

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

**Aktivierung von Thrombozyten durch humane  
atherosklerotische Plaques:  
Mechanismen und Inhibition**

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

**vorgelegt von  
Sandra Magdalena Penz**

**aus  
Traunstein**

**2008**



**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Siess**

**2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Marcus Hacker**

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. Klaus G. Parhofer  
Prof. Dr. Karl Sotlar**

**Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser**

**Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2008**



*Für meinen Papa*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Thrombozyten .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Morphologie der Thrombozyten.....	1
1.1.2. Thrombozytenfunktion und Mechanismen der Thrombozyten-aktivierung.....	3
1.1.2.1. Adhäsion .....	3
1.1.2.2. Aktivierung, Gestaltwandel und Sekretion.....	4
1.1.2.3. Aggregation .....	6
<b>1.2. Plaque-Entstehung und Plaqueruptur.....</b>	<b>7</b>
1.2.1. Entwicklung atherosklerotischer Läsionen.....	7
1.2.2. Plaque-Erosion, Plaqueruptur und Freilegung Thrombus-aktivierender Substanzen.....	11
<b>1.3. Antithrombozytäre Substanzen.....</b>	<b>17</b>
1.3.1. Acetylsalicylsäure (Aspirin <sup>®</sup> , ASS) und andere Cyclooxygenase-Inhibitoren.....	17
1.3.2. ADP-Rezeptor-Antagonisten .....	19
1.3.3. GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten .....	22
<b>1.4. Thrombozyten-Kollagen-Interaktion .....</b>	<b>24</b>
1.4.1. Kollagentypen und deren Verteilung in gesunden Gefäßwänden und atherosklerotischen Läsionen.....	24
1.4.2. Thrombozytäre Kollagenrezeptoren .....	30
1.4.2.1. Glykoprotein VI.....	31
1.4.2.2. Integrin $\alpha_2\beta_1$ .....	35
1.4.3. Bedeutung des Blutflusses und der VWF-GPIIb $\alpha$ -Achse für die Thrombozyten-Kollagen-Interaktion.....	38
<b>2. Fragestellung der Arbeit.....</b>	<b>42</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1. Materialien .....</b>	<b>44</b>
3.1.1. Geräte.....	44

3.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	45
3.1.3. Chemikalien, Enzyme, Peptide, Antikörper, IgG Isotypkontrollen.....	46
3.1.3.1. Chemikalien.....	46
3.1.3.2. Enzyme.....	48
3.1.3.3. Peptide.....	48
3.1.3.4. Antikörper.....	49
3.1.3.5. IgG Isotypkontrollen.....	50
<b>3.2. Methoden.....</b>	<b>51</b>
3.2.1. Präparation und Konservierung von humanem atherosklerotischen Plaquematerial aus der <i>Arteria carotis</i> .....	51
3.2.2. Blutabnahme.....	54
3.2.3. Präparation von humanem plättchenreichem und plättchenarmem Plasma sowie humaner gewaschener Thrombozyten.....	55
3.2.4. Turbidimetrische Messung von Thrombozytengestaltwandel („ <i>shape change</i> “) und Aggregation.....	57
3.2.5. Bestimmung der ATP-Sekretion in Suspensionen gewaschener Thrombozyten und im PRP.....	58
3.2.6. Bestimmung der Thrombozytenaggregation im Blut.....	58
3.2.6.1. Einzel-Thrombozyten-Zählung („ <i>single platelet counting</i> “ ).....	58
3.2.6.2. Impedanzaggregometrie (Multiplate <sup>®</sup> -System).....	59
3.2.7. Bestimmung der Thrombozyten-Monozyten-Aggregatbildung.....	61
3.2.8. Bestimmung der Gerinnung, bzw. Fibrinbildung mittels Thrombelastographie nach Rotationsprinzip (roTEM <sup>®</sup> -System).....	63
3.2.9. Mikroskopische Methoden.....	65
3.2.9.1. Lokalisation von Kollagenstrukturen in Plaqueschnitten mittels Immunhistochemie ..	65
3.2.9.2. Lokalisation von Kollagenstrukturen in Plauehomogenaten mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	66
3.2.9.3. Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung des thrombozytären Aktinzytoskeletts	67
3.2.10. Untersuchung der Thrombozytenadhäsion und Aggregation unter statischen Bedingungen.....	68



3.2.11. Untersuchung der Thrombozytenadhäsion und Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen.....	69
3.2.12. Proteinbiochemische Methoden.....	73
3.2.12.1. Bestimmung der Proteinkonzentration in Plaquesuspensionen.....	73
3.2.12.2. Kollagenextraktion und Bestimmung des Kollagengehalts im Plaquematerial .....	74
3.2.12.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	75
3.2.12.4. Gelfärbemethoden.....	76
3.2.12.5. Nachweis von Kollagen Typ I mittels Westernblotanalyse.....	76
3.2.13. Enzymatischer Verdau des Plaquekollagens mittels Kollagenase.....	77
3.2.14. Statistische Auswertung.....	78
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>79</b>
<b>4.1. Aktivierung von Thrombozyten durch humanes atherosklerotisches Plaquematerial</b>	<b>79</b>
4.1.1. Atherosklerotische Plaques stimulieren die Plättchenaggregation und Sekretion in gewaschenen Thrombozytensuspensionen, PRP und antikoaguliertem Blut.....	79
4.1.2. Atherosklerotische Plaques stimulieren die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten im Blut, sowie die Fibrinbildung in PPP, PRP und Blut.....	83
<b>4.2. Bedeutung von Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Plaquestrukturen für die Thrombozytenaktivierung .....</b>	<b>85</b>
4.2.1. Lokalisation und Morphologie Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiver Strukturen im Plaque .....	85
4.2.2. Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an kollagenpositiven Plaquestrukturen unter statischen Bedingungen .....	87
4.2.3. Adhäsion und Aggregatbildung von Thrombozyten an kollagenpositiven Plaquestrukturen unter arteriellen Flussbedingungen.....	90
<b>4.3. Relative Bedeutung der thrombozytären Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin <math>\alpha_2\beta_1</math> für die Thrombozytenaktivierung vermittelt durch fibrilläres Kollagen und atherosklerotisches Plaquematerial .....</b>	<b>92</b>
4.3.1. Vermittlung der Plaque-induzierten Thrombozytenadhäsion, Aggregation und Sekretion durch die Aktivierung thrombozytärer Kollagenrezeptoren.....	92
4.3.2. Atherosklerotisches Plaquematerial interagiert sowohl mit GPVI als auch mit dem Integrin $\alpha_2\beta_1$ .....	94

4.3.3. Relative Bedeutung des GPVI-Rezeptors für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung .....	95
4.3.3.1. Wirkung des anti-GPVI-Antikörpers 5C4 auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung in PRP und Blut .....	95
4.3.3.2. Wirkung des anti-GPVI-Antikörpers 10B12 auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung in PRP und Blut .....	98
4.3.4. Relative Bedeutung des humanen Integrin $\alpha_2\beta_1$ für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung .....	103
4.3.4.1. Wirkung des anti-Integrin $\alpha_2$ -Antikörpers 6F1 auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung und Aggregatbildung in PRP und Blut .....	103
4.3.5. Relative Bedeutung der humanen Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ für die Plaque-induzierte Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten .....	106
4.3.6. Relative Bedeutung des murinen Glykoprotein VI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung .....	107
<b>4.4. Bedeutung des thrombozytären VWF-Rezeptors GPIb<math>\alpha</math> für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung .....</b>	<b>110</b>
4.4.1. Bedeutung des thrombozytären VWF-Rezeptors GPIb $\alpha$ für die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation im Blut .....	110
4.4.2. Bedeutung des thrombozytären VWF-Rezeptors GPIb $\alpha$ für die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen .....	112
<b>4.5. Bedeutung der sekundären Botenstoffe ADP und TxA2 für die Thrombozytenaktivierung vermittelt durch Kollagen und atherosklerotisches Plaquematerial .....</b>	<b>113</b>
4.5.1. Bedeutung der ADP-Rezeptoren P2Y <sub>1</sub> und P2Y <sub>12</sub> für die Thrombozytenaktivierung vermittelt durch Kollagen und atherosklerotisches Plaquematerial .....	114
4.5.1.1. Bedeutung von P2Y <sub>1</sub> und P2Y <sub>12</sub> für die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation in PRP und Blut .....	114
4.5.1.2. Bedeutung von P2Y <sub>1</sub> und P2Y <sub>12</sub> für die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation in PRP und Blut .....	117
4.5.1.3. Bedeutung von P2Y <sub>1</sub> und P2Y <sub>12</sub> für die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen .....	121
4.5.2. Bedeutung von TxA2 sowie der Kombination von TxA2 und ADP für die Thrombozytenaktivierung vermittelt durch Kollagen und atherosklerotisches Plaquematerial .....	122
4.5.2.1. Bedeutung von TxA2 sowie der Kombination von TxA2 und ADP für die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation in PRP und Blut .....	122

4.5.2.2. Bedeutung von TxA <sub>2</sub> sowie der Kombination von TxA <sub>2</sub> und ADP für die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation in PRP und Blut.....	124
4.5.2.3. Bedeutung von TxA <sub>2</sub> sowie der Kombination von TxA <sub>2</sub> und ADP für die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen	126
<b>4.6. Gegenüberstellung aktiver und inaktiver atherosklerotischer Plaques .....</b>	<b>129</b>
4.6.1. Bedeutung der Thrombozytenzahl des PRP für die Plaque-Aktivität .....	129
4.6.2. Vergleich von Kollagengehalt und Struktur aktiver und inaktiver atherosklerotischer Plaques .....	132
4.6.3. Korrelation von Plaque-Aktivität und Glykoprotein VI-Bindung.....	141
<b>4.7. Resultate zur Aufbereitung und Konservierung des atherosklerotischen Plaque-materials .....</b>	<b>144</b>
4.7.1. Plaque-Aufbereitungsmethoden und deren Einfluss auf die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung sowie die Gerinnung .....	144
4.7.2. Optimierung der Plaquehaftung auf Glasoberflächen .....	151
4.7.2.1. Plaquehomogenate .....	151
4.7.2.2. Plaqueschnitte .....	154
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>157</b>
<b>5.1. Einfluss der Plaque-Aufbereitung und –Konservierung auf die Thrombozyten-aktivierung.....</b>	<b>157</b>
<b>5.2. Etablierung eines Modells zur Analyse der Plaque-induzierten Thrombusbildung.</b>	<b>158</b>
<b>5.3. Direkte, „tissue factor“-unabhängige Thrombozyten-aktivierung durch atherosklerotisches Plaquematerial – Bedeutung Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiver Plaquestrukturen .....</b>	<b>160</b>
<b>5.4. Relative Bedeutung der Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin <math>\alpha_2\beta_1</math> für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung.....</b>	<b>163</b>
<b>5.5. Bedeutung des VWF-Rezeptors GPIIb/IIIa für die Plaque-induzierte Thrombozyten-aktivierung.....</b>	<b>166</b>
<b>5.6. Bedeutung der ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> sowie der thrombozytären Cyclooxygenase für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung .....</b>	<b>170</b>
<b>5.7. Vergleich aktiver und inaktiver atherosklerotischer Plaques .....</b>	<b>176</b>

**6. Zusammenfassung ..... 184**

**Anhang..... 186**

**Literaturverzeichnis ..... 187**

Abkürzungen und Einheiten

Wissenschaftliche Beiträge

Danksagung

Lebenslauf

# 1. Einleitung

## 1.1. Thrombozyten

### 1.1.1. Morphologie der Thrombozyten

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, stellen mit einem Durchmesser von im Mittel 2  $\mu\text{m}$  die kleinsten korpuskulären Bestandteile des zirkulierenden Blutes dar. Im Gegensatz zu anderen eukaryotischen Blutzellen weisen die Thrombozyten keinen Zellkern auf (anukleäre Zellen) und sind aus diesem Grund nicht oder nur sehr eingeschränkt in der Lage Proteine neu zu synthetisieren. Im physiologischen Zustand zirkulieren 150.000 bis 400.000 Thrombozyten/ $\mu\text{l}$  Blut für eine durchschnittliche Dauer von 7 bis 10 Tagen im peripheren Gefäßsystem und werden anschließend im retikulären System der Leber und Milz abgebaut. In etwa 20% der Gesamtblutplättchenzahl werden hierbei täglich erneuert (Morgenstern, 1997; George, 2000). Die Thrombozyten werden im Knochenmark durch Zytoplasma-Abschnürungen ihrer Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, gebildet, wobei der exakte Mechanismus der Plättchenbildung derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Bisher geht man davon aus, dass die Megakaryozyten so genannte „*proplatelets*“ formen, an deren Enden Blutplättchen abgeschnürt und anschließend Scherkraft vermittelt in die Blutzirkulation freigesetzt werden (Hartwig *et al.*, 2003; Italiano *et al.*, 2007; Junt *et al.*, 2007). Von einem Megakaryozyt werden durchschnittlich 1.000 bis 3.000 Thrombozyten gebildet (Chernoff *et al.*, 1980); pro Tag werden ca. 35.000 bis 40.000 Plättchen/ $\mu\text{l}$  Blut hergestellt (Ballem *et al.*, 1992).

Die Ultrastruktur der Thrombozyten zeigt einen komplexen Aufbau, welcher auf Grund morphologischer Kriterien in 4 unterschiedliche Zonen unterteilt werden kann (Mackie *et al.*, 1988; Gawaz, 1999; George, 2000):

**I)** Die **periphere Zone** besteht aus der Zytoplasmamembran, aufgebaut aus verschiedenen Glykoproteinen, Proteinen und Mukopolysacchariden, welche die so genannte Glykokalyx der Blutplättchen bilden und in eine Phospholipiddoppelschicht eingebettet sind. In diese Zone sind die Oberflächenrezeptoren integriert, welche für die Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten vermittelt durch verschiedenste Agonisten benötigt werden.

**II)** Die **strukturelle Zone** setzt sich aus submembranös gelegenen Mikrotubuli, kurzen Aktinfilamenten und anderen Strukturproteinen der Thrombozyten zusammen, welche sowohl für die typisch diskoide Ruheform als auch für die Ausbildung der Pseudopodien nach Aktivierung der Blutplättchen benötigt werden. Die Strukturproteine bilden das thrombozytäre

Zytoskelett, welches hauptsächlich aus Aktin (ca. 10 bis 15% der Gesamtproteinmasse) und Aktinbindeproteinen, sowie aus Myosin und Tubulin besteht.

**III) Die Zone der Organellen** im Zytoplasma der Thrombozyten enthält vor allem Mitochondrien, Glykogenspeicher und 3 verschiedene Formen an Speichergranula. Die Speichergranula unterteilen sich in so genannte dichte Granula,  $\alpha$ -Granula und Lysosomen. Die dichten Granula, deren Name auf ihrer charakteristischen elektronenmikroskopischen Dichte beruht, enthalten eine Reihe von niedermolekularen Verbindungen wie z. B. ADP, ATP,  $\text{Ca}^{2+}$  und Serotonin, welche vor allem den Aggregationsvorgang der Blutplättchen fördern. Die zahlenmäßig am häufigsten vorkommenden  $\alpha$ -Granula beinhalten verschiedenste Enzyme, Zytokine, Adhäsionsproteine, sowie Wachstums- und Koagulationsfaktoren, welche für die Adhäsion, Aggregation und Chemotaxis der Plättchen, sowie für die thrombozytär vermittelte Inflammation und Gerinnung benötigt werden. Die Lysosomen der Thrombozyten ähneln den Lysosomen anderer Zellen und enthalten hydrolytische Enzyme wie z. B. Elastasen und Kollagenasen.

**IV) Das Membransystem** der Blutplättchen setzt sich aus dem mit der Plasmamembran verbundenen offenen kanikulären System und dem dichten tubulären System, dem Hauptspeicherort für freie Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ), zusammen. Freie Kalziumionen spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation des Plättchenmetabolismus, sowie der Aktivierung der Thrombozyten. Überschreitet die freie zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration einen bestimmten Schwellenwert, kommt es zur Formveränderung der Thrombozyten mit Ausbildung von Pseudopodien, sowie zur Degranulation. Das offene kanikuläre System dient vor allem der Vergrößerung der Membranoberfläche nach der Plättchenaktivierung, sowie der thrombozytären Sekretion und Endozytose (George, 2000).

Im ruhenden, nicht aktivierten Zustand weisen die Blutplättchen eine charakteristisch diskoide Form mit einer durchschnittlichen Oberfläche von  $8 \mu\text{m}^2$  auf. Werden die Thrombozyten aktiviert, führen sie einen Gestaltwandel, auch „*shape change*“ genannt, durch und ändern ihre typisch diskoide Form in die der so genannten Echinosphärozyten. Dabei bilden sie durch Ausstülpungen der Zytoplasmamembran kurze Pseudopodien und lange Filopodien aus, wodurch sich ihre Oberfläche von ursprünglich  $8 \mu\text{m}^2$  auf bis zu  $13 \mu\text{m}^2$  vergrößern kann (Morgenstern, 1997; Gawaz, 1999).

### **1.1.2. Thrombozytenfunktion und Mechanismen der Thrombozytenaktivierung**

Die Hauptfunktion der Thrombozyten besteht in der Aufrechterhaltung der Integrität des vaskulären Systems. Im physiologischen Zustand zirkuliert das Blut in einem geschlossenen Gefäßsystem, ohne dass es zum Anhalten des Blutflusses oder zum Blutaustritt in das umliegende Gewebe kommt. Eine isolierende Endothelzellschicht, welche der Thrombusbildung aktiv durch die Sekretion antithrombogener und vasoaktiver Substanzen wie z. B. dem Stickstoffmonoxid oder dem Prostazyklin entgegenwirkt, trennt hierbei den Blutstrom von den subendothelial gelegenen prothrombogenen Gefäßwandkomponenten ab. Unter diesen Bedingungen zirkulieren die Thrombozyten im inaktiven diskoiden Zustand und ohne miteinander oder mit anderen Zellen zu interagieren im peripheren Blut. Sobald es allerdings zu einer Schädigung, Verletzung oder Aktivierung des Gefäßwandendothels kommt, werden die ruhenden Plättchen aktiviert. Unter physiologischen Bedingungen, z. B. nach traumatischen Gefäßwandverletzungen wie Schnittwunden, sorgen die Thrombozyten zusammen mit löslichen Plasmakomponenten wie dem Fibrinogen durch die Bildung eines hämostatischen Pfropfes für das rasche Verschließen der Läsion und somit das Sistieren der Blutung an dieser Stelle. Patienten mit gestörter Thrombozytenfunktion oder einer zu geringen Thrombozytenzahl zeigen in der Regel schwere Blutungskomplikationen, da ihre Plättchen nicht in der Lage sind nach einer Verletzung der Gefäßwand die Integrität des vaskulären Systems aufrecht zu erhalten. In atherosklerotisch modifizierten Gefäßen, deren Integrität durch eine Schädigung oder Erosion des Plaque-Endothels, sowie durch eine Plaqueruptur gestört ist, kann es durch Hämostase-analoge Vorgänge ebenfalls zur Thrombozyten- und Gerinnungsaktivierung und darauf folgend zur Bildung eines plättchen- und fibrinreichen Thrombus kommen. Blutplättchen spielen also nicht nur unter physiologischen, sondern auch unter pathophysiologischen Bedingungen, wie beispielsweise der Bildung eines gefäßverschließenden Gerinnsels im Zuge verschiedener kardio- oder cerebrovaskulärer Erkrankungen, eine entscheidende Rolle. Der Prozess der Bildung eines hämostatischen, bzw. thrombotischen Plättchenaggregates ist hoch komplex und setzt sich abgesehen von der Aktivierung des Gerinnungssystems aus 3 eng miteinander verknüpften Phasen der Thrombozytenaktivierung, nämlich der Adhäsion, Aktivierung und Aggregation, zusammen (Ruggeri, 2002; Gachet, 2006).

#### **1.1.2.1. Adhäsion**

Nach traumatischer Verletzung der schützenden Endothelzellschicht der Gefäßwand werden subendotheliale extrazelluläre Matrixstrukturen wie z. B. verschiedene Kollagentypen, von Willebrand Faktor (VWF), Laminin, Fibronectin und Thrombospondin freigelegt, welche das initiale Abfangen („*tethering*“) und Rollen („*rolling*“), sowie die stabile Adhäsion der zirkulierenden Blutplättchen und die darauf folgende Bildung eines wundverschließenden

Thrombus vermitteln (Ruggeri, 2002; Samara *et al.*, 2003). Vor allem Matrixkomponenten wie z. B. Kollagen Typ I und Kollagen Typ III, sowie der an das Kollagen gebundene VWF scheinen hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen (Ruggeri, 2002). Zwei Membranglykoproteine der Thrombozyten, das Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , sowie das Glykoprotein VI (GPVI), interagieren direkt mit dem subendothelial exponierten Kollagen und vermitteln die Plättchenadhäsion sowie intrazelluläre Signale zur Aktivierung der Thrombozyten. Darauf folgend kommt es zur stabilen Adhäsion und Ausbreitung der Blutplättchen (Clemetson *et al.*, 2001; Nieswandt *et al.*, 2003). Auf die exakte Struktur und Funktion dieser beiden thrombozytären Kollagenrezeptoren wird in Abschnitt 1.4.2 der Einleitung genauer eingegangen. Bei Strömungsbedingungen des Blutes mit relativ hohen Scherraten von mehr als  $1.000\text{ s}^{-1}$  hängt das initiale Abfangen („*tethering*“) und transiente Anhaften („*rolling*“) der Plättchen an die subendotheliale extrazelluläre Matrix entscheidend von der Interaktion des thrombozytären Glykoprotein Iba (GPIba) mit dessen Liganden, dem VWF, ab (siehe auch Abschnitt 1.4.3 der Einleitung) (Savage *et al.*, 1996; Savage *et al.*, 1998; Ruggeri, 2002). Neben verschiedenen Kollagentypen und dem VWF, sind wie bereits erwähnt Fibronektin, Laminin und Thrombospondin als weitere Adhäsionsproteine der extrazellulären Matrix zu nennen, für welche die Thrombozyten ebenfalls spezifische Rezeptoren besitzen (Balbona *et al.*, 1992; Timpl *et al.*, 1994). Die Relevanz dieser Matrixkomponenten für die Blutplättchenaktivierung im Rahmen der Hämostase oder Thrombose ist allerdings derzeit noch nicht eindeutig geklärt (van Zanten *et al.*, 1994; Ruggeri, 2002; Samara *et al.*, 2003).

#### **1.1.2.2. Aktivierung, Gestaltwandel und Sekretion**

Typische phänotypische Manifestationen aktivierter Thrombozyten beinhalten den Plättchengestaltwandel, die Sekretion der Inhaltsstoffe der thrombozytären Granula, sowie die Veränderung der Orientierung der Membranphospholipide und die Aggregation der Blutplättchen (Ruggeri, 2002).

Der thrombozytäre Gestaltwandel („*shape change*“), welchem unter anderem eine Aktinpolymerisation mit Neuorganisation des Zytoskeletts zugrunde liegt, läuft innerhalb weniger Sekunden nach der Plättchenaktivierung durch verschiedenste Agonisten ab und dient vermutlich vor allem der Vergrößerung der Membranoberfläche, der Zentralisierung der sekretorischen Granula und der optimalen Ausbreitung der Blutplättchen auf der exponierten subendothelialen Matrix (Morgenstern, 1997; Gawaz, 1999). Die wichtigsten Stimuli der Thrombozytenaktivierung innerhalb der Adhäsionssubstrate stellen, wie in Abschnitt 1.1.2.1 angeführt, Kollagen und der VWF dar (Ruggeri, 2002). Neben den Komponenten der subendothelialen Matrix können auch andere im Bereich von Gefäßverletzungen generierte und sezernierte Agonisten wie Thrombin, welches auf der Oberfläche von Thrombozyten gebildet



wird, ADP, welches z. B. von Erythrozyten oder aus den dichten Granula aktivierter Plättchen freigesetzt wird, sowie Thromboxan A2 (TxA2) und die Lysophosphatidsäure (LPA), welche ebenfalls von stimulierten Thrombozyten sezerniert werden, sowohl eine auto-, als auch eine parakrine Wirkung entfalten und dadurch die Aktivierung und Formveränderung der Plättchen induzieren (Ruggeri, 2002). Im Falle dieser Thrombozytenstimuli wird die Blutplättchenaktivierung über an heterotrimere G-Proteine ( $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12/13}$ ) gekoppelte Membranrezeptoren ausgelöst (Simon *et al.*, 1991; Offermanns, 2000; Ruggeri, 2002).  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren, wie z. B. Thrombinrezeptoren oder der ADP-Rezeptor  $P2Y_{12}$ , inhibieren die Aktivität der Adenylatzyklase und reduzieren auf diese Weise die intrazelluläre cAMP-Konzentration, was zur Aktivierung der Plättchen nach Thrombin- oder ADP-Stimulation beiträgt (Wilhelm *et al.*, 1993; Kunapuli *et al.*, 2003a; Gachet, 2006; Offermanns, 2006).  $G_q$ -gekoppelt liegen die thrombinsensitiven Protease-aktivierten Rezeptoren-1 und -4 (PAR-1 und PAR-4), sowie der ADP-Rezeptor  $P2Y_1$  und Thromboxanrezeptoren vor (Paul *et al.*, 1999; Kunapuli *et al.*, 2003a; Murugappan *et al.*, 2004; Gachet, 2006; Offermanns, 2006).  $G_q$  stimuliert die Phospholipase C- $\beta$  und dadurch die Bildung von Inositol-3-phosphat, sowie in Folge dessen einen Anstieg der zytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration und die Phosphorylierung der Myosinleichtkette, was einen Gestaltwandel der Plättchen bewirkt (Kunapuli *et al.*, 2003a; Gachet, 2006; Offermanns, 2006). Durch den Anstieg der zytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration wird darüber hinaus die Phospholipase A2 stimuliert, welche die Freisetzung von Arachidonsäure aus den thrombozytären Membranphospholipiden katalysiert. Aus der Arachidonsäure wird anschließend Cyclooxygenase-1-abhängig TxA2 synthetisiert. TxA2 verstärkt die Thrombozytenaktivierung nicht nur über die Aktivierung von  $G_q$ , sondern auch über  $G_{13}$  (Moers *et al.*, 2003).  $G_{12/13}$ -gekoppelte Proteine interagieren unter anderem mit kleinen GTP-bindenden Proteinen der Rho-Familie, welche bei vielen Zellen an der Signalweiterleitung vom aktivierten Rezeptor zu Reorganisationsprozessen des Zytoskeletts beteiligt sind (Offermanns, 2006). Auf diese Weise kann über die Aktivierung von Rho und Rho-Kinase in den Thrombozyten eine Phosphorylierung der Myosinleichtkette initiiert werden, so dass diese mit den Aktinfilamenten interagieren kann. Die Stimulation dieses Signalweges erfolgt  $Ca^{2+}$ -unabhängig und sorgt ebenso wie die  $Ca^{2+}$ -abhängige  $G_q$ -vermittelte Signaltransduktionskaskade für Veränderungen des Aktinzytoskeletts, welche die Grundlage des thrombozytären „*shape change*“ bilden (Bauer *et al.*, 1999; Offermanns, 2000; Offermanns, 2006). Abgesehen von Thromboxanrezeptoren, können auch die Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-4, sowie die thrombozytären LPA-Rezeptoren über Aktivierung des  $G_{13}$ /Rho/Rho-Kinase-Signalwegs  $Ca^{2+}$ -unabhängig eine Formveränderung der Blutplättchen induzieren (Offermanns, 2000; Siess *et al.*, 2004; Offermanns, 2006).

Bei der  $Ca^{2+}$ - und Proteinkinase C-abhängigen Sekretion der Plättchen erfolgt zuerst die Freisetzung der Inhaltsstoffe aus den dichten Granula (z. B. ADP, ATP,  $Ca^{2+}$  und Serotonin)

und den  $\alpha$ -Granula (z. B. Adhäsionsmoleküle, Wachstums- und Gerinnungsfaktoren). Im Anschluss daran werden lysosomale Enzyme sezerniert (Siess, 1989). Die Degranulation führt zu einer zur autokrinen und parakrinen Verstärkung des thrombozytären Aktivierungsprozesses und leitet zum anderen die sekundäre irreversible Phase der Plättchenaggregation ein. Die lysosomale Sekretion hydrolytischer Plättchenenzyme bewirkt eine Auflockerung der subendothelialen Struktur und kann darüber hinaus unter pathophysiologischen Bedingungen am Umbau der Gefäßwand im Zuge atherosklerotischer Prozesse beteiligt sein (Gawaz, 1999).

Eine weitere wichtige Konsequenz der Thrombozytenaktivierung besteht in der Veränderung der Orientierung der Membranphospholipide und damit in der Initiation der prokoagulatorischen Aktivität der Plättchen. Im Zuge dieses Vorganges kommt es zur Oberflächenexposition anionischer Phospholipide, vor allem von Phosphatidylserin, welche Bindestellen für verschiedene Enzyme und Kofaktoren der Gerinnungskaskade wie dem Faktor Va, VIIIa, IXa und Xa darstellen und durch die Bildung des Prothrombinase- und Tenasekomplexes den Ablauf eines funktionellen Koagulationsapparates ermöglichen (Zwaal *et al.*, 1998; Heemskerk *et al.*, 2002). Auf diese Weise kann ein plättchen- und fibrinreicher hämostatischer oder thrombotischer Pfropf im Bereich einer Gefäßwandläsion entstehen (Ruggeri, 2002).

### **1.1.2.3. Aggregation**

Als Thrombozytenaggregation bezeichnet man den Vorgang der Kohäsion von mindestens 2 Blutplättchen. Sie stellt einen Amplifikationsprozess dar, welcher innerhalb sehr kurzer Zeit (15 sek. bis 2 min) nach Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten zur Bildung eines wund- oder gefäßverschließenden Plättchenthrombus führt (Gawaz, 1999). Das zentrale Ereignis der Aggregation ist die durch „*inside-out signaling*“ vermittelte Aktivierung, bzw. Modifikation der Ligandenaffinität des thrombozytären Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Woodside *et al.*, 2001; Ruggeri, 2002; Calderwood, 2004). Die Aktivierung dieses Integrins, welches auch Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) genannt wird, stellt sowohl die Voraussetzung für die stabile Adhäsion der Plättchen an die exponierte subendotheliale Matrix, als auch die Voraussetzung für die Thrombozytenaggregation dar. Bei beiden Vorgängen binden im Plasma enthaltene Adhäsionsmoleküle, wie vor allem Fibrinogen, VWF und Fibronectin an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Ruggeri, 2002). Fibrinogen stellt hierbei den bedeutendsten Interaktionspartner dar. Nach Aktivierung der Blutplättchen werden spezifische Fibrinogenbindestellen innerhalb des GPIIb/IIIa-Komplexes freigelegt. RGD-Motive innerhalb der  $\alpha$ -Kette des Fibrinogens interagieren  $Ca^{2+}$ -abhängig mit spezifischen Bindungsdomänen des Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Die initiale GPIIb/IIIa-Fibrinogen-Interaktion ist noch reversibel (primäre Aggregationsphase), und geht

nach der Freisetzung thrombozytärer Granula-Inhaltsstoffe in eine irreversible Bindung des Fibrinogen an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  über (sekundäre Aggregationsphase) (Gawaz, 1999; Ruggeri, 2002).

## **1.2. Plaque-Entstehung und Plaqueruptur**

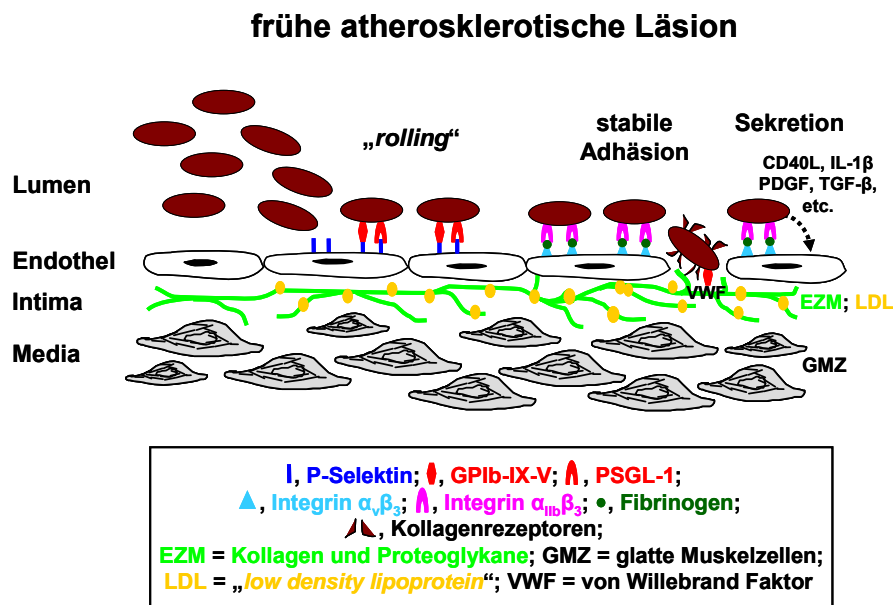
### **1.2.1. Entwicklung atherosklerotischer Läsionen**

Kardio-, bzw. cerebrovaskuläre Erkrankungen wie der akute Myokardinfarkt oder ischämische Schlaganfälle zählen zu den häufigsten Krankheits- und Todesursachen weltweit. Atherosklerose, eine progressive, systemische Erkrankung der arteriellen Gefäße, welche durch die Akkumulation von Lipiden, fibröser extrazellulärer Matrix und inflammatorischen Zellen in der Gefäßwand größerer Arterien charakterisiert ist, stellt die bedeutendste Ursache für die wachsende Bedrohung durch kardio- und cerebrovaskuläre Erkrankungen dar. Risikofaktoren wie erhöhtes Plasma-LDL-Cholesterin (Hypercholesterinämie), arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, *Diabetes mellitus*, Fettleibigkeit, Alter, Geschlecht und genetische Faktoren beschleunigen die Atherosklerose. Diese stellt die Voraussetzung für die Ruptur und Erosion arterieller Gefäße (Koronar-, Carotis- und Cerebralarterien) dar, welche zu einem fatalen Gefäßverschluss führen können. Pathophysiologisch liegen der Atherosklerose hoch komplexe Prozesse zu Grunde, welche im Wesentlichen durch inflammatorische Reaktionen in der Gefäßwand charakterisiert werden (Libby, 2002).

Bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen spielt die endotheliale Dysfunktion eine entscheidende Rolle (Lusis, 2000). Wird das Endothel durch einen oder mehrere der oben genannten Risikofaktoren und/oder durch turbulente nicht laminare Strömungsverhältnisse des Blutflusses, wie sie vor allem in Bereichen von Gefäßverzweigungen oder in Arterienbögen herrschen, geschädigt, dann erhöht sich dessen Durchlässigkeit für Lipoproteine (Gimbrone, 1999; Lusis, 2000). In Folge dessen kommt es zur Akkumulation von LDL im Subendothel. Die Retention von LDL in der Intima erfolgt hierbei über die Interaktion basischer Aminosäuren der LDL-Glykoproteinkomponente Apolipoprotein B mit negativ geladenen extrazellulären Matrixkomponenten wie beispielsweise Kollagenen oder Proteoglykanen (Versikan, Decorin, Biglykan, etc.) (Boren *et al.*, 1998; Lusis, 2000; Choy *et al.*, 2004). Das LDL wird über reaktive Sauerstoffradikale, welche von aktivierten vaskulären Zellen sowohl über den Lipoxigenase-, oder den Nicotinsäureamidadeninucleotidphosphat (NADPH)-Oxidase-Signalweg, als auch Myeloperoxidase-vermittelt gebildet werden können, zu minimal oxidiertem LDL (mm-LDL) oxidiert (Lusis, 2000; Navab *et al.*, 2004), welches anschließend eine Amplifikation der inflammatorischen Antwort in der arteriellen Gefäßwand hervorruft (Hansson, 2005). Die Endothelzellen werden durch das mm-LDL vermehrt aktiviert und exprimieren

proinflammatorische Moleküle wie Zytokine (z. B. „*monocyte chemoattractant protein-1*“ (MCP-1) und „*macrophage colony stimulating factor*“ (M-CSF)) und Adhäsionsmoleküle (z. B. P-Selektin, E-Selektin, „*vascular adhesion molecule-1*“ (VCAM-1), „*intercellular adhesion molecule-1*“ (ICAM-1) und  $\beta 3$ -Integrine) (Lusis, 2000).

Thrombozyten spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung früher atherosklerotischer Läsionen (Abb. 1.1). Verschiedene kardio- und cerebrovaskuläre Risikofaktoren führen zusammen mit der aus ihnen resultierenden verminderten Produktion endothelialer antithrombotischer und vasodilatierender Substanzen wie dem Prostazyklin und dem Stickstoffmonoxid zu einer erhöhten Aktivierbarkeit und Aggregabilität der zirkulierenden Blutplättchen (Luscher *et al.*, 1993; Huo *et al.*, 2004). Während der frühen Phase der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen können zirkulierende Thrombozyten sowohl an das aktivierte Endothel, als auch an die nach Endothelzellapoptose exponierte subendotheliale Matrix adhären (Abb. 1.1) (Gawaz *et al.*, 2005). Die Adhäsion der Plättchen an das Subendothel erfolgt über den VWF-Rezeptorkomplex GPIb-IX-V und die Kollagenrezeptoren der Thrombozyten (siehe Abschnitt 1.1.2.1, Abschnitt 1.4.2 und Abschnitt 1.4.3).



**Abb. 1.1: Rolle der Thrombozyten während der frühen Phase der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen.** CD40L = CD40-Ligand; IL-1 $\beta$  = Interleukin-1 $\beta$ ; PDGF = „platelet derived growth factor“; TGF- $\beta$  = „transforming growth factor- $\beta$ “.

Das initiale, transiente Anhaften („*rolling*“) der Thrombozyten an das aktivierte Endothel hingegen wird durch die Interaktion des thrombozytären VWF-Rezeptorkomplexes GPIb-IX-V und des thrombozytären P-Selektin Glykoproteinligand-1 (PSGL-1) mit dem endothelialen Oberflächenrezeptor P-Selektin vermittelt (Abb. 1.1) (Laszik *et al.*, 1996; Romo *et al.*, 1999;

Frenette *et al.*, 2000; Gawaz *et al.*, 2005). Im Anschluss daran erfolgt die stabile Adhäsion der Plättchen vermutlich durch die Interaktion des aktivierten thrombozytären Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  mit dem endothelialen Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , wobei Fibrinogen als Brückenmolekül zu dienen scheint (Gawaz *et al.*, 1997; Bombeli *et al.*, 1998; Massberg *et al.*, 1999; Gawaz *et al.*, 2005). Nach ihrer Adhäsion sekretieren die Thrombozyten eine Vielzahl proinflammatorischer Substanzen wie z. B. CD40-Ligand (CD40L), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), „*platelet derived growth factor*“ (PDGF) und „*transforming growth factor- $\beta$* “ (TGF- $\beta$ ) (Gawaz *et al.*, 1997; Bombeli *et al.*, 1998; Gawaz *et al.*, 2005). CD40L und IL-1 $\beta$  beispielsweise können die inflammatorischen Eigenschaften der Endothelzellen und somit das Voranschreiten der Atherogenese verstärken (Gawaz *et al.*, 2000; Gawaz *et al.*, 2005). Darüber hinaus rekrutieren die adhärenen Blutplättchen über Chemokine wie z. B. RANTES („*regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*“) oder den Plättchenfaktor-4 zirkulierende Leukozyten wie Monozyten zum aktivierten Endothel (von Hundelshausen *et al.*, 2001; von Hundelshausen *et al.*, 2005). Diese adhären über P- und E-Selektine zunächst temporär (Dong *et al.*, 1998), und haften darauf folgend über ICAM-1 und VCAM-1 stabil an der aktivierten Gefäßwand an (Collins *et al.*, 2000). Nach der Adhäsion dieser Blutzellen am Endothel führt ein Gradient des im Subendothel gebildeten Chemokins MCP-1 zur Transmigration der Monozyten über das Endothel in die frühe intimale Läsion (Hansson, 2005).

Im nächsten Schritt der Atherogenese stimuliert der Wachstumsfaktor M-CSF die Proliferation und Ausdifferenzierung der Monozyten zu Makrophagen und beeinflusst darüber hinaus verschiedene Makrophagenfunktionen wie beispielsweise die Expression von „*scavenger*“-Rezeptoren (Smith *et al.*, 1995). Reaktive Sauerstoffradikale und Enzyme, welche von proinflammatorischen Endothelzellen und Makrophagen gebildet werden, verursachen eine starke Oxidation des LDL zu ox-LDL, welches „*scavenger*“-Rezeptor-vermittelt von den Makrophagen aufgenommen wird. Dieser Prozess unterliegt keiner negativen Rückkopplung und kann somit zur ungehemmten Internalisierung von ox-LDL führen. Durch die Akkumulation von LDL-Partikeln in den Makrophagen entstehen besonders fettreiche Makrophagen, welche als Schaumzellen bezeichnet werden und typisch für die frühe atherosklerotische Läsion, den „*fatty streak*“, sind (Ross, 1999). Nach der Bildung des „*fatty streak*“, der in der Regel keine klinischen Symptome hervorruft, entwickeln sich komplexe atherosklerotische Läsionen, deren Ruptur oder Erosion kardio- und cerebrovaskuläre Erkrankungen zur Folge haben können.

In der frühen Phase der Entwicklung atherosklerotischer Plaques können außer Thrombozyten und Monozyten auch T-Lymphozyten (Mach *et al.*, 1999) und Mastzellen (Haley *et al.*, 2000) in die entstehende Läsion rekrutiert und dort aktiviert werden. Diese setzen ebenso wie aktivierte Endothelzellen und Makrophagen, bzw. Schaumzellen vermehrt proinflammatorische

Zytokine, Chemokine und matrixdegradierende Proteasen frei, welche maßgeblich an der Progression der Plaques zu komplexen Läsionen beteiligt sind. Die inflammatorische Umgebung (z. B. von Thrombozyten freigesetzter PDGF und „*transforming growth factor-β*“ (TGF-β)) aktiviert glatte Muskelzellen der Media, welche in den geschädigten Bereich der Intima einwandern, dort proliferieren und verstärkt extrazelluläre Matrixproteine wie z. B. Kollagene sezernieren. Dieser Prozess wird auch als Neointimabildung bezeichnet. Lysophosphatidsäure, welche in atherosklerotischen Geweben akkumuliert, kann ebenfalls zur Dedifferenzierung und Proliferation glatter Muskelzellen, sowie zur Proliferation von Fibroblasten führen (Tokumura *et al.*, 1994; Gennero *et al.*, 1999). Abgesehen von Entzündungsreaktionen wird die Plaqueprogression auch durch das Ansammeln und die Apoptose von Schaumzellen und die daraus resultierende Bildung eines lipidreichen und/oder nekrotischen Plaquekerns vorangetrieben.

Stabile atherosklerotische Läsionen sind dadurch gekennzeichnet, dass eine dicke fibröse Kappe, durchzogen von vielen glatten Muskelzellen in reichlich extrazellulärer Matrix, einen verhältnismäßig kleinen prothrombogenen, lipidreichen Plaquekernbereich von den zirkulierenden Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren im Blutstrom abtrennt (Ross, 1999; Libby, 2002). Im Gegensatz zu den stabilen Läsionen zeichnen sich vulnerable, rupturanfällige Plaques, auch atheromatöse Plaques genannt, durch einen großen lipidreichen und/oder nekrotischen Kernbereich, sowie eine dünne fibröse Kappe und einen hohen Anteil an inflammatorischen Zellen aus (Ross, 1999; Libby, 2002). Die inflammatorischen Zellen (vor allem Makrophagen und T-Lymphozyten) treten hauptsächlich in besonders rupturgefährdeten Arealen der Läsionen wie der Plaqueschulterregion, oder an bereits thrombosierte Stellen eines Plaques auf (Hansson *et al.*, 2006). Darüber hinaus werden auch die Integrität und Stabilität der bindegewebigen Kappe einer atheromatösen Läsion maßgeblich durch die Anwesenheit dieser Entzündungszellen beeinflusst. T-Zellen beispielsweise produzieren Interferon- $\gamma$ , welches die Proliferation und Transdifferenzierung von glatten Muskelzellen, sowie deren Produktion extrazellulärer Matrixproteine reduziert und auf diese Weise zur Destabilisierung atherosklerotischer Plaques beiträgt (Hansson *et al.*, 1989; Amento *et al.*, 1991; Hansson *et al.*, 2006). Es ist bekannt, dass die Stabilität der Plaquekappe durch die Verabreichung von Medikamenten wie Statinen deutlich erhöht werden kann, was auf eine Senkung des LDL-Levels im Plasma und die Reduktion der intimalen Inflammation zurückgeführt wurde (Libby, 2002; Libby *et al.*, 2003).

Stark vorangeschrittene atherosklerotische Läsionen neigen zur Kalzifizierung und Neovaskularisation. Das Einsprossen von kleinen Gefäßen aus der Adventitia und/oder Media kann als Quelle weiterer inflammatorischer Zellen dienen (Lusis, 2000). Die Ruptur solcher fragiler „*microvessels*“ führt zu einer Thrombose *in situ* in der Intima mit konsekutiver

Freisetzung verschiedener Mediatoren wie z. B. PDGF und TGF- $\beta$ , welche wie zuvor beschrieben die Rekrutierung von glatten Muskelzellen und die Matrixbildung stimulieren (Libby, 2002). Auf diese Weise kann eine klinisch inapparente Mikroeinblutung ebenfalls zur plötzlichen Progression eines Plaques beitragen (de Boer *et al.*, 1999).

### **1.2.2. Plaque-Erosion, Plaqueruptur und Freilegung Thrombus-aktivierender Substanzen**

Verletzungen einer atherosklerotischen Läsion durch Schädigung, bzw. Erosion des schützenden Gefäßendothels oder durch Ruptur der fibrösen Plaquekappe führen zur Freisetzung zahlreicher prothrombogener Substanzen, welche durch Kontakt mit dem Blutstrom die Bildung eines eventuell fatalen gefäßverschließenden plättchen- und fibrinreichen arteriellen Thrombus induzieren können (Virmani *et al.*, 2002).

Der Mechanismus der Plaque-Erosion wurde zum ersten Mal Anfang der 90er Jahre beschrieben (van der Wal *et al.*, 1994; Farb *et al.*, 1996) und wird für etwa 30 bis 40% aller akuten Koronarthrombosen verantwortlich gemacht. Die Plaque-Erosion ist häufig mit Nikotinabusus korreliert und tritt vor allem bei Frauen und jüngeren Männern unter 50 Jahren auf (Virmani *et al.*, 2000; Kolodgie *et al.*, 2004). Eine erosionsanfällige atherosklerotische Läsion ist in der Regel reich an glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix wie Proteoglykanen (z. B. Versikan), Hyaluronsäure und Kollagen, und weist darüber hinaus wenig inflammatorische Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten auf (Lafont, 2003; Kolodgie *et al.*, 2004). Interessanter Weise spielen Lipidakkumulationen und Entzündungsreaktionen bei den erosionsgefährdeten Plaques im Gegensatz zu den rupturgefährdeten Läsionen keine bedeutende Rolle (Lafont, 2003; Kolodgie *et al.*, 2004). Im Zuge der Plaque-Erosion gehen einzelne Endothelzellen auf Grund verminderter Haftung an der modifizierten extrazellulären Matrix verloren oder durch Apoptose zu Grunde (Mallat *et al.*, 1999; Rajavashisth *et al.*, 1999). Subendotheliale Matrixkomponenten wie z. B. Kollagen, Proteoglykane, Hyaluronsäure und VWF werden freigelegt und können im Anschluss daran die Thrombozytenadhäsion und Aktivierung, und somit die Bildung eines arteriellen Thrombus induzieren (Lafont, 2003; Kolodgie *et al.*, 2004).

Die Ruptur einer vorangeschrittenen atherosklerotischen Läsion, also das Aufbrechen der bindegewebshaltigen Plaquekappe, wurde vor ca. 30 Jahren zum ersten Mal von Davies *et al.* beschrieben und wird für 60 bis 75% aller akuten Koronarsyndrome verantwortlich gemacht (Davies *et al.*, 1984; Lafont, 2003). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit einer Plaqueruptur und somit des Auftretens akuter koronarer oder cerebrovaskulärer Syndrome stärker mit der Zusammensetzung und Vulnerabilität, als mit der

eigentlichen Größe, bzw. dem eigentlichen Stenosegrad einer atherosklerotischen Läsion korreliert (Hansson, 2005; Viles-Gonzalez *et al.*, 2006). Wie in Abschnitt 1.2.1 ausgeführt setzten sich typische rupturanfällige atherosklerotische Plaques (atheromatöse Plaques) aus einem großen lipidreichen Kernbereich bestehend aus Schaumzellen, apoptotischen und/oder nekrotischen Zellen, sowie deren Bruchstücken, umgeben von einer dünnen fibrösen Kappe aus Kollagen, Proteoglykanen und glatten Muskelzellen, zusammen (Guyton *et al.*, 1996; Katsuda *et al.*, 2003). Die Plaquekappe wird vor allem durch von aktivierten Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen gebildete matrixdegradierende Enzyme, wie z. B. den Matrixmetalloproteinasen abgebaut (Galis *et al.*, 1994; Sukhova *et al.*, 1999; Herman *et al.*, 2001; Libby, 2002). Die Kombination aus turbulentem, nicht laminarem Blutfluss, sowie der Reduktion des Zell- und Kollagengehalts der fibrösen Kappe trägt maßgeblich zur Instabilität rupturfähiger atherosklerotischer Läsionen bei (Hansson *et al.*, 2006).

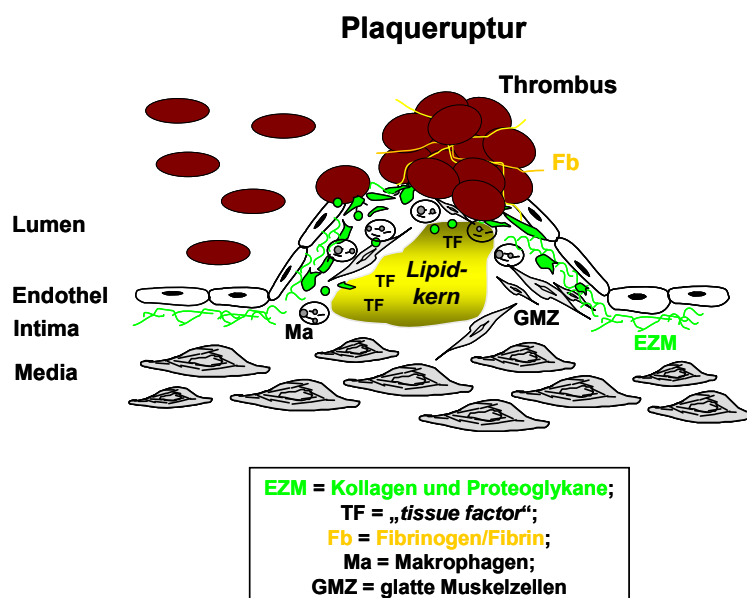
Trotz der entscheidenden Bedeutung der Plaquezusammensetzung für die Vulnerabilität einer atherosklerotischen Läsion, wird das Eintreten eines akuten ischämischen Ereignisses vom komplexen Zusammenspiel verschiedener Variablen innerhalb und außerhalb der Plaquerregion bestimmt. Als externe Einflüsse für eine Plaqueruptur sind systemische prothrombotische Faktoren wie z. B. eine erhöhte Plasma-Fibrinogenkonzentrationen und/oder eine gesteigerte Thrombozytenaggregabilität, sowie Vasospasmen, arterielle Hypertonie und/oder wie bereits zuvor erwähnt kritische Blutflussveränderungen bekannt (Fuster *et al.*, 1992b; Fuster *et al.*, 1992a; van der Wal *et al.*, 1999; Huo *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurden auch erhöhte Konzentrationen von Entzündungsmarkern im Plasma (z. B. Interleukin-6, C-reaktives Protein, CD40-Ligand und Myeloperoxidase) als frühe Zeichen für eine Plaquestabilisierung, bzw. das mögliche Auftreten atherothrombotischer Komplikationen beschrieben (Blake *et al.*, 2003; Alber *et al.*, 2005; Yeh *et al.*, 2006). Der Mechanismus der Plaqueruptur mit konsekutiver Thrombose ist folglich ein hoch komplexer Prozess, welcher in seinen molekularen und zellulären Einzelheiten bisher noch unzureichend verstanden ist.

Durch die Ruptur einer lipidreichen atherosklerotischen Läsion wird eine Vielzahl von prothrombogenen Substanzen freigesetzt, welche nach Kontakt mit dem Blutstrom die Bildung eines plättchen- und fibrinreichen Thrombus induzieren können (Abb. 1.2) (Virmani *et al.*, 2000; Lafont, 2003).

Eine wichtige prothrombogene Komponente atheromatöser Plaques stellt der „*tissue factor*“, auch Gewebethromboplastin genannt, dar (Ardissino *et al.*, 1997; Toschi *et al.*, 1997; Badimon *et al.*, 1999; Westrick *et al.*, 2001; Corti *et al.*, 2002a; Libby, 2002; Moons *et al.*, 2002; Viles-Gonzalez *et al.*, 2004). Vor allem der lipidreiche Kernbereich vulnerabler atherosklerotischer Läsionen enthält häufig einen hohen Anteil an diesem Protein (Abb. 1.2) (Wilcox *et al.*, 1989; Hatakeyama *et al.*, 1997; Toschi *et al.*, 1997; Viles-Gonzalez *et al.*, 2004; Marutsuka *et al.*, 2005). Durch die Apoptose von Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen und/oder



Lymphozyten kommt es in den lipidreichen Plaqueregionen zur Bildung phosphatidylserinreicher Mikropartikel, welche aktives Gewebethromboplastin auf ihrer Oberfläche präsentieren (Mallat *et al.*, 1999; Tedgui *et al.*, 2001). Der „*tissue factor*“ ist ein 47 kDa großes membranständiges Protein, welches von verschiedenen Zellen der Gefäßwand wie z. B. den Fibroblasten der Adventitia, den glatten Muskelzellen der Media oder von aktivierten Endothelzellen, Monozyten und glatten Muskelzellen exprimiert werden kann (Camerer *et al.*, 1996; Corti *et al.*, 2002a) und mit dem Gerinnungsfaktor VII, sowie dessen aktivierter Form, dem Faktor VIIa, der extrinsischen Koagulationskaskade interagiert (Dahlback, 2000; Morrissey, 2001). Der binäre Komplex aus „*tissue factor*“ und Faktor VIIa wird als der wichtigste Initiator der Gerinnung nach einer Gefäßwandverletzung betrachtet (Nemerson, 1995; Corti *et al.*, 2002a) und induziert über die proteolytische Aktivierung der Faktoren IX und X die Bildung von Thrombin (Banner *et al.*, 1996). Die „*tissue factor*“/Faktor VIIa-vermittelte enzymatische Aktivierung der Gerinnungsfaktoren IX und X wird durch das unter anderem auf der Oberfläche von aktivierten Blutplättchen oder thrombozytären Mikropartikeln exponierte Phosphatidylserin katalysiert (Heemskerk *et al.*, 2002; Morel *et al.*, 2006). Man geht bisher davon aus, dass der „*tissue factor*“ eine der bedeutendsten prothrombogenen Komponenten atherosklerotischer Plaques darstellt. Das Gewebethromboplastin aktiviert über die Bildung von Thrombin sowohl die Fibrinbildung als auch die Blutplättchen, und induziert dadurch die Entstehung eines fibrin- und plättchenreichen Thrombus (Ardissino *et al.*, 1997; Toschi *et al.*, 1997; Badimon *et al.*, 1999; Libby, 2002; Moons *et al.*, 2002).



**Abb. 1.2: Rolle der Thrombozyten bei der Entstehung eines gefäßverschließenden Thrombus nach Plaqueruptur.**

Abgesehen vom „*tissue factor*“, welcher die extrinsische Gerinnungskaskade aktiviert, wurden auch verschiedene thrombozytenaktivierende Substanzen in atherosklerotischen Plaques beschrieben (Tab. 1.1). Die Relevanz dieser Plaquekomponenten für die Thrombusaktivierung *in vivo* ist jedoch derzeit weitgehend ungeklärt.

**Tab. 1.1: Übersicht über thrombozytenaktivierende Komponenten atherosklerotischer Läsionen.**

thrombozytenaktivierende Plaquekomponenten	Referenzen
„stromal cell derived factor-1“ (SDF-1)	Abi-Youes <i>et al.</i> , 2000
Cholesterol-3-sulfat	Drayer <i>et al.</i> , 1967; Merten <i>et al.</i> , 2001
Lysophosphatidsäure (LPA)	Siess <i>et al.</i> , 1999; Rother <i>et al.</i> , 2003
Thrombospondin-1 (TSP-1)	Wight <i>et al.</i> , 1985; van Zanten <i>et al.</i> , 1994
Fibronektin	Smith <i>et al.</i> , 1986; van Zanten <i>et al.</i> , 1994
Vitronektin	Guettier <i>et al.</i> , 1989; van Zanten <i>et al.</i> , 1994
Fibrinogen/Fibrin	Bini <i>et al.</i> , 1989; van Zanten <i>et al.</i> , 1994
Kollagen	van Zanten <i>et al.</i> , 1994; Barnes <i>et al.</i> , 1999
von Willebrand Faktor (VWF)	de Meyer <i>et al.</i> , 1999

Das CXC-Chemokin SDF-1 („*stromal cell derived factor-1*“) beispielsweise, welches verstärkt in den Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen atherosklerotischer Läsionen exprimiert wird, wurde als eine dieser thrombozytenaktivierenden Plaque-substanzen beschrieben (Abi-Younes *et al.*, 2000). Dieses Chemokin, welches die Plättchen über die Interaktion mit deren Oberflächenrezeptor CXCR-4 aktiviert, ist allerdings nur ein relativ schwacher Thrombozytenstimulus (Abi-Younes *et al.*, 2000), und kann nur bei gleichzeitiger Anwesenheit niedriger Konzentrationen von ADP oder Thrombin eine Aggregation der Blutplättchen induzieren (Gear *et al.*, 2003).

Als weitere prothrombogene Komponente atherosklerotischer Läsionen wurde das Cholesterol-3-sulfat beschrieben, welches vor allem im lipidreichen Kernbereich akkumuliert (Drayer *et al.*, 1967; Merten *et al.*, 2001). Diese Sterolverbindung ist in der Lage, mit Thrombozyten zu interagieren, wobei sowohl dessen Cholesterinanteil, als auch dessen Sulfatgruppe an der Interaktion beteiligt sind (Blache *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass das Cholesterol-3-sulfat, ein *per se* relativ schwacher Plättchenagonist, sowohl in der Lage ist, die Thrombozytenadhäsion zu stimulieren (Merten *et al.*, 2001), als auch die durch ADP oder Thrombin hervorgerufene Aggregation und Sekretion der Blutplättchen zu verstärken (Blache *et al.*, 1995).

Acyl- und alkyl-Derivate der Lysophosphatidsäure (LPA), welche einen durch oxidative oder enzymatische Modifikation gebildeten Bestandteil des mild-oxidierten LDL darstellen und

darüber hinaus auch von aktivierten Thrombozyten gebildet und freigesetzt werden, akkumulieren ebenfalls im lipidreichen Kernbereich vorangeschrittener atherosklerotischer Läsionen und sind in der Lage, Blutplättchen zu aktivieren (Siess *et al.*, 1999; Siess, 2002; Rother *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass das im lipidreichen Kern atherosklerotischer Plaques vorhandene LPA über G-Protein-gekoppelte LPA-Rezeptoren und einen Rho/Rho-Kinase-Signaltransduktionsweg direkt einen raschen Gestaltwandel isolierter gewaschener Thrombozyten stimuliert (Siess *et al.*, 1999; Rother *et al.*, 2003). Zusätzlich ist auch bekannt, dass relativ niedrige LPA Konzentrationen (geringfügig höhere Konzentrationen als die physiologische Plasma-LPA-Konzentration) in der Lage sind, die Sphärisierung und Aggregation von Plättchen im Blut zu induzieren (Haseruck *et al.*, 2004). LPA scheint den thrombozytären „*shape change*“ hierbei direkt zu vermitteln. Die durch LPA hervorgerufene Aggregation der Plättchen im Blut ist abhängig von extrazellulärem ADP und dessen Interaktion mit den thrombozytären ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> (Haseruck *et al.*, 2004). Die Lysophosphatidsäure könnte dem zu Folge an der Thrombusbildung nach Plaqueruptur beteiligt sein, wobei eine direkte Aktivierung der Thrombozyten im Blut durch LPA im atherosklerotischen Plaquematerial bisher noch nicht gezeigt werden konnte.

Abgesehen von den bisher genannten prothrombogenen Substanzen werden während des Aufbrechens atherosklerotischer Läsionen auch fibröse Plaquekomponenten wie beispielsweise Kollagen freigelegt (siehe Abschnitt 1.4) (van Zanten *et al.*, 1994; Barnes *et al.*, 1999). Zirkulierender, globulärer VWF kann sich unter erhöhter Scherbelastung, wie sie vor allem in kleinen arteriellen oder atherosklerotisch modifizierten Gefäßen vorliegt, in die Länge strecken (Siedlecki *et al.*, 1996), an das nach einer Gefäßverletzung freigelegte Kollagen anlagern, seine Konformation ändern und sich zu langen Polymeren verketteten (Zimmerman *et al.*, 1986; Dent *et al.*, 1990; Ruggeri, 2003). Die Bindung des VWF an fibrilläres Kollagen wie z. B. Kollagen Typ I und Kollagen Typ III erfolgt hierbei vornehmlich über dessen A3-Domäne, wohingegen die Interaktion mit dem perlschnurartigen Kollagen Typ VI vor allem über die A1-Domäne des VWF vermittelt wird (Mazzucato *et al.*, 1999). Darüber hinaus kann der VWF auch endogen im Plaque immobilisiert vorkommen, wobei er hierbei hauptsächlich von den aktivierten Endothelzellen der Gefäßwand synthetisiert wird, wie in einer Arbeit von De Meyer *et al.* mit Kaninchen, welche einer Cholesterin-Diät unterzogen wurden, gezeigt wurde (De Meyer *et al.*, 1999). Dieser subendothelial gelegene VWF könnte möglicherweise ebenfalls eine Rolle bei der Thrombozytenadhäsion nach Plaqueruptur spielen (De Meyer *et al.*, 1999).

Thrombospondin-1 (TSP-1), ein Protein, welches mit verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix interagiert und aus den  $\alpha$ -Granula aktivierter Thrombozyten (Kehrel *et al.*, 1996), sowie von aktivierten Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Monozyten freigesetzt wird (Bornstein, 2001), könnte ebenfalls eine prothrombogene Plaquekomponente darstellen, da dieses Protein in atherosklerotischen Läsionen akkumuliert (Wight *et al.*, 1985;

van Zanten *et al.*, 1994). TSP-1 interagiert  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig mit verschiedenen thrombozytären Rezeptoren, wie dem Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ , dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , dem Integrin-assoziierten Protein, dem CD36 und dem GPIIb $\alpha$ , vermittelt die Adhäsion der Blutplättchen bei hohen arteriellen Scherraten und wird für die sekundäre, sekretionsabhängige Phase der Thrombozytenaggregation benötigt (Bornstein, 2001; Jurk *et al.*, 2003). Studien von van Zanten *et al.* haben allerdings gezeigt, dass TSP-1 keine maßgebliche Rolle bei der Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung nach Plaqueruptur zu spielen scheint, denn die Plättchen aus Citratblut, welches keine physiologischen Konzentrationen an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  enthält, und die Thrombozyten aus Heparin-antikoagulierte Blut, in welchem physiologische Konzentrationen an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  vorhanden sind, waren im gleichen Maße in der Lage, an Plaque-beschichtete Oberflächen zu adhären (van Zanten *et al.*, 1994).

Vitronektin kommt ebenfalls in erhöhten Konzentrationen in atherosklerotischen Läsionen vor (Guettier *et al.*, 1989; van Zanten *et al.*, 1994). Dieses extrazelluläre Matrixprotein interagiert vornehmlich über das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  mit den Blutplättchen und kann deren Adhäsion vermitteln (Bennett *et al.*, 1997). Die Bedeutung des Vitronektin für die Thrombusbildung nach der Ruptur einer vulnerablen atherosklerotischen Läsion ist derzeit allerdings noch nicht geklärt.

Fibronektin, eine weitere Komponente der extrazellulären Matrix, konnte im Vergleich zur gesunden arteriellen Gefäßwand ebenfalls in gesteigerten Konzentrationen in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden (Smith *et al.*, 1986; van Zanten *et al.*, 1994). Dieses Protein ist in der Lage, vornehmlich über das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  und das Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  mit den Thrombozyten zu interagieren und deren Adhäsion an die subendotheliale Matrix zu vermitteln. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das lösliche Fibronektin im Plasma eine wichtige Rolle bei der Stabilisation von Plättchenaggregaten nach einer Gefäßwandverletzung spielt (Cho *et al.*, 2006). In der zitierten Studie von van Zanten *et al.* konnte allerdings gezeigt werden, dass weder das Plaque-Fibronektin, noch das Plasma-Fibronektin maßgeblich an der Plaque-induzierten Thrombozytenadhäsion beteiligt ist (van Zanten *et al.*, 1994).

Auch die Proteine Fibrinogen und Fibrin, welche mit dem thrombozytären Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  interagieren können und unter anderem eine entscheidende Bedeutung für die Plättchenadhäsion, Ausbreitung und Aggregation, sowie auch für die Gerinnung besitzen (Mosesson, 2005), konnten verglichen mit normaler Intima in erhöhten Konzentrationen in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden (Bini *et al.*, 1989; van Zanten *et al.*, 1994). Das im Plaque vorkommende Fibrinogen, bzw. Fibrin scheint allerdings keine entscheidende Rolle bei der Initiation der Plaque-stimulierten Thrombusbildung zu spielen, denn Plättchen, deren GPIIb/IIIa-Rezeptor mit Hilfe des synthetischen Peptids RGDW blockiert wurde, aggregieren zwar nicht mehr auf Plaque-Oberflächen, sind jedoch durchaus in der Lage an diese zu adhären und somit durch die atherosklerotischen Läsionen aktiviert zu werden (van Zanten *et al.*, 1994).

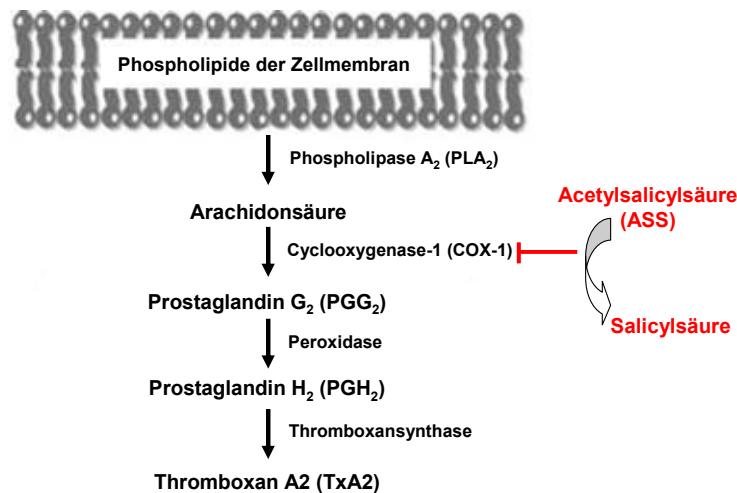
### **1.3. Antithrombozytäre Substanzen**

Die Hemmung der Thrombozytenfunktion mittels antithrombozytärer Substanzen hat sich als eine der wichtigsten Strategien zur Prophylaxe und Therapie thrombotischer Komplikationen bei Patienten mit kardio- und cerebrovaskulären Erkrankungen etabliert (Ross, 1999; Kariyazono *et al.*, 2004; Mayr *et al.*, 2006). Acetylsalicylsäure (Aspirin<sup>®</sup>, ASS) stellt die derzeit am häufigsten eingesetzte und am genauesten untersuchte antithrombozytäre Substanz dar, und gilt als „Goldstandard“ der Plättchenfunktionsinhibitoren (Phillips *et al.*, 2005). Da die Blutplättchenaktivierung jedoch über unterschiedliche Signalwege abläuft, welche nicht alle durch ASS beeinflusst werden können, wurden zusätzliche antithrombozytäre Substanzen entwickelt. Derzeit sind 3 Hauptklassen von Thrombozytenfunktionshemmern in klinischem Gebrauch, welche entweder intrazelluläre Thrombozytenaktivierungsschritte oder aber spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Blutplättchen blockieren: (a) Acetylsalicylsäure, (b) ADP-Rezeptor-Antagonisten und (c) Fibrinogen-Rezeptor-Antagonisten.

#### **1.3.1. Acetylsalicylsäure (Aspirin<sup>®</sup>, ASS) und andere Cyclooxygenase-Inhibitoren**

Die thrombozyteninhibierende Wirkung von Aspirin<sup>®</sup> wurde erstmals 1953 von L. L. Craven beschrieben (Craven, 1953), wobei der exakte Mechanismus der Blutplättchenhemmung durch dieses antithrombozytäre Medikament erst ca. 20 Jahre später aufgeklärt wurde (Collier *et al.*, 1971; Smith *et al.*, 1971; Vane, 1971). ASS hemmt selektiv und irreversibel die Aktivität der thrombozytären Cyclooxygenase-1 (COX-1), ein Enzym, welches die Biosynthese von Prostanoiden aus Arachidonsäure katalysiert (Abb. 1.3). Die Blockade der COX-1 erfolgt hierbei durch die irreversible Acetylierung der Hydroxylgruppe eines Serinrestes (Serin 530) im katalytischen Zentrum des Enzyms, welcher sich 70 Aminosäuren vom C-terminalen Ende des Enzyms entfernt befindet, und hält daher für die gesamte Lebensdauer der Thrombozyten an (Roth *et al.*, 1975; Patrono, 1994; Vane *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 2005). Unter physiologischen Bedingungen katalysiert die thrombozytäre Cyclooxygenase-1 zunächst die Bildung des instabilen zyklischen Endoperoxids Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) aus der zuvor aus den Membranphospholipiden freigesetzten Arachidonsäure (Abb. 1.3). An diese COX-1-vermittelte Reaktion schließt sich eine Peroxidase-reaktion an, in welcher das Prostaglandinendoperoxid PGG<sub>2</sub> über eine Peroxidase zum entsprechenden Alkohol Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) reduziert wird. Aus PGH<sub>2</sub> wird anschließend über die Thromboxansynthase hauptsächlich TxA<sub>2</sub> gebildet, welches eine wichtige Rolle bei der Amplifikation der Thrombozytenaggregation spielt und vasokonstriktorisch wirkt. Der instabile Vorläufer des Thromboxan A<sub>2</sub> PGH<sub>2</sub>, kann ebenso wie das TxA<sub>2</sub> selbst proaggregatorisch und vasokonstriktorisch wirken. Beide binden und aktivieren die gleichen Thromboxanrezeptoren (Dogné *et al.*, 2000; Dogné *et al.*, 2006). Klinische Studien mit spezifischen Inhibitoren der Thromboxansynthase haben gezeigt, dass diese Substanzen nicht so effektiv antithrombotisch wirken wie die Acetylsalicylsäure selbst,

sondern im Gegenteil eher prothrombotische Effekte hervorrufen, was zum einen auf die unvollständige Blockade der Thromboxansynthese und zum anderen auf die Akkumulation des TxA<sub>2</sub>-Vorläufers PGH<sub>2</sub> zurückgeführt wurde (Dogné *et al.*, 2000; Dogné *et al.*, 2006).



**Abb. 1.3: Cyclooxygenase-1-abhängige Thromboxan A<sub>2</sub>-Bildung der Blutplättchen und Modell des antithrombozytären Wirkmechanismus der Acetylsalicylsäure.**

Bereits nach einmaliger Einnahme von Aspirin<sup>®</sup> kommt es zu einer signifikanten Verlängerung der Blutungszeit, zur Inhibition, bzw. Reduktion der durch Arachidonsäure oder Kollagen induzierten Thrombozytenaggregation, sowie zur verminderten Freisetzungsreaktion der Plättchen mit Hemmung der zweiten Aggregationsphase nach ADP- oder Adrenalinstimulation. Obwohl ASS die Sekretion und Aggregation der Thrombozyten effektiv reduzieren kann, stellt es einen relativ schwachen Thrombozytenfunktionshemmer dar (Rinder *et al.*, 1993; Chronos *et al.*, 1994; Maalej *et al.*, 1996; Folts *et al.*, 1999). Bei starker Aktivierung der Thrombozyten wie z. B. durch hohe Konzentrationen an Thrombin, TRAP-6 („*thrombin receptor activating peptide-6*“) oder Kollagen wird die Blutplättchenaggregation und Sekretion durch Aspirin<sup>®</sup> nur relativ geringfügig beeinflusst (Motz, 1994; Toth *et al.*, 2006).

Zahlreiche groß angelegte klinische Studien wurden durchgeführt, welche positive Wirkungen von Aspirin<sup>®</sup> in der Primärprophylaxe und als Therapeutikum in akuten Situationen (z. B. akuter Myokardinfarkt, instabile *Angina pectoris* und ischämischer Schlaganfall), sowie als Therapeutikum in der Sekundärprävention von Reinfarkten und ischämischen Schlaganfällen belegten („*ISIS-2-study*“, 1988; „*Physicians-health-study*“, 1988; „*Antiplatelet-Trialists-Collaboration-meta-analysis*“, 1994; Baigent *et al.*, 1998). Neuere Studien haben allerdings gezeigt, dass Aspirin<sup>®</sup> die Thrombozytenaktivierung nur in etwa bei einem viertel aller Hoch-Risiko-Patienten effektiv inhibiert und einen relativ großen Anteil der kardio- und

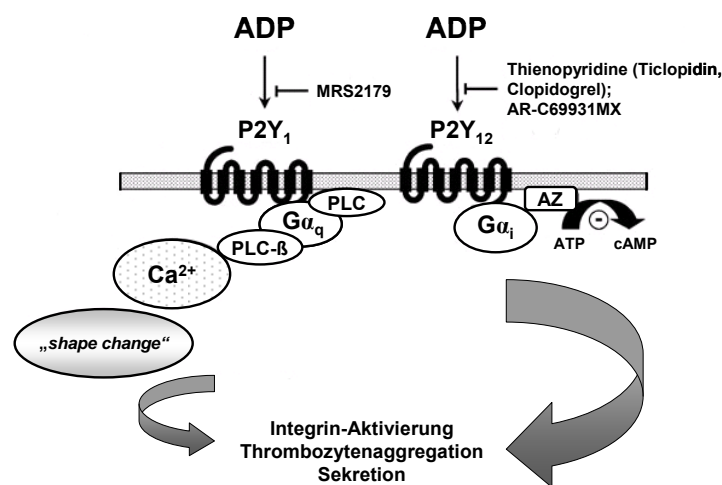
cerebrovaskulären thrombotischen Ereignisse nicht verhindern kann. Dieses Phänomen wird als „Aspirin<sup>®</sup>-Resistenz“ bezeichnet (Matchar *et al.*, 1994; Hanson *et al.*, 1998; Eikelboom *et al.*, 2004). Der Begriff der „Aspirin<sup>®</sup>-Resistenz“ ist allerdings nicht scharf definiert, sondern umfasst sowohl die fehlende Wirkung der Acetylsalicylsäure auf Grund einer reduzierten Bioverfügbarkeit dieser antithrombozytären Substanz, auf Grund alternativer COX-1-unabhängiger Signalwege der Blutplättchenaktivierung, auf Grund eines gesteigerten Thrombozytenumsatzes und/oder auf Grund interindividueller Variabilitäten, bzw. genetischer Polymorphismen (Hankey *et al.*, 2004). Die Verabreichung von Aspirin<sup>®</sup> ist darüber hinaus auch mit Nebenwirkungen wie z. B. gastrointestinalen Blutungen verbunden, welche unter Umständen lebensbedrohlich sein können (Patrono, 1994). Aus diesem Grund wird nach weiteren, wirksameren thrombozytenhemmenden Pharmaka, welche weniger oder gar keine Nebenwirkungen besitzen, gesucht.

Abgesehen von der Acetylsalicylsäure hemmen auch nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente (NSAIDs = „*nonsteroidal antiinflammatory drugs*“) wie beispielsweise Ibuprofen, Indomethacin oder Phenylbutazon die thrombozytäre Cyclooxygenase und somit die Synthese von TxA<sub>2</sub>. Im Gegensatz zu Aspirin<sup>®</sup> ist deren Inhibition jedoch kompetitiv und reversibel, und der thrombozytenfunktionshemmende Effekt nach einmaliger Einnahme nur kurzfristig nachweisbar. Darüber hinaus werden die protektiven Effekte der NSAIDs zur Prävention und Therapie kardiovaskulärer Krankheiten kontrovers diskutiert (Garcia Rodriguez *et al.*, 2000; Ray *et al.*, 2002). In einer epidemiologischen Studie konnte z. B. gezeigt werden, dass Ibuprofen bei gleichzeitiger Verabreichung von Aspirin<sup>®</sup> den kardioprotektiven Effekt der Acetylsalicylsäure abschwächt (MacDonald *et al.*, 2003).

### **1.3.2. ADP-Rezeptor-Antagonisten**

ADP stellt einen bedeutenden Thrombozytenagonisten dar, welcher die Blutplättchen über die Bindung spezifischer purinerner Membranrezeptoren (P2Y-Rezeptoren) aktiviert. Zwei unterschiedliche Subtypen von P2Y-Rezeptoren wurden bisher auf der Oberfläche von Thrombozyten beschrieben (Abb. 1.4) (Kunapuli *et al.*, 2003b; Gachet, 2006). P2Y<sub>1</sub>, ein Gα<sub>q</sub>-gekoppelter Rezeptor, welcher die ADP-stimulierte Freisetzung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup>, den Gestaltwandel, sowie eine transiente Aggregation der Blutplättchen vermittelt (Jin *et al.*, 1998; Gachet, 2006), und darüber hinaus an der Kollagen-induzierten Thrombozytenaktivierung und Aggregation beteiligt ist (Leon *et al.*, 1999; Mangin *et al.*, 2004); P2Y<sub>12</sub>, ein Gα<sub>i2</sub>-gekoppelter Rezeptor, welcher vor allem für die ADP-abhängige Inhibition der Adenylatzyklase, sowie für die Potenzierung der Thrombozytenaggregation und Sekretion induziert durch verschiedene Stimuli wie z. B. ADP, Kollagen, Thrombin und TxA<sub>2</sub> verantwortlich ist (Kunapuli *et al.*, 2003b; Gachet, 2006).

Während der Sekretion wird ADP in großen Mengen aus den Speichergranula der Thrombozyten, sowie in Bereichen eines Gewebeschadens von anderen Blutzellen wie den Erythrozyten freigesetzt. Im Bereich eines Gewebeschadens ist die Aktivität der endothelialen Ecto-ADPasen, welche normalerweise einen raschen Abbau des extrazellulären ADP bewirken, verringert, was zur lokalen ADP-Akkumulation und dadurch zur verstärkten Thrombusbildung führen kann. Verschiedene experimentelle und klinische Studien belegen besonders bei hohen Strömungsbedingungen, sowie bei gestörter Endothelfunktion die Bedeutung der ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung für die arterielle Thrombose (Coukell *et al.*, 1997).



**Abb. 1.4: Modell thrombozytärer ADP-Rezeptoren und deren Inhibition durch selektive ADP-Rezeptor-Antagonisten (modifiziert nach Gachet, 2006).** P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> stellen die essentiellen Rezeptoren für die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation dar. Der Gα<sub>q</sub>-gekoppelte P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor ist für die intrazelluläre Mobilisation von Ca<sup>2+</sup>, sowie den Thrombozyten-„shape change“ und den Beginn der Plättchenaggregation verantwortlich. Der Gα<sub>i</sub>-gebundene P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor komplimentiert die ADP-induzierte Aggregation und vermittelt die ADP-stimulierte Inhibition der Adenylatzyklase (AZ), sowie über verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege die Potenzierung der durch andere Thrombozytenstimuli wie z. B. Kollagen verursachte Plättchenaggregation und Sekretion. P2Y<sub>12</sub> ist das Zielmolekül selektiver antithrombotischer Substanzen wie den Thienopyridinen oder AR-C69931MX, während P2Y<sub>1</sub> das Zielmolekül neuer Plättchenfunktionshemmer wie beispielsweise dem MRS2179 darstellt. PLC = Phospholipase C.

Die bisher am meisten eingesetzten und am besten charakterisierten ADP-Rezeptor-Antagonisten sind als P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten die so genannten Thienopyridine (Abb. 1.4). Zu dieser Klasse antithrombotischer Substanzen gehören die Medikamente Ticlopidin (Thrombodine<sup>®</sup>) und Clopidogrel (Plavix<sup>®</sup>) (Phillips *et al.*, 2005). Thienopyridine sind so genannte „pro-drugs“ und werden durch hepatische Metabolisierung (Cytochrom P 450-abhängig) in aktive Substanzen umgewandelt. Der aktive Metabolit von Ticlopidin ist UR-4501 (Yoneda *et al.*, 2004), der aktive Metabolit von Clopidogrel ein reaktives Thiolderivat (Pereillo *et al.*, 2002). Die beiden aktiven Metabolite der Thienopyridine inaktivieren die P2Y<sub>12</sub>-Rezeptoren auf der Blutplättchenoberfläche irreversibel durch die Bildung einer Disulfidbrücke



zwischen der reaktiven Thiolgruppe des aktiven Metaboliten und zwei extrazellulären Cysteinresten (Cystein 17 und Cystein 270) des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors (Cattaneo, 2007). Auf diese Weise wird die ADP/P2Y<sub>12</sub>-vermittelte Senkung des cAMP-Spiegels aufgehoben (Cattaneo, 2007). Ebenso wie andere Thrombozytenfunktionshemmer verringern Thienopyridine indirekt durch die Hemmung der Fibrinogenrezeptoraktivierung die Bindung von plasmatischem Fibrinogen an dessen thrombozytären Rezeptor, dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , und somit die Bildung eines Thrombozytenaggregates (Kunapuli *et al.*, 2003a; Gachet, 2006). Das erste Thienopyridine, das Ticlopidin, wurde zunächst vor allem als eine Alternative zu Aspirin<sup>®</sup> für die Prävention von cerebralen ischämischen Thrombosen eingeführt (Hass *et al.*, 1989). Auf Grund des seltenen Auftretens schwerwiegender Nebenwirkungen wie z. B. Neutropenie oder thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura (Noble *et al.*, 1996) wurde Ticlopidin allerdings nicht länger verabreicht und durch das später entwickelte Clopidogrel ersetzt (Bertrand *et al.*, 2000).

In einer Vielzahl groß angelegter klinischer Studien erwies sich Clopidogrel als potente antithrombozytäre Substanz zur sekundären Prävention von ischämischen Thrombosen bei Patienten mit vorangegangenen cerebrovaskulären, koronaren oder peripheren arteriellen akuten klinischen Ereignissen, sowie nach dem Einsetzen einer koronaren endoluminalen Gefäßprothese („Stent“) (Gachet, 2006). Die CAPRIE-Studie hat darüber hinaus gezeigt, dass die Effektivität und Tolerierbarkeit dieses Plättchenfunktionshemmers mit der von Aspirin<sup>®</sup> vergleichbar, bzw. sogar höher war und etablierte Clopidogrel als ein zur Acetylsalicylsäure alternatives Medikament zur sekundären Prävention eines breiten Spektrums vaskulärer Erkrankungen („CAPRIE-study“, 1996). In der CURE-Studie, in welcher der Effekt der kombinierten Gabe von Clopidogrel und Aspirin<sup>®</sup> bei Patienten mit instabiler *Angina pectoris* und mit akutem Myokardinfarkt ohne ST-Segment Erhöhung untersucht wurde, wurde ein verbesserter antithrombozytärer Effekt der zusätzlichen Gabe von Clopidogrel gegenüber der alleinigen Verabreichung von Aspirin<sup>®</sup> beobachtet (Yusuf *et al.*, 2001). Im Gegensatz zur CURE-Studie konnte in einer relativ neuen klinischen Untersuchung jedoch gezeigt werden, dass die gleichzeitige Verabreichung von ASS und Clopidogrel das Auftreten kardio- und cerebrovaskulärer Thrombosen nicht signifikant gegenüber der alleinigen Gabe von Aspirin<sup>®</sup> verringert (Bhatt *et al.*, 2006). Ähnlich zur „Aspirin<sup>®</sup>-Resistenz“ wurde auch bei der Verabreichung von Clopidogrel eine interindividuelle Variabilität beobachtet („Clopidogrel-Resistenz“), welche vermutlich auf eine ineffiziente hepatische Bildung des aktiven P2Y<sub>12</sub>-blockierenden Metaboliten zurückgeführt werden kann (Cattaneo, 2004).

Kürzlich wurde ein weiterer P2Y<sub>12</sub>-Rezeptorblocker, das so genannte AR-C69931MX (Cangrelor<sup>®</sup>) beschrieben, welcher im Gegensatz zu den Thienopyridinen nicht oral verabreicht wird, sondern nach intravenöser Gabe sofort wirksam ist. Dieser Plättchenfunktionshemmer erwies sich als eine sehr potente und selektive antithrombozytäre Substanz (Ingall *et al.*, 1999;

van Giezen *et al.*, 2005). AR-C69931MX bindet an den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor im Unterschied zu den Thienopyridinen kompetitiv und reversibel, und inhibiert auf diese Weise effektiv die durch ADP und andere Blutplättchenstimuli induzierte Aggregation, Sekretion, P-Selektin Expression und prokoagulatorische Aktivität der Thrombozyten (Storey *et al.*, 2001). Erste Ergebnisse noch laufender klinischer Studien bezüglich der Wirkung dieses Thrombozytenfunktionshemmers weisen darauf hin, dass AR-C69931MX gut tolerierbar ist und die ADP-stimulierte thrombozytäre Aggregation, P-Selektin Expression und Plättchen-Monozyten-Interaktion effektiv blockiert (Storey *et al.*, 2001; Storey *et al.*, 2002).

Neben dem ADP-Rezeptor P2Y<sub>12</sub> stellt auch der ADP-Rezeptor P2Y<sub>1</sub> ein interessantes Zielmolekül antithrombozytärer Substanzen dar. Verschiedene kompetitive P2Y<sub>1</sub>-Antagonisten wie beispielsweise MRS2179 wurden entwickelt und deren Effekte auf die ADP-induzierte Blutplättchenaktivierung *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell untersucht (Kunapuli *et al.*, 2003a; Gachet, 2006). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass MRS2179 sowohl den ADP-induzierten Blutplättchen-„*shape change*“, als auch die darauf folgende Aggregation reduziert. Darüber hinaus weisen Versuche mit Thrombozyten von P2Y<sub>1</sub>-defizienten Mäusen oder von Mäusen, welchen MRS2179 verabreicht wurde, keine „*tissue factor*“- und Thrombin-stimulierbare Aggregation mehr auf (Leon *et al.*, 2001). Weder die Deletion noch die pharmakologische Blockade von P2Y<sub>1</sub> führte zu einer starken Verlängerung der Blutungszeit, was einen deutlichen Vorteil der Inhibition dieses Rezeptors gegenüber der Hemmung von P2Y<sub>12</sub> darstellt (Leon *et al.*, 1999). Die antithrombotische Wirkung von P2Y<sub>1</sub>-Antagonisten wurde bisher allerdings noch nicht in klinischen Studien analysiert, so dass zum jetzigen Zeitpunkt keine eindeutige Aussage über die präventiven Eigenschaften dieser Thrombozytenfunktionshemmer getroffen werden kann.

### **1.3.3. GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten**

GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten wurden entwickelt, um die Fibrinogenbindung des Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  auf der Oberfläche von Thrombozyten zu hemmen. Der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa stellt auf Grund verschiedener Tatsachen ein attraktives Angriffsziel antithrombozytärer Substanzen dar. Zum einen ist das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ein ausschließlich auf der Oberfläche von Blutplättchen vorkommendes Membranglykoprotein und zum anderen ist dieser Rezeptor ein wichtiger Bestandteil des finalen Signalweges der Thrombozytenaktivierung induziert durch viele verschiedene Blutplättchenagonisten. Darüber hinaus vermittelt GPIIb/IIIa die Thrombozytenausbreitung und Aggregation und ist daher essentiell für die Bildung eines wund- oder gefäßverschließenden Thrombus (Clemetson, 1995). Zusätzlich wird das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , welches neben Fibrinogen auch andere Liganden wie z. B. Fibronectin, VWF, Vitronectin und CD40L binden kann, für eine Reihe aggregationsunabhängiger Thrombozytenfunktionen wie

der Verstärkung der Koagulation, der Fibrinolyse, der vaskulären Zellproliferation und für die Vermittlung inflammatorischer Reaktionen benötigt (Phillips *et al.*, 2005). Drei unterschiedliche Klassen von GPIIb/IIIa-Antagonisten werden derzeit unterschieden: Fab-Fragmente eines monoklonalen anti-GPIIb/IIIa-Antikörpers (Abciximab), zyklische GPIIb/IIIa-blockierende Peptide (Eptifibatid) und synthetische GPIIb/IIIa-hemmende Peptidomimetika (Tirofiban). Während das Wirkprinzip, nämlich die Blockade der Ligandenbindung des Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Blockade der RGD-Bindungsdomäne auf GPIIIa ( $\beta_3$ ), bzw. der KQAGDV =  $\gamma$ -Ketten-Peptid-Bindungsdomäne auf GPIIb ( $\alpha_{IIb}$ )) (Quinn *et al.*, 2003), dieser Plättchenfunktionshemmer vergleichbar ist, unterschieden sich die strukturellen und pharmakologischen Eigenschaften, sowie die Spezifität der einzelnen Medikamente erheblich (Coller, 1995; Mousa *et al.*, 1996; Madan *et al.*, 1998).

Abciximab (ReoPro<sup>®</sup>) ist das humanisierte chimäre Fab-Fragment eines monoklonalen murinen anti-GPIIb/IIIa-Antikörpers, welches die durch verschiedene Agonisten hervorgerufene Bindung von Fibrinogen an seinen Rezeptor und die darauf folgende Aggregation dosisabhängig blockiert (Bennett, 2001). Die antithrombozytäre Wirkung von Abciximab wurde in verschiedenen klinischen Studien untersucht, die gezeigt haben, dass dieser ausschließlich intravenös verabreichbare Thrombozytenfunktionshemmer vor allem bei Hoch-Risiko-Patienten, bei denen eine percutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) durchgeführt wird, sowie bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom ohne persistierende ST-Segment-Erhöhung effektiv das Risiko des Auftretens koronarer Thrombosen verringern konnte (Bennett, 2001; Behan *et al.*, 2004). In den Verlaufsuntersuchungen nach 6 Monaten zeigte sich jedoch mit Ausnahme der Patienten mit *Diabetes mellitus* kein klarer Vorteil mehr von Abciximab gegenüber der konventionellen Therapie mit Aspirin<sup>®</sup> plus Heparin hinsichtlich der Senkung der Ereignisrate (Marso *et al.*, 1999; Bennett, 2001). Die Verabreichung von Abciximab resultierte zusätzlich in einer signifikant verlängerten Blutungszeit und bei einigen Patienten sogar in einer Thrombozytopenie (Bennett, 2001). Darüber hinaus ist dieser GPIIb/IIIa-Antagonist nicht hoch spezifisch für das thrombozytäre Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , sondern interagiert auch mit den ubiquitär vorkommenden Integrin  $\alpha_v\beta_3$  (Marso *et al.*, 1999) und dem leukozytären Integrin  $\alpha_M\beta_2$  (Tam *et al.*, 1998).

Zur Erhöhung der Rezeptoraffinität und Spezifität, sowie zum Schutz vor enzymatischem Abbau wurden in der Folge synthetische RGD-basierende zyklische Heptapeptide wie Eptifibatid (Integrilin<sup>®</sup>) als GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten entwickelt (Phillips *et al.*, 1997). Die PURSUIT Studie demonstrierte, dass die intravenöse Gabe von Eptifibatid das Auftreten akuter Koronarthrombosen signifikant verringern konnte und bewies somit, dass zyklische Peptide effektive GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten darstellen (Harrington, 1997). Die zusätzliche intravenöse Gabe von Tirofiban (Aggrastat<sup>®</sup>), einem synthetischen RGD-basierenden

Peptidomimetikum (Egbertson *et al.*, 1994), zur Standardtherapie (Aspirin<sup>®</sup> plus Heparin) beim Auftreten akuter Koronarsyndrome, konnte das Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko der Patienten ebenfalls günstig beeinflussen (Gibson *et al.*, 1998).

Alle hier erwähnten GPIIb/IIIa-Antagonisten stellen ausschließlich intravenös verabreichbare Medikamente dar und werden aus diesem Grund vor allem in akuten Situationen wie der PTCA oder beim Auftreten akuter koronarer Thrombosen eingesetzt (Scarborough *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2003). Abgesehen von diesen intravenösen GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten wurden für eine mögliche Langzeittherapie auch oral verabreichbare Substanzen entwickelt, welche allerdings zu enttäuschenden Ergebnissen in klinischen Studien geführt haben (Quinn *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu den positiven Ergebnissen mit den intravenösen GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten konnte die Verabreichung von oralen Integrin  $\alpha_{11b}\beta_3$ -blockierenden Pharmaka keine Reduzierung klinisch bedeutsamer Koronarthrombosen bewirken, sondern führte sogar zu einem signifikanten Anstieg der Mortalität der Patienten (Chew *et al.*, 2001). Orale Fibrinogenrezeptorantagonisten scheinen eine intrinsische prothrombotische Aktivität zu besitzen (Serebruany *et al.*, 2003) und werden aus diesem Grund derzeit nicht zur sekundären Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt (Quinn *et al.*, 2003).

