

**Diagnostik und Therapie atherosklerotischer
Plaques mittels Ultraschallkontrastmittel am
Mausmodell**

von Katja Annett Metzger

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Diagnostik und Therapie atherosklerotischer
Plaques mittels Ultraschallkontrastmittel am
Mausmodell**

von Katja Annett Metzger
aus Stuttgart

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von PD Dr. med. vet. Sven Reese

angefertigt in der
III. Medizinischen Klinik für Kardiologie und Kreislauferkrankungen
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Mentor: Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Gerhard Wess

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM.....	3
2.1	Das Kreislaufsystem	3
2.1.1	Aufbau und Funktion des Kreislaufsystems.....	3
2.1.2	Aufbau der Gefäßwand	4
2.1.3	Funktion des Gefäßendothels	6
2.2	Die Atherosklerose	7
2.2.1	Pathogenese der Atherosklerose.....	7
2.3	Der Thrombozyt	9
2.3.1	Aufbau und Herkunft der Thrombozyten	9
2.3.2	Hämostase	12
2.3.3	Adhäsion der Thrombozyten	12
2.3.4	Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten	13
2.3.5	Thrombozytäre Kollagenrezeptoren	16
2.3.6	Bindung von Thrombozyten an Kollagen	18
2.3.7	Der Kollagenrezeptor Glycoprotein VI (GPVI)	19
2.3.7.1	Aufbau des Kollagenrezeptors GPVI.....	19
2.3.7.2	Intrazelluläre Signalkaskade von GPVI	20
2.4	Das rekombinante, lösliche GPVI - Fc (Revacept®)	21
2.4.1	GPVI - Fc in der Diagnostik.....	23
2.4.2	GPVI - Fc in der Therapie	23

INHALTSVERZEICHNIS

2.5	Die Rolle der Thrombozyten bei der Atherosklerose	24
2.6	Microbubbles	26
2.6.1	Aufbau und Signalerzeugung	26
2.6.2	Zerstörung von Microbubbles durch hohe Ultraschallfrequenzen	28
2.6.3	<i>targeted</i> Microbubbles	28
2.6.4	Microbubbles in der Therapie	30
2.6.5	Vevo MicroMarker™	31
2.7	Darstellung von vulnerablen atherosklerotischen Plaques	33
2.8	Die ApoE ^{-/-} Maus	35
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	36
3.1	Zielvorstellung	36
3.2	Material und Methoden	38
3.2.1	Liste verwendeter Materialien und Geräte	38
3.2.1.1	Reagenzien	38
3.2.1.2	Färbelösungen	41
3.2.1.3	Gebrauchsgegenstände	42
3.2.1.4	Antikörper	43
3.2.1.5	Narkosemittel	44
3.2.1.6	Geräte	44
3.2.1.7	Analyseprogramme	45
3.2.2	Methoden	45
3.2.2.1	Biotinylierung des rekombinanten Proteins GPVI - Fc _γ (Revacept®)	45
3.2.2.2	Bestätigung der erfolgreichen Biotinylierung	46
3.2.2.3	Funktionalität des biotinylierten GPVI - Fc	47
3.2.2.4	FITC - Markierung des biotinylierten GPVI - Fc bzw. BSA	47
3.2.2.6	Darstellung der Microbubbles mittels Transmissions - Elektronen - Mikroskopie	48
3.2.2.7	Durchflusszytometrische Analyse der Microbubbles - Liganden - Komplexe	49

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.2.8 Dynamische Adhäsion (Flusskammer)	49
3.2.2.9 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	51
3.2.2.10 Ultraschalluntersuchung des Aortenbogens bei ApoE ^{-/-} Mäusen.....	52
3.2.2.11 Ultraschalluntersuchung der rechten Arteria carotis bei ApoE ^{-/-} Mäusen und Beeinflussung der Atheroprogression mittels Zerstörung des Ultraschallkontrastmittels	56
3.2.2.12 Analyse der <i>Contrast Intensity</i> des Ultraschallkontrastmittels mit der Computersoftware Vevo 2100 1.5.0	57
3.2.2.13 Ölrot - Färbung der Aorta und der Carotiden zur Bestimmung des Ausmaßes der atherosklerotischen Plaques	58
3.2.2.14 Histologische Untersuchungen.....	59
3.2.2.15 Statistik.....	65
3.3 Ergebnisse.....	66
3.3.1 Erfolgreiche Biotinylierung des rekombinanten GPVI - Fc (Revacept [®])	66
3.3.2 Funktionsprüfung des biotinylierten GPVI - Fc.....	67
3.3.4 Bildliche Darstellung der Microbubbles mit Elektronenmikroskopie.....	68
3.3.5 Bestätigung der Bindung des biotinylierten GPVI - Fc bzw. BSA an die Microbubbles mittels Durchflusszytometrie	69
3.3.6 Dynamische Adhäsion von MB _{GPVI} und MB _C an Kollagen in der Flusskammer	70
3.3.7 Diagnose atherosklerotischer Plaques bei ApoE ^{-/-} Mäusen.....	71
3.3.7.1 Atherosklerotische Plaques sind mit MB _{GPVI} darstellbar	71
3.3.7.2 Ultraschallkontrastsignal lässt sich durch Gabe von GPVI - Fc ₇₃ hemmen ...	73
3.3.7.3 Die Contrast Intensity korreliert mit dem Ausmaß des Plaqueareals.....	74
3.3.7.4 Darstellung der Progression atherosklerotischer Plaques mittels MB _{GPVI}	76
3.3.8 Beeinflussung der Atheroprogression im Bereich der Bifurkation der Arteria carotis	79
3.3.8.1 Sonographische Darstellung der Plaqueflächen im Bereich der Bifurkation der A. carotis	80

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.8.2	<i>Ex vivo</i> Darstellung der Plaquefläche mittels Ölrot-Färbung.....	81
3.3.9	Histologische Aufarbeitung der entnommenen Gefäße	82
4	DISKUSSION	87
4.1	Diskussion der Versuchsdurchführung.....	87
4.1.1	Das Mausmodell.....	87
4.1.2	Die Methode der <i>targeted</i> Microbubbles	88
4.1.2.1	Schwierigkeiten bei der Anwendung von <i>targeted</i> Microbubbles.....	89
4.1.3	Die Verwendung des Proteins GPVI - Fc (Revacept®).....	92
4.1.3.1	Gründe für die Verwendung von GPVI – Fc	92
4.1.3.2	Schwierigkeiten bei der Verwendung von löslichem GPVI - Fc	93
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	94
4.2.1	Ergebnisse der <i>in vitro</i> – Versuche.....	94
4.2.2	Ergebnisse der Diagnose atherosklerotischer Plaques bei ApoE ^{-/-} ohne Spezialdiät	95
4.2.3	Ergebnisse der Diagnose atherosklerotischer Plaques bei ApoE ^{-/-} mit Spezialdiät.	98
4.2.4	Einfluss von MB _{GPVI} auf die Plaquefläche im Bereich der A. carotis.....	100
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	102
5	ZUSAMMENFASSUNG	104
6	SUMMARY.....	106
7	LITERATURVERZEICHNIS	108
9	TABELLENVERZEICHNIS	124
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	125
11	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	127
12	DANKSAGUNG.....	130

1 EINLEITUNG

Laut statistischem Bundesamt war 2012 die häufigste Todesursache eine Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems. 40,2 % aller Todesfälle gehen auf eine solche Erkrankung zurück. Gerade bei älteren Menschen ist diese Todesursache weit verbreitet. 92 % der an Herz-Kreislauf-Erkrankungen Verstorbenen waren 65 Jahre und älter. Die wichtigsten spezifischen Todesursachengruppen waren dabei die ischämischen Herzkrankheiten, vor allem der Myokardinfarkt, und der Schlaganfall. Hauptursache plötzlicher thromboischämischer Komplikationen sind Rupturen atherosklerotischer Plaques, die für ca. 70 % aller tödlichen akuten myokardialen Infarkte oder den plötzlichen Herztod verantwortlich gemacht werden (NAGHAVI et al. 2003a; NAGHAVI et al. 2003b).

Meist geht die größte Infarktgefahr bei Menschen nicht von hochgradigen Lumeneinengungen der Gefäße durch atherosklerotische Plaques aus, sondern von mittleren Stadien der Läsionen, den „weichen“ biologisch aktiven (vulnerablen) Plaques. Bei diesen vulnerablen Plaques ist die Rupturgefahr mit anschließendem thromboembolischem Gefäßverschluss besonders hoch. Derzeitige diagnostische bildgebende Verfahren beschränken sich auf die Darstellung von Lumeneinengungen durch atherosklerotische Plaques mittels Angiographie oder Ultraschall ohne einen hohen diagnostischen Wert für die weitere Prognose atherosklerotischer Plaques zu haben. Die weitaus bedeutenderen vulnerablen Plaques, die meist nicht mit einer Lumeneinengung einhergehen (FUSTER et al. 1992; FARB et al. 1996), sind mit derzeitigen Methoden nicht sicher zu diagnostizieren.

Der Einsatz sogenannter molekularer Biomarker, die als Indikatoren für Krankheiten und Krankheitsrisiken verwendet werden, in Kombination mit modernen bildgebenden Verfahren

EINLEITUNG

birgt großes Potential zur Diagnose vulnerabler atherosklerotischer Plaques schon in frühen Stadien.

In der vorliegenden Arbeit soll das Potential des löslichen Proteins GPVI-Fc (Revacept®) als molekularer Biomarker, gekoppelt an Ultraschallkontrastmittel zur Diagnose vulnerabler atherosklerotischer Plaques eruiert werden. Außerdem soll die Möglichkeit analysiert werden, dieses Konstrukt zur Beeinflussung der Atheroprogression zu nutzen.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Das Kreislaufsystem

2.1.1 Aufbau und Funktion des Kreislaufsystems

Der Blutkreislauf besteht aus dem Herzen als zentralem Organ und aus den peripheren, dem Herzen zu- und abführenden Gefäßen, im Einzelnen den Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen. Aufgaben des Blutkreislaufs sind die ausreichende Durchblutung aller Organe, deren Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen und die Aufrechterhaltung des für Austauschvorgänge essentiellen hydrostatischen Drucks (VON ENGELHARDT 2005; EHMKE 2010).

Die vom Herzen abgehenden Arterien verzweigen sich peripher in immer kleiner werdende Gefäße, die Arteriolen, um schließlich in die kleinsten Gefäße, die Kapillaren, überzugehen, die ihrerseits wiederum das Blut in die Venolen entlassen, die dann über die Venen wieder im Herzen münden. Arteriolen, Kapillaren und Venolen bilden die sog. terminale Strombahn, in der sich der Austausch aller für die Zellen wichtigen Stoffe vollzieht (DRENCKHAHN 2004; SCHUMMER und HABERMEHL 2005; SCHIEBLER und KORF 2007; LIPPERT 2011).

2.1.2 Aufbau der Gefäßwand

Je nach ihrer Beanspruchung durch den im Gefäß herrschenden Druck und nach funktioneller Besonderheit in den verschiedenen Organen sind die Gefäße unterschiedlich gestaltet.

Dennoch gibt es Gemeinsamkeiten im Wandaufbau. Arterien und Venen haben einen dreischichtigen Wandaufbau: die glattwandige Innenauskleidung = Tunica intima, die Muskelschicht = Tunica media und die äußere Tunica adventitia (HEES 2006; SCHIEBLER und KORF 2007; WELSCH und DELLER 2010).

Arterien sind als Gefäße, die direkt vom Herzen wegführen einem starken Druck ausgesetzt. Bei den herznahen Gefäßen (Aorta und ihre kopfwärts ziehenden Gefäße sowie der Truncus pulmonalis und seine großen, in die Lunge eintretenden Gefäße) handelt es sich um Arterien vom elastischen Typ. Zur Peripherie hin gehen diese in die meist dickwandigen Arterien vom muskulösen Typ über (DRENCKHAHN 2004; SCHUMMER und HABERMEHL 2005; SCHIEBLER und KORF 2007; LIPPERT 2011). Die Arterien vom elastischen Typ wirken als Energiespeicher, um den schubweisen Blutstrom während der Systole des Herzens in eine kontinuierliche Strömung umzuwandeln (HEES 2006; SCHIEBLER und KORF 2007; WELSCH und DELLER 2010). Die Tunica intima beider Arterientypen besteht aus dem Endothel, einem einschichtigen Plattenepithel, und einer Lamina propria intimae aus Bindegewebe mit retikulären, kollagenen und elastischen Fasern (HEES 2006; SCHIEBLER und KORF 2007; WELSCH und DELLER 2010).

Die Tunica media besteht vor allem in den Arterien des muskulösen Typs aus eng liegenden glatten Muskelzellen. Sie ist unterteilt in die Membrana elastica interna und die Membrana elastica externa.

Die Tunica adventitia besteht aus Bindegewebe, hauptsächlich elastischen und kollagenen Fasern und ist meist sehr schmal (DRENCKHAHN 2004; SCHUMMER und HABERMEHL 2005; HEES 2006; SCHIEBLER und KORF 2007; WELSCH und DELLER 2010; LIPPERT 2011).

In den Kapillaren als terminale Strombahn findet der Stoffaustausch zwischen Körperzellen und Gefäßsystem statt. Ihre Wand besteht aus dem innen liegenden Endothel (einschichtiges

SCHRIFTTUM

Plattenepithel), der Basalmembran und den außen eng anliegenden Perizyten. Die Ultrastruktur der Kapillaren ist je nach Organ unterschiedlich aufgebaut und ermöglicht so einen organspezifischen Stoffaustausch (HEES 2006; SCHIEBLER und KORF 2007; WELSCH und DELLER 2010).

In den Venen wird das desoxygenierte Blut zum Herzen zurückgeführt. Die Venen bilden den Hauptteil des Niederdrucksystems im Kreislauf (DRENCKHAHN 2004; SCHUMMER und HABERMEHL 2005; SCHIEBLER und KORF 2007; LIPPERT 2011).

Die dreischichtige Gliederung der Venen ist im Vergleich zu den Arterien nur undeutlich ausgeprägt. Die Tunica intima besteht bei den meisten Venen nur aus dem Endothel, kann bei größeren Venen aber auch Muskelfaserbündel enthalten. In der Tunica media befinden sich Muskelfaserbündel, dazwischen kollagene Faserbündel und elastische Netze. Die Tunica adventitia ist bei den meisten Venen die am deutlichsten ausgeprägte Schicht und besteht aus verflochtenen kollagenen und elastischen Fasern, die in Längsmuskelzüge eingebaut sind. Somit wird die Dehnungsfähigkeit der Venen gewährleistet (HEES 2006; SCHIEBLER und KORF 2007; WELSCH und DELLER 2010).

Mittlere und größere Venen besitzen Venenklappen, die aus der Tunica intima hervorgehen, die ein Versacken des Blutes in der Peripherie verhindern (DRENCKHAHN 2004; SCHUMMER und HABERMEHL 2005; SCHIEBLER und KORF 2007; LIPPERT 2011 SINOWATZ und HEES 2006).

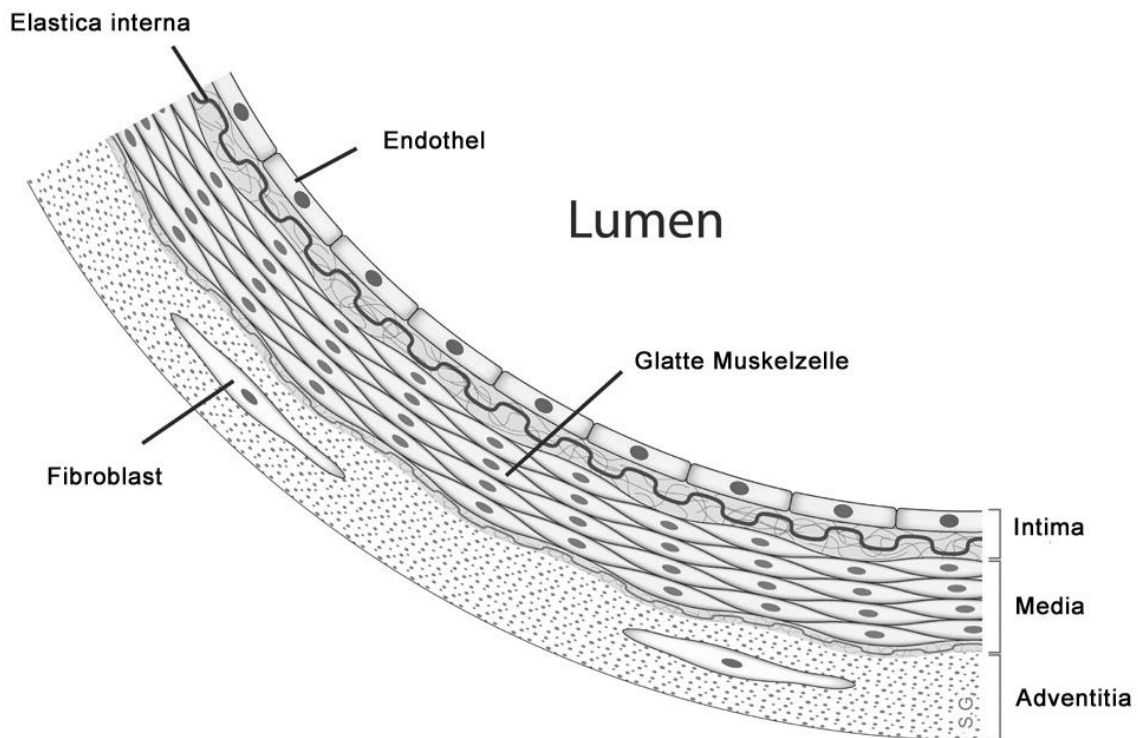


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Gefäßwand

(Anatomy overview of a human artery gezeichnet für eine Doktorarbeit. Maastricht, November 2005. Stijn A.I. Ghesquiere

www.applesnail.net;http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/05/Anatomy_artery.png;http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5/deed.de (18.05.2014)

2.1.3 Funktion des Gefäßendothels

Die Funktion des Gefäßendothels besteht darin, den Gefäßtonus aufrecht zu erhalten und den Stoffaustausch sowie den Blutfluss zu gewährleisten. Außerdem ist es an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren beteiligt und wichtig für die Aufrechterhaltung einer anti-koagulativen Gefäßoberfläche (SIEGEL-AXEL und GAWAZ 2007).

Das Gefäßendothel ist allerdings mehr als nur eine Barriere zwischen Blutstrom und umgebendem Gewebe. Es sollte als eigenständiges metabolisches und endokrines System

angesehen werden. Endothelzellen produzieren viele Substanzen, die an der Aufrechterhaltung des Blutdrucks und des Blutflusses beteiligt sind, unter anderem Heparansulfat, *angiotensin-converting*-Enzym oder Fibronektin (VANE et al. 1990).

Im Rahmen dieser Vorgänge werden anti-koagulatorische Moleküle, wie Thrombomodulin (CD141) auf der Oberfläche der Endothelzellen exprimiert (LI et al. 2005). Jedoch produzieren Endothelzellen auch pro-koagulatorische Substanzen, wie von-Willebrand-Faktor (vWF) (GROSS und AIRD 2000; SIEGEL-AXEL und GAWAZ 2007).

2.2 Die Atherosklerose

Die WHO definiert die Atherosklerose als eine variable Kombination von Veränderungen der Arterienintima, die mit einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, von Blut und Blutbestandteilen, ferner mit der Bildung eines fibrösen Gewebes und mit Kalkablagerungen einhergeht sowie mit Veränderungen der Media verbunden sein kann (www.uni-leipzig.de/~pharm/phfn/MsyndromSichardt.pdf (18.05.2014)).

Die Atherosklerose ist ein chronisch-progressive, inflammatorische Erkrankung der großen Arterien (ROSS 1999a; LUSIS 2000). Es sind viele Risikofaktoren bekannt, die die Atherosklerose begünstigen, unter anderem genetische Faktoren aber auch Umweltfaktoren wie cholesterinreiche Ernährung, Diabetes, Rauchen und Fettleibigkeit (LUSIS 2000).

2.2.1 Pathogenese der Atherosklerose

Die ursächliche Beziehung zwischen erhöhtem Blutcholesterolspiegel und Atherosklerose gilt als gesichert (STEINBERG 1989).

Histopathologisch beginnt die Atherosklerose mit der Ablagerung von LDL- (*low density lipoprotein*) Cholesterin in der subendothelialen Matrix (STEINBERG 2002). Das LDL-

SCHRIFTTUM

Cholesterin wird modifiziert, unter anderem durch Oxidation, Lipolyse und Proteolyse und wird dann von eingewanderten Makrophagen phagozytiert (STEINBERG 2002). Das durch chemische und oxidative Modifikationsprozesse veränderte LDL aktiviert Endothelzellen, was wiederum in einer vermehrten Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen resultiert, u.a. VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) und P-Selektin. (LI et al. 1993; YOUNG und PARTHASARATHY 1994; KITA et al. 2001). Angelockte Monozyten adhären, dringen in die Intima der Gefäßwand ein und differenzieren zu Makrophagen (SMITH et al. 1995). Diese Differenzierung ist assoziiert mit der Ausbildung von *Scavenger-Rezeptoren* (HANSSON et al. 2002), welche zur Endozytose der modifizierten Lipoproteine in die Makrophagen führen. Diese Lipoproteine bilden im Zytoplasma der Makrophagen Fetttropfen und so werden die Makrophagen zu den mikroskopisch sichtbaren Schaumzellen (PEISER et al. 2002). Makroskopisch sind die Ansammlungen von Schaumzellen als *fatty streaks* sichtbar, die dem frühen atherosklerotischen Stadium entsprechen (STARY et al. 1994).

Wenn die Schaumzellen mit der Zeit absterben, sammelt sich ihr Lipid-reicher Inhalt zu einem immer weiter wachsenden nekrotischen Kern an. Außerdem kommt es zur Einwanderung glatter Muskelzellen von der Media in die Intima, wo sie Kollagen freisetzen und sich so eine fibröse Kappe bildet. So entstehen frühe Atherome, die sich zuerst in Richtung Adventitia ausbreiten, bei weiterem Fortschreiten allerdings schließlich doch zur Lumeneinengung der Gefäße führen (LUSIS et al. 2004).

Die Atherome werden mit der Zeit komplexer und enthalten zunehmend Kalzifizierungen, wobei auch die fibröse Kappe dünner wird (SCHWARTZ et al. 2007). Kommt es zur Ruptur der fibrösen Kappe lagern sich Thrombozyten und Fibrin an, was zur Bildung von Thromben führt (genau Beschreibung in Kapitel 2.3.4).

Je nach Größe und Lokalisation dieses aufgelagerten Thrombus kann es zur plötzlichen vollständigen oder partiellen Unterbrechung des Blutflusses kommen und ein Myokardinfarkt oder andere Folgeerkrankungen können ausgelöst werden. Außerdem kann es zur Abschwemmung eines Thrombus kommen, welcher dann Gefäße in unterschiedlichen Gebieten des Körpers verstopfen kann.

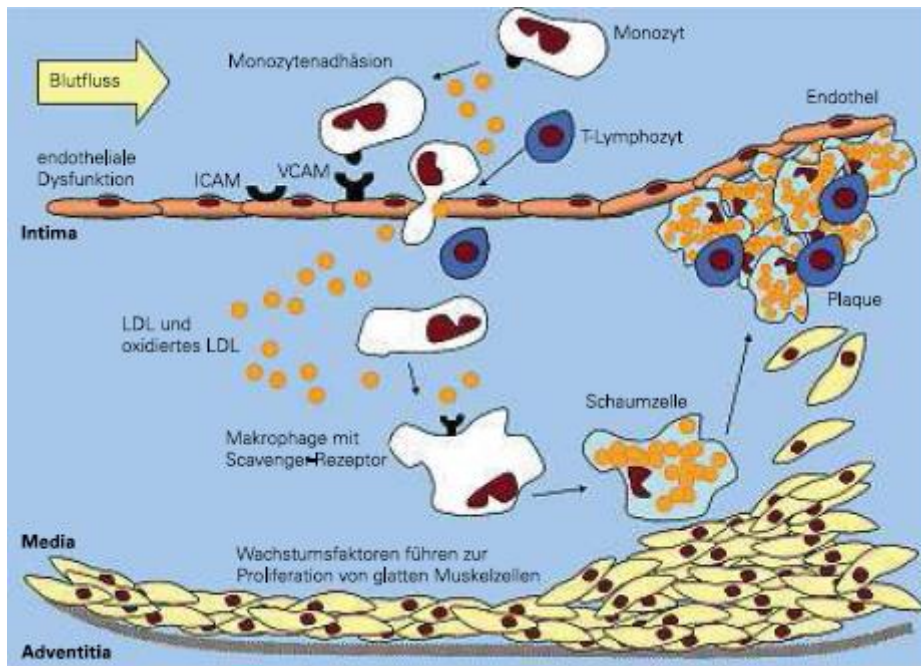


Abb. 2: Entstehung atherosklerotischer Plaques.

Durch endotheliale Dysfunktion kommt es zum Anheften von LDL, aber auch Monozyten, welche zu Makrophagen differenzieren und schließlich die charakteristischen Schaumzellen bilden. Schließlich kommt es zur Bildung eines Lipid-reichen nekrotischen Kerns, zur Einwanderung von Muskelzellen in die Intima und schließlich zu Lumeneinengungen der Gefäße (von Jens Christian Heuer, <http://loewenapothekebederkesa.wordpress.com/2008/11/> (18.05.2014))

2.3 Der Thrombozyt

2.3.1 Aufbau und Herkunft der Thrombozyten

Thrombozyten haben ihren Ursprung im Knochenmark, wo aus der Reihe der myeloiden Stammzellen zuerst ihre Vorläuferzellen, die Megakaryozyten hervorgehen. Reife Megakaryozyten verlassen das Knochenmark und gelangen ins Blut, wobei sie zu Thrombozyten zerfallen. Es können pro Megakaryozyt bis zu 1000 Thrombozyten entstehen. Thrombozyten sind bei den Säugetieren kernlos und 2 - 4 μm groß. Ihre Lebensdauer beträgt 3 - 10 Tage, wobei es während der Alterung zu Änderungen im Kohlenhydratmuster der Thrombozyten kommt, welche von den Zellen des mononukleären Phagozytosesystems in Milz

und Leber erkannt werden, was zum Abbau der alten Thrombozyten in diesen Organen führt (KASPERS und GÖBEL 2005).

Nach Gawaz (GAWAZ 2001) unterteilt sich die Struktur der Plättchen folgendermaßen:

- **Periphere Zone**
- **Strukturelle Zone**
- **Zone der Organellen**
- **Membransystem**

Periphere Zone:

Die periphere Zone besteht aus der Zytoplasmamembran, die ihrerseits aus verschiedenen Glykoproteinen, Proteinen und Mukopolysacchariden (Glykokalyx) besteht. Die zytoplasmatische Membran besteht wie bei anderen Zellen auch aus einer typischen Phospholipidschicht, die eine Vielzahl integrierte Proteine enthält, die als Rezeptoren für lösliche Agonisten oder Adhäsionsproteine fungieren.

Strukturelle Zone:

Sie besteht aus submembranös gelegenen Mikrotubuli umgeben von einem Netzwerk aus verschiedensten anderen Strukturproteinen. Diese Komponenten sind für die Aufrechterhaltung der typischen diskoiden Form des ruhenden Thrombozyten verantwortlich und sind aktiv an der Formveränderung des aktivierten Plättchens beteiligt.

Zone der Organellen:

Diese Zone befindet sich im Zytoplasma und besteht aus Mitochondrien, Glykogenspeicher und drei verschiedenen Formen von Speichergranula: dichte Granula, α -Granula und Lysosomen. Die Granula dienen als Speicherort für Proteine und andere Substanzen, die essentiell für die Plättchenfunktion sind.

Membransystem:

Das Membransystem besteht aus dem offenen kanalikulären System und dem dichten tubulären System. Das dichte tubuläre System ist ein Abkömmling des rauhen endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten. Es ist einer der Hauptspeicherorte für freie Kalziumionen, welche die zentrale Rolle in der Regulation des Plättchenmetabolismus und der Aktivierung spielen.

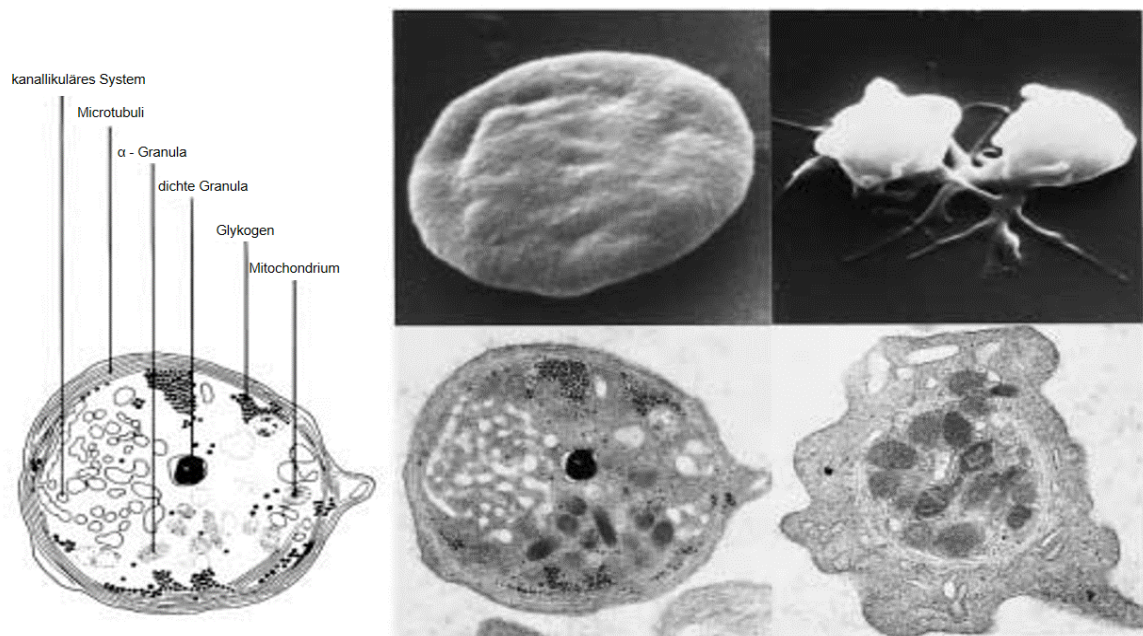


Abb. 3: Form und Zellorganellen ruhender und aktivierter Thrombozyten.

Links: schematische Darstellung der Zellorganellen eines Plättchens. Die oberen Fotografien zeigen Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen eines ruhenden Plättchens (links) und aktivierter Plättchen mit Formveränderungen und Bildung von Pseudopodien (rechts). Die unteren Fotografien zeigen dasselbe in der Transmissionselektronenmikroskopie (GEORGE 2000).

2.3.2 Hämostase

Verletzungen der Gefäße führen zum Verlust von Blut aus dem Gefäßsystem. Um diese Blutverluste möglichst gering zu halten reagiert der Organismus mit einer Reihe komplexer Vorgänge, die schließlich zur Hämostase (=Blutstillung) und zur Reparatur der Gefäßverletzung führen. Vier Mechanismen sind an der Hämostase beteiligt:

1. Vasokonstriktion
2. Primäre Hämostase (Bildung eines Thrombozytenaggregats): innerhalb von Sekunden adhären Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand und verschließen die Verletzung. Bei diesem Vorgang werden sie aktiviert, sezernieren Substanzen aus ihren Granula und aktivieren so weitere Thrombozyten (ANDREWS et al. 1997; GAWAZ 2004; KASPERS und GÖBEL 2005).
3. Sekundäre Blutstillung (Blutgerinnung): da das Thrombozytenaggregat sehr instabil ist, muss eine weitere Konsolidierung erfolgen. Kurz nach Beginn der Thrombozytenaggregation kommt die plasmatische Gerinnungskaskade in Gang, wobei Thrombin die wichtigste Protease des Gerinnungssystems ist. Thrombin ist ein potenter Aggregationsvermittler und ist außerdem beteiligt an der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und setzt so die Vernetzung des Thrombozytenaggregats in Gang (PACKHAM 1994; KASPERS und GÖBEL 2005). Im Anschluss kann dann die Regeneration des Gewebes einsetzen.
4. Bildung von Bindegewebe (endgültiger Wundverschluss)

2.3.3 Adhäsion der Thrombozyten

Die primäre Hämostase beginnt mit der Adhäsion der Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand (BAUMGARTNER 1977).

Die Thrombozytenadhäsion unter arteriellen Strömungsbedingungen und den damit einhergehenden hohen Scherkräften wird durch den von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt (WU 1996). Der vWF ist ein Plasmaprotein, welches vom Gefäßendothel aber auch von

Megakaryozyten gebildet und in Blut und subendotheliale Matrix abgegeben wird (ANDREWS et al. 1997; KASPERS und GÖBEL 2005). Der vWF bindet bei Verletzungen an freiliegendes Kollagen des Gefäßendothels, erfährt hierbei eine Konformationsänderung und ermöglicht so die Bindung an den membranständigen Rezeptorkomplex GPIb-V-IX auf Thrombozyten (ROTH 1991; RUGGERI 1997; ANDREWS et al. 1999; ANDRE et al. 2000; RUGGERI 2002; KASPERS und GÖBEL 2005).

Außerdem interagieren zwei weitere thrombozytäre Glykoproteine (GPIa-IIa = Integrin $\alpha 2\beta 1$ und GPVI) mit dem freiliegenden Kollagen der Gefäßwand und stabilisieren so die Adhäsion (STAATZ et al. 1989; WATSON und GIBBINS 1998; RUGGERI 2002) (siehe Abb. 4)

2.3.4 Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten

Nach Adhäsion an die Gefäßverletzung kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten. Ausgelöst wird diese initial durch Kollagen und Thrombin, die als sehr potente Thrombozytenaktivatoren gelten (WILNER et al. 1968; BAUMGARTNER 1977; VALETTAS und HERRMANN 2003). Zusätzlich sind noch folgende Thrombozytenagonisten an der Aktivierung beteiligt: Thromboxan A₂, Adrenalin, ADP, wobei jeder an seinen entsprechenden Rezeptor an der Plättchenoberfläche bindet (VALETTAS und HERRMANN 2003).

Die Aktivierung führt über eine Signalkaskade zur Formveränderung von Thrombozyten. Thrombozyten bilden hierbei Pseudopodien, was hauptsächlich sowohl durch die Bindung der thrombozytären Kollagenrezeptoren also auch durch Bindung von Thromboxan A₂ vermittelt wird (GALLET et al. 1999). Vor allem die Thrombozytenaktivierung durch Thrombin resultiert in der Ausbildung von Filopodien und Zellspreizung durch Ausspannen von Lamellen. (HARTWIG 1992).

Außerdem wird durch Aktivierung der Thrombozyten der Inhalt ihrer Granula, unter anderem Serotonin, Thromboxan A₂, Fibrinogen und von-Willebrand-Faktor freigesetzt. Diese freigesetzten Stoffe können ihrerseits wiederum weiter Thrombozyten aktivieren (KROLL und SCHAFFER 1989; KASPERS und GÖBEL 2005).

SCHRIFTTUM

Die Aktivierung von Thrombozyten führt außerdem zur Konformationsänderung eines weiteren Rezeptorkomplexes, dem GPIIb/IIIa-Komplex. Dadurch wird die Bindung dieses Rezeptors an Fibrinogen ermöglicht und es kommt zur Ausbildung von Fibrinogenbrücken zwischen den aktivierten Thrombozyten. Im Zuge der primären Hämostase ist so ein plättchenreicher, fragiler Thrombus entstanden und es folgt die sekundäre Hämostase (PEERSCHKE 1985; GEORGE 2000; KASIRER-FRIEDE et al. 2002; RUGGERI 2002; KASPERS und GÖBEL 2005).

Der Vorgang der Thrombusbildung wird auch in Gang gesetzt, wenn es bei atherosklerotischen Plaques zum Riss der fibrösen Kappe kommt. Nach Ruptur der atherosklerotischen Plaques mit Freilegung der subendothelialen Matrix kommt es zur Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten im Bereich der verletzten Gefäßwand (ROSS 1999b; LUSIS 2000; RUGGERI 2002)

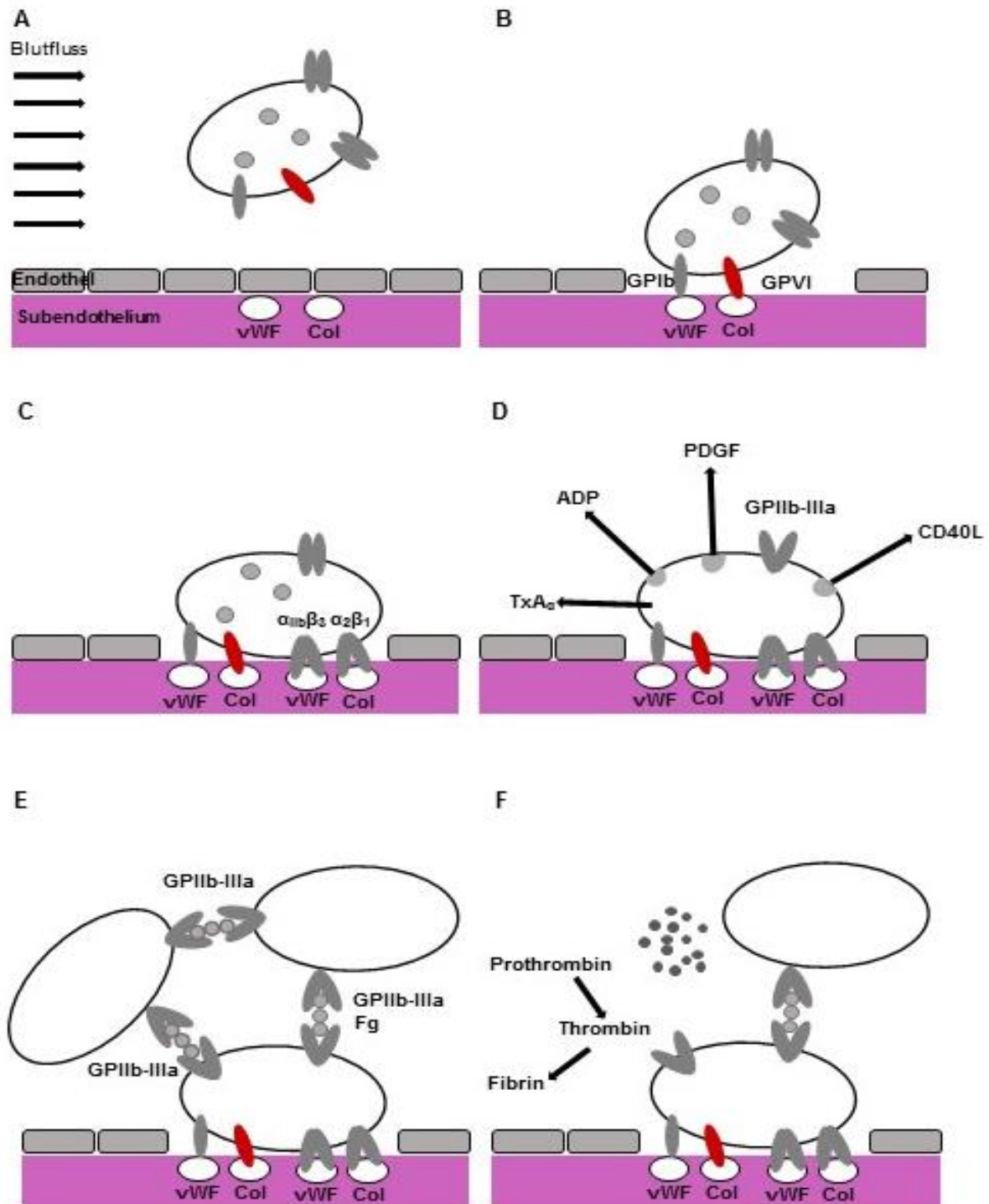


Abb. 4: Thrombozytenaggregation an freiliegendes Endothel

A) Blutfluss bei intaktem Endothel; B) bei einer Gefäßwandverletzung sind die extrazellulären Matrixproteine wie von-Willebrand-Faktor (vWF) und Kollagen (Col) freiliegend und Thrombozyten binden sowohl über GPIb (rot) als auch über GPIIb-IIIa an das Endothel: Adhäsion. C) Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$. D) Thrombozytenaktivierung mit Sekretion und Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa. E) Aggregation weiterer Thrombozyten über Fibrinogenbrücken (Fg) durch GPIIb-IIIa. F) Freisetzung von Mikropartikeln und Beginn der sekundären Hämostase: Bildung von Fibrin aus Prothrombin bzw. Thrombin (von Gawaz (GAWAZ 2004)).

