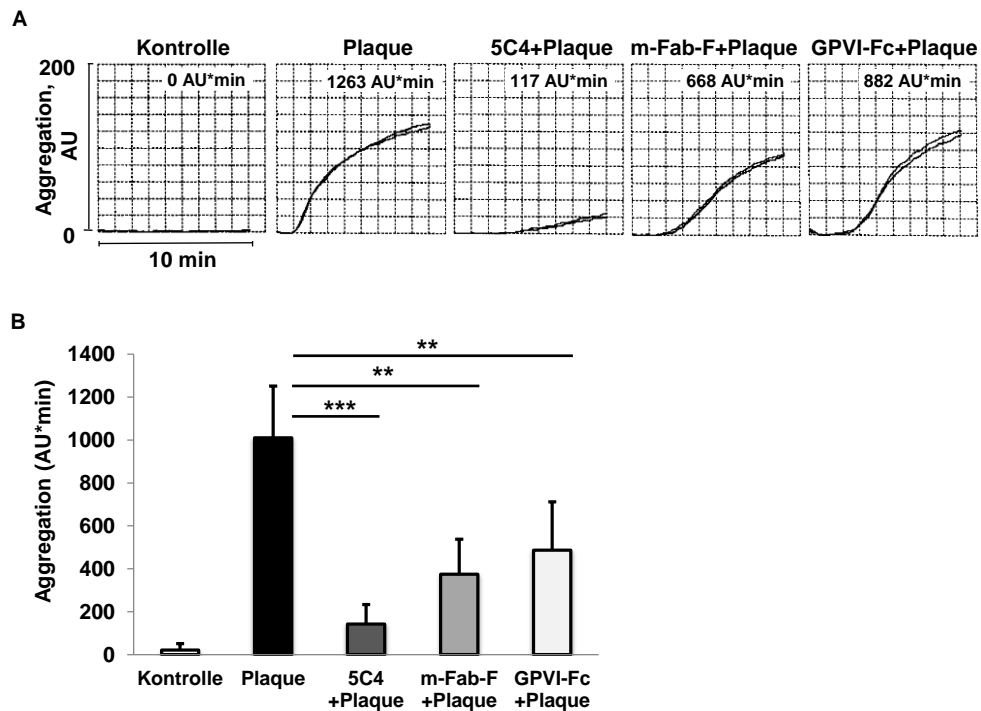


Abbildung 12: Antikörper gegen monomeres und dimeres GPVI (5C4), nur gegen dimeres GPVI (m-Fab-F), und GPVI-Fc hemmen die Plaque-induzierte statische Thrombozytenaggregation in unterschiedlichem Ausmaß

(A) Repräsentative MEA-Kurven. Blut wurde mit 5C4 (1,25 µg/ml), m-Fab-F (100 µg/ml) oder GPVI-Fc (50 µg/ml) präinkubiert bevor die Proben mit Plaque (208 µg/ml) für 10 min stimuliert wurden. (B) Balkendiagramm des Einflusses von 5C4, m-Fab-F und GPVI-Fc auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation gemessen über 10 min. MW + SD, n = 5. *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001 mit ANOVA für wiederholte Messungen und sekundären Paarvergleich nach Student-Newman-Keuls wie durch Balken angezeigt. Verändert nach Jamasbi et al.114

5.2 Wirkung von GPVI-Fc und GPVI-Antikörpern auf die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation unter arteriellen Strömungsbedingungen

Um zu versuchen, die Situation einer Plaque-Ruptur mit anschließender Thrombozytenaktivierung *in vivo* zu simulieren, wurde Plaquehomogenat mit Hirudin-antikoagulierem humanem Blut bei verschiedenen Arterien-typischen Strömungsgeschwindigkeiten perfundiert.

5.2.1 Validierung der Methode

Da zu diesem Zeitpunkt kein für geplante Versuche adäquates Protokoll sowohl für die Plaque-Beschichtung von Deckgläschen als auch für die Durchführung der Flusskammerexperimente existierte, wurde eine neue Methode der Beschichtung von Deckgläschen mit humanem Plaquematerial entwickelt (siehe 4.2.4.1) und auch ein neuer experimenteller Aufbau zur effizienten Durchführung von Flusskammerexperimenten im Labor etabliert (siehe 4.2.4.3).

5.2.1.1 Etablierung eines Strömungskammermodelles

Zwar wurden zuvor in selbigem Labor Flusskammerversuche mit Plaquematerial durchgeführt, jedoch wurde dabei ein veraltetes Strömungskammersystem und eine andere Plaque-Beschichtungsmethode verwendet, die für die experimentellen Fragestellungen dieser Dissertation nicht geeignet war. Bei Beschichtung von Deckgläschen mit Plaque nach der zuvor in der Arbeitsgruppe verwendeten Methode²³, deren Einbau in das neue Flusskammersystem (ibidi sticky-Slides) und anschließender Perfusion mit Blut, haftete das Plaquematerial nicht fest genug in der Flusskammer und wurde nach Beginn der Perfusion schnell weggespült. Zudem waren einige Plaquestücke an manchen Stellen sehr groß, sodass keine einheitliche und in verschiedenen Ansätzen vergleichbare Beschichtung erreicht werden konnte. Um diese großen Plaquestücke, die unter Fluss vermehrt weggespült wurden und die entstandenen Thrombozytenaggregate mit sich rissen, zu vermeiden, wurde das Plaquematerial nach dessen Verdünnung stehen gelassen, damit große Plaquestücke sedimentieren konnten. Anschließend wurde nur der daraus resultierende Überstand für die Beschichtung der Deckgläschen verwendet. Anstatt Albumin bei der Plaqueverdünnung einzusetzen²³, das in der verwendeten Flusskammer zu einer schlechteren Haftung des Plaquematerials unter Strömungsbedingungen führte, wurden erst nach dem Trocknen der Plaquehomogenate auf den Deckgläschen und anschließender Rehydratation mit PBS die Flusskammern mit humanem Serumalbumin (HSA) perfundiert, um freie, unspezifische Bindungsstellen auf dem Glas zu blockieren. Auch die ibidi sticky-Slides (Kammeroberseiten der Flusskammern) mussten mit HSA behandelt werden, da ohne HSA-Blockade Thrombozyten durch den Kunststoff der Kammeroberseiten und -ränder aktiviert wurden und an der Kammeroberfläche adhärirten. Die Hemmsubstanzen wurden bei diesen Versuchen dem humanen Blut vor der Perfusion beigemischt und anschließend wurde die Thrombozytenaggregation an Plaquehomogenat oder Kollagen über eine bestimmte Zeitspanne mittels Videomikroskopie gemessen. Bei den durchgeführten Experimenten wurden verschiedene Arterien-typische Scherraten (550/s oder 600/s, 1100/s, 1500/s) eingesetzt. Diese unterschiedlichen Perfusionsbedingungen wurden gewählt, da Scherraten von 550/s oder 600/s und 1100/s den Bereich der physiologischen mittleren und maximalen Scherraten in den Karotiden und Koronarien abdecken^{115,116}, und mittlere Scherraten von etwa 1500/s in leicht stenotischen koronaren Läsionen vorherrschen¹¹⁷.

Die in dieser Dissertation neu etablierten Flusskammerexperimente erlauben durch die Verwendung von Einweg-Flusskammern eine schnelle und durch die verbesserte Plaquebeschichtung reproduzierbarere Methode, mit der mehrfache Messungen (ca. 15-20) der Kinetik der Thrombozytenaggregation (jeweils bis zu 10 min) mit dem Blut desselben Spenders in einem Zeitraum von 30 min bis 4 Stunden nach Blutabnahme möglich sind. Zur

Veranschaulichung der Methode ist der experimentelle Aufbau der Flusskammerexperimente in Abbildung 13 gezeigt.

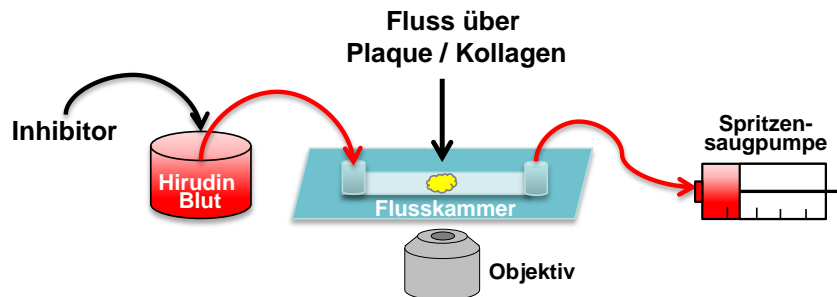


Abbildung 13: Experimenteller Aufbau der Flusskammerexperimente

5.2.1.2 Beschaffenheit der Plaqueoberfläche

Die Beschichtung der Deckgläschen mit Plaquehomogenat (siehe 4.2.4.1) ergab Plaquefragmente unterschiedlicher Größen, die eine unregelmäßige, leicht raue thrombogene Oberfläche bildeten. Eine repräsentative mikroskopische Aufnahme einer mit Plaquehomogenat beschichteten Fläche ist in Abbildung 14 dargestellt.

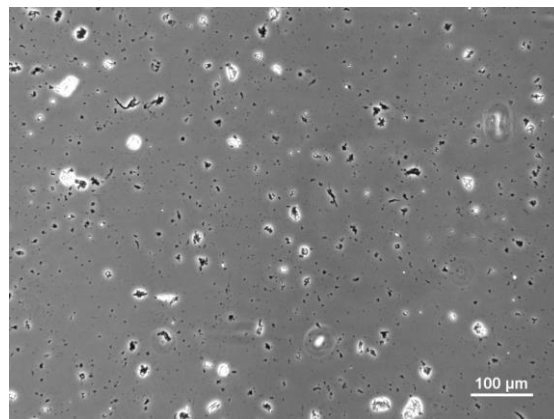


Abbildung 14: Repräsentative Abbildung der Beschichtung eines Glasdeckgläschens mit humanem Plaquehomogenat

Phasenkontrast-Bildgebung mit Hilfe eines 10x Objektivs.

Um die Rauheit der beschichteten Plaqueoberfläche abschätzen zu können, wurde die maximale Höhe der Plaquefragmente mittels SIM („structured illumination microscopy“) gemessen: Es ergaben sich Werte von $6,12 \pm 1,65 \mu\text{m}$ (MW \pm SD, n = 6).

Zum Prüfen der Reproduzierbarkeit der Experimente mit humanem Plaquehomogenat, wurden vor den Experimenten mit GPVI-Hemmstoffen Flusskammerexperimente zur Charakterisierung der Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von verschiedenen Plaque-Pools und unterschiedlicher Blutspender durchgeführt.

5.2.1.3 Unabhängigkeit der Thrombozytenaggregation von atherosklerotischen Plaque-Pools

Um individuelle Unterschiede der Plaques auszuschließen, wurden die Plaquehomogenate fünf verschiedener Patienten gepoolt. In dieser Dissertation wurden mehrere verschiedene Plaque-Pools verwendet, die routinemäßig bezüglich ihrer Thrombozytenaktivierung im Multiplate® gemessen wurden und vergleichbare Aggregationswerte zeigten. Da Unterschiede zwischen den einzelnen Plaque-Pools auszuschließen waren, wurde die durch verschiedene atherosklerotische Plaque-Pools induzierte Thrombozytenaggregation auch unter arteriellen Strömungsbedingungen verglichen.

Der Vergleich der Thrombozytenaggregation, vermittelt durch vier verschiedene Pools atherosklerotischer Plaquehomogenate, ergab keine Unterschiede, weder in der Kinetik noch im Ausmaß der Thrombozytenaggregation unter Strömungsbedingungen (Abbildung 15).

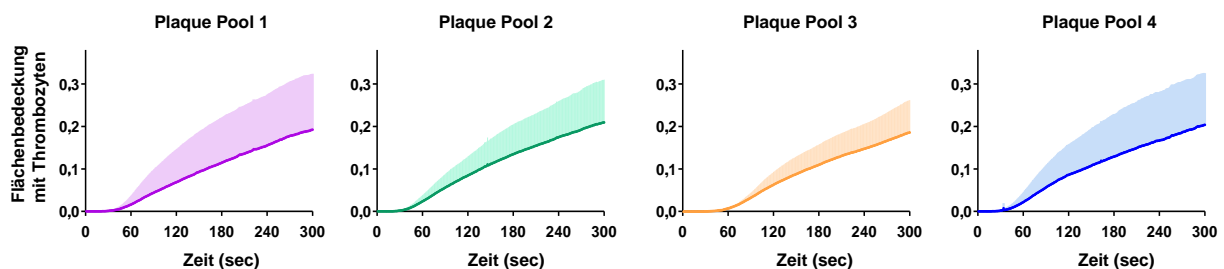


Abbildung 15: Unabhängigkeit der Thrombozytenaggregation von unterschiedlichen Plaque-Pools unter Strömungsbedingungen

Glasdeckgläschen wurden mit vier verschiedenen Pools von Plaquehomogenaten beschichtet und mit Hirudin-antikoagulierte Blut der gleichen Spender ($n=4$) bei einer Scherrate von 600/s perfundiert. Die Thrombozytenaggregation wurde kontinuierlich aufgenommen (1 Bild/sek), und die mit Thrombozyten bedeckte Fläche quantifiziert. MW + SD, $n=4$.

5.2.1.4 Spenderabhängigkeit der Thrombozytenaggregation

Die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation unter arteriellen Strömungsbedingungen war bei verschiedenen Blutspendern zum Teil sehr unterschiedlich (Abbildung 16).

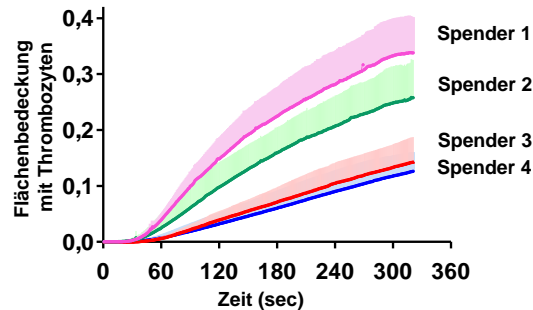


Abbildung 16: Spenderabhängigkeit der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation unter Strömungsbedingungen

Pools von verschiedenen Plaquehomogenaten ($n = 4$) wurden mit Hirudin-antikoagulierte Blut von vier verschiedenen Blutspendern bei einer Scherrate von 600/s perfundiert. Die Thrombozytenaggregation wurde videomikroskopisch aufgenommen (1 Bild/sek), und die mit Thrombozyten bedeckte Fläche quantifiziert. MW + SD, $n = 11-12$.

5.2.1.5 Erarbeitung eines Protokolls zur Fixierung von Flusskammerpräparaten

Um Flusskammerpräparate nach deren Perfusion mit Blut mittels hochauflösender mikroskopischer Methoden (SIM) weiter analysieren zu können, mussten die Präparate unter Fluss fixiert und die Thrombozyten gefärbt werden. Da zu diesem Zeitpunkt kein adäquates Protokoll zur Fixierung und Thrombozytenfärbung der Präparate existierte, musste ein neues Verfahren entwickelt werden, das die Beschaffenheit der Präparate vor und nach der Fixierung unverändert ließ. Die Schwierigkeit lag darin, sowohl die Bindung und Formbeschaffenheit der Thrombozyten, die an Plaque oder Kollagen gebunden hatten, durch den Fixierungsprozess nicht zu verändern, als auch eine nachträgliche Bindung von sich noch im Schlauchsystem befindlichen Thrombozyten durch die Fixationslösung an Plaque- oder Kollagenstrukturen zu verhindern. Dadurch sollte Artefakten vorgebeugt werden. Es wurden verschiedene Methoden getestet: Die an die Blutperfusion anschließende Überströmung der Präparate mit PBS führte zu einer unerwünschten Aktivierung (Formveränderung) der Thrombozyten. Eine Perfusion mit PFA 4% führte zur Fixierung von Blutzellen (inkl. Thrombozyten), die sich im zuführenden Schlauch befanden und sich anschließend an das Plaquehomogenat und Kollagen anhefteten. Indem zwischen der Perfusion mit Blut und der Fixationslösung eine winzige Luftblase in den Schlauch aufgenommen wurde und dem Fixationspuffer 5 mM EDTA beigefügt wurde, konnten diese Probleme umgangen werden. Die Vorgehensweise, die sich als optimal erwies, ist unter 4.2.5.3 aufgeführt und wurde für alle Flusskammerpräparate, die für SIM vorbereitet wurden, angewandt.

5.2.2 Einfluss von GPVI-Fc, BLO8-1 und 5C4 auf die Thrombozytenadhäsion und -aggregation an humanes atherosklerotisches Plaque unter arteriellen Strömungsbedingungen

Nach der Etablierung der Flusskammerversuche wurde der Einfluss von GPVI-Fc und der GPVI-Antikörper auf die Thrombozytenaggregation unter arteriellen Strömungsbedingungen getestet, um der Situation nach Plaque-Ruptur im menschlichen Körper ein Stück näherzukommen.

Die Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 17 zeigen die Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenablagerung durch GPVI-Fc, BLO8-1 und 5C4 bei einer Scherrate von 550/s. GPVI-Fc (50 µg/ml) verzögerte und reduzierte die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation im Vergleich zur Kontrolle signifikant (siehe auch Videos 1 and 2), jedoch war die Hemmung mit den GPVI-Antikörpern BLO8-1 (20 µg/ml) und 5C4 (1,25 µg/ml) wesentlich stärker. Diese hemmten die Aggregatbildung bei Scherraten von 550/s nahezu komplett, wobei nur noch eine Thrombozytenadhäsion beobachtet wurde, die aber vor allem transient war (Abbildung 17, Video 3).

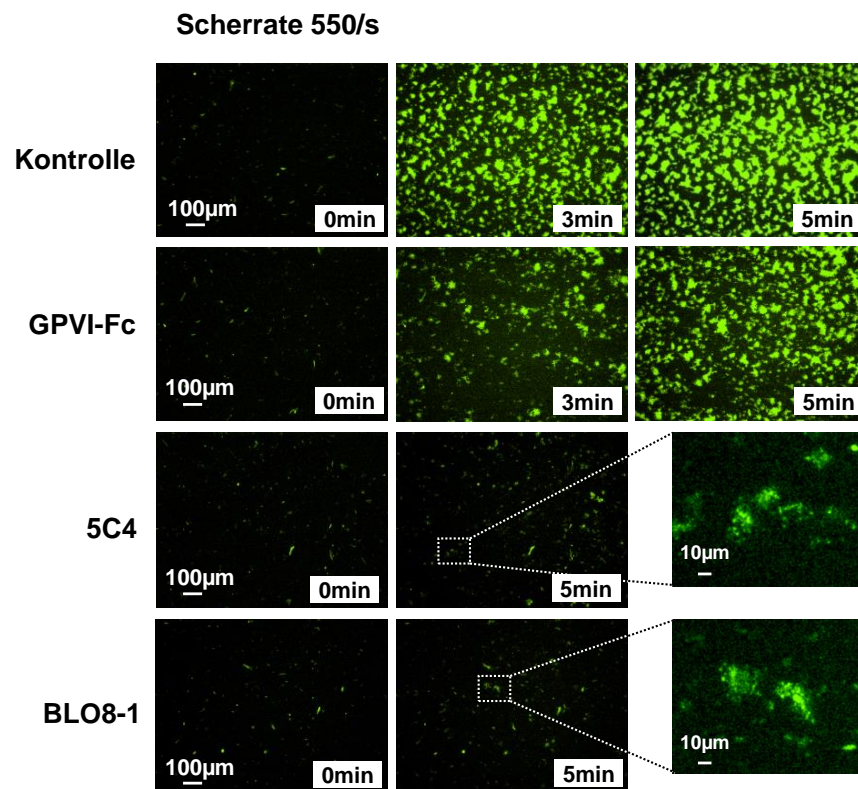


Abbildung 17: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozytenaggregatbildung an Plaquehomogenat zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Perfusion bei einer Scherrate von 550/s Blut wurde ohne (Kontrolle) oder mit GPVI-Fc (50 µg/ml), 5C4 (1,25 µg/ml) oder BLO8-1 (20 µg/ml) präinkubiert und die Thrombozyten wurden mit Mepacrine angefärbt. Die Thrombozytenaggregation wurde mittels Videomikroskopie kontinuierlich aufgenommen. (Videos 1-3) Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

Um auszuschließen, dass die limitierte Hemmung durch eine zu geringe Blutkonzentration von GPVI-Fc bedingt war, weil eventuell nicht alle hintereinander gelegenen GPO-Motive im Plaque-Kollagen blockiert worden waren, wurden Plaque-beschichtete Deckgläschen mit einer 50-fach höheren GPVI-Fc-Konzentration als nach Zugabe zum Blut erreicht wurde, präinkubiert. Nach der Inkubation mit diesem Überschuss an GPVI-Fc wurden die Plaquehomogenate bei einer Scherrate von 550/s mit Blut perfundiert. Wie schon in den Experimenten der statischen Thrombozytenaggregation beobachtet wurde (Abbildung 8), war die Hemmung mit GPVI-Fc auch unter diesen Bedingungen nicht erhöht (Abbildung 18).

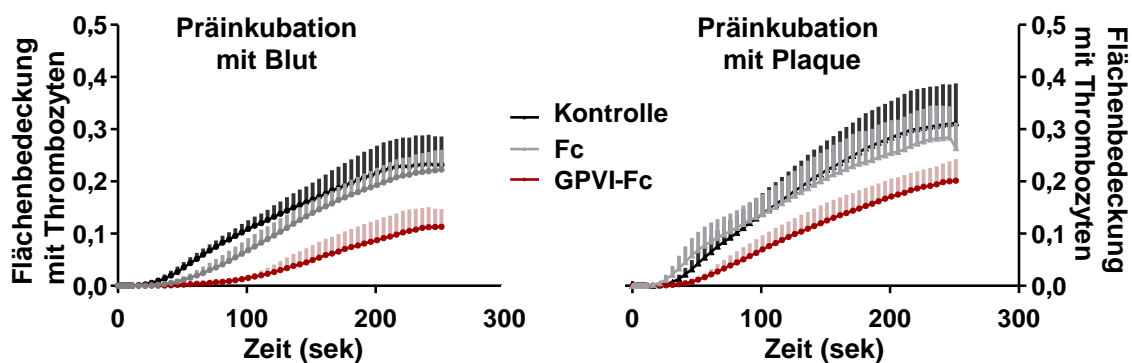


Abbildung 18: Präinkubation von Plaque mit einem Überschuss an GPVI-Fc hemmt die Thrombozytenaggregation bei niedriger Scherrate nicht stärker als GPVI-Fc nach Zugabe zum Blut

Die Thrombozyten wurden mit DiOC6 angefärbt. **(Links)** Puffer R (Kontrolle), äquimolare Konzentrationen (333 nM) von Fc-Kontrollprotein (17 µg/ml) oder GPVI-Fc (50 µg/ml), wurden vor der Perfusion über Plaque-beschichtete Deckgläschen dem Blut beigegeben. **(Rechts)** Plaque-beschichtete Deckgläschen wurden mit Puffer R (Kontrolle), oder einer hohen äquimolaren Konzentration (17 µM) von Fc-Kontrollprotein (34 µg in 40 µl = 850 µg/ml) oder GPVI-Fc (100 µg in 40 µl = 2500 µg/ml) für 5 min bei 37°C vor der Perfusion mit Blut (Scherrate 550/s) präinkubiert. Die GPVI-Fc-Konzentrationen für die Präinkubation waren 50-fach höher als die Blutkonzentrationen im linken Graphen. MW + SD, n = 4. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

Interessanterweise stieg die Hemmung von GPVI-Fc mit der Scherrate an: 5 min nach Beginn der Perfusion von Plaque mit GPVI-Fc enthaltendem Blut war die Thrombozytenaggregation bei einer angelegten Scherrate von 1100/s deutlich geringer als bei der Scherrate von 550/s (Abbildung 19, Abbildung 17). Auch die Hemmung mit dem GPVI-Antikörper 5C4 war bei 1100/s etwas deutlicher ausgeprägt: es wurde eine geringere Thrombozytenadhäsion beobachtet.

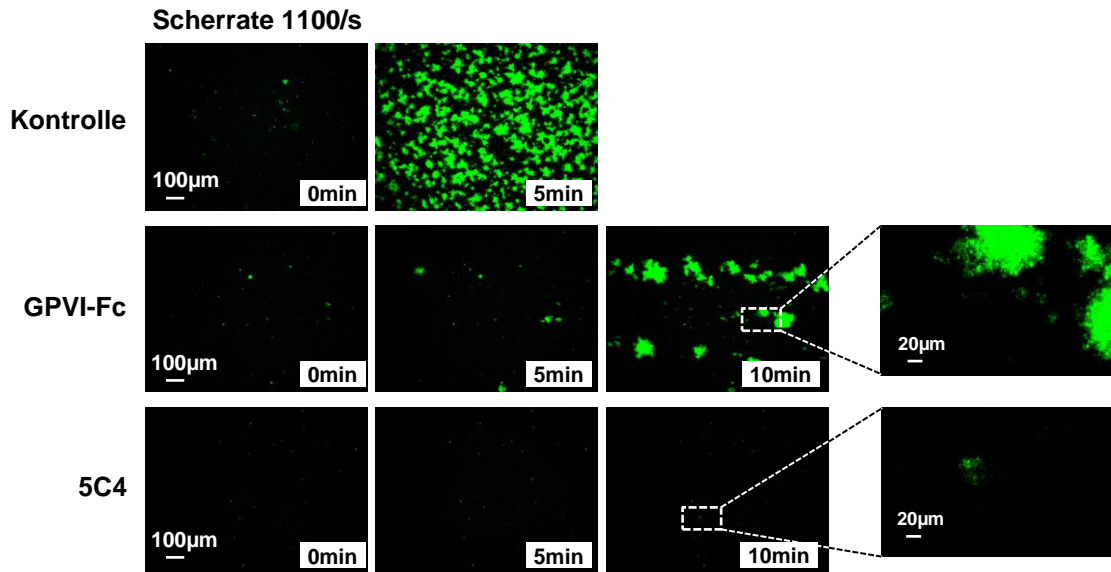


Abbildung 19: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozytenadhäsion und -aggregation an Plaque zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Perfusion bei einer Scherrate von 1100/s
Blut wurde ohne (Kontrolle) oder mit GPVI-Fc (50 µg/ml) oder 5C4 (1,25 µg/ml) präinkubiert und die Thrombozyten wurden mit Mepacrine angefärbt. Die Thrombozytenaggregation wurde mittels Videomikroskopie kontinuierlich aufgenommen. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

Um den scherabhängigen Effekt von GPVI-Fc zu bestätigen, wurden weitere Experimente bei einer noch höheren Scherrate von 1500/s vorgenommen. Die Quantifizierung der mit Thrombozyten bedeckten Fläche über die Zeit bei den drei verschiedenen Scherraten ergab eine signifikante Abhängigkeit der GPVI-Fc-Hemmwirkung von der angelegten Scherrate. Dabei hemmte GPVI-Fc die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation bei 1500/s höchst effektiv (Abbildung 20).

Die quantitative Auswertung der Thrombozytenadhäsion nach GPVI-Antikörper-Behandlung des Blutes zeigte deren effektive Hemmung der Thrombozytenaggregation, die unabhängig von der angelegten Scherrate war. Sowohl bei niedriger (550/s) als auch bei höherer Scherrate (1100/s) hemmten die Antikörper die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation nahezu komplett. Die beobachtete noch vorhandene Thrombozytenadhäsion war vor allem transient (Abbildung 20).