## **1.4. Thrombozyten-Kollagen-Interaktion**

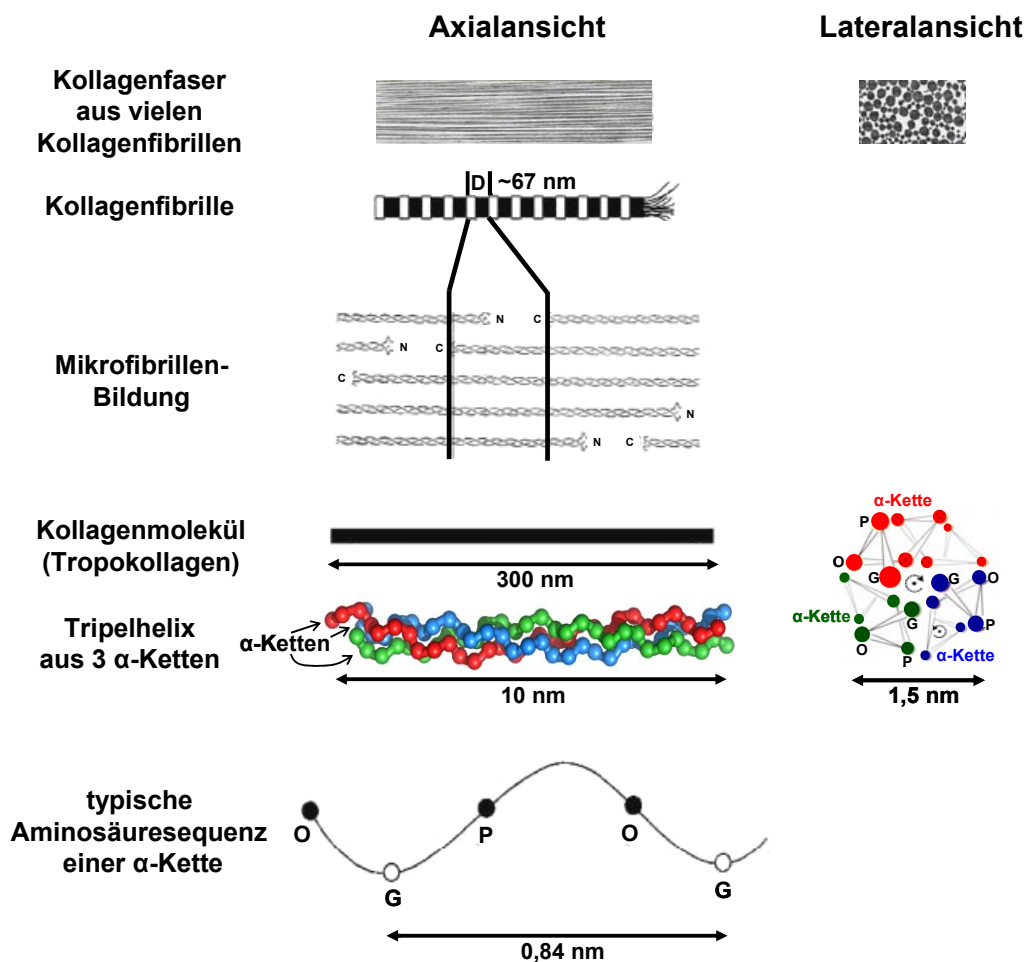
### **1.4.1. Kollagentypen und deren Verteilung in gesunden Gefäßwänden und atherosklerotischen Läsionen**

Kollagen, eine der Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix, stellt mit ca. 25% des Gesamtproteins die größte Proteinfamilie des menschlichen Körpers dar. Dieses Protein ist abgesehen von einer Reihe anderer Funktionen entscheidend für die Aufrechterhaltung der Gefäßwandintegrität und Elastizität, und ist an der Differenzierung, Adhäsion, Migration, Proliferation und Apoptose vaskulärer Zellen beteiligt (Barnes *et al.*, 1999; Alberts *et al.*, 2002). Darüber hinaus spielt das Kollagen auch eine wichtige Rolle in der Atherogenese, indem es vermehrt in atherosklerotisch modifizierten Gefäßbereichen synthetisiert wird und zu deren Verengung beiträgt. Weiterhin dient es als Depot für proatherogene Moleküle wie z. B. modifizierte Lipoproteine und Wachstumsfaktoren, und moduliert die Funktion von Makrophagen, sowie die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen und deren Empfindlichkeit für Wachstumsfaktoren (Rekhter, 1999). Zusätzlich wird das Kollagen für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität und der mechanischen Festigkeit des Plaquematerials verantwortlich gemacht (Rekhter, 1999; Ross, 1999).

Bisher wurden 28 unterschiedliche Kollagentypen (Typ I-XXVIII) beschrieben, welche sich in der Aminosäuresequenz ihrer einzelnen Polypeptidketten voneinander unterscheiden und an Hand ihrer Fähigkeit Fibrillen zu bilden in unterschiedliche Klassen unterteilt werden können (Prockop *et al.*, 1995; Koide, 2005; Farndale, 2006; Leitinger *et al.*, 2007). Die fibrillären Kollagene (Typ I, II, III, V, XI und XXVII), welche den größten Anteil des Gesamtkollagens stellen, können ihre tripelhelikalen Monomere in langen und dicken Kollagenfasern organisieren. Bei den netzwerkbildenden Kollagenen (Typ IV, VIII und X), den FACIT („*fibril-associated collagens with interrupted triple helices*“)-Kollagenen (Typ IX, XII, XIV, XVI, XIX, XXI und XXII), dem perlenschnurartigen Kollagen (Typ VI), der Verankerungsfibrille (Typ VII) oder den Kollagenen mit Transmembrandomänen (Typ XIII, XVII, XVIII, XXIII und XXV), sowie allen restlichen aktuell bekannten Kollagensubtypen, ist die tripelhelikale Struktur des Kollagens im Gegensatz zum fibrillären Kollagen eher diskontinuierlich organisiert.

Alle Kollagentypen weisen eine gemeinsame Struktur auf (Abb. 1.5). Abhängig vom einzelnen Kollagentyp bilden 3 gleiche (homotrimere) oder 3 unterschiedliche (heterotrimere) Polypeptidketten ( $\alpha$ -Ketten) das Grundgerüst der Kollagenmoleküle aus (Tab. 1.2) (Farndale *et al.*, 2004). Die Primärstruktur der  $\alpha$ -Ketten ist durch repetitive G-X-Y-Sequenzen charakterisiert, wobei Glycin (G) als kleinste Aminosäure an jeder dritten Position des Peptidstranges für die Bildung einer linksgängigen Helix der  $\alpha$ -Ketten sorgt und zusammen mit den in Richtung des externen Helixmilieus ausgerichteten Aminosäuren an Position X und Y eine Windung der Spirale bildet (Abb. 1.5) (Prockop *et al.*, 1979a; Prockop *et al.*, 1979b; Canty *et al.*, 2005). Die Position X der sich wiederholenden G-X-Y-Sequenzen wird häufig durch Prolin (P), die Position Y häufig durch 4-Hydroxyprolin (Choy *et al.*), einer äußerst seltenen Aminosäure, welche nahezu ausschließlich in Kollagenen vorkommt, besetzt. Das Vorhandensein von Hydroxyprolin wird für die Stabilität der Helix bei Körpertemperatur verantwortlich gemacht (Ramshaw *et al.*, 1998). Abhängig vom Kollagentyp umschlingen wie bereits erwähnt jeweils 3 gleiche (homotrimere) oder 3 unterschiedliche (heterotrimere) linksgängige  $\alpha$ -Helices einander (Tab. 1.2), so dass eine charakteristische rechtsgängige Kollagentripelhelix (Superhelix) entsteht, welche auf Grund vieler Wasserstoffbrückenbindungen äußerst stabil und langlebig ist, und in ihrer Länge von Kollagentyp zu Kollagentyp deutlich variieren kann (Abb. 1.5). Glycin wird in diesem Zusammenhang an jeder dritten Position der Aminosäuresequenz der Polypeptidketten benötigt, um eine dichte Packung der einzelnen  $\alpha$ -Ketten innerhalb der Tripelhelix zu ermöglichen (Prockop *et al.*, 1995). Der hohe Prolin- und Hydroxyprolinegehalt ist für die Wasserstoffbrückenbindung verantwortlich, welche die 3 linksgängigen Helices miteinander verknüpfen und Helix-Helix-Interaktionen innerhalb der polymeren Struktur des Kollagenmoleküls, auch Tropokollagen genannt, stabilisieren (Farndale *et al.*, 2004; Leitinger *et al.*, 2007). Aus den einzelnen Kollagenmolekülen werden mittels „*side to side*“- und „*end to*

*end*<sup>c</sup>-Anlagerung zuerst Kollagenmikrofibrillen und anschließend hoch komplex organisierte Kollagenfibrillen gebildet (Abb. 1.5). Die Kollagenfibrillen können abhängig vom Gewebe in dem sie vorkommen und abhängig von deren Entwicklungsstadium einige Millimeter lang werden und einen Durchmesser von ein paar wenigen Nanometern bis hin zu ~500 nm besitzen (Canty *et al.*, 2005).



**Abb. 1.5: Molekulare Eigenschaften der Kollagenstruktur von der primären Aminosäuresequenz zur Ultrastruktur gebündelter Kollagenfasern (modifiziert nach (Beck *et al.*, 1998) und (Orgel *et al.*, 2001)).** Die Hauptkomponente von fibrillärem Gewebe stellt die so genannte Kollagenfibrille dar, welche sich aus axial versetzten Kollagentripelhelices zusammensetzt. Die negativ gefärbte Fibrille weist eine typische hell-dunkel Streifung auf, welche mit einer Periodizität von ~67 nm (= D-Domäne) auftritt. G = Glycin, P = Prolin, O = Hydroxyprolin.

Da die benachbarten Kollagenmoleküle in den Fibrillen nicht bündig angeordnet sind, sondern um 67 nm, d. h. in etwa um ein viertel ihrer Länge, gegeneinander verschoben sind, entsteht ein charakteristisches Bänderungsmuster der Kollagenfibrillen, das sich alle 67 nm (234 Aminosäuren) wiederholt und als D-Domänen-Periodizität bezeichnet wird (Abb. 1.5) (Canty *et al.*, 2005). Die polymere Organisation der Kollagenmonomere in Fibrillen erscheint auf Grund

der axialen D-Domänen-Periodizität in der elektronenmikroskopischen Aufnahme einer negativ gefärbten Kollagenfibrille oder Faser als typische hell-dunkel Streifung (helle Bereiche: Region gegeneinander versetzter Kollagenmoleküle ohne Lücken, welche nicht durch negative Färbung visualisiert werden können; dunkle Bereiche: Region gegeneinander versetzter Kollagenmoleküle mit Lücken, welche durch negative Färbung detektiert werden können).

**Tab. 1.2: Zusammenstellung der molekularen Zusammensetzung und Gene, sowie der polymerisierten Form und des Vorkommens verschiedener Kollagentypen (modifiziert nach (Gelse *et al.*, 2003)).**

Kollagentyp	molekulare Zusammensetzung der $\alpha$ -Ketten	Gene	polymerisierte Form	Vorkommen im Gewebe
<b>fibrilläre Kollagene</b>				
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	COL1A1 COL1A2	Fibrille (Mischfibrillen mit Typ III und V)	Knochen, Haut, Sehnen, Bänder, Kornea, innere Organe, <u>Gefäßwand</u>
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1	Fibrille (Mischfibrillen mit Typ XI)	Knorpel, Glaskörper, Nucleus pulposus
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1	Fibrille (Mischfibrillen mit Typ I und V)	Haut, <u>Gefäßwand</u> , Reticulinfasern der meisten Gewebe (Lunge, Leber, Milz, etc.)
V	$\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	COL5A1 COL5A2 COL5A3	Fibrille (Mischfibrillen mit Typ I und III)	wie Kollagen Typ I; Knochen, Kornea, Lunge, etc.
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	COL11A1 COL11A2 COL11A3=COL2A1	Fibrille (Mischfibrillen mit Typ II)	wie Kollagen Typ II; Knorpel, Glaskörper
<b>netzwerkbildende Kollagene</b>				
IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ ; $\alpha 1-\alpha 6$	COL4A1 COL4A2 COL4A3 COL4A4 COL4A5 COL4A6	flächenförmiges Netzwerk	<u>Basallamina</u>
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_2\alpha 2(VIII)$	COL8A1 COL8A2	hexagonales Netzwerk	Endothelzellen, Descemet-Membran
X	$[\alpha 1(X)]_3$	COL10A1	hexagonales Netzwerk	hypertrophe Knorpel
<b>perlenschnurartige Kollagene</b>				
VI	$\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$	COL6A1 COL6A2 COL6A3	Mikrofibrillen; perlenschnurartige Struktur	Haut, Knorpel, Plazenta, Lunge, <u>Gefäßwand</u> , Bandscheibe
<b>fibrillenassoziierte (FACIT) Kollagene</b>				
IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	COL9A1 COL9A2 COL9A3	laterale Assoziation mit Kollagen Typ II	Knorpel, Kornea, Humor vitreus
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	COL12A1	laterale Assoziation mit Kollagen Typ I	Sehnen, Bänder, <u>Gefäßwand</u> , Prichondrium
XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	COL14A1	laterale Assoziation mit Kollagen Typ I	Haut, Sehnen, <u>Gefäßwand</u> , Plazenta, Lunge, Leber
XVI	$[\alpha 1(XVI)]_3$	COL16A1	Assoziation mit Kollagen Typ II	Fibroblasten, Amnion, Keratinozyten
<b>Verankerungsfibrillen</b>				
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	COL7A1	Verankerungsfibrille	unter geschichteten, schuppenartigen Epithelien; z.B. Haut, dermal-epidermale Verbindungen, etc.
<b>kollagenartige Proteine mit Transmembrandomäne</b>				
XIII	$[\alpha 1(XIII)]_3$	COL13A1	nicht bekannt	Epidermis, Haarfollikel, Darm, Endomysium, Lunge, Leber
XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	COL17A1	nicht bekannt	Hemidesmosomen, dermal-epidermale Verbindungen
XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	COL18A1	nicht bekannt	<u>Basallamina der Blutgefäße</u> , Lunge, Leber

Die Kollagenfibrillen werden durch kovalente Quervernetzungen über Lysin- und Hydroxylysinreste stabilisiert (Kadler *et al.*, 1996). Da die kurzen nicht helikalen amino- und carboxyterminalen Enden der Kollagenmoleküle, die so genannten Telopeptide, die Mehrheit

des Lysins enthalten, sind sie von großer Wichtigkeit für den Quervernetzungsprozess, bzw. die Kollagenfibrillenbildung. Diese kurzen linearen Aminosäuresequenzen der Telopeptide sind besonders anfällig für proteolytische Degradation (z. B. durch Pepsin), wohingegen der tripelhelikale Kernbereich des Kollagenmoleküls inert ist und ausschließlich von speziellen Kollagenasen (z. B. Matrixmetalloproteinasen) angegriffen und abgebaut werden kann (Rubin *et al.*, 1965; Drake *et al.*, 1966). Während des Alterungsprozesses steigt die Quervernetzungsrate der Fibrillen an, und die Kollagenfasern, welche sich durch komplizierte dreidimensionale Anordnungen einzelner Kollagenfibrillen bilden, gewinnen abhängig vom Gewebetyp an Bruchfestigkeit und Stabilität (Bailey *et al.*, 1974).

*In vivo* setzen sich Kollagenfibrillen und Fasern nicht immer aus einem einzigen Kollagentyp zusammen, sondern stellen häufig Hybride verschiedener Subtypen dar (Tab 1.2). Die Kollagenfibrillen der Haut sind z. B. aus Kollagen Typ I und Typ III aufgebaut, die der Knorpel enthalten Kollagen Typ II und Typ XI. Darüber hinaus können auch nicht-fibrilläre Kollagene wie beispielsweise die FACIT-Kollagene mit der Oberfläche von Kollagenfibrillen assoziieren (Prockop *et al.*, 1995; Canty *et al.*, 2005).

Zwischen 20 und 40% des Gesamtproteins arterieller Gefäßwände bestehen aus Kollagen (Barnes, 1985). Abgesehen von ihrer wichtigen mechanischen Bedeutung für die Gefäßwandintegrität stellen die Kollagene auch eine Oberfläche für das Anhaften weiterer Matrixkomponenten wie z. B. den Proteoglykanen (Decorin, Versikan, etc.) oder dem VWF dar, und sind essentiell für die Adhäsion von vaskulären Zellen (Barnes *et al.*, 1999; Canty *et al.*, 2005). Vierzehn der bekannten Kollagensubtypen (Typ I, III, IV, V, VI, VII, VIII, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVIII und XIX) konnten bisher in Gefäßwänden nachgewiesen werden (Kehrel, 1995; Barnes *et al.*, 1999; Plenz *et al.*, 2003). Die fibrillären Kollagentypen I und III stellen die vorherrschenden Kollagenkomponenten der arteriellen Gefäßwände dar und sind vor allem für deren Bruchfestigkeit und Elastizität verantwortlich. Der kleinere Teil der vaskulären Kollagenfibrillen besteht aus Kollagen Typ V. Neben den fibrillären Kollagenen wurden auch nicht-fibrilläre und netzwerkbildende Kollagentypen in geringeren Mengen in den Gefäßwänden von Arterien gefunden. Das netzwerkbildende Kollagen Typ IV z. B. ist in der endothelialen Basalmembran, sowie in der die glatten Muskelzellen umgebenden Basallamina angereichert (Kehrel, 1995; Barnes *et al.*, 1999). Obwohl auch andere Basalmembran-assoziierte Kollagentypen (Typ XV, XVIII und XIX) in den vaskulären Gefäßen nachgewiesen wurden, stellt das Typ IV Kollagen die Hauptkomponente des Basalmembrangerüsts dar. Das Kollagen Typ VI, ein perlschnurartiger Kollagentyp, wurde in der subendothelialen Matrix, sowie in der Media gefunden und kolokalisiert häufig mit anderen Kollagentypen und dem VWF (Ross *et al.*, 1995; Barnes *et al.*, 1999). Ultrastrukturelle Untersuchungen weisen darüber hinaus darauf hin, dass die Kollagen Typ VI-Mikrofibrillen als flexible Anker zur Verbindung einzelner Kollagenfasern dienen (Keene *et al.*, 1988). Die FACIT-Kollagene (Typ XII, XIV



und XVI) sind ebenfalls in arteriellen Gefäßwänden enthalten und scheinen am Prozess der Fibrillenassoziation, sowie der Regulation des Kollagenfibrillendurchmessers beteiligt zu sein (Plenz *et al.*, 2003). Auch das Verankerungsfibrillen-bildende Kollagen Typ VII, das netzwerkbildende Kollagen Typ VIII und das membrangebundene Kollagen Typ XIII wurden in arteriellen Gefäßwänden nachgewiesen und scheinen von Bedeutung für deren Stabilität und Elastizität zu sein (Plenz *et al.*, 2003).

Die Thrombozytenaktivierung durch die vaskulären Kollagene wurde mit Ausnahme der Kollagentypen XII, XIII, XV, XIV, XVIII und XIX unter statischen und arteriellen Flussbedingungen untersucht. Unter Flussbedingungen, welche den physiologischen Bedingungen in arteriellen Gefäßen relativ nahe kommen, stellen die Kollagentypen I, III und IV starke Thrombozytenagonisten dar und können die Adhäsion und Aggregation von Blutplättchen bei relativ hohen arteriellen Scherraten von bis zu  $2000 \text{ s}^{-1}$  vermitteln (Sixma *et al.*, 1997; Farndale *et al.*, 2004). Die etwas weniger reaktiven Kollagentypen VI und VIII hingegen können nur bei niedrigeren Scherraten von bis zu  $800 \text{ s}^{-1}$  Thrombozytenadhäsion induzieren. Das Kollagen Typ V unterstützt die Adhäsion der Plättchen unter arteriellen Flussbedingungen nicht (Farndale *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu den Untersuchungen unter Flussbedingungen sind alle getesteten Kollagentypen in der Lage unter statischen Bedingungen im gerührten System eine Thrombozytenaggregation hervorzurufen, was darauf hinweist, dass unter bestimmten Umständen jedes Kollagen in der Lage sein müsste, mit Blutplättchen zu interagieren (Barnes *et al.*, 1999). Abgesehen vom Subtyp der Kollagene ist auch die korrekte quaternäre Konformation dieser Proteine von besonderer Wichtigkeit für deren Interaktion mit den Plättchen, da die dreidimensionale Struktur der Kollagene für deren Erkennung durch ihre Liganden benötigt wird (Farndale *et al.*, 2004). Native polymere tripelhelikale Kollagenfibrillen z. B. können von ruhenden Thrombozyten gebunden werden und deren Adhäsion, Aktivierung und Aggregation induzieren (Kehrel, 1995). Die Bindung und Aktivierung der Blutplättchen an fibrilläres Kollagen verläuft relativ rasch,  $\text{Mg}^{2+}$ -unabhängig und wird vermutlich hauptsächlich durch den thrombozytären Kollagenrezeptor Glykoprotein VI vermittelt (Jung *et al.*, 1998; Savage *et al.*, 1999; Ware, 2004). Im Gegensatz dazu können lösliche Kollagene, welche nicht polymere und nicht fibrilläre monomere Kollagenmoleküle darstellen, zwar von ruhenden Thrombozyten gebunden werden, verursachen dabei jedoch keine Aggregation oder Sekretion. Die Bindung der Blutplättchen an lösliches Kollagen erfolgt verglichen mit der Bindung an fibrilläres Kollagen relativ langsam, ist  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängig und wird vor allem durch die Aktivierung des thrombozytären Kollagenrezeptors Integrin  $\alpha_2\beta_1$  vermittelt (Jung *et al.*, 1998; Ware, 2004).

Der Gesamtkollagengehalt sowie das Verhältnis verschiedener Kollagentypen in normalen und atherosklerotisch modifizierten Gefäßwänden unterschieden sich signifikant (Kehrel, 1995). Im Zuge der Plaquebildung und Progression steigt der Kollagengehalt der arteriellen Gefäßwand kontinuierlich an, bildet ein Depot für proatherogene Substanzen wie z. B. Lipoproteine,

Wachstumsfaktoren und Glykosilierungsendprodukte (Rekhter, 1999) und umfasst in etwa 60% des gesamten Plaqueproteins (Katsuda *et al.*, 2003). Vor allem die intimale Konzentration an Kollagen Typ I und Kollagen Typ III steigt mit dem Voranschreiten der Atherosklerose deutlich an, wobei das Typ I Kollagen in etwa zwei Drittel des Gesamtkollagengehalts des Plaquematerials umfasst (Murata *et al.*, 1986; Shekhonin *et al.*, 1987; van Zanten *et al.*, 1994). Kollagen Typ VI kommt in allen Stadien atherosklerotischer Läsionen vor, und trägt auf Grund seiner Resistenz gegenüber von glatten Muskelzellen und Makrophagen freigesetzten matrixdegradierenden Enzymen, zur Stabilität der atherosklerotischen Läsionen bei (Katsuda *et al.*, 1992; van Zanten *et al.*, 1994; Katsuda *et al.*, 2003). Die Anreicherung dieses Kollagentyps variiert allerdings stark von Plaque zu Plaque (van Zanten *et al.*, 1994). Kollagen Typ VIII akkumuliert ebenfalls in allen Stadien atherosklerotischer Läsionen und erhöht die Elastizität des Plauegewebes indem es die Plaquestruktur stabilisiert und mit elastischen Fasern interagiert (Katsuda *et al.*, 2003; Plenz *et al.*, 2003). Kollagen Typ V hingegen kann erst in vorangeschrittenen Läsionen, nicht aber in den frühen intimalen Verdickungen, dem „*fatty streak*“, nachgewiesen werden (Ooshima *et al.*, 1990; van Zanten *et al.*, 1994; Katsuda *et al.*, 2003). In vorangeschrittenen atherosklerotischen Plaques können darüber hinaus auch Kollagen Typ IV-Ablagerungen detektiert werden, welche vor allem um die glatten Muskelzellen der fibrösen Plaquekappe herum angeordnet sind (McCullagh *et al.*, 1980; Shekhonin *et al.*, 1987; Ooshima *et al.*, 1990; Katsuda *et al.*, 1992; Katsuda *et al.*, 2003). Wie bereits erwähnt verändert sich die Akkumulation eines jeden Kollagentyps kontinuierlich mit dem Voranschreiten der atherosklerotischen Läsion, und reflektiert den Metabolismus ihrer Hauptproduzenten, den glatten Muskelzellen, welcher vor allem von Wachstumsfaktoren und Zytokinen reguliert wird. TGF- $\beta$  z. B. erhöht die Synthese von Kollagen Typ I, III, IV und V, wohingegen das IL-1, TNF- $\alpha$  und das Interferon- $\gamma$  die Kollagenbildung durch glatte Muskelzellen unterdrücken (Katsuda *et al.*, 2003). PDGF verstärkt die Synthese von Kollagen Typ V und VIII, aber inhibiert die von Kollagen Typ IV (Katsuda *et al.*, 2003). Der Kollagengehalt atherosklerotischer Läsionen ist also das Ergebnis eines dynamischen Gleichgewichts zwischen Synthese und Degradation, wobei die Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Degradation durch die verstärkte Bildung matrixabbauender Enzyme wie den Matrixmetalloproteinasen oder Gelatinasen zur Destabilisierung des Plaques und darauf folgender Plaqueruptur mit gefäßverschließender Thrombusbildung führen kann (Sukhova *et al.*, 1999).

### **1.4.2. Thrombozytäre Kollagenrezeptoren**

Thrombozytäre Membranrezeptoren interagieren mit Adhäsionsliganden der nach einer Gefäßverletzung exponierten subendothelialen Matrix und sind als solche sowohl für den Ablauf der Hämostase, als auch für den der Thrombose unabdinglich (Ruggeri, 2002). Kollagen stellt eine der bedeutendsten plättchenaktivierenden Komponenten der extrazellulären Matrix

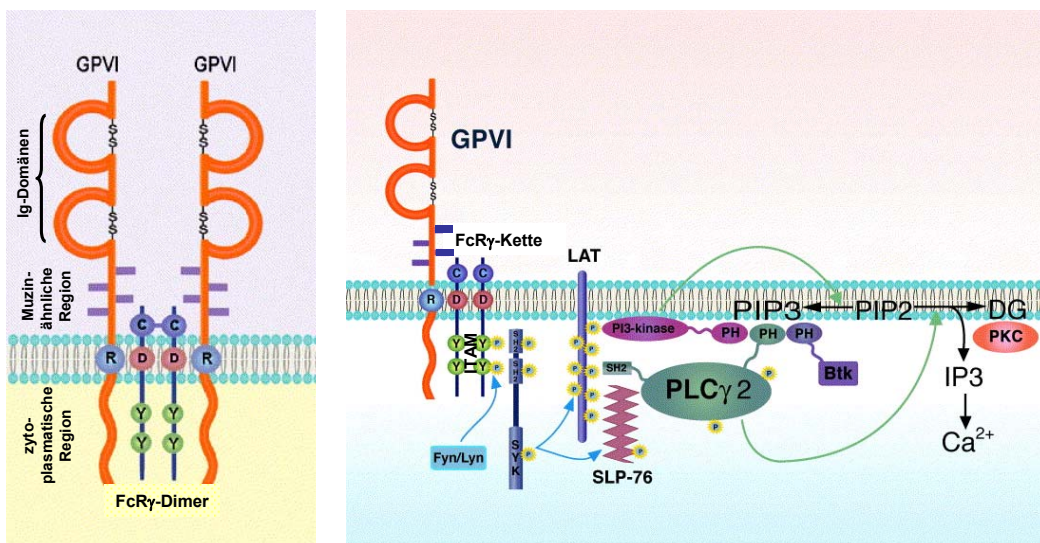
arterieller Gefäße dar und akkumuliert, wie bereits in 1.4.1 dargestellt, vermehrt in atherosklerotischen Läsionen. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl potentieller thrombozytärer Kollagenrezeptoren vorgeschlagen. Zu diesen zählen die Glykosyltransferase, das Fibronectin, der Plättchenfaktor XIII, das Glykoprotein (GP) IIb, GP61, GPIa/IIa (Integrin  $\alpha_2\beta_1$ ), GPIV (CD36), GPV, GPVI (P62), ein 85/90-kDa großes thrombozytäres Membranprotein, sowie ein für Kollagen Typ I spezifischer 65-kDa großer Rezeptor und die für Kollagen Typ III spezifischen 47- und 68/72-kDa großen Rezeptoren (Farndale *et al.*, 2004). Von all diesen kollagenbindenden Proteinen erwiesen sich allerdings nur GPVI und das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  als wirkliche Kollagenrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche, welche die Plättchen-Kollagen-Interaktion, sowie die darauf folgende Kollagen-induzierte Aktivierung der Thrombozyten vermitteln (Barnes *et al.*, 1998; Clemetson *et al.*, 2001; Nieswandt *et al.*, 2003; Samara *et al.*, 2003; Farndale *et al.*, 2004). Derzeit geht man davon aus, dass diese beiden Rezeptoren komplementäre Rollen bei der Kollagen-stimulierten Thrombusbildung spielen, wobei das Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , welches unter anderem GPVI-vermittelt aktiviert werden kann (Jung *et al.*, 2000), eher für die stabile Thrombozytenadhäsion verantwortlich gemacht wird, und GPVI eher als zentraler signalweiterleitender Rezeptor für die Aktivierung, Aggregation und Sekretion der Plättchen angesehen wird (Moroi *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005).

#### **1.4.2.1. Glykoprotein VI**

GPVI ist ein Typ I Transmembranglykoprotein, welches zur übergeordneten Familie der Immunglobulinrezeptoren gehört, und einen nicht kovalent gebundenen Komplex mit der Fc Rezeptor  $\gamma$ -Kette (FcR $\gamma$ ) bildet, welcher sich vermutlich aus 2 GPVI-Molekülen und einem FcR $\gamma$ -Ketten-Dimer zusammensetzt (Abb. 1.6) (Clemetson *et al.*, 1999; Clemetson *et al.*, 2001; Nieswandt *et al.*, 2003; Moroi *et al.*, 2004). Die FcR $\gamma$ -Kette, welche typische „Immunrezeptor Tyrosin-basierende Aktivierungsmotive“ (ITAMs) in ihrem zytoplasmatischen Fortsatz enthält, dient hierbei als der signalweiterleitende Teil des GPVI/FcR $\gamma$ -Komplexes und induziert nach Quervernetzung von GPVI durch die Bindung an fibrilläres Kollagen die Thrombozytenaktivierung, Sekretion und Aggregation (Clemetson *et al.*, 2001; Nieswandt *et al.*, 2003; Ware, 2004). GPVI bindet ausschließlich an fibrilläres Kollagen und muss einen dimeren Komplex ausbilden, um eine hohe Bindungsaffinität für seine Liganden aufzuweisen (Miura *et al.*, 2002; Moroi *et al.*, 2004).

Der humane GPVI-Rezeptor besteht aus 339 Aminosäuren und enthält 2 über Disulfidbrücken miteinander verbundene Immunglobulin (Ig)-C2-ähnliche extrazelluläre Domänen, eine Muzin-ähnliche Region, eine Transmembrandomäne, sowie einen kurzen 51 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Fortsatz (Abb. 1.6) (Clemetson *et al.*, 2001). Die beiden Ig-C2-Schleifen beinhalten hierbei die kollagenbindenden Domänen von GPVI (Clemetson *et al.*, 2001). Diese

interagieren vermutlich über ein Lysin an Position 59 der apikal gelegenen Oberfläche der Ig-C2-Schleifen mit spezifischen GPO-Sequenzen des fibrillären Kollagens (Kehrel *et al.*, 1998; Smethurst *et al.*, 2004). Die Affinität solcher tripelhelikaler Motive für GPVI steigt mit der Anzahl aneinander gereihter GPO-Sequenzen an. Das bisher längste solcher aneinander gereichte GPO-Motiv enthaltende synthetisch hergestellte Peptid, das so genannte Kollagenverwandte Peptid („*collagen-related peptide*“ (CRP); ~4 kDa), welches einen über Cysteinreste quervernetzten tripelhelikalen Kernbereich aus 10 GPO-Sequenzen enthält, bindet den GPVI-Rezeptor selektiv mit hoher Affinität. CRP induziert eine starke Thrombozytenaktivierung und Aggregation, und zwar unabhängig vom zweiten zentralen thrombozytären Kollagenrezeptor, dem Integrin  $\alpha_2\beta_1$  (Morton *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1999; Farndale, 2006). Obwohl die GPO-Sequenzen spezifisch für GPVI zu sein scheinen und mit einem Anteil von 10% aller fibrillären Domänen relativ häufig in Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-Fibrillen vorkommen, ist nicht bekannt, ob auch andere Kollagensequenzen, die keine GPO-Motive enthalten, möglicherweise ebenfalls von diesem Rezeptor erkannt werden können (Farndale *et al.*, 2004; Farndale, 2006).



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung des thrombozytären GPVI/FcR $\gamma$ -Komplexes (links), sowie dessen nach Kollagenbindung eingeleiteter Signaltransduktionskaskade (rechts) (modifiziert nach Moroi *et al.*, 2004). Die blauen Pfeile stehen für Tyrosinphosphorylierung und die grünen für eine enzymvermittelte Konversion. Btk = Bruton's Tyrosinkinase; C = Cystein; D = Aspartat; DG = Diacylglycerol; Fyn = Tyrosinkinase; IP3 = Inositol-3-phosphat; ITAM = Immunrezeptor Tyrosin-basierendes Aktivierungsmotiv; LAT = „*linker for activation of T-cells*“; Lyn = Tyrosinkinase; PH = Pleckstrin-Homologie-Domäne; „*PI3-kinase*“ = Phosphoinositid-3-Kinase; PIP2/3 = Phosphatidylinositol-bis/tris-phosphat; PKC = Proteinkinase C; PLC = Phospholipase C; R = Arginin; SH = Src-Homologie-Domäne; SLP-76 = 76 kDa Src-Homologie 2-Domäne-enthaltendes leukozytäres Protein; Y = Tyrosin.**

Ein positiv geladenes Arginin in der Transmembrandomäne des GPVI-Rezeptors, sowie die ersten 6 Aminosäuren der Juxtamembrandomäne vermitteln die Assoziation dieses

Glykoproteins mit FcR $\gamma$ , so dass der GPVI/FcR $\gamma$ -Komplex ausgebildet werden kann (Fig. 1.6) (Clemetson *et al.*, 2001; Nieswandt *et al.*, 2003; Moroi *et al.*, 2004). Der zytoplasmatische GPVI-Teil enthält eine prolinreiche Sequenz, welche selektiv an die Src-Homologie 3 (SH3)-Domänen der Tyrosinkinasen Fyn und Lyn bindet (Suzuki-Inoue *et al.*, 2002). Die Kollagen-vermittelte Quervernetzung von GPVI bringt die SH3-gebundenen Tyrosinkinasen Fyn und Lyn in Kontakt mit der FcR $\gamma$ -Kette und führt somit zur Tyrosinphosphorylierung der ITAM-Sequenz von FcR $\gamma$ , sowie zur darauf folgenden Bindung der Tyrosinkinase Syk an das ITAM-Motiv und damit zur Initiation der GPVI/FcR $\gamma$ -vermittelten Signaltransduktionskaskade (Ezumi *et al.*, 2002; Nieswandt *et al.*, 2003). Eine Vielzahl von weiteren Adaptermolekülen (z. B. LAT („*linker for activation of T-cells*“) und SLP-76 (76 kDa Src-Homologie 2-Domäne-enthaltendes leukozytäres Protein)) und Effektormolekülen wie z. B. die Phospholipase C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2), die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) und die Proteinkinase C (PKC) werden im weiteren Ablauf dieser Signaltransduktionskaskade aktiviert und vermitteln die Kollagen-stimulierte Aktivierung, Sekretion und Aggregation der Blutplättchen (Abb. 1.6) (Nieswandt *et al.*, 2003; Moroi *et al.*, 2004).

Die kollageninduzierte GPVI/FcR $\gamma$ -vermittelte Blutplättchenaktivierung wird kritisch durch das auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimierte „*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*“ (PECAM-1 oder CD31) gegenreguliert (Patil *et al.*, 2001). PECAM-1 besitzt in seiner zytoplasmatischen Region ein „Immunrezeptor Tyrosin-basierendes inhibitorisches Motiv“ (ITIM), sowie eine Proteintyrosinphosphatase (Src-Homologie 2-Phosphatase (SHP-2))-bindende Domäne, worüber es die Signaltransduktionswege ITAM-enthaltender und Proteintyrosinkinase (Syk)-bindender, aktivierender Plättchenrezeptoren, wie z. B. dem GPVI-Rezeptor, antagonisieren, und dadurch möglicherweise das Risiko einer unkontrollierten Thrombusbildung und Gefäßokklusion nach der Exposition von subendothelial gelegenen Matrixstrukturen wie z. B. dem Kollagen reduzieren kann (Patil *et al.*, 2001). Welche Komponenten der GPVI/FcR $\gamma$ -vermittelten Signaltransduktionskaskade hierbei als Substrate für die Dephosphorylierung durch den PECAM-1/SHP-2-Komplex dienen, ist derzeit noch offen.

GPVI wurde erstmals 1982 mittels 2D-Gelelektrophorese als ein 60 bis 65 kDa großes thrombozytäres Membranprotein identifiziert (Clemetson *et al.*, 1982; Moroi *et al.*, 2004). Hinweise darauf, dass dieses Glykoprotein eine entscheidende Rolle für die Kollagen-induzierte Blutplättchenaktivierung und Aggregation spielen könnte, stammen allerdings erst aus einer Studie von 1987 an einem Patienten mit Thrombozytopenie (autoimmuner thrombozytopenischer Purpura), dessen Blutplättchen kein GPVI auf ihrer Oberfläche besaßen und darüber hinaus nicht auf Kollagen als Aggregationsstimulus reagierten (Sugiyama *et al.*, 1987). In den folgenden Jahren wurden in Japan weitere Patienten mit GPVI-defizienten Thrombozyten beschrieben, welche ebenfalls spezifisch eine gestörte Kollagen-induzierte

Plättchenreaktion zeigten (Sugiyama *et al.*, 1987; Moroi *et al.*, 1989; Ryo *et al.*, 1992; Arai *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 2001). Der molekulare Hintergrund für die Abwesenheit von GPVI bei diesen Patienten konnte bisher allerdings noch nicht eindeutig geklärt werden (Clemetson *et al.*, 2001). Alle Patienten mit GPVI-Defizienz weisen nur eine geringfügig verzögerte Blutungszeit auf (Sugiyama *et al.*, 1987; Moroi *et al.*, 1989; Ryo *et al.*, 1992; Arai *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 2001). Darüber hinaus zeigen auch mittels gerichteter Gendeletion („*knock-out*“) oder durch Injektion eines GPVI-Antikörpers immunologisch generierte GPVI-defiziente Mäuse keine signifikant verlängerten Blutungszeiten (Nieswandt *et al.*, 2001b; Kato *et al.*, 2003; Ware, 2004). Die Thrombozyten der GPVI-„*knock out*“ Mäuse, sowie der GPVI-depletierten Mäuse besitzen keinen funktionellen GPVI-Rezeptor auf ihrer Oberfläche und zeigen nach der Zugabe physiologischer Konzentrationen an fibrillärem Kollagen keine Aggregation im gerührten System (Takai *et al.*, 1994; Nieswandt *et al.*, 2001b; Kato *et al.*, 2003; Ware, 2004). Untersuchungen der Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen von GPVI-„*knock out*“ Mäusen unter arteriellen Flussbedingungen haben gezeigt, dass diese Thrombozyten zwar an fibrilläres Kollagen adhäreren, sich dort jedoch nicht ausbreiten oder aggregieren können (Kato *et al.*, 2003), was darauf hinweist, dass GPVI vor allem für die Aktivierung der Plättchen, nicht aber für deren Adhäsion eine entscheidende Rolle spielt. Im Gegensatz dazu haben *in vitro*-Untersuchungen der Adhäsion und Aggregation mit immunologisch generierten GPVI-defizienten Mäuseblutplättchen gezeigt, dass diese Thrombozyten weder unter statischen, noch unter Flussbedingungen in der Lage waren, an immobilisiertes Kollagen zu adhäreren oder dort zu aggregieren (Nieswandt *et al.*, 2001b). Darüber hinaus weist auch eine *in vivo*-Studie mit den Plättchen immunologisch generierter GPVI-defizienter Mäuse, in welcher die Thrombusbildung an einer verletzten Gefäßwandstelle der *Arteria carotis* analysiert wurde, auf eine entscheidende Rolle von GPVI sowohl für die Thrombozytenadhäsion, als auch für deren Aktivierung und Aggregation hin (Massberg *et al.*, 2003). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz dieser beiden Studien könnte darin liegen, dass die Blutplättchen der GPVI-„*knock out*“-Mäuse noch immer die FcR $\gamma$ -Kette exprimieren, wohingegen durch die immunologische GPVI-Depletion auch FcR $\gamma$  in den Thrombozyten verloren geht (Ware, 2004). Es ist bisher nicht geklärt, ob die FcR $\gamma$ -Untereinheit bei den gentechnisch veränderten Mäusen vielleicht in der Lage sein könnte mit anderen thrombozytären Rezeptoren zu interagieren und auf diese Weise die Adhäsion der Plättchen am Kollagen induzieren kann. Darüber hinaus ist auch nicht bekannt, welchen Effekt die Immundepletion des gesamten GPVI/FcR $\gamma$ -Komplexes auf die durch andere Thrombozytenrezeptoren vermittelte Blutplättchenfunktion haben könnte. Flusseperimente mit humanen Thrombozyten ergeben ebenfalls kontroverse Ergebnisse bezüglich der exakten Funktion des Transmembranrezeptors GPVI für die kollagenstimulierte Plättchenadhäsion und Aggregatbildung. Die Blutplättchen eines GPVI-defizienten Patienten (Moroi *et al.*, 1996), sowie mit einem spezifischen anti-GPVI-Antikörper vorbehandelte humane Thrombozyten (Siljander *et al.*, 2004b) adhärerten zwar auf kollagenbeschichteten Oberflächen, konnten dort

allerdings nicht mehr aggregieren (Moroi *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu konnten die Blutplättchen eines zweiten GPVI-defizienten Patienten unter arteriellen Flussbedingungen auch nicht mehr an fibrilläres Kollagen adhären (Goto *et al.*, 2002b). Die Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studien sind bisher nicht geklärt und werden vor allem auf technische Unterschiede in den Versuchsdurchführungen, sowie auf das mögliche Vorhandensein geringer Mengen an GPVI auf der Thrombozytenoberfläche des ersten GPVI-defizienten Patienten zurückgeführt (Nieswandt *et al.*, 2003; Moroi *et al.*, 2004). Der Beitrag des thrombozytären Oberflächenrezeptors GPVI für die Adhäsion an Kollagenoberflächen wird daher aktuell noch kontrovers diskutiert, wohingegen die Kollagen-vermittelte Aktivierung, Aggregation und Sekretion der Blutplättchen hauptsächlich über GPVI abzulaufen scheint. Da weder die Patienten mit GPVI-defizienten Plättchen, noch die gentechnisch oder immunologisch generierten GPVI-depletierten Mäuse signifikant verlängerte Blutungszeiten aufweisen und der GPVI-Rezeptor eine zentrale Rolle bei der Kollagen-stimulierten Plättchenaktivierung spielt, könnte dieser Transmembranrezeptor ein interessantes Zielmolekül künftiger antithrombozytärer Strategien darstellen.

#### 1.4.2.2. **Integrin $\alpha_2\beta_1$**

Das Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , auch GPIa/IIa genannt, stellt den als erstes identifizierten Kollagenrezeptor auf der Oberfläche von Thrombozyten dar (Nieuwenhuis *et al.*, 1985) und gehört der übergeordneten Familie der Integrine mit nicht-kovalent verbundenen transmembranen Heterodimeren, bestehend aus einer  $\alpha$  (150-165 kDa)- und einer  $\beta$  (130 kDa)-Untereinheit, an (Kasirer-Friede *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). GPIa/IIa ist ein universaler Kollagenrezeptor, welcher unter arteriellen Flussbedingungen die Thrombozytenadhäsion an Kollagen Typ I bis Kollagen Typ IV, sowie an Kollagen Typ VI und Kollagen Typ VIII vermitteln kann (Saelman *et al.*, 1994). Hinweise darauf, dass dieses Integrin eine entscheidende Rolle für die Kollagen-induzierte Blutplättchenaktivierung und Aggregation spielen könnte, stammen aus einer Studie an einem Patienten mit Blutungsstörung, dessen Thrombozyten kein Integrin  $\alpha_2\beta_1$  auf ihrer Oberfläche sowie eine mangelhafte Kollagen-stimulierte Adhäsion, Aggregation und Ausbreitung („*spreading*“) aufwiesen (Nieuwenhuis *et al.*, 1985; Nieuwenhuis *et al.*, 1986). Die Ligandenspezifität des GPIa/IIa hängt vom Zelltyp ab, auf dessen Oberfläche es exprimiert wird, so dass es neben seiner Funktion als thrombozytärer Kollagenrezeptor bei Expression auf der Oberfläche anderer Zellen, wie beispielsweise den Endothel- und Epithelzellen, auch einen Rezeptor für z. B. Laminin, Fibronectin, Tenascin und den Echovirus-1 darstellen kann (Dickeson *et al.*, 1999). Das native kollagenbindende Integrin besitzt in seiner  $\alpha_2$ -Untereinheit eine ~200 Aminosäuren lange eingesetzte Domäne, die  $\alpha_2$  I („*inserted*“-)Domäne (Kamata *et al.*, 1994; Depraetere *et al.*, 1997), welche über eine konservierte Kationenbinderegion, das so genannte MIDAS („*metal ion-dependent adhesion site*“-)Motiv, Metallionen-abhängig an Kollagen bindet (Staatz *et al.*, 1989; Clemetson *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005). Die

Kationenbinderegion der  $\alpha_2$  I-Domäne weist hierbei eine klare Präferenz für die zweiwertigen Metallionen  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  auf (Clemetson *et al.*, 2001).

Vergleichbar zu anderen Integrinen wie z. B. dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wird auch die Kollagenaffinität des Integrin  $\alpha_2\beta_1$  aktivierungsabhängig durch „*inside-out signaling*“ erhöht (Jung *et al.*, 2000; Gibbins, 2004). Mit Hilfe synthetisch hergestellter kurzer tripelhelikaler Kollagenpeptide wurden GFOGER-Motive innerhalb verschiedener Kollagentypen (Typ I, II, IV) identifiziert, welche von der  $\alpha_2$  I-Domäne des GPIa/IIa erkannt und gebunden werden, und sowohl die Adhäsion, als auch die Aktivierung und das Ausbreiten von Thrombozyten vermitteln können (Knight *et al.*, 1998; Emsley *et al.*, 2000; Knight *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2003). Die Phenylalanin-, Glutamat- und Argininreste scheinen für diese Interaktion von besonderer Bedeutung zu sein (Emsley *et al.*, 2000; Knight *et al.*, 2000; Emsley *et al.*, 2004). GFOGER ist ein hoch affiner Integrin  $\alpha_2\beta_1$ -Ligand, welcher auch an die inaktive Form des Rezeptors bindet (Farndale, 2006). Andere Hexapeptide wie das GLOGER, das GMOGER, das GLSGER, das GASGER oder das GAOGER können ebenfalls von diesem Kollagenrezeptor gebunden werden, wobei diese allerdings vor allem mit dem aktiven GPIa/IIa interagieren (Farndale, 2006). Abgesehen von spezifischen Aminosäuresequenzen innerhalb des Kollagens, wird die Bindung des Kollagens an das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  auch durch die quaternäre Kollagenstruktur entscheidend beeinflusst (Savage *et al.*, 1999). Dieser Rezeptor ist im Gegensatz zu GPVI, welches ausschließlich an fibrilläres Kollagen bindet, sowohl in der Lage mit nicht quervernetztem, löslichem, als auch mit fibrillärem Kollagen zu interagieren (Savage *et al.*, 1999). Die Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten an fibrilläres Kollagen allerdings scheint wie bereits in Abschnitt 1.4.2.1 erwähnt hauptsächlich GPVI-abhängig und nur zu einem kleineren Teil GPIa/IIa-abhängig vermittelt zu werden (Jung *et al.*, 1998; Savage *et al.*, 1999; Miura *et al.*, 2002; Moroi *et al.*, 2004). Die Kollagenbindung des Integrin  $\alpha_2\beta_1$  führt ähnlich wie die GPVI-induzierte Signaltransduktionskaskade zur Tyrosinphosphorylierung verschiedenster Proteine wie z. B. Src, Syk und PLC $\gamma$ 2, sowie zum kalziumabhängigen Ausbreiten der Blutplättchen (Inoue *et al.*, 2003; Gibbins, 2004). Darüber hinaus scheinen auch die p38 MAP Kinase, die Integrin-gekoppelte Kinase („*integrin-linked kinase*“ (ILK)), Rac und die p21-aktivierte Kinase (PAK) in die Aktivierung der Thrombozyten nach der Bindung von Kollagen an das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  involviert zu sein (Suzuki-Inoue *et al.*, 2001; Sundaresan *et al.*, 2002; Gibbins, 2004; Stevens *et al.*, 2004). Die exakte Bedeutung dieses Integrins für die Kollagen-stimulierte Plättchenaktivierung ist allerdings bisher noch nicht vollständig geklärt.

Im ursprünglichen Modell der Thrombozyten-Kollagen-Interaktion, dem so genannten „*two-site, two-step*“-Modell, ging man davon aus, dass die Plättchen aktivierungsunabhängig zuerst über das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  stabil an das Kollagen adhäreren und im Anschluss daran GPVI-vermittelt aktiviert werden und aggregieren (Santoro *et al.*, 1991; Clemetson *et al.*, 2001). Dieses Modell der Thrombozyten-Kollagen-Interaktion, in welchem die Plättchenadhäsion und



die Plättchenaggregation als 2 voneinander getrennte Abläufe angesehen werden, wird von Untersuchungen von Moroi *et al.* und Siljander *et al.* mit humanen Thrombozyten unterstützt (Moroi *et al.*, 2000; Siljander *et al.*, 2004b). Darüber hinaus haben auch Arbeiten mit Integrin  $\alpha_2$ -defizienten Mäusethrombozyten gezeigt, dass diese Plättchen weder an lösliches Kollagen, noch bei niedrigen Scherraten an fibrilläres Kollagen adhären können (Chen *et al.*, 2002; Holtkotter *et al.*, 2002) und bestätigen somit das „two-site, two-step“-Modell der Thrombozyten-Kollagen-Interaktion.

Die zentrale Rolle des Integrin  $\alpha_2\beta_1$  für die Adhäsion der Blutplättchen am Kollagen wurde allerdings durch Studien mit immunologisch generierten GPVI-depletierten Mäusethrombozyten relativiert (Nieswandt *et al.*, 2000; Nieswandt *et al.*, 2001a). Die GPVI-defizienten Mäuseblutplättchen wiesen wie in Abschnitt 1.4.2.1 dargestellt keine Kollagen-induzierte Aggregation mehr auf, und waren weder unter statischen, noch unter Flussbedingungen in der Lage, an Kollagen zu adhären (Nieswandt *et al.*, 2001a; Nieswandt *et al.*, 2001b). Ein weiterer Hinweis, der die zentrale Rolle des GPIa/IIa in Frage stellt, war die Beobachtung, dass die Voraktivierung der Plättchen durch z. B. den spezifischen GPVI-Aktivator CRP die Affinität des Integrin  $\alpha_2\beta_1$  für dessen Liganden Kollagen erhöht (Jung *et al.*, 2000; Moroi *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass GPVI, und nicht das Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , den zentralen signalweiterleitenden Rezeptor der Blutplättchen-Kollagen-Interaktion darstellt und sowohl die initiale Bindung, als auch die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten induziert (Nieswandt *et al.*, 2001a). Die Hauptfunktion des Integrin  $\alpha_2\beta_1$  besteht gemäß diesem Modell vor allem in der Vermittlung und Aufrechterhaltung der stabilen Adhäsion der Plättchen an der subendothelialen Matrix (Chen *et al.*, 2005).

In einem relativ neuen vereinheitlichenden Modell der Thrombozyten-Kollagen-Interaktion geht man davon aus, dass 2 verschiedene Mechanismen der stabilen Blutplättchenadhäsion und Aktivierung auf Kollagenoberflächen existieren (Auger *et al.*, 2005). Diese beiden Mechanismen können anhand des Beitrags von GPVI und dem Integrin  $\alpha_2\beta_1$  unterschieden werden, wobei die GPVI-vermittelte Thrombozytenaktivierung sowohl vor (zentraler Rezeptor = GPVI; entspricht dem zweiten Modell), als auch nach der Integrin-vermittelten Adhäsion (zentraler Rezeptor = Integrin  $\alpha_2\beta_1$ ; entspricht dem „two site-two step“-Modell) erfolgen kann. Der relative Beitrag eines jeden Signaltransduktionsweges hängt von den jeweiligen Umgebungsbedingungen ab und kann beispielsweise durch die exponierte Kollagenmenge, den Typ der GPVI- und Integrin  $\alpha_2\beta_1$ -Bindungsstellen auf dem exponierten Kollagen oder durch die Expressionsrate dieser Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche beeinflusst werden (Auger *et al.*, 2005).

### **1.4.3. Bedeutung des Blutflusses und der VWF-GPIIb/IIIa-Achse für die Thrombozyten-Kollagen-Interaktion**

Die Adhäsion der Blutplättchen an die nach einer Gefäßwandverletzung exponierte extrazelluläre Matrix stellt einen komplexen Prozess dar, in welchen eine Vielzahl verschiedenster subendothelialer Adhäsionsliganden und thrombozytärer Oberflächenrezeptoren involviert sind. Welche dieser Adhäsionsliganden und Rezeptoren jeweils benötigt werden, hängt stark von den vorherrschenden Strömungsverhältnissen innerhalb des geschädigten Gefäßes ab (Jackson *et al.*, 2003). Ein Maß zur Beschreibung der Strömungsverhältnisse innerhalb der Gefäße stellen die Scherraten dar. Diese werden sowohl von der Größe des Gefäßes, als auch von der Flussgeschwindigkeit und der Viskosität des Blutes im Gefäßinneren bestimmt, und geben den relativen Geschwindigkeitsgradienten angrenzender Flüssigkeitsschichten innerhalb des Blutes wieder. Die Scherraten werden in  $\text{cm} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , bzw. dazu äquivalent in inversen Sekunden ( $\text{s}^{-1}$ ) angegeben und variieren von  $\sim 30$  bis  $100 \text{ s}^{-1}$  in großen Venen, von  $\sim 200$  bis  $500 \text{ s}^{-1}$  in der Aorta und von  $\sim 500$  bis  $1.500 \text{ s}^{-1}$  in mittelgroßen und kleineren Arterien, sowie in kleinen Arteriolen der Mikrozirkulation (Hanson *et al.*, 1998; Nesbitt *et al.*, 2006). In den Karotiden liegen die Scherraten zwischen  $\sim 150$  und  $500/1500 \text{ s}^{-1}$  (Mittelwert/Höchstwert), in den Koronararterien zwischen  $\sim 400$  bis  $650 \text{ s}^{-1}$  (Hoeks *et al.*, 1995; Wootton *et al.*, 1999; Stroev *et al.*, 2007). In stenosierten atherosklerotischen Gefäßen können die Scherraten in Abhängigkeit vom Stenosegrad sogar  $20.000$  bis zu  $40.000 \text{ s}^{-1}$  betragen (Strony *et al.*, 1993; Holme *et al.*, 1997).

Bei Scherraten von bis zu maximal  $1.000 \text{ s}^{-1}$ , wie sie beispielsweise in Venen sowie in größeren und mittelgroßen Arterien vorliegen können, wird das Anhaften der Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand vor allem durch die Interaktion von subendothelialen Matrixmolekülen mit ihren spezifischen Rezeptoren, d. h. von z. B. Kollagen mit GPVI und dem Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , von Fibronektin mit dem Integrin  $\alpha_5\beta_1$  oder dem Integrin  $\alpha_{11b}\beta_3$ , sowie von Laminin mit dem Integrin  $\alpha_6\beta_1$ , vermittelt (Nivelstein *et al.*, 1988; Hindriks *et al.*, 1992; Beumer *et al.*, 1994; Beumer *et al.*, 1995; Kroll *et al.*, 1996; Jackson *et al.*, 2003; Nesbitt *et al.*, 2006). Bei höheren Scherraten hingegen von mehr als  $1000 \text{ s}^{-1}$ , wie sie beispielsweise in kleinen Arterien und Arteriolen sowie in stenosierten arteriellen Gefäßen vorliegen können, hängt die initiale Adhäsion der Plättchen an die extrazelluläre Matrix stark von der Interaktion des konstitutiv auf der Thrombozytenoberfläche exprimierten GPIIb-IX-V-Rezeptorkomplexes mit dem an die subendotheliale Matrix gebundenen VWF ab (Ruggeri, 2002; Jackson *et al.*, 2003). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl gegen den VWF als auch gegen GPIIb/IIIa gerichtete Antikörper bei Strömungsbedingungen mit höheren Scherraten in der Lage sind, die Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen an kollagenbeschichtete Oberflächen zu inhibieren, bzw. stark zu reduzieren (Farndale *et al.*, 2004; De Meyer *et al.*, 2006). Die physiologische Bedeutung der VWF-GPIIb/IIIa-Interaktion für das initiale Anhaften der Plättchen

an der subendothelialen Matrix, sowie für die darauf folgende Thrombusbildung wird durch Blutungsstörungen wie der von Willebrand-Krankheit und dem Bernard-Soulier-Syndrom, welche durch quantitative oder qualitative Abnormalitäten des VWF oder des thrombozytären GPIb-IX-V-Rezeptorkomplexes verursacht werden, bestätigt (De Meyer *et al.*, 2006). Auf Grund der Tatsache, dass die VWF-GPIb $\alpha$ -Interaktion vor allem bei Strömungsbedingungen mit höheren Scherraten und somit vor allem in Arterien und atherosklerotisch modifizierten Gefäßen, nicht aber im venösen System eine wichtige Rolle spielt, könnte die Inhibition der VWF-GPIb $\alpha$ -Achse mittels anti-VWF-Antikörpern oder anti-GPIb $\alpha$ -Antikörpern eine viel versprechende antithrombotische Strategie darstellen (De Meyer *et al.*, 2006).

Der VWF (Molekulargewicht des Monomers: 278 kDa) stellt das größte bekannte Plasmaprotein dar und zirkuliert als Multimere von  $> 500$  kDa (Homodimer: 556 kDa) bis hin zu Polymeren einer Größe von mehr als 10.000 kDa im Blut (Ruggeri, 2003). Das Multimer ist fadenförmig und hat im Blut als globuläres Molekül einen Durchmesser von 200 bis 300 nm, kann sich aber unter Scherung bis zu einer Länge von 1300 nm entrollen (Siedlecki *et al.*, 1996; Ruggeri, 2003). Die VWF-Multimere setzen sich aus einer variierenden Anzahl von Molekülen (2 bis mehr als 50-100 Moleküle) zusammen, wobei jedes dieser Moleküle sowohl spezifische Bindungsstellen für Kollagen, als auch für den thrombozytären VWF (GPIb $\alpha$ )- und Fibrinogenrezeptor (Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) besitzt (Varughese *et al.*, 2002). Besonders die hoch polymerisierten VWF-Moleküle, der so genannte „*high-molecular-weight VWF*“ (Molekulargewicht  $> 6.000$  kDa), gelten als hämostatisch oder thrombotisch aktiv und vermitteln als Bindeglied zwischen Thrombozytenrezeptoren und Gefäßwandkomponenten, wie vor allem Kollagen, die Adhäsion und Aktivierung der Plättchen nach dem Aufheben der Gefäßwandintegrität (Varughese *et al.*, 2002).

Nach dem Auftreten einer Gefäßwandverletzung wird der im Bereich der Läsion aus den endothelialen Weibel-Palade Körperchen und den thrombozytären  $\alpha$ -Granula freigesetzte VWF, sowie der im Plasma zirkulierende VWF über seine A3-Domäne an fibrilläres Kollagen Typ I und Kollagen Typ III, den Hauptkollagentypen des Subendothels, gebunden (Lankhof *et al.*, 1996; Romijn *et al.*, 2001; Ruggeri, 2003). Innerhalb des Kollagen Typ III wurde hierbei das Nonapeptid RGQOGVMGF als die essentielle VWF-Bindungsdomäne identifiziert (Lisman *et al.*, 2006). Darüber hinaus kann der VWF auch vornehmlich über seine A1-Domäne vermittelt mit dem subendothelial gelegenen Kollagen Typ VI assoziieren (Mazzucato *et al.*, 1999; Varughese *et al.*, 2002). Strömungsdynamische Bedingungen und mechanische Belastungen könnten die VWF-Kollagen-Interaktion beeinflussen, wobei derzeit nicht eindeutig geklärt ist, welche Rolle diese Prozesse bei der VWF-Immobilisation auf der subendothelialen Matrix spielen (Ruggeri, 2003). Durch die unter Scherbelastung stattfindende Immobilisierung des VWF an der subendothelialen Matrix wird das globuläre VWF-Molekül lang gestreckt (Siedlecki *et al.*, 1996) und eine Bindungsstelle innerhalb der A1-Domäne, welche die

Interaktion des VWF mit dessen korrespondierenden thrombozytären Rezeptorkomplex (GPIb-IX-V) vermittelt, freigelegt, so dass die Blutplättchen an den kollagengebundenen VWF anhaften können (Varughese *et al.*, 2002).

Die Interaktion von löslichem VWF mit Kollagen Typ IV läuft im Gegensatz zu dessen Interaktion mit Kollagen Typ I, III und VI nicht direkt, sondern indirekt, bzw. blutplättchenvermittelt ab (van Zanten *et al.*, 1996; Farndale *et al.*, 2004). Der VWF bindet hierbei zunächst an die Thrombozyten und dann erst an das exponierte Kollagen Typ IV (van Zanten *et al.*, 1996; Farndale *et al.*, 2004).

Der thrombozytäre GPIb-IX-V-Rezeptorkomplex setzt sich aus den 4 Polypeptidketten GPIb $\alpha$  (Molekulargewicht: 135 kDa), GPIb $\beta$ , GPIX und GPV zusammen (Andrews *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2005). Die VWF-bindende Domäne dieses Rezeptorkomplexes befindet sich im N-Terminus der GPIb $\alpha$ -Untereinheit (Huizinga *et al.*, 2002; Uff *et al.*, 2002; Lopez *et al.*, 2005) und wird extrazellulär in einem 500 Å langen Proteinstrang exponiert, so dass die Interaktion des GPIb-IX-V-Komplexes mit dem subendothelial fixierten VWF auch unter Flussbedingungen mit hohen Scherraten erfolgen kann (Lopez *et al.*, 2005). Die VWF-vermittelte Thrombozyten-Matrix-Interaktion ist nur von transienter Dauer ( $\leq$  Sekunden) und kann alleine nicht zur Bildung eines wund- oder gefäßverschließenden Plättchenaggregates führen (Wootton *et al.*, 1999; Reininger *et al.*, 2004). Nach dem initialen VWF-GPIb $\alpha$ -vermittelten Abbremsen („*tethering*“) und Rollen („*rolling*“) der Thrombozyten an der extrazellulären Matrix führen die Interaktionen anderer thrombozytärer Rezeptoren, wie z. B. die der Kollagenrezeptoren Integrin  $\alpha_2\beta_1$  und GPVI mit subendothelial exponiertem Kollagen, zur stabilen Adhäsion, Aktivierung, Sekretion und Aggregation der Blutplättchen (Savage *et al.*, 1998; Ruggeri, 2002; Farndale *et al.*, 2004; Nesbitt *et al.*, 2006).

Die Interaktion des VWF mit dem thrombozytären GPIb-IX-V-Komplex erhöht darüber hinaus auch die Bindeaffinität von GPIIb/IIIa für dessen Liganden Fibrinogen, sowie für immobilisierten VWF, was zu einer Verstärkung der Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung beiträgt (Nesbitt *et al.*, 2002; Gibbins, 2004; Kasirer-Friede *et al.*, 2004). Die Aktivierung und Bindung des Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  durch Fibrinogenmoleküle und VWF-Multimere vermittelt über „*outside-in signaling*“ die Freisetzung löslicher Agonisten wie ADP und TxA2 und trägt somit zur Amplifikation der Thrombozytenaktivierung bei (Nesbitt *et al.*, 2006).

Abgesehen von ihrer Rolle beim initialen Anhaften der Thrombozyten unter Strömung mit hohen Scherraten, ist die VWF-GPIb $\alpha$ -Achse, in ähnlicher Weise wie der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa, auch an der Adhäsion weiterer Thrombozyten an der ersten adhären Plättchenschicht und somit an der Thrombozyten-Thrombozyten-Interaktion in einem wachsenden Plättchenaggregat beteiligt (Sakariassen *et al.*, 1986; Savage *et al.*, 1998; Ruggeri

*et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2003; Ruggeri *et al.*, 2006; Maxwell *et al.*, 2007). Die Bedeutung der VWF-GPIb $\alpha$ -Interaktion steigt hierbei mit zunehmender Scherrate an (Goto *et al.*, 1998; Tsuji *et al.*, 1999; Kulkarni *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2003). Von 0 s<sup>-1</sup> bis in etwa 1000 s<sup>-1</sup> wird die Thrombozytenaggregation vornehmlich durch die Interaktion von löslichem Fibrinogen mit dem aktivierten Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  vermittelt (Savage *et al.*, 1996; Ruggeri, 1997; Savage *et al.*, 1998; Maxwell *et al.*, 2007). VWF und GPIb $\alpha$  spielen bei diesen Strömungsverhältnissen keine Rolle (Maxwell *et al.*, 2007). Mit zunehmenden Scherraten von 1000 s<sup>-1</sup> bis 10.000 s<sup>-1</sup> allerdings wird die Aggregation mehr und mehr VWF-GPIb $\alpha$ -abhängig, wobei der Fibrinogen-GPIIb/IIIa-Interaktion zusehends eine eher untergeordnete Bedeutung zukommt (Maxwell *et al.*, 2007). Scherraten von mehr als 10.000 s<sup>-1</sup>, wie sie beispielsweise in stark stenosierten atherosklerotischen Arterien auftreten können, sind *per se* ohne Gefäßwandverletzung in der Lage, eine Thrombozytenaktivierung und Aggregation zu verursachen (Kroll *et al.*, 1996; Savage *et al.*, 1996; Ruggeri *et al.*, 2006; Maxwell *et al.*, 2007), welche ausschließlich von der VWF-GPIb $\alpha$ -Bindung abhängt (Ruggeri *et al.*, 2006). Die scherinduzierte VWF-GPIb $\alpha$ -Interaktion kann verschiedene Signaltransduktionswege auslösen, welche an intrazellulären und transzellulären Kalziumflux gekoppelt sind und zur Aktivierung des thrombozytären Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und damit zur Plättchenaktivierung, Sekretion und Aggregation führen (Nesbitt *et al.*, 2006).

## **2. Fragestellung der Arbeit**

Kardio- und cerebrovaskuläre Erkrankungen wie der akute Myokardinfarkt und ischämische Schlaganfälle zeichnen sich durch eine gemeinsame Pathogenese aus und werden häufig durch die Ruptur einer vorangeschrittenen, komplexen atherosklerotischen Läsion initiiert. Im Zuge dieses Vorganges kommt es zur Freisetzung zahlreicher prothrombogener Plaquesubstanzen, welche nach Kontakt mit dem Blutstrom die Bildung eines fatalen gefäßverschießenden fibrin- und plättchenreichen Thrombus induzieren können. Die Zusammensetzung vulnerabler atherosklerotischer Läsionen unterscheidet sich maßgeblich von der der gesunden Gefäßwand und bestimmt deren Thrombogenizität (Corti *et al.*, 2002b; Ruggeri, 2002). Vor allem die atheromatöse Region rupturanfälliger Plaques erwies sich als deutlich thrombogener, als die aus stabilen atherosklerotischen Läsionen isolierte kollagenreiche Matrix (Fernandez-Ortiz *et al.*, 1994; van Zanten *et al.*, 1994).

Von allen bisher beschriebenen prothrombogenen Plaquekomponenten wird der „*tissue factor*“ als der wichtigste Thrombus-induzierende Stimulus vulnerabler atherosklerotischer Läsionen angesehen (Toschi *et al.*, 1997; Viles-Gonzalez *et al.*, 2004). Man geht davon aus, dass der Plaque-„*tissue factor*“ nach seiner Freisetzung primär das extrinsische Gerinnungssystem aktiviert und somit die Bildung von Thrombin und Fibrin auslöst. Im Anschluss daran werden in einem zweiten Schritt die Plättchen durch das im Zuge der Gerinnung gebildete Thrombin aktiviert, so dass es zur Thrombozytenaggregation und schließlich zur Entwicklung eines fibrin- und plättchenreichen Thrombus kommen kann. In diesem Modell der Thrombusbildung nach Plaqueruptur werden die Blutplättchen also nicht direkt, sondern erst nach der Stimulation der Gerinnung durch den „*tissue factor*“ aktiviert. Zu Beginn dieser Arbeit war unklar, ob das atherosklerotische Plaquematerial direkt mit den Thrombozyten im Blut interagieren und auf diese Weise eine Thrombusbildung induzieren kann.

In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die im lipidreichen Kern atherosklerotischer Läsionen akkumulierte Lysophosphatidsäure in der Lage ist, gewaschene Thrombozyten direkt über deren LPA-Rezeptoren zu aktivieren, sowie deren Gestaltwandel („*shape change*“) zu induzieren (Siess *et al.*, 1999; Rother *et al.*, 2003). LPA stellt allerdings für sich genommen einen relativ schwachen Plättchenstimulus dar und kann alleine keine Aggregation der Thrombozyten im Blut hervorrufen (Haseruck *et al.*, 2004). Die LPA-stimulierte Plättchenaggregation im Blut hängt von extrazellulärem ADP und dessen Interaktion mit den thrombozytären ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> ab (Haseruck *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit stellte sich nun zunächst die Frage, ob außer dem isolierten lipidreichen Plaquekernbereich, welcher alleine keine Aktivierung der Thrombozyten in PRP und Blut induzierte, auch andere Bereiche atheromatöser Läsionen in der Lage sind, Plättchen in PRP

und Blut zu aktivieren, und ob diese Aktivierung direkt und somit „*tissue factor*“-unabhängig erfolgen kann. Darüber hinaus wurde untersucht, über welche Mechanismen die Plaque-stimulierte Thrombozytenaktivierung unter verschiedenen Strömungsverhältnissen abläuft, bzw. welche Plaquekomponenten und welche thrombozytären Rezeptoren und/oder sekundären Botenstoffe an diesem Vorgang beteiligt sind. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde der Effekt unterschiedlicher aktuell eingesetzter und möglicherweise zukünftig verabreichter antithrombozytärer Substanzen auf die Plaque-induzierte Plättchenadhäsion, Aktivierung und Aggregation untersucht. Analysiert wurden in diesem Zusammenhang verschiedene Kollagenrezeptor- und VWF-Rezeptor-blockierende Antikörper, sowie verschiedene ADP-Rezeptor-Antagonisten und Aspirin®.

Obwohl bisher eine Vielzahl antithrombozytärer Substanzen entwickelt wurde oder sich gerade in der Entwicklung befindet, gibt es aktuell keinen Thrombozytenfunktionshemmer, welcher spezifisch die plättchenabhängigen Mechanismen vaskulärer Erkrankungen inhibiert, ohne dabei mit der normalen, hämostatischen Thrombozytenfunktion zu interferieren. Aus diesem Grund bestand ein Ziel dieser Arbeit auch in der Suche nach einer optimalen antithrombozytären Strategie zur Prophylaxe und Therapie eines Gefäßverschlusses nach Plaqueruptur, welche die Hämostase nicht beeinflusst.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Materialien

#### 3.1.1. Geräte

Aggregometer	2-Kanal-LABOR <sup>®</sup> -Aggregometer, Fresenius AG (Bad Homburg, Deutschland); Lumi-Aggregometer „ <i>Platelet Ionized Calcium Aggregometer</i> (PICA <sup>®</sup> )“, Chronolog (Endingen, Deutschland)
Autoklaven	Autoklav 23, MELAG Medizintechnik (Berlin, Deutschland); Bioklav, Schütt Labortechnik GmbH (Göttingen, Deutschland)
Brutschrank	WTB Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Durchflusszytometer	FACScan, Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Gefrierschrank, -80°C	ULT1706, Revco Scientific (Asheville, NC, USA)
Gelelektrophorese-System	Biorad (München, Deutschland)
Impedanzaggregometer	Multiplate <sup>®</sup> -Gerät („ <i>multiple platelet function analyzer</i> “), Dynabyte Medical (München, Deutschland)
Magnetrührer	MR3001, Heidolph (Kehlheim, Deutschland)
Mikroskope	Aufrechtes Mikroskop Axioskop 2 plus, Zeiss (Jena, Deutschland); aufrechtes Mikroskop RBM 3, an digitale „Spot“-Kamera gebunden, Leica (Wetzlar, Deutschland); Lichtmikroskop D 65323, Leitz (Wetzlar, Deutschland); konfokales Laser Scanning Fluoreszenzmikroskop LSM 510Meta, Zeiss (Jena, Deutschland)



Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
pH-Meter	Model 765 Calimatic, Knick (Berlin, Deutschland)
Spektrophotometer	UVICON 930, Kontron Instruments (Neufahrn, Deutschland)
Spritzensaugpumpe	„Pump 33 Dual Syringe Pump“, Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA)
Thermomixer	Thermomixer kompakt, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Thrombelastograph	roTEM <sup>®</sup> -Gerinnungsanalysator, Pentapharm GmbH (München, Deutschland)
„Sysmex Platelet Counter“	PL-100, TOA Medical Electronics (Kobe, Japan)
„Sysmex Platelet Centrifuge“	PC-800, TOA Medical Electronics (Kobe, Japan)
Videokameras	schwarz-weiß Videokamera AVT BC-71, AVT Horn (Aalen, Deutschland); Pulnix CCD Kamera, JAI Inc. (San Jose, CA, USA)
Videorekorder	Model NV-HS930, Panasonic (Osaka, Japan)
Vortexer	REAX top, Heidolph (Kehlheim, Deutschland)
Waagen	Model BP 2100S und Modell R 160 P, Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Wasserbad	GFL GmbH (Burgwedel, Deutschland)
Zentrifugen	Biofuge pico, Omnifuge 2.0RS und Megafuge 1.0RS, Heraeus Sepatech (Osterode, Deutschland)
Zwei-Kanal-Linien-Schreiber	Servogor 102, Hinkel Elektronik (Pirmasens-Winzeln, Deutschland)

### **3.1.2. Verbrauchsmaterialien**

Butterflykanülen (19-Gauge)	Intermedica GmbH (Mainz, Deutschland)
Filme	Polapan, Polaroid (Offenbach, Deutschland)

Glasdeckgläschen	Ø 18 mm oder 24 x 50 mm, Corning BV (Schiphol-Rijk, Niederlande)
Hybond™-C extra Blotmembran	Amersham Biosciences (Ismaning, Deutschland)
„Lab-Tek chamber-slides“	Nunc (Wiesbaden, Deutschland)
Objektträger	26 x 76 mm, Menzel-Gläser GmbH (Braunschweig, Deutschland); 26 x 76 mm, silanisiert (Dako, Hamburg, Deutschland)
THROMBO-PLUS®-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

### **3.1.3. Chemikalien, Enzyme, Peptide, Antikörper, IgG Isotypkontrollen**

#### **3.1.3.1. Chemikalien**

Acetylsalicylsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	(37,5:1; 40% (w/v)), AMRESCO Inc. (Solon, Ohio, USA)
ADP	50704, Trinity Biotech Company (Lemgo, Deutschland)
Albumin, bovin, fettsäurefrei	A-7511, Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Apyrase (Adenosindi-/triphosphatase)	A-6535, Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
AR-C69931MX	AstraZeneca R&D Molndal (Molndal, Schweden)
ATP	Chronolog (Endingen, Deutschland)
„BM Blue POD Substrate“	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
CELLPACK™-Puffer	PK-30L, Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland)

Citrat, Monohydrat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Citrat, Trinatriumsalz	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
„dotMetric™-A 1 µl Protein Assay Kit“	Genotech (St. Louis, MO, USA)
Erythrolyselösung	Serotec GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Ficoll® Typ 70	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Formaldehydlösung (37% (w/v))	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kollagenreagens (Horm®)	Nycomed Pharma (Unterschleissheim, Deutschland)
Kollagen Typ I (aus Rinderhaut)	BD Biosciences (Bedford, MA, USA)
Kollagen Typ III (aus humaner Plazenta)	BD Biosciences (Bedford, MA, USA)
„Lowry Protein Assay Kit“	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Luziferin/Luziferase-Reagenz	Chrono-Lume®; Chronolog (Endingen, Deutschland)
Magermilchpulver	Biorad (München, Deutschland)
Mepacrin (Quinacrin-dihydrochlorid)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
MRS2179	M-3808, Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumcitratlösung	3,13% Trinatriumcitratdihydrat, Eifelfango (Bad Neuenahr-Ahrweiler, Deutschland)
Natriumdeoxycholat	D-6750, Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Phalloidin	Rhodamin gekoppelt, Molecular Probes™ (Eugene, OR, USA); Alexa Fluor®546 gekoppelt, Molecular Probes™ (Eugene, OR, USA)
Polyvinylpyrrolidon (PVP360)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Prostazyklin (PGI <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Proteaseinhibitorcocktail	P-8340, Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Refludan <sup>®</sup>	Lepirudin oder rekombinantes Hirudin, Pharmion Ltd. (Marburg, Deutschland)
Ristocetin	Rolf Greiner BioChemica (Flacht, Deutschland)
Rotiblock <sup>®</sup> (10x-Konzentrat)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
„SuperSignal <sup>®</sup> West Pico“-Chemilumineszenzsubstrat	Pierce (Rockford, IL, USA)
„Sircol <sup>™</sup> Kollagen Assay Kit“	Biocolor Ltd. (Belfast, Nordirland)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tween 20	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
„Zenon Rabbit IgG Labeling Kit“	Zenon <sup>™</sup> Alexa Fluor <sup>®</sup> 488/546/647, Molecular Probes <sup>™</sup> (Eugene, OR, USA)

Soweit nicht anders im Text vermerkt, wurden alle weiteren Chemikalien in p.a.-Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

### 3.1.3.2. Enzyme

Kollagenase Typ VII	aus <i>Clostridium histolyticum</i> ; C-0773, Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Korntrypsininhibitor	Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN, USA); Calbiochem, Merck Chemicals Ltd. (Darmstadt, Deutschland)

### 3.1.3.3. Peptide

CRP	GCO(GPO) <sub>10</sub> GCOG; kollagenverwandtes („collagen-related peptide“), GPVI-aktivierendes Peptid; (Morton <i>et al.</i> , 1995)
GFOGER-GPP	GPC(GPP) <sub>5</sub> GFOGER(GPP) <sub>5</sub> GPC; Integrin $\alpha_2\beta_1$ -blockierendes Peptid; (Knight <i>et al.</i> , 2000)

mCRP	monomeres kollagenverwandtes („ <i>monomeric collagen-related peptide</i> “), GPVI-blockierendes Peptid; (Morton <i>et al.</i> , 1995)
RGDS	Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ -blockierendes Tetrapeptid; Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

### 3.1.3.4. Antikörper

#### Primärantikörper

CD 14	monoklonales anti-CD14 Mäuse IgG2b, PE-gebunden; BD Biosciences (Bedford, MA, USA)
CD41a	monoklonales anti-CD41a Mäuse IgG1, FITC-gebunden; BD Biosciences (Bedford, MA, USA)
GPVI	10B12; anti-GPVI blockierende Einzelketten-Fv-Antikörperfragmente („ <i>single chain Fv antibody fragments</i> (scFvs)“); (Smethurst <i>et al.</i> , 2004; ;O'Connor <i>et al.</i> , 2006) Hemmexperimente: 50-200 $\mu\text{g/ml}$
GPVI	5C4; Fab-Fragmente eines monoklonalen anti-GPVI blockierenden Ratten IgG; (Massberg <i>et al.</i> , 2004) Hemmexperimente: 10 $\mu\text{g/ml}$
GPIIb $\alpha$	6B4; monoklonales anti-GPIIb $\alpha$ blockierendes Mäuse IgG1; (Cauwenberghs <i>et al.</i> , 2001) Hemmexperimente: 5 $\mu\text{g/ml}$
Integrin $\alpha_2\beta_1$	6F1; monoklonales anti-Integrin $\alpha_2$ blockierendes Mäuse IgG1; (Coller <i>et al.</i> , 1989) Hemmexperimente: 20 $\mu\text{g/ml}$

Integrin  $\alpha_2\beta_1$  P1E6; monoklonales anti-Integrin  $\alpha_2$  blockierendes Mäuse IgG1; Chemicon International (Temecula, CA, USA)

Hemmexperimente: 12,5  $\mu\text{g/ml}$

Kollagen Typ I polyklonales anti-Kollagen Typ I Kaninchen IgG; Rockland (Gilbertsville, PA, USA)  
 Immunfluoreszenz: 1:100; Immunhistochemie: 1:100;  
 Hemmexperimente: 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , bzw. 25  $\mu\text{g/ml}$ ;  
 Westernblot: 1:15.000

Kollagen Typ III polyklonales anti-Kollagen Typ III Kaninchen IgG; Rockland (Gilbertsville, PA, USA)  
 Immunfluoreszenz: 1:100; Immunhistochemie: 1:100;  
 Hemmexperimente: 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , bzw. 25  $\mu\text{g/ml}$ ;  
 Westernblot: 1:15.000

#### Sekundärantikörper

anti-Kaninchen IgG aus Ziege, Alexa Fluor<sup>®</sup>488- oder Alexa Fluor<sup>®</sup>546-gebunden; Molecular Probes<sup>™</sup> (Eugene, OR, USA)

anti-Kaninchen IgG aus Ziege, Meerrettichperoxidase („*horse raddish peroxidase*“ = HRP)-gebunden; Amersham Biosciences (Ismaning, Deutschland)

#### **3.1.3.5. IgG Isotypkontrollen**

2D4 anti-HLA Typ A2-Einzelketten-Fv-Antikörperfragmente „*single chain Fv antibody fragments (scFvs)*“;  
 Isotypkontrolle des anti-GPVI-Antikörpers 10B12;  
 (Smethurst *et al.*, 2004; O'Connor *et al.*, 2006)

Mäuse IgG1	MOPC-21; Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland); Isotypkontrolle des anti-GPIIb $\alpha$ -Antikörpers 6B4 sowie der anti-Integrin $\alpha_2$ -Antikörper 6F1 und P1E6
Kaninchen IgG	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland); Isotypkontrolle der anti-Kollagen Typ I- und der anti- Kollagen Typ III-Antikörper
Ratten IgG	Cymbus Biotechnology Ltd. (Hampshire, NF, USA); Isotypkontrolle des anti-GPVI-Antikörpers 5C4;
Ratten IgG	RmC 11H9; Isotypkontrolle des anti-GPVI-Antikörpers 5C4; (Massberg <i>et al.</i> , 2004)

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Präparation und Konservierung von humanem atherosklerotischen Plaquematerial aus der Arteria carotis

Dialysepuffer: 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05% (w/v) Chloramphenicol; pH 7,4

Im Rahmen gefäßchirurgischer Operationen, so genannter Thrombendarterektomien der Karotiden, wurden Gewebeproben atherosklerotischer Läsionen von Patienten mit Karotisstenose entnommen. Das Einverständnis der Patienten und die Genehmigung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München lagen hierbei jeweils vor dem Durchführen des Eingriffs vor. Bei der Entnahme der atherosklerotischen Läsion wurde strengstens darauf geachtet, dass weder Media noch Adventitia oder gesunde Intima zusammen mit dem Plaquematerial aus der Gefäßwand entfernt wurden. Durch die Anwendung des Operationsverfahrens der Thrombendarterektomie blieb die Struktur des gewonnenen Plaquematerials im ganzen („*en bloc*“) erhalten (Brandl *et al.*, 1997). Ausschließlich vorangeschrittene, lipidreiche atherosklerotische Läsionen, welche gemäß der Empfehlungen des „*Committee on Vascular Lesions of the Council of Atherosclerosis, American Heart Association*“ (Stary *et al.*, 1995) als so genannte Typ V-Atheromas klassifiziert wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit gesammelt und weiter bezüglich ihrer thrombozyten- und gerinnungsaktivierenden Eigenschaften untersucht. Die Typ V-Läsionen bestanden in der Regel aus einem lipidreichen und/oder nekrotischen Plauekern, welcher von fibrösem Gewebe umgeben war (Brandl *et al.*, 1997). Die makroskopische Zerlegung des Plaquematerials erfolgte

durch einen erfahrenen Gefäßchirurgen, der die atheromatöse Plaqueregion sorgfältig von angrenzenden Bereichen, wie der distalen kollagenreichen Plaqueschulterregion und der proximalen Region mit Bindegewebe, Schaumzellen und Lipidablagerungen abtrennte (Brandl *et al.*, 1997). Ein Teil der entnommenen atheromatösen Läsionen wurde in longitudinaler Richtung durchtrennt und eine Hälfte des Plaquematerials histomorphologisch charakterisiert, um die beschriebene makroskopische Zuordnung auch mikroskopisch verifizieren zu können (siehe Abschnitt 3.2.9.1). Die zweite Hälfte der atheromatösen Plaques wurde für Untersuchungen bezüglich ihrer plättchen- und gerinnungsaktivierenden Eigenschaften homogenisiert. Aus einigen besonders weichen Plaqueproben wurde nach vorsichtiger Längsteilung mit einem scharfen Skalpell das wachsartige, lipidreiche Kernmaterial, der so genannte „*lipid-rich core*“ des Plaques, stumpf herauspräpariert und auf die gleiche Weise wie die ganzen atheromatösen Läsionen weiter aufbereitet. Auch die fibrösen Kappen der vorangeschrittenen, lipidreichen atherosklerotischen Plaques einiger Patienten wurden separat präpariert und für weiterführende Analysen ihrer thrombozytenaktivierenden Eigenschaften homogenisiert.

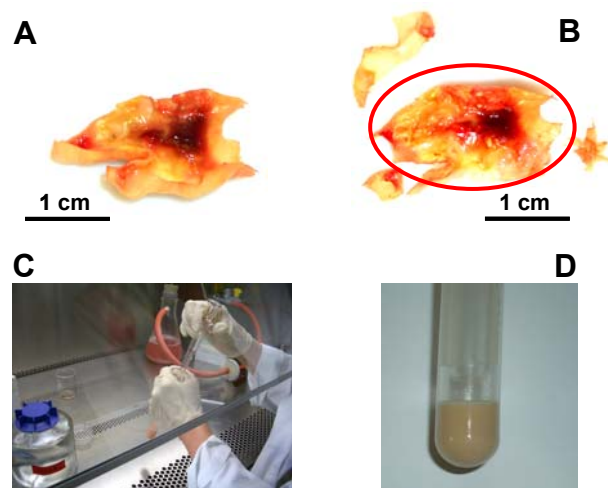
Zu Beginn dieser Arbeit verlief die Plaque-Aufbereitung wie folgt: Die atheromatösen Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Entnahme aus dem Patienten in ein 10 ml Polypropylen-Plastikgefäß überführt, bei 4°C gelagert, am gleichen oder Folgetag mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Nach dem vorsichtigen Auftauen der Plaqueproben auf Eis, wurden diese abgewogen, mit einem scharfen Skalpell zerkleinert und mit Glaspotter (10 ml Fassungsvermögen) und zylindrischem Glaspistill in Dialysepuffer homogenisiert (Endkonzentration: 50 oder 100 mg Feuchtgewicht/ml). Die so entstandenen Plaquesuspensionen wurden in 500 µl-Portionen aliquotiert und bis zur ihrem weiteren Einsatz bei -80°C gelagert. Sich wiederholende Einfrier- und Auftauzyklen der Plaquehomogenate wurden vermieden. Nahezu alle der in dieser Arbeit gezeigten Experimente wurden mit den auf diese Weise aufbereiteten atheromatösen Plaquehomogenaten (Abkürzungen: A-Plaques oder AP für atheromatöse Plaques) durchgeführt.

Da nicht alle der untersuchten Plaquehomogenate in der Lage waren Thrombozyten zu aktivieren und Fibrinbildung zu induzieren, wollten wir klären, ob die Stabilisation der plättchen- und gerinnungsaktivierenden Plaquekomponenten möglicherweise durch eine Modifikation der oben beschriebenen Plaque-Aufbereitungsmethode verbessert werden könnte. Um zu überprüfen, ob die Lagerung des Plaquematerials unmittelbar nach der Thrombendarrektomie einen Einfluss auf die Plaque-Aktivität hatte, wurden die Gewebeproben nach ihrer Entnahme aus dem Patienten nicht wie zuvor bei 4°C aufbewahrt, sondern sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Nach vorsichtigem Auftauen auf Eis wurden die Plaqueproben abgewogen, mit einem Skalpell zerkleinert, mit Glaspotter und Pistill in Dialysepuffer homogenisiert



(Endkonzentration: 100 mg Feuchtwicht/ml), zu je 100  $\mu$ l aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Auch bei diesen Homogenaten wurden häufige Einfrier- und Auftauzyklen vermieden. Die mittels dieses Verfahrens hergestellten Plaquesuspensionen (Abkürzungen: G-Plaques oder GP für schock gefrorene atheromatöse Plaques) kamen nur in einzelnen Experimenten dieser Arbeit zum Einsatz (siehe Abschnitte 4.3.3.1, 4.4, 4.5.1.2 und 4.7.1).

Die dritte Variation der Plaque-Aufbereitungsmethode bestand darin, die Gewebeproben wie zuvor die G-Plaques unmittelbar nach chirurgischer Entnahme in flüssigem Stickstoff schock zu gefrieren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufzubewahren, aber im Unterschied zu den vorangegangenen Verfahren, unter sterilen Bedingungen weiter zu verarbeiten. Nach dem vorsichtigen Auftauen des atherosklerotischen Plaquegewebes (Abb. 3.1 A) auf Eis, wurde die atheromatöse Plaqueregion präpariert (Abb. 3.1 B). Diese wurde anschließend abgewogen, mit einem Skalpell zerkleinert und in Dialysepuffer mit Glaspotter und Pistill homogenisiert (Endkonzentration: 100 mg Feuchtwicht/ml) (Abb. 3.1 C und D).



**Abb. 3.1: Herstellung eines Plaquehomogenates unter sterilen Bedingungen.** A) Digitalfotographische Aufnahme eines atherosklerotischen Plaquegewebes (Typ V-Atheromas) nach chirurgischer Entfernung aus einem Patienten mit Karotisstenose. B) Digitalfotographische Aufnahme nach Präparation der atheromatösen Plaqueregion (rot umrandet), welche weiter zu einem Plaquehomogenat aufbereitet wurde. C) Homogenisieren der atheromatösen Plaqueregion mit Glaspotter und zylindrischem Glaspistill unter sterilen Bedingungen. D) Fertiges Plaquehomogenat.

Die auf diese Weise gewonnen Plaquesuspensionen wurden in 100  $\mu$ l-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Sich wiederholende Auftau- und Einfrierzyklen der Plaquehomogenate wurden vermieden. Die mittels dieses Verfahrens hergestellten Plaquesuspensionen (Abkürzungen: GS-Plaques oder GSP für gefrorene, sterile atheromatöse Plaques) kamen ausschließlich in den Experimenten des Abschnitts 4.7.1 dieser Arbeit zum Einsatz. Diese dritte Methode der Plaque-Aufbereitung

wurde mit weiteren Verfahren verglichen: Ein Teil des frisch entnommenen Plauegewebes wurde nicht sofort schockgefroren, sondern nach kurzer Lagerung von maximal 2 h bei 4°C in Dialysepuffer mit oder ohne Proteaseinhibitorcocktail homogenisiert und anschließend wieder bei 4°C gelagert. Zusätzlich wurde ein Teil der frisch entnommenen Plaueproben in Dialysepuffer mit oder ohne 20%, bzw. 30% Glycerin homogenisiert, schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Diese auf unterschiedliche Weise konservierten Plauehomogenate wurden bezüglich ihrer thrombozyten- und gerinnungsaktivierenden Eigenschaften miteinander verglichen (siehe Abschnitt 4.7.1).

### 3.2.2. Blutabnahme

<u>ACD-Puffer:</u>	111 mM Glukose, 85 mM Trinatriumcitratdihydrat, 65 mM Citratmonohydrat; <i>pH</i> 4,5
<u>HEPES-Puffer:</u>	20 mM HEPES, 2,9 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 138 mM NaCl, 0,36 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; <i>pH</i> 7,4
<u>Citratlösungen:</u>	3,13% (w/v) Trinatriumcitratdihydratlösung (Eifelfango, Bad Neuenahr-Ahrweiler, Deutschland) oder 3,13% (w/v) Trinatriumcitratdihydrat gelöst in HEPES-Puffer
<u>Hirudinlösungen:</u>	2000 U/ml rekombinantes Hirudin gelöst in 0,9% NaCl-Lösung ( <i>pH</i> 7,4) oder 2000 U/ml rekombinantes Hirudin gelöst in HEPES-Puffer

Die Blutabnahme von peripher-venösem Blut aus der *Vena cubitalis* von gesunden Probanden (20 bis 50 Jahre) erfolgte mittels einer 19-G-Butterflykanüle und 50 ml Plastikspritzen, in welchen je nach Versuchsansatz verschiedene Volumina an Antikoagulantien vorgelegt wurden (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1: Antikoagulansvolumina, welche in Plastikspritzen zur Herstellung unterschiedlich gerinnungsblockierter Blutproben vorgelegt wurden.**

Versuchsansatz	vorgelegte Antikoagulansvolumina
<b>gewaschene Thrombozyten</b>	1/6 Volumen ACD-Puffer
<b>Citratblut</b>	1/10 Volumen Citratlösung (finale Citratkonzentration im Blut: 0,313%)
<b>Citrat-ASS-Blut</b>	1/10 Volumen Citratlösung plus 10 mM ASS (finale Konzentrationen im Blut: 0,313% Citrat; 1 mM ASS)
<b>Hirudinblut</b>	1/10 Volumen Hirudinlösung (finale Hirudinkonzentration im Blut: 200 U/ml oder 13 µg/ml)
<b>Hirudin-ASS-Blut</b>	1/10 Volumen Hirudinlösung plus 10 mM ASS (finale Konzentrationen im Blut: 200 U/ml Hirudin; 1 mM ASS)

Die Probanden wurden vor jeder Blutabnahme über mögliche Risiken aufgeklärt und haben entsprechend dem Protokoll von Helsinki ihr Einverständnis erklärt. Alle Probanden gaben an, mindestens 2 Wochen vor der Blutentnahme keinerlei Medikamente eingenommen zu haben.

Ausgenommen hiervon waren hormonelle Empfängnisverhütungsmittel. Während und unmittelbar nach der Blutabnahme wurden die Plastikspritzen leicht geschwenkt, um das vorgelegte Antikoagulans gleichmäßig im abgenommenen Blut zu verteilen, und somit die Blutgerinnung effektiv zu blockieren. Die ersten 3 ml des entnommenen Blutes wurden jeweils verworfen, um Verunreinigungen des Blutes mit Gewebethromboplastin zu vermeiden.

### **3.2.3. Präparation von humanem plättchenreichem und plättchenarmem Plasma sowie humaner gewaschener Thrombozyten**

#### Plättchenreiches Plasma (PRP)

Zur Gewinnung von PRP wurde gesunden Probanden peripher-venöses Blut aus der Kubitalvene wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben entnommen. Das antikoagulierte Blut wurde unmittelbar nach der Abnahme in 50 ml Polypropylenröhrchen überführt und zur Gewinnung von PRP für 20 min bei RT mit 160 x g (ohne Bremse) zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das PRP vorsichtig aus dem Überstand abgenommen. 20 µl des PRP wurden zur Thrombozytenzählung in 2 ml THROMBO-PLUS®-Puffer überführt, und die Blutplättchenzahl in einer Neubauer-Zählkammer gemäß den Angaben des Herstellers mit Hilfe des Lichtmikroskops Leitz D-65323 bestimmt. Adhäsions-, Aggregations- oder Gerinnungsexperimente mit dem PRP wurden bis maximal 3 h nach der Blutabnahme durchgeführt.

#### Plättchenarmes Plasma (PPP)

Das PRP wurde für 10 min bei RT mit 1.000 x g (mit Bremse) zentrifugiert, und das sich im Überstand befindliche PPP anschließend vorsichtig abgenommen. Die Gerinnungsexperimente mit dem PPP wurden bis maximal 5 h nach der Blutabnahme durchgeführt.