2.3.5 Thrombozytäre Kollagenrezeptoren

Die verschiedenen Kollagene sind entscheidende Aktivatoren von Thrombozyten, was dann in Thrombozytenaggregation und Hämostase mündet (BAUMGARTNER 1977). Die Thrombozytenaktivierung und ihre Regulierung stellen einen entscheidenden Schritt in der Differenzierung von physiologischer Hämostase und pathologischer Thrombose dar. Somit steckt in der Thrombozytenaktivierung durch Kollagen großes Potential pharmakologisch in die Hämostase einzugreifen (CLEMETSON 1999; CLEMETSON und CLEMETSON 2001).

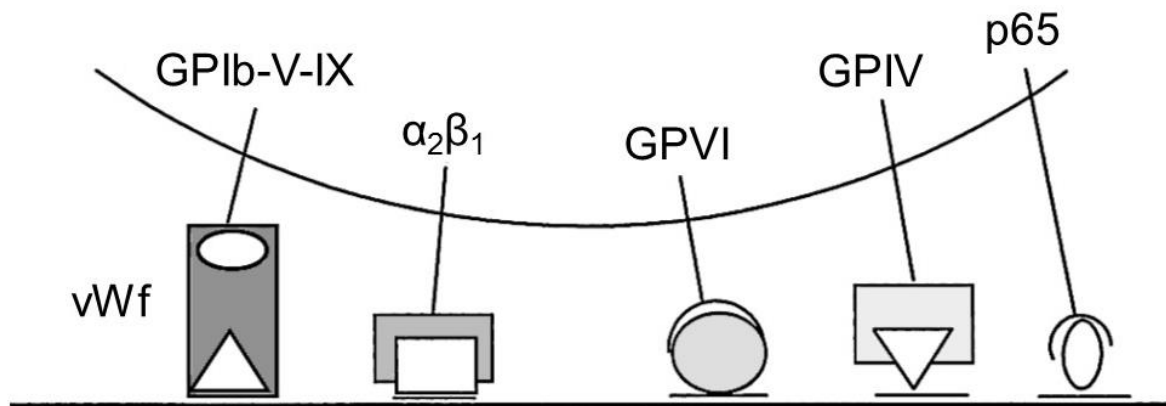


Abb. 5: Übersicht über die thrombozytären Kollagenrezeptoren.

Der Rezeptor-Komplex GPIb-V-IX bindet indirekt über den von-Willebrand-Faktor (vWf) an Kollagen, wohingegen Integrin $\alpha_2\beta_1$, GPVI, GPIV und p65 direkt an Kollagen binden. (von Clemetson (CLEMETSON 1999))

GPVI (P62 oder GPIIb)

GPVI ist der wichtigste Kollagenrezeptor auf Thrombozyten (MOROI et al. 1989; KEHREL et al. 1998; NIESWANDT und WATSON 2003). Außerdem ist er an der Aktivierung der Thrombozyten entscheidend beteiligt (zu Aufbau und Funktion siehe Kapitel 2.3.6).

Integrin $\alpha_2\beta_1$ oder GPIa-IIa

1986 wurde der Kollagenrezeptor GPIa als solcher von Santoro et al. (SANTORO 1986) definiert. Er ist der Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche, der als erster mit Kollagen interagiert. Allerdings bindet weder GPIa-IIa noch GPVI unter hohen Scherkräften, wie sie bei schnellen Strömungsgeschwindigkeiten vorkommen, an Kollagen. Unter solchen Bedingungen ist die initiale Bindung allein über die vWF-vermittelte Adhäsion von GPIb-V-IX an Kollagen bedingt. Durch diese Bindung kommt es zum sogenannten Rollen der Thrombozyten am Gefäßendothel und es wird GPIa-IIa aktiviert und die bisher instabile Bindung verfestigt sich (CLEMETSON und CLEMETSON 2001).

GPIV (CD36)

GPIV ist ein weiterer Kollagenrezeptor auf der Thrombozytenoberfläche und bindet an Kollagen V, aber nicht an Kollagen I und III. Er hat allerdings keine Bedeutung bei der Thrombozytenaktivierung (TANDON et al. 1989a; TANDON et al. 1989b; KEHREL et al. 1993; MOROI et al. 1997).

GPIb-V-IX

Wie schon erwähnt ist der Kollagenrezeptor GPIb-V-IX ein indirekter Rezeptor, der über den vWF an Kollagen bindet (ANDREWS et al. 1999). Diese Bindung vermittelt vor allem unter hohen Scherkräften bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten den ersten Kontakt zwischen Gefäßendothel und Thrombozyten, bewirkt das Rollen der Thrombozyten und ermöglicht so den weiteren Kontakt der Rezeptoren GPIa-IIa und GPVI an Kollagen (JACKSON et al. 2000; RUGGERI 2003).

2.3.6 Bindung von Thrombozyten an Kollagen

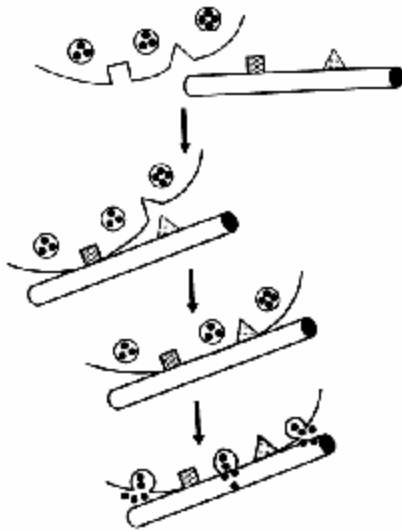


Abb. 6: *two-step, two-site Modell von Santoro*
(SANTORO et al. 1991)

Nach dem *Two-step, two-site* Modell nach Santoro et al. (SANTORO et al. 1991) (Abb. 6) bindet zuerst GPIIb/IIIa an Kollagen und ist verantwortlich für die Adhäsion des Thrombozyten. Danach sorgt GPIIb/IIIa für die Aktivierung der bereits an Kollagen gebundenen Thrombozyten und für die Sekretion der Granula-Inhaltsstoffe (SANTORO et al. 1991; MOROI et al. 1996).

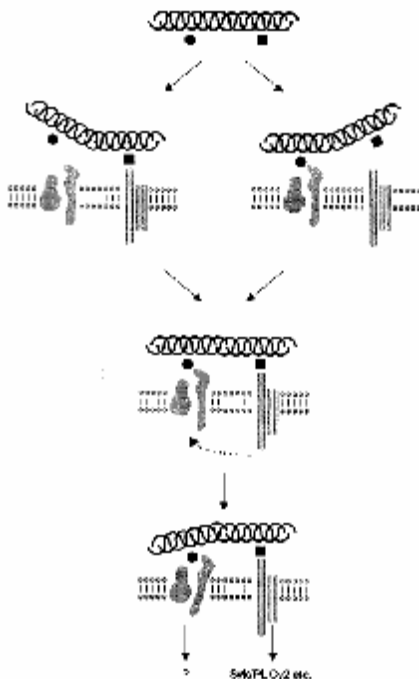


Abb. 7: *two-step, two-site Modell von Watson*
(WATSON et al. 2000)

Watson et al. (WATSON et al. 2000) modifizierten das *two-step, two-site* Modell (Abb.7). Sie postulierten, dass einer der beiden Rezeptoren (GPIIb/IIIa oder GPIIb/IIIa) zuerst an Kollagen bindet, die Bindung des zweiten Rezeptors verstärkt dann die Interaktion. Außerdem steigern Signale von GPIIb/IIIa die Affinität von GPIIb/IIIa für Kollagen.

Von Chen et al. (CHEN und KAHN 2003) wird ein Modell postuliert, nach dem der Kollagenrezeptor GPVI für die erste Kollagen - Thrombozyten Interaktion sorgt, was wiederum GPIa-IIa aktiviert und an die Oberfläche rekrutiert. Dieser amplifiziert wiederum das Kollagensignal und vervollständigt die Thrombozytenaktivierung.

2.3.7 Der Kollagenrezeptor Glycoprotein VI (GPVI)

Der Kollagenrezeptor GPVI wurde 1982 von Clemetson und McGregor das erste Mal beschrieben (CLEMETSON et al. 1982). Mittlerweile ist allgemein anerkannt, dass GPVI die entscheidende Rolle bei der Thrombozyten - Kollagen Adhäsion spielt (MOROI et al. 1989; WATSON und GIBBINS 1998; NIESWANDT et al. 2001a; NIESWANDT und WATSON 2003). Die direkte GPVI-Kollagen-Interaktion hat sich als entscheidend für die erste Plättchenbindung (*platelet tethering*) und die anschließende Plättchenadhäsion und Aggregation am freigelegten Gefäßendothel heraus gestellt (MASSBERG et al. 2003). Patienten mit GPVI-Mangel haben eine geringgradig verzögerte Blutungszeit, die allerdings nicht als Gerinnungsstörung zu bezeichnen ist (SUGIYAMA et al. 1987; MOROI et al. 1989). Die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation lässt sich bei GPVI-defizienten Plättchen sowohl beim Menschen als auch bei der Maus durch physiologische Kollagenkonzentrationen nicht auslösen (NIESWANDT et al. 2001b; GOTO et al. 2002).

2.3.7.1 Aufbau des Kollagenrezeptors GPVI

Humanes GPVI ist 60 – 65 kDa groß und gehört zur Familie der Glykoproteine vom Immunglobulin-Typ (CLEMETSON 1999). GPVI besteht aus 319 Aminosäuren und besitzt eine Signalsequenz von 30 Aminosäuren (EZUMI et al. 2000). Sowohl die Gensequenz für humanes GPVI (EZUMI et al. 2000) als auch für murines GPVI (JANDROT-PERRUS et al. 2000) sind bekannt und stimmen zu 64,4 % überein.

GPVI besteht aus zwei immunglobulinähnlichen Domänen und einer muzinähnlichen Serin-/Threonin-reichen Region im extrazellulären Bereich, einer Transmembrandomäne, einer

basischen und einer Prolin-reichen Region im intrazellulären Bereich. GPVI bildet einen Komplex mit der FcR γ -Kette, die entscheidend an der Signalübermittlung des Kollagenrezeptors beteiligt ist (GIBBINS et al. 1997; POOLE et al. 1997; CLEMETSON 1999; NIESWANDT et al. 2000; ZHENG et al. 2001).

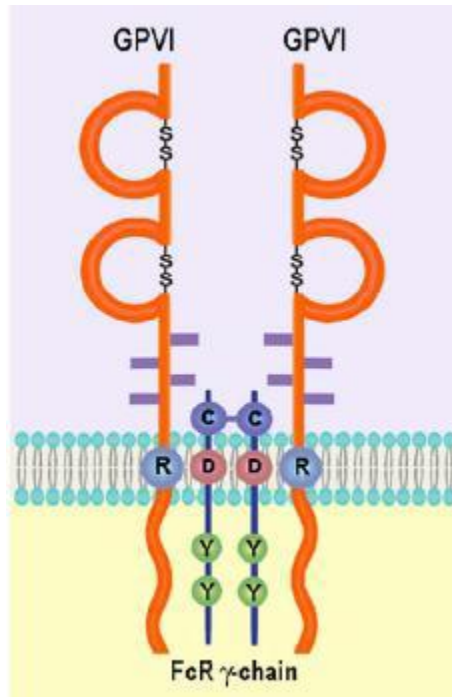


Abb. 8: Graphische Darstellung der GPVI-Struktur

GPVI liegt als Dimer vor und bildet einen Komplex mit der FcR γ -Kette (von Moroi und Jung (MOROI und JUNG 2004))

2.3.7.2 Intrazelluläre Signalkaskade von GPVI

Bei Bindung von GPVI an Kollagen kommt es zur Zusammenlagerung der beiden FcR γ -Untereinheiten und zur Phosphorylierung der ITAM-Domäne (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) am zytoplasmatischen Ende der FcR γ -Untereinheiten. Durch diese Phosphorylierung kommt es wiederum zur Phosphorylierung der „spleen tyrosine kinase“ (Syk) und darüber zur Aktivierung der Phospholipase $C\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$). Diese Phospholipase baut Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP $_2$) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP $_3$) ab. DAG aktiviert nun seinerseits die Proteinkinase C (PKC), die die Ca^{2+} -Freisetzung und die

Integrinaktivierung induziert und damit zu einer stabilen Thrombozytenadhäsion führt (Abb. 9) (WATSON et al. 2005; JUNG und MOROI 2008).

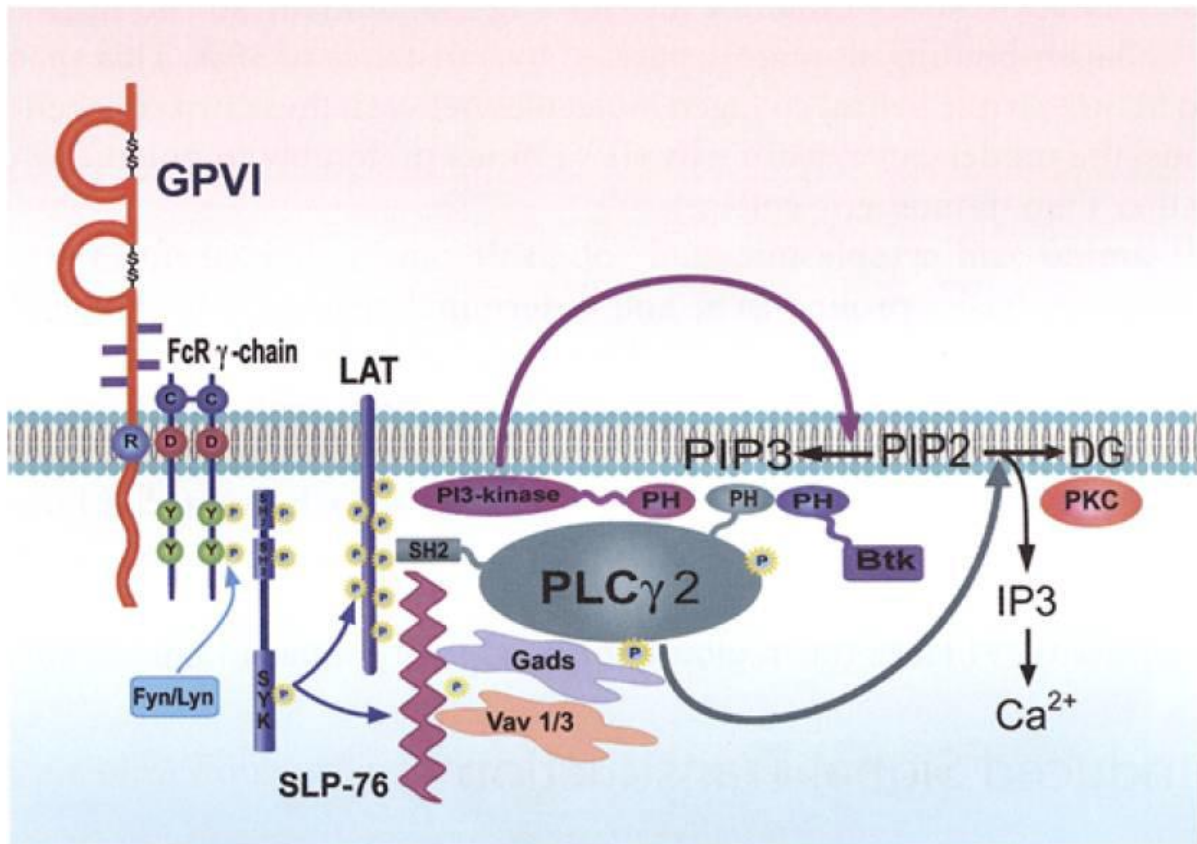


Abb. 9: Model des GPVI-Signalwegs.

PH = pleckstrin-homologe Domäne; SH2 = Src- homologe 2 Domäne (von Jung und Moroi (JUNG und MOROI 2008))

2.4 Das rekombinante, lösliche GPVI-Fc (Revacept®)

Durch Beeinflussung von Thrombozytenadhäsion und -aktivierung an Kollagen ergibt sich ein großes Potential in die primäre Hämostase einzugreifen, vor allem in die pathologisch ablaufende Hämostase (CLEMETSON 1999; CLEMETSON und CLEMETSON 2001). Die

SCHRIFTTUM

antithrombotische Wirkung der kompetitiven Hemmung der GPVI-Kollagen-Interaktion scheint hier ein vielversprechender Weg zu sein.

Miura et al. (MIURA et al. 2002) gelangen es 2002 GPVI zu klonieren. Sie konnten außerdem feststellen, dass nur die dimere Form des GPVI verbunden mit der humanen Immunglobulin-Fc-Domäne an Kollagen bindet, nicht die monomere Form. Massberg et al. (MASSBERG et al. 2004) entwickelten das lösliche GPVI, wobei die extrazelluläre Domäne des GPVI in der dimeren Form verbunden mit der humanen Fc-Domäne vorliegt. Sie konnten zeigen, dass lösliches GPVI-Fc an Kollagen bindet und dass die Thrombozytenadhäsion durch Gabe von löslichem GPVI-Fc kompetitiv gehemmt wird. Dies konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei der Carotisligatur im Mausmodell gezeigt werden.

Bültmann et al. (BULTMANN et al. 2006) konnten eine signifikante Thrombusreduktion bei lokaler Applikation von GPVI-Fc nach Ballondenudation beim Kaninchen feststellen. Von diesen Autoren konnte außerdem gezeigt werden, dass GPVI auch an aktiviertes atherosklerotisches Endothel bindet, ohne dass die Plaque rupturiert sein muss (BULTMANN et al. 2010) (vgl. Kapitel 2.4.1).

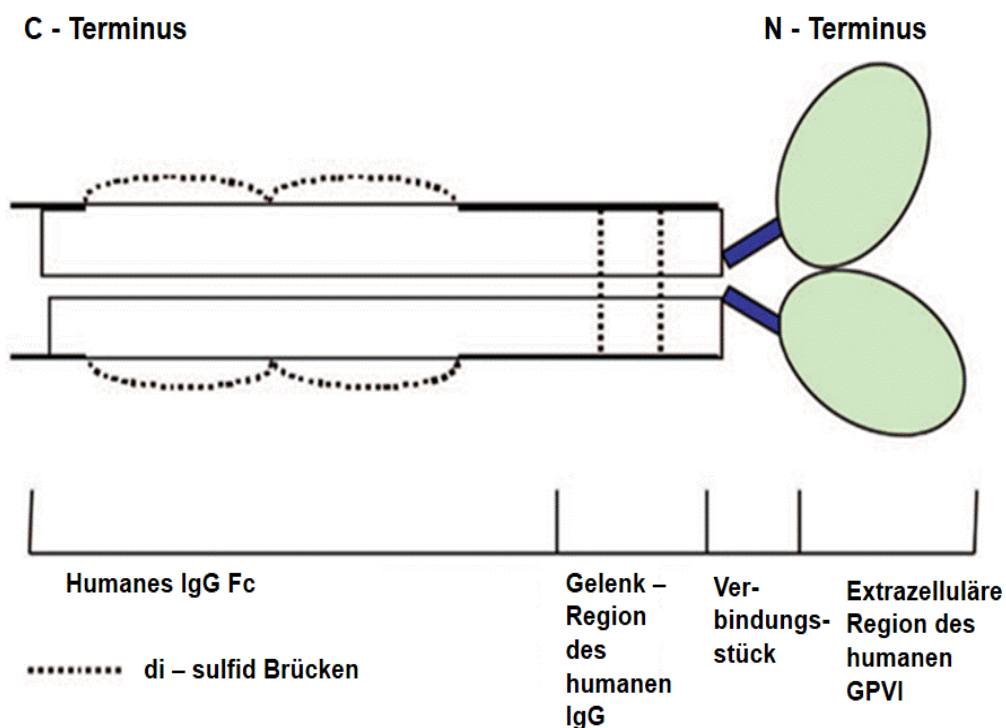


Abb. 10: Darstellung des rekombinanten GPVI-Fc (Revacept®)

GPVI-Fc besteht aus dem IgG-Teil und der extrazellulären Domäne des humanen GPVI (von Ungerer et al. (UNGERER et al. 2011))

2.4.1 GPVI-Fc in der Diagnostik

Dem löslichen GPVI-Fc wohnt ein großes Diagnostikpotential inne, da es an Kollagen verletzter Gefäßwände und atherosklerotische Plaques, bei denen thrombogenes Material freiliegt, bindet. Die Bindung von mit radioaktivem Jod gelabeltem GPVI-Fc an Draht-induzierte Verletzungen der Arteria carotis konnte sowohl in Wildtyp-Mäusen als auch in ApoE^{-/-} (vgl. Kapitel 2.8) Mäusen gezeigt werden (GAWAZ et al. 2005a). Schulz et al. (SCHULZ et al. 2008) konnten zusätzlich die Bindung von Jod gelabeltem GPVI-Fc an antherosklerotische Plaques in der ApoE^{-/-} Maus zeigen und bei Applikation von GPVI-Fc über einen längeren Zeitraum kam es zu einer Abschwächung der Atheroprogression im Vergleich zu mit Fc behandelten Kontrollmäusen. Die Anreicherung von GPVI-Fc an Verletzungen der Arteria carotis (Draht-Denudation und Carotis Ligatur) konnte auch mit Fluoreszenz-gelabeltem GPVI-Fc gezeigt werden (BIGALKE et al. 2011). Dieses Prinzip konnte außerdem *ex vivo* an den Arteriae carotis, femoralis und der Aorta abdominalis von Kaninchen gezeigt werden (BIGALKE et al. 2012).

Ein weiterer Ansatz der Diagnostik mittels GPVI-Fc wurde 2013 ebenfalls von Bigalke et al. (BIGALKE et al. 2013) beschrieben. Hier wurde mit radioaktivem Kupfer gelabeltes (⁶⁴Cu) GPVI-Fc bei mit Cholesterin reicher Diät gefütterten ApoE^{-/-} Mäusen und bei Wildtyp-Mäusen nach Ligatur der linken Arteria carotis eingesetzt. *In vivo* im PET-Scanner konnte eine vermehrte Anreicherung des GPVI-Fc im Bereich des Aortenbogens bei ApoE^{-/-} Mäusen und im Bereich der verletzten Arteria carotis festgestellt werden. Somit ist es möglich, mit gelabeltem GPVI-Fc freiliegendes subendotheliales Kollagen sowohl bei atherosklerotischen Plaques als auch bei verletzter Arteria carotis aufzuspüren und zu diagnostizieren.

2.4.2 GPVI-Fc in der Therapie

Wie schon in Kapitel 2.4.1 erwähnt, konnten Schulz et al. (SCHULZ et al. 2008) zeigen, dass es bei Applikation von GPVI-Fc über einen längeren Zeitraum zu einer abgemilderten Atheroprogression bei der ApoE^{-/-} Maus kommt. Auch bei Kaninchen, die mit Cholesterin-

reicher Diät gefüttert wurden konnte durch GPVI-Fc-Behandlung eine Reduktion der Gefäßwanddicke, der Plaquegröße und der Makrophagen- und T-Zell-Invasion beobachtet werden (UNGERER et al. 2013). Schönberger et al. konnten zeigen, dass eine acht-tägige Therapie mit GPVI - Fc nach Drahtdenudation der linken Arteria carotis Neointima-Formation vermindert (SCHONBERGER et al. 2008). Dieselbe Arbeitsgruppe konnten ebenfalls zeigen, dass die Gabe von GPVI-Fc die Infarktgröße nach transienter Ischämie der LAD (*left anterior descending artery*) des Herzens reduziert und die Herzfunktion erhält (SCHONBERGER et al. 2012).

Auch beim Schlaganfall konnte die Gabe von GPVI-Fc Infarktgröße und Ödem reduzieren, die funktionellen Folgen und die Prognose verbessern, ohne dass es zu intrakraniellen Blutungen kam (GOEBEL et al. 2013).

In einer klinischen Phase I Studie konnte bei gesunden Probanden eine dosisabhängige andauernde Hemmung der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation ohne signifikante Auswirkungen auf die Blutungszeit festgestellt werden. Es konnte ein dosisabhängiges, pharmakokinetisches Profil erstellt, hochspezifische pharmakodynamische Vorgänge gezeigt und die Sicherheit geprüft werden. Es wurden keine Auswirkungen auf Blutdruck, Pulsrate oder EKG Parameter festgestellt (UNGERER et al. 2011).

2.5 Die Rolle der Thrombozyten bei der Atherosklerose

Lange Zeit war die Rolle der Thrombozyten in der Entwicklung der Atherosklerose unbekannt (GAWAZ et al. 2005b). Theilmeier et al. konnten zeigen, dass Thrombozyten in hypercholesterinämischen Kaninchen an atherosklerotischen Prädilektionsstellen adhären, bevor atherosklerotische Läsionen zu finden sind (THEILMEIER et al. 2002). Massberg et al. konnten in ApoE^{-/-} Mäusen zeigen, dass Thrombozyten an Carotisendothel adhären, bevor es zu Entwicklung manifester atherosklerotischer Läsionen kommt (MASSBERG et al. 2002).

SCHRIFTTUM

Man geht mittlerweile von folgender Hypothese der Thrombozytenbeteiligung an der Entwicklung der Atherosklerose aus: aktivierte Plättchen „rollen“ entlang des aktivierten Gefäßendothels, vermittelt über GPIIb/IIIa/P-Selektin oder PSGL-1/P-Selektin. Dies geschieht an atherosklerotischen Prädilektionsstellen, an denen hohe Scherkräfte im Gefäß herrschen. Die Thrombozyten adhären daraufhin über β_3 -Integrine fest an das vaskuläre Endothel, geben proinflammatorische Stoffe ab und induzieren proatherogene Phänotypen der Endothelzellen. Außerdem rekrutieren adhären Thrombozyten zirkulierende Leukozyten (v.a. Monozyten), binden und aktivieren diese und initialisieren so Leukozytentransmigration und Schaumzellbildung (GAWAZ et al. 2005b) (vgl. Kapitel 2.1.1). Für diese Hypothese spricht auch, dass die Blockade des thrombozytären GPIIb/IIIa Leukozytenanreicherung reduziert und die Bildung atherosklerotischer Läsionen abschwächt (MASSBERG et al. 2002). Derselbe Effekt entsteht bei ApoE^{-/-} Mäusen, denen GPIIb/IIIa fehlt (MASSBERG et al. 2005).

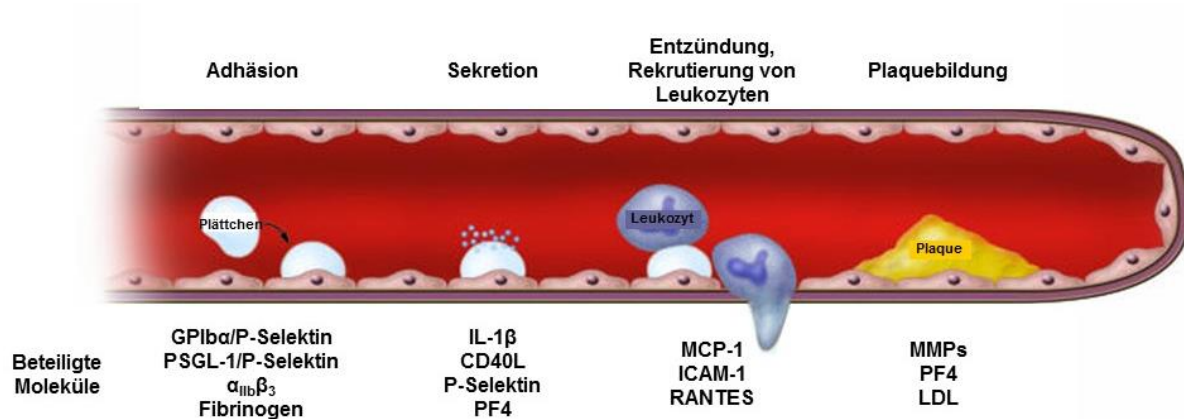


Abb. 11: Beteiligung von Thrombozyten an der Atherosklerose.

Hypothetische Darstellung der durch Thrombozyten ausgelösten Atherogenese. Aktivierte Plättchen rollen an den Prädilektionsstellen entlang, adhären an das Endothel und setzen proinflammatorische Stoffe frei, welche einen proatherogenen Phänotyp der Endothelzellen induzieren. Schließlich rekrutieren adhären Thrombozyten zirkulierende Leukozyten und initiieren so Leukozytentransmigration und Schaumzellbildung (von Gawaz et al. (GAWAZ et al. 2005b).

2.6 Microbubbles

Microbubbles werden schon seit geraumer Zeit als Ultraschallkontrastmittel eingesetzt, in der Kardiologie vor allem um die Herzkammern besser darzustellen, aber auch zur Diagnose mikrovaskulärer Perfusion (LINDNER 2004).

2.6.1 Aufbau und Signalerzeugung

Die Grundstruktur aller Microbubbles besteht aus einer äußeren Kapsel aus unterschiedlichen Materialien, die mit diversen Gasen gefüllt ist. Gramiak und Shah beschrieben 1968 das erste Mal die Verwendung von Microbubbles als Kontrastmittel in der Echokardiographie (GRAMIAK und SHAH 1968). Das erste von der „*United States Food and Drug Administration*“ (FDA) zugelassene Kontrastmittel war 1994 Albunex[®], bei dem die Microbubbles durch Ultraschallbestrahlung aus 5% humanem Serumalbumin hergestellt werden (CHRISTIANSEN et al. 1994). Mittlerweile gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Microbubbles, die als Kontrastmittel in der Medizin eingesetzt werden (KAUFMANN et al. 2007b) (siehe Tabelle 1).

SCHRIFTTUM

Tab. 1 Beispiele verschiedener Microbubbles Kontrastmittel.

In Deutschland ist derzeit nur OptisonTM und Sonovue[®] zugelassen; PLGA = polylactide co-glycolide ((LINDNER 2004).

Name	Hersteller	Hülle	Gas	Durchmesser(µm)
Optison TM	Mallinckrodt/Amersham	Albumin	Octafluoropropan	2 – 4,5
Definity [®]	Bristol - Myers Squibb Medical Imaging	Fette/Tenside	Octafluoropropan	1,1 – 3,3
Imagent [®]	Imcor	Fette/Tenside	N ₂ /Perfluorhexan	6,0
Sonovue [®]	Bracco Diagnostics	Fette	Schwefelhexafluorid	2 – 3
Levovist [®]	Schering AG	Fette/Galactose	Luft	2 – 4
CARDIOSphere [®]	Point Biomedical	PLGA polymer/ Albumin	Stickstoff	
AI - 700	Acusphere	PLGA polymer	Perfluorocarbon	
Sonovist [®]	Schering AG	Cyanoacrylate polymer	Luft	
Sonazoid [®]	Nycomed/ Amersham	Nicht umhüllt	Perfluorocarbon	

Treffen Ultraschallwellen auf die Microbubbles kommt es zur Streuung des Ultraschalls aufgrund der großen akkustischen Impedanz zwischen dem Gas innerhalb der Microbubbles und der umgebenden Flüssigkeit (DENG und LIZZI 2002). Je nach Stärke des eingesetzten Ultraschalls kommt es zu linearer oder nicht-linearer Streuung. Bei kleiner Amplitude (unter 50 kPa) kommt es zu linearer Streuung, bei großer Amplitude zu nicht-linearer (DE JONG et al. 1992). Des Weiteren wird die Streuung der Ultraschallstrahlen bedingt durch die Resonanz der Microbubbles aufgrund ihrer Steifigkeit und Trägheit. Die Steifigkeit kommt von der Verdichtung des eingeschlossenen Gasvolumens, die Trägheit von der umgebenden Masse, die unter eintreffendem Ultraschall oszilliert (MEDWIN 1977; DENG und LIZZI 2002).

Das in dieser Arbeit verwendete Ultraschallgerät Vevo 2100 von Visual Sonics benutzt die Technik der Amplitudenmodulation um das Signal der Microbubbles zu detektieren. In diesem

Fall werden zwei Ultraschallsignale ausgesandt, wobei das zweite Signal um den Faktor zwei kleiner ist als das erste. Dieser Faktor wird auch beim Signal, das vom Gewebe zurückgesandt wird, miteingerechnet. Trifft das Signal auf gleichförmiges Gewebe, heben sich die beiden Antwortsignale gegenseitig auf. Aufgrund der nicht-linearen Streuung der Signale an den Microbubbles kommt es hier nicht zu einer Aufhebung der Signale und man bekommt das typische Kontrastmittelsignal (VISUALSONICS).

2.6.2 Zerstörung von Microbubbles durch hohe Ultraschallfrequenzen

Schon bald nach Einzug der ersten Microbubbles als Kontrastmittel in die Medizin konnte festgestellt werden, dass intensiver Ultraschall zum Verschwinden von Microbubbles führt (PORTER und XIE 1995; DAYTON et al. 1999), allerdings war der genaue Mechanismus lange unbekannt. Mittlerweile weiß man, dass es durch die sogenannte Kavitation zur Zerstörung der Microbubbles kommt. Durch die Ultraschallstrahlung oszillieren Microbubbles, das heißt sie dehnen sich aus und schrumpfen wieder im Wechsel. Bei hoher Ultraschallintensität dehnen sich die Microbubbles sehr schnell, bis sie schließlich kollabieren und in viele kleine Microbubbles zerfallen. Dieser Vorgang wird als träge Kavitation bezeichnet (NEWMAN et al. 2001; NEWMAN und BETTINGER 2007; LENTACKER 2009). Dieses Phänomen kann man sich zunutze machen, um alle Microbubbles in einem Zielberich zu zerstören, also einen „Nullwert“ der Kontrastinetsität zu erzeugen. Im Anschluss kann dann die Anflutung des Kontrastmittels in diesem Zielbereich analysiert werden. Außerdem werden durch diese Zerstörung Zellmembranen permeabel, was man sich in der Medikamentenapplikation zunutze macht (vgl. Kapitel 2.6.4).

2.6.3 *targeted* Microbubbles

Sogenannte *targeted* Microbubbles sind schon in zahlreichen Veröffentlichungen zur Diagnose verschiedener pathologischer Vorgänge verwendet worden. Dabei werden an die Microbubbles

unterschiedliche Liganden gekoppelt, die dann gezielt an bestimmte Strukturen in den Gefäßen binden und somit ein vermehrtes Kontrastsignal in den Bereichen ergeben, in denen die Zielstruktur ausgebildet ist (KAUFMANN und LINDNER 2007; KLIBANOV 2007).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Liganden an die Microbubbles zu binden. Kleine Liganden werden oft schon bei der Herstellung der Microbubbles zugegeben und werden dabei Teil der Hülle (KLIBANOV et al. 1997). Andere Möglichkeiten sind die kovalente Bindung (z.B. Amid-Bindung) von Liganden an die Oberfläche von Microbubbles (VILLANUEVA et al. 1998) und die Koppelung von biotinylierten Liganden an die mit Streptavidin oder Avidin versehenen Hüllen (vgl. Kapitel 2.6.5).

Es gibt einige vielversprechende Studien über den Einsatz von *targeted* Microbubbles, z.B. in der Tumordiagnostik mit *integrin-binding knottin peptides* konjugierten Microbubbles (WILLMANN et al. 2010) oder Microbubbles, die freiliegendes CD81 an Endothelzellen mittels eines CD81 Antikörpers detektieren (YAN et al. 2012). Schumann et al. gelang es 2002 Microbubbles herzustellen, die selektiv an den GPIIb-IIIa Rezeptor auf Thrombozyten binden (SCHUMANN et al. 2002). McCarty et al. war es 2010 möglich mit der Koppelung von GPIIb an Microbubbles, die Präsenz von aktiviertem von-Willebrand-Faktor auf dem Gefäßendothel und so einen prothrombotischen und proinflammatorischen Phänotyp bei der Atherosklerose zu detektieren (MCCARTY et al. 2010). Einen ähnlichen Ansatz hatten auch Kaufmann et al., die *targeted* Microbubbles gegen *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1) entwickelten, die in der Lage sind vaskuläre Inflammation im Zusammenhang mit Atherosklerose in verschiedenen Stadien der Erkrankung zu detektieren (KAUFMANN et al. 2007a). Dies konnte sowohl für VCAM-1 als auch P-Selektin *targeted* Microbubbles in der LDL-Rezeptor Knockout-Maus gezeigt werden (KAUFMANN et al. 2010). Außerdem war es mit Hilfe dieser Microbubbles auch möglich den Erfolg einer anti-inflammatorischen Therapie mit Statinen zu detektieren (KHANICHEH et al. 2013).

Wang et al. konnten mit ihrem entwickelten Antikörper gegen aktiviertes Glykoprotein IIb/IIIa (LIBS-Antikörper), den sie an Microbubbles koppelten, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Thrombusbildung nach Verletzung der Arteria carotis verfolgen und auch den Erfolg einer pharmakologischen Thrombolyse *in vivo* überwachen (WANG et al. 2012).

2.6.4 Microbubbles in der Therapie

Es gibt verschiedene Ansätze Microbubbles mit den unterschiedlichsten Stoffen zu beladen und diese so an den entsprechenden Wirkungsstellen zu visualisieren. Generell lässt sich sagen, Stoffe können in den Microbubbles eingeschlossen sein, Teile der Hülle bilden oder über verschiedene Bindungen an der Microbubblesoberfläche befestigt sein (LENTACKER 2009). Unger et al. entwickelten 1998 die ersten mit Medikamenten beladenen Microbubbles, indem sie das Chemotherapeutikum Paclitaxel in Microbubbles einschlossen (UNGER et al. 1998). Auch der Einschluss verschiedener Stoffe in die Microbubbleshülle ist ein vielversprechender Ansatz, z.B. für DNA (TEUPE et al. 2002) oder therapeutisch bedeutende Proteine wie Hirudin (ZHAO et al. 2005). Außerdem gibt es die Möglichkeit, Substanzen an die Microbubbleshülle zu koppeln, z.B. über elektrostatische Bindung (CHRISTIANSEN et al. 2003) oder über eine Avidin-Biotin Interaktion (LUM et al. 2006), wobei die Hülle der Microbubbles mit Avidin bzw. Streptavidin versehen ist. Dies ist auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Microbubbles der Fall (vgl. Kapitel 2.6.5)

Man kann die beladenen Microbubbles auch mit dem Ansatz der *targeted* Microbubbles kombinieren, wodurch die Microbubbles genau an der Zielstelle des Medikaments festgehalten werden. Zudem können dann die Microbubbles gezielt zerstört werden und so die Substanzen an exakt der entsprechenden Stelle freigesetzt werden. Durch die Zerstörung kommt es zur sogenannten Kavitation, die die Membran der Endothelzellen kurzfristig permeabler macht und so eine vermehrte Anreicherung der Substanzen im Zielgewebe ermöglicht (TSUTSUI et al. 2004; BEKEREDJIAN et al. 2005; MAYER et al. 2008). Während der Zerstörung der Microbubbles entstehen Druckwellen und „Mikroströmungen“ (BRUJAN 2004), welche kurzzeitig Zellmembranen perforieren und sogar Blutgefäße permeabilisieren können, außerdem spielen auch Scherspannungen (WU 2002) eine Rolle bei diesem Prozess (BEKEREDJIAN et al. 2005; LE NTACKER 2009). Studien, die sich mit dem Risiko dieser Zerstörung beschäftigten, fanden häufig Rupturen der Kapillaren, Hämorrhagien und Endothelialzelltod (SKYBA et al. 1998; MILLER und QUDDUS 2000; AY et al. 2001; KOBAYASHI et al. 2002; LI et al. 2003). Die meisten dieser Studien wurden allerdings *ex vivo* und mit sehr viel höheren Konzentrationen und Dosen durchgeführt, als im klinischen Gebrauch verwendet. Das Ausmaß der oben genannten Risiken scheint stark an die

Konzentration der Microbubbles gekoppelt zu sein, außerdem an die Frequenz und Dauer des Ultraschalls (BEKEREDJIAN et al. 2005; MAYER et al. 2008).