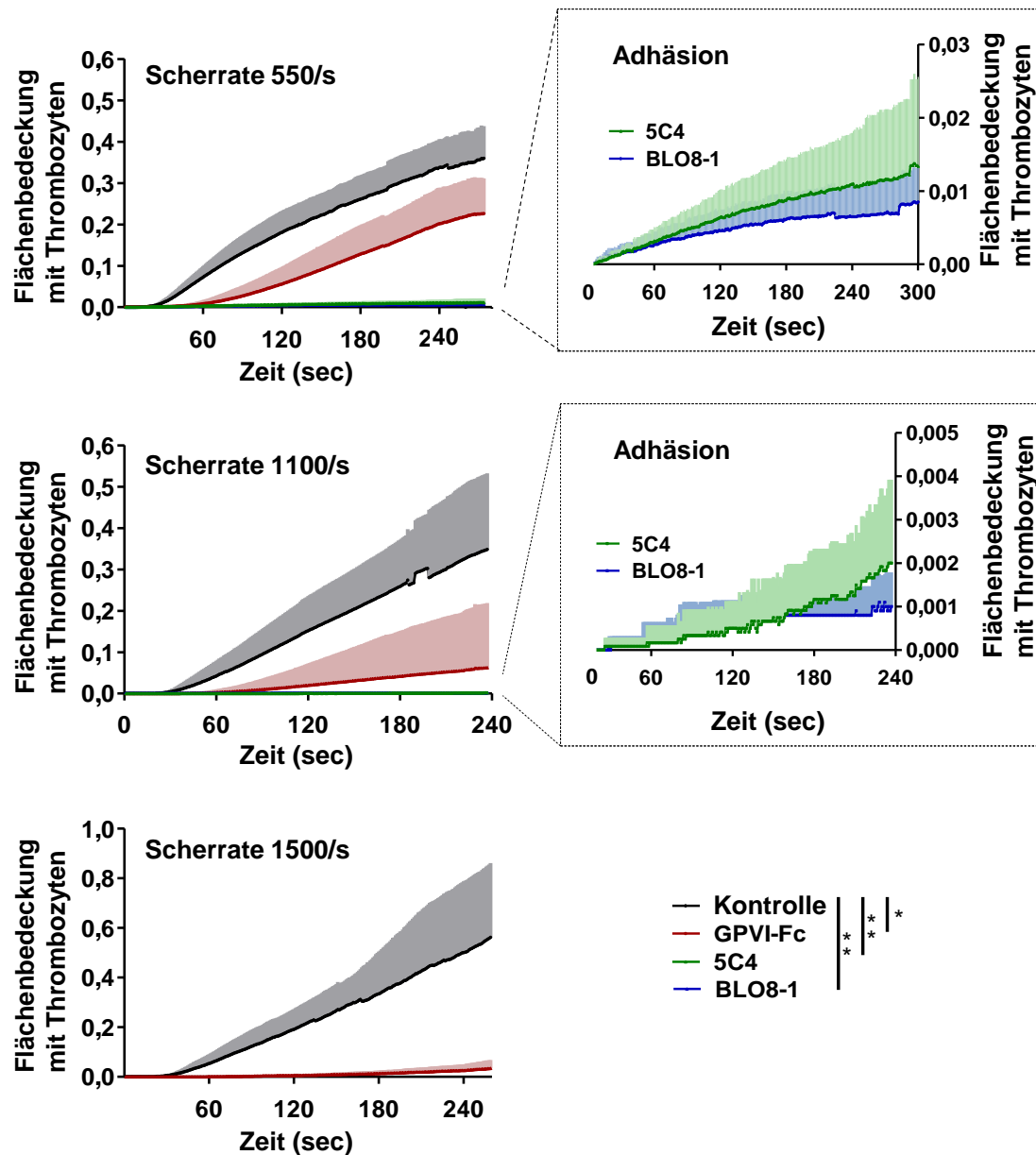


Abbildung 20: GPVI-Fc und anti-GPVI Antikörper (BLO8-1, 5C4) hemmen die Thrombozytenablagerung an atherosklerotisches Plaquematerial unterschiedlich stark unter arteriellen Strömungsbedingungen, wobei die Hemmung durch GPVI-Fc mit der Scherrate ansteigt

Wirkung von GPVI-Fc, BLO8-1 oder 5C4 auf den Zeitverlauf der Thrombozytenablagerung auf Plaques aus fließendem Blut bei drei verschiedenen arteriellen Scherraten. Blut wurde ohne (Kontrolle) oder mit GPVI-Fc (50 µg/ml), 5C4 (1,25 µg/ml) oder BLO8-1 (20 µg/ml) präinkubiert und die Thrombozyten wurden mit Mepacrine angefärbt. Fluoreszenzbilder der Thrombozytenablagerung wurden kontinuierlich aufgenommen (1 Bild/sek) und die mit Thrombozyten bedeckte Fläche wurde quantifiziert. **(Rechts)** BLO8-1- und 5C4-Kurven mit vergrößerter Skala. MW + SD, n = 5-12. 3-fach ANOVA für die unabhängigen Faktoren Behandlung (p < 0,001), Scherrate (p < 0,05) und Zeit (p < 0,001). Sekundäre Paarvergleiche innerhalb der Behandlung waren signifikant für Kontrolle vs. BLO8-1 (**: p < 0,01), 5C4 (**: p < 0,01) und GPVI-Fc (*: p < 0,05). Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

5.3 Entschlüsselung des Mechanismus der scherabhängigen Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation durch GPVI-Fc

Um einen Einblick in den Mechanismus der GPVI-Fc-vermittelten Hemmung der Thrombozytenaggregation an Plaque zu gewinnen und vor allem den Grund der scherabhängigen Wirkung von GPVI-Fc herauszufinden, wurden zur Darstellung der Interaktion von GPVI-Fc und Thrombozyten mit Plaque unter arteriellen Strömungsbedingungen hochauflösende bildgebende Verfahren verwendet.

5.3.1 GPVI-Fc-Bindung und Thrombozytenaggregation an Plaque bei niedriger und hoher Scherrate

Es sollte zunächst die Hypothese geprüft werden, ob die Scherabhängigkeit der GPVI-Fc-Wirkung durch eine quantitativ höhere Bindung von GPVI-Fc bei hoher Scherrate an Plaque-Kollagen zustande kam. Dazu wurde die Bindung von GPVI-Fc, das mit PE-gekoppelten anti-human-Fc Antikörpern markiert wurde (im Folgenden abgekürzt mit „PE-markiertes GPVI-Fc“), in Bezug auf die Thrombozytenadhäsion und -aggregation unter Strömungsbedingungen bei niedriger und hoher Scherrate visualisiert. Die Bindung von PE-markiertem GPVI-Fc an Plaque verlief rapide und erreichte etwa 250 sek nach Beginn der Blutperfusion eine Sättigung (Abbildung 21). Dabei erfolgte die GPVI-Fc-Bindung an Plaque schneller als die der Thrombozyten, wobei die Kinetik und Menge der GPVI-Fc-Bindung bei niedriger (550/s) und hoher (1500/s) Scherrate ähnlich war (Abbildung 21).

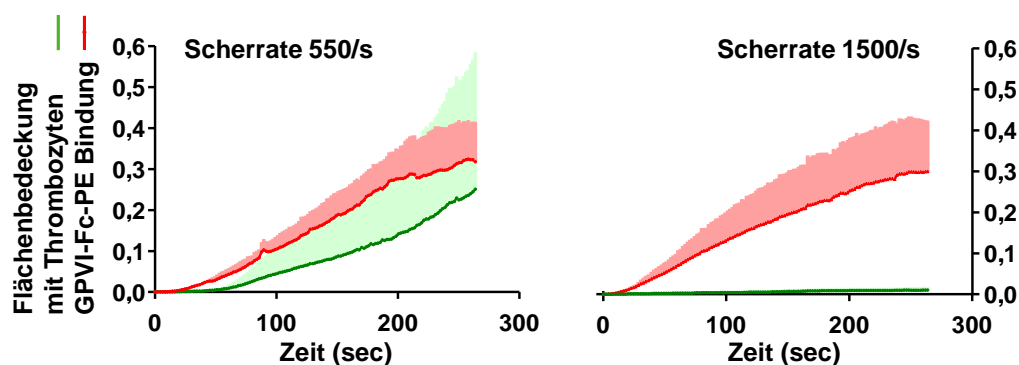


Abbildung 21: Dynamik der GPVI-Fc-Bindung, Thrombozytenadhäsion und -aggregation an atherosklerotischem Plaquematerial unter Strömungsbedingungen

GPVI-Fc (50 µg/ml), das mit PE-konjugierten anti-human-Fc Antikörpern (rot) markiert und vor der Perfusion dem Blut beigegeben wurde, band schnell an Plaquehomogenat. Die Bindung war bei niedriger und hoher Scherrate (550/s, 1500/s) gleich. Die Thrombozytenablagerung (grün; markiert mit DiOC6) trat bei niedriger Scherrate mit Verzögerung ein und war bei hoher Scherrate gehemmt. MW + SD, n = 3. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

Dies schloss einen Unterschied der GPVI-Fc-Bindung als Erklärung für die gute Hemmung der Thrombozytenaggregation durch GPVI-Fc bei hoher Scherrate aus.

Die Bindung von GPVI-Fc an kleine, stärker homogenisierte Plauekomponenten war etwas schneller als die Bindung an das gesamte, die großen Plauefragmente enthaltende Plauehomogenat (Abbildung 22, Abbildung 21). Die maximale GPVI-Fc-Bindung an diese kleinen, stark homogenisierten Plauekomponenten wurde schon innerhalb von 60 sek nach Beginn des Blutflusses erreicht (Abbildung 22).

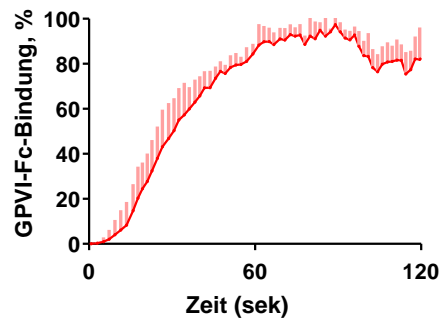


Abbildung 22: Schnelle und sättigbare GPVI-Fc-Bindung an die homogenen, kleinen Plauekomponenten unter Strömungsbedingungen

GPVI-Fc (50 µg/ml) wurde mit PE-konjugierten anti-human-Fc Antikörpern (rot) markiert und vor der Perfusion (Scherrate 550/s) über Plauehomogenat dem Blut beigegeben. Fluoreszenzbilder wurden durch Videomikroskopie (1 Bild/2 sek) unter Verwendung eines 100x Öl-Objektivs (NA 1,4) aufgenommen (Video 4). Sichtfelder, die nur die homogenen, kleinen Plauekomponenten enthielten wurden ausgeschnitten und die GPVI-Fc-Bindung quantifiziert. Die Werte sind in % der maximalen GPVI-Fc-Bindung angegeben. MW + SD, n = 4. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

5.3.2 Echtzeitmessung der Thrombozytenadhäsion/-aggregation und der GPVI-Fc-Bindung an Plaue und Kollagen durch DIC- und Fluoreszenz-Videomikroskopie bei maximaler Vergrößerung

Um der Ursache der Scherabhängigkeit der GPVI-Fc-Hemmung weiter auf den Grund zu gehen, wurde die GPVI-Fc-Bindung und Thrombozytenanlagerung an Plaue bei niedriger Scherrate mit DIC (differentieller Interferenzkontrast)- und Fluoreszenz-Mikroskopie bei maximaler Vergrößerung (100x Objektiv mit einer numerischen Apertur von 1,4; Ölimmersion) in den ersten Minuten der Blutperfusion beobachtet (Abbildung 23).

Das dem Blut beigegebene PE-markierte GPVI-Fc heftete sich sehr schnell in Form einzelner Punkte an kleine Plauepartikel sowie große Plauefragmente an. Die Bindung erfolgte stromauf- und stromabwärts der Plauefragmente und war überwiegend irreversibel (Videos 4 und 5). Verglichen mit der GPVI-Fc-Bindung war die Thrombozytenadhäsion an Plaue seltener und meist transient und die Thrombozytenaggregatbildung an Plaue war viel langsamer als die Bindung von GPVI-Fc (Video 5).

Es wurde zum einen beobachtet, dass GPVI-Fc die Thrombozytenbindung an Plaque verhindern konnte. Wie in Abbildung 23 A gezeigt ist, rollten einzelne Thrombozyten über an Plaque gebundenes, PE-markiertes GPVI-Fc, ohne eine feste Bindung eingehen zu können. Zum anderen gelang es einigen Thrombozyten, sich irreversibel, vor allem in Nischen stromabwärts größerer Plaquefragmente, anzuheften. Diese Thrombozyten dienten dann als Startpunkt für die Ausbildung von Thrombozytenaggregaten (Abbildung 23 B, Video 5).

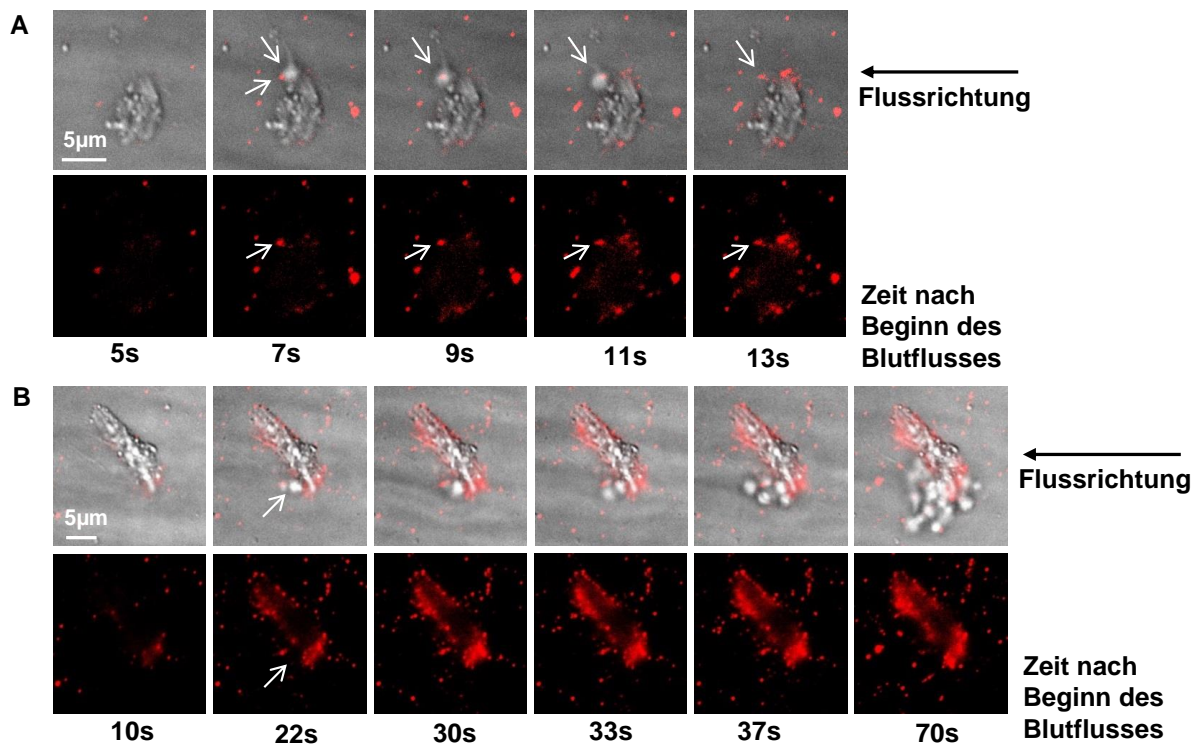


Abbildung 23: DIC- und Fluoreszenz-Bildgebung (maximale Vergrößerung) der GPVI-Fc-Bindung, Thrombozytenadhäsion und -aggregation an atherosklerotischem Plaquematerial unter Strömungsbedingungen

(A und B) GPVI-Fc (50 µg/ml) wurde mit PE-konjugierten anti-human-Fc Antikörpern (rot) markiert und vor der Perfusion über Plaque (550/s) dem Blut beigegeben. DIC- und Fluoreszenzbilder wurden mittels Videomikroskopie unter Verwendung eines 100x Öl-Objektivs (NA 1,4) aufgenommen (1 Bild/2 sek). Die Bilder sind repräsentativ für 4 individuelle Experimente. **Obere Reihen:** Überlagerung von DIC- (Plaque/Thrombozyten) und Fluoreszenz- (PE-markiertes GPVI-Fc) mikroskopischen Bildern. **Untere Reihen:** Fluoreszenzbilder von PE-markiertem GPVI-Fc. Siehe auch Videos 4 und 5. GPVI-Fc bindet stromauf- und stromabwärts an Plaquefragmente (grau) und kleine Plaquestücke, die durch DIC nicht detektierbar waren. Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung (grau) wurde vor allem stromabwärts beobachtet. **(A)** Ein einzelner Thrombozyt (obere Reihe, Pfeil) rollt über PE-markiertes GPVI-Fc (Pfeil unten), das bereits vorher an ein Stück Plaquematerial gebunden hatte. **(B)** Thrombozytenaggregatbildung ausgehend von einem einzelnen adhärenen Thrombozyten (Pfeil) in einer Flussnische stromabwärts des Plaquestückes. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

Die Bindung von fluoreszierendem GPVI-Fc an Plaque war spezifisch. Es zeigte keine Bindung an mit Albumin behandelten Glasoberflächen, und dem Blut beigegebenes fluoreszenzmarkiertes Fc-Kontrollprotein zeigte keine Bindung an Plaque.

Neben den Experimenten mit humanem Plauehomogenat wurde zum Vergleich die Kinetik und räumliche Verteilung der GPVI-Fc-Bindung und Thrombozytenadhäsion an Kollagenfasern untersucht. Wie auch in den Experimenten mit Plauehomogenat war die Bindung von GPVI-Fc an Kollagen sehr schnell (Video 6) und dichte GPVI-Fc-Punkte konnten adhärierende Thrombozyten daran hindern, sich stabil an die Kollagenfasern anzuheften (Abbildung 24 A). Die Thrombozyten besiedelten bevorzugt Segmente von Kollagenfasern, die wenig GPVI-Fc trugen (Abbildung 24 A, B), und sie waren sogar in der Lage, benachbartes, an Kollagen gebundenes GPVI-Fc zu verdrängen, um anschließend fest an diese Kollagenssegmente zu binden (Abbildung 24 B).

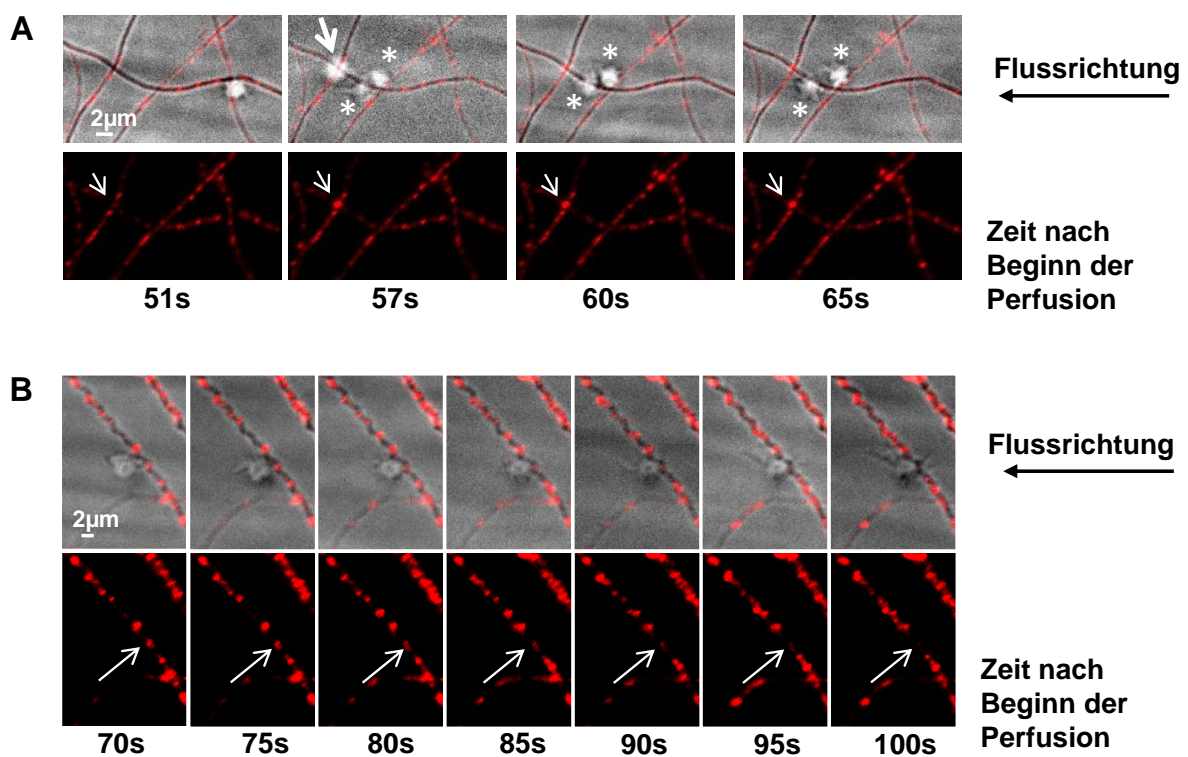


Abbildung 24: Dynamik der GPVI-Fc-Bindung und Thrombozytenadhäsion an Kollagen unter Strömungsbedingungen

(A und B) GPVI-Fc (50 µg/ml) wurde mit PE-konjugierten anti-human-Fc Antikörpern (rot) markiert und vor der Perfusion über Kollagen (550/s) dem Abciximab enthaltenden Blut beigemischt. DIC- und Fluoreszenzbilder wurden mittels Videomikroskopie unter Verwendung eines 100x Öl-Objektivs (NA 1,4) aufgenommen (1 Bild/2 Sek). Die Bilder sind repräsentativ für 6 individuelle Experimente. **Obere Reihen:** Überlagerung von DIC- (Kollagen/Thrombozyten) und Fluoreszenzbildern (PE-markiertes GPVI-Fc). **Untere Reihen:** Fluoreszenzbilder von PE-markiertem GPVI-Fc. Siehe auch Video 6. **(A)** Ein einzelner Thrombozyt (dicker Pfeil) rollt über PE-markiertes, an Kollagen gebundenes GPVI-Fc (dünner Pfeil in der Reihe darunter). Zwei Thrombozyten (Sternchen) adhärieren an Segmente der Kollagenfaser, die wenig fluoreszierendes GPVI-Fc enthalten. **(B)** Ein einzelner Thrombozyt, der sich stromabwärts an der Faser angeheftet hat und sich gegen den Blutstrom zur Faser hinbewegt, verdrängt PE-markiertes GPVI-Fc von Kollagen (Pfeile in der unteren Reihe). Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

5.3.3 3-dimensionale Darstellung der Thrombozytenaggregation mit Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie unter Strömungsbedingungen

Um die Thrombozytenaggregatbildung an Plaque unter arteriellen Strömungsbedingungen 3-dimensional darstellen zu können, wurde Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (TPLSM) angewendet.

Die Perfusion von Plaquehomogenat mit unbehandeltem Blut ergab eine Thrombozyten-aggregatbildung stromauf- und stromabwärts der Plaquefragmente bei niedrigen (Abbildung 25) und hohen Scherraten.

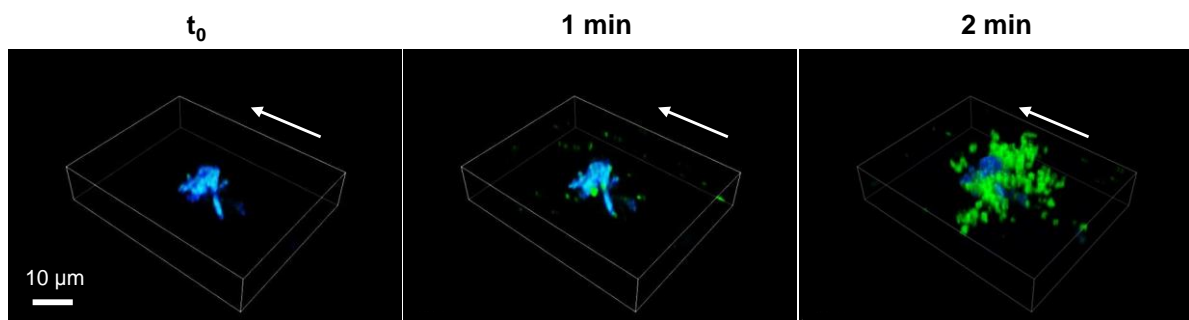


Abbildung 25: Thrombozyten (grün) aggregieren stromaufwärts und stromabwärts von Plaquematerial (blau) in unbehandeltem Blut. Bildgebung mit TPLSM

Zur Thrombozytenfärbung wurde dem Blut DiOC6 beigegeben (grün, Emissionsbereich 510-532 nm). Repräsentative 3D-Rekonstruktionen von TPLSM-Aufnahmen (z-Abschnitte 0,7 µm; totale Dicke 10 µm; Laserexcitation 770 nm) der Thrombozytenanhaftung an Plaque (Autofluoreszenz in blau, Emissionsbereich 410-490 nm) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Blutperfusion bei niedriger Scherrate (550/s). Pfeil: Strömungsrichtung.

Experimente mit GPVI-Fc behandeltem Blut zeigten eine schnelle Bindung von GPVI-Fc (fluoreszenzmarkiert mit Alexa Fluor® 594-konjugierten anti-human-Fc Antikörpern) an autofluoreszierende kleine und große Plaquefragmente unter niedriger und hoher Scherrate. Die GPVI-Fc-Bindung trat, wie auch schon zuvor observiert, vor der Thrombozytenadhäsion auf. Bei niedriger Scherrate wurde die Thrombozytenadhäsion und anschließende Aggregatbildung vor allem stromabwärts des Plaquematerials beobachtet (Abbildung 26; Video 7). Dieser Befund wurde durch DIC-Videomikroskopie in hoher Vergrößerung bestätigt (siehe Video 8). Bei hoher Scherrate war in Anwesenheit von GPVI-Fc die Thrombozytenadhäsion stromabwärts der Plaquestücke instabil und es wurde viel weniger Thrombozytenaggregatbildung beobachtet (Abbildung 26 B).

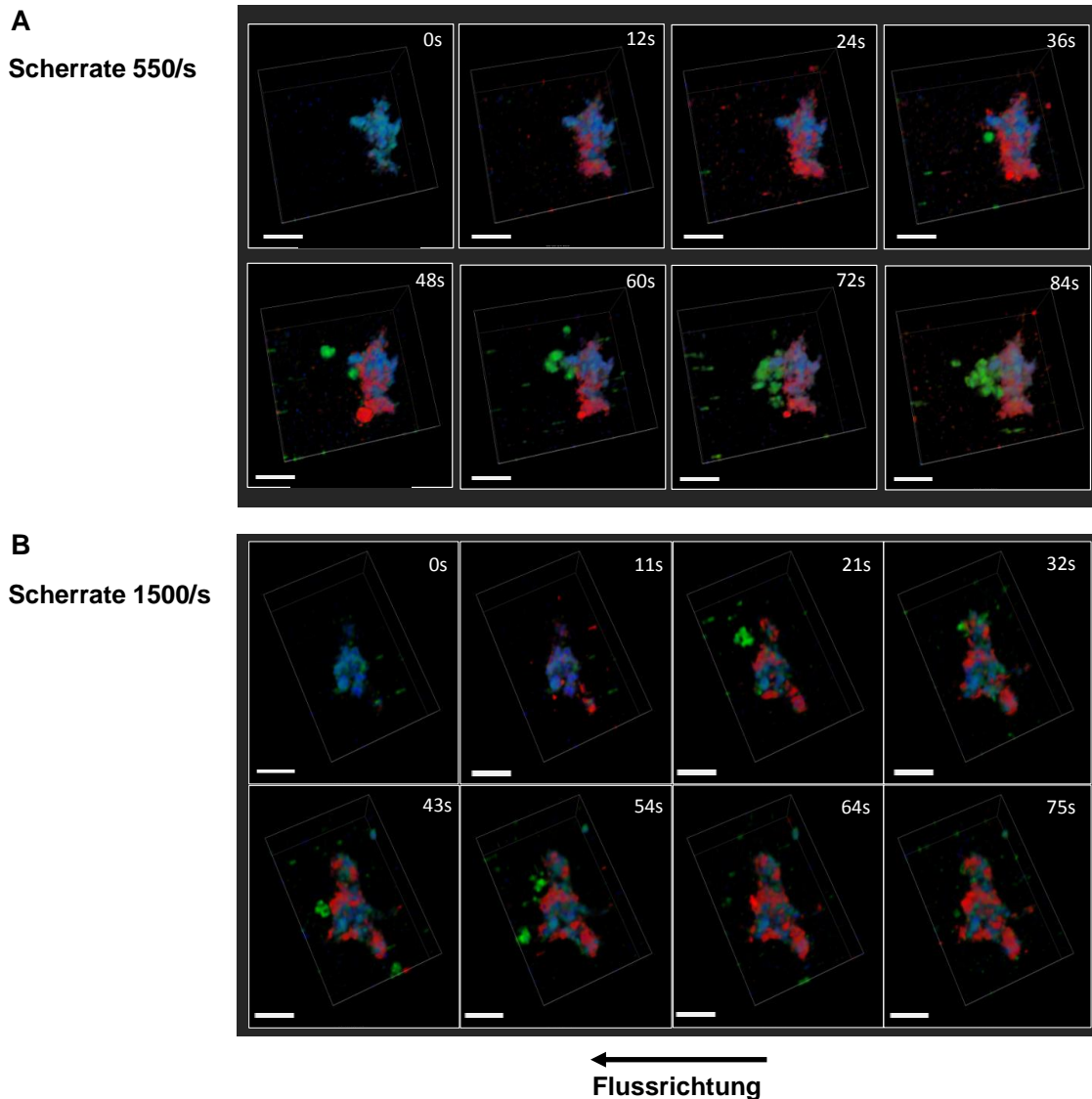


Abbildung 26: Thrombozyten (grün) aggregieren stromabwärts von Plaquematerial (blau) bei niedriger, aber nicht bei hoher Scherrate in Anwesenheit von GPVI-Fc (rot). Bildgebung mit TPLSM

Zur Thrombozytenfärbung wurde dem Blut DiOC6 beigegeben (grün, Emissionsbereich 510-532 nm). GPVI-Fc (50 µg/ml finale Konzentration) wurde mit Alexa Fluor® 594-konjugierten anti-human-Fc Antikörpern markiert (rot, Emissionsbereich 601-634 nm) und vor der Perfusion über Plaque dem Blut beigemischt. Representative 3D-Rekonstruktionen von TPLSM-Aufnahmen (z-Abschnitte 0,7 µm; totale Dicke 10 µm; Laserexcitation 770 nm) der Thrombozytenanhaftung an Plaque (Autofluoreszenz in blau, Emissionsbereich 410-490 nm) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Blutperfusion bei **(A)** geringer Scherrate (550/s) und **(B)** hoher Scherrate (1500/s). Skala = 5 µm. Siehe auch Video 7. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

5.3.4 Hochauflösende Darstellung der Interaktionsstellen von GPVI-Fc und Thrombozyten mit Plaquematerial und Kollagen mittels SIM

Um die Plaquestellen, an welche die Thrombozyten unter Strömungsbedingungen (550/s) in Anwesenheit von GPVI-Fc adhärirten, detaillierter visualisieren zu können, wurde SIM angewendet, die sehr hochauflösende fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen fixierter Präparate ermöglicht (Abbildung 27; 3D-Aufnahme in Video 9).