#### Gewaschene Thrombozytensuspensionen

ACD-Puffer: 111 mM Glukose, 85 mM Trinatriumcitratdihydrat, 65 mM Citratmonohydrat; *pH 4,5*

Tyrode-Albumin-Puffer: 0,35 % (w/v) Albumin (fettsäurefrei), 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Glukose, 10 mM HEPES, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 137 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; *pH 7,3*

Puffer B: 20 mM HEPES, 2,9 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 138 mM NaCl, 0,36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; *pH 6,2*

Puffer C: 5 mM Glukose, 20 mM HEPES, 2,9 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 138 mM NaCl, 0,36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; *pH 7,4*

Zur Herstellung einer Suspension gewaschener Thrombozyten nach der so genannten „Gachet-Standard-Methode“ (modifizierte Methode nach Cazenave *et al.*) (Cazenave *et al.*, 1993), wurde gesunden Probanden peripher-venöses Blut aus der Kubitalvene wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben entnommen. Die Blutabnahme erfolgte mittels einer 19-G-Butterflykanüle und 50 ml Plastikspritzen, in denen 1/6 Volumen ACD-Puffer vorgelegt war. Sofort nach der Abnahme wurde das Blut in 50 ml Polypropylenröhrchen überführt und zur Gewinnung von PRP für 20 min bei RT mit 160 x g (ohne Bremse) zentrifugiert. Das PRP im Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bei 37°C für 15 bis 30 min im Wasserbad inkubiert. Die Thrombozyten wurden anschließend durch Zentrifugation bei 1.570 x g (mit Bremse) pelletiert. Die Zentrifugationszeit war hierbei von der Menge des gewonnenen PRP pro Röhrchen abhängig (Tab. 3.2).

**Tab. 3.2: Zentrifugationszeit des plättchenreichen Plasmas nach Cazenave *et al.* (Cazenave *et al.*, 1993).**

Plasmamenge [ml]	15	20	25	30	35	40
Zentrifugationszeit [min]	10	12	13	14	15	16

Nach der Zentrifugation wurde das PPP sorgfältig und möglichst komplett abgenommen. Das Plättchenpellet wurde anschließend vorsichtig in 10 ml 37°C-warmem Tyrode-Albumin (0,35% (w/v))-Puffer resuspendiert, die Thrombozytensuspension mit 1 µM Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) versetzt und für 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Thrombozytensuspension nochmals mit 1 µM PGI<sub>2</sub> versetzt und bei RT für 8 min mit 1.100 x g (mit Bremse) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Thrombozytenpellet in 10 ml 37°C-warmen, albuminfreien Puffer B, welcher 0,3 U/ml Apyrase enthielt, aufgenommen. 20 µl der Puffer B-Suspension wurden zur Thrombozytenzählung in 2 ml THROMBO-PLUS<sup>®</sup>-Puffer überführt, und die Blutplättchenzahl in einer Neubauer-Zählkammer gemäß den Angaben des Herstellers mit Hilfe des Lichtmikroskops Leitz D-65323 bestimmt. Nach erneuter Pelletierung der Thrombozyten bei RT für 8 min mit 1.100 x g (mit Bremse), wurde das Blutplättchensediment in 37°C warmem 0,1% (w/v) Albumin- und 0,3 U/ml Apyrase-haltigem Puffer C aufgenommen. Die Thrombozytenkonzentration in der Suspension wurde durch entsprechendes Variieren des Volumens an Puffer C gemäß folgender Rechnung eingestellt:

$$\frac{\text{gezählte Thrombozytenzahl in Puffer B-Suspension} \times 10.000}{\text{gewünschte Thrombozytenzahl}/\mu\text{l Puffer C-Suspension}} \times 10 \text{ ml Puffer B} = x \text{ ml Puffer C}$$

Um die Voraktivierung der gewaschenen Blutplättchen in der fertigen Thrombozytensuspension zu minimieren, wurde diese für mindestens 30 min zum Ruhen bei

RT stehen gelassen. Aggregations-, Sekretions- und Adhäsionsexperimente mit gewaschenen Thrombozytensuspensionen wurden bis maximal 4 h nach der Blutabnahme durchgeführt.

### **3.2.4. Turbidimetrische Messung von Thrombozytengestaltwandel („*shape change*“) und Aggregation**

Bei der turbidimetrischen Messung von Thrombozytengestaltwandel und Aggregation nach Born (Born *et al.*, 1963) handelt es sich um eine Methode, welche die Lichttransmission einer gerührten Thrombozytensuspension oder von gerührtem PRP misst. Nach Zugabe eines Thrombozytenagonisten kommt es zur Sphärisierung (Gestaltwandel oder „*shape change*“) der initial diskoiden Blutplättchen, und dadurch zu einer Minderung der Lichttransmission und zur Abnahme der Oszillationen. Durch Aggregation der Blutplättchen nimmt die Anzahl der korpuskulären Bestandteile der Suspension ab, und daher die Lichttransmission zu.

Die Messung von Thrombozytengestaltwandel und der Aggregation erfolgte mittels eines 2-Kanal-LABOR<sup>®</sup>-Aggregometers der Firma Fresenius (Bad Homburg, Deutschland) sowie mittels eines Lumi-Aggregometers (siehe Abschnitt 3.2.5). Beide Geräte verwenden Weißlicht einer Wolframlampe und eine Photoelektrode zur Transmissionsmessung. Einweg Aggregationsküvetten wurden mit 400 µl Thrombozytensuspension (400.000 Thrombozyten/µl) oder PRP befüllt und nach einer ein- bis maximal fünfminütigen Vorinkubation bei 37°C mit oder ohne entsprechende Hemmsubstanzen in den Strahlengang der Aggregometer überführt. Nach Zugabe verschiedener Blutplättchenstimuli (ADP, atheromatöse Plaquehomogenate, Horm<sup>®</sup>-Kollagen, Ristocetin, etc.) wurde bei kontinuierlichem Rühren (1.100 rpm) die Sphärisierung, bzw. die Aggregation der Thrombozyten mit Hilfe eines 2-Kanal-Linien-Schreibers fortlaufend aufgezeichnet (Dauer: in der Regel 3 min). Die exakten Protokolle für die individuellen Versuchsansätze sind im Ergebnissteil aufgeführt.

Die Quantifizierung von „*shape change*“ oder Aggregation erfolgte durch das Ausmessen der Abweichung der Lichttransmission von der Basallinie in mm. Die maximale Abnahme der Lichttransmission von der Basallinie bei vollständigem Gestaltwandel, bzw. die maximale Zunahme der Lichttransmission bei vollständiger Aggregation wurden hierbei als 100%-Wert definiert und die weiteren Messwerte dazu in Relation gesetzt. In vielen Experimenten wurde die Horm<sup>®</sup>-Kollagen (2,5 µg/ml)-induzierte maximale Ab- und Zunahme der Lichttransmission als 100% „*shape change*“ und 100% Aggregation definiert. Die weiteren Messwerte wurden zu diesen Werten in Relation gesetzt. Zur absoluten Bestimmung der Veränderung der Lichttransmission, wurde in manchen Experimenten die Lichttransmission von PRP als 0%, die von PPP als 100% definiert. Die weiteren Messwerte wurden dann zu diesen Werten in Relation gesetzt.

### **3.2.5. Bestimmung der ATP-Sekretion in Suspensionen gewaschener Thrombozyten und im PRP**

Puffer C: 20 mM HEPES, 2,9 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 138 mM NaCl, 0,36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

Die ATP-Sekretion von Thrombozyten wurde während der Thrombozytenaktivierung in einem Lumi-Aggregometer („*Platelet Ionized Calcium Aggregometer*“ (PICA®)) bestimmt. Mit diesem Gerät ist es möglich gleichzeitig turbidimetrisch den Blutplättchen-„*shape change*“ und die Aggregation, sowie mittels des Luziferin-Luziferase-Assays die ATP-Sekretion von Thrombozyten während deren Aktivierung zu ermitteln.

Das Lumi-Aggregometer wurde hierfür auf 37°C vorgewärmt und 2 Thrombozytensuspensionen aus der initialen Suspension gewaschener Blutplättchen (400.000 Thrombozyten/μl) erstellt. Durch die Zugabe von 15 μl Puffer C zu 385 μl Thrombozytensuspension, sowie von 100 μl Puffer C zu 300 μl Thrombozytensuspension wurden eine plättchenreiche (PRS) und eine plättchenarme Suspension (PAS) gewaschener Thrombozyten erzeugt. Für die Experimente im PRP wurde an Stelle der plättchenarmen Suspension plättchenarmes Plasma (PPP) verwendet. Im Lumi-Aggregometer wurde die Lichttransmission im Vergleich PRS/PAS, bzw. PRP/PPP gemessen, und die Basallinie entsprechend eingestellt. Die ATP-Sekretion wurde bei kontinuierlichem Rühren (1.000 rpm) während der Blutplättchenaktivierung und Aggregation nach der Zugabe von 15 μl Luziferin-Luziferase-Reagenz zu 385 μl Thrombozytensuspension, bzw. PRP und der Zugabe verschiedener Thrombozytenagonisten (z. B. atheromatöses Plaquematerial, Horm®-Kollagen) bestimmt. Die Messungen wurden bis maximal 3 h nach der Blutabnahme durchgeführt.

### **3.2.6. Bestimmung der Thrombozytenaggregation im Blut**

#### **3.2.6.1. Einzel-Thrombozyten-Zählung („*single platelet counting*“)**

Fixationspuffer: 150 mM NaCl, 4,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,6 mM Na<sub>2</sub>EDTA,  
0,16% (w/v) Formaldehyd

Nach vorliegender Einverständniserklärung, wurde gesunden Probanden wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben peripher-venöses Blut aus der *Vena cubitalis* entnommen. Die Messung der Thrombozytenaggregation im Blut erfolgte geringfügig modifiziert nach Fox *et al.* (Fox *et al.*, 1982) durch Messung der Abnahme der Thrombozytenkonzentration. Bis zur Versuchsdurchführung wurde das antikoagulierte Blut bei RT aufbewahrt und 400 μl davon 2 min vor dem eigentlichen Experiment in einer Aggregationsküvette im Thermoblock eines 2-

Kanal-LABOR<sup>®</sup>-Aggregometers mit oder ohne entsprechende Hemmsubstanzen bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Küvette in die Röhreinrichtung des Aggregometers überführt und das Blut mit 1.000 rpm gerührt. Unmittelbar vor und zu variierenden Zeitpunkten nach der Zugabe verschiedener Thrombozytenagonisten (z. B. atheromatöses Plaquematerial, Horm<sup>®</sup>-Kollagen) wurde ein Aliquot (15 µl) des gerührten Blutes in ein 1 ml Eppendorf-Plastikgefäß überführt, in welchem 30 µl Fixationspuffer vorgelegt waren. Die fixierten Proben wurden mit 955 µl CELLPACK<sup>™</sup>-Puffer verdünnt, für 6 min bei in etwa 940 rpm (entsprechen ca. 80 x g) in der „*Sysmex Platelet Centrifuge PC-800*“ zentrifugiert und der Überstand, welcher die einzelnen Thrombozyten enthielt, weiter mit 10 ml CELLPACK<sup>™</sup>-Puffer vermischt. Die Blutplättchen in den Verdünnungen wurden mit Hilfe einer elektronischen Zählmaschine, dem „*Sysmex Platelet Counter PL-100*“, gezählt. In dieser Zählmaschine durchqueren die einzelnen Thrombozyten eine kleine Öffnung des Messwertgebers und erzeugen hierbei ein direkt zu ihrer Größe proportionales elektrisches Signal. Die % Thrombozytenaggregation im antikoagulierten Blut wurden als „% Abnahme der Thrombozyten“ im Vergleich zum Basalwert vor der Zugabe verschiedener Agonisten dargestellt und wie folgt berechnet:

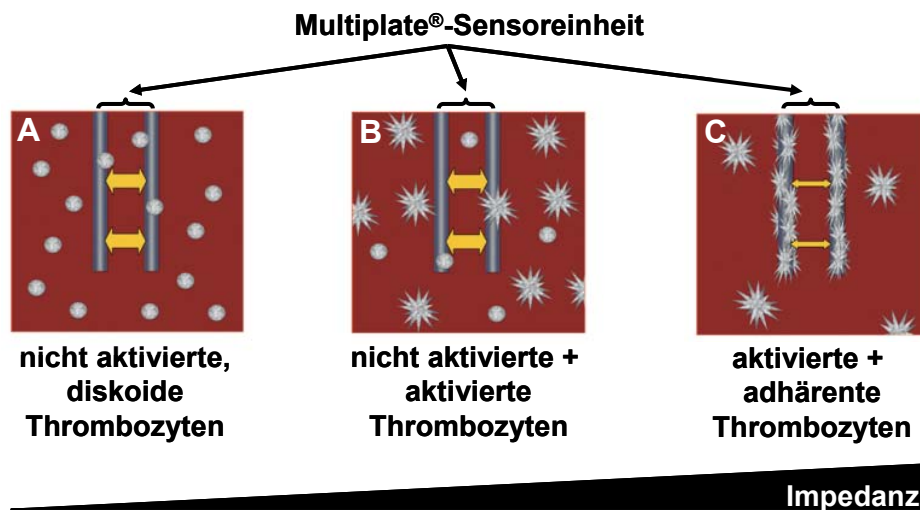
$$\text{Aggregation im Blut [\%]} = 100\% - \left( \frac{\text{Plättchenzahl nach der Aktivierung} \times 100 \text{ \%}}{\text{Plättchenzahl vor der Aktivierung}} \right)$$

Alle Messungen der Thrombozytenaggregation im Blut wurden jeweils in Duplikaten und bis maximal 3 h nach der Blutabnahme durchgeführt.

### **3.2.6.2. Impedanzaggregometrie (Multiplate<sup>®</sup>-System)**

Als zweite Methode der Bestimmung der Thrombozytenaggregation im Blut wurde wie von Tóth *et al.* beschrieben die Multiplate<sup>®</sup>-Analyse eingesetzt (Toth *et al.*, 2006). Das Multiplate<sup>®</sup> („*multiple platelet function analyzer*“)-System der Firma Dynabyte Medical (München, Deutschland) stellt eine neue Methode zur Messung der Thrombozytenfunktion in antikoaguliertem Blut dar und basiert auf einer Weiterentwicklung der Impedanzaggregometrie, welche in den 80er Jahren von Cardinal und Flower (Cardinal *et al.*, 1980) eingeführt wurde. Das Messprinzip des Multiplate<sup>®</sup>-Systems beruht auf der Tatsache, dass Thrombozyten unter normalen Bedingungen im nicht aktivierten und nicht thrombogenen Zustand im Blut zirkulieren (Abb. 3.2 A), jedoch nach Stimulation durch verschiedenste Agonisten an ihrer Oberfläche Rezeptoren exponieren, welche die Plättchenadhäsion an Gefäßwandverletzungen, sowie an körperfremden Oberflächen wie beispielsweise den Sensoroberflächen der Multiplate<sup>®</sup>-Messzellen erlauben (Abb. 3.2 B und C). Sobald die Thrombozyten der Blutprobe aktiviert werden, adhären und aggregieren, bzw. akkumulieren sie an den Sensoreinheit (Elektrodenpaar aus Kathode und Anode) der Multiplate<sup>®</sup>-Messzelle und erhöhen dadurch den elektrischen Widerstand (Impedanz) zwischen Kathode und Anode, welcher ein Maß für die

Plättchenaggregation darstellt (Abb. 3.2 B und C). Die Änderung des elektrischen Widerstands, bzw. die Aggregation wird hierbei fortlaufend im Multiplate®-Gerät aufgezeichnet und gegen die Zeit aufgetragen.



**Abb. 3.2: Schematischer Ablauf der Multiplate®-Impedanzaggregometrie.** A) Nicht aktivierte, diskoidale Thrombozyten einer 1:2 mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnten, antikoagulierten Blutprobe zirkulieren vor der Zugabe eines Plättchenagonisten frei in der Multiplate®-Messzelle. B) Durch die Zugabe eines Thrombozytenstimulus werden die nicht aktivierten Plättchen in der Multiplate®-Messzelle aktiviert und beginnen sich an die Sensoroberflächen (Elektrodenpaar aus Kathode und Anode) der Multiplate®-Sensoreinheit anzulagern. C) Adhärente Thrombozyten, bzw. Thrombozytenaggregate bilden eine Isolationsschicht auf der Oberfläche der Multiplate®-Sensoreinheit und erhöhen dadurch den elektrischen Widerstand (Impedanz) zwischen den Elektroden.

Das Multiplate®-Gerät besitzt 5 unabhängige Messeinheiten (Abb. 3.3 A), und pro Messeinheit werden wie bereits in Abb. 3.2 dargestellt je 2 voneinander unabhängige, parallel angeordnete Sensoreinheiten bestehend aus 2 Sensordrähten (Elektrodenpaare aus Kathode und Anode) einer Multiplate®-Einwegmesszelle in eine zirkulierende Blutprobe eingetaucht (Abb. 3.3 B). Die Sensordrähte besitzen einen Durchmesser von 0,3 mm und kontaktieren das Blut in der Messzelle über einen 3 mm langen Bereich.



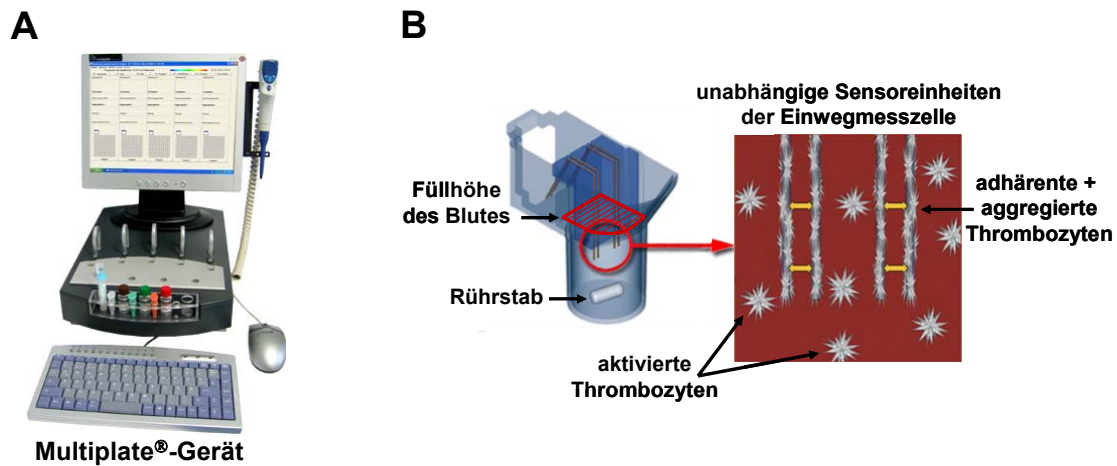


Abb. 3.3: Aufbau des Multiplate®-Systems. Übersicht über das Multiplate®-Gerät (A) und schematische Darstellung der Multiplate®-Einwegmesszelle (B) mit den 2 voneinander unabhängigen, parallel angeordneten Sensoreinheiten, bzw. Elektrodenpaaren, mittels welcher die Messung der Thrombozytenaggregation in 1:2 in 0,9% NaCl-Lösung verdünntem, antikoaguliertem Blut erfolgt (Vergrößerung).

Zur Analyse der Thrombozytenaggregation werden 300 µl Citrat- oder Hirudin-antikoaguliertes Blut 1:2 mit 0,9% NaCl-Lösung vermischt und in der Multiplate®-Einwegmesszelle bei 37°C mittels eines magnetischen Polytetrafluorethylen-beschichteten Rührstabes bei 800 rpm für 3 min mit oder ohne Hemmsubstanzen vorinkubiert. Anschließend wurden verschiedene Thrombozytenagonisten wie z. B. ADP, atheromatöses Plaquematerial, Horm®-Kollagen oder Ristocetin zugegeben und die Veränderung der elektrischen Impedanz aufgezeichnet (Dauer: 5-7 min). Die doppelte Messung der Impedanz, bzw. Aggregation an den 2 voneinander unabhängigen Sensoreinheiten der Messzelle stellt eine interne Qualitätskontrolle der Aggregationsmessung jeder einzelnen Messeinheit dar und verbessert die Reproduzierbarkeit des Verfahrens. Die Mittelwerte der 2 unabhängigen Messungen werden als so genannte Aggregationseinheiten (AE) angegeben. Des Weiteren wird die Fläche unter der Aggregationskurve („area under the curve“ = AUC) bestimmt, um ein Maß für die Aggregation bezogen auf die Zeit (Aggregationseinheiten x min = AE x min) wiedergeben zu können. Alle Messungen am Multiplate®-Gerät wurden frühestens 45 min und bis maximal 3 h nach der Blutabnahme durchgeführt.

### 3.2.7. Bestimmung der Thrombozyten-Monozyten-Aggregatbildung

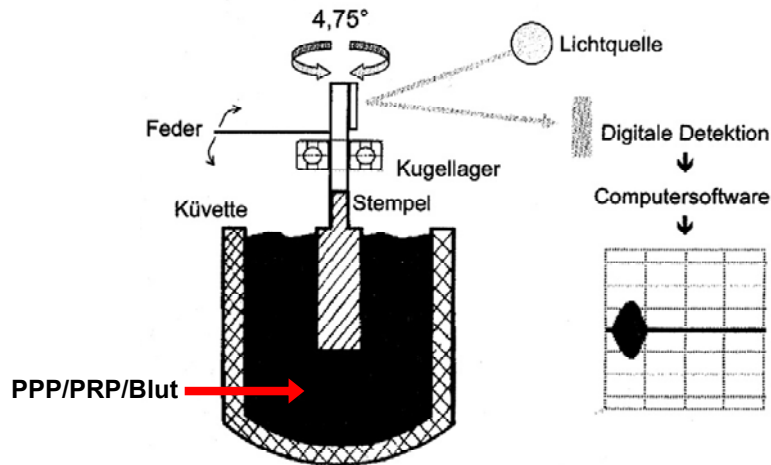
Gesunden Probanden wurde wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben Citrat- oder Hirudin-antikoaguliertes Blut entnommen. Die Messung der Thrombozyten-Monozyten-Aggregatbildung im Blut erfolgte mittels Durchflusszytometrie im FACScan-Gerät der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland). Die Methode der Durchflusszytometrie beruht auf der Detektion, Messung und Analyse von Signalen, die einzelne Zellen oder Partikel (0,5

µm bis maximal 40 µm) erzeugen, wenn sie in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl treten. Diese Technologie ermöglicht es gleichzeitig mehrere physikalische und Fluoreszenzparameter einer einzelnen Zelle in einer größeren Zellpopulation quantitativ zu bestimmen. Der Gebrauch spezifischer Antikörper, die an verschiedene fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind, erlaubt zusätzlich den Nachweis der Expression bestimmter Moleküle auf und in einer Zelle. Für die Bestimmung der Thrombozyten-Monozyten-Konjugate wurden zunächst 400 µl-Aliquots des Citrat- oder Hirudinblutes in Aggregationsküvetten eines 2-Kanal-Labor<sup>®</sup>-Aggregometers überführt und mit oder ohne Hemmsubstanzen bei 37°C im Thermoblock des Aggregometers vorinkubiert. Danach wurden die Aggregationsküvetten in die Strahlengang des Aggregometers überführt und das Blut bei 37°C mit 1.000 rpm gerührt. Unmittelbar vor, sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von Thrombozytenstimuli (z. B. atheromatöses Plaquematerial oder Horm<sup>®</sup>-Kollagen) wurden 100 µl der Blutproben zum Abstoppen der Reaktion zu 1 ml Erythrolyselösung in Eppendorf-Gefäße pipettiert und für 10 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden die lysierten Proben für 5 min bei RT mit 800 x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment einmal mit 1 ml PBS gewaschen. Die gewonnenen Zellpellets wurden für 15 bis 30 min bei RT und unter Lichtschutz mit den folgenden Antikörpern resuspendiert, bzw. inkubiert: FITC-gebundener anti-CD41a-Antikörper (5 µl; erkennt GPIIb auf der Thrombozytenoberfläche), bzw. FITC-gebundene Mäuse IgG1-Isotypkontrolle (5 µl; Kontrolle zu anti-CD41a-FITC), sowie PE-gebundener anti-CD14-Antikörper (2 µl; bindet den Lipopolysaccharid-Rezeptor auf der Monozytenoberfläche). Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurden 600 µl PBS zu den Proben pipettiert und die Thrombozyten-Monozyten-Aggregatbildung im FACScan-Gerät bestimmt. Die Monozyten konnten auf Grund ihrer Größe und Granularität, sowie ihrer spezifischen PE-Fluoreszenz von anderen Zellen unterschieden werden. Der Anteil an Thrombozyten-Monozyten-Konjugaten in der gesamten Monozytenpopulation (zuvor durch Größe und PE-Fluoreszenz festgelegtes Messfeld) wurde über die spezifische FITC-Fluoreszenz des anti-CD41a-Antikörpers im Gesamt-Monozyten-Messfeld („*monocyte gate*“) bestimmt. Die Thrombozyten-Monozyten-Aggregate wurden als „% Thrombozyten-Monozyten-Aggregate“ der gesamten Monozytenpopulation angegeben.

### **3.2.8. Bestimmung der Gerinnung, bzw. Fibrinbildung mittels Thrombelastographie nach Rotationsprinzip (roTEM<sup>®</sup>-System)**

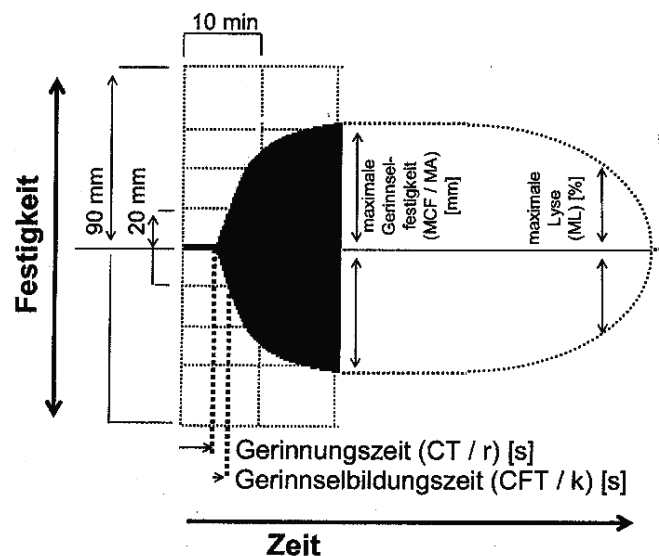
<u>HEPES-Puffer:</u>	10 mM HEPES gelöst in H <sub>2</sub> O (pH 7,4)
<u>CaCl<sub>2</sub>-Lösungen:</u>	100 mM CaCl <sub>2</sub> gelöst in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4)
<u>MgCl<sub>2</sub>-Lösung:</u>	10 mM MgCl <sub>2</sub> gelöst in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4)

Die Bestimmung der Plasma- oder Blutgerinnung, bzw. Fibrinbildung erfolgte mittels Thrombelastographie (TEG) nach Rotationsprinzip im roTEM<sup>®</sup>-Gerät der Pentapharm GmbH (München, Deutschland) (Traverso *et al.*, 1995; Zillmann *et al.*, 2001). Mit Hilfe dieser Methode war es möglich den Beginn der Fibrinbildung kontinuierlich über die Zeit, sowie die viskoelastischen Eigenschaften des Gerinnsels im Plasma oder Blut aufzuzeichnen. Zur Messung der Gerinnungsbildung wurden Plasma- oder Blutproben in eine zylindrische Einwegküvette aus Kunststoff überführt. In der auf 37°C vorgewärmten Plastikkuvette wurden vor der Zugabe des Plasmas oder Blutes 16,6 mM CaCl<sub>2</sub> und 32 µg/ml Korntrypsininhibitor (Hemmsubstanz der unspezifischen Oberflächenaktivierung, bzw. der Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems durch den Gerinnungsfaktor XII), sowie 10 µl atheromatöses Plauehomogenat (50 mg Feuchtgewicht/ml) vorgelegt (siehe Abschnitte 4.1.2 und 4.6.2). Bei den Gerinnungsexperimenten in Abschnitt 4.7 wurden 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, sowie 32 µg/ml Korntrypsininhibitor) und 5 µl atheromatöses Plauehomogenat (100 mg Feuchtgewicht/ml) in den Einwegküvetten vorgelegt. Anschließend wurden die Küvetten je nach Ansatz mit Citrat-PPP, Citrat-PRP oder Citratblut auf ein Endvolumen von 300 µl aufgefüllt. Ein Plastikstempel wurde in die Küvette eingesetzt und das Messgefäß in das roTEM<sup>®</sup>-Gerät überführt. Zwischen Stempel und Küvette verbleibt hierbei ein Abstand von 1 mm, welcher durch das Plasma oder Blut, bzw. das sich bildende Gerinnsel überbrückt wird. Während der Gerinnungsmessung nach Rotationsprinzip bleibt die Küvette stationär, wobei sich der Plastikstempel durch ein Federsystem abwechselnd um 4,75° nach links und rechts dreht (10 Zyklen/min) (Abb. 3.4). Der Widerstand gegen die Bewegung des Stempels wird mit Hilfe eines Photosensors detektiert und kontinuierlich aufgezeichnet (Abb. 3.4). Solange die Probe flüssig ist, kann die Bewegung des Stempels ungehindert erfolgen. Sobald jedoch das Plasma oder Blut in der Küvette anfängt zu koagulieren und eine mechanische Kopplung zwischen Stempel und Küvette erfolgt, reduziert das Gerinnsel die Drehung des Plastikstempels zunehmend mit steigender Gerinnselfestigkeit. Die Drehung des Stempels ist somit umgekehrt proportional zur Festigkeit des entstandenen Plasma- oder Blutgerinnsels.



**Abb. 3.4:** Schematische Darstellung der roTEM®-Detektionsmethode mittels Thrombelastographie nach Rotationsprinzip. Gezeigt sind Einweg-Messküvette und Einweg-Stempel des roTEM®-Gerätes, sowie der Photosensor und die digitale Detektionseinheit zur Messung der Veränderung der Gerinnselfestigkeit.

Die Amplitude der Stempeldrehung wird während des gesamten Gerinnungsvorgangs fortlaufend optisch an einem an das Gerät angeschlossenen Computer aufgezeichnet und die in Abb. 3.5 und Tab. 3.3 aufgeführten Parameter können daraus abgelesen werden. Zur Auswertung der Plaque-induzierten Plasma-, bzw. Blutgerinnung wurden die Gerinnungszeiten („*coagulation time*“ = CT) der einzelnen Messungen herangezogen, welche die Zeit vom Beginn der Messung bis zum Einsetzen der Gerinnung (Rotationsamplitude des Plastikstempels von 2 mm) angeben.



**Abb. 3.5:** Schematische Darstellung der Gerinnungsparameter, sowie der Skalierung der roTEM®-Detektionsmethode.

Tab. 3.3: Gerinnungsparameter, welche mittels der roTEM®-Detektionsmethode bestimmt werden können.

Parameter	Abkürzung	Definition
Gerinnungszeit	CT („coagulation time“)	Zeit (in sek.) vom Beginn der Messung bis zum Einsetzen der Gerinnung, bzw. einer Gerinnselfestigkeit von 2 mm; Gerinnungsaktivierung → Thrombinbildung → Beginn der Gerinnungspolymerisation
Gerinnselfestigkeit	MCF („maximum clot firmness“)	maximale mechanische Ausprägung des Gerinnsels, bzw. größte erreichte Amplitude (in mm); Verfestigung des Gerinnsels durch polymerisiertes Fibrin, Thrombozyten und FXII
Gerinnselfestigkeit	CFT („clot formation time“)	Zeit (in sek.) ab dem Beginn der Gerinnung bis zu einer Gerinnselfestigkeit von 20 mm; Fibrinpolymerisation → Verfestigung des Gerinnsels durch Thrombozyten und FXII
Gerinnselfestigkeit	MCF („maximum clot firmness“)	maximale mechanische Ausprägung des Gerinnsels, bzw. größte erreichte Amplitude (in mm); Verfestigung des Gerinnsels durch polymerisiertes Fibrin, Thrombozyten und FXII
Gerinnselfestigkeit	ML („maximum lysis“)	maximale Reduktion der Gerinnselfestigkeit (in % von MCF) während der Messung (max. 60 min); → Auflösung der Fibrinpolymere durch Plasmin; → Stabilität des Gerinnsels ist normal, wenn ML < 15% nach 60 min

### 3.2.9. Mikroskopische Methoden

#### 3.2.9.1. Lokalisation von Kollagenstrukturen in Plaqueschnitten mittels Immunhistochemie

PBS-Puffer: 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; *pH* 7,3

Citrat-Puffer: 10 mM Citratmonohydrat gelöst in H<sub>2</sub>O; *pH* 6,0

Für die immunhistochemische Lokalisation von Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Strukturen im Plaque *in situ*, wurden die atherosklerotischen Gewebeproben in 4% (v/v) Formaldehydlösung (*pH* 7,0) fixiert und in Paraffin eingebettet (Brandl *et al.*, 1997). Mit Hilfe eines Weichschnittmikrotoms wurden von den Paraffinblöcken 3 µm dicke Längsschnitte angefertigt und auf silanisierte Objektträger aufgebracht, welche anschließend zum Aushärten der Schnitte über Nacht bei 48°C inkubiert wurden. Nach dem Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe (Xylol, 100% (v/v) Isopropanol, 96% (v/v) Ethanol, 70% (v/v) Ethanol, H<sub>2</sub>O (deionisiert)), wurden die Plaquelängsschnitte zur Demaskierung der Antikörperbindungsstellen für 20 min in Citrat-Puffer (*pH* 6,0) in der Mikrowelle erhitzt. Um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte für 5 min mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit PBS von je 5 min, wurden die Plaquepräparate für 2 h bei RT in einer feuchten Kammer mit verschiedenen Primärantikörpern (anti-Kollagen Typ I- oder anti-Kollagen Typ III-Antikörper; 1:100 in 1% (w/v) BSA in PBS-Puffer) oder derselben Menge an Isotypkontrolle (Kaninchen IgG) inkubiert. Nach erneuten dreimaligem Waschen mit PBS, erfolgte eine 30-minütige Behandlung der Schnitte mit biotinyliertem anti-Kaninchen IgG

(1:200 in PBS-Puffer; „ABC Elite Kit“; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) als Sekundärantikörper. Als nächstes wurden die Plaquepräparate mit PBS gewaschen und zusammen mit einem Biotin-bindendem „ABC-Komplex“ (Streptavidin-Biotin-Merrettichperoxidase („horse raddish peroxidase“ = HRP)-Konjugat); „ABC Elite Kit“) für 30 min bei RT inkubiert. Mittels der Streptavidin-Biotin-HRP-Technik („DaKoChem Mate Detection kit“; Dako, Hamburg, Deutschland) konnten im letzten Schritt die kollagenpositiven Komponenten in den verschiedenen Plaqueschnitten durch die Zugabe des Chromogens 0,1% 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid als bräunliche Strukturen sichtbar gemacht werden. Die Gegenfärbung der Zellkerne in blau erfolgte mittels Hematoxylin-Eosin-Färbung (Brandl *et al.*, 1997).

### **3.2.9.2. Lokalisation von Kollagenstrukturen in Plaquehomogenaten mittels indirekter Immunfluoreszenz**

PBS-Puffer: 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; pH 7,3

Albumin-PBS-Lösungen: 0,1 oder 0,3% (w/v) Albumin (fettsäurefrei) gelöst in PBS-Puffer (pH 7,3)

PHEM-Puffer: 60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 6,1

Zur Lokalisation von kollagenpositiven Strukturen im fibrillären Kollagen oder atheromatösen Plaquematerial wurden mit Aceton und Isopropanol vorgereinigte Glasdeckgläser (Ø 18 mm; 24 x 50 mm) oder Labtech-Kammern ohne Aufsatz mit 20 µg/ml Horm<sup>®</sup>-Kollagen (50 µl in 0,1% (w/v) Albumin-PBS-Lösung) oder 5 mg Feuchtwicht/ml Plaquehomogenat (50 µl in 0,1% (w/v) Albumin-PBS-Lösung) beschichtet. Nach dem vollständigen Antrocknen des Kollagens und der Plaquehomogenate, wurden diese für 16 h bei 4°C mit 0,3%iger (w/v) Albumin-PBS-Lösung zum Blockieren der unspezifischen Bindestellen auf dem Glas inkubiert. Anschließend wurden die beschichteten Deckgläser einmal für 5 min mit PBS gewaschen und für 1 h bei RT mit verschiedenen Primärantikörpern (anti-Kollagen Typ I-/Typ III-Antikörper; 1:100 in PBS-Puffer) oder derselben Menge an Isotypkontrolle (Kaninchen IgG) inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit PBS-Puffer von je 5 min erfolgte eine 45-minütige Inkubation der Deckgläser unter Lichtausschluss und bei RT mit einem sekundären anti-Kaninchen IgG (1:200 in PBS-Puffer), welches an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor<sup>®</sup>488 gekoppelt war.

In den Experimenten zur Doppelfärbung der Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Plaquestrukturen wurden die anti-Kollagen-Antikörper direkt mit Hilfe des „Zenon<sup>™</sup> Rabbit IgG Labeling Kits“ gemäß den Angaben des Herstellers mit 2 unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Zenon<sup>™</sup> Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 und Zenon<sup>™</sup> Alexa Fluor<sup>®</sup> 647) direkt markiert (siehe Abschnitt 4.2.1). Die Zenon<sup>™</sup> Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Anregungsmaximum: 495 nm, Emissionsmaximum: 519 nm)-markierten Kollagenstrukturen wurden bei einer

Anregungswellenlänge von 488 nm, sowie mit Hilfe eines 505-530 nm Bandpassfilter als Emissionsfilter visualisiert. Die Zenon™ Alexa Fluor® 647 (Anregungsmaximum: 650 nm, Emissionsmaximum: 668 nm)-markierten Kollagenstrukturen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm, sowie mit Hilfe eines 615 nm Langpassfilter als Emissionsfilter nachgewiesen. Dieses Verfahren stellt die einzige Möglichkeit zur Doppelfärbung der Kollagen Typ I- und Typ III-positiven Strukturen mit den oben genannten kollagenspezifischen polyklonalen Kaninchenantiseren dar.

Nach der Inkubation der Kollagen- und Plaquepräparate mit den verschiedenen Antikörpern wurden diese erneut mit PBS-Puffer gewaschen und durch eine 10-minütige Inkubation mit 0,16% (v/v) formaldehydhaltigem PHEM-Puffer fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS-Puffer erfolgte die Einbettung der Glasdeckgläschen oder Labtech-Kammern mit Moviol, sowie deren Versiegelung mit Nagellack. Die Analyse der auf diese Weise erstellten Immunfluoreszenzpräparate des fibrillären Horm®-Kollagens und der kollagenpositiven Plaquekomponenten erfolgte anschließend mit Hilfe des aufrechten Fluoreszenzmikroskops Leica RBM 3, sowie des konfokalen Laser Scanning Fluoreszenzmikroskops Zeiss LSM 510Meta. Die weitere Bildverarbeitung wurde mit den Programmen „*LSM Image Browser*“ (Zeiss, Jena, Deutschland), „*Photoshop*“ (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland) und „*Power Point*“ (Microsoft, München, Deutschland) durchgeführt.

### **3.2.9.3. Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung des thrombozytären Aktinzytoskeletts**

PBS-Puffer: 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; pH 7,3

Albumin-PBS-Lösungen: 0,1 oder 0,3% (w/v) Albumin (fettsäurefrei) gelöst in PBS-Puffer (pH 7,3)

PHEM-Puffer: 60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 6,1

Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des thrombozytären F-Aktin Zytoskeletts wurden Suspensionen gewaschener Thrombozyten (40.000 Thrombozyten/μl), PRP oder Blut auf Plaque- oder kollagenbeschichteten Glasoberflächen (siehe Abschnitt 3.2.9.2) 30 min unter Lichtausschluss bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Glasplättchen kurz mit PBS-Puffer gewaschen und für 10 min bei RT mit 0,16% (v/v) formaldehydhaltigem PHEM-Puffer fixiert. Nach 3 Waschschriften mit PBS-Puffer von je 5 min, wurden die Präparate zur Permeabilisierung der Thrombozyten für 10 min bei RT mit 0,2% (v/v) Triton X-100 (in PBS-Puffer gelöst) inkubiert. Anschließend wurde nochmals dreimal für 5 min mit PBS-Puffer gewaschen und das thrombozytäre F-Aktin durch eine 30 bis 45-minütige Behandlung der Proben mit Rhodamin-Phalloidin (1:50 in PBS-Puffer) oder Phalloidin-Alexa Fluor®546 (1:50 in PBS-Puffer) bei RT und unter Lichtausschluss angefärbt. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Glasdeckgläschen oder Labtech-

Kammern mit Moviol eingedeckt und mit Nagellack versiegelt. Die so erstellten Immunfluoreszenzpräparate des thrombozytären Aktinzytoskeletts wurden anschließend an dem aufrechten Fluoreszenzmikroskops Leica RBM 3, sowie dem konfokalen Laser Scanning Fluoreszenz-Mikroskop Zeiss LSM 510Meta untersucht. Die weitere Bildverarbeitung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.9.2 beschrieben.

### **3.2.10. Untersuchung der Thrombozytenadhäsion und Aggregation unter statischen Bedingungen**

PBS-Puffer: 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; *pH 7,3*

Albumin-PBS-Lösungen: 0,1, 0,3 oder 0,5% (w/v) Albumin (fettsäurefrei) gelöst in PBS-Puffer (*pH 7,3*)

PHEM-Puffer: 60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>; *pH 6,1*

Denhardt's-Lösung: 0,02% (w/v) Ficoll<sup>®</sup> 70, 0,02% (w/v) Albumin (fettsäurefrei),  
0,02% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP)-360

Zur Untersuchung der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an Horm<sup>®</sup>-Kollagen oder an atheromatöses Plaquematerial wurden mit Aceton und Isopropanol vorgereinigte Glasdeckgläschen (Ø 18 mm; 24 x 50 mm) oder Labtech-Kammern ohne Aufsatz mit 20 µg/ml Horm<sup>®</sup>-Kollagen (50 µl in 0,1% (w/v) Albumin-PBS-Lösung) oder 5 mg/ml Plaquehomogenat (50 µl in 0,1% (w/v) Albumin-PBS-Lösung) beschichtet. Unspezifische Glasbindungsstellen wurden anschließend durch Inkubation der Deckgläschen mit 0,3%iger (w/v) Albumin-PBS-Lösung für 16 h bei 4°C blockiert. Danach wurden die Kollagenstrukturen durch Inkubation mit spezifischen anti-Kollagen Typ I- oder anti-Kollagen Typ III-Antikörpern sowie Alexa Fluor<sup>®</sup>488-gebundenen sekundären anti-Kaninchen-Antikörpern sichtbar gemacht (siehe Abschnitt 3.2.9.2). Im nächsten Schritt wurden ca. 100 µl gewaschene Thrombozytensuspension (40.000 Plättchen/µl) auf die kollagengefärbten Präparate aufgebracht und für 30 min bei 37°C im Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>, 90% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift von 1-2 min mit PBS, erfolgte die Fixierung der Proben mit 0,16% (v/v) Formaldehyd in PHEM-Puffer für 10 min bei RT. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und die Membran der adhärennten Thrombozyten durch eine 10-minütige Inkubation mit 0,2% (v/v) Triton X-100 (in PBS-Puffer gelöst) bei RT permeabilisiert. Die Proben wurden dann nochmals kurz mit PBS-Puffer gewaschen und zur Färbung des thrombozytären Aktinzytoskeletts unter Lichtausschluss mit einer Rhodamin- oder Alexa Fluor<sup>®</sup>546-Phalloidin-Lösung (1:50 in PBS-Puffer) für 30 bis 45 min bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS-Puffer wurden die Glasdeckgläschen oder Labtech-Kammern mit Moviol eingedeckt und mit Nagellack versiegelt. Das Betrachten der Präparate erfolgte an dem aufrechten Fluoreszenzmikroskops Leica RBM 3, sowie dem konfokalen Laser



Scanning Fluoreszenzmikroskop Zeiss LSM 510Meta. Die weitere Bildverarbeitung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.9.2 beschrieben.

Die Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Blutplättchen wurde auch an Plauegefrierschnitten untersucht. Glasdeckgläschen (25 x 50 mm) wurden mit Aceton und Isopropanol vorgereinigt und für 3 h bei 68°C mit Denhardt`s-Lösung beschichtet. Anschließend wurden die Deckgläschen zweimal für 20 sek. mit H<sub>2</sub>O (deionisiert) gewaschen und für 20 min bei RT mit einem 3:1 Gemisch aus Ethanol und Essigsäure behandelt. Danach wurden sie für 1 h bei RT getrocknet und für 3 h bei 180°C gebacken. Die Glasdeckgläschen waren nun vorbereitet für die Beschichtung mit den Plauegefrierschnitten. Mit Hilfe eines Kryomikrotoms wurden Plaueelängsschnitte einer Dicke von ca. 50 bis 100 µm hergestellt und auf die mit Denhardt`s-Lösung beschichteten Glasoberflächen durch zweistündiges Antrocknen bei RT aufgebracht. Um unspezifische Bindungsstellen auf dem Glas, bzw. der Denhardt`s-Beschichtung zu blockieren, wurden die Präparate für 16 h bei 4°C mit 0,5% (w/v) Albumin-PBS-Lösung inkubiert. Im nächsten Schritt wurden ca. 100 µl gewaschene Thrombozytensuspension (40.000 Plättchen/µl) auf die Gefrierschnitte aufgebracht und für 30 min bei 37°C im Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>, 90% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Nach 10-minütiger Fixierung der Proben mit 0,16% (v/v) Formaldehyd in PHEM-Puffer, wurden die adhärenen Thrombozyten durch eine 10-minütige Inkubation mit 0,2% (v/v) Triton X-100 (in PBS-Puffer gelöst) permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Färbung des thrombozytären Aktinzytoskeletts unter Lichtausschluss mit Alexa Fluor<sup>®</sup> 546-gekoppeltem Phalloidin (1:50 in PBS-Puffer) für 30 bis 45 min bei RT. Die Glasdeckgläschen wurden mit Moviol eingedeckt und mit Nagellack versiegelt. Das Betrachten der Präparate erfolgte an dem aufrechten Fluoreszenzmikroskop Leica RBM 3 oder dem konfokalen Laser Scanning Fluoreszenzmikroskop Zeiss LSM 510Meta. Die weitere Bildverarbeitung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.9.2 beschrieben.

### **3.2.11. Untersuchung der Thrombozytenadhäsion und Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen**

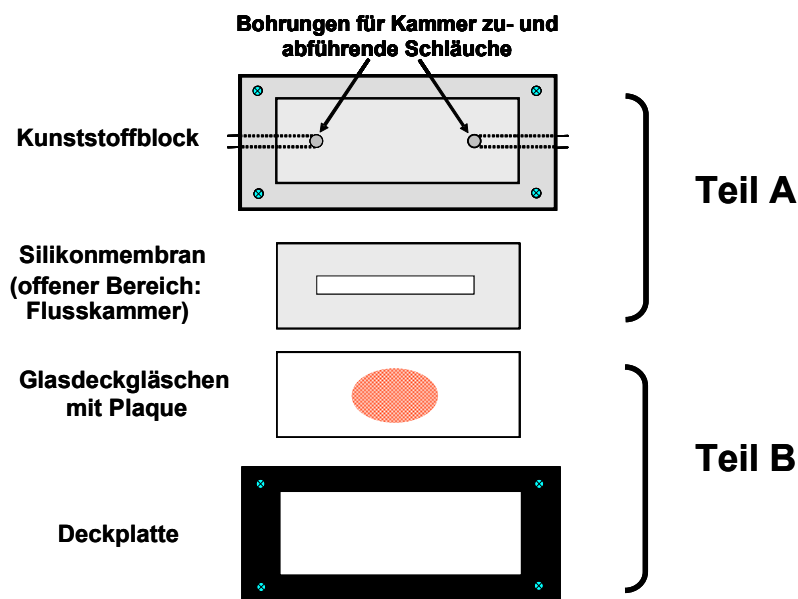
Albumin-PBS-Lösungen: 0,1 oder 0,3% (w/v) Albumin (fettsäurefrei) gelöst in PBS-Puffer (pH 7,3)

PBS-Puffer: 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; pH 7,3

Um der *in vivo*-Situation nach der Ruptur einer atherosklerotischen Läsion möglichst nahe zu kommen, wurde die Adhäsion und Aggregatbildung von humanen Thrombozyten an humanes atheromatöses Plauematerial unter physiologischen Strömungsverhältnissen analysiert. 30 µl der Plauehomogenate (5 mg Feuchtgewicht/ml in 0,1% (w/v) Albumin-PBS-Lösung) wurden

auf mit Aceton und Isopropanol vorgereinigte Glasdeckgläschen (24 x 50 mm) aufgebracht, für ca. 3 h bei RT angetrocknet und anschließend zum Abblocken unspezifischer Glasbindestellen für 16 h bei 4°C mit 0,3% (w/v) Albumin-PBS-Lösung inkubiert. Für einige Experimente wurden die Kollagenstrukturen des Plaquematerials wie in Abschnitt 3.2.9.2 beschrieben mit Hilfe spezifischer anti-Kollagen-Antikörper Fluoreszenz gefärbt.

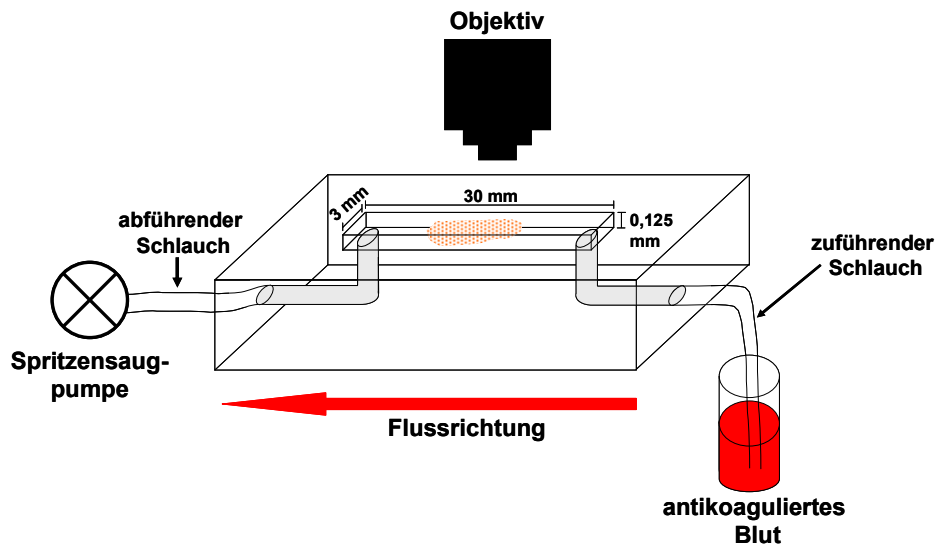
Die Plaquebeschichteten Deckgläschen wurden innerhalb von 24 h für die Flussexperimente verwendet. Hierfür wurden sie in eine Parallel-Platten-Flusskammer („parallel plate flow chamber“; Abb. 3.6) mit laminarer Strömung eingesetzt.



**Abb. 3.6: Schematische Darstellung der Parallel-Platten-Flusskammer mit ihren Einzelkomponenten.** Teil A) Plexiglaskörper, auf den von oben die Maske (Silikonmembran) für die Flusskammer (offener Bereich) aufgebracht wird. Teil B) Plaque (rot-weiß gepunktet)-beschichtetes Glasdeckgläschen, welches in die Fräsung der Deckplatte aus Metall eingelegt wird. Nach dem Aufbringen von PBS-Lösung aus das Deckgläschen werden die Teile A und B über 4 Schrauben und entsprechende Bohrungen (⊗) luftblasenfrei miteinander verbunden und die Flusskammer mit Teil B nach oben zeigend auf den Objektisch eines Mikroskops aufgebracht.

Die Parallel-Platten-Flusskammer besteht aus einem Plexiglaskörper, der eine Begrenzung der Kammer darstellt, sowie einer Deckplatte aus Metall, in welche das plaquebeschichtete Glasdeckgläschen eingesetzt wird, welches die zweite Begrenzung der Kammer bildet (Abb. 3.6). Die beiden Kammerteile werden durch eine 125 µm dicke Silikonmembran als Abstandshalter separiert, so dass eine Flusskammer von 31 mm Länge, 3 mm Breite und 0,125 mm Höhe entsteht (Abb. 3.6 und 3.7). Der Plexiglaskörper wird durch 4 Bohrungen und Schrauben an der Metallplatte verankert (Abb. 3.6). Nach dem Einsetzen des plaquebeschichteten Glasdeckgläschens in die Kammer wird diese luftblasenfrei verschlossen, auf den Objektisch des aufrechten Mikroskops Zeiss Axioskop 2 plus aufgebracht und

ebenfalls luftblasenfrei über Bohrungen im Plexiglaskörper mit PBS-gefüllten zuführenden und abführenden Schläuchen verbunden (Abb. 3.7). Das Mikroskop und die Flusskammer sind von einer Inkubationskammer umschlossen, in welcher konstant 37°C herrschen.



**Abb. 3.7:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Parallel-Platten-Flusskammer-Modells. Gezeigt sind von links nach rechts der Vorratsbehälter mit dem Hirudin-antikoagulierten Blut, in welchen der Flusskammer zuführende Schlauch getaucht ist, sowie das Plaquematerial (rot-weiß gepunktet), welches sich in der „Parallel-Platten-Flusskammer“ befindet und der Kammer abführende Schlauch, über welchen das Blut mittels einer direkt verbundenen Spritzenaugpumpe durch die Kammer, bzw. über das Plaquematerial gesaugt wird.

Die Perfusion von antikoaguliertem Blut über das Plaquematerial erfolgte mit 2 unterschiedlichen arteriellen Scherraten („*shear rates*“) von  $500 \text{ s}^{-1}$  und  $1500 \text{ s}^{-1}$ , welche unter physiologischen Bedingungen z. B. in mittelgroßen Arterien und in mäßig durch Atherosklerose stenosierte Arterien vorkommen können. Je nach Blutmenge wurde für die Perfusion ein 10 oder 50 ml Polypropylenröhrchen mit Hirudin-antikoaguliertem Blut befüllt, welches mittels einer Spritzenaugpumpe durch die Flusskammer gesaugt wurde (Abb. 3.7). Die Spritzenaugpumpe wurde je nach gewünschter Scherrate auf  $0,161 \text{ ml/min}$  ( $500 \text{ s}^{-1}$ ) oder  $0,484 \text{ ml/min}$  ( $1500 \text{ s}^{-1}$ ) eingestellt. Da sich während der laminaren Strömung des Blutes auf Grund ihrer Größe die Erythrozyten eher zur Mitte und die Thrombozyten eher zu den Rändern des Flüssigkeitsstroms hinverteilen, war es möglich, die Interaktion, bzw. Adhäsion und Aggregatbildung von Blutplättchen an das exponierte Plaquematerial in Echtzeit aufzuzeichnen. Die Thrombozytenadhäsion und Aggregation wurde mit Hilfe des aufrechten Mikroskops Zeiss Axioskop 2 plus, welches eine gleichzeitige Durchführung mikroskopischer Durchlicht- und Fluoreszenzverfahren ermöglicht, analysiert. Dieses Mikroskop war hierfür entweder mit einer an einen Videorekorder angeschlossenen Pulnix schwarz-weiß CCD-Kamera (Abschnitt 4.2.3) oder der an einen Videorekorder angeschlossenen schwarz-weiß CCD-Kamera AVT BC-71

(Abschnitte 4.3.3.2, 4.3.4.1, 4.4.2, 4.5.1.3 und 4.5.2.3) verbunden, so dass die Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung mit einer Aquisitionsrate von 25 Bildern/sek. fortlaufend auf S-VHS Videobändern aufgezeichnet werden konnte.

Zum einen erfolgte die Visualisierung der Thrombozyten mittels Hellfeldmikroskopie oder Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM), wobei ein „*Plan-Neofluar 63 x/1,25 Oil Ph3 Antiflex-Objektiv*“ (Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet wurde (Abschnitt 4.2.3). Die RIKM stellt ein Interferenzverfahren dar, welches besonders gut geeignet ist, um Strukturen in der Nähe eines Substrats genau abzubilden. Diese Mikroskopiermethode liefert eine Angabe über den Abstand verschiedener Strukturen (z. B. Plättchen oder Plaque) vom Substrat (Glasoberfläche); je dunkler die Strukturen erscheinen, um so näher sind sie am Substrat (4-12 nm Auflösung), je heller sie sind, um so weiter sind sie vom Substrat entfernt (bis zu 30 nm Auflösung). Zum anderen erfolgte die Visualisierung der Thrombozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitte 4.3.3.2, 4.3.4.1, 4.4.2, 4.5.1.3 und 4.5.2.3). Unmittelbar vor Beginn der Perfusion wurden die Blutplättchen hierfür mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mepacrin (10  $\mu$ M; wird über den Serotonintransporter in die dichten Granula der Thrombozyten aufgenommen und färbt diese) versetzt, so dass diese anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm mit Hilfe eines 40 x Objektivs („*Plan-Neofluar 40 x/1,30 Oil*“; Zeiss, Jena, Deutschland) visualisiert werden konnten. Die Visualisierung des Plaquematerials erfolgte entweder mittels Hellfeld-, bzw. RIKM-Technik (Abschnitte 4.2.3, 4.3.3.2 und 4.3.4.1), oder mittels Autofluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Abschnitte 4.3.3.2, 4.3.4.1, 4.4.2, 4.5.1.3 und 4.5.2.3). Zu Beginn der Flussexperimente wurde zuerst das mittels Hellfeldmikroskopie oder Fluoreszenzmikroskopie auf das Plaquematerial fokussiert und je nach Versuchsansatz im Anschluss daran die adhärenen und aggregierten Thrombozyten ebenfalls mittels Hellfeld- oder Fluoreszenztechnik dargestellt.

Die Digitalisierung und Analyse der Echtzeit-Videoaufnahmen erfolgte „*off-line*“ mit Hilfe des „*Matrox Inspector Software Packages*“ (Matrox Electronicx Systems Ltd., Kanada). Zur quantitativen Auswertung der adhärenen und aggregierten Thrombozyten pro Plaquefläche wurden je 10, bzw. 15 Gesichtsfelder der mit dem 40 x Objektiv (Zoom 0,4 oder 0,8) aufgenommenen Flussexperimente pro untersuchter Plaque-Oberfläche und Lauf herangezogen. Die einzelnen Gesichtsfelder wurden während des Flussversuches aufgenommen, indem man den mit Plaquematerial beschichteten Teil der Flusskammer immer wieder langsam in mäanderartigen Schlaufen mit dem Objektiv abgefahren ist. Ausgewertet wurden hierbei je nach Versuchsaufbau die min 4 bis 5 und 7 bis 10 nach Beginn der Blutperfusion. In den ausgewählten Gesichtsfeldern wurde der Schwellenwert der Fluoreszenzeinstellung so gewählt, dass entweder der Plaquebereich (schwächer fluoreszente Autofluoreszenz) oder aber die Thrombozyten (stärker fluoreszente spezifische Mepacrinfluoreszenz) dargestellt wurden.

Anschließend wurden die Bilder in ihre binäre Form konvertiert und in jedem Gesichtsfeld sowohl die Plauefläche, als auch die Fläche der adhärenen und aggregierten Thrombozyten mittels „blob counting“ bestimmt und zueinander als „% Plauefläche bedeckt von Thrombozytenaggregaten“ in Beziehung gesetzt.

Die Flusseperimente wurden bis maximal 4 h nach der Blutabnahme durchgeführt. Zur Untersuchung der Rolle verschiedener thrombozytärer Rezeptoren, sowie der Bedeutung von  $\text{TxA}_2$  für die Adhäsion und Aggregatbildung am atheromatösen Plauematerial wurde das Blut vor der Perfusion mit den in Tab. 3.4 aufgeführten Inhibitoren bei  $37^\circ\text{C}$  vorbehandelt.

**Tab. 3.4: In den Flusseperimenten eingesetzte antithrombozytäre Substanzen (finale Konzentrationen und Inkubationszeiten):**

Inhibitor-Target	Inhibitor; Inhibitorkonzentration	Kontrollantikörper	Inkubationszeit (bei $37^\circ\text{C}$ )
GPVI	10B12; 50 $\mu\text{g/ml}$	2D4	15 min
Integrin $\alpha_2\beta_1$	6F1; 20 $\mu\text{g/ml}$	Mäuse IgG1	15 min
GPIb $\alpha$	6B4; 5 $\mu\text{g/ml}$	Mäuse IgG1	10 min
P2Y <sub>1</sub>	MRS2179; 100 $\mu\text{M}$	/	10 min
P2Y <sub>12</sub>	AR-C69931MX; 1 $\mu\text{M}$	/	10 min
$\text{TxA}_2$	ASS; 1 mM	/	10 min

### 3.2.12. Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.12.1. Bestimmung der Proteinkonzentration in Plauesuspensionen

Proteinkonzentrationsbestimmung mittels „Mikro-Lowry Assay“

Die Proteinkonzentrationsbestimmung in den Plauehomogenaten erfolgte mittels des „Mikro-Lowry-Assay“, einer modifizierten Lowry-Methode nach Peterson (Peterson, 1977) gemäß den Angaben des Herstellers des „Lowry Protein Assay Kit“ der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland). Der „Lowry-Assay“ zur quantitativen Bestimmung von Proteinen beruht auf der Kombination der Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz. In alkalischer Lösung bildet sich hierbei zunächst ein blau-violetter Kupferproteinkomplex aus den  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen des zugegebenen Kupfersulfats und je 2 Biuretmolekülen (Carbamoylharnstoffmolekülen), welcher typisch für Verbindungen mit mindestens 2 CO-NH-

Gruppen (Peptidbindungen) ist. Dieser Kupferproteinkomplex unterstützt anschließend die Reduktion von Molybdat, bzw. Wolframat, welche im Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz in Form ihrer Heteropolyphosphorsäuren eingesetzt werden, durch vornehmlich Tyrosin, Tryptophan, und in geringerem Maße, Cystein, Cystin und Histidin des zugegebenen Proteins. Dabei wird vermutlich  $\text{Cu}^{2+}$  im Kupferproteinkomplex zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, welches dann mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz reagiert. Die resultierende intensive tiefblaue Färbung wird zum kolorimetrischen Nachweis von Peptiden und Proteinen verwendet und bei einer Wellenlänge von 750 nm vermessen.

Für die Proteinbestimmung wurden je 50  $\mu\text{l}$  Plauehomogenat (50 mg Feuchtgewicht/ml) 1:20 in  $\text{H}_2\text{O}$  (deionisiert) verdünnt. BSA-Lösungen einer Konzentration von 50, 100, 200, 300 und 400  $\mu\text{g/ml}$  dienten hierbei als Referenz zum Erstellen einer Eichkurve für die Proteinkonzentration. Zu allen Proben wurden anschließend 100  $\mu\text{l}$  0,15% (w/v) Deoxycholatsäure gegeben und diese für 10 min stark geschüttelt. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  72% (w/v) Trichloracetat wurden die Proben für weitere 15 min stark geschüttelt und das gefällte Protein anschließend abzentrifugiert (16.000 x g, RT, 10 min). Der Überstand wurde vorsichtig vom Proteinniederschlag abgenommen und verworfen. Das Proteinpellet wurde in 1 ml Lowry-Reagenz gelöst und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden alle Proben mit 0,5 ml Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz versetzt, und zur Entwicklung des tiefblauen Farbstoffes für 30 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Basierend auf Absorptionswerten der BSA-Eichkurve konnten die Proteinkonzentrationen in den untersuchten Plauehomogenaten ermittelt werden. Die Proteinkonzentrationen aller Proben wurden in Doppelwerten bestimmt.

#### Proteinkonzentrationsbestimmung mittels „dotMETRIC™ Protein-Assay Kit“

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Plauehomogenaten, welche bereits in SDS-Probenauftragspuffer gelöst waren, erfolgte mittels des „dotMETRIC™ Protein Assay Kit“ gemäß den Angaben des Herstellers. Die Proteinkonzentrationen aller Proben wurden in Doppelwerten bestimmt.

#### **3.2.12.2. Kollagenextraktion und Bestimmung des Kollagengehalts im Plauematerial**

Extraktionspuffer: 0,5 M Essigsäure, 3,75  $\mu\text{l}$  Proteaseinhibitorcocktail; pH 3,0

Zur Bestimmung der Kollagenkonzentration in atheromatösen Plauehomogenaten wurde zunächst das lösliche Kollagen aus den Gewebeproben extrahiert. Hierfür wurden jeweils 150  $\mu\text{l}$  eines Plauehomogenates (50 mg Feuchtgewicht/ml) zusammen mit 1,5 ml

Extraktionspuffer für 24 bis 48 h bei 4°C unter kontinuierlichem Rühren inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 1 h bei 4°C und 16.000 x g zentrifugiert, und die Konzentration des extrahierten, löslichen Kollagen im Überstand gemäß den Angaben des Herstellers des „Sircol™ soluble Collagen Assay Kit“ durchgeführt. Dieser Assay beruht auf der Interaktion des in Pikrinsäure gelösten, anionischen Farbstoffes Siriusrot mit den Sulfonsäureseitenkettengruppen der basischen Aminosäuren des Kollagens. Die Kollagenkonzentrationen aller Proben wurden in Doppelwerten bestimmt.

### 3.2.12.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Probenauftragspuffer (5 x): 250 mM Tris-HCl, 50% (v/v) Glycerin, 10% (w/v) SDS,  
10% (v/v) Triton X-100, 0,025% (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8

Natriumdeoxycholatlösung: 120 mM Natriumdeoxycholat gelöst in H<sub>2</sub>O

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris-Base, 190 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

Die elektrophoretische Separation von Proteinen erfolgte mittels diskontinuierlicher Glycin-SDS-PAGE (8% Polyacrylamidgel oder 4-20% Polyacrylamidgradientengel; BioRad, München, Deutschland) nach Lämmli *et al.* (Laemmli, 1970). Verschiedene Kollagentypen, Plauehomogenate (aktive, inaktive oder sekundär durch sich wiederholende Einfrier- und Auftauzyklen und eine Langzeitlagerung bei -20°C inaktivierte Plaques), sowie kollagenaseverdaute Kollagen- und Plaueproben wurden vor dem Auftrag in 5 x SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen, mit Natriumdeoxycholatlösung (Endkonzentration: 6 mM) versetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben mit β-Mercaptoethanol (Endkonzentration: 10%) vermischt und für 30 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Mengen der Proben auf ein Gel aufgetragen und die Proteinauftrennung im Gel erfolgte im Elektrophoresepuffer für ca. 1 h bei 120 V. Die SDS-Gele wurden nach erfolgter Elektrophorese für Westernblotanalysen verwendet, oder die aufgetrennten Proteine mittels Coomassie-, bzw. Silberfärbung visualisiert.

### 3.2.12.4. Gelfärbemethoden

#### Coomassie-Färbung nach Weber *et al.*; modifiziert (Weber *et al.*, 1969)

Coomassie-Färbelösung: 0,25% (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250, 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

Die Polyacrylamidgele wurden für 15 bis 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes in Entfärber gewaschen.

#### Silberfärbung nach Blum *et al.*; modifiziert (Blum *et al.*, 1987)

Fixierlösung: 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

Thiosulfatlösung: 0,8 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O gelöst in H<sub>2</sub>O

Silbernitratlösung: 12 mM AgNO<sub>3</sub>, 0,02% (v/v) Formaldehyd

Entwicklerlösung: 280 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,16 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 0,05% (v/v) Formaldehyd

Stopplösung: 67 mM Glycin gelöst in H<sub>2</sub>O

Die Polyacrylamidgele wurden über Nacht in Fixierlösung fixiert. Anschließend wurden die Gele dreimal 10 min mit 50 % (v/v) Ethanol gewaschen und für 1 min in Thiosulfatlösung geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen für je 20 sek. in H<sub>2</sub>O wurden die Gele 20 min mit Silbernitratlösung imprägniert. An erneutes Waschen mit H<sub>2</sub>O schloss sich die Entwicklung der silbergefärbten Proteine an. Waren die Proteine deutlich zusehen, wurde die Entwicklung mit einer glycinhaltigen Stopplösung beendet.

### 3.2.12.5. Nachweis von Kollagen Typ I mittels Westernblotanalyse

Transfer-Puffer: 48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol

TBS-Puffer: 10 mM Tris-Base, 150 mM NaCl; *pH* 7,6

TBST-Puffer: 10 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20; *pH* 7,6

Magermilchlösung: 5% (w/v) Magermilchpulver gelöst in TBS- oder TBST-Puffer; *pH* 7,6

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine einem Western blotting unterzogen (Kyhse-Andersen, 1984); modifiziert). Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond™-C extra Blotmembran) erfolgte in einer Mini-Protean Kammer der Firma Biorad (München, Deutschland) nach dem



„Tankblot“-Verfahren bei 4°C für 1 h bei 200 mA. Nach dem Transfer wurde die Membran entnommen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 2 h bei RT in 5% (w/v) Magermilch-TBS-Puffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST-Puffer (jeweils 5 min) wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 5% (w/v) Magermilch-TBST-Puffer geschwenkt, welchem der primäre anti-Kollagen Typ I-Antikörper in einer Verdünnung von 1:15.000 zugesetzt war. Nach dieser Inkubation wurden nicht gebundene, bzw. nicht spezifisch gebundene primäre Antikörper durch dreimaliges 10-minütiges Waschen mit TBST-Puffer entfernt. Anschließend wurde die Membran für 45 min bei RT mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten sekundären anti-Kaninchen IgG, welches 1:5.000 in 5% (w/v) Magermilch-TBST-Puffer verdünnt war, inkubiert. Nach erneutem dreimaligem 10-minütigen Waschen wurde die Membran für 10 min in „*Super Signal<sup>®</sup> West Pico Luminol Enhancer*“ und „*Super Signal<sup>®</sup> Stable Peroxide Solution*“-Detektionslösung inkubiert. Die Lichtemission bei der Umsetzung der Detektionslösung durch die Meerrettichperoxidase wurde durch Auflegen eines Röntgenfilmes (Polapan) dokumentiert.

### **3.2.13. Enzymatischer Verdau des Plaquekollagens mittels Kollagenase**

TESCA-Puffer: 50 mM TES, 0,36 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 20 mM HEPES; *pH* 7,4

Kollagenaselösung: 50 µg/ml Kollagenase gelöst in TESCA-Puffer; *pH* 7,4

CaCl<sub>2</sub>-Lösung: 25 mM CaCl<sub>2</sub> gelöst in H<sub>2</sub>O; *pH* 7,4

BSA-Lösung: 1,25 M BSA gelöst in TESCA-Puffer; *pH* 7,4

Für den Abbau der Kollagenstrukturen im atheromatösen Plaquematerial wurden 2 mg (20 µl) Plauehomogenat (100 mg Feuchtwicht/ml) zusammen mit 0,6 µg Kollagenase (12 µl Kollagenaselösung) und 9 mM CaCl<sub>2</sub> (18 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung) zum Starten der Gewebeaufschlussreaktion für 24 h bei 37°C und kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Kontrollinkubationen des Plaquematerials erfolgten an Stelle der Kollagenase zusammen mit 1 µg BSA (12 µl BSA-Lösung). 20 µg (20 µl) Horm<sup>®</sup>-Kollagen wurde als Referenz für das Plaquematerial zusammen mit 0,6 µg Kollagenase oder 1 µg BSA und 9 mM CaCl<sub>2</sub> zum Starten der Gewebeaufschlussreaktion ebenfalls für 24 h bei 37°C und kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Der Erfolg des Kollagenabbaus im Plauehomogenat wurde mit Hilfe der turbidimetrischen Messung der Thrombozytenaggregation im PRP in einem 2-Kanal-Labor<sup>®</sup>-Aggregometer, sowie mittels SDS-Gelelektrophorese und darauf folgender Silberfärbung, bzw. darauf folgendem Westernblot überprüft.

### **3.2.14. Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (MW $\pm$ SA) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels gepaartem oder ungepaartem Student t-Test ermittelt. Unterschiede zwischen einzelnen Ergebnissen wurden als signifikant betrachtet, wenn  $p < 0,05$  war. Die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes und des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten  $r$  erfolgte mittels „Excel 2003“ (Microsoft, München, Deutschland). Ein Pearsonscher Korrelationskoeffizient  $r$  wurde als statistisch signifikant betrachtet, wenn  $p < 0,05$  war.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Aktivierung von Thrombozyten durch humanes atherosklerotisches Plaquematerial**

#### **4.1.1. Atherosklerotische Plaques stimulieren die Plättchenaggregation und Sekretion in gewaschenen Thrombozytensuspensionen, PRP und antikoagulierte Blut**

Zur Untersuchung der Aktivierung von Thrombozyten durch humanes atherosklerotisches Plaquematerial wurden mittels des Operationsverfahrens der Thrombendarterektomie Gewebeproben von mehr als 60 verschiedenen Patienten mit Karotisstenose entnommen (siehe Abschnitt 3.2.1). Bei den isolierten Gewebeproben handelte es sich ausschließlich um vorangeschrittene, lipidreiche atherosklerotische Plaques, so genannte Typ V-Atheromas, welche in der Regel eine Läsion mit lipidreichem und/oder nekrotischem Kern umgeben von fibrösem Gewebe darstellten (Stary *et al.*, 1995; Brandl *et al.*, 1997; Virmani *et al.*, 2000). Nach der chirurgischen Entnahme des Plaquematerials wurde die atheromatöse Region präpariert und sorgfältig von angrenzenden Plaquebereichen wie z. B. der distalen kollagenreichen Plaqueschulterregion oder der proximal gelegenen Region mit Bindegewebe, Schaumzellen und Lipidablagerungen abgetrennt (Brandl *et al.*, 1997). Im Anschluss daran wurden diese atheromatösen Plaques (Abkürzung: AP) homogenisiert und weiter bezüglich ihrer blutplättchenaktivierenden Eigenschaften untersucht. Zusätzlich zum ganzen atheromatösen Plaquematerial wurde aus einigen besonders weichen Gewebeproben das lipidreiche Kernmaterial, der so genannte „*lipid-rich core*“, stumpf herauspräpariert, homogenisiert und ebenfalls weiter bezüglich seines thrombozytenaktivierenden Charakters analysiert. In einer früheren Studie von Rother *et al.* konnte mittels turbidimetrischer Aggregationsmessung nachgewiesen werden, dass der lipidreiche Kern des Plaquegewebes, sowie Lipidextrakte atherosklerotischer Läsionen einen raschen Gestaltwandel („*shape change*“) ohne darauf folgende Aggregation der Blutplättchen in Suspensionen gewaschener Thrombozyten hervorrufen (Rother *et al.*, 2003). Die durch das lipidreiche Kernmaterial vermittelte Plättchenaktivierung wurde in diesen Untersuchungen auf die Akkumulation von Lysophosphatidsäure zurückgeführt (Rother *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Beobachtungen bestätigt (Abb. 4.1).

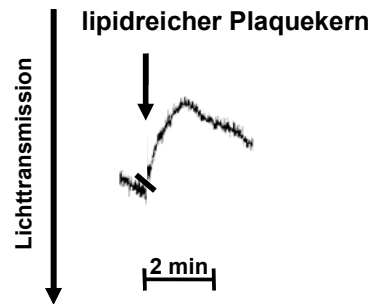


Abb. 4.1: Aktivierung von gewaschenen humanen Thrombozyten durch die lipidreiche Kernregion atherosklerotischer Plaques. Suspensionen gewaschener humaner Thrombozyten ( $400.000/\mu\text{l}$ ) wurden mit  $1,25\text{ mg Feuchtwicht/ml}$  einer homogenisierten lipidreichen Plaquekernregion versetzt und die Zunahme der Lichttransmission und somit der Gestaltwandel („*shape change*“) der Blutplättchen mittels turbidimetrischer Aggregationsmessung bestimmt. Die gezeigte Kurve ist repräsentativ für 15 Experimente mit den lipidreichen Plaquekernregionen 5 unterschiedlicher Patienten.

Die Zugabe von Homogenaten ganzer atheromatöser Plaques (AP), welche außer dem Lipidkern auch noch fibröse Kapselanteile enthielten und vornehmlich in dieser Arbeit untersucht wurden, führte zu einer veränderten Plättchenreaktion in Suspensionen gewaschener humaner Thrombozyten und induzierte nach einer charakteristischen Verzögerungs („*lag*“)-Phase von ca. 0,5 bis 1 min einen Gestaltwandel der Blutplättchen, sowie deren Aggregation (Abb. 4.2).

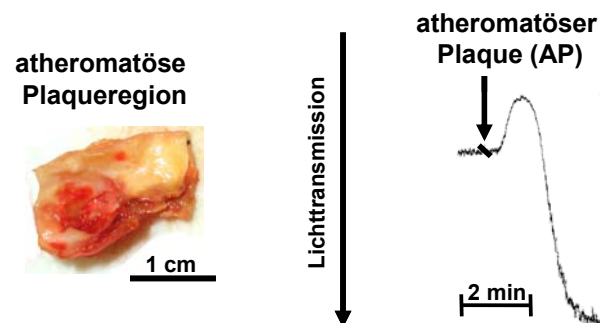
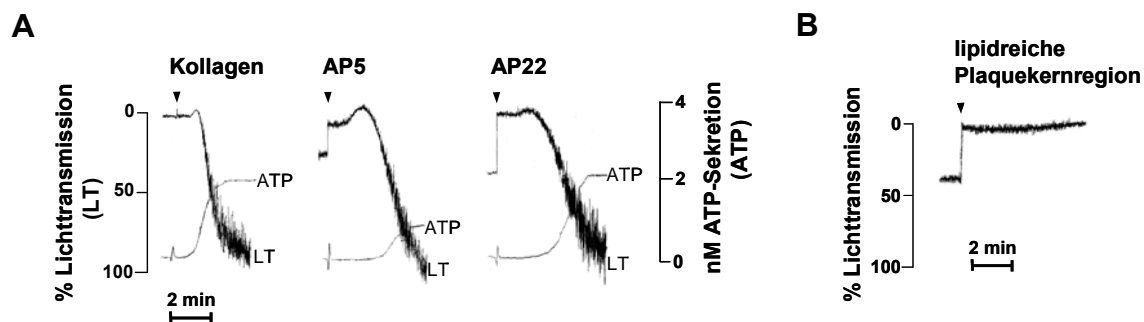


Abb. 4.2: Aktivierung gewaschener humaner Thrombozyten durch atheromatöse Plaques (AP). Links) Digitalfotografische Aufnahme der atherosklerotischen Läsion eines Patienten mit Karotisstenose unmittelbar nach der Präparation der atheromatösen Plaqueregion. Rechts) Suspensionen gewaschener humaner Thrombozyten ( $400.000/\mu\text{l}$ ) wurden mit  $1,25\text{ mg Feuchtwicht/ml}$  atheromatösem Plaquehomogenat versetzt und die Ab-, bzw. Zunahme der Lichttransmission und somit der Gestaltwandel („*shape change*“) und die darauf folgende Aggregation der Plättchen mittels turbidimetrischer Aggregationsmessung bestimmt. Die gezeigte Kurve ist repräsentativ für je 2 bis 3 Experimente mit den atheromatösen Plaqueregionen 56 unterschiedlicher Patienten.

Die Thrombozytenaktivierung durch das atheromatöse Plaquematerial war dosisabhängig und erreichte ihr Maximum in der Regel bei einer Plaquekonzentration von 1 bis  $2,5\text{ mg Feuchtwicht/ml}$  (Daten nicht gezeigt).

Auch in plättchenreichem Plasma induzierten die atheromatösen Plauehomogenate nach einer charakteristischen „lag“-Phase von 0,5 bis 1 min einen Thrombozytengestaltwandel und darauf folgend eine Aggregation (Abb. 4.3 A). Die Kinetik der Plaue-vermittelten Plättchenaktivierung war hierbei vergleichbar mit der Kinetik der Horm<sup>®</sup>-Kollagen-induzierten Thrombozytenstimulation. 56 der 60 im Vergleich getesteten Plaues riefen eine submaximale oder maximale Aggregation im PRP von durchschnittlich  $82 \pm 39\%$  Lichttransmission (MW $\pm$ SA; n=56 Plaues) hervor (Abb. 4.3 A und 4.4 A). Zusätzlich stimulierten diese aggregationsaktiven Plauehomogenate auch die Sekretion von ATP aus den dichten Granula der Thrombozyten (Abb. 4.3 A). Im Gegensatz dazu verursachte die Zugabe der Homogenate lipidreicher Plauekernregionen (1,25 mg Feuchtwicht/ml) keinerlei Aktivierung der Blutplättchen im PRP (Abb. 4.3 B).



**Abb. 4.3: Horm<sup>®</sup>-Kollagen und atheromatöse Plaues (AP) induzieren eine vergleichbare Kinetik der Thrombozytenaktivierung im PRP. Lipidreiche Plauekernregionen hingegen können die Plättchen im PRP nicht aktivieren.** A) Horm<sup>®</sup>-Kollagen (2,5 µg/ml) oder atheromatöses Plauematerial (1,25 mg Feuchtwicht/ml) wurden zu Citrat-antikoaguliernem PRP pipettiert und der „shape change“, sowie die Aggregation der Blutplättchen nach Zugabe der Agonisten mittels turbidimetrischer Aggregationsmessung bestimmt. Die Thrombozytenaggregation wurde als % Lichttransmission (LT) angegeben. Zusätzlich wurde auch die Kollagen- und Plaue-stimulierte ATP-Sekretion aus den dichten Granula der Plättchen mittels „Luziferin-Luziferase-Assay“ gemessen und als nM ATP-Sekretion (ATP) angegeben (siehe Abschnitt 3.2.5). Die gezeigten Kurven sind repräsentativ für je 2 bis 13 Experimente mit den atheromatösen Plauehomogenaten 56 (Thrombozytenaggregationsmessung), bzw. 10 (ATP-Sekretionsmessung) unterschiedlicher Patienten. B) Homogenate einer lipidreichen Plauekernregion (1,25 mg Feuchtwicht/ml) wurden zu Citrat-PRP pipettiert und die Aktivierung der Plättchen im Aggregometer bestimmt. Die gezeigten Kurven sind repräsentativ für 9 Experimente mit den lipidreichen Plauekernregionen 3 unterschiedlicher Patienten.

Nicht alle der untersuchten atheromatösen Plaues waren jedoch in der Lage eine Aktivierung der Thrombozyten im PRP hervorzurufen. Vier der 60 im Vergleich analysierten Läsionen waren inaktiv und verursachten weder einen Plättchengestaltwandel, noch die Aggregation oder Sekretion der Thrombozyten in plättchenreichem Plasma (Abb. 4.4 A und B). Auf diese inaktiven Plaues wird später in Abschnitt 4.6 des Ergebnisteils noch genauer eingegangen.

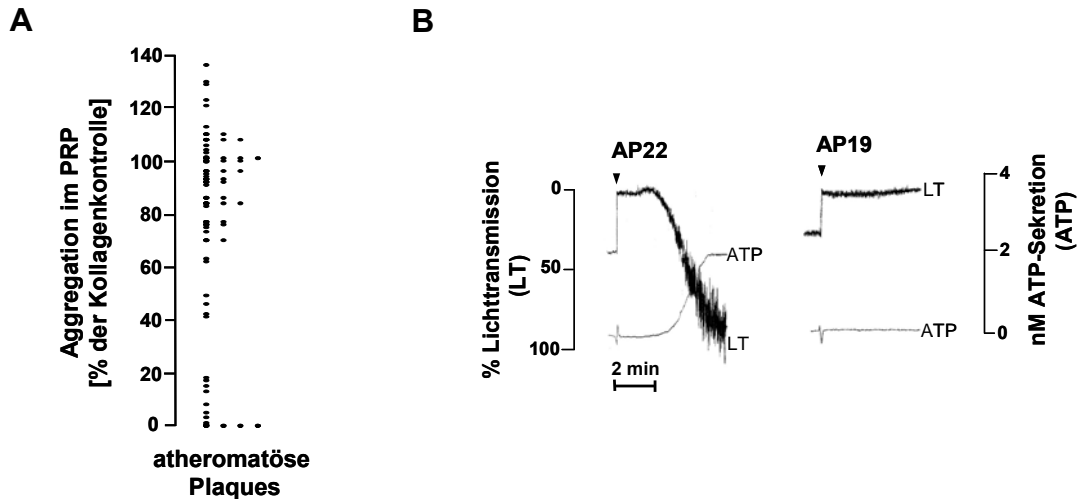


Abb. 4.4: Übersicht über die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung im PRP. A) Aggregation der Blutplättchen in Citrat-antikoaguliertem PRP nach der Zugabe der atheromatösen Plaques (AP) (1,25 mg Feuchtgewicht/ml) 60 unterschiedlicher Patienten mit Karotisstenose. Die Werte sind als % der Kollagen (2,5 µg/ml)-induzierten Aggregation angegeben und stellen Mittelwerte aus je 2 bis 13 Messungen im Citrat-PRP verschiedener Probanden dar. Auf Grund der Angabe der Werte als % der Kollagenkontrolle kann die Plaque-induzierte Aggregation auch mehr als 100% Aggregation betragen. B) Vergleich von Thrombozyten-, „shape change“ und Aggregation (% Lichttransmission = LT; PRP = 0%, PPP = 100%), sowie der ATP-Sekretion (nM ATP-Sekretion = ATP) im Citrat-PRP eines Probanden induziert durch ein aktives (AP22) und ein inaktives (AP19) atheromatöses Plaqueshomogenat (1,25 mg Feuchtgewicht/ml).

Wenn die Homogenate atheromatöser Plaques zu antikoaguliertem Blut gegeben wurden, dann induzierten sie ebenfalls dosisabhängig eine irreversible Plättchenaggregation (Abb. 4.5). Auch hier war wie zuvor im PRP die Plaque-vermittelte Kinetik der Thrombozytenaktivierung sehr ähnlich zur Horm<sup>®</sup>-Kollagen induzierten Blutplättchenstimulation.

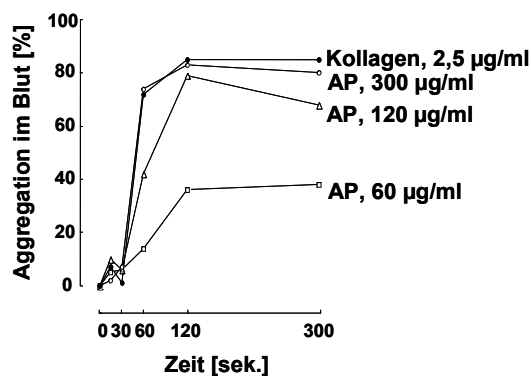
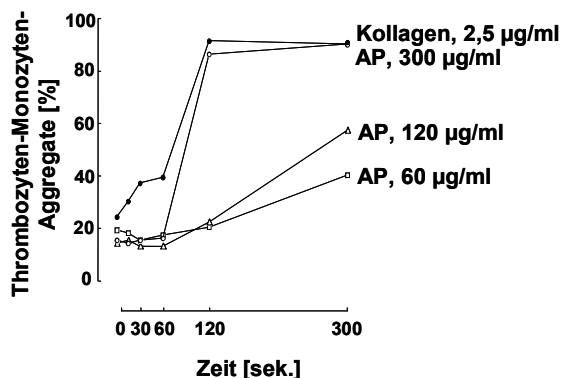


Abb. 4.5: Dosisabhängige Stimulation der Thrombozytenaggregation im Blut vermittelt durch Horm<sup>®</sup>-Kollagen und atheromatöses Plaquesmaterial (AP). Die durch die Zugabe von Kollagen (2,5 µg/ml)- oder ansteigender Konzentrationen an Plaquesmaterial (x µg Feuchtgewicht/ml) verursachte Aggregation in Citrat-antikoaguliertem Blut wurde mittels Einzelthrombozytenzählung bestimmt und als % Aggregation im Blut angegeben (siehe Abschnitt 3.2.6.1). Das gezeigte Diagramm ist repräsentativ für 20 voneinander unabhängige Experimente.

#### 4.1.2. Atherosklerotische Plaques stimulieren die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten im Blut, sowie die Fibrinbildung in PPP, PRP und Blut

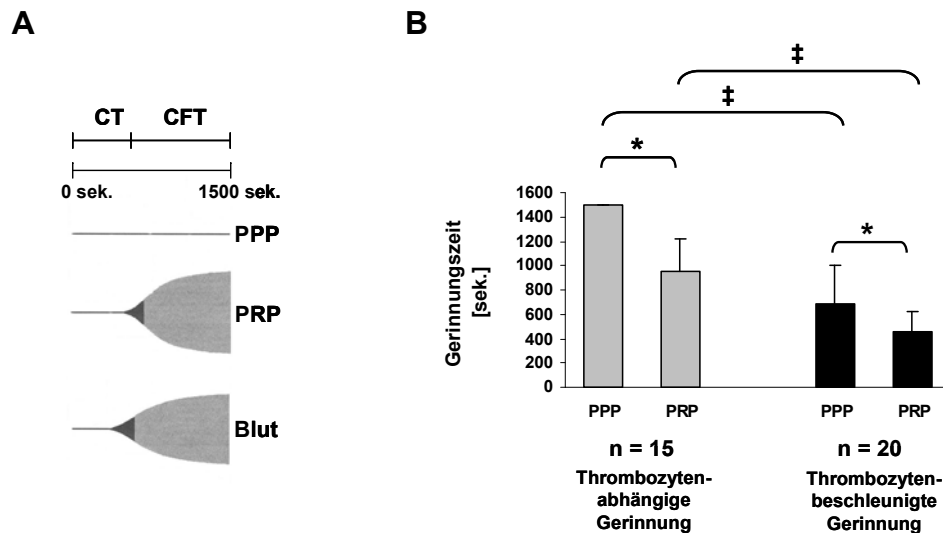
Die Zugabe ansteigender Konzentrationen an atheromatösen Plauehomogenaten zu Citrat-antikoaguliertem Blut induzierte dosisabhängig die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Konjugaten (Abb. 4.6).



**Abb. 4.6: Kollagen- und Plaque-induzierte Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten im Blut.** Die Messung der durch Horm<sup>®</sup>-Kollagen (2,5 µg/ml)- oder durch ansteigende Konzentrationen an atheromatösem Plauematerial (AP) (x µg Feuchtgewicht/ml)-induzierten Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten erfolgte in gerührtem Citratblut 5 min nach der Zugabe der Agonisten mittels Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 3.2.7). Die Thrombozytenpopulation wurde hierfür mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten anti-CD41a-Antikörpers, die Monozytenpopulation mittels eines fluoreszenzmarkierten anti-CD14-Antikörpers markiert. Das gezeigte Diagramm ist repräsentativ für 20 voneinander unabhängige Experimente.

Wie aus Arbeiten von Lösche *et al.* bekannt war, kann die Interaktion von Thrombozyten und Monozyten zur Aktivierung des intravaskulären Gewebethromboplastins („*tissue factors*“) und somit zur Aktivierung der extrinsischen Blutgerinnung führen (Losche, 2005). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob das atheromatöse Plauematerial, welches in der Lage war, die Interaktion von Thrombozyten und Monozyten zu fördern, zusätzlich thrombozytenabhängig Fibrinbildung und Gerinnung induzieren konnte. Mit Hilfe der Thrombelastographie nach Rotationsprinzip war es möglich die Plaque-stimulierte Fibrinbildungs-, bzw. Gerinnungszeit in rekalkifiziertem plättchenarmem und plättchenreichem Plasma, sowie in rekalkifiziertem Blut zu analysieren (siehe Abschnitt 3.2.8). Es wurden hierbei Plauehomogenate von 37 verschiedenen Patienten vergleichend untersucht. Zwei der 37 getesteten Plaues waren gerinnungsaktiv und induzierten weder im PPP, noch PRP oder Blut die Bildung von Fibrin (Daten nicht gezeigt). Diese beiden Plaues waren darüber hinaus ebenfalls nicht in der Lage, eine Aggregation der Thrombozyten im PRP hervorzurufen (Daten nicht gezeigt). 35 der 37, also 95%, der untersuchten Plaues jedoch stimulierten die Fibrinbildung und waren somit gerinnungsaktiv. 15 dieser 35 gerinnungsaktiven

Plauehomogenate konnten nur im PRP, nicht aber im PPP eine Gerinnung induzieren (Abb. 4.7 A und B). Diese atheromatösen Läsionen benötigten also die Anwesenheit von Plättchen, um die Bildung von Fibrin stimulieren zu können. Die Zeit bis zum Einsetzen der Gerinnung im PRP betrug hierbei  $954 \pm 268$  sek. (MW $\pm$ SA; n=15 Plaques). Im PPP kam es hingegen für mehr als 1500 sek. zu keiner Fibrinbildung (Abb. 4.7 A und B).



**Abb. 4.7: Atheromatöse Plaques stimulieren Fibrinbildung und Gerinnung in rekalfiziertem PPP, PRP und Blut.** A) Citrat-antikoaguliertes, mit 16 mM CaCl<sub>2</sub> rekalfiziertes PPP, PRP oder Blut wurde mit atheromatösem Plauehomogenat (1,65 mg Feuchtgewicht/ml) versetzt und die Plaue-induzierte Gerinnungszeit („coagulation time“ = CT) und Gerinnungsbildungszeit („clot formation time“ = CFT) mittels Thrombelastographie nach Rotationsprinzip im ro<sup>®</sup>TEM-Gerät ermittelt (siehe Abschnitt 3.2.8). Exemplarisch sind die Thrombelastogrammkurven im PPP, PRP und Blut eines der 15 untersuchten Plaques gezeigt, welche thrombozytenabhängig Fibrinbildung, bzw. Gerinnung induzieren. B) Zusammenfassung der Plaue-stimulierten Gerinnungszeiten in PPP und PRP. Gegenüberstellung der Plauehomogenate 35 verschiedener Patienten, welche thrombozytenabhängig (grau; n=15) und thrombozytenbeschleunigt (schwarz; n=20) Fibrinbildung, bzw. Gerinnung induzieren. \* p < 0,05 für PPP versus PRP. ‡ p < 0,05 für thrombozytenabhängig versus thrombozytenbeschleunigte Gerinnung.

Die anderen 20 der 37 vergleichend analysierten Plauehomogenate konnten bereits im PPP und somit thrombozytenunabhängig eine Gerinnung hervorrufen (Abb. 4.7. B). Diese setzte nach  $680 \pm 320$  sek. (MW $\pm$ SA; n=20 Plaques) ein. Die Zugabe dieser Plauehomogenate zum PRP führte schon nach  $452 \pm 175$  sek. (MW $\pm$ SA; n=20 Plaques) zur Fibrinbildung und wurde demzufolge signifikant durch die Thrombozyten beschleunigt. Darüber hinaus war sie auch signifikant kürzer, als die Gerinnungszeit der 15 Plaques, welche keine Koagulation im PPP induzieren konnten.

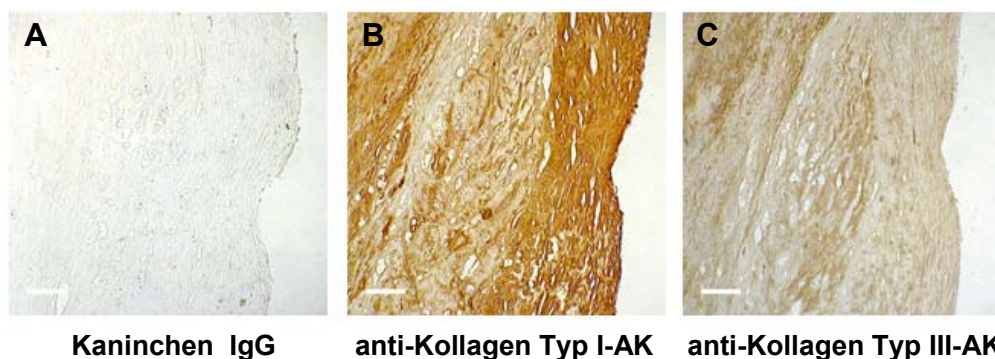
Zusammenfassend konnte aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass der Großteil der untersuchten Plauehomogenate in der Lage war, eine Fibrinbildung, bzw. eine Gerinnung zu stimulieren. Die Plaue-vermittelte Fibrinbildung und Koagulation schien hierbei ganz oder zumindest teilweise thrombozytenabhängig hervorgerufen worden zu sein.



