

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten

Institut der Universität München

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Christian Weber



**Die Rolle des thrombozytären Glykoprotein VI-Rezeptors für die
Thrombozytenaktivierung durch Fibrin**

(The role of glycoprotein VI receptor for platelet activation by fibrin)

Dissertation

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

vorgelegt von

Danmei Zhang

aus Iserlohn

2022

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Siess

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Tobias Petzold
PD Dr. med. Lisa Gross

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Janina Jamasbi

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2022

Eidesstaatliche Versicherung

Zhang, Danmei

Name, Vorname

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

**Die Rolle des thrombozytären Glykoprotein VI-Rezeptors für die
Thrombozytenaktivierung durch Fibrin**

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

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

München, 07.07.2022

Ort, Datum

Danmei Zhang

Unterschrift Doktorandin

Widmung

meinen Eltern und meiner Schwester Dongyan

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis.....	10
2 Einleitung.....	11
2.1. Thrombozytenfunktion.....	11
2.2. Ablauf der Thrombozytenaktivierung.....	11
2.3. Atherosklerotisch-bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen (ASCVD).....	14
2.4. Pathophysiologie der Atherothrombose.....	15
2.4.1. Rolle von GPIb.....	16
2.4.2. Rolle von GPVI.....	17
2.4.3. Fibrinogen und Fibrin.....	20
2.4.4. Interaktion von Fibrin und Fibrinogen mit GPVI.....	22
2.5. GPVI-Inhibitoren.....	24
2.6. Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI).....	24
3 Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation.....	26
4 Materialien und Methoden.....	28
4.1 Materialien.....	28
4.1.1. Antikörper, Reagenzien und Proteinkonjugate: Flussversuche und Präparatfixierung.....	28
4.1.2. Allgemeine Puffer und Lösungen.....	29
4.1.3. Antikörper, Reagenzien und Materialien: SDS-PAGE, Silberfärbung und Immunoblotting.....	30
4.1.4. Blutabnahmematerial.....	31
4.1.5. Hardware und Software.....	31
4.2. Methoden.....	32
4.2.1. Blutentnahme.....	32
4.2.2. Auftragen von aufgereinigtem Fibrinogen, rekombinanten Fibrinogen und Fibrin.....	32
4.2.3. Auftragen von Plasmafibrin.....	33
4.2.4. Auftragen von Tissue Factor.....	33
4.2.5. Flusseperimente.....	33
4.2.6. Errechnung der Flussraten.....	35
4.2.7. Auswertung der Thrombozytenadhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen.....	35
4.2.8. Fixierung der Proben für advanced optical imaging (two-photon confocal laser scanning microscopy (TPLSM), stimulated emission depletion (STED)-Mikroskopie und structured illumination microscopy (SIM)).....	35
4.2.9. Beurteilung der Fibrinarten und Thrombozytenaktivierung durch TPLSM, STED und SIM.....	36
4.2.10. SDS- Polyacrylamid-Elektrophorese (PAGE), Silberfärbung und Immunoblotting.....	36
4.3. Statistik.....	37
5 Ergebnisse.....	38
5.1. Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen.....	38
5.1.1. Wirkung des GPVI-AK 5C4 auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Aktivierung.....	38
5.1.2. Wirkung des Syk-Inhibitor II auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Aktivierung.....	40
5.1.3. Wirkung des BTKi Ibrutinib auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Aktivierung.....	41
5.2. Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen.....	42
5.2.1. Vergleich zwischen Fibrinogen- und Fibrin-induzierter Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation.....	42
5.2.2. Die Rolle von GPVI, GPIb und des GPVI-Signalings durch Syk und Btk auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation (600/s).....	44
5.2.2.1. Wirkung des GPVI-AK 5C4 auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s).....	44
5.2.2.2. Wirkung des Syk-Inhibitor II auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s).....	45
5.2.2.3. Wirkung des GPIb-AK 6B4 auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s).....	46
5.2.2.4. Gemeinsame Wirkung von 5C4 kombiniert mit Syk-Inhibitor II, sowie 6B4 mit Syk-Inhibitor II auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s).....	47

5.2.2.5. Wirkung des BTKi Ibrutinib auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s).....	49
5.2.3. Die Rolle von GPVI, GPIb und des GPVI-Signalings durch Syk und Btk auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation (1265/s).....	49
5.2.3.1. Wirkung des GPVI-AK 5C4 auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s)	50
5.2.3.3. Wirkung des GPIb-AK 6B4 auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s)	52
5.2.3.4. Wirkung des BTKi Ibrutinib auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s).....	53
5.3. Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Bedingungen	54
5.3.1. Vergleich zwischen Fibrin und Plasmafibrin-induzierter Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation.....	54
5.3.2. Die Rolle von GPVI, GPIb und GPVI-Signaling durch Syk und Btk auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation (600/s).....	56
5.3.2.1. Wirkung des GPVI-AK 5C4 auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s)	56
5.3.2.2. Wirkung des Syk-Inhibitor II auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s)....	57
5.3.2.3. Wirkung des GPIb-AK 6B4 auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s)	58
5.3.2.4. Wirkung des BTKi Ibrutinib auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s)	59
5.3.3. Die Rolle von GPVI, GPIb und intrazellulärem GPVI-Signaling durch Syk und Btk auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation (1265/s)	60
5.3.3.1. Wirkung des GPVI-AK 5C4 auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s)	60
5.3.3.2. Wirkung des Syk-Inhibitor II auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s) ..	61
5.3.3.3. Wirkung des GPIb-AK 6B4 auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s)	62
5.3.3.4. Wirkung des BTKi Ibrutinib auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s) ...	63
5.4. Tissue-Factor (TF)-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen	63
5.4.1. Vergleich zwischen Fibrin, Plasmafibrin und TF-Fibrin induzierter Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation	64
5.4.2. Wirkung des GPVI-AK 5C4 auf die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung	65
5.4.3. Wirkung des Syk-Inhibitor II auf die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung.....	66
5.4.4. Wirkung des GPIb-AK 6B4 auf die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung	67
5.4.5 Wirkung des BTKi Ibrutinib auf die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung	68
5.5. Plasmafibrinnetz: Inkorporation von einer Vielzahl von Proteinen	69
5.6. <i>Structured illumination microscopy</i> (SIM) und <i>confocal laser scanning microscopy</i> von Fibrin und Thrombozyten.....	71
5.6.1. Vergleich des strukturellen Aufbaus der unterschiedlichen Fibrinarten	72
5.6.2. Vergleich der aktivierten Thrombozyten auf reinem Fibrin und Plasmafibrin.....	73
5.6.3. Albumin und Plasmafibrin.....	76
6 Diskussion	78
6.1. Die Rolle von GPVI bei der Thrombozytenaktivierung durch Fibrin, Plasmafibrin oder TF-Fibrin unter arteriellen Flussbedingungen	78
6.2. Die Rolle von GPVI bei der Thrombozytenaktivierung durch Fibrinogen unter arteriellen Flussbedingungen	81
6.3. Die Rolle von GPIb bei der Thrombozytenaktivierung durch Fibrin unter arteriellen Flussbedingungen	81
7 Zusammenfassung und Ausblick.....	83
8 Literaturverzeichnis.....	84
9 Abbildungsverzeichnis.....	97
10 Videoverzeichnis	99
11 Danksagung	100

1 Abkürzungsverzeichnis

mAK	Monoklonaler Antikörper
BSA	Bovine Serum albumin
Btk	Bruton-Tyrosinkinase
BTKi	Bruton-Tyrosinkinase-Inhibitor
Fc	„fragment cristallyzable“, Fc-Teil eines Antikörpers
Fg	Fibrinogen
GP	Glykoprotein
GPVI	Glykoprotein VI
GPIb	Glykoprotein Ib
HSA	Humanes Serum Albumin
mAK	Monoklonaler Antikörper
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphat-gepufferte Salzlösung
RT	Raumtemperatur
SD	Standard deviation
s	Sekunden
SIM	„structured illumination microscopy“, Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung
STED-Mikroskopie	„stimulated emission depletion“-Mikroskopie
Syk	Spleen Tyrosinkinase
TF	Tissue Factor
TPLSM	“two-photon laser scanning microscopy“, Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie
Tz	Thrombozyt
vWF	Von Willebrand-Faktor

2 Einleitung

2.1. Thrombozytenfunktion

Thrombozyten (Blutplättchen) sind kleine diskoide Blutzellen mit einem Durchmesser von 2-4 μm , die eine elementare Rolle in der Blutgerinnung spielen. Es befinden sich im Schnitt 150.000 – 400.000 Thrombozyten/ μl im Blut mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 10 Tagen bis zu ihrem Abbau in der Milz oder Leber. Sie entstehen aus kernlosen Abschnürungen aus Ausläufern der Megakaryozyten im Knochenmark und initiieren die primäre und sekundäre Hämostase (Blutgerinnung) im Körper. Dabei haften die Thrombozyten an verletztes Endothelgewebe der Blutgefäße sowie an Bestandteile der subendothelialen extrazellulären Matrix, v.a. Kollagen und VWF (sog. Thrombozytenadhäsion), wodurch sie aktiviert werden. Die aktivierten Blutplättchen rekrutieren daraufhin weitere Plättchen (sog. Thrombozytenaggregation), welche weiter gerinnungssteigernde Stoffe ausschütten. Die wichtigste Funktion der Thrombozyten ist neben der Unterbindung von Blutungen die Reparatur des verletzten Endothels. Diese schützenden Abläufe können bei chronisch oder akut geschädigtem Endothel wie bei der Atherosklerose allerdings auch nachteilig sein und Gefäßverschlüsse verursachen.^{1,2,3,4}

2.2. Ablauf der Thrombozytenaktivierung

Die Thrombozytenaktivierung nach arterieller Gefäßverletzung läuft in drei Phasen ab.

1. Thrombozytenadhäsion

Zunächst kommt es nach Verletzung des Endothels zum Freiliegen von extrazellulärer Matrix, u.a. Kollagen, Fibronectin und Laminin. Diese führen durch direkte Bindung an Thrombozyten-Rezeptoren zu deren Aktivierung.^{2,5} Der Mechanismus der spezifischen Thrombozytenaktivierung ist dabei stark Scherraten-abhängig.⁶ Unter hohen Scherraten ($> 1000/\text{s}$) zeigt vor allem der im Plasma vorhandene Von-Willebrand-Faktor (vWF) eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Thrombozyten durch die Herstellung einer Verbindung zwischen Kollagen und dem Glykoprotein (GP) Ib-IX-V Rezeptorkomplex auf den Thrombozyten.⁷ Repräsentative Szenarien, bei denen hohe Scherraten vorherrschen, sind u.a. vaskuläre Stenosen oder kleine Arteriolen. Nach Plaque-Ruptur/Erosion dockt zunächst löslicher vWF an freiliegendes Kollagen (v.a. Typ I und III) an und bindet anschließend in immobilisiertem Zustand mit seiner A1-Domäne mit hoher Affinität an den vWF-Rezeptor GPIIb α . Dabei kommt es zum sog. *tethering* (Rollen) und der primären Adhäsion der Thrombozyten an das verletzte Endothelgewebe.^{2,4} Im Weiteren können die Thrombozyten mit den beiden Haupt-Kollagen-Rezeptoren GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_2\beta_1$) und GPVI durch diesen ersten Kontakt eine feste Bindung mit dem subendothelialen Kollagen herstellen.⁸⁻¹⁰ Bei niedrigen Scherraten können Thrombozyten unabhängig von vWF direkt über die Kollagen-Rezeptoren an das Gewebe binden. Die Rolle von GPIIb und GPVI werden im Verlauf unter Kapitel 2.4.1. und 2.4.2. genauer

erläutert. Nach der Bindung von GPVI an Kollagen wird der Fibrin(ogen)-Rezeptor GPIIb/IIIa (Integrin α IIb β 3) aktiviert. Durch GPIIb/IIIa Interaktion mit Fibrinogen/Fibrin wird die Aggregation der Thrombozyten eingeleitet.

2. Thrombozytenaktivierung

Die direkte Interaktion mit der extrazellulären Matrix führt zur Aktivierung der Thrombozyten und läuft hauptsächlich über zwei intrazelluläre Signalwege ab: *Immunoreceptor tyrosine activation motif* (ITAM)-gekoppelte Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Abb. 1). Zu den ITAM-gekoppelten Rezeptoren gehört v.a. GPVI, der durch Tyrosin-Phosphorylierungen intrazellulär die Plättchen-Aktivierung auslöst und eine Ausschüttung von Adenosindiphosphate (ADP), Serotonin, Thromboxan A₂ (TXA₂) und prokoagulatorischen Stoffen aus den α -Granula bewirkt. ADP, TXA₂ und Thrombin aktivieren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und führen im Sinne eines *outside-in Signaling* zur weiteren Ausschüttung Thrombozyten-stimulierender Substanzen.^{11,12,13} TXA₂ wird aus Arachidonsäure von aktivierten Thrombozyten mithilfe der Cyclooxygenase gebildet und dockt nach dessen Sekretion an die Plättchen-Rezeptoren TP α and TP β an. Darauf wird intrazellulär die Phospholipase C (PLC) aktiviert, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inosit-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) umwandelt. IP₃ verursacht einen Anstieg der Calcium-Konzentration im Zytosol, während DAG die Proteinkinasen C-aktiviert. ADP bindet primär an zwei spezifische Plättchenrezeptoren, P₂Y₁ und P₂Y₁₂. Ersterer führt intrazellulär zu einem Anstieg von Calcium, und P₂Y₁₂ hemmt die Adenylatcyclase und reduziert die Bildung von cAMP. Hierdurch verstärkt der P₂Y₁₂-Rezeptor die Aktivierungsreaktion innerhalb des Thrombozyten.^{3,14} Aus diesem Grund werden im klinischen Alltag schon seit einigen Jahren z.B. bei akutem Koronarsyndrom P₂Y₁₂-Rezeptorblocker mit großem Erfolg eingesetzt.¹⁵ Thrombin entsteht am Ende der Gerinnungskaskade aus Prothrombin und bindet an die beiden G-Protein gekoppelten Thrombin-Rezeptoren PAR1 und PAR4. Durch PAR1 werden einige intrazelluläre Signalübertragungswege aktiviert: Über G₁₂ und G₁₃ werden Rho-GTPasen stimuliert, welche die Umstrukturierung des Zytoskeletts einleiten, während über G_q die Calciumkonzentration hoch- und über G_i die cAMP-Produktion herabreguliert wird. Thrombin agiert zum einen als stärkster Aktivator der Thrombozyten und bewirkt zum anderen die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Außerdem treibt es weitere Sekretion der Thrombozyten-stimulierenden Agonisten (ADP, TXA₂) an, welche wiederum eine positive Rückkopplungsreaktion auslösen. Außerdem wird der Thrombus durch die Aktivierung von Faktor XIII, sowie der Aktivierung von *activating thrombin activatable fibrinolysis inhibitor* (TAFI) stabilisiert.^{3,4,14,16–19}

Das gemeinsame Ziel der intrazellulären Abläufe durch Erhöhung der Calciumkonzentration und Herab-Regulation von cAMP in den Blutplättchen bei der Aktivierung ist vor allem die Umwandlung des GPIIb/IIIa-Rezeptors (Integrin α IIb β 3) in seine aktive Form (*inside-out signaling*). Sobald dieser letzte Schritt der Thrombozytenaktivierung erreicht ist, kann dieser nun an Fibrinogen und vWF binden und eine stabile Verbindung zwischen Thrombozyten herstellen.^{3,11,14,20,21}

Während der Adhäsion durchlaufen die Thrombozyten innerhalb kurzer Zeit einen Formwandel (*shape change*). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind äußerst komplex und werden hier nur angerissen. Das aus spezifischen Aktin, Tubulin, Spektrin and Filamin-Strukturen bestehende Zytoplasma direkt unter der Plasmamembran der Blutplättchen gibt dem Thrombozyten seine diskoide Form. Nach externen Stimuli kommt es zu einer Umlagerung des Zytoskeletts. Hierbei findet eine Umwandlung der scheibenförmigen Struktur der Plättchen in eine sphärische Form mit Entwicklung von Lamellipodien bzw. Filopodien, also Membranausstülpungen, durch Aktinfilamente statt. Ziel des *Shape Change* und des damit verbundenen *Spreadings* ist die ausreichende Abdeckung des verletzten Endothels mit Stoppen der Blutung und die Auslösung der Aggregation durch die Vernetzung mit weiteren Thrombozyten.^{22,23}

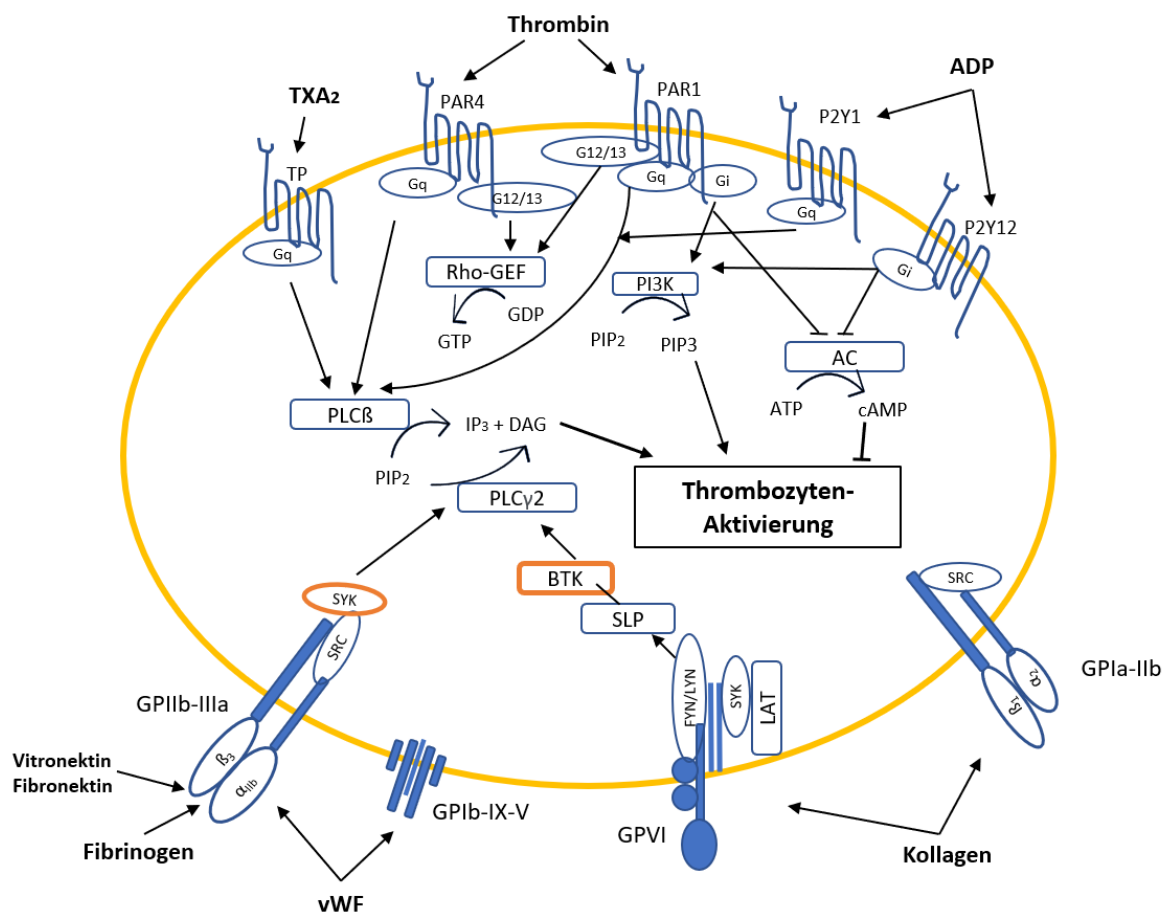


Abbildung 1: Schematische Darstellung der wichtigsten Thrombozyten-Rezeptoren und ihre intrazellulären Signalwege; modifiziert nach Stegner et al. 2011

Gq-Proteine: Phospholipase-C (PLC)-gekoppelte G-Proteine, Gi-Proteine: inhibitorische G-Proteine; Adenylatcyclase (AC), Inositoltrisphosphat (IP3), Diacylglycerol (DAG), Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2), Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3), Adenosintriphosphat (ATP), Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Adaptor Protein SLP-76 (SLP), Src-Tyrosinkinase, Syk-Tyrosinkinase, *T protein linker for activation of T cell* (LAT), Tyrosinkinasen Fyn and Lyn, *Rho-Guanine nucleotide-exchange factors* (Rho-GEF)

3. Thrombozytenaggregation

Die durch *Inside-out-Signaling*-induzierte Konformationsänderung des $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Rezeptors in den hochaffinen (*high-affinity*) Status bewirkt eine verstärkte Bindung des Integrinrezeptors an seine Liganden, v.a. Fibrinogen. Die elementare Rolle des $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Rezeptors zeigt sich an der sehr hohen Rezeptordichte mit ca. 60-80.000 Rezeptoren auf einem Thrombozyten inklusive der Reserven, die durch Sekretion aus alpha-Granula zusätzlich noch auf der Zellmembran exprimiert werden können. Fibrinogen dient bei der Aggregation als wichtiges Bindeglied zwischen benachbarten Thrombozyten. So führt die enge Vernetzung der Blutplättchen zur irreversiblen Aggregation und Thrombusbildung. Der GPIIb/IIIa-Rezeptor bindet neben Fibrinogen zusätzlich noch Fibrin und vWF.^{2,24,25,26} Bei hohen Scherraten wirkt auch vWF als Bindeglied zwischen den Blutplättchen. Weiterhin binden auch Fibronectin, und Vitronectin an GPIIb/IIIa und leisten einen Beitrag zur Aggregation.²⁷⁻²⁹ Nach Andocken der o.g. Liganden an den Rezeptor kommt es zu einer intrazellulären Signalübertragung (*outside-in signaling*), welche anschließend, wenn die Liganden immobilisiert sind, zur Thrombozytenadhäsion und Aggregation führt.³⁰

2.3. Atherosklerotisch-bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen (ASCVD)

Atherosklerose beschreibt eine Ansammlung von Fett und Entzündungszellen in der Intimaschicht der Gefäßzellen des arteriellen Stromgebietes. Ursache hierfür sind neben der schon länger bestehenden Hyperlipidämie und hämodynamischen Belastung auch die endotheliale Dysfunktion und die Hochregulation der Entzündungsreaktionen. Mit der Zeit entsteht eine sogenannte Plaque, welche solange wächst bis nur noch eine dünne Endothelschicht die Barriere zwischen Blutstrom und dem Lipidkern bildet.³¹⁻³⁴ Eine Ruptur oder ein einengendes Atherom führen folglich zu einem verminderten Blutfluss hinter der Stenose, wodurch es akut zu einem Abbruch des Blutflusses kommt oder chronisch zu einer Minderversorgung des betreffenden Endorgans führen kann.

Herz-Kreislauf-Erkrankungen (engl. ASCVD) gehören mit knapp 40% zu den führenden Todesursachen im Erwachsenenalter in der deutschen Bevölkerung. In den Formenkreis der atherosklerotisch-bedingten Erkrankungen gehören vor allem die koronare Herzerkrankung (KHK), der ischämische Schlaganfall oder die periphere arterielle Verschlusskrankung.³⁵ Die „Global Burden of Disease“-Studie 2015 zeigte, dass Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit geschätzt 423 Millionen Fällen und 18 Millionen Todesfällen weltweit auch global weiterhin die Liste der häufigsten Todesursachen mit anführen wird.³⁶

Durch atherosklerotische Veränderungen und Läsionen können Atherothrombosen entstehen, die entweder eine Minderperfusion oder eine Blockade des hinter der Stenose liegenden Organs auslösen. Es gibt zwei pathophysiologische Vorgänge, die jeder Komplikation zugrunde liegen: Plaque-Ruptur und Plaque-Erosion.

Oftmals bleibt bei ausgeprägten atherosklerotischen Plaques lediglich noch eine dünne fibröse Kappe (*fibrous cap*; $< 0,06 \mu\text{m}$) übrig, welche die einzige Barriere zum Lumen darstellt. Diese kann bereits bei geringen Stress-Stimuli rupturieren und somit extrazelluläre Matrix (EZM) freilegen, was eine rasche Thrombusbildung induziert. Physiologisch gesehen besitzen das Endothel eine Reihe von Schutzmechanismen, die in solchen Situationen die Thrombolysis aktivieren. Allerdings kann das geschädigte Endothel hier ihre Funktion nicht erfüllen. Unmittelbare Folge einer Plaque-Ruptur kann beispielsweise der ST-Hebungsinfarkt (STEMI) sein, bei der die betreffende Koronararterie komplett verlegt wird.^{31,37,38}

2.4. Pathophysiologie der Atherothrombose

Eine intakte Endothelschicht übt neben antithrombozytären und fibrinolytischen auch antikoagulatorische Funktionen aus und unterbindet zu jeder Zeit eine Thrombozytenadhäsion und -Aggregation. Das Endothel bildet nicht nur eine mechanische Barriere zwischen Blut und EZM, sondern hält durch Ausschüttung von inhibitorischen Signalmolekülen die Hämostase im Gleichgewicht. Dazu zählt unter anderem die Regulation des Gefäßtonus, der zellulären Adhäsion, sowie die Proliferation der glatten Muskelzellen und die Beherrschung der inflammatorischen Vorgänge. Dies erreicht das gesunde Endothel durch Ausschüttung von Prostacyclin, NO und der Aktivierung der Fibrinolyse mit Antithrombin und Plasmin. Weiter wird die Gerinnung durch das Thrombin-getriggerte Protein C/S-System gehemmt.^{39,40} All diese protektiven Faktoren sind bei der Atherosklerose deutlich eingeschränkt.

Nach Ruptur oder Erosion einer atherosklerotischen Plaque entstehen sogenannte Atherothrombosen. Dabei docken die Thrombozyten zunächst über die Interaktion des GPIb-Rezeptors mit vWF an das freiliegende Kollagen (v.a. Typ I, III und VI). Eine feste Adhäsion an Kollagen erfolgt anschließend über dessen thrombozytäre Rezeptoren GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) und GPVI.^{1,40,41} Als einer der wichtigsten Auslöser der Atherothrombose aktiviert vor allem der nun freiliegende *Tissue Factor* (TF) die plasmatische Gerinnung. Hierdurch entsteht am Ende der Gerinnungskaskade Thrombin, das nachfolgend Fibrinogen zu Fibrin umwandelt. Die Fibrinfasern werden anschließend durch Faktor XIII quer vernetzt, sodass am Ende ein durch Fibrin stabilisierter Thrombus die atherosklerotische Läsion bedeckt.⁴⁰⁻⁴⁴

Penz et al. ist es gelungen die Bildung eines arteriellen Atherothrombus näher zu beschreiben. Zunächst konnte die Gruppe nachweisen, dass GPVI einen zentralen Rezeptor in der Thrombozytenaktivierung durch Plaquematerial, v.a. durch sogenanntes *Binding* an Kollagen Typ I und III, darstellt.⁴⁵ Weiter konnte erstmalig ein sogenannter 2-Stufen-Mechanismus beschrieben werden, bei dem die Thrombozyten zunächst in einer ersten schnellen Phase durch GPVI vermittelt an das Kollagen der Plaques adhären und dort aggregieren. Die zweite Phase, die erst nach über 3 Minuten eintritt, beginnt mit der Bildung von Thrombin und Fibrin durch TF-Aktivierung.

Neben GPVI trägt auch der thrombozytäre GPIb-Rezeptor bedeutend zur Thrombusformation bei. Es werden bereits Inhibitoren der vWF/GPIb-Interaktion und ihre potenzielle Wirkung bei der Unterbindung atherothrombotischer Ereignisse untersucht.⁴⁶

Toschi und Kollegen zeigten erstmals, dass humane arterielle Plaques mit hohem TF-Anteil im lipidreichen Kern, deutlich thrombogener waren und verstärkt die Thrombozyten aktivierten.⁴⁷ Weiterführend untersuchten Badimon und Kollegen den Nutzen einer TF-Hemmung auf humanen atherosklerotischen Plaques. Unter Flussbedingungen konnte nach Einsatz von TF-Inhibitoren eine signifikante Reduktion der Thrombozytenadhäsion nachgewiesen werden.⁴⁰

Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen der Menge an TF im Plaque und dem Fibrin-Anteil in den Atherothrombosen hergestellt werden. So untersuchten Sato und Kollegen an Patienten, die an einem Herzinfarkt verstorben waren, die Atherothrombosen und die zugehörigen atherosklerotischen Plaques. Hierbei zeigte sich, dass TF-reiche Plaques bevorzugt rupturieren und vor allem Fibrin-reiche Atherothrombosen generieren.⁴⁸

In der letzten Dekade ist außerdem vor allem ein weiterer Faktor für die Entstehung der Atherosklerose/-Thrombose in den Fokus gerückt: Inflammation.⁴⁹ Es konnte in einer Reihe von Experimenten gezeigt werden, dass bestimmte T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems in atherosklerotischen Plaques nachzuweisen waren und den Vorgang beschleunigten. Dies zeigte sich vor allem auch bei Rauchern, sowie Patienten mit chronischen Erkrankungen.⁵⁰⁻⁵²

Ein weiterer interessanter Aspekt ist der mögliche direkte Einfluss von Thrombozyten selbst bei der Entstehung von atherosklerotischen Läsionen.^{1,53} So wurde in Mausmodellen nachgewiesen, dass eine Hemmung der Thrombozyten mit ASS (Inhibierung der Cyclooxygenase COX) die Bildung von atherosklerotischen Plaques deutlich reduziert.⁵⁴ Massberg et al. konnten ebenfalls im Mausmodell zeigen, dass Thrombozyten häufig schon vor Auftreten einer atherosklerotischen Läsion an das Endothel adhären. Eine Plättchenhemmung verringerte auch hier die Bildung von Atherosklerose.⁵⁵

Im kommenden Abschnitt werden die für die Entstehung der Atherothrombose wichtigen Plättchen-Rezeptoren GPIb und GPVI und ihre Interaktion mit Fibrin genauer beleuchtet.