Dabei wurde beobachtet, dass GPVI-Fc in Form von Punkten, oft in perlschnurartiger Weise, an Plaque-Kollagen sowohl stromabwärts als auch stromaufwärts der Plaquefragmente gebunden hatte, wobei auch Abschnitte des Plaque-Kollagens von GPVI-Fc unbesetzt blieben (Abbildung 27). Die Thrombozyten adhärten an verschiedene Segmente der Kollagenfasern, und deren Interaktion mit Kollagen war in spezifischen z-Ebenen des Plaques erkennbar (siehe Pfeile in Abbildung 27; Video 9). Diese Stellen waren nicht mit GPVI-Fc besetzt, aber zuweilen in unmittelbarer Nähe zu GPVI-Fc, das an Kollagen gebunden hatte. Auch in den SIM-Experimenten adhärten die Thrombozyten vor allem stromabwärts der Plaquefragmente.

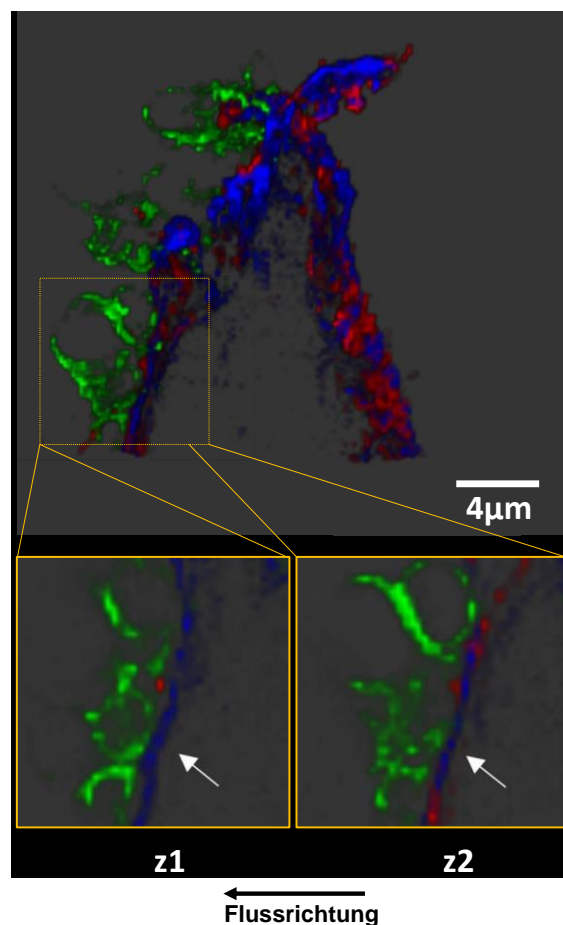


Abbildung 27: Thrombozyten (grün) adhärten stromabwärts an bestimmte Bereiche von Plaque-Kollagen (blau), die nicht mit GPVI-Fc besetzt sind, sich aber in nächster Nähe von GPVI-Fc (rot) befinden. SIM-Bildgebung

Mit anti-Kollagen Typ I und Typ III Antikörpern und Alexa Fluor® 405-konjugierten Sekundärantikörpern vorgefärbte Plaquehomogenate wurden mit GPVI-Fc (50 µg/ml, markiert mit Alexa Fluor® 594-gekoppelten anti-human-Fc Antikörpern) und Abciximab enthaltendem Blut bei einer Scherrate von 550/s überströmt. Die Präparate wurden 3 min nach Beginn der Perfusion fixiert und die Thrombozyten mit anti-CD41 Antikörpern und DyLight® 488-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt. SIM-Aufnahmen wurden von aufeinanderfolgenden 0,2 µm Abschnitten der Probe gemacht. **(Oben)** 3D-Überblick des Präparates (Dicke 3,6 µm). **(Unten)** Vergrößerte Ausschnitte des Präparates in zwei z-Positionen von unten nach oben (z1 = 1,0-1,6 µm; z2 = 1,6-2,2 µm) zeigen Thrombozytenadhäsion an bestimmte Stellen von Plaque-Kollagen (Pfeile). Das Bild ist repräsentativ für sieben weitere. Für eine 3D-Darstellung siehe auch Video 9. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

Zum Vergleich wurde die GPVI-Fc- und Thrombozytenbindung an Kollagenfasern untersucht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten stabil an Segmente von Kollagenfasern adhärten, die wenig GPVI-Fc trugen (Abbildung 28, siehe auch Video 10).

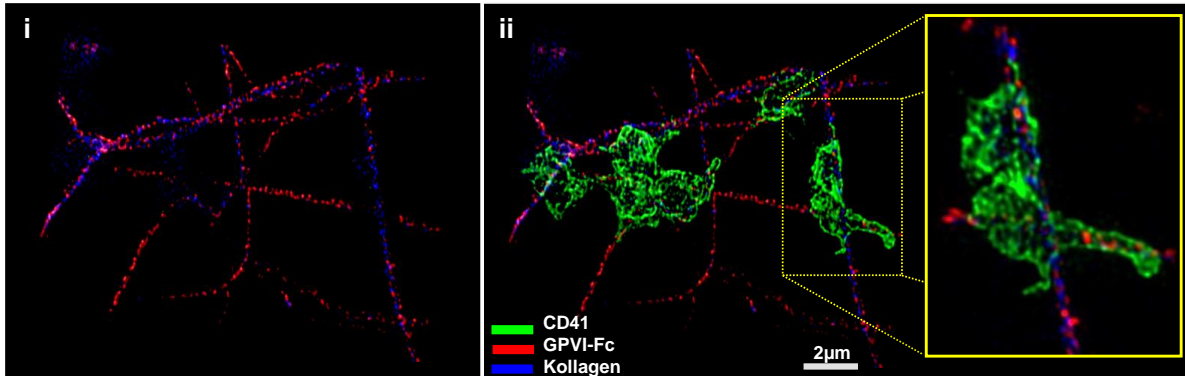


Abbildung 28: Thrombozyten adhärten an Kollagenssegmente, die wenig GPVI-Fc tragen. SIM Bildgebung

Kollagen-beschichtete Deckgläschen wurden mit anti-Kollagen Typ I und Typ III Antikörpern und Alexa Fluor® 405-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt. GPVI-Fc (50 µg/ml) wurde mit PE-gekoppelten anti-human-Fc Antikörpern markiert und vor Beginn der Perfusion (Scherrate 550/s) zu RGDS enthaltendem Blut gegeben. 4 min nach Beginn der Perfusion wurden die Thrombozyten fixiert und mit anti-CD41 Antikörpern und DyLight® 488-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt. Die Fluoreszenzbilder zeigen eine Maximumintensitätsprojektion von 0,15 µm z-Abschnitten (total z: 2,5 µm) eines SIM-Bildes. i und ii sind identische Bilder. i Bindung von GPVI-Fc (rot) an Kollagenfasern (blau). Der grüne Kanal (Thrombozyten) wurde ausgeblendet. ii Bild wie in i aber mit Thrombozyten (grün). Das Bild ist repräsentativ für fünf weitere von unterschiedlichen Experimenten. Für eine 3D-Darstellung siehe auch Video 10. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

5.3.5 Aufklärung des Mechanismus der Scherabhängigkeit der GPVI-Fc-Wirkung

Die mittels hochauflösender mikroskopischer Bildgebung gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass sich trotz GPVI-Fc-Behandlung des Blutes bei niedriger Scherrate Aggregate in Strömungsnischen der Plaquefragmente bildeten. Dabei dienten einzelne Thrombozyten, die vor allem an GPVI-Fc-freie Segmente des Plaque-Kollagens adhärten, als Startpunkte der Aggregatbildung. Diese Beobachtungen führten zu folgender Hypothese: Einzelne, an GPVI-Fc-freie Stellen adhärerende Thrombozyten werden durch Plaque-Kollagen aktiviert, setzen daraufhin ADP und TxA₂ frei, das bei niedrigen Scherraten in Strömungsnischen der Plaquestücke akkumuliert und somit für die Rekrutierung von vorbeifließenden Thrombozyten in Aggregate verantwortlich ist. Bei hohen Scherraten jedoch wird das von den Thrombozyten freigesetzte ADP und TxA₂ weggespült, sodass nur selten kleine Thrombozytenaggregate gebildet werden können. Die aufgestellte Hypothese ist in Abbildung 29 bildlich dargestellt.

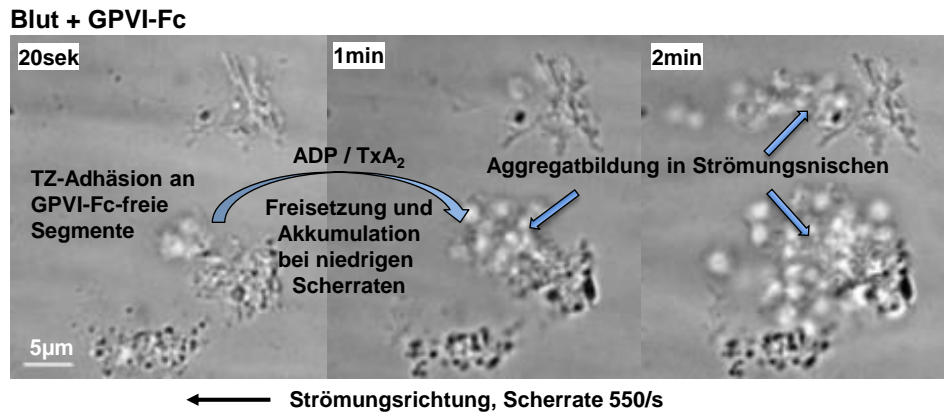


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Hypothese des Mechanismus der Scherabhängigkeit mit GPVI-Fc

TZ = Thrombozyten; ADP = Adenosindiphosphat; TxA₂ = Thromboxan A₂

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Flusseperimente bei niedriger Scherrate durchgeführt, bei denen sowohl der ADP-Rezeptor als auch die TxA₂-Synthese inhibiert wurde. Die kombinierte Hemmung des thrombozytären P2Y₁₂-Rezeptors durch Cangrelor und der TXA₂-Synthese durch ASS führte, wie erwartet, zu einer Verminderung, aber keiner vollständigen Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation. Die Kombination von ASS und Cangrelor mit GPVI-Fc jedoch verhinderte fast vollständig die bei niedriger Scherrate beobachtete, noch vorhandene Thrombozytenaggregatbildung nach GPVI-Fc-Behandlung des Blutes (Abbildung 30). Diese Ergebnisse deuten auf die Richtigkeit der zuvor aufgestellten Hypothese hin.

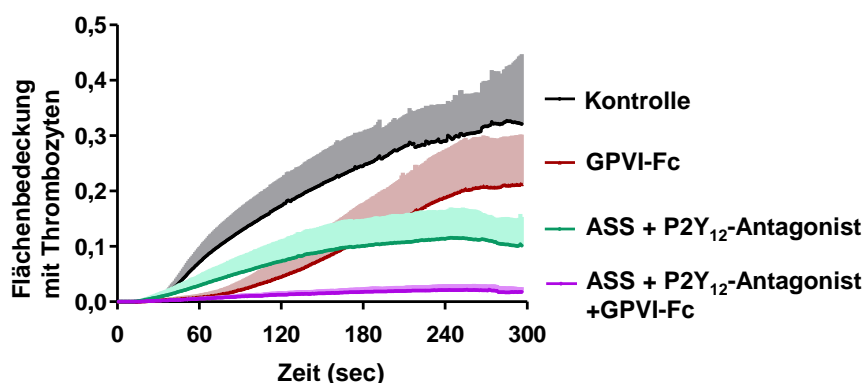


Abbildung 30: Die noch vorhandene Thrombozytenaggregation in Anwesenheit von GPVI-Fc wird durch die Blockade der thrombozytären Cyclooxygenase und des P2Y₁₂-Rezeptors gehemmt

Blut wurde für 5 min ohne (Kontrolle) oder mit GPVI-Fc (50 µg/ml) vorinkubiert, der P2Y₁₂-Rezeptorantagonist Cangrelor (1 µM) wurde dem ASS (1 mM) enthaltenden Blut, entweder alleine oder in Kombination mit GPVI-Fc, beigegeben. Das Blut wurde bei einer Scherrate von 550/s über Plaque perfundiert und die Thrombozytenaggregation mittels Videomikroskopie kontinuierlich (1 Bild/sek) aufgezeichnet. MW + SD, n = 5. ANOVA bei 300 sek mit sekundärem Paarvergleich ASS+P2Y₁₂-Antagonist+GPVI-Fc vs. ASS+P2Y₁₂-Antagonist und ASS+P2Y₁₂-Antagonist+GPVI-Fc vs. GPVI-Fc (p<0,005). Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

Als zusätzliche Verifizierung der Hypothese wurden weitere Experimente durchgeführt, bei denen dem Blut niedrige inhibitorische Schwellenkonzentrationen von 5C4 zugesetzt wurden, die zu einer ähnlichen Hemmung der Thrombozytenaggregation wie der durch GPVI-Fc bei niedriger Scherrate führten. Die Überlegung dabei war, die thrombozytären GPVI-Rezeptoren unvollständig zu blockieren, sodass sich immer noch freie GPVI-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche befinden würden, die mit Plaque-Kollagen interagieren könnten. Dabei adhärten die Thrombozyten ebenso vor allem an Stellen stromabwärts der Plaquefragmente und rekrutierten weitere Thrombozyten in Aggregate (siehe Video 11). Eine zusätzliche Hemmung der P2Y₁₂-Rezeptoren mit Ticagrelor und der TXA₂-Bildung durch ASS führte zu einer signifikanten Reduktion der Thrombozytenaggregation in Anwesenheit niedriger 5C4-Konzentrationen (Abbildung 31), was ebenso das vorgeschlagene Erklärungsmodell unterstützt.

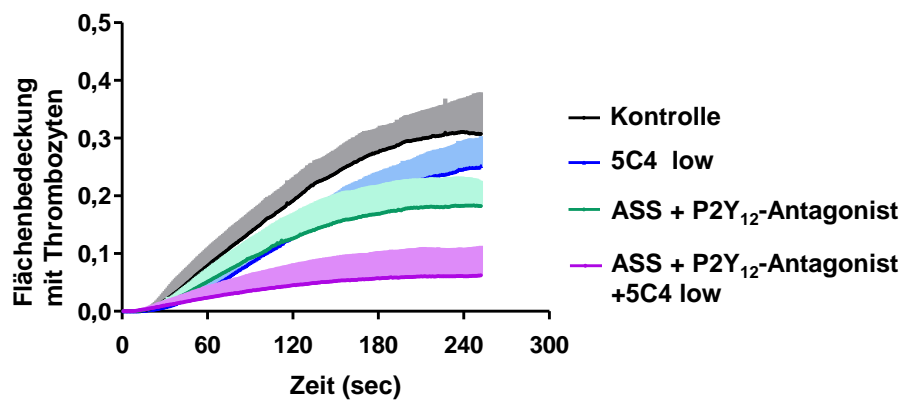


Abbildung 31: Die noch vorhandene Thrombozytenaggregation in Anwesenheit von niedrigen 5C4 Konzentrationen wird durch die Blockade der thrombozytären Cyclooxygenase und des P2Y₁₂-Rezeptors gehemmt

Blut wurde für 5 min ohne (Kontrolle) oder mit einer niedrigen inhibitorischen Schwellenkonzentration von 5C4 (5C4 low; 0,5 µg/ml) vorinkubiert, der P2Y₁₂-Rezeptorantagonist Ticagrelor (5 µM) wurde dem ASS (1 mM) enthaltenden Blut, entweder alleine oder in Kombination mit 5C4, beigegeben. Das Blut wurde bei einer Scherrate von 550/s über Plaque perfundiert und die Thrombozytenaggregation mittels Videomikroskopie kontinuierlich (1 Bild/sek) aufgezeichnet. MW + SD, n = 6. ANOVA bei 300 sek mit sekundärem Paarvergleich ASS+P2Y₁₂-Antagonist+5C4 low vs. ASS+P2Y₁₂-Antagonist und ASS+P2Y₁₂-Antagonist+5C4 low vs. 5C4 low (p<0,01). Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁴

5.4 Verbesserung der inhibitorischen Effizienz von GPVI-Fc durch anti-Fc-Antikörper-vermittelte Quervernetzung von GPVI-Fc

Da GPVI-Fc selbst in sehr hohen Konzentrationen nicht in der Lage war, alle Bindungsstellen an Kollagen abzusättigen und die Thrombozytenaggregation bei niedriger Scherrate zu verhindern, war das nächste Ziel, das inhibitorische Potential von GPVI-Fc zu verbessern. Dazu sollte GPVI-Fc in einer solchen Weise modifiziert werden, dass es eine kontinuierlichere Bindung an Kollagen aufweisen und einem Verdrängen durch Thrombozyten standhalten würde. Der thrombozytäre GPVI-Rezeptor clustert in „lipid rafts“, was zu einer hohen GPVI-Dimeren-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche führt. Deshalb war die Überlegung, GPVI-Fc in eine oligomere Form zu transformieren, um möglicherweise besser mit den GPVI-Dimeren auf aktivierten Thrombozyten kompetitieren zu können.

5.4.1 Herstellung von quervernetzten GPVI-Fc-Komplexen

Eine GPVI-Oligomerisierung wurde durch eine anti-Fc-Antikörper-vermittelte Quervernetzung der Fc-Teile von GPVI-Fc realisiert. Dies sollte zu einer engeren Anordnung der GPVI-Fc-Moleküle an ihren entsprechenden Bindungsmotiven auf Kollagen führen.

Um quervernetzte (XL, Abkürzung für „cross-linking“) GPVI-Fc-Komplexe zu generieren (GPVI-Fc*IgG-XL und GPVI-Fc*Fab2-XL) wurden anti-human-Fc IgG und anti-human-Fc Fab2 Antikörper in äquimolaren Konzentrationen mit GPVI-Fc präinkubiert. Eine schematische Darstellung der Herstellung quervernetzter GPVI-Fc-Komplexe ist am Beispiel der Quervernetzung durch anti-human-Fc Fab2 in Abbildung 32 dargestellt.

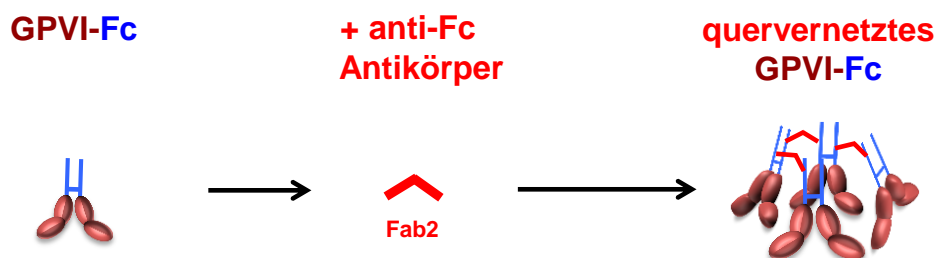


Abbildung 32: Schematische Darstellung der durch anti-Fc-Antikörper vermittelten Quervernetzung von GPVI-Fc

5.4.2 Hemmung der statischen Thrombozytenaggregation durch quervernetztes GPVI-Fc

Die Wirkung der quervernetzten GPVI-Fc-Komplexe auf die Thrombozytenaggregation wurde zuerst unter statischen Bedingungen in gerührtem Blut mittels Impedanzaggregometrie getestet und mit der Wirkung von unvernetztem GPVI-Fc verglichen. Dabei führte die Vorinkubation von Blut mit den quervernetzten GPVI-Fc-Komplexen (GPVI-Fc*IgG-XL oder GPVI-Fc*Fab2-XL) zur effektiveren Hemmung der Plaque- oder Kollagen-stimulierten Thrombozytenaggregation als GPVI-Fc alleine (Abbildung 33). Für mit Plaquehomogenat stimulierte Proben wurde eine Hemmung von $72 \pm 12\%$ mit GPVI-Fc*IgG-XL im Vergleich zu $35 \pm 13\%$ mit unvernetztem GPVI-Fc erreicht und eine Hemmung von $84 \pm 10\%$ durch GPVI-Fc*Fab2-XL im Vergleich zu $40 \pm 13\%$ durch GPVI-Fc. Für Kollagen-stimulierte Proben lag die Hemmung durch GPVI-Fc*IgG-XL bei $60 \pm 17\%$ im Vergleich zu $20 \pm 17\%$ durch GPVI-Fc, und die Hemmung durch GPVI-Fc*Fab2-XL lag bei $67 \pm 21\%$ im Vergleich zu $18 \pm 9\%$ durch GPVI-Fc. Mit Fc-Kontrollprotein, das mit anti-human-Fc IgG oder anti-human-Fc Fab2 quervernetzt wurde (Fc*IgG-XL; Fc*Fab2-XL), oder mit IgG oder Fab2 alleine wurde keine signifikante Hemmung der Thrombozytenaggregation gemessen (Abbildung 33).

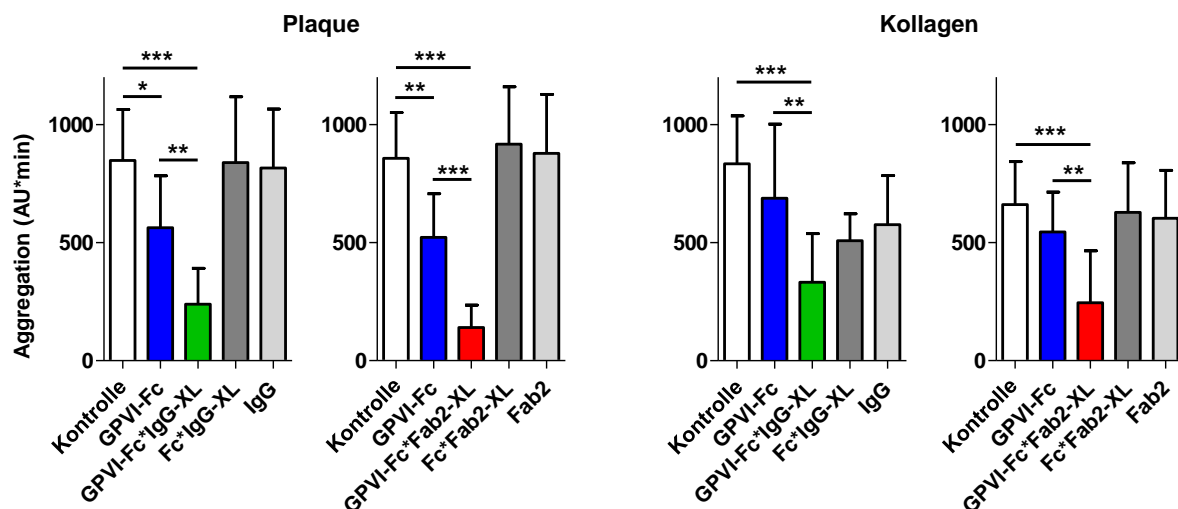


Abbildung 33: Die Quervernetzung von GPVI-Fc durch anti-human-Fc IgG (GPVI-Fc*IgG-XL) und anti-human-Fc Fab2 (GPVI-Fc*Fab2-XL) verstärkt die Hemmung der Kollagen- oder Plaque-induzierten statischen Thrombozytenaggregation verglichen mit GPVI-Fc

Balkendiagramme der Effekte von GPVI-Fc (20 µg/ml; 133 nM) und GPVI-Fc und Fc-Kontrollprotein, die mit anti-human-Fc IgG (GPVI-Fc*IgG-XL, Fc*IgG-XL; 133nM, linke Felder) oder mit anti-human-Fc Fab2 (GPVI-Fc*Fab2-XL, Fc*Fab2-XL; 133 nM, rechte Felder) quervernetzt wurden, auf die Plaque- oder Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation. Weitere Kontrollen wurden mit anti-human-Fc IgG (133 nM; linke Felder) und anti-human-Fc Fab2 (133 nM; rechte Felder) durchgeführt. Die kumulative Thrombozytenaggregation (AU*min) wurde mittels MEA über 10 min gemessen. MW + SD, n = 4. ANOVA für wiederholte Messungen mit sekundären Paarvergleichen (wie durch Linien angezeigt) mit Tukey's Test. *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

Konzentrationsabhängigkeitskurven von GPVI-Fc*Fab2-XL zeigten ab einer Konzentration von 33 nM bei allen Konzentrationen eine signifikant stärkere Hemmung durch GPVI-Fc*Fab2-XL als durch unvernetztes GPVI-Fc, sowohl nach Plaque- als auch nach Kollagen-Stimulation (Abbildung 34).

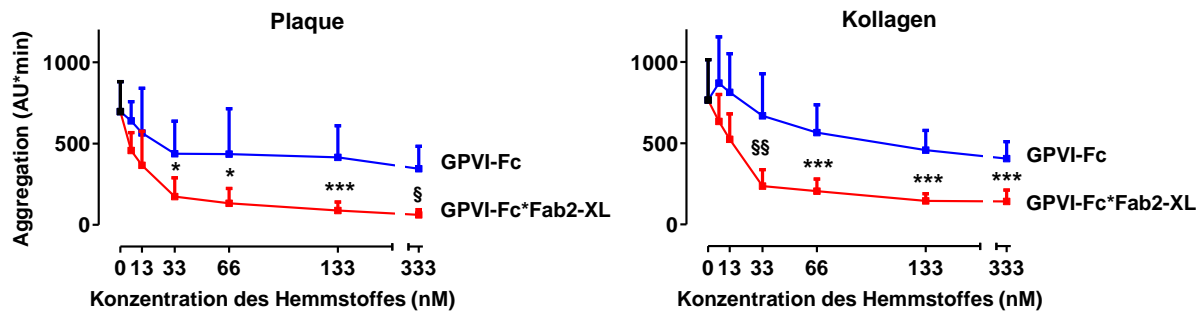


Abbildung 34: Konzentrationsabhängigkeit des Effektes von GPVI-Fc*Fab2-XL auf die Plaque- und Kollagen-vermittelte Thrombozytenaggregation verglichen mit GPVI-Fc

GPVI-Fc und GPVI-Fc, das mit anti-human-Fc Fab2 zur Quervernetzung vorinkubiert wurde (GPVI-Fc*Fab2-XL), wurde dem Blut in aufsteigenden Konzentrationen vor Start der Messung beigemischt. Die Plaque- oder Kollagen-induzierte kumulative Thrombozytenaggregation (AU*min) wurde mittels MEA über 10 min gemessen. MW + SD, n = 4-6. *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001 mit Student's t-Test oder §: p<0,05; §§: p<0,01 mit Mann-Whitney's U-Test. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

5.4.3 Hemmung der durch Plaque und Kollagen induzierten Thrombozytenaggregation durch quervernetztes GPVI-Fc unter Strömungsbedingungen

Neben den oben gezeigten Experimenten der statischen Thrombozytenaggregation, wurde im Folgenden die Hemmwirkung von quervernetztem und unvernetztem GPVI-Fc unter Strömungsbedingungen verglichen um der pathophysiologischen Situation einer Plaque-verletzung in vivo ein Stück näher zu kommen.