2.6.5 Vevo MicroMarker™

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Microbubbles handelt es sich um die VEVO MicroMarker™ Contrast Agent Kits der Firma VisualSonics. Diese Microbubbles werden im Auftrag von VisualSonics von der Firma Bracco speziell für Versuche an Tieren hergestellt, sind von ihrem Aufbau aber identisch mit dem Kontrastmittel SonoVue® (Bracco Imaging GmbH), das in der Humanmedizin verwendet wird. Sie haben einen Perfluorocarbon-Kern und eine Hülle aus Phospholipiden. Die Microbubbles SonoVue®, die in der Humanmedizin eingesetzt werden, haben im Gegensatz dazu einen Kern aus Schwefel-Hexafluorid. Bei VEVO MicroMarker™ ist eine einheitliche Größe der Microbubbles garantiert. Diese liegt zwischen 2,3 - 2,9 µm. Bei der Herstellung des SonoVue® Kontrastmittels werden hingegen auch unterschiedlich große Microbubbles akzeptiert.

Sie sind in einer „Non - targeted“ Version und einer „Target-Ready“ Version erhältlich. In dieser Arbeit sind Target - Ready Contrast Agent Kits verwendet worden. Diese sind auf der Hülle mit Streptavidin versehen, sodass verschiedenste biotinylierte Liganden über die Biotin - Streptavidin Bindung an die Microbubbles gebunden werden können (www.visualsonics.com).

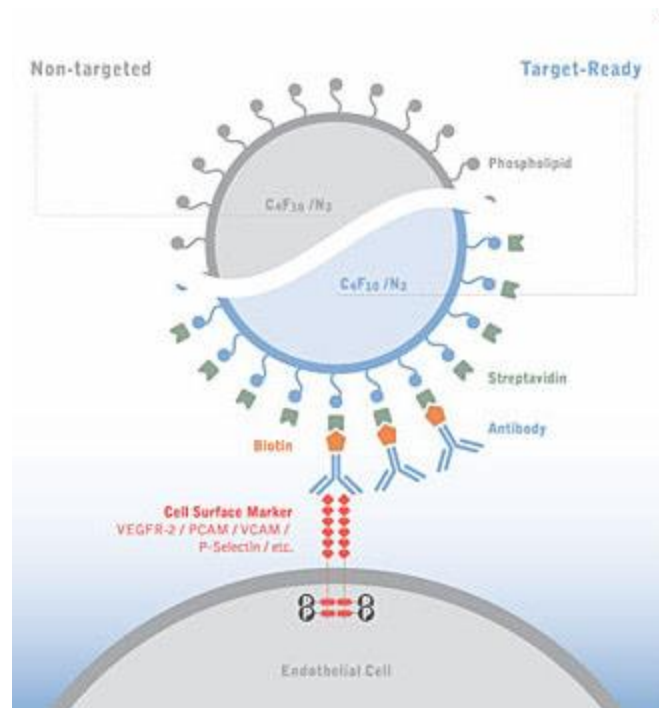


Abb. 12: graphische Darstellung der Vevo MicroMarker™ Contrast Agent Kits.

Sie bestehen aus einem Perfluorocarbonkern und einer Phospholipidhülle, die bei der „Target-Ready“ Version noch mit Streptavidin versehen ist (grün) (www.visualsonics.com)

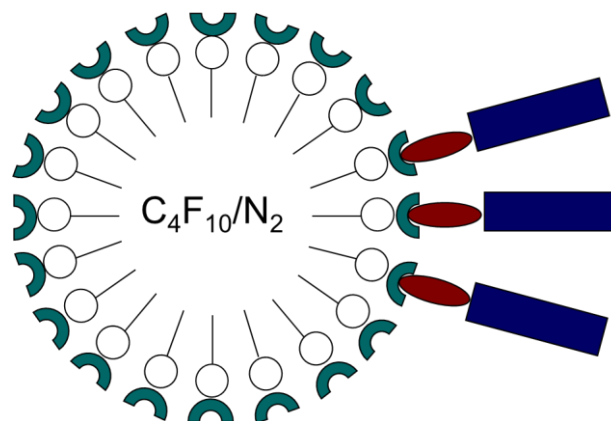


Abb. 13: GPVI-Fc konjugierte Microbubbles.

Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten, mit GPVI-Fc konjugierten Microbubbles

—○ = Phospholipide C = Streptavidin ● = Biotin ■ = GPVI - Fc

2.7 Darstellung von vulnerablen atherosklerotischen Plaques

Das Standardverfahren zur Diagnose der Atherosklerose war lange Zeit die Angiographie, bei der Messungen von Stenose und lumenalem Durchmesser durchgeführt werden (TEN KATE et al. 2010). Allerdings rührt die Infarktgefahr beim Menschen weniger von hochgradigen Lumeneinengungen, sondern hauptsächlich von rupturierten Plaques, die häufig noch keine Lumeneingengung zeigen (FUSTER et al. 1992; FARB et al. 1996). Solche Plaques mit hohem Rupturrisiko werden als vulnerable Plaques bezeichnet (TEN KATE et al. 2010). Histopathologisch sind diese charakterisiert durch aktive Entzündung, einen großen lipidhaltigen Kern, dünner fibröser Kappe, Hämorrhagien innerhalb des Plaques und Neovaskularisierung (FALK et al. 1995; NAGHAVI et al. 2003b; FLEINER et al. 2004; STAUB et al. 2010). In den letzten Jahren wurden auch einige neue nicht invasive Methoden zur Diagnostik vulnerabler Plaques entwickelt, vor allem Ultraschall, Computer-Tomographie (CT) und Magnet - Resonanz - Tomographie (MRT). Diese Methoden haben allerdings alle ihre Grenzen, entweder technisch bedingt oder sie sind nur bei bestimmten Patienten anwendbar und liefern somit nicht vollständig befriedigende Ergebnisse (TEN KATE et al. 2010).

Neue Ansätze setzen auf die oben genannten Techniken in Kombination mit sogenannten molekularen Biomarkern, die als Indikatoren für Krankheiten verwendet werden. Auf Basis des Wissens über die Atherogenese werden verschiedene molekulare Biomarker eingesetzt, die über unterschiedliche pathologische Mechanismen der Atherosklerose versuchen, diese zu diagnostizieren. Beispiele hierfür sind die Inflammation (GAWAZ et al. 2004), die Thrombogenität (MASSBERG et al. 2004; GAWAZ et al. 2005a; BIGALKE et al. 2011; BIGALKE et al. 2013) und die Apoptose oder Matrix-Metalloproteinasen. Diese molekularen Biomarker werden mit unterschiedlichen bildgebende Methoden wie Ultraschall, CT, MRT oder PET kombiniert, um so die vulnerablen Plaques sichtbar zu machen. GPVI gilt als vielversprechender molekularer Biomarker, um vulnerable Plaques zu detektieren und wurde auch schon mit verschiedenen Techniken in diversen tierexperimentellen Studien gekoppelt (LANGER et al. 2007) (vgl. Kapitel 2.4.1).

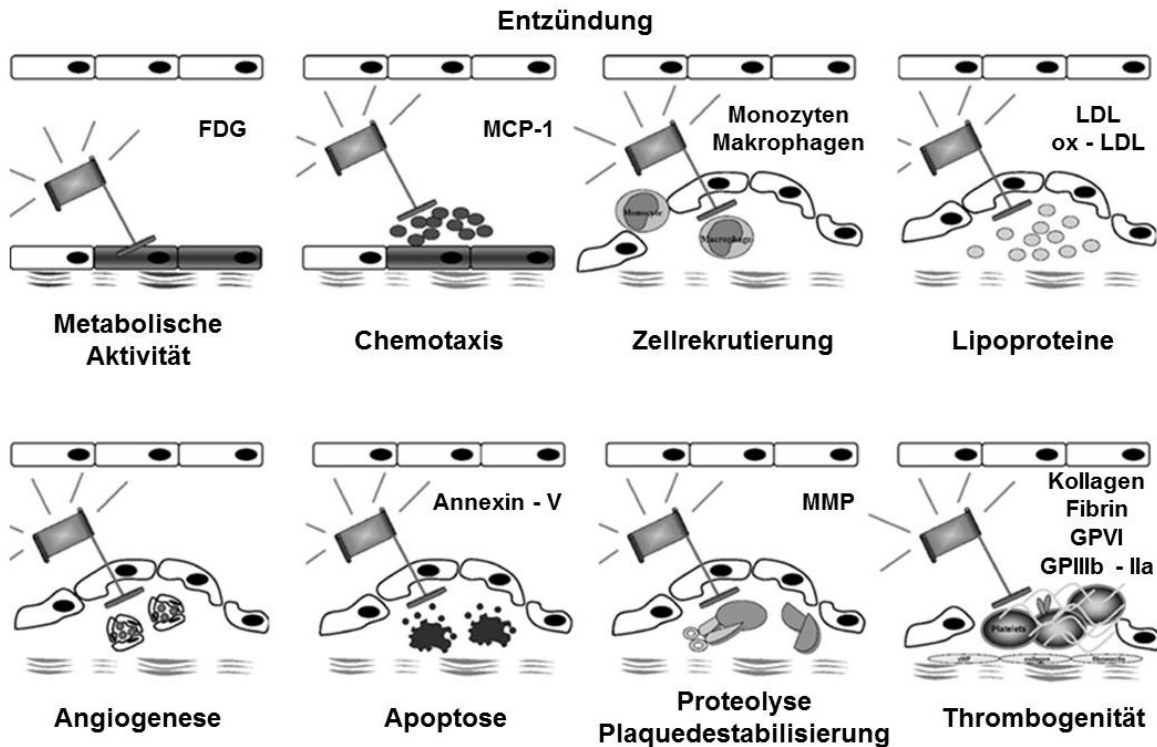


Abb. 14: Darstellung molekularer Biomarker.

Basierend auf dem Wissen zur Atherogenese wurden verschiedene diagnostische Konzepte entwickelt. Große Bedeutung hat die molekulare Darstellung von Entzündung, was vermehrte metabolische Aktivität, Chemotaxis, Zellrekrutierung und Ansammlung von Lipoproteinen umfasst. Außerdem wurden auch Mediatoren von Angiogenese, Apoptose und Matrix-Metalloproteinasen (MMP) erfolgreich eingesetzt. Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Darstellung der Plaque-Thrombogenität, was sowohl Thrombose als auch die Darstellung der thrombogenen subendothelialen Matrixproteine mittels FDG (Fluorodeoxyglukose), Monozyten chemoattractant protein-1 (MCP-1), LDL (lowdensity Lipoprotein), ox-LDL (oxidiertes LDL), GP (Glycoprotein) und vWF (von-Willebrand- Faktor) einschließt. (von Langer et. al. (LANGER et al. 2007))

2.8 Die ApoE^{-/-} Maus

Apolipoprotein E (ApoE) ist Bestandteil des *very low density lipoprotein* (VLDL), das in der Leber synthetisiert wird (SHORE und SHORE 1973) und einer Subklasse des *high density lipoproteins* (HDL), das am Cholesteroltransport der Zellen untereinander beteiligt ist (MAHLEY 1986). ApoE vermittelt außerdem die Bindung von ApoE-beinhaltenen Lipoproteinen an den LDL-Rezeptor und ist somit verantwortlich für die zelluläre Aufnahme dieser Partikel (HUI et al. 1981). Des Weiteren ist es essentiell für die Aufnahme von Restpartikeln der im Darm gebildeten Chylomikronen in der Leber (SHERRILL und DIETSCHY 1978; DRISCOLL und GETZ 1984; PIEDRAHITA et al. 1992).

Piedrahita et al. entwickelten 1992 eine Maus, bei der das Gen für das Apolipoprotein E durch Einbau einer Neomycin-Kassette verändert ist. Diese homozygot defiziente Maus ist somit unfähig ApoE zu synthetisieren und die oben beschriebenen Vorgänge auszuführen (PIEDRAHITA et al. 1992).

Diese Maus entwickelt ähnlich dem Menschen altersabhängig atherosklerotische Läsionen. Diese beginnen wie beim Menschen mit Schaumzellbildung und schreiten bis hin zur Bildung vulnerabler Plaques und Plaquerupturen fort (REDDICK et al. 1994; CARMELIET et al. 1998; ZEIBIG et al. 2011).

Guo et al. fanden 2002 heraus, dass ApoE^{-/-} Mäuse, die restriktiv gefüttert wurden, signifikant weniger atherosklerotische Plaques entwickeln, als solche, die mit Fett *ad libitum* gefüttert wurden (GUO et al. 2002).

Aufgrund ihrer Atheroskleroseentwicklung ähnlich der des Menschen, werden ApoE^{-/-} Mäuse häufig für Forschungsprojekte bezüglich Atherosklerose verwendet.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielvorstellung

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Möglichkeit lösliches GPVI-Fc (Revacept®) als molekularen Biomarker einzusetzen, es an Target-Ready Contrast Agents™ zu koppeln und so mittels Ultraschall vulnerable atherosklerotische Plaques zu diagnostizieren.

GPVI-Fc ist in der Literatur schon mehrfach als Diagnostikum für atherosklerotische Plaques beschrieben, wobei die Plaques *in vivo* mit Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und *ex vivo* mit Hilfe von Fluoreszenzsignalen sichtbar gemacht wurden (GAWAZ et al. 2005a; SCHULZ et al. 2008; BIGALKE et al. 2011; BIGALKE et al. 2012; BIGALKE et al. 2013).

Die Möglichkeit, Ultraschallkontrastmittel gekoppelt mit anderen molekularen Biomarkern zur Darstellung atherosklerotischer Plaques zu nutzen ist ebenfalls schon mehrfach beschrieben worden (KAUFMANN et al. 2007a; KAUFMANN et al. 2010; MCCARTY et al. 2010; WANG et al. 2012).

Somit wurde von der Hypothese ausgegangen, dass zwei solche unabhängig voneinander gut erforschte und funktionierende Methoden in Kombination die ideale Möglichkeit bieten vulnerable atherosklerotische Plaques schon in frühen Stadien zu diagnostizieren.

Der Einsatz von Ultraschall bietet gegenüber der PET-Untersuchung einige Vorteile. Ultraschallgeräte sind in den meisten Kliniken und ärztlichen Praxen schon vorhanden, müssen also nicht extra angeschafft werden. Im Falle einer Neuanschaffung sind die Kosten weitaus

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

geringer, außerdem sind Ultraschallgeräte platzsparender und für die Anwendung sind keine weiteren Sicherheitsmaßnahmen nötig. Die Untersuchung im PET ist zudem um einiges aufwändiger und sowohl für Patienten als auch Anwender durch die eingesetzten radioaktiven Stoffe gefährlicher.

Für diese Arbeit wurde die ApoE^{-/-} Maus als ideales Modelltier für die Atherosklerose ausgewählt, da bei diesem Mausstamm die Atheroskleroseentwicklung genau erforscht ist und auch durch eine entsprechende Diät beeinflusst werden kann.

Außerdem sollte in dieser Studie auch das Potential des Kontrastmittel-GPVI-Konstrukts Einfluss auf die Atheroprogression zu nehmen evaluiert werden. Das therapeutische Potential, das GPVI-Fc inne hat, ist auch schon mehrfach dargelegt worden (SCHONBERGER et al. 2008; SCHULZ et al. 2008; UNGERER et al. 2013). Der Vorteil der Bindung an Ultraschallkontrastmittel ist, dass die Anflutung des Proteins im Zielgewebe durch die Darstellung des Kontrastsignals sicher bestätigt werden kann. Zudem sollte überprüft werden, ob es möglich ist, durch Zerstörung des Ultraschallkontrastmittels eine wie in der Literatur beschriebene verbesserte Aufnahme (TSUTSUI et al. 2004; BEKEREDJIAN et al. 2005; MAYER et al. 2008) von GPVI-Fc im Bereich der Kontrastmittelzerstörung zu erreichen und somit den positiven Effekt von GPVI-Fc noch zu verstärken.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Liste verwendeter Materialien und Geräte

3.2.1.1 Reagenzien

Aceton	(Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Aquatex®	(Merck KG, Darmstadt, Deutschland)
Biotinylierungs-Kit	EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotinylation Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)
Bovines Kollagen I	(BD Biosciences; CA; USA)
Bovines Serum Albumin	BSA 30% Lösung (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Deutschland)
Bovines Serum Albumin	(BSA, AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
Bovines Serum Albumin (1 %)	Albumin bovine serum, Fraction V, ≥96 % (Sigma - Aldrich, Darmstadt, Deutschland)
Citratpuffer (pH 6,0)	41 ml 0,1 M Natriumcitrat (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) 9 ml 0,1 M Zitronensäure (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

	auf 500 ml mit dd _{H2O} auffüllen (Millipore Corporation, Billerica, USA)
Coating Buffer	15 mM Na ₂ CO ₃ (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 35 mM NaHCO ₃ (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 3 mM NaN ₃ (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
DAB	20 µl DAB-Chromogen pro 1 ml Substratpuffer (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
Destilliertes Wasser	(Millipore Corporation, Billerica, USA)
Detektionsreagenz	TMB Detection Reagent (Serva, Heidelberg, Deutschland)
Ethanol	(99 %) (SAV, Flintsbach, Deutschland)
Farbstoff für Proteinkonzentrationsbestimmung	BioRadProtein-Assay Farbstoffkonzentration 1:5 in H ₂ O, (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
Fluorescein - Isothiocyanat (FITC)	(Sigma - Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Formalin	Formaldehyd-Lösung 4,0% (Otto Fischech GmbH, Saarbrücken, Deutschland)
GPVI - Fc	2,4 mg/ml (Corimmun GmbH, Martinsried, Deutschland)
HistoGreen	2 Tropfen HistoGreen Chromogen auf 1 ml HistoGreen-Puffer und 2 Tropfen H ₂ O ₂ (HISTOPRIME®, LINARIS, Dossenheim, Deutschland)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

H ₂ O ultrapore	(Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
Methanol	(Merck KG, Darmstadt, Deutschland)
Microbubbles	VEVO MicroMarker™ Target-Ready Contrast Agent (Visual Sonics, Toronto, Kanada)
NaCl	Isotonische Natrium-Chlorid Lösung 0,9% (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃ 1M, pH 9,3 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
PBS (phosphate buffered saline)	PBS Tabletten (Gibco, Carlsbad, USA)
Protein Block serum - free	(DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
Proteinstandard	1 mg/ml BSA (SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Roti Histol®	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Roti Histokitt®	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Stopplösung	1M Schwefelsäure (H ₂ SO ₄ , Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Streptavidin - HRP	(DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
Tissue Tec®	(Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwonde, Niederlande)
Tween - PBS	0,1% (v/v) Tween 20 (Merck) in 1x PBS lösen
Wasserstoffperoxid (30 %)	(Merck KG, Darmstadt, Deutschland)

3.2.1.2 Färbelösungen

Eisenhämatoxylin nach Weigert	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Eisessig	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Eosin	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Hämalaunlösung	Sauer nach Mayer (Mayers hemalaun solution, Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Lichtgrün	Light Green SF (SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland) Herstellung: 0,2 g Lichtgrün SF + 0,2 ml Eisessig + 100 ml Aqua dest.
Phosphorwolframsäure-Orange G-Gemisch	Sodium Phosphotungstate hydrate (SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland) Orange G (SIGMA - Aldrich, Steinheim, Deutschland) Herstellung: 4 g Phosphorwolframsäure + 2 g Orange G + 100 ml Aqua dest.
Ponceau-Säurefuchsin	Ponceau Xylidine (SIGMA - Aldrich, Steinheim, Deutschland) Accustain® Biebrich, Scarlet-Acid Fuchsin Solution (SIGMA - Aldrich, Steinheim, Deutschland) Herstellung: 0,2 g Ponceau + 0,1 g Säurefuchsin + 0,6 ml Eisessig + 300ml Aqua dest.
Ölrot-Lösung	Ölrot-O (SIGMA-Chemie, Deisenhofen, Deutschland) Stammlösung: 5 g Ölrot-O in 1000 ml 100% Ethanol

Gebrauchslösung: 60 ml Stammlösung + 40 ml Aqua dest.

3.2.1.3 Gebrauchsgegenstände

Deckgläser, 24 x 60 mm	(R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland)
Deckgläser, 24 x 50 mm	(R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland)
Enthaarungscreme	Veet (Reckitt Benckiser, Slough, Berkshire, England)
Gewebekleber	Histoacryl® (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland)
Immuno HB 96 - well Platte	(Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)
Kanüle	20G (BD Microlance®, BD, Franklin Lakes, USA)
Kryoförmchen	25 mm x 20 mm x 5 mm (Saccura Finetek USA, Inc. Torrance, CA, USA)
Liquid Blocker Stift	(Science Services, Japan)
Objektträger	25 mm x 75 mm x 1 mm, Super Frost®Plus (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Spritze	1 ml, Injekt® - F (BBraun, Melsungen, Deutschland)
Trennsäule	PD10 - Säule (Sephadex G - 25M; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Ultraschallgel	Sonogel® (SonogelVertriebsGmbH, Bad Camberg, Deutschland)
Venenverweilkatheter	Vevo® MicroMarker™ TVA (Tail Vein Access) (VisualSonics, Toronto, Kanada)

3.2.1.4 Antikörper

Anti-GPVI, Klon 4C9	(zur Verfügung gestellt von Helmholtz - Zentrum, München, Deutschland)
Anti-human IgG-HRP, Fc-Fragment spezifisch	(Jackson Immuno Research Europe, Newmarket, UK)
Antikörper Immunhistologie	Siehe Tabellen Kapitel 3.2.2.14
Esel anti-Ziege IgG-6nm, Gold gelabelt	(Jackson Immuno-Research Laboratories, West Grove, USA)
FITC Mouse IgG1 Isotype Control	(BD Biosciences, CA, USA)
Ziege anti-Maus IgG, biotinyliert	(Vector Laboratories, Burlingame, USA)

3.2.1.5 Narkosemittel

Isofluran	IsofluranCP (CP Pharma, Burgdorf, Deutschland)
-----------	--

3.2.1.6 Geräte

ELISA 550 platereader	(Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
FACSCalibur Durchflusszytometer	(BD Biosciences, CA, USA)
Flusskammer	Weite 5 mm, Tiefe 50 µm (Maastricht Instruments, Maastricht, Niederlande)
Kryotom	(Leica Instruments, Nussloch, Deutschland)
Mikrotom	Jung Multicut 2045 (Leica Instruments, Nussloch, Deutschland)
Mikrowelle	(Bosch, Deutschland)
Nikon Mikroskop Optiphot - 2	(NIKON GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
Nikon Kamera Sight DS-U1	(NIKON GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
Ultraschallgerät	Vevo 2100 (VisualSonics, Toronto, Kanada)
Schallkopf 38 MHz	MS 400 (VisualSonics, Toronto, Kanada)
Schallkopf 24 MHz	MS 250 (VisualSonics, Toronto, Kanada)
Zeiss Mikroskop Axio Vert 200	(Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
Zeiss Kammera AxioCam MRc5	(Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

Zeiss LIBRA 120 Transmissionselektronen- (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
mikroskop

3.2.1.7 Analyseprogramme

Axio Vision	(Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
NIS-Elements BR 2.1	(Nikon, Düsseldorf, Deutschland)
PRISM	(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)
SPSS	(IBM SPSS Inc, Chicago, IL, USA)
Vevo2100 1.5.0	(VisualSonics, Toronto, Kanada)

3.2.2 Methoden

3.2.2.1 Biotinylierung des rekombinanten Proteins GPVI-Fc (Revacept[®])

Das rekombinante Protein GPVI-Fc wurde mit einem handelsüblichen Biotinylierungskit (EZ-Link[™] Sulfo-NHS-Biotinylation Kit) biotinyliert. Dieses Kit beinhaltet als Biotin Sulfo-N-Hydroxysuccinimide (NHS)-ester aktiviertes Biotin, welches mit primären Aminogruppen (-NH₂) von Antikörpern, Proteinen oder anderen Stoffen reagiert und stabile Aminbindungen eingeht.

2,2 mg Biotin wurden in 500 µl ultrapore H₂O aufgelöst. Es wurden 4 Mol Biotin pro 1 Mol Protein eingesetzt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

500 µl aufgetautes GPVI-Fc (2,4 mg/ml) wurden mit 21 µl aufgelöstem Biotin für eine Stunde inkubiert.

Währenddessen wurden die mitgelieferten Auftrennsäulen durch Zentrifugation (1000 g für 2 min) vom Lagerpuffer befreit und durch weitere 3 - malige Zentrifugation mit 2,5 ml PBS (1000 g für 2 min) kalibriert.

Das biotinylierte GPVI-Fc wurde durch Zentrifugation mit 100 µl ultrapore H₂O bei 1000 g für 2 min gewaschen und aufgefangen.

Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Dafür wurden 10 µl eines Proteinstandards (1 mg/ml BSA) in absteigenden Konzentrationen in eine 96-well-Platte pipettiert (1 mg/ml bis 0,0625 mg/ml), außerdem 10 µl des zu bestimmenden Proteins in den Verdünnungen 1:10 und 1:50. Pro Well wurden 200 µl verdünnter Farbstoff hinzu pipettiert, die Absorption im ELISA-Reader bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration berechnet.

Nach dem gleichen Verfahren wurde mit bovinem Serumalbumin als Kontrolle verfahren.

3.2.2.2 Bestätigung der erfolgreichen Biotinylierung

Um die erfolgreiche Biotinylierung zu bestätigen, wurde ein ELISA durchgeführt. Dafür wurde eine 96-well Platte über Nacht bei 4°C mit 10 µg/ml Kollagen in *Coating Buffer* beschichtet. Die Platte wurde zweimal mit 250 µl pro Well Tween-PBS gewaschen und mit je 100 µl der zu testenden Proteine biotinyliertes GPVI-Fc und biotinyliertes BSA, sowie der Kontrollen BSA und GPVI-Fc in den Konzentration 0; 0,1; 1; 5 und 10 µg/ml für 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Platte wurde zweimal mit Tween-PBS gewaschen und mit jeweils 100 µl Streptavidin-HRP für 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Nach fünfmaligem Waschgang mit Tween-PBS wurde jedes Well mit 100 µl Detektionsreagenz für 10 min inkubiert und die Färbung danach mit 100 µl 1M H₂SO₄ gestoppt.

Die Absorption wurde im ELISA-Reader bei einem Messwert von 450 nm und einem Referenzwert von 570 nm gemessen.

3.2.2.3 Funktionalität des biotinylierten GPVI-Fc

Um zu prüfen, ob bei biotinyliertem GPI- Fc die Bindungsfähigkeit an Kollagen erhalten bleibt wurde ein weiterer ELISA durchgeführt. Hierfür wurde eine 96-well Platte über Nacht bei 4°C mit 10 µg/ml Kollagen in *Coating Buffer* beschichtet und nach zweimaligem Waschgang mit 250 µl/well Tween-PBS über Nacht bei 4°C mit 1% BSA blockiert. Nach zweimaligem Waschgang wurde die Platte mit den Proben GPVI-Fc, biotinyliertes GPVI-Fc, biontinyliertes BSA und FcIgG₂ für 1h bei Raumtemperatur inkubiert (Konzentrationen: 0; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml). Nach erneutem zweimaligem Waschgang erfolgte eine Inkubation mit anti-human IgG-HRP (1:10 000) für 1h bei Raumtemperatur. Die Platte wurde fünfmal mit Tween-PBS gewaschen und für 10 min mit 100 µl/well Detektionsreagenz inkubiert. Die Färbung wurde mit 100 µl/well 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption im ELISA-Reader bei einem Messwert von 450 nm und einem Referenzwert von 570 nm gemessen.

3.2.2.4 FITC-Markierung des biotinylierten GPVI-Fc bzw. BSA

Es wurde eine gesättigte FITC-Lösung hergestellt. 1 Spatelspitze FITC wurde zu 500 µl PBS gegeben und für 2 min bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zum Labeln abgenommen.

1,5 mg des biotinylierten Proteins (GPVI-Fc bzw. BSA) wurden mit PBS auf 1000 µl verdünnt und dann mit 100 µl NaHCO₃ und 200 µl gesättigter FITC-Lösung für 2 Stunden unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur inkubiert.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Nach dreimaliger Spülung der Trennsäule mit PBS und BSA wurde die Proteinmischung über die Säule gegeben und in Fraktionen aufgefangen. Die Fraktion mit gelabeltem Protein weist eine Grün - Gelbfärbung auf. Danach wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. (siehe Kapitel 3.2.2.1)

3.2.2.5 Bindung von biotinyliertem GPVI-Fc bzw. BSA an Microbubbles

Die Microbubbles (VEVO MicroMarker™ Target-Ready Contrast Agent) befinden sich in gefriergetrocknetem Zustand in einem Glasfläschchen. Sie wurden nach Anleitung der Firma VisualSonics wieder in Lösung gebracht. Dazu wurden 500 µl NaCl-Lsg. mit einer 1ml Spritze und einer 20G Kanüle in das Fläschchen eingebracht und die Kanüle wurde für ein paar Sekunden belassen, um die Phiole zu belüften. Das Fläschchen wurde sanft geschwenkt und die Microbubbles wurden für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Nach 10 min wurde der entsprechende Ligand (biotinyliertes GPVI-Fc bzw. biotinyliertes BSA) in einer Konzentration von 0,05 mg/ml zugegeben, wieder sanft geschwenkt und das Ganze erneut für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Der Microbubbles-Ligand Komplex muss innerhalb von 4 - 6 Stunden verwendet werden, da danach die Microbubbles instabil werden und zerfallen.

3.2.2.6 Darstellung der Microbubbles mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

Die Microbubbles wurden wie in Kapitel 3.2.2.5 beschrieben hergestellt, jedoch nicht mit einem Liganden inkubiert. Für die Nativaufnahmen der Microbubbles wurden 3 µl der 1:10 verdünnten Microbubbles auf ein 400 mesh Netz aufgetragen. Für die Immuno-Elektronenmikroskopie wurden die Microbubbles zuerst für 15 min bei Raumtemperatur mit

einem biotinylierten Anti-Maus IgG Antikörper inkubiert und anschließend gegengefärbt mit einem Gold markierten Anti-Ziege IgG.

Die Proben wurden unter dem Transmissionselektronenmikroskop bei 120 kv betrachtet.

3.2.2.7 Durchflusszytometrische Analyse der Microbubbles-Liganden-Komplexe

Die Microbubbles wurden wie in Kapitel 3.2.2.5 beschrieben aufgelöst und für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Ein Teil der Microbubbles wurde mit 10 µg biotinyliertem GPVI-Fc bzw. BSA inkubiert, der andere Teil mit biotinyliertem GPVI-Fc-FITC bzw. biotinyliertem BSA-FITC. Es wurden jeweils 2×10^8 Microbubbles (100 µl) der Microbubbles-Liganden-Komplexe in FACS-Röhrchen verteilt.

Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden alle Ansätze mit 190 µl NaCl-Lsg. verdünnt, um das entsprechende Volumen und die Verdünnung für die durchflusszytometrische Analyse zu erhalten. Microbubbles ohne Liganden dienten als Kontrolle. Die Microbubbles wurden im Forward/Sideward Scatter detektiert, die Messung der Fluoreszenz gab Aufschluss über die erfolgte Färbung.

3.2.2.8 Dynamische Adhäsion (Flusskammer)

Die dynamische Adhäsion der Microbubbles-GPVI-Komplexe wurde mit Hilfe einer Flusskammer analysiert. Dafür wurden Deckgläser mit 70% Ethanol gereinigt, getrocknet, über Nacht mit 200 µg/ml Bovinem Kollagen I bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag für eine Stunde mit 3% BSA in PBS bei Raumtemperatur blockiert.

Microbubbles-GPVI-Fc-Komplexe (MB_{GPVI}) bzw. Microbubbles-BSA-Komplexe= Microbubbles-*Control*-Komplexe (MB_C) wurden wie in Kapitel 3.2.2.5 beschrieben hergestellt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Da Microbubbles Gas-gefüllt sind und somit nach oben steigen, muss die Flusskammer umgedreht werden, sodass das Deckglas oben liegt und die Microbubbles darunter durchfließen.

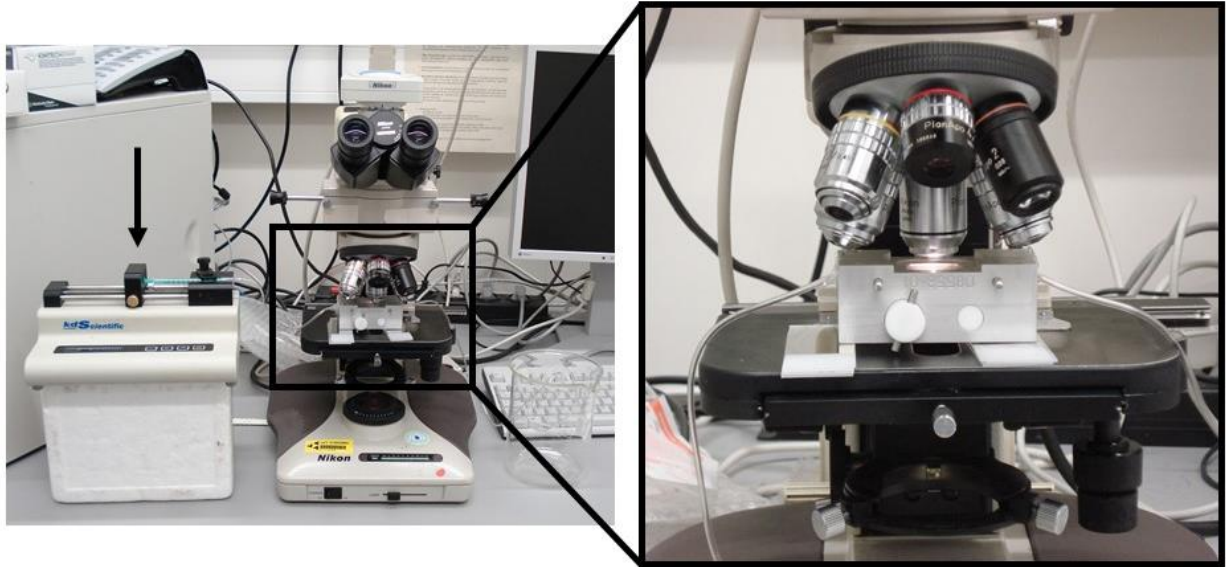


Abb. 15: Flusskammerversuch.

Darstellung des Aufbaus der Flusskammer (links). Mittels eines Perfusors (Pfeil) werden die MB_{GPVI} bzw. MB_C gleichmäßig durch die Flusskammer gespült.

Da die Microbubbles Gas-gefüllt sind musste die Flusskammer umgedreht werden (rechts).

Ein Durchgang wurde begonnen mit einer Scherrate von 50/sec (= 0,37 ml/h) für 5 Minuten. Danach wurde die Scherrate erhöht auf 1000/sec (= 7,53 ml/h). Nach 3 und 5 Minuten bei dieser Scherrate wurde ein Foto aufgenommen. Nach 6 Minuten wurde die Scherrate auf die Maximalrate von 1750/sec (=13,18ml/h) erhöht und erneut fotografiert. Die Fotografien wurden mit einem 40x Objektiv aufgenommen.

Danach wurde mit 1 ml NaCl-Lsg. bei einer Scherrate von 1000/sec für 5 Minuten gespült, und anschließend wurde mit den noch in der Spritze verbliebenen 0,4 ml der NaCl-Lsg. bei einer Scherrate von 1750/sec gespült. Nach Ende des Spülvorgangs wurden weitere 5 Fotografien angefertigt, bei denen mit Hilfe des Programms NIS-Elements BR 2.1 die adhärenen Microbubbles gezählt wurden.

3.2.2.9 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere dienten ApoE^{-/-} Mäuse (B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/J), je nach Versuch unterschiedlichen Alters (siehe bei der Beschreibung des entsprechenden Versuchs), die teils aus Eigenzucht, teils von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) stammen.

Als Kontrolle dienten C57BL/6J Mäuse von Charles River (Sulzfeld, Deutschland).

Alle Mäuse werden in Gruppenhaltung bis zu 5 Tieren in Makrolon Typ II Käfigen gehalten. Treten Rankämpfe auf, werden Männchen getrennt und in kleineren Gruppen bzw. Einzelhaltung gehalten. In der Tierhaltung herrschen eine kontinuierliche Temperatur von 20 - 23°C und eine Luftfeuchtigkeit von 50 - 60 %. Ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden ist vorhanden, genauso ein kontinuierlicher Luftaustausch. In den Lichtphasen beträgt die Beleuchtung der Käfige max. 50 lux. Haltungsfutter (Ssniff, Soest, Deutschland) bzw. Cholesterinfutter mit 1,5 % Cholesterol (Ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser steht den Tieren *ad libidum* zur Verfügung. Eingestreut werden die Tiere mit entkeimtem und entstaubtem Weichholzgranulat aus Espenholz (Fa. ABEDD - LAB & VET Service GmbH, Wien, Österreich), das einmal wöchentlich gewechselt wird. In jedem Käfig befindet sich zudem ein Stück sterilisierter Zellstoff, das den Tieren zum Nestbau und als Beschäftigung dient. Bei einzeln gehaltenen Männchen bzw. auch bei Weibchen in Gruppenhaltung befinden sich außerdem Häuschen im Käfig. Die Genehmigung der tierexperimentellen Studie erfolgte durch das Regierungspräsidium Tübingen unter der Nummer M14/13 nach § 8 Tierschutzgesetz vom 24. 07. 1972 (Neufassung vom 26.05.2006, zuletzt geändert 07.08.2013).

3.2.2.10 Ultraschalluntersuchung des Aortenbogens bei ApoE^{-/-} Mäusen

Die verwendeten Mäuse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tab. 2: Übersicht der für die Ultraschalluntersuchung des Aortenbogens verwendeten Mäuse

Stamm	Alter	Spezialdiät
ApoE ^{-/-}	12 Monate	nein
ApoE ^{-/-}	3 Monate	nein
C57Bl/6J	12 Monate	nein
ApoE ^{-/-}	9 Wochen	ja, für 5 Wochen
ApoE ^{-/-}	13 Wochen	ja, für 9 Wochen
ApoE ^{-/-}	17 Wochen	ja, für 13 Wochen
C57Bl/6J	9 Wochen	nein
C57Bl/6J	13 Wochen	nein
C57Bl/6J	17 Wochen	nein

MB_{GPVI} bzw. MB_C wurden wie in Kapitel 3.2.2.5 beschrieben hergestellt.