2.4.1. Rolle von GPIb

Die Hauptaufgabe des thrombozytären Rezeptorkomplexes GPIb-IX-V ist die Initiierung der primären Hämostase durch die Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßläsion. Dies geschieht durch die enge Interaktion von subendotheliale vWF mit dem Komplex aus insgesamt 4 unterschiedlichen transmembranen Polypeptiden: GPIb α , GPIb β , GPV und GPIX.⁵⁶⁻⁵⁹ Die Bindung an den Rezeptorkomplex erfolgt primär über die A1-Domäne von vWF an das extrazelluläre N-terminale Ende von GPIb α .⁶⁰ Neben vWF bindet der Rezeptorkomplex zusätzlich noch Thrombin, Faktor XI und XII, P-Selectin und MAC 1.^{59,60} Die vWF-Rezeptorbindung ist besonders effizient bei sehr hohen Scherraten (>6000/s, z.B. bei atherosklerotischen Stenosen).^{6,60} Aufgrund dieser

wichtigen Eigenschaft werden Arzneimittel erforscht, welche die Interaktion zwischen vWF und GPIb α unterbinden und so Atherothrombosen verhindern sollen.⁴⁶ Untersuchungen in Hundemodellen zeigten bereits eine gute Inhibition der Thrombusformation bei arteriellen Stenosen ohne erhebliche Verlängerung der Blutungszeit.⁶¹ Nach Bindung von vWF an GPIb durchläuft der Fibrinogenrezeptor α IIb β 3 eine Konformationsänderung in seine aktive Form, indem der Rezeptorkomplex direkt Signale nach intrazellulär weiterleitet und durch das *outside-In-Signaling* den Rezeptor α IIb β 3 aktiviert. Inzwischen gibt es Daten, die zeigen, dass GPIb-IX-V als Signalrezeptor unter anderem über einen Anstieg von intrazellulärem Kalzium und Aktivierung von Src-Kinasen und PI3-Kinasen und PKC das Integrin α IIb β 3 aktivieren kann.^{57,62–65} Weiter konnte eine wichtige Rolle der FcR γ -Kette und des Fc γ RIIA-Rezeptor in der Thrombozytenaktivierung durch GPIb gezeigt werden. Nach GPIb-Aktivierung bilden Src und Lyn einen Komplex mit der FcR γ -Kette und aktivieren durch Phosphorylierung von Syk und LAT die Phospholipase Cy2 (PLC γ 2).^{10,66} Für den thrombozytären Fc γ RIIA-Rezeptor wurde eine Co-Lokalisation zu GPIb gezeigt.⁶⁷ Auch hier wird nach GPIb-Stimulation und anschließende Src-Aktivierung der Fc γ RIIA-Rezeptor phosphoryliert, ohne dass vWF direkt an den Fc γ RIIA-Rezeptor bindet. In der Folge wird von intrazellulär über Syk-Kinasen und PLC γ 2 Integrin α IIb β 3 aktiviert.^{10,57,66,68,69}

2.4.2. Rolle von GPVI

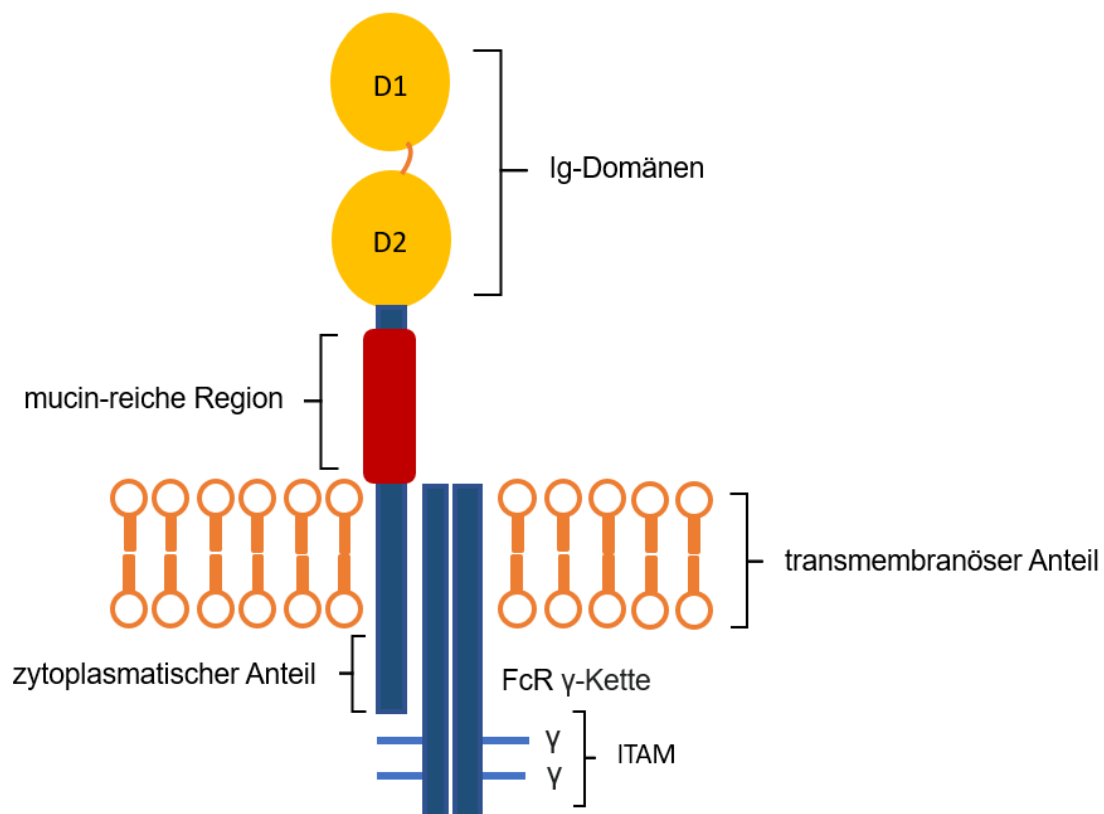


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines monomeren GPVI; modifiziert nach Nieswandt et al. 2003

immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)

GPVI wurde erstmalig von Moroi und Kollegen als Kollagenrezeptor auf Thrombozyten beschrieben. Aufgefallen war eine Patientin mit erhöhter Blutungsneigung mit sonst normalen Gerinnungsparametern. Weitere Untersuchungen zeigten, dass der Membranrezeptor GPVI fehlte.⁷⁰ Neben dem GPIIb/IIIa ($\alpha 2\beta 1$ -Integrin) stellte sich GPVI als weiterer Hauptrezeptor für Kollagen dar. Während $\alpha 2\beta 1$ vor allem die Thrombozytenadhäsion unterstützt, spielt GPVI vor allem in der Signalübertragung und Thrombozytenaktivierung eine wichtige Rolle.^{71,72} GPVI ist ein 60-65 kDa großes Glykoprotein, das lediglich auf Thrombozyten und Megakaryozyten vorkommt und der Familie der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie angehört.⁷³⁻⁷⁵ Schulz und Kollegen konnten zeigen, dass GPVI-Fc vor allem an Kollagen Typ III im nekrotischen Kern einer atherosklerotischen Läsion bindet und sehr wahrscheinlich auch eine nicht unerhebliche Rolle bei der Bildung einer Atherothrombose spielt.⁷⁶ Weitere GPVI-Rezeptorliganden sind u.a. Laminin, Fibronektin, Vitronektin, Adiponektin und das Oberflächenprotein EMMPRIN (CD147, *extracellular matrix metalloproteinase inducer*).⁷⁷⁻⁸¹ 2015 wurde erstmalig von Mammadova-Bach sowie Alshehri und Kollegen eine Interaktion von GPVI mit Fibrin beschrieben. Eine nähere Betrachtung und Analyse dieses neu entdeckten Fibrin/Fibrinogen-GPVI Zusammenspiels erfolgt in Kapitel 2.4.3.^{82,83}

GPVI wird an der Zelloberfläche von Thrombozyten exprimiert und bildet einen Komplex mit FcR γ -Ketten. Ein monomerer Rezeptorkomplex besteht aus einem GPVI-Molekül und zwei FcR Ketten (Abb. 3). Dabei gehen diese eine nicht-kovalente Bindung ein, indem eine Arginin-Aminosäure des transmembranen GPVI Anteils an eine Aspartat-Aminosäure der FcR γ -Kette bindet.^{84,85} GPVI kommt auf der Thrombozytenoberfläche sowohl als Monomere, als auch als Dimere vor, wobei eine effiziente Bindung an Kollagen vor allem gezeigt werden konnte, wenn GPVI-Rezeptoren in vermehrter Anzahl an der Zelloberfläche exprimiert waren und als Dimere vorlagen. GPVI-Monomere zeigten lediglich eine geringe Affinität zu Kollagen, während GPVI-Rezeptoren nach Zusammenlagerung zu Dimeren eine deutlich erhöhte Affinität zu Kollagen zeigen. Nach Adhäsion an Kollagen lagerten sich weiterhin die GPVI-Dimere zu sogenannten *Clustern* zusammen, wodurch eine gesteigerte Affinität zu Kollagen und stark erhöhte Aktivierung der Thrombozyten verursacht wurde.⁸⁶⁻⁹⁰

Die FcR γ -Ketten besitzen an ihrem zytosolischen Ende jeweils ein *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM), welches durch die Src-Kinasen Fyn und Lyn phosphoryliert wird. Hierdurch wird die Tandem SH2 Domäne der Tyrosinkinase Syk aktiviert, welche anschließend *downstream* die Adaptor-Proteine SLP-76 und LAT phosphoryliert und in ein Signalosom rekrutiert. Am Ende der Signalkaskade wird PLC γ 2 aktiviert, was eine zytosolische Kalziumerhöhung, sowie eine vermehrte Expression von aktiven GPIIb/IIIa-Rezeptoren bewirkt (Abb. 2).^{57,70,74,84} Dass die oben beschriebene Reaktion GPVI-abhängig stattfindet, wurde mithilfe von Experimenten nachgewiesen, die zeigten, dass eine Syk-Phosphorylierung oder PLC γ 2 Aktivierung bei GPVI-defizienten Thrombozyten nicht abläuft.⁹¹ Ebenso konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von Syk oder PLC γ 2 zu einer abgeschwächten Thrombozytenaktivierung durch Kollagen führt.^{92,93}

Insgesamt ist GPVI ein zentral wichtiger Rezeptor für die Adhäsion an Kollagen und Plättchenaktivierung durch Kollagen. Ex vivo zeigten Penz und Kollegen eine GPVI-abhängige Thrombusbildung auf humanen atherosklerotische Plaques.⁴⁵ Weiter konnten Massberg und

Kollegen in vivo zeigen, dass GPVI entscheidend bei der arteriellen Thrombusbildung nach Gefäßverletzung durch seine Bindung an Kollagen beteiligt ist.⁹⁴ Klinisch äußert sich eine GPVI-Defizienz allerdings nur in einer moderaten Blutungsneigung.^{70,95,96}

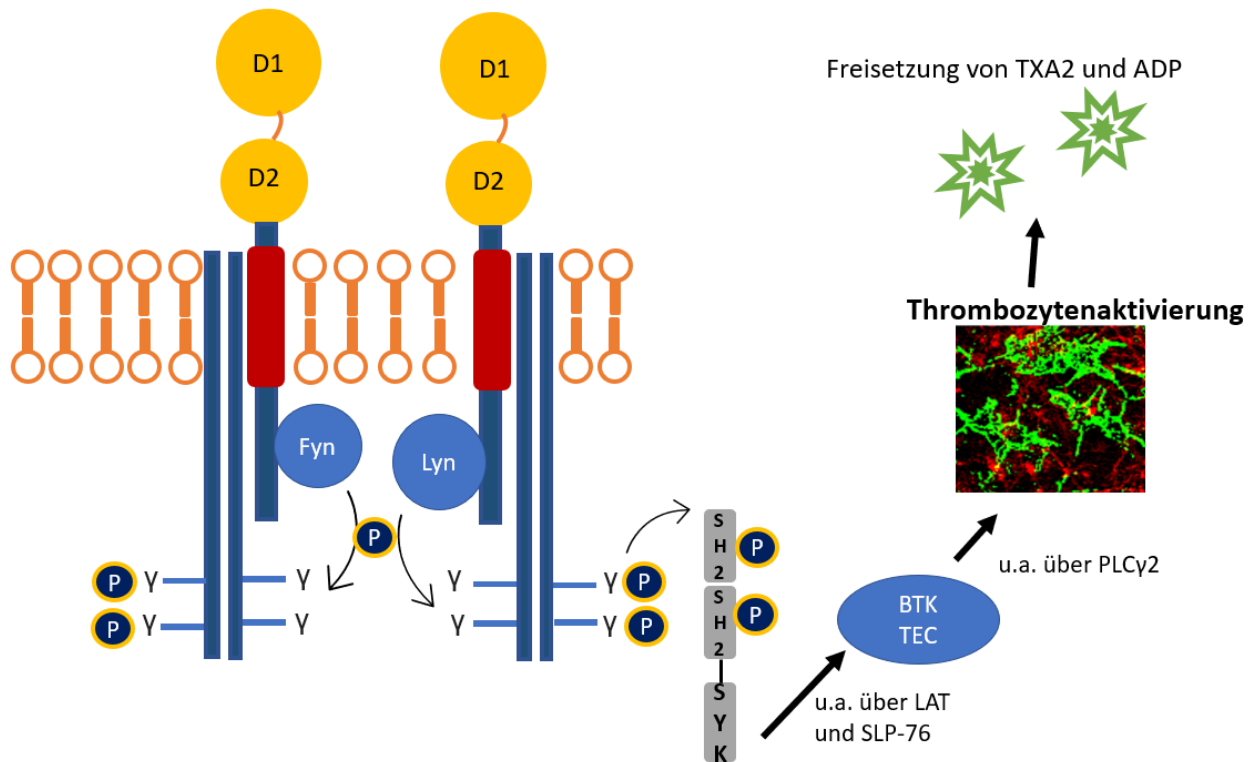


Abbildung 3: Schematische Darstellung des GPVI-Dimers und der intrazellulären Signalwege bis zur Thrombozytenaktivierung (vereinfachte Darstellung); modifiziert nach Nieswandt et al. 2003

Tyrosinkinasen: Fyn, Lyn, TEC, Bruton-Tyrosinkinase (Btk); Adaptor Protein SLP-76 (SLP), *T protein linker for activation of T cell* (LAT), Phospholipase-Cy2 (PLCy2)

Relevanz von GPVI im klinischen Setting

Einige Daten zeigen bereits eine potenzielle klinische Bedeutung von GPVI. So wurde bei übergewichtigen Patienten eine vermehrte Expression des thrombozytären GPVI in aktiver Form, sowie eine verstärkte Plättchen Aggregation nach GPVI-Aktivierung beschrieben. Dieses Phänomen scheint positiv mit dem Body Mass Index (BMI) zu korrelieren.⁹⁷ Auch bei Diabetes-Patienten wurde eine erhöhte GPVI-Plättchen Reaktivität beschrieben, welche in Verbindung mit kardiovaskulären Komplikationen gebracht wurde.⁹⁸ Bigalke und Kollegen demonstrierten, dass bei Patienten mit ACS die Expression von thrombozytärem GPVI erhöht und mit deutlich schlechterer klinischer Prognose assoziiert ist.^{99–101} Des Weiteren zeigen Daten von Al-Tamimi, als auch Smith und Kollegen, dass lösliches GPVI (sGPVI) in Schlaganfall- und ACS-Patienten im Plasma wesentlich erhöht ist.^{102,103}

2.4.3. Fibrinogen und Fibrin

Fibrinogen ist ein Glykoprotein-Hexamer (340kDa), welches aus 2 $\text{A}\alpha$ -, $\text{B}\beta$ - und γ -Untereinheiten aufgebaut ist. Man teilt das Fibrinogen-Molekül in die zwei äußeren Domänen D und das Zentrum E ein (Abb. 4). Es wird in der Leber synthetisiert und wird als Akute-Phase-Protein in Entzündungssituationen vermehrt gebildet. Die normale Plasmakonzentration von Fibrinogen beträgt im Durchschnitt 200–400 mg/dl mit einer Halbwertszeit von ca. 4 Tagen.^{104–108} Am Ende der Gerinnungskaskade wird Fibrinogen durch eine Thrombin-abhängige Proteolyse zu Fibrin umgewandelt.

Tissue Factor (TF), auch Faktor III oder Gewebethromboplastin genannt, befindet sich bei intakter Gefäßwand im Subendothelium und ist der wichtigste Aktivator der extrinsischen Hämostase und ein Ko-Faktor von Faktor VII. Erst bei Schädigung der Endothelbarriere wird TF freigelegt und formt einen Komplex mit Faktor VII, um am Ende der extrinsischen Gerinnungskaskade Thrombin zu generieren, das Fibrinogen zu Fibrin aktiviert.^{42,109–112}

Die Bildung von Fibrin geschieht durch Abspaltung von sogenannten Fibrinpeptiden (FpA; FpB, Abb.4) vom N-Terminus der $\text{A}\alpha$ -Ketten und $\text{B}\beta$ -Ketten, wodurch Bindungsstellen frei werden (*knobs*, Domäne E). An diese lagern sich anschließenden die Gegenspieler eines anderen Fibrinogens (*holes*, Domäne D). Durch weitere Elongation und *Branching* entsteht im Verlauf ein Netz aus Fibrinfasern (Abb. 5). Nach einem initialen longitudinalen Wachstum kommt es im Verlauf zu einem lateralen Zuwachs.^{104–106,113} Durch die Plasma Transglutaminase Faktor XIII wird das Fibrinnetz stabilisiert. Dieser Vorgang wird als *Crosslinking* beschrieben. Dabei werden die C-Termini der γ -Untereinheiten mithilfe von aktivierten Faktor XIII kovalent miteinander verbunden (sog. γ -Dimer). Etwas verzögert treten auch α -Ketten und α - γ -Ketten *Crosslinking* Reaktionen auf.^{104–106,114,115} Durch das *Crosslinking* wird das Fibrinnetz nicht nur stabilisiert, sondern auch vor Lyse und mechanischem Stress geschützt.¹¹⁶ Die Stabilität des Fibrinnetzes beschreibt die Widerstandsfähigkeit des *Clots* gegenüber mechanischem Stress und Fibrinolyse. Diese ist stark von äußeren Faktoren abhängig: Zum einen beeinflussen verschiedene genetische Polymorphismen von Fibrinogen, Plasmakonzentration von Fibrinogen und genetische Fibrinogen-Variationen die Zusammensetzung eines Fibrinclots. Zum anderen zeigen FXIII-Polymorphismen und andere Faktoren, wie Thrombin-Aktivität, Blutfluss, pH-Wert, EZM oder Medikamente Auswirkung auf die Netzstruktur.^{107,117–121} Die Netzstruktur selbst beeinflusst wiederum das Ausmaß der Fibrinolyse. Je nach Aufbau und die Kompaktheit des Netzes wird ein Andocken von fibrinolytischen Substanzen erleichtert oder verhindert. So werden dünne und engmaschige Netze weniger und Netze mit dicken Fibrinfasern und größeren Zwischenräumen vermehrt lysiert.^{122–124} Einen weiteren wichtigen Einfluss haben Plasmaproteine auf die Eigenschaften des Fibrinnetzes.^{125,126} So zeigten Nikoljassen und Kollegen, dass Faktor XIII neben der Stabilisierung des Fibrinnetzes zusätzlich einige Plasmaproteine mit Fibrin kovalent quervernetzen kann.¹²⁷ Neben der durch Faktor XIII quervernetzen Plasmaproteine gibt es auch eine Reihe von Proteinen, die nicht kovalent an Fibrin binden und die Netzeigenschaften mitbeeinflussen.^{128,129} Durch den Einfluss dieser Plasmaproteine unterscheiden sich die Netzeigenschaften zu künstlich hergestelltem Fibrin.

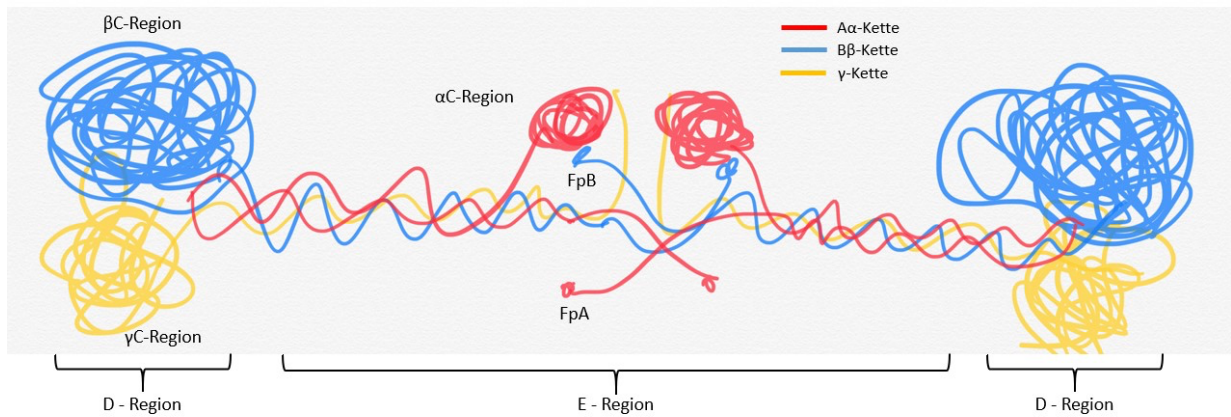


Abbildung 4: schematischer Aufbau von Fibrinogen; modifiziert nach Köhler et al. 2015

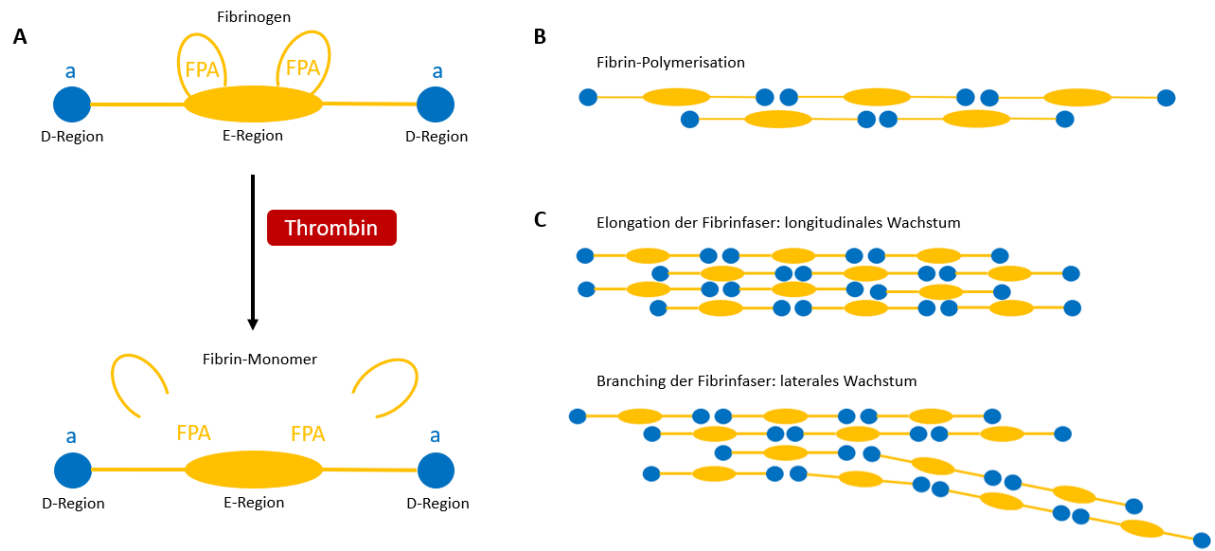


Abbildung 5: vereinfachte schematische Darstellung der Fibrinbildung

A Durch Abspaltung von Fibrinpeptid A (FPA) entsteht ein Fibrinmonomer und ermöglicht die Fibrin-Polymerisation **B** Domäne E und D legen sich zu Fibrin zusammen. **C** Wachstum der Fibrinfaser durch Elongation (oben) und Branching (unten); modifiziert nach U of U Mathematical Biology Gels Group

Fibrinogen und Fibrin sind nicht nur in der physiologischen Gerinnung von Bedeutung, sondern sind bei der Entwicklung von Atherothrombosen entscheidend beteiligt.^{130–135}

So repräsentiert eine erhöhte Fibrinogen-Konzentration im Serum einen nachgewiesenen Risikofaktor für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen.^{136–138}

Es konnte zudem im Rahmen der PLOT-Studie gezeigt werden, dass ACS-Patienten mit vermehrt Fibrinolyse-resistenten Fibrin Clots einem weitaus höheren Risiko eines schlechten klinischen Verlaufs ausgesetzt waren.¹³⁹ Des Weiteren zeigten Wohlberg sowie Undas und Kollegen, dass eine veränderte Zusammensetzung des Fibrinnetzes ebenso ein erhöhtes Thromboserisiko darstellt.^{140–142}

Neben der erhöhten Fibrinogen-Konzentration und der veränderten *Clot*-Struktur von Fibrin, kann Fibrin eine Atherothrombose auch lokal durch vermehrte Plaquebildung verstärken.^{143–146}

Lorenzet und Kollegen konnten in Plaques verschiedene Fibrinarten und deren Degradationsprodukte nachweisen. Dass Fibrin möglicherweise kausal bei der Entstehung von Plaques mitwirkt, wurde durch eine Fibrinabbauprodukt-verstärkte Proliferation von glatten Muskelzellen, sowie einer Sekretion von Wachstumsfaktoren in den Endothelzellen gezeigt.^{147,148} Tavora und Kollegen zeigten immunhistochemisch eine erhöhte Fibrinablagerung im nekrotischen Kern von fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques.¹⁴⁹

Um Fibrin und dessen Wirkungen auf Thrombozyten unter experimentellen Bedingungen zu untersuchen, gibt es verschiedene Arten und Weisen der Herstellung. Dabei entstehen Fibrinnetze mit unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften. So ist das aus aufgereinigtem Fibrinogen hergestellte Fibrin, das „reine Fibrin“ (hier immer bezeichnet als **Fibrin**), ein anderes Fibrin als das in Plasma hergestellte Fibrin (hier immer bezeichnet als **Plasma-Fibrin**). Das aus TF im fließenden Blut gebildete Fibrin (**TF-Fibrin**) stellt die physiologischste Form dar. Die Herstellung wird unten im Kapitel zu den Methoden näher beschrieben.

2.4.4. Interaktion von Fibrin und Fibrinogen mit GPVI

Erstmals wurde durch Mammadova-Bach und Kollegen GPVI als Fibrin-Rezeptor beschrieben. Durch den Einsatz von anti-GPVI-Antikörper 9O12 wurde eine stark verminderte Thrombozytenadhäsion auf polymerisiertem Fibrin gezeigt. Mithilfe von Bindungs-Assays konnte die Gruppe eine Bindung von GPVI an Fibrin zeigen. Zudem wurde unter Flussbedingungen durch GPVI-Fab-AK 9O12 eine verminderte Thrombozytenadhäsion auf Fibrin nachgewiesen.⁸² Weiter konnten auch Alshehri und Kollegen GPVI als Fibrinrezeptor identifizieren. Mittels ELISA konnte eine Bindung nicht nur an polymerisiertes Fibrin, sondern auch an monomeres Fibrin nachgewiesen werden. Ebenso zeigten Experimente eine Fibrin-induzierte Vermehrung der FcR γ -Ketten und gesteigerte Syk-Phosphorylierung durch GPVI, unabhängig vom Integrin α IIb β 3. Zusätzlich wurde gezeigt, dass GPVI-defiziente Mäuse nach FeCl₃-induzierter Endothelläsion an mesenterischen Arteriolen in vivo eine deutlich verlängerte Thrombusbildungszeit und eine Verzögerung bei der Initiierung der Thrombozytenadhäsion aufwiesen. Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche Rolle von GPVI bei der Thrombusbildung hin, die über eine GPVI-Fibrin-Interaktion erfolgen könnte.^{83,150} Weiter konnten Mangin und Kollegen in vitro immobilisiertes Fibrinogen als weiteren GPVI-Aktivator humaner Thrombozyten ausmachen. Murines GPVI konnte hingegen nicht durch Fibrinogen aktiviert werden.⁹⁶ Mangin und Kollegen zogen daher die Schlussfolgerung, dass GPVI als Fibrinogenrezeptor durch positive Feedback Reaktionen eine elementare Rolle in der Entstehung von Atherothrombosen spielt.

Wie bereits beschrieben liegt GPVI in monomerer und dimerer Form vor, dabei bindet letztere mit wesentlich höherer Affinität an Kollagen.^{88,89} Bezüglich der Affinität zu Fibrin gibt es widersprüchliche Daten. Onselaer und Kollegen zeigten, dass Fibrin und eines seiner Spaltprodukte, das D-Dimer, vor allem an monomeres GPVI binden.¹⁵¹ Allerdings konnten Induruwa und Kollegen lediglich eine Fibrin

Bindung an dimeres GPVI nachweisen, während Ebrahim und Kollegen durch spezifische Bindungsassays keinerlei Bindung von rekombinanten dimerem GPVI (Revacept) an Fibrin zeigen konnten.^{152,153} Diese Unterschiede wurden in einer Stellungnahme von Slater und Kollegen in einem Übersichtsartikel adressiert.¹⁵⁴

Eine Untersuchung von verschiedenen Fibrinarten bezüglich der GPVI-Interaktion und Auswirkung auf die Thrombozytenaktivierung wurde in den oben genannten Studien nicht durchgeführt. In allen Studien (außer in der Studie von Ebrahim und Kollegen) wurde ausschließlich aus aufgereinigtem Fibrinogen hergestelltes Fibrin verwendet.¹⁵³

2.5. GPVI-Inhibitoren

In den letzten Jahren ist die Gruppe der GPVI-Inhibitoren als attraktive neue antithrombozytäre Substanz in den Fokus gerückt. Herkömmliche Plättchenhemmer haben sich als wirksam in der Prävention und Therapie von kardiovaskulären Ereignissen bewährt. Allerdings ging der Erfolg mit einem deutlich erhöhten Blutungsrisiko einher. Vorteile einer GPVI-Hemmung sind die exklusive GPVI-Expression auf Thrombozyten und Megakaryozyten und die erhaltene primäre Hämostase ohne wesentlich gesteigertes Blutungsrisiko bei GPVI-Hemmung und GPVI-Defizienz.^{155–160}

Es gibt verschiedene Strategien, um GPVI zu hemmen. Eine Gruppe stellen die sogenannten löslichen GPVI-*Mimics* dar, die aus zwei extrazellulären Domänen von GPVI bestehen und an eine Fc-Domäne eines humanen IgG gebunden sind. Durch eine verstärkte Bindung der GPVI-*Mimics* an Kollagen wird ein Andocken durch thrombozytäres GPVI blockiert.^{155,161} Eine weitere Gruppe stellen die anti-GPVI-Antikörper dar, welche direkt gegen GPVI gerichtet sind und die Bindung an Kollagen verhindern (sog. inhibitorische AK). Vertreter der inhibitorischen anti-GPVI Antikörper 5C4, OM2, OM4 und 9O12 zeigten einen hemmenden Effekt der Kollagen-GPVI Bindung in vitro und in vivo, ohne die Blutungszeit zu verlängern.^{161–164} Für die Versuche in dieser Arbeit wurde 5C4 als anti-GPVI-AK eingesetzt. 5C4 ist ein Fab-Fragment eines monoklonalen Ratten-IgGs und bindet an D1 und die Verbindungsstruktur zu D2 von GPVI.¹⁶⁵

Klinisch wurden bereits zwei Vertreter der GPVI-Inhibitoren in Phase I Studien untersucht: ACT017 und Revacept.^{166–168} ACT017 ist ein gegen GPVI-gerichteter Antikörper, der präklinisch eine vielversprechende antithrombozytäre Wirkung zeigte.¹⁶⁹ Revacept, ein dimerisches GPVI-Fusionprotein, bindet an Kollagen und hemmt somit die GPVI-Bindung der Thrombozyten an Kollagen in Plaques.¹⁶¹ Beide GPVI-Inhibitoren zeigten jeweils in Phase-I-Studien bereits ein gutes Sicherheits- und Verträglichkeitsprofil.^{166–168}

2.6. Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI)

Tyrosinkinasen sind wichtige Enzyme, die intrazelluläre Signale aufnehmen und weitergeben, und die Zellfunktion auf und ab regulieren können. Bekannte Vertreter der Tyrosinkinase-Familie sind z.B. die *Src family kinases* (SFK), sowie Syk and Btk. Durch ihre bedeutende Rolle in der Zellaktivierung besteht die Möglichkeit durch Hemmung der Tyrosinkinasen diese herabzuregulieren.¹⁷⁰ Entdeckt und bereits erfolgreich eingesetzt wird diese Art von Therapie in der Hämatologie und Onkologie. Tyrosinkinase-Inhibitoren sind meist oral zu verabreichende Tabletten, welche gezielt das intrazelluläre *Signaling* unterbinden und im Rahmen von Tumorerkrankungen lebenswichtige Signalketten des Zellwachstums oder des Metabolismus hemmen.^{171,172} Auffallend waren in den durchgeführten klinischen Studien ein gehäuftes Auftreten von Blutungsereignissen bei Patienten nach TKI-Behandlung. Tyrosinkinasen regulieren nicht nur intrazellulär in Tumorzellen deren Wachstum, sondern beeinflussen auch in vielen anderen Zellen, so auch den Thrombozyten, die Zellaktivierung. Der onkologische Einsatz von TKIs geht daher häufig mit einem sogenannten *off-target* Effekt durch Hemmung der Tyrosinkinasen in gesunden Zellen einher. Aus diesem *off-target*

Effekt mit Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion ergibt sich gleichzeitig eine Perspektive auf einen möglichen therapeutischen Ansatz einer antithrombozytären Therapie.^{173–176}

Als ITAM-gekoppelter Rezeptor bietet GPVI im Ablauf der intrazellulären Signalkaskade mehrfache Angriffspunkte für Tyrosinkinaseinhibitoren (s.o.).¹¹ So wurden in den letzten Jahren auch Tyrosinkinaseinhibitoren als potenzielle Plättchenhemmer vermehrt untersucht.^{177–179}

Bruton-Tyrosinkinase-Inhibitoren (BTKi)

Btk wird primär in B-Lymphozyten exprimiert und gehört zu der Familie der TEC-Kinasen. Btk spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Reifung der B-Zellen, sowie bei der Proliferation von B-Zell-Malignomen. Aus diesem Grund wurden initial Btk-Hemmer für die Tumorthherapie entwickelt.¹⁸⁰ So wird der irreversible BTKi Ibrutinib in der klinischen Praxis bereits in der Standardtherapie von Mantelzelllymphomen und Chronischer Lymphatischer Leukämie eingesetzt. Dabei wurden beim Einsatz von Ibrutinib vermehrt Blutungen festgestellt. Vermutet wurde eine mögliche Hemmung von Btk *downstream* vom GPVI.¹⁸¹ Zahlreiche Arbeiten konnten zeigen, dass die GPVI-abhängige Thrombozytenadhäsion und -aggregation durch Ibrutinib signifikant reduziert wurde.^{178,179} Weiterhin wurde auch eine Rolle von Btk in der vWF/GPIIb-Interaktion nachgewiesen.^{182,183} Ex vivo konnte durch Busygina und Kollegen eine Hemmung der Thrombusbildung auf atherosklerotischen Plaques durch Ibrutinib festgestellt werden. Diese Eigenschaft erweitert die therapeutische Bandbreite von Ibrutinib zusätzlich zu der antineoplastischen Wirkung auch als potenzieller und Atherothrombose-spezifische Plättchenhemmer.^{179,184}

Syk (Spleen Tyrosinkinase)-Inhibitoren

Als zentrales Mitglied der Signalkette *downstream* von GPVI leitet Syk die Aktivierung des Thrombozyten durch Phosphorylierung der Phospholipase Cy2 und darauf folgendem Kalziumanstieg ein.^{11,91,177,185} Auch hier gibt es seit einiger Zeit ein Interesse an einer möglichen plättchenhemmenden Wirkung durch Syk-Inhibitoren.¹⁸⁶ Verschiedene Syk-Inhibitoren wurden ex vivo und in Mausmodellen experimentell eingesetzt und auf ihre antithrombozytäre Wirkung untersucht. Van Eeuwijk und Kollegen zeigte in Mausmodellen in vivo, dass der Einsatz von Syk-Inhibitoren zu einer signifikanten Reduktion des ischämischen Schlaganfalls und Gehirnfarktareas, sowie verbesserten neurologischen und motorischen Ergebnissen führte.¹⁸⁷

3 Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation

Der Kollagenrezeptor GPVI hat sich in den letzten Jahren als interessante Zielstruktur für eine mögliche therapeutische Thrombozytenhemmung hervorgetan. Vor allem die selektive Expression auf Thrombozyten und Megakaryozyten, sowie der Aspekt einer erhaltenen physiologischen Hämostase nach GPVI-Inhibition stellen eine sehr attraktive Grundlage dafür.

Erstmals wurde eine Bindung von GPVI an Fibrin von zwei Arbeitsgruppen im Jahr 2015 beschrieben. Weitere Arbeitsgruppen konnten darauffolgend zudem Bindungen von GPVI an Fibrinogen und Spaltprodukte aus Fibrin zeigen. Bei einer möglichen „Doppel-Bindung“ an Kollagen und Fibrin würde eine GPVI-Hemmung bei einer akuten Atherothrombose in der Unterdrückung nicht nur der initialen Plättchenaktivierung durch Plaque-Kollagen, sondern auch der Plättchenaktivierung durch Fibrin, gebildet durch Plaque-TF, resultieren.^{82,83,96,152,154}

Allerdings konnte in einer Studie einer anderen Arbeitsgruppe keinerlei Bindung von rekombinanten dimeren GPVI-Fc Fusionsproteinen an Fibrin nachgewiesen werden. Hierbei wurden zudem unterschiedliche Arten von Fibrin untersucht.

Um die Rolle des GPVI-Rezeptors als Fibrin/Fibrinogen-Rezeptor näher zu beschreiben wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Welche Wirkung haben die unterschiedlichen Fibrinarten (Fibrin, Plasmafibrin, TF-Fibrin) auf die Thrombozytenaktivierung? Welchen Einfluss nehmen dabei verschiedene Scherraten auf die Fibrin/Fg-Thrombozyten-Interaktion?
2. Welche Wirkung hat der GPVI-AK 5C4 auf die Thrombozytenadhäsion und -Aggregation auf den unterschiedlichen Fibrinarten und unter unterschiedlichen Scherraten?
3. Welche Rolle spielt GPIIb bei der Plättchen-Aggregation auf Fibrin und kann diese durch den GPIIb AK 6B4 beeinflusst werden?
4. Welche Wirkung haben Btk- und Syk-Inhibitoren, welche das GPV-*signaling* hemmen, auf die Thrombozytenaktivierung auf den unterschiedlichen Fibrinarten und bei unterschiedlichen Scherraten?
5. Welchen Einfluss haben Plasmaproteine im Fibrinnetz bei der Thrombozytenaktivierung?

Das Ziel dieser Arbeit ist die Beantwortung der oben gestellten Fragen und letztlich die Erhebung eines Vergleiches der verschiedenen Fibrinarten (Fibrin, Plasmafibrin, TF-Fibrin) für die Rolle von GPVI und dessen Signalübertragung bei der Thrombozytenadhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen. Es ist anzumerken, dass zum Zeitpunkt der durchgeführten Experimente nur die Studien von Mammadova-Bach und Alshehri und Kollegen publiziert waren.