5.4.3.1 Potentere Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch quervernetztes GPVI-Fc verglichen mit unvernetztem GPVI-Fc

Wie in den mikroskopischen Aufnahmen und Diagrammen in Abbildung 35 A und B gezeigt ist, hemmte GPVI-Fc*IgG-XL die Plaque-stimulierte Aggregatbildung zu jedem Zeitpunkt nach Beginn der Perfusion effektiver als GPVI-Fc. Mit GPVI-Fc*Fab2-XL war die Hemmung sogar noch ausgeprägter und die Thrombozytenanlagerung an Plaque war nahezu aufgehoben (Abbildung 35). Die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch GPVI-Fc*IgG-XL und GPVI-Fc*Fab2-XL war interessanterweise am Ende der Perfusion nach Plaque-Stimulation ausgeprägter als nach Kollagen-Stimulation (Abbildung 35 B).

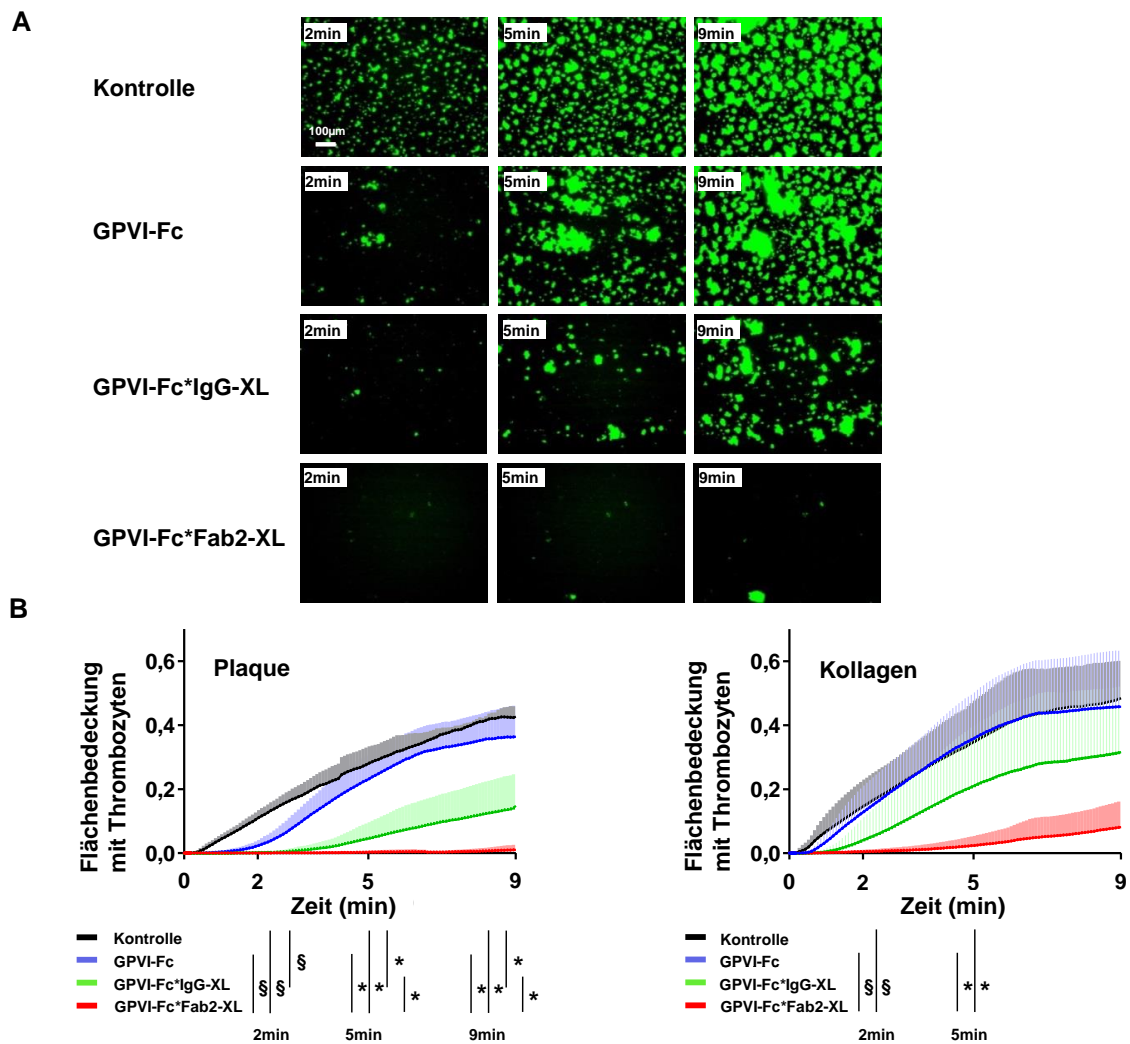


Abbildung 35: Die Quervernetzung von GPVI-Fc mit anti-human-Fc IgG (GPVI-Fc*lgG-XL) oder anti-human-Fc Fab2 (GPVI-Fc*Fab2-XL) erhöht dessen Hemmung der Plaque- oder Kollagen-stimulierten Thrombozytenaggregation unter Strömungsbedingungen

Puffer R (Kontrolle), GPVI-Fc oder GPVI-Fc (50 µg/ml; 333 nM), das mit äquimolaren Mengen von anti-human-Fc IgG oder anti-human-Fc Fab2 Antikörpern zur Quervernetzung vorinkubiert wurde, wurde vor der Perfusion über Plaquehomogenat (Scherrate 600/s) zu DiOC6 (zur Thrombozytenfärbung) enthaltendem Blut gegeben. **(A)** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der mit Thrombozyten bedeckten Fläche 2, 5 und 9 min nach Beginn der Perfusion. **(B)** Effekt von GPVI-Fc, GPVI-Fc*lgG-XL oder GPVI-Fc*Fab2-XL auf die Kinetik der Thrombozytenablagerung von fließendem Blut auf Plaque oder Kollagen (1 Bild/sek). MW + SD, n = 4-6. Vergleiche mit ANOVA on ranks (2 min) bzw. ANOVA (5 und 9 min) und sekundären Paarvergleichen wie durch Linien angezeigt (§: p<0,05; *: p<0,05). Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

Wie auch in den statischen Assays hemmte das mit anti-human-Fc IgG oder anti-human-Fc Fab2 quervernetzte Fc-Kontrollprotein die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation unter Strömungsbedingungen nicht (Abbildung 36).

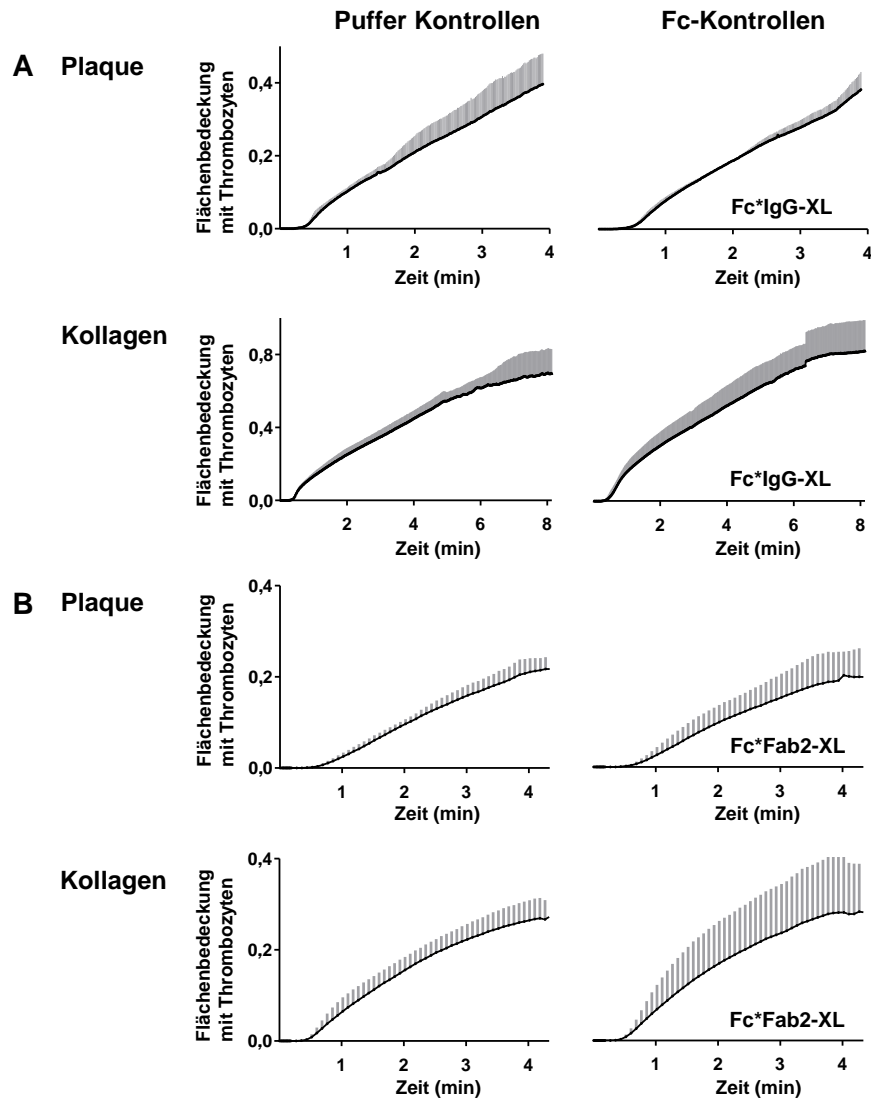


Abbildung 36: Die Quervernetzung von Fc-Kontrollprotein mit anti-human-Fc IgG (A) und anti-human-Fc Fab2 (B) hat, verglichen mit unbehandeltem Blut, keinen Einfluss auf die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation unter Strömungsbedingungen

Fc-Kontrollprotein (Fc; 333 nM) wurde zur Quervernetzung mit äquimolaren Konzentrationen von anti-human-Fc IgG oder Fab2 inkubiert. Puffer (Kontrolle), Fc-Kontrollprotein + anti-human-Fc IgG (Fc*IgG-XL; 333 nM), oder Fc-Kontrollprotein + anti-human-Fc Fab2 (Fc*Fab2-XL; 333 nM) wurden vor der Perfusion (Scherrate 600/s) über Plaquehomogenat oder Kollagen dem DiOC6 (zur Thrombozytenfärbung) enthaltenden Blut beigegeben. Fluoreszenzbilder der Thrombozytenanlagerung wurden kontinuierlich aufgezeichnet (1 Bild/5 sek). MW + SD, n = 3. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

Die antithrombotische Wirkung von quervernetztem GPVI-Fc wurde mit der des GPVI-Antikörpers 5C4 verglichen. Dabei schien GPVI-Fc*Fab2-XL die Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregation unter Strömungsbedingungen sogar noch besser zu hemmen als 5C4 (Abbildung 37).

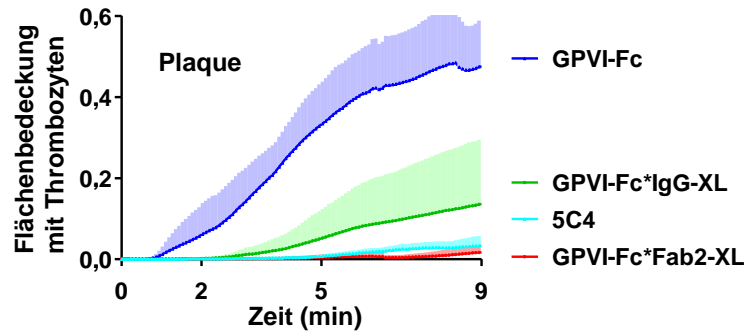


Abbildung 37: Vergleich der Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation durch quervernetztes GPVI-Fc und dem GPVI-Antikörper 5C4 unter Strömungsbedingungen

GPVI-Fc wurde mit anti-human-Fc Fab2 oder IgG in äquimolaren Konzentrationen vorinkubiert (GPVI-Fc*Fab2-XL, GPVI-Fc*IgG-XL). 5C4 (2,5 µg/ml) wurde für 5 min im Blut inkubiert, GPVI-Fc (50 µg/ml; 333 nM), GPVI-Fc*Fab2-XL (333 nM) und GPVI-Fc*IgG-XL (333 nM) wurden vor der Perfusion (Scherrate 600/s) über Plaquehomogenat dem DiOC6 (zur Thrombozytenfärbung) enthaltenden Blut beigemischt. Fluoreszenzbilder der Thrombozytenablagerung wurden kontinuierlich aufgenommen (1 Bild/5 sek). MW + SD, n = 3. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

Weitere Experimente zeigten, dass das Mengenverhältnis von GPVI-Fc zu den anti-Fc-Antikörpern für die Hemmung der Thrombozytenaggregation unter Strömungsbedingungen entscheidend war. Ein 1:1 (äquimolar) Verhältnis von GPVI-Fc : anti-human-Fc Fab2, womit möglicherweise längere lineare Komplexe generiert werden, war effektiver in der Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation als ein molares Verhältnis von 1:0,5 GPVI-Fc : anti-human-Fc Fab2 (Abbildung 38).

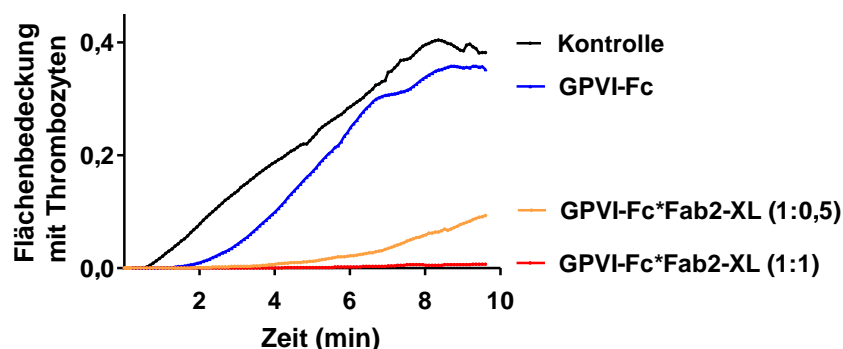


Abbildung 38: Das Ausmaß der Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation durch quervernetztes GPVI-Fc unter Strömungsbedingungen ist abhängig vom molaren Verhältnis von GPVI-Fc : quervernetztem Antikörper

GPVI-Fc wurde mit anti-human-Fc Fab2 Antikörpern in äquimolaren Konzentrationen (1:1 Verhältnis) oder in einem molaren Verhältnis von 1:0,5 (GPVI-Fc : anti-human-Fc Fab2) inkubiert. Puffer R (Kontrolle), GPVI-Fc (50 µg/ml) und GPVI-Fc*Fab2-XL (1:0,5 und 1:1 molare Verhältnisse) wurden vor der Perfusion über Plaquehomogenat (Scherrate 600/s) dem DiOC6 (zur Thrombozytenfärbung) enthaltenden Blut beigegeben. Fluoreszenzbilder der Thrombozytenablagerung wurden kontinuierlich aufgenommen (1 Bild/sek). Das Experiment ist repräsentativ für zwei weitere. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

In den folgenden experimentellen Ansätzen sollte unvernetztes sowie quervernetztes GPVI-Fc durch Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht werden. Dazu wurden zur alleinigen Markierung (ohne Quervernetzung) von GPVI-Fc Fluorophor-gekoppelte anti-human-Fc Antikörper in einem molaren Verhältnis 20:1 oder 10:1 (GPVI-Fc : Antikörper) eingesetzt. Dabei wurde - basierend auf den Ergebnissen von Abbildung 38 und 40 - angenommen, dass bei diesen molaren Verhältnissen die Antikörper GPVI-Fc nicht quervernetzen. Deshalb werden im Folgenden die GPVI-Fc-Komplexe, bei denen GPVI-Fc nicht in einem molaren Verhältnis von 1:1 mit anti-human-Fc Antikörpern gemischt wurde, als unvernetztes GPVI-Fc bezeichnet (GPVI-Fc*IgG bzw. GPVI-Fc*Fab2).

5.4.3.2 Kinetik der Bindung von unvernetztem und quervernetztem GPVI-Fc

Um zu untersuchen, ob die bessere inhibitorische Wirkung von quervernetztem GPVI-Fc durch dessen schnellere Bindung zustandekam, wurde die Bindungskinetik von unvernetztem GPVI-Fc und quervernetztem GPVI-Fc an Kollagen verglichen. Die Perfusion von Kollagen-beschichteten Deckgläsern mit Blut, das PE-markiertes quervernetztes GPVI-Fc (GPVI-Fc*Fab2-XL) oder PE-markiertes unvernetztes GPVI-Fc (GPVI-Fc*Fab2) enthielt, zeigte, dass die Bindung von GPVI-Fc*Fab2-XL nur geringfügig schneller war als die von GPVI-Fc*Fab2 (Abbildung 39; Video 12 und Video 13). Wie in den Fluoreszenzintensitäts-Oberflächendiagrammen illustriert ist, war jedoch die Bindung von GPVI-Fc*Fab2-XL an Kollagen viel höher als die von GPVI-Fc*Fab2 (Abbildung 39).

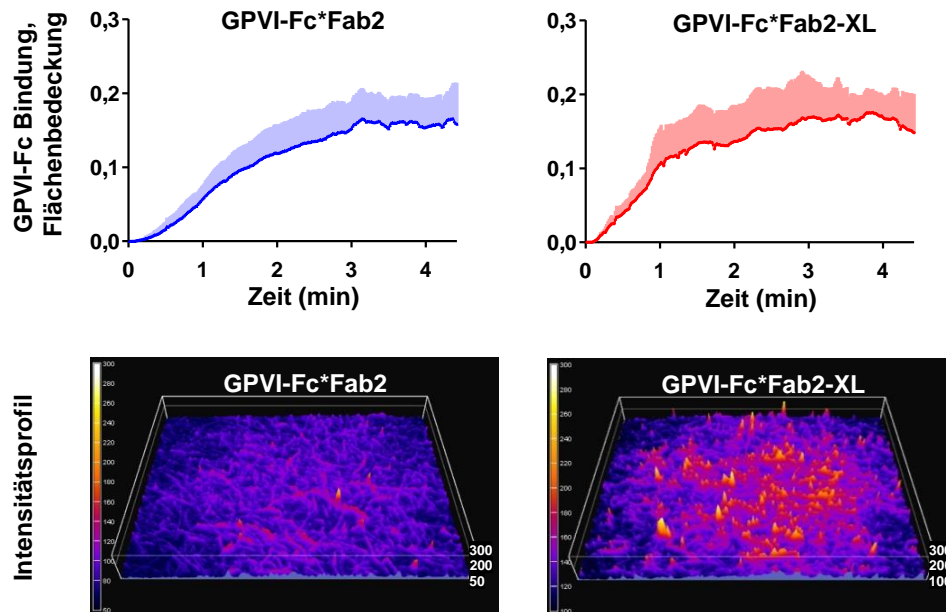


Abbildung 39: Kinetik der Bindung von unvernetztem und quervernetztem GPVI-Fc an Kollagen

GPVI-Fc (50 µg/ml; 333 nM) wurde entweder mit PE-markiertem anti-human-Fc Fab2 (20:1 mol/mol, GPVI-Fc*Fab2) oder mit einer Mischung von PE-markiertem und unmarkiertem anti-human-Fc Fab2 (1:10) zur Quervernetzung (GPVI-Fc*Fab2-XL, 1:1 mol/mol, GPVI-Fc : anti-human-Fc Fab2) vorinkubiert. Die Mischungen wurden vor der Perfusion über Kollagen (Scherrate 600/s) dem Abciximab enthaltenden Blut beigegeben. Die Bindung von fluoreszenzmarkiertem GPVI-Fc (quervernetzt oder unvernetzt) an Kollagen wurde mit Hilfe eines 10x Objektivs mittels Videomikroskopie (1 Bild/sek) kontinuierlich aufgenommen. **(Oben)** Zeitverlauf der GPVI-Fc*Fab2- und GPVI-Fc*Fab2-XL-Bindung an Kollagen (Flächenbedeckung). MW + SD, n = 4. Siehe auch Videos 12 und 13. **(Unten)** Fluoreszenzintensitäts-Oberflächendiagramme von an Kollagen gebundenes GPVI-Fc*Fab2 und GPVI-Fc*Fab2-XL 3 min nach Beginn der Perfusion. Farbverläufe zeigen eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

5.4.4 Analyse der quervernetzten und unvernetzten GPVI-Fc-Komplexe mittels analytischer Ultrazentrifugation

Nach der Generierung der funktionellen Daten zur überlegenen Wirksamkeit von quervernetztem GPVI-Fc sollten die durch die Interaktion von GPVI-Fc mit anti-Fc-Antikörpern gebildeten Proteinkomplexe genauer charakterisiert werden. Als Verfahren zur Charakterisierung der Proteinkomplexe wurde analytische Ultrazentrifugation (AUZ) durchgeführt. Dazu wurde GPVI-Fc entweder mit Alexa Fluor[®] 488-konjugierten anti-human-Fc IgG oder anti-human-Fc Fab2 Antikörpern vorinkubiert. Um GPVI-Fc mit anti-Fc-Antikörpern zu sättigen, wurde ein GPVI-Fc:Antikörper-Verhältnis von 10:1 gewählt (GPVI-Fc*Fab2, GPVI-Fc*IgG), wohingegen für die Quervernetzung von GPVI-Fc ein GPVI-Fc:Antikörper-Verhältnis von 1:1 verwendet wurde (GPVI-Fc*Fab2-XL, GPVI-Fc*IgG-XL). Die AUZ der entstandenen Proteinkomplexe brachte verschiedene Größenverteilungsmuster je nach quervernetztem Antikörper hervor.

Für unvernetzte und mit anti-human-Fc IgG quervernetzte Komplexe von GPVI-Fc ergaben sich drei Peaks mit ähnlichen Svedberg-Werten, jedoch unterschiedlicher Mengenverteilung der Proteine (Abbildung 40 A).

Bei der Verwendung von anti-human-Fc Fab2 zur Quervernetzung von GPVI-Fc wurde eine Verschiebung zu höheren Svedberg-Werten beobachtet, was auf die Bildung von Proteinkomplexen mit höherem Molekulargewicht und möglicherweise verschiedenen Konfigurationen von Fab2-quervernetzten Komplexen hindeutet (Abbildung 40 A).

Eine genauere Größenbestimmung der entstandenen Proteinkomplexe war mit dieser Methode jedoch nicht möglich, da die Peaks breit und nicht klar getrennt waren.

Mögliche Strukturen der GPVI-Fc*IgG-XL- und GPVI-Fc*Fab2-XL-Komplexe basierend auf dem annähernden Molekulargewicht der Hauptpeaks (etwa 400-800 kDa) sind in Abbildung 40 B dargestellt. Sie zeigen die Bildung von oligomeren ((GPVI-Fc)₂ und (GPVI-Fc)₃) GPVI-Fc-Antikörper-Komplexen.

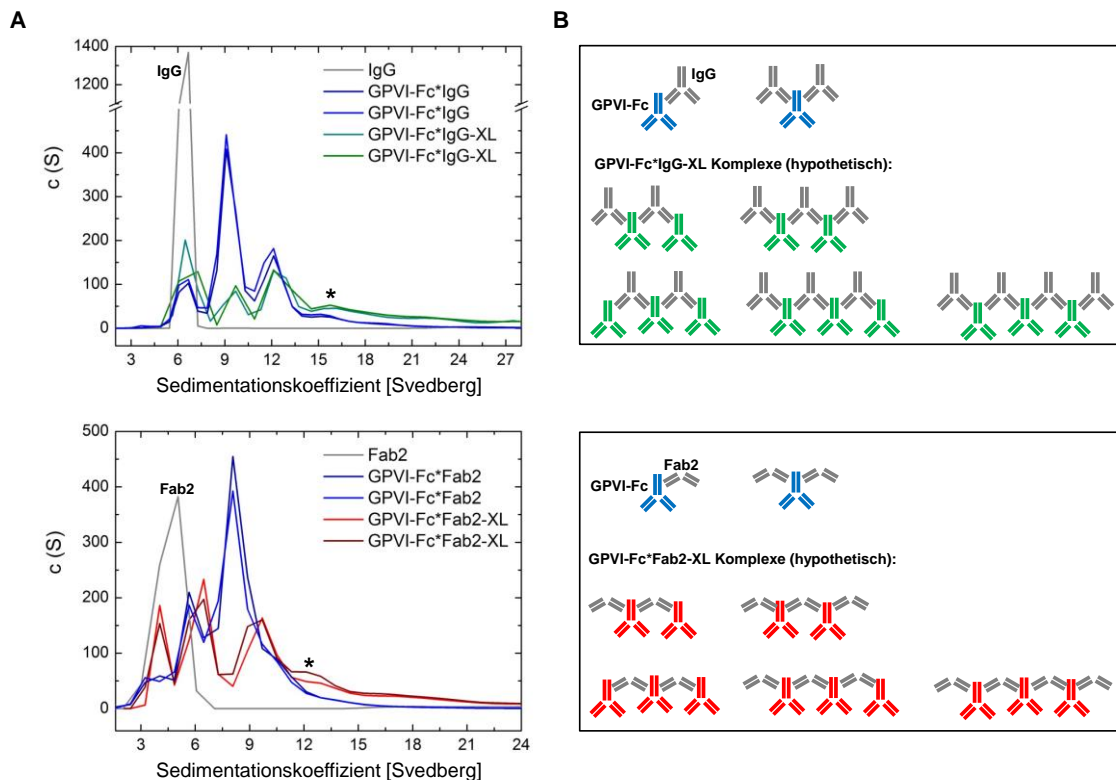


Abbildung 40: Durch analytische Ultrazentrifugation ermitteltes Molekulargewichtsverteilungsmuster der unvernetzten und quervernetzten GPVI-Fc-Komplexe

GPVI-Fc 2,5 μ M (10:1 molares Verhältnis zu Fc-Antikörper) oder 400 nM (1:1 molares Verhältnis zu Fc-Antikörper) wurde mit anti-human-Fc IgG-Alexa Fluor[®] 488 (oben) oder anti-human-Fc Fab2-Alexa Fluor[®] 488 (unten) entweder in einem molaren Verhältnis von 10:1 (dunkel und hell blau: GPVI-Fc*IgG, GPVI-Fc*Fab2) oder in einem molaren Verhältnis von 1:1 zur Quervernetzung von GPVI-Fc (dunkel und hell grün: GPVI-Fc*IgG-XL; rot, braun: (GPVI-Fc*Fab2-XL) inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert und die Sedimentation wurde aufgezeichnet (1 Scan/90 sek). **(A)** c(S) Sedimentationskoeffizienten der Proben wurden in Duplikaten durchgeführt. Sternchen: hochmolekulare Komplexe. **(B)** Mögliche GPVI-Fc-Antikörper-Komplexe. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸, (A) ist Teil der Doktorarbeit von C. John.

5.4.5 Analyse der Bindung von Thrombozyten und GPVI-Fc-Komplexen mittels hochauflösender mikroskopischer Verfahren

Als nächstes wurden hochauflösende mikroskopische Bildgebungsmethoden (SIM und STED) angewendet, um die Bindung der GPVI-Fc-Komplexe an Kollagen detailliert darzustellen. Zuerst wurde zum einen die Anlagerung von unvernetztem GPVI-Fc an Kollagenfasern aus fließendem Blut mit der von quervernetztem GPVI-Fc verglichen und zum anderen die Thrombozytenadhäsion unter beiden Bedingungen untersucht.

Die SIM-Bildgebung von nach der Blutperfusion fixierten Präparaten zeigte, dass unvernetztes fluoreszenzmarkiertes GPVI-Fc*IgG und GPVI-Fc*Fab2 an Kollagen in punktförmiger, inhomogener Weise gebunden hatte, wobei Segmente auf den Kollagenfasern frei blieben, die von Thrombozyten zur Oberflächenmembranverankerung verwendet wurden (Abbildung 41). Im Gegensatz dazu war die Bindung von quervernetztem fluoreszenzmarkiertem GPVI-Fc*IgG-XL und GPVI-Fc*Fab2-XL an Kollagen ausgeprägter, homogener und schnell genug, um eine Thrombozytenanheftung nahezu vollständig zu verhindern (Abbildung 41). Diese qualitativen Beobachtungen (Abbildung 41 links) wurden durch quantitative Messungen bestätigt (Abbildung 41 rechts).