Um die spezifische Bindung von MB_{GPVI} an Kollagen zu untersuchen, sollte die Bindung durch vorherige Gabe von löslichem GPVI-Fc blockiert werden. Dafür wurde den entsprechenden

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Mäusen 1 h vor Ultraschalluntersuchung GPVI-Fc in einer Gesamtdosis von 4 mg/kg intravenös appliziert.

Die Maus wurde in einer Narkosebox mittels Isofluran narkotisiert und bei Verlust der Stellreflexe auf die Plattform des Ultraschallsystems gelegt. Die Narkose wurde mit Isofluran (1,5%, Sauerstoff - Flow 0,8/min) aufrechterhalten.

Es wurde ein Venenverweilkatheter in die Schwanzvene gelegt und mit Gewebekleber fixiert.

Die Maus wurde in Rückenlage auf der Plattform fixiert, wobei EKG, Atmung und mittels einer Rektalsonde Körpertemperatur der Maus überwacht werden. Die Temperatur der Platte wird anhand der Körpertemperatur gesteuert, um die Maus vor Auskühlung zu schützen. Die Vitalparameter Puls, Atmung und Körpertemperatur werden auf dem Bildschirm des Ultraschallgeräts angezeigt (Abb. 15).

Die rechte Thoraxseite der Maus wurde enthaart und mit NaCl-Lsg. gereinigt. Mit dem Schallkopf MS 400 (38 MHz) wurde der Aortenbogen von einer modifizierten rechtsseitigen parasternalen Schallkopfposition untersucht und aufgezeichnet. Daraufhin wurde der Schallkopf gewechselt und eine Aufnahme mit dem Schallkopf MS 250 (24 MHz) angefertigt. Es wurde ein *Gate* auf die Atmung gelegt, sodass die Aufnahmen nur aufgezeichnet werden, wenn keine Atembewegung der Maus stattfindet.

Ein 50 µl Bolus MB_{GPVI} bzw. MB_C wurde mittels des Schwanzvenenkatheters appliziert und der Katheter danach mit 100 µl NaCl gespült. Die Anflutung des Kontrastmittels wurde aufgezeichnet. Nach 2 Minuten wurden die Microbubbles zweimal im Abstand von 50 Frames (ca. 4 sec.) durch eine hohe Ultraschallfrequenz zerstört. Ein solcher „Zerstörungszyklus“= Burst erfolgte insgesamt dreimal hintereinander (Abb. 16).

Danach wurde die Maus in derselben Narkose durch Entbluten getötet und danach die rechte und linke A. carotis, die Aorta, Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere entnommen. Die Carotiden und die Aorta wurden zu weiteren Analyse in Paraformaldehyd gelagert bzw. für die Ölrot-Färbung und die anti-GPIIb α -Färbung in Flüssigstickstoff und danach bei -80°C eingefroren. Alle Organe wurden zuerst in Flüssigstickstoff gegeben und danach bei -80°C eingefroren.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

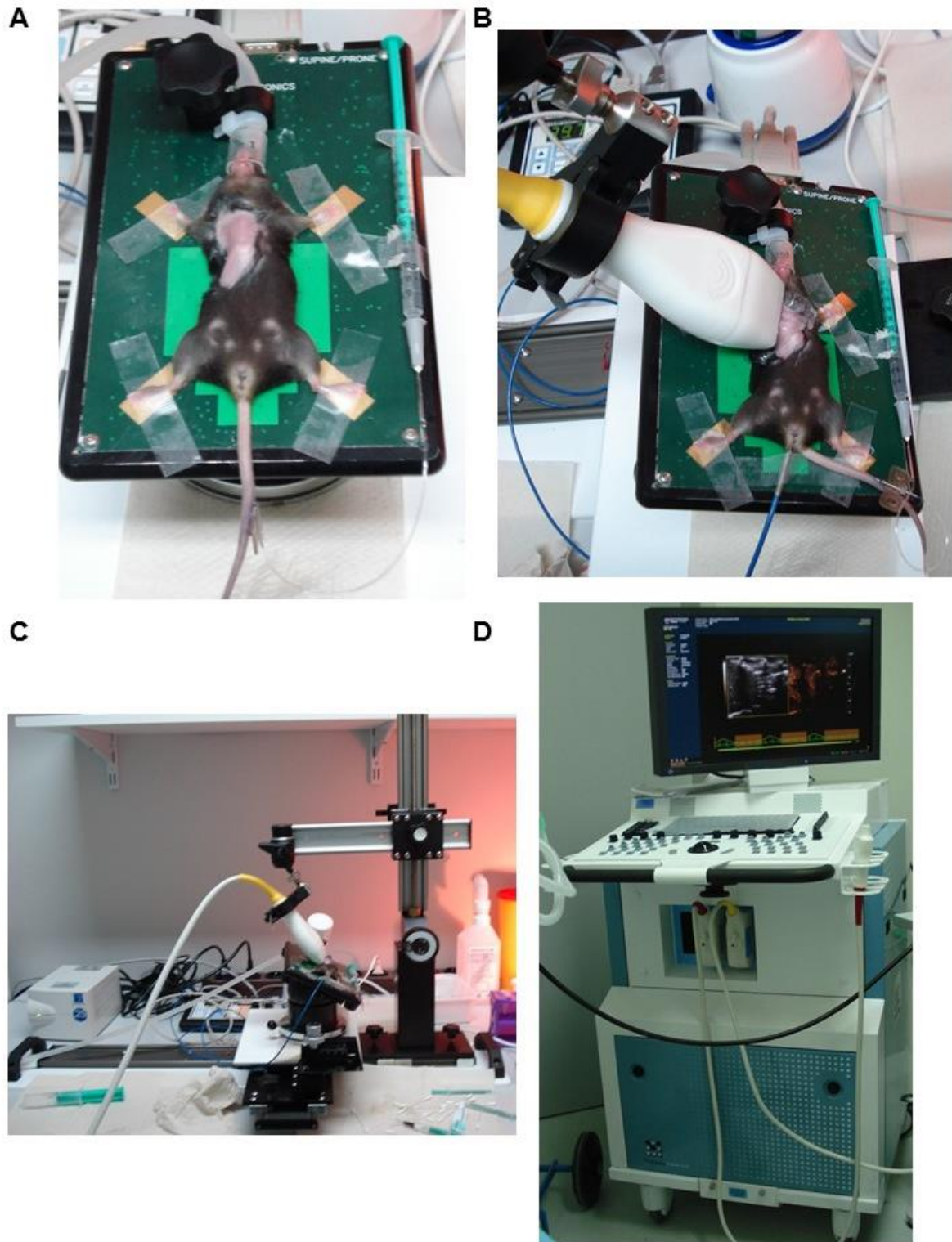


Abb. 16: Ultraschallkontrastmitteluntersuchung bei Mäusen

Der Maus wird ein Venenverweilkatheter in die Schwanzvene gelegt und sie wird mittels Klebeband auf der Plattform des Ultraschallgeräts fixiert. Im goldenen Bereich der Plattform wird ein EKG, im hellgrünen Bereich die Atmung abgeleitet (A). Untersuchung des Aortenbogens aus einer modifizierten rechtsseitigen parasternalen Schallkopfposition. Hier ist auch die Rektalsonde zur Aufzeichnung der Körperinnentemperatur zu sehen (B). Gesamtes Schienensystem des Ultraschallgeräts für eine Fixierung des Schallkopfes und der Maus in der gewünschten Position (C). Das Ultraschallgerät während der Kontrastmittelaufnahme (D)

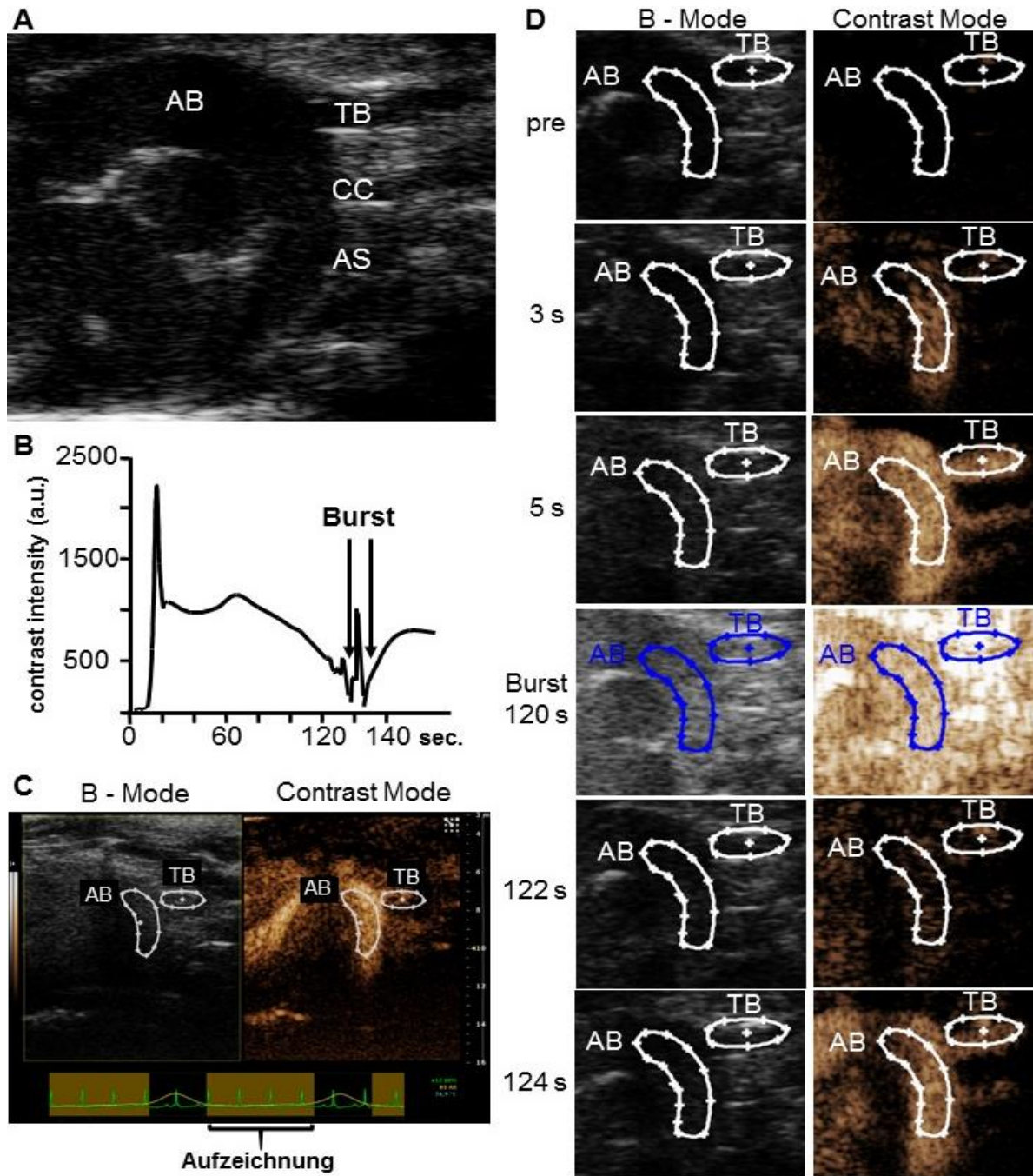


Abb. 17: Ultraschallaufnahmen.

(A) Nativaufnahme des Aortenbogens mit seinen 3 Abgängen. (B) zeitliche Darstellung der Ultraschalluntersuchung beginnend mit der Anflutung bis zum 1. + 2. Burst. (C) Darstellung der Kontrastmittelaufnahme. Links B-Mode, rechts Contrast Mode. Unten werden EKG- und Atmungskurve angezeigt, der gelbe Bereich ist die Zeit, in der keine Atmung stattfindet und nach Gating auf die Atmung die Aufzeichnungen stattfinden. (D) zeitliche Darstellung der unterschiedlichen Phasen. Die Anflutung des Kontrastmittels kann verfolgt werden (3 - 5sec. nach Applikation). Nach Abwarten von ca. 2 Minuten in denen GPVI ermöglicht wird, an Kollagen zu binden, werden die Microbubbles zerstört (Burst 120sec.), danach kann die Wiederanflutung beobachtet werden (122 - 124sec.)

AB=Aortenbogen; TB=Truncus brachiocephalicus; CC=Arteria carotis communis sinistra; AS=Arteria subclavia sinistra

3.2.2.11 Ultraschalluntersuchung der rechten Arteria carotis bei ApoE^{-/-} Mäusen und Beeinflussung der Atheroprogression mittels Zerstörung des Ultraschallkontrastmittels

MB_{GPVI} bzw. MB_C wurden wie in Kapitel 3.2.2.5 beschrieben hergestellt, allerdings wurden für den Therapieversuch die Liganden biotinyliertes GPVI-Fc und biotinyliertes BSA in einer Konzentration von 0,76 mg/ml (Gesamtdosis pro Maus 2,0 mg/kg) hinzugegeben. Der Maus wurde wie in Kapitel 3.2.2.10 beschrieben ein Schwanzvenenkatheter gelegt, der Hals der Maus wurde im Bereich der Bifurkation der Carotiden enthaart, gereinigt und die Maus auf der Ultraschallplattform fixiert.

Der Bereich der Carotiden wurde erst mit dem Ultraschallkopf MS 400 in der Querachse aufgesucht und die Bifurkation der rechten Carotis in der Längsachse dargestellt. Nach Tausch des Schallkopfes wurde dieselbe Untersuchung nochmals mit dem Schallkopf MS 250 durchgeführt.

Ein 50 µl Bolus MB_{GPVI} bzw. MB_C wurde mittels des Schwanzvenenkatheters appliziert und der Katheter danach mit 100 µl NaCl-Lsg. gespült. Die Anflutung des Kontrastmittels wurde im Bereich der rechten Carotibifurkation aufgezeichnet. Nach 2 Minuten wurden die Microbubbles zweimal im Abstand von ca. 50 Frames (ca. 4 sec.) durch eine hohe Ultraschallfrequenz im Bereich der rechten Carotibifurkation zerstört. Ein solcher „Zerstörungszyklus“ erfolgte insgesamt fünfmal hintereinander.

Nach Entfernen des Venenverweilkatheters wurde die Maus in den mit Rotlicht bestrahlten Käfig zurückgesetzt und bis zum vollständigen Aufwachen beobachtet.

Nach einer Woche wurden die Mäuse erneut in Narkose gelegt und die oben beschriebene Behandlung wurde nochmals durchgeführt.

Nach einer weiteren Woche (Gesamtbeobachtungszeit von 2 Wochen) wurde den Mäusen nach Entbluten in Narkose die rechte und linke A. carotis, die Aorta, Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere entnommen. Die Carotiden und die Aorta wurden zur weiteren Analyse in Paraformaldehyd gelagert. Alle Organe wurden zuerst in Flüssigstickstoff und danach bei -80°C eingefroren.

3.2.2.12 Analyse der *Contrast Intensity* des Ultraschallkontrastmittels mit der Computersoftware Vevo 2100 1.5.0

Alle aufgenommenen Filme können mit Hilfe der Software von VisualSonics betrachtet, weiter bearbeitet und analysiert werden.

Zur Darstellung atherosklerotischer Plaques sollte die Intensität des Kontrastmittels im Bereich des Aortenbogens und des Truncus brachiocephalicus analysiert werden. Bei den Mäusen, bei denen eine Beeinflussung der Atheroprogression erreicht werden sollte, wurde der Bereich der rechten Carotisbifurkation analysiert.

Über das zu analysierende Areal wurde eine *Region of Interest* (ROI) gezeichnet. Nun stellt das Programm die Kontrastmittelintensität (*Contrast Intensity* (CI) in arbitrary units (a.u.)) als Kurve im Verlauf der Zeit graphisch dar. Auch der Burst wird dargestellt. Außerdem wird für jeden einzelnen Frame der Aufnahme ein Kontrastintensitätswert in einer Tabelle angezeigt.

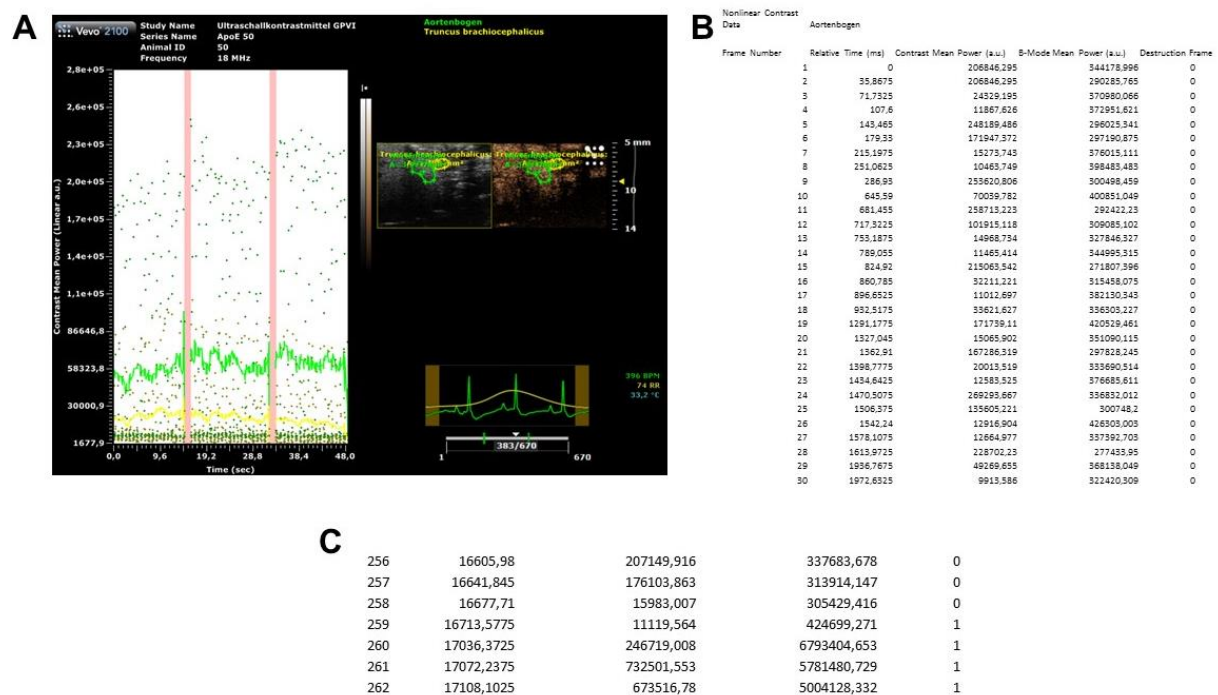


Abb. 18: Analyse der Contrast Intensity

Das Analyseprogramm stellt die Contrast Intensity als Einzelpunkte und als gemittelte Kurve dar. Der Burst wird als rosa Längsbalken dargestellt (A). (B) Auszug aus der Tabelle der Einzelwerte, mit den Spalten beginnend von links nach rechts mit Frame Number, Relative Time (ms), Contrast Mean Power (a.u.), B-Mode Mean Power (a.u.) und Destruction Frame. Eine „1“ in der Spalte Destruction Frame zeigt den Burst an (C)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Es wurde jeweils der erste und der fünfte Burst zur Analyse hinzugezogen, um sowohl die erste Anflutung des Kontrastmittels und somit die initiale Bindung von GPVI-Fc an die atherosklerotischen Plaques, als auch einen Zeitpunkt wenn schon ein Großteil des GPVI-Fc gebunden hat, in die Auswertung mit ein zu beziehen.

Da es nicht zu vermeiden ist, dass die Kontrastmittelintensität im Zusammenhang mit der Herzbewegung schwankt wurde immer der Median der Contrast Intensity verschiedener Frames gebildet, damit sich „Ausreißer“ auf den Wert nicht so stark auswirken.

Es wurde der Median von 50 Frames vor dem jeweiligen Burst gebildet, um so einen möglichst großen Bereich abzudecken und einen möglichst realitätsnahen Wert zu erhalten. Dann wurde der Median von 20 Frames direkt nach dem Burst gebildet. Da durch die schnelle Herzaktion der Maus die Wiederanflutung nach Zerstörung des Kontrastmittels sehr schnell zustande kommt, wurde nach dem Burst der Median von nur 20 Frames genommen, um diesen Wert nicht durch eben diese zu verfälschen.

Es wurde die Differenz zwischen Median vor Burst und Median nach Burst gebildet und dieser Wert als Maß der Thrombogenität der atherosklerotischen Plaques herangezogen.

3.2.2.13 Ölrot-Färbung der Aorta und der Carotiden zur Bestimmung des Ausmaßes der atherosklerotischen Plaques

Die Carotiden und die Aorta wurden für mindestens 24 h in Formalin gelagert und danach unter dem Stereomikroskop von umgebendem Fett- und Bindegewebe befreit.

Jedes Gefäß wurde für 1 - 2 min in destilliertes Wasser gegeben, danach für 3 min in 50% Ethanol und schließlich für 25 - 30 min in Ölrot - Gebrauchslösung (Ölrotstammlösung 1,5 : 1 in destilliertem Wasser verdünnt) gefärbt, wobei nach ca. 20 min die Intensität beurteilt werden sollte, um gegebenenfalls die Färbezeit zu verkürzen oder zu verlängern.

Die Gefäße wurden danach für 1 - 2 min in destilliertem Wasser gespült und wieder in Formalin gelagert.

Fotographien der Gefäße wurden mit dem Zeiss Mikroskop Axio-Vert 200 und der dazugehörigen Kamera MRc5 angefertigt. Mittels der Analysesoftware Axio Vision wurden im Anschluss die Plaqueareale ausgemessen.

3.2.2.14 Histologische Untersuchungen

Herstellung von Paraffinschnitten

Ein Teil der entnommenen Gefäße wurde in 4 % Formaldehyd fixiert, durch eine aufsteigende Alkoholreihe (destilliertes Wasser, 70%, 80%, 95%, zweimal 100% Ethanol, zweimal Roti Histol[®]) entwässert und in Paraffin eingebettet. Der Aortenbogen wurde hierfür so positioniert, dass er später im Querschnitt angeschnitten werden. Mittels des Mikrotoms wurden anschließend Paraffinschnitte in einer Dicke von 5 µm angefertigt, im Wasserbad gestreckt und anschließend auf beschichtete Objektträger aufgetragen. Dabei wurden auf jedem Objektträger drei Schnitte nebeneinander angeordnet, wodurch auf demselben Objektträger, neben der Antikörperfärbung, eine Isotyp- und PBS-Kontrolle mitgeführt werden konnte. Anschließend wurden die Schnitte getrocknet.

Herstellung von Kryoschnitte

Die für Kryoschnitte entnommenen Aortenbögen wurden in entsprechenden Förmchen positioniert (so, dass später der Querschnitt angeschnitten wird) und in Tissue Tec[®] eingefroren. Mittels Kryotom wurden Kryoschnitte in einer Dicke von 5 µm hergestellt und auf beschichteten Objektträgern angeordnet. Dabei wurden auf jedem Objektträger drei Schnitte nebeneinander angeordnet. Dadurch kann auf demselben Objektträger, neben der Antikörperfärbung, eine Isotyp- und PBS-Kontrolle mitgeführt werden. Anschließend wurden die Objektträger eingefroren.

Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Um die HE-Färbung durchzuführen, müssen die Gefäßschnitte zunächst entparaffiniert werden. Hierfür wurden die Präparate zweimal für 10 min in Roti Histol® inkubiert. Mittels einer absteigenden Alkoholreihe aus 100 %, 95 %, 80% und 70 % Ethanol wurden die Schnitte anschließend rehydriert. Nach der Rehydrierung wurden die Objektträger für 5 min in destilliertes Wasser gestellt und im Anschluss für 5 min in Hämalan gefärbt. Hämalan färbt die basophilen Strukturen der Präparate, insbesondere die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-enthaltenden Zellkerne an. Daraufhin wurden die Objektträger 15 min unter lauwarmes fließendes Leitungswasser gestellt. Dabei schlägt die zunächst rötlich-braune Färbung durch Erhöhung des pH-Wertes (Bläuen) in den charakteristischen Blautönen um.

Die Rotfärbung der azidophilen Bestandteile der Präparate, vor allem Zellplasmae, erfolgte für 3 min in 1% Eosin, welches mit einem Tropfen Eisessig versetzt wurde. Zur Dehydrierung wurden die Objektträger je 5 sek durch eine aufsteigende Alkoholreihe von 70%, 80% und 90% Ethanol geführt und anschließend zweimal 5 min in 100% Ethanol inkubiert. Danach wurden die entwässerten Schnitte für 3 min in Roti Histol® geklärt und anschließend mithilfe von Roti Histokitt® eingedeckelt. Die HE-Färbungen wurden als Übersichtsfärbungen genutzt.

Masson-Goldner-Färbung

Um die Masson-Goldner-Färbung durchzuführen, müssen die Gefäßschnitte zunächst wie bei der HE-Färbung entparaffiniert werden. Hierfür wurden die Präparate zweimal für 10 min in Roti Histol® inkubiert. Mittels einer absteigenden Alkoholreihe aus 100%, 95%, 80% und 70% Ethanol wurden die Schnitte anschließend rehydriert. Nach der Rehydrierung wurden die Objektträger für 5 min in destilliertes Wasser gestellt und danach für 2 min die Kerne in Eisenhämatoxylin gefärbt. Nach kurzem Spülen in Aqua dest. wurden die Schnitte für 15 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und danach für 5 min in Ponceau-Säurefuchsin gegeben. Dieser Farbstoff durchdringt aufgrund seiner feinen Dispersität innerhalb kürzester

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Zeit alle Strukturen und färbt Muskulatur, Zellplasma (Ponceau) und Bindegewebe (Säurefuchsin) rot. Nach erneutem Waschen in Aqua dest. wurden die Gefäßschnitte für 10 min in dem Phosphorwolframsäure-Orange G-Gemisch inkubiert. Phosphorwolframsäure ist ein hochkolloidaler Stoff, der den sauren Farbstoff aus dem kollagenen Bindegewebe verdrängt, damit sich das Lichtgrün anlagern kann. Orange G färbt zusätzlich die Erythrozyten orange an. Nach nochmaligem Waschen in Aqua dest. wurden die Gefäßschnitte für 5 min in Lichtgrün gefärbt, das aufgrund seiner grobdispersen Phase zuerst nur die groben kollagenen Fasern anfärbt. Bevor der Farbstoff in feinere Strukturen eindringen kann, wird die Färbung gestoppt.

Zur anschließenden Dehydrierung wurden die Objektträger je 5 sek durch eine aufsteigende Alkoholreihe von 70%, 80% und 90% Ethanol geführt und anschließend zweimal 5 min in 100% Ethanol inkubiert. Danach wurden die entwässerten Schnitte für 3 min in Roti Histol® geklärt und anschließend mithilfe von Roti Histokitt® eingedeckelt.

Ölrot-Färbung von Kryoschnitten

Die entsprechenden Kryoschnitte wurden aus dem Gefrierschrank genommen und für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Daraufhin wurden die Schnitte für 30 min in 4% Formaldehyd fixiert und für weitere 30 min bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Schnitte wurden für 5 min in 60% Alkohol getaucht und daraufhin 10 min in Ölrot-Gebrauchslösung gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte kurz in 60% Alkohol und in destilliertem Wasser gewaschen.

Zur Gegenfärbung der basophilen Kerne wurden die Objektträger für 3 min in Hämalan gefärbt und für 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut, um den charakteristischen Blauton durch Erhöhung des pH zu erhalten.

Zum Schluss wurden die Objektträger in wässrigem Eindeckmedium (Aquatex®) eingedeckelt.

Immunhistochemie

Paraffinschnitte

Um die immunhistochemischen Färbungen auf Paraffinschnitten durchzuführen müssen die Gefäßschnitte zuerst wie bei der HE-Färbung beschrieben entparaffiniert und über eine Alkoholreihe rehydriert werden. Danach wurden die Objektträger 15 min in Citratpuffer (pH = 6) gekocht, um das Antigen zu demaskieren, das heißt, um die durch die Formalin-Fixierung verloren gegangene Immunreaktivität wieder herzustellen. Die Gefäßschnitte ließ man langsam abkühlen, sie wurden dreimal 2 min in Tween-PBS gewaschen und 15 min in H₂O₂ (3%) inkubiert, was die endogene Peroxidase hemmt, um spätere falsch positive Signale auszuschließen. Nach erneutem Waschen mit Tween-PBS wurden die einzelnen Schnitte mit einem Liquid Blocker Stift voneinander getrennt, um ein ineinander laufen der Antikörper zu vermeiden. Um die Bindung von GPVI-Fc an Kollagen in atheroklerotischen Plaques darzustellen, wurde ein Teil der Gefäßschnitte für 30 min mit löslichem GPVI-Fc bzw. Fc als Kontrolle inkubiert und danach mit anti-Fc Antikörper gefärbt. Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte für 30 min mit Protein Block serum-free inkubiert. Der Protein Block wird abgekippt und die Schnitte wurden für 1 h bei Raumtemperatur mit den entsprechenden Primärantikörper inkubiert, welcher zuvor in 3% BSA in PBS verdünnt wurde. Da auf einem Objektträger immer 3 Schnitte aufgetragen sind, wurde jeweils ein Schnitt mit dem Primärantikörper, ein Schnitt mit PBS und ein Schnitt mit der entsprechenden Isotyp-Kontrolle aus der Spezies des Primärantikörpers inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal für 5 min in Tween-PBS gewaschen und anschließend der entsprechende biotinylierte Sekundärantikörper für 30 min bei Raumtemperatur aufgetragen. Erneut wurde dreimal für 5 min in Tween-PBS gewaschen und für weitere 30 min mit Streptavidin-HRP inkubiert. Nach nochmaligem dreimaligem Waschen für 5 min in Tween-PBS wurden die Schnitte mit HistoGreen bzw. DAB inkubiert, das zuvor nach Herstellerangaben hergestellt wurde. Nach 2 - 5 min, wenn eine Grünfärbung zu sehen war, wurde das HistoGreen abgekippt und die Schnitte nochmals dreimal für 2 min in Tween-PBS gewaschen. Um die Zellkerne anzufärben wurden die Gefäßschnitte für 3 min in Hämalaun gefärbt und für 10 min unter lauwaremem fließendem Leitungswasser gebläut. Zur abschließenden Entwässerung wurden die Schnitte jeweils für 5 sek in einer aufsteigenden Alkoholreihe aus 70%, 80%, 90% und

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

zweimal 100% inkubiert und schließlich zweimal 3 min in Xylol geklärt und mit Roti Histokitt® eingedeckelt.

Alle verwendeten Antikörper und Isotypkontrollen mit den entsprechenden Verdünnungen sind in den Tabellen 3 - 5 aufgeführt.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte nach Trocknung über Nacht mithilfe des Mikroskops Optiphot-2 und der Software NIS-Elements.

Tab. 3: Primäre Antikörper für die Immunhistochemie (Paraffinschnitte)

Antikörper	Vorinkubation	Spezies	Verdünnung	Firma
Anti-human-IgG, Fc-Fragment spezifisch	nein	Ziege	1:500	Jackson Immuno Research
Anti-human-IgG, Fc-Fragment spezifisch	30 min GPVI-Fc bzw. Fc	Ziege	1:500	Jackson Immuno Research
Anti-Biotin	nein	Ziege	1:200	Thermo Scientific

Tab. 4: Sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie (Paraffinschnitte)

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
Anti-Ziege	Kaninchen	Anti-Fc: 1:500 Anti-Biotin: 1:250	DakoCytomation

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 5: Isotypenkontrolle für die Immunhistochemie (Paraffinschnitte)

Isotypenkontrolle	Färbung	Verdünnung	Firma
IgG Ziege	Anti - Fc	1:2500	DakoCytomation
IgG Ziege	Anti - Biotin	1:1250	DakoCytomation

Kryoschnitte

Die Kryoschnitte wurden nach Entnahme aus dem Gefrierschrank für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Gefäßschnitte wurden anschließend zuerst für 7 min in Formaldehyd fixiert, dreimal für 2 min in PBS gewaschen und nochmals 10 min in kaltem Aceton fixiert und für 20 min an der Luft trocknen gelassen. Nach erneutem zweimaligem Waschen für 2 min in Tween-PBS erfolgt die restliche Färbung beginnend mit Inkubation in 3% H₂O₂ analog zur Färbung der Paraffinschnitte wie dort beschrieben. Allerdings erfolgte bei den Kryoschnitten die Inkubation der Gefäßschnitte mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C im Kühlschrank

Alle verwendeten Antikörper und Isotypkontrollen mit den entsprechenden Verdünnungen sind in den Tabellen 6 - 8 aufgeführt.

Tab. 6: Primäre Antikörper für die Immunhistochemie (Kryoschnitte)

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
Anti-GPIIb α (CD42b)	Ratte	1:50	emfret analytics

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 7: Sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie (Kryoschnitte)

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
Anti-Ratte	Kaninchen	1:200	DakoCytomation

Tab. 8: Isotypenkontrolle für die Immunhistochemie (Kryoschnitte)

Isotypenkontrolle	Verdünnung	Firma
IgG Ratte	1:50	DakoCytomation

3.2.2.15 Statistik

Alle *in vitro* Versuche wurden mindestens zweimal durchgeführt, bei *in vivo* Versuchen ist die Anzahl angegeben. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Statistische Analysen wurden mittels den Computerprogrammen PRISM (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) und SPSS (IBM SPSS Inc, Chicago, IL) durchgeführt. Die Signifikanz wurde mittels two - tailed t - test ermittelt. Ab einem p-Wert kleiner 0,05 wird von statistischer Signifikanz gesprochen (*p < 0.05; **p < 0.01 und ***p < 0.001).

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Erfolgreiche Biotinylierung des rekombinanten GPVI-Fc (Revacept®)

Die Biotinylierung von GPVI-Fc wurde mit dem handelsüblichen Biotinylierungskit EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotinylation Kit von Thermo Scientific durchgeführt. Die erfolgreiche Biotinylierung wurde über einen Kollagen-Bindungs-ELISA bestätigt.

Die erfolgreiche Biotinylierung wurde über Streptavidin detektiert, an das *Horseradish*-Peroxidase gekoppelt ist. Diese *Horseradish*-Peroxidase reagiert ihrerseits mit dem Detektionsreagenz TMB und bewirkt eine Farbumwandlung von TMB, welches konzentrationsabhängig ein unterschiedlich intensives Blau annimmt. Durch die Zugabe von 1M Schwefelsäure wird diese Reaktion gestoppt und die blaue Farbe in den einzelnen Wells schlägt nach gelb um. Die Absorption dieser gelben Farbe wurde dann im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Mean Absorbance (OD))

Konzentrationsabhängig wurde in den einzelnen Wells eine höhere *Mean Absorbance* detektiert, wobei bei nicht biotinyliertem GPVI und BSA keine erhöhte *Mean Absorbance* detektiert werden konnte. Diese *Mean Absorbance* ist als Wert für die Biotinylierung zu betrachten. Es konnte somit eine konzentrationsabhängige erfolgreiche Biotinylierung sowohl von GPVI-Fc als auch von BSA festgestellt werden (Abb.18). Bei einer Konzentration von 10 µg/ml betrug der Mittelwert für biotinyliertes GPVI-Fc $2,33 \pm 0,41$ verglichen mit nicht biotinyliertem GPVI-Fc $0,327 \pm 0,21$. Auch bei BSA konnte so eine erfolgreiche Biotinylierung festgestellt werden. Hier betrug der Mittelwert $2,39 \pm 0,34$, wobei er bei nicht biotinyliertem BSA bei $0,23 \pm 0,027$ lag.

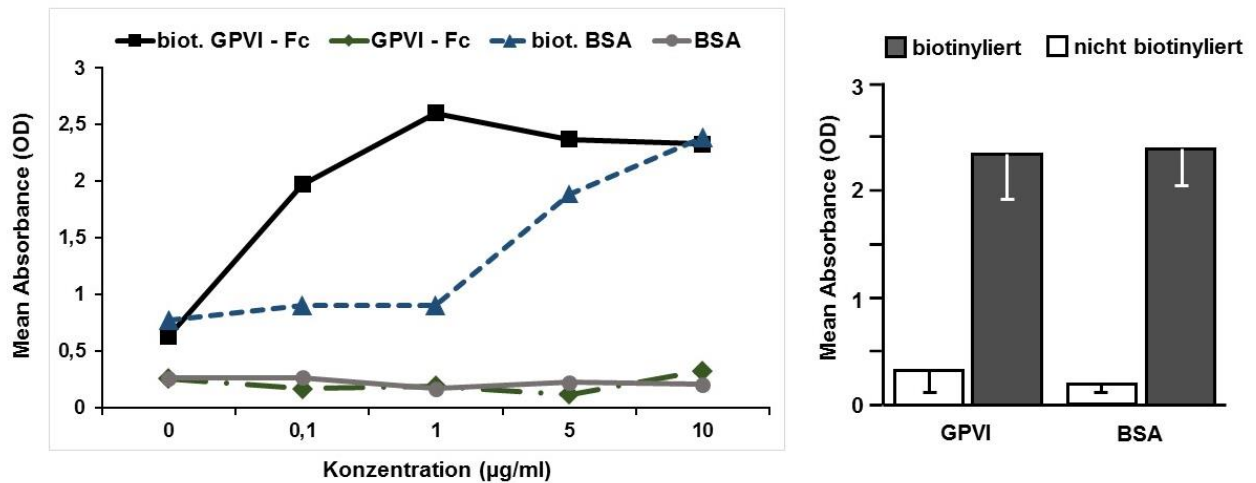


Abb. 19: Biotinylierung von GPVI-Fc.

Konzentrationsabhängiger Anstieg der Mean Absorbance bei biotinyliertem GPVI- Fc bzw. BSA (links). Rechts: direkter Vergleich der Biotinylierung bei 10 µg/ml.

3.3.2 Funktionsprüfung des biotinylierten GPVI-Fc

Nach der erfolgreichen Biotinylierung sollte analysiert werden, ob dem biotinylierten GPVI-Fc seine volle Funktionsfähigkeit erhalten bleibt und es weiterhin erfolgreich an Kollagen bindet. Hierfür wurde ein Kollagen-Bindungs-ELISA durchgeführt, bei dem unspezifische Bindungen über Nacht mit BSA blockiert wurden. Als Positivkontrolle diente nicht biotinyliertes GPVI-Fc, als Negativkontrolle sowohl biotinyliertes BSA, als auch Fc. Das gebundene GPVI-Fc wurde mit einem HRP-gelabeltem anti-human IgG, Fc-Fragment spezifischen Antikörper detektiert und wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben mit Detektionsreagenz TMB und Schwefelsäure farblich dargestellt. Die *Mean Absorbance* (OD) wurde ebenfalls im ELISA Reader bei 450 nM gemessen. Die Werte der *Mean Absorbance* können in diesem ELISA als Maß für die Bindung von GPVI-Fc an Kollagen betrachtet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die *Mean Absorbance* konzentrationsabhängig bei biotinyliertem GPVI-Fc wie bei nicht biotinyliertem GPVI-Fc ansteigt (Abb. 19). Sie lag bei einer Konzentration von 10 µg/ml bei nicht biotinyliertem GPVI-Fc bei $1,14 \pm 0,64$ und bei biotinyliertem GPVI-Fc bei $1,62 \pm 0,45$.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Somit konnte die voll erhaltene Funktionsfähigkeit von biotinyliertem GPVI-Fc bestätigt werden.