## **4.2. Bedeutung von Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Plaquestrukturen für die Thrombozytenaktivierung**

### **4.2.1. Lokalisation und Morphologie Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiver Strukturen im Plaque**

Ähnliche Kinetiken der Horm<sup>®</sup>-Kollagen- und Plaque-induzierten Thrombozytenaktivierung (siehe Abschnitt 4.1.1) führten zu der Frage, ob die Plaque-stimulierte Blutplättchenaktivierung durch kollagenartige Plaquestrukturen verursacht sei. Es wurden daher zunächst die Lokalisation und die Morphologie von Kollagenkomponenten im Plaque genauer untersucht. Vor allem die Kollagentypen I und III wurden näher analysiert, da aus früheren Veröffentlichungen bekannt war, dass diese beiden Kollagene bevorzugt in atherosklerotischen Läsionen akkumulieren (McCullagh *et al.*, 1980; Katsuda *et al.*, 1992; Katsuda *et al.*, 2003). Zur Lokalisation der Kollagenstrukturen wurde das Plaquematerial unmittelbar nach der chirurgischen Entfernung in Paraffin eingebettet (siehe Abschnitt 3.2.9.1). Die Paraffinblöcke wurden anschließend in Längsschnitte unterteilt und das Plaquekollagen mit Hilfe spezifischer polyklonaler anti-Kollagen Typ I- und anti-Kollagen Typ III-Antikörper gefärbt (Abb. 4.8).

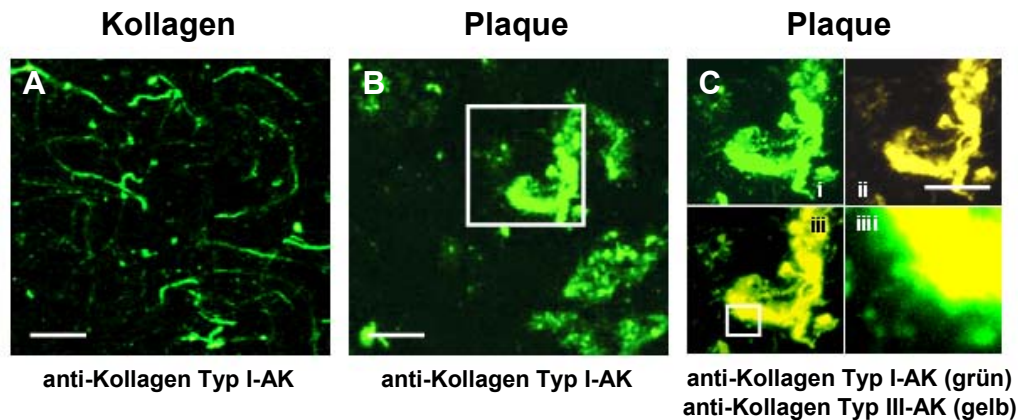


**Abb. 4.8: Identifikation Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiver Strukturen in den Paraffinschnitten atherosklerotischer Läsionen.** Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen aufeinander folgender Paraffinlängsschnitte (Dicke: 3 µm) eines vorangeschrittenen atherosklerotischen Plaques, welcher mit spezifischen anti-Kollagen Typ I- (B), bzw. anti-Kollagen Typ III (C)-Antikörpern (AK) angefärbt wurde. Als Kontrolle für die polyklonalen anti-Kollagen-Antikörper wurde Kaninchen IgG (A) eingesetzt. Die Präparate wurden mit einem biotinyliertem sekundären anti-Kaninchen-Antikörper inkubiert und im Anschluss daran die kollagenpositiven Plaquestrukturen durch das Anwenden der „Streptavidin-Biotin-Komplex-Merrettichperoxidase-Technik“ mit dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid als bräunliche Strukturen sichtbar gemacht. Die Zellnuklei wurden mit Hämatoxylin und Eosin gegen gefärbt und sind in blassblau dargestellt. Die gezeigten lichtmikroskopischen Aufnahmen sind repräsentativ für 3 Experimente mit den Plaquelängsschnitten 3 unterschiedlicher Patienten. Längenmaß: 100 µm.

In der immunhistochemischen Färbung der Plaqueschnitte konnten sowohl Kollagen Typ I-, als auch Kollagen Typ III-positiv Strukturen identifiziert werden (Abb. 4.8). Die Kollagen Typ I-positiven Komponenten waren vor allem in der fibrösen Kappe der atherosklerotischen

Läsionen lokalisiert. Darüber hinaus traten sie aber auch im Kernbereich der Plaquelängsschnitte auf. Die Kollagen Typ III-positiven Bereiche befanden sich im Gegensatz dazu weniger in der fibrösen Kappe, sondern vermehrt in der Kernregion des Plaquematerials.

Neben der immunhistochemischen Untersuchung von Plaquelängsschnitten wurde die Lokalisation und Morphologie kollagenartiger Strukturen ebenfalls in den Homogenaten der atheromatösen Läsionen analysiert. Hierfür wurden die Plauehomogenate auf Glasdeckgläschen aufgebracht und mit spezifischen polyklonalen anti-Kollagen Typ I- und anti-Kollagen Typ III-Antikörpern, sowie entsprechenden fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern angefärbt (siehe Abschnitt 3.2.9.2). Die Untersuchung dieser Präparate mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass sowohl Kollagen Typ I-, als auch Kollagen Typ III-positive Strukturen in den Plauehomogenaten vorhanden waren (Abb. 4.9 B und C). Verglichen mit der charakteristisch fibrillären Struktur von Horm<sup>®</sup>-Kollagen (Abb. 4.9 A), waren die Kollagenstrukturen im Plauematerial eher heterogen in ihrer Morphologie (Abb. 4.9 B und C). Sie variierten relativ stark in ihrer Größe (kleine und größere Bestandteile) und Form (punktförmige und faserige Strukturen), und wiesen zum Teil eine clusterartige, spongiforme Gestalt auf.



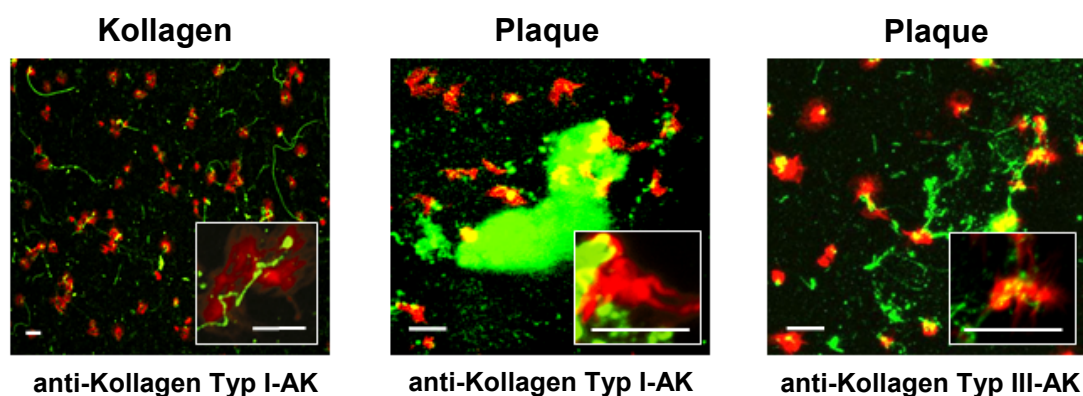
**Abb. 4.9: Identifikation Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiver Strukturen in Plauehomogenaten.** A, B) Glasdeckgläschen wurden mit Horm<sup>®</sup>-Kollagen (20 µg/ml) oder Plauehomogenaten (5 mg Feuchtgewicht/ml) beschichtet, deren Kollagenstrukturen mit Hilfe spezifischer anti-Kollagen-Antikörper (AK) gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Doppelfärbung eines Plauehomogenates mit fluoreszenzmarkierten anti-Kollagen Typ I- und anti-Kollagen Typ III-Antikörpern (i, anti-Kollagen Typ I-Färbung (grün); ii, anti-Kollagen Typ III-Färbung (gelb); iii, Übereinanderlagerung von i und ii; iiiii, Vergrößerung von iii). Die gezeigten konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind repräsentativ für 3 Experimente mit den Plauehomogenaten 3 unterschiedlicher Patienten. Längenmaß: 50 µm.

Um Kollagen Typ I- und die Kollagen Typ III-positive Strukturen gleichzeitig in einem Plauehomogenat untersuchen zu können, wurde eine Doppelfärbung beider Kollagentypen wie in Abschnitt 3.2.9.2 beschrieben durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die gegen diese

beiden Kollagentypen gerichteten Antikörper vor der Inkubation mit dem Plaquematerial direkt mit den Fluoreszenzfarbstoffen „Zenon™ Alexa Fluor® 488“ und „Zenon™ Alexa Fluor® 647“ markiert. Die Doppelfärbung der Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-Strukturen in den Plauehomogenaten hat gezeigt, dass diese beiden Kollagentypen häufig miteinander kolokalisierten, wobei das Kollagen Typ I auf das Kollagen Typ III aufgelagert zu sein schien (Abb. 4.9 C).

#### **4.2.2. Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an kollagenpositiven Plauestrukturen unter statischen Bedingungen**

Nach der Identifikation kollagenpositiver Plauekomponenten, wurde die Adhäsion und Aggregation von Blutplättchen am Plauematerial untersucht. Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positive Strukturen der zuvor auf Glasoberflächen immobilisierten Plauehomogenate wurden wie in Abschnitt 3.2.10 beschrieben mit spezifischen anti-Kollagen-Antikörpern angefärbt und mit Suspensionen gewaschener humaner Thrombozyten inkubiert (Abb. 4.10). Horm®-Kollagen-beschichtete Glasoberflächen, in welchen die Kollagen Typ I-positiven Strukturen angefärbt waren und welche ebenfalls mit gewaschenen Plättchen inkubiert wurden, dienten hierbei als Referenz.

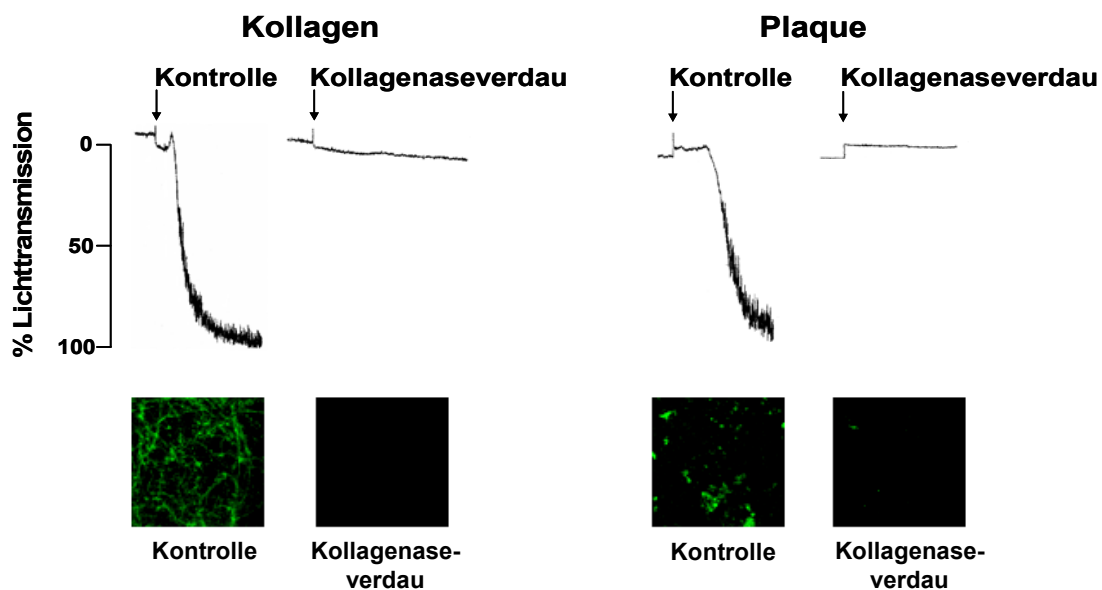


**Abb. 4.10: Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten an Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Plauestrukturen.** Die kollagenpositiven Strukturen Horm®-Kollagen (20 µg/ml)-, sowie Plauehomogenat (5 mg Feuchtgewicht/ml)-beschichteter Glasdeckgläschen wurden mit spezifischen anti-Kollagen Typ I- und anti-Kollagen Typ III-Antikörpern (AK) gefärbt. Suspensionen gewaschener humaner Thrombozyten (40.000/µl) wurden auf die Kollagen- oder Plaue-Oberflächen aufgebracht, und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Präparate fixiert, permeabilisiert und einer Färbung des thrombozytären Aktinzytoskeletts mittels fluoreszenzmarkiertem Phalloidin unterzogen. In den gezeigten kofokalmikroskopischen Aufnahmen sind kollagenpositive Strukturen in grün und das thrombozytäre F-Aktin in rot dargestellt. Dieses Experiment ist repräsentativ für 3 Experimente mit den Plauehomogenaten 2 unterschiedlicher Patienten. Längenmaß: 10 µm.

Die Thrombozyten adhärten sowohl an das Horm®-Kollagen, als auch an Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positive Komponenten der Plauehomogenate (Abb. 4.10). Die Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Plauestrukturen, welche die Blutplättchen aktivierten,

waren morphologisch sehr heterogen. Sowohl große clusterartige, als auch kleine punktförmige oder faserige Kollagenstrukturen der untersuchten atheromatösen Plauehomogenate waren bei diesen Experimenten in der Lage, die Adhäsion, Aktivierung, Formveränderung und Ausbreitung der Thrombozyten zu induzieren. Ausdruck der starken Plättchenaktivierung durch die kollagenpositiven Plauekomponenten war die Formveränderung des thrombozytären Aktinzytoskeletts, sowie die damit einhergehende Ausbildung von Pseudopodien und Aktinstressfasern (Abb. 4.10; Vergrößerungen).

Um herauszufinden, ob Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positive Strukturen die zentralen thrombozytenaktivierenden Plauebestandteile darstellten, wurden die nachfolgenden Verdau- und Hemmexperimente durchgeführt. Im ersten Versuchsansatz wurden die Plauehomogenate mit bakterieller Kollagenase inkubiert (Abb. 4.11). Der Verdau von Horm<sup>®</sup>-Kollagen mit bakterieller Kollagenase diente hierbei als Kontrolle.

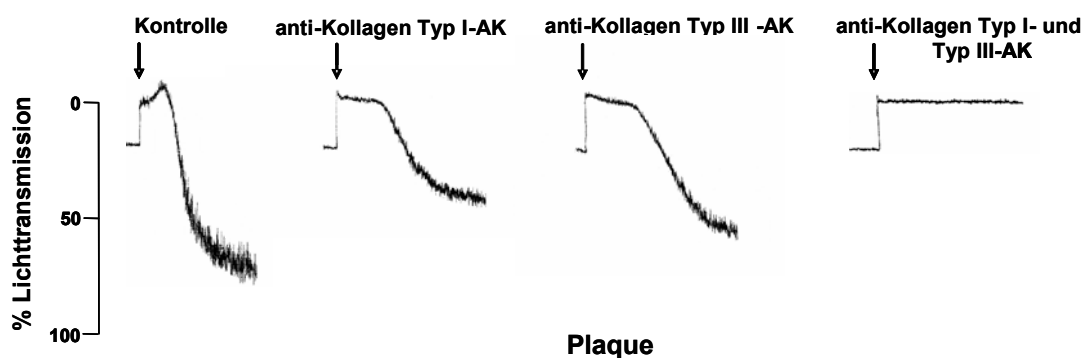


**Abb. 4.11: Inhibition der Kollagen- und Plaue-induzierten Thrombozytenaktivierung nach Kollagenasebehandlung.** Horm<sup>®</sup>-Kollagen (20 µg) oder atheromatöses Plauematerial (2 mg Feuchtgewicht) wurde für 24 h bei 37°C mit bakterieller Kollagenase oder als Kontrolle mit Albumin in TESCA-Puffer inkubiert (siehe Abschnitt 3.2.13). Oben) Kontroll- (20 µl; enthalten 8 µg Kollagen oder 0,8 mg Feuchtgewicht Plauematerial) und Verdauansätze (20 µl) wurden zu Citrat-antikoaguliertem PRP pipettiert und die Thrombozytenaggregation (% Lichttransmission; PRP = 0%, PPP = 100%) bestimmt. Unten) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kontroll- und Verdauansätze, welche auf Glasdeckgläschen aufgebracht und mit einem spezifischen anti-Kollagen Typ III-Antikörper gefärbt wurden (grüne Fluoreszenz). Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für 4 Experimente mit den Plauehomogenaten 4 unterschiedlicher Patienten.

Nach der Kollagenasebehandlung des Plauematerials, bzw. des Kollagens wurde der Kollagenverdau fluoreszenzmikroskopisch überprüft und die thrombozytenaktivierenden

Eigenschaften der Ansätze mittels turbidimetrischer Aggregationsmessung im PRP analysiert (Abb. 4.11). Durch die Kollagenasebehandlung ging sowohl die Kollagen-, als auch die Plaque-vermittelte Thrombozytenaktivierung im PRP vollständig verloren. Darüber hinaus konnten in den Immunfluoreszenzpräparaten der verschiedenen Verdauansätze im Gegensatz zu den Kontrollen keine kollagenpositiven Strukturen mehr identifiziert werden.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden Plaquehomogenate mit spezifischen polyklonalen anti-Kollagen Typ I- und anti-Kollagen Typ III-Antikörpern vorbehandelt und deren thrombozytenaktivierende Eigenschaften anschließend mittels turbidimetrischer Aggregationsmessung im PRP untersucht. Durch die Präinkubation des Plaquematerials mit beiden anti-Kollagen-Antikörpern konnte die Plaque-vermittelte Plättchenaktivierung („*shape change*“ und Aggregation) vollständig inhibiert werden (Abb. 4.12). Jeder dieser Antikörper für sich genommen reduzierte die Plaque-stimulierte Thrombozytenaktivierung nur zum Teil (Daten nicht gezeigt); auch eine Verdopplung der Konzentration eines jeden Antikörpers bewirkte keine stärkere Hemmung und konnte die Plaque-induzierte Plättchenaggregation zwar verringern, nicht jedoch vollständig inhibieren (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12: Präinkubation des Plaquematerials mit anti-Kollagen Typ I- und anti-Kollagen Typ III-Antikörpern inhibiert die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung im Citrat-PRP.** Atheromatöses Plaquematerial (0,5 mg Feuchtgewicht) wurde für 10 min bei RT mit einem anti-Kollagen Typ I (25 µg)-Antikörper, einem anti-Kollagen Typ III (25 µg)-Antikörper oder der Kombination aus beiden Antikörpern (je 12,5 µg) vorinkubiert. Die Ansätze wurden zu Citrat-antikoagulierte PRP pipettiert und die Thrombozytenaktivierung im Aggregometer überprüft. Die Plättchenaggregation ist in % Lichttransmission (PRP = 0%, PPP = 100%) angegeben. Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für 3 Experimente mit den Plaquehomogenaten 3 unterschiedlicher Patienten.

Die anti-Kollagen Typ I- und anti-Kollagen Typ III-Antikörper-vermittelte Blockade des Plaque-stimulierten Thrombozytengestaltwandels und der Aggregation erwies sich allerdings als chargenabhängig. In späteren Versuchen zur Hemmung der Plaque-vermittelten Plättchenaktivierung, in welchen teilweise die gleichen Plaquehomogenate wie in den früheren Versuchen eingesetzt wurden, konnte mit einer anderen Charge anti-Kollagen Typ I- und anti-

Kollagen Typ III-Antikörpern des selben Herstellers nur eine geringe Inhibition der Thrombozytenaggregation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe beider Antiseren führte auch nach Verdopplung, bzw. Verdreifachung der eingesetzten Antikörperkonzentrationen nur noch zu einer Reduktion der Aggregation vergleichbar mit der, wie sie in früheren Versuchen mit jedem anti-Kollagen-Antikörper für sich genommen auftraten (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede könnte darin bestehen, dass die Antikörper der zweiten Charge zum einen von anderen Kaninchen stammten und zum anderen das Aufreinigungsverfahren der polyklonalen Antiseren zwischen der ersten und zweiten Antikörpercharge leicht variiert wurde, so dass die polyklonalen Antiseren der ersten Charge, welche effektiver inhibierten, vermutlich Antikörper enthielten, welche zumindest teilweise gegen andere Epitope des Kollagens gerichtet waren, als die Antikörper der polyklonalen Antiseren der zweiten Charge.

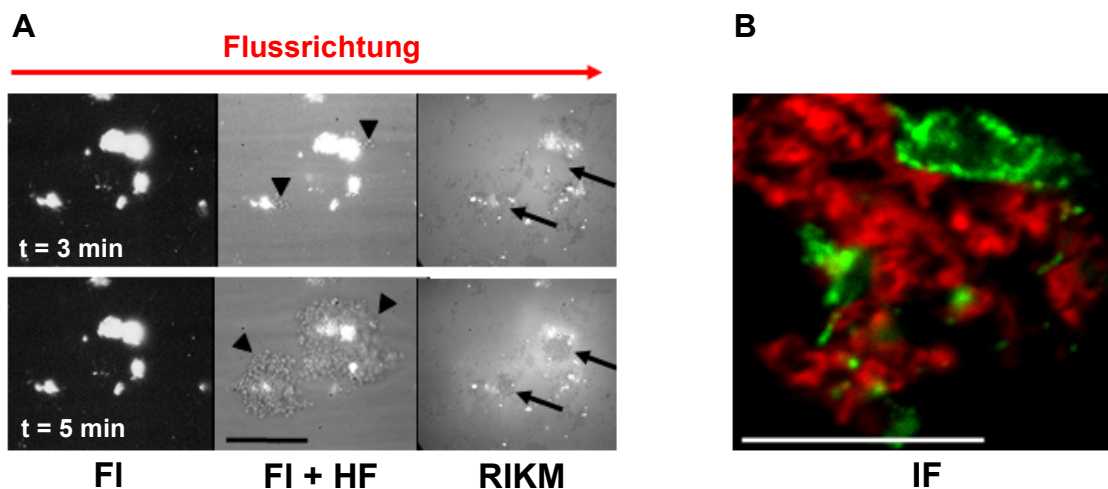
Zusammengefasst haben sowohl die Verdauexperimente mit bakterieller Kollagenase, als auch die Hemmexperimente mit den anti-Kollagen Typ I- und anti-Kollagen Typ III-Antikörpern gezeigt, dass Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positive Plauekomponenten essentiell für die Thrombozytenaktivierung und Aggregation durch humanes atheromatöses Plauegewebe waren.

#### **4.2.3. Adhäsion und Aggregatbildung von Thrombozyten an kollagenpositiven Plauestrukturen unter arteriellen Flussbedingungen**

Nachdem die Aktivierung von Thrombozyten durch Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positive Plauestrukturen unter statischen Adhäsionsbedingungen nachgewiesen wurde, wurden die Blutplättchenadhäsion und Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen untersucht, um der *in vivo*-Situation nach Ruptur einer atherosklerotischen Läsion möglichst nahe zu kommen. Hierfür wurde Hirudin-antikoaguliertes Blut für 10 min mit einer arteriellen Scherrate von 1500 s<sup>-1</sup> (entspricht der Scherrate in moderat stenosierten Arterien) über Plaue-beschichtete Oberflächen perfundiert (siehe Abschnitt 3.2.11). Mittels Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie konnte die Adhäsion einzelner Thrombozyten und die darauf folgende Aggregation an kollagenartigen Plauestrukturen visualisiert werden (Abb. 4.13 A und Video-CD im Anhang). Innerhalb der ersten 2 min nach Beginn der Blutperfusion begannen sich die Thrombozyten transient am flussabwärts gelegenen Ende der kollagenpositiven Plauestrukturen anzulagern. Nach ca. 3 min ging diese transiente Adhäsion der Plättchen in eine stabile über. Weitere Thrombozyten wurden rekrutiert, so dass sich nach und nach stetig wachsende Blutplättchenaggregate ausbildeten. Nach ca. 5 min traten final große Thrombozytenaggregate auf den Plaue-Oberflächen auf. Mit Hilfe der Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie, einem mikroskopischen Verfahren zur Visualisierung von



Membrankontakten und immobilisierten Substraten, war es möglich Flächen von ausgebreiteten Blutplättchen („*spread platelets*“) am Boden der Aggregate darzustellen (Abb. 4.13 A und Video-CD im Anhang). Über diese Fläche aus gespreizten Thrombozyten wurden die nach oben großflächig gewachsenen Aggregate am Plaquesubstrat verankert. Auch hier zeigte sich wie zuvor bei der Untersuchung der statischen Plättchenadhäsion am Plaquematerial (siehe Abb. 4.10, Abschnitt 4.2.2) kein Unterschied im Anhaften der Thrombozyten an morphologisch heterogenen, kleineren oder größeren kollagenartigen Plauekcomponenten. Beide Strukturen waren in der Lage, die Adhäsion von Blutplättchen zu vermitteln und diese zu aktivieren.



**Abb. 4.13: Thrombozyten in antikoaguliertem Blut adhären und aggregieren an kollagenpositiven Plauekstrukturen unter arteriellen Flussbedingungen ( $1500 \text{ s}^{-1}$ ).** A) Hirudin-antikoaguliertes Blut wurde in einer „Parallel-Platten-Flusskammer“ mit einer Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  für 10 min bei  $37^\circ\text{C}$  über Plauek ( $5 \text{ mg}$  Feuchtgewicht/ml)-beschichtete Glasdeckgläschen perfundiert. Die Plauekollagenstrukturen wurden vor dem Flussexperiment mit Hilfe spezifischer anti-Kollagen Typ III-Antikörper angefärbt (weiß; Fluoreszenz = FI). Adhärenente Thrombozyten wurden mittels Hellfeld (HF)- oder Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM) dargestellt. Die Pfeilspitzen (▲) markieren adhärenente Thrombozyten am flussabwärts gelegenen Ende der kollagenartigen Plauekstrukturen 3 min nach Beginn des Blutflusses, sowie große Thrombozytenaggregate 5 min nach Beginn der Perfusion. Die RIKM-Technik ermöglicht die Darstellung von dunkelgrauen Bereichen ausgebreiteter, bzw. gespreizter Thrombozyten (Pfeile; ►) nah am Plaueksubstrat (Abstand:  $\sim 10 \text{ nm}$ ) 5 min, jedoch nicht 3 min nach Beginn der Perfusion, über welche die Plättchenaggregate am Plauek verankert sind. Das Experiment ist repräsentativ für 11 Flussversuche mit den Plauekhomogenaten 5 verschiedener Patienten. Längenmaß:  $40 \mu\text{m}$ . B) Immunfluoreszenz (IF)-mikroskopische Darstellung eines Thrombozytenaggregates, welches nach 10 min Perfusion am kollagenpositiven Plauekmaterial adhäreniert. Grün, Kollagen Typ III-positive Plauekstrukturen. Rot, Aktinzytoskelett der Thrombozyten. Längenmaß:  $10 \mu\text{m}$ .

Exemplarisch wurde nach einem Flussversuch das perfundierte Glasdeckgläschen aus der Flusskammer entnommen, das Präparat fixiert, die adhärenenten Thrombozyten permeabilisiert und einer Färbung des thrombozytären Aktinzytoskettes mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin unterzogen. In der konfokalmikroskopischen Fluoreszenzaufnahme dieses Perfusionspräparates zeigte sich entlang der kollagenpositiven Plauekstrukturen eine Aktivierung der Plättchen innerhalb der Aggregate (Abb. 4.13 B). Verglichen mit der Aktivierung der Thrombozyten nach

statischer Adhäsion waren die Blutplättchen in den Aggregaten, welche sich unter Flussbedingungen ausgebildet haben, etwas weniger stark aktiviert. Diese Plättchen wiesen vor allem „*shape change*“, bzw. eine Ringbildung des thrombozytären Aktins, sowie Pseudopodien auf. Stark aktivierte, ausgebreitete Thrombozyten waren kaum vorhanden.

Hervorzuheben ist, dass die Adhäsion und Aggregatbildung der Blutplättchen unter Fluss in Anwesenheit von rekombinantem Hirudin, einem direkten Thrombininhibitor, stattfand und somit unabhängig von der extrinsischen Gerinnung, welche durch den „*tissue factor*“ im Plaquematerial aktiviert hätte werden können, ablief.

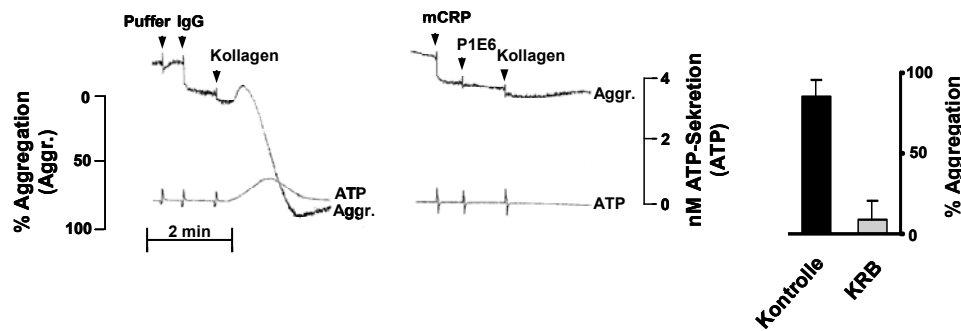
### **4.3. Relative Bedeutung der thrombozytären Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ für die Thrombozytenaktivierung vermittelt durch fibrilläres Kollagen und atherosklerotisches Plaquematerial**

#### **4.3.1. Vermittlung der Plaque-induzierten Thrombozytenadhäsion, Aggregation und Sekretion durch die Aktivierung thrombozytärer Kollagenrezeptoren**

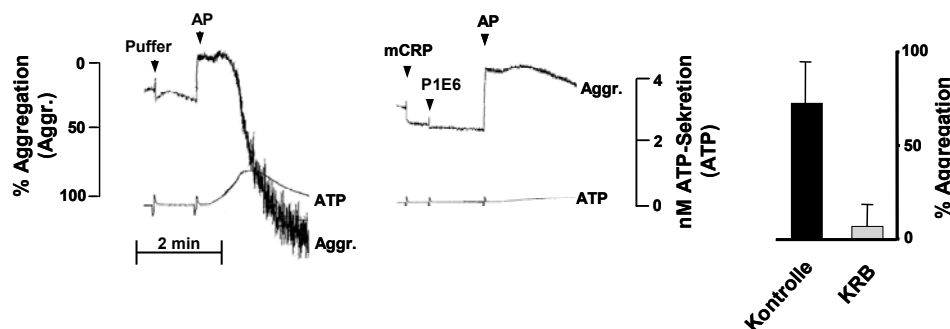
In den folgenden Experimenten wurde untersucht, inwiefern die beiden bedeutendsten thrombozytären Kollagenrezeptoren, GPVI und das Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , eine Rolle für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung spielen. Suspensionen gewaschener humaner Blutplättchen wurden mit der Kombination aus dem monomeren kollagenverwandten Peptid mCRP („*monomeric collagen-related peptide*“) zur Inhibition von GPVI und dem monoklonalen anti-Integrin  $\alpha_2$ -Antikörper P1E6, sowie entsprechenden Kontrollen präinkubiert, und im Anschluss daran die Plaque-stimulierte Thrombozytenaktivierung und Aggregation mittels turbidimetrischer Aggregationsmessung bestimmt (Abb. 4.14 B). Als Kontrolle für eine effektive Hemmung der beiden Kollagenrezeptoren durch mCRP und P1E6 wurde fibrilläres Horm<sup>®</sup>-Kollagen eingesetzt (Abb. 4.14 A). Sowohl die Horm<sup>®</sup>-Kollagen, als auch die Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregation und ATP-Sekretion konnte durch gleichzeitige Blockade der beiden Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin  $\alpha_2\beta_1$  nahezu vollständig inhibiert werden.



## A) Kollagen



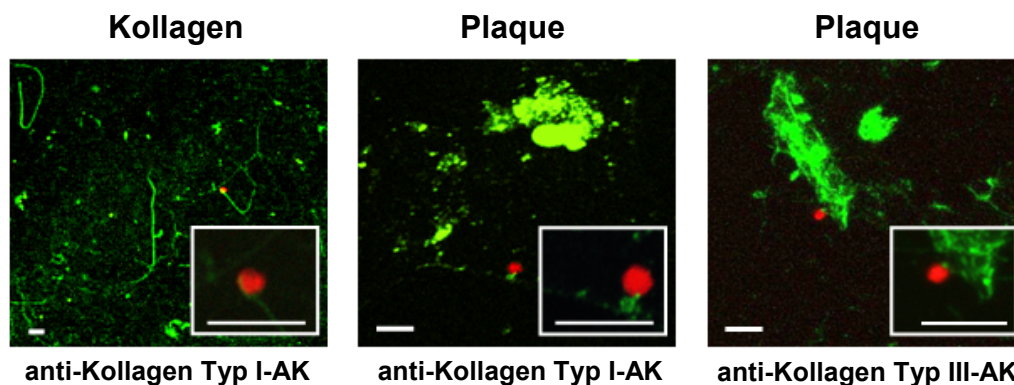
## B) Plaque



**Abb. 4.14: Inhibition der Kollagen (A)- und Plaque (B)-induzierten Thrombozytenaggregation und ATP-Sekretion mittels Kollagenrezeptorblockade (KRB).** Zur Blockade der thrombozytären Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin  $\alpha_2\beta_1$  wurden Suspensionen gewaschener humaner Thrombozyten für 5 min bei 37°C mit dem monomeren kollagenverwandten Peptid mCRP (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und dem monoklonalen anti-Integrin  $\alpha_2$ -Antikörper P1E6 (12,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert. Als Kontrolle für mCRP und P1E6 dienten PBS-Puffer und Mäuse IgG1. Anschließend wurden Horm®-Kollagen (1,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (A) oder Plaquehomogenate (2,5 mg Feuchtgewicht/ml) (B) zu den Plättchensuspensionen pipettiert und die Thrombozytenaggregation (% der Kollagen (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )-induzierten Aggregation = Aggr.), sowie gleichzeitig die ATP-Sekretion (nM ATP = ATP) aus den dichten Granula bestimmt. Die Balkendiagramme rechts zeigen die MW $\pm$ SA der Kollagen (n=5)- und der Plaque (n=9)-induzierten Aggregation.

Zusätzlich zur Untersuchung des Einflusses der Blockade beider Kollagenrezeptoren auf die Plaque-vermittelte Thrombozytenaggregation und Sekretion, wurde die Rolle von GPVI und Integrin  $\alpha_2\beta_1$  auch für die Plaque-induzierte Plättchenadhäsion und Aktivierung unter statischen Bedingungen analysiert (Abb. 4.15). Bei gleichzeitiger Inhibition beider Kollagenrezeptoren mittels mCRP und P1E6 waren sowohl die Adhäsion, als auch die Ausbreitung der Thrombozyten durch die kollagenpositiven Strukturen immobilisierter Plaquehomogenate vollständig inhibiert (Abb. 4.15; vgl. mit den Ergebnissen des gleichen Experiments ohne Kollagenrezeptorblockade in Abb. 4.10, Abschnitt 4.2.2). Nur vereinzelt traten nicht aktivierte, diskoide Plättchen auf den Plaque-Oberflächen auf. Als Vergleich zur Plaque-induzierten Thrombozytenaktivierung wurde die kollagenvermittelte Adhäsion und Aktivierung unter statischen Adhäsionsbedingungen untersucht. Auch in diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Plättchenadhäsion und Aktivierung durch gleichzeitige Blockade von GPVI und dem Integrin  $\alpha_2\beta_1$  vollständig verhindert werden konnte (Abb. 4.15; vgl. mit den

Ergebnissen des gleichen Experiments ohne Kollagenrezeptorblockade in Abb. 4.10, Abschnitt 4.2.2).



**Abb. 4.15: Inhibition der Kollagen und Plaque-vermittelten Thrombozytenadhäsion und Aktivierung mittels Kollagenrezeptorblockade.** Mit Horm<sup>®</sup>-Kollagen (20 µg/ml) oder Plaquehomogenaten (5 mg Feuchtgewicht/ml) beschichtete Glasdeckgläschen wurden mit spezifischen anti-Kollagen-Antikörpern (AK) gefärbt. Suspensionen gewaschener humaner Thrombozyten (40.000/µl) wurden zur Blockade von GPVI und Integrin  $\alpha_2\beta_1$  für 5 min bei 37°C mit mCRP (500 µg/ml) und dem Antikörper P1E6 (12,5 µg/ml) vorbehandelt. Anschließend wurden die Thrombozytensuspensionen auf die Kollagen- oder Plaque-beschichteten Oberflächen aufgebracht und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Präparate fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Grün, kollagenpositive Strukturen; rot, thrombozytäres F-Aktin. Die gezeigten konfokalmikroskopischen Aufnahmen sind repräsentativ für 3 Experimente mit Kollagen, sowie für 3 Experimente mit den Plaquehomogenaten 2 unterschiedlicher Patienten. Längenmaß: 10 µm.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass beide thrombozytäre Kollagenrezeptoren, GPVI und das Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , eine Rolle bei der Plaque-stimulierten Aktivierung von Thrombozyten besitzen. Die relative Bedeutung von GPVI und Integrin  $\alpha_2\beta_1$  wurde im Folgenden genauer analysiert.

#### **4.3.2. Atherosklerotisches Plaquematerial interagiert sowohl mit GPVI als auch mit dem Integrin $\alpha_2\beta_1$**

Um zu untersuchen, ob atherosklerotisches Plaquematerial mit beiden Kollagenrezeptoren interagiert, wurden zunächst in Zusammenarbeit mit Dr. Richard Farndale (Universität Cambridge, Cambridge, England) Bindungsstudien mit rekombinanten Kollagenrezeptoren durchgeführt. Hierzu wurden die rekombinante Ektodomäne des GPVI-Rezeptors (Smethurst *et al.*, 2004), sowie die rekombinante  $\alpha_2$  I-Domäne (Ektodomäne des Integrin  $\alpha_2\beta_1$ ) (Siljander *et al.*, 2004a) eingesetzt und mit den Plaquehomogenaten 6 unterschiedlicher Patienten oder zum Vergleich mit ihren spezifischen Kollagenliganden inkubiert. Als spezifischer Ligand für GPVI wurde das tripelhelikale Peptid CRP („collagen-related peptide“) verwendet (Morton *et al.*, 1995); als spezifischer Ligand für das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  das tripelhelikale Peptid GFOGER-GPP (Knight *et al.*, 2000). Die Bindung der rekombinanten Kollagenrezeptoren an CRP und GFOGER-GPP, sowie an die unterschiedlichen Plaquehomogenate wurde mittels eines

enzymgekoppelten Immunsorptionsstests („enzyme linked immunosorbent assay“ = ELISA) bestimmt (Siljander *et al.*, 2004a; Smethurst *et al.*, 2004). Hierbei wurde gefunden, dass das Plaquematerial sowohl an GPVI, als auch an das  $\alpha_2$ -Integrin binden kann. Die Bindung an rekombinantes GPVI betrug  $0,332 \pm 0,04$  (MW $\pm$ SA; n=6) im Vergleich zu dessen Bindung an CRP (=1,00). Darüber hinaus erwies sich die Bindung der Plaquehomogenate an GPVI als hoch spezifisch, denn sie konnte durch Präinkubation des rekombinanten Rezeptors mit dem anti-GPVI-Antikörper 10B12 (25  $\mu$ g/ml) (O'Connor *et al.*, 2006) vollständig inhibiert werden. Die Plaques zeigten auch eine magnesiumabhängige Bindung an die rekombinante  $\alpha_2$  I-Domäne von  $0,212 \pm 0,03$  (MW $\pm$ SA; n=6) im Vergleich zu deren Bindung an GFOGER-GPP (=1,00). Aus diesen Ergebnissen ging hervor, dass alle 6 untersuchten Homogenate atheromatöser Läsionen in der Lage waren sowohl mit dem Glykoprotein VI, als auch mit dem Integrin  $\alpha_2\beta_1$  spezifisch zu interagieren. Die Bindung der Plaquehomogenate an das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  fiel jedoch im Vergleich zur Plaque-GPVI-Interaktion geringer aus.

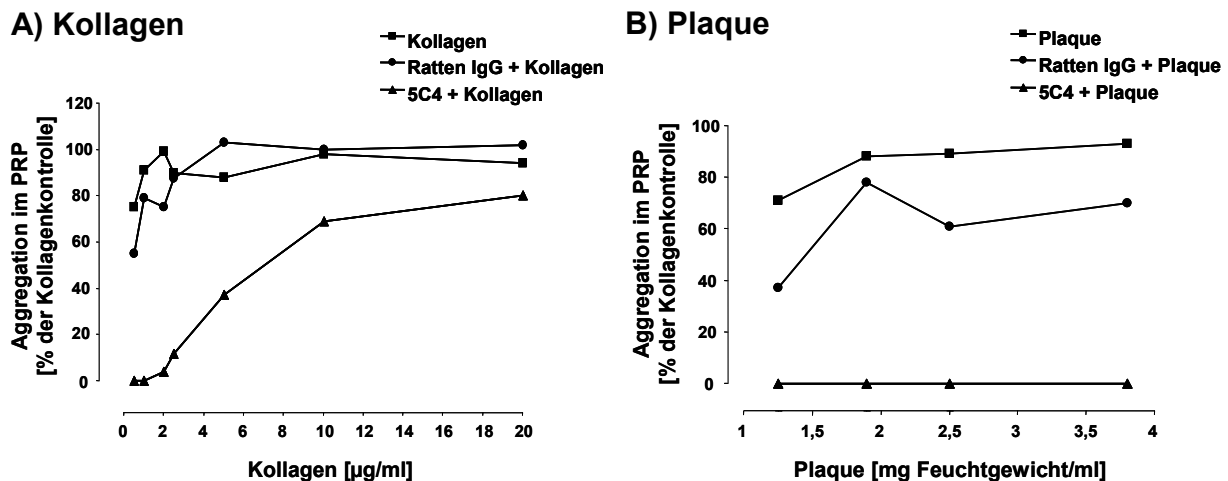
### **4.3.3. Relative Bedeutung des GPVI-Rezeptors für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung**

#### **4.3.3.1. Wirkung des anti-GPVI-Antikörpers 5C4 auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung in PRP und Blut**

Zur Untersuchung der Bedeutung des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI für die Blutplättchenaktivierung vermittelt durch atheromatöses Plaquematerial wurde die blockierende Wirkung verschiedener spezifischer anti-GPVI-Antikörper in PRP und Blut analysiert. Zu Beginn wurde hierzu zunächst der anti-GPVI-Antikörper 5C4, die Fab-Fragmente eines monoklonalen anti-GPVI Ratten IgG (Massberg *et al.*, 2003), eingesetzt. Zur Untersuchung der blockierenden Wirkung dieses Antikörpers auf die Plaque-vermittelte Thrombozytenaggregation, wurde plättchenreiches Plasma mit 5C4 oder entsprechender Isotypkontrolle (Fab-Fragmente des Ratten IgG) vorbehandelt, und anschließend die durch aufsteigende Konzentrationen an Horm<sup>®</sup>-Kollagen oder Plaquematerial stimulierte Thrombozytenaggregation bestimmt (Abb. 4.16 A und B). Die Kollagen-induzierte Aggregation konnte bis zu einer Konzentration von ca. 2  $\mu$ g/ml Horm<sup>®</sup>-Kollagen vollständig durch 5C4 inhibiert werden (Abb. 4.16 A). Mit ansteigender Kollagenkonzentration jedoch nahm die blockierende Eigenschaft dieses anti-GPVI-Antikörpers kontinuierlich ab, bis schließlich die durch 20  $\mu$ g/ml Kollagen hervorgerufene Aggregation im Vergleich zur Kontrolle nur noch um 22% reduziert wurde. Im Gegensatz dazu konnte 5C4 die Plaque-vermittelte Thrombozytenaggregation bei den eingesetzten Plaquekonzentrationen immer zu 100% blockieren (Abb. 4.16 B). Konzentrationen von 1,25 bis 3,8 mg Feuchtwicht/ml Plaques, welche Konzentrationen von ca. 0,8 bis 18  $\mu$ g an löslichem Kollagen/ml Plaques entsprachen (siehe Abschnitt 3.2.12.2), konnten nach der Präinkubation des

PRP mit 5C4 keine Plättchenaggregation mehr induzieren. Auch der Plaque-stimulierte „*shape change*“ der Thrombozyten wurde durch die Vorbehandlung des PRP mit 5C4 vollständig gehemmt (Daten nicht gezeigt). Die Isotypkontrolle zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Kollagen-vermittelte Plättchenaggregation, und verminderte die Plaque-stimulierte Aggregation nur geringfügig.

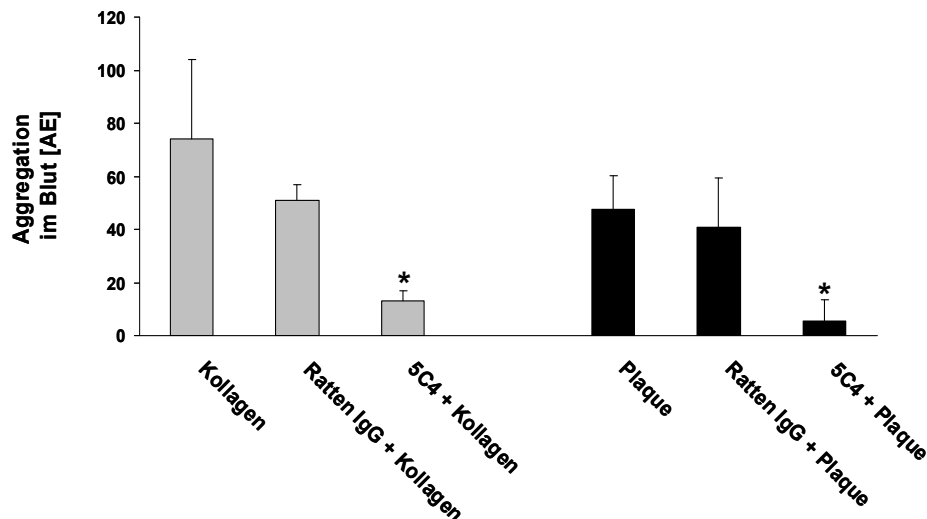
Die Ergebnisse dieser Versuche haben gezeigt, dass die Plaque-verursachte Plättchenaggregation im PRP weitaus effektiver als die Horm<sup>®</sup>-Kollagen-induzierte Aggregation durch den anti-GPVI-Antikörper 5C4 gehemmt wurde, was darauf hinwies, dass ein Unterschied in der Thrombozytenaktivierung durch fibrilläres Kollagen und Plaquekollagen bestand.



**Abb. 4.16: Unterschiedliche Inhibition der Kollagen- und Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation im PRP durch den anti-GPVI-Antikörper 5C4.** Citrat-PRP wurde für 3 min bei 37°C mit dem anti-GPVI-Antikörper 5C4 (10 µg/ml) oder der gleichen Menge an Isotypkontrolle (Fab-Fragmente des Ratten IgG) vorbehandelt. Aufsteigende Konzentrationen an Horm<sup>®</sup>-Kollagen (A) oder atheromatösen Plaquehomogenaten (B) wurden zum Citrat-PRP pipettiert und die Thrombozytenaggregation im Aggregometer bestimmt. Die Werte sind als % der Kollagen (2,5 µg/ml)-induzierten Aggregation angegeben und stellen MW aus 2 bis 6 Messungen mit dem PRP verschiedener Probanden dar.

Im Folgenden wurde die blockierende Wirkung des anti-GPVI-Antikörpers 5C4 im Blut mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate<sup>®</sup>-Gerät analysiert (siehe Abschnitt 3.2.6.2). Das Blut wurde hierbei für 3 min mit 5C4 (10 µg/ml) oder der gleichen Konzentration der entsprechenden Isotypkontrolle vorbehandelt. Darauf folgend wurden die Horm<sup>®</sup>-Kollagen- und die Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregation bestimmt (Abb. 4.17). Kollagen (1 µg/ml) induzierte mit 74±30 Aggregationseinheiten (AE) (MW±SA, n=3) eine höhere Aggregation der Blutplättchen als das Plaquematerial (1,25 mg Feuchtwicht/ml; ca. 0,8-2,3 µg/ml lösliches Plaquekollagen), welches eine Aggregation von 48±12 AE (MW±SA, n=11 mit 3 verschiedenen Plaques) verursachte. Sowohl die Kollagen-, als auch die Plaque-vermittelte Aggregation konnten in diesen Experimenten durch die Vorbehandlung des Blutes mit 5C4

signifikant auf  $13 \pm 4$  AE (MW $\pm$ SA, n=3; 82% Hemmung) und  $6 \pm 8$  AE (MW $\pm$ SA, n=11 mit 3 verschiedenen Plaques; 88% Hemmung) reduziert werden. Die Isotypkontrolle hatte hingegen keinen inhibierenden Einfluss auf die Plaque-induzierte Plättchenaggregation und verringerte die Kollagen-stimulierte Aggregation der Thrombozyten nicht signifikant.



**Abb. 4.17: Wirkung des anti-GPVI-Antikörpers 5C4 auf die Kollagen- und Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation im Blut.** Citrat-antikoaguliertes Blut wurde für 3 min bei 37°C mit 5C4 (10 µg/ml) oder der gleichen Menge an Isotypkontrolle (Fab-Fragmente des Ratten IgG) vorbehandelt. Horm®-Kollagen (1 µg/ml) oder atheromatöses Plaquematerial (AP) (1,25 mg Feuchtgewicht/ml) wurden zum Citratblut pipettiert und die Plättchenaggregation mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät bestimmt. Die Werte sind als Aggregationseinheiten (AE) angegeben und stellen die MW $\pm$ SA aus 3 Experimenten mit Kollagen und 11 Experimenten mit den Plaqueshomogenaten 3 verschiedener Patienten dar. \* p < 0,05 für 5C4 versus Kollagen- und Plauekontrolle.

Da bekannt ist, dass die Aktivierung des Integrin  $\alpha_2\beta_1$  magnesiumabhängig erfolgt (Clemetson *et al.*, 2001), wurde die Wirkung von 5C4 auch in Hirudin-antikoaguliertem Blut untersucht, um die Bindung von Plaquematerial an dieses Integrin zu ermöglichen. Antikoagulation mittels rekombinantem Hirudin, welches direkt an Thrombin bindet und somit die Blutgerinnung verhindert, führt im Unterschied zur Antikoagulation mit Citrat nicht zur Bildung eines Chelatkomplexes mit zweiwertigen Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) im Blut. In 2 unabhängigen Experimenten im Hirudinblut konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation durch den anti-GPVI-Antikörper 5C4 mit einem durchschnittlichen Wert von 94% (n=2) ähnlich effektiv wie zuvor im Citratblut erfolgte (Daten nicht gezeigt). GPVI stellte also auch in Hirudin-antikoaguliertem Blut den wichtigsten thrombozytären Oberflächenrezeptor für die Aggregation der Blutplättchen verursacht durch atheromatöses Plaquematerial dar.

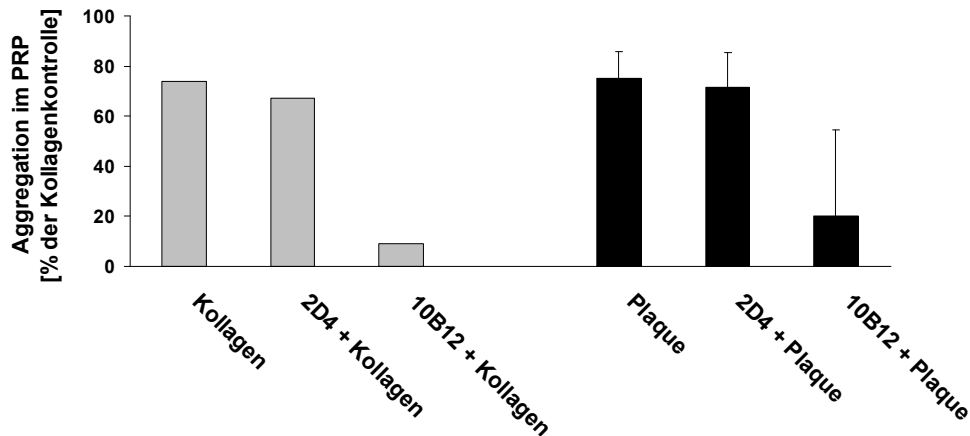
Zusammengefasst konnten die Experimente mit dem anti-GPVI-Antikörper 5C4 in PRP und Blut zeigen, dass die Plaque-induzierte Plättchenaggregation vor allem von dem thrombozytären Kollagenrezeptor GPVI abhängig war.

Die Wirkung des anti-GPVI-Antikörpers 5C4 auf die Plaque-stimulierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung wurde in 2 Experimenten unter arteriellen Flussbedingungen ( $1500 \text{ s}^{-1}$ ) mit Hirudinblut analysiert. Für diese Untersuchungen wurde ein Plaquegemisch, welches aus 3 unterschiedlichen GS (schock gefrorenen und steril aufbereiteten)-Plauehomogenaten (siehe Abschnitt 3.2.1) erstellt wurde, eingesetzt. 5C4 reduzierte die von Plättchenaggregaten besetzte Plaquefläche 4 bis 5 min nach Beginn der Perfusion um 85% von 66% auf 10% Plaquefläche bedeckt von Thrombozytenaggregaten ( $n=2$ ; Daten nicht gezeigt). Sieben bis 10 min nach Beginn des Blutflusses war die Hemmung allerdings mit 40% ( $n=2$ ) deutlich schwächer (Daten nicht gezeigt). Die Inhibition des GPVI-Rezeptors mittels 5C4 unter arteriellen Flussbedingungen zeigte also verglichen mit der zuvor in gerührtem PRP oder Blut beobachteten Hemmung einen deutlich geringeren Effekt auf die Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregatbildung.

#### **4.3.3.2. Wirkung des anti-GPVI-Antikörpers 10B12 auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung in PRP und Blut**

Abgesehen von der Wirkung des anti-GPVI-Antikörpers 5C4 wurde auch der Effekt des anti-GPVI-Einzelketten-Fv-Antikörperfragments 10B12 (Smethurst *et al.*, 2004) auf die Plaque-vermittelte Thrombozytenaktivierung und Aggregation untersucht. Die zu Verfügung stehende Menge an 10B12 war allerdings begrenzt und aus diesem Grund wurden nur wenige Versuche im Aggregometer durchgeführt. Die bei diesen Experimenten eingesetzten Konzentrationen von fibrillärem Horm<sup>®</sup>-Kollagen ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) und atheromatösem Plauehomogenat ( $1,25 \text{ mg Feuchtwicht/ml}$ ) induzierten in etwa eine vergleichbare Aggregation der Blutplättchen im PRP (Abb. 4.18). Sowohl die Kollagen-, als auch die Plaque-stimulierte Aggregation konnte durch die Vorbehandlung des PRP mit 10B12 im Vergleich zur Kontrolle (100%) deutlich um 88% ( $n=1$ ) und  $74 \pm 36\%$  ( $n=3$  mit 3 Plaues) reduziert werden. Die Isotypkontrolle 2D4 zeigte hierbei keinen signifikanten Einfluss auf die Kollagen- oder Plaque-induzierte Plättchenaggregation.

Verglichen mit der stärkeren Inhibition der Plaque-stimulierten Aggregation im Citrat-PRP durch den anti-GPVI-Antikörper 5C4 (siehe Abb. 4.16 und Abschnitt 4.3.3.1), schien der anti-GPVI-Antikörper 10B12 die Plaque-induzierte Plättchenaktivierung etwas weniger effektiv zu blockieren.

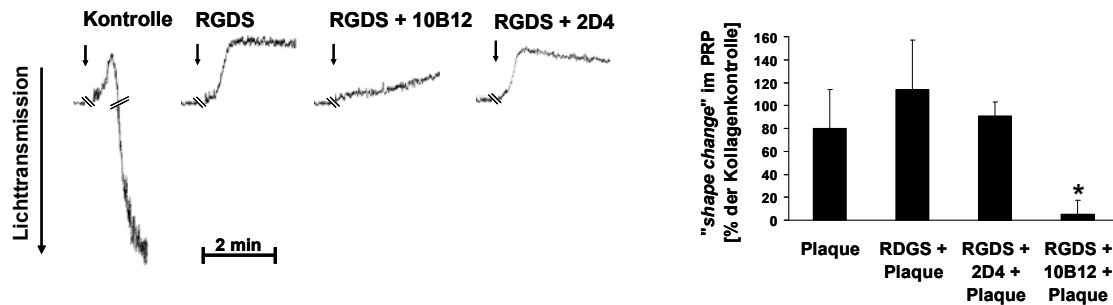


**Abb. 4.18: Inhibition der Kollagen- und Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation im PRP durch den anti-GPVI-Antikörper 10B12.** Citrat-antikoaguliertes PRP wurde für 3 min bei 37°C mit dem anti-GPVI-Antikörper 10B12 (50 µg/ml) oder der gleichen Menge der Isotypkontrolle 2D4 vorinkubiert. Horm<sup>®</sup>-Kollagen (1 µg/ml) oder die atheromatösen Plaquehomogenate (1,25 mg Feuchtgewicht/ml) 3 verschiedener Patienten wurden zum Citrat-PRP pipettiert und die Plättchenaggregation im Aggregometer bestimmt. Die Werte (% der Kollagen (2,5 µg/ml)-induzierten Aggregation) stellen für Kollagen die Werte einer Messung und für das Plaquematerial die MW±SA einer Messung mit den Plaquemomogenaten 3 verschiedener Patienten im Citrat-PRP eines Probanden dar.

Um die relative Rolle des Kollagenrezeptors Glykoprotein VI für die Plaque-vermittelte Plättchenaktivierung weiter zu analysieren, wurde zunächst die Bedeutung von GPVI für die initiale Thrombozytenaktivierungsphase, den „*shape change*“, näher untersucht (Abb. 4.19 A und B). Für die Analyse der initialen Thrombozytenaktivierungsphase, wurden alle Experimente in Anwesenheit von RGDS, einem Antagonisten des thrombozytären Fibrinogenrezeptors (GPIIb/IIIa, bzw. Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) (Gartner *et al.*, 1985), durchgeführt (Abb. 4.19 A und B). In Anwesenheit von RGDS waren die Blutplättchen nicht mehr in der Lage, eine Plaque- oder Kollagen-induzierte Aggregation zu durchlaufen und zeigten ausschließlich Gestaltwandel. Im Vergleich zu den Kontrollen mit Kollagen oder Plaque verstärkte sich der Plättchen-„*shape change*“ nach der Vorbehandlung des PRP mit RGDS, da die Thrombozyten nicht mehr von dem Gestaltwandel (Zunahme der Lichttransmission) in die Aggregationsphase (Abnahme der Lichttransmission) übergehen konnten und somit die maximale Sphärisierung der Plättchen (maximale Zunahme der Lichttransmission) auftrat. Zusätzlich wurden die Versuche zur Analyse der initialen Thrombozytenaktivierungsphase in Hirudin-PRP durchgeführt, so dass beide thrombozytäre Kollagenrezeptoren, GPVI und das Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , ihre Liganden binden konnten. Auch bei diesen Experimenten wurde vergleichend zum atheromatösen Plaquematerial fibrilläres Horm<sup>®</sup>-Kollagen untersucht. Die Präinkubation des PRP mit dem anti-GPVI-Antikörper 10B12 konnte die Plaque-induzierte Sphärisierung der Thrombozyten auf  $3\pm 8\%$  „*shape change*“ der 2D4-Kontrolle (MW±SA; n=5) und somit fast vollständig inhibieren (Abb. 4.19 A). Der thrombozytäre Kollagenrezeptor Glykoprotein VI spielte also eine zentrale Rolle bei der Plaque-stimulierten initialen Phase der Thrombozytenaktivierung. Der Kollagen-induzierte Gestaltwandel hingegen wurde durch die

Präinkubation des PRP mit 10B12 deutlich weniger beeinflusst und nur auf 54±41% des Formwandels der Kontrolle (MW±SA; n=3) reduziert (Abb. 4.19 B). Die Isotypkontrolle 2D4 zeigte in diesen Experimenten weder auf den durch Plaquematerial, noch auf den durch Kollagen verursachten Thrombozytengestaltwandel einen signifikant inhibierenden Effekt.

### A) Plaque



### B) Kollagen

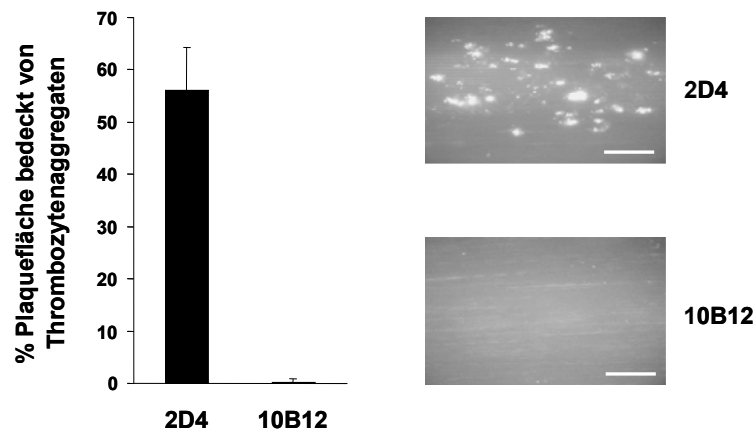


**Abb. 4.19: Inhibition der initialen Phase der Plaque (A)- und Kollagen (B)-induzierten Thrombozytenaktivierung im PRP durch den anti-GPVI-Antikörper 10B12.** Hirudin-antikoaguliertes PRP wurde für 2 min bei 37°C mit RGDS (2 mM), sowie mit oder ohne den anti-GPVI-Antikörper 10B12 (50 µg/ml) oder der gleichen Menge der Isotypkontrolle 2D4 vorinkubiert. Atheromatöse Plauehomogenate (1,25 mg Feuchtgewicht/ml) (A) oder Horm®-Kollagen (1 µg/ml) (B) wurden zum Hirudin-PRP pipettiert und der Plättchen-„shape change“, bzw. die Aggregation mittels turbidimetrischer Aggregationsmessung bestimmt. Links sind repräsentative Kurven der Thrombozytenaktivierung gezeigt. In den beiden Balkendiagrammen rechts stellen die Werte (% des Kollagen (2,5 µg/ml)-induzierten „shape change“; gemessen nach 3 min) MW±SA aus 3 Experimenten mit Kollagen und 5 Experimenten mit den Plauehomogenaten 2 verschiedener Patienten dar. \* p < 0,05 für 10B12 versus Kontrolle.

Die antithrombozytäre Wirkung des anti-GPVI-Antikörpers 10B12 in Bezug auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung wurde vor allem unter arteriellen Flussbedingungen genauer analysiert. Die Vorbehandlung des Hirudinblutes mit 10B12 resultierte in einer vollständigen Blockade der Plaque-stimulierten Plättchenaggregation und Thrombusbildung bei 1500 s<sup>-1</sup> 7 bis 10 min nach Beginn der Perfusion (Abb. 4.20). In all diesen Versuchen waren die Blutplättchen zwar noch in der Lage an die aktivierenden Komponenten des Plauematerials zu adhären, wobei die Interaktion allerdings nur transient erfolgte. Die Ergebnisse unter



arteriellen Flussbedingungen, welche den *in vivo*-Bedingungen nach der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques relativ nahe kommen, deuteten also erneut auf eine bedeutende Rolle des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI für die Plaque-vermittelte Thrombozytenaktivierung hin.



**Abb. 4.20: Effekt des anti-GPVI-Antikörpers 10B12 auf die Plaque-vermittelte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen.** Hirudin-antikoaguliertes Blut wurde für 10 min bei 37°C mit einer Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  über Plaquehomogenat (5 mg Feuchtwicht/ml)-beschichtete Glasoberflächen perfundiert. Vor der Perfusion wurde das Blut für 15 min bei 37°C mit 10B12 (50  $\mu\text{g/ml}$ ) oder der gleichen Menge der Isotypkontrolle 2D4 vorbehandelt, sowie unmittelbar vor Beginn des Flussversuchs zur Färbung der Thrombozyten mit Mepacrin (10  $\mu\text{M}$ ) versetzt. Adhärenz Plättchen und Plättchenaggregate wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Links im Blockdiagramm sind die Werte als % Plaquefläche bedeckt von Thrombozytenaggregaten angegeben (MW $\pm$ SA; n=3 Flusseexperimente mit den Plaques 2 unterschiedlicher Patienten). Rechts sind repräsentativ für 3 Experimente Fluoreszenzaufnahmen 8 min nach Beginn des Blutflusses gezeigt. Längenmaß = 100  $\mu\text{m}$ .

Beim direkten Vergleich der inhibierenden Wirkung der beiden anti-GPVI-Antikörper 5C4 und 10B12 auf die Plaque-stimulierte Thrombozytenaktivierung und Aggregatbildung wurden folgende Beobachtungen gemacht: 5C4 blockierte wie bereits in Abschnitt 4.3.3.1 beschrieben die durch nicht sofort nach ihrer Entnahme aus den Patienten schock gefrorene und nicht vollständig steril aufbereitete atheromatöse Plaques (Abkürzung: A-Plaques; siehe Abschnitt 3.2.1) hervorgerufene Thrombozytenformveränderung und Aggregation in gerührtem Citrat-PRP vollständig (Tab. 4.1 und Abb. 4.16). In Flusseexperimenten in Zusammenarbeit mit Dr. C. Schulz (Herzzentrum München, München, Deutschland), in welchen verglichen mit der in dieser Arbeit eingesetzten Parallel-Platten-Flusskammer (siehe Abschnitt 3.2.11) ein etwas modifiziertes Flusskammermodell (Flusskammermaße: 15 mm Länge, 2 mm Breite, 0,3 mm Höhe; Scherraten:  $1000 \text{ s}^{-1}$ ) verwendet wurde, konnte die A-Plaque-vermittelte Plättchenadhäsion und Aggregatbildung zwar stark, nicht jedoch aber vollständig durch die Vorbehandlung von Heparin-antikoaguliertem Blut mit 5C4 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) reduziert werden (Tab. 4.1) (Schulz *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu 5C4 konnte der anti-GPVI-Antikörper 10B12 wie bereits gezeigt die A-Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation in gerührtem Citrat-PRP

nicht vollständig inhibieren (Tab. 4.1 und Abb. 4.18), wohingegen die A-Plaque-vermittelte stabile Plättchenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen mit Scherraten von  $1500 \text{ s}^{-1}$  komplett durch die Vorbehandlung von Hirudinblut mit 10B12 blockiert wurde (Tab. 4.1 und Abb. 4.20).

**Tab. 4.1: Gegenüberstellung der durch die anti-GPVI-Antikörper 5C4 und 10B12 vermittelten Inhibition des Plaque-induzierten Thrombozytengestaltwandels und der Aggregation im gerührten System und unter Fluss.** A-Plaques = atheromatöse Plaques (nicht schock gefroren und nicht vollständig steril aufbereitet). GS-Plaques = schock gefrorene und steril aufbereitete atheromatöse Plaques (siehe Abschnitt 3.2.1). Die Werte stellen die MW±SA aus 2 bis 11 Messungen mit dem Blut verschiedener Probanden dar.

	% Hemmung der Thrombozytenaggregation / % Hemmung des Thrombozyten-„shape change“ im Citrat-PRP		% Hemmung der Thrombozytenaggregatbildung nach 7-10 min Fluss	
	5C4	10B12	5C4	10B12
<b>A-Plaques</b>	100±0% / 100±0%	74±36% / keine vollständige Hemmung	keine vollständige Hemmung (Heparinblut; Schulz <i>et al.</i> , in Vorbereitung)	100±0% (Hirudinblut)
<b>GS-Plaques</b>	100±0% / 100±0%	87±23% / keine vollständige Hemmung	40% (Hirudinblut)	/

Die durch sofort nach ihrer Entnahme schock gefrorene und steril aufbereitete atheromatöse Plaques (Abkürzung: GS-Plaques; siehe Abschnitt 3.2.1) hervorgerufene Thrombozytenaktivierung und Aggregation in gerührtem Citrat-PRP wurde ebenso wie die durch A-Plaques-homogenate induzierte Plättchenaktivierung („shape change“) und Aggregation mittels 5C4 immer vollständig inhibiert (100±0% Inhibition; MW±SA; n=3) (Tab. 4.1). Im Gegensatz dazu reduzierte 10B12 ebenso wie zuvor die A-Plaque-vermittelte auch die durch GS-Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregation im Citrat-PRP nicht vollständig und resultierte in 87±23% Inhibition (MW±SA; n=3) (Tab. 4.1). Auch im Hirudin-PRP wirkte 5C4 effizienter als 10B12 und blockierte neben der A-Plaque-stimulierten Blutplättchenaggregation auch deren Gestaltwandel vollständig (n=3; Daten nicht gezeigt). 10B12 hingegen inhibierte die GS-Plaque-induzierte Aggregation im Hirudin-PRP zwar vollständig, konnte jedoch den thrombozytären „shape change“ nicht, bzw. nur geringfügig beeinflussen (n=3; Daten nicht gezeigt). Unter arteriellen Flussbedingungen konnte bisher noch kein Vergleich der Wirkung der beiden anti-GPVI-Antikörper auf die A- und GS-Plaque-stimulierte Aggregatbildung angestellt werden, da keine ausreichenden Mengen an 10B12 vorlagen. Die GS-Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen wurde wie bereits

in Abschnitt 4.3.3.1 gezeigt nicht vollständig durch den anti-GPVI-Antikörper 5C4 blockiert (Tab. 4.1).

Diese Beobachtungen deuteten zusammengefasst auf eine Parallele des Effekts der beiden anti-GPVI-Antikörper auf die durch A-Plaques und GS-Plaques induzierte Thrombozytenaktivierung und Aggregation hin, wobei 5C4 der effektivere GPVI-Inhibitor im gerührten System und 10B12 der wirksamere GPVI-Inhibitor unter Fluss zu sein schien.

#### **4.3.4. Relative Bedeutung des humanen Integrin $\alpha_2\beta_1$ für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung**

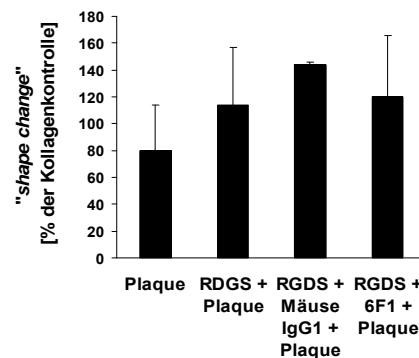
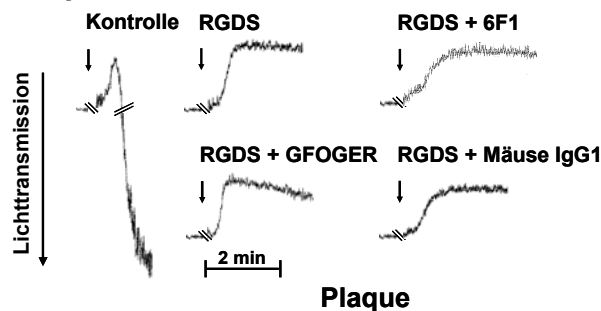
##### **4.3.4.1. Wirkung des anti-Integrin $\alpha_2$ -Antikörpers 6F1 auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung und Aggregatbildung in PRP und Blut**

Zur Untersuchung der Bedeutung des thrombozytären Kollagenrezeptors Integrin  $\alpha_2\beta_1$  für die Blutplättchenaktivierung vermittelt durch atheromatöses Plaquematerial wurde die blockierende Wirkung des spezifischen anti-Integrin  $\alpha_2$ -Antikörpers 6F1 in PRP und Blut analysiert. 6F1, ein monoklonales anti-Integrin  $\alpha_2$  Mäuse IgG1, wurde zum ersten Mal von Coller *et al.* als Integrin  $\alpha_2$ -blockierender Antikörper beschrieben (Coller *et al.*, 1989). Um die relative Bedeutung des Integrin  $\alpha_2\beta_1$  für die Plaque-abhängige Blutplättchenaktivierung genauer zu definieren, wurde die Rolle dieses Kollagenrezeptors mit der Bedeutung des Kollagenrezeptors GPVI (siehe Abschnitt 4.3.3.2) verglichen.

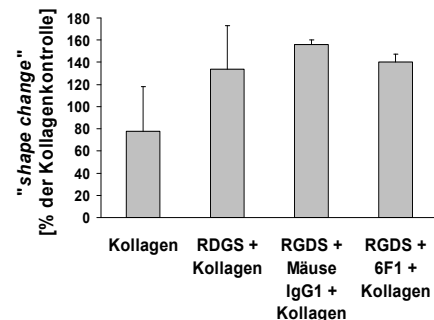
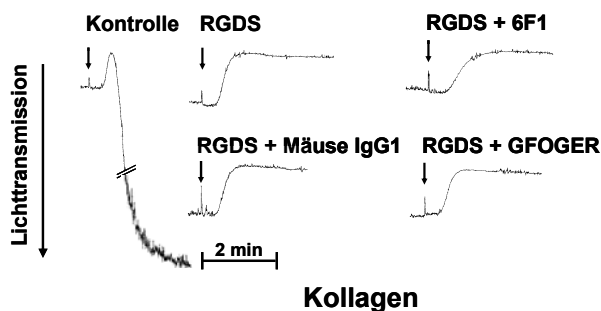
Zuerst wurde hierbei die initiale Blutplättchenaktivierungsphase näher untersucht. Für die Analyse des thrombozytären Gestaltwandels wurden wie zuvor in Abschnitt 4.3.3.2 beschrieben alle Experimente zur Inhibition der Thrombozytenaggregation in Anwesenheit von RGDS durchgeführt (Abb. 4.21 A und B). Darüber hinaus wurde in diesen Versuchen Hirudin-PRP eingesetzt, in welchem auch das Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , dessen Bindung an Kollagen magnesiumabhängig erfolgt (Clemetson *et al.*, 2001), mit seinen Liganden interagieren konnte. Die Präinkubation des PRP mit 6F1 beeinflusste die Plaque-induzierte Sphärisierung der Thrombozyten im Vergleich zur Isotypkontrolle Mäuse IgG1 nicht signifikant ( $87\pm 24\%$  der Kontrolle;  $MW\pm SA$ ;  $n=3$ ) (Abb. 4.21 A). Der Kollagen-stimulierte Gestaltwandel schien durch die Präinkubation des PRP mit 6F1 im Vergleich zur Isotypkontrolle Mäuse IgG1 leicht verzögert zu sein (Abb. 4.21 B). Zusätzlich zu diesem anti-Integrin  $\alpha_2$ -Antikörper wurde in einem Experiment vergleichend auch der inhibierende Effekt des Integrin  $\alpha_2\beta_1$ -bindenden Peptids GFOGER-GPP untersucht. Auch hierbei zeigte sich kein Einfluss des Peptides auf den Plaque-stimulierten Thrombozytengestaltwandel (Abb. 4.21 A).

Verglichen mit dem stark inhibierenden Effekt des anti-GPVI-Antikörpers 10B12, welcher zuvor in der Abb. 4.19 des Abschnitts 4.3.3.2 dargestellt wurde, konnte der anti-Integrin  $\alpha_2$ -Antikörper 6F1 den Plaque-induzierten thrombozytären „shape change“ nicht signifikant blockieren. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass GPVI im Gegensatz zu dem Integrin  $\alpha_2\beta_1$  essentiell für die initiale Plättchenaktivierungsphase nach Zugabe von atheromatösem Plaquematerial war.

### A) Plaque



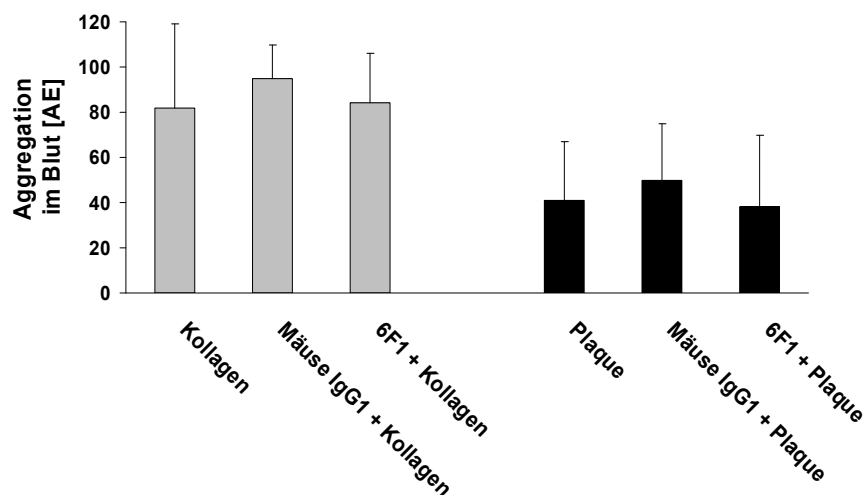
### B) Kollagen



**Abb. 4.21: Inhibition der initialen Phase der Plaque (A)- und Kollagen (B)-induzierten Thrombozytenaktivierung im PRP durch den anti-Integrin  $\alpha_2$ -Antikörper 6F1 und das Integrin  $\alpha_2\beta_1$ -blockierende Peptid GFOGER-GPP.** Hirudin-antikoaguliertes PRP wurde für 2 min bei 37°C mit RGDS (2 mM), sowie mit oder ohne den anti-Integrin  $\alpha_2$ -Antikörper 6F1 (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), der gleichen Menge an Isotypkontrolle (Mäuse IgG1) oder GFOGER-GPP (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) vorbehandelt. Plaquehomogenate (1,25 mg Feuchtgewicht/ml) (A) oder Horm<sup>®</sup>-Kollagen (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (B) wurden zum Hirudin-PRP pipettiert und der Gestaltwandel („shape change“), bzw. die Aggregation der Thrombozyten im Aggregometer bestimmt. Links sind repräsentative Kurven der Plättchenaktivierung gezeigt. In den beiden Balkendiagrammen stellen die Werte (% des Kollagen (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )-induzierten „shape change“, gemessen nach 3 min) MW $\pm$ SA aus 3 Experimenten mit Kollagen und 3 Experimenten mit den Plaquehomogenaten 2 unterschiedlicher Patienten dar.

Der Einfluss von 6F1 auf die Plaque- und Kollagen-vermittelte Thrombozytenaktivierung wurde als nächstes im Blut mittels Impedanzaggregometrie untersucht. Das Blut wurde hierbei mit 6F1 oder der gleichen Konzentration der Isotypkontrolle Mäuse IgG1 vorbehandelt. Darauf folgend wurde die Horm<sup>®</sup>-Kollagen- (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und die Plaque (1,25 mg Feuchtgewicht/ml)-

induzierte Thrombozytenaggregation im Multiplate®-Gerät bestimmt (Abb. 4.22) (siehe Abschnitt 3.2.6.2). Weder die Kollagen-, noch die Plaque-vermittelte Aggregation der Blutplättchen konnte durch die Vorbehandlung des Blutes mit 6F1 im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert werden (Abb. 4.22). Die Blockade des Kollagenrezeptors Integrin  $\alpha_2\beta_1$  führte also im gerührten System im Gegensatz zur Blockade des Kollagenrezeptors GPVI (siehe Abschnitt 4.3.3.2) weder im Blut, noch im PRP zu einer signifikanten Inhibition der Plaque-stimulierten Thrombozytenaktivierung.



**Abb. 4.22: Wirkung des anti-Integrin  $\alpha_2$ -Antikörpers 6F1 auf die Kollagen- und Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation im Blut.** Citrat-antikoagulierte Blut wurde für 3 min bei 37°C mit dem anti-Integrin  $\alpha_2$ -Antikörper 6F1 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) oder der gleichen Menge an Isotypkontrolle Mäuse IgG1 vorinkubiert. Horm®-Kollagen (1  $\mu\text{g/ml}$ ) oder atheromatöses Plaquehomogenat (1,25 mg Feuchtgewicht/ml) wurden zum Citratblut pipettiert und die Thrombozytenaggregation mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät bestimmt. Die Werte sind als Aggregationseinheiten (AE) angegeben und stellen MW $\pm$ SA aus 4 Experimenten mit Kollagen und 8 Experimenten mit den Plaquehomogenaten 2 verschiedener Patienten dar.

Die antithrombozytäre Wirkung des anti-Integrin  $\alpha_2$ -Antikörpers 6F1 wurde des Weiteren unter arteriellen Flussbedingungen untersucht. Hierfür wurde Hirudin-antikoagulierte Blut für 10 min bei 37°C mit einer Scherrate von 1500  $\text{s}^{-1}$  über Plaque-beschichtete Oberflächen perfundiert (Abb. 4.23). Weder die Präinkubation des Blutes mit 6F1, noch die Vorbehandlung mit dessen Isotypkontrolle Mäuse IgG1 konnte die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregatbildung 7 bis 10 min nach Beginn des Blutflusses hierbei signifikant reduzieren. Die Plättchen lagerten sich sowohl in den Kontroll-, als auch in den Hemmexperimenten an die aktivierenden Plaquekomponenten an und bildeten ca. 3 min nach Beginn der Blutperfusion größere Aggregate aus, welche nach ca. 5 min ihr maximales Wachstum erreichten.

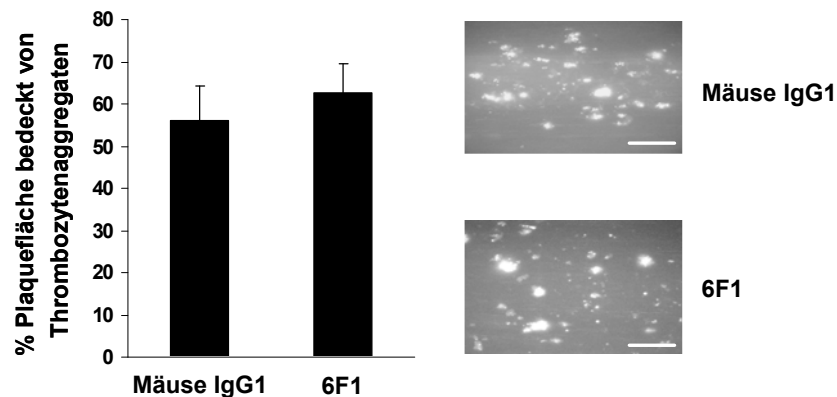


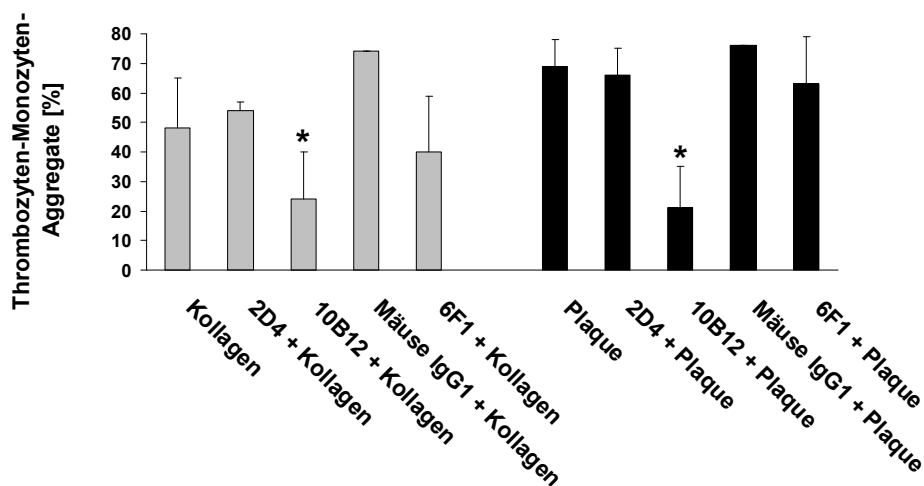
Abb. 4.23: Effekt des anti-Integrin  $\alpha_2$ -Antikörpers 6F1 auf die Plaque-stimulierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen. Hirudinblut wurde für 10 min bei 37°C mit einer Scherrate von 1500 s<sup>-1</sup> über Plaquehomogenat (5 mg Feuchtgewicht/ml)-beschichtete Glasdeckgläschen perfundiert. Vor der Perfusion wurde das Blut für 15 min mit 6F1 (20 µg/ml) oder der gleichen Menge der Isotypkontrolle Mäuse IgG1 vorbehandelt, und unmittelbar vor dem Flussexperiment zur Färbung der Thrombozyten mit Mepacrin (10 µM) versetzt. Adhärente Plättchen und Plättchenaggregate wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Links im Balkendiagramm sind die Werte als % Plaquefläche bedeckt von Thrombozytenaggregaten dargestellt (MW±SA; n=3 Flussexperimente mit 2 unterschiedlichen Plaquehomogenaten). Rechts sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen 8 min nach Beginn des Blutflusses gezeigt. Längenmaß = 100 µm.

Zusammengefasst konnte beobachtet werden, dass die durch atheromatöses Plaquematerial induzierte Thrombozytenaktivierung („*shape change*“, Adhäsion und Aggregation) sowohl unter statischen Bedingungen, als auch unter Flussbedingungen vorrangig durch die Interaktion des GPVI-Rezeptors mit den prothrombogenen Komponenten vorangeschrittener atherosklerotischer Läsionen hervorgerufen wurde. Das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  schien für diesen Vorgang keine größere Bedeutung zu haben.

#### 4.3.5. Relative Bedeutung der humanen Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ für die Plaque-induzierte Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten

Wie in Abschnitt 4.1.2 dargestellt, ist das atheromatöse Plaquematerial in der Lage, die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten im Blut zu fördern, sowie Gerinnung und Fibrinbildung in PPP, PRP und Blut zu induzieren. Die relative Bedeutung von GPVI und Integrin  $\alpha_2\beta_1$  für die Plaque-vermittelte Interaktion von Blutplättchen mit Monozyten wurde mit Hilfe spezifischer, blockierender Antikörper durchflusszytometrisch untersucht (siehe Abschnitt 3.2.7). Die Plaque-stimulierte Bindung von Thrombozyten und Monozyten wurde durch die Präinkubation des Blutes mit 10B12 signifikant von 69±9 auf 21±14% Thrombozyten-Monozyten-Konjugate (MW±SA; n=4) reduziert (Abb. 4.24). Im Vergleich dazu konnte die Vorbehandlung des Blutes mit 6F1 das Plaque-induzierte Anhaften der Plättchen an Monozyten nicht signifikant verringern.

Die Kollagen-stimulierte Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten konnte ebenfalls signifikant durch die Vorbehandlung des Blutes mit dem anti-GPVI-Antikörper 10B12 von  $48 \pm 17$  auf  $26 \pm 16\%$  Thrombozyten-Monozyten-Konjugate (MW $\pm$ SA; n=3) verringert werden (Abb. 4.24). 6F1 hingegen reduzierte die Kollagen-vermittelte Adhäsion von Blutplättchen an Monozyten nur relativ geringfügig und nicht signifikant. Diese Beobachtungen wiesen auf eine bedeutende Rolle des GPVI-Rezeptors sowohl für die Plaque- als auch für die Kollagen-induzierte Anlagerung von Thrombozyten an Monozyten hin.

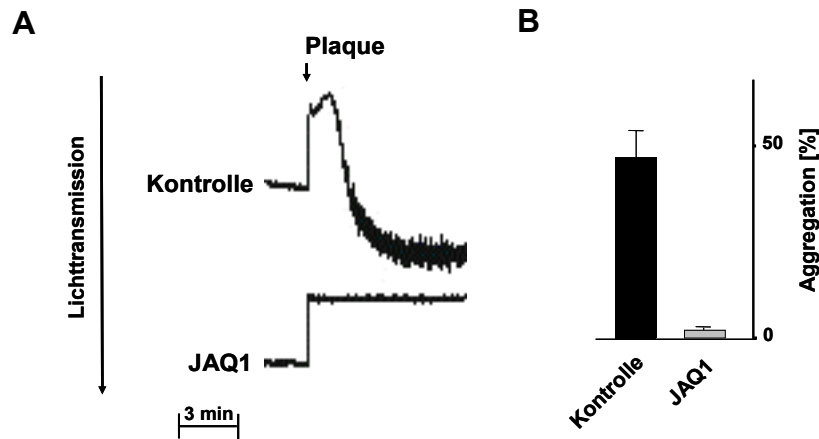


**Abb. 4.24: Bedeutung von GPVI und Integrin  $\alpha_2\beta_1$  für die Kollagen- und Plaque-vermittelte Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten.** Die Messung der Horm<sup>®</sup>-Kollagen (1  $\mu$ g/ml) und Plaque (0,25 mg Feuchtgewicht/ml)-induzierten Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten im Citratblut erfolgte mittels Durchflusszytometrie mit spezifischen anti-CD41a- und anti-CD14-Antikörpern. Zur Blockade des thrombozytären GPVI-Rezeptors wurde das Blut 15 min vor Beginn des Experiments bei 37°C mit 10B12 (200  $\mu$ g/ml) oder der gleichen Menge der Isotypkontrolle 2D4 vorbehandelt. Zur Inhibition des Integrin  $\alpha_2\beta_1$  wurde das Blut vor der Messung für 15 min bei 37°C mit 6F1 (20  $\mu$ g/ml) oder der gleichen Menge an Mäuse IgG1 inkubiert. Das Balkendiagramm stellt die MW $\pm$ SA aus 3 Experimenten mit Kollagen, sowie 3 (6F1), bzw. 4 (10B12, 2D4) Experimenten mit dem Plaquehomogenat eines Patienten dar. Die Experimente mit den Mäuse IgG1-Kontrollen wurden jeweils nur einmal durchgeführt. \* p < 0,05 für 10B12 versus Kontrolle.

#### **4.3.6. Relative Bedeutung des murinen Glykoprotein VI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung**

Abgesehen von dem humanen GPVI und Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , wurde die relative Rolle dieser thrombozytären Kollagenrezeptoren für die Plaque-vermittelte Blutplättchenaktivierung auch im Mausmodell in Zusammenarbeit mit Dr. Tamer Rabie (Arbeitsgruppe Dr. Bernhard Nieswandt, Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg) analysiert. Zuerst wurde hierbei Mäuse-PRP mit dem spezifischen anti-GPVI-Antikörper JAQ1 (Nieswandt *et al.*, 2000) vorbehandelt, und die Aktivierung der murinen Thrombozyten durch humanes atheromatöses Plaquematerial mittels turbidimetrischer Aggregationsmessung bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Blutplättchenaggregation, als auch der „shape change“ durch die Präinkubation des

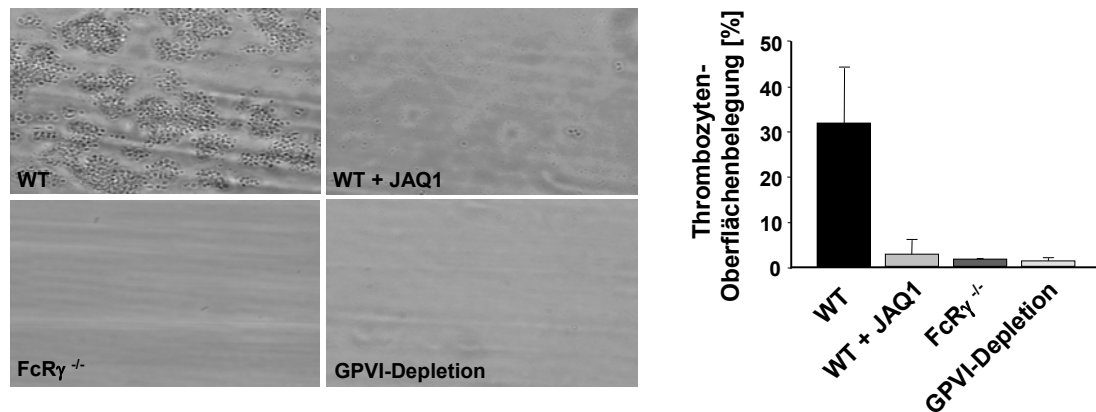
PRP mit JAQ1 vollständig blockiert wurde (Abb. 4.25 A und B), so dass daraus geschlossen wurde, dass GPVI auch auf den Mäuseblutplättchen einen zentralen Rezeptor für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung und Aggregation darstellte.



**Abb. 4.25: Die Plaque-induzierte Aggregation muriner Thrombozyten kann durch Inhibition von GPVI mittels JAQ1 vollständig inhibiert werden.** Heparin (20 U/ml)-antikoaguliertes Mäuse-PRP wurde mit oder ohne den anti-GPVI-Antikörper JAQ1 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) für 7 min bei RT vorbehandelt. Anschließend wurden die Thrombozyten (500.000/ $\mu\text{l}$ ) mit humanem Plaquematerial (1,25 mg Feuchtgewicht/ml) stimuliert und der Gestaltwandel, sowie die Aggregation der Mäuseplättchen im Aggregometer über einen Zeitraum von 10 min gemessen. Die Lichttransmission von PRP wurde als 0%, die von PPP als 100% definiert und die weiteren Messwerte zu diesen Werten in Relation gesetzt. A) Repräsentative Aggregationskurven der Plaque-stimulierten Thrombozytenaktivierung in der Kontrolle und nach Präinkubation des PRP mit JAQ1. B) Balkendiagramm der  $\text{MW} \pm \text{SA}$  aus 6 Experimenten mit den Plaquesomogenaten 6 unterschiedlicher Patienten.

Im Folgenden wurde untersucht, ob unter arteriellen Flussbedingungen ebenfalls eine Parallele zwischen der Plaquematerial-induzierten murinen und humanen Thrombozytenaktivierung besteht und welche Rolle die Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin  $\alpha_2\beta_1$  in diesem Zusammenhang spielen. Um die Aktivierung der Mäuseblutplättchen unter arteriellen Flussbedingungen analysieren zu können wurde Heparin-antikoaguliertes Mäuseblut mit einer Scherrate von  $1000 \text{ s}^{-1}$  über Plaque-beschichtete Glasoberflächen perfundiert (Abb. 4.26). Bei der Perfusion des Blutes von Wildtyp-Mäusen bildeten sich innerhalb von 4 min nach Beginn des Blutflusses bereits größere Thrombozytenaggregate auf den Plaque-Oberflächen aus. Um die Rolle des murinen GPVI-Rezeptors in diesem Zusammenhang genauer zu untersuchen wurde das Blut von Wildtyp-Mäusen unmittelbar vor dem Flussexperiment mit dem anti-GPVI-Antikörper JAQ1 (100  $\mu\text{g/ml}$ ) präinkubiert und darauf folgend die Plaque-vermittelte Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten analysiert. Die Blockade von GPVI mit Hilfe von JAQ1 reduzierte die Plaque-vermittelte Adhäsion und Aggregatbildung der murinen Plättchen nahezu vollständig.