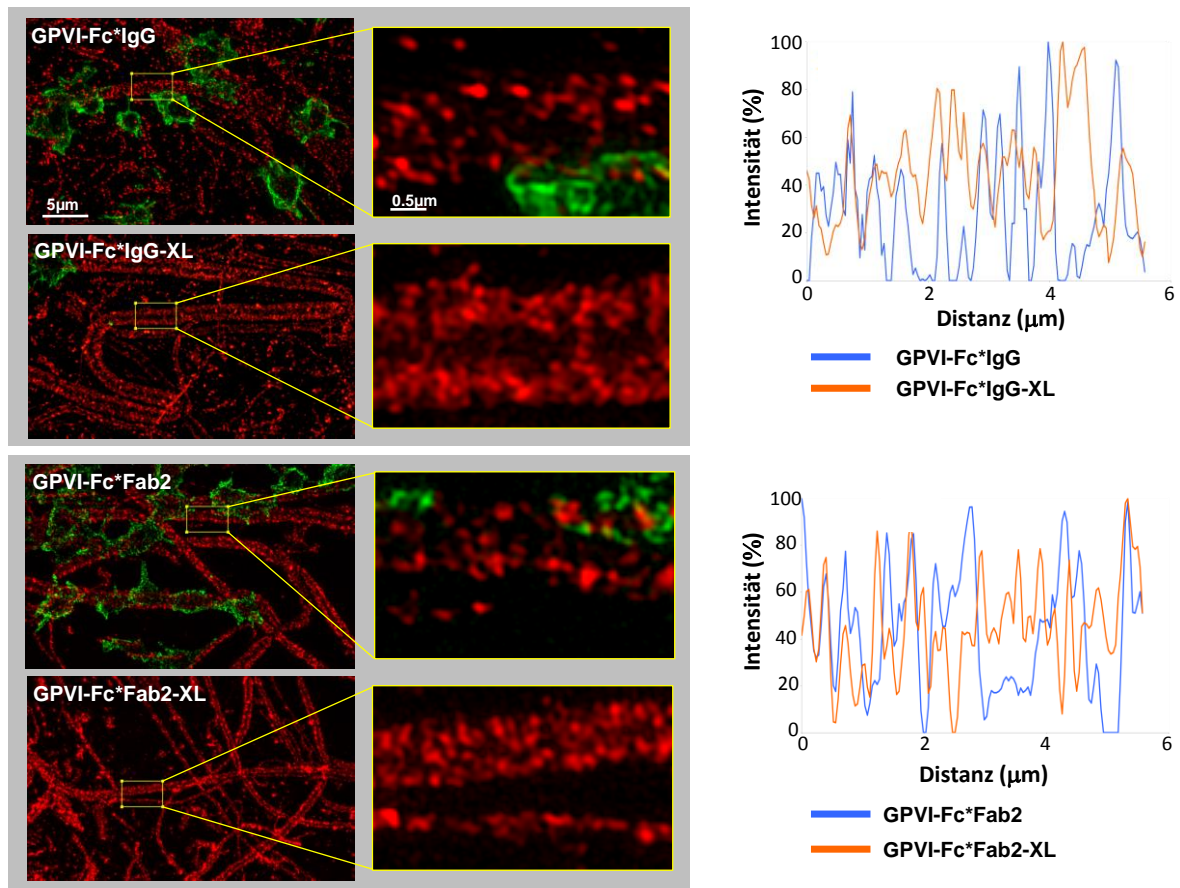


Abbildung 41: SIM-Bildgebung der Bindung von GPVI-Fc (unvernetzt und quervernetzt) und Thrombozyten an Kollagen

GPVI-Fc wurde mit anti-human-Fc Antikörpern entweder in einem molaren Verhältnis von 20:1 (GPVI-Fc*IgG, GPVI-Fc*Fab2) inkubiert, oder zur Quervernetzung in einem molaren Verhältnis von 1:1 (GPVI-Fc*IgG-XL, GPVI-Fc*Fab2-XL). Die Antikörper enthielten 10% PE-konjugiertes anti-human-Fc IgG oder anti-human-Fc Fab2. Die Mischungen wurden vor der Perfusion über Kollagen (Scherrate 600/s) dem Abciximab enthaltenden Blut beigegeben (333 nM GPVI-Fc). 4 min nach Beginn der Perfusion wurden die Thrombozyten fixiert und mit anti-CD41 Antikörpern und DyLight® 488-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt. **(Links)** SIM-Bilder der Bindung von PE-markiertem GPVI-Fc (unvernetzt und quervernetzt, rot) und Thrombozyten (grün) an Kollagen mit vergrößerten Ausschnitten (x800) auf der rechten Seite. Es sind Maximumintensitätsprojektionen von 0,15 µm z-Abschnitten (total z: 2,5 µm) dargestellt. **(Rechts)** In den links aufgeführten Bildern wurden mit Hilfe der ZEN-Software Linienintensitätsprofile (Maximale Intensität 100%) erzeugt, indem eine gekrümmte Linie in der zentralen Fokusebene entlang vergleichbarer, thrombozytenfreier Segmente einer Kollagenfasern gezogen wurde. Der Prozentsatz der Intensität wurde basierend auf dem maximalen Intensitätsniveau, das in der quantifizierten Region gemessen wurde, berechnet. Die Bindung von unvernetztem GPVI-Fc an Kollagen ist diskontinuierlich und zeigt Fasersegmente, die nicht von GPVI-Fc besetzt sind (Null-Intensität in den Linienprofilen). Die Bilder sind repräsentativ für fünf verschiedene Experimente. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

Um den alleinigen Effekt der quervernetzten GPVI-Fc-Komplexe auf die Thrombozytenadhäsion, ungeachtet der GPVI-Fc*IgG-XL- und GPVI-Fc*Fab2-XL-Bindung, sichtbar zu machen, wurde nach Behandlung des Blutes mit unvernetztem oder quervernetztem GPVI-Fc die Thrombozytenadhäsion an gefärbten Kollagenfasern mittels SIM untersucht. Auch in diesen Experimenten stellte sich die bessere Wirksamkeit von GPVI-Fc*IgG-XL und GPVI-Fc*Fab2-XL gegenüber GPVI-Fc bei der Hemmung der Thrombozytenadhäsion an Kollagenfasern deutlich heraus (Abbildung 42).

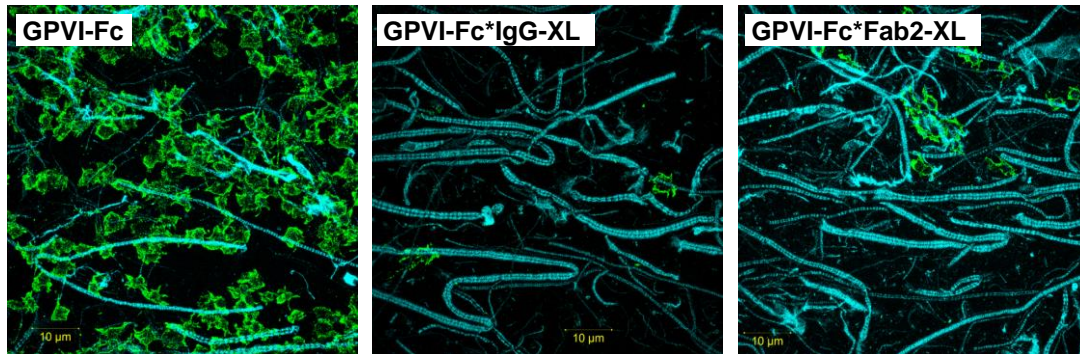


Abbildung 42: SIM-Bildgebung der stabilen Thrombozytenadhäsion an Kollagenfasern nach Zugabe von GPVI-Fc, GPVI-Fc*IgG-XL oder GPVI-Fc*Fab2-XL zum Blut

Kollagen-beschichtete Deckgläschen wurden mit anti-Kollagen Typ I und Typ III Antikörpern und Alexa Fluor[®] 405-konjugierten Sekundärantikörpern (blau) gefärbt. GPVI-Fc wurde zur Quervernetzung mit anti-human-Fc IgG oder Fab2 Antikörpern in einem molaren Verhältnis von 1:1 (GPVI-Fc*IgG-XL, GPVI-Fc*Fab2-XL) inkubiert. GPVI-Fc (50 µg/ml) oder äquimolare Konzentrationen von GPVI-Fc*IgG-XL oder GPVI-Fc*Fab2-XL wurden vor Beginn der Perfusion (Scherrate 600/s) dem Abciximab enthaltenen Blut beigegeben. 4min nach Beginn des Blutflusses wurden die Thrombozyten fixiert und mit anti-CD41 Antikörpern und DyLight[®] 488-konjugierten Sekundärantikörpern (grün) gefärbt. Es sind Maximumintensitätsprojektionen von 0,15 µm z-Abschnitten (total z: 2,5 µm) dargestellt. Das Bild ist repräsentativ für fünf weitere von verschiedenen Experimenten. Jamasbi et al.¹¹⁸

Das genaue Bindungsmuster der unvernetzten und quervernetzten GPVI-Fc-Komplexe an Kollagenfasern wurde nun weiter mit Hilfe von optischer Nanoskopie unter Verwendung von SIM und STED (für noch höhere Auflösung) analysiert. Dazu wurden Kollagenfasern direkt, entweder mit fluoreszenzmarkiertem, unvernetztem GPVI-Fc oder mit GPVI-Fc, das zuvor mit anti-human-Fc IgG oder anti-human-Fc Fab2 quervernetzt wurde, inkubiert. Die Analyse der Präparate mit SIM zeigte, dass die quervernetzten GPVI-Fc-Komplexe eine kontinuierliche und homogene Bindung an Kollagen im Vergleich zu einem eher gepunkteten Bindungsmuster von unvernetztem GPVI-Fc aufwiesen (Abbildung 43).

Um eine noch höhere Auflösung als mit SIM zu erreichen, wurde die Bindung von unvernetztem und quervernetztem GPVI-Fc an Kollagenfasern mittels STED-Mikroskopie analysiert. In diesen Experimenten wurden die Kollagenfasern zeitgleich mit GPVI-Fc (unvernetzt oder quervernetzt, grün) und mit Alexa Fluor[®] 594-gefärbten anti-Kollagen Typ I und III Antikörpern (rot) inkubiert. Die Bindung von quervernetztem GPVI-Fc an Kollagen zeigte eine ausgeprägte Kollokalisierung mit den Kollagen-Antikörpern (gelb), wobei die Kollagenfasern mit quervernetztem GPVI-Fc hülsenartig ummantelt wurden (Abbildung 43 B). Dagegen wiesen die unvernetzten GPVI-Fc-Komplexe, wie auch schon mit SIM beobachtet, eine diskontinuierliche Bindung an Kollagen auf (Abbildung 43 A und B).

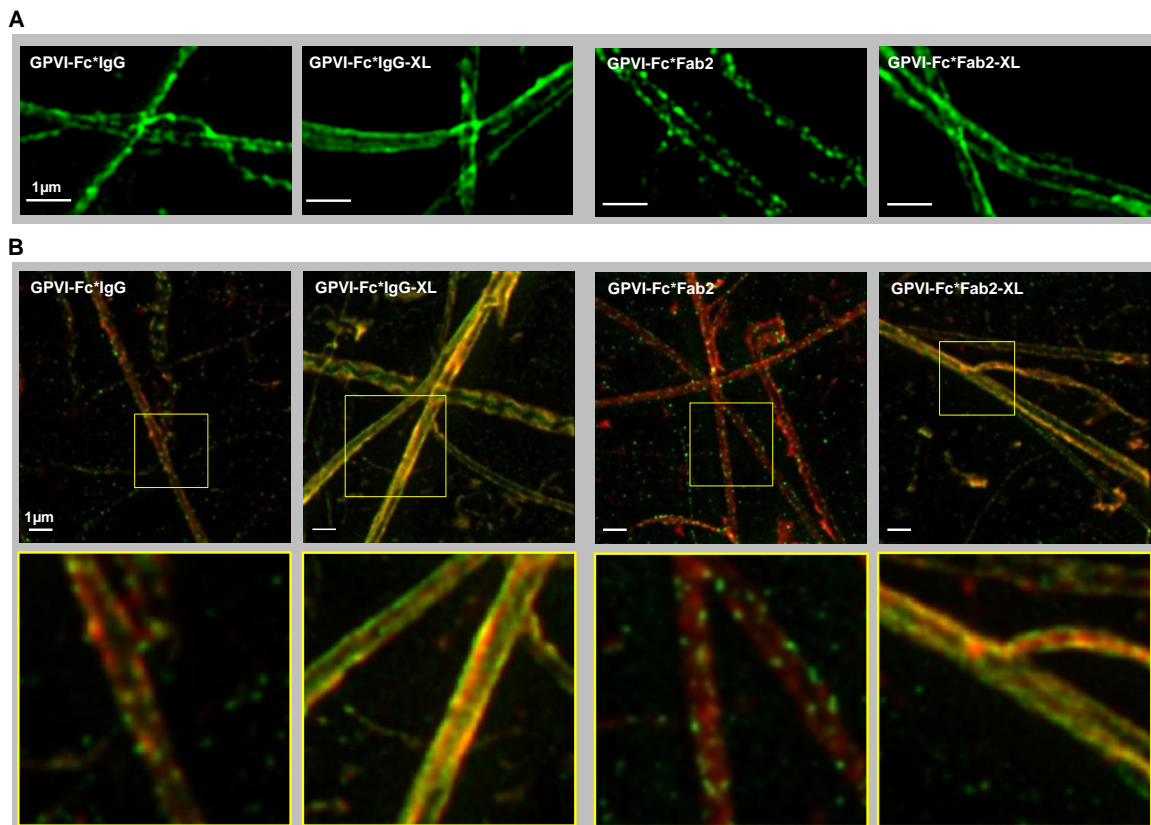


Abbildung 43: SIM- und STED-Bildgebung von Kollagenfasern, die mit unvernetztem GPVI-Fc (GPVI-Fc*IgG, GPVI-Fc*Fab2) oder quervernetztem GPVI-Fc (GPVI-Fc*IgG-XL, GPVI-Fc*Fab2-XL) gefärbt wurden
 GPVI-Fc wurde mit Alexa Fluor® 488-konjugierten anti-human-Fc IgG oder anti-human-Fc Fab2 Antikörpern entweder in einem molaren Verhältnis von 10:1 (unvernetztes GPVI-Fc) oder in einem molaren Verhältnis von 1:1 (quervernetztes GPVI-Fc) inkubiert. Die Mischungen wurden anschließend mit Kollagen-beschichteten Deckgläschen inkubiert. **(A)** SIM-Bildgebung. Die Aufnahmen sind Maximumintensitätsprojektionen von 0,15 µm z-Abschnitten (total z: 1,5 µm). Die Bilder sind repräsentativ für fünf weitere Experimente. **(B)** STED-Bildgebung. Kollagen-beschichtete Deckgläschen wurden zeitgleich mit Alexa Fluor® 594-markierten Kollagen Typ I und Typ III Antikörpern (rot) und mit GPVI-Fc (grün), das entweder unvernetzt oder quervernetzt war, gefärbt. Die gelbe Farbe zeigt die Kolokalisation von quervernetztem GPVI-Fc mit Kollagen-Antikörpern. Jamasbi et al.¹¹⁸, (B) ist Teil der Doktorarbeit von M. Bianchini.

5.4.6 Bestätigung des Mechanismus der Quervernetzung

Als nächstes sollte die Annahme bestätigt werden, dass die Potenzierung der inhibitorischen Wirkung von GPVI-Fc tatsächlich durch eine Quervernetzung der GPVI-Domänen verursacht ist und nicht nur durch eine Absättigung der Fc-Bindungsstellen am GPVI-Fc. Dazu wurde GPVI-Fc einerseits mit anti-human-Fc Fab2 zur Quervernetzung inkubiert (GPVI-Fc*Fab2-XL) und andererseits mit einem Überschuss an anti-human-Fc Fab, das nur eine Antigen-Bindungsstelle trägt und somit nicht in der Lage ist, GPVI-Fc quervernetzen (GPVI-Fc*Fab). Nach der Vorinkubation von Plaque- oder Kollagen-beschichteten Deckgläschen mit GPVI-Fc*Fab2-XL oder GPVI-Fc*Fab wurde die Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation unter Strömungsbedingungen aufgezeichnet.

Wie erwartet, wurde praktisch keine Wirkung von GPVI-Fc*Fab im Gegensatz zu einer vollständigen Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch GPVI-Fc*Fab2-XL beobachtet (Abbildung 44). Dies macht deutlich, dass tatsächlich die Quervernetzung für die starke Hemmung durch GPVI-Fc*Fab2-XL verantwortlich ist.

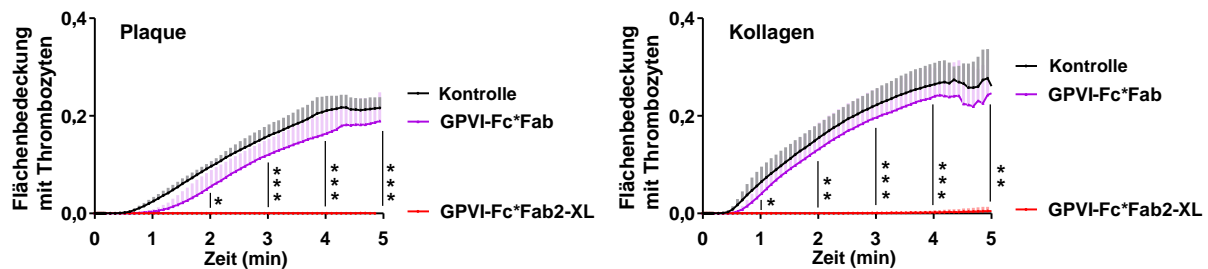


Abbildung 44: Im Gegensatz zu GPVI-Fc*Fab2-XL hemmt GPVI-Fc*Fab die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation unter Fluss nicht

GPVI-Fc (100 µg/ml; 666 nM) wurde mit einem 3-fachen molaren Überschuss von anti-human-Fc Fab-Alexa Fluor® 594 (GPVI-Fc*Fab) oder äquimolaren Konzentrationen von anti-human-Fc Fab2 (GPVI-Fc*Fab2-XL) inkubiert. Mit Plaque oder Kollagen beschichtete Deckgläschen wurden mit GPVI-Fc*Fab oder GPVI-Fc*Fab2-XL inkubiert bevor sie mit DiOC6 enthaltendem Blut (Scherrate 600/s) perfundiert wurden. Der Effekt von GPVI-Fc*Fab und GPVI-Fc*Fab2-XL auf die Kinetik der Thrombozytenablagerung an Plaque und Kollagen wurde mittels Videomikroskopie kontinuierlich aufgenommen (1 Bild/5 sek). MW + SD, n = 4. *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001 mit ANOVA für wiederholte Messungen bei vollen Minuten 2 bis 5 und sekundärem Paarvergleich mit Tukey's Test wie durch Balken angezeigt. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

Neben der quantitativen Auswertung der Wirkung von GPVI-Fc*Fab2-XL und GPVI-Fc*Fab auf die Thrombozytenaggregation wurde auch die Bindung von GPVI-Fc*Fab2-XL und GPVI-Fc*Fab an Kollagen und die dazugehörige Thrombozytenadhäsion mittels SIM dargestellt (Abbildung 45).

In diesen Experimenten wurde die Abwesenheit von Thrombozytenadhäsion an Kollagenfasern in GPVI-Fc*Fab2-XL enthaltenden Proben bestätigt und ein netzartiges, dichtes Bindungsmuster von GPVI-Fc*Fab2-XL beobachtet (Abbildung 45). Im Gegensatz dazu war die GPVI-Fc*Fab-Bindung an Kollagen inhomogener, wobei Fasersegmente für Thrombozytenmembrankontakte frei blieben (Abbildung 45). Die qualitativen Beobachtungen (Abbildung 45 links) wurden durch quantitative Messungen bestätigt (Abbildung 45 rechts).

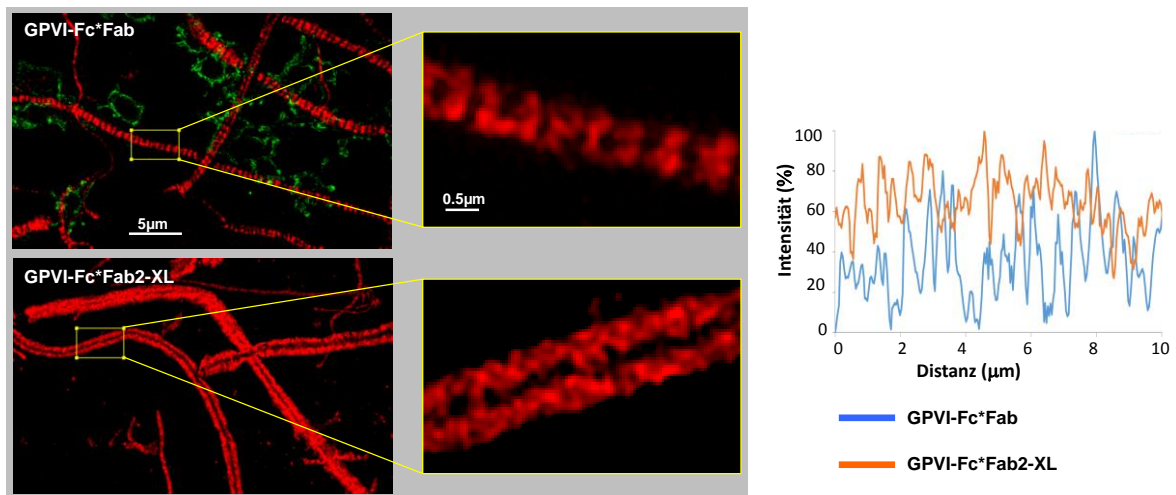


Abbildung 45: SIM-Bildgebung der GPVI-Fc*Fab- und GPVI-Fc*Fab2-XL-Bindung und Thrombozytenadhäsion an Kollagenfasern

GPVI-Fc (100 µg/ml; 666 nM) wurde mit einem 3-fachen molaren Überschuss von anti-human-Fc Fab-Alexa Fluor[®] 594 (GPVI-Fc*Fab) oder äquimolaren Konzentrationen von anti-human-Fc Fab2-PE (GPVI-Fc*Fab2-XL) inkubiert. Kollagen-beschichtete Deckgläschen wurden mit GPVI-Fc*Fab-Alexa Fluor[®] 594 oder GPVI-Fc*Fab2-PE-XL inkubiert, bevor sie mit Abciximab enthaltendem Blut perfundiert wurden (Scherrate 600/s). 4 min nach Beginn der Perfusion wurden die Thrombozyten fixiert und mit anti-CD41 Antikörpern und DyLight[®] 488-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt. **(Links)** SIM-Aufnahmen (Maximumintensitätsprojektionen von 0,15 µm z-Abschnitten; total z: 2,5 µm) mit vergrößerten Ausschnitten (x800), die die verschiedenen Muster der GPVI-Fc*Fab- und GPVI-Fc*Fab2-XL-Bindung (rot) an Kollagen-Doppelfasern zeigen. Thrombozytenadhäsion (grün) an Kollagen wurde bei GPVI-Fc*Fab, aber nicht bei GPVI-Fc*Fab2-XL behandelten Proben beobachtet. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für fünf verschiedene Experimente. **(Rechts)** Mit Hilfe der ZEN-Software wurden Linienintensitätsprofile (Maximum Intensität 100%) erzeugt, indem eine gekrümmte Linie in der zentralen Fokusebene entlang vergleichbarer, thrombozytenfreier Segmente der Kollagenfasern (der Bilder links) gezogen wurde. Der Prozentsatz der Intensität wurde basierend auf dem maximalen Intensitätsniveau, das in der quantifizierten Region gemessen wurde, berechnet. Die Bindung von GPVI-Fc*Fab an Kollagen ist diskontinuierlich mit Fasersegmenten ohne signifikante Bindung (< 10% in den Linienprofilen). Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

5.4.7 Auswirkung von quervernetztem GPVI-Fc auf die Blutungszeit

Um zu testen, ob quervernetztes GPVI-Fc die Blutungszeit erhöhen könnte, wurden Messungen mit dem Thrombozytenfunktionsanalysator PFA-200 durchgeführt. Dieses Gerät simuliert die primäre Hämostase *in vitro* und wird für Routine-Screenings von Patienten mit potentiellem Blutungsrisiko angewandt^{111,119}. Verglichen mit Puffer oder GPVI-Fc erhöhte GPVI-Fc*Fab2-XL die mit Kollagen/ADP- oder Kollagen/Epinephrin-Kartuschen gemessene Verschlusszeit nicht signifikant (Abbildung 46). ASS diente als positive Kontrolle der Messung und führte bei der Verwendung von Kollagen/Epinephrin-Kartuschen zu einer verlängerten Verschlusszeit.

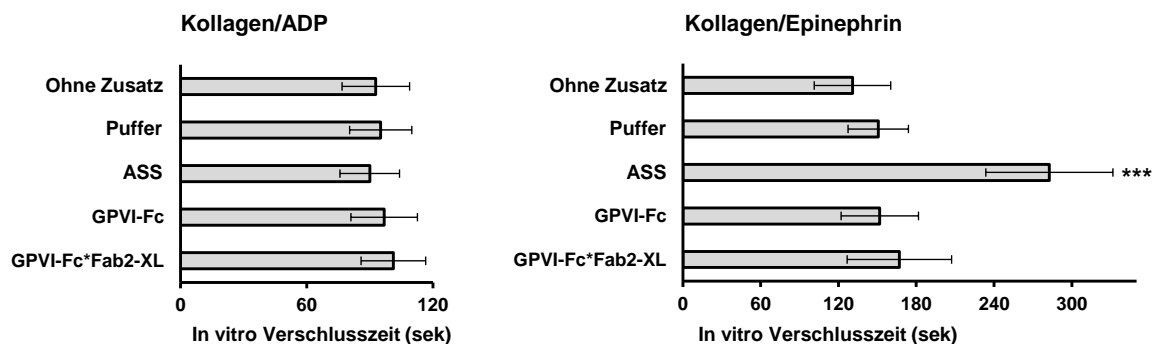


Abbildung 46: Keine signifikante Erhöhung der *in vitro* Blutungszeit durch GPVI-Fc*Fab2-XL

Citratblut wurde entweder ohne Zusatz oder mit Puffer (PBS), ASS (300 µg/ml), GPVI-Fc (333 nM) oder GPVI-Fc*Fab2-XL (333 nM) vorinkubiert bevor die Mischungen in Kollagen/ADP- oder Kollagen/Epinephrin-Kartuschen transferiert wurden und die *in vitro* Verschlusszeit mit dem „platelet function analyzer“ PFA-200 bestimmt wurde. MW ± SD, n = 6. ***: p<0,001 mit ANOVA und für alle sekundären Paarvergleiche von ASS zu den anderen Bedingungen. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

6 Diskussion

Derzeit verwendete antithrombozytäre Therapien reduzieren zwar ischämische kardio- und zerebrovaskuläre Ereignisse, jedoch teilweise mit begrenzter Effizienz und auf Kosten eines erhöhten Blutungsrisikos⁴⁴. Daher werden zusätzliche antithrombotische Strategien entwickelt. Da GPVI der wesentliche thrombozytäre Kollagen-Rezeptor bei der Plaque-induzierten Thrombusbildung ist, aber nur eine geringe Bedeutung in der Hämostase hat, stellt dieser Rezeptor einen vielversprechenden Angriffspunkt für die Entwicklung neuer antithrombotischer Wirkstoffe dar.

Während für die Bindung an „normale“ Bindegewebs-Kollagene noch ein weiterer thrombozytärer Rezeptor, nämlich das Integrin $\alpha_2\beta_1$, eine wichtige Rolle spielt³²⁻³⁴, aggregieren Thrombozyten an Plaque-Kollagene ausschließlich mithilfe des GPVI-Rezeptors^{23,35}. Dieser ist nur auf Thrombozyten und deren Vorläuferzellen exprimiert⁴⁴. Durch die Hemmung von GPVI kann daher möglicherweise selektiv die durch Plaque-Kollagene induzierte Thrombozytenaktivierung verhindert werden, ohne dass es zu einer gesteigerten Blutungsneigung kommt.

Um eine möglichst effektive und sichere Strategie der GPVI-Hemmung zu definieren, wurden im Rahmen dieser Dissertation unterschiedliche, die GPVI-Kollagen-Interaktion hemmende Verbindungen sowohl in statischen Testverfahren der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation als auch in Experimenten unter arteriellen Strömungsbedingungen verglichen.

6.1 Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation

In den meisten früheren Studien der GPVI-vermittelten Thrombozytenaktivierung wurden isolierte Kollagenfasern (Typ I und III), „collagen-related peptide“ oder Convulxin verwendet, um thrombozytäres GPVI zu stimulieren. Auch in atherosklerotischen Plaques stellen Kollagene Typ I und Typ III die wesentlichen Thrombozyten-aktivierenden Komponenten dar^{22,23}.

Um die pathophysiologische Situation der Plaque-Ruptur so gut wie möglich nachzuahmen, wurden mit humanem Plaquehomogenat beschichtete Deckgläschen unter arteriellen Strömungsbedingungen mit Blut perfundiert. Koronare Thrombosen entstehen meistens durch die Ruptur eines „thin-cap fibroatheroma“, wodurch der Kollagen-enthaltende nekrotische Plaquekern mit zirkulierendem Blut in Kontakt kommt^{35,120}. Somit wird nach einer Plaque-Ruptur *in vivo* eine neue thrombogene, raue luminale Oberfläche generiert, die die Dynamik der Thrombozytenadhäsion und -aggregation beeinflusst¹²¹, und die mit dem in

dieser Dissertation verwendeten *ex vivo* Plaque-Modell imitiert werden könnte, da in diesem Plaquefragmente unterschiedlicher Größen eine unregelmäßige, leicht raue thrombogene Oberfläche (<8 µm hoch) bilden.