Die beschriebenen Resultate und Methoden dieser Dissertation bilden die Grundlage für die folgende Publikation:

Thromb Haemost. 2020;120(6):977-993. *Glycoprotein VI is not a Functional Platelet Receptor for Fibrin Formed in Plasma or Blood.* **Danmei Zhang**, Mariam Ebrahim, Kristin Adler, Xavier Blanchet, Janina Jamasbi, Remco T. A. Megens, Kerstin Uhland, Martin Ungerer, Götz Münch, Hans Deckmyn, Christian Weber, Natalie Elia, Reinhard Lorenz, Wolfgang Siess

doi:10.1055/s-0040-1710012

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1. Antikörper, Reagenzien und Proteinkonjugate: Flussversuche und Präparatfixierung

Antikörper und Tyrosinkinase-Inhibitoren

Ibrutinib	Btk-Inhibitor	Selleckchem (Houston, USA)
Syk-Inhibitor-II	Syk-Inhibitor	Merck Millipore (Massachusetts, USA)
5C4	Ratten mAK gegen GPVI	advanceCor GmbH (Martinsried, Deutschland)
6B4	Humaner mAK gegen GPIIb α	Prof. Dr. Hans Deckmyn Dr. h. c. Laboratory for Thrombosis Research PharmAbs, the KU Leuven Antibody Center KU Leuven Campus Kulak Kortrijk
Abciximab	Muriner mAK gegen GPIIbIIIb	Janssen Biologicals B.V. (Leiden, Niederlande)

Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Human Fibrinogen (FIB3: <i>Plasminogen, vWF, and Fibronectin Depleted</i>)	Enzyme Research Laboratories (FIB 3; Swansea, VK)
Rekombinantes Fibrinogen	Dr. Nakashima of KM Biologics Ltd, (Kumamoto, Japan)
Recombiplastin 2G	Instrumentation Laboratory Company (Bedford, MA, USA)
DiOC6	Life Technologies (Eugene, OR, USA)
Natrium-Citrat 3,13%	Eifelfango (Bad-Neuenahr-Ahrweiler, Germany)
Calcium Chloride	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Humanes Serumalbumin (HSA, Katalog #: A1653)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
BSA	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
EDTA	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumchloride	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumchloride	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
ProLong [®] Diamond antifade mountant	Life Technologies (Eugene, OR, USA)

Refludan® (recombinant Lepirudin)	Celgene (Windsor, Großbritannien), Professor Christian Sommerhoff (Klinikum, LMU, München, Deutschland).
Human Thrombin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glas Coverslips	No.1,5H, Menzel-Gläser GmbH (Braunschweig, Deutschland)
High precision Glas Coverslips	24x60mm, No.1.5H, Paul Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Silicon tube	Wagner & Munz GmbH (München, Deutschland)
sticky-Slide I 0,1 Luer (Kanalvolumen: 25 µl, Länge: 50 mm, Breite: 5 mm, Höhe: 100 µm)	ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland)

Proteinkonjugate

Fibrinogen From Human Plasma, Alexa Fluor™ 647 Conjugate	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Fibrinogen From Human Plasma, Alexa Fluor™ 594 Conjugate	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
CD41 Monoclonal Antibody (MEM-06), Alexa Fluor 488	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Albumin from Bovine Serum (BSA), Alexa Fluor™ 647 conjugate	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)

4.1.2. Allgemeine Puffer und Lösungen

Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)	Gibco (Grand Island, New York, USA)
Fixation-Buffer	4% PFA in PBS; 5 mM EDTA
HSA*	HSA 4%, HSA 0,5% oder HSA 0,1% in PBS
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Denhardt's solution (50x)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Washing Buffer*	HSA 0,1% in PBS; 6,5 µg/ml Refludan®
Laemmli Buffer *	50 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 0.025% Bromo-phenol Blue, 10% Glycerol, 5% β-Mercapto-ethanol (siehe 4.1.3.)
Natriumchlorid 0,9%	B.Braun (Melsungen, Deutschland)

* Eigene Herstellung

4.1.3. Antikörper, Reagenzien und Materialien: SDS-PAGE, Silberfärbung und Immunoblotting

Lösungsmittel und Reagenzien

Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Bromophenol blue	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
β-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
SeeBlue Plus2	ThermoFisher (Cat.Nr. LC5925; Waltham, MA, USA)
Amersham Protran 0.2 NC nitrocellulose membranes	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
1% Amersham ECL Prime Blocking Reagent	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Roti®-Block	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate	ThermoFisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)

Kontrollproteine und Antikörper für Westernblot

Humaner vWF (Haemate® P)	CSL Behring GmbH (Marburg, Deutschland)
Faktor XIII (FXIII) from human plasma	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland); 233501-M
Vitronectin (human recombinant)	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Fibronectin from human plasma	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
recombinant FXIII B-subunit antibody	RnD Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland); NBP1-89811
monoclonal anti-VTN/vitronectin antibody (clone 615-1D1-44, LS-C150852; 2.5µg/mL)	LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA, USA)
monoclonal anti-FGG/fibrinogen gamma chain antibody (clone OT11F5, LS-C338397)	LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA, USA),

monoclonal anti-FN1/fibronectin antibody (clone HFN 7.1; LS-C87819)	LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA, USA)
polyclonal rabbit anti-human VWF antibody	Dako (Hamburg, Deutschland); A008202-2

4.1.4. Blutabnahmematerial

Butterfly Winged infusion Set (20 Gauge)	Intermedica GmbH (Mainz, Deutschland)
Falcon® Tubes, 15 ml und 50 ml	Sarsted (Nümbrecht, Deutschland)
Plastic syringes 10ml, 20ml, 50ml	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Silicon tube	Wagner & Munz GmbH (München, Deutschland)

4.1.5. Hardware und Software

Zentrifuge	Thermo Heraeus Multifuge 1S-R Gekühlte Zentrifuge Centrifuge TTH-400 Rotor 4x400, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Inkubator	WTB Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Wasseraufreinigungssystem	Milli Q Direct Q 16, Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Kamera	CoolSNAP HQ2 CCD camera, Photometrics (Tucson, AZ, USA) Retiga R1TM CCD camera (Teledyne Q imaging, Surrey, BC, Kanada)
Microscope	ELYRA PS.1 Mikroskop (structured illumination microscope), Carl Zeiss (Jena, Deutschland) Leica SP8/3X Confocal und Leica TCS SP8 STED 3X Mikroskop (Mannheim, Deutschland) Nikon Eclipse TE2000-E invertiertes Fluoreszenzmikroskop (Tokyo, Japan)
Luminescent Image Analyzer Bildanalyzesystem	FujiFilm LAS-3000 Luminescent Image Reader, FujiFilm (Minata, Tokio, Japan)
Syringe pump	LEGATO 270, Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA)
Vortex	REAX top, Heidolph (Kehlheim, Deutschland)
Waagen	BP2100S und R160P, Sartorius (Göttingen, Deutschland)
NIS-element 3.4	Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
SigmaStat 3.5-Programm-Paket	Systat software Inc. (Point Richmond, CA, USA)
ZEN Software	Carl Zeiss MicroImaging (Jena, Deutschland)

4.2. Methoden

4.2.1. Blutentnahme

Gesunden Probanden wurde Blut durch Venenpunktion abgenommen. Die Probanden stimmten nach einer ausführlichen Aufklärung der experimentellen Verwendung ihrer Blutproben zu und unterschrieben ein nach Beratung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München (AZ 365-14) erstelltes Informations- und Einwilligungsschreiben. Die Blutabnahme entsprach den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen laut der Deklaration von Helsinki.

Das Blut wurde entweder mit Hirudin (~200U/ml; 13µg/ml) oder Citrat (10.64 mM f.c.) antikoaguliert. Als Ausschlusskriterium für eine Blutspende galt eine Medikamenteneinnahme in den letzten 14 Tagen, welche die Thrombozytenfunktion beeinträchtigten. Die Blutentnahme erfolgte mit einem Butterfly Infusion Set von 20 Gauge in der V. mediana cubiti der Ellenbeuge. Nach Blutabnahme wurden die Experimente in einem Zeitfenster von 4 Stunden durchgeführt.

4.2.2. Auftragen von aufgereinigtem Fibrinogen, rekombinanten Fibrinogen und Fibrin

Das *Coating* erfolgte analog der beschriebenen Schritte in der Publikation von Ebrahim et al.¹⁵³ Hierfür wurde Fibrinogen von *Enzyme Research* in PBS gelöst (100 µg/l) und horizontal in 30µl Aliquots auf eine Fläche von 1cm x 0,5 cm auf die *Glass Coverslips* aufgetragen. Nach Blockieren der unspezifischen freien Bindungsstellen auf den Glas-Deckgläschen mit HSA 0,5% in PBS wurden die Fibrinogen-Slides bei 4°C in einer feuchten Kammer bis zum Flussversuch aufbewahrt (mindestens für 2 Stunden).

Für die Herstellung von Fibrin oder rekombinantem Fibrin wurde Fibrinogen von *Enzyme Research* bzw. rekombinantes Fibrinogen zunächst in PBS gelöst (0,699 mg/ml f.c.). In der Lösung folgte die Aktivierung von Fibrin durch Zugabe von CaCl₂ (2,5mM f.c.) und Thrombin (0,5 U/ml f.c.).⁶ Das Gemisch wurde anschließend in 8µl Aliquots rasch auf eine Fläche von 1 cm² auf den *Glass Coverslips* aufgetragen. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde Thrombin durch die Zugabe von 10 U/ml rekombinantem Hirudin (Refludan®, direkter Thrombin-Inhibitor) inaktiviert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde ein sogenanntes *Suction-Cleaning* mithilfe von Pipetten durchgeführt, bei der die überschüssige Flüssigkeit von den Präparaten vorsichtig abgesaugt wurde. Die Fibrinpräparate wurden nach einem Waschvorgang mit PBS (100µl) und Blockierung der freien Bindungsstellen mit HSA 0,5% in PBS (200µl) wie oben geschildert bis zum Versuch aufbewahrt. Um die Fasern auch bildgebend darzustellen, wurde vor der Aktivierung zu Fibrin fluoreszenzmarkiertes Fibrinogen (Alexa-Fluor 647 Fibrinogen) (15 µg/ml f. c.) hinzugefügt. Reines Fibrin aus Fibrinogen von *Enzyme Research* wird im Folgenden nur als Fibrin bezeichnet.

4.2.3. Auftragen von Plasmafibrin

Humanes Plasma wurde aus Citrat-Blut von gesunden Spendern durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 1000 x g (Temperatur: 4°C) gewonnen. Im Anschluss wurden dem Plasma (80µl) Thrombin (0,3 U/ml f. c.) hinzugefügt, woraufhin sich Plasmafibrin bildete. Dieses wurde rasch in 8µl Aliquots auf einer Fläche von 1 cm x 0,5 cm auf die *Glass Coverslips* aufgetragen. Die weitere Behandlung (Waschvorgang und Blockierung freier Bindungsstellen) erfolgte wie bereits oben beschrieben. Auch hier wurde in manchen Experimenten zur Darstellung der Fibrinfasern vor der Aktivierung des Fibrins Alexa-Fluor 647 Fibrinogen (60 µg/ml f.c.) hinzugegeben. Die hier verwendeten *Glass Coverslips* wurden zuvor mit Denhardt-Lösung vorbehandelt, um eine bessere Haftung des Fibrinnetzes sicherzustellen. Hierfür wurden die Deckgläschen mit Denhardt-Lösung für 3 Stunden bei 68°C beschichtet und gelagert. Nach einem Waschvorgang mit deionisiertem Wasser wurden die Deckgläschen für 20 min bei Raumtemperatur mit Ethanol fixiert, bevor sie luftgetrocknet und anschließend bei 180°C für 3 Stunden erhitzt wurden.¹⁸⁸

4.2.4. Auftragen von Tissue Factor

Zur Herstellung von Fibrin im Blut wurde Tissue Factor (TF) als Hauptaktivator des extrinsischen Pfades der Gerinnungskaskade auf *Glass Coverslips* aufgetragen. Während des Blutflusses über immobilisierten TF wird im Citrat-Blut Fibrin produziert. Dieses durch TF-induzierte Fibrin wird im Folgenden als TF-Fibrin bezeichnet. Das Citrat-Blut wurde hierfür vor den Versuchen mit Calcium (8 mM) und Magnesium (0,1mM) rekonstituiert (s. Kapitel Flusseexperimente) Für die Experimente wurde rekombinanter humaner TF (Recombiplastin 2 G) in PBS und HSA 0,5% gelöst (3 ng/ml f.c.) und in 30µl Aliquots (90pg) auf eine Fläche von je 1 cm x 0,5 cm aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur, wurden die *Slides* bis zum Flussversuch bei 4°C trocken aufbewahrt. Die hier verwendeten *Glass Coverslips* wurden wie bei Plasmafibrin zur besseren Haftung des Fibrins mit Denhardt-Lösung vorbehandelt.

4.2.5. Flusseexperimente

Der Grundaufbau der Flussversuche ist in Abbildung 6 abgebildet. Die Etablierung der Methode erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Janina Jamasbi und Kollegen im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit.¹⁸⁹

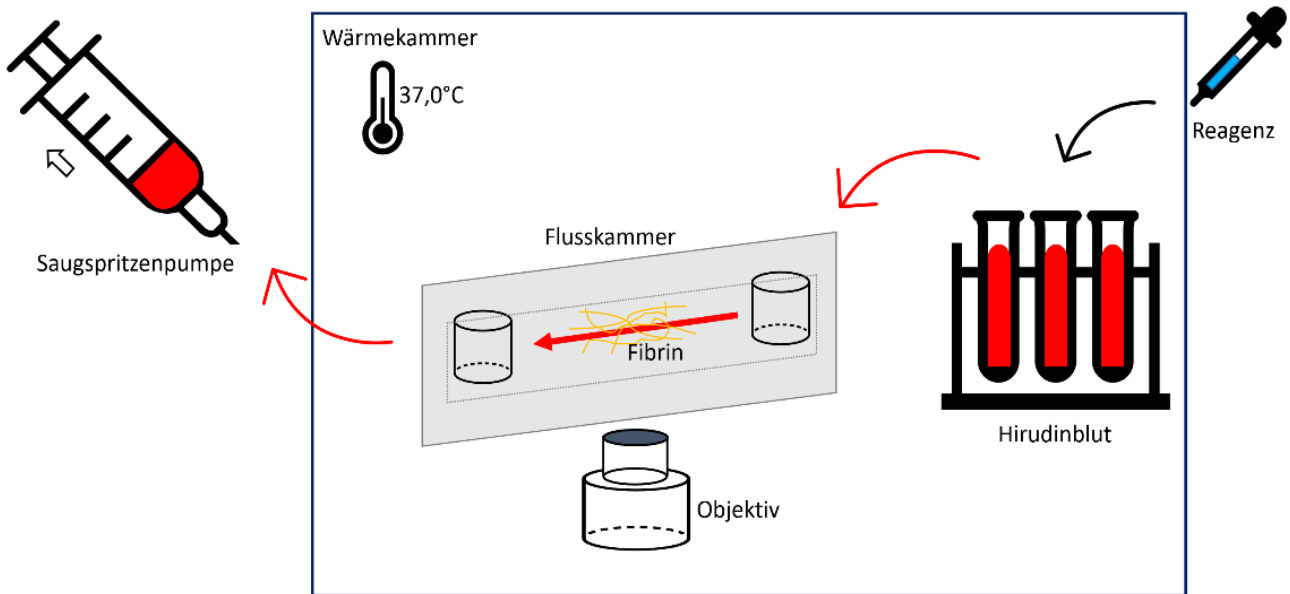


Abbildung 6: Aufbau des Flussexperimentes

Für die Versuche wurde Hirudin- bzw. Citrat-Blut verwendet. Die mit Fibrinogen, Fibrin oder *Tissue Factor* beschichteten Glas Deckgläschen wurden an eine spezielle Einwegflusskammer (*Sticky-Slide* | 0,1 Luer, ibidi) angebracht und auf dem Objektisch des Fluoreszenzmikroskops platziert. Mit einer Saugspritzenpumpe konnten spezifische Flussraten eingestellt werden. Das Blut konnte dabei durch ein Schlauchsystem angesaugt werden. Eine Wärmekammer um das Mikroskop hielt durchgehend eine Temperatur von 37°C (Körpertemperatur) aufrecht.

Das zu testende Reagenz wurde vor dem Flussexperiment dem Blut hinzugefügt und bei 37°C gemeinsam mit DiOC6 (1 μ M, fluoreszierender Farbstoff, um Thrombozyten anzufärben) für 10 min bzw. 15 min prä-inkubiert. Währenddessen wurden die *Slides* für jeweils 1 Minute mit PBS gewaschen und mit HSA (4% in PBS) erneut blockiert, um unspezifische Bindungsstellen auf dem Glas Coverslip abzudecken. Hiernach wurden die Fibrinogen-, Fibrin-, Plasmafibrin- oder *Tissue Factor*-Präparate bei voreingestellter arterieller Flussrate mit Spenderblut perfundiert. Die Flussraten wurden anhand der angestrebten arteriellen Scherraten von 600/s und 1265/s eingestellt (siehe 4.2.6). Das Spenderblut war für die Versuche auf zwei Arten antikoaguliert: mit Hirudin oder Citrat (siehe 4.2.1). Für Versuche mit Fibrinogen, Fibrin und Plasmafibrin wurde Hirudin-Blut verwendet, während zur Herstellung von TF-induziertem Fibrin Citrat-Blut benutzt wurde. Bei Versuchen mit Hirudinblut wurden neben dem Inhibitor und DiOC6 vor der Perfusion keine weiteren Reagenzien dazugegeben. Das Citrat-Blut musste vor der Durchführung des Versuches mit Calciumchlorid (8 mM) und Magnesiumchlorid (0,1 mM) rekonstituiert werden.¹⁹⁰

4.2.6. Errechnung der Flussraten

Die Aktivierung von Thrombozyten durch Fibrin im arteriellen Strömungsgebietes findet vor allem bei Scherraten von 600/s und 1265/s statt. Die Flussgeschwindigkeit für diese Scherraten wurde entsprechend folgender Formel ermittelt:¹⁹¹

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

Die Kammerhöhe betrug 110µm und die Kammerweite 5mm.¹⁸⁹ Da die unterschiedlichen Fibrinnetze sehr variabel in ihrer Höhe sind (Plasmafibrin: Netzhöhe bis zu 30µm, Fibrin dagegen nur ca. 2 µm), mussten die Flussraten entsprechend angepasst werden, um Scherraten von 600/s und 1265/s zu erhalten.

4.2.7. Auswertung der Thrombozytenadhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen

Mit Beginn der Blutperfusion wurden kontinuierlich in Echtzeit (1 Bild pro Sekunde) mit einem 10x Objektiv (NA 0.4) durch das Nikon TE2000E Mikroskop und der Photometrics CoolSNAP HQ2 CCD Kamera (0,66µm/px) Aufnahmen der mit DiOC6 angefärbten Thrombozyten gemacht. Die Videos wurden bis zu 5 Minuten aufgenommen. So konnte später die Auswirkung der Inhibitoren auf die Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen über die Zeit beurteilt werden. Die Auswertung der Videos erfolgte im Anschluss mithilfe der NIS-Element 3.4 Software. Nach Entfernung von Störgeräuschen im Hintergrund und Setzen eines adäquaten Schwellenwertes zur Detektion der gefärbten Thrombozyten, wurde die quantitative Flächenbedeckung eines definierten Areal (in %) mit Thrombozyten ausgemessen. Die gemessenen Werte wurden in Graphen mit Mittelwert (MW) und Standardabweichungen (SD) über die Zeit zusammengefasst. Jeder Flussversuch wurde doppelt durchgeführt.

4.2.8. Fixierung der Proben für *advanced optical imaging (two-photon confocal laser scanning microscopy (TPLSM), stimulated emission depletion (STED)-Mikroskopie und structured illumination microscopy (SIM))*

Für die bildgebenden Verfahren wie TPLSM, STED und SIM wurden die Präparate speziell vorbereitet und fixiert. Ziel war die genaue Beurteilung der Fibrinnetze und der Thrombozytenmorphologie unter Flussbedingungen. Wie oben beschrieben wurden Fibrin und Plasmafibrin auf *high precision Glass Coverslips* aufgetragen. Um die Fibrinfasern darzustellen, wurden vor der Aktivierung zu Fibrin Alexa Fluor-647- oder Alexa Fluor-594-konjugiertes Fibrinogen zu Fibrinogen (15 µg/mL) oder Plasma (60 µg/mL) hinzugefügt. Das Verhältnis des Fluoreszenz-gebundenen Fibrinogen zu Fibrinogen und Plasmafibrinogen waren ähnlich: 47:1 und 25-75:1 (basierend auf den mittleren Plasmafibrinogenwerten im Blut von 1,5 - 4,5 mg/ml). Zur Darstellung von Albumin wurde Alexa

Fluor-647 konjugiertes Albumin (BSA) ebenfalls während des *Coating* Vorgangs vor der Fibrinbildung hinzugefügt (Verhältnis Plasma-Albumin : Alexa Fluor-647 *konjugiertes* Albumin = 200 : 1).

Vor dem Blutfluss über Fibrin, wurde dem Hirudinblut DiOC6 hinzugefügt und für 10 Minuten prä-inkubiert. Auch hier wurde das Präparat jeweils für 1 Minute mit PBS und HSA (4% in PBS) vor der Perfusion mit Blut gewaschen und blockiert. Nach 2-minütiger Perfusion mit Hirudinblut wurde der Fluss abgebrochen und die Slides zur Fixierung mit PFA (4% in PBS) und EDTA (5mM) überströmt. Es folgte eine Perfusion mit Waschpuffer (0,5% HSA in PBS mit 6,5 µg/ml Hirudin) über 2 Minuten und die Anfärbung der Thrombozyten mit anti-CD41-Alexa-Fluor 488 *Conjugate*. Hierfür wurde die Pumpe für 2 Minuten angehalten, damit eine ausreichende Färbung der Thrombozyten erreicht werden konnte. Nach einem weiteren 2-minütigem Waschvorgang wurde das Präparat in *Prolong Diamond Antifade Mountant* eingebettet, die Öffnungen mit Parafilm luftdicht verschlossen und abgedunkelt aufbewahrt.

4.2.9. Beurteilung der Fibrinarten und Thrombozytenaktivierung durch TPLSM, STED und SIM

Die fixierten Präparate wurden mithilfe von verschiedenen hochauflösenden mikroskopischen Methoden analysiert. Bei der *2-Photon Confocal Laser Scanning Microscopy* (TPLSM) und STED-Mikroskopie wurden die Präparate mit dem SP8/3X Confocal- und SP8/ STED 3X- Mikroskop (Leica) zusammen mit einem 405-nm Laser und einer Weiß-Licht-Laserquelle betrachtet. Die Auswertung der Bilder erfolgte über das Softwarepaket LAS X. Structured Illumination Microscopy (SIM) wurde mit einem ELYra PS.1 Mikroskop (CarlZeiss) durchgeführt.¹⁹² Die Auswertung und Bildrekonstruktion hierfür lief über die Software ZEN Black Edition (CarlZeiss Microimaging). Es wurde jeweils die Struktur des Fibrinnetzes, die Morphologie der Thrombozyten und die Ablagerung von Albumin beurteilt. Dafür wurden Aufnahmen von dünnen Schichten in der Z-Ebene (0,05 – 0,2 µm) in jeweils 3 Fluoreszenzkanälen gemacht.

4.2.10. SDS- Polyacrylamid-Elektrophorese (PAGE), Silberfärbung und Immunoblotting

Zum Nachweis von Proteinen im Plasmafibrin wurden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-, Silberfärbung- und *Immunoblotting*-Versuche durchgeführt. Die mit Fibrinogen, rekombinantem Fibrin, Fibrin und Plasmafibrin beschichteten Glas Coverslips wurden dazu in vorgewärmten Puffer (100µl) mit Urea (10 M) und β-Mercaptoethanol (10 mM) gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Fibrinogen, rekombinantes Fibrin und Fibrin (je 300 ng) und Plasmafibrin (1 µg) wurden in Laemmli Puffer (s. Materialien) re-suspendiert und anschließend für 5 min aufgeköcht bevor eine Proteintrennung in 7%- oder 12% - SDS-PAGE erfolgte. Darauf folgte die Silberfärbung zunächst mit Gel-Fixierung mit 40% Ethanol, 10% Essigsäure, 50% H₂O für 1 Stunde. Nach einem intensiven Waschvorgang wurde das Gel mit 0,02% Natrium-Thiosulfat für 1 Minute sensibilisiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurde das Gel mit 0,1% Silbernitrat (mit 0,02% Formaldehyd) über 20 Minuten gefärbt. Das Gel wurde nach wiederholtem Waschen mit 3% Natriumcarbonat (mit 0,05% Formaldehyd) behandelt. Abschließend wurde der Färbeprozess mit 5% Essigsäure gestoppt.

Für das *Immunoblotting* wurden die Fibrinogen-, Fibrin- und Plasmafibrin-Proben (300ng) sowie Kontrollproteine (VWF, Fibronectin, Factor XIII, Vitronectin, HSA) (150 ng), über 7% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (zur Detektion von VWF, und Fibronectin) oder 12% SDS-PAGE (zur Detektion von Factor XIII, Vitronectin) getrennt, bevor diese auf Amersham Protran 0.2 NC Nitrocellulose Membranen transferiert wurden. Die Blots wurden für eine Stunde in 1% Amersham ECL Prime Blocking Reagent und 1X Roti®-Block blockiert und anschließend mit primären Antikörpern und *Horseradish Peroxidase* (HRP) konjugierten sekundären Antikörpern behandelt. Zuletzt wurde zur Detektion der Proteine mithilfe des FujiFilm LAS-3000 *Luminescent Image Reader* das *SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent* Substrat hinzugegeben.

4.3. Statistik

Die Ergebnisse zweier parallel durchgeführter Versuche unter verschiedener Versuchsbedingungen wurden durch den *Student t-Test* verglichen. Die Ergebnisse von mehreren parallel durchgeführten Versuchen unter verschiedenen Versuchsbedingungen wurden zunächst alle einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen unterzogen und anschließend mithilfe der Bonferroni Methode paarweise verglichen. In Fällen, bei welchen eine parametrische Testung nicht angewendet werden konnte, wurde entsprechend der *Mann-Whitney's U-Test* oder eine Rangvarianzanalyse für wiederholte Messungen angewendet und im Anschluss paarweise Vergleiche mit dem *Turkey-Test* durchgeführt.

5 Ergebnisse

Um die Rolle von GPVI und dem GPVI-Signaling nach Thrombozytenaktivierung durch Fibrinogen und Fibrin zu untersuchen, wurde die Wirkung des GPVI-AK 5C4, des Syk-Inhibitor II und dem BTKi Ibrutinib auf die Thrombozytenadhäsion- und Aggregation auf Fibrinogen, Fibrin (aus aufgereinigtem Fibrinogen hergestellt) und physiologischem Fibrin (Plasmafibrin und TF-Fibrin) im fließenden Blut (arterielle Scherraten) untersucht.

5.1. Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen.

Zuerst wurde die Interaktion von Thrombozyten mit Fibrinogen untersucht. Vor Beginn der Flusseperimente wurden dem Blut jeweils GPVI-AK 5C4, Syk-Inhibitor II und Ibrutinib hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte die Aktivierung der Thrombozyten durch Fibrinogen, welches auf Glas Deckgläschen immobilisiert wurde.

5.1.1. Wirkung des GPVI-AK 5C4 auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Aktivierung

Für diese Versuchsreihe wurde stark aufgereinigtes Fibrinogen, das zusätzlich von Plasminogen, von Willebrand Factor und Fibronectin depletiert worden war (Reinheit von >95%) verwendet, um möglichst eine Aktivierung durch Kontamination mit weiteren Proteinen auszuschließen.¹⁵³ Es war in den ersten Minuten eine rasche Plättchen-Adhäsion auf Fibrinogen zu sehen bis ein Plateau nach ca. 3-4 min erreicht wurde (Abb. 7). Während des gesamten Flusseperiments auf Fibrinogen wurden nur wenige kleine Thrombozyten-Aggregate gesehen. Es wurde nach der Zugabe des GPVI-AK 5C4 keine Hemmung der Fibrinogen-induzierten Plättchen-Aktivierung beobachtet, und es zeigte sich nach 5 min eine mit dem Kontroll-Experiment vergleichbare Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten. Die eingesetzte Konzentration von 5C4 (5µg/ml) war ausreichend, um die Kollagen-induzierte GPVI-abhängige Thrombozytenaggregation im Blut >90% zu unterbinden.¹⁶⁵

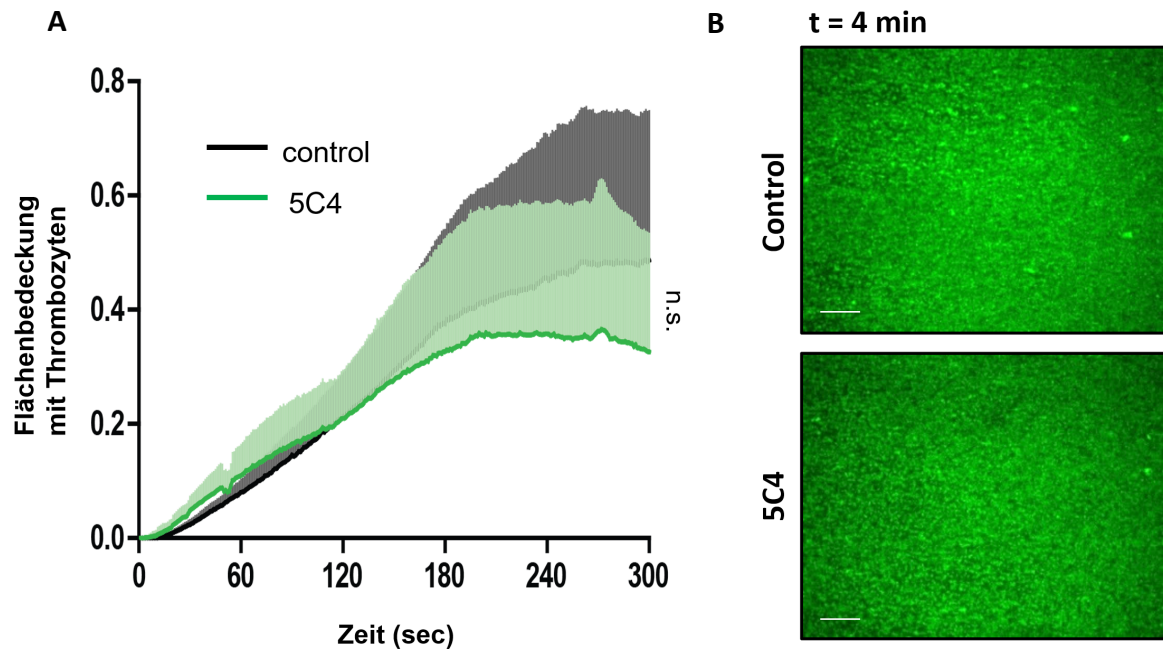


Abbildung 7: GPVI-AK 5C4 hat keinen Effekt auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen

A Kurvendiagramm des Effektes der GPVI-Inhibition auf die Kinetik der Thrombozytenaktivierung durch Fibrinogen. Vor dem Flussexperiment wurde Hirudin-antikoagulierte Blut DiOC6 zur Färbung der Thrombozyten hinzugefügt und für 10min bei 37°C ohne (Kontrolle) oder mit dem GPVI-AK 5C4 (5µg/ml) präinkubiert. Bei einer Scherrate von 600/s erfolgte die Aktivierung der Plättchen durch das auf dem Deckgläschen beschichtete Fibrinogen. Sekündliche Messung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation über 5min. MW + SD, n=5, n.s., nicht signifikant

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Wirkung von 5C4 auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts nach links. Maßstab = 100µm

5.1.2. Wirkung des Syk-Inhibitor II auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Aktivierung

Des Weiteren konnte auch nach Zugabe von Syk-Inhibitor II bis zum Versuchsende nach 5 min keine hemmende Wirkung auf Fibrinogen beobachtet werden (Abb. 8). Die eingesetzte Konzentration von Syk-Inhibitor II ($2\mu\text{M}$) war ausreichend, um die Kollagen-induzierte GPVI-abhängige Thrombozytenaggregation im Blut zu unterbinden (nicht-veröffentlichte Daten von Busygina et al.).

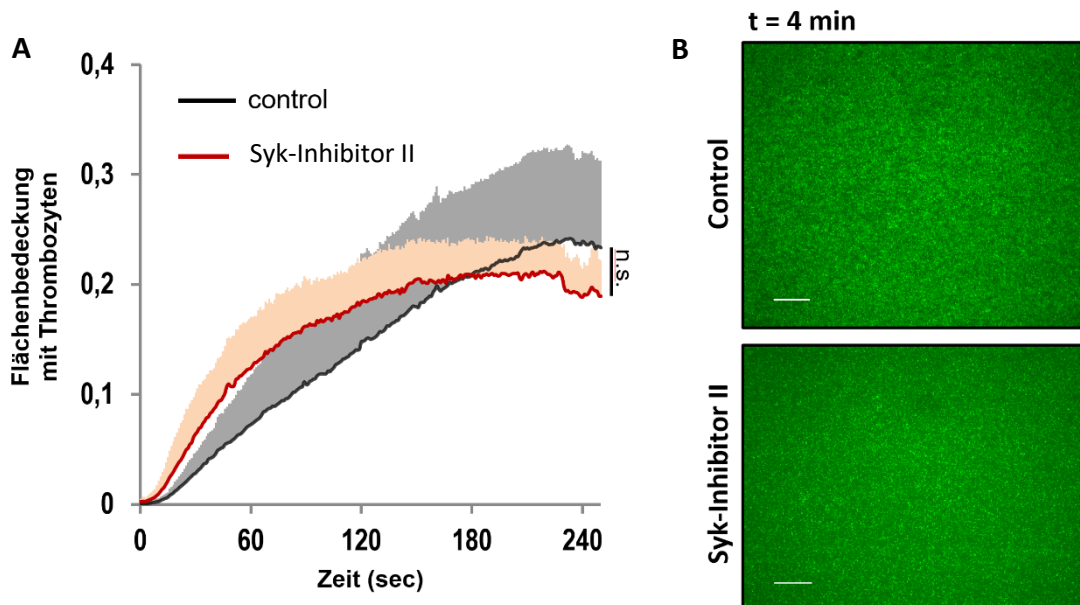


Abbildung 8: Der Syk-Inhibitor II hat keinen Effekt auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen

A Effekt des Syk-Inhibitors ($2\mu\text{M}$) auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozytenaktivierung. Das Blut wurde wie in Legende zu Abb. 7 beschrieben prä-inkubiert. MW + SD, $n=5$, n.s., nicht signifikant

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Wirkung von Syk-Inhibitor II auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts nach links. Maßstab = $100\mu\text{m}$

5.1.3. Wirkung des BTKi Ibrutinib auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Aktivierung

In einer weiteren Versuchsreihe mit Fibrinogen wurde Hirudin-antikoaguliertes Blut mit dem BTKi Ibrutinib untersucht. Die eingesetzte Konzentration von Ibrutinib ($1\mu\text{M}$) war ausreichend, um die Kollagen-induzierte GPVI-abhängige Thrombozytenaggregation im Blut zu unterbinden.¹⁸⁴ Im Gegensatz zu den vorangegangenen Flussversuchsreihen wurde nach Hinzufügen von Ibrutinib eine deutliche Hemmung beobachtet (Abb. 9). Während das Plateau bei Ibrutinib bereits nach ca. 2 min erreicht wird, nimmt die Flächenbedeckung mit Thrombozyten des Kontrollversuchs bis zum Zeitpunkt von 3,5 min zu (Abb. 9). In den repräsentativen Abbildungen zeigt sich in der Kontrolle nach 4 min eine vermehrte Adhäsion und ebenso kleine Aggregate, welche im Ibrutinib-Flussexperiment nicht vorhanden sind. Ibrutinib scheint primär einen inhibitorischen Effekt auf die Plättchenaggregation auszuüben.