**Abb. 4.26: GPVI ist essentiell für die Plaque-vermittelte Adhäsion und Aggregatbildung muriner Thrombozyten unter arteriellen Flussbedingungen.** Heparin (20 U/ml)-antikoaguliertes Blut von Wildtyp (WT)-Mäusen mit oder ohne JAQ1 (100  $\mu\text{g/ml}$ ), FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäusen oder GPVI-depletieren Mäusen wurde für 4 min bei RT mit einer Scherrate von 1000 s<sup>-1</sup> über Plaquehomogenat (5 mg Feuchtgewicht/ml)-beschichtete Glasoberflächen perfundiert. Bei diesen Experimenten wurde eine transparente Flusskammer mit einer Tiefe von 50  $\mu\text{m}$  verwendet, in welche die beschichteten Glasdeckgläschen (24 x 60 mm) eingesetzt wurden. Der Eingang der Flusskammer war mit einer mit dem Heparinblut befüllten Spritze verbunden. Mittels einer pulsfreien Pumpe wurde das Mäuseblut mit einer Scherrate von 1000 s<sup>-1</sup> (entspricht einer Flussrate von 7,53 ml/h) über die Plaque-Oberflächen perfundiert. Anschließend wurde die Kammer mit der gleichen Flussrate für 10 min mit HEPES-Puffer gespült und jeweils mindestens 5 verschiedene Gesichtsfelder (40 x Objektiv) aufgenommen. Links sind repräsentativ einzelne Phasenkontrastaufnahmen der verschiedenen Versuchsansätze gezeigt. Das Balkendiagramm rechts zeigt die MW $\pm$ SA der Oberflächenbelegung mit Thrombozyten in % der Gesamtoberfläche aus je 6 unabhängigen Flussexperimenten pro Versuchsansatz mit den Plaquehomogenaten 6 verschiedener Patienten.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der GPVI-Rezeptor auf der Oberfläche der Thrombozyten depletiert und das Blut der GPVI-depletieren Mäuse über Plaque-beschichtete Oberflächen perfundiert. Zur GPVI-Depletion bekamen Wildtyp-Mäuse 5 Tage vor dem eigentlichen Experiment 100  $\mu\text{g/ml}$  JAQ1 injiziert (Nieswandt *et al.*, 2001b). Auch bei diesem Versuchsansatz wurde die Plaque-stimulierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung nahezu vollständig inhibiert (Abb. 4.26).

Darüber hinaus wurde auch das Blut von FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäusen bezüglich seiner Plaque-vermittelten Thrombozytenaktivierung unter arteriellen Flussbedingungen getestet (Nieswandt *et al.*, 2000). Die FcR $\gamma$ -Kette ist ein wichtiger Bestandteil des thrombozytären GPVI-FcR $\gamma$ -Rezeptorkomplexes, ohne welche GPVI nicht auf der Oberfläche der Blutplättchen exponiert werden kann (Nieswandt *et al.*, 2003; Moroi *et al.*, 2004). Auch die Thrombozyten der FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäuse waren nicht in der Lage, an das exponierte atheromatöse Plaquematerial zu adhären oder Aggregate darauf zu formen.

Die Plättchen im Blut von Integrin  $\alpha_2$ <sup>-/-</sup>-Mäusen hingegen, welche kein Integrin  $\alpha_2\beta_1$  mehr auf ihrer Oberfläche exprimierten, verhielten sich genau wie die Plättchen im Blut der Wildtyp-Mäuse und adhärten und aggregierten am humanen Plaquesgewebe (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst konnte demzufolge auch für Mäuseplättchen gezeigt werden, dass GPVI, jedoch nicht das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  bei der Plaque-vermittelten Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen von zentraler Bedeutung war.

#### **4.4. Bedeutung des thrombozytären VWF-Rezeptors GPIb $\alpha$ für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung**

##### **4.4.1. Bedeutung des thrombozytären VWF-Rezeptors GPIb $\alpha$ für die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation im Blut**

Abgesehen von der Bedeutung der beiden Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin  $\alpha_2\beta_1$  wurde im Folgenden auch die Rolle des thrombozytären VWF-Rezeptors GPIb $\alpha$  für die Plaque-induzierte Blutplättchenaggregation und Thrombusbildung genauer untersucht. Da bekannt war, dass GPIb $\alpha$  unter arteriellen Strömungsbedingungen einen wichtigen Rezeptor für die Vermittlung des initialen Anhaftens, bzw. des Rollens von Thrombozyten an Kollagenstrukturen im Subendothel darstellt (Cauwenberghs *et al.*, 2001; Ruggeri, 2002), ergab sich die Frage, ob die Interaktion von VWF mit thrombozytärem GPIb $\alpha$  eine entscheidende Bedeutung zu Beginn der Plaque-vermittelten Thrombusbildung haben könnte. Weiterhin wurde beschrieben, dass der in atherosklerotischen Läsionen Cholesterolfütterter Kaninchen vorhandene VWF wichtig für die Plaque-stimulierte Thrombusbildung ist (De Meyer *et al.*, 1999).

Die Bedeutung von GPIb $\alpha$  für die Plaque-induzierte Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten im Blut wurde zunächst mit dem Multiplate<sup>®</sup>-Gerät analysiert (siehe Abschnitt 3.2.6.2). Für diese Versuche wurde der monoklonale anti-GPIb $\alpha$ -Antikörper 6B4, ein potenter GPIb $\alpha$ -Inhibitor (Cauwenberghs *et al.*, 2001), eingesetzt. Als Kontrolle wurde dessen blockierender Effekt auf die Ristocetin-vermittelte Plättchenaktivierung und Aggregation im Blut untersucht (Abb. 4.27). Ristocetin ist ein Vancomycin-ähnliches Antibiotikum aus dem Bakterium *Nocardia lurida*, welches spezifisch an die prolinreiche Region der A1-Domäne des VWF im Blut bindet, worauf sich dessen Konformation ändert und es darauf folgend zur Bindung des VWF an GPIb $\alpha$  unter statischen Bedingungen kommen kann (Dong *et al.*, 2001). Die durch Ristocetin (0,5 mg/ml) vermittelte Thrombozytenaggregation wurde durch die Inkubation von Hirudin-antikoagulierte Blut mit 1  $\mu$ g/ml 6B4 vollständig von  $90 \pm 41$  AE (Aggregationseinheiten) (MW $\pm$ SA; n=4) auf  $0 \pm 0$  AE (MW $\pm$ SA; n=4) reduziert (Abb. 4.27). Die Inkubation des Blutes mit der 6B4-Isotypkontrolle Mäuse IgG1 hingegen bewirkte keine signifikante Reduktion der Ristocetin-induzierten Plättchenaggregation.

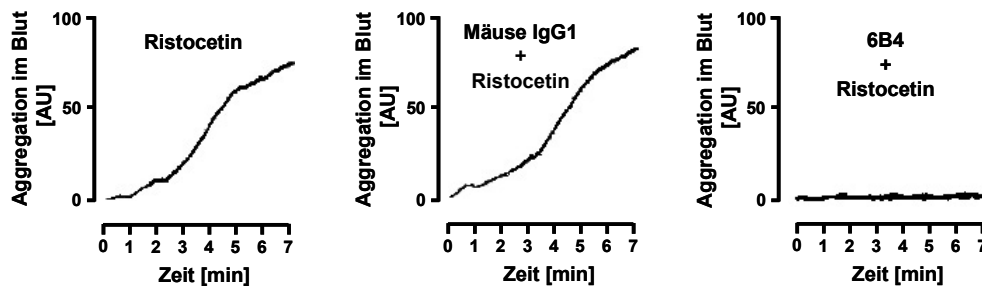


Abb. 4.27: Effekt des anti-GPIIb/IIIa-Antikörpers 6B4 auf die Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation im Blut. Hirudinblut wurde für 3 min bei 37°C mit oder ohne den anti-GPIIb/IIIa-Antikörper 6B4 (1 µg/ml) oder der gleichen Menge der Isotypkontrolle Mäuse IgG1 inkubiert. Die Aggregation der Thrombozyten wurde durch die Zugabe von Ristocetin (0,5 mg/ml) induziert und mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät über einen Zeitraum vom 7 min gemessen. Gezeigt sind repräsentative Multiplate®-Kurven für jeden der Versuchsansätze. Pro Versuchsansatz wurden 4 unabhängige Experimente mit dem Hirudinblut 4 unterschiedlicher Probanden durchgeführt.

Im Gegensatz zur Ristocetin-stimulierten Thrombozytenaktivierung wurde die Plaque-induzierte Plättchenaggregation durch Konzentrationen von bis zu 5 µg/ml 6B4 nicht signifikant beeinflusst (Abb. 4.28 A und B).

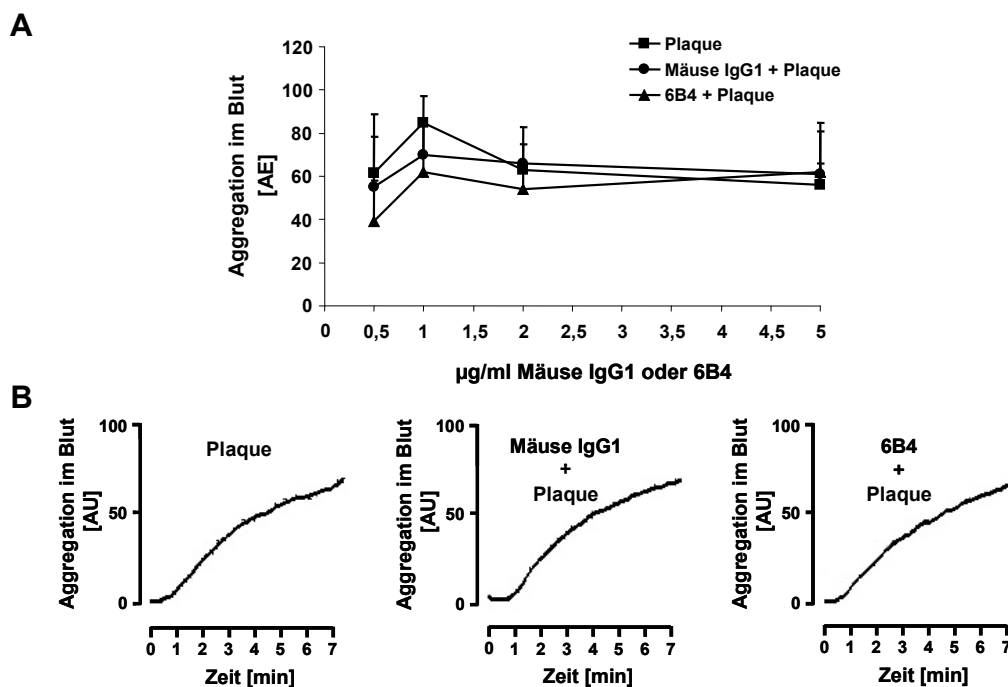


Abb. 4.28: Dosis-Wirkungskurve des Effekts des anti-GPIIb/IIIa-Antikörpers 6B4 auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation im Blut. Hirudinblut wurde für 3 min bei 37°C mit oder ohne aufsteigende Konzentrationen des anti-GPIIb/IIIa-Antikörpers 6B4 oder dessen Isotypkontrolle Mäuse IgG1 inkubiert. Die Aggregation der Thrombozyten wurde durch die Zugabe von atheromatösem Plaquehomogenat (0,83 mg Feuchtgewicht/ml) induziert und über einen Zeitraum vom 7 min mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät bestimmt. Für alle Experimente wurde das gleiche Plaquegemisch verwendet, welches zu Beginn der Versuchsreihe zu gleichen Teilen aus 3 verschiedenen G (gefrorenen)-Plaquehomogenaten hergestellt wurde (siehe Abschnitt 3.2.1). A) Liniendiagramm, in welchem die Werte (Aggregationseinheiten = AE) MW±SA aus 3 bis 5 Messungen mit dem Hirudinblut verschiedener Probanden darstellen. B) Repräsentative Multiplate®-Kurven für die Versuchsansätze mit 5 µg/ml 6B4, bzw. 5 µg/ml Mäuse IgG1.

Die Tatsache, dass die Blockade des VWF-Rezeptors GPIIb/IIIa im gerührten System keinen Einfluss auf die Plaque-induzierte Aktivierung und Aggregation von Blutplättchen besaß, stimmte mit der bereits aus früheren Publikationen bekannten Beobachtung überein, dass die GPIIb/IIIa-VWF-Achse vor allem unter arteriellen Flussbedingungen mit hohen Scherraten, weniger aber unter Flussbedingungen mit niedrigen Scherraten oder im statischen System eine Bedeutung für die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten an extrazellulärer Matrix besitzt (Savage *et al.*, 1998; Sugimoto *et al.*, 1999).

#### **4.4.2. Bedeutung des thrombozytären VWF-Rezeptors GPIIb/IIIa für die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen**

Die Interaktion von VWF, entweder im Plaque (De Meyer *et al.*, 1999) oder zirkulierend im Blut, mit seinem Rezeptor GPIIb/IIIa könnte eine entscheidende Rolle während der initialen Phase der Plaque-stimulierten Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen spielen. Aus diesem Grund wurde die Wirkung des anti-GPIIb/IIIa-Antikörpers 6B4 auf die Plaque-induzierte Blutplättchenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen bei verschiedenen Scherraten (500 und 1500 s<sup>-1</sup>) untersucht. Bei Strömungen mit einer Scherrate von 500 s<sup>-1</sup>, wie sie z. B. in mittelgroßen Arterien vorliegen, bewirkte die Präinkubation des Blutes mit 6B4 weder in der frühen Phase der Plaque-vermittelten Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung (4 bis 5 min nach Beginn der Perfusion), noch in der späteren Phase des Aggregatwachstums (7 bis 10 min nach Beginn der Perfusion) eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.29). Im Gegensatz dazu konnte 6B4 die Plaque-stimulierte Plättchenaggregatbildung bei Strömungsbedingungen mit höheren Scherraten von 1500 s<sup>-1</sup>, wie sie z. B. in moderat stenosierten Arterien vorliegen, signifikant von 71±9 auf 12±3% (MW±SA; n=5; 4 bis 5 min nach Beginn der Perfusion), bzw. von 74±4 auf 17±5% Plaquefläche bedeckt von Thrombozytenaggregaten (MW±SA; n=4; 7 bis 10 min nach Beginn der Perfusion) hemmen. Bei diesen Scherraten verringerte der anti-GPIIb/IIIa-Antikörper nicht nur die Anzahl und die Fläche der mit Plättchenaggregaten bedeckten Plaque-Oberflächen (Abb. 4.29), sondern reduzierte auch die Höhe der einzelnen Thrombozytenaggregate deutlich (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die VWF-GPIIb/IIIa-Achse bei höheren Scherraten von 1500 s<sup>-1</sup> nicht nur maßgeblich an der initialen Adhäsion der Blutplättchen an das atheromatöse Plaquematerial beteiligt war, sondern auch bei der darauf folgenden Thrombozyten-Thrombozyten-Interaktion in den wachsenden Thromben eine wichtige Rolle spielte. Bei niedrigeren Scherraten von 500 s<sup>-1</sup> hingegen war die VWF-GPIIb/IIIa-Achse nicht von signifikanter Bedeutung.

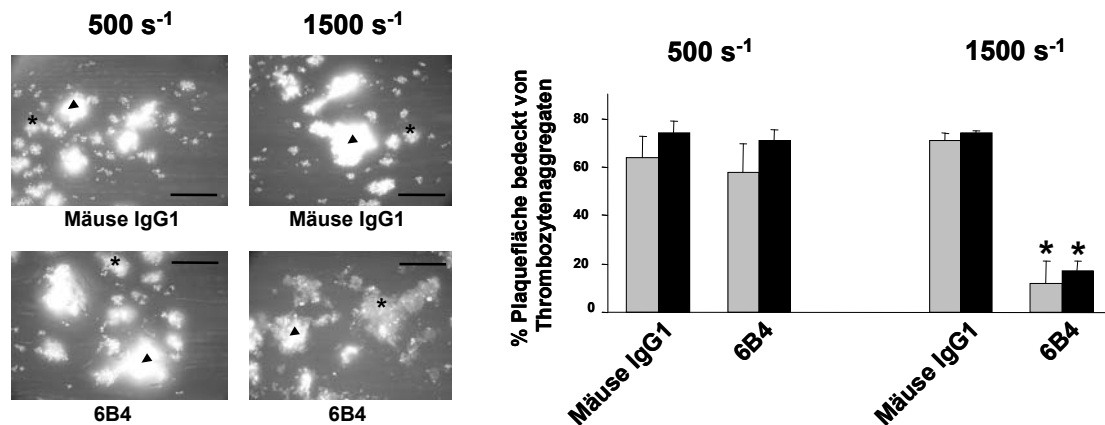


Abb. 4.29: Gegenüberstellung des Effekts des anti-GPIIb/IIIa-Antikörpers 6B4 auf die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen bei niedrigeren (500 s<sup>-1</sup>) und höheren Scherraten (1500 s<sup>-1</sup>). Hirudin-antikoaguliertes Blut wurde für 10 min bei 37°C mit Scherraten von 500 oder 1500 s<sup>-1</sup> über Plaque (5 mg Feuchtgewicht/ml)-beschichtete Glasdeckgläschen perfundiert. Für alle Experimente wurde das gleiche Plaquesgemisch verwendet, welches zu Beginn der Versuchsreihe zu gleichen Teilen aus 3 verschiedenen G (gefrorenen)-Plaqueshomogenaten hergestellt wurde (siehe Abschnitt 3.2.1). Vor der Perfusion wurde das Blut für 10 min mit 6B4 (5 µg/ml) oder der gleichen Menge an Isotypkontrolle (Mäuse IgG1) vorbehandelt, und unmittelbar vor Beginn des Experiments zur Färbung der Thrombozyten mit Mepacrin (10 µM) versetzt. Links sind repräsentativ für 4 Experimente bei 500 s<sup>-1</sup> und für 5 Experimente bei 1500 s<sup>-1</sup> fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen 7-10 min nach Beginn des Blutflusses gezeigt. Das Plaquesmaterial wurde mittels Autofluoreszenz visualisiert (hellgrau;\*), adhärenente Thrombozyten und Thrombozytenaggregate mittels spezifischer Mepacrinfluoreszenz (weiß;▲). Längenmaß: 50 µm. Rechts ist im Balkendiagramm der Effekt von 6B4 und Mäuse IgG1 auf die Thrombozytenaggregatbildung 4-5 (graue Balken) und 7-10 min (schwarze Balken) nach Beginn der Perfusion mit Scherraten von 500 s<sup>-1</sup>, bzw. 1500 s<sup>-1</sup> gezeigt. Die Werte sind als % Plaquefläche bedeckt von Thrombozytenaggregaten angegeben und stellen MW±SA aus 4 Messungen (500 s<sup>-1</sup>), bzw. 5 Messungen (1500 s<sup>-1</sup>) mit dem Blut verschiedener Probanden dar. \* p < 0,05 für 6B4 versus Mäuse IgG1.

#### 4.5. Bedeutung der sekundären Botenstoffe ADP und TxA2 für die Thrombozytenaktivierung vermittelt durch Kollagen und atherosklerotisches Plaquesmaterial

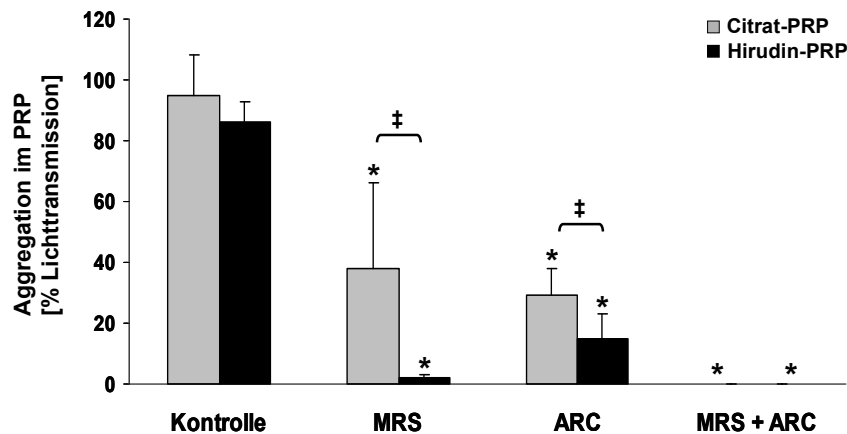
Das Wachstum eines plättchenreichen Thrombus wird maßgeblich durch die Freisetzung positiver „feedback“-Mediatoren wie dem Adenosin-5'-diphosphat (ADP) und dem Thromboxan A2 (TxA2), sowie deren Interaktion mit ihren korrespondierenden Thrombozytenrezeptoren propagiert (Ruggeri, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage, welche Bedeutung diese sekundären Botenstoffe für die Plaque-induzierte Blutplättchenaktivierung und Aggregatbildung besitzen. Abgesehen von der Plaque-stimulierten Thrombusbildung wurde die Rolle von ADP und TxA2 auch für die Kollagen-vermittelte Thrombozytenaktivierung untersucht, da Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positive Plaquesstrukturen, wie in Abschnitt 4.2 gezeigt wurde, wesentliche prothrombogene Komponenten der atherosklerotischen Läsionen darstellten.

#### **4.5.1. Bedeutung der ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> für die Thrombozytenaktivierung vermittelt durch Kollagen und atherosklerotisches Plaquematerial**

##### **4.5.1.1. Bedeutung von P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> für die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation in PRP und Blut**

Um die Bedeutung der beiden thrombozytären ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> für die Kollagen-induzierte Aggregation zu untersuchen, wurde der anti-aggregatorische Effekt des P2Y<sub>1</sub>-Antagonisten MRS2179, sowie des P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten AR-C69931MX in PRP und Blut analysiert. Hirudin und Citrat wurden hierbei als Antikoagulantien verglichen, um zu überprüfen, ob die Wirkung dieser beiden antithrombozytären Substanzen von der Anwesenheit zweiwertiger Ionen abhängig war.

In Zusammenarbeit mit Dr. Orsolya Tóth (Universität Pécs, Pécs, Ungarn) durchgeführte Dosis-Wirkungsexperimente bezüglich der Inhibition der ADP (5 µM)-induzierten Thrombozytenaggregation in Citrat- und Hirudin-antikoaguliertem Blut konnten zeigen, dass 1 µM AR-C69931MX und 100 µM MRS2179 die optimalen Antagonistkonzentrationen darstellten, um die ADP-vermittelte Aggregation vollständig (AR-C69931MX) oder zu mehr als 90% (MRS2179) zu blockieren (Daten nicht gezeigt; Haseruck *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu zeigten Experimente in Citrat- und Hirudin-antikoaguliertem PRP, dass maximale Antagonistkonzentrationen von 100 µM MRS2179 und 1 µM AR-C69931MX die ADP (5 µM)-induzierte Thrombozytenaggregation nur reduzieren, nicht aber vollständig inhibieren konnten (Abb. 4.30). Im Citrat-PRP reduzierte MRS2179 (100 µM) die ADP-vermittelte Aggregation von 95±13 auf 38±28% Lichttransmission (MW±SA; n=5). Im Hirudin-PRP wirkte MRS2179 deutlich stärker und verringerte die Blutplättchenaggregation von 86±7 auf 2±1% Lichttransmission (MW±SA; n=4). AR-C69931MX (1 µM) reduzierte die ADP-stimulierte Aggregation von 95±13 auf 29±9% Lichttransmission (MW±SA; n=5) im Citrat-PRP, sowie von 86±7 auf 15±8% Lichttransmission (MW±SA; n=4) im Hirudin-PRP. Auffällig bei diesen Experimenten war, dass beide ADP-Rezeptor-Antagonisten im Hirudin-PRP, also in Anwesenheit physiologischer Konzentrationen an zweiwertigen Ionen, signifikant besser inhibierten, als im Citrat-PRP. Die Kombination aus 100 µM MRS2179 und 1 µM AR-C69931MX blockierte sowohl in Citrat-, als auch in Hirudin-antikoaguliertem PRP die ADP-induzierte Blutplättchenaktivierung und Aggregation vollständig.



**Abb. 4.30: Effekt der ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation in Citrat- und Hirudin-antikoagulierte PRP.** Citrat (graue Balken)- oder Hirudin (schwarze Balken)-PRP wurde für 3 min bei 37°C mit MRS2179 (100 µM), AR-C69931MX (1 µM) oder der Kombination aus beiden ADP-Rezeptor-Antagonisten vorbehandelt. Die Thrombozytenaggregation wurde durch Zugabe von ADP (5 µM) induziert und mittels turbidimetrischer Aggregationsmessung bestimmt. Im Balkendiagramm sind die Werte in % Lichttransmission (PRP = 0%, PPP = 100%) angegeben und stellen MW±SA aus 5 Experimenten mit dem Citrat-PRP und 4 Experimenten mit dem Hirudin-PRP verschiedener Probanden dar. \* p < 0,05 für MRS/ARC/MRS+ARC versus Kontrolle. ‡ p < 0,05 für Citrat- versus Hirudin-PRP.

Der inhibierende Effekt von 100 µM MRS2179 und 1 µM AR-C69931MX wurde im Folgenden auf die Kollagen-induzierte Plättchenaktivierung und Aggregation im PRP und Blut untersucht. Die Kollagen (0,5 µg/ml)-stimulierte Aggregation war mit 90±11 (MW±SA; n=7) und 79±26% Lichttransmission (MW±SA; n=4) in etwa vergleichbar in Citrat- und Hirudin-PRP (Abb. 4.31). MRS2179 und AR-C69931MX verringerten die Kollagen-vermittelte Thrombozytenaggregation von 90±11 (MW±SA; n=7) auf 62±33 und 31±19% Lichttransmission im Citrat-PRP (MW±SA; n=6), sowie von 79±26 (MW±SA; n=4) auf 35±33 und 1±3% Lichttransmission im Hirudin-PRP (MW±SA; n=4). Die Kombination beider ADP-Rezeptor-Antagonisten reduzierte die Aggregation nahezu vollständig auf 7±10% Lichttransmission (MW±SA; n=7) im Citrat-PRP und komplett auf 0±0% Lichttransmission (MW±SA; n=4) im Hirudin-PRP. Der Kollagen-vermittelte Gestaltwandel der Plättchen konnte durch die Präinkubation des Hirudin-antikoagulierte PRP mit AR-C69931MX jedoch nicht blockiert werden (Daten nicht gezeigt). Auch bei diesen Experimenten mit Kollagen als Thrombozytenagonist wiesen die antithrombozytären Substanzen MSR2179 und AR-C69931MX, wie zuvor bei den Versuchen mit ADP als Plättchenstimulus, eine stärkere Wirkung im Hirudin-, als im Citrat-PRP auf. Darüber hinaus wurde unter beiden Antikoagulationsbedingungen eine deutlich ausgeprägtere Blockade der Kollagen-stimulierten Thrombozytenaktivierung und Aggregation durch den P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten AR-C69931MX, als durch den P2Y<sub>1</sub>-Antagonisten MRS2179 beobachtet.

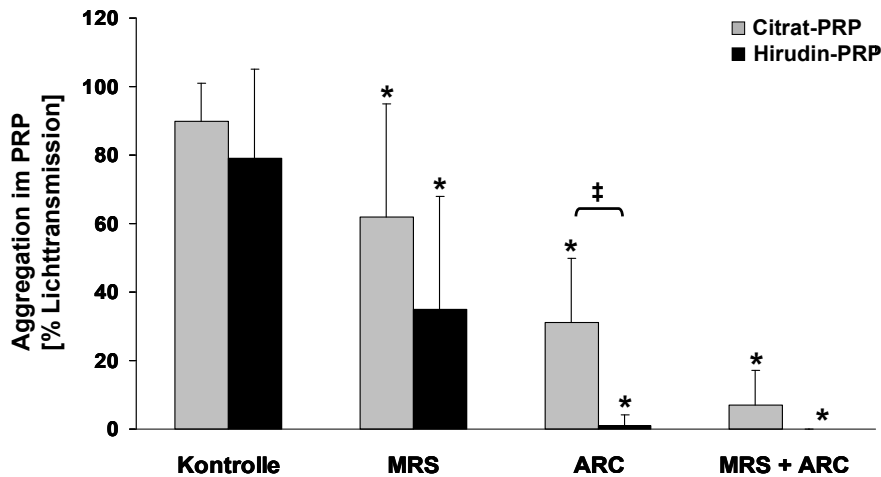


Abb. 4.31: Effekt der ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation in Citrat- und Hirudin-antikoagulierte PRP. Citrat (graue Balken)- oder Hirudin (schwarze Balken)-PRP wurde für 3 min bei 37°C mit MRS2179 (100 µM), AR-C69931MX (1 µM) oder der Kombination aus beiden ADP-Rezeptor-Antagonisten inkubiert. Die Thrombozytenaggregation wurde durch die Zugabe von Horm®-Kollagen (0,5 µg/ml) induziert und im Aggregometer gemessen. Im Balkendiagramm sind die Werte in % Lichttransmission (PRP = 0%, PPP = 100%) angegeben und stellen MW±SA aus 6-7 Experimenten mit dem Citrat-PRP und 4 Experimenten mit dem Hirudin-PRP verschiedener Probanden dar. \* p < 0,05 für MRS/ARC/MRS+ARC versus Kontrolle. ‡ p < 0,05 für Citrat- versus Hirudin-PRP.

Im Gegensatz zu der ähnlichen Aggregation im Citrat- und Hirudin-PRP (siehe Abb. 4.31), führte die Zugabe von Kollagen zu Citrat- oder Hirudin-antikoagulierte Blut zu einer unterschiedlichen Thrombozytenaktivierung (Abb. 4.32). Die Kollagen (0,5 µg/ml)-induzierte Aggregation im Hirudinblut war mit 132±40 Aggregationseinheiten (AE) (MW±SA; n=6) deutlich höher als die im Citratblut mit 64±15 AE (MW±SA; n=11). Der ADP-Rezeptor-Antagonist MRS2179 war nicht wie zuvor im PRP (siehe Abb. 4.31, Abschnitt 4.5.1.1) in der Lage, die Kollagen-vermittelte Aggregation im Citratblut signifikant zu reduzieren. Im Hirudinblut hingegen reduzierte der P2Y<sub>1</sub>-Blocker die Kollagen-abhängige Blutplättchenaggregation signifikant von 132±40 auf 42±56 AE (MW±SA; n=6). Der P2Y<sub>12</sub>-Antagonist AR-C69931MX inhibierte unter beiden Antikoagulantien effektiv, und verringerte die Kollagen-stimulierte Aggregation im Citratblut von 64±15 auf 32±11 AE (MW±SA; n=11) sowie im Hirudinblut von 132±40 auf 46±29 AE (MW±SA; n=6). Die Kombination beider ADP-Rezeptor-Blocker reduzierte die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation im Citratblut von 64±15 auf 19±12 AE (MW±SA; n=11). Im Hirudin-antikoagulierte Blut allerdings wirkte die kombinierte Inhibition beider ADP-Rezeptoren deutlich effektiver und resultierte in einer nahezu vollständigen Reduktion der Kollagen-vermittelten Plättchenaggregation von 132±40 auf 3±2 AE (MW±SA; n=6).



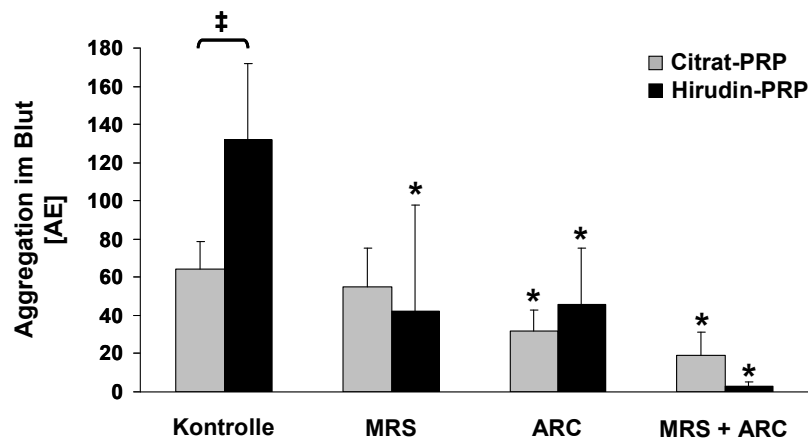


Abb. 4.32: Effekt der ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation in Citrat- und Hirudin-antikoaguliertem Blut. Citrat (graue Balken)- oder Hirudinblut (schwarze Balken) wurde für 3 min bei 37°C mit MRS2179 (100 µM), AR-C69931MX (1 µM) oder der Kombination beider ADP-Rezeptor-Antagonisten vorbehandelt. Die Thrombozytenaggregation wurde durch die Zugabe von Horm<sup>®</sup>-Kollagen (0,5 µg/ml) induziert und mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate<sup>®</sup>-Gerät bestimmt. Im Balkendiagramm stellen die Werte (Aggregationseinheiten = AE) MW±SA aus 11 Experimenten mit dem Citratblut und 6 Experimenten mit dem Hirudinblut verschiedener Probanden dar. \* p < 0,05 für MRS/ARC/MRS+ARC versus Kontrolle. ‡ p < 0,05 für Citrat- versus Hirudinblut.

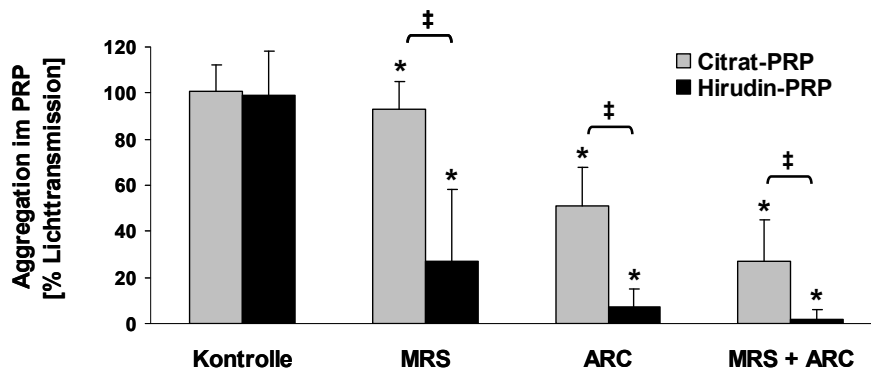
Zusammenfassend konnte in den Untersuchungen der Bedeutung von ADP und dessen Thrombozytenrezeptoren für die Kollagen-induzierte Blutplättchenaktivierung und Aggregation folgendes gezeigt werden: 1. ADP spielt eine wichtige Rolle in der Amplifikation der Kollagen-stimulierten Thrombozytenaggregation in PRP und Blut; 2. AR-C69931MX verringert die Kollagen-vermittelte Aggregation wirksamer als MRS2179; 3. Die Blockade beider ADP-Rezeptoren reduziert die Kollagen-induzierte Aggregation am effektivsten; 4. Beide ADP-Rezeptor-Antagonisten inhibieren die Kollagen-stimulierte Aggregation der Plättchen deutlich effizienter in Hirudin-, als in Citrat-antikoaguliertem Plasma oder Blut; 5. MRS2179 und AR-C69931MX verringern die Kollagen-vermittelte Aggregation im Blut weniger effizient, als in plättchenreichem Plasma.

Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass beide ADP-Rezeptoren, P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>, an der Verstärkung der Kollagen-stimulierten Thrombozytenaggregation beteiligt sind, wobei P2Y<sub>12</sub> von größerer Bedeutung zu sein schien als P2Y<sub>1</sub>. Des Weiteren war die Wirkung der ADP-Rezeptor-Antagonisten optimal in Gegenwart physiologischer Konzentrationen zweiwertiger Ionen (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>), welche in Citrat-antikoaguliertem PRP und Blut cheliiert werden.

#### 4.5.1.2. Bedeutung von P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> für die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation in PRP und Blut

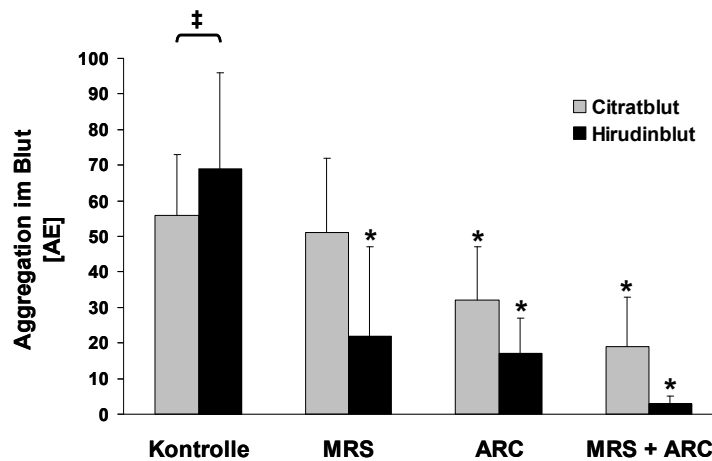
Die Zugabe von humanem atheromatösem Plaquematerial (0,83 mg Feuchtgewicht/ml) rief eine in etwa vergleichbare Thrombozytenaggregation von 101±11 (MW±SA; n=6) und 99±19%

Lichttransmission (MW±SA; n=7) in Citrat- und Hirudin-antikoagulierte PRP hervor (Abb. 4.33). Die Vorbehandlung des PRP mit MRS2179 und AR-C69931MX reduzierte die Plaque-stimulierte Blutplättchenaggregation im Citrat-PRP von 101±11 nur auf 93±11 und 51±17% Lichttransmission (MW±SA; n=6). Im Vergleich dazu wirkten die ADP-Rezeptor-Blocker im Hirudin-PRP signifikant effektiver und verringerten die Aggregation von 99±19 auf 27±31 (MW±SA; n=7; MRS2179) und 7±8% Lichttransmission (MW±SA; n=7; AR-C69931MX). Die Blockade des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors mittels AR-C69931MX schien hierbei einen größeren Einfluss auf die Plaque-vermittelte Thrombozytenaktivierung zu besitzen als die Blockade des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors mittels MRS2179. Die effektivste Reduktion der Plaque-induzierten Aggregation auf 27±18% Lichttransmission (MW±SA; n=6) im Citrat-PRP, sowie auf 2±4% Lichttransmission (MW±SA; n=6) im Hirudin-PRP war jedoch nach der Vorbehandlung des Plasmas mit der Kombination aus MRS2179 und AR-C69931MX zu beobachten.



**Abb. 4.33: Effekt der ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation in Citrat- und Hirudin-antikoagulierte PRP.** Citrat (graue Balken)- oder Hirudin (schwarze Balken)-PRP wurde für 3 min bei 37°C mit MRS2179 (100 µM), AR-C69931MX (1 µM) oder der Kombination aus beiden ADP-Rezeptor-Blockern vorbehandelt. Die Thrombozytenaggregation wurde durch die Zugabe von Plaquematerial (0,83 mg Feuchtgewicht/ml) 3 unterschiedlicher Patienten induziert und mittels turbidimetrischer Aggregationsmessung bestimmt. Im Balkendiagramm sind die Werte in % Lichttransmission (PRP = 100%, PPP = 0%) angegeben und stellen MW±SA aus 6 Experimenten mit dem Citrat-PRP und 6-7 Experimenten im Hirudin-PRP verschiedener Probanden dar. \*  $p < 0,05$  für MRS/ARC/MRS+ARC versus Kontrolle. ‡  $p < 0,05$  für Citrat- versus Hirudin-PRP.

Im Gegensatz zu einer vergleichbaren Plaque-stimulierten Thrombozytenaggregation in Citrat- und Hirudin-antikoagulierte PRP, führte die Zugabe von Plaquematerial (0,83 mg/ml) zu Hirudinblut (69±27 AE; MW±SA; n=5) zu einer höheren Blutplättchenaggregation als im Citratblut (55±16 AE; MW±SA; n=12) (Abb. 4.34). Ein ähnliches, jedoch deutlich stärker ausgeprägtes Phänomen, wurde zuvor auch für die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation im Blut beobachtet (siehe Abb. 4.32, Abschnitt 4.5.1.1).

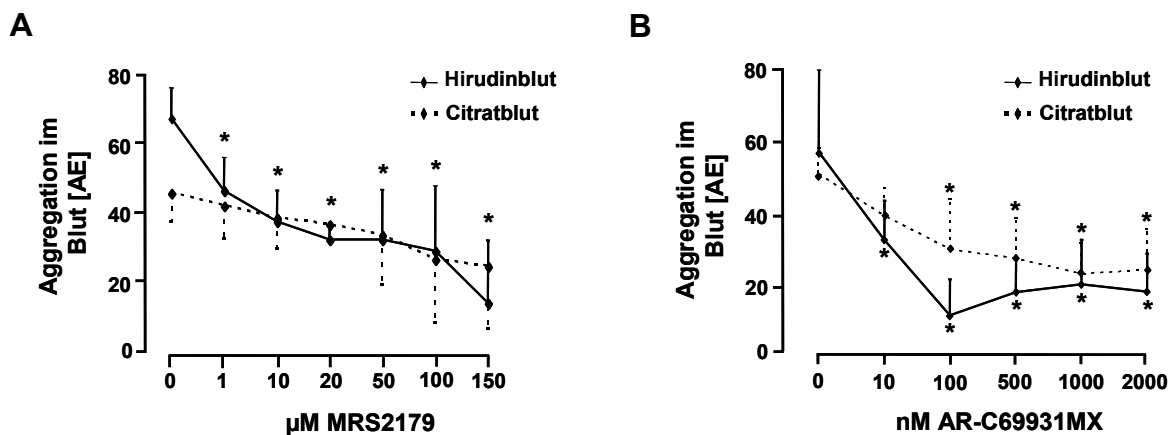


**Abb. 4.34: Effekt der ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation in Citrat- und Hirudin-antikoagulierte Blut.** Citrat (graue Balken)- oder Hirudinblut (schwarze Balken) wurde für 3 min bei 37°C mit MRS2179 (100 µM), AR-C69931MX (1 µM) oder der Kombination aus beiden ADP-Rezeptor-Antagonisten vorinkubiert. Die Thrombozytenaggregation wurde durch die Zugabe von Plaquematerial (0,83 mg Feuchtgewicht/ml) 5 unterschiedlicher Patienten induziert und mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät bestimmt. Im Balkendiagramm sind die Werte in Aggregationseinheiten (AE) angegeben und stellen MW±SA aus 12 Experimenten mit dem Citratblut und 5 Experimenten mit dem Hirudinblut verschiedener Probanden dar. \* p < 0,05 MRS/ARC/MRS+ARC versus Kontrolle. ‡ p < 0,05 für Citrat- versus Hirudinblut.

Im Citratblut konnte der P2Y<sub>1</sub>-Blocker MRS2179 die Plaque-vermittelte Aggregation nicht signifikant reduzieren (Abb. 4.34). Auch hier wurde, wie zuvor in Abb. 4.32 (siehe Abschnitt 4.5.1.1) gezeigt, eine vergleichbare Beobachtung für Kollagen als Thrombozytenstimulus gemacht. In Hirudin-antikoagulierte Blut jedoch verringerte die Zugabe von MSR2179 die Plaque-stimulierte Plättchenaggregation signifikant von 69±27 auf 22±25 AE (MW±SA; n=5). Die Vorbehandlung des Blutes mit dem P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten AR-C69931MX setzte die Thrombozytenaggregation im Citrat- und Hirudinblut von 55±16 auf 32±15 AE (MW±SA; n=12), bzw. von 69±27 auf 17±10 AE (MW±SA; n=5) herab. Eine weitere Parallele zu den zuvor mit Kollagen erhaltenen Ergebnissen (siehe Abb. 4.32, Abschnitt 4.5.1.1) bestand darin, dass AR-C69931MX verglichen mit MRS2179 auch bei der Plaque-stimulierten Aggregation die effektivere anti-aggregatorische Substanz darstellte. Die Kombination beider ADP-Rezeptor-Blocker reduzierte die durch das Plaquematerial hervorgerufene Thrombozytenaggregation im Citratblut nur geringfügig stärker als AR-C69931MX alleine (Abb. 4.34). Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von MRS2179 plus AR-C69931MX zum Hirudinblut zu einer signifikant effektiveren Hemmung der Blutplättchenaggregation von ursprünglich 69±27 auf 3±2 AE (MW±SA; n=5).

Dosis-Wirkungsexperimente mit aufsteigenden Konzentrationen der ADP-Rezeptor-Antagonisten und konstanter Plaquekonzentration (0,83 mg Feuchtgewicht/ml) zeigten, dass die eingesetzten Konzentrationen von 100 µM MRS2179 und 1 µM AR-C69931MX ausreichten,

um die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation in Hirudin-antikoagulierte Blut maximal zu inhibieren (Abb. 4.35 A und B). Im Citratblut war die Hemmung geringer als im Hirudinblut, und im Falle von MRS2179 nicht signifikant. Interessanter Weise konnten niedrigere Konzentrationen der P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>12</sub>-Hemmer die Plaque-stimulierte Blutplättchenaggregation im Hirudinblut ebenfalls signifikant inhibieren (Abb. 4.35 A und B). Im Gegensatz dazu waren die niedrigeren Konzentrationen von MSR2179 und AR-C69931MX, wie in Abschnitt 4.5.1.1 beschrieben, nicht in der Lage, die ADP (5 µM)-induzierte Aggregation maximal zu blockieren. Ein Grund für diesen Unterschied in der Hemmung könnte darin liegen, dass im Vergleich zur exogen zugegebenen ADP-Konzentration von 5 µM, die Plaque-vermittelte Thrombozytenaktivierung zur Freisetzung einer geringeren Menge an ADP führte.



**Abb. 4.35: Dosis-Wirkungskurven der Effekte von MRS2179 und AR-C69931MX auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation in Citrat- und Hirudin-antikoagulierte Blut.** Citrat (gestrichelte Linie)- oder Hirudinblut (durchgezogene Linie) wurde für 3 min bei 37°C mit ansteigenden Konzentrationen von MRS2179 (A) oder AR-C69931MX (B) vorbehandelt, die Thrombozytenaggregation durch Zugabe von Plaquematerial (0,83 mg Feuchtgewicht/ml) induziert und mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät bestimmt. Für alle Experimente wurde das gleiche Plaquesgemisch eingesetzt, welches zu Beginn der Versuchsreihe zu gleichen Teilen aus 3 verschiedenen G (gefrorenen)-Plaqueshomogenaten hergestellt wurde (siehe Abschnitt 3.2.1). Die Werte (Aggregationseinheiten = AE) stellen MW±SA aus 5 Experimenten mit dem Blut verschiedener Probanden dar. \* p < 0,05 für MRS/ARC versus Kontrolle.

Zusammenfassend konnte bei den Untersuchungen zur Bedeutung des sekundären Botenstoffes ADP und dessen thrombozytärer Rezeptoren für die Plaque-induzierte Blutplättchenaggregation gezeigt werden, dass ADP sowie dessen Interaktion mit P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> die Plaque-stimulierte Thrombozytenaktivierung und Aggregation verstärkten. Der P2Y<sub>12</sub>-Antagonist AR-C69931MX reduzierte die Plaque-induzierte Plättchenaggregation hierbei sowohl im PRP als auch im Blut wirksamer als der P2Y<sub>1</sub>-Antagonist MRS2179. Beide ADP-Rezeptor-Antagonisten wirkten darüber hinaus deutlich effektiver in Hirudin- als in Citrat-antikoagulierte plättchenreichem Plasma und Blut. Ferner inhibierten MRS2179 und AR-C69931MX die Plaque-vermittelte Thrombozytenaggregation im Blut weniger effizient als im PRP.

#### 4.5.1.3. Bedeutung von P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> für die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen

Die Bedeutung der ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung und Aggregation wurde in Hirudin-antikoagulierte Blut unter arteriellen Flussbedingungen bei einer Scherrate von 1500 s<sup>-1</sup> untersucht (Abb. 4.36).

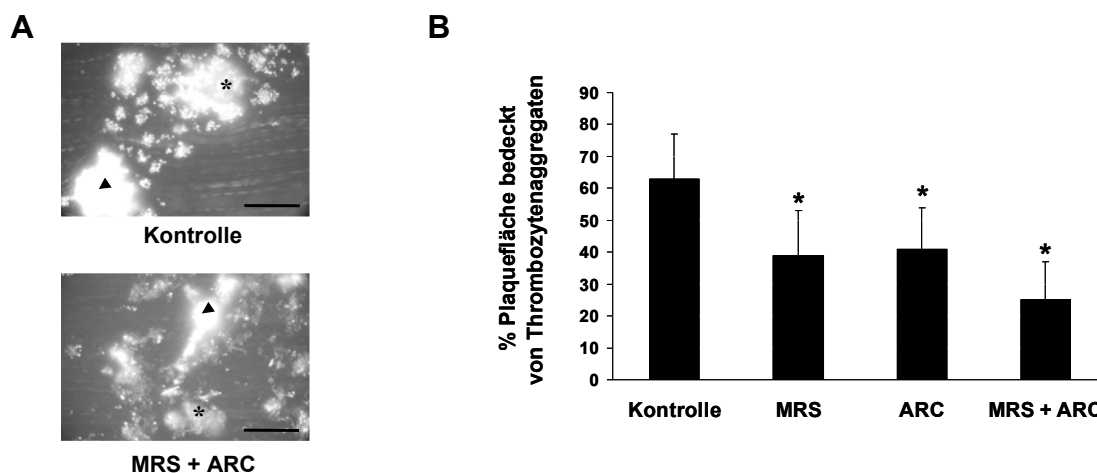


Abb. 4.36: Effekt der ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX auf die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen (1500 s<sup>-1</sup>). Hirudin-antikoagulierte Blut wurde für 10 min bei 37°C mit einer Scherrate von 1500 s<sup>-1</sup> über Plaque (5 mg Feuchtgewicht/ml)-beschichtete Glasoberflächen perfundiert. Vor der Perfusion wurde das Blut für 10 min mit MRS2179 (100 µM), AR-C69931MX (1 µM) oder der Kombination beider ADP-Rezeptor-Antagonisten vorbehandelt, und unmittelbar vor Beginn des Experiments zur Färbung der Thrombozyten mit Mepacrin (10 µM) versetzt. A) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kontroll- und MRS+ARC-Experimente 7-10 min nach Beginn des Blutflusses. Das Plaquematerial wurde mittels Autofluoreszenz (hellgrau;\*) visualisiert; adhärenente Thrombozyten mittels Mepacrinfluoreszenz (weiß;▲) dargestellt. Längenmaß: 50 µm. B) Im Balkendiagramm sind die Werte in % Plaquefläche bedeckt von Thrombozytenaggregaten 7-10 min nach Beginn der Perfusion angegeben und stellen MW±SA aus 5 Experimenten mit den atheromatösen Plaques 3 unterschiedlicher Patienten im Blut verschiedener Probanden dar. \* p < 0,05 für MRS/ARC/MRS+ARC versus Kontrolle.

Die videomikroskopische Analyse der Plättchenadhäsion und Aggregatbildung zeigte, dass die Adhäsion der Thrombozyten in den Kontrollexperimenten nach ca. 0,5 bis 3 min stattfand und durch die Vorbehandlung des Blutes mit den ADP-Rezeptor-Antagonisten nicht beeinflusst wurde (Daten nicht gezeigt). Nach einer Perfusionsdauer von 7 bis 10 min waren in den Kontrollen 63±14% (MW±SA; n=5) der Plaquefläche mit Thrombozytenaggregaten bedeckt (Abb. 4.36). Die Vorbehandlung des Blutes mit den antithrombozytären Substanzen MRS2179 und AR-C69931MX, sowie deren Kombination, verringerten die Plaque-stimulierte Blutplättchenadhäsion und Aggregatbildung im Vergleich dazu signifikant von 63±14 auf 39±14, 41±13 und 25±12% (MW±SA; n=5).

Verglichen mit der stärkeren Hemmwirkung der ADP-Rezeptor-Antagonisten unter statischen Aggregationsbedingungen in gerührtem PRP oder Blut (siehe Abschnitt 4.5.1.2), reduzierten

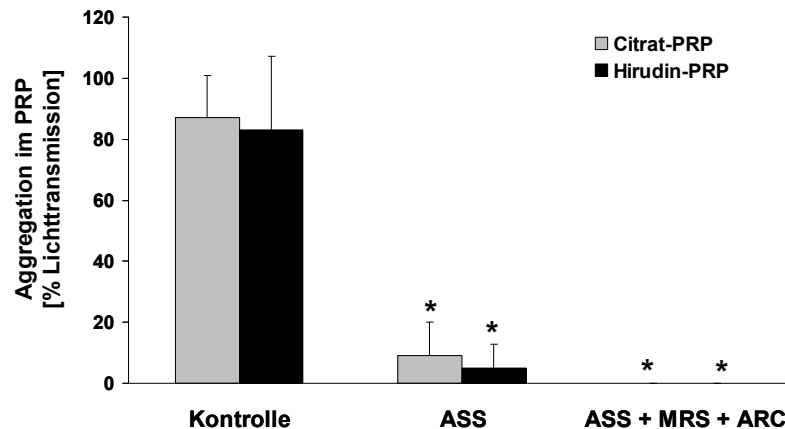
MRS2179 und AR-C69931MX die Plaque-stimulierte Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen deutlich geringer. MRS2179 und AR-C69931MX inhibierten die Aggregatbildung in diesen Experimenten in etwa gleich effektiv. Die Kombination von MRS2179 und AR-C69931MX zeigte hierbei die größte Wirksamkeit.

#### **4.5.2. Bedeutung von TxA2 sowie der Kombination von TxA2 und ADP für die Thrombozytenaktivierung vermittelt durch Kollagen und atherosklerotisches Plaquematerial**

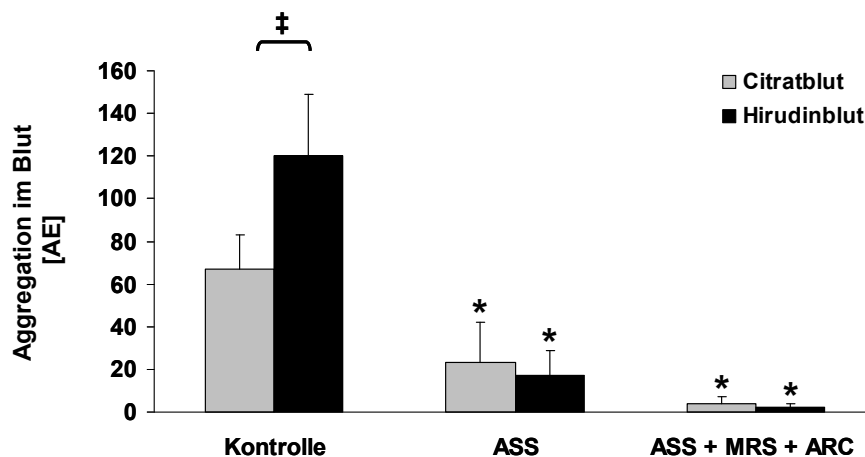
Außer ADP wird auch der sekundäre Botenstoff TxA2 von aktivierten Thrombozyten freigesetzt (Ruggeri, 2002), und spielt als positiver „*feedback*“-Mediator möglicherweise eine Rolle bei der Kollagen- und Plaque-induzierten Thrombusbildung. In den folgenden Untersuchungen wurde die Bedeutung von TxA2 mittels Aspirin® (ASS) analysiert, welches die thrombozytäre Cyclooxygenase-1 acetyliert und auf diese Weise die nachfolgende Bildung von TxA2 verhindert (Phillips *et al.*, 2005). Für diese Experimente wurde eine Konzentration von 1 mM Aspirin eingesetzt, von welcher bekannt war, dass sie die Cyclooxygenase-1 vollständig inhibiert (Savi *et al.*, 2000; Haseruck *et al.*, 2004). Zusätzlich zur Bedeutung von TxA2 für die Kollagen- und Plaque-stimulierte Thrombozytenaktivierung, wurde auch ein möglicher synergistischer Effekt von Aspirin® und den beiden ADP-Rezeptoren-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX untersucht.

##### **4.5.2.1. Bedeutung von TxA2 sowie der Kombination von TxA2 und ADP für die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation in PRP und Blut**

Die Zugabe von Kollagen (0,5 µg/ml) zu Citrat- oder Hirudin-antikoaguliertem PRP verursachte in etwa eine vergleichbare Thrombozytenaggregation von 87±14 (MW±SA; n=7) und 83±24% Lichttransmission (MW±SA; n=5) (Abb. 4.37). Die Vorbehandlung des plättchenreichen Plasmas mit Aspirin® verringerte die Kollagen-induzierte Aggregation im Vergleich dazu auf 9±10 (MW±SA; n=7) und 5±8% Lichttransmission (MW±SA; n=5) im Citrat- und Hirudin-PRP. Im Unterschied zur effektiveren Wirkung der ADP-Rezeptor-Antagonisten im Hirudin-PRP (siehe Abb. 4.30, Abschnitt 4.5.1.1), war der inhibierende Effekt von Aspirin® nicht von der Präsenz physiologischer Konzentrationen zweiwertiger Ionen abhängig. Die Kombination aus allen 3 antithrombozytären Substanzen (ASS, MRS2179 und AR-C69931MX) konnte die Kollagen-stimulierte Plättchenaktivierung („*shape change*“) und Aggregation im PRP vollständig blockieren (Abb. 4.37).



**Abb. 4.37: Effekt von Aspirin® (ASS) sowie der Kombination von ASS und den ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation in Citrat- und Hirudin-antikoagulierte PRP.** Für die Experimente mit Aspirin® wurde das PRP aus Citrat- oder Hirudinblut hergestellt, welches bereits bei der Abnahme mit ASS (1 mM) versetzt wurde. Kontroll- oder ASS-enthaltendes Citrat (graue Balken)- oder Hirudin-PRP (schwarze Balken) wurde für 3 min bei 37°C mit oder ohne MRS2179 (100 µM) und AR-C69931MX (1 µM) vorinkubiert. Anschließend wurde die Thrombozytenaggregation durch die Zugabe von Horm®-Kollagen (0,5 µg/ml) induziert und im Aggregometer bestimmt. Im Balkendiagramm stellen die Werte (% Lichttransmission; PRP = 0%, PPP = 100%) MW±SA aus 4 (ASS+MRS+ARC), bzw. 7 (Kontrolle, ASS) Experimenten mit dem Citrat-PRP, sowie aus 4 (ASS+MRS+ARC), bzw. 5 (Kontrolle, ASS) Experimenten mit dem Hirudin-PRP verschiedener Probanden dar. \* p < 0,05 für ASS/ASS+MRS+ARC versus Kontrolle.



**Abb. 4.38: Effekt von Aspirin® (ASS) sowie der Kombination von ASS und den ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation in Citrat- und Hirudinblut.** In den Kontrollexperimenten wurde Citrat- oder Hirudin-antikoagulierte Blut eingesetzt; für die Experimente mit Aspirin® wurde das Citrat- oder Hirudinblut bereits bei der Abnahme mit ASS (1 mM) versetzt. Das Kontroll- oder ASS-enthaltende Citrat (graue Balken)- oder Hirudinblut (schwarze Balken) wurde für 3 min bei 37°C mit oder ohne der Kombination aus MRS2179 (100 µM) und AR-C69931MX (1 µM) vorinkubiert. Die Thrombozytenaggregation wurde durch die Zugabe von Horm®-Kollagen (0,5 µg/ml) induziert und mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät bestimmt. Im Balkendiagramm stellen die Werte (Aggregationseinheiten = AE) MW±SA aus 3 (ASS+MRS+ARC), bzw. 12 (Kontrolle, ASS) Experimenten mit dem Citratblut, sowie 5 Experimenten mit dem Hirudinblut verschiedener Probanden dar. \* p < 0,05 für ASS/ASS+MRS+ARC versus Kontrolle. ‡ p < 0,05 für Citrat- versus Hirudinblut.

In Citrat- und Hirudinblut fiel die Hemmwirkung der Thrombozyteninhibitoren verglichen mit der Wirkung im PRP geringer aus (Abb. 4.38). Die Vorbehandlung des Blutes mit ASS reduzierte die Kollagen-vermittelte Blutplättchenaggregation von  $67 \pm 16$  (MW $\pm$ SA; n=12) auf  $23 \pm 19$  Aggregationseinheiten (AE) (MW $\pm$ SA; n=12) im Citratblut und von  $120 \pm 29$  (MW $\pm$ SA; n=5) auf  $17 \pm 12$  AE (MW $\pm$ SA; n=5) im Hirudinblut. Die Kombination von ASS, MRS2179 und AR-C69931MX verringerte die Kollagen-stimulierte Aggregation signifikant auf  $4 \pm 3$  AE (MW $\pm$ SA; n=3) im Citratblut, sowie auf  $2 \pm 2$  AE (MW $\pm$ SA; n=5) im Hirudinblut.

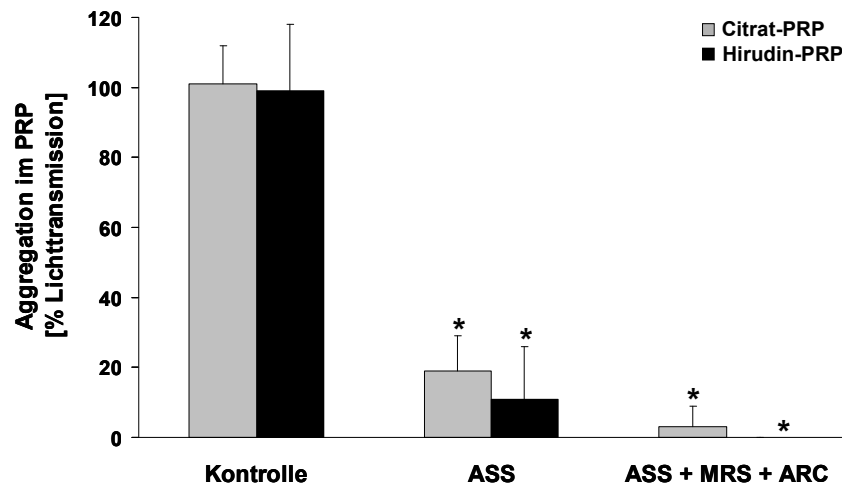
Zusammenfassend konnte bei der Untersuchung des Effekts von Aspirin<sup>®</sup> und der Kombination von Aspirin<sup>®</sup> plus MRS2179 und AR-C69931MX auf die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation gezeigt werden, dass die Kollagen-stimulierte Aktivierung der Thrombozyten sowohl von der sekundären Potenzierung durch TxA<sub>2</sub> als auch von der Amplifikation durch ADP abhängig war. Darüber hinaus fiel die inhibierende Wirkung dieser antithrombozytären Substanzen effizienter im Blut als in plättchenreichem Plasma aus. Eine ähnliche Beobachtung wurde zuvor auch für die ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX gemacht (siehe Abschnitt 4.5.1).

#### **4.5.2.2. Bedeutung von TxA<sub>2</sub> sowie der Kombination von TxA<sub>2</sub> und ADP für die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation in PRP und Blut**

Die Zugabe von humanem Plaquematerial (0,83 mg Feuchtgewicht/ml) rief eine vergleichbare Thrombozytenaggregation von  $101 \pm 11$  (MW $\pm$ SA; n=6) und  $99 \pm 19\%$  Lichttransmission (MW $\pm$ SA; n=7) in Citrat- und Hirudin-antikoaguliertem PRP hervor (Abb. 4.39). Die Vorbehandlung des PRP mit Aspirin<sup>®</sup> verringerte die Plaque-stimulierte Aggregation auf  $19 \pm 10$  (MW $\pm$ SA; n=6) und  $11 \pm 15\%$  Lichttransmission (MW $\pm$ SA; n=7) im Citrat- und Hirudin-PRP. Im Unterschied zu den in Abschnitt 4.5.1 untersuchten ADP-Rezeptor-Antagonisten reduzierte Aspirin<sup>®</sup> die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung in etwa gleich gut im Citrat- und Hirudin-PRP. Die Aktivität dieser antithrombozytären Substanz schien also nicht von der Anwesenheit physiologischer Konzentrationen an zweiwertigen Ionen abhängig zu sein. Die Plaque-vermittelte Blutplättchenaggregation wurde durch die Zugabe von ASS etwas weniger als die Kollagen-abhängige Aggregation (siehe Abb. 4.37, Abschnitt 4.5.2.1) inhibiert, was auf einen Unterschied zwischen fibrillärem Kollagen und dem Plaquematerial bezüglich der Thrombozytenaktivierung hindeutete. Die Kombination von Aspirin<sup>®</sup> und den ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX konnte die Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregation im Citrat-PRP nicht wie die durch Kollagen vermittelte Aggregation (siehe Abb. 4.37, Abschnitt 4.5.2.1) vollständig blockieren, sondern resultierte in einer Restaggregation von  $3 \pm 6\%$  Lichttransmission (MW $\pm$ SA; n=6) (Abb. 4.39). In Hirudin-antikoaguliertem plättchenreichem Plasma hingegen inhibierte die Präinkubation mit allen 3

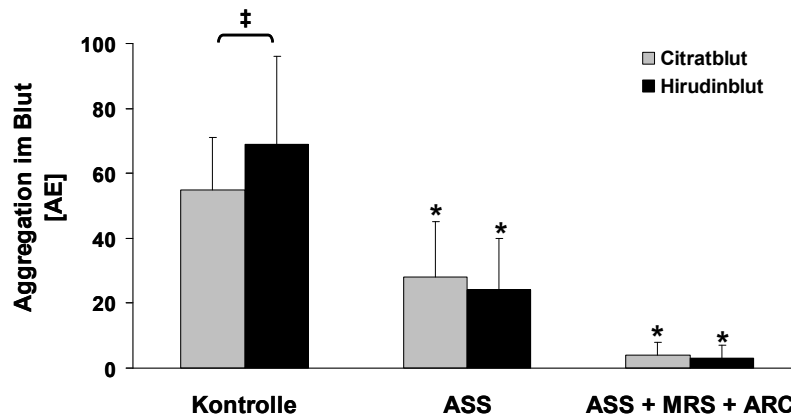


antithrombozytären Substanzen die Plaque-induzierte Aktivierung („*shape change*“) und Aggregation der Plättchen vollständig.



**Abb. 4.39: Effekt von Aspirin® (ASS), sowie der Kombination von ASS und den ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation in Citrat- und Hirudin-antikoagulierte PRP.** Für die Experimente mit Aspirin® wurde das PRP aus Citrat- oder Hirudinblut hergestellt, welches bereits bei der Abnahme mit ASS (1 mM) versetzt wurde. Kontroll- oder ASS-enhaltendes Citrat (graue Balken)- oder Hirudin-PRP (schwarze Balken) wurde für 3 min bei 37°C mit oder ohne MRS2179 (100 µM) und AR-C69931MX (1 µM) vorinkubiert. Im Anschluss daran wurde die Thrombozytenaggregation durch die Zugabe von Plaquematerial (0,83 mg Feuchtgewicht/ml) 3 unterschiedlicher Patienten induziert und mittels turbidimetrischer Aggregationsmessung bestimmt. Im Balkendiagramm stellen die Werte (% Lichttransmission; PRP = 100%, PPP = 0%) MW±SA aus 6 Experimenten mit dem Citrat-PRP und 4 (ASS+MRS+ARC), bzw. 7 Experimenten (Kontrolle, ASS) mit dem Hirudin-PRP verschiedener Probanden dar. \* p < 0,05 für ASS/ASS+MRS+ARC versus Kontrolle.

Die Zugabe von Aspirin® zu Citratblut verringerte die Plaque (0,83 mg Feuchtgewicht/ml)-induzierte Aggregation von 55±16 auf 28±17 Aggregationseinheiten (AE) (MW±SA; n=12) (Abb. 4.40). Im Hirudinblut wurde die Plaque-stimulierte Plättchenaktivierung durch ASS von 69±27 auf 24±16 AE (MW±SA; n=5) reduziert. Ein Vergleich des Effekts von Aspirin® auf die Plaque (Abb. 4.40)- und Kollagen (siehe Abb. 4.37, Abschnitt 4.5.2.1)-vermittelte Aggregation zeigte, dass Aspirin® deutlich effektiver inhibierte, wenn Kollagen als Thrombozytenstimulus eingesetzt wurde. Diese Ergebnisse wiesen erneut auf einen Unterschied zwischen Plaque und fibrillärem Kollagen bezüglich deren Blutplättchenaktivierung hin. Die Kombination von Aspirin® und den ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX konnte die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation weder im Citrat-, noch im Hirudinblut vollständig blockieren (Abb. 4.40). Die Restaggregationen betragen hierbei allerdings jeweils 4±4 (MW±SA; n=4) und 3±4 AE (MW±SA; n=5) in Citrat- und Hirudin-antikoagulierte Blut.



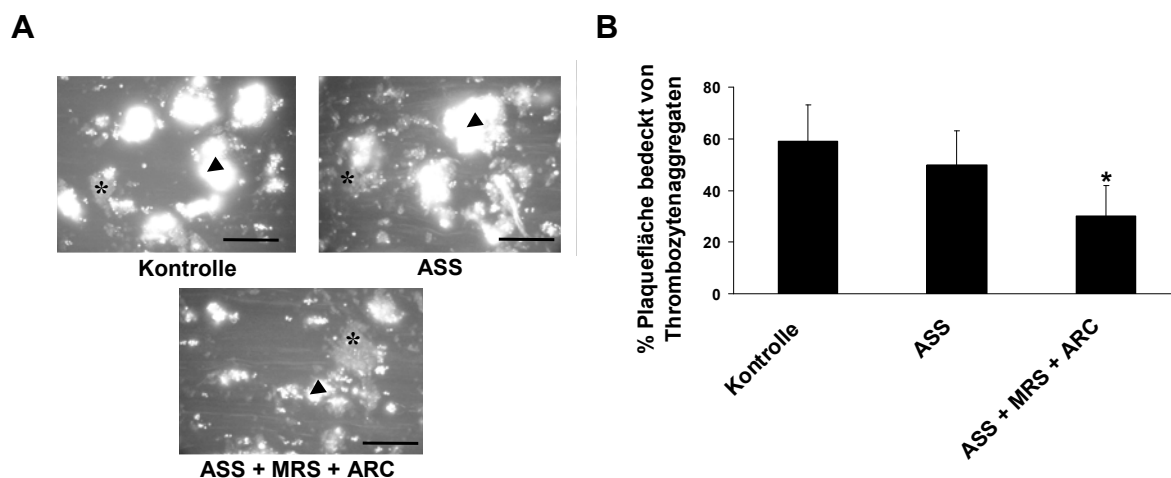
**Abb. 4.40: Effekt von Aspirin® (ASS), sowie der Kombination von ASS und den ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation in Citrat- und Hirudinblut.** In den Kontrollexperimenten wurde Citrat- oder Hirudin-antikoagulierte Blut verwendet; für die Experimente mit Aspirin® wurde das Citrat- oder Hirudinblut bereits bei der Abnahme mit ASS (1 mM) versetzt. Kontroll- oder ASS-enthaltendes Citrat (graue Balken)- oder Hirudinblut (schwarze Balken) wurde für 3 min bei 37°C mit und ohne MRS2179 (100 µM) und AR-C69931MX (1 µM) vorinkubiert. Die Thrombozytenaggregation wurde durch die Zugabe von Plaquematerial (0,83 mg Feuchtgewicht/ml) 5 unterschiedlicher Patienten induziert und mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät bestimmt. Im Balkendiagramm sind die Werte (Aggregationseinheiten = AE) als MW±SA aus 4 (ASS+MRS+ARC), bzw. 12 (Kontrolle, ASS) Experimenten mit dem Citratblut, sowie 5 Experimenten mit dem Hirudinblut verschiedener Probanden dargestellt. \* p < 0,05 für ASS/ASS+MRS+ARC versus Kontrolle. ‡ p < 0,05 für Citrat- versus Hirudinblut.

In den Experimenten zur Untersuchung der Rolle der sekundären Botenstoffe ADP und TxA2 bei der Plaque-stimulierten Blutplättchenaktivierung und Aggregation konnte gezeigt werden, dass alle 3 antithrombozytären Substanzen (MRS2179, AR-C69931MX und Aspirin®) in der Lage waren, die Aggregation zu verringern. Sie wirkten dabei alle weniger effizient im Blut als im PRP. Darüber hinaus zeigten vor allem die ADP-Rezeptor-Antagonisten einen deutlich besseren anti-aggregatorischen Effekt in Hirudin- als in Citrat-antikoagulierte Plasma und Blut. Die Kombination aus Aspirin®, MRS2179 und AR-C69931MX konnte die Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregation am effektivsten reduzieren und zeigte somit, dass die Plättchenaktivierung verursacht durch humanes atheromatöses Plaquematerial im gerührten System sowohl durch ADP als auch durch TxA2 verstärkt wurde.

#### **4.5.2.3. Bedeutung von TxA2 sowie der Kombination von TxA2 und ADP für die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen**

Die Bedeutung von TxA2 sowie der Kombination von TxA2 und ADP für die Plaque-stimulierte Thrombozytenaktivierung und Aggregatbildung wurde unter arteriellen Flussbedingungen mit 2 verschiedenen Scherraten (500 s<sup>-1</sup> und 1500 s<sup>-1</sup>) untersucht. Die videomikroskopische Analyse der Thrombozytenadhäsion und Aggregation zeigte, dass bei den Kontrollexperimenten 7 bis 10 min nach Beginn der Perfusion bei 1500 s<sup>-1</sup> 59±14% (MW±SA,

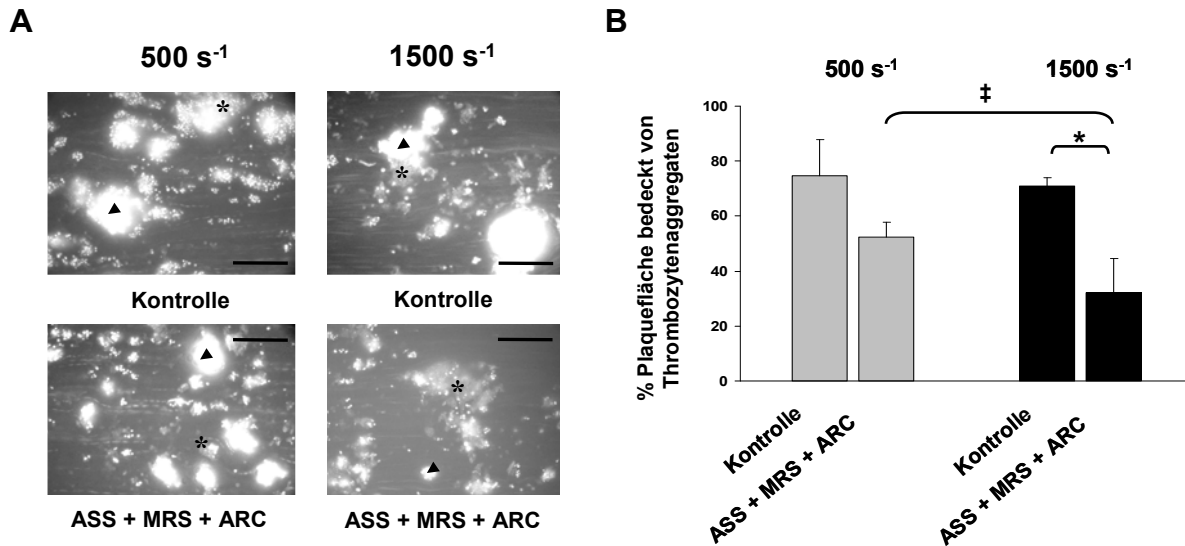
n=8) der Plaquesfläche von Thrombozytenaggregaten bedeckt waren (Abb. 4.41 A und B). Die Vorbehandlung des Blutes mit Aspirin® verringerte die Plaque-induzierte Blutplättchenadhäsion und Aggregatbildung hierbei im Vergleich zur Kontrolle nur sehr gering und nicht signifikant von  $59 \pm 14$  auf  $50 \pm 13\%$  (MW $\pm$ SA; n=8). Die Kombination von ASS mit den beiden ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX hingegen reduzierte die von Thrombozytenaggregaten bedeckte Plaquesfläche signifikant auf  $30 \pm 20\%$  (MW $\pm$ SA; n=5) (Abb. 4.41 A und B), und führte zu keiner Verstärkung der Hemmung durch MRS2179 plus AR-C69931MX (siehe Abb. 4.36, Abschnitt 4.5.1.3).



**Abb. 4.41: Effekt von Aspirin® (ASS) sowie der Kombination von ASS und den ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX auf die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen ( $1500 \text{ s}^{-1}$ ).** In den Kontrolleexperimenten wurde Hirudin-antikoagulierendes Blut verwendet; für die Experimente mit Aspirin® wurde das Hirudinblut bereits bei der Abnahme mit ASS (1 mM) versetzt. Vor der Perfusion wurde das Kontroll- oder ASS-enthaltende Hirudinblut für 10 min mit oder ohne MRS2179 (100  $\mu\text{M}$ ) plus AR-C69931MX (1  $\mu\text{M}$ ) inkubiert, und unmittelbar vor Beginn des Experiments zur Färbung der Thrombozyten mit Mepacrin (10  $\mu\text{M}$ ) versetzt. Im Anschluss daran wurde das Blut für 10 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit einer Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  über Plaque (5 mg Feuchtgewicht/ml)-beschichtete Glasoberflächen perfundiert. A) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kontroll-, ASS- und ASS+MRS+ARC-Experimente 7-10 min nach Beginn der Perfusion. Das Plaquematerial wurde mittels Autofluoreszenz (hellgrau;\*) visualisiert; adhärente Thrombozyten, sowie Thrombozytenaggregate mittels Mepacrinfluoreszenz (weiß;▲) dargestellt. Längenmaß: 50  $\mu\text{m}$ . B) Im Balkendiagramm sind die Werte als % Plaquesfläche bedeckt von Thrombozytenaggregaten 7-10 min nach Beginn der Perfusion angegeben und stellen MW $\pm$ SA aus 5 (ASS+MRS+ARC), bzw. 8 (Kontrolle, ASS) Experimenten mit den atheromatösen Plaqueshomogenaten 4 unterschiedlicher Patienten dar. \*  $p < 0,05$  für ASS+MRS+ARC versus Kontrolle.

Da Aspirin® im Vergleich zur Kontrolle die bei höheren arteriellen Scherraten von  $1500 \text{ s}^{-1}$  ablaufende Plaque-stimulierte Plättchenadhäsion und Aggregatbildung nicht signifikant reduzieren konnte und auch die durch MRS2179 plus AR-C69931MX hervorgerufene Abnahme der Thrombozytenadhäsion und Aggregation nicht weiter verstärkte, stellte sich die Frage, ob ASS, bzw. die Zugabe von ASS zu den beiden ADP-Rezeptor-Antagonisten bei niedrigeren arteriellen Scherraten von  $500 \text{ s}^{-1}$ , bei denen die von den Plättchen freigesetzten

sekundären Botenstoffe wie z. B. TxA2 und ADP möglicherweise länger im Bereich des entstehenden Thrombus verbleiben können, unter Umständen eine größere Wirkung zeigen können. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde der Effekt der Kombination von Aspirin® mit den ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX vergleichend bei niedrigeren ( $500 \text{ s}^{-1}$ ) und höheren Scherraten ( $1500 \text{ s}^{-1}$ ) analysiert (Abb. 4.42 A und B).



**Abb. 4.42: Vergleich des Effekts der Kombination von Aspirin® (ASS), MRS2179 und AR-C69931MX auf die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung bei niedrigeren und höheren Scherraten ( $500 \text{ s}^{-1}$  und  $1500 \text{ s}^{-1}$ ).** In den Kontrollexperimenten wurde Hirudin-antikoaguliertes Blut verwendet; für die Experimente mit Aspirin® wurde das Hirudinblut bereits bei der Abnahme mit ASS (1 mM) versetzt. Vor der Perfusion wurde das Kontroll- oder ASS-enthaltende Hirudinblut für 10 min mit oder ohne MRS2179 (100  $\mu\text{M}$ ) plus AR-C69931MX (1  $\mu\text{M}$ ) inkubiert, und unmittelbar vor Beginn des Experiments zur Färbung der Thrombozyten mit Mepacrin (10  $\mu\text{M}$ ) versetzt. Im Anschluss daran wurde das Blut für 10 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit einer Scherrate von  $500 \text{ s}^{-1}$  oder  $1500 \text{ s}^{-1}$  über Plaque-Oberflächen (5 mg Feuchtgewicht/ml) perfundiert. A) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kontroll-, sowie der ASS+MRS+ARC-Experimente 7-10 min nach Beginn der Perfusion. Das Plaquematerial wurde mittels Autofluoreszenz (hellgrau;\*) visualisiert; adhärenente Thrombozyten, sowie Thrombozytenaggregate mittels Mepacrinfluoreszenz (weiß;▲) dargestellt. Längenmaß: 50  $\mu\text{m}$ . B) Im Balkendiagramm sind die Werte als % Plaquefläche bedeckt von Thrombozytenaggregaten 7-10 min nach Beginn der Perfusion angegeben und stellen MW $\pm$ SA aus 4 Experimenten mit den atheromatösen Plaques 2 unterschiedlicher Patienten mit dem Blut verschiedener Probanden dar. \*  $p < 0,05$  für ASS+MRS+ARC ( $1500 \text{ s}^{-1}$ ) versus Kontrolle. ‡  $p < 0,05$  für ASS+MRS+ARC ( $1500 \text{ s}^{-1}$ ) versus ASS+MRS+ARC ( $500 \text{ s}^{-1}$ ).

Bei niedrigen Scherraten von  $500 \text{ s}^{-1}$  waren nach ca. 10 min Blutfluss  $75 \pm 13\%$  (MW $\pm$ SA; n=4) der beschichteten Plaquefläche von Thrombozytenaggregaten bedeckt (Abb. 4.42 A und B). Anders als erwartet konnte die Vorbehandlung des Blutes mit der Kombination aus Aspirin®, MRS2179 und AR-C69931MX die Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregatbildung bei dieser Scherrate zwar auf  $53 \pm 5\%$  (MW $\pm$ SA; n=4) verringern, wobei diese Reduktion jedoch geringer als bei der höheren Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  ausfiel und nicht signifikant war. Bei einer Scherrate

von  $1500\text{ s}^{-1}$  wurde die Aggregatbildung der Plättchen signifikant von  $71\pm 3$  auf  $32\pm 13\%$  ( $MW\pm SA$ ;  $n=4$ ) von Thrombozytenaggregaten bedeckte Plaquefläche verringert.

Die positiven „*feedback*“-Mediatoren ADP und TxA<sub>2</sub> schienen also bei Flussbedingungen mit niedrigeren Scherraten einen geringeren Einfluss auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung und Aggregation zu besitzen als bei höheren Scherraten.

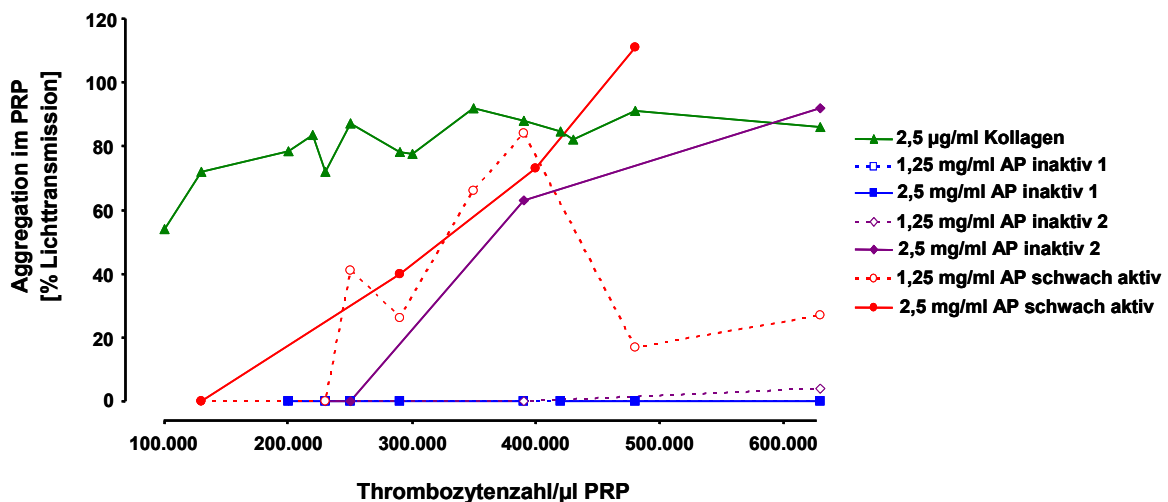
## **4.6. Gegenüberstellung aktiver und inaktiver atherosklerotischer Plaques**

### **4.6.1. Bedeutung der Thrombozytenzahl des PRP für die Plaque-Aktivität**

Wie bereits im Abschnitt 4.1.1 gezeigt wurde, waren nicht alle der in dieser Arbeit untersuchten humanen atheromatösen Plaquehomogenate in der Lage, Thrombozyten zu aktivieren. Diese inaktiven Plaques induzierten weder einen Gestaltwandel, noch eine Aggregation der Thrombozyten in plättchenreichem Plasma (siehe Abb. 4.4, Abschnitt 4.1.1). Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen thrombozytenaktivierenden Eigenschaften der atheromatösen Plaquehomogenate verschiedener Patienten wurden im Folgenden weiter analysiert.

Auf Grund der Tatsache, dass das Plaquehomogenat eines Patienten nicht immer die gleiche, sondern eine variierende Thrombozytenaktivierung im PRP verschiedener Probanden induzierte (Daten nicht gezeigt), stellte sich eingangs die Frage, ob die Aktivität der einzelnen Plaquematerialien möglicherweise von der Konzentration der Thrombozyten im PRP abhängen könnte. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde zunächst die Aktivität von 3 zuvor als inaktiv und schwach aktiv beschriebenen atheromatösen Läsionen mit dem PRP unterschiedlicher Probanden, welches je nach Proband eine variierende Plättchenzahl besaß, analysiert (Abb. 4.43). Die Horm<sup>®</sup>-Kollagen-stimulierte Thrombozytenaktivierung wurde in diesen Experimenten vergleichend untersucht. Das fibrilläre Horm<sup>®</sup>-Kollagen ( $1,25\text{ }\mu\text{g/ml}$  und  $2,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) induzierte nahezu unabhängig von der Konzentration der Thrombozyten im PRP der verschiedenen Probanden eine relativ starke Plättchenaggregation von 72 bis 91% Lichttransmission ( $n=1$ ) (Abb. 4.43). Nur bei sehr geringen Thrombozytenzahlen von  $100.000$  Blutplättchen/ $\mu\text{l}$  PRP war die Aktivierung der Plättchen mit 54% Lichttransmission ( $n=1$ ) niedriger. Das erste der 3 analysierten atheromatösen Plaquehomogenate, „AP inaktiv 1“, war unabhängig von der Blutplättchenzahl (bis zu  $680.000$  Thrombozyten/ $\mu\text{l}$  PRP) und auch unabhängig von der Plaquekonzentration (bis zu  $2,5\text{ mg Feuchtwicht/ml}$ ) nicht in der Lage, eine Aggregation der Thrombozyten im PRP hervorzurufen. Im Gegensatz dazu war die Aktivität der Plaquehomogenate „AP inaktiv 2“ und „AP schwach aktiv“ sowohl von der

Anzahl der Blutplättchen als auch von der zugegebenen Plaquekonzentration abhängig. Beide Plaques induzierten ab einer Mindestkonzentration von ca. 200.000 bis 250.000 Thrombozyten/ $\mu$ l PRP eine Aggregation der Plättchen. Interessanterweise zeigte der „AP schwach aktiv“ (1,25 mg Feuchtgewicht/ml) bei hohen Thrombozytenkonzentrationen von mehr als 500.000 Plättchen/ $\mu$ l PRP eine verringerte Blutplättchenaggregation.

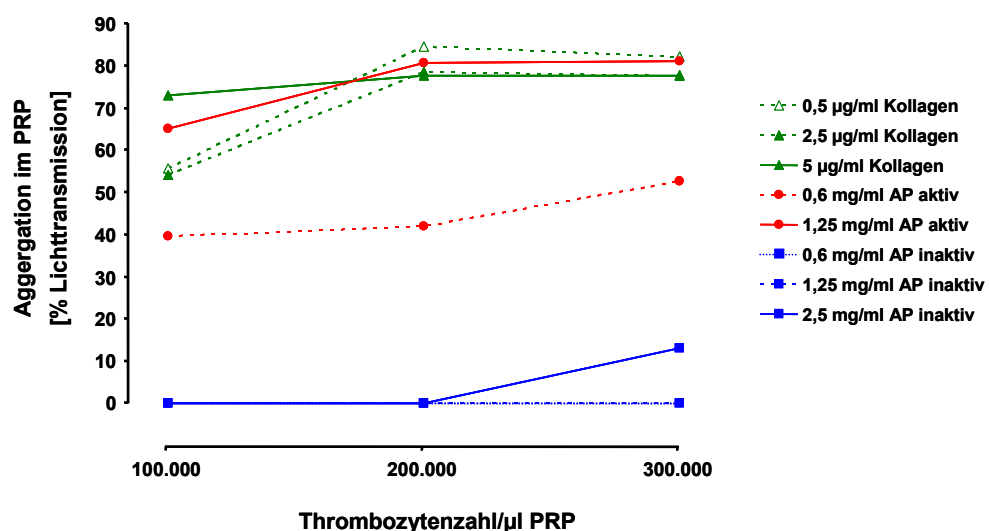


**Abb. 4.43: Abhängigkeit der Kollagen- und Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation von der Plättchenkonzentration des PRP unterschiedlicher Probanden.** Die Bestimmung der Thrombozytenzahl im Citrat-PRP 14 unterschiedlicher Probanden erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Abschnitt 3.2.3). Jede Plättchenkonzentration steht für das Citrat-PRP eines der 14 untersuchten Probanden. Horm<sup>®</sup>-Kollagen (2,5  $\mu$ g/ml) oder 2 verschiedene Konzentrationen 3 unterschiedlicher atheromatöser Plaques (AP) („AP inaktiv 1“, „AP inaktiv 2“ und „AP schwach aktiv“) wurden zum Citrat-PRP pipettiert und die Thrombozytenaggregation bestimmt. Die Aggregationswerte (% Lichttransmission; PRP = 0%, PPP = 100%) stellen die Werte je einer Messung pro Kollagen-, bzw. AP-Konzentration mit dem Citrat-PRP eines Probanden dar.

Außer der Untersuchung der Plaque-Aktivität in Abhängigkeit von der Thrombozytenzahl mit dem PRP unterschiedlicher Probanden, wurde die Thrombozytenaktivierung verursacht durch aufsteigende Konzentrationen an aktiven und inaktiven atheromatösen Plaquehomogenaten auch im PRP des gleichen Probanden analysiert, welches zuvor mit PPP so eingestellt wurde, dass sich 3 Plasmasuspensionen mit unterschiedlichen Plättchenkonzentrationen (100.000, 200.000 und 300.000 Thrombozyten/ $\mu$ l PRP) ergaben (Abb. 4.44). Horm<sup>®</sup>-Kollagen diente hierbei erneut als Vergleichsagonist der Thrombozytenaggregation, und induzierte in allen untersuchten Plättchenkonzentrationen bei einer maximalen Kollagenkonzentration von 5  $\mu$ g/ml eine maximale Thrombozytenaggregation. Niedrigere Kollagenkonzentrationen (2,5  $\mu$ g/ml und 0,5  $\mu$ g/ml) waren bei 200.000 und 300.000 Plättchen/ $\mu$ l PRP genauso aktiv wie 5  $\mu$ g/ml Horm<sup>®</sup>-Kollagen. Nur bei einer Thrombozytenzahl von 100.000 Plättchen/ $\mu$ l PRP war die durch diese Kollagenkonzentrationen stimulierte Aggregation etwas verringert. Die Thrombozytenkonzentration hatte also nur einen geringfügigen Einfluss auf die Kollagen-stimulierte Blutplättchenaktivierung.

Das Homogenat eines aktiven atheromatösen Plaques verursachte ebenso wie das Horm<sup>®</sup>-Kollagen eine Aggregation der Thrombozyten im PRP, welche unabhängig von der Plättchenkonzentration war (Abb. 4.44). Anders als bei Kollagen jedoch war die Aggregation durch die niedrige Plaquemenge (0,6 mg Feuchtgewicht/ml) bei allen Thrombozytenkonzentrationen deutlich geringer als die bei hoher Plaquemenge (1,25 mg Feuchtgewicht/ml).

Das Homogenat einer inaktiven atheromatösen Läsion konnte bis zu einer Konzentration von 1,25 mg Feuchtgewicht/ml auch bei höheren Plättchenkonzentrationen keine Aggregation der Thrombozyten induzieren. Eine hohe Konzentration des inaktiven Plauehomogenates von 2,5 mg Feuchtgewicht/ml hingegen rief bei einer hohen Plättchenkonzentration von 300.000 Thrombozyten/ $\mu$ l PRP eine geringe Aggregation hervor, und schien somit in seiner Aktivität geringfügig von der Plättchenkonzentration im PRP abhängig zu sein.



**Abb. 4.44: Abhängigkeit der Plaque- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation von der Plättchenkonzentration des PRP eines Probanden.** Aus dem Citrat-PRP eines gesunden Probanden wurden durch Verdünnen mit PPP 3 Suspensionen unterschiedlicher Thrombozytenkonzentrationen hergestellt. Aufsteigende Konzentrationen an Horm<sup>®</sup>-Kollagen oder atheromatösen Plaques (AP) (AP aktiv und AP inaktiv) wurden zum PRP pipettiert und die Blutplättchenaggregation bestimmt. Die Aggregationswerte (% Lichttransmission; PRP = 0%, PPP = 100%) stellen MW aus den Messungen mit den PRP-Verdünnungen 2 verschiedener Probanden dar.

Zusammengefasst wiesen die Ergebnisse zur Untersuchung der Bedeutung der Thrombozytenzahl für die Plaque-Aktivität darauf hin, dass die Aktivität der atheromatösen Plauehomogenate bei einer Konzentration  $\geq 200.000$  Plättchen/ $\mu$ l PRP weitgehend von der Thrombozytenkonzentration im PRP unabhängig war. In der Regel lagen die Thrombozytenkonzentrationen der in dieser Arbeit untersuchten plättchenreichen Plasmasuspensionen bei ca. 250.000 bis 350.000 Thrombozyten/ $\mu$ l PRP. Die Variation der Aggregationsaktivität des Plauehomogenates eines Patienten innerhalb des PRP verschiedener

Probanden kann also nicht auf die unterschiedliche Konzentration der Plättchen im PRP zurückgeführt werden, sondern ist nur durch eine unterschiedliche Sensitivität der Thrombozyten der verschiedenen Spender auf das Plaquematerial zu erklären.

#### **4.6.2. Vergleich von Kollagengehalt und Struktur aktiver und inaktiver atherosklerotischer Plaques**

In Abschnitt 4.2 wurden Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positive Strukturen atheromatöser Läsionen als essentiell für den „*shape change*“, die Adhäsion und die Aggregatbildung der Blutplättchen unter statischen und arteriellen Flussbedingungen beschrieben. Da die Thrombozytenzahl keinen Einfluss auf die unterschiedliche Aktivität des Plaquematerials verschiedener Patienten zu haben schien, stellte sich die Frage, ob der Gehalt an Plauekollagen wesentlich für die biologische Aktivität der einzelnen Plauehomogenate verantwortlich sein könnte. Um die Kollagenkonzentration in den Plauehomogenaten bestimmen zu können, wurde der lösliche Kollagenanteil mittels Essigsäure aus dem Plauematerial extrahiert und der Kollagengehalt der Extrakte kolorimetrisch bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.12.2). Der Kollagengehalt in % des Gesamtproteingehalts der Plauehomogenate schwankte sehr stark und betrug zwischen 2 und 79% ( $31 \pm 24\%$ ;  $MW \pm SA$ ;  $n=27$ ) (Tab. 4.2). Beim Vergleich der Kollagenkonzentrationen aktiver und inaktiver Plauehomogenate konnte keine positive Korrelation zwischen dem Kollagengehalt des Plauematerials und dessen Aktivität gefunden werden ( $y = -2,6201 x + 736,68$ ;  $R^2 = 0,1301$ ;  $r = -0,36$ ) (Abb. 4.45 und Tab. 4.2). Sowohl Plauehomogenate, welche eine Blutplättchenaggregation induzieren konnten, als auch inaktive Plaues wiesen zum Teil einen sehr hohen Gehalt an löslichem Kollagen auf.