Obwohl auch nicht stenotische koronare Läsionen, bei denen physiologische Scherraten von 500/s bis 600/s vorherrschen, rupturieren können, sind koronare Plaques, die das höchste Risiko bergen einen Myokardinfarkt hervorzurufen, zu mindestens 50% stenotisch, was zu höheren Scherraten (1500/s) an der Rupturstelle führt^{122,123}.

6.2 Vergleich der antithrombotischen Wirkung von GPVI-Antikörpern und GPVI-Fc

Wie bereits erwähnt, ist eine vielversprechende Strategie, die Thrombozyten-Kollagen-Interaktion zu hemmen, die Blockade des thrombozytären GPVI-Rezeptors. In den dieser Dissertation zugrundeliegenden Experimenten wurden die GPVI-Antikörper BLO8-1 und 5C4 verwendet, die beide sowohl monomeres als auch dimeres GPVI blockieren.

BLO8-1 ist ein von einer Phagen-Display-Bibliothek isolierter, humaner anti-GPVI-Einzeldomänenantikörper, der aus einer einzelnen Immunglobulin-variablen Domäne besteht und direkt an ein Epitop in D1 auf der apikalen Oberfläche von GPVI bindet¹²⁴. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass BLO8-1 in der Lage ist, die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation unter arteriellem Fluss zu hemmen¹²⁴. 5C4 ist das Fab-Fragment eines monoklonalen GPVI-blockierenden Antikörpers (IgG) aus der Ratte, der an Epitope von GPVI an D1 und dem Schnittpunkt zu D2 bindet^{94,114}.

BLO8-1 und 5C4 hemmten die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation fast vollständig unter statischen Bedingungen. Auch unter Strömungsbedingungen bei niedrigen (550/s) und hohen Scherraten (1100/s und 1500/s) unterdrückten beide GPVI-Antikörper die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation, während eine Thrombozytenadhäsion noch zu beobachten war. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit früheren Studien, bei denen unterschiedliche Versuchsbedingungen (Strömungskammer, Plaque-Beschichtung) verwendet wurden und in denen gezeigt wurde, dass 10B12, ein humaner, gegen GPVI gerichteter scFv-Antikörper („single chain variable fragment“, bestehend aus den kovalent verbundenen variablen Domänen der leichten und schweren Kette eines Antikörpers), und 5C4 die Thrombozytenaggregation an humanem Plaquehomogenat verhinderten^{23,24,35}.

Um die Rolle von dimerem GPVI im Vergleich zu monomerem GPVI zu evaluieren, wurde m-Fab-F, ein humaner rekombinanter Fab-Antikörper gegen GPVI-Dimere^{67,69}, verwendet, um selektiv die dimere Form von GPVI auf Thrombozyten zu hemmen.

m-Fab-F hemmte die statische Thrombozytenaggregation weniger effektiv als 5C4 (das monomeres und dimeres GPVI inhibiert), aber stärker als GPVI-Fc. Die Tatsache, dass sowohl dimeres GPVI-Fc als auch der GPVI-Dimer-spezifische m-Fab-F Antikörper die Thrombozytenaggregation weniger effektiv hemmten als 5C4, könnte zum einen darauf hindeuten, dass bi-selektive Antikörper, die monomeres und dimeres GPVI erkennen, potentere therapeutische Wirkstoffe darstellen, und zum anderen, dass monomeres GPVI funktionell wichtig ist. Diese Ergebnisse sind jedoch mit Vorsicht zu interpretieren, da m-Fab-F wahrscheinlich nicht an alle GPVI-Dimere auf der Thrombozytenoberfläche binden kann. Es wurde nämlich beschrieben, dass mit m-Fab-F eine geringere maximale Bindung erreicht wurde als mit anderen Antikörpern gegen dimeres GPVI, obwohl die Bindung von m-Fab-F an GPVI-Dimere sättigbar war⁶⁹. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass GPVI-Dimere in mehr als nur einer Konformation existieren. Neben der unvollständigen Bindung von m-Fab-F könnte dessen geringere Wirksamkeit auch damit erklärt werden, dass während der Thrombozytenaktivierung aus GPVI-Monomeren rekrutierte Dimere an Kollagen binden, bevor m-Fab-F die Möglichkeit hatte, diese Dimere zu blockieren. Die überlegene Wirksamkeit der verwendeten GPVI-Antikörper könnte unter diesem Aspekt auch damit erklärt werden, dass diese durch die zusätzliche Bindung an GPVI-Monomere die Dimer-Rekrutierung aus Monomeren während der Thrombozytenaktivierung beeinträchtigen. Eine funktionelle Rolle von monomerem GPVI für die Thrombozytenaktivierung ist eher unwahrscheinlich, da gezeigt wurde, dass ausschließlich die dimere Form von GPVI mit hoher Affinität an Kollagen bindet^{66,69}. Da m-Fab-F von der Kooperationsgruppe um S. Jung nur in geringen Mengen zur Verfügung gestellt werden konnte, war es nur möglich m-Fab-F für Experimente unter statischen Bedingungen zu verwenden und es konnte nicht unter arteriellen Strömungsbedingungen getestet werden. Eine neue Generation von anti-GPVI-Dimer-Hemmstoffen auf Antikörperbasis ist in Entwicklung, jedoch derzeit noch nicht verfügbar.

Die Hemmung durch GPVI-Antikörper wurde mit der Hemmung von löslichem dimerem GPVI-Fc sowohl im gerührten statischen System als auch unter arteriellen Strömungsbedingungen verglichen. GPVI-Fc inhibierte unter statischen und niedrigen Scherbedingungen selbst in hohen Konzentrationen die Aggregation weniger effektiv als die GPVI-Antikörper. Es wurde ausgeschlossen, dass die limitierte Hemmung durch GPVI-Fc wegen zu niedrig eingesetzter GPVI-Fc-Konzentrationen zustande kam, indem Plaquematerial mit einem Überschuss an GPVI-Fc vorinkubiert wurde, damit alle GPVI-Bindungsstellen an Kollagen maximal abgesättigt würden. Dabei wurden 35- bis 50-fach höhere GPVI-Konzentrationen eingesetzt als in Experimenten, bei denen GPVI-Fc dem Blut beigegeben wurde. Die Thrombozytenaggregation wurde jedoch trotz Vorinkubation von Plaque mit sehr hohen GPVI-Fc-Konzentrationen sowohl in den statischen

Aggregationsexperimenten als auch unter Strömungsbedingungen nicht stärker inhibiert. Einen möglichen Grund dafür könnten Unterschiede zwischen GPVI-Fc und thrombozytärem GPVI darstellen: Zum einen könnten die Abstände der beiden Kollagenbindungsstellen auf dimerem GPVI-Fc weniger flexibel sein als die auf thrombozytärem GPVI, wodurch die Kollagenbindungsstellen möglicherweise nicht immer perfekt auf die GPO-Sequenzen auf Plaque-Kollagen passen, was demzufolge nicht immer eine Bindung erlaubt. Zum anderen könnte die GPVI-Rezeptordichte einen weiteren Unterschied darstellen. Nach Thrombozytenaktivierung werden GPVI-Dimere aus Monomeren gebildet und „clustern“ in „lipid rafts“, was zu einer hohen GPVI-Dimeren-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche führt und somit zu einem die Bindungsaffinität erhöhenden synergistischen Effekt.

Unerwarteterweise war die Hemmung durch GPVI-Fc abhängig von der angewendeten Scherrate, wobei bei 1500/s GPVI-Fc die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation sogar nahezu vollständig hemmte.

6.3 Scherabhängigkeit der GPVI-Fc-Wirkung

Um den Mechanismus der scherabhängigen Hemmung durch GPVI-Fc aufzuklären, wurden hochauflösende optische Bildgebungsverfahren (TPLS-Videomikroskopie, STED-Mikroskopie, SIM, und DIC- und Fluoreszenz-Videomikroskopie (bei hoher Vergrößerung) angewendet.

Diese Bildgebungsstudien zeigten, dass GPVI-Fc sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts an Plaquefragmente band, wobei die Kinetik und Menge der GPVI-Fc-Bindung an Plaque bei niedrigen und hohen Scherraten fast gleich war. Somit konnte ein Unterschied in der GPVI-Fc-Bindung als Erklärung für die überlegene Hemmung der Thrombozytenablagerung bei hoher Scherrate ausgeschlossen werden. Aufschlussreich war jedoch die Beobachtung, dass Thrombozyten, besonders bei geringer Scherrate, an GPVI-Fc-freie Stellen von Plaque-Kollagen in Strömungsnischen der Plaquefragmente adhärten, in denen womöglich annähernd statische Bedingungen herrschten. Diese noch vorhandene Thrombozytenaggregatbildung bei niedrigen Scherraten in Gegenwart von GPVI-Fc konnte durch die Hemmung des thrombozytären P2Y₁₂-Rezeptors und der TxA₂-Bildung unterdrückt werden. Dies deutet darauf hin, dass eine GPVI-induzierte Signalweiterleitung in einigen wenigen Thrombozyten, die sich stromabwärts der Plaquefragmente anheften konnten, ausreicht, um eine stabile Thrombozytenadhäsion und die Rekrutierung von zirkulierenden Thrombozyten durch freigesetztes ADP und TxA₂ hervorzurufen. Ähnliche Ergebnisse konnten nach Behandlung des Blutes mit niedrigen 5C4-Konzentrationen, die zu einer unvollständigen GPVI-Hemmung führen, gezeigt werden: Bei niedriger Scherrate fand ebenfalls eine Thrombozytenaggregation in Plaque-

Strömungsnischen statt, die durch ADP- und TxA₂-Hemmung deutlich verringert wurde. Diese Beobachtung unterstützt zusätzlich den oben genannten Mechanismus. Unter Bedingungen mit hohen Scherraten wurden keine oder nur kleine stabile Aggregate beobachtet. Bei hoher Scherrate werden ADP und TxA₂ wahrscheinlich weggespült und können in der Nähe fließende Thrombozyten nicht mehr aktivieren und rekrutieren, was zu der gesteigerten Effektivität von GPVI-Fc bei hoher Scherrate beiträgt. Zusätzlich könnte es sein, dass GPVI-Fc auch vWF-Bindungsstellen auf Kollagen besetzt, wodurch die vWF-vermittelte Thrombozyten-adhäsion gehemmt würde, die vor allem bei hohen Scherraten relevant ist⁹⁶.

6.4 Klinische Relevanz der scherabhängigen Wirkung von GPVI-Fc im Vergleich zur Hemmung durch GPVI-Antikörper

Die potente Thrombozytenhemmung durch GPVI-Fc bei hoher Scherrate deutet auf eine an Ruptur-Stellen von Hochrisiko-Läsionen lokal erhöhte antithrombotische Wirksamkeit von GPVI-Fc hin. Bekanntermaßen sind koronare Läsionen, die ein hohes Risiko bergen, einen Myokardinfarkt zu verursachen, stenotisch (Einengung des Lumens um > 50%)^{122,123}, was zu höheren Scherraten an der stenotischen Stelle führt. Plaques rupturieren meistens entweder an der entzündeten Plaqueschulter oder am stenotischsten Teil, an dem der endotheliale Scherstress am höchsten ist^{18,125}. Das Fehlen einer ausgeprägten Hemmung durch GPVI-Fc bei Stase oder Strömung mit niedrigen Scherraten könnte einen Vorteil in Bezug auf das Blutungsrisiko bedeuten, da schwere Blutungskomplikationen meist in Gefäßen mit geringeren Strömungsgeschwindigkeiten und Scherraten auftreten als beispielsweise in Koronararterien. Sicherheitsbedenken einer Therapie mit GPVI-Fc alleine, aber auch in Kombination mit anderen Thrombozytenaggregationshemmstoffen erscheinen daher geringer als mit GPVI-Antikörpern, die hoch wirksam unabhängig von den Scherbedingungen sind und systemisch wirken.

Diese Überlegungen stimmen überein mit den Ergebnissen einer Phase-I-Studie, die zeigte, dass GPVI-Fc die Blutungszeit nicht erhöhte⁹³, und auch mit den Befunden, dass eine GPVI-Fc-Behandlung alleine oder auch in Kombination mit anderen antithrombozytären Arzneimitteln (ASS, Clopidogrel, Heparin, Dipyridamol) die Blutungszeit bei Mäusen nicht verlängerte⁹⁷. Dagegen wurde bei manchen Patienten mit anti-GPVI-Autoantikörpern eine erhöhte Blutungszeit und Blutungsneigung beobachtet⁸⁸.

Außer anti-GPVI-Autoantikörpern können Patienten verschiedene genetisch bedingte GPVI-Defekte aufweisen, die abhängig vom klinischen Hintergrund zu unterschiedlich starken Blutungsneigungen führten⁸⁸. Eine Therapie mit GPVI-Antikörpern könnte deshalb eher als GPVI-Fc zu Blutungskomplikationen führen. In einer Studie mit Mäusen wurde

gezeigt, dass eine durch GPVI-Antikörper induzierte Depletion von thrombozytärem GPVI in Kombination mit einer ASS-Therapie die normale Hämostase deutlich beeinträchtigen kann⁹¹. Zudem kann eine Behandlung mit GPVI-Antikörpern durch GPVI-Shedding oder Internalisierung zu einer langanhaltenden GPVI-Depletion von der Thrombozytenoberfläche führen. Ob BLO8-1 und 5C4 diese Effekte haben, ist jedoch nicht bekannt.

6.5 Erhöhung der antithrombotischen Effizienz von GPVI-Fc durch Antikörper-vermittelte Quervernetzung

Auch wenn vermutlich meistens höhere arterielle Scherraten (>1500/s) an Plaque-Rupturstellen vorhanden sind, ist es wahrscheinlich, dass die Unregelmäßigkeit der zerstörten luminalen Gefäßintima und die Exposition von Plaquematerial zu verschiedenen Scherbedingungen und turbulenter Strömung führt, die die Thrombozytenablagerung an der Läsionsstelle beeinflusst. Dieser Aspekt ist besonders wichtig, wenn eine hochgradige, von den aktuellen Scherbedingungen unabhängige Thrombozytenhemmung erforderlich ist, beispielsweise um eine akute Atherothrombose bei interventions-assoziierten Plaquerupturen, wie z.B. bei der perkutanen koronaren Intervention, zu verhindern.

Deshalb war das nächste Ziel dieser Dissertation, die antithrombotische Wirksamkeit von GPVI-Fc soweit zu erhöhen, dass eine den GPVI-Antikörpern vergleichbare hemmende Wirksamkeit erreicht werden würde, ohne jedoch die Läsions-Selektivität von GPVI-Fc zu verlieren. Die Idee war, die GPVI-Bindung an exponiertes Plaque-Kollagen so zu verbessern, dass es in möglichst hoher Dichte an die Kollagenfasern binden würde, um dadurch Thrombozyten die Interaktion mit Kollagen zu erschweren. Dies wurde umgesetzt, indem GPVI-Fc mit Fc-Antikörpern quervernetzt und somit in GPVI-Multimere transformiert wurde. Dazu wurden entweder anti-human-Fc IgG oder anti-human-Fc Fab2 Antikörper mit äquimolaren Konzentrationen von GPVI-Fc vorinkubiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Strategie der Antikörper-vermittelten Quervernetzung von GPVI-Fc in der Tat die inhibitorische Wirkung von GPVI-Fc auf die Kollagen- und Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation sowohl unter statischen als auch unter Strömungsbedingungen stark erhöhte.

Konzentrationsabhängigkeitskurven von GPVI-Fc*Fab2-XL zeigten eine überlegene Hemmung von quervernetzten GPVI-Fc-Komplexen im Vergleich zu unvernetztem GPVI-Fc, wobei signifikante Verbesserungen bereits mit niedrigen Konzentrationen der quervernetzten GPVI-Fc-Komplexe erreichbar waren (33 nM). Diese waren deutlich niedriger als die maximalen GPVI-Fc-Plasmakonzentrationen (50 µg/ml = 333 nM), die nach einmaliger intravenöser Applikation in einer früheren klinischen Phase-I-Studie erreicht wurden⁹³.

Die Tatsache, dass die monovalente anti-human-Fc Fab-Kontrolle, die nicht in der Lage ist GPVI-Fc quervernetzen, inaktiv war und die hemmende Wirkung von GPVI-Fc nicht potenzierte, bestätigte, dass eine Quervernetzung und nicht eine Sättigung von Fc-Bindungsstellen der zugrundeliegende Mechanismus für die überragende inhibitorische Wirkung ist. Zudem konnte mit Hilfe von analytischer Ultrazentrifugation die Quervernetzung von GPVI-Fc bestätigt werden, indem die Existenz von oligomeren GPVI-Komplexen nachgewiesen wurde.

Das mit Fab2 quervernetzte GPVI-Fc war dem mit IgG quervernetzten GPVI-Fc in seiner Hemmung überlegen, was mit dem Fehlen der Fc-Teile in den GPVI-Fc*Fab2-XL-Komplexen erklärt werden könnte. Multivalente Fc-Moleküle, die bei GPVI-Fc*IgG-XL-Komplexen nach deren Bindung an Kollagen exponiert werden können, könnten von Fc-Rezeptor-tragenden Blutzellen gebunden und anschließend besonders unter Strömungsbedingungen von Kollagen weggespült werden. Zudem könnten Thrombozyten über deren Fc-Rezeptoren aktiviert werden, was zur Aggregation führen und dem hemmenden Effekt von GPVI-Fc*IgG-XL-Komplexen entgegenwirken könnte.

Durch GPVI-Fc*Fab2-XL konnte sogar eine etwas stärkere Hemmung der Thrombozytenaggregation als mit 5C4 erzielt werden, was möglicherweise durch eine zusätzliche Abschirmung von verschiedenen Epitopen auf Plaque durch GPVI-Fc*Fab2-XL erklärt werden könnte. Nach 5C4-Behandlung des Blutes ist eine verbleibende Thrombozytenadhäsion an Plaquematerial mittels GPIIb, Integrin $\alpha_2\beta_1$ oder anderer thrombozytärer Rezeptoren möglich, wohingegen nach GPVI-Fc*Fab2-XL-Behandlung die Thrombozyten möglicherweise wegen sterischer Hinderung durch an Plaque-Kollagen gebundene multivalente GPVI-Fc*Fab2-XL-Komplexe nicht mehr an Plaque adhäreren können.

Hochauflösende mikroskopische Bildgebungsverfahren zeigten, dass die Bindung von quervernetztem GPVI-Fc an Kollagen in einer kontinuierlichen und homogenen Weise stattfand, wobei Kollagen hülsenartig ummantelt wurde. Möglicherweise wurde die Ausrichtung von GPVI durch dessen Quervernetzung derart verändert, dass es besser an GPO-Domänen auf Kollagenfasern binden konnte, was zur Verhinderung des Kontaktes der Thrombozyten mit deren Bindungsmotiven an Kollagen führte. Auch ein Synergismus der Bindung der einzelnen GPVI-Domänen, der zu einer deutlich stärkeren inhibitorischen Wirkung der quervernetzten GPVI-Komplexe führt, ist wahrscheinlich. Im Gegensatz dazu zeigte unvernetztes GPVI-Fc ein inhomogenes, eher gepunktetes Bindungsmuster, bei dem Zwischenräume für die Wechselwirkung der Thrombozytenoberfläche mit den Kollagenfasern frei blieben.

Messungen mit dem PFA-200-Gerät ergaben, dass quervernetztes GPVI-Fc zu keiner Erhöhung der *in vitro* Verschlusszeit führte, was von wichtiger klinischer Bedeutung sein könnte. Unter dem Aspekt, dass quervernetzte GPVI-Fc-Komplexe durch die mantelartige Umhüllung von Kollagen eventuell auch andere Bindungsstellen abschirmen könnten, wäre eine Erhöhung der *in vitro* Verschlusszeit zu erwarten gewesen. Die erlangten Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass doch keine Abschirmung von anderen Bindungsstellen am Kollagen durch die GPVI-Fc-Komplexe erfolgte. Zumindest die Interaktion von thrombozytärem GPIIb mit an Kollagen gebundenem vWF muss noch stattgefunden haben, da mit dem PFA-200-Gerät sehr sensitiv vWF- bzw. GPIIb-abhängige Störungen gemessen werden können und somit die *in vitro* Verschlusszeit bei einer Besetzung der vWF-Bindungsstellen durch quervernetztes GPVI-Fc verlängert gewesen wäre. Ob jedoch auch *in vivo* keine Gefahr von erhöhter Blutungsneigung besteht, müsste durch *in vivo*-Studien geprüft werden.

Der große Vorteil einer Therapie mit oligomeren GPVI-Fc-Komplexen gegenüber der mit GPVI-Antikörpern, die GPVI auf allen Thrombozyten blockieren, wäre, dass bei einer Behandlung mit diesen oligomeren GPVI-Komplexen zirkulierende Thrombozyten unberührt bleiben, da die antithrombotische Wirkung auf den Ort des Geschehens (Kollagenexposition nach Plaquerletzung) begrenzt ist.

Weitere Überlegungen einer möglichen klinischen Anwendung von quervernetztem GPVI-Fc sind in Abschnitt 7.2 weiter ausgeführt.

7 Klinische Relevanz

7.1 Entwurf von klinischen Studien mit GPVI-Fc und GPVI-Antikörpern

Die in dieser Dissertation erlangten Ergebnisse, nämlich die unterschiedliche Hemmung durch GPVI-Fc und GPVI-Antikörper, könnten für den Entwurf von klinischen Studien von Bedeutung sein: GPVI-Antikörper könnten eine höhere antithrombotische Wirksamkeit als GPVI-Fc aufweisen, sind aber möglicherweise mit einem höheren Blutungsrisiko behaftet.

Da klinische Studien allein mit einem neuen antithrombotischen Arzneistoff, der bereits etablierte Medikamente ersetzen könnte, im Hinblick auf Sicherheitsbedenken nicht möglich sind, werden neue Arzneistoffe in der Regel in Kombination mit klinisch zugelassenen Medikamenten getestet. Daher könnten GPVI-Antikörper in einer dualen antithrombozytären Medikation, entweder in Kombination mit Aspirin[®] oder einem P2Y₁₂-Antagonisten, erprobt werden. Nachdem GPVI-Fc wahrscheinlich ein besseres Sicherheitsprofil hat, könnte es auch in einer dreifach antithrombozytären Therapie mit Aspirin und einem P2Y₁₂-Antagonisten zur Behandlung von Myokardinfarkt oder ischämischem Schlaganfall getestet werden¹²⁶.

Neben dem Einsatz von GPVI-Fc bei akuten atherothrombotischen Ereignissen ist auch eine prophylaktische Gabe von GPVI-Fc bei Hochrisikopatienten denkbar. Dazu müsste es zunächst in eine geeignete Arzneimittel-Formulierung gebracht werden, die beispielsweise eine wöchentliche subkutane Applikation ermöglicht, und der wiederholte Gebrauch müsste im Hinblick auf unerwünschte Wirkungen getestet werden. Ein dem GPVI-Fc strukturell ähnliches Protein (Etanercept) wird bereits in dem Arzneimittel Enbrel[®] zur Behandlung von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises ein- bis zweimal wöchentlich subkutan appliziert¹²⁷. Enbrel ist ein gentechnologisch hergestelltes, ebenfalls 150 kDa schweres, dimeres Fusionsprotein, das aus der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne des humanen Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-2, verbunden mit dem Fc-Teil von humanem IgG, besteht und zum Abfangen von TNF dient¹²⁷.

7.2 Weiterentwicklung quervernetzter GPVI-Fc-Komplexe für einen möglichen klinischen Gebrauch

Nachdem in dieser Dissertation der Wirksamkeitsnachweis für eine überlegene antithrombotische Wirksamkeit von GPVI-Fc-Oligomeren erbracht wurde, könnten multivalente GPVI-Moleküle weiter auf ihre klinische Anwendung zugeschnitten werden: Während einer perkutanen koronaren Intervention ist im Moment der Dilatation eines stenosierenden Plaques eine starke, kurzfristige und Läsions-orientierte antithrombotische Behandlung erwünscht. Dies könnte durch eine einzige lokale Applikation von mit Antikörpern quervernetzten GPVI-Fc-Oligomeren durch den intrakoronaren Katheter während des Eingriffs erfolgen. Dadurch könnte eine maximale Bindung der quervernetzten GPVI-Fc-Oligomere an der Läsionsstelle erreicht werden. Da die quervernetzten GPVI-Komplexe im Blutkreislauf aufgrund begrenzter Stabilität dissoziieren würden, ist es wahrscheinlich, dass die starke antithrombotische Wirkung auf die Läsionsstelle beschränkt bliebe. Für diese Indikation müssten die in dieser Dissertation verwendeten anti-human-Fc Antikörper aus der Ziege durch humane monoklonale anti-Fc-Antikörper ersetzt werden. Solche humane, monoklonale, gegen Fc-gerichtete Antikörper sind als bivalente Fab-Fragmente bereits kommerziell verfügbar (human combinatorial antibody library, HuCAL[®]) und könnten prinzipiell für die GPVI-Fc-Quervernetzung in klinischen Studien weiter entwickelt werden.

Für andere Indikationen, wie z.B. bei akuter Plaque-Ruptur oder -Erosion, würde jedoch eine Langzeitstabilität der multivalenten GPVI-Moleküle im Blutkreislauf bevorzugt werden. Bei Patienten mit rezidivierenden Embolien nach Plaque-Erosion beispielsweise wäre ein dauerhaftes Abschirmen wiederkehrender Kollagenexposition durch den Einsatz entsprechender GPVI-Oligomere wünschenswert. Bei einer Langzeittherapie mit durch Antikörper quervernetzten GPVI-Oligomeren ist jedoch die potentielle Immunogenität großer GPVI-Fc-Antikörper-Komplexe zu beachten und möglichst zu vermeiden. Daher müssen andere Strategien entwickelt werden, um die GPVI-Domänen in ein multivalentes Format zu transformieren. Eine Möglichkeit wäre die gerichtete, chemische Quervernetzung von GPVI-Domänen.

Insgesamt ist die hier gezeigte Antikörper-vermittelte Quervernetzung von GPVI-Fc ein neuartiges Prinzip zur Erhöhung des GPVI-Antagonismus, das eine effektive Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenstimulation bietet, wobei die Wirkung auf die Läsion konzentriert ist und deshalb keine unerwünschten systemischen, antithrombozytären Wirkungen zu erwarten sind.

8 Zusammenfassung

Glykoprotein VI (GPVI) ist der essentielle thrombozytäre Kollagen-Rezeptor in der Atherothrombose, wobei dessen Hemmung nur eine milde Blutungsneigung verursacht. Deshalb stellt GPVI einen attraktiven antithrombotischen Angriffspunkt dar.

Der thrombozytäre GPVI-Rezeptor zeigt nur in seiner dimeren, jedoch nicht in seiner monomeren Konformation eine hohe Bindungsaffinität für Kollagen. Um derzeit verwendete antiatherothrombotische Therapien zu verbessern, wurden verschiedene Strategien zur Hemmung der Wechselwirkung von GPVI mit Plaque-Kollagen im ersten Teil dieser Dissertation verglichen.

Dafür wurde das Thrombozyten-hemmende Potential von GPVI-Antikörpern mit löslichem dimeren GPVI-Fc, welches das systemische Blutungsrisiko nicht erhöht, verglichen. Zwei gegen monomeres und dimeres GPVI gerichtete GPVI-Antikörper (BLO8-1 und 5C4) zeigten eine effektive Hemmung der durch humanes atherosklerotisches Plaquematerial induzierten Thrombozytenaggregation, sowohl unter statischen als auch unter arteriellen Strömungsbedingungen (Scherraten von 550/s und 1100/s). Unter Fluss wurde die Thrombozytenaggregation fast vollständig gehemmt, während eine Thrombozytenadhäsion noch vorhanden war.

Im Gegensatz dazu war die Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation durch lösliches dimeres GPVI-Fc unter statischen und bei Strömungsbedingungen unter niedriger Scherrate selbst bei maximal erreichbaren Konzentrationen viel weniger ausgeprägt. GPVI-Fc wirkt durch die Besetzung von GPVI-Bindungsstellen auf Kollagen als kompetitiver Inhibitor der Thrombozytenaggregation. Die Hemmung durch GPVI-Fc stieg jedoch mit der Scherrate an.