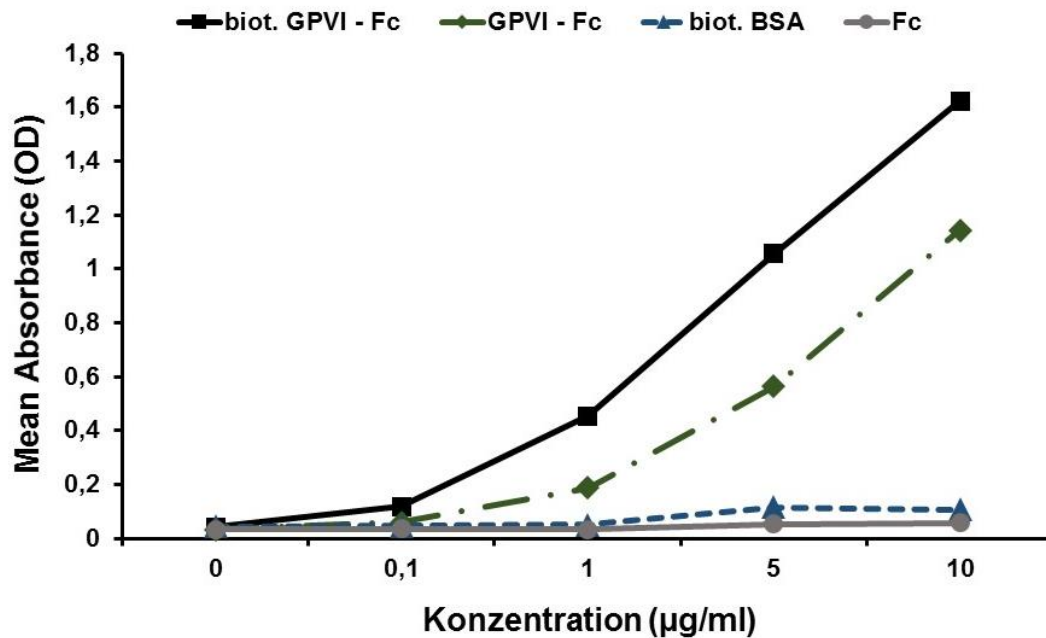


Abb. 20: Funktionsfähigkeit des biotinylierten GPVI-Fc

Konzentrationsabhängige Bindung von biotinyliertem GPVI-Fc (biot. GPVI-Fc) und reinem GPVI-Fc im Gegensatz zu biotinyliertem BSA (biot. BSA) und Fc. Die Unterschiede zwischen biotinyliertem GPVI-Fc und reinem GPVI-Fc sind vermutlich durch Pipettierungenauigkeiten bedingt.

3.3.4 Bildliche Darstellung der Microbubbles mit Elektronenmikroskopie

Um einen Eindruck der äußeren Gestalt der Microbubbles zu bekommen, wurden Aufnahmen mit dem Transmissions-Elektronen-Mikroskop angefertigt. Diese Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Fehrenbacher im Labor der Hautklinik des Universitätsklinikums Tübingen angefertigt.

Um außerdem das in die äußere Hülle inkorporierte Streptavidin sichtbar zu machen, wurden mit einem Gold-markierten biotinylierten Antikörper gezielt diese Bereiche dargestellt.

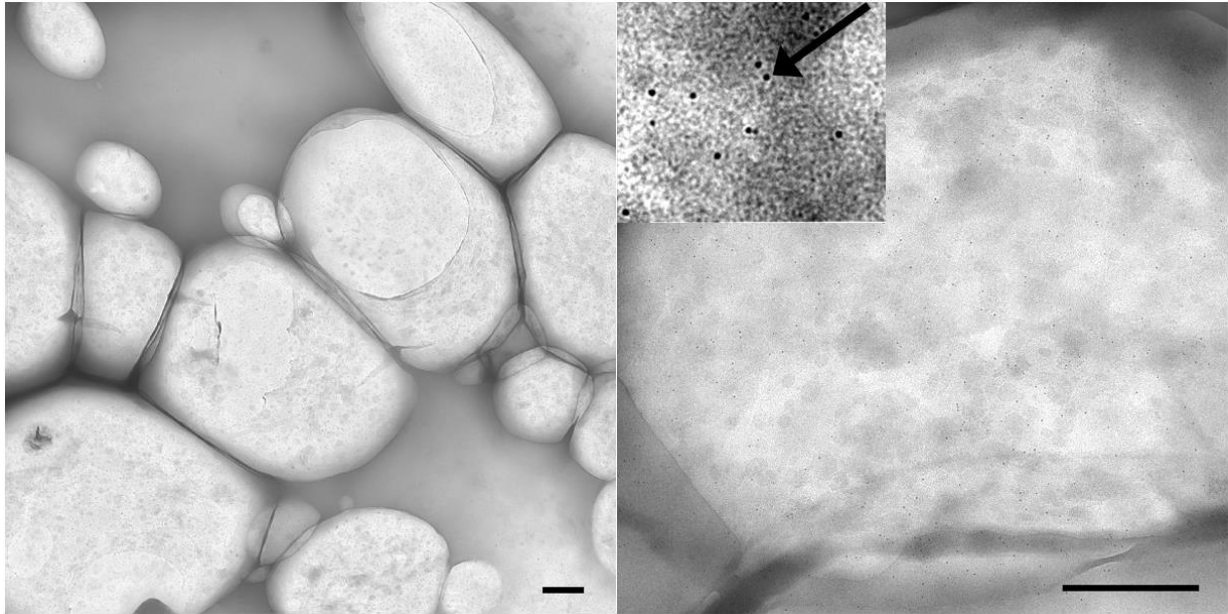


Abb. 21: Elektronenmikroskopdarstellung der Microbubbles.

Links: native Darstellung mehrerer nebeneinander liegender Microbubbles. Rechts: Färbung des Streptavidins auf der Hülle der Microbubbles mit vergrößertem Ausschnitt. Die Goldpartikel stellen sich als kleine schwarze Punkte auf der Oberfläche der Microbubbles dar (Pfeil). (Maßstabsbalken = 0,5 μm)

3.3.5 Bestätigung der Bindung des biotinylierten GPVI-Fc bzw. BSA an die Microbubbles mittels Durchflusszytometrie

Um zu zeigen, dass biotinyliertes GPVI-Fc und biotinyliertes BSA auch wirklich an die Microbubbles binden, wurde ein durchflusszytometrisches Verfahren gewählt. Die Microbubbles haben mit einem Durchmesser von 2,3 – 2,9 μm ungefähr die Größe von Thrombozyten und können somit sehr gut mittels Durchflusszytometrie erfasst werden.

Reine Microbubbles wurden als Kontrolle und zur Einstellung des *Gates* benutzt. Ein Teil der Microbubbles wurde mit biotinyliertem und gleichzeitig FITC-markiertem GPVI-Fc inkubiert ($\text{MB}_{\text{GPVI-FITC}}$), der andere Teil mit biotinyliertem und FITC-markiertem BSA ($\text{MB}_{\text{C-FITC}}$). Diese Gruppen wurden im FACScalibur Durchflusszytometer analysiert.

Sowohl für $\text{MB}_{\text{GPVI-FITC}}$ ($44,31 \pm 5,02$) als auch $\text{MB}_{\text{C-FITC}}$ ($44,12 \pm 6,85$) konnte eine erhöhte Fluoreszenz verglichen mit den reinen Microbubbles ($1,02 \pm 0,01$) festgestellt werden. Die

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

mittlere Fluoreszenz von $MB_{GPVI-FITC}$ und MB_C-FITC unterscheiden sich kaum. Daraus kann geschlossen werden, dass biotinyliertes GPVI-Fc und biotinyliertes BSA in gleicher Menge und gleich stark an die Microbubbles binden und MB_C somit als gute Negativkontrolle für MB_{GPVI} dienen können.

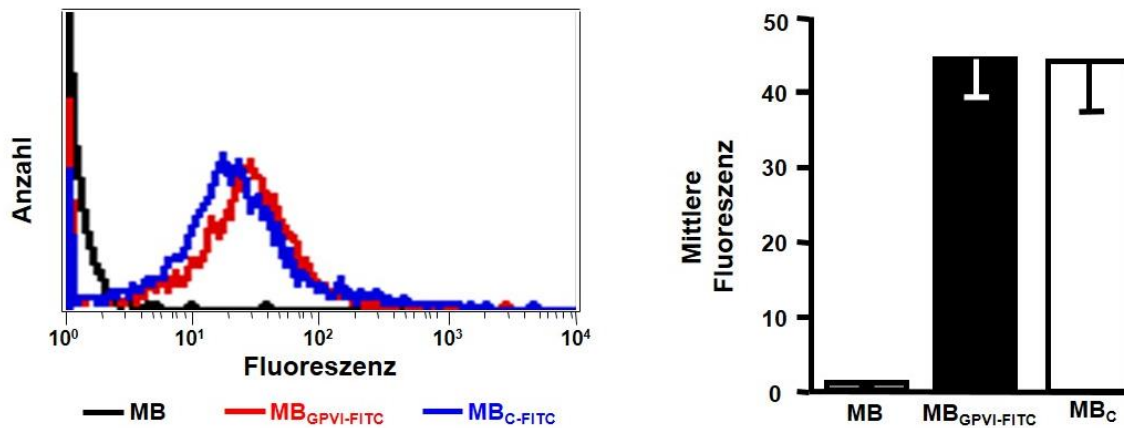


Abb. 22: Durchflusszytometrie.

MB wurden zum Einstellen des Gates verwendet. $MB_{GPVI-FITC}$ und MB_C-FITC zeigen eine erhöhte Fluoreszenz gegenüber den *MB*. Die Fluoreszenzstärken beider Gruppen sind fast identisch (links). Die graphische Darstellung der mittleren Fluoreszenz zeigt die gleiche Bindung von biotinyliertem GPVI-Fc und biotinyliertem BSA an Microbubbles (rechts).

3.3.6 Dynamische Adhäsion von MB_{GPVI} und MB_C an Kollagen in der Flusskammer

In diesem Versuch wurde die Adhäsion von MB_{GPVI} an Kollagen unter Flussbedingungen analog der Bedingungen, wie sie in Arterien vorherrschen, untersucht. Es wurden mit Kollagen beschichtete Objektträger in einer Flusskammer verwendet und mit Hilfe eines Perfusors flossen die entsprechenden vorinkubierten Microbubbles in unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten über die Kollagenoberfläche. So konnte die auch unter dynamischen Bedingungen statt findende und über GPVI vermittelte Adhäsion von MB_{GPVI} an Kollagen sowohl fotografisch und auch als Film dokumentiert werden. Die Quantifizierung der adhärenen Microbubbles zeigte eine hoch signifikant höhere Bindung von MB_{GPVI} (Mittelwert der adhärenen Microbubbles pro Sichtfeld = $433,92 \pm 23,72$) an Kollagen im Vergleich zu MB_C (Mittelwert = $139,17 \pm 15,04$; $p < 0,001$).

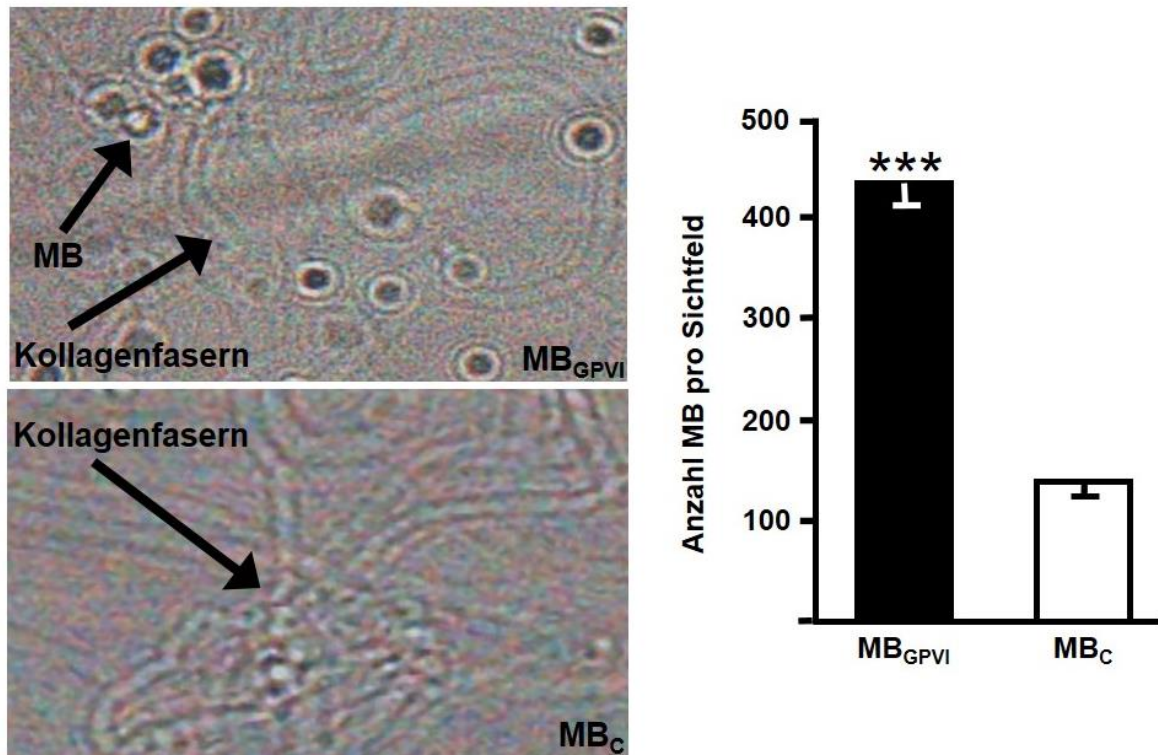


Abb. 23: Dynamische Adhäsion in der Flusskammer.

Fotographien der Flusskammer von MB_{GPVI} (oben) und MB_C (unten) (links). Rechts: MB_{GPVI} binden hoch signifikant häufiger an Kollagen als MB_C.

3.3.7 Diagnose atherosklerotischer Plaques bei ApoE^{-/-} Mäusen

3.3.7.1 Atherosklerotische Plaques sind mit MB_{GPVI} darstellbar

Bei 12 Monate alten ApoE^{-/-} Mäusen wurde die *Contrast Intensity* im Bereich des Aortenbogens und im Bereich des Truncus brachiocephalicus ausgewertet und verglichen. Die *Contrast Intensity* bei Untersuchung mit MB_{GPVI} war sowohl im Bereich des Aortenbogens (Mittelwert = 231.7 ± 73.52 ; $p = 0.034$, $n = 8$) als auch im Truncus brachiocephalicus (Mittelwert = 270.4 ± 61.76 ; $p = 0.015$, $n = 8$) signifikant erhöht verglichen mit MB_C (Mittelwert Aortenbogen = 49.42 ± 25.90 ; Mittelwert Truncus brachiocephalicus = 73.54 ± 35.61 ; $n = 8$). In der im Anschluss durchgeführten Ölrotfärbung der entnommenen Aortenbögen konnte kein relevanter Unterschied in der Plaquefläche der unterschiedlich untersuchten Gruppen festgestellt werden.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Im Bereich des Aortenbogens waren die Plaueflächen im Mittel bei mit MB_C untersuchten Mäusen sogar größer. Der Mittelwert der Plauefläche in % der Gesamtfläche im Bereich des Aortenbogens betrug bei mit MB_{GPVI} untersuchten Mäusen $58,25\% \pm 4,58$ und bei mit MB_C untersuchten Mäusen $67,92\% \pm 5,00$. Im Bereich des Truncus brachiocephalicus betrug die Plauefläche bei MB_{GPVI} $83,67\% \pm 2,10$ und bei MB_C $81,06\% \pm 2,25$. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der unterschiedlichen *Contrast Intensity* um individuelle Unterschiede im Ausmaß der Plaueareale bei den verschiedenen Mäusen handelt.

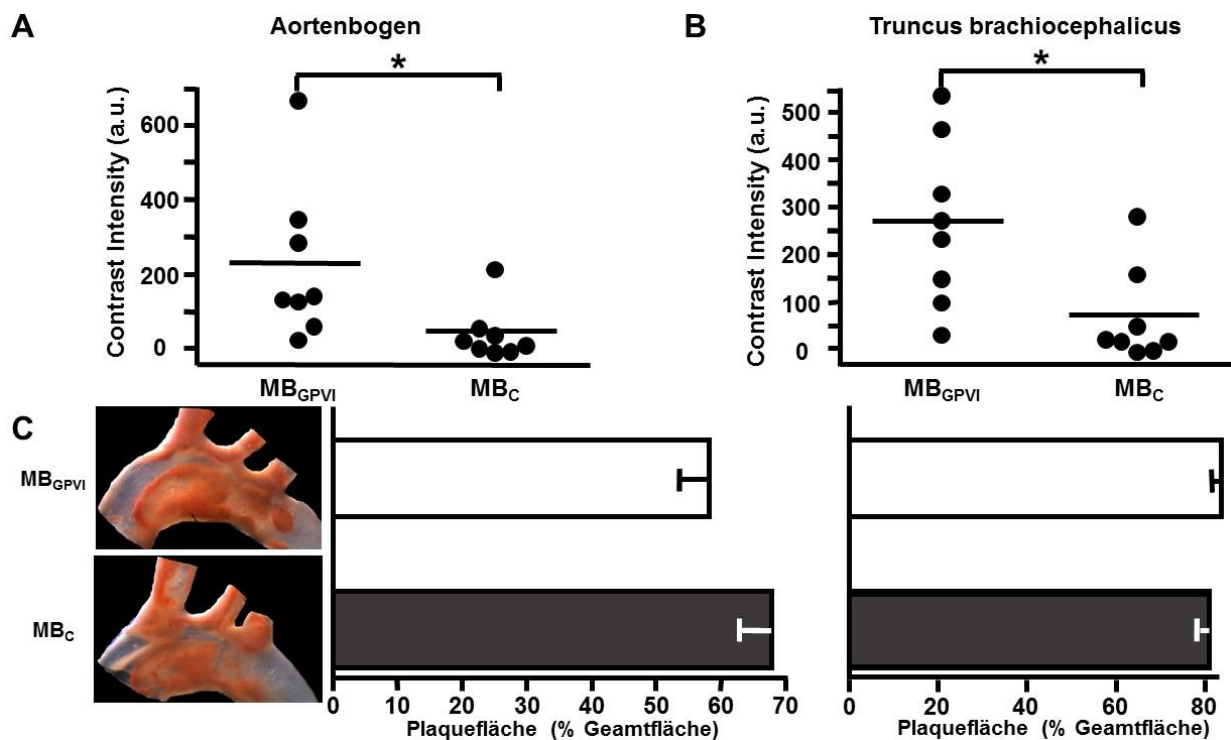


Abb. 24: Vergleichende Darstellung der *Contrast Intensity* zwischen mit MB_{GPVI} und MB_C behandelten Mäusen.

Dargestellt im Bereich des Aortenbogens (A) und im Bereich des Truncus brachiocephalicus (B). (C) Die Plaueflächen sind bei beiden Gruppen nahezu identisch; links: repräsentative Fotos von gefärbten Aortenbögen; ausgemessene Plauefläche im Aortenbogen (Mitte) und Truncus brachiocephalicus (rechts).

3.3.7.2 Ultraschallkontrastsignal lässt sich durch Gabe von GPVI-Fc hemmen

Lösliches GPVI-Fc wurde den Mäusen eine Stunde vor Ultraschalluntersuchung in einer Gesamtdosis von 4 mg/kg appliziert. Dieses lösliche GPVI-Fc soll an das freiliegende Kollagen in den atherosklerotischen Plaques binden und somit verhindern, dass MB_{GPVI} an dieses freiliegenden Kollagen binden. Durch diesen Versuch sollte analysiert werden, dass MB_{GPVI} spezifisch an Kollagen binden. Nach Gabe von löslichem GPVI-Fc konnte bei den so behandelten Mäusen ein geringeres *Contrast Intensity* Signal festgestellt werden. Der Mittelwert im Aortenbogen betrug bei Mäusen, die eine GPVI-Blockade erfahren hatten, $43,2 \pm 68,9$, ($n = 5$) im Vergleich zu Mäusen, bei denen keine Blockade stattgefunden hatte mit $231,7 \pm 37,52$, ($n = 8$; $p = 0,07$). Im Bereich des Truncus brachiocephalicus betrug die *Contrast Intensity* nach Blockade $48,1 \pm 52,1$ ($n = 4$; $p = 0,04$), im Vergleich dazu betrug die *Contrast Intensity* bei nicht blockierten $270,4 \pm 174,7$ ($n = 8$).

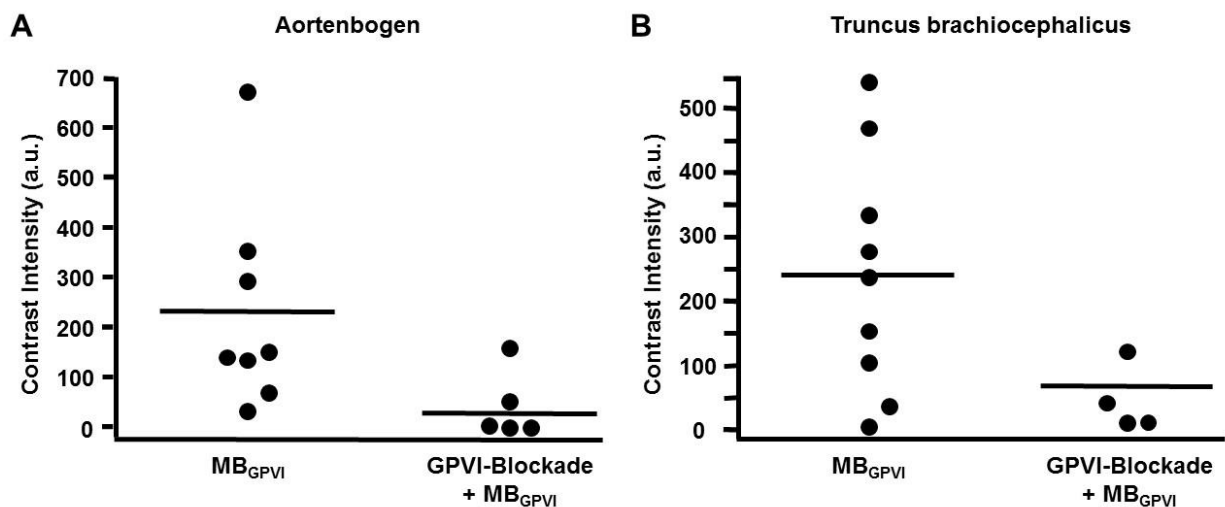
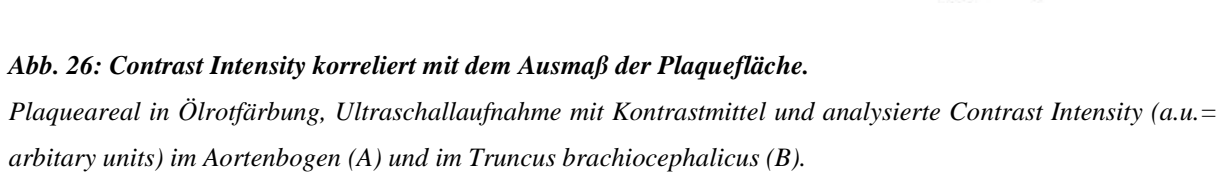


Abb. 25: Blockade der MB_{GPVI} Bindung.

A) Vergleich der Contrast Intensity im Aortenbogen bei normaler Untersuchung mit MB_{GPVI} ($n = 8$) bzw. vorheriger Blockade der GPVI-Bindungsstellen mit löslichem GPVI-Fc ($n = 5$). B) gleiche Darstellung im Truncus brachiocephalicus.

3.3.7.3 Die Contrast Intensity korreliert mit dem Ausmaß des Plaqueareals

In weiteren Versuchen wurde die *Contrast Intensity* von 12 Monate alten ApoE^{-/-}, 3 Monate alten ApoE^{-/-} und C57Bl/6J (Wildtyp = WT) Mäusen nach Untersuchung mit MB_{GPVI} verglichen. Die *Contrast Intensity* war bei 3 Monate alten ApoE^{-/-} (Mittelwert Aortenbogen = $57,78 \pm 26,09$; Truncus brachiocephalicus = $129,47 \pm 62,82$; n = 8) verglichen mit WT (Mittelwert Aortenbogen = $39,15 \pm 8,57$; Truncus brachiocephalicus = $44,27 \pm 12,49$; n = 8) etwas erhöht. Bei 12 Monate alten ApoE^{-/-} (Mittelwert Aortenbogen = $231,7 \pm 73,52$; Truncus brachiocephalicus = $270,4 \pm 61,76$) war die *Contrast Intensity* signifikant erhöht verglichen mit 3 Monate alten ApoE^{-/-} (p Aortenbogen = 0,04; p Truncus brachiocephalicus = 0,13) und verglichen mit WT (p Aortenbogen = 0,02; p Truncus brachiocephalicus = 0,03) (Abb. 25). Nach Ölrotfärbung der im Anschluss an die Ultraschalluntersuchung entnommenen Aortenbögen und Analyse des Ausmaßes des Plaqueareals konnte eine positive Korrelation zwischen Contrast Intensity und Plaquegröße ermittelt werden (Abb. 26).



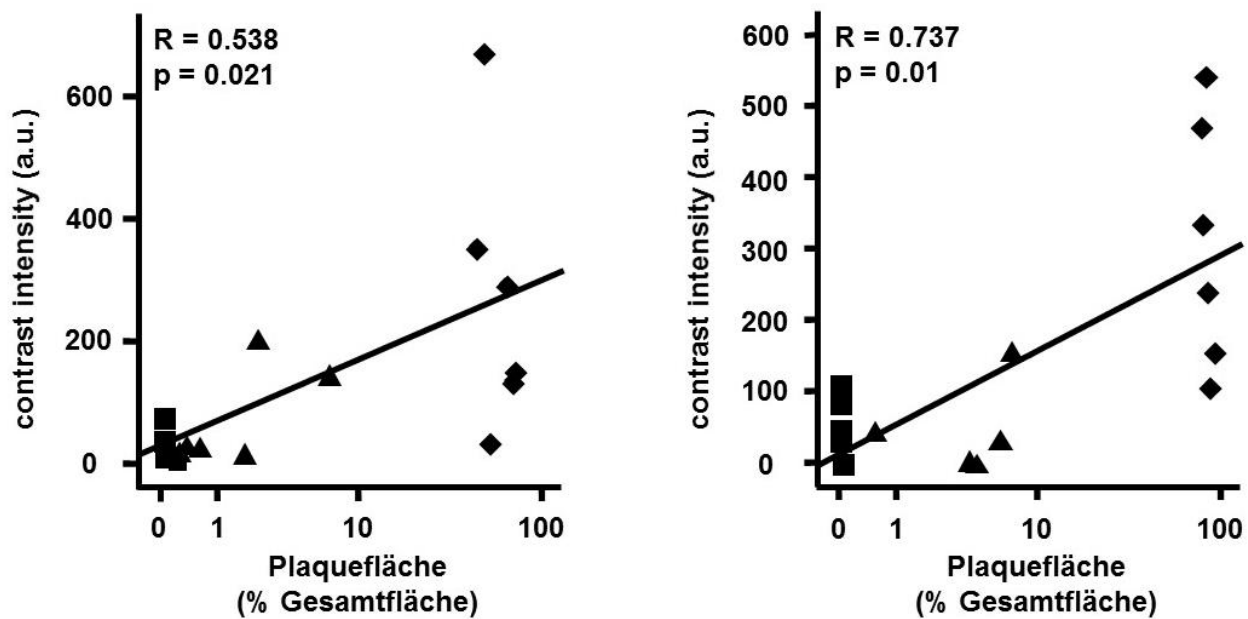


Abb. 27: Korrelation zwischen Contrast Intensity und gemessener Plauefläche.

Dargestellt im Aortenbogen (links) und im Truncus brachiocephalicus ■ = WT; ▲ = ApoE^{-/-}, 3 Monate; ◆ = ApoE^{-/-}, 12 Monate

3.3.7.4 Darstellung der Progression atherosklerotischer Plaques mittels MB_{GPVI}

Durch diesen Versuch sollte untersucht werden, ob es möglich ist mit Hilfe der Microbubbles das Fortschreiten der Atherosklerose zu detektieren. Die Progression sollte mittels ApoE^{-/-} Mäusen, die eine cholesterinreiche Diät erhielten, analysiert werden. ApoE^{-/-} Mäuse entwickeln unter dieser Diät fortschreitende atherosklerotische Plaques, deren Entwicklung sehr genau untersucht ist. Ab einem Alter von 4 Wochen wurden die Mäuse mit der cholesterinreichen Diät gefüttert, jeweils in der 9., 13., und 17. Lebenswoche wurden die Mäuse mittels Kontrastmittel untersucht und die Aortenbögen entnommen.

In der 9. LW konnten die atherosklerotischen Plaques detektiert werden. Es konnte ein deutlicher Unterschied in der *Contrast Intensity* zwischen Mäusen, die mit MB_{GPVI} untersucht wurden (Mittelwert Aortenbogen = $37,51 \pm 11,71$; Truncus brachiocephalicus = $86,08 \pm 21,15$; $n = 4$), und solchen, die mit MB_C untersucht wurden (Mittelwert Aortenbogen = $2,59 \pm 1,68$, $p = 0,028$; Truncus brachiocephalicus = $55,10 \pm 25,34$, $p = 0,51$; $n = 4$) festgestellt werden.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Allerdings wurde schon bei den Mäusen in der 13. Lebenswoche kein Unterschied mehr in der *Contrast Intensity* im Aortenbogen (Mittelwert $MB_{GPVI} = 9,48 \pm 3,19$; $MB_C = 15,99 \pm 5,66$; $n = 4$) festgestellt. Im Truncus brachiocephalicus (Mittelwert $MB_C = 33,21 \pm 10,99$; $n = 4$) konnte eine gering höhere *Contrast Intensity* bei mit MB_{GPVI} (Mittelwert $= 43,73 \pm 13,88$; $n = 4$) untersuchten Mäusen festgestellt werden.

In der 17. Lebenswoche war es jedoch nicht mehr möglich die atherosklerotischen Plaques zu detektieren. Hier war das Signal der mit Kontrastmittel behandelten Tiere sehr niedrig und es konnte nur noch ein minimaler Unterschied in der *Contrast Intensity* zwischen mit MB_{GPVI} (Mittelwert Aortenbogen $= 1,40 \pm 0,78$; Truncus brachiocephalicus $= 6,81 \pm 2,43$; $n = 5$) und MB_C (Mittelwert Aortenbogen $= 2,71 \pm 1,56$; Truncus brachiocephalicus $= 8,47 \pm 5,07$; $n = 5$) untersuchten Mäusen gefunden werden, wobei sogar das Signal der mit MB_C untersuchten Tiere minimal höher war.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

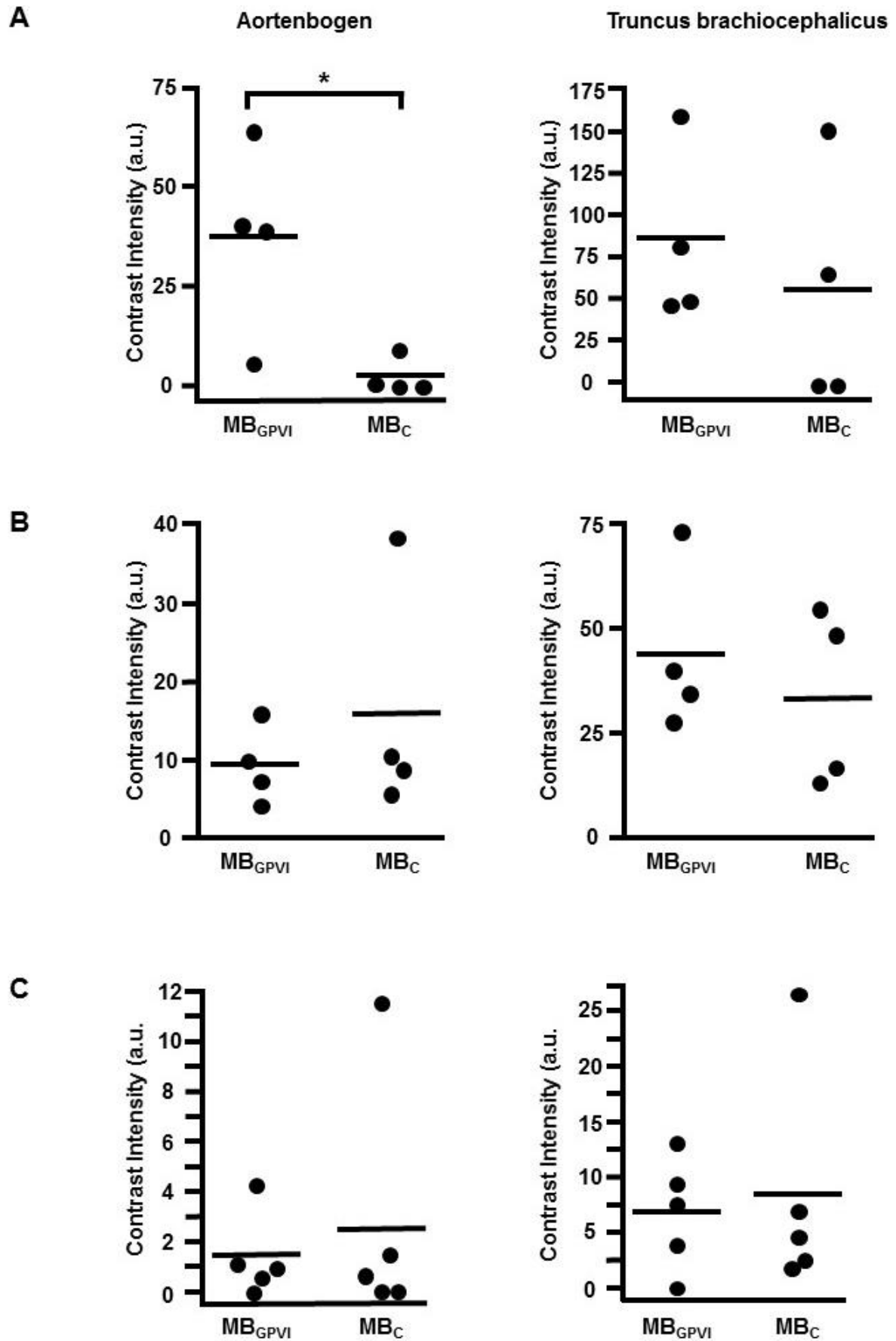


Abb. 28: Contrast Intensity bei mit cholesterinreicher Diät gefütterten ApoE^{-/-}.

A) im Alter von 9 Wochen, B) im Alter von 13 Wochen, C) im Alter von 17 Wochen.

Ein Problem, das bei diesen Versuchen auftrat, war das mit dem Alter der Mäuse immer niedriger werdende reine Signal der Microbubbles. Dies lag bei den Mäusen in der 9. Lebenswoche im Bereich von 2 000 – 3 000, erniedrigte sich bei den Mäusen in der 13. Lebenswoche schon auf 900 – 1 000 und lag in der 17. Lebenswoche nur noch bei ca. 300.

3.3.8 Beeinflussung der Atheroprogression im Bereich der Bifurkation der Arteria carotis

Um das bei GPVI-Fc beschriebene Potential die Progression atherosklerotischer Plaques abzumildern auch für MB_{GPVI} zu analysieren, wurden 12 Monate alte ApoE^{-/-} Mäuse zweimal im Abstand von jeweils einer Woche im Bereich der Bifurkation der rechten A. carotis mit MB_{GPVI} bzw. MB_C in einer therapeutischen Dosis von 2 mg/kg untersucht. Die Microbubbles wurden im Bereich der Bifurkation zerstört. Nach einer Gesamtdauer von 2 Wochen wurden den Mäusen die Gefäße entnommen und bei den Carotiden zur Analyse der Plaquefläche eine Ölrot-Färbung durchgeführt. Durch diesen Versuch konnte auch ein möglicher positiver Effekt einer Microbubbleszerstörung auf die Aufnahme von GPVI-Fc im beschallten Gebiet im Vergleich zur nicht mit Ultraschall untersuchten linken Arteria carotis analysiert werden.

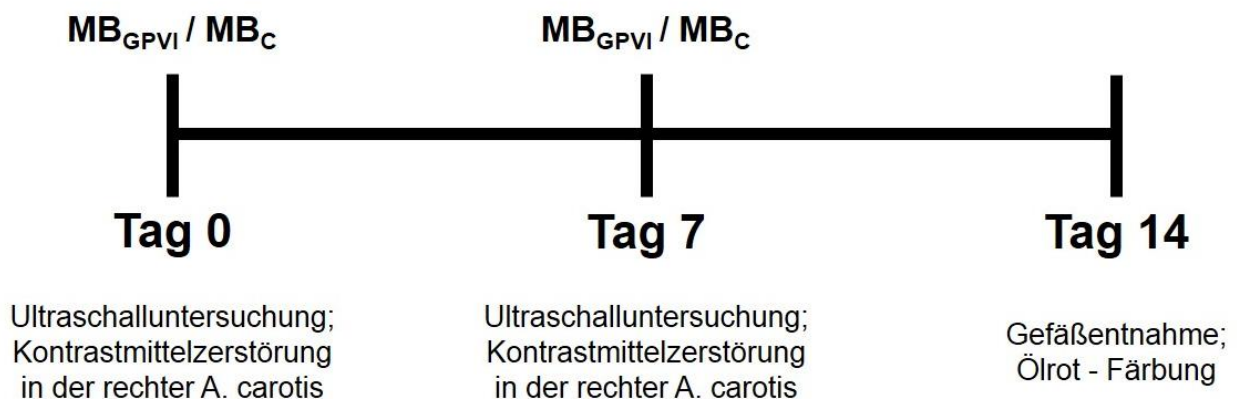


Abb. 29: Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Versuchs.

3.3.8.1 Sonographische Darstellung der Plaquelächen im Bereich der Bifurkation der A. carotis

Auch im Bereich der Bifurkation der A. carotis ist es möglich mittels MB_{GPVI} Plaquelächen zu detektieren. Sowohl bei der ersten Ultraschalluntersuchung an Tag 0 (Mittelwert $MB_{GPVI} = 553,51 \pm 338,39$; Mittelwert $MB_C = 109,27 \pm 41,17$; $n = 6$; $p = 0,2$), als auch bei der zweiten Ultraschalluntersuchung an Tag 7 (Mittelwert $MB_{GPVI} = 27,30 \pm 9,47$; Mittelwert $MB_C = 10,24 \pm 3,84$; $n = 6$; $p = 0,08$) war die Contrast Intensity bei mit MB_{GPVI} untersuchten Mäusen höher als bei mit MB_C untersuchten Mäusen. Allerdings ist auch hier, wie schon in Kapitel 3.3.7.4 erwähnt, ein großer Unterschied zwischen der reinen Helligkeit ohne Berechnungen der *Contrast Intensity* zwischen der ersten und der zweiten Untersuchung zu sehen (vgl. auch Diskussion). Um somit die beiden Untersuchungszeitpunkte miteinander vergleichen zu können wurde jeweils die *Contrast Intensity* von 100 als 0 - Wert festgelegt und die Mittelwerte pro Maus dann entsprechend faktoriell berechnet. Es konnte ein Rückgang der Helligkeit des Kontrastmittelsignals an Tag 7 festgestellt werden, was ein Hinweis sein könnte, dass die in Kapitel 3.3.8.2 beschriebene abgemilderte Atheroprogression durch die GPVI - Fc Behandlung auch sonographisch darstellbar ist.