Darüber hinaus bestand weder eine eindeutige positive, noch negative Korrelation zwischen dem Gehalt an löslichem Plauekollagen und der durch die Plauehomogenate verursachten Gerinnung, bzw. Fibrinbildung in rekalkifiziertem plättchenarmem ( $y = 0,0327 x + 482,03$ ;  $R^2 = 0,0027$ ;  $r = 0,052$ ) und plättchenreichem Plasma ( $y = 0,1075 x + 438,64$ ;  $R^2 = 0,02$ ;  $r = 0,141$ ) (Tab. 4.2). Auch der prozentuale Anteil an löslichem Kollagen des Gesamtproteingehalts der Plauehomogenate korrelierte nicht eindeutig mit der durch die Plaues hervorgerufenen Koagulation (PPP:  $y = 0,0107 x + 19,994$ ;  $R^2 = 0,0446$ ;  $r = 0,211$ ; PRP:  $y = 0,015 x + 20,487$ ;  $R^2 = 0,06$ ;  $r = 0,245$ ).



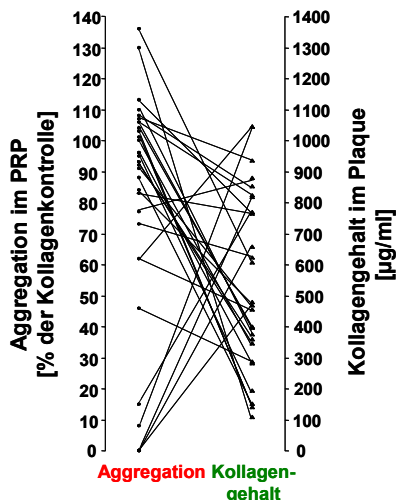
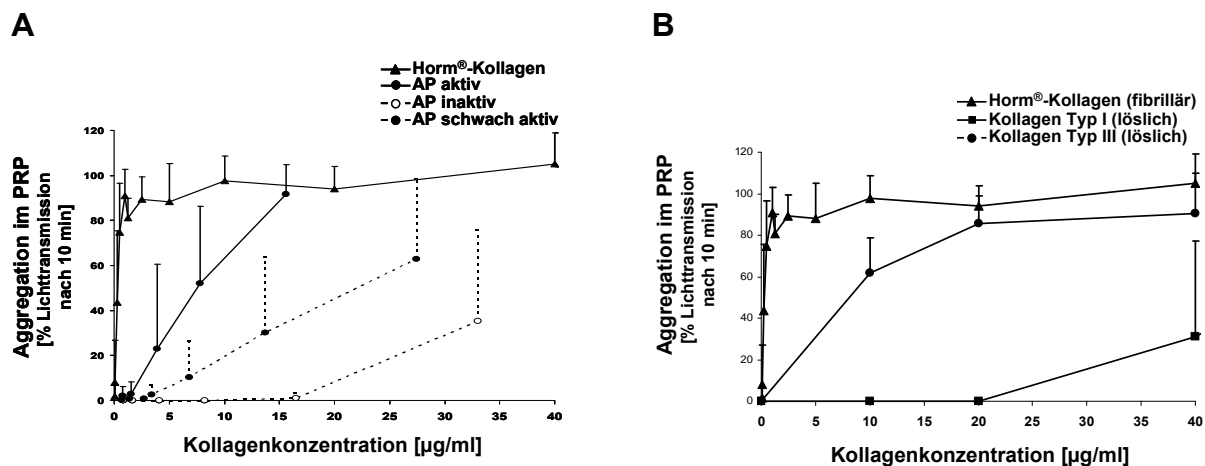


Abb. 4.45: Die thrombozytenaktivierende Eigenschaft atheromatöser Plaques korreliert nicht mit deren Gehalt an löslichem Kollagen. Plauehomogenate (1,25 mg Feuchtgewicht/ml) 29 unterschiedlicher Patienten wurden zu Citrat-PRP pipettiert und die Plaue-stimulierte Thrombozytenaggregation bestimmt. Die Aggregationswerte (% der Kollagen (2,5 µg/ml)-induzierten Aggregation) stellen MW aus 3 bis 5 Messungen im PRP verschiedener Probanden dar. Die Kollagenkonzentration der 29 verschiedenen Plauehomogenate wurde nach Essigsäure (0,5 M)-Extraktion des löslichen Kollagenanteils kolorimetrisch bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.12.2).

Tab. 4.2: Gegenüberstellung des Kollagengehalts, der Aggregation und der Gerinnung der Plauehomogenate 29 verschiedener Patienten. Das Plauekollagen ist als µg Kollagen/ml Plauehomogenat angegeben (siehe Abschnitt 3.2.12.2). Die Plaue (1,25 mg Feuchtgewicht/ml)-induzierte Thrombozytenaggregation (% der Kollagen (2,5 µg/ml)-induzierten Aggregation) stellt die MW±SA aus je 3-5 Messungen pro Plaue mit dem Citrat-PRP verschiedener Probanden dar. Die Plaue (1,65 mg Feuchtgewicht/ml)-induzierte Gerinnungszeit (sek.) stellt die MW, bzw. MW±SA aus je 1-3 Messungen pro Plauehomogenat mit dem rekalfiziertem Citrat-PPP, bzw. Citrat-PRP verschiedener Probanden dar (siehe Abschnitt 3.2.8).

	Plauehomogenat				Aggregation im Citrat-PRP [% der Kollagenkontrolle]	Gerinnungszeit im PPP/PRP [sek.]
	Feuchtgewicht [mg/ml]	Protein-konzentration [µg/ml]	Konzentration an löslichem Kollagen [µg/ml]	% Kollagen des Gesamtproteins		
AP3	50	1343	348	26	84±12	>1500/1379±340
AP5	50	467	194	42	95±16	>1500/828±279
AP10	50	1086	854	79	108±18	>1500/886±301
AP14	50	876	377	43	93±14	>1500/586±164
AP15	50	590	284	48	96±10	322±85/241±72
AP19	50	876	470	54	0±0	>1500/>1500
AP20	50	1429	660	46	0±0	>1500/922
AP22	50	2566	880	34	77±14	>1500/1481±286
AP32	50	1867	481	26	96±11	1119±191/440±40
AP34	50	2657	818	31	106±8	492±216/286±26
AP37	50	1423	1045	73	62±32	319±33/244±15
AP38	50	1350	1045	77	8±14	>1500/1219
AP39	50	1223	825	67	0±0	-
AP40	50	2069	289	14	46±45	-
AP41	50	2189	770	35	15±14	959±50/760±211
AP006	100	3143	506	16	83±10	-
AP008	100	-	360	-	100±14	-
AP009	100	-	609	-	136±41	-
AP012	100	5654	110	2	103±36	>1500/1027±348
AP013	100	5231	399	8	104±18	754±159/485±67
AP014	100	841	401	48	92±21	-
AP015	100	4445	398	9	110±39	>1500/679±137
AP016	100	6245	935	15	107±49	-
AP017	100	3054	153	5	88±18	316±127/324±53
AP019	100	4890	625	13	73±29	847±238/536±248
AP020	100	4549	457	10	91±12	1263±227/640±74
AP022	100	2984	92	3	130±10	988±188/760±211
AP023	100	2458	142	6	101±9	290±244/244±73
AP024	100	3913	766	20	113±27	704±34/510±122

Da keine positive Korrelation der Thrombozytenaggregation und des Gehalts an löslichem Kollagen der Plaques verschiedener Patienten gefunden werden konnte, wurde im Folgenden die Dosis-Wirkungsbeziehung des Kollagengehalts 3 unterschiedlicher Plaquehomogenate („AP aktiv“, „AP schwach aktiv“, „AP inaktiv“) und der Plättchenaggregation genauer analysiert. In Abb. 4.46 ist die Aggregation der Thrombozyten durch ansteigende Konzentrationen eines inaktiven, eines schwach aktiven und eines stark aktiven Plaquehomogenates in Abhängigkeit der Plaquekollagenkonzentration dargestellt.



**Abb. 4.46: Vergleich der Plaque- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaktivierung in Abhängigkeit von der Kollagenkonzentration.** A) Aufsteigende Konzentrationen von Horm®-Kollagen oder von 3 unterschiedlich aktiven Plaquehomogenaten (AP) wurden zu Citrat-PRP pipettiert und die Thrombozytenaggregation für 10 min bei 37°C im Aggregometer bestimmt. B) Aufsteigende Konzentrationen an fibrillärem Horm®-Kollagen, löslichem Kollagen Typ I oder löslichem Kollagen Typ III wurden zu Citrat-PRP pipettiert und die Thrombozytenaggregation für 10 min bei 37°C gemessen. Die Aggregationswerte (% Lichttransmission nach 10 min; PRP = 0%, PPP = 100%) stellen die MW±SA aus 3 bis 6 Messungen mit dem Citrat-PRP unterschiedlicher Probanden dar.

Ab einer Plaquekollagenkonzentration von ca. 15 µg/ml (entspricht einer Plaquekonzentration von ca. 2,5 mg Feuchtgewicht/ml) war auch die inaktive atheromatöse Läsionen in der Lage, eine geringfügige Aggregation der Thrombozyten zu erzielen (Abb. 4.46 A). Das schwach aktive Plaquehomogenat rief bereits ab einer Plaquekollagenkonzentration von ca. 5 bis 10 µg/ml (entspricht einer Plaquekonzentration von ca. 0,8-1,6 mg Feuchtgewicht/ml) eine Plättchenaggregation hervor. Bei dem stark aktiven Plaquehomogenat reichten bereits weniger als 5 µg/ml zugegebenes Plaquekollagen (entspricht einer Plaquekonzentration < 0,8 mg Feuchtgewicht/ml) aus, um die Plättchen zu aktivieren. Der Gehalt eines Plaquehomogenates an löslichem Kollagen schien folglich also zumindest in diesen Versuchen negativ mit dessen thrombozytenstimulierender Aktivität zu korrelieren. Obwohl manche individuelle inaktive Plaques auch einen hohen Gehalt an löslichem Kollagen aufwiesen, zeigte das Verhältnis des Gehalts an löslichem Kollagen und der Thrombozytenaktivierbarkeit der Plaques der einzelnen Patienten keine eindeutige negative Korrelation ( $y = -2,6201 x + 736,68$ ;  $R^2 = 0,1301$ ;  $r = 0,36$ ).

Darüber hinaus bestand auch zwischen dem prozentualen Anteil an löslichem Kollagen des Gesamtproteingehalts der Plaques und der durch die atheromatösen Läsionen induzierten Thrombozytenaggregation kein absolut klarer negativer Zusammenhang ( $y = -0,3187 x + 56,045$ ;  $R^2 = 0,2715$ ;  $r = -0,52$ ) (Tab. 4.2).

Es fiel auf, dass verglichen mit fibrillären Horm<sup>®</sup>-Kollagen, höhere Konzentrationen an löslichem Plaquekollagen zum PRP gegeben werden mussten, um eine vergleichbare Aktivierung der Thrombozyten hervorzurufen (Abb. 4.46 A). So induzierte eine Konzentration von 15 µg/ml Plaquekollagen des aktiven Plaquehomogenates eine maximale Aggregation im PRP, welche verglichen mit der zur Stimulation der maximalen Plättchenaggregation benötigten Konzentration an fibrillärem Kollagen (0,5 µg/ml) um den Faktor 30 höher war. Das fibrilläre Kollagen stellt also einen deutlich stärkeren Plättchenagonisten als das Plaquekollagen dar.

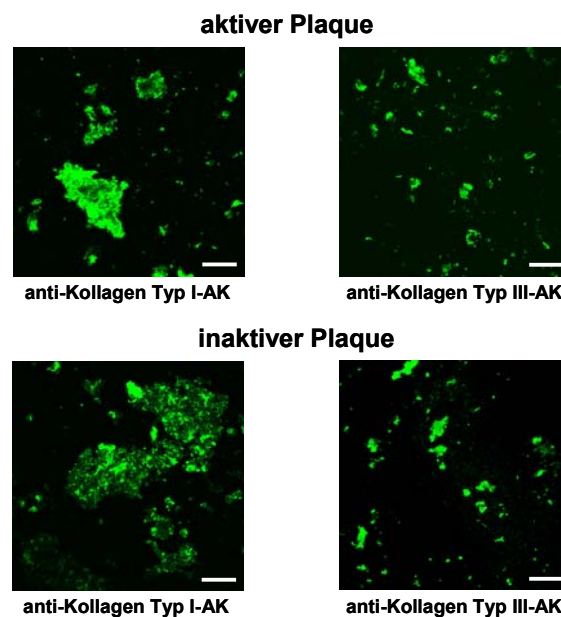
Dosis-Wirkungskurven von löslichem Kollagen Typ I und löslichem Kollagen Typ III zeigten, dass wesentlich höhere Konzentrationen dieser Kollagene benötigt wurden, um eine mit dem fibrillären Horm<sup>®</sup>-Kollagen vergleichbare Plättchenaggregation im PRP zu induzieren (Abb. 4.46 B). Auch die Kinetiken der Thrombozytenaktivierung unterschieden sich hierbei deutlich: Lösliches Kollagen Typ I (40 µg/ml) oder lösliches Kollagen Typ III (10 µg/ml) aktivierte die Plättchen nach einer Verzögerungs („lag“-)Phase von ca. 3,5 oder ca. 2,5 min nach dessen Zugabe zum PRP; fibrilläres Kollagen hingegen induzierte bereits nach weniger als 0,5 min nach dessen Zugabe zum PRP einen „shape change“, sowie die darauf folgende Aggregation der Thrombozyten. Insgesamt schien die durch das lösliche Kollagen Typ III hervorgerufene Aggregation der durch das aktive Plaquehomogenat stimulierten Plättchenaggregation ähnlich zu sein. Die Kollagen Typ I-vermittelte Aktivierung der Plättchen hingegen wies eher eine Ähnlichkeit zu dem inaktiven Plaquehomogenat auf.

Zusammengefasst ließen diese Ergebnisse vermuten, dass die Kollagenkomponenten der atheromatösen Plaques nicht die typisch fibrilläre Struktur des Horm<sup>®</sup>-Kollagens auswiesen. Viel eher glich die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation der durch lösliches Kollagen vermittelten Aggregation, welche im Vergleich zu Horm<sup>®</sup>-Kollagen ebenfalls höhere Konzentrationen benötigte, um die Blutplättchen zu aktivieren (Abb. 4.46 A und B).

Bei der morphologischen Untersuchung der löslichen Typ I- und Typ III-Kollagene mittels Immunfluoreszenz konnten in Abhängigkeit vom Beschichtungsverfahren fibrilläre Strukturen in den beiden Kollagenen visualisiert werden. Nach Beschichtung der Glasoberflächen durch Antrocknung der löslichen Kollagene bei Raumtemperatur, wurden im löslichen Kollagen Typ I eher längere und größere Kollagenfasern detektiert, welche jedoch nur äußerst selten auftraten. Im löslichen Kollagen Typ III hingegen waren bei dieser Beschichtungsmethode viele kürzere,

eher mikrofibrilläre Strukturen zu beobachten. Erfolgte die Kollagenbeschichtung der Glasoberflächen allerdings nicht durch Antrocknung bei Raumtemperatur, sondern durch eine 24-stündige Inkubation der Deckgläschen mit löslichem Kollagen bei 4°C, dann konnten keine typisch fibrillären Strukturen mittels Immunfluoreszenz detektiert werden.

Aus diesem Grund war es nun interessant, die Morphologie der kollagenpositiven Plaquestrukturen in aktiven und inaktiven Plauehomogenaten mittels Fluoreszenzmikroskopie zu vergleichen (Abb. 4. 47). Auf Grund der Tatsache, dass das gesamte Plauehomogenat für diese Untersuchungen auf die Glasoberflächen aufgebracht wurde, konnte man auch abschätzen, ob der Gesamtkollagengehalt der aktiven und inaktiven Läsionen unterschiedlich war. Auch bei diesen Untersuchungen ergaben sich weder in der Struktur der Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Plauekomponenten, noch im Gesamtkollagengehalt aktiver und inaktiver Plauehomogenate sichtbare Unterschiede (Abb. 4.47). Beide enthielten sowohl Kollagen Typ I- als auch Kollagen Typ III-positve Komponenten, welche eine vergleichbare, heterogene Morphologie aufwiesen.



**Abb. 4.47: Vergleich Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiver Strukturen aktiver und inaktiver Plaues.** Glasdeckgläschen wurden mit atheromatösen Plauehomogenaten (5 mg Feuchtgewicht/ml) beschichtet und deren Kollagenstrukturen mittels spezifischer anti-Kollagen Typ I- oder anti-Kollagen Typ III-Antikörper (AK) gefärbt. Gezeigt sind konfokalmikroskopische Fluoreszenzaufnahmen der kollagenpositiven Plauestrukturen (grün), welche eine Thrombozytenaggregation im PRP auslösen (aktiver Plaque), bzw. nicht auslösen (inaktiver Plaque). Dieses Experiment ist repräsentativ für 3 Kollagenfärbungen mit je 2 aktiven, bzw. 2 inaktiven Plauehomogenaten. Längenmaß: 50 µm.

In weiteren Experimenten wurde das Proteinprofil aktiver und inaktiver Plauehomogenate nach SDS-gelelektrophoretischer Auftrennung mittels Silberfärbung analysiert (siehe Abschnitte 3.2.12.3 und 3.2.12.4). Vergleichend dazu wurde der Kollagen Typ I-Anteil der

Plauehomogenate, welcher wie in Abb. 4.8 (siehe Abschnitt 4.2.1) gezeigt wurde einen großen Teil des Plauekollagens darstellt, nach SDS-gelelektrophoretischer Proteinauftrennung mittels Westernblot mit einem spezifischen anti-Kollagen Typ I-Antikörper untersucht (siehe Abschnitt 3.2.12.5). Kollagen Typ I ist ein fibrilläres Kollagen, dessen rechtsgängige Tripelhelix sich aus 3 linksgängigen Kollagenpolypeptidketten, den  $\alpha$ -Ketten, zusammensetzt (siehe Abschnitt 1.4.1) (Prockop *et al.*, 1995). Zwei dieser Polypeptidketten stellen die  $\alpha 1(I)$ -Ketten ( $\sim 140$  kDa) dar. Die dritte Polypeptidkette ist die  $\alpha 2(I)$ -Kette ( $\sim 130$  kDa). Mit Hilfe der gelelektrophoretischen Auftrennung des Kollagen Typ I können die beiden  $\alpha$ -Ketten, sowie  $\beta$ -Ketten (Dimere aus 2  $\alpha$ -Ketten;  $\geq 190$  kDa) und Degradationsfragmente der  $\alpha 1(I)$ - und  $\alpha 2(I)$ -Ketten nachgewiesen werden. Wie von Mattice *et al.* beschrieben, weisen SDS-Kollagenpeptid-Komplexe auf Grund ihres relativ hohen Gehaltes an Arginyl-, Histidyl- und Lysylresten häufig von ihrem wirklichen Molekulargewicht abweichende, meist geringfügig darunter liegende molekulare Massen auf (Mattice *et al.*, 1976).

Bei der Separation der Plaueproteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) traten verschiedene methodische Schwierigkeiten auf, welche vor allem darin bestanden, die Plauekollagene so zu lösen, dass diese gelelektrophoretisch aufgetrennt werden konnten. Es wurde die Zusammensetzung der Probenauftragspuffer mehrfach modifiziert und verschiedene Proteinauftrennungsverfahren, wie die native Gelelektrophorese (Ramshaw *et al.*, 1988) oder die SDS-PAGE (Laemmli, 1970), sowie Variationen innerhalb dieser Verfahren (z. B. Variationen des Polyacrylamidgehalts der Gele) miteinander verglichen. Nach mehreren fehlgeschlagenen Versuchen in denen keine erhöhte Löslichkeit der Plaueproteine in den Proben erzielt, bzw. keine Kollagenstrukturen nach Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnten, erwiesen sich die Probenaufbereitung mit einem speziellen Auftragspuffer, welcher hohe Konzentrationen an SDS, sowie Triton X-100 und Natriumdeoxycholat enthielt, und eine SDS-PAGE mit 8%igen Polyacrylamidgelen, bzw. 4 bis 20%igen Polyacrylamidgradientengelen, als das am besten geeignete Verfahren zur Auftrennung der Plaueproteine sowie zum Nachweis kollagenpositiver Strukturen in den atherosklerotischen Läsionen (siehe Abschnitt 3.2.12.3). In der in Abb. 4.48 dargestellten Silberfärbung eines SDS-Polyacrylamidgels wurden Proben von fibrillärem Horm<sup>®</sup>-Kollagen und löslichem Kollagen Typ I, sowie von aktiven und inaktiven Plauehomogenaten vor und nach dem Verdau mit bakterieller Kollagenase, aufgetragen.

Das fibrilläre Horm<sup>®</sup>-Kollagen konnte auf Grund seiner tripelhelikalen Struktur nicht mittels SDS-PAGE separiert werden (Abb. 4.48, Spur 2). Ein geringer Teil des Horm<sup>®</sup>-Kollagens durchlief zwar das 4%ige Sammelgel, konnte jedoch nicht in das 8%ige Trenngel einlaufen. Diese Bande zwischen Sammel- und Trenngel war nach der Vorbehandlung des Horm<sup>®</sup>-Kollagens mit Kollagenase nahezu verschwunden (Abb. 4.48, Spur 3).

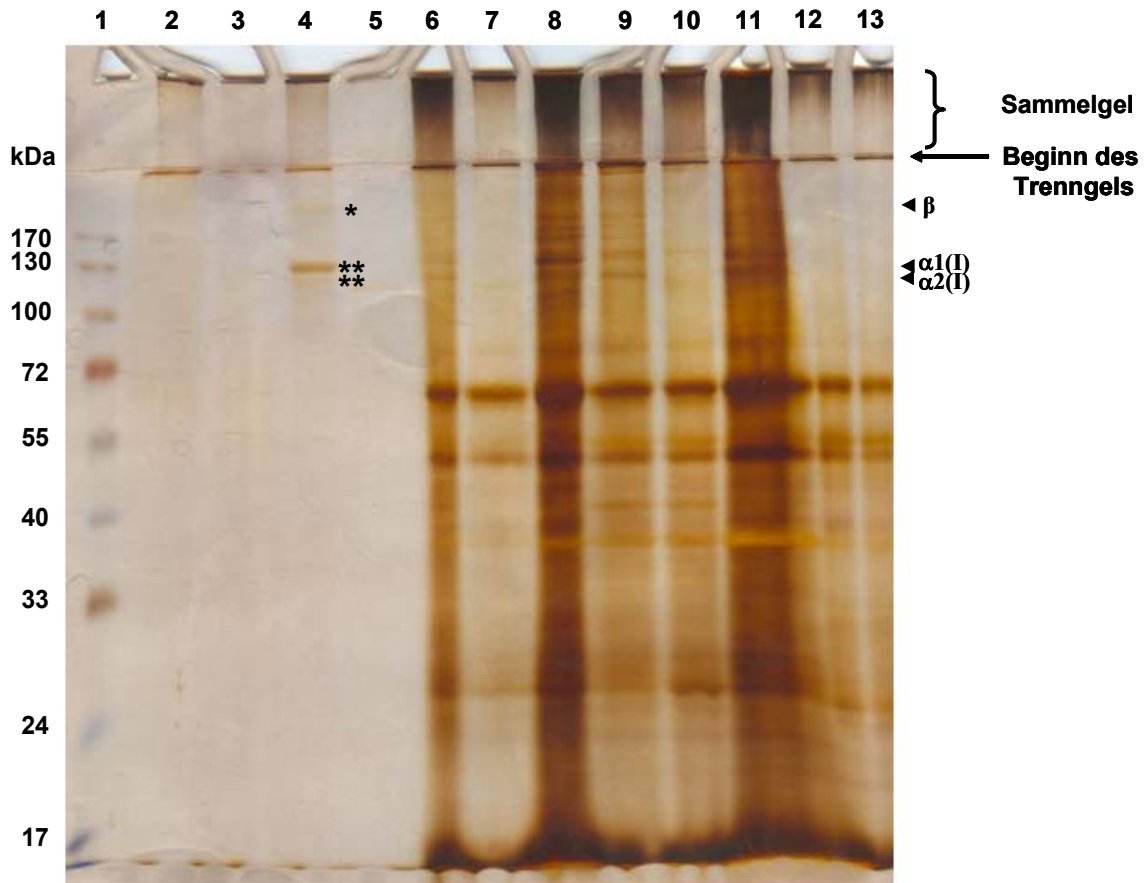


Abb. 4.48: Vergleich der Kollagenzusammensetzung und des Kollagengehalts aktiver und inaktiver Plauehomogenate, sowie von fibrillärem und löslichem Kollagen. Fibrilläres Horm<sup>®</sup>-Kollagen (~20 µg), lösliches Kollagen Typ I (~5µg), sowie 2 aktive (AP1, AP2) und ein inaktiver Plaue (AP3) (~0,7 mg Feuchtgewicht) wurden mittels SDS-PAGE (4%iges Sammel-, 8%iges Trenngel) separiert und die aufgetrennten Proteinbanden anschließend mittels Silberfärbung visualisiert. Darüber hinaus wurden den Kontrollen entsprechende Mengen der kollagenaseverdauten Ansätze der Kollagene und Plauehomogenate (AP1, AP2, AP3), sowie der durch sich wiederholende Einfrier- und Auftauzyklen und eine Langzeitlagerung bei -20°C generierten inaktivierten Formen der beiden aktiven Plaues („AP1 inaktiviert“, „AP2 inaktiviert“), welche im Gegensatz zu deren Kontrollen keine Thrombozytenaggregation mehr im PRP induzierten, auf das Gel aufgetragen. Links sind die molekularen Massen in kDa angegeben.

#### Gelspuren:

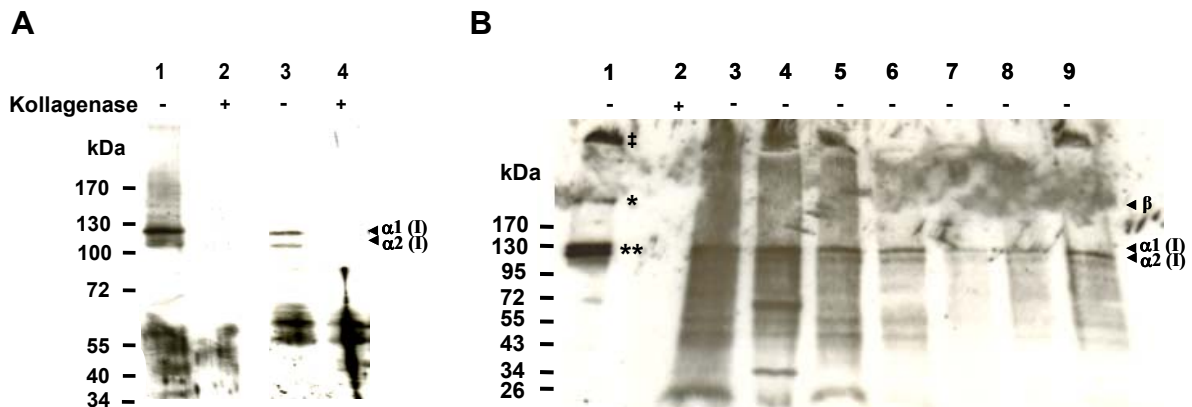
- |  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| 1. Proteinstandard                               | 6. AP1-Kontrolle (aktiver Plaue)    |
| 2. Horm <sup>®</sup> -Kollagen-Kontrolle         | 7. AP1-Kollagenaseverdau            |
| 3. Horm <sup>®</sup> -Kollagen-Kollagenaseverdau | 8. AP1 inaktiviert                  |
| 4. Kollagen Typ I-Kontrolle                      | 9. AP2-Kontrolle (aktiver Plaue)    |
| 5. Kollagen Typ I-Kollagenaseverdau              | 10. AP2-Kollagenaseverdau           |
|  | 11. AP2 inaktiviert                 |
|  | 12. AP3-Kontrolle (inaktiver Plaue) |
|  | 13. AP3-Kollagenaseverdau           |

Das lösliche Kollagen Typ I konnte im Gegensatz zum fibrillären Kollagen mittels Silberfärbung visualisiert werden (Abb. 4.48, Spur 4). Es traten hier eine Doppelbande bei in etwa 130 kDa (\*\*), welche sich vermutlich aus den beiden  $\alpha$ -Ketten,  $\alpha 1(I)$  und  $\alpha 2(I)$ , des Kollagen Typ I zusammensetzte, sowie auch eine relativ schwach sichtbare Bande bei in etwa 200 kDa (\*) auf, welche einer  $\beta$ -Kette des Kollagen Typ I entsprechen könnte. Degradationsprodukte des der  $\alpha 1(I)$ - und  $\alpha 2(I)$ -Ketten konnten nicht nachgewiesen werden. Auch beim löslichen Kollagen Typ I konnte ein Teil des Proteins wie zuvor beim Horm<sup>®</sup>-Kollagen zwar am Beginn des Sammelgels, nicht aber im Trenngel der SDS-PAGE gefunden werden, was auf das Vorhandensein hoch-molekulargewichtiger Kollagenmultimere zurückgeführt werden könnte (Savage *et al.*, 1999). Nach Kollagenase-Verdau des löslichen Kollagen Typ I wurden mittels Silberfärbung weder  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Ketten, noch kleinere Kollagenegradationsfragmente detektiert (Abb. 4.48, Spur 5).

Vergleichend zur Silberfärbung wurde nach der SDS-Gelelektrophorese ein Westernblot mit einem spezifischen anti-Kollagen Typ I-Antikörper durchgeführt (Abb. 4.49 A und B). Lösliches Kollagen Typ I konnte mit den anti-Kollagen Typ I-Antikörpern immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 4.49 B, Spur 1). Es waren hier die Doppelbande (\*\*) mit in etwa der molekularen Masse der  $\alpha 1(I)$  - und  $\alpha 2(I)$ -Ketten des Kollagen Typ I, eine Bande (\*) mit in etwa der molekularen Masse der  $\beta$ -Kette des Kollagen Typ I, sowie eine Bande (‡) am Beginn des Trenngels sichtbar. Nach dem Verdau des löslichen Kollagen Typ I mittels bakterieller Kollagenase waren diese kollagenpositiven Strukturen vollständig verschwunden (Abb. 4.49 B, Spur 2), was auf eine hohe Spezifität des eingesetzten anti-Kollagen Typ I-Antikörpers hinwies.

Die Auftrennung aktiver (AP1, AP2 und AP4) und inaktiver Plaquehomogenate (AP3) mittels SDS-PAGE und Silberfärbung, bzw. Immunoblot mit einem anti-Kollagen Typ I-Antikörper ergab folgende Ergebnisse: In den aktiven Plaques (AP1 und AP2) waren in der Silberfärbung Proteinbanden auf der Höhe der  $\alpha 1(I)$ - und  $\alpha 2(I)$ -Ketten des Kollagen Typ I schwach sichtbar (Abb. 4.48, Spuren 6 und 9). Nur ein Teil des Plaqueproteins, welches auf das Gel aufgetragen wurde, wurde separiert; ein relativ großer Teil der Plaqueproteine konnte in den Gelauftragstaschen und zwischen dem Sammel- und dem Trenngel mittels Silberfärbung detektiert werden (Abb. 4.48, Spuren 6-13). Nach Kollagenasebehandlung der aktiven Plaques (AP1 und AP2), welche durch den Kollagenverdau ihre Aggregationsaktivität verloren hatten (Daten nicht gezeigt), traten keine oder deutlich schwächere Signale auf der Höhe der  $\alpha 1(I)$ - und  $\alpha 2(I)$ -Ketten als in den Kontrollansätzen auf (Abb. 4.48, Spuren 7 und 10). Mittels Immunoblot mit einem anti-Kollagen Typ I-Antikörper konnten in den aktiven Plaquehomogenaten (AP1, AP2 und AP4) Signale mit molekularen Massen, welche in etwa den molekularen Massen der  $\alpha 1(I)$ - und  $\alpha 2(I)$ -Ketten entsprachen, detektiert werden (Abb. 4.49 A, Spuren 1 und 3; Abb. 4.49 B, Spuren 3, 5 und 7). Neben diesen beiden Signalen traten weitere

Banden in den Gelspuren der aktiven Plauehomogenate auf, welche möglicherweise Degradationsfragmente des Kollagen Typ I darstellen könnten. Nach der Kollagenasebehandlung aktiver Plaques (AP2 und AP4) konnten bis auf 2 unspezifische Proteinbanden (etwa 60 und 65 kDa) keine Kollagen Typ I-positiven Signale mehr visualisiert werden (Abb. 4.49 A, Spuren 2 und 4), was auf eine hohe Spezifität der Interaktion der Antikörper mit dem kollagenpositiven Strukturen des Plauematerials hindeutete.



**Abb. 4.49: Kollagen Typ I-Westernblot von löslichem Kollagen und aktiven, bzw. inaktiven Plauehomogenaten.** A) Zwei aktive (AP2 und AP4) Plaques (~0,7 mg Feuchtgewicht) wurden mittels SDS-PAGE (8%) separiert, und ein Westernblot mit einem anti-Kollagen Typ I-Antikörper durchgeführt. Zusätzlich wurden den Kontrollen entsprechende Mengen der kollagenaseverdauten Ansätze dieser Plaques, welche im Gegensatz zu deren Kontrollen keine Thrombozytenaggregation mehr im PRP hervorriefen, auf das Gel aufgetragen und deren Kollagen Typ I-positive Strukturen visualisiert. B) Lösliches Kollagen Typ I (~5µg), sowie 3 aktive (AP1, AP2 und AP4) und ein inaktiver Plaue (AP3) (~0,7 mg Feuchtgewicht) wurden mittels Gradientengelelektrophorese (4-20% Polyacrylamid) separiert, und ein Westernblot mit einem anti-Kollagen Typ I-Antikörper durchgeführt. Zusätzlich wurden den Kontrollen entsprechende Mengen des kollagenaseverdauten Ansatzes des löslichen Kollagen Typ I, sowie der durch sich wiederholende Einfrier- und Auftauzyklen, sowie eine Langzeitlagerung bei -20°C generierte inaktivierten Formen der 3 aktiven Plaques („AP1 inaktiviert“, „AP2 inaktiviert“, „AP4 inaktiviert“), welche im Gegensatz zu deren Kontrollen keine Thrombozytenaggregation mehr im Citrat-PRP zu induzierten, auf das Gel aufgetragen und deren Kollagen Typ I-positive Strukturen visualisiert. Links von den Westernblots sind jeweils die molekularen Massen in kDa angegeben.

#### Spuren:

- |    |                                  |    |                                     |
|----|----------------------------------|----|-------------------------------------|
| A) | 1. AP2-Kontrolle (aktiver Plaue) | B) | 1. Kollagen Typ I-Kontrolle         |
|    | 2. AP2-Kollagenaseverdau         |    | 2. Kollagen Typ I-Kollagenaseverdau |
|    | 3. AP4-Kontrolle (aktiver Plaue) |    | 3. AP1-Kontrolle (aktiver Plaue)    |
|    | 4. AP4-Kollagenaseverdau         |    | 4. AP1 inaktiviert                  |
|    |                                  |    | 5. AP2-Kontrolle (aktiver Plaue)    |
|    |                                  |    | 6. AP2 inaktiviert                  |
|    |                                  |    | 7. AP4-Kontrolle (aktiver Plaue)    |
|    |                                  |    | 8. AP4 inaktiviert                  |
|    |                                  |    | 9. AP3 (inaktiver Plaue)            |



Außer der Kollagenasebehandlung wurden die aktiven Plaquehomogenate (AP1, AP2 und AP4) durch die Kombination aufeinander folgender Einfrier- und Auftauzyklen (mindestens 3 Zyklen), sowie einer Langzeitlagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inaktiviert. Der Verlust der Aggregationsaktivität dieser Plaqueproben wurde mittels turbidimetrischer Aggregationsbestimmung im PRP nachgewiesen (Daten nicht gezeigt) und die Proteine dieser Ansätze anschließend mittels SDS-PAGE separiert. Trotz der Unfähigkeit dieser Proben eine Aggregation im PRP zu induzieren, zeigten sie in der Silberfärbung (Abb. 4.48, Spuren 8 und 11) und im Westernblot mit einem anti-Kollagen Typ I-Antikörper (Abb. 4.49 B, Spuren 4, 6 und 8) ein ähnliches Proteinmuster wie ihre entsprechenden unbehandelten, aktiven Plaquekontrollen. Ein Unterschied zwischen den aktiven und durch Einfrier- und Auftauzyklen, sowie der Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  generierten inaktivierten Plaqueproben bestand jedoch nach Silberfärbung. Bei den inaktivierten Proben schien ein größerer Teil des Plaquematerials in das Gel eingelaufen zu sein (Abb. 4.48, Spuren 8 und 11).

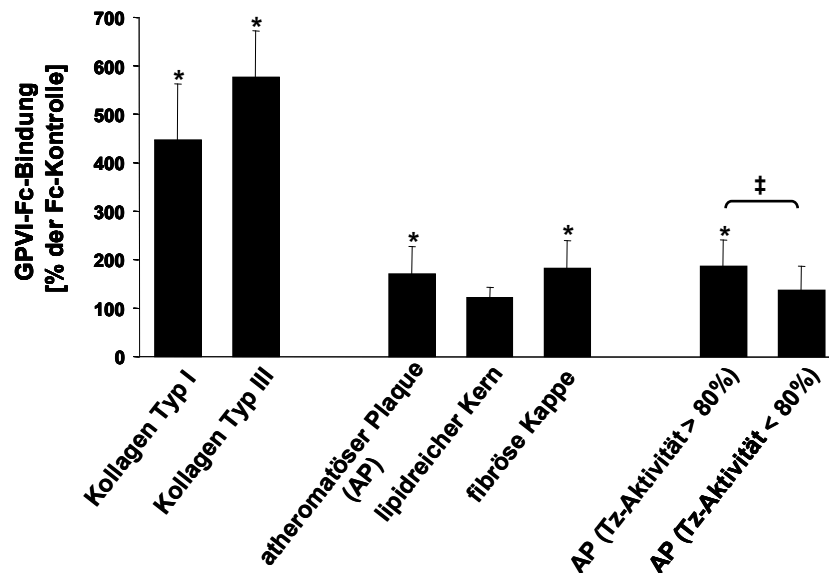
Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der Gehalt an löslichem Kollagen Typ I-positivem Plaquekollagen, bzw. an  $\alpha 1(\text{I})$ - oder  $\alpha 2(\text{I})$ -Ketten, die Aktivität des Plaquematerials nicht beeinflusst. Ein von vornherein inaktiver Plaque (AP3) wies im Westernblot mit dem anti-Kollagen Typ I-Antikörper ebenfalls Signale, welche der molekularen Masse der  $\alpha 1(\text{I})$ - oder  $\alpha 2(\text{I})$ -Ketten des Kollagen Typ I entsprachen, auf (Abb. 4.49 B, Spur 9).

### **4.6.3. Korrelation von Plaque-Aktivität und Glykoprotein VI-Bindung**

In Abschnitt 4.3 wurde der thrombozytäre Kollagenrezeptor GPVI als einer der wichtigsten Vermittler der Plaque-induzierten Thrombozytenaktivierung beschrieben. Im Folgenden stellte sich nun die Frage, ob die Aktivität der atheromatösen Läsionen möglicherweise mit deren Fähigkeit GPVI zu binden korreliert. In Zusammenarbeit mit Dr. Christian Schulz (Herzzentrum München, München, Deutschland) wurde daher die Bindung des rekombinanten GPVI-Proteins (GPVI-Fc) (Massberg *et al.*, 2004) an immobilisierte Plaquehomogenate mittels eines enzymgekoppelten Immunadsorptionsassays (ELISA) untersucht (Abb. 4.50). Lösliches Kollagen Typ I und lösliches Kollagen Typ III wurde als Referenz eingesetzt. Zusätzlich zu den atheromatösen Plaquehomogenaten wurde die Interaktion von GPVI-Fc auch mit den Homogenaten separat präparierter lipidreicher Plaquekernregionen und fibröser Plaquekappen analysiert.

Wie in Abb. 4.50 gezeigt, konnte das rekombinante GPVI-Protein sowohl an die atheromatösen Plaquehomogenate als auch an die Homogenate der fibrösen Plaquekappen spezifisch binden, was darauf hinwies, dass GPVI mit den Kollagen enthaltenden Komponenten in atherosklerotischen Läsionen interagieren kann. Verglichen mit der Interaktion von GPVI-Fc mit löslichem Kollagen Typ I oder löslichem Kollagen Typ III war die Bindung des rekombinanten Proteins an die atheromatösen Plaquehomogenate, bzw. die fibrösen

Plauekappen allerdings gering. Im Gegensatz zur spezifischen Interaktion von GPVI-Fc mit den atheromatösen Läsionen und fibrösen Kappen konnte das rekombinante Protein nicht spezifisch an die lipidreichen Plauekernregionen binden.



**Abb. 4.50: Bindung des rekombinanten GPVI-Proteins an lösliches Kollagen und atheromatöse Plauehomogenate (AP), sowie die Homogenate lipidreicher Plauekernregionen und fibröser Plauekappen.** Die Bindung des rekombinanten GPVI-Proteins (GPVI-Fc) an lösliches Kollagen Typ I und Typ III, sowie an die Homogenate der atheromatösen Plaues (AP) 12 unterschiedlicher Patienten, der lipidreichen Plauekernregionen 7 unterschiedlicher Patienten und der fibrösen Plauekappen 4 unterschiedlicher Patienten wurde wie folgt mittels ELISA bestimmt. Das Kollagen (1 µg) oder das Plauematerial (je 0,15 mg Feuchtgewicht) wurde in Zellkulturschälchen immobilisiert und unspezifische Bindungsstellen über Nacht bei 4°C mit Rotiblock abgesättigt. Anschließend wurden die Proben für 1 h bei RT mit GPVI-Fc (20 µg/ml in PBST) oder der gleiche Menge an Fc-Kontrolle inkubiert. Nachdem der Fc-Teil des rekombinanten GPVI, bzw. der Fc-Kontrolle durch Inkubation (1 h bei RT) mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten anti-Fc-Antikörper (1:10.000) gebunden wurde, wurde das Meerrettichperoxidase-Substrat „BM Blue POD Substrate“ zugegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) gestoppt und der Umsatz des Substrates bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Die Bindung von GPVI-Fc ist in % der Bindung der Fc-Kontrolle angegeben. Die Werte im Balkendiagramm stellen die MW±SA aus 3 Messungen mit Kollagen TypI/III, 28 Messungen mit den 12 AP-Homogenaten, 15 Messungen mit den 7 lipidreichen Kernregionen und 9 Messungen mit den 4 fibrösen Plauekappen dar. Rechts im Balkendiagramm sind die % GPVI-Fc-Bindung der 12 AP-Homogenate getrennt nach deren Thrombozyten (Tz)-aktivierenden Eigenschaften (Tz-Aktivität >, bzw. < 80% der Kollagen (2,5 µg/ml)-induzierten Aggregation) im Citrat-PRP dargestellt. \* p < 0,05 für Kollagen Typ I/III, AP, fibröse Kappe und AP (Tz-Aktivität > 80%) versus Fc-Kontrolle; ‡ p < 0,05 für AP (Tz-Aktivität > 80%) vs. AP (Tz-Aktivität < 80%).

Die in diesen Experimenten analysierten atheromatösen Plaues von 12 verschiedenen Patienten wiesen eine unterschiedliche thrombozytenaktivierende Aggregationsaktivität im PRP auf (Tab. 4.3), welche wie in Abschnitt 4.6.2 dargestellt nicht auf deren unterschiedlichen Gehalt an löslichem Kollagen zurückgeführt werden konnte. Aus diesem Grund wurde

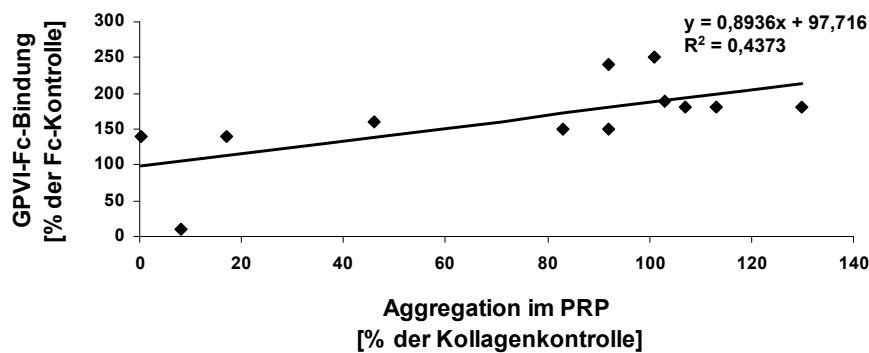
untersucht, ob die Plaque-Aktivität dieser atheromatösen Läsionen möglicherweise mit deren Bindung an das rekombinante GPVI-Protein korreliert.

**Tab. 4.3: Gegenüberstellung der thrombozytären Aktivität und der Bindung des rekombinanten GPVI-Proteins (GPVI-Fc) von die atheromatösen Plaques (AP) 12 unterschiedlicher Patienten.** Die Plaque (1,25 mg Feuchtgewicht/ml)-induzierte Thrombozytenaggregation der 12 verschiedenen AP-Homogenate wurde im Citrat-PRP mittels turbidimetrischer Aggregationsmessung bestimmt. Die Aggregationswerte (% der Kollagen (2,5 µg/ml)-induzierten Aggregation) stellen MW, bzw. MW±SA aus 2 bis 5 Messungen mit dem PRP verschiedener Probanden dar. Die Untersuchung der Bindung von GPVI-Fc (% Bindung der Fc-Kontrolle) an das Plaquematerial wurde wie in Abb. 4.48 beschrieben durchgeführt. Die Werte stellen die MW aus einer bis 3 Messungen pro Plauehomogenat dar.

Plauehomogenat	Aggregation im Citrat-PRP [% der Kollagenkontrolle]	GPVI-Fc-Bindung [% der Fc-Kontrolle]
AP20	0±0	140
AP38	8±14	10
AP39	17±28	140
AP40	46±45	160±80
AP006	83±10	150±40
AP010	92	150
AP014	92±21	240
AP016	100±15	180
AP023	101±9	250±70
AP012	103±36	190
AP024	113±27	180±60
AP022	130±10	180±60

Zwischen der Plaque-Aktivität und der Bindung von GPVI-Fc an das Plaquematerial konnte eine positive, jedoch eher nur mäßige Korrelation nachgewiesen werden ( $r = 0,6613$ ) (Abb. 4.51). Ein inaktives Plauehomogenat (AP20) war ebenso wie die aktiven Plaques in der Lage, das rekombinante Protein zu binden (Tab. 4.3 und Abb. 4.51). Darüber hinaus gab es atheromatöse Läsionen (AP 38 und AP 40), welche nicht spezifisch an GPVI-Fc gebunden haben und dennoch eine Thrombozytenaggregation im PRP induzierten.

Auffällig bei diesen Untersuchungen war allerdings, dass alle stark aktiven Plauehomogenate (Tz-Aktivität > 80%;  $n = 8$  AP) mit  $186 \pm 56\%$  Bindung der Fc-Kontrolle (MW±SA;  $n=19$ ) eine signifikant höhere GPVI-Fc-Bindung aufwiesen als die schwächer oder gar nicht aktiven Plauehomogenate (Tz-Aktivität < 80%;  $n = 4$  AP), welche sich mit  $137 \pm 49\%$  Bindung der Fc-Kontrolle (MW±SA;  $n=9$ ) nicht signifikant von der Kontrolle und der Bindung von GPVI-Fc an die lipidreichen Plauekernregionen unterschieden (Abb. 4.50 und 4.51).



**Abb. 4.51: Korrelation der thrombozytären Aktivität und der Bindung des rekombinanten GPVI-Proteins (GPVI-Fc) der atheromatösen Plaques (AP) 12 unterschiedlicher Patienten.** Die Plaque (1,25 mg Feuchtgewicht/ml)-induzierte Thrombozytenaggregation der 12 verschiedenen AP-Homogenate im Citrat-PRP wurde mittels turbidimetrischer Aggregationsmessung bestimmt. Die Aggregationswerte (% der Kollagen (2,5 µg/ml)-induzierten Aggregation) stellen MW aus 2 bis 5 Messungen mit dem PRP verschiedener Probanden dar. Die Bindung von GPVI-Fc (% Bindung der Fc-Kontrolle) an das Plaquematerial wurde wie in Abb. 4.48 beschrieben bestimmt. Die Werte stellen MW aus einer bis 3 Messungen pro Plauehomogenat dar.

Zusammengefasst konnte aus den Untersuchungen zur Korrelation der Plaque-Aktivität und der Bindung des Plaquematerials an GPVI geschlossen werden, dass Plaques, welche in der Lage waren, spezifisch mit GPVI zu interagieren, eine hohe, bzw. maximale Thrombozytenaktivierung induzierten. Andererseits haben diese Experimente ebenfalls gezeigt, dass die Blutplättchen auch durch Plauehomogenate aktiviert werden können, welche eine relativ geringe, bzw. keine GPVI-Fc-Bindung zeigten. Weiterhin wies die im Vergleich zu dem atheromatösen Plauematerial sehr starke Bindung des rekombinanten GPVI-Proteins an das lösliche Kollagen Typ I und Kollagen Typ III darauf hin, dass die Höhe der GPVI-Fc-Bindung nicht mit der Plättchenaktivierung korreliert, welche nach der Stimulation mit löslichem Kollagen Typ I und Typ III geringer ausfiel als nach der Stimulation mit Plaque (siehe Abb. 4.46, Abschnitt 4.6.2).

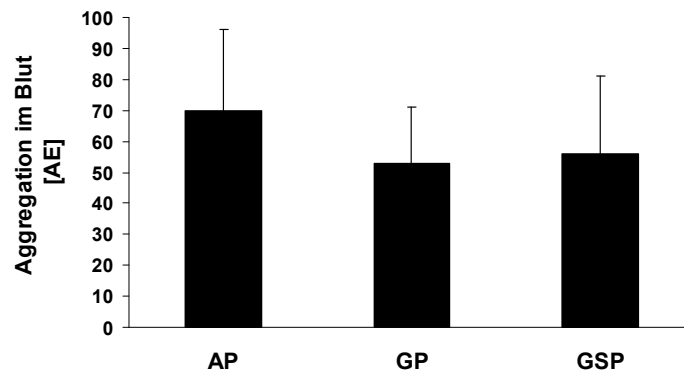
## **4.7. Resultate zur Aufbereitung und Konservierung des atherosklerotischen Plauematerials**

### **4.7.1. Plaue-Aufbereitungsmethoden und deren Einfluss auf die Plaue-induzierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung sowie die Gerinnung**

Nicht alle der in dieser Arbeit untersuchten atheromatösen Läsionen waren in der Lage, Thrombozyten zu aktivieren oder Fibrinbildung zu induzieren. Wie bereits in den Abschnitten 4.1.1, 4.1.2 und 4.6 ausgeführt, riefen die Plauehomogenate einiger Patienten weder eine Thrombozytenaggregation in plättchenreichem Plasma, noch eine Koagulation in

plättchenarmem oder plättchenreichem Plasma hervor. Da es, wie in Abschnitt 4.6.2 beschrieben wurde, möglich war, die Aktivität einiger Plaquehomogenate durch die Kombination aufeinander folgende Einfrier- und Auftauzyklen und einer Langzeitlagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zu verringern, bzw. diese ursprünglich aktiven Plaques sekundär zu inaktivieren, stellte sich die Frage, ob die Aktivität des Plaquematerials möglicherweise durch die Aufbereitung und Konservierung, bzw. Lagerung der Gewebekomponenten beeinflusst wurde. Die meisten der in dieser Studie getesteten atheromatösen Läsionen, welche als so genannte atheromatöse Plaques (Abkürzungen: A-Plaques oder AP) bezeichnet wurden, wurden nach ihrer Entnahme aus den Patienten bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert, am gleichen oder Folgetag in flüssigem Stickstoff schock gefroren und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt (siehe Abschnitt 3.2.1). Nach dem vorsichtigen Auftauen der Gewebestücke auf Eis, wurden diese mit Glaspotter und Pistill in Dialysepuffer homogenisiert und die fertigen Plaquehomogenate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Da die Möglichkeit bestand, dass sich die Zwischenlagerung des frisch aus den Patienten entnommenen Plaquematerials bei  $4^{\circ}\text{C}$  negativ auf die thrombozyten- und gerinnungsaktivierenden Eigenschaften der Läsionen auswirkte, wurde untersucht, ob die biologische Aktivität durch das sofortige Einfrieren der Plaques in flüssigem Stickstoff nach der Entnahme (siehe Abschnitt 3.2.1) eventuell besser konserviert wäre. Die auf diese Weise behandelten Plaqueproben wurden als so genannte gefrorene atheromatöse Plaques (Abkürzungen: G-Plaques oder GP) bezeichnet. Das sofortige Schockgefrieren der Läsionen schien die Plaque-stimulierte Aggregation in Hirudin-antikoaguliertem Blut zu verringern (Abb. 4.52). Die Aggregation der A-Plaques betrug  $70 \pm 26$  Aggregationseinheiten (AE) ( $237 \pm 107$  AE x min) (MW $\pm$ SA; n=13), die der sofort schock gefrorenen G-Plaques  $53 \pm 18$  AE ( $255 \pm 155$  AE x min) (MW $\pm$ SA; n=43). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Unabhängig davon bestand auch kein Unterschied des inhibierenden Effekts des anti-GPVI-Antikörpers 5C4 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) auf die Plaque-induzierte Aggregation im Hirudinblut wenn  $0,83 \text{ mg Feuchtwicht/ml}$  eines A-Plaques (92% Hemmung, n=2)- oder eines G-Plaques (94% Hemmung, n=2) als Plättchenagonist eingesetzt wurden (siehe Abschnitt 4.3.3.1).



**Abb. 4.52: Effekt verschiedener Plaque-Aufbereitungsmethoden auf die Plaque-induzierte Aggregation im Blut.** Hirudin-antikoaguliertes Blut wurde mit 0,83 mg Feuchtgewicht/ml (5  $\mu$ l der 100 mg Feuchtgewicht/ml Homogenate) Plaquehomogenat versetzt und die darauf folgende Aggregation der Thrombozyten im Multiplate<sup>®</sup>-Gerät bestimmt. Drei unterschiedliche Plaque-Aufbereitungsverfahren wurden hierbei verglichen. Die „A-Plaques“ (AP; n=5) wurden nach der Entnahme aus dem Patienten bei 4°C zwischengelagert, die „G-Plaques“ (GP; n=5) sofort schock gefroren und die „GS-Plaques“ (GSP; n=5) zusätzlich zum Schockgefrieren unter absolut sterilen Bedingungen weiterverarbeitet. Im Balkendiagramm sind die im Multiplate<sup>®</sup>-Gerät gemessenen Werte als Aggregationseinheiten (AE) angegeben und stellen die MW $\pm$ SA aus 13 Experimenten mit 5 A-Plaques, 43 Experimenten mit 5 G-Plaques und 26 Experimenten mit 5 GS-Plaques mit dem Hirudinblut verschiedener Probanden dar.

Unter arteriellen Flussbedingungen mit Scherraten von 1500 s<sup>-1</sup> war die Aggregatbildung der Thrombozyten auf mit A-Plaques- und G-Plaques-beschichteten Glasoberflächen ebenfalls vergleichbar stark (siehe Abb. 4.43, Abschnitt 4.5.1.3 für AP und Abb. 4.29, Abschnitt 4.4.2 für GP). Die Adhäsion der Blutplättchen an dem sofort schock gefrorenen Läsionen allerdings fand nicht wie zuvor an den bei 4°C zwischengelagerten Präparaten erst nach ca. 3 min (siehe Abschnitt 4.2.3), sondern schneller, nach bereits ca. 1 bis 2 min statt (Daten nicht gezeigt). Die G-Plaques schienen die Adhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen also schneller zu induzieren als die A-Plaques.

Eine weitere Modifikation der Plaque-Aufbereitungsmethode bestand darin, die atherosklerotischen Läsionen nach dem Schockgefrieren, der Lagerung bei -80°C und dem vorsichtigen Auftauen auf Eis, unter absolut sterilen Bedingungen weiter zu verarbeiten (siehe Abschnitt 3.2.1). Dieses Plaquematerial, die so genannten gefrorenen und steril behandelten atheromatösen Plaques (Abkürzungen: GS-Plaques oder GSP), war ähnlich aggregationsaktiv wie die Plaquehomogenate der beiden ersten Aufbereitungsverfahren zuvor und induzierte mit 56 $\pm$ 25 AE (248 $\pm$ 222 AE x min) (MW $\pm$ SA; n=26) eine vergleichbare Thrombozytenaggregation im Hirudinblut (Abb. 4.52).

Der auffälligste Effekt des nach der Plaque-Entnahme unmittelbar erfolgenden Schockgefrierens, im Vergleich zur Lagerung nach der Entnahme bei 4°C bestand bezüglich der Plaque-stimulierten Fibrinbildung. Sowohl die G-Plaques (Daten nicht gezeigt), als auch die GS-Plaques induzierten im Gegensatz zu den bei 4°C zwischengelagerten A-Plaques

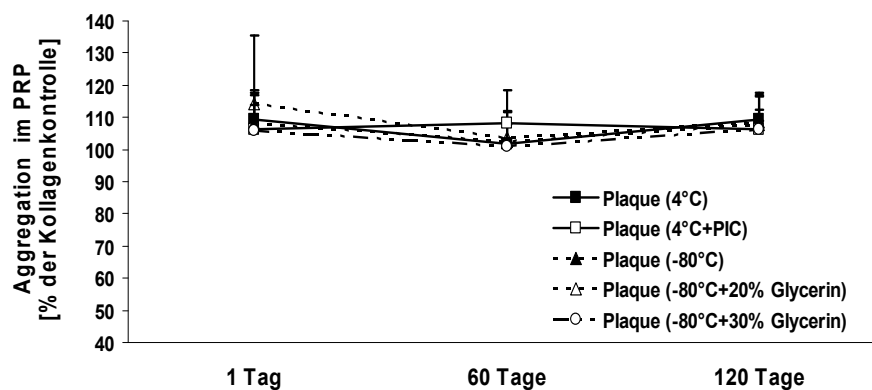
(siehe Abb. 4.7, Abschnitt 4.1.2) im PPP eine rasche Fibrinbildung ( $343 \pm 186$  sek.;  $MW \pm SA$ ;  $n=4$ ) (Abb. 4.54). Bei der durch die G- und GS-Plaques hervorgerufenen Fibrinbildung bestand darüber hinaus auch kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Gerinnungszeiten in PPP und PRP ( $339 \pm 131$  sek.;  $MW \pm SA$ ;  $n=4$ ) wie sie zuvor für die A-Plaques beobachtet wurde (siehe Abb. 4.7, Abschnitt 4.1.2). Das sofortige Schockgefrieren des frisch entnommenen Plauegewebes und die sterile Plaue-Aufbereitung wirkten sich also vor allem auf die gerinnungsaktivierenden Eigenschaften des Plauematerials positiv aus.

Abgesehen vom Effekt der Zwischenlagerung und sterilen Aufbereitung der Plaues wurden auch unterschiedliche Zusammensetzungen des Homogenisationspuffers untersucht, welche einen Einfluss auf die Haltbarkeit der Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  haben könnten. Es wurde hierbei sowohl die Zugabe eines Proteaseinhibitorcocktails, welcher die Aktivität der möglicherweise in den isolierten Plauegeweben vorkommenden proteolytischen Enzyme hemmen kann, als auch die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Glycerin, welches z. B. häufig in Gefrierpuffern zur Stabilisierung der Protein-, Zucker- und Aminosäurestruktur und somit zum Schutz vor Proteindenaturierung während des Kristallisierungsprozesses eingesetzt wird, vergleichend analysiert. Abgesehen von der Langzeitlagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wurde ein Teil eines jeden Plauehomogenates nicht schock gefroren, sondern bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und dessen Aktivität überprüft, da bekannt war, dass z. B. Lipoproteine wie das LDL empfindlich auf ein Einfrieren reagieren und bei diesem Prozess möglicherweise degradiert werden könnten. Zur Durchführung dieser Experimente wurden Plauepräparate von 4 verschiedenen Patienten sofort nach der Entnahme unter absolut sterilen Bedingungen homogenisiert, die Homogenate in 5 gleiche Teile getrennt und auf 5 unterschiedliche Weisen (Plaue-Aufbereitungsverfahren I-V) weiter behandelt (Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3: Übersicht über verschiedene Verfahren zur Plauekonservierung und Lagerung.**

Aufbereitungsverfahren	Homogenisierung	homogenisiert in	Lagerung bei
I	steril	Dialysepuffer	$4^{\circ}\text{C}$
II	steril	Dialysepuffer + Proteaseinhibitorcockt ail	$4^{\circ}\text{C}$
III	steril	Dialysepuffer	$-80^{\circ}\text{C}$ (schock gefroren)
IV	steril	Dialysepuffer + 20% Glycerin	$-80^{\circ}\text{C}$ (schock gefroren)
V	steril	Dialysepuffer + 30% Glycerin	$-80^{\circ}\text{C}$ (schock gefroren)

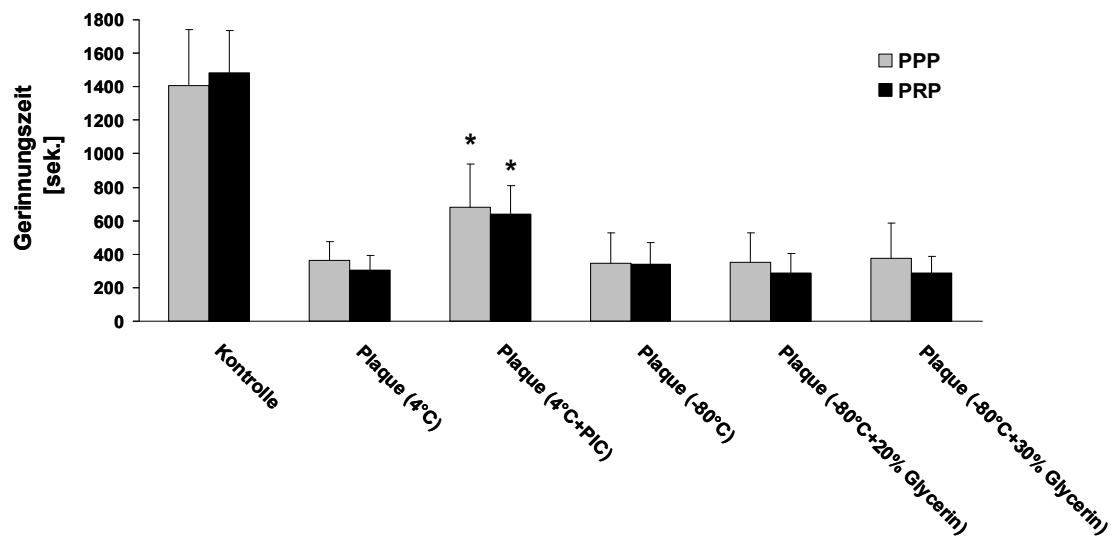
Beim Vergleich der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation im PRP ergab sich kein signifikanter Unterschied der 5 auf verschiedene Weisen aufbereiteten Plaquehomogenate (Abb. 4.53). Alle getesteten Plaquehomogenate waren einen Tag nach ihrer Herstellung in der Lage, in etwa eine vergleichbare Blutplättchenaggregation im PRP hervorzurufen. Auch nach einer Lagerzeitlagerung von 60, bzw. 120 Tagen induzierten diese auf unterschiedliche Weisen konservierten und aufbewahrten Homogenate einer atheromatösen Läsion vergleichbare Aggregationswerte im PRP.



**Abb. 4.53: Vergleich der Thrombozytenaggregation im PRP induziert durch unterschiedlich konservierte Plaquehomogenate.** Citrat-antikoaguliertes PRP wurde mit atheromatösem Plaquematerial (1,25 mg Feuchtgewicht/ml) versetzt und darauf folgend die Aggregation der Thrombozyten bestimmt. Fünf unterschiedliche Konservierungsverfahren der Plaqueprobe eines Patienten (siehe Tab. 4.4) wurden hierbei verglichen und deren thrombozytenaktivierende Eigenschaften nach einem, 60 und 120 Tagen untersucht. Im gezeigten Liniendiagramm stellen die Werte (% der Kollagen (2,5 µg/ml)-induzierten Aggregation) MW±SA aus 4 Experimenten mit den Plaquepräparaten 4 unterschiedlicher Patienten im PRP verschiedener Probanden dar. PIC = Proteaseinhibitorcocktail.

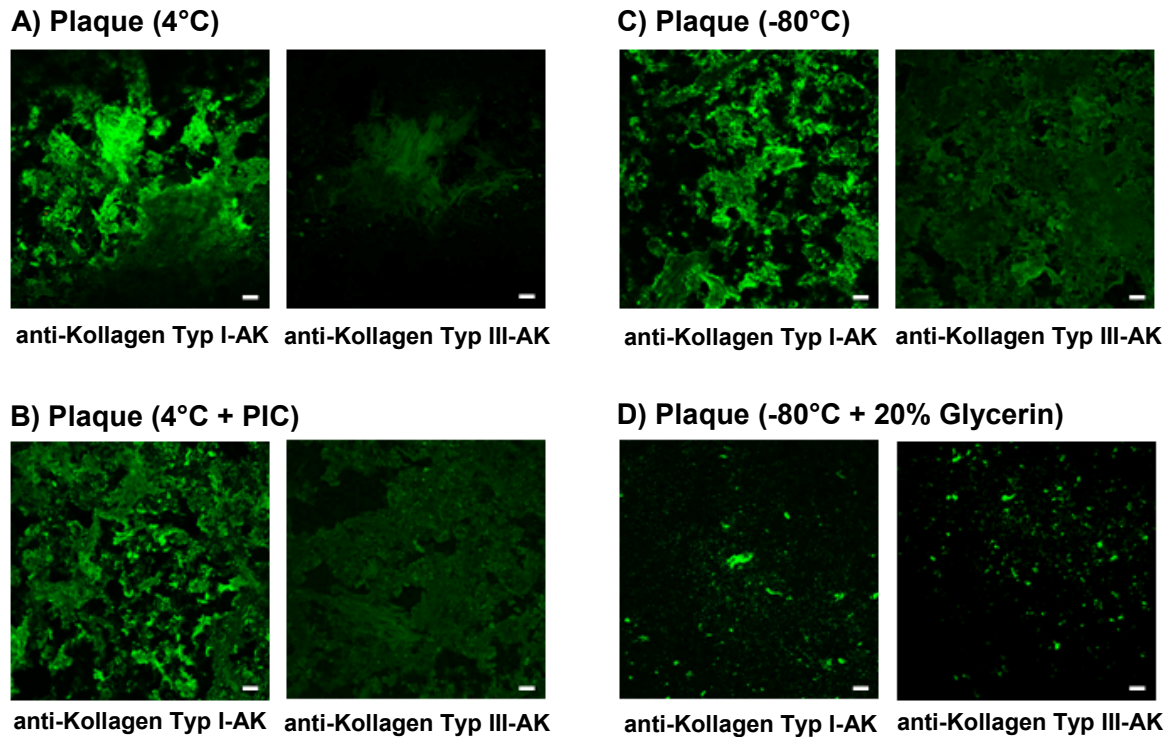
Die Auswirkung der 5 unterschiedlichen Konservierungs- und Lagerungsverfahren der Plaques wurde auch auf die Plaque-induzierte Fibrinbildung im PPP und PRP untersucht. Bis auf die Plaquehomogenate, welche bei 4°C gelagert und mit Proteaseinhibitorcocktail versetzt wurden, ergaben sich hierbei keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Plaque-stimulierten Gerinnungszeiten zwischen den einzelnen Plaqueproben (Abb. 4.54). Weder die Lagerung bei 4°C oder -80°C, noch die Zugabe von Glycerin in den Dialysepuffer veränderte die Plaque-induzierte Gerinnungszeit signifikant. Ausschließlich die Zugabe von Proteinaseinhibitoren zum Plaquematerial konnte die Zeit bis zur Fibrinbildung sowohl im PPP als auch im PRP signifikant verzögern, was durch eine Hemmung der Gerinnungsfaktoren (hauptsächlich Serinproteasen) erklärbar ist.





**Abb. 4.54: Vergleich der Fibrinbildung im PPP und PRP verursacht durch unterschiedlich konservierte Plauehomogenate.** Citrat-antikoaguliertes PPP oder PRP wurde mit 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub> und 32 µg/ml Korntrypsininhibitor versetzt und mit atheromatösem Plauematerial (1,65 mg Feuchtgewicht/ml) stimuliert. Die Zeit (in sek.) bis zum Einsetzen der Plaue-induzierten Gerinnung wurde mittels Thrombelastographie nach Rotationsprinzip im roTEM<sup>®</sup>-Gerät ermittelt. Fünf unterschiedliche Konservierungsverfahren der Plaueprobe eines Patienten (siehe Tab. 4.4) wurden hierbei verglichen. Im Balkendiagramm sind die MW±SA der Gerinnungszeiten aus 4 Experimenten mit den Plaues 4 unterschiedlicher Patienten gezeigt. PIC = Proteaseinhibitorcocktail. \* p < 0,05 für Plaue (4°C+PIC) versus Plaue (4°C; -80°C; -80°C+20%/30% Glycerin).

Abschließend wurde die Morphologie der kollagenpositiven Komponenten von einem Plaue, von welchem 5 auf verschiedene Verfahren aufbereitete und gelagerte Homogenate hergestellt wurden, miteinander verglichen (Abb. 4.55). Die Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Strukturen unterschieden sich nicht wesentlich zwischen den bei 4°C oder -80°C, bzw. mit Proteaseinhibitorcocktail versetzten Plauehomogenaten (Abb. 4.55 A, B und C). Sie zeigten alle eine starke Kollagen Typ I-positive Fluoreszenz, wohingegen die Kollagen Typ III-positiven Komponenten bei diesen Präparaten eher schwach ausgeprägt waren. Das mit 20% Glycerin versetzte und bei -80°C gelagerte Plauehomogenat hingegen zeigte als einziges ein anderes Kollagenmuster und wies deutlich kleinere Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiv, heterogene Strukturen auf (Abb. 4.55 D). Im Vergleich zu den anderen Aufbereitungs- und Lagerungsmethoden waren in diesem Homogenat insgesamt wesentlich weniger kollagenpositive Komponenten zu erkennen.



**Abb. 4.55: Vergleich Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiver Strukturen in unterschiedlich aufbereiteten Plaquehomogenaten.** Glasdeckgläschen wurden mit Plaquehomogenaten (5 mg Feuchtgewicht/ml) beschichtet, und deren Kollagenstrukturen mittels spezifischer anti-Kollagen Typ I- und anti-Kollagen Typ III-Antikörper (AK) fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Fünf unterschiedliche Konservierungsverfahren der Plaqueprobe eines Patienten (siehe Tab. 4.4) wurden hierbei verglichen. A) Bei 4°C gelagertes Plaquehomogenat. B) Mit Proteaseinhibitorcocktail (PIC) versetztes und bei 4°C gelagertes Plaquehomogenat. C) Bei -80°C gelagertes Plaquehomogenat. D) Mit 20% Glycerin versetztes und bei -80°C gelagertes Plaquehomogenat. Grün, kollagenpositive Strukturen. Längenmaß: 20 µm.

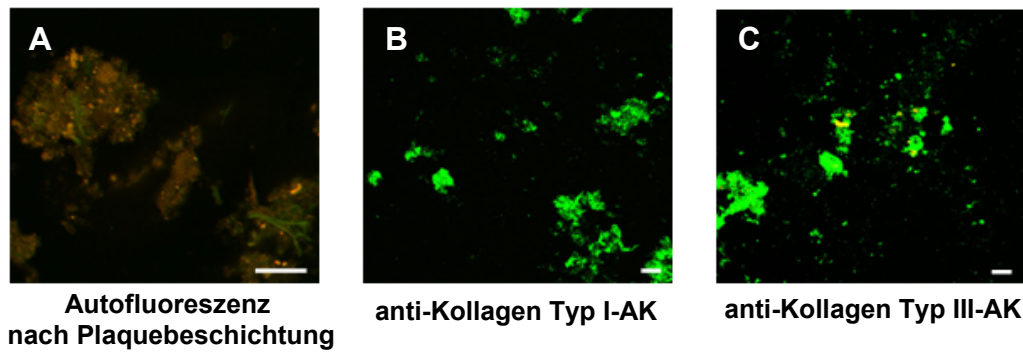
Zusammengefasst wiesen diese Ergebnisse darauf hin, dass das sofortige Schockgefrieren der frisch aus den Patienten entnommenen Plaques, sowie die sterile Weiterverarbeitung des Gewebes vor allem für die Konservierung der gerinnungsaktivierenden Eigenschaften der Plaquehomogenate wichtig war. Die aggregationsaktivierenden Eigenschaften wurden durch diese Veränderungen der Plaque-Aufbereitung jedoch nicht maßgeblich beeinflusst. Darüber hinaus brachte auch die Zugabe von Proteaseinhibitoren oder Glycerin keine Verbesserung der aggregations- und gerinnungsaktivierenden Plaque-Eigenschaften und wurde daher weggelassen.

## **4.7.2. Optimierung der Plaquehaftung auf Glasoberflächen**

### **4.7.2.1. Plaquehomogenate**

Auf Grund der Tatsache, dass Lipidkomponenten des Plaquematerials wie z. B. die Lysophosphatidsäure in der Lage sind, Thrombozyten zu aktivieren und einen Gestaltwandel hervorzurufen (Siess *et al.*, 1999; Rother *et al.*, 2003), stellte sich die Frage, ob diese Lipide auch in den auf Glasdeckgläschen immobilisierten Plaquehomogenaten enthalten sind, und die Blutplättchenadhäsion und Aggregation unter statischen Bedingungen sowie bei arteriellem Fluss beeinflussen können. Die Lipide atherosklerotischer Läsionen besitzen eine gelblich-bernsteinfarbene bis orange-rötliche Autofluoreszenz (Emissionswellenlängen: ca. 515 bis 610 nm), wenn sie bei einer Wellenlänge von 476 nm angeregt werden (Fitzmaurice *et al.*, 1989). Im Gegensatz dazu weisen Plaquematrixkomponenten wie z. B. Elastin und Kollagen bei einer Anregungswellenlänge von 476 nm eine grünliche Autofluoreszenz (Emissionsmaximum: ca. 515 bis 530 nm) auf (Fitzmaurice *et al.*, 1989; Richards-Kortum *et al.*, 1989). Die Eigenschaft der Autofluoreszenz wurde genutzt, um zu untersuchen, ob Lipide auf den mit Plaquehomogenaten beschichteten Glasoberflächen enthalten waren, und wie sich deren Lokalisation zu den Matrixstrukturen verhielt.

Eigene Versuche haben gezeigt, dass die Plaquelipide (rötlich) optimal bei einer Anregungswellenlänge von 543 nm (Emissionsfilter: 560 nm Langpassfilter; Lochblende: 270  $\mu\text{m}$ ) und die Matrixstrukturen atherosklerotischer Läsionen (grünlich) optimal bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Emissionsfilter: 505-530 nm Bandpassfilter; Lochblende: 270  $\mu\text{m}$ ) mittels Autofluoreszenz dargestellt werden konnten. Unmittelbar nach der Beschichtung der Glasdeckgläschen mit den Plaquehomogenaten wurden mittels Autofluoreszenz sowohl grünliche morphologisch heterogene, teils faserige Matrixstrukturen als auch rötliche Lipide visualisiert, welche häufig kolokalisierten (Abb. 4.56 A). Der Lipidgehalt dieser direkt nach der Plaquebeschichtung untersuchten Präparate wurde mit dem Lipidgehalt Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-gefärbter Plaquepräparate verglichen. Wie in der Abb. 4.56 B und C dargestellt ist, ging ein Teil des Plaquematerials während der Waschschrte zur Färbung der Plaquekollagenstrukturen verloren, wobei vor allem die Plaquelipide nach der Färbung der Kollagenstrukturen kaum noch detektierbar waren.



**Abb. 4.56: Vergleich der Plaquelipid- und Matrixstrukturen direkt nach der Plaqueschichtung, sowie nach dem Färben der Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Plaquelipidkomponenten.** Das Homogenat einer atheromatösen Läsion (100 mg Feuchtgewicht/ml) wurde 1:20 in Albumin (0,1%)-PBS-Puffer verdünnt, auf Deckgläschen immobilisiert und die Plaquelipid-, sowie Matrixstrukturen unmittelbar nach dem Antrocknen auf den Glasoberflächen mittels Autofluoreszenz visualisiert. Die Kollagenstrukturen des Plaquematerials wurden mittels spezifischer anti-Kollagen Typ I-/Typ III-Antikörper (AK) fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. A) Übereinanderlagerung der Autofluoreszenz der Lipide (rötlich; Anregungswellenlänge: 543 nm; Emissionsfilter: 560 nm Langpassfilter; Lochblende: 270  $\mu\text{m}$ ) und der Matrixstrukturen (grünlich; Anregungswellenlänge: 488 nm; Emissionsfilter: 505-530 nm Bandpassfilter; Lochblende: 270  $\mu\text{m}$ ) eines Plaqueschichtates unmittelbar nach der Plaqueschichtung. B) und C) Übereinanderlagerung der Kollagen Typ I (B)- und Kollagen Typ III (C)-positiven Plaqueschichtstrukturen (grün; Anregungswellenlänge: 488 nm; Emissionsfilter: 505-530 nm; Lochblende: 63  $\mu\text{m}$ ) und der Autofluoreszenz der Plaquelipide (rötlich; Anregungswellenlänge: 543 nm; Emissionsfilter: 560 nm Langpassfilter; Lochblende: 270  $\mu\text{m}$ ) nach der Kollagenfärbung der Homogenate. Dieses Experiment ist repräsentativ für 3 Experimente mit den Plaqueschichtaten 3 unterschiedlicher Patienten. Längenmaß: 20  $\mu\text{m}$ .

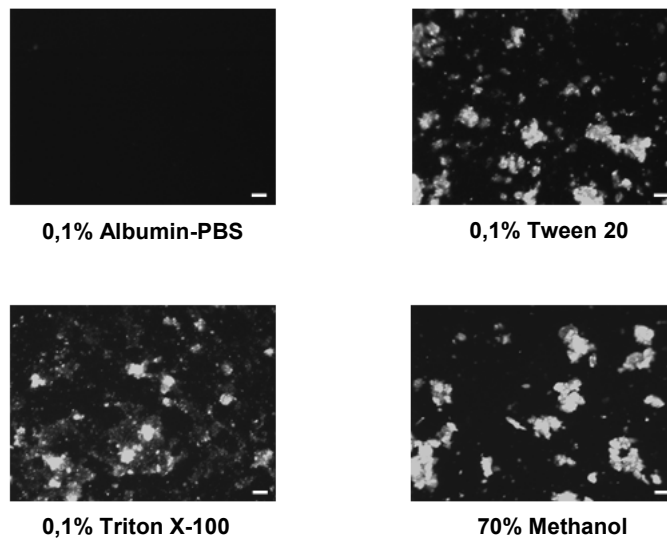
Auf Grund der Tatsache, dass wie bereits in Abschnitt 4.6.2 beschrieben wurde, kein signifikanter Unterschied im Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-Gehalt plättchenaktivierender und inaktiver Plaqueschichtate bestand, stellte sich die Frage, ob möglicherweise ein Unterschied im Gehalt an Plaquelipidkomponenten, bzw. im Verhältnis Plaquelipidkomponenten zu Plaqueschichtstrukturen aktiver und inaktiver atheromatöser Läsionen bestand. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die Matrixstrukturen und Lipidanteile aktiver, inaktiver und sekundär durch sich wiederholende Einfrier- und Auftauzyklen sowie durch eine Langzeitlagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inaktivierter Plaqueschichtate unmittelbar nach ihrer Immobilisierung auf Glasoberflächen mittels Autofluoreszenz visualisiert und miteinander verglichen (Tab. 4.4). Zusätzlich wurden auch die Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Strukturen dieser Plaqueschichtmaterialien mittels spezifischer Fluoreszenzfärbung analysiert.

Bei diesen Untersuchungen konnte kein Unterschied im Gehalt an Plaquelipidkomponenten, bzw. im Verhältnis von Plaqueschichtstrukturen zu Plaquelipidkomponenten aktiver und inaktiver oder sekundär inaktivierter Plaqueschichtate verschiedener Patienten festgestellt werden (Tab. 4.4). Der Gehalt der mittels Autofluoreszenz detektierbaren Lipidkomponenten der Plaques schien deren Aktivität demzufolge nicht zu determinieren. Darüber hinaus war in diesen Experimenten erneut kein eindeutiger Zusammenhang des Plaqueschichtgehalts an Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Strukturen und der Plaqueschichtaktivität erkennbar.

**Tabelle 4.4: Vergleich der Autofluoreszenz der Plaquelipid- und Plaquematrixkomponenten, sowie der Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Strukturen aktiver und inaktiver Plaquesomogenate.** Die Lipid- und Matrixkomponenten 2 thrombozytenaktivierender (AP aktiv 1 und 2) und 2 inaktiver (AP inaktiv 1 und 2) Plaquesomogenate, welche auf Glasoberflächen immobilisiert waren, wurden unmittelbar nach deren Antrocknen auf den Glasdeckgläschen mittels Autofluoreszenz visualisiert und deren Gehalt in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen verglichen. Die Kollagenstrukturen in diesen Homogenaten wurden mittels spezifischer anti-Kollagen Typ I-/Typ III-Antikörper gefärbt und deren Gehalt in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ebenfalls bestimmt. Zusätzlich wurde die lipid-, bzw. matrixspezifische Autofluoreszenz, sowie die Kollagen Typ I-/Typ III-spezifische Fluoreszenz von einem aktiven Plaquesomogenat, welches sekundär durch sich wiederholende Einfrier- und Auftauzyklen und eine Langzeitlagerung bei -20°C inaktiviert wurde, in dessen aktiver und inaktivierter Form verglichen.

Plaquesomogenat	Autofluoreszenz		Kollagen Typ I-Färbung		Kollagen Typ III-Färbung	
	aktiv	inaktiv	aktiv	inaktiv	aktiv	inaktiv
<b>AP aktiv 1</b>	+++ Matrix + Lipid	/	+++	/	++	/
<b>AP aktiv 2</b>	+++ Matrix +++ Lipid	/	+	/	+++	/
<b>AP inaktiv 1</b>	/	+ Matrix + Matrix	/	+	/	++
<b>AP inaktiv 2</b>	/	+++ Matrix +++ Lipid	/	+	/	+++
<b>AP aktiv/inaktiviert 1</b>	+++ Matrix +++ Lipid	+++ Matrix +++ Lipid	+++	+	+++	+++

Da nicht klar war, ob bei der Immobilisierung der Plaquesomogenate auf den Glasoberflächen auch wirklich alle Lipidkomponenten haften blieben, wurden folgende Vorversuche durchgeführt, um die Haftung des Plaquematerials und insbesondere ihrer Lipide auf den Deckgläschen zu verbessern. Die Homogenate lipidreicher Plaquekernregion, welche, wenn sie wie die Homogenate atheromatöser Läsionen zuvor in Albumin (0,1%)-PBS-Puffer verdünnt waren, verhältnismäßig schlecht auf den Glasoberflächen hafteten, wurden vor dem Auftragen auf die Deckgläschen mit verschiedenen milden Detergentien oder Methanol vermischt und deren Oberflächenhaftung anschließend mittels Autofluoreszenz überprüft (Abb. 4.57). Für diese Untersuchungen wurden die lipidreichen Plaquekernhomogenate mit Triton X-100 (0,1%), Tween 20 (0,1%) oder Methanol (70%) versetzt, durch Antrocknung auf Glasoberflächen immobilisiert und im Anschluss daran das Plaquematerial mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert (Abb. 4.57). Die Zugabe aller 3 Substanzen verbesserte die Haftung des Plaquematerials auf Glas im Vergleich zur Kontrolle (Albumin (0,1%)-PBS-Puffer) merklich.



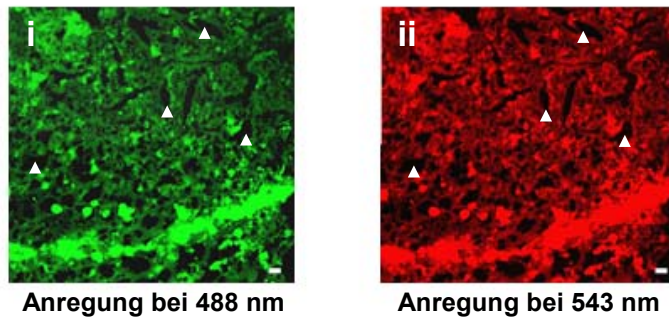
**Abb. 4.57: Optimierung der Haftung eines lipidreichen Plaquekernhomogenates nach Vorbehandlung mit verschiedenen Detergentien und organischem Lösungsmittel.** Das Homogenat des lipidreichen Plaquekerns (50 mg Feuchtgewicht/ml) eines Patienten wurde 1:10 in Albumin (0,1%)-PBS-Puffer, sowie in Triton X-100 (0,1%)-, Tween 20 (0,1%)- oder Methanol (70%)-enthaltenden Albumin (0,1%)-PBS-Puffer verdünnt und mittels Antrocknung auf Glasdeckgläschen immobilisiert. Nach einem Waschschriff mit PBS und der Einbettung der Proben mit Moviol wurde das auf den Oberflächen haftende Plaquematerial mittels Autofluoreszenz (optimale Anregungswellenlänge zur Darstellung der Plaque lipide: 543 nm; Emissionsfilter: 560 nm Langpassfilter; Lochblende: 270  $\mu\text{m}$ ) visualisiert. Längenmaß: 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.7.2.2. Plaqueschnitte

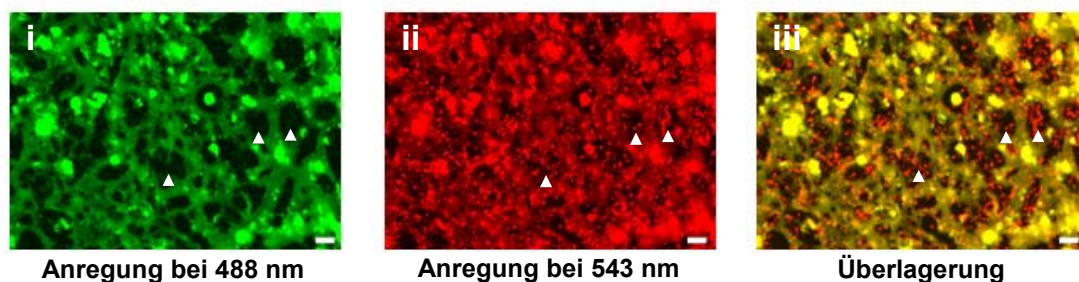
Während des Vorgangs des Homogenisierens wird die Struktur des Plauegewebes zerstört und die Konzentration der Plauebestandteile durch die Zugabe von Puffer verdünnt. Um diese Veränderungen des Plauematerials zu umgehen, wurden in den folgenden Experimenten Plaueschnitte untersucht. Hierfür wurden in ersten Versuchen Gefrierschnitte schock gefrorener Plauepräparate mit Hilfe eines Cryomikrotoms hergestellt und durch Antrocknung auf Glasdeckgläschen aufgebracht. Um die Haftung der Cryoschnitte auf den Glasoberflächen zu verbessern wurden die Deckgläschen zuvor mit Denhardt's-Lösung beschichtet (siehe Abschnitt 3.2.10). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Plauegefrierschnitte mittels Autofluoreszenz konnten sowohl Matrixkomponenten als auch Lipidstrukturen in den Plaueschnitten visualisiert werden (Abb. 4.58 A). Die Matrix- und Lipidkomponenten waren hierbei bei beiden untersuchten Wellenlängen, 488 nm und 543 nm, sichtbar, da die jeweilige Autofluoreszenz auf Grund der relativ großen Dicke sowie der Koloalisation der Lipid- und Matrixstrukturen des Plaueschnittes sehr intensiv war. Darüber hinaus war auch zu beobachten, dass die beschichtete Glasoberfläche nicht durchgängig mit dem Plauecryschnitt belegt war, sondern Lücken ( $\Delta$ ) in den Präparaten auftraten, welche vermutlich auf das Beschichtungsverfahren zurückzuführen waren. Zusätzlich zur Autofluoreszenz der Plauegefrierschnitte wurde auch das Anhaften von Plättchen an diesem Material analysiert. Suspensionen gewaschener Thrombozyten wurden hierfür auf die mit Plauecryschnitten beschichteten Glasdeckgläschen aufgebracht und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die Präparate wurden fixiert, permeabilisiert und das thrombozytäre F-Aktin mittels fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt (siehe Abschnitt 3.2.9.3). Die Autofluoreszenz der Plaquematrix- und Lipidstrukturen, sowie die spezifische Fluoreszenz des thrombozytären F-Aktin wurden im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch detektiert (Abb. 4.58 B).

### A) Plaqueschnitt



### B) Plaqueschnitt + Thrombozyten



**Abb. 4.58: Untersuchung der Autofluoreszenz von Plaqueschnitten, sowie der Thrombozytenadhäsion und Aggregation an Gefrierschnitten atheromatöser Läsionen.** Ein atheromatöser Plaque wurde mittels Cryomikrotom in serielle Schnitte zerteilt und die Gefrierschnitte durch Antrocknung auf Denhardt's-beschichteten Glasdeckgläsern immobilisiert (siehe Abschnitt 3.2.10). A) Autofluoreszenz eines Plauegefrierschnittes bei Anregungswellenlängen von 488 nm (Emissionfilter: 505-530 nm Bandpassfilter; Lochblende: 270  $\mu\text{m}$ ) und 543 nm (Emissionsfilter: 560 nm Langpassfilter; Lochblende: 270  $\mu\text{m}$ ).  $\Delta$  zeigt die Lücken der Plauebeschichtung, in welcher die Denhardt's-Schicht der Glasoberfläche freiliegt. B) Suspensionen gewaschener Thrombozyten (40.000/ $\mu\text{l}$ ) wurden auf eine mit einem Plauegefrierschnitt beschichtete Oberfläche aufgebracht und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Präparat fixiert, permeabilisiert und einer Färbung des thrombozytären Aktinzytoskeletts mittels fluoreszenzmarkiertem Phalloidin unterzogen. Mittels Autofluoreszenz wurden durch Anregung bei 488 nm vornehmlich die Matrixstrukturen (i) und durch Anregung bei 543 nm vornehmlich die Lipidkomponenten (ii) des atherosklerotischen Plaues visualisiert. Die Phalloidinfluoreszenz (ii und iii) des thrombozytären Aktinzytoskeletts wurde bei einer Wellenlänge von 543 nm (Emissionsfilter: 560 nm Langpassfilter; Lochblende: 63  $\mu\text{m}$ ) detektiert und mit der Matrix- und Lipidaufuoreszenz des Gefrierschnittes überlagert (iii).  $\Delta$  zeigt die Lücken der Plauebeschichtung, in welcher die Denhardt's-Schicht der Glasoberfläche freiliegt (i), sowie die an diese Denhardt's-behandelte Glasoberfläche adhärenenten Thrombozyten in den Plauemateriallücken (ii und iii). Längenmaß: 50  $\mu\text{m}$ .

Es ergab sich allerdings ein Problem bei der Untersuchung der statischen Plättchenadhäsion an den Gefrierschnitten, da die Thrombozyten trotz dem Abblocken der unspezifischen Bindungsstellen auf der Glasoberfläche mittels Albumin (0,5%)-PBS-Inkubation über Nacht nicht nur an das Plauematerial, sondern auch an das in den Zwischenräumen des

Plaquematerials freigelegte Denhardt`s-behandelte Glas ( $\Delta$ ) und somit unspezifisch gebunden haben (Abb. 4.58 B). Kontrollexperimente nur mit Denhardt`s-beschichteten Glasdeckgläschen haben ebenfalls gezeigt, dass gewaschene Thrombozyten unter statischen Adhäsionsbedingungen an diese Oberflächen anhaften konnten (Daten nicht gezeigt), so dass auf diese Weise vorbehandelte Plaquecryoschnitte nicht zur Analyse der statischen Plättchenadhäsion geeignet zu sein schienen.



## **5. Diskussion**

### **5.1. Einfluss der Plaque-Aufbereitung und –Konservierung auf die Thrombozytenaktivierung**

Verschiedene Aufbereitungsmethoden der atheromatösen Läsionen und deren Einfluss auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation in PRP und Blut, sowie auf die Fibrinbildung in PPP und PRP wurden miteinander verglichen. Modifikationen der Konservierung des Plaquematerials im Vergleich zu der ursprünglich verwendeten Plaque-Aufbereitungsmethode (atheromatöse Plaques; Abkürzungen: A-Plaques oder AP; siehe Abschnitt 3.2.1) wie das Schockgefrieren der atheromatösen Läsionen unmittelbar nach chirurgischer Entnahme aus dem Patienten (gefrorene atheromatöse Plaques; Abkürzungen: G-Plaques oder GP; siehe Abschnitt 3.2.1) und die anschließend komplett steril erfolgende Aufbereitung der Plaques während der Homogenisierung (gefrorene und steril aufbereitete atheromatöse Plaques; Abkürzungen: GS-Plaques oder GSP; siehe Abschnitt 3.2.1) zeigten hierbei keinen signifikanten Einfluss auf die durch atheromatöse Läsionen stimulierte Plättchenaggregation im PRP. Die Plaque-vermittelte Fibrinbildung wurde jedoch deutlich durch diese Variationen der Plaque-Aufbereitung beeinflusst, bzw. verbessert. Die G- und GS-Plaqueshomogenate wiesen im Gegensatz zu den A-Plaqueshomogenaten keine beschleunigte Fibrinbildung mehr im PRP verglichen mit PPP auf. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die sofort schock gefrorenen Plaqueproben mehr aktive gerinnungsstimulierende Komponenten wie z. B. den „*tissue factor*“ zu enthalten scheinen. Abgesehen vom „*tissue factor*“ könnten aber auch andere Plaquekomponenten wie z. B. in atherosklerotischen Läsionen enthaltene Kollagene oder Glykosaminoglykane verantwortlich für die erhöhte Plaque-stimulierte Fibrinbildung der G- und GS-Plaqueshomogenate sein. Es ist bekannt, dass Kollagene und Glykosaminoglykane über negativ geladene Oberflächen mit dem Gerinnungsfaktor XII, welcher kürzlich in einer Studie von Renne *et al.* als bedeutender Faktor für die Thrombusbildung beschrieben wurde, interagieren (Kontaktaktivierung) und somit über die intrinsische Koagulationskaskade die Bildung von Fibrin induzieren können (Renne *et al.*, 2005). Die prokoagulatorischen Eigenschaften von Kollagen hängen allerdings stark vom jeweiligen Kollagentyp, der verfügbaren Kollagenoberfläche sowie der Ladung des präsentierten Kollagens ab (Kawamoto *et al.*, 1990). Ob die Verstärkung der Plaque-vermittelten Fibrinbildung nun durch eine Erhöhung des „*tissue factor*“- oder des Kollagen-, bzw. Glykosaminoglykangehalts der atheromatösen Plaqueshomogenate hervorgerufen wurde, könnte in künftigen Experimenten beispielsweise durch den Vergleich der Plaque-stimulierten Fibrinbildung mit und ohne spezifischen gegen die potentiell gerinnungsaktivierenden Plaquekomponenten gerichteten Antikörpern untersucht werden.