Hochauflösende optische Bildgebungsverfahren zeigten eine schnelle und persistente Bindung von fluoreszenz-markiertem GPVI-Fc an Plaque-Kollagen unter niedrigen und hohen Scherraten, stromaufwärts und stromabwärts der Plaquefragmente, wobei es Bereiche auf Plaque-Kollagen gab, die frei von GPVI-Fc blieben. Bei niedriger Scherrate (550/s) adhärten die Thrombozyten in Strömungsnischen des Plaques an diese GPVI-Fc-freien Segmente der Kollagenfasern und rekrutierten durch die Freisetzung von ADP und TxA_2 andere Thrombozyten in Aggregate. Im Gegensatz dazu wurden unter hoher Scherrate (1500/s) nur wenige kleine Aggregate beobachtet, da freigesetztes ADP und TxA_2 wahrscheinlich durch die hohe Fließgeschwindigkeit des Blutes weggespült werden.

Die potente Thrombozytenhemmung durch GPVI-Fc bei hoher Scherrate (1500/s) legt eine lokale antithrombotische Wirksamkeit an stenotischen Läsionen, die ein hohes Ruptur-Risiko bergen, nahe. Eine schematische Zusammenfassung der Ergebnisse über die Wirkung von GPVI-Fc und GPVI-Antikörpern ist in Abbildung 47 dargestellt.

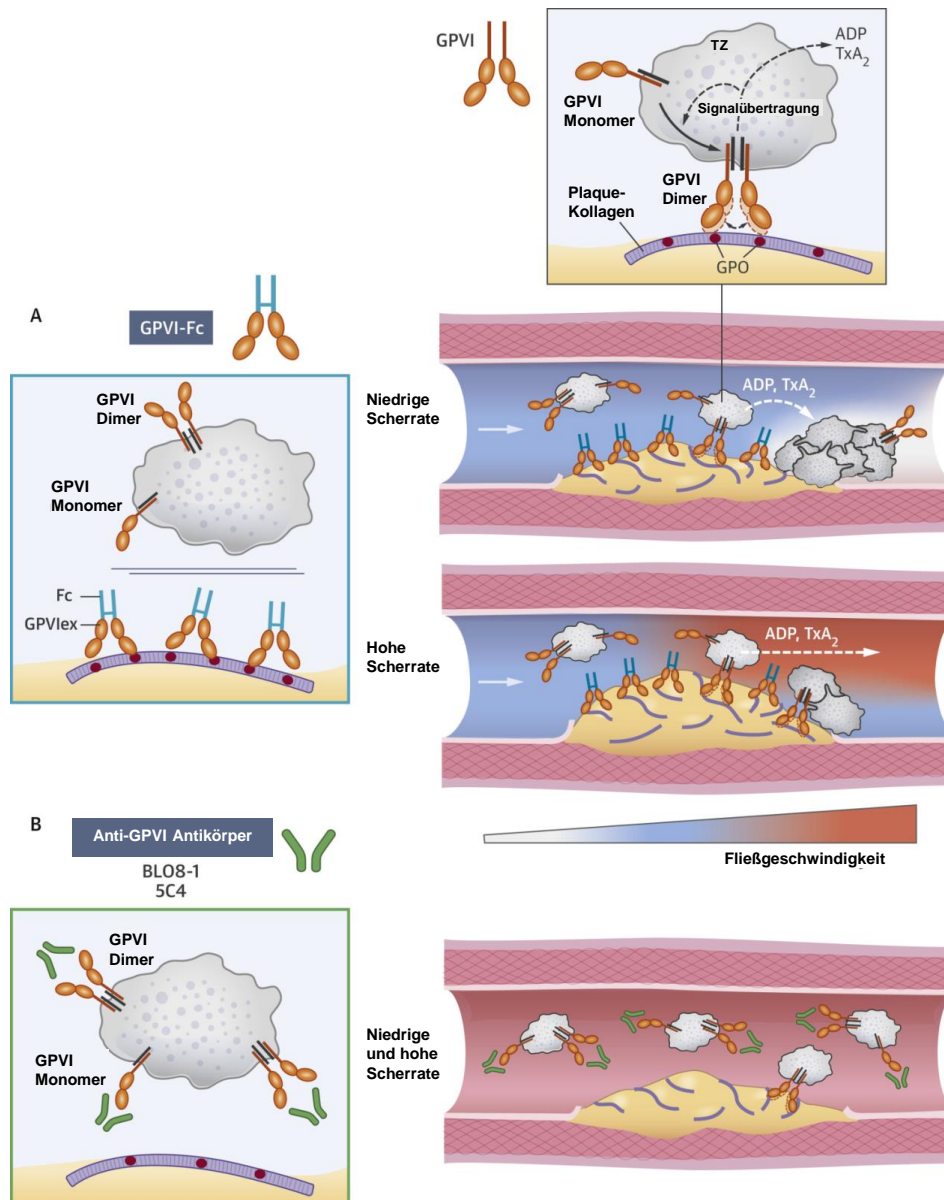


Abbildung 47: Unterschiedliche Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation durch GPVI-Fc und GPVI-Antikörper

(A) GPVI-Fc bindet an freigelegte GPO-Sequenzen auf Kollagen stromauf- und stromabwärts nach Plaque-Ruptur und konkurriert mit thrombozytärem GPVI-Dimer. Nur wenige von GPVI-Fc unbesetzte GPO-Bindungsstellen werden benötigt, um effizient eine GPVI-Signaltransduktion mit darauffolgender ADP- und TxA_2 -Freisetzung (gebogener gestrichelter weißer Pfeil, oben) auszulösen. Dies ermöglicht stabile Thrombozytenadhäsion und -aggregation in Strömungsnischen unter niedrigen Scherraten. Unter hohen Scherraten, die an Rupturstellen von stenotischen Hochrisiko-Läsionen auftreten, werden ADP und TxA_2 durch die hohen Fließgeschwindigkeiten weggespült (gerader gestrichelter weißer Pfeil, unten), wodurch es zur stärkeren Hemmung der Aggregatbildung durch GPVI-Fc kommt. Weißer Pfeil = Richtung des Blutflusses. (B) GPVI-Antikörper binden an Thrombozyten im Blutkreislauf und hemmen die Thrombozytenaggregation nach Plaque-Ruptur unabhängig von Fließgeschwindigkeit und Stenosen. ADP = Adenosindiphosphat; Fc = „fragment crystallizable region“ von IgG; GPO = Glycin-Prolin-Hydroxyprolin, GPVI = Glycoprotein VI; GPVIlex = externe Domäne von GPVI; TxA_2 = Thromboxane A_2 ; TZ = Thrombozyt. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

Um die antithrombotischen Eigenschaften von GPVI-Fc zu verbessern und dessen Läsions-Selektivität mit dem vollen Potential des GPVI-Antagonismus, wie durch GPVI-Antikörper hervorgerufen, zu kombinieren, wurden im zweiten Teil dieser Dissertation oligomere GPVI-Komplexe hergestellt. Deren thrombozytenhemmende Wirkung wurde unter statischen Bedingungen sowie unter Strömungsbedingungen getestet. Oligomeres GPVI wurde erhalten, indem GPVI-Fc mit anti-human-Fc Antikörpern inkubiert wurde, um die Fc-Teile von GPVI-Fc quervernetzen. Die Quervernetzung potenzierte die Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch GPVI-Fc sowohl unter statischen Bedingungen als auch unter Strömungsbedingungen. Dabei war die Quervernetzung mit anti-human-Fc Fab2 der mit anti-human-Fc IgG überlegen. Die monovalente anti-human-Fc Fab-Kontrolle (die nicht in der Lage ist Fc-Teile quervernetzen) war inaktiv. Hochauflösende optische Bildgebungsverfahren zeigten eine hülsenartige Ummantelung der Kollagenfasern durch gebundene, quervernetzte GPVI-Fc-Antikörper-Komplexe, was eine Thrombozytenbindung an Kollagen verhinderte. Im Gegensatz dazu zeigte unvernetztes GPVI-Fc ein inhomogenes Bindungsmuster, wobei Fasersegmente für die Thrombozytenanhaftung frei blieben. Eine schematische Darstellung der Bindung von unvernetztem und quervernetztem GPVI-Fc ist in Abbildung 48 gezeigt.

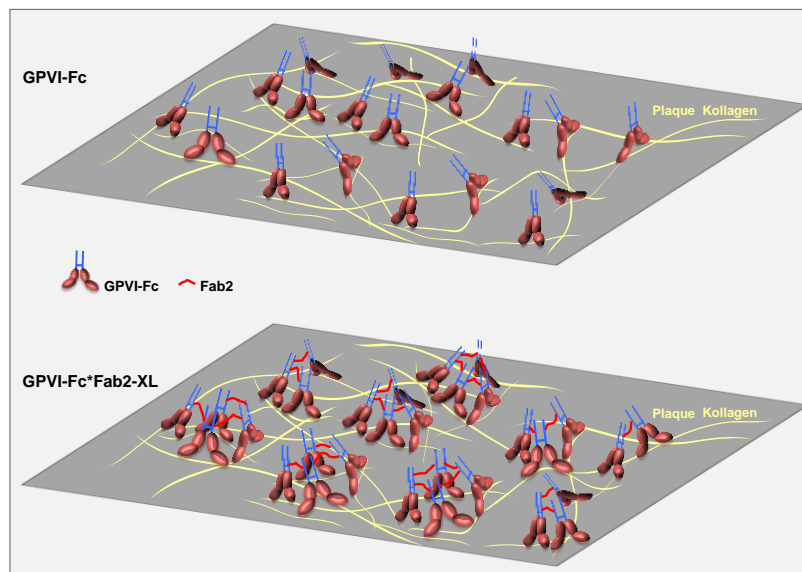


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Bindung von GPVI-Fc und mit anti-human-Fc Fab2 quervernetztem GPVI-Fc an Plaque-Kollagen

Die Quervernetzung von dimerem GPVI-Fc-Fusionsprotein (GPVI, braun; Fc, blau) mit anti-human-Fc Fab2 Antikörpern (rot) schafft oligomere ($n = 2-4$) GPVI-Moleküle, die dichter (unten) als GPVI-Fc (oben) an ihre korrespondierenden Motive an Kollagenfasern binden. Verändert nach Jamasbi et al.¹¹⁸

Da quervernetztes GPVI-Fc die Blutungszeit *in vitro* nicht erhöhte, könnte eine GPVI-Quervernetzung zu oligomeren GPVI-Komplexen eine neue, hochwirksame Strategie zur Verhinderung der Atherothrombose bieten, ohne das systemische Blutungsrisiko zu erhöhen.

9 Summary

Glycoprotein VI (GPVI) is the essential platelet collagen receptor in atherothrombosis, however, its inhibition causes only a mild bleeding tendency. Thus, GPVI emerged as an attractive antithrombotic target. Platelet GPVI in its dimeric but not monomeric conformation shows high affinity binding to collagen. To improve current anti-atherothrombotic therapy different strategies to inhibit the GPVI/plaque collagen interactions were compared in the first part of the dissertation. The platelet inhibiting potential of anti-GPVI antibodies was compared to recombinant soluble dimeric GPVI-Fc, which does not increase systemic bleeding risk. Two anti-GPVI antibodies (BLO8-1 and 5C4) targeting monomeric and dimeric GPVI effectively inhibited human atherosclerotic plaque-induced platelet aggregation under static as well as under arterial flow conditions (shear rates of 550/s and 1100/s). Under flow platelet aggregation was nearly abolished whereas platelet adhesion was preserved. In contrast, dimeric GPVI-Fc, which acts as a competitive inhibitor for platelet GPVI by occupying GPVI binding sites on collagen, inhibited less, even at maximal concentrations, plaque-induced platelet aggregation under static and low shear conditions. However, inhibition by GPVI-Fc increased with shear rate. Advanced optical imaging revealed a rapid and persistent binding of fluorescence-labeled GPVI-Fc to plaque collagen under low and high shear flow, upstream and downstream of plaque fragments, but leaving spaces of plaque collagen free of GPVI-Fc. At low shear (550/s), platelets adhered down-stream of plaque in flow niches to the GPVI-Fc-free segments of collagen fibers and recruited other platelets into aggregates via ADP and TxA_2 release. In contrast, under high shear conditions (1500/s), only few small platelet aggregates were observed, probably due to ADP and TxA_2 being flushed away by high shear flow. The potent platelet inhibition by GPVI-Fc at high shear flow (1500/s) suggests localized antithrombotic efficacy at stenotic lesions, which have a high risk to rupture. A schematic summary of the effect of GPVI-Fc and anti-GPVI-antibodies is shown in figure 47.

To enhance the antithrombotic properties of GPVI-Fc and combine its lesion selectivity with the full potential of GPVI antagonism as demonstrated by the anti-GPVI antibodies, in the second part of this dissertation, oligomeric GPVI-complexes were created and its platelet inhibiting potential was tested under static and flow conditions. To obtain oligomeric GPVI, GPVI-Fc was incubated with anti-human-Fc antibodies to cross-link the Fc tails of GPVI-Fc. Cross-linking potentiated the inhibition of human plaque- and collagen-induced platelet aggregation by GPVI-Fc under static and flow conditions. Cross-linking with anti-human-Fc Fab2 was superior to anti-human-Fc IgG whereas monovalent anti-human-Fc Fab control (unable to cross-link Fc-tails) was inactive. Advanced optical imaging revealed a sheath-like coverage of collagen fibers by bound cross-linked GPVI-Fc antibody complexes preventing

platelet attachment to collagen. In contrast, non cross-linked GPVI-Fc showed a dotted binding pattern leaving fiber segments free for platelet attachment. A scheme of the binding of cross-linked and non cross-linked GPVI to collagen is shown in figure 48.

Cross-linked GPVI-Fc did not increase bleeding time *in vitro* and therefore cross-linking of GPVI into oligomeric complexes might provide a new, highly effective strategy to prevent atherothrombosis without increasing systemic bleeding risk.

10 Literaturverzeichnis

- 1 Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002;8(11):1227-1234.
- 2 Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008;359(9):938-949.
- 3 Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost.* 2011;9 Suppl 1:92-104.
- 4 Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood.* 2003;102(2):449-461.
- 5 Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res.* 2007;100(12):1673-1685.
- 6 Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost.* 2010;8(7):1456-1467.
- 7 Dutting S, Bender M, Nieswandt B. Platelet GPVI: a target for antithrombotic therapy?! *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(11):583-590.
- 8 Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med (Berl).* 2011;89(2):109-121.
- 9 Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res.* 2006;99(12):1293-1304.
- 10 Kaplan ZS, Jackson SP. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program.* 2011;2011:51-61.
- 11 Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, et al. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res.* 2014;114(12):1852-1866.
- 12 Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420(6917):868-874.
- 13 Falk E, Nakano M, Bentzon JF, et al. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *European heart journal.* 2013;34(10):719-728.
- 14 Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(5):1262-1275.
- 15 Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation.* 1999;99(19):2503-2509.
- 16 Deguchi JO, Aikawa E, Libby P, et al. Matrix metalloproteinase-13/collagenase-3 deletion promotes collagen accumulation and organization in mouse atherosclerotic plaques. *Circulation.* 2005;112(17):2708-2715.
- 17 Burke AP, Farb A, Malcom GT, et al. Plaque rupture and sudden death related to exertion in men with coronary artery disease. *JAMA.* 1999;281(10):921-926.
- 18 Maurovich-Horvat P, Ferencik M, Voros S, et al. Comprehensive plaque assessment by coronary CT angiography. *Nature reviews Cardiology.* 2014;11(7):390-402.
- 19 Kolodgie FD, Burke AP, Wight TN, et al. The accumulation of specific types of proteoglycans in eroded plaques: a role in coronary thrombosis in the absence of rupture. *Curr Opin Lipidol.* 2004;15(5):575-582.

- 20 Mazzucato M, Cozzi MR, Pradella P, et al. Vascular PG-M/versican variants promote platelet adhesion at low shear rates and cooperate with collagens to induce aggregation. *Faseb J.* 2002;16(14):1903-1916.
- 21 Virmani R, Burke AP, Farb A, et al. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(8 Suppl):C13-18.
- 22 van Zanten GH, de Graaf S, Slootweg PJ, et al. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest.* 1994;93(2):615-632.
- 23 Penz S, Reiningger AJ, Brandl R, et al. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *Faseb J.* 2005;19(8):898-909.
- 24 Reiningger AJ, Bernlochner I, Penz SM, et al. A 2-step mechanism of arterial thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(11):1147-1158.
- 25 De Meyer GR, Hoylaerts MF, Kockx MM, et al. Intimal deposition of functional von Willebrand factor in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(10):2524-2534.
- 26 Siess W, Zangl KJ, Essler M, et al. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(12):6931-6936.
- 27 Katsuda S, Kaji T. Atherosclerosis and extracellular matrix. *Journal of atherosclerosis and thrombosis.* 2003;10(5):267-274.
- 28 Toschi V, Gallo R, Lettino M, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 1997;95(3):594-599.
- 29 Guglielmini G, Appolloni V, Momi S, et al. Matrix metalloproteinase-2 enhances platelet deposition on collagen under flow conditions. *Thromb Haemost.* 2016;115(2):333-343.
- 30 Lenti M, Falcinelli E, Pompili M, et al. Matrix metalloproteinase-2 of human carotid atherosclerotic plaques promotes platelet activation. Correlation with ischaemic events. *Thromb Haemost.* 2014;111(6):1089-1101.
- 31 Hechler B, Gachet C. Comparison of two murine models of thrombosis induced by atherosclerotic plaque injury. *Thromb Haemost.* 2011;105 Suppl 1:S3-12.
- 32 Gardiner EE, Karunakaran D, Shen Y, et al. Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases. *J Thromb Haemost.* 2007;5(7):1530-1537.
- 33 Auger JM, Kuijpers MJ, Senis YA, et al. Adhesion of human and mouse platelets to collagen under shear: a unifying model. *Faseb J.* 2005;19(7):825-827.
- 34 Herr AB, Farndale RW. Structural insights into the interactions between platelet receptors and fibrillar collagen. *J Biol Chem.* 2009;284(30):19781-19785.
- 35 Schulz C, Penz S, Hoffmann C, et al. Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo. *Basic Res Cardiol.* 2008;103(4):356-367.
- 36 Muller KA, Chatterjee M, Rath D, et al. Platelets, inflammation and anti-inflammatory effects of antiplatelet drugs in ACS and CAD. *Thromb Haemost.* 2015;114(3):498-518.
- 37 Ferreiro JL, Angiolillo DJ. New directions in antiplatelet therapy. *Circulation Cardiovascular interventions.* 2012;5(3):433-445.
- 38 Patrono C, Garcia Rodriguez LA, Landolfi R, et al. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2005;353(22):2373-2383.

- 39 Penz SM, Reininger AJ, Toth O, et al. Glycoprotein Ibalpha inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost.* 2007;97(3):435-443.
- 40 Cattaneo M. New P2Y(12) inhibitors. *Circulation.* 2010;121(1):171-179.
- 41 Udell JA, Bonaca MP, Collet JP, et al. Long-term dual antiplatelet therapy for secondary prevention of cardiovascular events in the subgroup of patients with previous myocardial infarction: a collaborative meta-analysis of randomized trials. *European heart journal.* 2016;37(4):390-399.
- 42 Bonaca MP, Bhatt DL, Cohen M, et al. Long-term use of ticagrelor in patients with prior myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2015;372(19):1791-800.
- 43 Adams HP, Jr., Effron MB, Torner J, et al. Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II). *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2008;39(1):87-99.
- 44 Zahid M, Mangin P, Loyau S, et al. The future of glycoprotein VI as an antithrombotic target. *J Thromb Haemost.* 2012;10(12):2418-2427.
- 45 Yousuf O, Bhatt DL. The evolution of antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *Nature reviews Cardiology.* 2011;8(10):547-559.
- 46 Metharom P, Berndt MC, Baker RI, et al. Current state and novel approaches of antiplatelet therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(6):1327-1338.
- 47 Moroi M, Jung SM, Okuma M, et al. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest.* 1989;84(5):1440-1445.
- 48 Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, et al. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors. *J Biol Chem.* 1999;274(41):29019-29024.
- 49 Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue AH, et al. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood.* 2000;96(5):1798-1807.
- 50 Horii K, Kahn ML, Herr AB. Structural basis for platelet collagen responses by the immune-type receptor glycoprotein VI. *Blood.* 2006;108(3):936-942.
- 51 Smethurst PA, Joutsu-Korhonen L, O'Connor MN, et al. Identification of the primary collagen-binding surface on human glycoprotein VI by site-directed mutagenesis and by a blocking phage antibody. *Blood.* 2004;103(3):903-911.
- 52 Zheng YM, Liu C, Chen H, et al. Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor gamma -chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen. *J Biol Chem.* 2001;276(16):12999-13006.
- 53 Berlanga O, Tulasne D, Bori T, et al. The Fc receptor gamma-chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin. *Eur J Biochem.* 2002;269(12):2951-2960.
- 54 Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, et al. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett.* 1997;413(2):255-259.
- 55 Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, et al. A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem.* 1997;272(38):23528-23531.

- 56 Deckmyn H, De Meyer SF, Broos K, et al. Inhibitors of the interactions between collagen and its receptors on platelets. *Handbook of experimental pharmacology*. 2012(210):311-337.
- 57 Smethurst PA, Onley DJ, Jarvis GE, et al. Structural basis for the platelet-collagen interaction: the smallest motif within collagen that recognizes and activates platelet Glycoprotein VI contains two glycine-proline-hydroxyproline triplets. *J Biol Chem*. 2007;282(2):1296-1304.
- 58 Bultmann A, Li Z, Wagner S, et al. Impact of glycoprotein VI and platelet adhesion on atherosclerosis--a possible role of fibronectin. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49(3):532-542.
- 59 Schonberger T, Ziegler M, Borst O, et al. The dimeric platelet collagen receptor GPVI-Fc reduces platelet adhesion to activated endothelium and preserves myocardial function after transient ischemia in mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;303(7):C757-766.
- 60 Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJ, et al. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood*. 2006;107(4):1405-1412.
- 61 Riba R, Hughes CE, Graham A, et al. Globular adiponectin induces platelet activation through the collagen receptor GPVI-Fc receptor gamma chain complex. *J Thromb Haemost*. 2008;6(6):1012-1020.
- 62 Alshehri OM, Hughes CE, Montague S, et al. Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood*. 2015;126(13):1601-1608.
- 63 Polgar J, Clemetson JM, Kehrel BE, et al. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *J Biol Chem*. 1997;272(21):13576-13583.
- 64 Asselin J, Knight CG, Farndale RW, et al. Monomeric (glycine-proline-hydroxyproline)₁₀ repeat sequence is a partial agonist of the platelet collagen receptor glycoprotein VI. *Biochem J*. 1999;339 (Pt 2):413-418.
- 65 Andrews RK, Arthur JF, Gardiner EE. Targeting GPVI as a novel antithrombotic strategy. *Journal of blood medicine*. 2014;5:59-68.
- 66 Miura Y, Takahashi T, Jung SM, et al. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J Biol Chem*. 2002;277(48):46197-46204.
- 67 Jung SM, Tsuji K, Moroi M. Glycoprotein (GP) VI dimer as a major collagen-binding site of native platelets: direct evidence obtained with dimeric GPVI-specific Fabs. *J Thromb Haemost*. 2009;7(8):1347-1355.
- 68 Loyau S, Dumont B, Ollivier V, et al. Platelet glycoprotein VI dimerization, an active process inducing receptor competence, is an indicator of platelet reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(3):778-785.
- 69 Jung SM, Moroi M, Soejima K, et al. Constitutive dimerization of glycoprotein VI (GPVI) in resting platelets is essential for binding to collagen and activation in flowing blood. *J Biol Chem*. 2012;287(35):30000-30013.
- 70 Lee FA, van Lier M, Relou IA, et al. Lipid rafts facilitate the interaction of PECAM-1 with the glycoprotein VI-FcR gamma-chain complex in human platelets. *J Biol Chem*. 2006;281(51):39330-39338.
- 71 Rabie T, Varga-Szabo D, Bender M, et al. Diverging signaling events control the pathway of GPVI down-regulation in vivo. *Blood*. 2007;110(2):529-535.

- 72 Al-Tamimi M, Tan CW, Qiao J, et al. Pathologic shear triggers shedding of vascular receptors: a novel mechanism for down-regulation of platelet glycoprotein VI in stenosed coronary vessels. *Blood*. 2012;119(18):4311-4320.
- 73 Al-Tamimi M, Grigoriadis G, Tran H, et al. Coagulation-induced shedding of platelet glycoprotein VI mediated by factor Xa. *Blood*. 2011;117(14):3912-3920.
- 74 Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, et al. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med*. 2001;193(4):459-469.
- 75 Ohlmann P, Hechler B, Ravanat C, et al. Ex vivo inhibition of thrombus formation by an anti-glycoprotein VI Fab fragment in non-human primates without modification of glycoprotein VI expression. *J Thromb Haemost*. 2008;6(6):1003-1011.
- 76 Boylan B, Berndt MC, Kahn ML, et al. Activation-independent, antibody-mediated removal of GPVI from circulating human platelets: development of a novel NOD/SCID mouse model to evaluate the in vivo effectiveness of anti-human platelet agents. *Blood*. 2006;108(3):908-914.
- 77 Bender M, Hofmann S, Stegner D, et al. Differentially regulated GPVI ectodomain shedding by multiple platelet-expressed proteinases. *Blood*. 2010;116(17):3347-3355.
- 78 Bigalke B, Stellos K, Geisler T, et al. Expression of platelet glycoprotein VI is associated with transient ischemic attack and stroke. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2010;17(1):111-117.
- 79 Bigalke B, Geisler T, Stellos K, et al. Platelet collagen receptor glycoprotein VI as a possible novel indicator for the acute coronary syndrome. *American heart journal*. 2008;156(1):193-200.
- 80 Bigalke B, Langer H, Geisler T, et al. Platelet glycoprotein VI: a novel marker for acute coronary syndrome. *Semin Thromb Hemost*. 2007;33(2):179-184.
- 81 Al-Tamimi M, Gardiner EE, Thom JY, et al. Soluble glycoprotein VI is raised in the plasma of patients with acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2011;42(2):498-500.
- 82 Wurster T, Poetz O, Stellos K, et al. Plasma levels of soluble glycoprotein VI (sGPVI) are associated with ischemic stroke. *Platelets*. 2013;24(7):560-565.
- 83 Al-Tamimi M, Mu FT, Moroi M, et al. Measuring soluble platelet glycoprotein VI in human plasma by ELISA. *Platelets*. 2009;20(3):143-149.
- 84 Locke D, Chen H, Liu Y, et al. Lipid rafts orchestrate signaling by the platelet receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem*. 2002;277(21):18801-18809.
- 85 Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, et al. Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *J Biol Chem*. 2002;277(24):21561-21566.
- 86 Bhatt H, Kochar S, Htun WW, et al. Coronary Collateral Circulation and Cardiovascular Risk Factors: Is There a Paradox? *Angiology*. 2015;66(6):588-594.
- 87 Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, et al. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(12):2341-2349.
- 88 Arthur JF, Dunkley S, Andrews RK. Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. *British journal of haematology*. 2007;139(3):363-372.
- 89 Dumont B, Lasne D, Rothschild C, et al. Absence of collagen-induced platelet activation caused by compound heterozygous GPVI mutations. *Blood*. 2009;114(9):1900-1903.