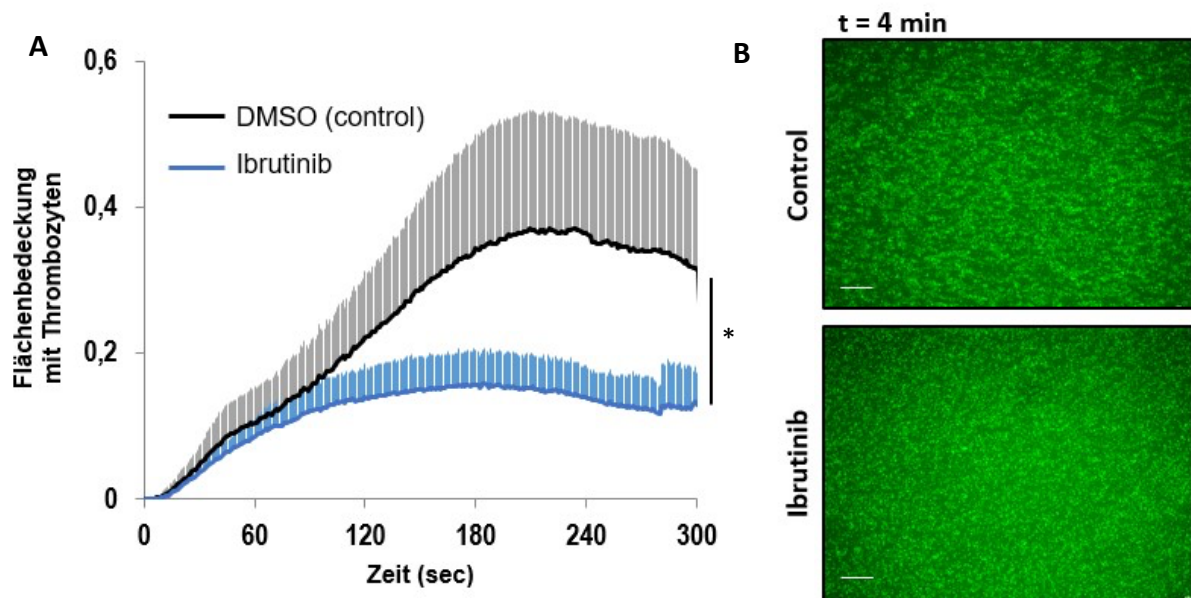


Abbildung 9: BTKi Ibrutinib hemmt die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten--Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)

A Effekt des BTKi Ibrutinib ($1\mu\text{M}$; 15min bei 37°C in DMSO) oder DMSO (0.1%, Kontrolle)) auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozytenaktivierung. MW + SD, n=5, statistische Signifikanz bei t = 4 min für Control vs. Ibrutinib (*: p = 0.013)

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Wirkung von Ibrutinib auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts nach links. Maßstab = $100\mu\text{m}$

5.2. Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen.

Um die Interaktion von thrombozytären GPVI, GPIb, Syk und Btk mit Fibrin zu untersuchen, wurde Fibrinogen durch Thrombin zu Fibrin aktiviert und anschließend die Thrombozytenadhäsion und -Aggregation an Fibrin unter Fluss gemessen. Um auch den Einfluss der Scherrate zu prüfen, wurden die Flussversuche mit zwei verschiedenen arteriellen Scherraten durchgeführt (600/s und 1265/s).²⁶

5.2.1. Vergleich zwischen Fibrinogen- und Fibrin-induzierter Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation

Im Vergleich zu Fibrinogen (Abb. 10) waren auf mit Fibrin beschichteten Deckgläschen schon nach 1min einzelne Aggregate zu sehen, welche in Zahl und Größe nach 2-3 Minuten stark zunahmen (Abb. 10; Abb. 11).

Neben einer erhöhten Flächenbedeckung mit Thrombozyten war ein sigmoidaler Verlauf der Kinetik der Thrombozytenbedeckung erkennbar, ohne ein Plateau nach 5 min zu erreichen (Abb. 12).

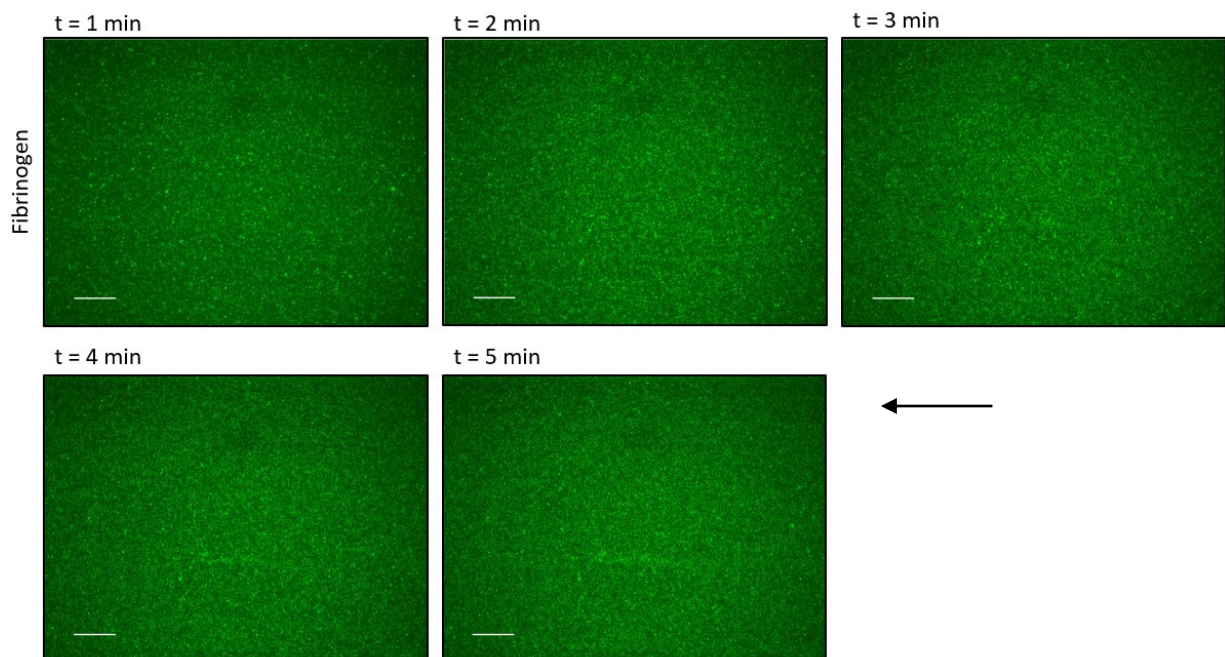


Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahmen der Thrombozyten-Adhäsion an Fibrinogen von Minute 1 bis 5

Nach Inkubation (10 min, 37°C) des Hirudin-antikoagulierten Blutes mit DiOC6 (zur Thrombozytenfärbung), wurde das Blut über Fibrinogen (auf Deckgläschen immobilisiert) perfundiert. Dabei wurden über 5 min ein Video der Thrombozytenanhaftung an Fibrinogen aufgezeichnet. Repräsentativ sind die mikroskopischen Aufnahmen zu den jeweils vollen Minuten abgebildet. Flussrichtung von rechts nach links. Maßstab = 100µm

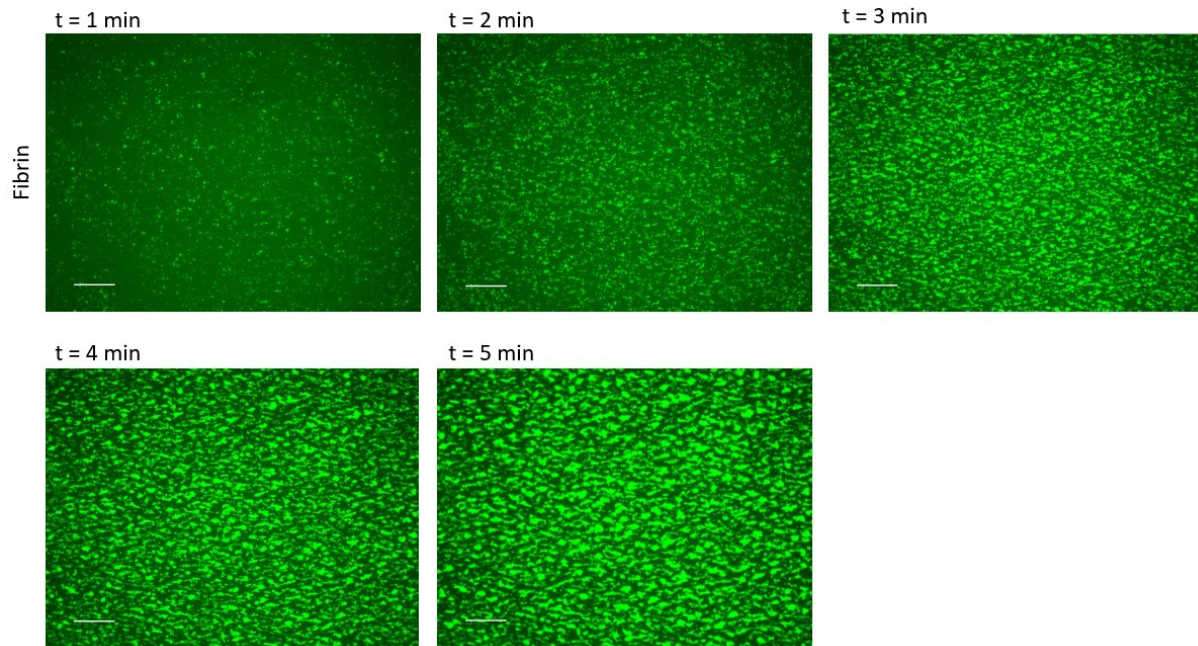


Abbildung 11: Minütliche Repräsentation der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation auf Fibrin
 Details siehe Legende zu Abb. 10

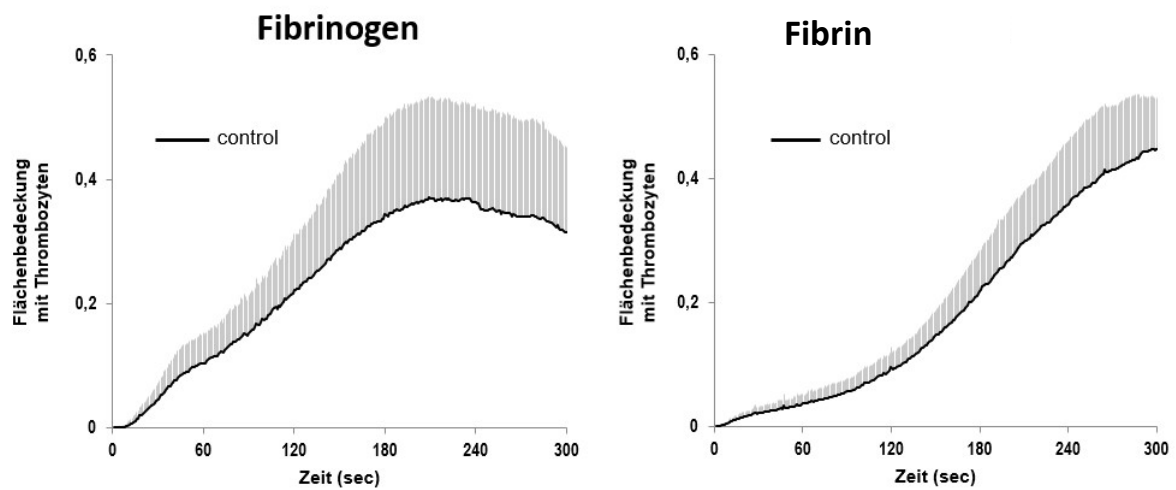


Abbildung 12: Kinetik der Thrombozytenadhäsion/-aggregation auf Fibrinogen und Fibrin unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)

Links Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen. MW + SD, n=5; **Rechts:** Thrombozytenadhäsion an Fibrin. MW + SD, n=5

5.2.2. Die Rolle von GPVI, GPIb und des GPVI-Signalings durch Syk und Btk auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation (600/s)

5.2.2.1. Wirkung des GPVI-AK 5C4 auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s)

Bereits innerhalb der ersten Minute nach Beginn des Blutflusses war eine Hemmung der Thrombozyten-Aggregation zu sehen, wobei schon nach 2 Minuten die Hemmung deutlich war. Die gesamte sigmoidal verlaufende Thrombozytenaggregation wurde bis einschließlich dem Versuchsende (5 Minuten) vollständig von 5C4 gehemmt. Betrachtet man die initiale Thrombozyten-Adhäsion, scheint diese kaum beeinträchtigt im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 13 B). Der GPVI-AK 5C4 verhinderte daher vor allem die rasante Bildung der Plättchen-Aggregate.

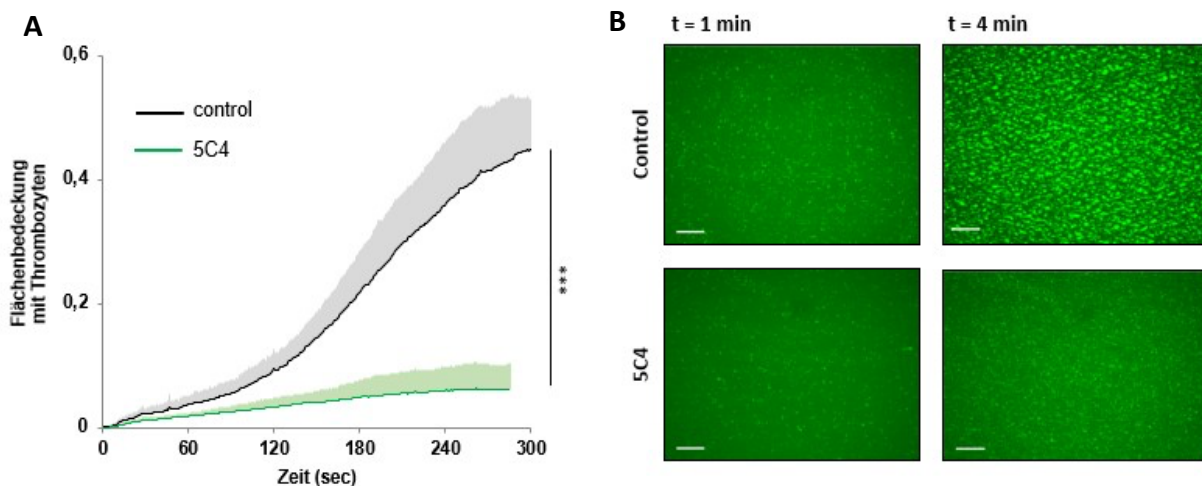


Abbildung 13: Der GPVI-AK 5C4 hemmt die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)

A Effekt des GPVI-AKs 5C4 auf die Fibrin-induzierte Thrombozytenaktivierung. Vor dem Flussexperiment wurde Hirudin-antikoagulierem Blut DiOC6 zur Färbung der Thrombozyten hinzugefügt und für 10min bei 37°C ohne (Control) oder mit 5C4 (5µg/ml) prä-inkubiert. Bei einer Scherrate von 600/s erfolgte die Aktivierung der Plättchen durch das auf den Deckgläsern beschichtete Fibrin. Sekündliche Messung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation über 5min MW + SD, n=5, statistische Signifikanz bei t = 4 min für Control vs. 5C4 (***: p < 0.001), nicht graphisch dargestellt: signifikante Hemmung der Flächenbedeckung mit Thrombozyten auch in t = 120 s, t = 180 s, t = 240 s mit jeweils p < 0.001

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Wirkung von 5C4 auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 1 min und 4 min. Flussrichtung von rechts nach links. Maßstab = 100µm

5.2.2.2. Wirkung des Syk-Inhibitor II auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s)

Flussversuche mit Syk-Inhibitor II zeigten einen zu 5C4 vergleichbaren hemmenden Effekt (Abb. 14). So war auch hier schon innerhalb der ersten Minuten nach Beginn des Blutflusses die Thrombozytenaggregation inhibiert, welche bis zum Versuchsende (5 Minuten) anhielt. Ebenso schien die initiale Thrombozyten-Adhäsion im Vergleich zu Kontrolle kaum beeinträchtigt zu sein (Abb. 14 B). Syk-Inhibitor II verhinderte wie 5C4 vor allem die rasante Bildung der Plättchen-Aggregate.

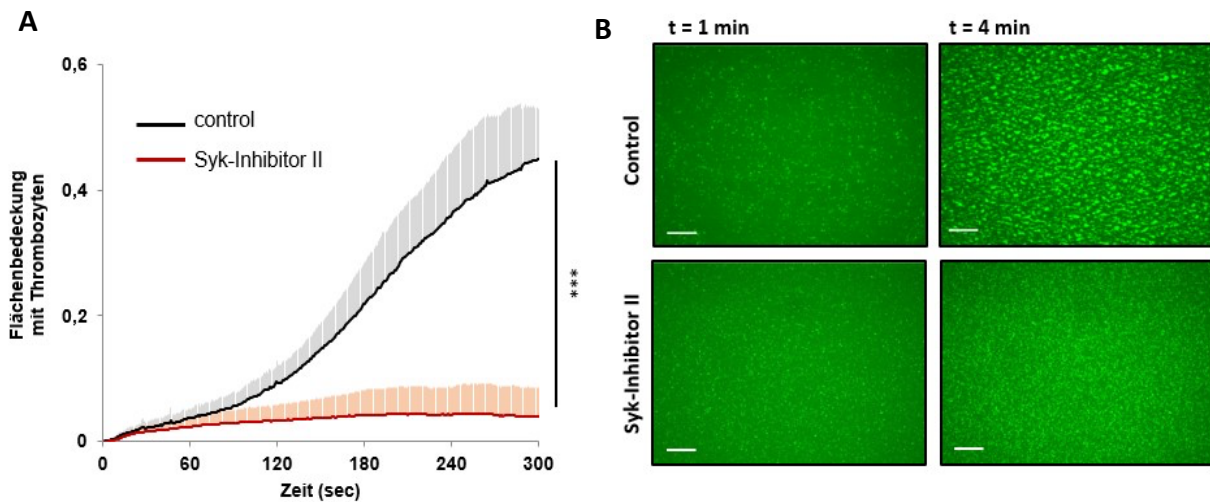


Abbildung 14: Syk-Inhibitor II hemmt die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)

A Effekt von Syk-Inhibitor II ($2\mu\text{M}$, 10 min 37°C) auf die Fibrin-induzierte Thrombozytenaggregation. Details siehe Legende zu Abb. 13. MW + SD, $n=5$, statistische Signifikanz bei $t = 4$ min für Control vs. Syk-Inhibitor II (***: $p < 0.001$). Nicht graphisch dargestellt: signifikante Hemmung der Flächenbedeckung mit Thrombozyten auch in $t = 120$ s, $t = 180$ s, $t = 240$ s mit jeweils $p < 0.001$

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Wirkung von Syk-Inhibitor II auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 1 min und 4 min. Flussrichtung von rechts nach links. Maßstab = $100\mu\text{m}$

5.2.2.3. Wirkung des GPIIb-AK 6B4 auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s)

Da eine Beteiligung von GPIIb, einem Rezeptor für vWF, an der Fibrin-induzierten Aggregation beschrieben wurde,¹⁹³ wurde eine Versuchsreihe mit dem GPIIb-AK 6B4 durchgeführt. Interessanterweise war bei diesen Experimenten ebenfalls eine deutliche Hemmung der Aggregation, aber weniger der Adhäsion sichtbar (Abb. 15).

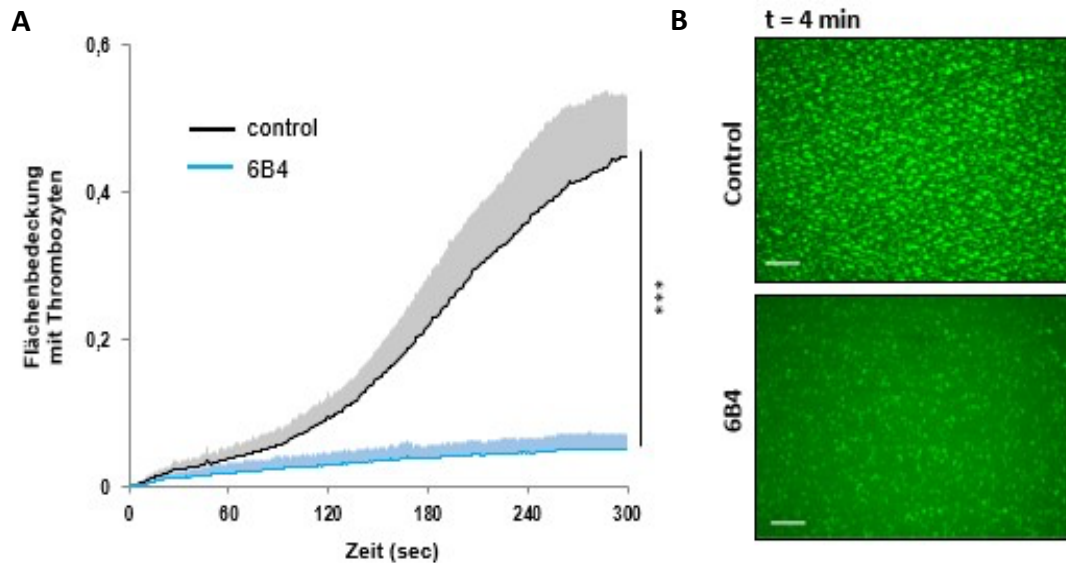


Abbildung 15: GPIIb-AK 6B4 hemmt die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)

A Effekt von 6B4 (5µg/ml) auf die Fibrin-induzierte Thrombozytenaggregation. Durchführung siehe Legende zu Abb. 13. MW + SD, n=5, statistische Signifikanz bei t = 4 min für Control vs. 6B4 (***: p < 0.001). Nicht graphisch dargestellt: signifikante Hemmung der Flächenbedeckung mit Thrombozyten auch in t = 120 s, t = 180 s, t = 240 s mit jeweils p < 0.001

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Wirkung von 6B4 auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts nach links. Maßstab = 100µm

5.2.2.4. Gemeinsame Wirkung von 5C4 kombiniert mit Syk-Inhibitor II, sowie 6B4 mit Syk-Inhibitor II auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s)

Da Syk in der Signalkaskade von sowohl GPVI als auch GPIb beteiligt ist, wurde in der nächsten Versuchsreihe eine duale Hemmung mit 5C4 und Syk-Inhibitor II, sowie 6B4 und Syk-Inhibitor II getestet, um die Rolle der Tyrosinkinase Syk näher zu untersuchen. Die Wirkung der kombinierten Hemmung wurde mit der Wirkung der jeweiligen Einzelsubstanzen 5C4, 6B4 und Syk-Inhibitor II verglichen.

Durch die Zugabe von 5C4 zu Syk-Inhibitor II wurde keine Steigerung der hemmenden Wirkung gegenüber der Einzelsubstanz Syk-Inhibitor II und 5C4 nach Fibrin-Aktivierung der Thrombozyten beobachtet. Es ist daher anzunehmen, dass die Ursache der fehlenden Zunahme der inhibitorischen Wirkung durch die Addition von 5C4 daran liegt, dass der GPVI-Signalweg bereits durch Syk -als Teil der GPVI-Signalkaskade- gehemmt wurde (Abb. 16A).

Hingegen war bei der Kombination von GPIb- und Syk-Inhibition im Flussversuch eine Zunahme der hemmenden Wirkung gegenüber den Einzelsubstanzen zu sehen. Die Plättchen-Hemmung durch 6B4 scheint daher nicht durch eine nachfolgende Syk-Hemmung vermittelt zu sein, da eine Zunahme der Hemmung durch den Syk-Inhibitor zu beobachten war (Abb. 16B). Syk ist demnach wahrscheinlich nicht Teil der GPIb-Signalkaskade nach Fibrin-Aktivierung der Thrombozyten.

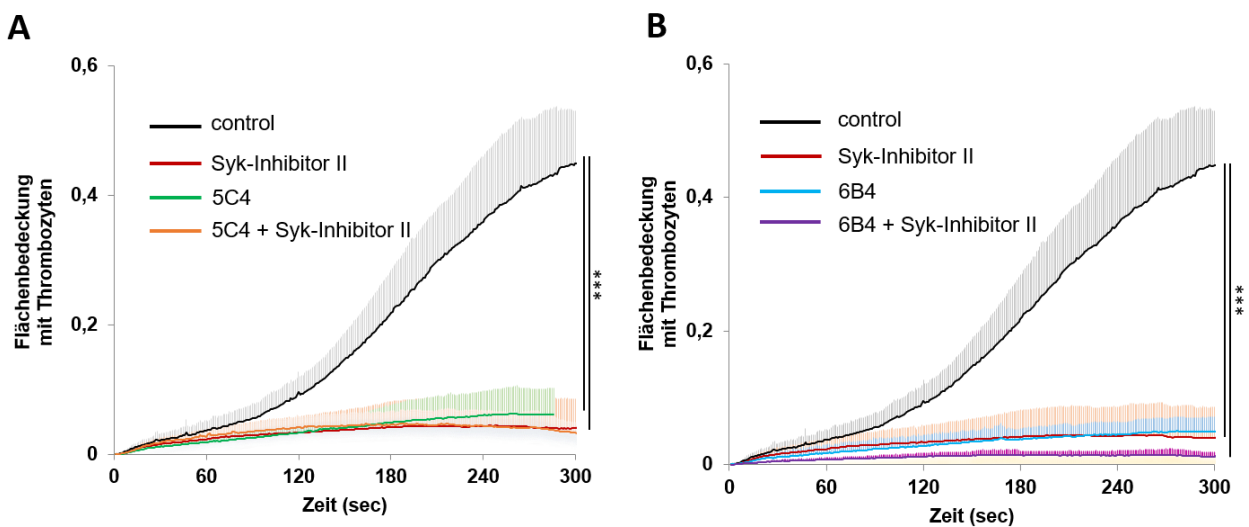


Abbildung 16: Wirkung der Kombinationshemmung von 5C4/Syk-Inhibitor II und 6B4/Syk-Inhibitor II auf die Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen im Vergleich zu den Einzelsubstanzen (600/s)

A Das Kurvendiagramm zeigt die Wirkung der Kombination von 5C4 (5µg/ml) und Syk-Inhibitor II (2µM) auf die Thrombozyten-Aggregation im Vergleich zu den Substanzen allein. MW + SD, n=5, statistische Signifikanz bei t = 4 min für Control vs. Kombination aus 5C4 und Syk-Inhibitor II (***: p <0.001). Nicht graphisch dargestellt: signifikante Hemmung der Flächenbedeckung mit Thrombozyten auch in t = 120 s, t = 180 s, t = 240 s mit jeweils p<0.001

B Das Kurvendiagramm zeigt die Wirkung der Kombination von 6B4 (5µg/ml) und Syk-Inhibitor II (2µM) auf die Thrombozyten-Aggregation im Vergleich zu den einzelnen Substanzen allein. MW + SD, n=5, statistische Signifikanz bei t = 4 min für Control vs. 6B4, Control vs. Syk-Inhibitor II und Control vs. Kombination aus 5C4 und Syk-Inhibitor II (***: p <0.001). Nicht graphisch dargestellt: signifikante Hemmung der Flächenbedeckung mit Thrombozyten auch in t = 120 s, t = 180 s, t = 240 s mit jeweils p<0.001

Durchführung siehe Legende Abb.13

5.2.2.5. Wirkung des BTKi Ibrutinib auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s)

Im nächsten Schritt wurde die Btk-Beteiligung an der GPVI-Signalübertragung nach der Thrombozytenaktivierung durch Fibrin untersucht. Es ist beschrieben, dass Btk bei der Kollagen-induzierten GPVI-Aktivierung eine Rolle spielt.⁷³ Bei unseren Flussversuchen konnte eine deutliche Hemmung der Plättchenaggregation durch die Gabe von Ibrutinib beobachtet werden (Abb. 17).

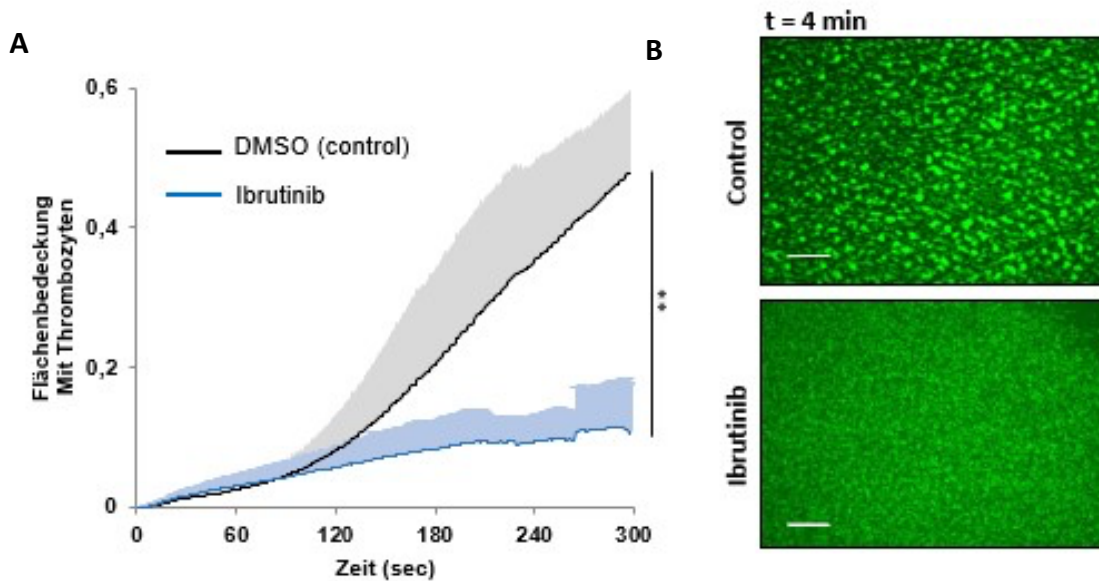


Abbildung 17: BTKi Ibrutinib hemmt die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)

A Kurvendiagramm des Effektes von Ibrutinib (1 μ M) auf die Fibrin-induzierte Thrombozytenaktivierung mit sekundlicher Messung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation über 5min. MW + SD, n=5, statistische Signifikanz bei t = 4 min für Control vs. Ibrutinib (**: p <0.01)

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 1 min und 4 min. Flussrichtung von rechts. Maßstab = 100 μ m

5.2.3. Die Rolle von GPVI, GPIb und des GPVI-Signalings durch Syk und Btk auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation (1265/s)

Um einen möglichen Einfluss der Scherrate auf die Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation zu untersuchen, wurden die o.g. Versuchsreihen parallel bei einer höheren Scherrate von 1265/s durchgeführt. Die gewählte Scherrate gleicht der Scherrate einer arteriellen Stenose.¹⁶⁵ Da den Probanden hierfür dieselbe Blutmenge abgenommen wurde, war die Dauer der Flussversuche entsprechend verkürzt. Dadurch ist auch die geringere Flächenbedeckung mit Thrombozyten zu erklären.

5.2.3.1. Wirkung des GPVI-AK 5C4 auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s)

Entsprechend den Flussversuchen, die bei der niedrigeren Scherrate von 600/s durchgeführt wurden, wurden die Glas Deckgläschen mit Fibrin beschichtet. Nach Inkubation des Blutes mit GPVI-AK 5C4 wurde Fibrin anschließend mit einer Scherrate von 1265/s perfundiert. Über einen Zeitraum von bis zu 3,5 min wurde erneut die Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation gemessen. Genau wie bei der Versuchsreihe der Scherrate von 600/s konnte bei der erhöhten Scherrate eine Hemmung der Flächenbedeckung mit Thrombozyten beobachtet werden (Abb. 18).

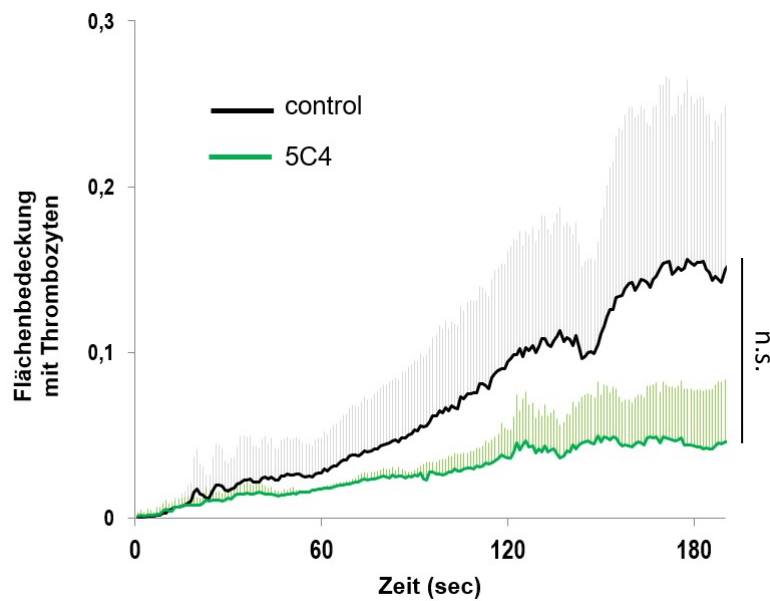


Abbildung 18: GPVI-AK 5C4 (5µg/ml) hemmt die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s).

Kurvendiagramm des Effektes von 5C4 auf die Fibrin-induzierten Thrombozytenaktivierung mit sekundlicher Messung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation über 3,5 min. MW + SD, n=3, Prüfung der statistischen Signifikanz bei t = 3 min für Control vs. 5C4, n.s., nicht signifikant (p = 0,14)

5.2.3.2. Wirkung des Syk-Inhibitor II auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s)

Auch in der Versuchsreihe mit Syk-Inhibitor II wurde bei einer Scherrate von 1265/s eine Hemmung festgestellt (Abb. 19).