Des Weiteren wurde der Einfluss verschiedener Zusammensetzungen des Homogenisationspuffers, mit welchem die lipidreichen atherosklerotischen Plaques verdünnt

wurden, und verschiedene Lagerungstemperaturen der fertigen Plauehomogenate auf die plättchen- und gerinnungsaktivierenden Eigenschaften der Homogenate atheromatöser Läsionen analysiert. Der ursprünglich verwendete Homogenisationspuffer enthält NaCl (150 mM), EDTA (1 mM) und das Antibiotikum Chloramphenicol (0,05% (w/v)). Das Versetzen dieses Puffers mit einem Proteaseinhibitorcocktail, welcher im isolierten Plauegewebe möglicherweise enthaltene Serin- und Cysteinproteasen sowie Aminopeptidasen inhibiert, besaß keinerlei signifikanten Einfluss auf die Plaue-induzierte Thrombozytenformveränderung und Aggregation im PRP. Die durch atheromatöse Läsionen stimulierte Fibrinbildung war in auf diese Weise aufbereiteten Plaueproben jedoch deutlich verzögert, was sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die proteolytisch wirkenden Gerinnungsfaktoren durch den Proteaseinhibitorcocktail gehemmt wurden.

Das Versetzen des Homogenisationspuffers mit verschiedenen Konzentrationen an Glycerin, welches einen häufig verwendeten Protein stabilisator in Gefrierpuffern darstellt und vor allem dem Schutz der Proteine vor Denaturierung während des Kristallisierungsprozesses beim Einfrieren dient (Sousa, 1995; Farnum *et al.*, 1999), bewirkte keinen Anstieg der Plauevermittelten Thrombozytenaktivierung und Aggregation im PRP. Darüber hinaus wurde in den mit Glycerin versetzten Plauehomogenaten mittels Immunfluoreszenz im Vergleich zu den Plauehomogenaten ohne Glycerin ein verändertes Kollagenmuster beobachtet. Es traten deutlich kleinere und weniger Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positive, heterogene Plauestrukturen auf, was darauf hindeuten könnte, dass das Versetzen der Homogenate atheromatöser Läsionen mit Glycerin die durch Antrocknung vermittelte Haftung des Plauematerials auf den Glasoberflächen verschlechtert. Um die Wirkung der vulnerablen atheromatösen Läsionen möglichst gänzlich und unverfälscht untersuchen zu können, wurden die Plaueproben daher ohne diese Zusätze homogenisiert. Auch eine Langzeitlagerung der sterilen Plauehomogenate bei 4°C und nicht bei -80°C, wie sie in der Regel in dieser Arbeit durchgeführt wurde, steigerte weder die plättchenaktivierenden, noch die gerinnungsstimulierenden Eigenschaften der atheromatösen Läsionen signifikant, so dass für die Herstellung künftiger Plauehomogenate die Methode der Plaue-Aufbereitung und Konservierung mit direktem Schockgerieren unmittelbar nach der chirurgischen Entnahme aus dem Patienten und steriler Weiterverarbeitung, sowie einer Langzeitlagerung bei -80°C beibehalten wird.

## **5.2. Etablierung eines Modells zur Analyse der Plaue-induzierten Thrombusbildung**

Obwohl antithrombozytäre Medikamente in der Praxis häufig zur Inhibition der Bildung eines intra-arteriellen gefäßverschließenden Plättchenthrombus und somit zur Verhinderung der Entstehung akuter koronarer Syndrome oder ischämischer Schlaganfälle nach der Ruptur atherosklerotischer Läsionen eingesetzt werden, ist erstaunlich wenig über den Einfluss dieser

Substanzen auf die Interaktion der Thrombozyten mit humanem Plaquematerial bekannt. Die Effekte von Plättchenhemmern werden im Allgemeinen *in vitro* nach der Stimulation humaner Thrombozyten mit definierten Plättchenstimuli wie z. B. ADP oder Kollagen, oder *in vivo* in verschiedenen Tiermodellen analysiert. Ein wirklich gutes Tiermodell zur Untersuchung der Vorgänge während, bzw. nach dem Aufbrechen einer lipidreichen vulnerablen atherosklerotischen Läsion existiert derzeit allerdings noch nicht (Cullen *et al.*, 2003). Es ist bekannt, dass die Zusammensetzung eines humanen atheromatösen Plaques stark von der Beschaffenheit der atherosklerotischen Läsionen der Tiermodelle abweicht (Cullen *et al.*, 2003). Murine Plaques beispielsweise, welche am häufigsten zur Untersuchung der Vorgänge während der Thrombusbildung nach Plaqueruptur herangezogen werden, stellen in der Regel keine typischen vulnerablen oder instabilen vorangeschrittenen atheromatösen Läsionen dar, sondern gleichen eher den frühen deutlich weniger rupturgefährdeten Stadien humaner atherosklerotischer Plaques, wie z. B. dem „fatty streak“ (Cullen *et al.*, 2003; Schwartz *et al.*, 2007). Darüber hinaus können die Thrombozyten verschiedener Tiere auch nicht auf alle in humanen atheromatösen Läsionen enthaltene plättchenaktivierende Komponenten wie z. B. die Lysophosphatidsäure reagieren, so dass die arterielle Thrombusbildung nach einer Plaqueruptur im Tiermodell auch aus diesem Grund nicht direkt mit der Thrombusbildung nach dem Aufbrechen einer humanen Läsion verglichen werden kann (Gerrard *et al.*, 1979; Schumacher *et al.*, 1979; Tokamura *et al.*, 1981). Aus diesen Gründen bestand ein Fokus dieser Arbeit darin, ein experimentelles Modell der Plaqueruptur zu entwickeln, in welchem die direkte Interaktion humaner Blutplättchen mit lipidreichem atherosklerotischem Plaquematerial beobachtet werden kann und welches somit der *in vivo*-Aktivierung der Thrombozyten nach Plaqueruptur in menschlichen Gefäßen gleichen könnte. Zu diesem Zweck wurden die Homogenate humaner atheromatöser Läsionen auf Glasoberflächen immobilisiert und im Anschluss daran in eine Parallel-Platten-Flusskammer eingesetzt. Fluoreszenzmarkierte Plättchen in Hirudin-antikoaguliertem Blut, in welchem physiologische Konzentrationen divalenter Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) vorliegen, wurden über diese Oberflächen perfundiert und die Adhäsion und Aggregatbildung der Thrombozyten dabei in Echtzeit visualisiert. Durch den Einsatz verschiedener Plättchenhemmer war es möglich, die Bedeutung einzelner thrombozytärer Rezeptoren und Botenstoffe genauer zu definieren.

Bei diesen Experimenten wurde allerdings beobachtet, dass nicht alle Plaquekomponenten gleich gut auf den Glasoberflächen immobilisiert werden konnten, und vor allem die Plaquelipide zum großen Teil während der Perfusion verloren gingen. Das Versetzen der Plaquehomogenate mit den milden Detergentien Triton X-100 und Tween 20 oder dem organischen Lösungsmittel Methanol konnte die Haftung der lipidreichen Plaquekomponenten auf den Glasoberflächen verbessern, so dass durch die Zugabe dieser Substanzen zu den Homogenaten atheromatöser Läsionen die Untersuchung des Einflusses von Lipiden, wie z. B. der Lysophosphatidsäure, auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregatbildung unter arteriellem Fluss ermöglicht werden könnte.

Zusätzlich sollte zur Optimierung des Plaquerupturmodells in zukünftigen Experimenten auch in Erwägung gezogen werden, den durch das Homogenisieren des Gewebes erzeugten Verdünnungsschritt des Plaquematerials zu umgehen und die Plättchenadhäsion direkt an auf Glasoberflächen immobilisierten Gefrierschnitten atheromatöser Läsionen zu untersuchen. Auf diese Weise könnte neben der Bedeutung einzelner thrombozytärer Rezeptoren und Metabolite auch die genaue Lokalisation der Adhäsion und Thrombusbildung innerhalb der Plaques unter Fluss erfolgen.

### **5.3. Direkte, „tissue factor“-unabhängige Thrombozytenaktivierung durch atherosklerotisches Plaquematerial – Bedeutung Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiver Plaquestrukturen**

Vorangeschrittene, lipidreiche atherosklerotische Läsionen, welche von einer dünnen fibrösen Kappe umgeben sind und eine Vielzahl inflammatorischer Zellen enthalten, sind in der Regel vulnerabel und werden als atheromatöse Plaques bezeichnet. Deren Ruptur kann zur Bildung eines gefäßverschießenden fibrin- und plättchenreichen Thrombus führen, welcher unter anderem akute Myokardinfarkte oder ischämische Schlaganfälle nach sich zieht. Von allen bisher beschriebenen prothrombogenen Plaquekomponenten wird der „tissue factor“ als eine der wichtigsten, wenn nicht sogar als die bedeutendste Thrombus-induzierende Komponente vorangeschrittener atherosklerotischer Läsionen angesehen (Ardissino *et al.*, 1997; Toschi *et al.*, 1997; Badimon *et al.*, 1999; Westrick *et al.*, 2001; Corti *et al.*, 2002b; Libby, 2002; Moons *et al.*, 2002; Viles-Gonzalez *et al.*, 2004). Gemäß diesem Modell der Plaque-stimulierten Thrombusbildung wird nach dem Aufbrechen einer atheromatösen Läsion durch den Kontakt des Plaque-„tissue factors“ mit dem Blutstrom primär die extrinsische Koagulation aktiviert und auf diese Weise die Bildung von Thrombin und Fibrin induziert. Die Blutplättchen werden durch das während der Gerinnung gebildete Thrombin aktiviert, so dass es zur Thrombozytenaggregation und schließlich zur Bildung eines gefäßverschießenden fibrin- und plättchenreichen Thrombus kommen kann. In diesem weitgehend anerkannten und verbreiteten Modell der Thrombusbildung nach Plaqueruptur wird also zunächst die Gerinnung stimuliert und erst sekundär werden nach der Bildung von Thrombin die Blutplättchen aktiviert (Corti *et al.*, 2002b; Libby, 2002; Moons *et al.*, 2002; Viles-Gonzalez *et al.*, 2004). Antikoagulantien, also Medikamente zur Hemmung der Blutgerinnung wie z. B. der direkte Thrombininhibitor Hirudin (Weitz *et al.*, 2003), würden entsprechend dieser Modellvorstellung die adäquate antithrombotische Strategie zur frühen Prävention, bzw. Therapie akuter thrombotischer Verschlüsse kardio- und cerebrovaskulärer Gefäße darstellen.

Aus früheren Studien dieser Arbeitsgruppe war bekannt, dass die im lipidreichen Kern vorangeschrittener atherosklerotischer Läsionen akkumulierte Lysophosphatidsäure den raschen Gestaltwandel („shape change“) gewaschener Plättchen stimuliert (Siess *et al.*, 1999; Rother *et al.*, 2003). Es war allerdings nicht geklärt, ob das atherosklerotische Plaquematerial über eine

direkte Interaktion mit den Thrombozyten auch deren Sekretion und Aggregation und somit die Bildung eines Plättchenthrombus unter arteriellen Strömungsverhältnissen induzieren kann. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Homogenate der atheromatösen Läsionen von mehr als 60 verschiedenen Patienten, welche sowohl lipidreiche als auch fibröse Plaquebestandteile enthielten, nicht nur den „*shape change*“ der Thrombozyten, sondern auch direkt deren Sekretion und Aggregation in Suspensionen gewaschener Plättchen stimulierten. Darüber hinaus führte die Zugabe der atheromatösen Plaquehomogenate auch in PRP und in antikoaguliertem Blut zur Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten. Die Blutplättchen waren zusätzlich auch in der Lage, unter statischen Adhäsionsbedingungen sowie unter arteriellen Flussbedingungen mit unterschiedlichen Scherraten an immobilisiertes atheromatöses Plaquegewebe zu adhären, sich an diesem Material auszubreiten und darauf folgend große Thrombozytenaggregate zu bilden. Eine Plättchenaktivierung durch Thrombin, entweder gebildet durch den Plaque-„*tissue factor*“ oder durch im Blut zirkulierenden intravaskulären oder „*blood-borne tissue factor*“, welcher ebenfalls als ein möglicher Initiator der extrinsischen Gerinnung diskutiert wird (Engelmann *et al.*, 2003; Engelmann, 2006), war unter diesen experimentellen Bedingungen ausgeschlossen. Darüber hinaus verursachte die Zugabe der Plaquehomogenate zu antikoaguliertem Blut die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Konjugaten, welche zur Aktivierung des intravaskulären „*tissue factor*“-Signalweges und somit zur Stimulierung der Koagulation beitragen können (Losche, 2005).

Unter den vielen bisher beschriebenen potentiell blutplättchenaktivierenden Komponenten atherosklerotischer Läsionen wie z. B. verschiedenen Kollagentypen, VWF, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin, Fibrinogen/Fibrin, dem SDF-1, dem Cholesterolsulfat oder der Lysophosphatidsäure (van Zanten *et al.*, 1994; Barnes *et al.*, 1999; De Meyer *et al.*, 1999; Siess *et al.*, 1999; Abi-Younes *et al.*, 2000; Merten *et al.*, 2001; Rother *et al.*, 2003), konnten in der vorliegenden Arbeit morphologisch heterogene Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positive Plaquestrukturen als die zentralen aktivierungs- und aggregationsvermittelnden Komponenten atheromatöser Läsionen identifiziert werden. Die Kollagen Typ I- und Typ III-positiven Plaquebestandteile stimulierten direkt das Anhaften und die Ausbreitung von Thrombozyten unter statischen Adhäsionsbedingungen, sowie die Plättchenadhäsion und Aggregatbildung unter Fluss.

Kollagen Typ I-positive Strukturen konnten hierbei in den Paraffinschnitten der atheromatösen Läsionen sowohl in der fibrösen Kappe, als auch im Kernbereich verschiedener Plaqueproben nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu befanden sich die Kollagen Typ III-positiven Komponenten vorrangig im Kernbereich der Plaqueschnitte. In den Plaquehomogenaten kolokalisierten die Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Strukturen miteinander. Die Unterschiede der Kollagenverteilung in den Paraffinschnitten und Homogenaten atheromatöser

Läsionen sind vermutlich auf die mechanische Prozessierung und die daraus resultierende Modifikation des Plaquematerials während der Homogenisierung zurückzuführen.

Sowohl die enzymatische Degradation des Plaquekollagens mittels bakterieller Kollagenase, als auch die kombinierte Blockade Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiver Plaquestrukturen mittels spezifischer anti-Kollagen Typ I- und anti-Kollagen Typ III-Antikörper und die gleichzeitige Blockade der beiden wichtigsten thrombozytären Kollagenrezeptoren, des GPVI und des Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , inhibierten die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion, sowie den Plaque-stimulierten Gestaltwandel und die Aggregation der Plättchen. Die getrennte Vorbehandlung des Plaquematerials entweder mit spezifischen anti-Kollagen Typ I- oder anti-Kollagen Typ III-Antikörpern hingegen konnte die Plaque-abhängige Thrombozytenaktivierung und Aggregation nur teilweise reduzieren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiv gefärbte Plaquekomponenten die wichtigsten thrombozytenaktivierenden Bestandteile lipidreicher atherosklerotischer Läsionen darstellen und eine Blockade ihrer Interaktionspartner, der thrombozytären Kollagenrezeptoren (siehe Abschnitt 5.2), möglicherweise eine vielversprechende zukünftige antithrombozytäre Strategie sein könnte.

In einer frühen Arbeit von van Zanten *et al.* wurde vermutet, dass die verglichen mit normalen, gesunden arteriellen Gefäßwänden deutlich erhöhte Thrombogenizität atherosklerotischer Läsionen mit Veränderungen in der Quantität und der Beschaffenheit des Kollagen Typ I und/oder Kollagen Typ III im Plaquematerial korrelieren könnte (van Zanten *et al.*, 1994). In dieser Studie wurde die unter Fluss (Scherraten:  $1600 \text{ s}^{-1}$ ) stattfindende Adhäsion und Aggregatbildung von Blutplättchen an den Gefrierschnitten humaner atherosklerotischer Läsionen diverser Zusammensetzungen analysiert, welche hauptsächlich *post mortem* von Personen mit unterschiedlichen Todesursachen entnommen wurden und in der Regel nicht einem typisch atheromatösen Plaque bestehend aus einem zentralen lipidreichen und/oder nekrotischen Kernbereich sowie einer dünnen fibrösen Kappe entsprachen, sondern eher heterogen in ihrer Struktur waren. Die Thrombozytenadhäsion und Aggregation erfolgte bei diesen Untersuchungen hauptsächlich in den Bereichen der Gefrierschnitte atherosklerotischer Läsionen, welche eine intensive Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiv gefärbte Plaque aufwiesen. Es traten hierbei allerdings auch intensiv Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-gefärbte Plaquebereiche auf, welche nicht von Plättchen besetzt waren, was einen Hinweis darauf lieferte, dass die Thrombogenizität der atherosklerotischen Läsionen nicht alleine mit der Kollagenquantität im Plaque zu korrelieren schien, sondern dass auch ein Zusammenhang mit der Beschaffenheit des Plaquekollagens bestehen könnte. Die Hypothese der Beteiligung von Kollagen an der durch die Plaquegefrierschnitte induzierten Plättchenadhäsion wurde darüber hinaus mittels Flussexperimenten mit dem Blut eines Patienten, welcher nur 20% der

normalen GPIa-Konzentration auf seinen Thrombozytenoberflächen trug, sowie mit dem rekombinanten Plättchenadhäsionsinhibitor „*leech anti-platelet protein*“ (r-LAPP), welcher sowohl die Bindung des Integrin  $\alpha_2\beta_1$  (GPIa/IIa) als auch die Bindung von VWF an Kollagen blockieren kann (Depraetere *et al.*, 1999), unterstützt. In den Untersuchungen mit dem Blut des Patienten dessen Thrombozyten nur 20% GPIa trugen war vor allem die Größe der Plättchenaggregate auf den Schnitten der atherosklerotischen Läsionen verringert. Bei den Flussexperimenten in welchen das Blut mit r-LAPP versetzt war trat verglichen mit der Kontrolle eine stark reduzierte Adhäsion und Aggregatbildung der Thrombozyten auf. Auf Grund des Fehlens geeigneter inhibierender Antikörper, welche die Interaktion der Plaquekollagene (anti-Kollagen Typ I-/Typ III-Antikörper) mit den Thrombozyten blockieren können, konnte in der Studie von van Zanten *et al.* allerdings nicht geklärt werden, ob beide Kollagentypen (Kollagen Typ I und Kollagen Typ III) gleichbedeutend sind oder ob einer der beiden Kollagentypen wichtiger für die Plaque-stimulierte Plättchenaktivierung und Aggregatbildung ist. Außerdem wurde auch die Beteiligung der thrombozytären Kollagenrezeptoren an der Plaque-vermittelten Thrombozytenaktivierung und Aggregation in dieser Arbeit nicht untersucht (Integrin  $\alpha_2\beta_1$ ), bzw. war nicht bekannt (GPVI).

In einer zeitgleich zu der hier diskutierten Arbeit durchgeführten Studie von Cosemans *et al.* wurde die bedeutende Rolle des Plaquekollagens sowie die des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI (siehe auch Abschnitt 5.2) für die Plaque-vermittelte Thrombozytenaktivierung und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen bestätigt (Cosemans *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen bedeutenden Funktion von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III als wichtigen Auslöser der Plaque-induzierten Plättchenadhäsion und Aggregation, zeigten Cosemans *et al.*, dass vermutlich vor allem Kollagen Typ I die entscheidende thrombozytenaktivierende Komponente in atherosklerotischen Läsionen darstellt. Bei den Untersuchungen von Cosemans *et al.* wurden allerdings nicht wie in dieser Arbeit die ganzen chirurgisch entnommenen atheromatösen Plaques von mehr als 60 verschiedenen Patienten herangezogen, sondern es wurden die zell- und lipidfreien Homogenate *post mortem* entnommener vorangeschrittener atherosklerotischer Plaques („*fibrous cap atheromas*“) nur 4 verschiedener Personen analysiert, welche sich in ihrer Zusammensetzung deutlich von den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Homogenaten unterschieden.

#### **5.4. Relative Bedeutung der Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positive Strukturen essentiell für die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und Aggregation waren, stellte sich die Frage welche Rolle die thrombozytären Kollagenrezeptoren, GPVI und das Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , in diesem Zusammenhang spielen. Die gleichzeitige Inhibition beider

Kollagenrezeptoren führte zur vollständigen Blockade der Plaque-stimulierten Plättchenaggregation und Sekretion sowie zur Hemmung der Adhäsion und des Ausbreitens von Suspensionen gewaschener Thrombozyten auf immobilisierten Plaquehomogenaten unter statischen Bedingungen. Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit auch nachgewiesen, dass die atheromatösen Läsionen mit den rekombinanten Formen beider thrombozytärer Kollagenrezeptoren, also sowohl mit rekombinantem GPVI, als auch mit der rekombinanten  $\alpha 2$  I-Domäne des Integrin  $\alpha 2\beta 1$  spezifisch interagierten, wobei die Bindung an das GPVI verglichen mit der an das Integrin etwas stärker ausfiel.

Zur Klärung der Frage, ob beide Kollagenrezeptoren gleich bedeutend für die Vermittlung der Plaque-induzierten Thrombozytenaktivierung sind oder ob möglicherweise einer der beiden eine wichtigere Rolle spielt, wurde der Einfluss 2 verschiedener anti-GPVI-Antikörper (5C4 und 10B12), sowie der Effekt eines anti-Integrin  $\alpha 2$ -Antikörpers (6F1) auf die Plaque-stimulierte Plättchenaktivierung, Adhäsion, Aggregation und Sekretion im gerührten System und unter arteriellen Flussbedingungen untersucht, und miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten eindeutig, dass das GPVI den zentralen Rezeptor für die Vermittlung der Plaque-induzierten Thrombozytenaktivierung und Aggregation darstellt, während dem Integrin  $\alpha 2\beta 1$  keine funktionell wichtige Rolle zukommt. Die gegen GPVI gerichteten Antikörper 5C4 und 10B12 waren in der Lage, sowohl den Plaque-vermittelten Plättchen-„*shape change*“ und die Aggregation im gerührten System, als auch die durch die Homogenate atheromatöser Läsionen hervorgerufene Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter Fluss stark zu reduzieren, bzw. vollständig zu inhibieren. Im Gegensatz dazu wurden weder der Plaque-stimulierte thrombozytäre „*shape change*“ und die Aggregation im gerührten System, noch die Adhäsion und Aggregatbildung der Blutplättchen an atheromatösen Plaquehomogenaten unter arteriellen Flussbedingungen signifikant durch die Vorbehandlung der Thrombozyten mit dem anti-Integrin  $\alpha 2$ -Antikörper 6F1 beeinflusst.

Ebenso wie die Plaque-induzierte Plättchenformveränderung und Aggregation konnten die beiden gegen das thrombozytäre GPVI gerichteten Antikörper 5C4 und 10B12 auch den Kollagen-vermittelten thrombozytären „*shape change*“ und die darauf folgende Aggregation im gerührten System reduzieren. Im Gegensatz zum Plaque-stimulierten Plättchengestaltwandel, welcher nicht durch die Vorbehandlung des Blutes mit dem monoklonalen Antikörper 6F1 beeinflusst wurde, verzögerte, bzw. verringerte die Blockade des Integrin  $\alpha 2\beta 1$  mittels 6F1 den durch fibrilläres Kollagen induzierten „*shape change*“ der Thrombozyten signifikant. In einer Arbeit von Siljander *et al.* wurde darüber hinaus gezeigt, dass 6F1 die Adhäsion der Plättchen an Kollagenfasern, sowie deren darauf folgende  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Aktivierung, Phosphatidylserinexpression und Aggregatgröße verringerte (Siljander *et al.*, 2004b), was auf eine Bedeutung des Integrin  $\alpha 2\beta 1$  für die Thrombozytenadhäsion, Aktivierung und Aggregation vermittelt durch fibrilläres Kollagen hinwies.



Die unterschiedliche Wirkung des anti-Integrin  $\alpha_2$ -Antikörpers auf die durch Plaquematerial und fibrilläres Kollagen hervorgerufene Blutplättchenaktivierung deutet darauf hin, dass die Struktur der mit GPVI interagierenden kollagenpositiven Komponenten atheromatöser Läsionen wahrscheinlich nicht der Struktur von fibrillärem Kollagen entspricht. In den Immunfluoreszenzaufnahmen der Plauehomogenate wurde gefunden, dass die Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Komponenten morphologisch tatsächlich nicht typisch fibrilläres Kollagen darstellten, sondern eher sehr heterogen in ihrer Struktur waren. Der mögliche Einfluss der Kollagenstruktur auf die Plaue-induzierte Plättchenstimulation wird im Abschnitt 5.7 näher diskutiert.

Der Vergleich der inhibierenden Wirkung der beiden anti-GPVI-Antikörper 5C4 und 10B12 hat gezeigt, dass 5C4 die durch atheromatöse Plaques (Abkürzungen: A-Plaques oder AP; siehe Abschnitt 3.2.1) und sofort nach ihrer Entnahme schocke gefrorene und steril aufbereitete atheromatöse Plaques (Abkürzungen: GS-Plaques oder GSP; siehe Abschnitt 3.2.1) stimulierte Thrombozytenaggregation in gerührtem PRP immer vollständig blockierte, wohingegen 10B12 nicht in der Lage war, eine komplette Reduktion im gerührten System zu induzieren. Unter arteriellen Flussbedingungen mit Scherraten von  $1500 \text{ s}^{-1}$  allerdings inhibierte 10B12 die durch A-Plauehomogenate vermittelte Plättchenaggregatbildung vollständig, wohingegen 5C4 keine komplette Hemmung der A- oder GS-Plaue-stimulierten Aggregatbildung unter diesen Bedingungen hervorrufen konnte. Die Wirkung von 10B12 auf die GS-Plaue-vermittelte Thrombozytenadhäsion und Aggregation unter Fluss konnte bisher mangels ausreichender Mengen an Antikörper noch nicht analysiert werden. Eine mögliche Erklärung für die fehlende vollständige Blockade der A- und GS-Plaue-vermittelten Blutplättchenaggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen durch 5C4 könnte darin liegen, dass unter diesen Adhäsions- und Aggregationsbedingungen positive „*feedback*“ Mediatoren wie z. B. ADP und TxA<sub>2</sub>, welche im gerührten System des Aggregometers sehr gut wirken können, unter Umständen weniger von Bedeutung sind. Es könnte sein, dass 5C4 möglicherweise vor allem zu einer spezifischen Subpopulation von GPVI-Rezeptoren bindet, welche die Bildung von Plättchenaggregaten in gerührtem PRP und Blut vor allem über Sekundärmediatoren induzieren. Unter Flussbedingungen sind möglicherweise andere Subpopulationen von GPVI-Rezeptoren wichtig, welche vor allem die Adhäsion der Thrombozyten an das Plauematerial vermitteln und nicht durch 5C4 blockiert werden. Diese GPVI-Rezeptorsubpopulation wurde gemäß den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit durch den anti-GPVI-Antikörper 10B12 effektiver inhibiert.

Auch die durch humanes atheromatöses Plauegewebe verursachte Aktivierung, Adhäsion und Aggregatbildung muriner Blutplättchen wurde vorrangig durch die Interaktion des Kollagenrezeptors GPVI mit den Plauehomogenaten induziert. Flussversuche zur Adhäsion

und Aggregation muriner Thrombozyten mit arteriellen Scherraten von  $1000 \text{ s}^{-1}$  haben gezeigt, dass weder die Plättchen, auf deren Oberfläche der GPVI-Rezeptor mittels des spezifischen anti-GPVI-Antikörpers JAQ1 blockiert oder depletiert war (Nieswandt *et al.*, 2001b), noch die Thrombozyten von  $\text{FcR}\gamma^{-/-}$ -Mäusen, welche keinen funktionellen GPVI-Rezeptor auf ihrer Oberfläche trugen (Nieswandt *et al.*, 2000), in der Lage waren, sich an das immobilisierte humane Plaquematerial anzulagern. Der „knock out“ des thrombozytären Kollagenrezeptors Integrin  $\alpha_2\beta_1$  zeigte im Gegensatz dazu keinen hemmenden Effekt auf die Plaque-stimulierte Blutplättchenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen. Eine ähnliche diese Ergebnisse unterstützende Beobachtung wurde auch in einer Studie von Massberg *et al.* gemacht, in welcher die *in vivo*-Thrombusbildung muriner GPVI-depletierter Thrombozyten nach Verletzung der *Arteria carotis* im Vergleich zur Kontrolle mit Wildtyp-Mäusen vollständig inhibiert war (Massberg *et al.*, 2003).

Abgesehen von der Plaque-vermittelten Plättchenaktivierung und Aggregation wurde auch die durch atheromatöse Läsionen verursachte Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten signifikant durch die Präinkubation des Blutes mit dem anti-GPVI-Antikörper 10B12 inhibiert. Im Gegensatz dazu verringerte der anti-Integrin  $\alpha_2$ -Antikörper 6F1 die Plaque-induzierte Interaktion von Blutplättchen mit Monozyten nicht signifikant. Auf Grund der Tatsache, dass die Bindung von Thrombozyten an Monozyten die „tissue factor“-Expression, bzw. die Expression von aktivem, „decrypted“ „tissue factor“ auf der Monozytenoberfläche stimulieren und auf diese Weise die extrinsische Koagulation aktivieren kann (Osterud, 2001; Eilertsen *et al.*, 2005; Losche, 2005), und dass die durch die atheromatösen Läsionen hervorgerufene Plättchen-Monozyten-Interaktion GPVI vermittelt zu sein scheint, kann vermutet werden, dass das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Plaquesgewebe zumindest teilweise GPVI-abhängig Gerinnung, bzw. Fibrinbildung induziert. Diese Annahme wird durch die bereits erwähnte parallel zu der hier diskutierten Arbeit erschienenen Studie von Cosemans *et al.* unterstützt, in welcher die Plaque-induzierte Freilegung von prokoagulatorisch wirkendem Phosphatidylserin auf der Thrombozytenoberfläche gänzlich und die Plaque-stimulierte Thrombinbildung zumindest teilweise GPVI-abhängig erfolgten (Cosemans *et al.*, 2005).

### **5.5. Bedeutung des VWF-Rezeptors GPIIb $\alpha$ für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung**

Da bekannt ist, dass die Interaktion des thrombozytären VWF-Rezeptors GPIIb $\alpha$  mit kollagengebundenem VWF vor allem bei höheren arteriellen Scherraten von mehr als  $1000 \text{ s}^{-1}$  eine wichtige Rolle für die Vermittlung des initialen transienten Anhaftens („tethering“ und „rolling“) von Blutplättchen an extrazellulärer Matrix spielt (Cauwenberghs *et al.*, 2001; Ruggeri, 2002; Ruggeri, 2007), wurde außer der Bedeutung der thrombozytären

Kollagenrezeptoren auch die Rolle von GPIIb/IIIa für die Plaque-stimulierte Plättchenaktivierung und Aggregatbildung genauer untersucht. Ein weiterer Grund für die Analyse der Rolle von GPIIb/IIIa bestand darüber hinaus darin, dass aus einer früheren Studie von De Meyer *et al.* Hinweise darauf hin vorlagen, dass VWF in atherosklerotischen Läsionen Cholesterin-gefütterter Kaninchen akkumuliert und dieser endogen in den Läsionen vorkommende VWF zumindest an der in Kaninchengefäßen stattfindenden Plaque-induzierten Thrombusbildung beteiligt zu sein scheint (De Meyer *et al.*, 1999).

Der monoklonale anti-GPIIb/IIIa-Antikörper 6B4 konnte die Plaque-vermittelte Thrombozytenaggregation in gerührtem Blut nicht signifikant inhibieren. Diese Ergebnisse weisen ebenso wie die Beobachtungen verschiedener anderer Arbeitsgruppen (Tsuji *et al.*, 1999; Maxwell *et al.*, 2007) darauf hin, dass die VWF/GPIIb/IIIa-vermittelte Blutplättchenaktivierung und Aggregation im gerührten System, also unter Bedingungen, welche sehr niedrigen Flussgeschwindigkeiten mit geringen Scherraten entsprechen, nicht von Bedeutung ist.

Die Wirkung von 6B4 wurde auch auf die Plaque-stimulierte Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen mit niedrigeren ( $500 \text{ s}^{-1}$ ) und höheren Scherraten ( $1500 \text{ s}^{-1}$ ) analysiert. Bei den Experimenten mit Scherraten von  $500 \text{ s}^{-1}$  bewirkte die Vorbehandlung von Hirudinblut mit 6B4 keine signifikante Reduktion der durch atheromatöses Plaquematerial induzierten Plättchenadhäsion und Aggregatbildung. Im Gegensatz dazu wurde die Adhäsion der Thrombozyten, bzw. die Anzahl der aggregatbedeckten Plaqueflächen durch die Präinkubation des Blutes mit dem anti-GPIIb/IIIa-Antikörper bei höheren Scherraten von  $1500 \text{ s}^{-1}$  signifikant um  $77 \pm 5\%$  (MW $\pm$ SA; n=4) verringert. Studien mit immobilisiertem VWF als Adhäsionssubstrat haben gezeigt, dass das initiale transiente Anhaften von Thrombozyten an diesen Oberflächen unter Flussbedingungen mit Scherraten von  $50 \text{ s}^{-1}$  bis hin zu  $1500 \text{ s}^{-1}$  merklich durch die Blockade von GPIIb/IIIa reduziert werden kann (Savage *et al.*, 1996). Die durch zirkulierenden VWF vermittelte Plättchenadhäsion und Aggregatbildung auf kollagenbeschichteten Oberflächen hingegen wird nur unter Flussbedingungen mit höheren Scherraten von  $\geq 1210 \text{ s}^{-1}$ , bzw.  $1500 \text{ s}^{-1}$ , nicht jedoch unter Flussbedingungen mit niedrigeren Scherraten von  $\leq 500 \text{ s}^{-1}$ , vollständig durch eine Blockade von GPIIb/IIIa inhibiert (Savage *et al.*, 1998; Sugimoto *et al.*, 1999). Die Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit lassen demzufolge vermuten, dass das unter arteriellen Strömungsbedingungen erfolgende Anhaften der Thrombozyten an das exponierte Plaquematerial der Adhäsion von Blutplättchen an Kollagenoberflächen, welche zirkulierenden VWF gebunden haben, ähnelt. Möglicherweise ist daher die Interaktion des thrombozytären GPIIb/IIIa mit dem aus der Zirkulation gebundenen VWF und nicht mit dem endogen in atherosklerotischen Läsionen vorkommendem VWF von größerer Bedeutung für die Plaque-stimulierte Thrombusbildung bei  $1500 \text{ s}^{-1}$ . Um die Bedeutung des endogen im Plaquematerial enthaltenen VWF genauer gegenüber der Rolle des

zirkulierenden VWF abgrenzen zu können, müssten weitere Experimente mit VWF-freiem Plasma, bzw. Blut (van Zanten *et al.*, 1994), sowie mit spezifischen VWF-blockierenden Antikörpern, wie z. B. einem gegen die mit Kollagen Typ I und Kollagen Typ III interagierende VWF-A3-Domäne gerichteten Antikörper (Vanhoorelbeke *et al.*, 2003; De Meyer *et al.*, 2006), durchgeführt werden, mit deren Hilfe die Adhäsion des im Blut zirkulierenden VWF an das exponierte Kollagen des Plaquematerials verhindert werden würde.

Interessanter Weise wurde bei den Flussexperimenten mit den höheren Scherraten von  $1500 \text{ s}^{-1}$  nicht nur die Adhäsion der Thrombozyten, bzw. die Anzahl der von Aggregaten bedeckten Plaqueflächen, sondern auch die Höhe der einzelnen Plättchenaggregate und somit das Aggregatwachstum, signifikant durch die Vorbehandlung des Blutes mit dem anti-GPIIb $\alpha$ -Antikörper 6B4 reduziert. Die 6B4-vermittelte Inhibition des Wachstums der Thrombozytenaggregate bei dieser Scherrate könnte 2 mögliche Erklärungen haben: (a) Durch die Blockade von GPIIb $\alpha$  mittels 6B4 wird die VWF/GPIIb $\alpha$ -abhängige thrombozytäre Signaltransduktion inhibiert, welche zur Erhöhung des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels sowie zu der für die stabile Plättchenaggregation essentiellen Hochregulierung und Aktivierung des Fibrinogenrezeptors Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  führt (Cauwenberghs *et al.*, 2001; Mazzucato *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2003; Ruggeri, 2003). (b) Die durch 6B4 hervorgerufene Reduktion des Aggregatwachstums könnte darüber hinaus auch durch verringerte VWF/GPIIb $\alpha$ -vermittelte Plättchen-Plättchen-Kontakte erklärt werden. Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass die VWF/GPIIb $\alpha$ -Interaktion ab einer Scherrate von mehr als  $1000 \text{ s}^{-1}$  zusätzlich zur Bindung von Fibrinogen, Fibrin und VWF an das Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  in die Thrombozyten-Thrombozyten-Brückenbildung (Kohäsion, Aggregation) involviert ist (Maxwell *et al.*, 2007). Bei sehr hohen Scherraten von mehr als  $10.000 \text{ s}^{-1}$ , wie sie in stenosierten Gefäßen oder zum Teil auch auf Grund veränderter hämodynamischer Kräfte im Bereich wachsender Plättchenaggregate herrschen, wird die VWF/GPIIb $\alpha$ -Interaktion sogar essentiell für den thrombozytären Aggregationsvorgang (Ruggeri *et al.*, 1999; Kulkarni *et al.*, 2000; Ruggeri *et al.*, 2006; Maxwell *et al.*, 2007).

Gemäß den Beobachtungen dieser Arbeit scheint möglicherweise ein synergistisches Zusammenspiel von GPIIb $\alpha$  und GPVI bei der Vermittlung der Plaque-induzierten Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung unter Flussbedingungen mit höheren Scherraten von  $1500 \text{ s}^{-1}$  zu bestehen. Aus einer Studie von Arthur *et al.* ist bekannt, dass GPIIb $\alpha$  und GPVI eng miteinander gekoppelt auf der Oberfläche von ruhenden und aktivierten humanen Blutplättchen vorliegen (Arthur *et al.*, 2005). Multimere Schlangengifte der C-Typ Lektin-Familie wie z. B. Alboaggregin A oder Alboluxin belegen darüber hinaus bei deren Bindung an die Thrombozyten sowohl GPIIb $\alpha$ , als auch GPVI (Bergmeier *et al.*, 2001; Dörmann *et al.*, 2001; Du *et al.*, 2002; Kanaji *et al.*, 2003), was ebenfalls für eine enge räumliche Nähe, bzw. eine mögliche Assoziation dieser beiden Plättchenrezeptoren spricht. Auch Kollagen interagiert

sowohl mit GPV des thrombozytären GPIb-IX-V-Rezeptorkomplexes als auch mit GPVI (Moog *et al.*, 2001; Nieswandt *et al.*, 2003), und auch diese Bindung könnte durch eine Angrenzung beider Rezeptoren, bzw. Rezeptorkomplexe erleichtert werden (Arthur *et al.*, 2005). Die enge räumliche Nähe von GPIb $\alpha$  und GPVI könnte zumindest teilweise deren bereits in der Literatur beschriebenes (Goto *et al.*, 2002b; Massberg *et al.*, 2003; Andrews *et al.*, 2004; Siljander *et al.*, 2004b) und in der vorliegenden Arbeit für die Plaque-stimulierte Plättchenaktivierung und Aggregatbildung angedeutetes funktionelles Zusammenspiel sowie die gemeinsamen Eigenschaften der durch sie vermittelten Signalantworten, welche die VWF- und Kollagen-stimulierte Aktivierung (transiente intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung) und Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -abhängige Aggregation der Thrombozyten weiterleiten, erklären (Andrews *et al.*, 2004; Baker *et al.*, 2004). Sowohl in den GPIb $\alpha$ -, als auch in den GPVI-induzierten Signaltransduktionsweg ist die Fc $\gamma$ -Kette involviert (Falati *et al.*, 1999; Nieswandt *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2003; Nieswandt *et al.*, 2003; Andrews *et al.*, 2004), welche direkt mit GPVI assoziiert und notwendig für dessen Oberflächenexpression ist (Arthur *et al.*, 2005). Die Ligandenbindung beider Rezeptoren könnte über einen Quervernetzungsmechanismus, welcher auch Fc $\gamma$  involviert, eine Signaltransduktionskaskade auslösen (Arthur *et al.*, 2005) und auf diese Weise synergistisch wirken. Aus *in vitro*- und *in vivo*-Studien mit Mäusethrombozyten ist darüber hinaus bekannt, dass GPVI und GPIb-IX-V bei der Initiation und Stabilisierung der Thrombusbildung zusammenzuarbeiten scheinen (Massberg *et al.*, 2003; Kuijpers *et al.*, 2004). *In vitro*-Untersuchungen der Thrombusbildung unter Fluss mit humanen Blutplättchen auf Kollagen-beschichteten Oberflächen hingegen weisen darauf hin, dass die synergistische Wirkung beider Plättchenrezeptoren vor allem für die stabile Thrombozytenaggregation benötigt wird (Goto *et al.*, 2002b).

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zur Annahme, dass die Verabreichung von Wirkstoffen wie beispielsweise spezifischen anti-GPIb $\alpha$ -Antikörpern, welche die Interaktion von GPIb $\alpha$  mit seinen Liganden, wie vor allem dem VWF, inhibieren können, vielversprechende alternative und/oder z. B. zur GPVI-Inhibition ergänzende antithrombozytäre Strategien zur Therapie und Prävention kardio- und cerebrovaskulärer Gefäßverschlüsse darstellen könnten. Erste Versuche zur Überprüfung des Einflusses solcher GPIb $\alpha$ -blockierender Antikörper haben bereits gezeigt, dass die Injektion von 6B4-Fab-Fragmenten einen potenten antithrombotischen Effekt *in vivo* in 2 verschiedenen Thrombosemodellen im Pavian aufwies, bei welchen zum einen ein arteriovenöses Shunt-Modell in den Femoralgefäßen und zum anderen ein modifiziertes Folts-Modell mit Femoralarterienstenose eingesetzt wurde, wobei die Blutungszeiten der Tiere nicht signifikant durch die Verabreichung von 6B4 verlängert wurden und darüber hinaus auch keine Thrombozytopenie auftrat (Cauwenberghs *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2002).

## **5.6. Bedeutung der ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> sowie der thrombozytären Cyclooxygenase für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung**

Die zur Zeit präventiv und therapeutisch eingesetzten antithrombozytären Substanzen Aspirin<sup>®</sup>, welches die thrombozytäre Cyclooxygenase-1 acetyliert (Vane *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 2005), und Clopidogrel<sup>®</sup>, welches nach hepatischer Metabolisierung den ADP-Rezeptor P2Y<sub>12</sub> der Plättchen blockiert (Cattaneo, 2007), inhibieren über die Interferenz mit der Synthese, bzw. Wirkung der positiven „feedback“-Mediatoren TxA<sub>2</sub> und ADP vor allem die sekundäre Aktivierungsphase der Thrombozyten. Es stellte sich nun die Frage, inwieweit Aspirin<sup>®</sup> und neue plättcheninhibierende Substanzen, welche die thrombozytären ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> (MRS2179) und P2Y<sub>12</sub> (AR-C69931MX) hemmen und sich gegenwärtig bereits teilweise in der klinischen Erprobungsphase befinden, die Plaque-induzierte Blutplättchenaktivierung beeinflussen. Die Wirkung dieser 3 Thrombozytenhemmer wurde vergleichend in Citrat- und Hirudin-antikoaguliertem plättchenreichem Plasma und Blut ausgetestet.

Mit Ausnahme der fehlenden Wirkung des P2Y<sub>1</sub>-Antagonisten MRS2179 in Citrat-antikoaguliertem Blut, waren beide ADP-Rezeptor-Antagonisten, MRS2179 und AR-C69931MX, in gerührtem PRP oder Blut immer in der Lage, die Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregation signifikant zu reduzieren. Der direkte Vergleich der Wirkung beider ADP-Rezeptor-Antagonisten hat hierbei gezeigt, dass AR-C69931MX die Plaque-induzierte Plättchenaggregation sowohl im Citrat-, als auch im Hirudin-PRP effektiver als MRS2179 inhibierte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der ADP-Rezeptor P2Y<sub>12</sub> zumindest in gerührtem PRP, also unter Bedingungen, welche sehr niedrigen Flussgeschwindigkeiten mit sehr geringen Scherraten entsprechen, der bedeutendere der beiden thrombozytären ADP-Rezeptoren für die Plaque-vermittelte Aggregation zu sein scheint. Die Bedeutung von P2Y<sub>12</sub> für die Amplifikation der durch ADP und andere Agonisten wie z. B. Thrombin- oder Kollagen-stimulierten Blutplättchenaggregation und Sekretion ist bereits aus früheren Studien bekannt (Cattaneo *et al.*, 2000; Conley *et al.*, 2003; Hechler *et al.*, 2005; Gachet, 2006). Im Citratblut inhibierte AR-C69931MX die Plaque-vermittelte Thrombozytenaggregation ebenfalls effektiver als MRS2179. Im Hirudinblut hingegen reduzierten der P2Y<sub>1</sub>- und der P2Y<sub>12</sub>-Antagonist die Plaque-induzierte Plättchenaggregation in etwa gleichermaßen stark, was darauf schließen lässt, dass unter diesen Bedingungen, also beim Vorliegen physiologischer Konzentrationen an zweiwertigen Ionen im Blut, beide ADP-Rezeptoren gleichbedeutend für die durch atheromatöses Plaquematerial stimulierte Vermittlung der sekundären Plättchenaktivierungsphase zu sein scheinen. Die Kombination aus MRS2179 und AR-C69931MX inhibierte die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation sowohl im Citrat-, als auch im Hirudin-PRP und Blut wirksamer, als jeder Antagonist für sich alleine genommen, wobei deren Zugabe zu Hirudin-PRP oder Blut die Aggregation nahezu vollständig blockierte.

Auch die durch fibrilläres Kollagen hervorgerufene Plättchenaggregation wurde durch die Zugabe beider ADP-Rezeptor-Antagonisten vor allem im Hirudin-PRP und Blut nahezu vollständig inhibiert, was auf eine ähnliche Rolle des sekundären „feedback“-Mediators ADP, bzw. synergistische Wirkung dessen thrombozytärer Oberflächenrezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> für die Plaque- und Kollagen-stimulierte Thrombusbildung im gerührten System hinweisen könnte. Insgesamt war die anti-aggregatorische Wirkung von MRS2179 und AR-C69931MX im Blut gegenüber der Wirkung in plättchenreichem Plasma geringer. Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass im Blut ADP außer von aktivierten Thrombozyten auch von Erythrozyten freigesetzt werden kann (Falcon *et al.*, 1989; Lüthje, 1989; Alkhamis *et al.*, 1990; Bonnefoy *et al.*, 2001; Satoh *et al.*, 2002).

Die Zugabe von Aspirin<sup>®</sup> reduzierte die Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregation ebenso wie die beiden ADP-Rezeptor-Antagonisten sowohl im PRP als auch im Blut signifikant. Auch die Inhibition durch Aspirin<sup>®</sup> war im PRP deutlicher als im Blut ausgeprägt. Im Gegensatz zu MRS2179 und AR-C69931MX war die Hemmwirkung von Aspirin<sup>®</sup> ähnlich in Citrat- und Hirudin-antikoaguliertem PRP und Blut und somit nicht von der Art des eingesetzten Antikoagulans abhängig.

Der Vergleich der Hemmwirkung von Aspirin<sup>®</sup> auf die durch Plaquematerial und Horm<sup>®</sup>-Kollagen hervorgerufene Thrombozytenaggregation zeigte, dass der Effekt von Aspirin<sup>®</sup> auf die Kollagen-induzierte Aggregation (85% Inhibition im Hirudinblut) stärker war als die Wirkung auf die Plaque-stimulierte Aggregation (64% Inhibition im Hirudinblut), was auf einen Unterschied in der durch atheromatöses Plaquematerial und fibrilläres Kollagen hervorgerufenen Plättchenaktivierung hindeutet. Die Ursache für die geringere Hemmung der Plaque-vermittelten Thrombozytenaggregation durch Aspirin<sup>®</sup> könnte unter anderem darin liegen, dass atheromatöse Läsionen Lysophosphatidsäure enthalten, welche die Thrombozytenaktivierung und Aggregation wie in einer Studie von Haserück *et al.* gezeigt wurde Aspirin<sup>®</sup>-unabhängig induziert (Haserück *et al.*, 2004).

Die Kombination aus beiden ADP-Rezeptor-Antagonisten und Aspirin<sup>®</sup> stellte die wirksamste Blockade der Plaque-vermittelten Plättchenaggregation dar und resultierte in einer nahezu vollständigen, bzw. kompletten Inhibition. Beide „feedback“-Mediatoren, ADP und TxA<sub>2</sub>, spielen also in gerührtem PRP und Blut eine wichtige Rolle bei der durch atheromatöses Plaquematerial hervorgerufenen Thrombozytenaktivierung und Aggregation.

Neben der Wirkung in gerührtem plättchenreichem Plasma und Blut, wurde der Effekt der 3 antithrombozytären Substanzen MRS2179, AR-C69931MX und Aspirin<sup>®</sup> auch auf die Plaque-vermittelte Plättchenadhäsion und Aggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen mit niedrigeren (500 s<sup>-1</sup>) und höheren Scherraten (1500 s<sup>-1</sup>) untersucht. Im Gegensatz zu dem GPIIb/3a-blockierenden Antikörper 6B4 (siehe Abschnitt 5.5) waren die ADP-Rezeptor-

Antagonisten MSR2179 und AR-C69931MX sowohl bei Scherraten mit  $500\text{ s}^{-1}$ , als auch bei Scherraten mit  $1500\text{ s}^{-1}$  in der Lage, die durch atheromatöse Plaquehomogenate verursachte Thrombozytenaggregatbildung zu verringern. Interessanter Weise war der Effekt unter Flussbedingungen mit höheren Scherraten, wie sie vornehmlich in kleineren arteriellen und stenosierten Gefäßen vorliegen, deutlich stärker ausgeprägt als bei den niedrigeren Scherraten. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der sekundäre Botenstoff ADP, von dem bekannt ist, dass er eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung der Scherstress-induzierten Thrombozytenaggregation spielt (Moake *et al.*, 1988; Turner *et al.*, 2001; Kunapuli *et al.*, 2003b), bei der Plättchenthrombusbildung in stenosierten arteriellen Gefäßen involviert sein könnte. Im Gegensatz zu den Experimenten in gerührtem Citrat- und Hirudin-PRP sowie in gerührtem Citratblut, in welchen der P2Y<sub>12</sub>-Antagonist AR-C69931MX den effektiveren Aggregationsinhibitor darstellte, war unter arteriellen Strömungsbedingungen kein Unterschied in der Wirkung von MRS2179 und AR-C69931MX auf die Plaque-stimulierte Plättchenthrombusbildung zu sehen. Die Kombination aus beiden ADP-Rezeptorblockern inhibierte die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation unter allen experimentellen Bedingungen wirkungsvoller, als jeder Antagonist für sich alleine genommen, woraus geschlossen werden kann, dass zur effektiven Inhibition der Thrombusbildung nach Plaqueruptur beide ADP-Rezeptoren, P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>, welche unterschiedliche thrombozytäre Signaltransduktionswege aktivieren, blockiert werden sollten. Auf diese Weise wird sowohl der durch die Bindung von ADP an P2Y<sub>1</sub> aktivierte G<sub>αq</sub>/Phospholipase C/Ca<sup>2+</sup>-Signaltransduktionsweg als auch die durch die Interaktion von ADP mit P2Y<sub>12</sub> vermittelte Inhibition der Adenylatzyklase unterbunden (siehe Abb. 1.4, Abschnitt 1.3.2) (Gachet, 2006). In einer bereits in den Abschnitten 5.3 und 5.4 erwähnten zeitgleich zu der hier diskutierten Arbeit durchgeführten Studie von Cosemans *et al.* konnte die Bedeutung von ADP für die Plaque-stimulierte Plättchenaggregatbildung unter arteriellen Flussbedingungen bestätigt werden, wobei in dieser Studie der Beitrag der beiden ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> nicht wie in der vorgelegten Arbeit vergleichend untersucht wurde (Cosemans *et al.*, 2005).

Frühere Studien, in welchen die Bedeutung von P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> für die Kollagen-induzierte Thrombozytenaktivierung und Aggregatbildung unter Flussbedingungen analysiert wurden, lieferten widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Rolle dieser beiden ADP-Rezeptoren. In einer Studie von Turner *et al.* wurde beschrieben, dass wie in dieser Arbeit für atheromatöses Plaquematerial dargestellt beide ADP-Rezeptoren, also sowohl P2Y<sub>1</sub>, als auch P2Y<sub>12</sub>, wichtig für die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregatbildung sind, und dass zur effizienten, bzw. signifikanten Hemmung der Kollagen-vermittelten Plättchenthrombusbildung unter Fluss beide Rezeptoren antagonisiert werden müssen (Turner *et al.*, 2001). In verschiedenen anderen Studien hingegen wurde gezeigt, dass die Inhibition eines jeden ADP-Rezeptors, entweder von P2Y<sub>1</sub> (Remijn *et al.*, 2002; Goto *et al.*, 2006) oder von P2Y<sub>12</sub> (Goto *et al.*, 2002a; Remijn *et al.*, 2002; Vilahur *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 2006), die durch Kollagen stimulierte Thrombozytenablagerung und Aggregatbildung signifikant verringert. Die in diesen Arbeiten

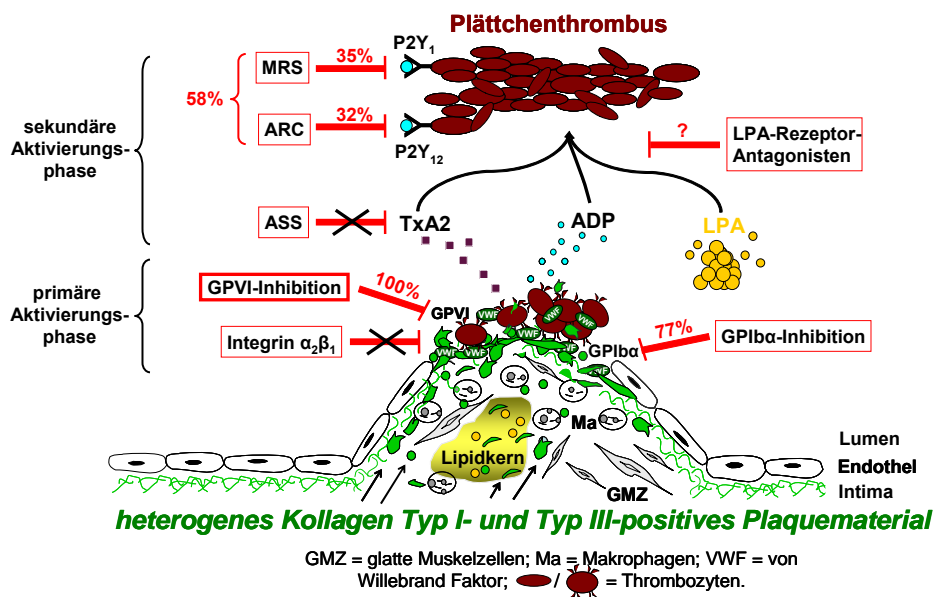


beobachteten unterschiedlichen Wirkungen der P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten auf die Kollagen-vermittelte Plättchenthrombusbildung könnten hierbei zum einen an der verschiedenen Dauer der Flusseexperimente und zum anderen auch an den variierenden eingesetzten Scherraten und/oder Antikoagulantien liegen. So ist beispielsweise bekannt, dass die Verwendung bestimmter Antikoagulantien wie z. B. von Thrombininhibitoren *in vitro* zu einer Überschätzung des eigentlichen antithrombotischen Potentials von P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten auf Kollagenoberflächen unter Flussbedingungen führen kann, da die Blockade des thrombozytären P2Y<sub>12</sub>/G<sub>i</sub>-Signalweges synergistisch mit der Inhibition des Thrombin-stimulierten G<sub>q</sub>-vermittelten Signalweges der Plättchen wirken kann (Conley *et al.*, 2003).

Überraschender Weise war Aspirin<sup>®</sup> im Gegensatz zu den Experimenten in gerührtem PRP und Blut in den Flusseexperimenten (Scherraten: 1500 s<sup>-1</sup>) nicht in der Lage, die Anzahl der von Thrombozytenaggregaten bedeckten Plaqueflächen signifikant im Vergleich zur Kontrolle zu verringern. Darüber hinaus führte die Zugabe dieses Cyclooxygenase-1-Inhibitors anders als in gerührtem PRP und Blut auch nicht zu einer weiteren Reduktion der durch die Kombination von MRS2179 plus AR-C69931MX hervorgerufenen Hemmung der Plaque-induzierten Plättchenaggregatbildung. Auch in den Experimenten mit niedrigeren Scherraten von 500 s<sup>-1</sup> konnte Aspirin<sup>®</sup> die Plaque-vermittelte Thrombusbildung im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant hemmen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die TxA<sub>2</sub>-Bildung im Gegensatz zur ADP-Rezeptor-Aktivierung im Verlauf der Thrombusbildung nach Plaqueruptur unter arteriellen Flussbedingungen eine untergeordnete Rolle spielen könnte. Aus einer früheren Arbeit von Barstad *et al.* ist bekannt, dass der Effekt von Aspirin<sup>®</sup> auf die Kollagen-verursachte Plättchenaggregatbildung unter Fluss von der jeweils eingesetzten Scherrate abhängt, wobei bei niedrigeren und sehr hohen Scherraten von 650 s<sup>-1</sup> und 10.500 s<sup>-1</sup> keine inhibierende Wirkung von Acetylsalicylsäure gefunden wurde (Barstad *et al.*, 1996). Diese Daten könnten eine mögliche Erklärung für das Fehlen des antithrombozytären Effekts von Aspirin<sup>®</sup> auf die Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregatbildung unter Flussbedingungen mit niedrigeren Scherraten von 500 s<sup>-1</sup> darstellen. Barstad *et al.* haben des weiteren gezeigt, dass Aspirin<sup>®</sup> bei Scherraten von 2.600 s<sup>-1</sup> zu einer Reduktion der auf den Kollagenoberflächen stattfindenden Blutplättchenaggregatbildung führte, welche allerdings nur sehr moderat ausfiel (Barstad *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurde in einer Studie von Moake *et al.* berichtet, dass die Scher-induzierte, VWF-unterstützte Thrombozytenaktivierung und Aggregation Aspirin<sup>®</sup>-resistent, jedoch ADP-abhängig erfolgt (Moake *et al.*, 1988). Zusammengefasst stützen diese Beobachtungen die Resultate der vorliegenden Arbeit, in welcher Aspirin<sup>®</sup> unter arteriellen Flussbedingungen keine Hemmung der durch atherosklerotisches Plaquematerial stimulierten Plättchenaktivierung und Aggregatbildung bewirkte und der Scher/VWF/ADP-Aktivierungsachse eine bedeutende Rolle zugewiesen wird.

Der Gegensatz dieser *in vitro*-Ergebnisse zu dem klinisch erwiesenen protektiven Effekt von Aspirin® bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen könnte möglicherweise wie folgt erklärt werden: Aus den Studien verschiedener Arbeitsgruppen ist bekannt, dass die Thrombozytenadhäsion und Aktivierung mit darauf folgender Cyclooxygenase-1-abhängiger TxA<sub>2</sub>-Bildung in der frühen Phase der Arterogenese und während der Progression atherosklerotischer Läsionen eine Rolle spielt (Belton *et al.*, 2003; Gawaz, 2006). Diese könnte durch die Acetylsalicylsäure gehemmt werden, und dadurch die Entstehung vulnerabler Plaques inhibieren, bzw. verzögern. In der akuten Phase der Thrombusbildung nach Plaqueruptur hingegen kann vermutlich durch Plättchenstimuli wie atheromatöses Plaquematerial oder Kollagen unter Fluss freigesetztes ADP die inhibierende Wirkung von Aspirin® umgehen (Awtry *et al.*, 2000; Eikelboom *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde auch beschrieben, dass die Verabreichung von Aspirin® nur in etwa bei einem Viertel aller Patienten schwerwiegende vaskuläre Ereignisse und symptomatische Atherothrombosen (z. B. akute Myokardinfarkte, bzw. Reinfarkte oder ischämische Schlaganfälle) verhindern kann ("Antithrombotic-Trialists-Collaboration", 2002; Hankey *et al.*, 2004). Die TxA<sub>2</sub>-Bildung scheint demzufolge keine unabdingliche Schlüsselrolle bei der Thrombusbildung nach Plaqueruptur zu besitzen.

Das in Abb. 5.1 dargestellte grafische Schema zeigt den gemäß den in den Abschnitten 5.3 bis 5.6 diskutierten Ergebnissen dieser Arbeit vermutlich erfolgenden Ablauf der Entstehung eines gefäßverschießenden Plättenthrombus nach der Ruptur einer vulnerablen, lipidreichen atherosklerotischen Läsion unter arteriellen Flussbedingungen bei Scherraten von  $1500\text{ s}^{-1}$ . In dieser Darstellung sind die Resultate in Hirudin-antikoagulierte Blut zusammengefasst, was bedeutet, dass die durch den Plaque-„*tissue factor*“ vermittelte Thrombusbildung hier nicht mit einbezogen ist. Gemäß diesem Modell werden nach dem Aufbrechen einer atheromatösen Läsion zunächst morphologisch heterogene Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positive Strukturen des Plaquematerials freigelegt (siehe Abschnitt 5.3). Endogener Plaque-VWF oder VWF, der aus der Blutzirkulation stammt und an die exponierte kollagenartige Plaquematrix bindet, induziert darauf hin durch die Interaktion mit dessen thrombozytärem Rezeptor, dem GPIIb/IIIa, die initiale transiente Adhäsion der Blutplättchen unter arteriellen Flussbedingungen (siehe Abschnitt 5.5). Die Hemmung dieser Interaktion mittels eines spezifischen anti-GPIIb/IIIa-Antikörpers reduzierte die Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregatbildung um 77%. Im Anschluss daran werden das stabile Anhaften der Blutplättchen und deren Aktivierung vornehmlich durch die Bindung kollagenartiger Plaquestrukturen an deren thrombozytären Kollagenrezeptor GPVI vermittelt. Die Inhibition dieser Bindung durch den Antikörper 10B12 konnte die durch atheromatöses Plaquematerial verursachte Thrombusbildung zu 100% blockieren, was darauf hinweist, dass GPVI den zentralen thrombozytären Rezeptor für die Plaque-induzierte Plättchenaktivierung und Aggregatbildung darstellt (siehe Abschnitt 5.4).



**Abb. 5.1: Modellhafte Darstellung der Plättchenthrombusbildung nach Plaqueruptur.** Gezeigt sind der Ablauf der Thrombozytenaktivierung und Aggregatbildung, sowie die % Inhibition der Plaque-induzierten Plättchenthrombusbildung durch verschiedene antithrombozytäre Substanzen im Hirudinblut unter arteriellen Flussbedingungen mit Scherraten bei  $1500 \text{ s}^{-1}$ . ADP = Adenosindiphosphat; ARC = ARC69931MX; ASS = Acetylsalicylsäure; LPA = Lysophosphatidsäure; MRS = MRS2179; TxA<sub>2</sub> = Thromboxan A<sub>2</sub>.

Der zweite wichtige Kollagenrezeptor auf der Oberfläche der Thrombozyten, das Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , ist, wie in Abb. 5.1 gezeigt, nicht am Vorgang der Plaque-stimulierten Plättchenaktivierung beteiligt, denn seine Inhibition mittels eines spezifischen inhibierenden Antikörpers blieb ohne jeglichen Einfluss (siehe Abschnitt 5.4). Die Interaktion von kollagenpositiven Plaquestrukturen und GPVI leitet eine Reihe von Ereignissen ein, welche zur Sekretion von thrombozytären Granula-Inhaltsstoffen, Fibrinogenrezeptoraktivierung, Plättchenausbreitung und Aggregation führen. Das Wachstum der auf diese Weise entstandenen Thrombozytenaggregate, bzw. die Bildung eines gefäßverschließenden Thrombus wird schließlich vor allem durch die Freisetzung des sekundären Botenstoffes ADP propagiert. Eine Blockade beider thrombozytärer ADP-Rezeptoren (P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>) mittels spezifischer Antagonisten reduzierte die Plaque-stimulierte Plättchenaggregatbildung um ca. 60% (siehe Abschnitt 5.6). Verglichen mit dem thrombozytären Kollagenrezeptor GPVI und dem VWF-Rezeptor GPIIb/IIIa spielen die ADP-Rezeptoren unter Flussbedingungen bei  $1500 \text{ s}^{-1}$  allerdings eine geringere Rolle. Eine mögliche Ursache für die untergeordnete Rolle des positiven „feedback“-Mediators ADP, sowie dessen Interaktion mit P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>, könnte darin liegen, dass das ADP, welches von aktivierten Thrombozyten und roten Blutkörperchen freigesetzt wird, auf Grund der hohen Flussgeschwindigkeit nicht ausreichend im Bereich des wachsenden Thrombus akkumulieren kann. Der zweite für die Bildung eines hämostatischen Plättchenthrombus wichtige sekundäre Botenstoff TxA<sub>2</sub> scheint für die Plaque-vermittelte

Thrombozytenaktivierung und Aggregation keine Rolle zu spielen, denn die Inhibition der Thromboxanbiosynthese mittels Aspirin® zeigte keinen Einfluss auf die thrombozytäre Aggregatbildung (siehe Abschnitt 5.6). Neben der zentralen Bedeutung des Kollagenrezeptors GPVI, scheint auch die Interaktion des VWF-Rezeptors GPIb $\alpha$  mit dessen Liganden nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Plaque-vermittelten initialen Thrombozytenadhäsion, sondern auch der Aktivierung und Aggregatbildung zu spielen, denn die Inhibition dieses Rezeptors mittels eines blockierenden Antikörpers verringerte nicht nur die Anzahl der plättchenaggregatbedeckten Plaqueflächen, sondern reduzierte auch die Höhe der einzelnen Aggregate (siehe Abschnitt 5.5). GPVI und GPIb $\alpha$  scheinen also synergistisch an der thrombozytären Signalweiterleitung nach der Ruptur einer atheromatösen Läsion beteiligt zu sein, wobei GPVI das bedeutendere beider Oberflächenproteine ist. Neben Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Plaquestrukturen könnte auch die vor allem im lipidreichen Kern vulnerabler atherosklerotischer Plaques akkumulierte Lysophosphatidsäure an der Thrombozytenaktivierung und Aggregation beteiligt sein (Abb. 5.1) (Siess *et al.*, 1999; Rother *et al.*, 2003). Da derzeit keine im Blut inhibierend wirkenden LPA-Rezeptor-Antagonisten bekannt sind, konnte die relative Bedeutung dieses Plaque-Lysophospholipids für die Plaque-stimulierte Plättchenaktivierung im Blut nicht untersucht werden. In ersten nur teilweise veröffentlichten Experimenten der Dissertation von Olympia Bikou konnte allerdings gezeigt werden, dass die Wirkung von fibrillärem Kollagen bezüglich der Thrombozytenaktivierung und Aggregation durch Lysophosphatidsäure verstärkt wurde (Bikou *et al.*, 2006), so dass ein möglicher Synergismus beider in atherosklerotischen Läsionen vorkommender Substanzen bezüglich der Plättchenaktivierung vorstellbar wäre.

## **5.7. Vergleich aktiver und inaktiver atherosklerotischer Plaques**

Nicht alle der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten humanen atheromatösen Plaquehomogenate waren in der Lage, Blutplättchen zu aktivieren. Einige waren inaktiv und konnten weder eine Formveränderung, noch eine Aggregation der Thrombozyten in gerührtem PRP induzieren. Verschiedene Ursachen für die variierenden Aktivitäten der atheromatösen Plaquehomogenate, wie Unterschiede in den Thrombozytenkonzentrationen des in den Aggregometerexperimenten eingesetzten PRP, Unterschiede im Kollagengehalt oder der Kollagenstruktur des Plaquematerials, sowie eine variierende GPVI-Bindung der atheromatösen Läsionen wurden ausgeschlossen. Ferner zeigte die vergleichende Analyse des Protein-, bzw. Kollagen Typ I-Profiles aktiver und inaktiver Plaquehomogenate mittels SDS-gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Silberfärbung, bzw. anschließendem Immunoblot mit einem spezifischen anti-Kollagen Typ I-Antikörper, dass in allen untersuchten Plaquematerialien sowohl  $\alpha$ 1(I)-, als auch  $\alpha$ 2(I)-Ketten des Kollagen Typ I vorhanden waren. Die variierende Aktivität der atheromatösen Läsionen konnte demzufolge auch nicht auf deren

unterschiedlichen Gehalt an löslichen Kollagen Typ I-spezifischen  $\alpha$ -Untereinheiten zurückgeführt werden.

Die Plaque-induzierte Blutplättchenaggregation war oberhalb einer Konzentration von 200.000 Thrombozyten/ $\mu$ l PRP weitgehend von der Plättchenkonzentration im analysierten PRP unabhängig. Da die Anzahl der Thrombozyten/ $\mu$ l PRP bei den meisten der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten zwischen 250.000 und 350.000 lag, kann die unterschiedliche Aktivität der Plaquehomogenate verschiedener Patienten nicht auf die Plättchenkonzentration des untersuchten PRP zurückgeführt werden. Unterhalb einer Thrombozytenkonzentration von 200.000 Plättchen/ $\mu$ l PRP war die Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregation allerdings deutlich geringer. Da sich die durch das Plaquematerial hervorgerufene Plättchenaggregation in gerührtem PRP, wie in Abschnitt 5.6 beschrieben, aus der initialen Aktivierung durch kollagenpositive Plaquestrukturen und der daraus resultierenden Freisetzung der sekundären Botenstoffe ADP und TxA<sub>2</sub> und somit der sekundär stimulierten Amplifikation der Thrombozytenaktivierung zusammensetzt, ist es wahrscheinlich, dass bei einer Plättchenkonzentration unterhalb von 200.000 Thrombozyten/ $\mu$ l PRP diese beiden positiven „*feedback*“-Mediatoren in geringeren Mengen sekretiert werden und somit die Plaque-induzierte Plättchenaggregation in diesem Fall schwächer ausfällt.

Im Gegensatz zur Plaque-vermittelten Aggregation war die durch verschiedene Konzentrationen an fibrillärem Horm<sup>®</sup>-Kollagen hervorgerufene Plättchenaggregation auch unterhalb einer Thrombozytenkonzentration von 200.000 Plättchen/ $\mu$ l PRP in etwa immer vergleichbar. Bezüglich des Aggregationsmechanismus im PRP liegen daher bei einer Thrombozytenkonzentration von weniger als 200.000 Plättchen/ $\mu$ l PRP zwischen den kollagenpositiven Plaquestrukturen und fibrillärem Kollagen Unterschiede vor. Darüber hinaus wies auch die Tatsache, dass das Horm<sup>®</sup>-Kollagen unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen (0,5  $\mu$ g/ml, 2,5  $\mu$ g/ml und 5  $\mu$ g/ml) eine in etwa immer gleich hohe Plättchenaggregation im PRP stimulierte und die aktiven atheromatösen Plaques in niedrigeren Konzentrationen (0,6 mg Feuchtgewicht/ml) eine verglichen mit einer höheren Plaquekonzentration (1,25 mg Feuchtgewicht/ml) deutlich verringerte Aggregation induzierten darauf hin, dass Unterschiede zwischen den kollagenpositiven Plaquestrukturen und typisch fibrillärem Kollagen bestanden. Morphologisch lagen wie mittels Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt wurde zwischen den Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Plaquestrukturen und dem fibrillären Horm<sup>®</sup>-Kollagen (Gemisch aus 95% Kollagen Typ I- und 5% Kollagen Typ III-Fibrillen) (Favaloro, 2000) deutliche Unterschiede vor. Die Kollagen Typ I- und Typ III-positiven Komponenten der Plaquehomogenate waren sehr heterogen in ihrer Gestalt. Es traten sowohl größere als auch kleine kollagenpositive Strukturen auf, welche in der Lage waren, mit den Blutplättchen zu interagieren. In der Regel waren keine fibrillären Kollagenstrukturen im Plaquematerial sichtbar und nur in den

Homogenaten einzelner atheromatöser Läsionen konnten mittels anti-Kollagen Typ III-Antikörpern kurze Kollagenfibrillen detektiert werden. Auf Grund dieser Beobachtungen kann vermutet werden, dass typisch fibrilläre Plauekollagenstrukturen wahrscheinlich nicht für die Aktivierung der Thrombozyten durch humane atheromatöse Läsionen verantwortlich sind.

Weitere Experimente der hier diskutierten Arbeit zeigten, dass verglichen mit fibrillärem Horm<sup>®</sup>-Kollagen viel höhere Konzentrationen an löslichem Kollagen Typ I (ca. um den Faktor 200 höher) und löslichem Kollagen Typ III (ca. um den Faktor 25 höher), sowie an Plauekollagen (abhängig von der individuellen Plaue-Aktivität um den Faktor 25-165 höher) eingesetzt werden mussten, um eine vergleichbare Thrombozytenaggregation im PRP zu induzieren. Dies könnte auf eine ähnliche Plättchenaktivierung vermittelt durch lösliche Kollagene und atheromatöse Läsionen hindeuten. Fibrilläres Kollagen erwies sich also als ein bezüglich der Aggregation im PRP deutlich stärkerer Plättchenagonist als lösliches Kollagen, was bereits auch in früheren Studien anderer Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Savage *et al.*, 1999; Siljander *et al.*, 1999; Bernardo *et al.*, 2004). Savage *et al.* haben beispielsweise gezeigt, dass die 50-fache Konzentration an löslichem Kollagen Typ I benötigt wurde, um eine mit fibrillärem Kollagen Typ I vergleichbare Thrombozytenantwort im PRP auszulösen, wobei die durch lösliches Kollagen Typ I verursachte „lag“-Phase vor dem Einsetzen der Plättchenaggregation verglichen mit der durch fibrilläres Kollagen Typ I vermittelten „lag“-Phase trotzdem noch deutlich verzögert war (Savage *et al.*, 1999). In einer Studie von Siljander *et al.* wurde darüber hinaus gezeigt, dass fibrilläres Kollagen Typ I sowohl im statischen System als auch unter Fluss ein besseres und aktiveres Substrat für die Thrombozytenadhäsion und Aggregation darstellt als lösliches Kollagen Typ I, wobei hier in etwa nur die 4-fache Konzentration an löslichem Kollagen Typ I benötigt wurde, um eine zum fibrillären Kollagen Typ I vergleichbare Plättchenaktivierung zu erzielen (Siljander *et al.*, 1999). Es ist bekannt, dass Kollagene eine geeignete tertiäre und quaternäre Struktur annehmen muss, um effektiv mit den Thrombozyten interagieren zu können (Morton *et al.*, 1995; Jarvis *et al.*, 2002). Sowohl die Länge und der Durchmesser als auch die Morphologie der Kollagenfasern besitzen einen entscheidenden Einfluss auf deren Fähigkeit die Blutplättchen zu aktivieren (Jarvis *et al.*, 2002). Mögliche Ursachen für die Unterschiede der in den oben genannten Arbeiten benötigten vielfachen Konzentrationen an löslichem verglichen mit fibrillärem Kollagen könnten daher darin liegen, dass die analysierten löslichen Kollagene unterschiedliche tertiäre und/oder quaternäre Strukturen besitzen. Die morphologische Untersuchung der in dieser Arbeit eingesetzten löslichen Typ I- und Typ III-Kollagene mittels Immunfluoreszenzmikroskopie hat gezeigt, dass abhängig vom Beschichtungsverfahren durchaus fibrilläre Strukturen in den löslichen Kollagenen detektiert werden konnten. Das lösliche Kollagen Typ I, welches die Thrombozyten weniger stark aktivierte als das lösliche Kollagen Typ III, enthielt eher längere und größere Kollagenfasern, welche allerdings nur sehr selten auftraten. Im löslichen Kollagen

Typ III hingegen waren viele kürzere, mikrofibrilläre Strukturen zu beobachten, welche eventuell effektiver als die vereinzelt Kollagen Typ I-Fasern mit den Blutplättchen interagieren und somit die Thrombozyten stärker aktivieren können.

Gegen die Hypothese, dass lösliche Kollagenstrukturen die blutplättchenaktivierenden Komponenten vorangeschrittener lipidreicher atherosklerotischer Läsionen darstellen spricht allerdings, dass keine absolut eindeutige Korrelation des Kollagengehalts der Plauehomogenate verschiedener Patienten und der durch sie hervorgerufenen Thrombozytenaggregation im PRP sowie der Fibrinbildung im PPP oder PRP gefunden werden konnte. Darüber hinaus sprechen auch die Daten vorangegangener Veröffentlichungen gegen diese Hypothese, in welchen nachgewiesen wurde, dass der Kollagenrezeptor Integrin  $\alpha_2\beta_1$  vor allem für die durch lösliches Kollagen verursachte Plättchenadhäsion und Aggregatbildung verantwortlich gemacht wird, während die durch fibrilläres Kollagen stimulierte Thrombozytenadhäsion und Aggregation vor allem GPVI-abhängig erfolgen zu scheint (Jung *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1998; Savage *et al.*, 1999; Siljander *et al.*, 1999; Nieswandt *et al.*, 2001a; Kato *et al.*, 2003; Nieswandt *et al.*, 2003; Moroi *et al.*, 2004; Siljander *et al.*, 2004b). Da die in dieser Arbeit untersuchte Plaue-stimulierte Thrombozytenaktivierung und Aggregatbildung unabhängig von dem Integrin  $\alpha_2\beta_1$  war und vor allem durch den Kollagenrezeptor GPVI vermittelt wurde, scheint sich das Plauekollagen bezüglich der Plättchenaktivierung also auch deutlich anders als lösliches Kollagen zu verhalten. Vergleichende Untersuchungen der Plauekollagenstruktur, bzw. der verschiedenen Kollagentypen atheromatöser Läsionen mittels Elektronenmikroskopie, bzw. mittels Immun-Elektronenmikroskopie mit spezifischen anti-Kollagen-Antikörpern wie sie bereits in vorangegangenen Studien eingesetzt wurden (Nivelstein *et al.*, 1991; Nivelstein *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1996; Lusic, 2000; Ihling *et al.*, 2004; Parastatidis *et al.*, 2007), könnten unter Umständen weitere Einblicke in die Ursachen für die Unterschiede aktiver und inaktiver Plaues liefern.

Wie bereits eingangs erwähnt, konnte die unterschiedliche Aktivität der atheromatösen Läsionen verschiedener Patienten auch in der vergleichenden Analyse des Protein-, bzw. Kollagen Typ I-Profiles mittels SDS-gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Silberfärbung, bzw. anschließendem Immunoblot mit anti-Kollagen Typ I-Antikörpern nicht auf deren Gehalt an löslichen Kollagen Typ I-spezifischen  $\alpha$ -Ketten zurückgeführt werden. Trotz des Unvermögens der durch die Kombination aufeinander folgender Einfrier- und Auftauzyklen sowie einer Langzeitlagerung bei  $-20^\circ\text{C}$  generierten inaktivierten atheromatösen Läsionen eine Plättchenaggregation im PRP zu induzieren, zeigten diese Plaueproben in der Silberfärbung und im Immunoblot ein ähnliches Proteinmuster, bzw. Kollagen Typ I-Profil, wie ihre entsprechenden unbehandelten, aktiven Plauekontrollen. Der einzige erkennbare Unterschied zwischen den aktiven und inaktivierten atheromatösen Läsionen bestand in der

dunkleren Färbeintensität der Proteine der inaktivierten Plaquesproben nach Silberfärbung. Es könnte sein, dass verglichen mit den aktiven Proben bei den inaktivierten Proben ein größerer Teil des Plaquematerials in das Gel eingelaufen war. Die dunklere Färbeintensität der Spuren mit den inaktivierten Plaquesproben könnte auch durch Veränderungen der Plaquesproteine nach der Inaktivierungsbehandlung erklärt werden. Es könnte sich hierbei beispielsweise um Plaquesproteine mit oxidierten Lipiden handeln. LDL z. B. ist empfindlich gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen und wird durch diese oxidiert und aggregiert (Chopra *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002).

Zusätzlich zu den Kollagen Typ I-spezifischen  $\alpha 1(I)$ - und  $\alpha 2(I)$ -Ketten traten in den Gelspuren aller Plaquesproben im Gegensatz zu den Gelspuren des aufgereinigten löslichen Kollagen Typ I noch viele weitere Banden auf, welche in der Silberfärbung vermutlich vor allem darauf zurückgeführt werden können, dass diese Proteinfärbemethode nicht ausschließlich spezifisch für Proteine ist, sondern auch im Plaquesmaterial enthaltene Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide und Lipide visualisieren kann (Hempelmann, 1998; Lottspeich *et al.*, 1998). Darüber hinaus besteht ein Nachteil der Silberfärbung darin, dass sie trotz ihrer hohen Sensitivität (Nachweisgrenze: 5 bis 30 ng Protein) nicht besonders gut zur Quantifizierung von Proteinen geeignet ist, da sich die Färbeintensität der Proteine mit Silberionen nicht linear zur aufgetragenen Proteinmenge verhält und verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität detektiert werden (Voss *et al.*, 2000). Zur quantitativen Bestimmung der Protein-, bzw. Kollagenmenge in aktiven und inaktiven Plaqueshomogenaten wurden daher die Proteine alternativ zur Silberfärbung mittels Coomassie gefärbt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Coomassiefärbungen, welche mit einer Nachweisgrenze von 200 bis 400 ng Protein deutlich weniger sensitiv als die Silberfärbungen sind (Lottspeich *et al.*, 1998), konnten in nicht ausreichendem Maße kollagenpositive Plaquesstrukturen im Trenngel detektieren (Daten nicht gezeigt).

Das Auftreten vieler weiterer Banden in den Immunoblots der Plaqueshomogenate, welche nicht den mittels anti-Kollagen Typ I-Antikörpern detektierten Kollagen Typ I- $\alpha$ -Ketten entsprachen, könnte durch Degradationsprodukte des Kollagen Typ I erklärt werden, welche *in vivo* durch im atherosklerotischen Plaquesgewebe vorhandene Matrixmetalloproteinasen gebildet werden können (Galis *et al.*, 1994; Herman *et al.*, 2001; Galis *et al.*, 2002; Rouis, 2005; Dollery *et al.*, 2006). Der Abbau der Plaqueskollagene durch aktive Matrixmetalloproteinasen könnte sowohl zu einer Abnahme der Plaques-induzierten Thrombozytenaktivierung und Aggregation führen, falls fibrilläres, unlösliches Kollagen die plättchenaktivierende Komponente atheromatöser Läsionen darstellt, als auch eine Zunahme der Plaques-vermittelten Thrombozytenaktivierung und Aggregation stimulieren, falls die plättchenaktivierenden Bestandteile atheromatöser Läsionen kleine, sekundär quervernetzte Kollagenfragmente darstellen. Die Analyse des Vorhandenseins von Kollagen Degradationsfragmenten im Plaquesmaterial könnte somit möglicherweise Hinweise für die Ursachen der verschiedenen Aktivitäten atheromatöser



Plaques liefern. Falls die Degradation des fibrillären, unlöslichen Kollagens in den Plauehomogenaten mittels Kollagenasen wie z. B. der Matrixmetalloproteinase-8, welche hauptsächlich unlösliches, tripelhelikales Kollagen degradieren (Dollery *et al.*, 2006), zu einer Verringerung der Plaue-stimulierten Plättchenaggregation führt, dann wäre es möglich, dass inaktive Plauehomogenate diese fibrillären, unlöslichen Kollagenkomponenten nicht in ausreichender Konzentration enthalten. Falls der Abbau des Plauekollagens mittels spezifischer Gelatinasen wie z. B. der Matrixmetalloproteinase-9, welche ausschließlich denaturiertes, lösliches Kollagen degradieren (Dollery *et al.*, 2006), allerdings zu einer Abnahme der Plaue-vermittelten Thrombozytenaggregation führt, dann könnte es sein, dass vor allem kleine, quervernetzte Kollagenfragmente, welche dem hochreaktiven GPVI-Rezeptor-aktivierenden Peptid CRP („collagen-related peptide“) gleichen (Morton *et al.*, 1995; Asselin *et al.*, 1999), für die plättchenaktivierenden Eigenschaften der atheromatösen Läsionen verantwortlich sind. Inaktive Plaues würden entsprechend dieser Hypothese einen geringen Gehalt an solchen kleinen, sekundär quervernetzten Kollagenfragmenten enthalten. Zur Analyse solcher für die variierenden Plaue-Aktivitäten potentiell verantwortlichen Kollagendegradationsprodukte wurden Experimente mit Gradientengelen durchgeführt, in welchen sowohl die Kollagen Typ I- $\alpha$ -Ketten (Molekulargewicht: ca. 130-140 kDa) als auch die kleinen Degradationsfragmente (Molekulargewicht:  $\sim$ 4 kDa) dieses Kollagensubtyps visualisiert werden konnten. Die kleinen Kollagen Typ I-Fragmente traten jedoch ebenso wie die Kollagen Typ I- $\alpha$ -Ketten sowohl in den aktiven als auch in den inaktiven Plauehomogenaten auf. Letztlich blieb die Ursache für die Unterschiede in der Thrombozytenaggregation hervorgerufen durch aktive und inaktive Plauehomogenate daher unklar.

Andere potentielle Ursachen für die variierenden Aktivitäten der atheromatösen Läsionen verschiedener Patienten könnten Unterschiede in den im Plauegewebe enthaltenen Kollagensubtypen wie z. B. Kollagen Typ III oder Kollagen Typ VI darstellen. Von Kollagen Typ III ist bekannt, dass es neben Kollagen Typ I ebenfalls in vorangeschrittenen atherosklerotischen Plaues akkumuliert (Katsuda *et al.*, 2003) und eine zu Kollagen Typ I vergleichbare Adhäsion und Aggregation von Blutplättchen vermitteln kann (Saelman *et al.*, 1994; Farndale *et al.*, 2004). Kollagen Typ VI kommt ebenso in allen Stadien atherosklerotischer Läsionen vor, und trägt auf Grund seiner Resistenz gegenüber von glatten Muskelzellen und Makrophagen freigesetzten matrixdegradierenden Enzymen zur Stabilität atherosklerotischer Plaues bei (Katsuda *et al.*, 1992; van Zanten *et al.*, 1994; Katsuda *et al.*, 2003). Dieser Kollagentyp ist etwas weniger reaktiv als das fibrilläre Kollagen Typ I und induziert vor allem bei Scherraten von bis zu  $800\text{ s}^{-1}$  eine Thrombozytenadhäsion (Saelman *et al.*, 1994; Farndale *et al.*, 2004).

Erste Untersuchungen ergaben, dass die lösliche Kollagen Typ III-Plättchenaktivierungskinetik im PRP in etwa dem Verlauf der Thrombozytenaktivierung verursacht durch aktive

Plauehomogenate entsprach, so dass es möglich wäre, dass das lösliche Kollagen Typ III einen bedeutenden Plättchenstimulus atheromatöser Läsionen darstellt. Widersprüchlich zu dieser Hypothese wurde allerdings in Aggregometerversuchen im PRP sowie in den in Zusammenarbeit mit Dr. C. Schulz (Herzzentrum, München, Deutschland) durchgeführten Experimenten im Heparinblut unter arteriellen Flussbedingungen mit Scherraten von  $1000\text{ s}^{-1}$  (unveröffentlichte Daten) (Schulz *et al.*, 2006), in welchen die Plauehomogenate mit spezifischen anti-Kollagen Typ I- und anti-Kollagen Typ III-Antikörpern vorbehandelt wurden, gefunden, dass beide Kollagentypen, Kollagen Typ I und Kollagen Typ III, in etwa gleich wichtig für die Plaue-stimulierte Thrombozytenadhäsion und Aggregation waren. Darüber hinaus ergab auch der direkte Vergleich der Morphologie Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiver Strukturen aktiver und inaktiver Plauehomogenate mittels Immunfluoreszenzmikroskopie weder einen weiteren Aufschluss über die Beschaffenheit der plättchenaktivierenden Komponenten vorangeschrittener lipidreicher atherosklerotischer Läsionen, noch über die relative Bedeutung eines jeden Kollagentyps, so dass man zum jetzigen Zeitpunkt nicht sagen kann, dass Kollagen Typ I oder Kollagen Typ III eine wichtigere Rolle bei der Plaue-verursachten Plättchenaktivierung spielt. Ein Vergleich der relativen Konzentrationen von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III im Plauematerial, sowie Untersuchungen des Plaue-Kollagen Typ III-Profiles und der Plaue-Kollagen Typ III-Degradationsfragmente mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung oder Coomassiefärbung sowie anschließendem Westernblot mit anti-Kollagen Typ III-Antikörpern könnte die Rolle dieses Kollagentyps für die durch atheromatöse Läsionen stimulierte Plättchenaktivierung und Aggregation weiter aufklären.

Der Einfluss von Kollagen Typ VI-positiven Strukturen auf die Plaue-induzierte Thrombozytenaktivierung und Aggregation wurde bisher noch nicht näher analysiert, aber möglicherweise erbringt die Untersuchung der Konzentration, Verteilung, Morphologie, sowie des Kollagen Typ VI-Profiles und der Degradationsfragmente des Kollagen Typ VI weitere Einblicke in die Ursachen für die unterschiedlichen Aktivitäten der Plauehomogenate verschiedener Patienten.

Zusammengefasst konnte bei der Gegenüberstellung aktiver und inaktiver Plauematerialien also kein absolut eindeutiger Zusammenhang zwischen der Plaue-Aktivität und dem Plauekollagengehalt oder der Plauekollagenstruktur, bzw. dem Plauekollagen Typ I-Profil im Westernblot hergestellt werden. Die Ergebnisse der Aggregationsstudien und der Untersuchungen unter Fluss zeigten jedoch, dass die GPVI-Aktivierung durch das Plauekollagen essentiell für die initiale Thrombozytenaktivierung (Adhäsion, Gestaltwandel) und Aggregation ist. Des Weiteren konnte bei der Analyse der Korrelation der Plaue-Aktivität und der Bindung des Plauematerials an GPVI beobachtet werden, dass atheromatöse Läsionen, welche spezifisch mit GPVI interagierten, auch eine hohe, bzw. maximale Plättchenaktivierung

induzierten. Im Gegensatz dazu wiesen einige der thrombozytenaktivierenden Plaquehomogenate nur eine relativ geringe oder gar keine GPVI-Bindung auf. Darüber hinaus fiel die Bindung des rekombinanten GPVI-Fc-Proteins an lösliches Kollagen Typ I und Kollagen Typ III im Vergleich zur Bindung an die Plaquehomogenate deutlich stärker aus, was ebenfalls darauf hin deuten könnte, dass die Plättchenaktivierung, welche nach der Stimulation mit löslichem Kollagen Typ I und Typ III schwächer war als nach der Stimulation mit Plaque, nicht alleinig mit der GPVI-Fc-Bindung korreliert.

Die Plaquekollagen-GPVI-Plättchen-Interaktion scheint also den zentralen, möglicherweise aber nicht den einzigen Mechanismus der Blutplättchenaktivierung verursacht durch humanes lipidreiches atherosklerotisches Plaquematerial darzustellen. Außer der Zusammensetzung und Struktur des Plaquekollagens könnte auch dessen Assoziation mit anderen extrazellulären Matrixproteinen wie z. B. Glykoproteinen oder Proteoglykanen an der Aktivierung der Thrombozyten nach der Ruptur einer Läsion beteiligt sein und unter Umständen synergistisch mit der Wechselwirkung zwischen dem Plaquekollagen und dem GPVI-Rezeptor wirken. Das Glykoprotein Laminin, welches kürzlich von Inoue *et al.* als ein weiterer spezifischer GPVI-Ligand beschrieben wurde (Inoue *et al.*, 2006) und in atherosklerotischen Läsionen vorkommt (van Zanten *et al.*, 1994), könnte beispielsweise mit dem Plaquekollagen synergistisch auf GPVI wirkende Eigenschaften besitzen. Gegen einen möglichen synergistischen Effekt der kollagenpositiven und der Lamininstrukturen atheromatöser Läsionen bezüglich der Thrombozytenaktivierung spricht allerdings, dass die Plaque-induzierte Plättchenaggregation durch die Vorbehandlung der Plaquehomogenate mit anti-Kollagen Typ I- und anti-Kollagen Typ III-Antikörpern, welche gemäß den Angaben des Herstellers weniger als 1% Kreuzreaktivität mit anderen extrazellulären Matrixproteinen aufweisen, vollständig blockiert werden konnte. Wie bereits erwähnt könnten auch kleine durch Matrixmetalloproteinaseverdau gebildete und anschließend vernetzte Degradationsfragmente eines oder mehrerer Kollagentypen, welche in ihrer Struktur dem kollagenverwandten Peptid CRP gleichen, sehr gute GPVI-Stimulatoren darstellen und als aktive Plaquekomponenten in Betracht gezogen werden.

## 6. Zusammenfassung

Atheromatöse Plaques sind vulnerabel, und deren Ruptur kann die Bildung gefäßverschießender plättchen- und fibrinreicher Thromben induzieren, welche akute Myokardinfarkte und ischämische Schlaganfälle verursachen können. Bisher geht man davon aus, dass der Plaque-„*tissue factor*“ als Aktivator der extrinsischen Blutgerinnung und Stimulator der Thrombin-vermittelten Plättchenaktivierung und Aggregation die bedeutendste prothrombogene Substanz atheromatöser Läsionen darstellt.

Zu Beginn dieser Arbeit war nicht geklärt, ob und wie das lipidreiche atherosklerotische Plaquematerial auch direkt mit den Thrombozyten im Blut interagieren und auf diese Weise die Bildung eines gefäßverschießenden Plättchenthrombus induzieren kann. Die atheromatösen Läsionen von mehr als 60 verschiedenen Patienten mit Karotisstenose wurden mittels Endarterektomie isoliert und Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positive, morphologisch äußerst heterogene Strukturen in den Plaques identifiziert, welche direkt die Adhäsion, Sekretion und Aggregation von Plättchen in Puffer, Plasma und Blut stimulierten. Darüber hinaus lösten die Plaques auch die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten sowie eine plättchenbeschleunigte Fibrinbildung und Gerinnung aus. Unter arteriellen Flussbedingungen induzierten die kollagenpositiven Komponenten des Plaquematerials die Adhäsion, das Ausbreiten und die Aggregatbildung der Thrombozyten. Die Plaque-stimulierte Plättchenaggregatbildung erfolgte sehr rasch (< 5 min) und wurde in Hirudin-antikoaguliertem Blut beobachtet, was darauf schließen lässt, dass diese direkt und unabhängig von der Plaque-„*tissue factor*“-vermittelten Koagulation erfolgte und sehr wahrscheinlich für die initiale und schnelle Thrombusbildung nach einer Plaqueruptur *in vivo* von Bedeutung ist.