- 90 Hermans C, Wittevrongel C, Thys C, et al. A compound heterozygous mutation in glycoprotein VI in a patient with a bleeding disorder. *J Thromb Haemost.* 2009;7(8):1356-1363.
- 91 Gruner S, Prostredna M, Aktas B, et al. Anti-glycoprotein VI treatment severely compromises hemostasis in mice with reduced alpha2beta1 levels or concomitant aspirin therapy. *Circulation.* 2004;110(18):2946-2951.
- 92 Jiang P, Jandrot-Perrus M. New advances in treating thrombotic diseases: GPVI as a platelet drug target. *Drug discovery today.* 2014;19(9):1471-1475.
- 93 Ungerer M, Rosport K, Bultmann A, et al. Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation.* 2011;123(17):1891-1899.
- 94 Massberg S, Konrad I, Bultmann A, et al. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *Faseb J.* 2004;18(2):397-399.
- 95 ClinicalTrials.gov, NCT01645306: Revacept in Symptomatic Carotid Stenosis (Revacept/CS/02)
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01645306?term=revacept&rank=1>
[Stand 01.09.2016, 16:33]
- 96 Goebel S, Li Z, Vogelmann J, et al. The GPVI-Fc fusion protein Revacept improves cerebral infarct volume and functional outcome in stroke. *PLoS One.* 2013;8(7):e66960.
- 97 Ungerer M, Li Z, Baumgartner C, et al. The GPVI-Fc fusion protein Revacept reduces thrombus formation and improves vascular dysfunction in atherosclerosis without any impact on bleeding times. *PLoS One.* 2013;8(8):e71193.
- 98 Gruner S, Prostredna M, Koch M, et al. Relative antithrombotic effect of soluble GPVI dimer compared with anti-GPVI antibodies in mice. *Blood.* 2005;105(4):1492-1499.
- 99 Li H, Lockyer S, Concepcion A, et al. The Fab fragment of a novel anti-GPVI monoclonal antibody, OM4, reduces in vivo thrombosis without bleeding risk in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(5):1199-1205.
- 100 Schwartz SM, Galis ZS, Rosenfeld ME, et al. Plaque rupture in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(4):705-713.
- 101 Hansson GK, Heistad DD. Two views on plaque rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(4):697.
- 102 Jackson CL, Bennett MR, Biessen EA, et al. Assessment of unstable atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(4):714-720.
- 103 Kuijpers MJ, Gilio K, Reitsma S, et al. Complementary roles of platelets and coagulation in thrombus formation on plaques acutely ruptured by targeted ultrasound treatment: a novel intravital model. *J Thromb Haemost.* 2009;7(1):152-161.
- 104 Hu W, Polinsky P, Sadoun E, et al. Atherosclerotic lesions in the common coronary arteries of ApoE knockout mice. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology.* 2005;14(3):120-125.
- 105 Bentzon JF, Falk E. Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease? *Curr Opin Lipidol.* 2010;21(5):434-440.
- 106 Brandl R, Richter T, Haug K, et al. Topographic analysis of proliferative activity in carotid endarterectomy specimens by immunocytochemical detection of the cell cycle-related antigen Ki-67. *Circulation.* 1997;96(10):3360-3368.
- 107 Toth O, Calatzis A, Penz S, et al. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost.* 2006;96(6):781-788.

- 108 Bampalis VG, Brantl SA, Siess W. Why and how to eliminate spontaneous platelet aggregation in blood measured by multiple electrode aggregometry. *J Thromb Haemost.* 2012;10(8):1710-1714.
- 109 Van Kruchten R, Cosemans JM, Heemskerk JW. Measurement of whole blood thrombus formation using parallel-plate flow chambers - a practical guide. *Platelets.* 2012;23(3):229-242.
- 110 Kratzer MA, Negrescu EV, Hirai A, et al. The Thrombostat system. A useful method to test antiplatelet drugs and diets. *Semin Thromb Hemost.* 1995;21 Suppl 2:25-31.
- 111 Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, et al. Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. *Semin Thromb Hemost.* 1995;21 Suppl 2:106-112.
- 112 Penz S. Aktivierung von Thrombozyten durch humane atherosklerotische Plaques: Mechanismen und Inhibition. Dissertation, LMU München. 2008.
- 113 Favaloro EJ. Collagen binding assay for von Willebrand factor (VWF:CBA): detection of von Willebrands Disease (VWD), and discrimination of VWD subtypes, depends on collagen source. *Thromb Haemost.* 2000;83(1):127-135.
- 114 Jamasbi J, Megens RT, Bianchini M, et al. Differential Inhibition of Human Atherosclerotic Plaque-Induced Platelet Activation by Dimeric GPVI-Fc and Anti-GPVI Antibodies: Functional and Imaging Studies. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(22):2404-2415.
- 115 Reneman RS, Arts T, Hoeks AP. Wall shear stress--an important determinant of endothelial cell function and structure--in the arterial system in vivo. Discrepancies with theory. *J Vasc Res.* 2006;43(3):251-269.
- 116 Samady H, Eshtehardi P, McDaniel MC, et al. Coronary artery wall shear stress is associated with progression and transformation of atherosclerotic plaque and arterial remodeling in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2011;124(7):779-788.
- 117 Liu B, Tang D. Influence of non-Newtonian properties of blood on the wall shear stress in human atherosclerotic right coronary arteries. *Molecular & cellular biomechanics : MCB.* 2011;8(1):73-90.
- 118 Jamasbi J. Cross-linking GPVI-Fc by anti-Fc antibodies potentiates its inhibition of atherosclerotic plaque- and collagen-induced platelet activation. *JACC: Basic to translational Science.* 2016;1(3):131-142.
- 119 Mahalle N, Garg M, Kulkarni M, et al. Association of Inflammatory Cytokines with Traditional and Nontraditional Cardiovascular Risk Factors in Indians with known Coronary Artery Disease. *Annals of medical and health sciences research.* 2014;4(5):706-712.
- 120 Cheruvu PK, Finn AV, Gardner C, et al. Frequency and distribution of thin-cap fibroatheroma and ruptured plaques in human coronary arteries: a pathologic study. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(10):940-949.
- 121 Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, et al. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol.* 1994;23(7):1562-1569.
- 122 Puri R, Nicholls SJ, Ellis SG, et al. High-risk coronary atheroma: the interplay between ischemia, plaque burden, and disease progression. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(12):1134-1140.
- 123 Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation.* 2003;108(15):1772-1778.

- 124 Walker A, Pugh N, Garner SF, et al. Single domain antibodies against the collagen signalling receptor glycoprotein VI are inhibitors of collagen induced thrombus formation. *Platelets*. 2009;20(4):268-276.
- 125 Fukumoto Y, Hiro T, Fujii T, et al. Localized elevation of shear stress is related to coronary plaque rupture: a 3-dimensional intravascular ultrasound study with in-vivo color mapping of shear stress distribution. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(6):645-650.
- 126 Kleiman NS, Kolandaivelu K. Expanding the Roster: Developing New Inhibitors of Intravascular Thrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(22):2416-2419.
- 127 Pfizer. FACHINFORMATION, Enbrel® 25 mg. 2016.

11 Appendix

11.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der Thrombozytenadhäsion und -aggregation an Kollagen nach Arterienverletzung.....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der GPVI-Struktur (Dimer) und der GPVI-vermittelten Signaltransduktion	12
Abbildung 3: Wirkungsweise von löslichem dimeren GPVI-Fc und GPVI-Antikörpern	16
Abbildung 4: Aminosäuresequenz des thrombozytären GPVI Isoform 2 Precursors im Vergleich zur Aminosäuresequenz von GPVI-Fc	17
Abbildung 5: Schematischer Versuchsaufbau der MEA-Experimente mit GPVI-Fc.....	41
Abbildung 6: GPVI-Fc vermindert die statische Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation mit Kollagen oder Plaque durch Erhöhung der "lag-time"	42
Abbildung 7: GPVI-Fc vermindert dosisabhängig die statische Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation mit Kollagen oder Plaque.....	43
Abbildung 8: Präinkubation von Plaque mit einem Überschuss an GPVI-Fc hemmt die Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen nicht stärker als GPVI-Fc nach Zugabe zum Blut	43
Abbildung 9: GPVI-Fc hat keinen Effekt auf die statische Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation mit ADP oder TRAP	44
Abbildung 10: BLO8-1 und 5C4 hemmen die Plaque- und Kollagen-stimulierte statische Thrombozytenaggregation im Blut	45
Abbildung 11: BLO8-1 und 5C4 haben keinen Effekt auf die statische Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation mit ADP oder TRAP	46
Abbildung 12: Antikörper gegen monomeres und dimeres GPVI (5C4), nur gegen dimeres GPVI (m-Fab-F), und GPVI-Fc hemmen die Plaque-induzierte statische Thrombozytenaggregation in unterschiedlichem Ausmaß.....	47
Abbildung 13: Experimenteller Aufbau der Flusskammerexperimente	49
Abbildung 14: Repräsentative Abbildung der Beschichtung eines Glasdeckgläschens mit humanem Plaquehomogenat.....	49
Abbildung 15: Unabhängigkeit der Thrombozytenaggregation von unterschiedlichen Plaque-Pools unter Strömungsbedingungen	50
Abbildung 16: Spenderabhängigkeit der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation unter Strömungsbedingungen.....	51

Abbildung 17: Repräsentative mikroskopischen Aufnahmen der Thrombozytenaggregatbildung an Plaquehomogenat zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Perfusion bei einer Scherrate von 550/s.....	52
Abbildung 18: Präinkubation von Plaque mit einem Überschuss an GPVI-Fc hemmt die Thrombozytenaggregation bei niedriger Scherrate nicht stärker als GPVI-Fc nach Zugabe zum Blut.....	53
Abbildung 19: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozytenadhäsion und -aggregation an Plaque zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Perfusion bei einer Scherrate von 1100/s	54
Abbildung 20: GPVI-Fc und anti-GPVI Antikörper (BLO8-1, 5C4) hemmen die Thrombozytenablagerung an atherosklerotisches Plaquematerial unterschiedlich stark unter arteriellen Strömungsbedingungen, wobei die Hemmung durch GPVI-Fc mit der Scherrate ansteigt.	55
Abbildung 21: Dynamik der GPVI-Fc-Bindung, Thrombozytenadhäsion und -aggregation an atherosklerotischem Plaquematerial unter Strömungsbedingungen.....	56
Abbildung 22: Schnelle und sättigbare GPVI-Fc-Bindung an die homogenen, kleinen Plaquekomponenten unter Strömungsbedingungen	57
Abbildung 23: DIC- und Fluoreszenz-Bildgebung (maximale Vergrößerung) der GPVI-Fc-Bindung, Thrombozytenadhäsion und -aggregation an atherosklerotischem Plaquematerial unter Strömungsbedingungen	58
Abbildung 24: Dynamik der GPVI-Fc-Bindung und Thrombozytenadhäsion an Kollagen unter Strömungsbedingungen.....	59
Abbildung 25: Thrombozyten (grün) aggregieren stromaufwärts und stromabwärts von Plaquematerial (blau) in unbehandeltem Blut. Bildgebung mit TPLSM.....	60
Abbildung 26: Thrombozyten (grün) aggregieren stromabwärts von Plaquematerial (blau) bei niedriger, aber nicht bei hoher Scherrate in Anwesenheit von GPVI-Fc (rot). Bildgebung mit TPLSM	61
Abbildung 27: Thrombozyten (grün) adhärieren stromabwärts an bestimmte Bereiche von Plaque-Kollagen (blau), die nicht mit GPVI-Fc besetzt sind, sich aber in nächster Nähe von GPVI-Fc (rot) befinden. SIM-Bildgebung	62
Abbildung 28: Thrombozyten adhärieren an Kollagenssegmente, die wenig GPVI-Fc tragen. SIM Bildgebung	63
Abbildung 29: Schematische Darstellung der Hypothese des Mechanismus der Scherabhängigkeit mit GPVI-Fc.....	64
Abbildung 30: Die noch vorhandene Thrombozytenaggregation in Anwesenheit von GPVI-Fc wird durch die Blockade der thrombozytären Cyclooxygenase und des P2Y ₁₂ -Rezeptors gehemmt	64

Abbildung 31: Die noch vorhandene Thrombozytenaggregation in Anwesenheit von niedrigen 5C4 Konzentrationen wird durch die Blockade der thrombozytären Cyclooxygenase und des P2Y ₁₂ -Rezeptors gehemmt.....	65
Abbildung 32: Schematische Darstellung der durch anti-Fc-Antikörper vermittelten Quervernetzung von GPVI-Fc.....	66
Abbildung 33: Die Quervernetzung von GPVI-Fc durch anti-human-Fc IgG (GPVI-Fc*IgG-XL) und anti-human-Fc Fab2 (GPVI-Fc*Fab2-XL) verstärkt die Hemmung der Kollagen- oder Plaque-induzierten statischen Thrombozytenaggregation verglichen mit GPVI-Fc.....	67
Abbildung 34: Konzentrationsabhängigkeit des Effektes von GPVI-Fc*Fab2-XL auf die Plaque- und Kollagen-vermittelte Thrombozytenaggregation verglichen mit GPVI-Fc.....	68
Abbildung 35: Die Quervernetzung von GPVI-Fc mit anti-human-Fc IgG (GPVI-Fc*IgG-XL) oder anti-human-Fc Fab2 (GPVI-Fc*Fab2-XL) erhöht dessen Hemmung der Plaque- oder Kollagen-stimulierten Thrombozytenaggregation unter Strömungsbedingungen.....	69
Abbildung 36: Die Quervernetzung von Fc-Kontrollprotein mit anti-human-Fc IgG (A) und anti-human-Fc Fab2 (B) hat, verglichen mit unbehandeltem Blut, keinen Einfluss auf die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation unter Strömungsbedingungen.....	70
Abbildung 37: Vergleich der Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation durch quervernetztes GPVI-Fc und dem GPVI-Antikörper 5C4 unter Strömungsbedingungen.....	71
Abbildung 38: Das Ausmaß der Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation durch quervernetztes GPVI-Fc unter Strömungsbedingungen ist abhängig vom molaren Verhältnis von GPVI-Fc : quervernetztem Antikörper	71
Abbildung 39: Kinetik der Bindung von unvernetztem und quervernetztem GPVI-Fc an Kollagen	73
Abbildung 40: Durch analytische Ultrazentrifugation ermitteltes Molekulargewichtsverteilungsmuster der unvernetzten und quervernetzten GPVI-Fc-Komplexe.....	74
Abbildung 41: SIM-Bildgebung der Bindung von GPVI-Fc (unvernetzt und quervernetzt) und Thrombozyten an Kollagen.....	76
Abbildung 42: SIM-Bildgebung der stabilen Thrombozytenadhäsion an Kollagenfasern nach Zugabe von GPVI-Fc, GPVI-Fc*IgG-XL oder GPVI-Fc*Fab2-XL zum Blut.....	77

Abbildung 43: SIM- und STED-Bildgebung von Kollagenfasern, die mit unvernetztem GPVI-Fc (GPVI-Fc*IgG, GPVI-Fc*Fab2) oder quervernetztem GPVI-Fc (GPVI-Fc*IgG-XL, GPVI-Fc*Fab2-XL) gefärbt wurden.....	78
Abbildung 44: Im Gegensatz zu GPVI-Fc*Fab2-XL hemmt GPVI-Fc*Fab die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation unter Fluss nicht	79
Abbildung 45: SIM-Bildgebung der GPVI-Fc*Fab- und GPVI-Fc*Fab2-XL-Bindung und Thrombozytenadhäsion an Kollagenfasern.....	80
Abbildung 46: Keine signifikante Erhöhung der <i>in vitro</i> Blutungszeit durch GPVI-Fc*Fab2-XL.....	81
Abbildung 47: Unterschiedliche Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation durch GPVI-Fc und GPVI-Antikörper	93
Abbildung 48: Schematische Darstellung der Bindung von GPVI-Fc und mit anti-human-Fc Fab2 quervernetztem GPVI-Fc an Plaque-Kollagen	94

11.2 Videoverzeichnis

Auf der beigelegten Video-CD befinden sich folgende Videos:

Video 1 Thrombozyten aggregieren auf Plaquematerial in fließendem Blut.

Thrombozyten (grün) wurden mit Mepacrin angefärbt und Blut wurde für 5 min über Plauehomogenat perfundiert (Scherrate: 550/s). Die Thrombozytenaggregation wurde unter Verwendung eines 10x Objektivs (NA 0,4) mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert (1 Bild/sek). Flussrichtung von rechts nach links.

Video 2 Nach Behandlung des Blutes mit GPVI-Fc tritt die Thrombozytenaggregation auf Plaquematerial verzögert ein und ist reduziert.

Blut wurde mit GPVI-Fc (50 µg/ml) behandelt und für 5 min über Plauehomogenat perfundiert (Scherrate: 550/s). Thrombozyten (grün) wurden mit Mepacrin angefärbt. Die Thrombozytenaggregation wurde unter Verwendung eines 10x Objektivs (NA 0,4) mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert (1 Bild/sek). Flussrichtung von rechts nach links.

Video 3 Nach Behandlung des Blutes mit GPVI-Antikörpern ist die Thrombozytenaggregation auf Plaquematerial gehemmt. Die Thrombozytenadhäsion ist eher transient als stabil.

Blut wurde mit 5C4 (1,25 µg/ml) behandelt und für 5 min über Plauehomogenat perfundiert (Scherrate: 550/s). Thrombozyten (grün) wurden mit Mepacrin angefärbt. Die Thrombozytenadhäsion wurde unter Verwendung eines 10x Objektivs (NA 0,4) mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert (1 Bild/sek). Flussrichtung von rechts nach links.

Video 4 GPVI-Fc bindet schnell an kleine und große Plauefragmente.

GPVI-Fc wurde mit PE-konjugierten anti-human-Fc Antikörpern markiert und vor Beginn der Perfusion über Plauehomogenat (Scherrate: 550/s) dem Blut beigegeben (finale Konzentration 50 µg/ml). GPVI-Fc (rot) wurde unter Verwendung eines 100x Öl-Objektivs (NA 1,4) mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert (1 Bild/2 sek). Flussrichtung von rechts nach links.

Video 5 Dynamik der GPVI-Fc-Bindung und Thrombozytenanhaftung an Plauefragmente.

GPVI-Fc bindet schnell stromaufwärts und stromabwärts an kleine und große Plauefragmente, Thrombozyten adhäreren in Strömungsnischen an große Plauefragmente, was zur Thrombozytenaggregation führt.

GPVI-Fc (rot) wurde mit PE-konjugierten anti-human-Fc Antikörpern markiert und vor Beginn der Perfusion über Plauehomogenat (Scherrate: 550/s) dem Blut beigegeben (finale Konzentration 50 µg/ml). Plauefragmente und Thrombozyten wurden mit DIC- und PE-markiertes GPVI-Fc wurde mit Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung eines 100x Öl-Objektivs (NA 1,4) detektiert (1 Bild/2 sek). Flussrichtung von rechts nach links.

Video 6 **GPVI-Fc-Bindung an Kollagen.**

GPVI-Fc wurde mit PE-konjugierten anti-human-Fc Antikörpern markiert und vor Beginn der Perfusion über Kollagen (Scherrate: 600/s) dem Abciximab enthaltenden Blut beigegeben (finale GPVI-Fc-Konzentration 50 µg/ml). GPVI-Fc (rot) wurde unter Verwendung eines 100x Öl-Objektivs (NA 1,4) mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert (1 Bild/sek). Flussrichtung von rechts nach links.

Video 7 **Trotz schneller GPVI-Fc-Bindung an Plaquematerial aggregieren Thrombozyten stromabwärts von großen Plauefragmenten bei niedriger Scherrate.**

Dreidimensionale Visualisierung (TPLSM) der Thrombozytenanlagerung (grün) an autofluoreszierendes Plaquematerial (blau) in Anwesenheit von GPVI-Fc (rot). Totale Dicke 10 µm; z-Abschnitte 0,7 µm. Thrombozyten wurden mit DiOC6 angefärbt. GPVI-Fc wurde mit Alexa Fluor[®] 594-konjugierten anti-human-Fc Antikörpern markiert und vor Beginn der Perfusion über Plauehomogenat (Scherrate: 550/s) dem Blut beigegeben (finale Konzentration 50 µg/ml). Flussrichtung von rechts nach links.

Video 8 **Thrombozyten adhären und aggregieren bei niedriger Scherrate in Anwesenheit von GPVI-Fc stromabwärts an Plauefragmente.**

Blut wurde mit GPVI-Fc (50 µg/ml) behandelt und über Plauehomogenat perfundiert (Scherrate: 550/s). Plauehomogenat und Thrombozyten wurden unter Verwendung eines 100x Öl-Objektivs (NA 1,4) mittels DIC-Mikroskopie detektiert (1 Bild/sek). Flussrichtung von rechts nach links.

Video 9 **Dreidimensionale Animation des SIM-Bildes in Abbildung 27.**

Thrombozyten (grün) adhären stromabwärts an bestimmte Stellen des Plaue-Kollagens (blau), die von GPVI-Fc (rot) nicht besetzt sind, sich aber in nächster Nähe davon befinden. SIM Bildgebung. Totale Dicke 3,6 µm; z-Abschnitte 0,2 µm.

Video 10 **Dreidimensionale Animation des SIM-Bildes in Abbildung 28.**

Thrombozyten (grün) adhären hauptsächlich an Kollagensegmente (blau), die wenig GPVI-Fc (rot) tragen. SIM Bildgebung. Totale Dicke 2,5 µm; z-Abschnitte 0,15 µm.

Video 11 **Thrombozyten adhären und aggregieren stromabwärts an Plauefragmente in Anwesenheit niedriger inhibitorischer Schwellenkonzentrationen von 5C4.**

Blut wurde mit 5C4 (0,5 µg/ml) behandelt und über Plauehomogenat perfundiert (Scherrate: 550/s). Plauehomogenat und Thrombozyten wurden unter Verwendung eines 100x Öl-Objektivs (NA 1,4) mittels DIC-Mikroskopie detektiert (1 Bild/sek). Flussrichtung von rechts nach links.

Video 12 **Kinetik der Bindung von unvernetztem GPVI-Fc an Kollagen unter Strömungsbedingungen.**

GPVI-Fc wurde mit PE-markierten anti-human-Fc Fab2 Antikörpern in einem molaren Verhältnis von 20:1 inkubiert. Die Mischung wurde vor der Perfusion (Scherrate: 600/s) über Kollagen dem Abciximab enthaltenden Blut beigegeben (finale GPVI-Fc-Konzentration 333 nM).

Die Bindung von PE-markiertem GPVI-Fc*Fab2 (rot) an Kollagen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (1 Bild/sek) unter Verwendung eines 10x Objektivs (NA 0,4) aufgezeichnet. Flussrichtung von rechts nach links.

Video 13 **Kinetik der Bindung von quervernetztem GPVI-Fc an Kollagen unter Strömungsbedingungen.**

GPVI-Fc wurde mit 10% PE-markierten und 90% unmarkierten anti-human-Fc Fab2 Antikörpern in einem molaren Verhältnis von 1:1 zur GPVI-Fc-Quervernetzung inkubiert. Die Mischung wurde vor der Perfusion (Scherrate: 600/s) über Kollagen dem Abciximab enthaltenden Blut beigegeben (finale GPVI-Fc-Konzentration 333 nM).

Die Bindung von PE-markiertem GPVI-Fc*Fab2-XL (rot) an Kollagen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (1 Bild/sek) unter Verwendung eines 10x Objektivs (NA 0,4) aufgezeichnet. Flussrichtung von rechts nach links.

Die hier gezeigten Videos sind publiziert ^{114, 118}.

12 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Weber, dem Leiter des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, für die Möglichkeit bedanken, im IPEK promovieren zu können.

Dank gebührt auch der advanceCor GmbH sowie der Bayerischen Forschungstiftung für die Finanzierung meiner Projekte und damit für die Ermöglichung dieser Dissertation.

Besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Alexander Faußner bedanken, der mit hilfreichen Anregungen und motivierenden Gesprächen zu meinem Projekt beitrug und mir stets mit freundlichem Rat zur Seite stand.

Ein spezieller Dank gebührt Prof. Dr. Wolfgang Siess. Seine intensive Förderung und kontinuierliche Unterstützung meiner Projekte und sein immenses Wissen haben entscheidend zum Erfolg dieser Dissertation beigetragen. Das in mich gesetzte Vertrauen ließ mich auch in schwierigen Situationen nicht mutlos werden. Besonders dankbar bin ich ihm für die Möglichkeit, Forschung in Israel zu betreiben, was nicht nur einen immensen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Dissertation hatte, sondern auch ein großer persönlicher Gewinn war. Die väterliche Fürsorge von Herrn Prof. Siess und die herzliche Gastfreundschaft von Jenny Racah bereiteten mir einen unvergesslichen Aufenthalt in Israel.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Reinhard Lorenz für seinen wichtigen Beitrag zu meinem Projekt. Sein medizinisches Wissen sowie die Durchführung der Statistik waren unverzichtbar für meine Arbeit.

Auch Kathrin von Oheimb bin ich sehr verbunden für ihre technische Assistenz und Unterstützung im Laboralltag und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zudem erhielt ich tatkräftigen Beistand von Mariaelvy Bianchini und Dr. Remco Megens, die mit TPLSM und STED-Mikroskopie dazu beitrugen, diese Arbeit mit eindrucksvollen Bildern zu ergänzen. Danke für die ausgezeichnete Zusammenarbeit!

Ich danke Dr. Natalie Elia vom Department of Life Sciences der Ben Gurion University of the Negev in Israel, die mir erlaubte, einen Teil meiner Arbeit in ihrem Labor auszuführen. Sie und Shachar Sherman führten mich in die "Superresolution-Mikroskopie" ein und trugen mit ihrer Hilfe und Erfahrung wesentlich zum Erfolg meines Projektes bei.

Desweiteren möchte ich mich bei Dr. Martin Ungerer, Dr. Götz Münch und Dr. Kerstin Uhland von advanceCor bedanken für die anregenden Diskussionen bezüglich meines Projektes, für

die Bereitstellung von GPVI-Fc und 5C4 und die Möglichkeit, PFA-200-Messungen in ihrem Labor durchzuführen.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Richard Brandl von der Praxis für Gefäßchirurgie und Venenmedizin in München für die Bereitstellung von humanem atherosklerotischen Plaquematerial für meine Forschung.

Zudem danke ich Prof. Dr. Richard Farndale und Dr. Stefanie Jung vom Department of Biochemistry der University of Cambridge in Großbritannien für die Unterstützung bei der Interpretation der erlangten Daten und für die Bereitstellung von m-Fab-F.

Auch Adam Walker von GlaxoSmithKline research & development bin ich zu Dank verpflichtet für die Bereitstellung von BLO8-1.

Bei Christine John und Prof. Dr. Buchner vom Lehrstuhl für Biotechnologie der Technischen Universität München bedanke ich mich für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation zur Charakterisierung der quervernetzten GPVI-Fc-Komplexe.

Außerdem danke ich Dr. Pankaj Goyal vom Department of Biotechnology von der Central University of Rajasthan in Indien für die Einführung in die Fluoreszenz-Mikroskopie.

Ich danke unserem IT-Beauftragten Dr. Philipp von Hundelshausen für seine Tipps in technischen Angelegenheiten.

Den Sekretärinnen vom IPEK, Frau Bretzke, Frau Stöger und Frau Herrle, danke ich für ihre beständige Freundlichkeit und ihr Zuvorkommen bei jeglichen Angelegenheiten.

Auch bei Nada, unserer Laborhelferin, die unermüdlich für Ordnung sorgte, bedanke ich mich herzlich.

Ein besonderer Dank gilt den Laborkollegen meiner Arbeitsgruppe: Suman, für ihre Hilfsbereitschaft bei der Einarbeitung am Anfang meiner Doktorandenzeit, Kristina, Ann, Gesa, Mariam, Yaci und Danny für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, die herzliche Arbeitsatmosphäre und die vielen lustigen gemeinsamen Stunden.

Auch meinem Kollegen und gutem Freund Xavier, dem "funniest guy in the lab", der mir mit Ratschlägen zur täglichen Laborarbeit stets zur Seite stand und der auch nach unzähligen Fragen noch geduldig blieb, danke ich von Herzen. Ein besonderer Dank gebührt Manu und Zhen für die unvergessliche gemeinsame Zeit am IPEK. Ihr seid Freunde fürs Leben geworden! Auch Susanne, Helene, Renske und Pati danke ich für die vielen gemeinsamen Aktivitäten und dass ihr mir nach langen Nächten in München immer Übernachtung mit

Frühstück im Wohnheim geboten habt. Ganz besonders danke ich auch Holger und Chrissy, die mit ihrem einzigartigen Humor immer für gute Stimmung im Arbeitsraum sorgten. Danke für eure Hilfsbereitschaft, dass ihr mir immer den „richtigen Knopf“ bei jeder technischen Herausforderung gezeigt habt und dass ihr beim täglichen „Telefondienst“ die Geduld nicht verloren habt. Außerdem möchte ich mich bei Ake, Birgit, Jean-Eric, Steffi, Jürgen, Klaus, Yvonne D., Maik, Ela, Oli und Norbert für die herzliche Aufnahme ins IPEK bedanken. Auch Almu, Yvonne J., Carlos, Martina, Larissa, Petra, Janine und Julian und allen anderen Mitarbeitern vom IPEK, die ich nicht namentlich genannt habe, danke ich für die freundliche und familiäre Atmosphäre. Ich hätte mir keine besseren Kollegen vorstellen können! Selbst euer Blut habt ihr für mich geopfert!

Weiterhin möchte ich meinen guten Freunden danken: Christine fürs Zuhören und Ermutigen beim Üben meiner Vorträge und Präsentationen und Sven für seine stetige Hilfsbereitschaft und Motivation. Du bist einfach der Größte!

Ein besonderer Dank gebührt meinem Freund Philipp, der mir nicht nur in technischen Fragen stets zur Seite stand, sondern auch geduldig und verständnisvoll neben mir saß, wenn meine Zeit nur der Arbeit galt. Schön, dass du immer für mich da warst!

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen geliebten Eltern, die mich in jeglicher Hinsicht mit ihrer Fürsorge und Ermutigung durch die Höhen und Tiefen meiner Doktorarbeit begleitet haben. Ohne euch hätte ich das alles nicht geschafft!