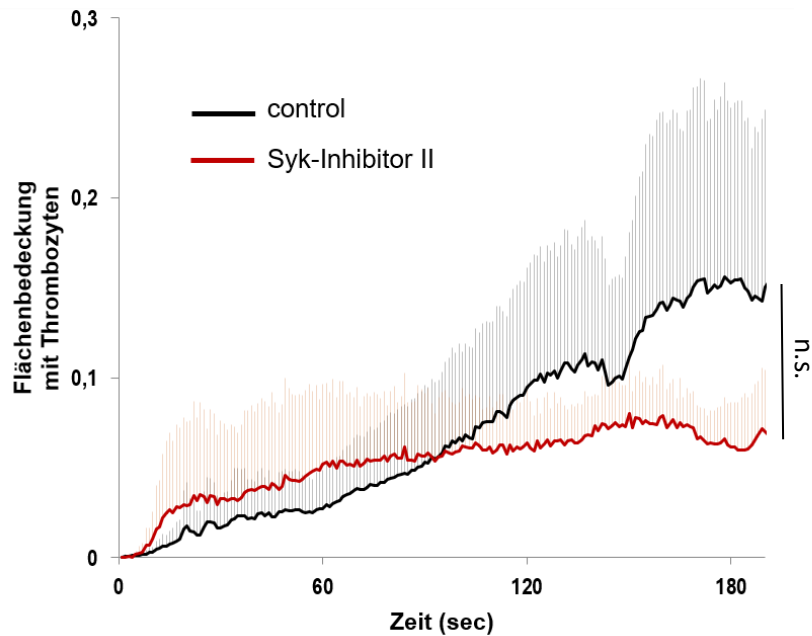


Abbildung 19: Syk-Inhibitor II (2 μ M) hemmt die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation

Kurvendiagramm des Effektes von Syk-Inhibitor II auf die Fibrin-induzierten Thrombozytenaktivierung mit sekundlicher Messung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation über 3,5 min. MW + SD, n=4. Prüfung der statistischen Signifikanz bei t = 3 min für Control vs. 5C4; n.s., nicht signifikant (p = 0,19)

5.2.3.3. Wirkung des GPIb-AK 6B4 auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s)

Für die thrombozytäre Adhäsion bei sehr hohen Scherraten ist die vWF-bedingte GPIb-Rezeptoraktivierung wichtig.^{6,60} Erwartungsgemäß zeigte sich beim Einsatz des GPIb-AK 6B4 bei der hohen Scherrate von 1265/s eine starke Inhibition (Abb. 20).

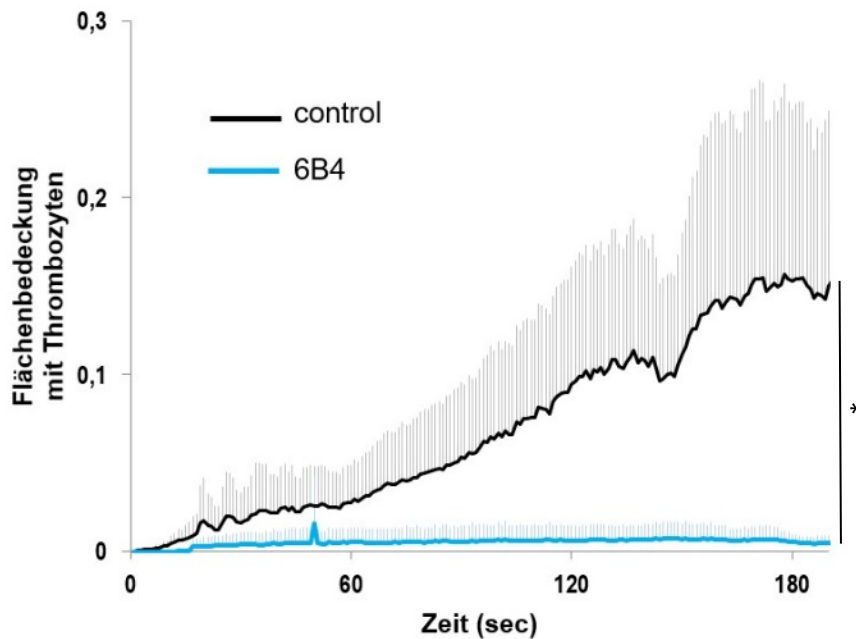


Abbildung 20: GPIb-AK 6B4 (5µg/ml) hemmt die Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s)

Kurvendiagramm des Effektes von 6B4 auf die Fibrin-induzierten Thrombozytenaktivierung mit sekundlicher Messung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation über 3,5 min. MW + SD, n=3. Prüfung der statistischen Signifikanz bei t = 3 min für Control vs. 6B4 (*: p<0,1)

5.2.3.4. Wirkung des BTKi Ibrutinib auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s)

Bei einer Scherrate von 1265/s konnte nach Einsatz des BTKi Ibrutinib ein ähnlicher Effekt wie bei der niedrigen Scherrate auf die Plättchen-Aktivierung durch Fibrin nachgewiesen werden (Abb.21).

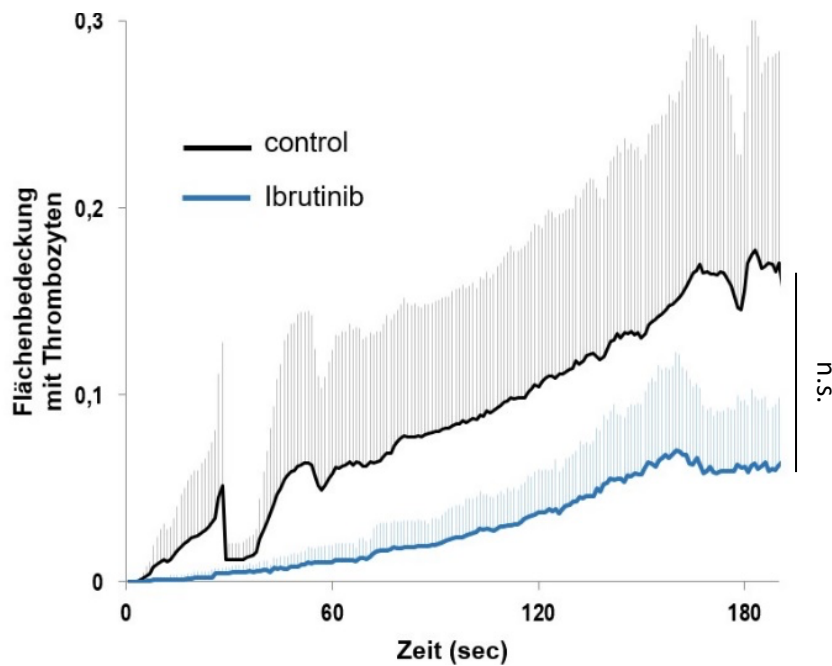


Abbildung 21: BTKi Ibrutinib ($1\mu\text{M}$) hemmt die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s)

Kurvendiagramm des Effektes von Ibrutinib auf die Fibrin-induzierten Thrombozytenaktivierung mit sekundlicher Messung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation über 3,5 min. MW + SD, n=3, Prüfung der statistischen Signifikanz bei t = 3 min für Control vs. Ibrutinib; n.s., nicht signifikant ($p=0,19$)

5.3. Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Bedingungen

Um die Wirkung von Fibrin auf die Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter physiologischeren Bedingungen zu untersuchen, wurde in der folgenden Versuchsreihe Fibrin in Plasma durch Stimulation mit Thrombin hergestellt und auf Glas Deckgläschen aufgetragen. Im Anschluss wurde, analog zu den Versuchen mit Fibrin hergestellt aus aufgereinigtem Fibrinogen, Plasmafibrin mit antikoaguliertem Blut bei arteriellen Flussbedingungen überströmt. Dabei wurde die Flächenbedeckung mit Thrombozyten über einen Zeitraum von 5 min bzw. 3,5 min gemessen, bei Scherraten von 600/s bzw. 1265/s.

Die Dicke der Fibrinnetze von Fibrin und Plasmafibrin unterschieden sich hierbei stark. Das „dünne“ Fibrinnetz besaß eine geringe Netzhöhe von nur 3 µm, während das Plasmafibrin ein Netzkonstrukt bildete, welches einem schwammartigen Kissen gleich und eine Höhe von ca. 30 µm erreichte. Die Höhe der Flusskammer wurde dadurch entsprechend verringert, was bei der Berechnung der Flussraten berücksichtigt wurde (siehe Methode Abschnitt 4.2.6)

5.3.1. Vergleich zwischen Fibrin und Plasmafibrin-induzierter Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation

Überraschenderweise war die Plättchen-Aggregation auf Plasmafibrin im Vergleich zu Fibrin (Abb. 11) deutlich vermindert. So war vor allem die Größe der Aggregate verringert, während die Adhäsion der Thrombozyten vergleichbar war (Abb. 22). Plasmafibrin zeigte daher im Gegensatz zu Fibrin keine sigmoidale Kinetik der Flächenbedeckung mit Thrombozyten (Abb. 24A). Im Durchschnitt war die gemessene Flächenbedeckung mit Thrombozyten um mehr als die Hälfte geringer als auf Fibrin ($18 \pm 3.7\%$ vs. $45 \pm 7.4\%$, MW \pm SD).

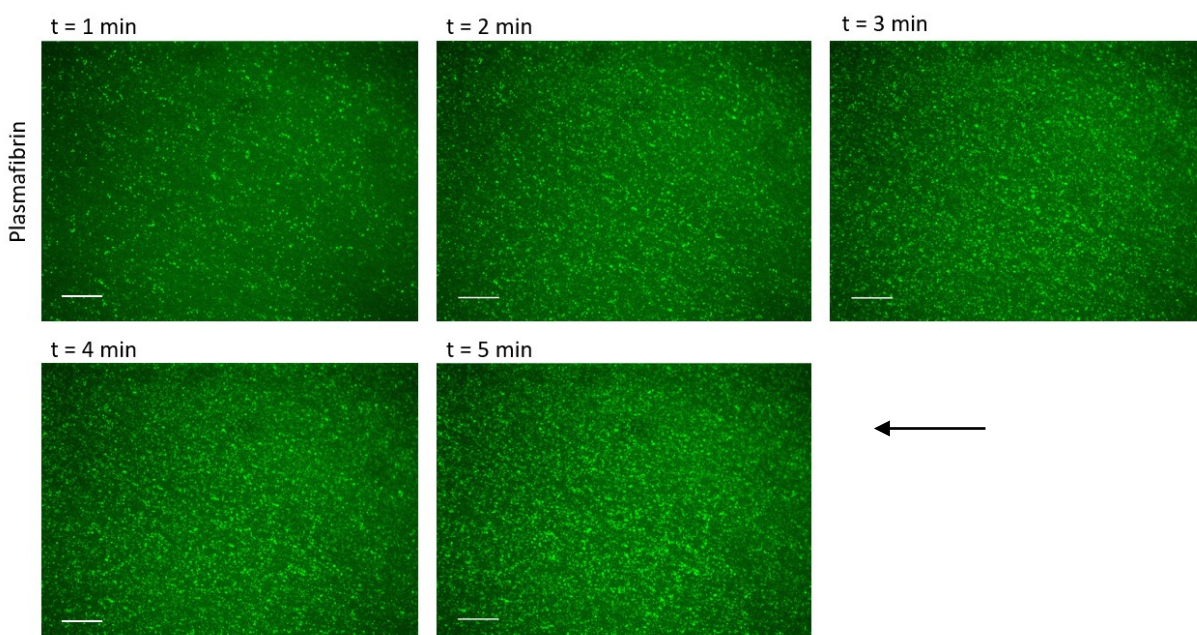


Abbildung 22: Minütliche Repräsentation der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation auf Plasmafibrin

Nach Inkubation (10 min, 37°C) des Hirudin-antikoagulierten Blutes mit DiOC6 zur Thrombozytenfärbung, wurde das Blut über Plasmafibrin (auf mit Denhardt-Lösung vorbehandelten Deckgläschen immobilisiert) geströmt. Dabei wurden über 5 min sekundliche Aufnahmen der Thrombozyten gemacht. Repräsentativ sind mikroskopische Aufnahmen zu den jeweils vollen Minuten abgebildet. Flussrichtung von rechts nach links. Maßstab = 100µm

Da für die Experimente mit Plasmafibrin eine Vorbehandlung der Deckgläschen mit Denhardt-Lösung notwendig war, um ein Ablösen der Fibrinnetze während des Blutflusses zu verhindern, wurden Kontrollexperimente durchgeführt (Abb. 23). Hierbei wurde nachgewiesen, dass die Experimente mit Fibrin, immobilisiert auf Deckgläschen ohne Vorbehandlung mit Denhardt-Lösung, vergleichbare Ergebnisse brachten. Somit beeinträchtigen die mit Denhardt-Lösung behandelten *Slides* die Resultate der Flussversuche nicht.

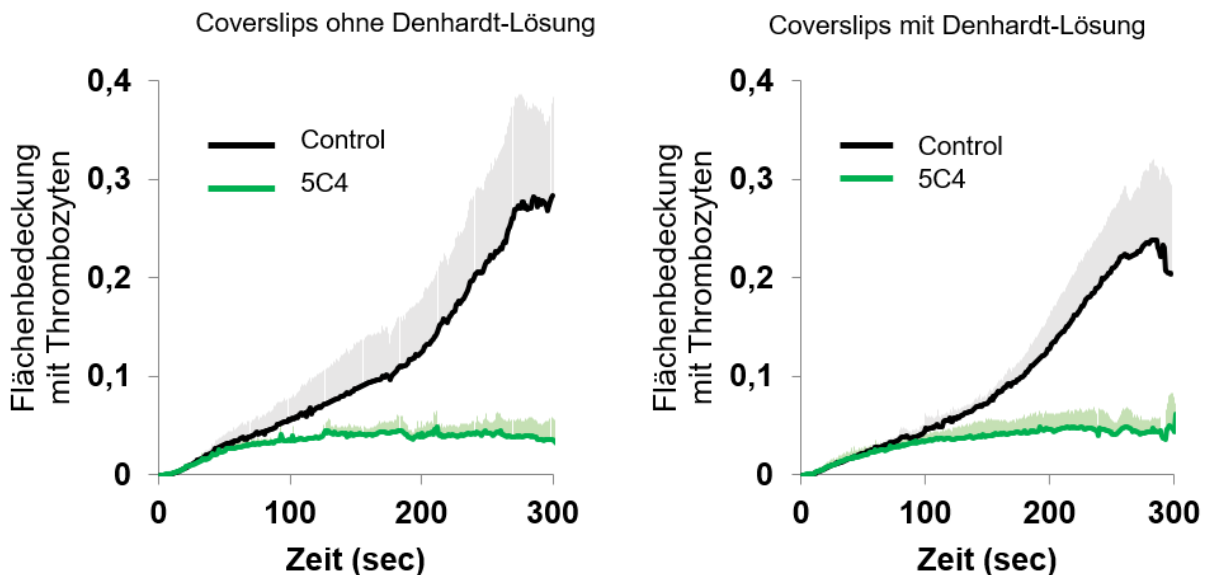


Abbildung 23: Wirkung des GPVI-AK 5C4 (5µg/ml) auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)

Kein Unterschied, ob Fibrin auf unbehandelten oder mit Denhardt-Lösung vorbehandelten Deckgläschen immobilisiert wurde. MW + SD (n=3)

5.3.2. Die Rolle von GPVI, GPIb und GPVI-Signaling durch Syk und Btk auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation (600/s)

5.3.2.1. Wirkung des GPVI-AK 5C4 auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s)

Auch hier wurde zunächst die Wirkung des GPVI-AK 5C4 auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozytenadhäsion/-aggregation bei einer Scherrate von 600/s untersucht. Im Vergleich zu den Versuchen auf reinem Fibrin war die Flächenbedeckung mit Thrombozyten durch die Hemmung von GPVI mit 5C4 nicht signifikant gehemmt (Abb. 24).

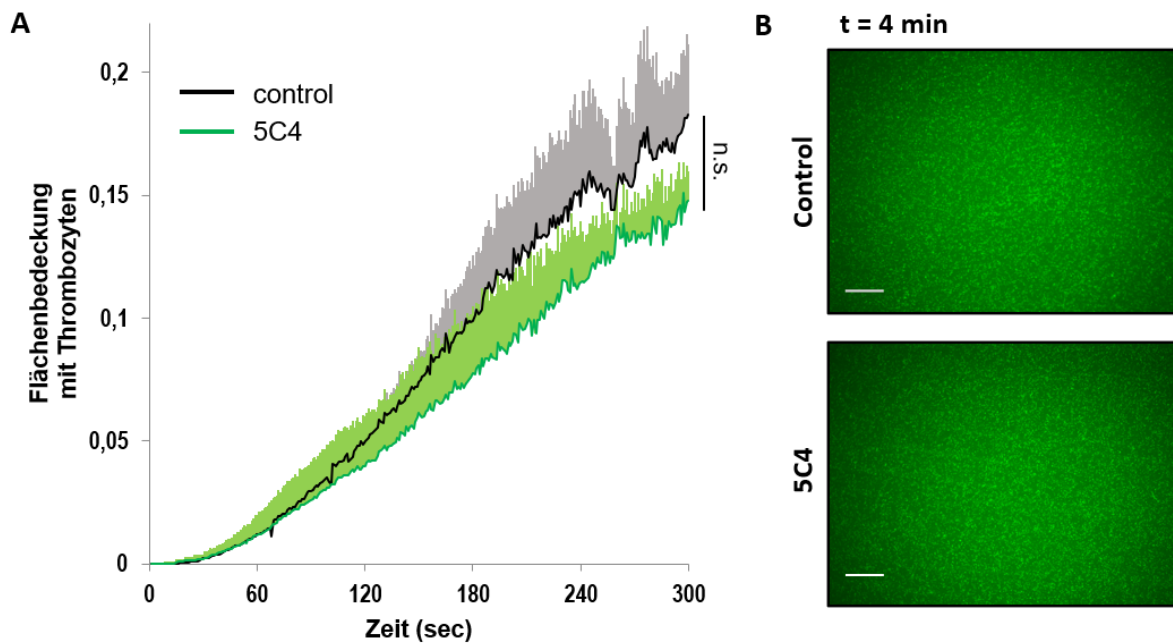


Abbildung 24: GPVI-AK 5C4 hemmt nicht signifikant die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellem Fluss (600/s).

A Kurvendiagramm der Wirkung von 5C4 auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion. MW + SD, n=5, n.s., nicht signifikant

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Wirkung von 5C4 auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts. Maßstab = 100µm

5.3.2.2. Wirkung des Syk-Inhibitor II auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s)

Des Weiteren wurde die Wirkung von Syk-Inhibitor II auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion- und Aggregation bei einer Scherrate von 600/s untersucht. Ebenso wie im vorherigen Versuch konnte auf Plasmafibrin im Vergleich zu reinem Fibrin keine signifikante Hemmung festgestellt werden (Abb. 25).

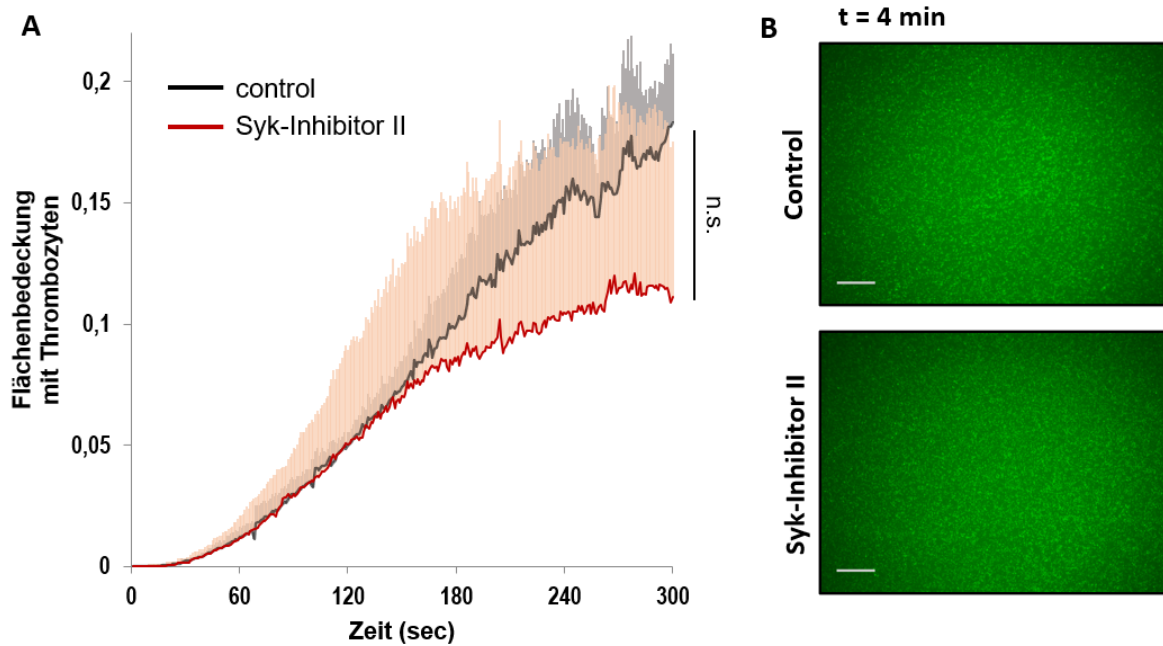


Abbildung 25: Syk-Inhibitor II (2 μ M) hemmt nicht signifikant die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellem Fluss (600/s).

A Kurvendiagramm der Wirkung von Syk-Inhibitor II auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion. MW + SD, n=5, n.s., nicht signifikant

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts. Maßstab = 100 μ m

5.3.2.3. Wirkung des GPIb-AK 6B4 auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s)

Bei der Untersuchung des GPIb-AK 6B4 auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozytenaktivierung bei einer Scherrate von 600/s wurde eine Inhibition der Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion gefunden, welche allerdings deutlich geringer ausgeprägt war als auf reinem Fibrin (Abb. 17; Abb. 26). Insgesamt war hier eine Hemmung von 57% nach 5 Minuten zu beobachten.

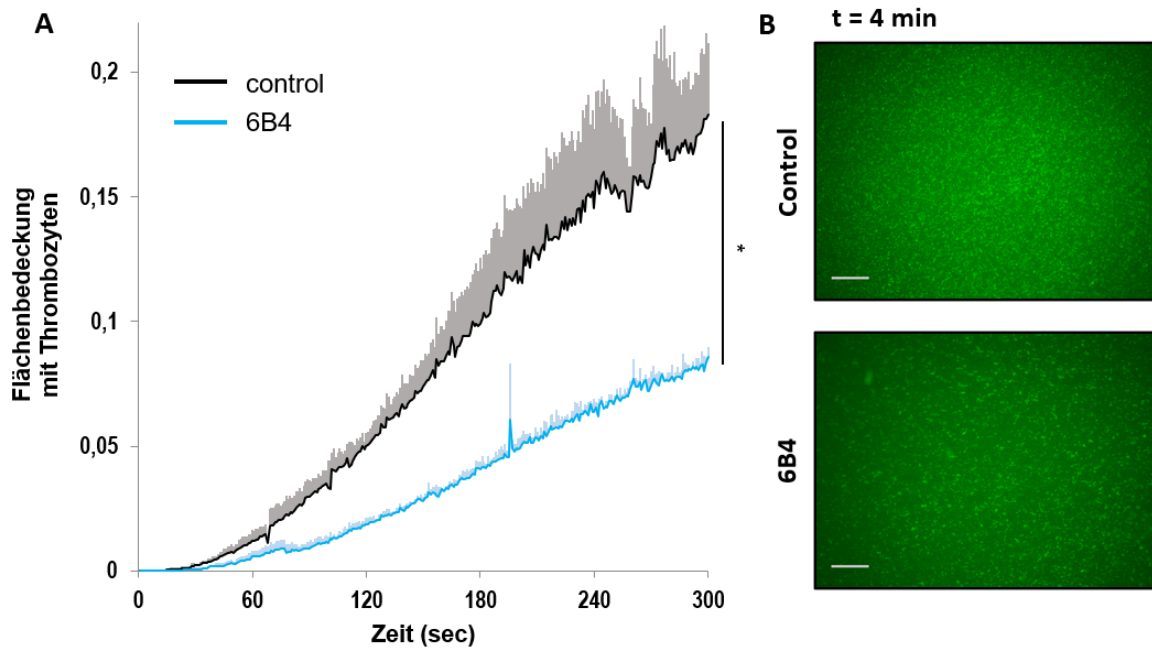


Abbildung 26: GPIb-AK 6B4 (5µg/ml) hemmt die Plättchen-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen

A Kurvendiagramm der Wirkung von 6B4 auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion. MW + SD, n=5, statistische Signifikanz bei t = 5min für Control vs. 6B4 (*: p <0.05)

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts. Maßstab = 100µm

5.3.2.4. Wirkung des BTKi Ibrutinib auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (600/s)

Bei Flussversuchen auf Plasmafibrin mit dem BTKi Ibrutinib bei Scherraten von 600/s konnte keine signifikante Hemmung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation festgestellt werden (Abb. 27).

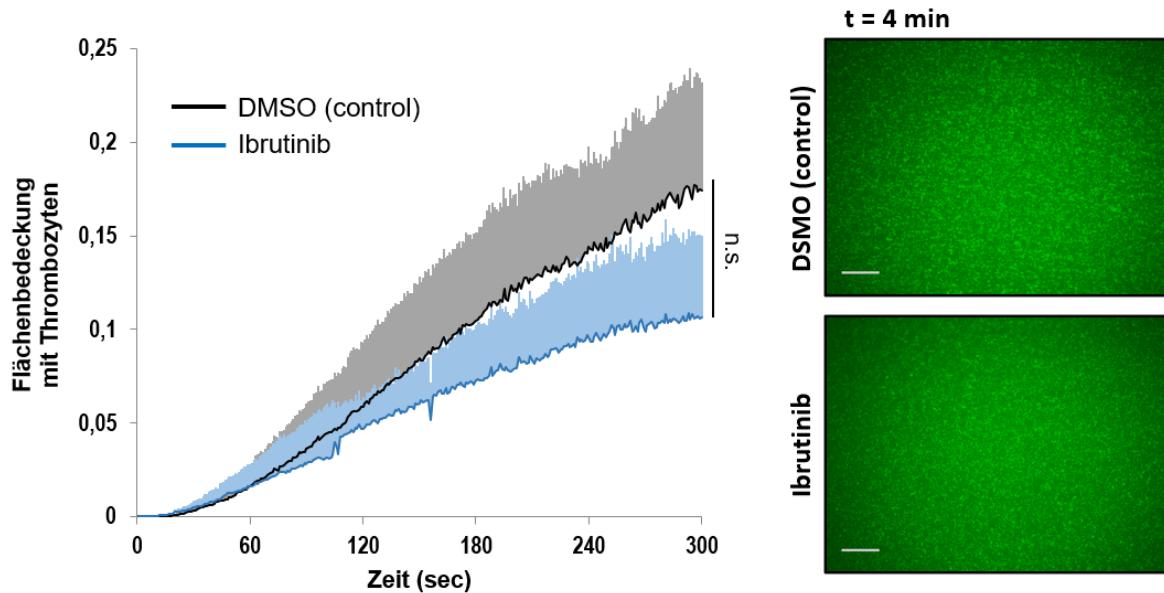


Abbildung 27: Ibrutinib hemmt die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s) nicht signifikant

A Kurvendiagramm der Wirkung von Ibrutinib auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion. Hirudin-antikoagulierten Blutes mit DiOC6 wurde mit DMSO (0.1%; Control) oder mit Ibrutinib (1 μ M) für 15 min bei 37°C vor-inkubiert. MW + SD, n=5, n.s., nicht signifikant

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts nach links. Maßstab = 100 μ m

5.3.3. Die Rolle von GPVI, GPIb und intrazellulärem GPVI-Signaling durch Syk und Btk auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation (1265/s)

Nach den Flussversuchen auf Plasmafibrin bei Scherraten von 600/s, wurde anschließend der Einfluss einer höheren Scherrate (1265/s) untersucht, welche auch in arteriellen Stenosen gemessen wird.¹¹ Es wurden dieselben Inhibitoren wie in den vorherigen Versuchen eingesetzt. Insgesamt konnte eine ähnliche Wirkung auch bei dieser hohen Scherrate beobachtet werden.

5.3.3.1. Wirkung des GPVI-AK 5C4 auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s)

Mit dem GPVI-AK 5C4 wurde wie bei der Scherrate von 1265/s keine signifikante Hemmung der Plasmafibrin-induzierten Thrombozytenaggregation beobachtet (Abb. 28).

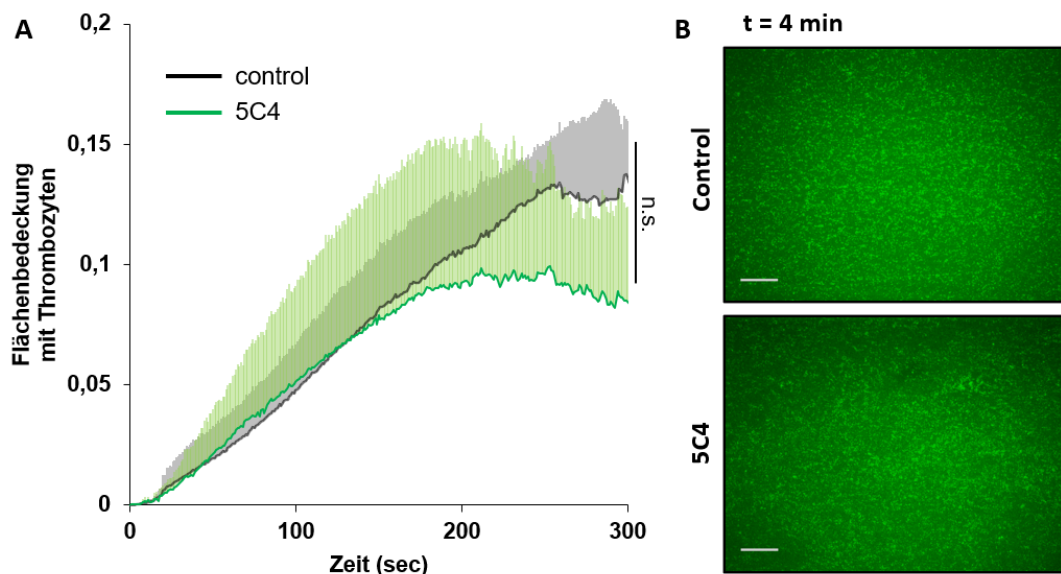


Abbildung 28: GPVI-AK 5C4 hemmt die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s) nicht

A Das repräsentative Kurvendiagramm zeigt die Wirkung von 5C4 auf die Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion. Vor dem Flussversuch erfolgte eine Prä-Inkubation des Hirudin-antikoagulierten Blutes mit DiOC6 ohne (Control) und mit 5C4 (5µg/ml) für 10 min bei 37°C. Bei einer Scherrate von 1265/s erfolgte die Aktivierung der Plättchen durch das auf dem Deckgläschen beschichtete Plasmafibrin. Sekündliche Messung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation über 5min. MW + SD, n=5, n.s., nicht signifikant

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts. Maßstab = 100µm

5.3.3.2. Wirkung des Syk-Inhibitor II auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s)

Im Folgenden wurde die Wirkung von Syk-Inhibitor II auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozytenaggregation bei einer Scherrate von 1265/s untersucht. Auch in diesem Fall konnte bei höherer Scherrate keine signifikante Inhibition der Thrombozyten-Aktivierung gemessen werden (Abb. 29).

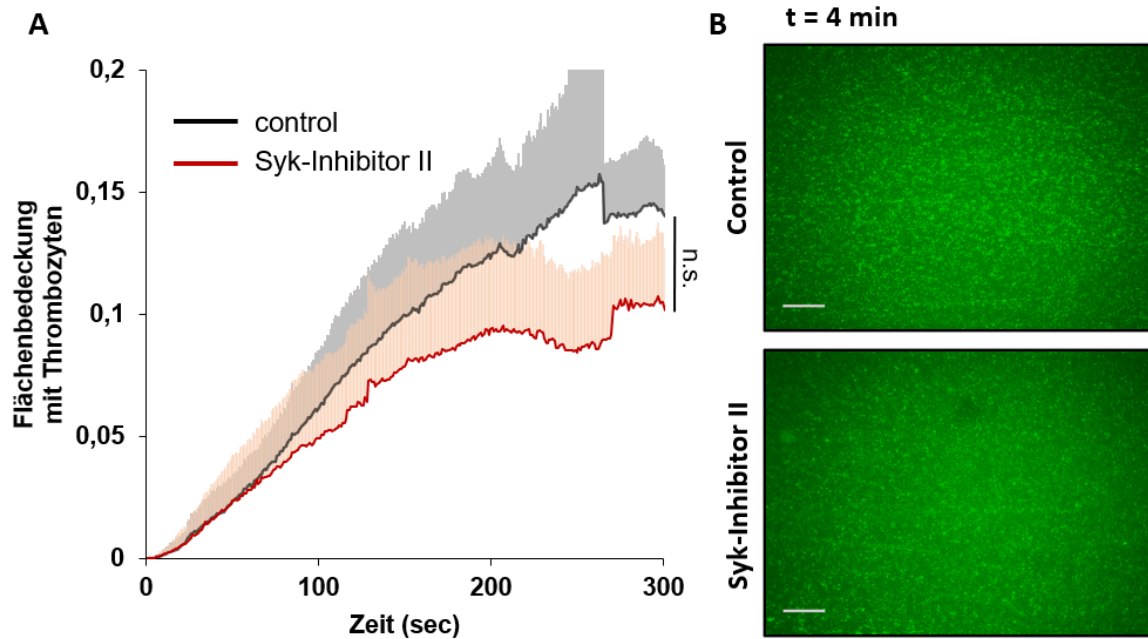


Abbildung 29: Syk-Inhibitor II ($2\mu\text{M}$) hemmt die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s) nicht

A Kurvendiagramm der Wirkung von Syk-Inhibitor II auf die Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion. MW + SD, $n=5$; n.s., nicht signifikant

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts. Maßstab = $100\mu\text{m}$

5.3.3.3. Wirkung des GPIIb-AK 6B4 auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s)

Im Vergleich zur geringeren Scherrate von 600/s war die hemmende Wirkung von GPIIb-AK 6B4 auf die Thrombozytenaggregation stimuliert durch Plasmafibrin bei der Scherrate von 1265/s stärker (93 % nach 5 min). Es wurden hier keine Thrombozyten-Aggregate und nur eine geringe Adhäsion beobachtet (Abb. 30).

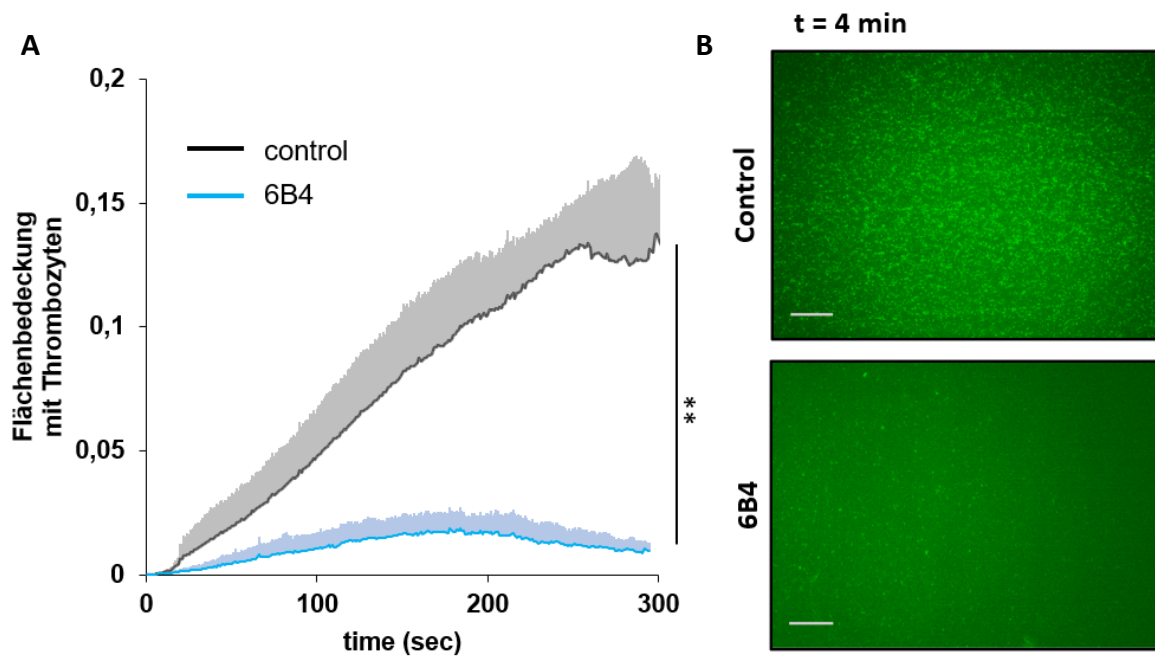


Abbildung 30: Der GPIIb-AK 6B4 (5µg/ml) hemmt die Plättchen-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s)

A Kurvendiagramm der Wirkung von 6B4 auf die Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion. MW + SD, n=4, statistische Signifikanz bei t = 4 min für Control vs. 6B4 (**: p < 0.01)

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts. Maßstab = 100µm

5.3.3.4. Wirkung des BTKi Ibrutinib auf die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung (1265/s)

Bei den Flussversuchen auf Plasmafibrin und einer Scherrate von 1265/s wurde mit dem BTKi Ibrutinib keine Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -Aggregation festgestellt (Abb. 31).