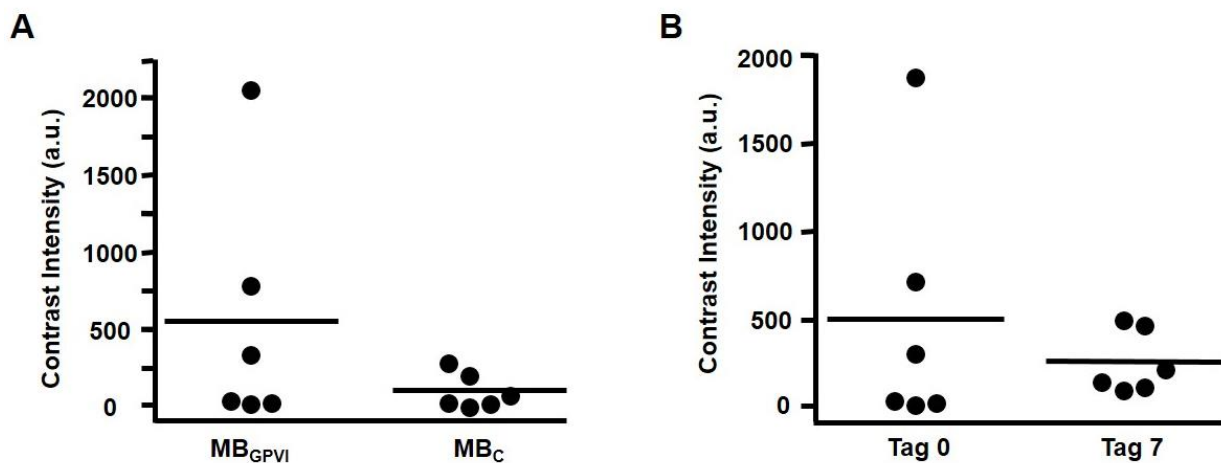


Abb. 30: Darstellung der Plaques im Bereich der Bifurkation der rechten A. carotis.

A) An Tag 0 konnte auch im Bereich der A. carotis ähnlich wie im Aortenbogen eine unterschiedlich helle Contrast Intensity festgestellt werden. B) Der Vergleich der Contrast Intensity von mit MB_{GPVI} untersuchten Mäusen an Tag 0 und Tag 7 zeigt einen Rückgang der Helligkeit des Kontrastmittelsignals.

3.3.8.2 *Ex vivo* Darstellung der Plaquefläche mittels Ölrot-Färbung

Nach 2 Wochen bei Opferung der Mäuse konnte in der Ölrot-Färbung der Carotiden bei den mit MB_{GPVI} behandelten Mäusen eine signifikant reduzierte Plaquefläche (Mittelwert Plaquefläche = 11,25% ± 3,46; n = 6) verglichen mit den Mäusen, die mit MB_C behandelt wurden (Mittelwert Plaquefläche = 49,83% ± 11,35; n = 5; p = 0,014), gefunden werden.

Ein Vergleich zwischen der Plaquefläche der rechten und der linken A. carotis bei mit MB_{GPVI} behandelten Mäusen ergab nur einen kleinen Unterschied. Bei diesen Mäusen waren die Plaqueflächen in der rechten A. carotis (Mittelwert Plaquefläche = 11,25% ± 3,46; n = 6; p = 0,52), in der die Zerstörung der Microbubbles stattgefunden hat, geringgradig kleiner als in der nicht sonographisch behandelten linken A. carotis (Mittelwert Plaqueflächen = 15,22% ± 4,80; n = 6).

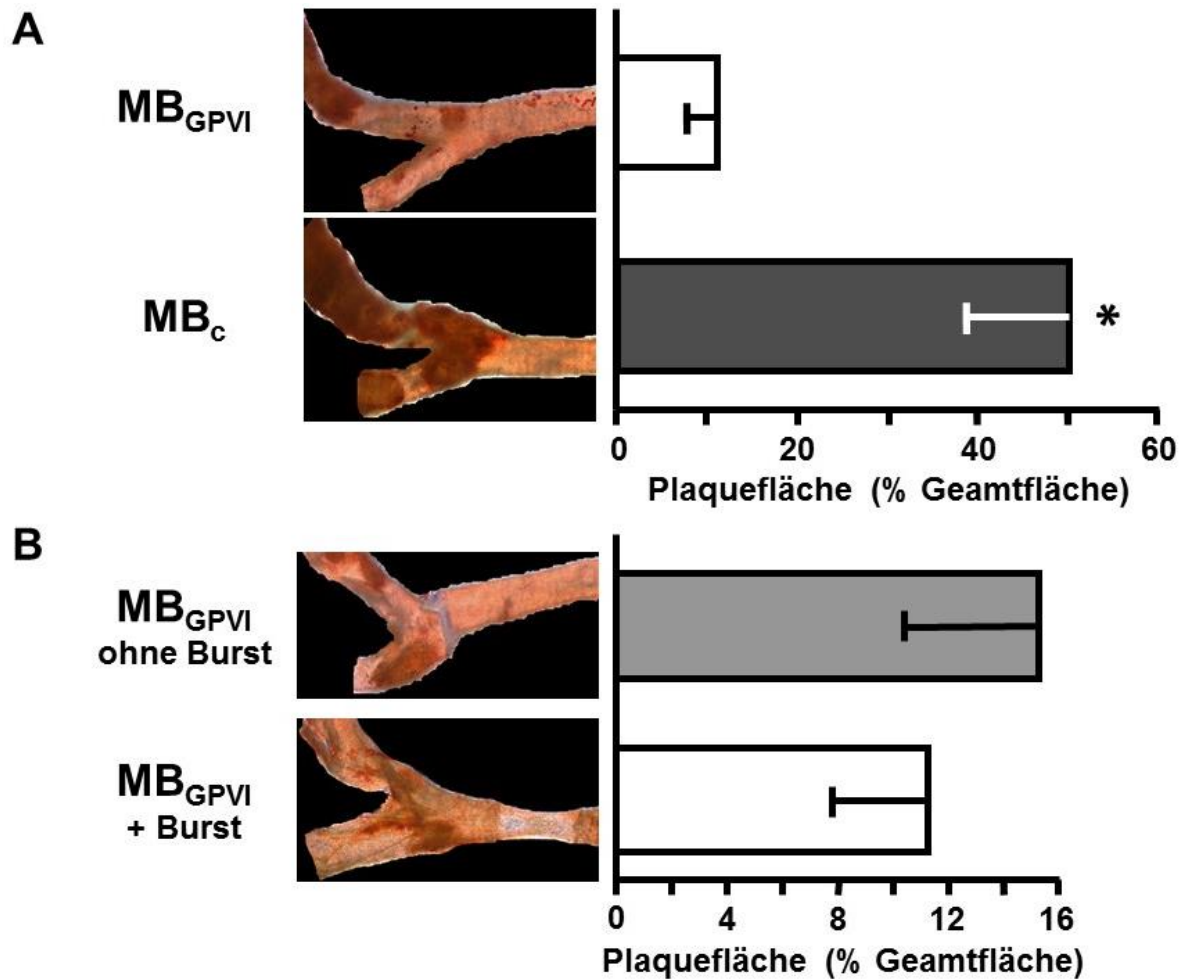


Abb. 31: Plaueflächen im Bereich der Bifurkation der A. carotis.

A: die Plauefläche bei mit MB_{GPVI} behandelten Tieren ist signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe. B: geringgradige Reduktion der Plauefläche in der rechten A. carotis, in der die Kontrastmittelzerstörung stattgefunden hat..

3.3.9 Histologische Aufarbeitung der entnommenen Gefäße

Nach Opferung der Mäuse wurden die Aortenbögen je nach angestrebter Färbung in Paraffin eingebettet oder eingefroren und anschließend geschnitten.

Zuerst sollte eine Darstellung der Gefäße und der atherosklerotischen Plaques bei ApoE^{-/-} im Vergleich zu Gefäßen von C57BL/6J (WT) Mäusen erfolgen. In der HE-Färbung und in der Ölrot-Färbung können die atherosklerotischen Plaques gut dargestellt werden. Deutlich ist die unterschiedliche Dicke und der unterschiedliche Wandaufbau der Gefäße bei ApoE^{-/-} Mäusen verglichen mit WT Mäusen zu sehen. In der Masson-Goldner-Färbung, in der Kollagenfasern

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

grün dargestellt werden, wird deutlich, wieviel Kollagen als mögliche Bindungsstelle für GPVI in atherosklerotischen Plaques zu finden ist.

Um noch einmal zu verdeutlichen, dass GPVI an Kollagen bindet, wurden Schnitte von unbehandelten ApoE^{-/-} Mäusen vor der Färbung mit GPVI-Fc inkubiert und daraufhin eine anti-Fc Immunhistochemie durchgeführt. Es zeigte sich eine deutliche Grünfärbung, die darstellt, dass GPVI an das in Plaques reichlich vorhandene Kollagen bindet.

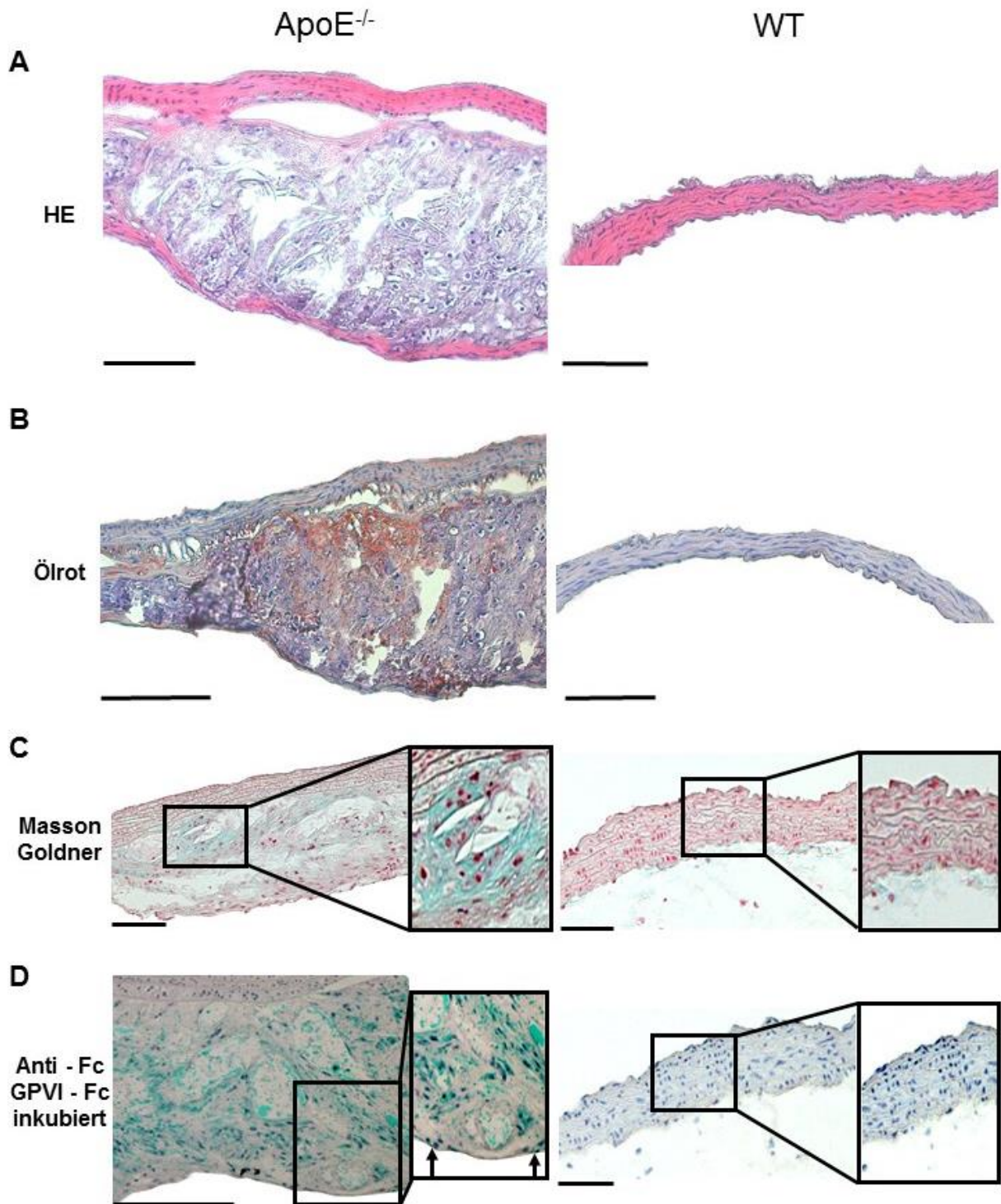


Abb. 32: Vergleichende histologische Darstellung des Aortenbogens bei *ApoE*^{-/-} und WT Mäusen.

Die HE - (A) und die Ölrot-Färbung (B) zeigen die Unterschiede in der Dicke der Gefäßwand als auch in der Fettanlagerung auf. C) Die Masson-Goldner Färbung zeigt den hohen Gehalt an Kollagen in Plaqueareal auf. Die anti-Fc Färbung (D), bei der die Schnitte zuvor mit GPVI-Fc inkubiert wurden, bestätigt dieses Ergebnis durch die Bindung von GPVI an Kollagen (grün). Die Bindung von GPVI-Fc ist auch im Bereich des Endothels zu sehen (Pfeile).

Originalbilder mit 20x Objektiv aufgenommen; Maßstabsbalken = 100 μm

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Des Weiteren sollten außerdem Unterschiede in den Plaques bei ApoE^{-/-}, die mit MB_{GPVI} und bei solchen, die mit MB_C behandelt wurden, festgestellt werden. Sowohl in der HE - als auch in der Ölrot-Färbung konnten keine Unterschiede zwischen mit MB_{GPVI} und MB_C behandelten Mäusen gefunden werden. Ein großer Unterschied im Kontrastmittelsignal, bedingt durch sehr unterschiedliche Ausprägungen von Plaques, kann somit ausgeschlossen werden.

Mit der Immunhistochemie zum einen gegen Fc, zum anderen gegen Biotin konnte gezeigt werden, dass sich im Plaque das an Microbubbles gekoppelte GPVI-Fc anreichert. Die anti-GPIb α -Färbung konnte außerdem zeigen, dass weniger Thrombozyten im mit MB_{GPVI} behandelten Plaque zu finden sind.

Die anti-Fc-Färbung wurde mit DAB, die anti-Biotin-Färbung mit HistoGreen gefärbt.

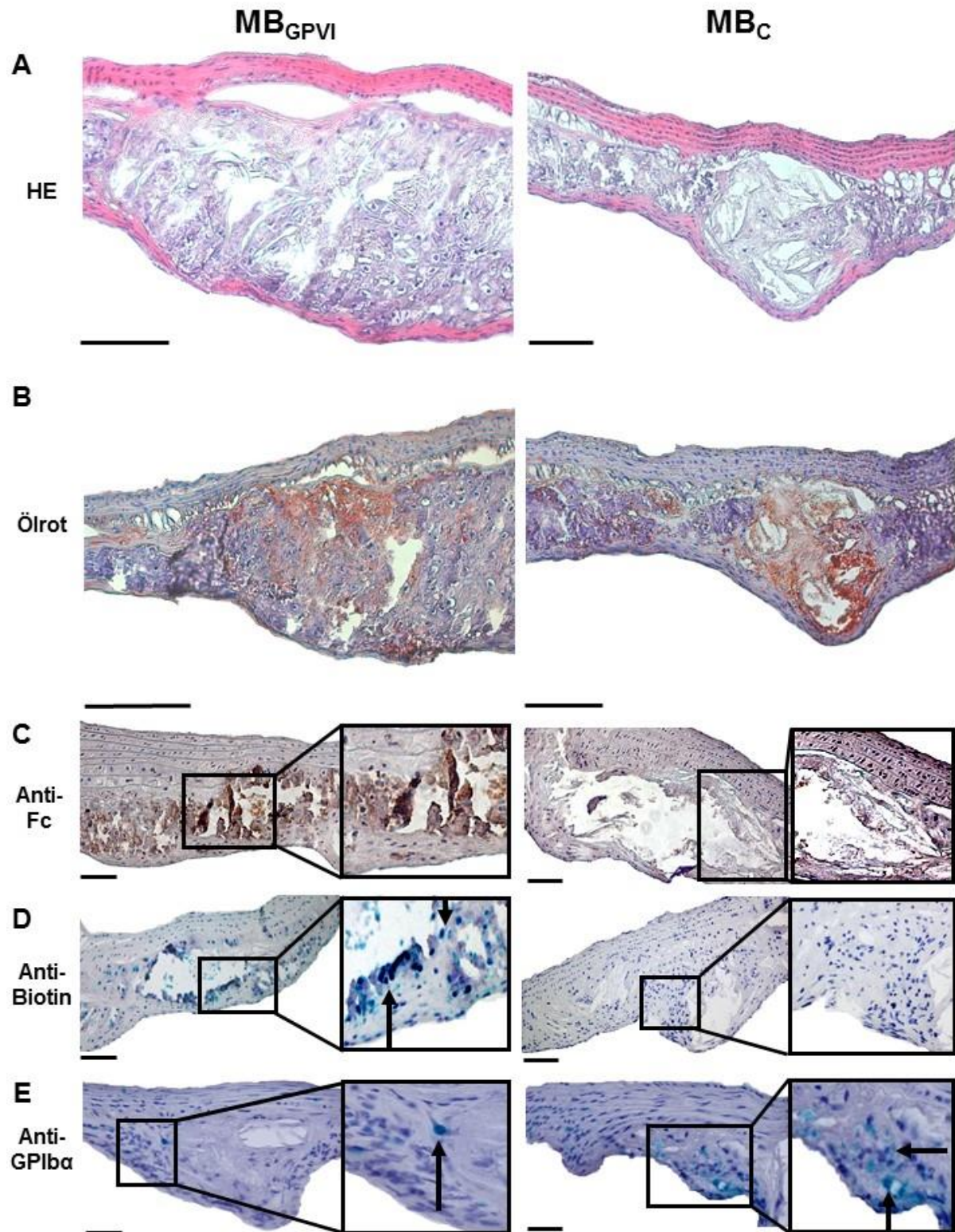


Abb. 33: Vergleichende histologische Darstellung mit MB_{GPVI} und MB_C behandelter Aortenbögen.

In der HE- (A) und der Ölrot-Färbung (B) sind keine relevanten morphologischen Unterschiede zwischen den beiden Behandlungen sichtbar. Die anti-Fc (C) und die anti-Biotin (D) Färbung zeigen auf unterschiedliche Weise die Anreicherung von GPVI-Fc im Plaqueareal. E) Die anti-GPIIb Färbung zeigt die reduzierte Ansammlung von Thrombozyten bei mit MB_{GPVI} behandelten Mäusen.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Versuchsdurchführung

4.1.1 Das Mausmodell

Tiermodelle sind immer umstritten und es muss immer genau abgewogen werden, ob sie unerlässlich und ethisch vertretbar sind und ob sie einen herausragenden Wissensgewinn für die Forschung erbringen können. Auch die Wahl des Modells ist von Bedeutung. Aufgrund der Vielfalt an unterschiedlichen transgenen Tieren, die kommerziell zu erwerben sind, ist die Maus häufig das Tier der Wahl.

Auch die kurze Generationszeit und die im Verhältnis zu anderen Tierarten günstigen Haltungskosten und der geringe Verbrauch an Narkotika oder Therapeutika machen die Maus zu einem oft verwendeten Tiermodell.

Für diese Arbeit war die entsprechende transgene Veränderung von entscheidender Bedeutung. Das Mausmodell der ApoE^{-/-} Maus ist ein weit verbreitetes Modell für die Atheroskleroseforschung. Wildtyp-Mäuse sind, auch wenn sie mit cholesterinreicher Diät gefüttert werden, weitgehend resistent gegen die Ausbildung atherosklerotischer Plaques. (PAIGEN et al. 1994). Erst nach sehr langer cholesterinreicher Diät entwickeln sie atypische entzündliche *fatty-streak* Läsionen, die wenig der Entwicklung humaner antherosklerotischer Plaques gleichen (CARMELIET et al. 1998). Aufgrund des Defizits von ApoE^{-/-} Mäusen Apolipoprotein E produzieren zu können, kommt es zu einer altersabhängigen Atheroskleroseentwicklung, die sehr nahe an der Krankheitsentwicklung des Menschen ist. Bei diesen Mäusen entwickeln sich antherosklerotische Plaques wie beim Menschen altersabhängig

DISKUSSION

beginnend mit Schaumzellanreicherung, Bildung fibröser Kappen und schließlich Entwicklung vulnerabler Plaques gefolgt von Plaqueruptur (REDDICK et al. 1994; CARMELIET et al. 1998; GUO et al. 2002). Zhang et al. (ZHANG et al. 1994) konnten zeigen dass ApoE^{-/-} Mäuse, die mit cholesterinreicher Diät gefüttert werden, sogar im Mittel 30 - mal größere Plaqueflächen aufweisen, als ApoE^{-/-}, die eine normale Diät erhielten.

Somit ist diese Maus ideal für atherosklerotische Forschungsarbeiten.

Trotz aller genetischen Veränderungen und Versuche standardisierte Versuchsbedingungen herzustellen, muss man bei einem Tiermodell immer im Hinterkopf behalten, dass individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren immer im Bereich des Möglichen sind. Vor allem hat sich dies in dieser Arbeit bei den Mäusen gezeigt, die keine Spezialdiät erhielten und schon 12 Monate alt waren.

So wie auch beim Menschen nicht jeder Mensch des gleichen Alters einen gleichen Atherosklerosegrad aufweist, so ist dies auch bei der Maus zu erwarten. Individuelle Unterschiede im Stoffwechsel und äußere Einflüsse wie z.B. Licht oder Interaktionen mit anderen Artgenossen bedingen, sosehr auch auf eine Standardisierung geachtet wird, Unterschiede in Größe und Aufbau der atherosklerotischen Plaques. Diese Unterschiede werden durch die doch manchmal starken Individualunterschiede und hohen Standardabweichungen sowohl im Signal des Ultraschallkontrastmittels als auch in der Plaquefläche deutlich.

Nichtsdestotrotz bieten solche individuellen Unterschiede natürlich auch gerade bei einer solchen Methodenentwicklung im Hinblick auf die individuellen Unterschiede beim Menschen das Potential herauszufinden, ob eine solche Methode auch diesem Problem, vor dem eine diagnostische Methode in der Medizin immer steht, stand hält.

4.1.2 Die Methode der *targeted* Microbubbles

Die Methode molekulare Biomarker an Microbubbles zu koppeln und dies als Diagnostikum verschiedenster Krankheiten zu nutzen ist mittlerweile eine weit verbreitete Technik in der Medizin und wird mit verschiedenen molekularen Biomarkern für die unterschiedlichsten

DISKUSSION

Krankheiten immer wieder neu erforscht. Häufige Einsatzgebiete von *targeted* Microbubbles sind die Tumorforschung, meist die Angiogenese im Tumorgebiet (ELLEGALA et al. 2003; WELLER et al. 2005), aber auch in der Transplantationsmedizin (WELLER et al. 2003) hat diese Methode schon Anwendung gefunden. Sehr vielversprechend ist die Methode auch auf dem Gebiet der Entzündungsforschung, da an diesem Geschehen viele endothelialen Marker beteiligt sind, die Angriffspunkte für *targeted* Microbubbles bieten (VISUALSONICS INC.; TORONTO 2011). Gebiete, in denen diese Methode im Rahmen der Entzündungsforschung schon genutzt wurde, sind unter anderem Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen (WELLER et al. 2003) oder die Erforschung von Morbus Crohn (BACHMANN et al. 2006).

Auch auf dem Gebiet der kardiovaskulären Forschung ist diese Methode schon mit unterschiedlichsten molekularen Biomarkern erfolgreich angewendet worden. So konnten Kaufmann et al. mit *targeted* Microbubbles, die an *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1) binden, unterschiedliche Stadien der Atherosklerose detektieren (KAUFMANN et al. 2007a), was auch für P-Selektin *targeted* Microbubbles möglich war (KAUFMANN et al. 2010). Den *targeted* Microbubbles, die Schumann et. al herstellten, war es möglich selektiv an den Rezeptor GPIIb-IIIa auf Thrombozyten zu binden (SCHUMANN et al. 2002). Durch die Kopplung von GPIb α an Microbubbles war es McCarty et al. möglich, die Präsenz von aktiviertem von-Willebrand-Faktor auf dem Gefäßendothel zu detektieren. Mittels eines an Microbubbles gekoppelten Antikörpers gegen aktiviertes Glykoprotein IIb/IIIa (LIBS-Antikörper), den Wang et al. entwickelten, waren sie in der Lage die Thrombusbildung nach Verletzung der A. carotis darzustellen sowie die medikamentöse Thrombolyse zu verfolgen (WANG et al. 2012).

4.1.2.1 Schwierigkeiten bei der Anwendung von *targeted* Microbubbles

Obwohl diese Methode schon mehrfach erfolgreich angewendet wurde, traten doch während den Versuchen für diese Arbeit auch Schwierigkeiten in der Anwendung von *targeted* Microbubbles auf. Zum einen ist es unerlässlich die Applikation der Microbubbles bei allen Mäusen vergleichbar zu machen. Somit musste eine Strategie gefunden werden, wie die

DISKUSSION

Microbubbles jeder Maus in etwa gleichem Tempo appliziert werden. Es wurde darauf geachtet, die gesamte Applikation innerhalb einer Zeitspanne von 20 sec. durchzuführen.

Außerdem musste den MB_{GPVI} Zeit gegeben werden an die atherosklerotischen Plaques zu binden. Somit wurde zwischen Ende der Applikation und erstem *Burst*-Zyklus ein Zeitraum von 2 Minuten verstreichen gelassen.

Die größte Schwierigkeit stellte das schwankende Signal des Kontrastmittels, vor allem im Bereich des Aortenbogens dar. In einem langsamer durchbluteten Organ (z.B. Niere) oder in einem Tumor hat man ein sehr konstantes Anflutungssignal und kann dann mittels *Burst* einen Nullwert generieren und die erneute Anflutung analysieren. Durch den schnellen Herzschlag bei Mäusen, der auch in Narkose noch bei 300 - 500 Schlägen/min liegt und den an die Herzaktion gekoppelten Auswurf von Blut in den Aortenbogen entwickelt sich ein wellenförmiges Kontrastsignal (Abb. 33). Der individuelle Herzschlag jeder einzelnen Maus hat somit erheblichen Einfluss auf das Kontrastmittelsignal. Außerdem hat auch die Atmung und die damit verbundene mechanische Verlagerung des Brustkorbs, die eine kurzzeitige Winkelveränderung des Schallkopfs bedingt, Auswirkungen auf die Signalstärke.

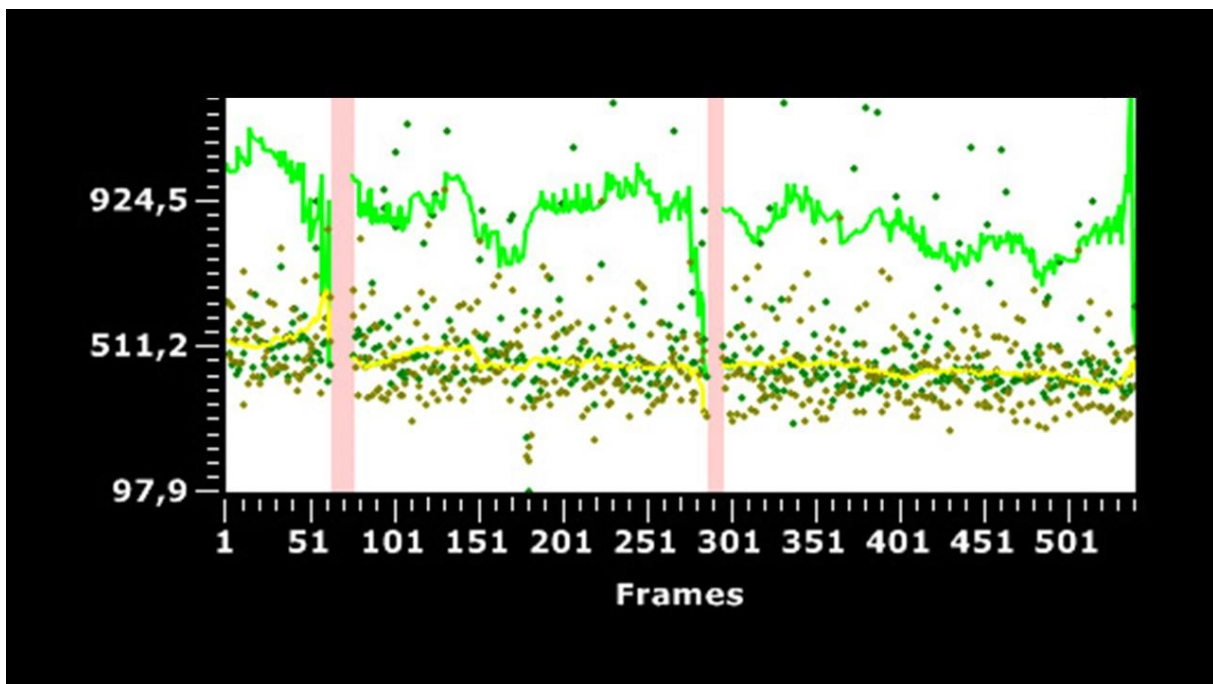


Abb. 34: Wellenförmiges Kontrastsignal

Deutlich zu sehen ist das wellenartige Kontrastsignal, das im Bereich des Aortenbogens (grün) deutlich stärker ausgeprägt ist, als im Bereich des Truncus brachiocephalicus (gelb).

DISKUSSION

Um dieses Problem etwas einzudämmen wurde versucht bei allen Mäusen einen Herzschlag von ca. 400/min durch Steuerung der Narkosetiefe zu erreichen bevor das Kontrastmittel appliziert wurde. Des Weiteren wurde mittels des Ultraschallsystems auf die Atmung gegatet, sodass nur noch Aufnahmen zwischen zwei Atemzyklen aufgenommen wurden.

Um die Schwankungen bedingt durch den Herzschlag etwas weiter einzudämmen wurde bei der Auswertung darauf geachtet, dass bei den 50 Bildern, die vor einem *Burst* zur Analyse hinzugezogen wurden, eine Periode gewählt wurde, bei der das Signal möglichst konstant war.

Als weiteres Problem stellte sich heraus, dass bei unterschiedlichen „Ultraschalldurchgängen“ teilweise das Kontrastmittelsignal unterschiedlich hell war. Vermutlich ist diese Helligkeit durch unterschiedliche Faktoren bedingt. Eine Rolle spielt das „Eigensignal“ des Gewebes, das bei jeder Maus anders ist. Außerdem der Winkel, mit der die Ultraschallwellen auf die Microbubbles treffen und natürlich auch wieviel Zeit zwischen Auflösen der Microbubbles und Applikation verstrichen ist. Um diese Unterschiede möglichst gering zu halten, wurde versucht, den Aortenbogen immer gleich darzustellen. Um zu jeder mit MB_{GPVI} untersuchten Maus immer eine möglichst adäquate Kontrollmaus zu erhalten, wurde immer im Wechsel eine Maus mit MB_{GPVI} und eine mit MB_C untersucht. Oft relativierte sich diese unterschiedliche Helligkeit bei der späteren Berechnung des Signals durch die Subtraktion des Signals vor und nach *Burst* und die weitere Subtraktion des „Eigensignals“ des Gewebes. Auch die Berechnung des Signals pro mm² konnte die teils unterschiedlichen Maße des Aortenbogens bei den unterschiedlichen Mäusen relativieren. Trotzdem wurde oft eine recht unterschiedliche Helligkeit des Signals festgestellt. Bevor diese Methode bei Menschen eingesetzt werden kann muss auf jeden Fall dieses Problem ausgemerzt werden, da in einem solchen Fall keine parallele MB_C Kontrolle möglich ist.

4.1.3 Die Verwendung des Proteins GPVI-Fc (Revacept®)

4.1.3.1 Gründe für die Verwendung von GPVI-Fc

Das lösliche GPVI-Fc ist ein mittlerweile gut bekanntes und erforschtes Protein. Plättchenrekrutierung und -adhäsion an kollagenreiche atherosklerotische Plaques ist ein entscheidender Schritt in der Atheroprogression und für die Bildung von Thromben und Gefäßverschluss im Bereich der atherosklerotischen Plaques (RUGGERI 2002). Entscheidender Rezeptor der Thrombozyten bei diesem Vorgang ist der Kollagenrezeptor GPVI (MOROI et al. 1989; WATSON und GIBBINS 1998; NIESWANDT et al. 2001a; NIESWANDT und WATSON 2003; UNGERER et al. 2011). Nach der erstmaligen Synthese des löslichen GPVI-Fc (MASSBERG et al. 2004) ist dieses Protein schon in zahlreichen Studien verwendet worden. Nach Applikation von löslichem GPVI-Fc bindet es an Kollagen und belegt so die Bindungsstellen für das thrombozytäre GPVI, sodass weniger Thrombozyten an Kollagen binden können. Dieser Effekt konnte sowohl bei mechanischen Verletzungen wie der Drahtdenudation (SCHONBERGER et al. 2008) oder der Ballondenudation (BULTMANN et al. 2006) gezeigt werden, als auch in Form einer abgemilderten Atheroprogression in der ApoE^{-/-} Maus (SCHULZ et al. 2008) und bei Kaninchen (UNGERER et al. 2013).

Auch bei der Darstellung von Gefäßverletzungen (GAWAZ et al. 2005a; BIGALKE et al. 2011; BIGALKE et al. 2012; BIGALKE et al. 2013) und von atherosklerotischen Plaques (SCHULZ et al. 2008; BIGALKE et al. 2013) konnte lösliches GPVI-Fc durch Kopplung an unterschiedliche radioaktive und fluoreszierende Stoffe erfolgreich eingesetzt werden.

Somit ist sowohl das Diagnose- als auch das Therapiepotential von GPVI-Fc schon mehrfach bestätigt worden. Nachdem dieses Protein schon sehr gut erforscht ist, sind von diesem Aspekt aus nicht mehr so viele unerforschte Bereiche in die Ergebnisse mit ein zu kalkulieren. Dadurch dass bekannt ist, wie lösliches GPVI-Fc alleine oder bei Kopplung mit anderen Stoffen reagiert, stellte sich bei dieser Arbeit hauptsächlich die Frage, ob GPVI-Fc dieses Potential auch bei Koppelung an Microbubbles inne hat bzw. ob das Bindungspotential an Kollagen mit Hilfe von Microbubbles sichtbar gemacht werden kann.

DISKUSSION

Ein weiterer entscheidender Vorteil von löslichem GPVI-Fc ist, dass es in einer klinischen Phase I-Studie (UNGERER et al. 2011) schon erfolgreich getestet wurde und sich derzeit in einer klinischen Phase III-Studie befindet. Somit ist dieses Protein voraussichtlich in naher Zukunft kommerziell zu erwerben und könnte dann nach entsprechender Prüfung hoffentlich mit den in der Klinik verwendeten Microbubbles eingesetzt werden.

4.1.3.2 Schwierigkeiten bei der Verwendung von löslichem GPVI-Fc

Die bedeutendste Frage bei der Verwendung von löslichem GPVI-Fc als Diagnostikum ist, ab welchem Stadium der Atherosklerose kann lösliches GPVI-Fc erfolgreich eingesetzt werden kann. Wenn man davon ausgeht, dass GPVI nur an Kollagen bindet, muss folgerichtig Kollagen freiliegen und dem Blutstrom ausgesetzt sein, damit eine Bindung von GPVI zustande kommt. Dies setzt wiederum freiliegendes Kollagen bei einer Verletzung oder vulnerable Plaques voraus. Massberg et al. konnten allerdings zeigen, dass Thrombozyten auch schon in einem sehr frühen Stadium der Atherogenese an das Endothel adhären, in dem noch keine Plaques zu finden sind (MASSBERG et al. 2002). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass lösliches GPVI-Fc auch an Fibronectin bindet (BULTMANN et al. 2010). Fibronectin kann in atherosklerotischem Endothel sowohl bei ApoE^{-/-} Mäusen als auch beim Menschen vermehrt gefunden werden (MATTER et al. 2004). Die Ausbildung von Fibronectin wird durch inflammatorische Stimuli im Endothel induziert (CHO und MOSHER 2006). Schönberger et al. konnten 2012 zeigen, dass GPVI zudem auch an Vitronectin bindet (SCHONBERGER et al. 2012). Vitronectin ist ein Serumprotein, das von aktivierten Endothelzellen gebunden werden kann und von diesen daraufhin im Gefäßlumen präsentiert wird (ZANETTI et al. 1994; SCHONBERGER et al. 2012). Somit scheint die GPVI-Vitronectin-Interaktion ebenfalls Anteil an der Bindung von Thrombozyten an aktiviertes Endothel zu haben (SCHONBERGER et al. 2012).

In der Studie von Bültmann et al. konnte erfolgreich gezeigt werden, dass GPVI schon an aktiviertes Endothel bindet, bevor Kollagen frei liegt (BULTMANN et al. 2010). Dieses Ergebnis ist von entscheidender Bedeutung für das Diagnosepotential von GPVI-Fc. Da GPVI neben Kollagen auch an Fibronectin und Vitronectin bindet, ist freiliegendes Kollagen nicht zwingend von Nöten, dass GPVI an Endothel adhärert. Dies lässt den Rückschluss zu, dass es

möglich zu sein scheint, mit Hilfe von löslichem GPVI-Fc atherosklerotische Plaques schon in frühen Stadien der Atherogenese, die noch nicht mit freiliegendem Kollagen einhergehen, zu diagnostizieren.

Diese Bindung von GPVI-Fc an vulnerable Plaques und auch schon an aktiviertes Endothel hat essentielle Bedeutung für die Atherosklerosediagnostik, da das größte Infarktrisiko beim Menschen von vulnerablen Plaques ausgeht, die in den meisten Fällen zu keiner Lumeneinengung der Gefäße führen (FUSTER et al. 1992; FARB et al. 1996). Diese vulnerablen Plaques ohne Lumeneinengung sind mit derzeitigen Diagnosemethoden wie der Angiographie nicht sicher zu diagnostizieren.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Ergebnisse der *in vitro*-Versuche

Die *in vitro*-Versuche konnten eindeutig mittels ELISA die Biotinylierung von löslichem GPVI-Fc sowie die auch im biotinylierten Zustand erhaltene Kollagenbindungsfähigkeit von GPVI-Fc zeigen. Somit waren die ersten Voraussetzungen für die Kopplung von GPVI-Fc an Target-Ready Contrast AgentsTM geschaffen.

Durch zusätzliche FITC-Markierung des biotinylierten GPVI-Fc und durchflusszytometrische Analyse der nativen Microbubbles und der mit biotinyliertem GPVI-FITC und biotinyliertem BSA-FITC inkubierten Microbubbles konnte die Bindung der biotinylierten Liganden an die Microbubbles gezeigt werden. Dieser Versuch konnte auch bestätigen, dass biotinyliertes GPVI und biotinyliertes BSA in fast identischer Menge an die Microbubbles binden. Somit stellen MB_C eine adäquate Kontrolle für die Anwendung von MB_{GPVI} dar.

Im Flusskammerversuch konnte die postulierte Bindung von MB_{GPVI} im Gegensatz zu MB_C an kollagenbeschichtete Objektträger auch unter dynamischen Flussbedingungen gezeigt werden.

DISKUSSION

Durch diese *in vitro* Versuche konnte gezeigt werden, dass MB_{GPVI} alle Voraussetzungen erfüllen, um erfolgreich im *in vivo* Versuch eingesetzt zu werden.