Sowohl die Ergebnisse mit humanen, als auch mit murinen Blutplättchen wiesen auf eine essentielle Rolle morphologisch diverser Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiver Plaquestrukturen und des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI bei der durch atheromatöse Läsionen stimulierten Plättchenformveränderung, Adhäsion, Ausbreitung, Sekretion und Aggregation im statischen System und unter arteriellen Flussbedingungen hin. Der zweite bedeutende thrombozytäre Kollagenrezeptor, das Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , schien hingegen nicht an der durch die atheromatösen Läsionen hervorgerufenen Plättchenadhäsion und Aggregation im statischen System und unter Fluss beteiligt zu sein. Diese Beobachtungen führten zur Annahme, dass die Verabreichung von z. B. spezifischen anti-GPVI-Antikörpern oder löslichem GPVI-Protein, welche die Interaktion des thrombozytären GPVI-Rezeptors mit dessen Liganden im Plaquetewebe (Kollagen Typ I/Typ III) inhibieren, viel versprechende neue und effektive antithrombotische Strategien zur frühen Prävention kardio- und cerebrovaskulärer Gefäßverschlüsse darstellen könnten.

Der thrombozytäre VWF-Rezeptor GPIIb/IIIa war weder im gerührten System, noch unter Fluss mit niedrigeren Scherraten von  $500 \text{ s}^{-1}$  von Bedeutung für die durch atheromatöse Plaques induzierte Plättchenaggregation im Blut. Unter arteriellen Flussbedingungen mit höheren Scherraten von  $1500 \text{ s}^{-1}$  allerdings resultierte die Blockade von GPIIb/IIIa in einer starken Reduktion ( $77 \pm 5\%$ ) der Plaque-stimulierten Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung. Dies lässt darauf schließen, dass unter diesen Strömungsbedingungen auch die Interaktion des VWF mit dem Plättchen-GPIIb/IIIa-Rezeptor eine wichtige Rolle für die Thrombusbildung nach Plaqueruptur spielt.

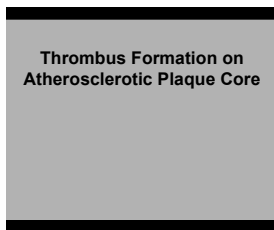
Sowohl die ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 (P2Y<sub>1</sub>-Antagonist) und AR-C69931MX (P2Y<sub>12</sub>-Antagonist), als auch Aspirin<sup>®</sup> konnten die Plaque-vermittelte Thrombozytenaggregation in gerührtem PRP und Blut signifikant verringern, wobei die Kombination aller drei Plättchenhemmer am effektivsten wirkte und die Plaque-induzierte Aggregation vollständig inhibierte. Unter arteriellem Fluss (Scherraten:  $1500 \text{ s}^{-1}$ ) wirkten MRS1279, AR-C69931MX sowie deren Kombination allerdings deutlich weniger effizient als im statischen System und reduzierten die Plaque-stimulierte Plättchenaggregatbildung nur um  $35 \pm 14\%$ ,  $32 \pm 13\%$  und  $58 \pm 12\%$ . Überraschender Weise führte die Zugabe von Aspirin<sup>®</sup> unter Fluss zu keiner signifikanten Reduktion der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregatbildung. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ADP-Rezeptor-Antagonisten sowie Aspirin<sup>®</sup> die Bildung eines gefäßverschießenden Thrombus nach Plaqueruptur eher ineffizient hemmen dürften.

Die atheromatösen Plaques verschiedener Patienten wiesen unterschiedliche thrombozytenaktivierende Eigenschaften auf, welche weder auf deren variierenden Gehalt an löslichem Kollagen, noch auf die unterschiedliche Morphologie der Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-positiven Plaquekomponenten zurückgeführt werden konnte. Weiterhin verhielt sich sowohl fibrilläres als auch lösliches Kollagen Typ I und Kollagen Typ III anders als das Plaquematerial bezüglich der Plättchenaggregation im PRP. Die Bindung des thrombozytären GPVI-Rezeptors an das Plaquematerial stellte die Voraussetzung für die Plättchenaktivierung der Plaques dar, wobei jedoch keine eindeutige positive Korrelation zwischen der GPVI-Bindung und der Aktivität der atheromatösen Läsionen verschiedener Patienten hergestellt werden konnte. Der Grund für die unterschiedliche Thrombozytenaktivierung induziert durch das Plaquematerial verschiedener Patienten bleibt letztlich also unklar. Die weitere Erforschung möglicher Ursachen für die unterschiedlichen plättchenaktivierenden Eigenschaften der lipidreichen atheromatösen Läsionen verschiedener Patienten stellt eine interessante und vor allem klinisch relevante zukünftige Fragestellung dar.

# Anhang

## Inhalt der Video-CD

Auf der Video-CD befindet sich die komprimierte Version des im Abschnitt 4.2.3 des Ergebnisteils beschriebenen Films der Adhäsion und Aggregatbildung von Thrombozyten an kollagenpositiven Plaquestrukturen unter arteriellen Flussbedingungen.



**Film 1. Adhäsion und Aggregatbildung von Thrombozyten an kollagenpositiven Plaquestrukturen unter arteriellen Flussbedingungen (komprimierte Version, 21 MB).** Humanes Hirudin-antikoaguliertes Blut wurde für eine Dauer von 10 min bei 37°C in einer Parallel-Platten-Fluskammer mit einer Scherrate von 1500 s<sup>-1</sup> über Plaque-beschichtete Glasoberflächen, in welchen die Kollagen Typ III-positiven Strukturen fluoreszenzmarkiert waren, perfundiert. In dieser Echtzeitvideosequenz wird die Plaque-stimulierte Thrombusbildung zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Hellfeld (BF für „*bright field*“)-, Fluoreszenz (Fl)- und Reflektions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM) dargestellt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts.

Zeitpunkt t = 0 min: Echtzeitvisualisierung des Plaquematerials vor Beginn der Perfusion mittels BF- und Fl-Mikroskopie sowie der RIKM-Technik. Im Gegensatz zu den BF- und Fl-Aufnahmen können mittels RIKM-Technik sowohl substratnahe (dunkelgraue Bereiche, Abstand ca. 10 nm), als auch substratferne (weiße Bereiche, Abstand ca. 20-30 nm) Plaquestrukturen dargestellt werden.

Zeitpunkt t = 3 min: Echtzeitvisualisierung der Thrombozyten-adhäsion 3 min nach Beginn der Perfusion. Einzelne Plättchen (grau, BF) lagern sich am flussabwärts gelegenen Ende der kollagenpositiven Plaquestrukturen (weiß, Fl) an, rekrutieren weitere Thrombozyten und wachsen zu größeren Aggregaten heran.

Zeitpunkt t = 5 min: Echtzeitvisualisierung der Thrombozyten-aggregation 5 min nach Beginn der Perfusion. Große Plättchen-aggregate (grau, BF) haben sich gebildet, welche über eine Fläche aus ausgebreiteten Thrombozyten („*spread platelets*“) nah am Plaquesubstrat (RIKM-Technik: dunkelgraue Bereiche, Abstand ca. 10 nm) am kollagenpositiven Plaquematerial (weiß, Fl) verankert sind.

## Literaturverzeichnis

Abi-Younes, S., Sauty, A., Mach, F., Sukhova, G. K., Libby, P. and Luster, A. D. (2000) The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 86, 131-138.

Alber, H. F., Suessenbacher, A. and Weidinger, F. (2005) The role of inflammation in the pathophysiology of acute coronary syndromes. *Wien Klin Wochenschr* 117, 445-455.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. New York: Taylor & Francis Group.

Alkhamis, T. M., Beissinger, R. L. and Chediak, J. R. (1990) Artificial surface effect on red blood cells and platelets in laminar shear flow. *Blood* 75, 1568-1575.

Amento, E. P., Ehsani, N., Palmer, H. and Libby, P. (1991) Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 11, 1223-1230.

Andrews, R. K., Gardiner, E. E., Shen, Y. and Berndt, M. C. (2004) Platelet interactions in thrombosis. *IUBMB Life* 56, 13-18.

Andrews, R. K., Gardiner, E. E., Shen, Y., Whisstock, J. C. and Berndt, M. C. (2003) Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 1170-1174.

"Antiplatelet-Trialists-Collaboration-meta-analysis". (1994) Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--III: Reduction in venous thrombosis and pulmonary embolism by antiplatelet prophylaxis among surgical and medical patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration. *Bmj* 308, 235-246.

"Antithrombotic-Trialists-Collaboration". (2002) Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Bmj* 324, 71-86.

Arai, M., Yamamoto, N., Moroi, M., Akamatsu, N., Fukutake, K. and Tanoue, K. (1995) Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br J Haematol* 89, 124-130.

Ardissino, D., Merlini, P. A., Ariens, R., Coppola, R., Bramucci, E. and Mannucci, P. M. (1997) Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 349, 769-771.

Arthur, J. F., Gardiner, E. E., Matzaris, M., Taylor, S. G., Wijeyewickrema, L., Ozaki, Y., Kahn, M. L., Andrews, R. K. and Berndt, M. C. (2005) Glycoprotein VI is associated with GPIb-IX-V on the membrane of resting and activated platelets. *Thromb Haemost* 93, 716-723.

Asselin, J., Knight, C. G., Farndale, R. W., Barnes, M. J. and Watson, S. P. (1999) Monomeric (glycine-proline-hydroxyproline)<sub>10</sub> repeat sequence is a partial agonist of the platelet collagen receptor glycoprotein VI. *Biochem J* 339, 413-418.

Auger, J. M., Kuijpers, M. J., Senis, Y. A., Watson, S. P. and Heemskerk, J. W. (2005) Adhesion of human and mouse platelets to collagen under shear: a unifying model. *Faseb J* 19, 825-827.

Awtry, E. H. and Loscalzo, J. (2000) Aspirin. *Circulation* 101, 1206-1218.

Badimon, J. J., Lettino, M., Toschi, V., Fuster, V., Berrozpe, M., Chesebro, J. H. and Badimon, L. (1999) Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation* 99, 1780-1787.

Baigent, C., Collins, R., Appleby, P., Parish, S., Sleight, P. and Peto, R. (1998) ISIS-2: 10 year survival among patients with suspected acute myocardial infarction in randomised comparison of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither. The ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Bmj* 316, 1337-1343.

Bailey, A. J., Robins, S. P. and Balian, G. (1974) Biological significance of the intermolecular crosslinks of collagen. *Nature* 251, 105-109.

Baker, J., Griggs, R. K., Falati, S. and Poole, A. W. (2004) GPIb potentiates GPVI-induced responses in human platelets. *Platelets* 15, 207-214.

Balbona, K., Tran, H., Godyna, S., Ingham, K. C., Strickland, D. K. and Argraves, W. S. (1992) Fibulin binds to itself and to the carboxyl-terminal heparin-binding region of fibronectin. *J Biol Chem* 267, 20120-20125.

Ballem, P. J., Belzberg, A., Devine, D. V., Lyster, D., Spruston, B., Chambers, H., Doubroff, P. and Mikulash, K. (1992) Kinetic studies of the mechanism of thrombocytopenia in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 327, 1779-1784.



Banner, D. W., D'Arcy, A., Chene, C., Winkler, F. K., Guha, A., Konigsberg, W. H., Nemerson, Y. and Kirchhofer, D. (1996) The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* 380, 41-46.

Barnes, M. J. (1985) Collagens in atherosclerosis. *Coll Relat Res* 5, 65-97.

Barnes, M. J. and Farndale, R. W. (1999) Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol* 34, 513-525.

Barnes, M. J., Knight, C. G. and Farndale, R. W. (1998) The collagen-platelet interaction. *Curr Opin Hematol* 5, 314-320.

Barstad, R. M., Orvim, U., Hamers, M. J., Tjonnfjord, G. E., Brosstad, F. R. and Sakariassen, K. S. (1996) Reduced effect of aspirin on thrombus formation at high shear and disturbed laminar blood flow. *Thromb Haemost* 75, 827-832.

Bauer, M., Retzer, M., Wilde, J. I., Maschberger, P., Essler, M., Aepfelbacher, M., Watson, S. P. and Siess, W. (1999) Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact human platelets. *Blood* 94, 1665-1672.

Beck, K. and Brodsky, B. (1998) Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the alpha-helical coiled coil. *J Struct Biol* 122, 17-29.

Behan, M. W. and Storey, R. F. (2004) Antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *Postgrad Med J* 80, 155-164.

Belton, O. A., Duffy, A., Toomey, S. and Fitzgerald, D. J. (2003) Cyclooxygenase isoforms and platelet vessel wall interactions in the apolipoprotein E knockout mouse model of atherosclerosis. *Circulation* 108, 3017-3023.

Bennett, J. S. (2001) Novel platelet inhibitors. *Annu Rev Med* 52, 161-184.

Bennett, J. S., Chan, C., Vilaire, G., Mousa, S. A. and DeGrado, W. F. (1997) Agonist-activated alphavbeta3 on platelets and lymphocytes binds to the matrix protein osteopontin. *J Biol Chem* 272, 8137-8140.

Bergmeier, W., Bouvard, D., Eble, J. A., Mokhtari-Nejad, R., Schulte, V., Zirngibl, H., Brakebusch, C., Fässler, R. and Nieswandt, B. (2001) Rhodocytin (aggrexin) activates platelets lacking alpha2beta1 integrin, glycoprotein VI, and the ligand-binding domain of glycoprotein Ibalpha. *J Biol Chem* 276, 25121-25126.

Bernardo, A., Bergeron, A. L., Sun, C. W., Guchhait, P., Cruz, M. A., Lopez, J. A. and Dong, J. F. (2004) Von Willebrand factor present in fibrillar collagen enhances platelet adhesion to collagen and collagen-induced platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 2, 660-669.

Bertrand, M. E., Rupprecht, H. J., Urban, P. and Gershlick, A. H. (2000) Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting : the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation* 102, 624-629.

Beumer, S., Heijnen, H. F., MJ, I. J., Orlando, E., de Groot, P. G. and Sixma, J. J. (1995) Platelet adhesion to fibronectin in flow: the importance of von Willebrand factor and glycoprotein Ib. *Blood* 86, 3452-3460.

Beumer, S., MJ, I. J., de Groot, P. G. and Sixma, J. J. (1994) Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoproteins GP IIb/IIIa and VLA-5, and inhibition by heparin. *Blood* 84, 3724-3733.

Bhatt, D. L., Fox, K. A., Hacke, W., Berger, P. B., Black, H. R., Boden, W. E., Cacoub, P., Cohen, E. A., Creager, M. A., Easton, J. D., Flather, M. D., Haffner, S. M., Hamm, C. W., Hankey, G. J., Johnston, S. C., Mak, K. H., Mas, J. L., Montalescot, G., Pearson, T. A., Steg, P. G., Steinhubl, S. R., Weber, M. A., Brennan, D. M., Fabry-Ribaudo, L., Booth, J. and Topol, E. J. (2006) Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* 354, 1706-1717.

Bikou, O., Penz, S., Pandey, D., Barndl, R. and Siess, W. (2006) The atherosclerotic plaque components lysophosphatidic acid and collagen synergistically activate platelets. *Atherosclerosis Supplements* 7(3S), 30.

Bini, A., Fenoglio, J. J., Jr., Mesa-Tejada, R., Kudryk, B. and Kaplan, K. L. (1989) Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis. Use of monoclonal antibodies. *Arteriosclerosis* 9, 109-121.

Blache, D., Becchi, M. and Davignon, J. (1995) Occurrence and biological effects of cholesteryl sulfate on blood platelets. *Biochim Biophys Acta* 1259, 291-296.

Blake, G. J. and Ridker, P. M. (2003) C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 41, 37S-42S.

Blum, H., Beier, H. and Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.

Bombeli, T., Schwartz, B. R. and Harlan, J. M. (1998) Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta1 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med* 187, 329-339.

Bonnefoy, A., Liu, Q., Jerome, W. G., Legrand, C. and Frojmovic, M. M. (2001) Platelets in suspension require preactivation to adhere to immobilized fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci* 936, 459-463.

Boren, J., Olin, K., Lee, I., Chait, A., Wight, T. N. and Innerarity, T. L. (1998) Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest* 101, 2658-2664.

Born, G. V. and Cross, M. J. (1963) Effect of adenosine diphosphate on the concentration of platelets in circulating blood. *Nature* 197, 974-976.

Bornstein, P. (2001) Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest* 107, 929-934.

Brandl, R., Richter, T., Haug, K., Wilhelm, M. G., Maurer, P. C. and Nathrath, W. (1997) Topographic analysis of proliferative activity in carotid endarterectomy specimens by immunocytochemical detection of the cell cycle-related antigen Ki-67. *Circulation* 96, 3360-3368.

Calderwood, D. A. (2004) Integrin activation. *J Cell Sci* 117, 657-666.

Camerer, E., Kolsto, A. B. and Prydz, H. (1996) Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 81, 1-41.

Canty, E. G. and Kadler, K. E. (2005) Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 118, 1341-1353.

"CAPRIE-study". (1996) A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 348, 1329-1339.

Cardinal, D. C. and Flower, R. J. (1980) The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 3, 135-158.

Cattaneo, M. (2004) Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1980-1987.

Cattaneo, M. (2007) Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 5, 45-55.

Cattaneo, M., Lecchi, A., Lombardi, R., Gachet, C. and Zighetti, M. L. (2000) Platelets from a patient heterozygous for the defect of P2CYC receptors for ADP have a secretion defect despite normal thromboxane A2 production and normal granule stores: further evidence that some cases of platelet 'primary secretion defect' are heterozygous for a defect of P2CYC receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, E101-106.

Cauwenberghs, N., Meiring, M., Vauterin, S., van Wyk, V., Lamprecht, S., Roodt, J. P., Novák, L., Harsfalvi, J., Deckmyn, H. and Kotzé, H. F. (2000) Antithrombotic effect of platelet glycoprotein Ib-blocking monoclonal antibody Fab fragments in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1347-1353.

Cauwenberghs, N., Vanhoorelbeke, K., Vauterin, S., Westra, D. F., Romo, G., Huizinga, E. G., Lopez, J. A., Berndt, M. C., Harsfalvi, J. and Deckmyn, H. (2001) Epitope mapping of inhibitory antibodies against platelet glycoprotein Iba reveals interaction between the leucine-rich repeat N-terminal and C-terminal flanking domains of glycoprotein Iba. *Blood* 98, 652-660.

Cazenave, J. P., Mulvihill, J. N., Sutter-Bay, A., Gachet, C. and Beretz, A. (1993) A Centrifugation Technique for the Preparation of Suspensions of Non Activated Human Platelets. *Kluwer Academic Publishers* 431-439.

Chen, J., Diacovo, T. G., Grenache, D. G., Santoro, S. A. and Zutter, M. M. (2002) The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *Am J Pathol* 161, 337-344.

Chen, J. and Lopez, J. A. (2005) Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. *Microcirculation* 12, 235-246.

Chernoff, A., Levine, R. F. and Goodman, D. S. (1980) Origin of platelet-derived growth factor in megakaryocytes in guinea pigs. *J Clin Invest* 65, 926-930.

Chew, D. P., Bhatt, D. L., Sapp, S. and Topol, E. J. (2001) Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: a meta-analysis of phase III multicenter randomized trials. *Circulation* 103, 201-206.

Cho, J. and Mosher, D. F. (2006) Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost* 4, 1461-1469.

Chopra, M., Fitzsimons, P., Hopkins, M. and Thurnham, D. I. (2001) Dialysis and gel filtration of isolated low density lipoproteins do not cause a significant loss of low density lipoprotein tocopherol and carotenoid concentration. *Lipids* 36, 205-209.

Choy, P. C., Siow, Y. L., Mymin, D. and O, K. (2004) Lipids and atherosclerosis. *Biochem Cell Biol* 82, 212-224.

Chronos, N. A., Wilson, D. J., Janes, S. L., Hutton, R. A., Buller, N. P. and Goodall, A. H. (1994) Aspirin does not affect the flow cytometric detection of fibrinogen binding to, or release of alpha-granules or lysosomes from, human platelets. *Clin Sci (Lond)* 87, 575-580.

Clemetson, J. M., Polgar, J., Magnenat, E., Wells, T. N. and Clemetson, K. J. (1999) The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcalphaR and the natural killer receptors. *J Biol Chem* 274, 29019-29024.

Clemetson, K. J. (1995) Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb Haemost* 74, 111-116.

Clemetson, K. J. and Clemetson, J. M. (2001) Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 86, 189-197.

Clemetson, K. J., McGregor, J. L., James, E., Dechavanne, M. and Luscher, E. F. (1982) Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J Clin Invest* 70, 304-311.

Coller, B. S. (1995) Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 92, 2373-2380.

Coller, B. S., Beer, J. H., Scudder, L. E. and Steinberg, M. H. (1989) Collagen-platelet interactions: evidence for a direct interaction of collagen with platelet GPIa/IIa and an indirect interaction with platelet GPIIb/IIIa mediated by adhesive proteins. *Blood* 74, 182-192.

Collier, J. G. and Flower, R. J. (1971) Effect of aspirin on human seminal prostaglandins. *Lancet* 2, 852-853.

Collins, R. G., Velji, R., Guevara, N. V., Hicks, M. J., Chan, L. and Beaudet, A. L. (2000) P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 191, 189-194.

Conley, P. B. and Delaney, S. M. (2003) Scientific and therapeutic insights into the role of the platelet P2Y<sub>12</sub> receptor in thrombosis. *Curr Opin Hematol* 10, 333-338.

Corti, R. and Badimon, J. J. (2002a) Biologic aspects of vulnerable plaque. *Curr Opin Cardiol* 17, 616-625.

Corti, R., Farkouh, M. E. and Badimon, J. J. (2002b) The vulnerable plaque and acute coronary syndromes. *Am J Med* 113, 668-680.

Cosemans, J. M., Kuijpers, M. J., Lecut, C., Loubele, S. T., Heeneman, S., Jandrot-Perrus, M. and Heemskerk, J. W. (2005) Contribution of platelet glycoprotein VI to the thrombogenic effect of collagens in fibrous atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 181, 19-27.

Coukell, A. J. and Markham, A. (1997) Clopidogrel. *Drugs* 54, 745-750; discussion 751.

Craven, L. L. (1953) Experiences with aspirin (Acetylsalicylic acid) in the nonspecific prophylaxis of coronary thrombosis. *Miss Valley Med J* 75, 38-44.

Cullen, P., Baetta, R., Bellosta, S., Bernini, F., Chinetti, G., Cignarella, A., von Eckardstein, A., Exley, A., Goddard, M., Hofker, M., Hurt-Camejo, E., Kanters, E., Kovanen, P., Lorkowski, S., McPeath, W., Weitkamp, B. and de Winther, M. (2003) Rupture of the Atherosclerotic Plaque: Does a Good Animal Model Exist? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 529-534.

Dahlback, B. (2000) Blood coagulation. *Lancet* 355, 1627-1632.

Davies, M. J. and Thomas, A. (1984) Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med* 310, 1137-1140.

de Boer, O. J., van der Wal, A. C., Teeling, P. and Becker, A. E. (1999) Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc Res* 41, 443-449.

De Meyer, G. R., Hoylaerts, M. F., Kockx, M. M., Yamamoto, H., Herman, A. G. and Bult, H. (1999) Intimal deposition of functional von Willebrand factor in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 2524-2534.

De Meyer, S. F., Vanhoorelbeke, K., Ulrichs, H., Staelens, S., Feys, H. B., Salles, I., Fontayne, A. and Deckmyn, H. (2006) Development of monoclonal antibodies that inhibit platelet adhesion or aggregation as potential anti-thrombotic drugs. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 6, 191-207.

Dent, J. A., Berkowitz, S. D., Ware, J., Kasper, C. K. and Ruggeri, Z. M. (1990) Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6306-6310.

Depraetere, H., Kerekes, A. and Deckmyn, H. (1999) The collagen-binding leech products rLAPP and calin prevent both von Willebrand factor and alpha2beta1(GPIa/IIa)-I-domain binding to collagen in a different manner. *Thromb Haemost* 82, 1160-1163.

Depraetere, H., Wille, C., Gansemans, Y., Stanssens, P., Lauwereys, M., Baruch, D., De Reys, S. and Deckmyn, H. (1997) The integrin alpha 2 beta 1 (GPIa/IIa)-I-domain inhibits platelet-collagen interaction. *Thromb Haemost* 77, 981-985.

Dickeson, S. K., Mathis, N. L., Rahman, M., Bergelson, J. M. and Santoro, S. A. (1999) Determinants of ligand binding specificity of the alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins. *J Biol Chem* 274, 32182-32191.

Dogné, J.-M., de Leval, X., Delarge, J., David, J.-L. and Maserell, B. (2000) New Trends in Thromboxane and Prostacyclin Modulators. *Curr Med Chem* 7, 609-628.

Dogné, J.-M., Hanson, J., de Leval, X., Pratico, D., Pace-Asciak, C. R., Pirotte, B. and Ruan, K.-H. (2006) From the Design to the Clinical Application of Thromboxane Modulators. *Curr Pharm Des* 12, 903-923.

Dollery, C. M. and Libby, P. (2006) Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res* 69, 625-635.

Dong, J. F., Berndt, M. C., Schade, A., McIntire, L. V., Andrews, R. K. and Lopez, J. A. (2001) Ristocetin-dependent, but not botrocetin-dependent, binding of von Willebrand factor to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex correlates with shear-dependent interactions. *Blood* 97, 162-168.

Dong, Z. M., Chapman, S. M., Brown, A. A., Frenette, P. S., Hynes, R. O. and Wagner, D. D. (1998) The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 102, 145-152.

Dörmann, D., Clemetson, K. J., Navdaev, A., Kehrel, B. E. and Clemetson, K. J. (2001) Alboaggregin A activates platelets by mechanism involving glycoprotein VI as well as glycoprotein Ib. *Blood* 97, 929-936.

Drake, M. P., Davison, P. F., Bump, S. and Schmitt, F. O. (1966) Action of proteolytic enzymes on tropocollagen and insoluble collagen. *Biochemistry* 5, 301-312.

Drayer, N. M. and Lieberman, S. (1967) Isolation of cholesterol sulfate from human aortas and adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 27, 136-139.

Du, X. P., Magnenat, E., Wells, T. N. and Clemetson, K. J. (2002) Alboluxin, a snake C-type lectin from *Trimeresurus albolabris* venom is a potent platelet agonist acting via GPIb and GPVI. *Thromb Haemost* 87, 692-698.

Egbertson, M. S., Chang, C. T., Duggan, M. E., Gould, R. J., Halczenko, W., Hartman, G. D., Laswell, W. L., Lynch, J. J., Jr., Lynch, R. J., Manno, P. D. and et al. (1994) Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 2. Optimization of a tyrosine template as a mimic for Arg-Gly-Asp. *J Med Chem* 37, 2537-2551.

Eikelboom, J. W. and Hankey, G. J. (2004) Failure of aspirin to prevent atherothrombosis: potential mechanisms and implications for clinical practice. *Am J Cardiovasc Drugs* 4, 57-67.

Eilertsen, K.-E. and Osterud, B. (2005) The role of blood cells and their microparticles in blood coagulation. *Biochem Soc Trans* 33, 418-422.

Emsley, J., Knight, C. G., Farndale, R. W. and Barnes, M. J. (2004) Structure of the integrin alpha2beta1-binding collagen peptide. *J Mol Biol* 335, 1019-1028.

Emsley, J., Knight, C. G., Farndale, R. W., Barnes, M. J. and Liddington, R. C. (2000) Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell* 101, 47-56.

Engelmann, B. (2006) Initiation of coagulation by tissue factor carriers in blood. *Blood Cells Mol Dis* 36, 188-190.

Engelmann, B., Luther, T. and Muller, I. (2003) Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *Thromb Haemost* 89, 3-8.

Ezumi, Y., Kodama, K., Uchiyama, T. and Takayama, H. (2002) Constitutive and functional association of the platelet collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma-chain complex with membrane rafts. *Blood* 99, 3250-3255.

Falati, S., Edmead, C. E. and Poole, A. W. (1999) Glycoprotein Ib-V-IX, a receptor for van Willebrand factor, couples physically and functionally to the Fc receptor gamma-chain, Fyn, and Lyn to activate human platelets. *Blood* 94, 1648-1656.

Falcon, C., Arnout, J. and Vermylen, J. (1989) Platelet aggregation in whole blood--studies with a platelet counting technique--methodological aspects and some applications. *Thromb Haemost* 61, 423-428.



Farb, A., Burke, A. P., Tang, A. L., Liang, T. Y., Mannan, P., Smialek, J. and Virmani, R. (1996) Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* 93, 1354-1363.

Farndale, R. W. (2006) Collagen-induced platelet activation. *Blood Cells Mol Dis* 36, 162-165.

Farndale, R. W., Sixma, J. J., Barnes, M. J. and de Groot, P. G. (2004) The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost* 2, 561-573.

Farnum, M. and Zukoski, C. (1999) Effect of glycerol on the interactions and solubility of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biophys J* 76, 2716-2726.

Favaloro, E. J. (2000) Detection of von Willebrand disorder and identification of qualitative von Willebrand factor defects. *Am J Clin Pathol* 114, 608-618.

Fernandez-Ortiz, A., Badimon, J. J., Falk, E., Fuster, V., Meyer, B., Mailhac, A., Weng, D., Shah, P. K. and Badimon, L. (1994) Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol* 23, 1562-1569.

Fitzmaurice, M., Bordagaray, J. O., Engelmann, G. L., Richards-Kortum, R., Kolubayev, T., Feld, M. S., Ratliff, N. B. and Kramer, J. R. (1989) Argon ion laser-excited autofluorescence in normal and atherosclerotic aorta and coronary arteries: morphologic studies. *Am Heart J* 118, 1028-1038.

Folts, J. D., Schafer, A. I., Loscalzo, J., Willerson, J. T. and Muller, J. E. (1999) A perspective on the potential problems with aspirin as an antithrombotic agent: a comparison of studies in an animal model with clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 33, 295-303.

Fox, S. C., Burgess-Wilson, M., Heptinstall, S. and Mitchell, J. R. (1982) Platelet aggregation in whole blood determined using the Ultra-Flo 100 Platelet Counter. *Thromb Haemost* 48, 327-329.

Frenette, P. S., Denis, C. V., Weiss, L., Jurk, K., Subbarao, S., Kehrel, B., Hartwig, J. H., Vestweber, D. and Wagner, D. D. (2000) P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 191, 1413-1422.

Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J. and Chesebro, J. H. (1992a) The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 326, 242-250.

Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J. and Chesebro, J. H. (1992b) The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 326, 310-318.

Gachet, C. (2006) Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46, 277-300.

Galis, Z. S. and Khatri, J. J. (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90, 251-262.

Galis, Z. S., Sukhova, G. K., Lark, M. W. and Libby, P. (1994) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94, 2493-2503.

Garcia Rodriguez, L. A., Varas, C. and Patrono, C. (2000) Differential effects of aspirin and non-aspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs in the primary prevention of myocardial infarction in postmenopausal women. *Epidemiology* 11, 382-387.

Gartner, T. K. and Bennett, J. S. (1985) The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets. *J Biol Chem* 260, 11891-11894.

Gawaz, M. (1999) *Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Hererkrankung*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Gawaz, M. (2006) Platelets in the onset of atherosclerosis. *Blood Cells Mol Dis* 36, 206-210.

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

Gawaz, M., Langer, H. and May, A. E. (2005) Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 115, 3378-3384.

Gawaz, M., Neumann, F. J., Dickfeld, T., Reininger, A., Adelsberger, H., Gebhardt, A. and Schomig, A. (1997) Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 96, 1809-1818.

Gear, A. R. and Camerini, D. (2003) Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation* 10, 335-350.

Gelse, K., Poschl, E. and Aigner, T. (2003) Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1531-1546.

Gennero, I., Xuereb, J. M., Simon, M. F., Girolami, J. P., Bascands, J. L., Chap, H., Boneu, B. and Sie, P. (1999) Effects of lysophosphatidic acid on proliferation and cytosolic Ca<sup>++</sup> of human adult vascular smooth muscle cells in culture. *Thromb Res* 94, 317-326.

George, J. N. (2000) Platelets. *Lancet* 355, 1531-1539.

Gerrard, J. M., Kindom, S. E., Peterson, D. A. and White, J. G. (1979) Lysophosphatidic acids. II. Interaction of the effects of adenosine diphosphate and lysophosphatidic acids in dog, rabbit, and human platelets. *Am J Pathol* 97, 531-547.

Gibbins, J. M. (2004) Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci* 117, 3415-3425.

Gibson, C. M., Goel, M., Cohen, D. J., Piana, R. N., Deckelbaum, L. I., Harris, K. E. and King, S. B., 3rd. (1998) Six-month angiographic and clinical follow-up of patients prospectively randomized to receive either tirofiban or placebo during angioplasty in the RESTORE trial. Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcomes and Restenosis. *J Am Coll Cardiol* 32, 28-34.

Gimbrone, M. A., Jr. (1999) Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol* 155, 1-5.

Goto, S., Ikeda, Y., Saldivar, E. and Ruggeri, Z. M. (1998) Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest* 101, 479-486.

Goto, S., Tamura, N. and Handa, S. (2002a) Effects of adenosine 5'-diphosphate (ADP) receptor blockade on platelet aggregation under flow. *Blood* 99, 4644-4645; author reply 4645-4646.

Goto, S., Tamura, N., Handa, S., Arai, M., Kodama, K. and Takayama, H. (2002b) Involvement of glycoprotein VI in platelet thrombus formation on both collagen and von Willebrand factor surfaces under flow conditions. *Circulation* 106, 266-272.

Goto, S., Tamura, N., Ishida, H. and Ruggeri, Z. M. (2006) Dependence of platelet thrombus stability on sustained glycoprotein IIb/IIIa activation through adenosine 5'-diphosphate receptor stimulation and cyclic calcium signaling. *J Am Coll Cardiol* 47, 155-162.

Grant, M. B., Wargovich, T. J., Ellis, E. A., Tarnuzzer, R., Cabarello, S., Estes, K., Rossing, M., Spoerri, P. E. and Pepine, C. (1996) Expression of IGF-I, IGF-I receptor and IGF binding proteins-1, -2, -3 -4 and -5 in human atherectomy specimens. *Regul Pept.* 67, 137-144.

Guettier, C., Hinglais, N., Bruneval, P., Kazatchkine, M., Bariety, J. and Camilleri, J. P. (1989) Immunohistochemical localization of S protein/vitronectin in human atherosclerotic versus arteriosclerotic arteries. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 414, 309-313.

Guyton, J. R. and Klemp, K. F. (1996) Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 4-11.

Haley, K. J., Lilly, C. M., Yang, J. H., Feng, Y., Kennedy, S. P., Turi, T. G., Thompson, J. F., Sukhova, G. H., Libby, P. and Lee, R. T. (2000) Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation* 102, 2185-2189.

Hankey, G. J. and Eikelboom, J. W. (2004) Aspirin resistance. *Bmj* 328, 477-479.

Hanson, S. R. and Sakariassen, K. S. (1998) Blood flow and antithrombotic drug effects. *Am Heart J* 135, S132-145.

Hansson, G. K. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352, 1685-1695.

Hansson, G. K., Hellstrand, M., Rymo, L., Rubbia, L. and Gabbiani, G. (1989) Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J Exp Med* 170, 1595-1608.

Hansson, G. K. and Libby, P. (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 6, 508-519.

Harrington, R. A. (1997) Design and methodology of the PURSUIT trial: evaluating eptifibatid for acute ischemic coronary syndromes. Platelet Glycoprotein IIb-IIIa in Unstable Angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy. *Am J Cardiol* 80, 34B-38B.

Hartwig, J. and Italiano, J., Jr. (2003) The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* 1, 1580-1586.

Haseruck, N., Erl, W., Pandey, D., Tigyi, G., Ohlmann, P., Ravanat, C., Gachet, C. and Siess, W. (2004) The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. *Blood* 103, 2585-2592.

Hass, W. K., Easton, J. D., Adams, H. P., Jr., Pryse-Phillips, W., Molony, B. A., Anderson, S. and Kamm, B. (1989) A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients. Ticlopidine Aspirin Stroke Study Group. *N Engl J Med* 321, 501-507.

Hatakeyama, K., Asada, Y., Marutsuka, K., Sato, Y., Kamikubo, Y. and Sumiyoshi, A. (1997) Localization and activity of tissue factor in human aortic atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 133, 213-219.

Hechler, B., Cattaneo, M. and Gachet, C. (2005) The P2 receptors in platelet function. *Semin Thromb Hemost* 31, 150-161.

Heemskerk, J. W., Bevers, E. M. and Lindhout, T. (2002) Platelet Activation and Blood Coagulation. *Thromb Haemost* 88, 186-193.

Hempelmann, E. (1998) Mechanism of silver stain. *Electrophoresis Forum* 99, 118.

Herman, M. P., Sukhova, G. K., Libby, P., Gerdes, N., Tang, N., Horton, D. B., Kilbride, M., Breitbart, R. E., Chun, M. and Schonbeck, U. (2001) Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation* 104, 1899-1904.

Hindriks, G., Ijsseldijk, M. J., Sonnenberg, A., Sixma, J. J. and de Groot, P. G. (1992) Platelet adhesion to laminin: role of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions, shear rate, and platelet membrane glycoproteins. *Blood* 79, 928-935.

Hoeks, A. P., Samijo, S. K., Brands, P. J. and Reneman, R. S. (1995) Noninvasive determination of shear-rate distribution across the arterial lumen. *Hypertension* 26, 26-33.

Holme, P. A., Orvim, U., Hamers, M. J., Solum, N. O., Brosstad, F. R., Barstad, R. M. and Sakariassen, K. S. (1997) Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 646-653.

Holtkotter, O., Nieswandt, B., Smyth, N., Muller, W., Hafner, M., Schulte, V., Krieg, T. and Eckes, B. (2002) Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *J Biol Chem* 277, 10789-10794.

Huizinga, E. G., Tsuji, S., Romijn, R. A., Schiphorst, M. E., de Groot, P. G., Sixma, J. J. and Gros, P. (2002) Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science* 297, 1176-1179.

Huo, Y. and Ley, K. F. (2004) Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 14, 18-22.

Ihling, C., Bohrmann, B., Schaefer, H. E., Technau-Ihling, K. and Loeffler, B. M. (2004) Endothelin-1 and endothelin converting enzyme-1 in human atherosclerosis--novel targets for pharmacotherapy in atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2, 249-258.

Ingall, A. H., Dixon, J., Bailey, A., Coombs, M. E., Cox, D., McNally, J. I., Hunt, S. F., Kindon, N. D., Teobald, B. J., Willis, P. A., Humphries, R. G., Leff, P., Clegg, J. A., Smith, J. A. and Tomlinson, W. (1999) Antagonists of the platelet P2T receptor: a novel approach to antithrombotic therapy. *J Med Chem* 42, 213-220.

Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., Dean, W. L., Frampton, J. and Watson, S. P. (2003) Integrin alpha2beta1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLCgamma2. *J Cell Biol* 160, 769-780.

Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., McCarty, O. J., Moroi, M., Ruggeri, Z. M., Kunicki, T. J., Ozaki, Y. and Watson, S. P. (2006) Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood* 107, 1405-1412.

"ISIS-2-study". (1988) The ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet* 2, 349-360.

Italiano, J. E., Jr., Patel-Hett, S. and Hartwig, J. H. (2007) Mechanics of proplatelet formation. *J Thromb Haemost* 5, 18-23.

Jackson, S. P., Nesbitt, W. S. and Kulkarni, S. (2003) Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost* 1, 1602-1612.

Jarvis, G. E., Atkinson, B. T., Snell, D. C. and Watson, S. P. (2002) Distinct roles of GPVI and integrin alpha(2)beta(1) in platelet shape change and aggregation induced by different collagens. *Br J Pharmacol* 137, 107-117.

Jin, J., Daniel, J. L. and Kunapuli, S. P. (1998) Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem* 273, 2030-2034.

Jung, S. M. and Moroi, M. (1998) Platelets interact with soluble and insoluble collagens through characteristically different reactions. *J Biol Chem* 273, 14827-14837.

Jung, S. M. and Moroi, M. (2000) Signal-transducing mechanisms involved in activation of the platelet collagen receptor integrin  $\alpha(2)\beta(1)$ . *J Biol Chem* 275, 8016-8026.

Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D. D., Graf, T., Italiano, J. E., Jr., Shivdasani, R. and van Andrian, U. H. (2007) Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 317, 1767-1770.

Jurk, K., Clemetson, K. J., de Groot, P. G., Brodde, M. F., Steiner, M., Savion, N., Varon, D., Sixma, J. J., Van Aken, H. and Kehrel, B. E. (2003) Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *Faseb J* 17, 1490-1492.

Kadler, K. E., Holmes, D. F., Trotter, J. A. and Chapman, J. A. (1996) Collagen fibril formation. *Biochem J* 316 ( Pt 1), 1-11.

Kamata, T., Puzon, W. and Takada, Y. (1994) Identification of putative ligand binding sites within I domain of integrin  $\alpha 2 \beta 1$  (VLA-2, CD49b/CD29). *J Biol Chem* 269, 9659-9663.

Kanaji, S., Kanaji, T., Furihata, K., Kato, K., Ware, J. L. and Kunicki, T. J. (2003) Convoluxin binds native, human glycoprotein Ibalpha. *J Biol Chem* 278, 39452-39460.

Kariyazono, H., Nakamura, K., Arima, J., Ayukawa, O., Onimaru, S., Masuda, H., Iguro, Y., Majima, H. J., Sakata, R. and Yamada, K. (2004) Evaluation of anti-platelet aggregatory effects of aspirin, cilostazol and ramatroban on platelet-rich plasma and whole blood. *Blood Coagul Fibrinolysis* 15, 157-167.

Kasirer-Friede, A., Cozzi, M. R., Mazzucato, M., De Marco, L., Ruggeri, Z. M. and Shattil, S. J. (2004) Signaling through GP Ib-IX-V activates  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 independently of other receptors. *Blood* 103, 3403-3411.

Kato, K., Kanaji, T., Russell, S., Kunicki, T. J., Furihata, K., Kanaji, S., Marchese, P., Reininger, A., Ruggeri, Z. M. and Ware, J. (2003) The contribution of glycoprotein VI to stable

platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood* 102, 1701-1707.

Katsuda, S. and Kaji, T. (2003) Atherosclerosis and extracellular matrix. *J Atheroscler Thromb* 10, 267-274.

Katsuda, S., Okada, Y., Minamoto, T., Oda, Y., Matsui, Y. and Nakanishi, I. (1992) Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler Thromb* 12, 494-502.

Kawamoto, Y. and Kaibara, M. (1990) Procoagulant activity of collagen. Effect of difference in type and structure of collagen. *Biochim Biophys Acta* 1035, 361-368.

Keene, D. R., Engvall, E. and Glanville, R. W. (1988) Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *J Cell Biol* 107, 1995-2006.

Kehrel, B. (1995) Platelet-collagen interactions. *Semin Thromb Hemost* 21, 123-129.

Kehrel, B., Flicker, E., Wigbels, B., Osterfeld, M., van de Loo, J. and Luscher, E. F. (1996) Thrombospondin measured in whole blood--an indicator of platelet activation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 7, 202-205.

Kehrel, B., Wierwille, S., Clemetson, K. J., Anders, O., Steiner, M., Knight, C. G., Farndale, R. W., Okuma, M. and Barnes, M. J. (1998) Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood* 91, 491-499.

Knight, C. G., Morton, L. F., Onley, D. J., Peachey, A. R., Ichinohe, T., Okuma, M., Farndale, R. W. and Barnes, M. J. (1999) Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovasc Res* 41, 450-457.

Knight, C. G., Morton, L. F., Onley, D. J., Peachey, A. R., Messent, A. J., Smethurst, P. A., Tuckwell, D. S., Farndale, R. W. and Barnes, M. J. (1998) Identification in collagen type I of an integrin alpha2 beta1-binding site containing an essential GER sequence. *J Biol Chem* 273, 33287-33294.

Knight, C. G., Morton, L. F., Peachey, A. R., Tuckwell, D. S., Farndale, R. W. and Barnes, M. J. (2000) The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *J Biol Chem* 275, 35-40.



Koide, T. (2005) Triple helical collagen-like peptides: engineering and applications in matrix biology. *Connect Tissue Res* 46, 131-141.

Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Wight, T. N. and Virmani, R. (2004) The accumulation of specific types of proteoglycans in eroded plaques: a role in coronary thrombosis in the absence of rupture. *Curr Opin Lipidol* 15, 575-582.

Kroll, M. H., Hellums, J. D., McIntire, L. V., Schafer, A. I. and Moake, J. L. (1996) Platelets and shear stress. *Blood* 88, 1525-1541.

Kuijpers, M. J. E., Schulte, V., Oury, C., Lindhout, T., Broers, J., Hoylaerts, M. F., Nieswandt, B. and Heemskerk, J. W. (2004) Facilitating roles of murine platelet glycoprotein Ib and alphaIIb beta3 in phosphatidylserine exposure during vWF-collagen-induced thrombus formation. *J Physiol (Lond)* 558, 403-415.

Kulkarni, S., Dopheide, S. M., Yap, C. L., Ravanat, C., Freund, M., Mangin, P., Heel, K. A., Street, A., Harper, I. S., Lanza, F. and Jackson, S. P. (2000) A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest* 105, 783-791.

Kunapuli, S. P., Ding, Z., Dorsam, R. T., Kim, S., Murugappan, S. and Quinton, T. M. (2003a) ADP receptors--targets for developing antithrombotic agents. *Curr Pharm Des* 9, 2303-2316.

Kunapuli, S. P., Dorsam, R. T., Kim, S. and Quinton, T. M. (2003b) Platelet purinergic receptors. *Curr Opin Pharmacol* 3, 175-180.

Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-209.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lafont, A. (2003) Basic aspects of plaque vulnerability. *Heart* 89, 1262-1267.

Lankhof, H., van Hoeij, M., Schiphorst, M. E., Bracke, M., Wu, Y. P., Ijsseldijk, M. J., Vink, T., de Groot, P. G. and Sixma, J. J. (1996) A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb Haemost* 75, 950-958.

Laszik, Z., Jansen, P. J., Cummings, R. D., Tedder, T. F., McEver, R. P. and Moore, K. L. (1996) P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood* 88, 3010-3021.

- Leitinger, B. and Hohenester, E. (2007) Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol* 26, 146-155.
- Leon, C., Freund, M., Ravanat, C., Baurand, A., Cazenave, J. P. and Gachet, C. (2001) Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist. *Circulation* 103, 718-723.
- Leon, C., Hechler, B., Freund, M., Eckly, A., Vial, C., Ohlmann, P., Dierich, A., LeMeur, M., Cazenave, J. P. and Gachet, C. (1999) Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J Clin Invest* 104, 1731-1737.
- Libby, P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.
- Libby, P. and Aikawa, M. (2003) Mechanisms of plaque stabilization with statins. *Am J Cardiol* 91, 4B-8B.
- Lisman, T., Raynal, N., Groeneveld, D., Maddox, B., Peachey, A. R., Huizinga, E. G., de Groot, P. G. and Farndale, R. W. (2006) A single high-affinity binding site for von Willebrand factor in collagen III, identified using synthetic triple-helical peptides. *Blood* 108, 3753-3756.
- Lopez, J. A. and Dong, J. F. (2005) Shear stress and the role of high molecular weight von Willebrand factor multimers in thrombus formation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 16 Suppl 1, S11-16.
- Losche, W. (2005) Platelets and tissue factor. *Platelets* 16, 313-319.
- Lottspeich, F. and Zorbas, H. (1998) *Bioanalytik*. Heidelberg-Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Luscher, T. F., Tanner, F. C., Tschudi, M. R. and Noll, G. (1993) Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Annu Rev Med* 44, 395-418.
- Lusis, A. J. (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.
- Lüthje, J. (1989) Extracellular adenine compounds, red blood cells and haemostasis: facts and hypotheses. *Blut* 59, 367-374.

Maalej, N. and Folts, J. D. (1996) Increased shear stress overcomes the antithrombotic platelet inhibitory effect of aspirin in stenosed dog coronary arteries. *Circulation* 93, 1201-1205.

MacDonald, T. M. and Wei, L. (2003) Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin. *Lancet* 361, 573-574.

Mach, F., Sauty, A., Iarossi, A. S., Sukhova, G. K., Neote, K., Libby, P. and Luster, A. D. (1999) Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 104, 1041-1050.

Mackie, I. J. and Neal, C. R. (1988) The Platelet. Platelet-vessel wall Interactions. In: *The Bloomsbury series in clinical science*. Heidelberg: Springer Verlag Berlin; 1-32.

Madan, M., Berkowitz, S. D. and Tcheng, J. E. (1998) Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade. *Circulation* 98, 2629-2635.

Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Leseche, G., Freyssinet, J. M. and Tedgui, A. (1999) Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 99, 348-353.

Mangin, P., Ohlmann, P., Eckly, A., Cazenave, J. P., Lanza, F. and Gachet, C. (2004) The P2Y1 receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA2 formation is prevented. *J Thromb Haemost* 2, 969-977.

Marso, S. P., Lincoff, A. M., Ellis, S. G., Bhatt, D. L., Tanguay, J. F., Kleiman, N. S., Hammoud, T., Booth, J. E., Sapp, S. K. and Topol, E. J. (1999) Optimizing the percutaneous interventional outcomes for patients with diabetes mellitus: results of the EPISTENT (Evaluation of platelet IIb/IIIa inhibitor for stenting trial) diabetic substudy. *Circulation* 100, 2477-2484.

Marutsuka, K., Hatakeyama, K., Yamashita, A. and Asada, Y. (2005) Role of thrombogenic factors in the development of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 12, 1-8.

Massberg, S., Enders, G., Matos, F. C., Tomic, L. I., Leiderer, R., Eisenmenger, S., Messmer, K. and Krombach, F. (1999) Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 94, 3829-3838.

Massberg, S., Gawaz, M., Gruner, S., Schulte, V., Konrad, I., Zohlhofer, D., Heinzmann, U. and Nieswandt, B. (2003) A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* 197, 41-49.

Massberg, S., Konrad, I., Bultmann, A., Schulz, C., Munch, G., Peluso, M., Lorenz, M., Schneider, S., Besta, F., Muller, I., Hu, B., Langer, H., Kremmer, E., Rudelius, M., Heinzmann, U., Ungerer, M. and Gawaz, M. (2004) Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *Faseb J* 18, 397-399.

Matchar, D. B., McCrory, D. C., Barnett, H. J. and Feussner, J. R. (1994) Medical treatment for stroke prevention. *Ann Intern Med* 121, 41-53.

Mattice, W. L., Riser, J. M. and Clark, D. S. (1976) Conformational properties of the complexes formed by proteins and sodium dodecyl sulfate. *Biochemistry* 15, 4264-4272.

Maxwell, M. J., Westein, E., Nesbitt, W. S., Giuliano, S., Dopheide, S. M. and Jackson, S. P. (2007) Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation. *Blood* 109, 566-576.

Mayr, F. B. and Gilma, B. (2006) Current developments in anti-platelet therapy. *Wien Med Wochenschr* 156, 472-480.

Mazzucato, M., Pradella, P., Cozzi, M. R., De Marco, L. and Ruggeri, Z. M. (2002) Sequential cytoplasmatic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Ibalph mechanoreceptor. *Blood* 100, 2793-2800.

Mazzucato, M., Spessotto, P., Masotti, A., De Appollonia, L., Cozzi, M. R., Yoshioka, A., Perris, R., Colombatti, A. and De Marco, L. (1999) Identification of domains responsible for von Willebrand factor type VI collagen interaction mediating platelet adhesion under high flow. *J Biol Chem* 274, 3033-3041.

McCullagh, K. G., Duance, V. C. and Bishop, K. A. (1980) The distribution of collagen types I, III and V (AB) in normal and atherosclerotic human aorta. *J Pathol* 130, 45-55.

Merten, M., Dong, J. F., Lopez, J. A. and Thiagarajan, P. (2001) Cholesterol sulfate: a new adhesive molecule for platelets. *Circulation* 103, 2032-2034.

Miura, Y., Takahashi, T., Jung, S. M. and Moroi, M. (2002) 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* 277, 46197-46204.

Moake, J. L., Turner, N. A., Stathopoulos, N. A., Nolasco, L. and Hellums, J. D. (1988) Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood* 71, 1366-1374.

Moers, A., Nieswandt, B., Massberg, S., Wettschureck, N., Grüner, S., Konrad, I., Schulte, V., Aktas, B., Gratacap, M.-P., Simon, M. I., Gawaz, M. and Offermanns, S. (2003) G<sub>13</sub> is an essential mediator of platelet activation in haemostasis and thrombosis. *Nat Med* 9, 1418-1422.

Moog, S., Mangin, P., Lenain, N., Strassel, C., Ravanat, C., Schuhler, S., Freund, M., Santer, M., Kahn, M., Nieswandt, B., Gachet, C., Cazenave, J. P. and Lanza, F. (2001) Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. *Blood* 98, 1038-1046.

Moons, A. H., Levi, M. and Peters, R. J. (2002) Tissue factor and coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 53, 313-325.

Morel, O., Toti, F., Hugel, B., Bakouboula, B., Camoin-Jau, L., Dignat-George, F. and Freyssinet, J. M. (2006) Procoagulant Microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2594-2604.

Morgenstern, E. (1997) Human platelets morphology/ultrastructure. In: *Platelets and their factors. Handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Deutschland: Springer Verlag; 27-60.

Moroi, M. and Jung, S. M. (2004) Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res* 114, 221-233.

Moroi, M., Jung, S. M., Okuma, M. and Shinmyozu, K. (1989) A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest* 84, 1440-1445.

Moroi, M., Jung, S. M., Shinmyozu, K., Tomiyama, Y., Ordinas, A. and Diaz-Ricart, M. (1996) Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. *Blood* 88, 2081-2092.

Moroi, M., Onitsuka, I., Imaizumi, T. and Jung, S. M. (2000) Involvement of activated integrin alpha2beta1 in the firm adhesion of platelets onto a surface of immobilized collagen under flow conditions. *Thromb Haemost* 83, 769-776.

Morrissey, J. H. (2001) Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* 86, 66-74.

Morton, L. F., Hargreaves, P. G., Farndale, R. W., Young, R. D. and Barnes, M. J. (1995) Integrin alpha 2 beta 1-independent activation of platelets by simple collagen-like peptides: collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient alone for alpha 2 beta 1-independent platelet reactivity. *Biochem J* 306 ( Pt 2), 337-344.

Mosesson, M. W. (2005) Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 3, 1894-1904.

Motz, W. (1994) [Optimal dosage of acetylsalicylic acid in therapy of coronary heart disease]. *Internist (Berl)* 35, 1165-1170.

Mousa, S. A., Forsythe, M., Lorelli, W., Bozarth, J., Xue, C. B., Wityak, J., Sielecki, T. M., Olson, R. E., DeGrado, W., Kapil, R., Hussain, M., Wexler, R., Thoolen, M. J. and Reilly, T. M. (1996) Novel nonpeptide antiplatelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist, DMP754: receptor binding affinity and specificity. *Coron Artery Dis* 7, 767-774.

Murata, K., Motayama, T. and Kotake, C. (1986) Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis* 60, 251-262.

Murugappan, S., Shankar, H. and Kunapuli, S. P. (2004) Platelet receptors for adenine nucleotides and thromboxane A<sub>2</sub>. *Semin Thromb Hemost* 30, 411-418.

Nakamura, T., Jamieson, G. A., Okuma, M., Kambayashi, J. and Tandon, N. N. (1998) Platelet adhesion to native type I collagen fibrils. Role of GPVI in divalent cation-dependent and -independent adhesion and thromboxane A<sub>2</sub> generation. *J Biol Chem* 273, 4338-4344.

Nemerson, Y. (1995) Tissue factor: then and now. *Thromb Haemost* 74, 180-184.

Nesbitt, W. S., Kulkarni, S., Giuliano, S., Goncalves, I., Dopheide, S. M., Yap, C. L., Harper, I. S., Salem, H. H. and Jackson, S. P. (2002) Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha IIb beta 3-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow. *J Biol Chem* 277, 2965-2972.

Nesbitt, W. S., Mangin, P., Salem, H. H. and Jackson, S. P. (2006) The impact of blood rheology on the molecular and cellular events underlying arterial thrombosis. *J Mol Med* 84, 989-995.

Nieswandt, B., Bergmeier, W., Schulte, V., Rackebrandt, K., Gessner, J. E. and Zirngibl, H. (2000) Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain. *J Biol Chem* 275, 23998-24002.

Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J. W., Zirngibl, H. and Fassler, R. (2001a) Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *Embo J* 20, 2120-2130.

Nieswandt, B., Schulte, V., Bergmeier, W., Mokhtari-Nejad, R., Rackebrandt, K., Cazenave, J. P., Ohlmann, P., Gachet, C. and Zirngibl, H. (2001b) Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med* 193, 459-469.

Nieswandt, B. and Watson, S. P. (2003) Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 102, 449-461.

Nieuwenhuis, H. K., Akkerman, J. W., Houdijk, W. P. and Sixma, J. J. (1985) Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature* 318, 470-472.

Nieuwenhuis, H. K., Sakariassen, K. S., Houdijk, W. P., Nievelstein, P. F. and Sixma, J. J. (1986) Deficiency of platelet membrane glycoprotein Ia associated with a decreased platelet adhesion to subendothelium: a defect in platelet spreading. *Blood* 68, 692-695.

Nievelstein, P., Mottino, G., Fogelman, A. and Frank, J. (1994) An ultrastructural study of lipoprotein accumulation in cardiac valves of the rabbit. *Arterioscler Thromb* 14, 1151-1161.

Nievelstein, P. F., D'Alessio, P. A. and Sixma, J. J. (1988) Fibronectin in platelet adhesion to human collagen types I and III. Use of nonfibrillar and fibrillar collagen in flowing blood studies. *Arteriosclerosis* 8, 200-206.

Nievelstein, P. F., Fogelman, A. M., Mottino, G. and Frank, J. S. (1991) Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue. *Arterioscler Thromb* 11, 1795-1805.

Noble, S. and Goa, K. L. (1996) Ticlopidine. A review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the prevention of cerebral ischaemia and stroke. *Drugs Aging* 8, 214-232.

O'Connor, M. N., Smethurst, P. A., Davies, L. W., Joutsu-Korhonen, L., Onley, D. J., Herr, A. B., Farndale, R. W. and Ouwehand, W. H. (2006) Selective blockade of glycoprotein VI clustering on collagen helices. *J Biol Chem* 281, 33505-33510.

Offermanns, S. (2000) The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation. *Biol Chem* 381, 389-396.

Offermanns, S. (2006) Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 99, 1293-1304.

Ooshima, A. and Muragaki, Y. (1990) Collagen metabolism in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 598, 582-584.

Orgel, J. P., Miller, A., Irving, T. C., Fischetti, R. F., Hammersley, A. P. and Wess, T. J. (2001) The in situ supermolecular structure of type I collagen. *Structure* 9, 1061-1069.

Osterud, B. (2001) The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Semin Hematol* 38, 2-5.

Parastatidis, I., Thomson, L., Fries, D. M., Moore, R. E., Tohyama, J., Fu, X., Hazen, S. L., Heijnen, H. F., Dennehy, M. K., Liebler, D. C., Rader, D. J. and Ischiropoulos, H. (2007) Increased protein nitration in the atherosclerotic lesions and plasma of apolipoprotein A-1 deficient mice. *Circ Res* 101, 368-376.

Patil, S., Newman, D. K. and Newman, P. J. (2001) Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 serves as an inhibitory receptor that modulates platelet responses to collagen. *Blood* 97, 1727-1732.

Patrono, C. (1994) Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 330, 1287-1294.

Paul, B. Z., Jin, J. and Kunapuli, S. P. (1999) Molecular mechanism of thromboxane A<sub>2</sub>-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *J Biol Chem* 274, 29108-29114.

Pereillo, J. M., Maftouh, M., Andrieu, A., Uzabiaga, M. F., Fedeli, O., Savi, P., Pascal, M., Herbert, J. M., Maffrand, J. P. and Picard, C. (2002) Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 30, 1288-1295.

Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83, 346-356.

Phillips, D. R., Conley, P. B., Sinha, U. and Andre, P. (2005) Therapeutic approaches in arterial thrombosis. *J Thromb Haemost* 3, 1577-1589.

Phillips, D. R. and Scarborough, R. M. (1997) Clinical pharmacology of eptifibatide. *Am J Cardiol* 80, 11B-20B.

"Physicians-health-study". (1988) The physicians' health study: aspirin for the primary prevention of myocardial infarction. *N Engl J Med* 318, 924-926.

Plenz, G. A., Deng, M. C., Robenek, H. and Volker, W. (2003) Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Atherosclerosis* 166, 1-11.



Prockop, D. J. and Kivirikko, K. I. (1995) Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 64, 403-434.

Prockop, D. J., Kivirikko, K. I., Tuderman, L. and Guzman, N. A. (1979a) The biosynthesis of collagen and its disorders (first of two parts). *N Engl J Med* 301, 13-23.

Prockop, D. J., Kivirikko, K. I., Tuderman, L. and Guzman, N. A. (1979b) The biosynthesis of collagen and its disorders (second of two parts). *N Engl J Med* 301, 77-85.

Quinn, M. J., Byzova, T. V., Qin, J., Topol, E. J. and Plow, E. F. (2003) Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and its antagonism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 945-952.

Rajavashisth, T. B., Liao, J. K., Galis, Z. S., Tripathi, S., Laufs, U., Tripathi, J., Chai, N. N., Xu, X. P., Jovinge, S., Shah, P. K. and Libby, P. (1999) Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 274, 11924-11929.

Ramshaw, J. A., Shah, N. K. and Brodsky, B. (1998) Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J Struct Biol* 122, 86-91.

Ramshaw, J. A. and Werkmeister, J. A. (1988) Electrophoresis and electroblotting of native collagens. *Anal Biochem* 168, 82-87.

Ray, W. A., Stein, C. M., Daugherty, J. R., Hall, K., Arbogast, P. G. and Griffin, M. R. (2002) COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of serious coronary heart disease. *Lancet* 360, 1071-1073.

Reininger, A. J. and Spannagl, M. (2004) Interaktion des von Willebrand Faktors mit Thrombozyten und der Gefäßwand. *J Lab Med* 28, 514-520.

Rekhter, M. D. (1999) Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res* 41, 376-384.

Remijn, J. A., Wu, Y. P., Jeninga, E. H., MJ, I. J., van Willigen, G., de Groot, P. G., Sixma, J. J., Nurden, A. T. and Nurden, P. (2002) Role of ADP receptor P2Y(12) in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 686-691.

Renne, T., Pozgajova, M., Gruner, S., Schuh, K., Pauer, H. U., Burfeind, P., Gailani, D. and Nieswandt, B. (2005) Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 202, 271-281.

Richards-Kortum, R., Rava, R. P., Fitzmaurice, M., Tong, L. L., Ratliff, N. B., Kramer, J. R. and Feld, M. S. (1989) A one-layer model of laser-induced fluorescence for diagnosis of disease in human tissue: applications to atherosclerosis. *IEEE Trans Biomed Eng* 36, 1222-1232.

Rinder, C. S., Student, L. A., Bonan, J. L., Rinder, H. M. and Smith, B. R. (1993) Aspirin does not inhibit adenosine diphosphate-induced platelet alpha-granule release. *Blood* 82, 505-512.

Romijn, R. A., Bouma, B., Wuyster, W., Gros, P., Kroon, J., Sixma, J. J. and Huizinga, E. G. (2001) Identification of the collagen-binding site of the von Willebrand factor A3-domain. *J Biol Chem* 276, 9985-9991.

Romo, G. M., Dong, J. F., Schade, A. J., Gardiner, E. E., Kansas, G. S., Li, C. Q., McIntire, L. V., Berndt, M. C. and Lopez, J. A. (1999) The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med* 190, 803-814.

Ross, J. M., McIntire, L. V., Moake, J. L. and Rand, J. H. (1995) Platelet adhesion and aggregation on human type VI collagen surfaces under physiological flow conditions. *Blood* 85, 1826-1835.

Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126.

Roth, G. J. and Majerus, P. W. (1975) The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 56, 624-632.

Rother, E., Brandl, R., Baker, D. L., Goyal, P., Gebhard, H., Tigyi, G. and Siess, W. (2003) Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* 108, 741-747.

Rouis, M. (2005) Matrix Metalloproteinases: A potential therapeutic target in atherosclerosis. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 5, 541-548.

Rubin, A. L., Drake, M. P., Davison, P. F., Pfahl, D., Speakman, P. T. and Schmitt, F. O. (1965) Effects of Pepsin Treatment on the Interaction Properties of Tropocollagen Macromolecules. *Biochemistry* 4, 181-190.

Ruggeri, Z. M. (1997) Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost* 78, 611-616.

Ruggeri, Z. M. (2002) Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 8, 1227-1234.

Ruggeri, Z. M. (2003) Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 1, 1335-1342.

Ruggeri, Z. M. (2007) The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res* 120, S5-S9.

Ruggeri, Z. M., Dent, J. A. and Saldivar, E. (1999) Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood* 94, 172-178.

Ruggeri, Z. M., Orje, J. N., Habermann, R., Federici, A. B. and Reininger, A. J. (2006) Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood* 108, 1903-1910.

Ryo, R., Yoshida, A., Sugano, W., Yasunaga, M., Nakayama, K., Saigo, K., Adachi, M., Yamaguchi, N. and Okuma, M. (1992) Deficiency of P62, a putative collagen receptor, in platelets from a patient with defective collagen-induced platelet aggregation. *Am J Hematol* 39, 25-31.

Saelman, E. U., Nieuwenhuis, H. K., Hese, K. M., de Groot, P. G., Heijnen, H. F., Sage, E. H., Williams, S., McKeown, L., Gralnick, H. R. and Sixma, J. J. (1994) Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood* 83, 1244-1250.

Sakariassen, K. S., Nievelstein, P. F., Coller, B. S. and Sixma, J. J. (1986) The role of platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium. *Br J Haematol* 63, 681-691.

Samara, W. M. and Gurbel, P. A. (2003) The role of platelet receptors and adhesion molecules in coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 14, 65-79.

Santoro, S. A., Walsh, J. J., Staatz, W. D. and Baranski, K. J. (1991) Distinct determinants on collagen support alpha 2 beta 1 integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation. *Cell Regul* 2, 905-913.

Satoh, K., Yatomi, Y., Kubota, F. and Ozaki, Y. (2002) Small aggregates of platelets can be detected sensitively by a flow cytometer equipped with an imaging device: mechanisms of epinephrine-induced aggregation and antiplatelet effects of beraprost. *Cytometry* 48, 194-201.

Savage, B., Almus-Jacobs, F. and Ruggeri, Z. M. (1998) Specific Synergy of Multiple Substrate-Receptor Interactions in Platelet Thrombus Formation under Flow. *Cell* 94, 657-666.

Savage, B., Ginsberg, M. H. and Ruggeri, Z. M. (1999) Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow. *Blood* 94, 2704-2715.

Savage, B., Saldivar, E. and Ruggeri, Z. M. (1996) Initiation of Platelet Adhesion by Arrest onto Fibrinogen or Translocation on von Willebrand Factor. *Cell* 84, 289-297.

Savi, P., Bernat, A., Lale, A., Roque, C., Zamboni, G. and Herbert, J. M. (2000) Effect of aspirin on platelet desaggregation induced by SR121566, a potent GP-IIb/IIIa antagonist. *Platelets* 11, 43-48.

Scarborough, R. M., Kleiman, N. S. and Phillips, D. R. (1999) Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists. What are the relevant issues concerning their pharmacology and clinical use? *Circulation* 100, 437-444.

Schulz, C., Penz, S., Hoffmann, C., Bültmann, A., Gillitzer, A., Schneider, S., Barndl, R., Seidl, S., Massberg, S., Stellos, K., Kremmer, E., Schönberger, T., Pichler, B., Münch, G., Siess, W. and Gawaz, M. (2006) Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession *in vivo*. *Thromb Haemost*, in Vorbereitung.

Schumacher, K. A., Classen, H. G. and Spath, M. (1979) Platelet aggregation evoked in vitro and in vivo by phosphatidic acids and lysoderivatives: identity with substances in aged serum (DAS). *Thromb Haemost* 42, 631-640.

Schwartz, S. M., Galis, Z. S., Rosenfeld, M. E. and Falk, E. (2007) Plaque rupture in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 705-713.

Serebruany, V. L., Malinin, A. I., O'Connor C, M. and Gurbel, P. A. (2003) Effects of roxifiban on platelet aggregation and major receptor expression in patients with coronary artery disease for the Roxifiban Oral Compound Kinetics Evaluation Trial-I (ROCKET-I Platelet Substudy). *Am Heart J* 146, 91-98.

Shekhonin, B. V., Domogatsky, S. P., Idelson, G. L., Koteliansky, V. E. and Rukosuev, V. S. (1987) Relative distribution of fibronectin and type I, III, IV, V collagens in normal and atherosclerotic intima of human arteries. *Atherosclerosis* 67, 9-16.

Siedlecki, C. A., Lestini, B. J., Kottke-Marchant, K. K., Eppell, S. J., Wilson, D. L. and Marchant, R. E. (1996) Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 88, 2939-2950.

Siess, W. (1989) Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 69, 58-178.

- Siess, W. (2002) Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta* 1582, 204-215.
- Siess, W. and Tigyi, G. (2004) Thrombogenic and atherogenic activities of lysophosphatidic acid. *J Cell Biochem* 92, 1086-1094.
- Siess, W., Zangl, K. J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G. and Aepfelbacher, M. (1999) 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* 96, 6931-6936.
- Siljander, P. and Lassila, R. (1999) Studies of adhesion-dependent platelet activation: Distinct roles for different participating receptors can be dissociated by proteolysis of collagen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 3033-3043.
- Siljander, P. R., Hamaia, S., Peachey, A. R., Slatter, D. A., Smethurst, P. A., Ouwehand, W. H., Knight, C. G. and Farndale, R. W. (2004a) Integrin activation state determines selectivity for novel recognition sites in fibrillar collagens. *J Biol Chem* 279, 47763-47772.
- Siljander, P. R., Munnix, I. C., Smethurst, P. A., Deckmyn, H., Lindhout, T., Ouwehand, W. H., Farndale, R. W. and Heemskerk, J. W. (2004b) Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood* 103, 1333-1341.
- Simon, M. I., Strathmann, M. P. and Gautam, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-808.
- Sixma, J. J., van Zanten, G. H., Huizinga, E. G., van der Plas, R. M., Verkley, M., Wu, Y. P., Gros, P. and de Groot, P. G. (1997) Platelet adhesion to collagen: an update. *Thromb Haemost* 78, 434-438.
- Smethurst, P. A., Joutsu-Korhonen, L., O'Connor, M. N., Wilson, E., Jennings, N. S., Garner, S. F., Zhang, Y., Knight, C. G., Dafforn, T. R., Buckle, A., MJ, I. J., De Groot, P. G., Watkins, N. A., Farndale, R. W. and Ouwehand, W. H. (2004) Identification of the primary collagen-binding surface on human glycoprotein VI by site-directed mutagenesis and by a blocking phage antibody. *Blood* 103, 903-911.
- Smith, E. B. and Ashall, C. (1986) Fibronectin distribution in human aortic intima and atherosclerotic lesions: concentration of soluble and collagenase-releasable fractions. *Biochim Biophys Acta* 880, 10-15.

Smith, J. B. and Willis, A. L. (1971) Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat New Biol* 231, 235-237.

Smith, J. D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J. and Miyata, M. (1995) Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8264-8268.

Sousa, R. (1995) Use of glycerol, polyols and other protein structure stabilizing agents in protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 51, 271-277.

Statz, W. D., Rajpara, S. M., Wayner, E. A., Carter, W. G. and Santoro, S. A. (1989) The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg<sup>++</sup>-dependent adhesion of platelets to collagen. *J Cell Biol* 108, 1917-1924.

Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. and Wissler, R. W. (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92, 1355-1374.

Stevens, J. M., Jordan, P. A., Sage, T. and Gibbins, J. M. (2004) The regulation of integrin-linked kinase in human platelets: evidence for involvement in the regulation of integrin alpha 2 beta 1. *J Thromb Haemost* 2, 1443-1452.

Storey, R. F., Judge, H. M., Wilcox, R. G. and Heptinstall, S. (2002) Inhibition of ADP-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation by clopidogrel and the P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist AR-C69931MX but not aspirin. *Thromb Haemost* 88, 488-494.

Storey, R. F., Newby, L. J. and Heptinstall, S. (2001) Effects of P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptor antagonists on platelet aggregation induced by different agonists in human whole blood. *Platelets* 12, 443-447.

Stroev, P. V., Hoskins, P. R. and Easson, W. J. (2007) Distribution of wall shear rate throughout the arterial tree: a case study. *Atherosclerosis* 191, 276-280.

Strony, J., Beaudoin, A., Brands, D. and Adelman, B. (1993) Analysis of shear stress and hemodynamic factors in a model of coronary artery stenosis and thrombosis. *Am J Physiol* 265, H1787-1796.

Sugimoto, M., Tsuji, S., Kuwahara, M., Matsui, H., Miyata, S., Fujimura, Y. and Yoshioka, A. (1999) Shear-dependent functions of the interaction between soluble von Willebrand factor and

platelet glycoprotein Ib in mural thrombus formation on collagen surface. *Int J Hematol* 69, 48-53.

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

Sukhova, G. K., Schonbeck, U., Rabkin, E., Schoen, F. J., Poole, A. R., Billingham, R. C. and Libby, P. (1999) Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 99, 2503-2509.

Sundaresan, P. and Farndale, R. W. (2002) P38 mitogen-activated protein kinase dephosphorylation is regulated by protein phosphatase 2A in human platelets activated by collagen. *FEBS Lett* 528, 139-144.

Suzuki, T., Kohno, H., Hasegawa, A., Toshima, S., Amaki, T., Kurabayashi, M., Nagai, R., Kurabayashi, M. H., Shimada, K., Nakamura, H., Teramoto, T., Yamaguchi, H., Nishiyama, S., Takahashi, H., Michishita, I., Sugano, Z. and Konoshi, K. (2002) Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease. *Clin Biochem* 35, 347-353.

Suzuki-Inoue, K., Tulasne, D., Shen, Y., Bori-Sanz, T., Inoue, O., Jung, S. M., Moroi, M., Andrews, R. K., Berndt, M. C. and Watson, S. P. (2002) Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *J Biol Chem* 277, 21561-21566.

Suzuki-Inoue, K., Yatomi, Y., Asazuma, N., Kainoh, M., Tanaka, T., Satoh, K. and Ozaki, Y. (2001) Rac, a small guanosine triphosphate-binding protein, and p21-activated kinase are activated during platelet spreading on collagen-coated surfaces: roles of integrin alpha(2)beta(1). *Blood* 98, 3708-3716.

Takahashi, H. and Moroi, M. (2001) Antibody against platelet membrane glycoprotein VI in a patient with systemic lupus erythematosus. *Am J Hematol* 67, 262-267.

Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R. and Ravetch, J. V. (1994) FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 76, 519-529.

Tam, S. H., Sassoli, P. M., Jordan, R. E. and Nakada, M. T. (1998) Abciximab (ReoPro, chimeric 7E3 Fab) demonstrates equivalent affinity and functional blockade of glycoprotein IIb/IIIa and alpha(v)beta3 integrins. *Circulation* 98, 1085-1091.

Tedgui, A. and Mallat, Z. (2001) Apoptosis as a determinant of atherothrombosis. *Thromb Haemost* 86, 420-426.

Timpl, R. and Brown, J. C. (1994) The laminins. *Matrix Biol* 14, 275-281.

Tokamura, A., Fukuzawa, K., Isobe, J. and , e. a. (1981) Lysophosphatidic acid-induced aggregation of human and feline platelets: structure-activity relationship. *Biochem Biophys Res Commun* 99, 391-398.

Tokumura, A., Iimori, M., Nishioka, Y., Kitahara, M., Sakashita, M. and Tanaka, S. (1994) Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Am J Physiol* 267, C204-210.

Toschi, V., Gallo, R., Lettino, M., Fallon, J. T., Gertz, S. D., Fernandez-Ortiz, A., Chesebro, J. H., Badimon, L., Nemerson, Y., Fuster, V. and Badimon, J. J. (1997) Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 95, 594-599.

Toth, O., Calatzis, A., Penz, S., Losonczy, H. and Siess, W. (2006) Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 96, 781-788.

Traverso, C. I., Arcelus, J. I. and Caprini, J. A. (1995) Role of thromboelastography in evaluating other anticoagulant agents: warfarin and heparin-dihydroergotamine. *Semin Thromb Hemost* 21 Suppl 4, 59-62.

Tsuji, S., Sugimoto, M., Miyata, S., Kuwahara, M., Kinoshita, S. and Yoshioka, A. (1999) Real-time analysis of mural thrombus formation in various platelet aggregation disorders: distinct shear-dependent roles of platelet receptors and adhesive proteins under flow. *Blood* 94, 968-975.

Turner, N. A., Moake, J. L. and McIntire, L. V. (2001) Blockade of adenosine diphosphate receptors P2Y(12) and P2Y(1) is required to inhibit platelet aggregation in whole blood under flow. *Blood* 98, 3340-3345.

Uff, S., Clemetson, J. M., Harrison, T., Clemetson, K. J. and Emsley, J. (2002) Crystal structure of the platelet glycoprotein Ib(alpha) N-terminal domain reveals an unmasking mechanism for receptor activation. *J Biol Chem* 277, 35657-35663.

van der Wal, A. C. and Becker, A. E. (1999) Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc Res* 41, 334-344.



van der Wal, A. C., Becker, A. E., van der Loos, C. M. and Das, P. K. (1994) Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 89, 36-44.

van Giezen, J. J. and Humphries, R. G. (2005) Preclinical and clinical studies with selective reversible direct P2Y<sub>12</sub> antagonists. *Semin Thromb Hemost* 31, 195-204.

van Zanten, G. H., de Graaf, S., Slootweg, P. J., Heijnen, H. F., Connolly, T. M., de Groot, P. G. and Sixma, J. J. (1994) Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest* 93, 615-632.

van Zanten, G. H., Saelman, E. U. M., Schut-Hese, K. M., Wu, Y. P., Slootweg, P. J., Nieuwenhuis, H. K., De Groot, P. G. and Sixma, J. J. (1996) Platelet Adhesion to Collagen Type IV Under Flow Conditions. *Blood* 88, 3862-3872.

Vane, J. R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231, 232-235.

Vane, J. R. and Botting, R. M. (2003) The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res* 110, 255-258.

Vanhoorelbeke, K., Depraetere, H., Romijn, R. A., Huizinga, E. G., De Maeyer, M. and Deckmyn, H. (2003) A consensus tetrapeptide selected by phage display adopts the conformation of a dominant discontinuous epitope of a monoclonal anti-VWF antibody that inhibits the von Willebrand factor-collagen interaction. *J Biol Chem* 278, 37815-37821.

Varughese, K. I., Celikel, R. and Ruggeri, Z. M. (2002) Structure and function of the von Willebrand factor A1 domain. *Curr Protein Pept Sci* 3, 301-312.

Vilahur, G., Segales, E., Salas, E. and Badimon, L. (2004) Effects of a novel platelet nitric oxide donor (LA816), aspirin, clopidogrel, and combined therapy in inhibiting flow- and lesion-dependent thrombosis in the porcine ex vivo model. *Circulation* 110, 1686-1693.

Viles-Gonzalez, J. F., Anand, S. X., Zafar, M. U., Fuster, V. and Badimon, J. J. (2004) Tissue factor coagulation pathway: a new therapeutic target in atherothrombosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 43, 669-676.

Viles-Gonzalez, J. F., Fuster, V. and Badimon, J. J. (2006) Links between inflammation and thrombogenicity in atherosclerosis. *Curr Mol Med* 6, 489-499.

Virmani, R., Burke, A. P., Kolodgie, F. D. and Farb, A. (2002) Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol* 15, 439-446.

Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A. and Schwartz, S. M. (2000) Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1262-1275.

von Hundelshausen, P., Koenen, R. R., Sack, M., Mause, S. F., Adriaens, W., Proudfoot, A. E., Hackeng, T. M. and Weber, C. (2005) Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* 105, 924-930.

von Hundelshausen, P., Weber, K. S., Huo, Y., Proudfoot, A. E., Nelson, P. J., Ley, K. and Weber, C. (2001) RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 103, 1772-1777.

Voss, T. and Haberl, P. (2000) Observations on the reproducibility and matching efficiency of two-dimensional electrophoresis gels: consequences for comprehensive data analysis. *Electrophoresis* 21, 3345-3350.

Ware, J. (2004) Dysfunctional platelet membrane receptors: from humans to mice. *Thromb Haemost* 92, 478-485.

Weber, K. and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244, 4406-4412.

Weitz, J. I. and Crowther, M. A. (2003) New anticoagulants : current status and future potential. *Am J Cardiovasc Drugs* 3, 201-209.

Westrick, R. J., Bodary, P. F., Xu, Z., Shen, Y. C., Broze, G. J. and Eitzman, D. T. (2001) Deficiency of tissue factor pathway inhibitor promotes atherosclerosis and thrombosis in mice. *Circulation* 103, 3044-3046.

Wight, T. N., Raugi, G. J., Mumby, S. M. and Bornstein, P. (1985) Light microscopic immunolocation of thrombospondin in human tissues. *J Histochem Cytochem* 33, 295-302.

Wilcox, J. N., Smith, K. M., Schwartz, S. M. and Gordon, D. (1989) Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2839-2843.

Wilhelm, B. and Siess, W. (1993) Activation of the cloned platelet thrombin receptor decreases the pertussis-toxin-dependent ADP-ribosylation of the membrane and soluble inhibitory

guanine-nucleotide-binding-alpha proteins. Inhibition by the prostacyclin analog, iloprost. *Eur J Biochem* 216, 81-88.

Woodside, D. G., Liu, S. and Ginsberg, M. H. (2001) Integrin activation. *Thromb Haemost* 86, 316-323.

Wootton, D. M. and Ku, D. N. (1999) Fluid mechanics of vascular systems, diseases, and thrombosis. *Annu Rev Biomed Eng* 1, 299-329.

Wu, D., Meiring, M., Kotze, H. F., Deckmyn, H. and Cauwenberghs, N. (2002) Inhibition of platelet glycoprotein Ib, glycoprotein IIb/IIIa, or both by monoclonal antibodies prevents arterial thrombosis in baboons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 323-328.

Yeh, E. T. and Khan, B. V. (2006) The potential role of antiplatelet agents in modulating inflammatory markers in atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 4, 2308-2316.

Yoneda, K., Iwamura, R., Kishi, H., Mizukami, Y., Mogami, K. and Kobayashi, S. (2004) Identification of the active metabolite of ticlopidine from rat in vitro metabolites. *Br J Pharmacol* 142, 551-557.

Yusuf, S., Zhao, F., Mehta, S. R., Chrolavicius, S., Tognoni, G. and Fox, K. K. (2001) Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 345, 494-502.

Zillmann, A., Luther, T., Muller, I., Kotzsch, M., Spannagl, M., Kauke, T., Oelschlagel, U., Zahler, S. and Engelmann, B. (2001) Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 603-609.

Zimmerman, T. S., Dent, J. A., Ruggeri, Z. M. and Nannini, L. H. (1986) Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types IIC, IID, and IIE). *J Clin Invest* 77, 947-951.

Zwaal, R. F. A., Comfurius, P. and Bevers, E. M. (1998) Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 1376, 433-453.

## Abkürzungen

<b>A</b>	Alanin
Abb.	Abbildung
ACD	Azid-Citrat-Dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
AE	Aggregationseinheiten
AK	Antikörper
AP	atheromatöses Plaque
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure (Aspirin <sup>®</sup> )
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Aggregationskurve („ <i>area under the curve</i> “) (Multiplate <sup>®</sup> -System)
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin („ <i>bovine serum albumin</i> “)
<b>C</b>	Cystein
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat („ <i>cyclic adenosine monophosphate</i> “)
CRP	kollagenverwandtes Peptid („ <i>collagen-related peptide</i> “)
CT	Gerinnungszeit („ <i>coagulation time</i> “) (roTEM <sup>®</sup> -System)
CTI	Korntrypsininhibitor („ <i>corn trypsin inhibitor</i> “)
<b>D</b>	Aspartat
<b>E</b>	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EtOH	Ethanol
<b>F</b>	Phenylalanin
FACS <i>sorting</i> “)	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung („ <i>fluorescence activated cell</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FXII	Gerinnungsfaktor XII
<b>G</b>	Glycin
GP	Glykoprotein
<b>HEPES</b>	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase („ <i>horse raddish peroxidase</i> “)

## Abkürzungen und Einheiten

---

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Ig	Immunglobulin
K	Lysin
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KRB	<u>K</u> ollagen <u>r</u> ezeptor <u>b</u> lockade
LDL	„ <i>low density lipoprotein</i> “
LPA	Lysophosphatidsäure
mAK	monoklonaler Antikörper
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogenkarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
O	Hydroxyprolin
O.D.	optische Dichte bei einer Wellenlänge von $x$ nm
P	Prolin
PBS	Phosphat-gepufferte Saline („ <i>phosphate buffered saline</i> “)
PE	Phycoerythrin
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonsäure
PPP	plättchenarmes Plasma („ <i>platelet-poor plasma</i> “)
PRP	plättchenreiches Plasma („ <i>platelet-rich plasma</i> “)
Q	Glutamin
R	Arginin
RIKM	Reflektions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SA	Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TES	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure
TF	„ <i>tissue factor</i> “ (Gewebethromboplastin)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

V	Valin
VWF	von Willebrand Faktor
W	Tryptophan

### Einheiten

Å	Ångström
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar (= mol/l)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
mA	Milliamper
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
min	Minute
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
% (v/v)	Volumenprozent (Volumen pro Volumen)
% (w/v)	Gewichtsprozent (Gewicht pro Volumen)
rpm	Umdrehungen pro Minute („ <i>revolutions per minute</i> “)
s, bzw. sek.	Sekunden
U	Unit
UV	ultraviolett
<i>x</i> g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

**Wissenschaftliche Beiträge**

**1. Originalarbeiten**

Penz, S., Reininger, A. J., Brandl, R., Goyal, P., Rabie, T., Bernlochner, I., Rother, E., Goetz, C., Engelmann, B., Smethurst, P. A., Ouwehand, W. H., Farndale, R., Nieswandt, B. and Siess, W. (2005) Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB J* 19, 898-909.

Tóth, O., Calatzis, A., Penz, S., Losonczy, H. and Siess, W. (2006) Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 96, 781-788.

Penz, S. M., Reininger, A. J., Tóth, O., Deckmy, H., Brandl, R. and Siess, W. (2007) Glycoprotein Iba inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost* 97, 435-443.

Schulz, C., Penz, S., Hoffmann, C., Langer, H., Gillitzer, A., Schneider, S., Brandl, R., Seidl, S., Massberg, S., Pichler, B., Kremmer, E., Stellos, K., Schönberger, T., Siess, W. and Gawaz, M. (2008) Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession *in vivo*. *Basic Res Cardiol* 103, 356-367.

**2. Kongressbeiträge und Abstracts**

**a) Vorträge**

Penz, S., Reininger, A. J., Brandl, R., Rabie, T., Farndale, R., Gawaz, M., Nieswandt, B. and Siess, W. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *XIX<sup>th</sup> European Platelet Meeting 2004*, Bad Brückenau, Deutschland, Oktober 2004;  
(2005) *Platelets* 16, 229-248.

Penz, S., Reininger, A.J., Brandl, R., Goyal, P., Rabie, T., Bernlochner, I., Rother, E., Farndale, R., Nieswandt, B. and Siess, W. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *III. Symposium des DFG Graduiertenkolleg „Vaskuläre Biologie in der Medizin (GRK 438)“*, Herrsching am Ammersee, Deutschland, März 2005.

Penz, S., Reininger, A. J., Brandl, R., Farndale, R. and Siess, W. GPVI inhibition is more potent than ADP-receptor antagonism or aspirin in reducing plaque-induced platelet thrombus formation. *XIV International Symposium on Atherosclerosis*, Rom, Italien, Juni 2006;  
(2006) *Atherosclerosis Supplements* 7 (3), 326.

Bikou, O., Penz, S., Pandey, D., Brandl, R. and Siess, W. The atherosclerotic plaque components lysophosphatidic acid and collagen synergistically activate platelets. *XIV International Symposium on Atherosclerosis*, Rom, Italien, Juni 2006;

(2006) *Atherosclerosis Supplements* 7 (3), 30.

Penz, S., Reininger, A.J., Tóth, O., Deckmyn, H., Brandl, R. and Siess, W. Effect of anti-platelet drugs on platelet aggregation and thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques. *IV. Symposium des DFG Graduiertenkolleg „Vaskuläre Biologie in der Medizin (GRK 438)“*, Herrsching am Ammersee, Deutschland, November 2007.

Bernlochner, I., Reininger A.J., Penz, S., Gachet, C., Gawaz, M., Massberg, S., Brandl, R., and Siess, W. Relative Contribution of tissue factor and collagenous structures to arterial thrombus formation induced by atherosclerotic plaques. *IV. Symposium des DFG Graduiertenkolleg „Vaskuläre Biologie in der Medizin (GRK 438)“*, Herrsching am Ammersee, Deutschland, November 2007.

#### **b) Poster**

Reininger, A.J., Brandl, R., Penz, S., Goyal, P., Rabie, T., Rother, E., Goetz, C., Engelmann, B., Farndale, R., Nieswandt, B., and Siess, W. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *ASH Meeting 2004*, San Diego, USA, Dezember 2004;

(2004) *Blood* 104, abstract #2636.

Schulz, C., Penz, S., Hoffmann, C., Schneider, S., Siess, W., Gawaz, M., and Massberg, S. Glycoprotein VI mediates platelet adhesion to the vulnerable atherosclerotic plaque. *XXth ISTH Congress*, Sydney, Australien, August 2005;

(2005) *J Thromb Haemost* 3 (Suppl. 1), OR320.

Reininger, A. J., Penz, S., Brandl, R., Siess, W., and Ruggeri, Z. M. Platelet adhesion, aggregation and microparticle formation on von Willebrand factor, collagen and atherosclerotic plaques. *3<sup>rd</sup> European Meeting on Vascular Biology and Medicine*, Hamburg, Deutschland, September 2005;

(2005) *J Vasc Res* 42 (Suppl. 2), 85.

Penz, S., Reininger, A. J., Brandl, R., Goyal, P., Rabie, T., Bernlochner, I., Rother, E., Tóth, O., Calatzis, A., Farndale, R., Nieswandt, B., and Siess, W. Glycoprotein VI blockade, ADP receptor antagonists and aspirin inhibit thrombus formation induced by human atheromatous plaques. *Annual Meeting of the Society for Microcirculation and Vascular Biology (GfMVB)*, Rostock, Deutschland, September 2005;

(2006) *J Vasc Res* 43, 27-61.



## **Wissenschaftliche Beiträge**

---

Penz, S., Reininger, A.J., Brandl, R., Goyal, P., Rabie, T., Bernlochner, I., Rother, E., Farndale, R., Nieswandt, B., and Siess, W. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *Mechanism of thrombus formation 2005*, Frauenchiemsee, Deutschland, September 2005.

Penz, S., Reininger, A.J., Tóth, O., Deckmyn, H., Brandl, R., and Siess, W. Effect of anti-platelet drugs on platelet aggregation and thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques. *XXIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)*, Genf, Schweiz, Juli 2007;

### **c) Preise**

Posterpreis der „*Society for Microcirculation and Vascular Biology (GfMVB)*“, Rostock, Deutschland, September 2005.

## **Danksagung**

*An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die durch Ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.*

*Herrn Prof. Dr. P.C. Weber danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut, sowie für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.*

*Herrn Prof. Dr. W. Siess danke ich für die Vergabe dieses interessanten Themas, seine engagierte und intensive Förderung und Unterstützung der Arbeit, sowie für viele wertvolle Diskussionen, Ideen und Anregungen und das in mich gesetzte Vertrauen.*

*Herrn PD Dr. A.J. Reininger danke ich für die kompetente Unterstützung bei der Durchführung der Flussversuche und der Produktion des gezeigten Videos, sowie für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen. Ohne seine Hilfsbereitschaft bei jeglichen Problemen mit den Flusskammerversuchen wäre ein großer Teil dieser Arbeit nicht durchführbar gewesen.*

*Herrn Prof. Dr. R. Brandl danke ich für die Bereitstellung des atherosklerotischen Plaquematerials, einer der wichtigsten Voraussetzung dieser Arbeit.*

*Herrn Dr. C. Schulz und Prof. Dr. M. Gawaz danke ich für die Untersuchung der Bindung des löslichen GPVI an das Plaquematerial sowie für die Bereitstellung des anti-GPVI-Antikörpers 5C4. Bei Herrn Prof. Dr. R. Farndale und Herrn Dr. P. Smethurst bedanke ich mich für die Durchführung eines Teils der Plaque-GPVI-Integrin  $\alpha_2\beta_1$ -Bindungsstudien und die Bereitstellung des anti-GPVI-Antikörpers 10B12. Herrn Dr. T. Rabie und Herrn Prof. Dr. B. Nieswandt danke ich herzlich für die Kooperation bei den Mausexperimenten. Herrn Prof. Dr. B. Coller und Herrn Prof. Dr. H. Deckmyn danke ich für die Bereitstellung des anti-Integrin  $\alpha_2\beta_1$ -Antikörpers 6F1 sowie des anti-GPIIb $\alpha$ -Antikörpers 6B4. Bei Herrn Prof. Dr. B. Engelmann bedanke ich mich für die Durchführung der ersten roTEG<sup>®</sup>-Messungen in seinem Labor.*

*Allen Mitgliedern des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten und vor allem den Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Siess danke ich für die gute Zusammenarbeit während der letzten Jahre. Bei Nicole Wilke möchte ich mich ganz besonders für unzählige Blutabnahmen, ihre Unterstützung und Geduld bei der Durchführung von Aggregometerexperimenten, sowie für viele nette und zerstreuende Gespräche beim Mittagessen, etc. bedanken. Bei Frau Dr. O. Tóth bedanke ich mich für viele wertvolle und anregende fachspezifische sowie auch fachfremde Diskussionen und Unterhaltungen. Darüber hinaus danke ich vor allem Dr. Pankaj Goyal, Dr. Dharmendera Pandey, Isabell, Anna, Antje, Ilona, Kathrin, Dr. Vera Krump, Dr. Petra Kopp, Dr. Anna Osiak und Dr. Christian Johannes für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft, viele anregende Diskussionen, sowie nette und abwechslungsreiche Gespräche.*

*Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihre Liebe, ihre großzügige Unterstützung und stete Hilfe in allen Belangen meine Ausbildung und auch die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.*

*Nicht zuletzt möchte ich mich auch ganz lieb bei Sebastian für seine unermüdliche Geduld, sein Zuhören, seine Motivation und viele beruhigende und zerstreuende Momente bedanken.*



# Lebenslauf

## I. Persönliche Daten

Name	Sandra Magdalena Penz
Geburtsdatum	25. März 1977
Geburtstort	Traunstein

## II. Ausbildung und Auslandspraktika

September 1983 – Juli 1987	Grundschule in Chieming am Chiemsee
September 1987 – Juni 1996	Gymnasium Landschulheim Schloss Ising (Allgemeine Hochschulreife)
Oktober 1996 – Dezember 2001	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Hauptfach: Mikrobiologie; Nebenfächer: Genetik, Biochemie, Pharmakologie und Toxikologie)
November 2000 – März 2001	Auslandspraktikum im mikrobiologischen Labor der Firma „ <i>The Colomer Group</i> “ in Barcelona, Spanien.
Januar 2002 – November 2002	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. C. Baron; Titel: „ <i>Induktion der bakteriellen Stressantwort durch Typ IV-Sekretionssysteme</i> “
Dezember 2002 – Januar 2003	Auslandspraktikum im mikrobiologischen Labor des „Instituts für angewandte Hygiene“ in Graz, Österreich.
März 2003 – aktuell	Promotion am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Siess; Doktorandin im Graduiertenkolleg „Vaskuläre Biologie in der Medizin - GRK 438“