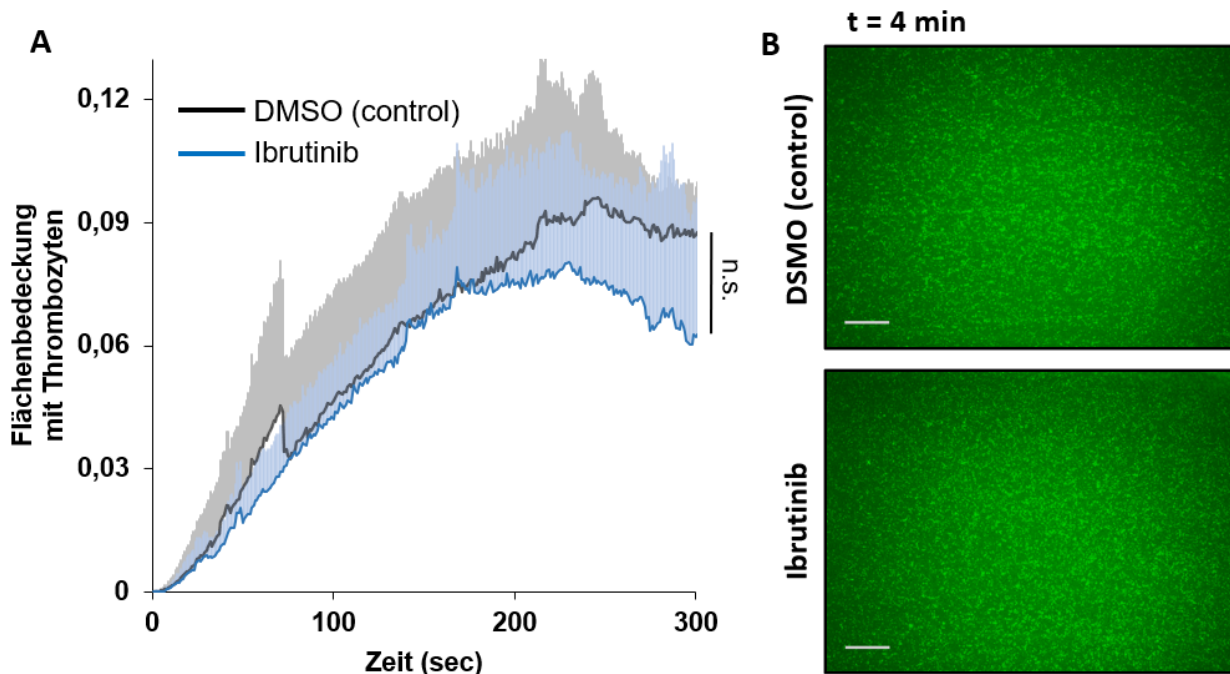


Abbildung 31: Ibrutinib hemmt die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s) nicht

A Kurvendiagramm der Wirkung von Ibrutinib auf die Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion. MW + SD, n=6, n.s., nicht signifikant

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts. Maßstab = 100µm

5.4. Tissue-Factor (TF)-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen

Um die Fibrin-Thrombozyten-Interaktion in einer Umgebung *ex vivo* nachzubilden, die der physiologischen Situation am ähnlichsten ist, wurde in der nächsten Versuchsreihe Fibrin direkt unter Blutfluss erzeugt. Hierfür wurde *Tissue Factor* auf mit Denhardt-Lösung vorbehandelten Glas Deckgläschen aufgetragen. Nach Rekonstitution des Citrat-antikoagulierten Blutes mit Magnesium und Kalzium und Perfusion des Blutes (Scherrate von 600/s) über den immobilisierten TF (Scherrate von 600/s) kam es durch Aktivierung der Gerinnungskaskade (extrinsischer *Pathway*) im Blut zur Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin welches dicke und sich in Flussrichtung orientierende Fasern bildete (Abb. 32). Durch die neu geformten Fibrinfasern wurden anschließend die Thrombozyten aktiviert.

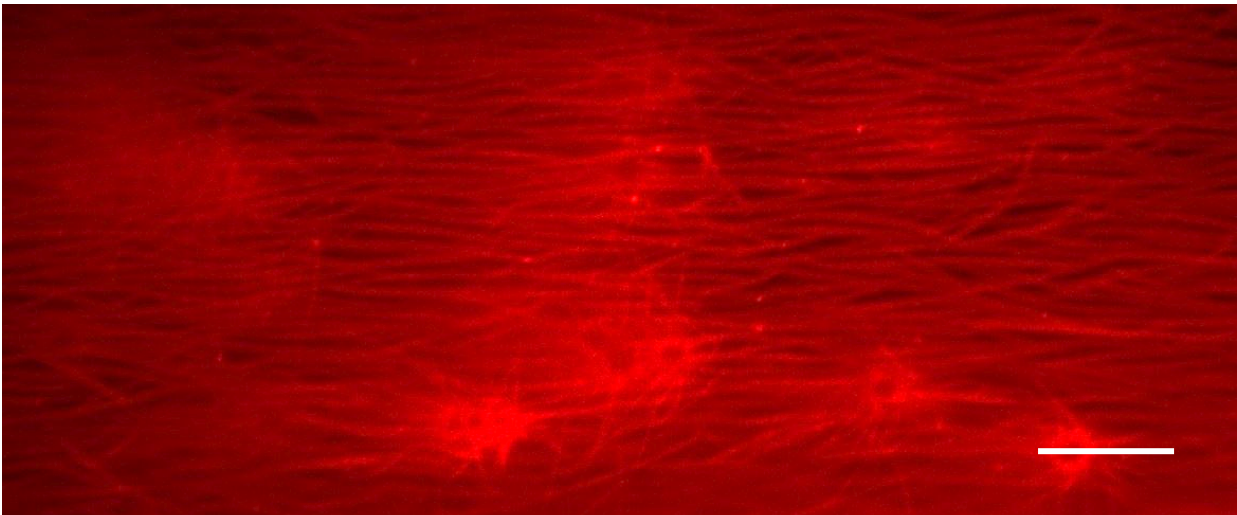


Abbildung 32: Repräsentative Darstellung des *Tissue Factor*-Fibrins

Vor dem Flussversuch erfolgte eine Prä-Inkubation des Citrat-antikoagulierten Blutes mit Alexa-Fluor 647 konjugiertem-Fibrinogen (10µg/ml) für 10 min bei 37°C. Das Citrat-Blut wurde direkt vor dem Flussversuch mit Magnesium und Kalzium rekonstituiert. Die Perfusion erfolgte über TF (auf Denhardt-Lösung behandelten Deckgläschen immobilisiert). Mikroskopische Darstellung des in Flussrichtung geformten TF-Fibrins. Flussrichtung von rechts nach links. Maßstab = 10µm

5.4.1. Vergleich zwischen Fibrin, Plasmafibrin und TF-Fibrin induzierter Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation

Vergleicht man nun die Thrombozyten-Aktivierung auf Fibrin, Plasmafibrin und TF-Fibrin, ist die Aktivierung durch letzteres am stärksten (Abb. 33). Die Plättchen-Aggregate waren 3- bis 4-mal so groß wie auf Fibrin.

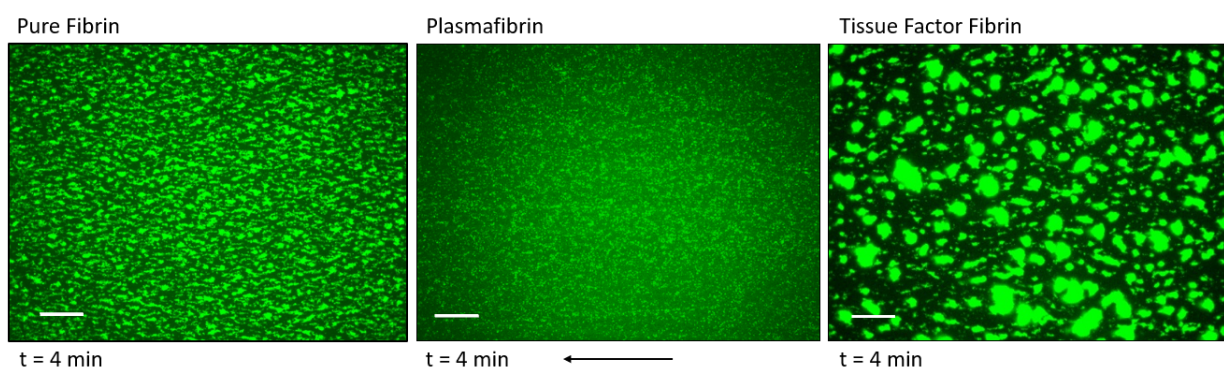


Abbildung 33: Repräsentative Darstellung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation auf den verschiedenen Fibrinarten nach 4 min

Nach 10 min Inkubation des Hirudin- bzw Citrat-antikoagulierten Blutes mit DiOC6 bei 37°C, wurde das Blut über die verschiedenen Fibrinarten perfundiert. **Links:** Fibrin, **Mitte:** Plasmafibrin, **Rechts:** TF-Fibrin. Hier wurde das Citrat-Blut vor dem Flussversuch mit Magnesium und Kalzium rekonstituiert. Repräsentativ sind mikroskopische Aufnahmen nach 4 Minuten Blutfluss abgebildet. Flussrichtung von rechts nach links. Maßstab = 100µm

5.4.2. Wirkung des GPVI-AK 5C4 auf die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung

Zunächst wurde analog zu den bereits untersuchten Fibrinarten die Wirkung des GPVI-AK 5C4 auf die durch TF-Fibrin-induzierte-Thrombozytenaggregation untersucht. Dafür wurde im fließenden Blut (Scherrate von 600/s) die Fibrinbildung durch immobilisierten TF getriggert und die nachfolgende Thrombozyten-Adhäsion und Aggregation an TF-Fibrin gemessen, welche mit einer Verzögerung von ca. 20 Sekunden begann. Anders als bei der TZ-Aktivierung durch Fibrin (Abb. 12), gingen Adhäsion und Aggregation ineinander über. Es waren keine 2 Phasen (sigmoidaler Verlauf) der Kinetik der Bedeckung mit Thrombozyten zu beobachten. Nach Einsatz von 5C4 wurde keine signifikante Inhibition der Kinetik und des Maximums der Plättchen-Adhäsion und -Aggregation gefunden (Abb. 34).

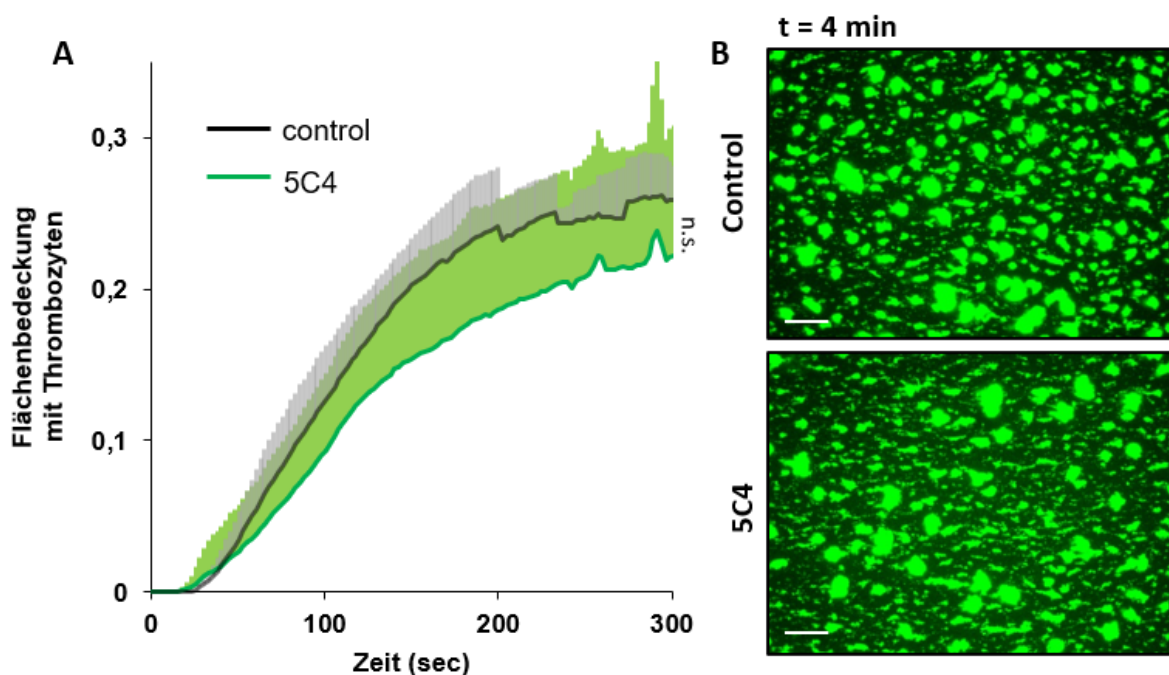


Abbildung 34: GPVI-AK 5C4 hemmt die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s) nicht

A Wirkung von 5C4 auf die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion. Vor dem Flussversuch erfolgte eine Prä-Inkubation des Citrat-antikoagulierten Blutes mit DiOC6 ohne (Control) und mit 5C4 (5µg/ml) für 10 min bei 37°C. Nach Rekonstitution des Blutes mit Magnesium- und Kalzium und Perfusion (600/s) über mit TF beschichteten Glas Deckgläschen, erfolgte die Aktivierung der Plättchen durch das während des Blutflusses gebildete TF-Fibrin. Sekündliche Messung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation über 5min. MW + SD, n=5, n.s., nicht signifikant

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts. Maßstab = 100 µm

5.4.3. Wirkung des Syk-Inhibitor II auf die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung

Im Weiteren wurde auch hier die Wirkung des Syk-Inhibitors II auf die TF-Fibrin-induzierte Thrombozytenaggregation gemessen. Nach gleichem Vorgehen wie in den vorherigen Experimenten wurde im rekonstituierten Citrat-Blut Fibrin durch TF gebildet und die Plättchen-Aktivierung untersucht. Es wurde auch bei diesen Versuchen keine signifikante Hemmung der Thrombozytenaggregation gefunden (Abb. 35).

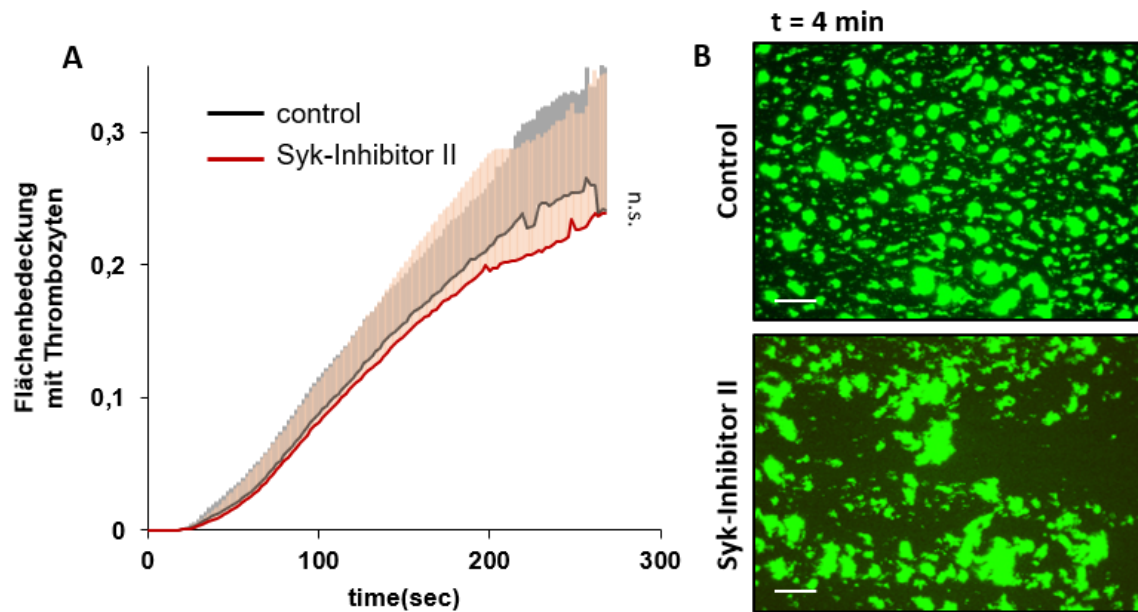


Abbildung 35: Syk-Inhibitor II ($2\mu\text{M}$) hemmt die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen ($600/\text{s}$) nicht

A Kurvendiagramm der Wirkung von Syk-Inhibitor II auf die Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion. Zwei-Sekündliche Messung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation über 5min. Zur Durchführung des Versuches siehe Legende Abb.35. MW + SD, $n=5$, n.s., nicht signifikant

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts. Maßstab = $100\mu\text{m}$

5.4.4. Wirkung des GPIIb-AK 6B4 auf die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung

Des Weiteren wurde der Einfluss des GPIIb-AK 6B4 auf die TF-Fibrin induzierte Thrombozyten-Aktivierung untersucht. Bei diesen Experimenten wurde eine signifikante Hemmung festgestellt (Abb. 36).

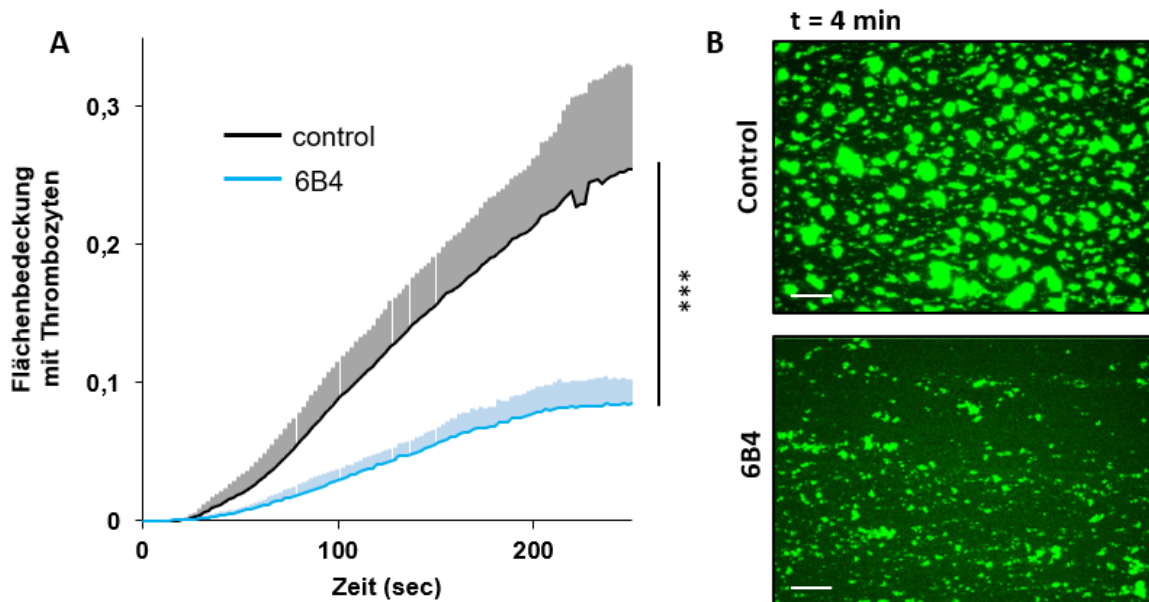


Abbildung 36: GPIIb-AK 6B4 (5 μ g/ml) hemmt die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)

A Kurvendiagramm der Wirkung von 6B4 auf die Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion. Zur Durchführung des Versuches siehe Legende Abb.35. MW + SD, n=5, statistische Signifikanz bei t = 4 min für Control vs. 6B4 (***: p < 0.001).

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts. Maßstab = 100 μ m

5.4.5 Wirkung des BTKi Ibrutinib auf die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung

Abschließend wurde auch in dieser Versuchsreihe der BTKi Ibrutinib untersucht. Auf TF-Fibrin konnte kein signifikanter Unterschied der Thrombozytenaggregation zwischen der Kontrolle und in mit Ibrutinib behandeltem Blut nachgewiesen werden (Abb. 37).

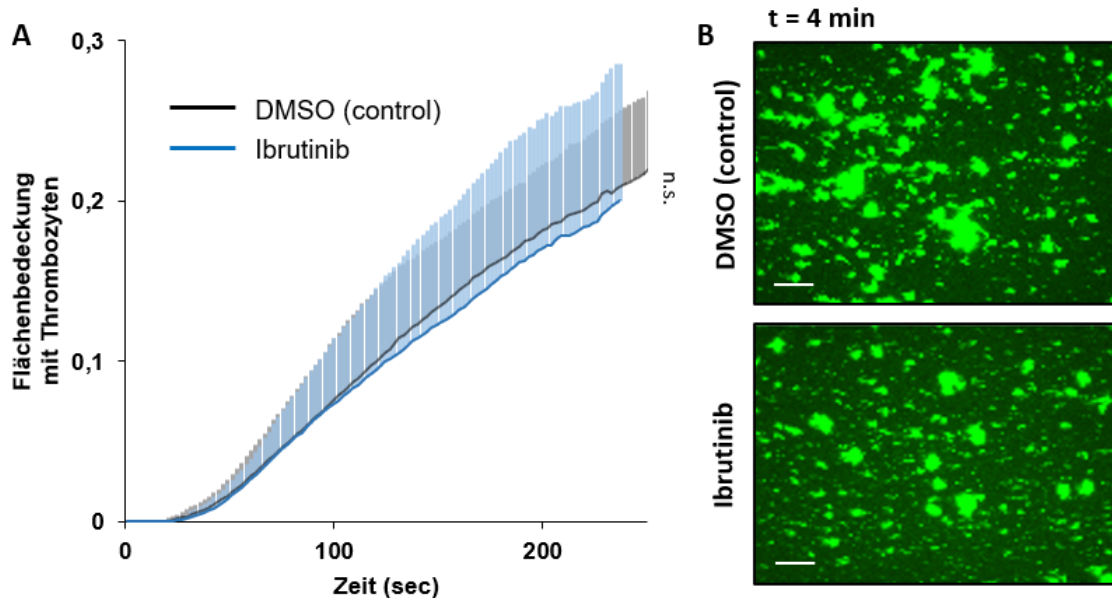


Abbildung 37: Ibrutinib hemmt die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s) nicht

A Kurvendiagramm der Wirkung von Ibrutinib auf die Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion. Vor dem Flussversuch erfolgte eine Prä-Inkubation des Hirudin-antikoagulierten Blutes mit DiOC6 entweder mit DMSO (0,1%, Control) oder mit Ibrutinib (1µM) für 15 min bei 37°C. Nach Rekonstitution der Magnesium- und Kalziumkonzentration im Blut erfolgte die Thrombozytenaktivierung durch im Blut gebildetes (TF-induziert) Fibrin bei einer Scherrate von 600/s. Sekündliche Messung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation über 5min. MW + SD, n=5, n.s., nicht signifikant

B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation nach Blutfluss von 4 min. Flussrichtung von rechts. Maßstab = 100 µm

5.5. Plasmafibrinnetz: Inkorporation von einer Vielzahl von Proteinen

Betrachtet man die durch die verschiedenen Fibrinarten hervorgerufenen Aggregations- und Adhäsionskurven der Thrombozyten im Vergleich, scheinen die GPVI-Signalwege (außer bei der Stimulation durch Fibrin) keine Rolle bei der Plättchen-Aktivierung durch endogen gebildete Fibrinarten (Plasmafibrin und TF-Fibrin) zu spielen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Inkorporation von Plasmaproteinen in die Fibrin-Netzwerke sein. Mithilfe von Silberfärbung und *Immunoblotting* (s. Methoden) konnte eine Vielzahl von Proteinen im Plasmafibrin im Vergleich zum rekombinanten und reinen Fibrin nachgewiesen werden (Abb. 38, 39). In der Silberfärbung zeigten sich beim rekombinanten Fibrinogen/ Fibrin und reinem Fibrinogen deutlich die Banden der drei Polypeptidketten: α , β , und γ , welche das Grundkonstrukt des Fibrinogen-Moleküls bilden. Bei reinem Fibrin ist statt einer starken γ -Bande bei 98 kDa zusätzlich eine prominente Bande (*) zu sehen. Diese stellt am ehesten eine sog. γ - γ Dimerkette, die durch Faktor XIII *Crosslinking* entstanden ist und mit einem höheren molekularen Gewicht (Mw) einhergeht. Die breite Bande bei reinem Fibrin (***) stellt sehr wahrscheinlich bei der Polymerisation entstandene α -Ketten-Polymere dar. Diese Vermutungen bestätigten sich auch im Immunblot mit anti-Fibrinogen γ -Ketten und anti-FXIII Antikörpern (s.u.).

Um zusätzliche Proteine in den Fibrinnetzwerken nachzuweisen, wurden Antikörper gegen die FXIII B-Untereinheit, Fibronectin, vWF und Vitronectin eingesetzt. Plasmafibrin beinhaltete erwartungsgemäß eine Vielzahl von Proteinen. Neben Faktor XIII und γ - γ Dimere, wurden exklusiv bei Plasmafibrin Fibronectin, vWF und Vitronectin nachgewiesen. Die zusätzlich dargestellten Banden stellen höchstwahrscheinlich degradierte Proteinanteile dar. Die immunoreaktive 98 kDa-Bande in den Immunoblots von reinem und rekombinantem Fibrinogen, und rekombinantem Fibrin mit dem Fg- γ -Ketten Antikörper könnte durch die hohe Affinität des Antikörpers für die γ -Kette, die in der intramolekularen kreuz-vernetzten α - γ heterodimeren Kette vorhanden ist, erklärt werden. Diese kommt bis zu 2 % in Fibrinogen vor.¹¹³ Diese Erklärung ist plausibel, da in dieser Position in der Silberfärbung kaum Proteine nachgewiesen wurden. Interessanterweise enthielten im Gegensatz zu rekombinantem Fibrin nur reines Fibrinogen und Fibrin Faktor XIII. Dies erklärt die Bildung der γ - γ Dimerketten (98kDa Bande) und α -Polymerketten in reinem Fibrin (Abb. 38).

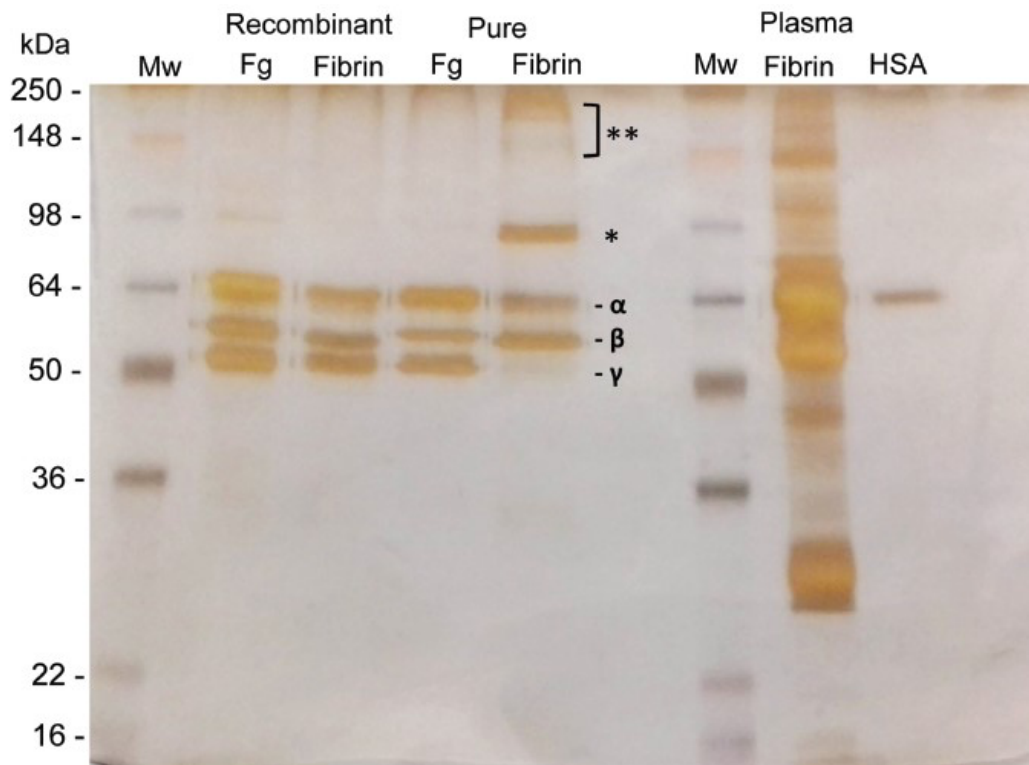


Abbildung 38: Silberfärbung der Proteine. Plasma-Fibrin inkorporiert im Vergleich zu rekombinatem und reinem (*pure*) Fibrin zusätzliche Proteine

Die unterschiedlichen Fibrinarten wurden entsprechend der oben beschriebenen Methoden auf Glas Deckgläschen aufgetragen. Kontroll-Proteine (150 ng), rekombinantes Fibrinogen und Fibrin, reines Fibrinogen and Fibrin (je 300 ng), und Plasma-Fibrin (1 µg) wurden in Laemmli Puffer mit 5% β-Mercaptoethanol suspendiert und anschließend in SDS-PAGE nach Größe getrennt. In der Silberfärbung deuten α, β, und γ die Position der einzelnen Fibrinogen Ketten an. Das Sternchen bei reinem Fibrin zeigt die Position von γ-γ Dimeren an; das Doppel-Sternchen deutet vermutlich die Position der α-Polymerketten an. Mw: molecular weight markers; Fg: Fibrinogen; HSA: humanes Serum Albumin; γ: γ-Kette von Fibrinogen; γ-γ: γ-Ketten Dimer;

Immunoblots

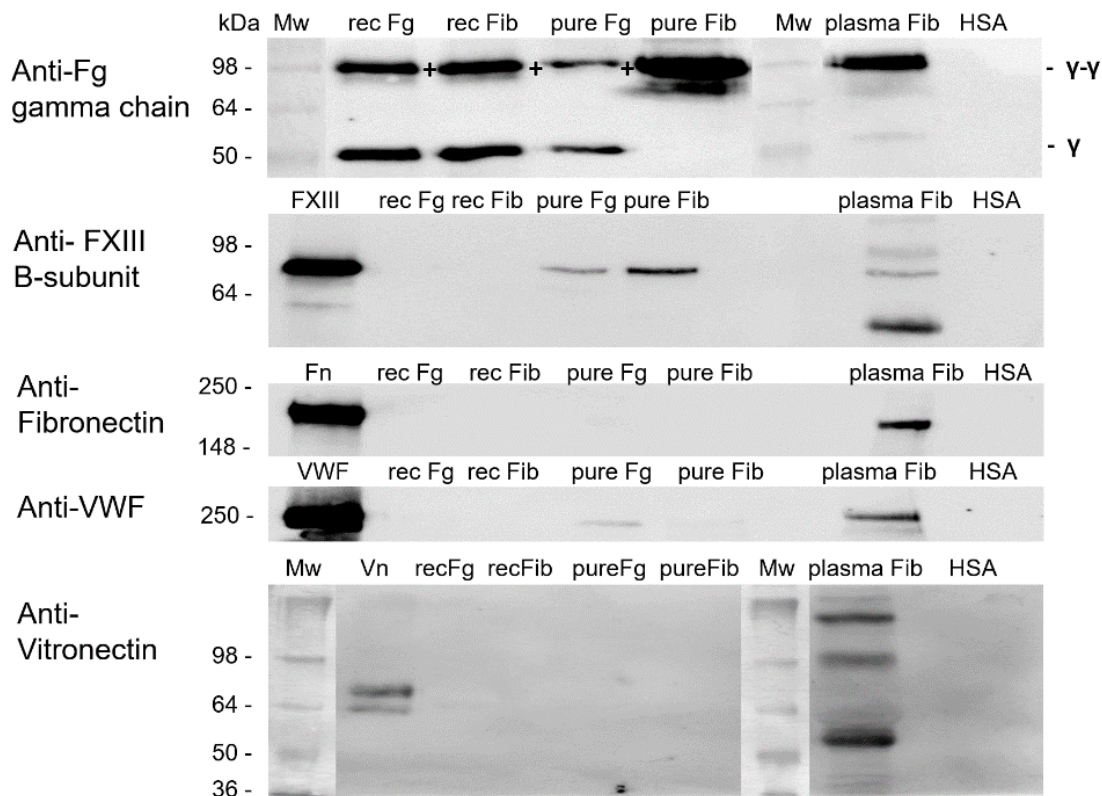


Abbildung 39: Immunoblots der Proteine in den verschiedenen Fibrinnetzwerken. Plasmafibrin inkorporiert im Vergleich zu rekombinantem und reinem (*pure*) Fibrin zusätzliche Proteine

Kontrollproteine (150 ng), Fibrinogen, Fibrin und HSA durch 7% SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (VWF, Fibronectin) bzw. 12% SDS-PAGE (Factor XIII, Vitronectin) getrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulose-Membrane und einstündiger Blockade mit 1% *Amersham ECL Prime Blocking Reagent* und 1X *Roti®-Block* wurde das Fibrin/Fibrinogen anschließend mit primären Antikörpern und *Horseradish Peroxidase* (HRP) konjugierten sekundären Antikörpern behandelt. Zur Detektion der Proteine erfolgte ein Zusatz von *SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate*.