Solche *in vitro*-Vorversuche sind wichtig, um sicher zu stellen, dass die Microbubbles - Liganden-Komplexe vor Einsatz *in vivo* auch richtig funktionieren. Auch in anderen Studien, die sich mit der Darstellung vulnerabler Plaques beschäftigten, wurde zuerst *in vitro* die Funktionalität der Microbubbles-Liganden-Komplexe analysiert, wobei die Methoden zur Analyse des Liganden sich abhängig von dessen Eigenschaften unterscheiden. So wurde in der von Wang et al. (WANG et al. 2012) veröffentlichten Studie die erfolgreiche Biotinylierung des LIBS-Antikörpers im Western Blot bestätigt, was in der vorliegenden Studie im ELISA geschah. Von Wang et al. wurde die Funktionalität des biotinylierten Antikörpers sowie die Bindung an Microbubbles beides in einer FACS-Analyse bestätigt. Auch die dynamische Adhäsion des Microbubbles-Liganden-Komplexes wurde in Flusskammerexperimenten von den Autoren bestätigt bevor *in vivo*-Versuche durchgeführt wurden. Auch Kaufmann et al. analysierten in ihren Studien die Komplexe zuerst mittels FACS-Analyse und anschließenden Flusskammerexperimenten (KAUFMANN et al. 2007a; KAUFMANN et al. 2010), ebenso wie McCarty et al. (MCCARTY et al. 2010).

4.2.2 Ergebnisse der Diagnose atherosklerotischer Plaques bei ApoE^{-/-} ohne Spezialdiät

Für die ersten Versuche zur Diagnose atherosklerotischer Plaques wurden 12 Monate alte ApoE^{-/-} im Gegensatz zu Wildtyp und 3 Monate alten ApoE^{-/-} Mäusen analysiert. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen ApoE^{-/-}, die mit MB_{GPVI} und solchen, die mit MB_C untersucht wurden, festgestellt werden.

Analysiert wurden jeweils getrennt voneinander die Prädispositionsstellen für atherosklerotische Plaques an der inneren Kurvatur des Aortenbogens und am Abgang des Truncus brachiocephalicus.

Auch eine Blockade der MB_{GPVI} Bindung an atherosklerotische Plaques durch vorherige Gabe von löslichem GPVI-Fc war erfolgreich. Allerdings waren hier auch 2 Mäuse dabei, bei denen die Blockade nicht erfolgreich war. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass zu wenig

DISKUSSION

lösliches GPVI-Fc im Voraus appliziert wurde. Es ist denkbar, dass bei diesen Mäusen so viel freies Kollagen vorhanden war, dass die applizierte Menge GPVI-Fc zu gering war. In diesem Fall wäre nur ein geringer Teil der GPVI-Bindungsstellen durch lösliches GPVI-Fc besetzt worden. Durch die große Menge freiliegendes Kollagen wären dann jedoch immer noch genug Bindungsstellen für MB_{GPVI} vorhanden, um ein hohes Signal zu erzeugen.

Die Möglichkeit, dass bei diesen Mäusen kein freiliegendes Kollagen vorhanden war, ist eher unwahrscheinlich, da die *Contrast Intensity* bei diesen Mäusen ähnlich hoch war wie bei mit MB_{GPVI} ohne Blockierung untersuchten Mäusen und somit deutlich höher als bei WT-Mäusen oder mit MB_C untersuchten Tieren.

Bei 12 Monate alten ApoE^{-/-} konnte ein signifikant höheres *Contrast Intensity* Signal nach Untersuchung mit MB_{GPVI} verglichen mit Wildtyp Mäusen sowohl im Aortenbogen als auch im Truncus brachiocephalicus festgestellt werden. Im Aortenbogen war das Signal im Vergleich zu 3 Monate alten ApoE^{-/-} signifikant höher. Im Gegensatz dazu konnte im Truncus brachiocephalicus kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies scheint allerdings auf einen Ausreißer in der Gruppe der 3 Monate alten ApoE^{-/-} Mäuse zurück zu führen zu sein. Dieser Ausreißer hatte vermutlich schon mehr freiliegendes Kollagen im Bereich des Truncus brachiocephalicus, als es die anderen Mäuse im Alter von 3 Monaten üblicherweise haben. Dies wird wahrscheinlich in der weiter unten in diesem Kapitel beschriebenen individuellen Varianz seine Ursache haben.

Auch die positive Korrelation zwischen *Contrast Intensity* Signal und Plaquesfläche sowohl im Aortenbogen als auch im Truncus brachiocephalicus zeigt die Möglichkeit mit MB_{GPVI} atherosklerotische Plaques zu diagnostizieren.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass es möglich ist mit MB_{GPVI} atherosklerotische Plaques zu diagnostizieren.

Allerdings zeigt sich in all diesen Versuchen eine große Varianz innerhalb der einzelnen Gruppen (vgl. Abb. 25). Diese kann zum einen bedingt sein durch die individuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Mäusen. Wie auch beim Menschen, entwickelt sich auch bei Mäusen die Atherosklerose nicht bei allen gleich, insbesondere bei den für diese Versuche verwendeten Mäusen, die keine Spezialdiät erhielten, sondern die rein altersbedingte atherosklerotische Plaques entwickelten. Auch wenn diese Mäuse denselben genetischen

DISKUSSION

Hintergrund haben und unter standardisierten Haltungsbedingungen leben gibt es doch kleine individuelle Unterschiede z.B. des Fressverhaltens, die unterschiedliche Ausprägungen atherosklerotischer Plaques bedingen können. Insbesondere die Menge der freiliegenden GPVI-Bindungsstellen ist bei den einzelnen Mäusen unter Umständen recht unterschiedlich. Auch wenn die Mäuse ähnlich große atherosklerotische Plaques haben, können doch unterschiedliche Mengen an Kollagen freiliegen. Auch die schon in Kapitel 4.1.2.1 beschriebenen Schwierigkeiten in der Standardisierung des Versuchsablaufs haben einen Anteil an der Streuung.

Auch in anderen Publikationen war es möglich mittels Microbubbles-Liganden Komplexen atherosklerotische Ereignisse zu diagnostizieren. So gelang es Kaufmann et al. (KAUFMANN et al. 2007a) mit einem an Microbubbles gekoppelten Antikörper gegen VCAM-1 frühe atherosklerotische Stadien in der ApoE^{-/-} Maus zu detektieren. VCAM-1 spielt eine essentielle Rolle in der Entwicklung atherosklerotischer Plaques durch Monozyten und T-Lymphozyten Rekrutierung (O'BRIEN et al. 1996). VCAM-1 wird normalerweise in sehr geringen Mengen exprimiert, ist in frühen Stadien der Atheroskleroseentwicklung allerdings auf Endothelzellen deutlich vermehrt (NAKASHIMA et al. 1998; IYAMA et al. 1999). Eine Detektion früher atherosklerotischer Stadien gelang derselben Gruppe auch in der LDL Rezeptor defizienten Maus mittels Antikörpern gegen VCAM-1 und P-Selektin gekoppelt an Microbubbles. Auch P-Selektin ist an der frühen Entwicklung der Atherosklerose beteiligt (KAUFMANN et al. 2010).

Mc Carty et al. (MCCARTY et al. 2010) gelang es 2010 mittels *targeted* Microbubbles gegen aktivierten von-Willebrand-Faktor sowohl verletztes Endothel als auch atherosklerotische Plaques nachzuweisen.

Wang et al. (WANG et al. 2012) verfolgten hingegen mit *targeted* Microbubbles eine andere Strategie und konnten mit einem Antikörper spezifisch gegen aktiviertes Glykoprotein IIb/IIIa (LIBS-Antikörper) gekoppelt an Microbubbles die Thrombusbildung im Verletzungsmodell der A. carotis nachweisen und zudem die medikamentelle Thrombolyse darstellen.

Der Ansatz frühere atherosklerotische Stadien mittels *targeted* Microbubbles zu diagnostizieren ist schon von unterschiedlichen Arbeitsgruppen experimentell untersucht worden, allerdings noch nie unter Verwendung von rekombinantem GPVI-Fc.

4.2.3 Ergebnisse der Diagnose atherosklerotischer Plaques bei ApoE^{-/-} mit Spezialdiät

Um die Möglichkeit unterschiedliche Stadien der Atherogenese zu diagnostizieren zu analysieren wurden vier Wochen alte ApoE^{-/-} mit einer cholesterinreichen Diät gefüttert und jeweils in der 9., 13., und 17. Lebenswoche mit MB_{GPVI} untersucht.

In der 9. Lebenswoche konnte ein deutlicher Unterschied in der *Contrast Intensity* zwischen Mäusen, die mit MB_{GPVI} untersucht wurden und solchen die mit MB_C untersucht wurden gefunden werden. Ab der 13. Lebenswoche scheint sich dieses unterschiedliche Signal allerdings aufzuheben, es ist nur noch im Truncus brachiocephalicus ein gering höheres *Contrast Intensity* Signal zu finden. In der 17. Lebenswoche war kein wirklicher Unterschied im Signal zwischen MB_{GPVI} und MB_C zu finden.

Bei diesem Versuch trat das bereits in Kapitel 3.3.8.1 kurz angerissene Problem des insgesamt niedrigen Kontrastmittelsignals auf. Es war schon rein optisch sichtbar, dass das Kontrastmittelsignal bei ApoE^{-/-} Mäusen in der 9. Lebenswoche deutlich heller war als bei denen in der 17. Lebenswoche (Abb. 34).

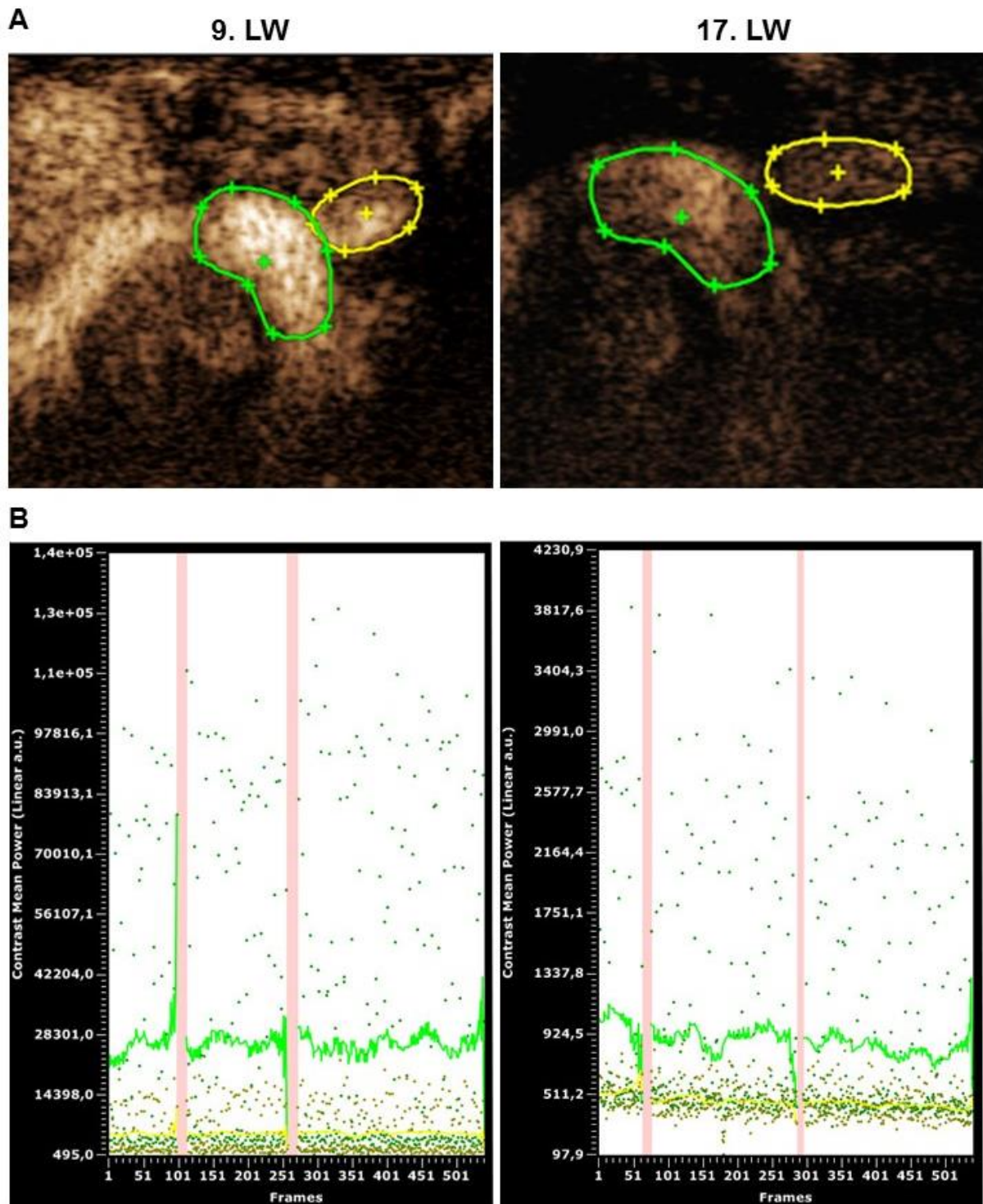


Abb. 35: Unterschiedliche Kontrastsignale in den unterschiedlichen Altersgruppen.

In der 9. LW (rechts) ist das Signal des Kontrastmittels viel heller, als in der 17. LW. Dies kann schon rein optisch beurteilt werden (A). Auch in der graphischen Darstellung des Kontrastsignals (B) ist dies deutlich sichtbar. Das Signal des Aortenbogens (grün) liegt in der 9. LW im Durchschnitt zwischen 20 000 und 28 000, wohingegen es in der 17. LW nur noch bei ca. 700 – 1200 liegt. Beim Truncus brachiocephalicus (gelb) ist es ähnlich. Auch die Maximalwerte der Contrast Intensity (Y-Achse) sind in der 17. LW sehr viel niedriger.

DISKUSSION

Dieses Problem wurde auch bei der Analyse der *Contrast Intensity* deutlich. Bei den Median - Werten der Mäuse konnte in den unterschiedlichen Altersgruppen ein Unterschied in der Helligkeit des Kontrastmittels festgestellt werden. Die Helligkeit lag bei Mäusen in der 9. Lebenswoche im Bereich von 20 000 – 28 000, erniedrigte sich bei den Mäusen in der 13. Lebenswoche schon auf 3 000 – 6 000 und lag in der 17. Lebenswoche nur noch bei 700 - 1200. Die Helligkeit bei 12 Monate alten ApoE^{-/-} Mäusen ohne Spezialdiät lag in ähnlichen Bereichen wie bei Mäusen in der 9. Lebenswoche.

Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert werden, welches Problem hinter diesem verminderten Signal steckt. Es scheint so, als ob mit zunehmendem Alter das Signal immer mehr abgeschirmt wird und deshalb die *Contrast Intensity* immer niedriger wird. In der Sektion dieser Mäuse konnte natürlich eine mit zunehmendem Alter immer dickere Fettschicht im Bereich des Thorax gefunden werden, die auch die Ultraschallwellen durchdringen müssen. Es konnten allerdings in der Literatur keinerlei Hinweise gefunden werden, dass Fett Ultraschallwellen oder Kontrastmittelsignale abschwächt.

Diese Ergebnisse müssen in weiteren Versuchen überprüft werden und sollten sie reproduzierbar sein, ist es zwingend nötig genauer zu analysieren, wodurch diese Abschwächung des Kontrastmittelsignals zustande kommt. Schließlich ist ein wichtiger Prädispositionsfaktor für Atherosklerose beim Menschen auch Fettleibigkeit (LUSIS 2000) und somit darf dies keine Limitation für eine Anwendung dieser Methode sein.

4.2.4 Einfluss von MB_{GPVI} auf die Plaquefläche im Bereich der A. carotis

Nach zweimaliger Applikation von MB_{GPVI} im Abstand von einer Woche und Zerstörung der Microbubbles im Bereich der rechten A. carotis bei 12 Monate alten ApoE^{-/-} Mäusen konnte nach Entnahme der Carotiden eine signifikante Reduktion der Plaquefläche bei mit MB_{GPVI} behandelten Mäusen im Vergleich zu mit MB_C behandelten Mäusen festgestellt werden.

Dieses Ergebnis bestätigt das schon in früheren Veröffentlichungen dargestellte Potential von GPVI-Fc die Atheroprogression abzumildern. Die konnte sowohl bei vierwöchiger

DISKUSSION

intraperitonealer Applikation bei ApoE^{-/-} Mäusen gezeigt werden (SCHULZ et al. 2008), als auch nach zweiwöchiger Applikation im Carotidrahtdenudationsmodell (SCHONBERGER et al. 2008). Der Vorteil der Kopplung des GPVI-Fc an Microbubbles ist, dass die Anflutung der Substanz im Plaquegebiet visualisiert werden kann und somit sichergestellt wird, dass das Protein auch wirklich das Wirkungsgebiet erreicht.

Ein weiterer Aspekt der Applikation von Stoffen mittels Microbubbles ist die in verschiedenen Publikationen beschriebene vermehrte Anreicherung von Stoffen im Zielgewebe nach Zerstörung von Microbubbles durch kurzzeitige erhöhte Permeabilität der Zellmembranen und Blutgefäße (TSUTSUI et al. 2004; BEKEREDJIAN et al. 2005; MAYER et al. 2008). Um dies für MB_{GPVI} zu analysieren wurde bei den Mäusen nur die rechte A. carotis mit Ultraschall untersucht und die Microbubbles zerstört. Die linke A. carotis wurde nicht untersucht, da die MB_{GPVI} aber intravenös gegeben wurden, ist davon auszugehen, dass sich MB_{GPVI} im Bereich der linken A. carotis angesammelt haben und auch dort ihr therapeutisches Potential entwickelten. Nach Analyse der Plaquefläche konnte im Vergleich zwischen linker und rechter A. carotis eine geringfügig kleinere Fläche im Bereich der rechten A. carotis, in der der *Burst* stattgefunden hatte, festgestellt werden. Dieses Ergebnis könnte Potential haben, muss aber auf jeden Fall in weiteren Versuchen reproduziert werden. Die Anzahl der Mäuse war mit n = 6 recht gering und der Effekt von GPVI-Fc wirkt natürlich im ganzen Körper. Da die Applikation von MB_{GPVI} schon einen deutlichen Effekt erzielte, kann die Zerstörung der Microbubbles nur noch zu einer kleinen Verbesserung führen. Dieses Ergebnis sollte aber auf jeden Fall in weiteren Versuchen genauer analysiert werden und eventuell sollte auch die MB_{GPVI} Behandlung über einen längeren Zeitraum als den in dieser Arbeit analysierten, untersucht werden. Bei dieser kleinen Anzahl an Versuchstieren muss natürlich immer auch in Betracht gezogen werden, dass ein solches Ergebnis, bei dem nur ein kleiner Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht, auch nur Zufall sein kann. Diese kann nur durch weitere Versuche geklärt werden.

Eine weitere Bestätigung für die Abmilderung der Atheroprogression durch MB_{GPVI} kann in der immunhistologischen Analyse der Aortenbögen gefunden werden. Hier zeigte sich deutlich, dass weniger Thrombozyten im Plaquegebiet nach MB_{GPVI} Behandlung vorhanden sind.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die in dieser Arbeit etablierte Ansatz GPVI-Fc beladene Microbubbles sowohl zur Diagnostik als auch zur Beeinflussung der Atherogenese zu verwenden, stellt eine viel versprechende Methode dar. Da sowohl Microbubbles schon für den klinischen Alltag vorhanden sind, als auch das lösliche GPVI-Fc (Revacept®) vermutlich bald Einzug hält, ist diese Methode sehr interessant für die Humanmedizin.

Die Diagnose atherosklerotischer Plaques ist derzeit erst möglich, wenn diese schon zu einer Lumeneinengung der Gefäße geführt haben. Da diese Erkrankung allerdings in den Industrieländern sehr verbreitet ist, ist es von großer Bedeutung eine Diagnostikmethode zu haben, die atherosklerotische Plaques schon erkennt, bevor es zur Lumeneinengung kommt, bestenfalls sogar bevor sich vulnerable Plaques entwickeln. Außerdem wird natürlich eine nicht invasive Methode bevorzugt. Dieses Potential wohnt der MB_{GPVI}-Methode inne. Mittels GPVI-Fc ist es möglich, vulnerable atherosklerotische Plaques zu detektieren, bevor diese rupturieren bzw. eventuell auch aktiviertes Endothel vor der Entwicklung manifester Plaques (BULTMANN et al. 2010). Zudem handelt sich bei Ultraschall um eine nicht invasive, schonende Methode, die sowohl für Patienten als auch für Anwender keinerlei Risiken birgt.

Allerdings müssen die hier gefundenen Ergebnisse noch durch weitere Versuche bestätigt werden. Es muss ermittelt werden, ob die Ergebnisse reproduzierbar sind und die oben beschriebenen Schwierigkeiten müssen umgangen werden. Vor allem das Kontrastmittelsignal muss konstanter bzw. vergleichbarer werden. Schließlich kann nicht zu jedem untersuchten Patienten ein „Kontrollpatient“ mit MB_C untersucht werden. Auch muss durch weitere Versuche ein einheitlicher Grenzwert der *Contrast Intensity* festgestellt werden, ab welchem man von vulnerablen Plaques spricht. Diese Fragen müssen weitere Analysen beantworten.

Sollte es durch diese Methode möglich sein, Patienten mit hohem Risiko für die Entwicklung einer Atherosklerose oder mit Atherosklerose im Anfangsstadium zu diagnostizieren, könnte über dieselbe Methode gleichzeitig die Atherogenese verzögert bzw. die funktionelle Aktivität der atherosklerotischen Plaques modifiziert (von vulnerabel zu stabil) werden. Ob allerdings

DISKUSSION

die Zerstörung des Ultraschallkontrastmittels einen entscheidenden Effekt hat, muss in weiteren Studien analysiert werden. Ein großer Vorteil der Applikation von GPVI-Fc über die Kopplung an Microbubbles stellt jedoch sicherlich die Möglichkeit dar, sicher zu stellen, dass die Substanz das Zielgebiet sicher erreicht hat.

Es lässt sich schlussfolgern, dass die in dieser Arbeit untersuchte Methode großes Potential für die Medizin birgt, es allerdings noch viele weitere Versuche und Analysen benötigt, bis diese Methode Einzug in den klinischen Alltag halten kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Atherosklerose ist eine chronisch progressive Erkrankung, die von verschiedenen Risikofaktoren beeinflusst wird. Sie beginnt mit Ablagerungen von LDL-Cholesterin im Endothel großer Arterien. Nach Einwanderung von Makrophagen kommt es zur Schaumzellbildung, die makroskopisch als *fatty streaks* sichtbar sind und das frühe Stadium der Atherosklerose bilden. Des Weiteren kommt es zur Bildung von frühen Atheromen mit fibröser Kappe und Kollageneinlagerungen, zur Lumeneingengung und final schließlich zur Ruptur der Plaques und drauffolgender Thrombusbildung.

Schon früh in der Atheroskleroseentwicklung werden Thrombozyten rekrutiert und adhären. Die Adhäsion von Thrombozyten ist ein entscheidender Schritt in der Atheroprogression und bei der Bildung von Thromben. Entscheidend für ihre Adhäsion ist die Vermittlung durch den Kollagenrezeptor GPVI auf der Thrombozytenoberfläche. Mit Hilfe der löslichen, rekombinanten Form des GPVI, das an die humane IgG Fc-Domäne gekoppelt ist, ist es möglich sowohl atherosklerotische Plaques zu diagnostizieren als auch die Adhäsion von Thrombozyten kompetitiv zu hemmen und so die Atheroprogression abzumildern.

In dieser Arbeit wurde das lösliche GPVI-Fc (Revacept®) an Target-Ready Contrast Agents™, ein Ultraschallkontrastmittel, gekoppelt. Dieses Kontrastmittel besteht aus sogenannten Microbubbles, die auf ihrer Hülle mit Streptavidin versehen sind und so biotinylierte Liganden binden können. Diese Microbubbles sollen durch die Koppelung an biotinyliertes GPVI-Fc (MB_{GPVI}) an atherosklerotische Plaques im Aortenbogen und in der A. carotis der ApoE^{-/-} Maus binden und über das Ultraschallsignal atherosklerotische Plaques sichtbar machen.

Zuerst wurde *in vitro* die Funktionsfähigkeit von biotinyliertem GPVI-Fc, die Bindung an Microbubbles und die Bindung der MB_{GPVI} an Kollagen unter Flussbedingungen betätigt.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Aortenbogen und im Truncus brachiocephalicus konnte ein erhöhtes Kontrastmittelsignal verglichen mit BSA gekoppelten Kontrollmicrobubbles (MB_C), sowie die Hemmung des Kontrastsignals durch vorherige Gabe von löslichem GPVI-Fc aufgezeigt werden, was die Spezifität der MB_{GPVI} beweist. Die Ultraschalluntersuchung des Aortenbogens bei 12 Monate alten $ApoE^{-/-}$ Mäusen ergab ein signifikant höheres Signal im Vergleich zu Wildtyp und 3 Monate alten $ApoE^{-/-}$ Mäusen. Diese Beobachtung konnte durch eine positive Korrelation zwischen Kontrastmittelsignal und Plaquefläche in der Ölrot-Färbung betätigt werden. Bei $ApoE^{-/-}$ Mäusen, die eine cholesterinreiche Diät erhielten, gestaltete sich die Detektion atherosklerotischer Plaques mit zunehmendem Alter als schwieriger und war in der 17. Lebenswoche nicht mehr möglich.

Die Ansammlung der MB_{GPVI} im Plaqueareal konnte auch immunhistologisch bestätigt werden.

Als weitere Einsatzmöglichkeit der MB_{GPVI} sollte die Abmilderung der Atheroprogression durch GPVI-Fc analysiert werden. Außerdem ist beschrieben, dass Stoffe sich vermehrt anreichern in Gebieten, in denen Microbubbles mit hohen Ultraschallfrequenzen zerstört wurden. In dieser Arbeit konnte mit zweimaliger Applikation von MB_{GPVI} im Abstand von einer Woche nach einem Gesamtbeobachtungszeitraum von zwei Wochen die Plaquefläche im Bereich der A. carotis im Vergleich zu MB_C signifikant reduziert werden. Der Vergleich der rechten A. carotis, in der eine Zerstörung der Microbubbles stattgefunden hat, mit der linken A. carotis ergab eine nochmalige geringe Reduktion der Plaqueflächen in der rechten A. carotis.

Diese Arbeit zeigt eine neue nicht-invasive Methode der Atherosklerosediagnostik, die potentiell weitaus früher atherosklerotische Plaques bzw. vulnerable Plaques diagnostizieren kann, als es mit bisherigen Diagnostikmethoden möglich ist. Die Microbubbles bieten auch die Möglichkeit, die Atheroprogression abzumildern und in den Verlauf der Atherosklerose einzugreifen, wobei die Anflutung des Medikaments sicher beobachtet werden kann und durch zusätzliche Zerstörung der Microbubbles der Effekt des GPVI-Fc verstärkt werden kann.

6 SUMMARY

Atherosclerosis is a progressive chronic disease, which is affected by different risk factors. At the beginning of this disease LDL deposits can be found at the endothelium of big arteries. After migration of macrophages to the affected area they differentiate into foam cells. This early state of atherosclerosis is visible as so-called *fatty streaks*. Eventually, atheromas with fibrous caps and collagen storage develop. Finally, the arterial lumen is compressed, followed by plaque rupture and thrombus formation.

Early in atherogenesis recruitment and adhesion of platelets takes place. Platelet adhesion is critically involved in atheroprogession and thrombus formation. Platelet adhesion to atherosclerotic lesions is primarily mediated through the platelet-specific collagen receptor glycoprotein VI (GPVI). Therefore, recombinant soluble dimeric GPVI, linked to the human Fc domain, can be used to detect atherosclerotic plaques and to inhibit platelet adhesion competitively. Thus thrombus formation can be prevented and the progression of atherosclerosis can be decelerated.

In this study soluble GPVI-Fc (Revacept®) was linked to Targed-Ready Contrast Agents™. This is a contrast agent used for ultrasound analysis and contains microbubbles with a streptavidin – incorporated shell for ligand binding. With these GPVI-conjugated microbubbles (MB_{GPVI}) it could be possible to detect atherosclerotic plaques in the aortic arch and the truncus brachiocephalicus.

SUMMARY

First, functionality of biotinylated GPVI-Fc, its binding to microbubbles and binding of MB_{GPVI} to collagen under flow conditions were confirmed *in vitro*.

In the aortic arch and in the truncus brachiocephalicus contrast intensity was enhanced compared to control microbubbles which were conjugated with BSA (MB_C). Furthermore, it was possible to block contrast signal by previous injection of soluble GPVI-Fc. This demonstrates specific binding of MB_{GPVI} to the atherosclerotic plaques.

Contrast intensity in the aortic arch was significantly enhanced in 12 months old ApoE^{-/-} mice compared to wild type mice and 3 months old ApoE^{-/-}, respectively. This result could be confirmed by the positive correlation of contrast intensity and the plaque area measured after oilred staining.

In ApoE^{-/-} mice fed on high-fat diet, detection of atherosclerotic plaques became more difficult as the mice aged. At the age of 17 weeks it was no longer possible to detect atherosclerotic plaques.

With immunohistological staining we could detect accumulation of MB_{GPVI} in the plaque area.

Furthermore, we wanted to analyse the potential of MB_{GPVI} to attenuate atheroprogession. It is known that disruption (=burst) of microbubbles helps to accumulate substances in the affected area. It was possible to reduce plaque area significantly in the carotid artery after administration and disruption of MB_{GPVI} twice a week. In the burst threatened right carotid artery a more distinct reduction could be found as compared to the left carotid artery without burst treatment.

This study shows a new non-invasive method to detect atherosclerotic plaques. With this method potential atherosclerotic plaques or vulnerable plaques can be detected much earlier than it is possible with current available detection methods. It also seems to have relevant potential to attenuate atheroprogession.

7 LITERATURVERZEICHNIS

ANDRE P., DENIS C. V., WARE J., SAFFARIPOUR S., HYNES R. O., RUGGERI Z. M., WAGNER D. D. (2000)

Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins, *Blood*, 96(10), 3322-8.

ANDREWS R. K., LOPEZ J. A., BERNDT M. C. (1997)

Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation, *Int J Biochem Cell Biol*, 29(1), 91-105.

ANDREWS R. K., SHEN Y., GARDINER E. E., DONG J. F., LOPEZ J. A., BERNDT M. C. (1999)

The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling, *Thromb Haemost*, 82(2), 357-64.

AY T., HAVAUX X., VAN CAMP G., CAMPANELLI B., GISELLU G., PASQUET A., DENEJ F., MELIN J. A., VANOVERSCHDELDE J. L. (2001)

Destruction of contrast microbubbles by ultrasound: effects on myocardial function, coronary perfusion pressure, and microvascular integrity, *Circulation*, 104(4), 461-6.

BACHMANN C., KLIBANOV A. L., OLSON T. S., SONNENSCHN E. J. R., RIVERA-NIEVES J., COMINELLI F., LEY K. F., LINDNER J. R., PIZARRO T. T. (2006)

Targeting mucosal addressin cellular adhesion molecule (MAdCAM)-1 to noninvasively image experimental Crohn's disease, *Gastroenterology*, 130(1), 8-16.

BAUMGARTNER H. R. (1977)

Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I. Reaction of human platelets with alpha chymotrypsin-digested subendothelium, *Thromb Haemost*, 37(1), 1-16.

BEKEREDJIAN R., GRAYBURN P. A., SHOHET R. V. (2005)

Use of ultrasound contrast agents for gene or drug delivery in cardiovascular medicine, *J Am Coll Cardiol*, 45(3), 329-35.

BIGALKE B., LINDEMANN S., SCHONBERGER T., POHLMAYER I., CHIRIBIRI A., SCHUSTER A., BOTNAR R. M., GRIESSINGER C. M., PICHLER B. J., GAWAZ M. (2012)

LITERATURVERZEICHNIS

Ex vivo imaging of injured arteries in rabbits using fluorescence-labelled glycoprotein VI-Fc, *Platelets*, 23(1), 1-6.

BIGALKE B., PHINIKARIDOU A., ANDIA M. E., COOPER M. S., SCHUSTER A., SCHONBERGER T., GRIESSINGER C. M., WURSTER T., ONTHANK D., UNGERER M., GAWAZ M., NAGEL E., BOTNAR R. M. (2013)

Positron Emission Tomography/Computed Tomographic and Magnetic Resonance Imaging in a Murine Model of Progressive Atherosclerosis Using ⁶⁴Cu-Labeled Glycoprotein VI-Fc, *Circ Cardiovasc Imaging*, 6(6), 957-64.

BIGALKE B., POHLMAYER I., SCHONBERGER T., GRIESSINGER C. M., UNGERER M., BOTNAR R. M., PICHLER B. J., GAWAZ M. (2011)

Imaging of injured and atherosclerotic arteries in mice using fluorescence-labeled glycoprotein VI-Fc, *Eur J Radiol*, 79(2), e63-9.

BRUJAN E. A. (2004)

The role of cavitation microjets in the therapeutic applications of ultrasound, *Ultrasound Med Biol*, 30(3), 381-7.

BULTMANN A., HERDEG C., LI Z., MUNCH G., BAUMGARTNER C., LANGER H., KREMMER E., GEISLER T., MAY A., UNGERER M., GAWAZ M. (2006)

Local delivery of soluble platelet collagen receptor glycoprotein VI inhibits thrombus formation in vivo, *Thromb Haemost*, 95(5), 763-6.

BULTMANN A., LI Z., WAGNER S., PELUSO M., SCHONBERGER T., WEIS C., KONRAD I., STELLOS K., MASSBERG S., NIESWANDT B., GAWAZ M., UNGERER M., MUNCH G. (2010)

Impact of glycoprotein VI and platelet adhesion on atherosclerosis--a possible role of fibronectin, *J Mol Cell Cardiol*, 49(3), 532-42.

CARMELIET P., MOONS L., COLLEN D. (1998)

Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis, *Cardiovasc Res*, 39(1), 8-33.

CHEN H., KAHN M. L. (2003)

Reciprocal signaling by integrin and nonintegrin receptors during collagen activation of platelets, *Mol Cell Biol*, 23(14), 4764-77.

CHO J., MOSHER D. F. (2006)

Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation, *J Thromb Haemost*, 4(7), 1461-9.

CHRISTIANSEN C., KRYVI H., SONTUM P. C., SKOTLAND T. (1994)

Physical and biochemical characterization of Alunex, a new ultrasound contrast agent consisting of air-filled albumin microspheres suspended in a solution of human albumin, *Biotechnol Appl Biochem*, 19 (Pt 3), 307-20.

CHRISTIANSEN J. P., FRENCH B. A., KLIBANOV A. L., KAUL S., LINDNER J. R. (2003)

Targeted tissue transfection with ultrasound destruction of plasmid-bearing cationic microbubbles, *Ultrasound Med Biol*, 29(12), 1759-67.

CLEMETSON K. J. (1999)

LITERATURVERZEICHNIS

Platelet collagen receptors: a new target for inhibition?, *Haemostasis*, 29(1), 16-26.

CLEMETSON K. J., CLEMETSON J. M. (2001)

Platelet collagen receptors, *Thromb Haemost*, 86(1), 189-97.

CLEMETSON K. J., MCGREGOR J. L., JAMES E., DECHAVANNE M., 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(2), 304-11.

DAYTON P. A., MORGAN K. E., KLIBANOV A. L., BRANDENBURGER G. H., FERRARA K. W. (1999)

Optical and acoustical observations of the effects of ultrasound on contrast agents, *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 46(1), 220-32.

DE JONG N., HOFF L., SKOTLAND T., BOM N. (1992)

Absorption and scatter of encapsulated gas filled microspheres: theoretical considerations and some measurements, *Ultrasonics*, 30(2), 95-103.

DENG C. X., LIZZI F. L. (2002)

A review of physical phenomena associated with ultrasonic contrast agents and illustrative clinical applications, *Ultrasound Med Biol*, 28(3), 277-86.

DRENCKHAHN D., Kapitel 9, Herz.Kreislauf-System, Seiten 71-89

in BENNINGHOFF A., DRENCKHAHN D. (2004)

Anatomie Band 2, *Elsevier GmbH, München*

DRISCOLL D. M., GETZ G. S. (1984)

Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E, *J Lipid Res*, 25(12), 1368-79.

EHMKE, H., Kapitel 6, Das Kreislaufsystem; Seiten 174 - 177

in KLINKE R., PAPE H-C., KURTZ A., SILBERNAGL S. (2010)

Physiologie, *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*

ELLEGALA D. B., LEONG-POI H., CARPENTER J. E., KLIBANOV A. L., KAUL S., SHAFFREY M. E., SKLENAR J., LINDNER J. R. (2003)

Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)beta3, *Circulation*, 108(3), 336-41.

EZUMI Y., UCHIYAMA T., TAKAYAMA H. (2000)

Molecular cloning, genomic structure, chromosomal localization, and alternative splice forms of the platelet collagen receptor glycoprotein VI, *Biochem Biophys Res Commun*, 277(1), 27-36.

FALK E., SHAH P. K., FUSTER V. (1995)

Coronary plaque disruption, *Circulation*, 92(3), 657-71.

FARB A., BURKE A. P., TANG A. L., LIANG T. Y., MANNAN P., SMIALEK J., VIRMANI R. (1996)

LITERATURVERZEICHNIS

Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death, *Circulation*, 93(7), 1354-63.

FLEINER M., KUMMER M., MIRLACHER M., SAUTER G., CATHOMAS G., KRAPF R., BIEDERMANN B. C. (2004)

Arterial neovascularization and inflammation in vulnerable patients: early and late signs of symptomatic atherosclerosis, *Circulation*, 110(18), 2843-50.

FUSTER V., BADIMON L., BADIMON J. J., CHESEBRO J. H. (1992)

The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1), *N Engl J Med*, 326(4), 242-50.

GALLET C., ROSA J. P., HABIB A., LEBRET M., LEVY-TOLEDANO S., MACLOUF J. (1999)

Tyrosine phosphorylation of cortactin associated with Syk accompanies thromboxane analogue-induced platelet shape change, *J Biol Chem*, 274(33), 23610-6.

GAWAZ M. (2001)

Blood Platelets

Physiology, Pathophysiology, Membrane Receptors, Antiplatelet Principles, and Therapy for Atherothrombotic Diseases, *G. Thieme - Verlag, Stuttgart; New York*.

GAWAZ M. (2004)

Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium, *Cardiovasc Res*, 61(3), 498-511.

GAWAZ M., KONRAD I., HAUSER A. I., SAUER S., LI Z., WESTER H. J., BENDEL F. M., SCHWAIGER M., SCHOMIG A., MASSBERG S., HAUBNER R. (2005a)

Non-invasive imaging of glycoprotein VI binding to injured arterial lesions, *Thromb Haemost*, 93(5), 910-3.

GAWAZ M., LANGER H., MAY A. E. (2005b)

Platelets in inflammation and atherogenesis, *J Clin Invest*, 115(12), 3378-84.

GEORGE J. N. (2000)

Platelets, *Lancet*, 355(9214), 1531-9.

GIBBINS J. M., OKUMA M., FARNDAL R., BARNES M., WATSON S. P. (1997)

Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain, *FEBS Lett*, 413(2), 255-9.