Links rekombinantes (*rec*) Fg/Fibrin (Fib), **Mitte** reines (*pure*) Fg/Fibrin (Fib). **Rechts** Plasmafibrin

Mw: molecular weight markers; Fg: Fibrinogen; Fib: Fibrin; HSA: humanes Serum-Albumin; γ : γ -Kette von Fibrinogen; γ - γ : γ -Dimer-Kette; Fn: Fibronectin; Vn: Vitronectin

5.6. Structured illumination microscopy (SIM) und confocal laser scanning microscopy von Fibrin und Thrombozyten

Um die beobachteten funktionellen Unterschiede der Rolle von GPVI für die Thrombozytenaktivierung durch die verschiedenen Fibrinarten und die mögliche Rolle von Plasmaproteinen, vor allem Albumin, aufzuklären, nutzten wir zur genauen Darstellung der Fibrin-Netzstrukturen und der Thrombozyten SIM- und *Confocal Laser Scanning* Mikroskopie. Beides sind bildgebende Verfahren, mit welchen fixierte Präparate hochauflösend dargestellt werden können. Sie wurden in dieser Arbeit genutzt, um mögliche strukturelle Unterschiede von künstlichem Fibrin und Plasmafibrin und der an diese Fibrine adhätierenden Thrombozyten aufzuklären.

5.6.1. Vergleich des strukturellen Aufbaus der unterschiedlichen Fibrinarten

Die Herstellung des Fibrins und die Beschichtung der Deckgläschen mit Fibrin erfolgte analog den oben beschriebenen Flussversuchen. Vor der Fibrinbildung wurde fluoreszenzmarkiertes Fibrinogen (AlexaFluor-594, rot) hinzugefügt, um die Fibrinnetze anzufärben. Unmittelbar nach Bildung der Fibrinnetze war der Unterschied zwischen der Höhe der Fibrinnetze auffallend. Das Plasmafibrinnetz war durchschnittlich 30 μm hoch, während reines Fibrin lediglich eine dünne Beschichtung von nur etwa 2 μm bildete.

Weiter differierte die Netzstruktur der beiden Fibrinarten erheblich (Abb. 40). Die Grundstruktur des Plasmafibrinnetzes zeigte sich eher locker und bestand aus längeren Fibrinfasern. Das reine Fibrinnetz hingegen erschien dichter, mit mehr Verzweigungspunkten und irregulär zusammengesetzt. Betrachtete man nur die einzelnen Fibrinfasern, konnte man feststellen, dass das reine Fibrin einen mittleren Faserdurchmesser von 0,18 μm ($\pm 0,6\mu\text{m}$) hatte, während die Plasmafibrinfasern mit 0,28 ($\pm 0,9\mu\text{m}$) (MW \pm SD, n= 30) deutlich dicker waren und knotiger aussahen (beispielhaft dargestellt in Abb. 41B). Zusätzlich zeigte sich, dass das Fasernetz aus Plasmafibrin einheitlicher war, während das Netz aus reinem Fibrin unregelmäßiger wirkte.

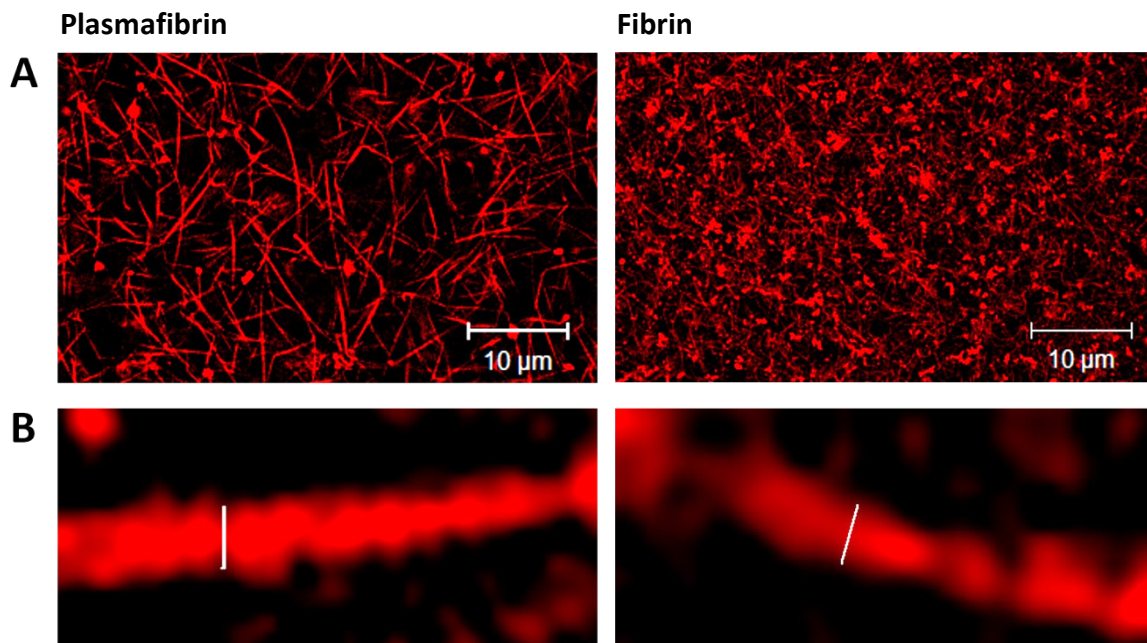
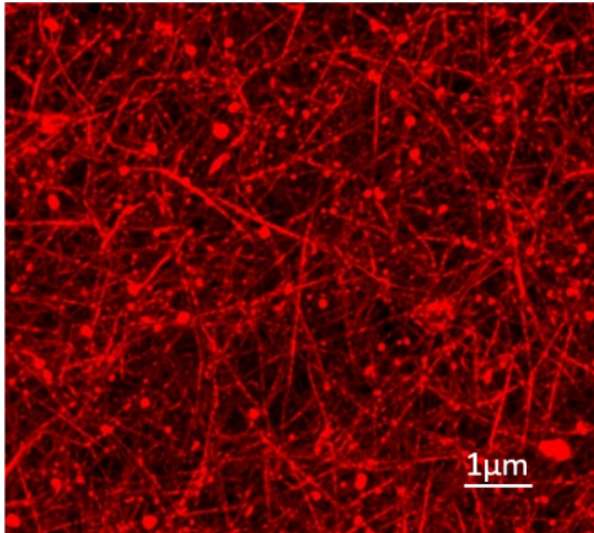


Abbildung 40: Plasmafibrin (links) und Fibrin (rechts) unterscheiden sich in der Netzstruktur und der Faserdicke. SIM-Bildgebung

Fluoreszenzmarkiertes (AlexaFluor-594) Fibrinogen wurde vor der Fibrinbildung zu Plasma bzw. Fibrinogen gegeben. SIM-Aufnahmen von aufeinanderfolgenden Abschnitten (z-Ebenen) des Fibrinnetzes. Repräsentative Darstellung: **A** Netzstruktur Plasmafibrin (links; z = 0,2 μm) und Fibrin (rechts; z = 0,12 μm). **B** Darstellung von einzelnen Fibrinfasern. Plasmafibrin (links) und Fibrin (rechts) mit Faser-Durchmessern von 0,28 μm und 0,18 μm . Maßstab = 10 μm

Eine gute Übersicht der Unterschiede zwischen den Netzstrukturen der beiden Fibrinnetzwerke bieten auch die überlagerten Aufnahmen aller aufgenommenen Schichten der TPSLM-Aufnahmen, der sogenannten *Maximal Intensity Projection* (MIP; Abb. 41).

Plasmafibrin



Fibrin

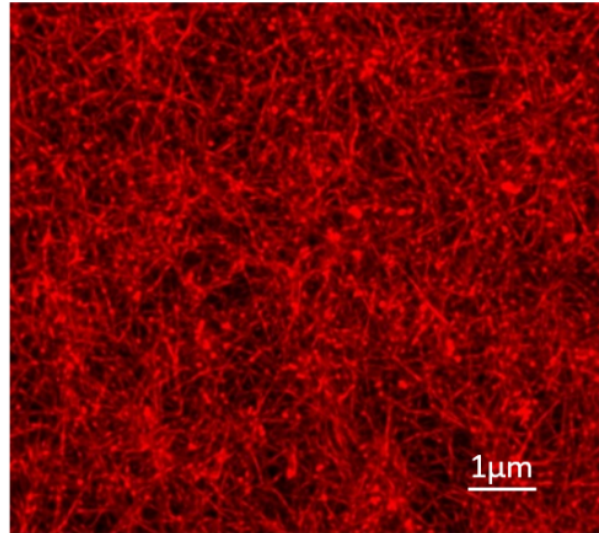


Abbildung 41: Aufnahmen der Fibrinnetze in der *Maximal Intensity Projection* (MIP). *Confocal Laser Scanning* Mikroskopie (TPSLM-Aufnahmen)

Fluoreszenzmarkiertes (AlexaFluor-594) Fibrinogen wurde vor der Fibrinbildung zu Plasma und Fibrinogen gegeben. MIP-Aufnahmen der jeweiligen Fibrinnetze. Plasmafibrin (links). Fibrin (rechts). Maßstab = 1 μm

5.6.2. Vergleich der aktivierten Thrombozyten auf reinem Fibrin und Plasmafibrin

Um die Thrombozytenaktivierung darzustellen, wurden die Thrombozyten jeweils auf Plasmafibrin und reinem Fibrin unter arteriellen Flussbedingungen (Scherraten: 600/s und 1265/s) untersucht. Dafür wurde der Blutfluss nach 2 min unterbrochen und das Präparat fixiert (s. Methoden). Da das Netz aus Plasmafibrin erheblich höher war, wurden die Flussraten entsprechend angepasst, um die erwünschte Scherrate zu erhalten. Sowohl bei niedriger als auch bei hoher Scherrate war die Adhäsion der Thrombozyten auf Plasmafibrin niedriger als auf reinem Fibrin. Zusätzlich entwickelten die Thrombozyten auf Plasmafibrin bei beiden Scherraten weniger Pseudopodien und erschienen morphologisch kleiner und runder (Abb. 42). Eine mögliche Erklärung könnte eine erniedrigte Aktivierung der Blutplättchen durch die Besetzung der Fibrinfasern mit Plasmaproteinen sein (Abschirmung der Fibrinfaser). Plasmaproteine sind bei reinem Fibrin nur eventuell als Verunreinigung vorhanden, und Thrombozyten können daher ungehindert durch Fibrin bereits früh aktiviert werden. Einen anschaulichen Vergleich der Morphologie der adhätierenden Thrombozyten auf Plasmafibrin und Fibrin zeigen die statischen Videoaufnahmen nach Beendigung des Flussversuchs, bei denen über die verschiedenen Z-Ebenen das Fibrinnetz bis zu den Thrombozyten durchleuchtet wird (Video 1-6, auf beigelegtem USB-Stick; s. Videoverzeichnis).

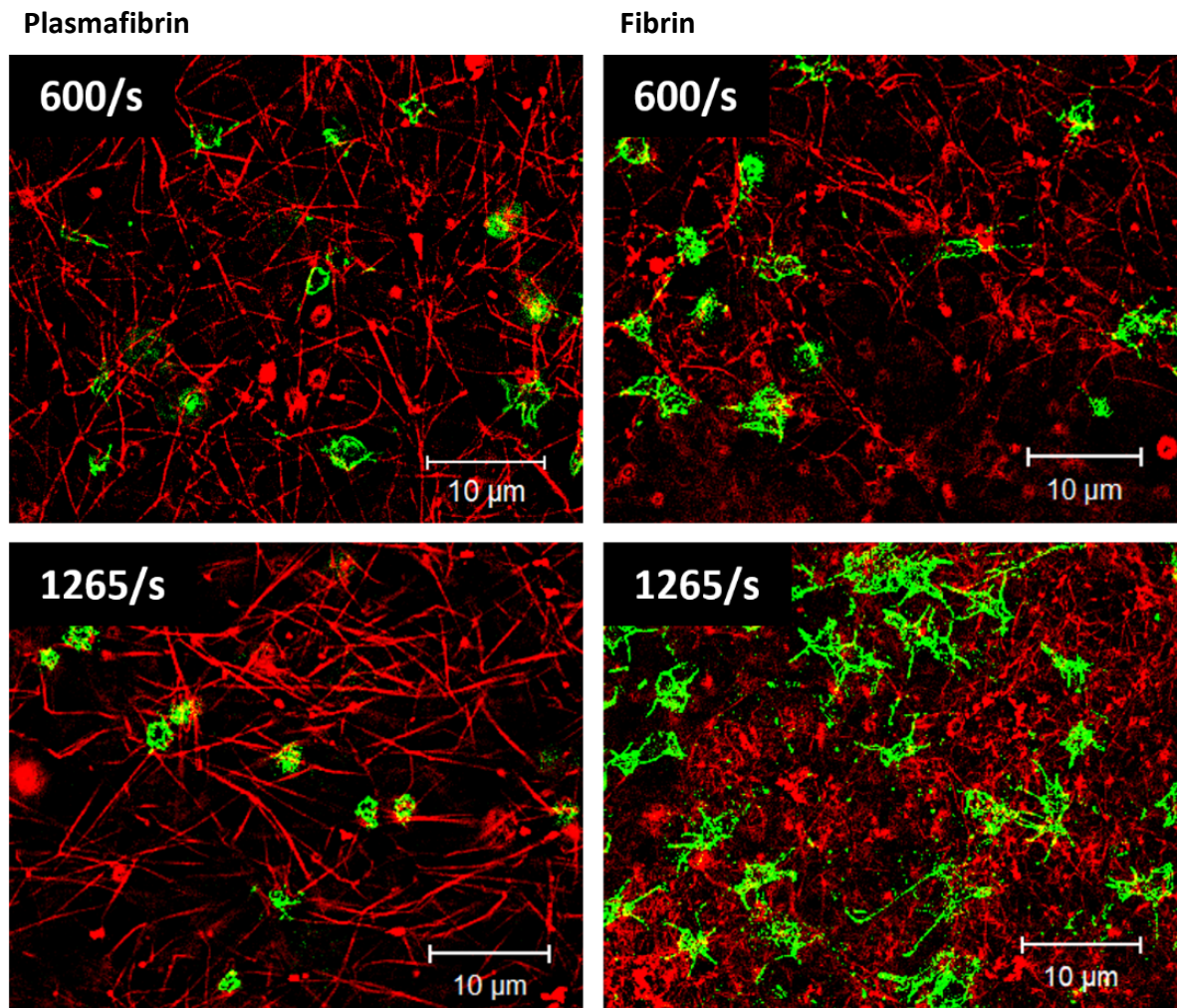
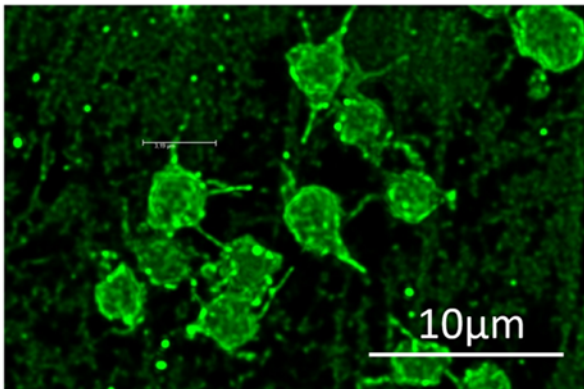


Abbildung 42: Repräsentative Bilder der Thrombozytenadhäsion auf Plasmafibrin und reinem Fibrin unter arteriellen Flussbedingungen. SIM-Bildgebung

Fluoreszenzmarkiertes (AlexaFluor-594) Fibrinogen wurde vor der Fibrinbildung zu Plasma (links) oder Fibrinogen (rechts) gegeben, und die Fibrin-beschichteten Deckgläschen wurden in Flusskammern (ibidi) montiert. Vor Perfusion am Nikon-Mikroskop mit zwei Scherraten (wurde dem Hirudinblut DiOC6 zur orientierenden Plättchen-Färbung während des Versuchs zugefügt). Nach 2 Minuten wurde der Blutfluss gestoppt und das Präparat mit einem PBS-Puffer, der PFA (4%) und EDTA (5mM) enthielt, zur Waschung und Fixierung der Thrombozyten überströmt. Danach erfolgte die erneute Färbung der Thrombozyten mit konjugiertem anti-CD41-Alexa-Fluor 488 (grün). Anschließend erfolgte die Einbettung des Präparates in *Prolong Diamond Antifade Mountant* und die Darstellung mittels SIM. **Links** Thrombozytenadhäsion auf Plasmafibrin (links; $z = 0,15 \mu\text{m}$). **Rechts** Thrombozytenadhäsion auf reinem Fibrin (rechts; $z = 0,12 \mu\text{m}$). Scherraten von 600/s (obere Reihe) und 1265/s (untere Reihe) nach 2-minütigem Blutfluss. Blutfluss von rechts nach links. Maßstab = 10 μm

Die maximale optische Auflösung einzelner Thrombozyten verdeutlicht den Unterschied in der Morphologie der aktivierten Thrombozyten auf den beiden Fibrinarten (Abb. 43).

Plasmafibrin



Fibrin

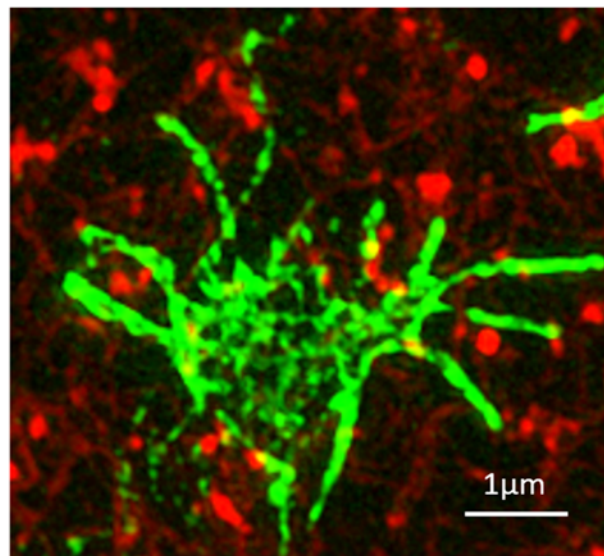
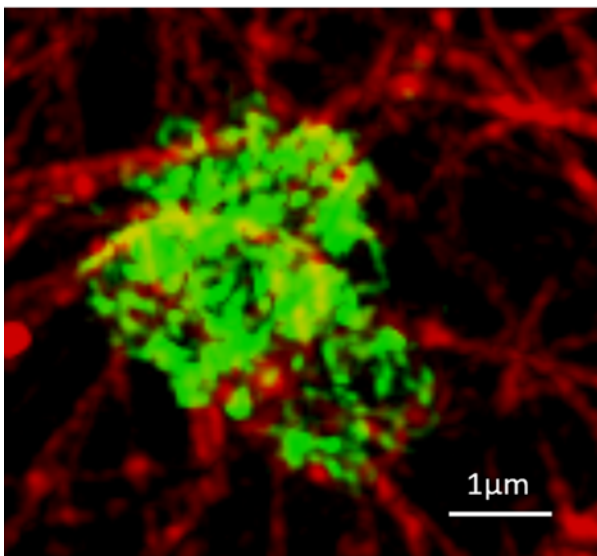
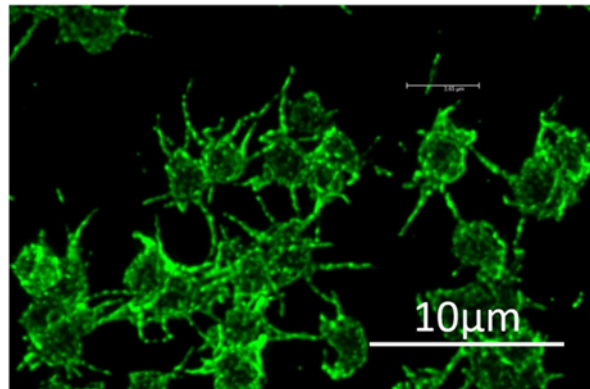


Abbildung 43: Repräsentative Bilder einzelner adhätierender Thrombozyten auf Plasmafibrin und reinem Fibrin unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 1265/s).

Obere Reihe TPSLM-Bildgebung (MIP). **Links** Thrombozyt auf Plasmafibrin. **Rechts** Thrombozyt auf reinem Fibrin. Maßstab = 10 µm. Scherrate 1265/s

Untere Reihe SIM-Bildgebung. **Links** Thrombozyt auf Plasmafibrin (links; $z = 0,15 \mu\text{m}$). **Rechts** Thrombozyt auf reinem Fibrin (rechts; $z = 0,12 \mu\text{m}$). Maßstab = 1 µm. Scherrate 1265/s

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in der Legende zu Abb. 42 beschrieben

5.6.3. Albumin und Plasmafibrin

Wie bereits unter 5.6. beschrieben, inkorporiert Plasmafibrin eine Vielzahl von Proteinen, welche möglicherweise die Aktivierung durch GPVI auf Thrombozyten verhindert. Den größten Anteil der Plasmaproteine (60%) macht Albumin aus. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass Albumin während der Fibrinpolymerisation im Plasma in das Fibrinnetz inkorporiert wird und somit verhindert, dass Thrombozyten voll aktiviert werden. Um diese Möglichkeit zu testen, wurde bei der Herstellung von Plasmafibrin neben AlexaFluor-594 Fibrinogen (rot) auch AlexaFluor647-conjugated Albumin (magenta) aus Rinderserum (BSA) hinzugefügt. Anschließend wurde mithilfe von SIM die Lokalisation von Albumin untersucht. Es wurde tatsächlich eine sehr gute Co-Lokalisation von Albumin mit den Fibrinfasern nachgewiesen (Abb. 44).

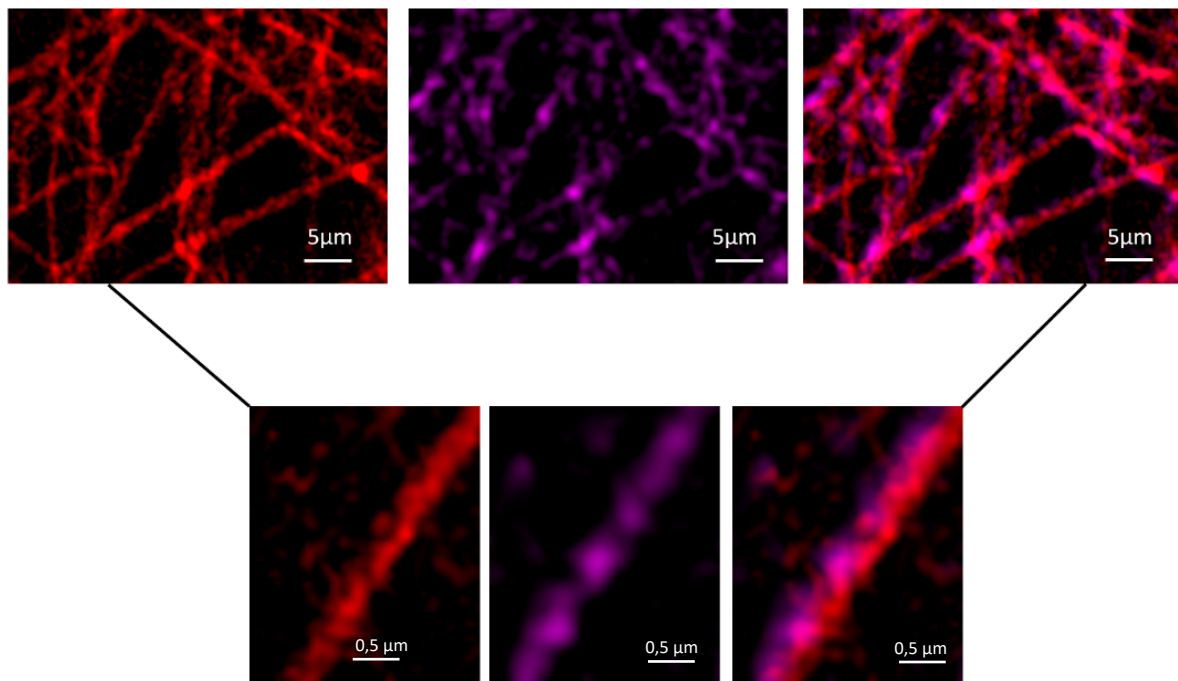


Abbildung 44: Co-Lokalisation von Albumin und Fibrin. SIM-Bildgebung

AlexaFluor-594 konjugiertes Fibrinogen (rot) und Alexa Fluor-647 konjugiertes Albumin (magenta) wurden vor der Fibrinherstellung zu Plasma hinzugefügt. **Obere Reihe:** Repräsentativer Ausschnitt aus einem Plasmafibrinnetz. Fibrin (links), Albumin (Mitte) und Überlagerung beider Bilder (rechts); **Untere Reihe:** Zoom einer einzelnen Fibrinfaser mit Albumin. Direkte Anlagerung von Albumin an die Fibrinfaser Fibrin (links), Albumin (Mitte) und Überlagerung beider Bilder (rechts). Maßstab = 5 µm und 0,5 µm

Anschließend wurden die Adhäsionsstellen der Thrombozyten in Bezug zur Lokalisation von Albumin an Fibrin untersucht. Es konnten nach sorgfältigem Durchsehen der Präparate Albumin-freie Stellen am Plasmafibrin entdeckt werden, an denen sich bevorzugt Thrombozyten anhefteten (Abb. 45). Die weitflächige Inkorporation von Albumin in die Fibrinfasern und die damit fehlenden Andockungsstellen für Thrombozyten könnten eine plausible Erklärung bieten, weshalb in den oben gezeigten Flussversuchen die Plättchen auf Plasmafibrin nur gering aktiviert waren.

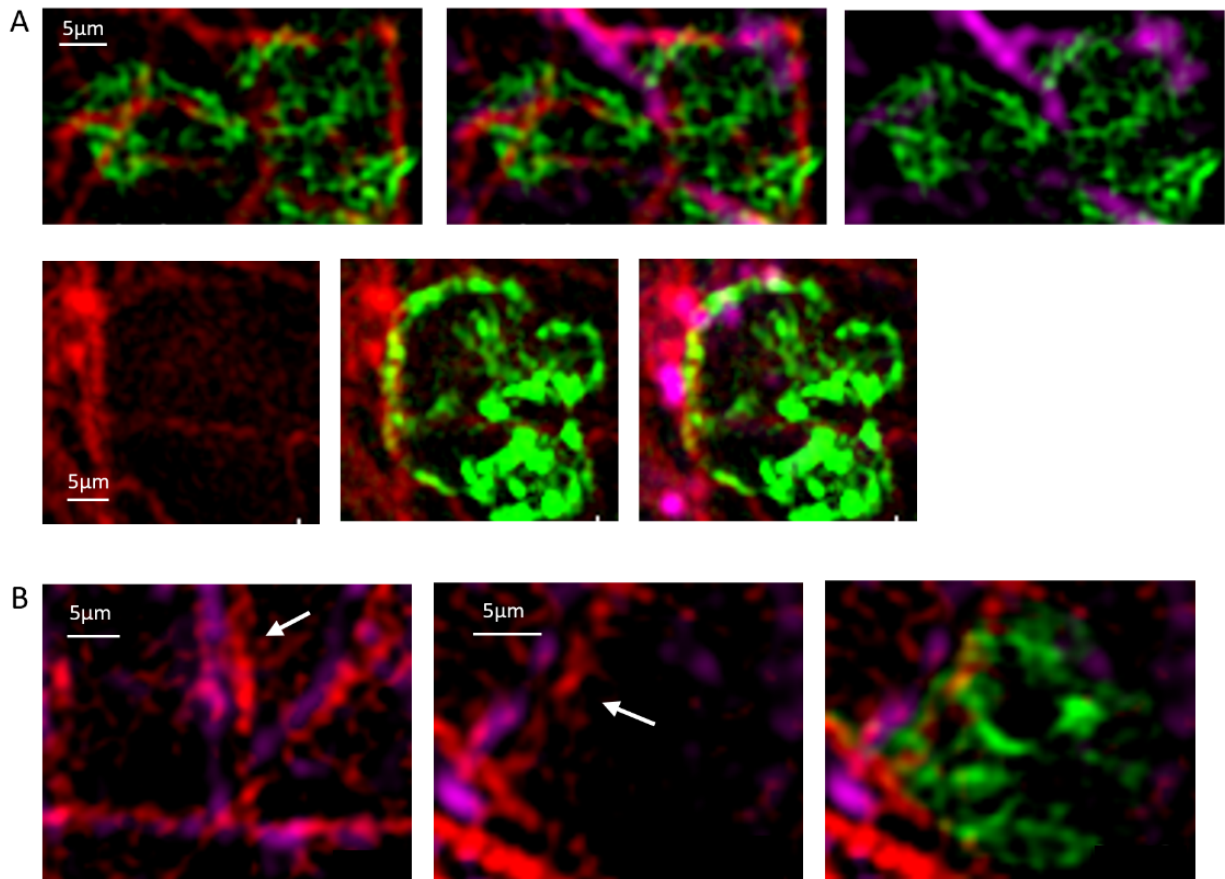


Abbildung 45: Adhäsion von Thrombozyten unter Flussbedingungen bevorzugt an „Albumin-freies“ Fibrin (SIM: *Structured Illumination Microscopy*)

AlexaFluor-594 konjugiertes Fibrinogen (rot) und Alexa Fluor-647 konjugiertes Albumin (magenta) wurden vor der Fibrinherstellung zu Plasma hinzugefügt. Anschließend wurde der Flussversuch (Scherrate 600/s) mit Hirudin-antikoagulierte Blut für 2 Minuten so durchgeführt wie in Legende zu Abb. 42 beschrieben. **A** Bevorzugte Thrombozyten -Adhäsion an Albumin-freie Stellen der Fibrinfasern beispielhaft gezeigt. obere Reihe: z13 (0.15 μm); untere Reihe: z9–z14 (MIP) **B** „Albumin-freies“ Fibrin, dargestellt durch die weißen Pfeile (links und mittig: z7); Thrombozytenadhäsion an die Albumin-freie rechte Fibrinfaser aus dem mittigen Bild (rechts: z6-8 MIP)

6 Diskussion

Aufgrund der spannenden Entdeckung in den letzten Jahren, dass GPVI nicht nur Kollagen bindet, sondern auch als Fibrinrezeptor fungiert, hat sich ein neues Feld in der Erforschung des GPVI-Rezeptors und dessen Ligand Fibrin aufgetan. GPVI-Hemmer bzw. GPVI-Signalweg-Inhibitoren werden bereits in klinischen Studien untersucht, da GPVI aufgrund seiner alleinigen Expression auf Thrombozyten und Megakaryozyten und geringem Blutungsrisiko eine äußerst attraktive Zielstruktur für Plättchen-hemmende Substanzen darstellt.¹⁶⁸ Eine mögliche GPVI-Bindung an Fibrin bzw. Fibrinogen könnte eventuell von Vorteil für die Therapie von Atherothrombosen mit GPVI-Inhibitoren sein. Es könnte aber auch das Risiko von Blutungen erhöhen. Bekanntermaßen geht der Einsatz von Fibrinogenrezeptor-Inhibitoren (Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten) mit einem erheblichen Blutungsrisiko einher.¹⁹⁴

Die Zielsetzung der Dissertation war die Untersuchung der Rolle von membran-gebundenem GPVI auf Thrombozyten und die Auswirkung verschiedener Arten von Fibrin (reines Fibrin, Plasmafibrin und TF-Fibrin) auf deren Aktivierung. Bisherige Untersuchungen zeigten vor allem Bindungsanalysen und Thrombozytenaktivierungs-Untersuchungen durch künstliches Fibrin, aber nicht durch physiologisch generiertes Fibrin, wie Plasmafibrin oder *Tissue Factor*-Fibrin.^{82,83} Wir untersuchten daher sowohl die strukturellen Unterschiede und die funktionellen Auswirkungen der verschiedenen Fibrinarten für die Thrombozytenaktivierung, sowie die Rolle von GPVI und dessen Signalwege für die Thrombozytenaktivierung durch die verschiedenen Fibrinarten.

6.1. Die Rolle von GPVI bei der Thrombozytenaktivierung durch Fibrin, Plasmafibrin oder TF-Fibrin unter arteriellen Flussbedingungen

Betrachtet man nun zusammenfassend die Ergebnisse, bestätigt sich, dass in vitro unter arteriellen Flussbedingungen der GPVI-Rezeptor und dessen intrazelluläre Signalwege mit den Tyrosinkinasen Syk und Btk eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Thrombozyten auf Fibrin spielen. Hierdurch konnten die Daten von Mammadova-Bach und Alshehri und Kollegen bestätigt werden.^{82,83} Dies galt allerdings nur solange Thrombozyten durch reines Fibrin oder rekombinantes Fibrin aktiviert wurden. Überraschenderweise zeigte sich nach Einsatz von GPVI-AK 5C4 und Syk-Inhibitor II oder BTKi Ibrutinib weder bei TF-Fibrin noch bei Plasmafibrin eine signifikant-hemmende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation. Im physiologischen Setting mit Plasmafibrin und *Tissue Factor*-Fibrin spielt der thrombozytäre GPVI als Fibrinrezeptor demnach keine wichtige Rolle.

Um die Thrombozytenaktivierung sowohl unter physiologischen Bedingungen (niedrigere Scherrate, typisch in Koronararterien oder Karotiden), als auch unter pathophysiologischen Bedingungen (hohe Scherrate, z.B. bei leicht stenotischen koronaren Läsionen) in vitro nachzuahmen, wurden die Fluss-Experimente bei zwei verschiedenen arteriellen Scherraten (600/s und 1265/s) durchgeführt.¹⁹⁵ Jedoch scheinen die zwei Scherraten insgesamt die Ergebnisse nicht zu beeinflussen.

Als mögliche Erklärung der Diskrepanz zwischen der Wirkung der GPVI-Antikörper und der Syk- und Btk-Hemmer für die Thrombozytenaktivierung durch die verschiedenen Arten von Fibrin ergeben sich folgende Punkte.

Prinzipiell könnte für die Thrombozyten-aggregationshemmende Wirkung des GPVI-Antikörpers 5C4 und der Tyrosinkinase-Hemmer nach Aktivierung durch reines Fibrin eine Verunreinigung des kommerziellen verfügbaren, aufgereinigten Fibrinogens durch Plasmaproteine, wie Vitronektin und Fibronektin verantwortlich sein. Diese können an GPVI binden und könnten nach Inkorporation in Fibrin die Thrombozyten aktivieren.^{78,196} Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Flussexperimente mit Fibrin, hergestellt aus rekombinantem Fibrinogen, wiederholt. Auch hier zeigte sich erneut eine signifikante Hemmung auf Thrombozyten-aggregation durch den GPVI-AK 5C4, sodass die Wirkung von 5C4 tatsächlich durch eine Hemmung der Interaktion von Fibrin mit GPVI zurückzuführen ist. Die Erklärung einer möglichen Verunreinigung durch Plasmaproteine wurde durch diese Versuche ausgeschlossen.

Ein großer Unterschied zwischen Fibrin und endogen gebildetem Fibrin (Plasmafibrin, TF-Fibrin) ist vor allem die Inkorporation von einer Vielzahl von Plasmaproteinen in deren Fasern^{104,105,107}, welche zu einer veränderten Netzstruktur, -Stabilität und Faserdicke führt, und die Interaktion mit Thrombozyten beeinflussen kann, wie die Ergebnisse zeigen. In der Tat führten diese Unterschiede jeweils zu einem veränderten Thrombozytenverhalten. So zeigte Fibrin eine sigmoidal zunehmende Thrombozytenbedeckung im Gegensatz zum linearen Anstieg mit anschließender Plateaubildung von Plasmafibrin und TF-Fibrin. Auch das Adhäsions- und Aggregationsverhalten der Thrombozyten unterschied sich abhängig von der Art des Fibrins (Abb. 34). Plasmafibrin wies die kleinsten Aggregate auf, während bei Fibrin durch eine verstärkte Thrombozytenaktivierung größere Aggregate entstanden. Die stärkste Plättchenaktivierung wurde durch TF-Fibrin induziert, mit Thrombozytenaggregaten, die 3-4-fach größer ausfielen als auf Fibrin.