GOEBEL S., LI Z., VOGELMANN J., HOLTHOFF H. P., DEGEN H., HERMANN D. M., GAWAZ M., UNGERER M., MUNCH G. (2013)

The GPVI-Fc fusion protein Revacept improves cerebral infarct volume and functional outcome in stroke, *PLoS One*, 8(7), e66960.

GOTO S., TAMURA N., HANDA S., ARAI M., KODAMA K., TAKAYAMA H. (2002)

Involvement of glycoprotein VI in platelet thrombus formation on both collagen and von Willebrand factor surfaces under flow conditions, *Circulation*, 106(2), 266-72.

GRAMIAK R., SHAH P. M. (1968)

LITERATURVERZEICHNIS

Echocardiography of the aortic root, *Invest Radiol*, 3(5), 356-66.

GROSS P. L., AIRD W. C. (2000)

The endothelium and thrombosis, *Semin Thromb Hemost*, 26(5), 463-78.

GUO Z., MITCHELL-RAYMUNDO F., YANG H., IKENO Y., NELSON J., DIAZ V., RICHARDSON A., REDDICK R. (2002)

Dietary restriction reduces atherosclerosis and oxidative stress in the aorta of apolipoprotein E-deficient mice, *Mech Ageing Dev*, 123(8), 1121-31.

HANSSON G. K., LIBBY P., SCHONBECK U., YAN Z. Q. (2002)

Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis, *Circ Res*, 91(4), 281-91.

HARTWIG J. H. (1992)

Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation, *J Cell Biol*, 118(6), 1421-42.

HEES H., Kapitel 7, Kreislaufsystem, Seite 191-2004

in SINOWATZ F., HEES H. (2006)

Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie, *Eigenverlag, München*.

HUI D. Y., INNERARITY T. L., MAHLEY R. W. (1981)

Lipoprotein binding to canine hepatic membranes. Metabolically distinct apo-E and apo-B,E receptors, *J Biol Chem*, 256(11), 5646-55.

IYAMA K., HAJRA L., IYAMA M., LI H., DICHIARA M., MEDOFF B. D., CYBULSKY M. I. (1999)

Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation, *Circ Res*, 85(2), 199-207.

JACKSON S. P., MISTRY N., YUAN Y. (2000)

Platelets and the injured vessel wall-- "rolling into action": focus on glycoprotein Ib/V/IX and the platelet cytoskeleton, *Trends Cardiovasc Med*, 10(5), 192-7.

JANDROT-PERRUS M., BUSFIELD S., LAGRUE A. H., XIONG X., DEBILI N., CHICKERING T., LE COUEDIC J. P., GOODEARL A., DUSSAULT B., FRASER C., VAINCHENKER W., VILLEVAL J. L. (2000)

Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily, *Blood*, 96(5), 1798-807.

JUNG S. M., MOROI M. (2008)

Platelet glycoprotein VI, *Adv Exp Med Biol*, 640, 53-63.

KASIRER-FRIEDE A., WARE J., LENG L., MARCHESE P., RUGGERI Z. M., SHATTIL S. J. (2002)

Lateral clustering of platelet GP Ib-IX complexes leads to up-regulation of the adhesive function of integrin alpha IIb beta 3, *J Biol Chem*, 277(14), 11949-56.

LITERATURVERZEICHNIS

KASPERS B., GÖBEL TH., Kapitel 10.4, Hämostase, Seiten 207 - 212
in VON ENGELHARDT W., BREVES G. (2000)
Physiologie der Haustiere, *Enke Verlag, Stuttgart*.

KAUFMANN B. A., CARR C. L., BELCIK J. T., XIE A., YUE Q., CHADDERDON S.,
CAPLAN E. S., KHANGURA J., BULLENS S., BUNTING S., LINDNER J. R. (2010)
Molecular imaging of the initial inflammatory response in atherosclerosis: implications for
early detection of disease, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(1), 54-9.

KAUFMANN B. A., LINDNER J. R. (2007)
Molecular imaging with targeted contrast ultrasound, *Curr Opin Biotechnol*, 18(1), 11-6.

KAUFMANN B. A., SANDERS J. M., DAVIS C., XIE A., ALDRED P., SAREMBOCK I. J.,
LINDNER J. R. (2007a)
Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis with targeted ultrasound detection of
vascular cell adhesion molecule-1, *Circulation*, 116(3), 276-84.

KAUFMANN B. A., WEI K., LINDNER J. R. (2007b)
Contrast echocardiography, *Curr Probl Cardiol*, 32(2), 51-96.

KEHREL B., KRONENBERG A., RAUTERBERG J., NIESING-BRESCH D., NIEHUES U.,
KARDOEUS J., SCHWIPPERT B., TSCHOPE D., VAN DE LOO J., CLEMETSON K. J.
(1993)
Platelets deficient in glycoprotein IIIb aggregate normally to collagens type I and III but not to
collagen type V, *Blood*, 82(11), 3364-70.

KEHREL B., WIERWILLE S., CLEMETSON K. J., ANDERS O., STEINER M., KNIGHT C.
G., FARNDAL R. W., OKUMA M., 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(2), 491-9.

KHANICHEH E., MITTERHUBER M., XU L., HAEUSELMANN S. P., KUSTER G. M.,
KAUFMANN B. A. (2013)
Noninvasive ultrasound molecular imaging of the effect of statins on endothelial inflammatory
phenotype in early atherosclerosis, *PLoS One*, 8(3), e58761.

KITA T., KUME N., MINAMI M., HAYASHIDA K., MURAYAMA T., SANO H.,
MORIWAKI H., KATAOKA H., NISHI E., HORIUCHI H., ARAI H., YOKODE M. (2001)
Role of oxidized LDL in atherosclerosis, *Ann N Y Acad Sci*, 947, 199-205; discussion 205-6.

KLIBANOV A. L. (2007)
Ultrasound molecular imaging with targeted microbubble contrast agents, *J Nucl Cardiol*,
14(6), 876-84.

KLIBANOV A. L., HUGHES M. S., MARSH J. N., HALL C. S., MILLER J. G., WIBLE J.
H., BRANDENBURGER G. H. (1997)
Targeting of ultrasound contrast material. An in vitro feasibility study, *Acta Radiol Suppl*, 412,
113-20.

LITERATURVERZEICHNIS

- KOBAYASHI N., YASU T., YAMADA S., KUDO N., KUROKI M., KAWAKAMI M., MIYATAKE K., SAITO M. (2002)
Endothelial cell injury in venule and capillary induced by contrast ultrasonography, *Ultrasound Med Biol*, 28(7), 949-56.
- KROLL M. H., SCHAFER A. I. (1989)
Biochemical mechanisms of platelet activation, *Blood*, 74(4), 1181-95.
- LANGER H., SCHONBERGER T., BIGALKE B., GAWAZ M. (2007)
Where is the trace? Molecular imaging of vulnerable atherosclerotic plaques, *Semin Thromb Hemost*, 33(2), 151-8.
- LENTACKER I. S. S. S., N. (2009)
Drug loaded microbubble design for ultrasound triggered delivery, *Soft Matter*, 5, 2161-2170.
- LI G., SANDERS J. M., PHAN E. T., LEY K., SAREMBOCK I. J. (2005)
Arterial macrophages and regenerating endothelial cells express P-selectin in atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient mice, *Am J Pathol*, 167(6), 1511-8.
- LI H., CYBULSKY M. I., GIMBRONE M. A., JR., LIBBY P. (1993)
An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium, *Arterioscler Thromb*, 13(2), 197-204.
- LI P., CAO L. Q., DOU C. Y., ARMSTRONG W. F., MILLER D. (2003)
Impact of myocardial contrast echocardiography on vascular permeability: an in vivo dose response study of delivery mode, pressure amplitude and contrast dose, *Ultrasound Med Biol*, 29(9), 1341-9.
- LINDNER J. R. (2004)
Microbubbles in medical imaging: current applications and future directions, *Nat Rev Drug Discov*, 3(6), 527-32.
- LUM A. F., BORDEN M. A., DAYTON P. A., KRUSE D. E., SIMON S. I., FERRARA K. W. (2006)
Ultrasound radiation force enables targeted deposition of model drug carriers loaded on microbubbles, *J Control Release*, 111(1-2), 128-34.
- LIPPERT H., Kapitel 1.4, Kreislauforgane (Systema cardiovasculare), Seite 67-77
in LIPPERT H. (2011)
Lehrbuch Anatomie, Elsevier GmbH, München
- LUSIS A. J. (2000)
Atherosclerosis, *Nature*, 407(6801), 233-41.
- LUSIS A. J., MAR R., PAJUKANTA P. (2004)
Genetics of atherosclerosis, *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 5, 189-218.
- MAHLEY R. W. (1986)
The molecular basis of atherosclerosis: concepts derived from studies of lipoprotein metabolism and cell biology, *Clin Invest Med*, 9(4), 304-8.

LITERATURVERZEICHNIS

MASSBERG S., BRAND K., GRUNER S., PAGE S., MULLER E., MULLER I., BERGMIEIER W., RICHTER T., LORENZ M., KONRAD I., NIESWANDT B., GAWAZ M. (2002)

A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation, *J Exp Med*, 196(7), 887-96.

MASSBERG S., GAWAZ M., GRUNER S., SCHULTE V., KONRAD I., ZOHLNHOFFER D., HEINZMANN U., NIESWANDT B. (2003)

A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo, *J Exp Med*, 197(1), 41-9.

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., GAWAZ M. (2004)

Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo, *FASEB J*, 18(2), 397-9.

MASSBERG S., SCHURZINGER K., LORENZ M., KONRAD I., SCHULZ C., PLESNILA N., KENNERKNECHT E., RUDELIUS M., SAUER S., BRAUN S., KREMMER E., EMAMBOKUS N. R., FRAMPTON J., GAWAZ M. (2005)

Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb, *Circulation*, 112(8), 1180-8.

MATTER C. M., SCHULER P. K., ALESSI P., MEIER P., RICCI R., ZHANG D., HALIN C., CASTELLANI P., ZARDI L., HOFER C. K., MONTANI M., NERI D., LUSCHER T. F. (2004)

Molecular imaging of atherosclerotic plaques using a human antibody against the extra-domain B of fibronectin, *Circ Res*, 95(12), 1225-33.

MAYER C. R., GEIS N. A., KATUS H. A., BEKEREDJIAN R. (2008)

Ultrasound targeted microbubble destruction for drug and gene delivery, *Expert Opin Drug Deliv*, 5(10), 1121-38.

MCCARTY O. J., CONLEY R. B., SHENTU W., TORMOEN G. W., ZHA D., XIE A., QI Y., ZHAO Y., CARR C., BELCIK T., KEENE D. R., DE GROOT P. G., LINDNER J. R. (2010)

Molecular imaging of activated von Willebrand factor to detect high-risk atherosclerotic phenotype, *JACC Cardiovasc Imaging*, 3(9), 947-55.

MEDWIN H. (1977)

Counting bubbles acoustically: A review, *Ultrasonics*, 15(1), 7-13.

MILLER D. L., QUDDUS J. (2000)

Diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies induces capillary rupture in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(18), 10179-84.

MIURA Y., TAKAHASHI T., JUNG S. M., 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(48), 46197-204.

MOROI M., JUNG S. M. (2004)

LITERATURVERZEICHNIS

Platelet glycoprotein VI: its structure and function, *Thromb Res*, 114(4), 221-33.

MOROI M., JUNG S. M., NOMURA S., SEKIGUCHI S., ORDINAS A., DIAZ-RICART M. (1997)

Analysis of the involvement of the von Willebrand factor-glycoprotein Ib interaction in platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions, *Blood*, 90(11), 4413-24.

MOROI M., JUNG S. M., OKUMA M., SHINMYOZU K. (1989)

A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion, *J Clin Invest*, 84(5), 1440-5.

MOROI M., JUNG S. M., SHINMYOZU K., TOMIYAMA Y., ORDINAS A., 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(6), 2081-92.

NAGHAVI M., LIBBY P., FALK E., CASSCELLS S. W., LITOVSKY S., RUMBERGER J., BADIMON J. J., STEFANADIS C., MORENO P., PASTERKAMP G., FAYAD Z., STONE P. H., WAXMAN S., RAGGI P., MADJID M., ZARRABI A., BURKE A., YUAN C., FITZGERALD P. J., SISCOVICK D. S., DE KORTE C. L., AIKAWA M., AIRAKSINEN K. E., ASSMANN G., BECKER C. R., CHESEBRO J. H., FARB A., GALIS Z. S., JACKSON C., JANG I. K., KOENIG W., LODDER R. A., MARCH K., DEMIROVIC J., NAVAB M., PRIORI S. G., REKHTER M. D., BAHR R., GRUNDY S. M., MEHRAN R., COLOMBO A., BOERWINKLE E., BALLANTYNE C., INSULL W., JR., SCHWARTZ R. S., VOGEL R., SERRUYS P. W., HANSSON G. K., FAXON D. P., KAUL S., DREXLER H., GREENLAND P., MULLER J. E., VIRMANI R., RIDKER P. M., ZIPES D. P., SHAH P. K., WILLERSON J. T. (2003a)

From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II, *Circulation*, 108(15), 1772-8.

NAGHAVI M., LIBBY P., FALK E., CASSCELLS S. W., LITOVSKY S., RUMBERGER J., BADIMON J. J., STEFANADIS C., MORENO P., PASTERKAMP G., FAYAD Z., STONE P. H., WAXMAN S., RAGGI P., MADJID M., ZARRABI A., BURKE A., YUAN C., FITZGERALD P. J., SISCOVICK D. S., DE KORTE C. L., AIKAWA M., JUHANI AIRAKSINEN K. E., ASSMANN G., BECKER C. R., CHESEBRO J. H., FARB A., GALIS Z. S., JACKSON C., JANG I. K., KOENIG W., LODDER R. A., MARCH K., DEMIROVIC J., NAVAB M., PRIORI S. G., REKHTER M. D., BAHR R., GRUNDY S. M., MEHRAN R., COLOMBO A., BOERWINKLE E., BALLANTYNE C., INSULL W., JR., SCHWARTZ R. S., VOGEL R., SERRUYS P. W., HANSSON G. K., FAXON D. P., KAUL S., DREXLER H., GREENLAND P., MULLER J. E., VIRMANI R., RIDKER P. M., ZIPES D. P., SHAH P. K., WILLERSON J. T. (2003b)

From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I, *Circulation*, 108(14), 1664-72.

NAKASHIMA Y., RAINES E. W., PLUMP A. S., BRESLOW J. L., ROSS R. (1998)

Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(5), 842-51.

NEWMAN C. M., BETTINGER T. (2007)

Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer, *Gene Ther*, 14(6), 465-75.

LITERATURVERZEICHNIS

- NEWMAN C. M., LAWRIE A., BRISKEN A. F., CUMBERLAND D. C. (2001)
Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality, *Echocardiography*, 18(4), 339-47.
- NIESWANDT B., BERGMEIER W., SCHULTE V., RACKEBRANDT K., GESSNER J. E., 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(31), 23998-4002.
- NIESWANDT B., BRAKEBUSCH C., BERGMEIER W., SCHULTE V., BOUVARD D., MOKHTARI-NEJAD R., LINDHOUT T., HEEMSKERK J. W., ZIRNGIBL H., FASSLER R. (2001a)
Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen, *EMBO J*, 20(9), 2120-30.
- NIESWANDT B., SCHULTE V., BERGMEIER W., MOKHTARI-NEJAD R., RACKEBRANDT K., CAZENAVE J. P., OHLMANN P., GACHET C., ZIRNGIBL H. (2001b)
Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice, *J Exp Med*, 193(4), 459-69.
- NIESWANDT B., WATSON S. P. (2003)
Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?, *Blood*, 102(2), 449-61.
- O'BRIEN K. D., MCDONALD T. O., CHAIT A., ALLEN M. D., ALPERS C. E. (1996)
Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content, *Circulation*, 93(4), 672-82.
- OGAWA M., ISHINO S., MUKAI T., ASANO D., TERAMOTO N., WATABE H., KUDOMI N., SHIOMI M., MAGATA Y., IIDA H., SAJI H. (2004)
(18)F-FDG accumulation in atherosclerotic plaques: immunohistochemical and PET imaging study, *J Nucl Med*, 45(7), 1245-50.
- PACKHAM M. A. (1994)
Role of platelets in thrombosis and hemostasis, *Can J Physiol Pharmacol*, 72(3), 278-84.
- PAIGEN B., PLUMP A. S., RUBIN E. M. (1994)
The mouse as a model for human cardiovascular disease and hyperlipidemia, *Curr Opin Lipidol*, 5(4), 258-64.
- PEERSCHKE E. I. (1985)
The platelet fibrinogen receptor, *Semin Hematol*, 22(4), 241-59.
- PEISER L., MUKHOPADHYAY S., GORDON S. (2002)
Scavenger receptors in innate immunity, *Curr Opin Immunol*, 14(1), 123-8.
- PIEDRAHITA J. A., ZHANG S. H., HAGAMAN J. R., OLIVER P. M., MAEDA N. (1992)
Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(10), 4471-5.

LITERATURVERZEICHNIS

POOLE A., GIBBINS J. M., TURNER M., VAN VUGT M. J., VAN DE WINKEL J. G., SAITO T., TYBULEWICZ V. L., WATSON S. P. (1997)

The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen, *EMBO J*, 16(9), 2333-41.

PORTER T. R., XIE F. (1995)

Transient myocardial contrast after initial exposure to diagnostic ultrasound pressures with minute doses of intravenously injected microbubbles. Demonstration and potential mechanisms, *Circulation*, 92(9), 2391-5.

REDDICK R. L., ZHANG S. H., MAEDA N. (1994)

Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression, *Arterioscler Thromb*, 14(1), 141-7.

ROSS R. (1999a)

Atherosclerosis--an inflammatory disease, *N Engl J Med*, 340(2), 115-26.

ROSS R. (1999b)

Atherosclerosis is an inflammatory disease, *Am Heart J*, 138(5 Pt 2), S419-20.

ROTH G. J. (1991)

Developing relationships: arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins, *Blood*, 77(1), 5-19.

RUGGERI Z. M. (1997)

Mechanisms initiating platelet thrombus formation, *Thromb Haemost*, 78(1), 611-6.

RUGGERI Z. M. (2002)

Platelets in atherothrombosis, *Nat Med*, 8(11), 1227-34.

RUGGERI Z. M. (2003)

Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions, *J Thromb Haemost*, 1(7), 1335-42.

SANTORO S. A. (1986)

Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen, *Cell*, 46(6), 913-20.

SANTORO S. A., WALSH J. J., STAATZ W. D., BARANSKI K. J. (1991)

Distinct determinants on collagen support alpha 2 beta 1 integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation, *Cell Regul*, 2(11), 905-13.

SCHIEBLER T. H., KORF H.-W., Kapitel 6, Blutkreislauf und Herz, Lymphgefäße - Allgemeinen Organisation, Seite 177 - 199

in SCHIEBLER T. H., KORF H.-W. (2007)

Anatomie, *Steinkopff Verlag, Berlin*

SCHONBERGER T., SIEGEL-AXEL D., BUSSL R., RICHTER S., JUDENHOFER M. S., HAUBNER R., REISCHL G., KLINGEL K., MUNCH G., SEIZER P., PICHLER B. J., GAWAZ M. (2008)

LITERATURVERZEICHNIS

The immunoadhesin glycoprotein VI-Fc regulates arterial remodelling after mechanical injury in ApoE^{-/-} mice, *Cardiovasc Res*, 80(1), 131-7.

SCHONBERGER T., ZIEGLER M., BORST O., KONRAD I., NIESWANDT B., MASSBERG S., OCHMANN C., JURGENS T., SEIZER P., LANGER H., MUNCH G., UNGERER M., PREISSNER K. T., ELVERS M., GAWAZ M. (2012)

The dimeric platelet collagen receptor GPVI-Fc reduces platelet adhesion to activated endothelium and preserves myocardial function after transient ischemia in mice, *Am J Physiol Cell Physiol*, 303(7), C757-66.

SCHULZ C., PENZ S., HOFFMANN C., LANGER H., GILLITZER A., SCHNEIDER S., BRANDL R., SEIDL S., MASSBERG S., PICHLER B., KREMMER E., STELLOS K., SCHONBERGER T., SIESS W., 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(4), 356-67.

SCHUMANN P. A., CHRISTIANSEN J. P., QUIGLEY R. M., MCCREERY T. P., SWEITZER R. H., UNGER E. C., LINDNER J. R., MATSUNAGA T. O. (2002)

Targeted-microbubble binding selectively to GPIIb IIIa receptors of platelet thrombi, *Invest Radiol*, 37(11), 587-93.

SCHUMMER A., HABERMEHL K.-H., Kapitel Blutgefäße, Bau und Funktion, Seite 8-14 in NICKEL R., SCHUMMER A., SEIFERLE E. (2005)

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane, Parey Verlag, Stuttgart.

SCHWARTZ S. M., GALIS Z. S., ROSENFELD M. E., FALK E. (2007)

Plaque rupture in humans and mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(4), 705-13.

SHERILL B. C., DIETSCHY J. M. (1978)

Characterization of the sinusoidal transport process responsible for uptake of chylomicrons by the liver, *J Biol Chem*, 253(6), 1859-67.

SHORE V. G., SHORE B. (1973)

Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components, *Biochemistry*, 12(3), 502-7.

SIEGEL-AXEL D. I., GAWAZ M. (2007)

Platelets and endothelial cells, *Semin Thromb Hemost*, 33(2), 128-35.

SKYBA D. M., PRICE R. J., LINKA A. Z., SKALAK T. C., KAUL S. (1998)

Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue, *Circulation*, 98(4), 290-3.

SMITH J. D., TROGAN E., GINSBERG M., GRIGAUX C., TIAN J., 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(18), 8264-8.

STAATZ W. D., RAJPARA S. M., WAYNER E. A., CARTER W. G., SANTORO S. A. (1989)

The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg⁺⁺-dependent adhesion of platelets to collagen, *J Cell Biol*, 108(5), 1917-24.

LITERATURVERZEICHNIS

STARY H. C., CHANDLER A. B., GLAGOV S., GUYTON J. R., INSULL W., JR., ROSENFELD M. E., SCHAFFER S. A., SCHWARTZ C. J., WAGNER W. D., WISSLER R. W. (1994)

A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association, *Circulation*, 89(5), 2462-78.

STAUB D., SCHINKEL A. F., COLL B., COLI S., VAN DER STEEN A. F., REED J. D., KRUEGER C., THOMENIUS K. E., ADAM D., SIJBRANDS E. J., TEN CATE F. J., FEINSTEIN S. B. (2010)

Contrast-enhanced ultrasound imaging of the vasa vasorum: from early atherosclerosis to the identification of unstable plaques, *JACC Cardiovasc Imaging*, 3(7), 761-71.

STEINBERG D. (1989)

The cholesterol controversy is over. Why did it take so long?, *Circulation*, 80(4), 1070-8.

STEINBERG D. (2002)

Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime, *Nat Med*, 8(11), 1211-7.

SUGIYAMA T., OKUMA M., USHIKUBI F., SENSACKI S., KANAJI K., UCHINO H. (1987)

A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia, *Blood*, 69(6), 1712-20.

TANDON N. N., KRALISZ U., JAMIESON G. A. (1989a)

Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion, *J Biol Chem*, 264(13), 7576-83.

TANDON N. N., LIPSKY R. H., BURGESS W. H., JAMIESON G. A. (1989b)

Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36), *J Biol Chem*, 264(13), 7570-5.

TEN KATE G. L., SIJBRANDS E. J., STAUB D., COLL B., TEN CATE F. J., FEINSTEIN S. B., SCHINKEL A. F. (2010)

Noninvasive imaging of the vulnerable atherosclerotic plaque, *Curr Probl Cardiol*, 35(11), 556-91.

TEUPE C., RICHTER S., FISSALTHALER B., RANDRIAMBOAVONJY V., IHLING C., FLEMING I., BUSSE R., ZEIHNER A. M., DIMMELER S. (2002)

Vascular gene transfer of phosphomimetic endothelial nitric oxide synthase (S1177D) using ultrasound-enhanced destruction of plasmid-loaded microbubbles improves vasoreactivity, *Circulation*, 105(9), 1104-9.

THEILMEIER G., MICHELIS C., SPAEPEN E., VREYS I., COLLEN D., VERMYLEN J., HOYLAERTS M. F. (2002)

Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia, *Blood*, 99(12), 4486-93.

TSUTSUI J. M., XIE F., PORTER R. T. (2004)

The use of microbubbles to target drug delivery, *Cardiovasc Ultrasound*, 2, 23.

LITERATURVERZEICHNIS

- UNGER E. C., MCCREERY T. P., SWEITZER R. H., CALDWELL V. E., WU Y. (1998)
Acoustically active lipospheres containing paclitaxel: a new therapeutic ultrasound contrast agent, *Invest Radiol*, 33(12), 886-92.
- UNGERER M., LI Z., BAUMGARTNER C., GOEBEL S., VOGELMANN J., HOLTHOFF H. P., GAWAZ M., MUNCH G. (2013)
The GPVI-Fc fusion protein Revacept reduces thrombus formation and improves vascular dysfunction in atherosclerosis without any impact on bleeding times, *PLoS One*, 8(8), e71193.
- UNGERER M., ROSPORT K., BULTMANN A., PIECHATZEK R., UHLAND K., SCHLIEPER P., GAWAZ M., MUNCH G. (2011)
Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans, *Circulation*, 123(17), 1891-9.
- VALETTAS N., HERRMANN H. C. (2003)
The role of platelets and platelet inhibition in acute myocardial infarction, *Coron Artery Dis*, 14(5), 357-63.
- VANE J. R., ANGGARD E. E., BOTTING R. M. (1990)
Regulatory functions of the vascular endothelium, *N Engl J Med*, 323(1), 27-36.
- VILLANUEVA F. S., JANKOWSKI R. J., KLIBANOV S., PINA M. L., ALBER S. M., WATKINS S. C., BRANDENBURGER G. H., WAGNER W. R. (1998)
Microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1 bind to activated coronary artery endothelial cells, *Circulation*, 98(1), 1-5.
- VISUALSONICS Inc.; Toronto, Kanada 'www.visulasonics.com'
- VISUALSONICS INC.; Toronto., Kanada (2011) 'Contrast-Enhanced Micro-Ultrasound For Small Animal Molecular and Functional Imaging',
- VON ENGELHARDT W., Kapitel 9, Kreislauf, Seiten 171 - 172
in VON ENGELHARDT W., BREVES G. (2005)
Physiologie der Haustiere, *Enke Verlag, Stuttgart*.
- WANG X., HAGEMEYER C. E., HOHMANN J. D., LEITNER E., ARMSTRONG P. C., JIA F., OLSCHESKI M., NEEDLES A., PETER K., AHRENS I. (2012)
Novel single-chain antibody-targeted microbubbles for molecular ultrasound imaging of thrombosis: validation of a unique noninvasive method for rapid and sensitive detection of thrombi and monitoring of success or failure of thrombolysis in mice, *Circulation*, 125(25), 3117-26.
- WATSON S., BERLANGA O., BEST D., FRAMPTON J. (2000)
Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid?, *Platelets*, 11(5), 252-8.
- WATSON S. P., AUGER J. M., MCCARTY O. J., PEARCE A. C. (2005)
GPVI and integrin α IIb β 3 signaling in platelets, *J Thromb Haemost*, 3(8), 1752-62.

LITERATURVERZEICHNIS

WATSON S. P., GIBBINS J. (1998)

Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM, *Immunol Today*, 19(6), 260-4.

WELLER G. E., LU E., CSIKARI M. M., KLIBANOV A. L., FISCHER D., WAGNER W. R., VILLANUEVA F. S. (2003)

Ultrasound imaging of acute cardiac transplant rejection with microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1, *Circulation*, 108(2), 218-24.

WELLER G. E., WONG M. K., MODZELEWSKI R. A., LU E., KLIBANOV A. L., WAGNER W. R., VILLANUEVA F. S. (2005)

Ultrasonic imaging of tumor angiogenesis using contrast microbubbles targeted via the tumor-binding peptide arginine-arginine-leucine, *Cancer Res*, 65(2), 533-9.

WELSCH U., DELLER T, Kapitel 5 Organe des Kreislaufsystems, Seiten 199-223
in WELSCH U., DELLER T. (2010)

Lehrbuch Histologie, Elsevier GmbH, München

WILLMANN J. K., KIMURA R. H., DESHPANDE N., LUTZ A. M., COCHRAN J. R., GAMBHIR S. S. (2010)

Targeted contrast-enhanced ultrasound imaging of tumor angiogenesis with contrast microbubbles conjugated to integrin-binding knottin peptides, *J Nucl Med*, 51(3), 433-40.

WILNER G. D., NOSSEL H. L., LEROY E. C. (1968)

Aggregation of platelets by collagen, *J Clin Invest*, 47(12), 2616-21.

WU J. (2002)

Theoretical study on shear stress generated by microstreaming surrounding contrast agents attached to living cells, *Ultrasound Med Biol*, 28(1), 125-9.

WU K. K. (1996)

Platelet activation mechanisms and markers in arterial thrombosis, *J Intern Med*, 239(1), 17-34.

YAN F., LI X., JIN Q., CHEN J., SHANDAS R., WU J., LI L., LING T., YANG W., CHEN Y., LIU X., ZHENG H. (2012)

Ultrasonic imaging of endothelial CD81 expression using CD81-targeted contrast agents in in vitro and in vivo studies, *Ultrasound Med Biol*, 38(4), 670-80.

YOUNG S. G., PARTHASARATHY S. (1994)

Why are low-density lipoproteins atherogenic?, *West J Med*, 160(2), 153-64.

ZANETTI A., CONFORTI G., HESS S., MARTIN-PADURA I., GHIBAUDI E., PREISSNER K. T., DEJANA E. (1994)

Clustering of vitronectin and RGD peptides on microspheres leads to engagement of integrins on the luminal aspect of endothelial cell membrane, *Blood*, 84(4), 1116-23.

ZEIBIG S., LI Z., WAGNER S., HOLTHOFF H. P., UNGERER M., BULTMANN A., UHLAND K., VOGELMANN J., SIMMET T., GAWAZ M., MUNCH G. (2011)

Effect of the oxLDL binding protein Fc-CD68 on plaque extension and vulnerability in atherosclerosis, *Circ Res*, 108(6), 695-703.

LITERATURVERZEICHNIS

ZHANG S. H., REDDICK R. L., BURKEY B., MAEDA N. (1994)

Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption, *J Clin Invest*, 94(3), 937-45.

ZHAO Y. Z., LIANG H. D., MEI X. G., HALLIWELL M. (2005)

Preparation, characterization and in vivo observation of phospholipid-based gas-filled microbubbles containing hirudin, *Ultrasound Med Biol*, 31(9), 1237-43.

ZHENG Y. M., LIU C., CHEN H., LOCKE D., RYAN J. C., KAHN M. L. (2001)

Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor gamma -chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen, *J Biol Chem*, 276(16), 12999-3006.

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Beispiele verschiedener Microbubbles Kontrastmittel.	27
Tab. 2: Übersicht der für die Ultraschalluntersuchung des Aortenbogens verwendeten Mäuse	52
Tab. 3: Primäre Antikörper für die Immunhistochemie (Paraffinschnitte)	63
Tab. 4: Sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie (Paraffinschnitte)	63
Tab. 5: Isotypenkontrolle für die Immunhistochemie (Paraffinschnitte)	64
Tab. 6: Primäre Antikörper für die Immunhistochemie (Kryoschnitte)	64
Tab. 7: Sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie (Kryoschnitte)	65
Tab. 8: Isotypenkontrolle für die Immunhistochemie (Kryoschnitte)	65

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematischer Aufbau der Gefäßwand	6
Abb. 2: Entstehung atherosklerotischer Plaques.	9
Abb. 3: Form und Zellorganellen ruhender und aktivierter Thrombozyten.....	11
Abb. 4: Thrombozytenaggregation an freiliegendes Endothel.....	15
Abb. 5: Übersicht über die thrombozytären Kollagenrezeptoren.....	16
Abb. 6: two-step, two-site Modell nach Santoro.....	18
Abb. 7: two-step, two-site Modell nach Watson	18
Abb. 8: Graphische Darstellung der GPVI-Struktur	20
Abb. 9: Model des GPVI-Signalwegs.	21
Abb. 10: Darstellung des rekombinanten GPVI-Fc (Revacept®).....	22
Abb. 11: Beteiligung von Thrombozyten an der Atherosklerose.....	25
Abb. 12: graphische Darstellung der Vevo MicroMarker™ Contrast Agent Kits.....	32
Abb. 13: GPVI-Fc konjugierte Microbubbles.....	32
Abb. 14: Darstellung molekularer Biomarker.....	34
Abb. 15: Flusskammerversuch.	50
Abb. 16: Ultraschallkontrastmitteluntersuchung bei Mäusen	54
Abb. 17: Ultraschallaufnahmen.....	55
Abb. 18: Analyse der Contrast Intensity	57
Abb. 19: Biotinylierung von GPVI-Fc.....	67
Abb. 20: Funktionsfähigkeit des biotinylierten GPVI-Fc	68
Abb. 21: Elektronenmikroskopdarstellung der Microbubbles.	69
Abb. 22: Durchflusszytometrie.	70
Abb. 23: Dynamische Adhäsion in der Flusskammer.....	71

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 24: Vergleichende Darstellung der Contrast Intensity zwischen mit MB _{GPVI} und MB _C behandelten Mäusen.	72
Abb. 25: Blockade der MB _{GPVI} Bindung.	73
Abb. 26: Contrast Intensity korreliert mit dem Ausmaß der Plaquefläche.	75
Abb. 27: Korrelation zwischen Contrast Intensity und gemessener Plaquefläche.	76
Abb. 28: Contrast Intensity bei mit cholesterinreicher Diät gefütterten ApoE ^{-/-}	78
Abb. 29: Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Versuchs.	79
Abb. 30: Darstellung der Plaques im Bereich der Bifurkation der rechten A. carotis.	80
Abb. 31: Plaqueflächen im Bereich der Bifurkation der A. carotis.	82
Abb. 32: Vergleichende histologische Darstellung des Aortenbogens bei ApoE ^{-/-} und WT Mäusen	84
Abb. 33: Vergleichende histologische Darstellung mit MB _{GPVI} und MB _C behandelter Aortenbögen.	86
Abb. 34: Wellenförmiges Kontrastsignal	90
Abb. 35: Unterschiedliche Kontrastsignale in den unterschiedlichen Altersgruppen.	99

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	<i>Grad Celcius</i>
µg	<i>Mikrogramm</i>
µl	<i>Mikroliter</i>
µm	<i>Mikrometer</i>
A. carotis	<i>Arteria carotis</i>
a.u.	<i>arbitrary units</i>
Abb.	<i>Abbildung</i>
ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
AG	<i>Aktiengesellschaft</i>
ApoE	<i>Apolipoprotein E</i>
biot.	<i>biotinyliert</i>
BSA	<i>Bovines Serum Albumin</i>
bzw.	<i>beziehungsweise</i>
Ca	<i>Kalzium</i>
CI	<i>Contrast Intensity</i>
CT	<i>Computertomographie</i>
Cu	<i>Kupfer</i>
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EKG	<i>Elektrokardiogramm</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FACS	<i>Fluorescence activated sorting</i>
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
g	<i>Schleuderziffer, Gramm</i>
G	<i>Gauge = Maß für den Außendurchmesser einer Kanüle</i>
GmbH	<i>Gesellschaft mit beschränkter Haftung</i>
GP	<i>Glykoprotein (durchnummeriert)</i>
h	<i>Stunden</i>
H ₂ O	<i>Wasser</i>
H ₂ O ₂	<i>Wasserstoffperoxid</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HE	<i>Hämatoxylin - Eosin</i>
HRP	<i>"horseradish peroxidase" = Meerrettichperoxidase</i>
IP3	<i>Inositoltriphosphat</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
kg	<i>Kilogramm</i>
KG	<i>Kommanditgesellschaft</i>
kPa	<i>Kilopascal</i>
kV	<i>Kilovolt</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
Lsg.	<i>Lösung</i>
LW	<i>Lebenswoche</i>
M	<i>Molar</i>
MB	<i>Microbubbles</i>
mg	<i>Milligramm, Milligramm, Milligramm</i>
MHz	<i>Megahertz</i>
min	<i>Minute</i>
ml	<i>Milliliter</i>
mm	<i>Millimeter</i>
mM	<i>Millimolar</i>
MRT	<i>Magnetresonanztomographie</i>
n	<i>Anzahl</i>
Na ₂ CO ₃	<i>Natriumcarbonat</i>
NaCl	<i>Natrium - Chlorid</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NaHCO ₃	<i>Natriumhydrogencarbonat</i>
NaN ₃	<i>Natriumazid</i>
nm	<i>Nanometer</i>
OD	<i>optische Dichte</i>
PBS	<i>"phosphate buffered saline" = phosohatgepufferte Salzlösung</i>
PET	<i>Positronen - Emissions - Tomographie</i>
PIP ₂	<i>Phosphatidyinositoldiphosphat</i>
PKC	<i>Proteinkinase C</i>
PLC Cγ ₂	<i>Phospholipase Cγ₂</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
rpm	<i>revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute</i>
sec.	<i>Sekunden</i>
SEM	<i>"standard error of the mean" = Standardfehler</i>
sog.	<i>sogenannt</i>
TMB	<i>Tetramethylbenzidine</i>
v.a.	<i>vor allem</i>
VCAM - 1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
vgl.	<i>vergleiche</i>
vWF	<i>von - Willebrand - Faktor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WT	<i>Wildtyp (Mäuse)</i>
z.B.	<i>zum Beispiel, zum Beispiel</i>

12 DANKSAGUNG

Ich danke ganz besonders Herrn PD Dr. med. vet. Sven Reese für die Übernahme der Dissertation an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig - Maximilians - Universität München und seine freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz, Direktor des Instituts für Kardiologie und Kreislauferkrankungen des UKT Tübingen, für die Vergabe des interessanten Themas, die externe Betreuung meiner Arbeit und die wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. med. vet. Tanja Schönberger für die geduldige Einarbeitung in sämtliche Methoden, die allzeit gewährte Hilfe, die konstruktiven Ratschläge, ihre enorme Geduld bei der Korrektur dieser Arbeit und natürlich ihr stets offenes Ohr für sämtliche Probleme.

Vielen Dank an Ingrid Epple, Jadwiga Kwiatkowska, Klaudia Posavec, Hanna Schnell, Christina Flaum und Lydia Laptev für ihre immer gewährte Unterstützung im Labor.

Vielen Dank auch an Birgit Fehrenbacher aus dem Labor der Hautklinik des UKT Tübingen für die schönen elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Gawaz, die immer für eine gute Arbeitsatmosphäre sorgten, für die gute Zusammenarbeit, freundschaftliche Unterstützung und ihre Motivation.

Außerdem möchte ich allen Tierpflegern für die verantwortungsvolle Versorgung und Pflege der Mäuse danken, sowie den Mitarbeitern des Tierärztlichen Dienstes für die Unterstützung bei rechtlichen Fragen und der Planung der Tierversuche.

Vielen herzlichen Dank an Dieter Fuchs und Katrin Suppelt von VisualSonics, für das zu Verfügung stellen der Microbubbles und sämtliche Hilfestellungen und Ratschläge rund um die Microbubbles und das Ultraschallgerät.

Mein Dank geht an all meine Freunde, die während der ganzen Zeit immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich jederzeit wieder motiviert haben.

Meinem Verlobten Thomas, meinen Eltern Helmut und Renate und meiner Schwester Antje möchte ich für all die Unterstützung und Motivation während des Studium und der Promotion danken. Ohne sie wäre dies alles nicht möglich gewesen