Entsprechend ging auch die Wirkung der Einzelsubstanzen abhängig von der Fibrinart auseinander. So wurde auf Fibrin durch den Einsatz von GPVI-AK 5C4, Syk-Inhibitor II oder Ibrutinib primär vor allem die Phase der Aggregation unterbunden, wohingegen die Adhäsion nicht beeinflusst wurde. Bei den anderen beiden Fibrinarten zeigte der Einsatz der o.g. Substanzen keinerlei messbare Hemmung der Thrombozytenaktivierung, sodass klar anzunehmen ist, dass neben der reinen Fibrinaktivierung andere physiologische Einflussfaktoren eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Thrombozyten spielen.

Plasmafibrin

Mit Hilfe von *Immunoblotting* und Silberfärbungen konnte nachgewiesen werden, dass zahlreiche Plasmaproteine im Plasmafibrin integriert sind: Neben Albumin wurden Faktor XIII, Fibronectin, vWF und Vitronectin nachgewiesen (Abb. 38). Es bestehen neben der von uns gezeigten noch eine Vielzahl weiterer Proteine, die während des Gerinnungsprozesses an Fibrin kovalent oder nicht-kovalent binden und ins Fibrinnetz eingegliedert werden, wie bereits in vorangegangenen Studien beschrieben.^{127–129} Dazu gehören u.a. Albumin, Fibronectin, Vitronectin, Tissue Plasminogen Activator (TPA), Plasminogen, Lipoprotein A, α 2-antiplasmin, Plasminogen-Activator Inhibitor-2 (PAI-2), Factor Xa, Factor V, Faktor XIII, TF-Pathwayinhibitor, *Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor* und vWF.^{117,128} Wie in der Einleitung bereits erwähnt, beeinflussen Plasmaproteine die Clot-Struktur und ihren Aufbau maßgeblich. So führen Albumin und Fibronectin beispielsweise zu einer vermehrten Faserdicke und nehmen so direkt Einfluss auf die Eigenschaften der Netzstruktur.^{104,126} Unsere Ergebnisse unterstützen diese Annahme. Das Netz aus Plasmafibrin war im Vergleich zum reinen Fibrin primär aus dicken Fibrinfasern aufgebaut. Ebenso war die Dicke des Netzes von Plasmafibrin mit bis zu 30 μ m um ein Vielfaches höher als das von reinem Fibrin mit nur 3 μ m Dicke.

Insgesamt zeigte sich auf Plasmafibrin eine deutlich eingeschränkte Thrombozytenaktivierung mit verminderter Thrombozyten-Adhäsion und geringeren morphologisch Veränderungen der adhärierenden Thrombozyten im Vergleich zu den stark aktivierten Thrombozyten mit Pseudopodienbildung auf reinem Fibrin. Eine nähere Betrachtung des Fibrinnetzes und der Ausbreitung von Albumin offenbarte eine enge Co-Lokalisation von Albumin mit den Fibrinfasern. Die Ergebnisse der SIM-Bildgebung legen nahe, dass die fast vollständige Bedeckung von Plasmafibrin durch Albumin es den Thrombozyten lediglich erlaubte, an den noch freiliegenden Stellen anzudocken. Im Gegensatz dazu konnten Thrombozyten an das Netz aus reinem Fibrin frei und ohne jegliche Hindernisse adhärieren und aggregieren

Tissue Factor Fibrin

TF-Fibrin wurde aus über TF fließendem rekalkifiziertem Citrat-Blut hergestellt. Dadurch wurde die Gerinnungskaskade aktiviert und über Thrombin die Fibrinbildung induziert. Dabei entstehen dicke Bündel aus Fibrinfasern, die sich parallel zur Flussrichtung ausrichten.^{153,197} Auf TF-Fibrin waren im Vergleich zu den anderen Fibrinarten deutlich mehr und größere Thrombozyten-Aggregate zu finden. Durch die Hemmung von GPVI, ebenso wie durch die Hemmung der intrazellulären Signalwege mit Syk-Inhibitor II und Btk-Inhibitor Ibrutinib, wurde kein relevanter Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung gefunden. Insgesamt fungiert der thrombozytäre GPVI-Rezeptor daher nicht als Fibrinrezeptor bei der Thrombozytenaktivierung durch TF-Fibrin.

Die starken strukturellen Unterschiede in der Netzkonstruktion von endogen hergestelltem Fibrin mit dessen Integration von Plasmaproteinen sind eine mögliche Erklärung für die untergeordnete Rolle von GPVI und dessen intrazellulären Signalwege in der Aktivierung von Thrombozyten im Gegensatz zu künstlich hergestelltem Fibrin.

6.2. Die Rolle von GPVI bei der Thrombozytenaktivierung durch Fibrinogen unter arteriellen Flussbedingungen

In verschiedenen kürzlich publizierten Arbeiten wurde gezeigt, dass der GPVI-Rezeptor auch an Fibrinogen bindet und anschließend die Plättchenaktivierung mitinitiiert.^{152,198} Diese Annahme konnte im Rahmen dieser Arbeit unter arteriellen Flussbedingungen nicht bestätigt werden. Weder der GPVI-AK 5C4 noch Syk-Inhibitor II zeigten einen hemmenden Effekt auf die Thrombozytenadhäsion und -aggregation auf Fibrinogen. Hierbei ist zu erwähnen, dass Induruwa und Kollegen einen inhibitorischen GPVI-Dimer-spezifischen Antikörper mFab-F einsetzten in der Annahme, dass Fibrinogen lediglich an GPVI-Dimer bindet.¹⁵² In unseren Versuchen wurde hingegen der monoklonale anti-GPVI-AK 5C4 verwendet, der sowohl an monomeres GPVI, als auch dimeres GPVI bindet.^{161,199} Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist aufgrund der unterschiedlichen AK und Aufbaus der Experimente schwierig. Weiter zeigte auch die Hemmung des intrazellulären Signalweges von GPVI durch Syk-Inhibitor II keine inhibitorische Wirkung und unterstreicht die These, dass Fibrinogen und GPVI bei der Thrombozytenaktivierung vermutlich keine relevante Bindung eingehen.

Erstaunlicherweise konnte der BTKi Ibrutinib in der hohen eingesetzten Konzentration (1 μ M) signifikant die Aggregation der Thrombozyten auf Fibrinogen hemmen. Eine mögliche Erklärung sind hier off-target Wirkungen von Ibrutinib im *Downstream Signaling* von α IIb β 3 zu erwägen.¹⁸³

6.3. Die Rolle von GPIb bei der Thrombozytenaktivierung durch Fibrin unter arteriellen Flussbedingungen

Interessanterweise zeigte sich nach Einsatz des GPIb-AK 6B4 (Hemmung der vWF-Interaktion mit thrombozytärem GPIb) nicht nur bei hohen Scherraten, sondern bereits bei einer Scherrate von 600/s eine Hemmung der Thrombozytenaggregation auf allen Arten von Fibrin. Das Ausmaß der Inhibition auf reinem Fibrin war vergleichbar mit dem der GPVI-Hemmung. Wie zu erwarten war, war vor allem bei hohen Scherraten von 1265/s eine verstärkte Hemmung der Thrombozytenaktivierung zu sehen.⁶

Die Ergebnisse suggerieren, dass thrombozytäres GPIb bei solch niedrigen Scherraten (600/s) möglicherweise direkt an Fibrin bindet. Eine Bindung an vWF erscheint weniger wahrscheinlich, da vWF unter diesen Flussbedingungen nachweislich nicht an Fibrin bindet.²⁰⁰ Daher könnte eine Fibrin-bindende Eigenschaft von GPIb eine Erklärung für die beschriebene Beobachtung sein. Zudem wäre auch eine direkte Interaktion von GPIb und GPVI denkbar, welche eine Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation auf Fibrin einleitet und verstärkt. Ein GPIb/GPVI-Komplex bei der Plättchenaktivierung durch vWF/Kollagen ist in der Literatur beschrieben.²⁰¹

Dass GPIb-Antikörper eine derartige Thrombozytenhemmung auf Fibrin hervorrufen, deutet auf eine bedeutsame Rolle von vWF und GPIb in der Adhäsion und Aggregation nicht nur an Kollagen, sondern auch an Fibrin hin. So wurde bereits durch Savage und Kollegen eine scherratenabhängige Rekrutierung von vWF und GPIb an Fibrinogen beschrieben. Bei niedrigeren Scherraten wird primär

durch das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ die Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen auf Fibrin eingeleitet. Bei höheren Scherraten bindet zunächst vWF an subendotheliale Matrix, z.B. Kollagen oder Fibrin, bevor vWF anschließend GPIb bindet und intrazellulär eine Konformationsänderung von $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ induziert.⁶ Dass eine GPIb-Hemmung daher vor allem bei hohen Scherraten einen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung hat, bestätigt sich auch in unseren Versuchen. Eine mögliche Erklärung des Phänomens wäre eine anfängliche Bindung von löslichem vWF an einzelne Fibrinstränge. Auf diese Weise wird vWF direkt bei der Entstehung des Netzkonstrukts miteingebaut und ist in der Lage, besonders bei hohen Scherraten über GPIb, Thrombozyten andocken zu lassen und bei der Thrombusbildung zu unterstützen.^{202–204} Unsere Experimente zeigen zudem, dass eine Beteiligung von GPIb auch bei der Rekrutierung von Thrombozyten bei einer Scherrate von 600/s von Bedeutung ist. Die genauen Mechanismen bleiben unklar.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Der thrombozytäre GPVI-Rezeptor ist in den letzten Jahren als interessante antithrombotische Zielstruktur in den Fokus gerückt.^{73,166,205} Durch präklinische und Phase I-Daten ergaben sich Hinweise, dass eine GPVI-Hemmung mit rekombinatem GPVI-Fc einen klinischen Vorteil bringen und ein gutes Sicherheits- und Tolerabilitätsprofil mit geringem Blutungsrisiko aufwies.^{167,168,206} Allerdings ergab die anschließend durchgeführte Phase II Studie mit GPVI-Antagonist Revacept im Rahmen der ISAR-PLASTER Studie bei Patienten mit stabiler Angina Pectoris keine Hinweise auf eine Reduktion von Myokardnekrosen.²⁰⁷

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit nicht gefunden werden, dass GPVI eine zentrale Rolle als funktioneller Rezeptor für physiologisch gebildetes Fibrin hat. Insgesamt unterschied sich die Wirkung von GPVI stark abhängig von dem eingesetzten Fibrin. So spielt der GPVI-Rezeptor bei künstlichem Fibrin und rekombinatem Fibrin neben dem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ eine entscheidende Rolle für die Plättchenaggregation auf den Fibrinfasern. Unter physiologischen Bedingungen der Fibrinbildung konnte dagegen weder die Thrombozytenadhäsion noch die -Aggregation durch eine direkte GPVI-Rezeptorhemmung oder Hemmung der intrazellulären Signalwege signifikant beeinflusst werden.

Weiter konnte im Rahmen des *Advanced Optical Imaging* gezeigt werden, dass reines Fibrin, welches keine Plasmaproteine enthält, die Thrombozyten sehr stark stimulierte und zu einer starken Ausbildung von Pseudopodien führte. Plasmafibrin hingegen ermöglichte lediglich an einigen Albumin-freien Stellen am Fibrinnetz eine Adhäsion von Thrombozyten, welche nur gering aktiviert waren. Zudem wurde ein ausgeprägter Unterschied im Aufbau der beiden Fibrinnetzwerke beobachtet. Insgesamt war also bei Stimulation der Thrombozytenaktivierung durch endogenes Fibrin (Plasmafibrin, TF-Fibrin) -und somit dem klinisch relevanten Setting- keine signifikante Beeinträchtigung der Thrombozytenadhäsion/-aggregation durch Hemmung von GPVI und GPVI-Signalwegen feststellbar. Somit scheint, unseren Studien zufolge, eine Interaktion von Fibrin mit GPVI keine entscheidende Rolle bei der Thrombozytenaggregation während der arteriellen Thrombusbildung zu spielen.

Diverse Studien haben gezeigt, dass anti-GPVI-Antikörper und Btk-Inhibitoren die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation hemmen.^{165,179,184} Betrachtet man nun die bereits nachgewiesene Wirkung gegen Atherothrombose gemeinsam mit den Resultaten dieser Arbeit, bestätigt sich die Annahme, dass eine GPVI-Hemmung Fibrin-unabhängig antithrombotisch wirkt ohne die direkte Thrombozyten-Interaktion mit Fibrin zu behindern. Somit bleibt bei einer GPVI-Rezeptor-hemmenden Therapie die physiologische Hämostase durch Fibrin aufrechterhalten.

8 Literaturverzeichnis

1. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002;8(11):1227-1234. doi:10.1038/nm1102-1227
2. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res.* 2007;100(12):1673-1685. doi:10.1161/01.RES.0000267878.97021.ab
3. Davì G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2007;357(24):2482-2494. doi:10.1056/NEJMra071014
4. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008;359(9):938-949. doi:10.1056/NEJMra0801082
5. Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res.* 2012;129(3):220-224. doi:10.1016/j.thromres.2011.11.036
6. Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* 1996;84(2):289-297. doi:10.1016/s0092-8674(00)80983-6
7. Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A, et al. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(19):7899-7903. doi:10.1073/pnas.0608422104
8. Houdijk WPM, Sakariassen KS, Nievelstein PFEM, Sixma JJ. Role of Factor VIII-von Willebrand factor and fibronectin in the interaction of platelets in flowing blood with monomeric and fibrillar human collagen types I and III. *J Clin Invest.* 1985;75(2):531-540. doi:10.1172/JCI111729
9. Tomokiyo K, Kamikubo Y, Hanada T, et al. Von Willebrand factor accelerates platelet adhesion and thrombus formation on a collagen surface in platelet-reduced blood under flow conditions. *Blood.* 2005;105(3):1078-1084. doi:10.1182/blood-2004-05-1827
10. Wu Y, Suzuki-Inoue K, Satoh K, et al. Role of Fc receptor γ -chain in platelet glycoprotein Ib-mediated signaling. *Blood.* 2001;97(12):3836-3845. doi:10.1182/blood.V97.12.3836
11. Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med.* 2011;89(2):109-121. doi:10.1007/s00109-010-0691-5
12. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res.* 2006;99(12):1293-1304. doi:10.1161/01.RES.0000251742.71301.16
13. Woodside DG, Liu S, Ginsberg MH. Integrin activation. In: *Thrombosis and Haemostasis.* Vol 86. Schattauer GmbH; 2001:316-323. doi:10.1055/s-0037-1616229
14. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2341-2349. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207522
15. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 2001;345(7):494-502. doi:10.1056/NEJMoa010746
16. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(1):41-48. doi:10.1161/01.ATV.0000193624.28251.83
17. Negrier C, Shima M, Hoffman M. The central role of thrombin in bleeding disorders. *Blood Rev.* 2019;38:100582. doi:10.1016/j.blre.2019.05.006

18. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem*. 1995;270(24):14477-14484. doi:10.1074/jbc.270.24.14477
19. Lorand L. Factor XIII: Structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol 936. New York Academy of Sciences; 2001:291-311. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03516.x
20. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente García V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*. 2009;94(5):700-711. doi:10.3324/haematol.2008.003178
21. Yun S-H, Sim E-H, Goh R-Y, Park J-I, Han J-Y. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/9060143
22. Shin EK, Park H, Noh JY, Lim KM, Chung JH. Platelet shape changes and cytoskeleton dynamics as novel therapeutic targets for anti-thrombotic drugs. *Biomol Ther*. 2017;25(3):223-230. doi:10.4062/biomolther.2016.138
23. Sandmann R, Köster S. Topographic Cues Reveal Two Distinct Spreading Mechanisms in Blood Platelets OPEN. *Nat Publ Gr*. 2016. doi:10.1038/srep22357
24. Jennings LK. Role of Platelets in Atherothrombosis. *Am J Cardiol*. 2009;103(3 SUPPL.):4A-10A. doi:10.1016/j.amjcard.2008.11.017
25. Fullard J. The Role of the Platelet Glycoprotein IIb / IIIa in Thrombosis and Haemostasis. *Curr Pharm Des*. 2005;10(14):1567-1576. doi:10.2174/1381612043384682
26. Albert F, Christopher N F. The platelet fibrinogen receptor: from megakaryocyte to the mortuary. *JRSM Cardiovasc Dis*. 2012;1(2):1-13. doi:10.1258/cvd.2012.012007
27. Goto S, Ikeda Y, Saldívar E, Ruggeri ZM. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest*. 1998;101(2):479-486. doi:10.1172/JCI973
28. Plow E, Srouji A, Meyer D, Marguerie G, Ginsberg M. Evidence that three adhesive proteins interact with a common recognition site on activated platelets. *undefined*. 1984.
29. Edward Plow BF, McEver RP, Collier BS, Woods VL, Gerard Marguerie JA, Ginsberg MH. *Related Binding Mechanisms for Fibrinogen, Fibronectin, von Willebrand Factor, and Thrombospondin on Thrombin-Stimulated Human Platelets*. Vol 66.; 1985. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/66/3/724/1639576/724.pdf>. Accessed November 21, 2020.
30. Rumbaut RE, Thiagarajan P. Platelet Aggregation. 2010.
31. Libby P, Buring JE, Badimon L, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Prim*. 2019;5(1). doi:10.1038/s41572-019-0106-z
32. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Nerem RM. The pathogenesis of atherosclerosis: An overview. *Clin Cardiol*. 1991;14(1 S):1-16. doi:10.1002/clc.4960141302
33. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: Process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med*. 2014;5(8):927-946. [/pmc/articles/PMC4258672/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24258672/). Accessed November 21, 2020.
34. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17(11):1410-1422. doi:10.1038/nm.2538
35. Todesursachen in Deutschland - Statistisches Bundesamt. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft->

Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html. Accessed May 31, 2020.

36. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(1):1-25. doi:10.1016/j.jacc.2017.04.052
37. Libby P, Pasterkamp G. Requiem for the “vulnerable plaque.” *Eur Heart J*. 2015;36(43):2984-2987. doi:10.1093/eurheartj/ehv349
38. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114(12):1852-1866. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302721
39. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115(10):1285-1295. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859
40. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014;276(6):618-632. doi:10.1111/joim.12296
41. K. Freynhofer M, Bruno V, Wojta J, Huber K. The Role of Platelets in Athero-Thrombotic Events. *Curr Pharm Des*. 2012;18(33):5197-5214. doi:10.2174/138161212803251899
42. Owens AP, Mackman N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. *Thromb Haemost*. 2010;104(3):432-439. doi:10.1160/TH09-11-0771
43. Moons AHM, Levi M, Peters RJG. Tissue factor and coronary artery disease. *Cardiovasc Res*. 2002;53(2):313-325. doi:10.1016/S0008-6363(01)00452-7
44. Jude B, Zawadzki C, Susen S, Corseaux D. Relevance of tissue factor in cardiovascular disease. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2005;98(6):667-671. <https://europepmc.org/article/med/16007822>. Accessed November 28, 2020.
45. Penz S, Reiningger AJ, Brandl R, et al. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *Faseb j*. 2005;19(8):898-909. doi:10.1096/fj.04-2748com
46. Jamasbi J, Ayabe K, Goto S, Nieswandt B, Peter K, Siess W. Platelet receptors as therapeutic targets: Past, present and future. *Thromb Haemost*. 2017;117(7):1249-1257. doi:10.1160/TH16-12-0911
47. Toschi V, Gallo R, Lettino M, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1997;95(3):594-599. doi:10.1161/01.CIR.95.3.594
48. Sato Y, Hatakeyama K, Yamashita A, Marutsuka K, Sumiyoshi A, Asada Y. Proportion of fibrin and platelets differs in thrombi on ruptured and eroded coronary atherosclerotic plaques in humans. *Heart*. 2005;91(4):526-530. doi:10.1136/hrt.2004.034058
49. Ross R. Inflammation or Atherogenesis. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-126. doi:10.1056/NEJM199901143400207
50. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17(11):1410-1422. doi:10.1038/nm.2538
51. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(6):399-409. doi:10.1038/nrcardio.2009.55
52. Libby P, Loscalzo J, Ridker PM, et al. Inflammation, Immunity, and Infection in Atherothrombosis: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(17):2071-2081. doi:10.1016/j.jacc.2018.08.1043
53. Huo Y, Ley KF. Role of Platelets in the Development of Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14(1):18-22. doi:10.1016/j.tcm.2003.09.007

54. Cyrus T, Sung S, Zhao L, Funk CD, Tang S, Praticò D. Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2002;106(10):1282-1287. doi:10.1161/01.CIR.0000027816.54430.96
55. Massberg S, Brand K, Grüner S, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. 2002;196(7):887-896. doi:10.1084/jem.20012044
56. Sakariassen KS, Nievelstein PFEM, Coller BS, Sixma JJ. The role of platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium. *Br J Haematol*. 1986;63(4):681-691. doi:10.1111/j.1365-2141.1986.tb07552.x
57. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost*. 2003;1(7):1602-1612. doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00267.x
58. Clemetson KJ, Clemetson KJ, Kocher Institute T. A short history of platelet glycoprotein Ib complex. 2007. doi:10.1160/TH07-05-0327
59. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC. Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(8):1170-1174. doi:10.1016/S1357-2725(02)00280-7
60. Canobbio I, Balduini C, Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal*. 2004;16(12):1329-1344. doi:10.1016/j.cellsig.2004.05.008
61. Kageyama S, Yamamoto H, Nakazawa H, Yoshimoto R. Anti-human vWF monoclonal antibody, AJvW-2 Fab, inhibits repetitive coronary artery thrombosis without bleeding time prolongation in dogs. *Thromb Res*. 2001;101(5):395-404. doi:10.1016/S0049-3848(00)00430-8
62. Kasirer-Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM, Shattil SJ. Signaling through GP Ib-IX-V activates α IIb β 3 independently of other receptors. *Blood*. 2004;103(9):3403-3411. doi:10.1182/blood-2003-10-3664
63. Yap CL, Anderson KE, Hughan SC, Dopheide SM, Salem HH, Jackson SP. Essential role for phosphoinositide 3-kinase in shear-dependent signaling between platelet glycoprotein Ib/V/IX and integrin α IIb β 3. *Blood*. 2002;99(1):151-158. doi:10.1182/blood.V99.1.151
64. Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Miyata S, Yoshioka A. Cytosolic calcium changes in a process of platelet adhesion and cohesion on a von Willebrand factor-coated surface under flow conditions. *Blood*. 1999;94(4):1149-1155. doi:10.1182/blood.v94.4.1149.416k18_1149_1155
65. Marshall SJ, Asazuma N, Best D, et al. Glycoprotein IIb-IIIa-dependent aggregation by glycoprotein Iba is reinforced by a Src family kinase inhibitor (PP1)-sensitive signalling pathway. *Biochem J*. 2002;361(2):297-305. doi:10.1042/0264-6021:3610297
66. Ozaki Y. GPIb-Related Signaling Pathways in Platelets. In: *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008*. Springer Japan; 2009:253-264. doi:10.1007/978-4-431-78847-8_17
67. Sullam PM, Hyun WC, Szöllösi J, Dong JF, Foss WM, López JA. Physical proximity and functional interplay of the glycoprotein Ib-IX-V complex and the Fc receptor Fc γ /RIIa on the platelet plasma membrane. *J Biol Chem*. 1998;273(9):5331-5336. doi:10.1074/jbc.273.9.5331
68. Falati S, Edmead CE, Poole AW. Glycoprotein Ib-V-IX, a receptor for von Willebrand factor, couples physically and functionally to the Fc receptor γ -chain, Fyn, and Lyn to activate human platelets. *Blood*. 1999;94(5):1648-1656. doi:10.1182/blood.v94.5.1648
69. Canobbio I, Bertoni A, Lova P, et al. Platelet Activation by von Willebrand Factor Requires Coordinated Signaling through Thromboxane A2 and Fc γ IIA Receptor. *J Biol Chem*. 2001;276(28):26022-26029. doi:10.1074/jbc.M102639200
70. Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that

lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest.* 1989;84(5):1440-1445. doi:10.1172/JCI114318

71. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. In: *Thrombosis and Haemostasis*. Vol 86. Schattauer GmbH; 2001:189-197. doi:10.1055/s-0037-1616217
72. Surin WR, Barthwal MK, Dikshit M. Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: Emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. *Thromb Res.* 2008;122(6):786-803. doi:10.1016/j.thromres.2007.10.005
73. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood.* 2003;102(2):449-461. doi:10.1182/blood-2002-12-3882
74. Jandrot-Perrus M, Lagrue AH, Okuma M, Bon C. Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin $\alpha 2\beta 1$. *J Biol Chem.* 1997;272(43):27035-27041. doi:10.1074/jbc.272.43.27035
75. Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TNC, Clemetson KJ. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors. *J Biol Chem.* 1999;274(41):29019-29024. doi:10.1074/jbc.274.41.29019
76. Schulz C, Penz S, Hoffmann C, et al. Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo. *Basic Res Cardiol.* 2008;103(4):356-367. doi:10.1007/s00395-008-0722-3
77. Rayes J, Watson SP, Nieswandt B. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2. *J Clin Invest.* 2019;129(1):12. doi:10.1172/JCI122955
78. Bültmann A, Li Z, Wagner S, et al. Impact of glycoprotein VI and platelet adhesion on atherosclerosis-A possible role of fibronectin. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(3):532-542. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.04.009
79. Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJT, et al. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin $\alpha 6\beta 1$ -dependent activation of GPVI. *Blood.* 2006;107(4):1405-1412. doi:10.1182/blood-2005-06-2406
80. Schulz C, Von Brühl ML, Barocke V, et al. EMMPRIN (CD147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions in vivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall. *J Thromb Haemost.* 2011;9(5):1007-1019. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04235.x
81. Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost.* 2010;8(7):1456-1467. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03875.x
82. Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, et al. Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood.* 2015;126(5):683-691. doi:10.1182/blood-2015-02-629717
83. Alshehri OM, Hughes CE, Montague S, et al. Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood.* 2015;126(13):1601-1608. doi:10.1182/blood-2015-04-641654
84. Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson SP. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor γ -chain. *FEBS Lett.* 1997;413(2):255-259. doi:10.1016/S0014-5793(97)00926-5
85. Zheng YM, Liu C, Chen H, Locke D, Ryan JC, Kahn ML. Expression of the Platelet Receptor GPVI Confers Signaling via the Fc Receptor γ -Chain in Response to the Snake Venom Convulxin but Not to Collagen. *J Biol Chem.* 2001;276(16):12999-13006. doi:10.1074/jbc.M009344200
86. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI. *Adv Exp Med Biol.* 2008;640:53-63. doi:10.1007/978-0-

87. Chen H, Locke D, Liu Y, Liu C, Kahn ML. The platelet receptor GPVI mediates both adhesion and signaling responses to collagen in a receptor density-dependent fashion. *J Biol Chem*. 2002;277(4):3011-3019. doi:10.1074/jbc.M109714200
88. Poulter NS, Pollitt AY, Owen DM, et al. Clustering of glycoprotein VI (GPVI) dimers upon adhesion to collagen as a mechanism to regulate GPVI signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2017;15(3):549-564. doi:10.1111/jth.13613
89. Miura Y, Takahashi T, Jung SM, Moroi M. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen: A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J Biol Chem*. 2002;277(48):46197-46204. doi:10.1074/jbc.M204029200
90. Loyau S, Dumont B, Ollivier V, et al. Platelet glycoprotein VI dimerization, an active process inducing receptor competence, is an indicator of platelet reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(3):778-785. doi:10.1161/ATVBAHA.111.241067
91. Ichinohe T, Takayama H, Ezumi Y, et al. Collagen-stimulated activation of Syk but not c-Src is severely compromised in human platelets lacking membrane glycoprotein VI. *J Biol Chem*. 1997;272(1):63-68. doi:10.1074/jbc.272.1.63
92. Poole A, Gibbins JM, Turner M, et al. The Fc receptor γ -chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J*. 1997;16(9):2333-2341. doi:10.1093/emboj/16.9.2333
93. Pasquet J-M, Gross B, Quek L, et al. LAT Is Required for Tyrosine Phosphorylation of Phospholipase $Cy2$ and Platelet Activation by the Collagen Receptor GPVI. *Mol Cell Biol*. 1999;19(12):8326-8334. doi:10.1128/mcb.19.12.8326
94. Massberg S, Gawaz M, Grüner S, et al. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med*. 2003;197(1):41-49. doi:10.1084/jem.20020945
95. Arai M, Yamamoto N, Moroi M, Akamatsu N, Fukutake K, Tanoue K. Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br J Haematol*. 1995;89(1):124-130. doi:10.1111/j.1365-2141.1995.tb08900.x
96. Mangin PH, Onselaer MB, Receveur N, et al. Immobilized fibrinogen activates human platelets through glycoprotein VI. *Haematologica*. 2018;103(5):898-907. doi:10.3324/haematol.2017.182972
97. Barrachina MN, Sueiro AM, Izquierdo I, et al. GPVI surface expression and signalling pathway activation are increased in platelets from obese patients: Elucidating potential anti-atherothrombotic targets in obesity. *Atherosclerosis*. 2019;281:62-70. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.12.023
98. Arthur JF, Jandeleit-Dahm K, Andrews RK. Platelet hyperreactivity in diabetes: Focus on GPVI signaling—are useful drugs already available? *Diabetes*. 2017;66(1):7-13. doi:10.2337/db16-1098
99. Bigalke B, Geisler T, Stellos K, et al. Platelet collagen receptor glycoprotein VI as a possible novel indicator for the acute coronary syndrome. *Am Heart J*. 2008;156(1):193-200. doi:10.1016/j.ahj.2008.02.010
100. Bigalke B, Haap M, Stellos K, et al. Platelet glycoprotein VI (GPVI) for early identification of acute coronary syndrome in patients with chest pain. *Thromb Res*. 2010;125(5). doi:10.1016/j.thromres.2010.01.005
101. Bigalke B, Stellos K, Geisler T, et al. Expression of platelet glycoprotein VI is associated with transient ischemic attack and stroke. *Eur J Neurol*. 2010;17(1):111-117. doi:10.1111/j.1468-

1331.2009.02754.x

102. Smith BK, Peter K, Al-Tamimi M, Ahrens I, Andrews RK, Gardiner EE. Increased Soluble Platelet GPVI (sGPVI) in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Hear Lung Circ.* 2009;18:S114. doi:10.1016/j.hlc.2009.05.259
103. Al-Tamimi M, Mu FT, Arthur JF, et al. Anti-glycoprotein VI monoclonal antibodies directly aggregate platelets independently of FcγRIIIa and induce GPVI ectodomain shedding. *Platelets.* 2009;20(2):75-82. doi:10.1080/09537100802645029
104. Pieters M, Wolberg AS. Fibrinogen and fibrin: An illustrated review. *Res Pract Thromb Haemost.* 2019;3(2):161-172. doi:10.1002/rth2.12191
105. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1894-1904. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x
106. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem.* 2005;70:247-299. doi:10.1016/S0065-3233(05)70008-5
107. Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin formation, structure and properties. *Subcell Biochem.* 2017;82:405-456. doi:10.1007/978-3-319-49674-0_13
108. Köhler S, Schmid F, Settanni G. The Internal Dynamics of Fibrinogen and Its Implications for Coagulation and Adsorption. Doolittle RF, ed. *PLOS Comput Biol.* 2015;11(9):e1004346. doi:10.1371/journal.pcbi.1004346
109. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(6):1015-1022. doi:10.1161/01.ATV.0000130465.23430.74
110. Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesth Analg.* 2009;108(5):1447-1452. doi:10.1213/ane.0b013e31819bceb1
111. Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Tissue factor in coagulation: Which? where? when? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(12):1989-1996. doi:10.1161/ATVBAHA.108.177402
112. Dubois C, Panicot-Dubois L, Gainor JF, Furie BC, Furie B. Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model. *J Clin Invest.* 2007;117(4):953-960. doi:10.1172/JCI30537
113. U of U Mathematical Biology Gels Group. https://www.math.utah.edu/research/mathbio/groups/gels/gel_fibrin_page.html. Accessed February 23, 2021.
114. Hoppe B. Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation. *Thromb Haemost.* 2014;112(4):649-658. doi:10.1160/TH14-01-0085
115. Greenberg CS, Miraglia CC, Rickles FR, Shuman MA. Cleavage of blood coagulation Factor XIII and fibrinogen by thrombin during in vitro clotting. *J Clin Invest.* 1985;75(5):1463-1470. doi:10.1172/JCI111849
116. Liu W, Jawerth LM, Sparks EA, et al. Fibrin fibers have extraordinary extensibility and elasticity. *Science (80-).* 2006;313(5787):634. doi:10.1126/science.1127317
117. Weisel JW. Structure of fibrin: Impact on clot stability. *J Thromb Haemost.* 2007;5(SUPPL. 1):116-124. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02504.x
118. Kobbervig C, Williams E. FXIII polymorphisms, fibrin clot structure and thrombotic risk. *Biophys Chem.* 2004;112(2-3 SPEC. ISS.):223-228. doi:10.1016/j.bpc.2004.07.023
119. Lim BCB, Ariëns RAS, Carter AM, Weisel JW, Grant PJ. Genetic regulation of fibrin structure and

function: Complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet*. 2003;361(9367):1424-1431. doi:10.1016/S0140-6736(03)13135-2

120. Casini A, Neerman-Arbez M, Ariëns RA, de Moerloose P. Dysfibrinogenemia: From molecular anomalies to clinical manifestations and management. *J Thromb Haemost*. 2015;13(6):909-919. doi:10.1111/jth.12916
121. Campbell RA, Aleman MM, Gray LD, Falvo MR, Wolberg AS. Flow profoundly influences fibrin network structure: Implications for fibrin formation and clot stability in haemostasis. *Thromb Haemost*. 2010;104(6):1281-1284. doi:10.1160/TH10-07-0442
122. Gabriel D, Muga K, Boothroyd E. The effect of fibrin structure on fibrinolysis. *undefined*. 1992.
123. Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, Silva MMCG, Szabó L, Kolev K. The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: Kinetic and microscopic studies. *Blood*. 2011;117(2):661-668. doi:10.1182/blood-2010-06-290338
124. Lord ST. Molecular mechanisms affecting fibrin structure and stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(3):494-499. doi:10.1161/ATVBAHA.110.213389
125. Nair CH, Dhall DP. Studies on fibrin network structure: The effect of some plasma proteins. *Thromb Res*. 1991;61(3):315-325. doi:10.1016/0049-3848(91)90109-A
126. Wolberg AS. Plasma and cellular contributions to fibrin network formation, structure and stability. *Haemophilia*. 2010;16(SUPPL. 3):7-12. doi:10.1111/j.1365-2516.2010.02253.x
127. Nikolajsen CL, Dylund TF, Poulsen ET, Enghild JJ, Scavenius C. Coagulation factor XIIIa substrates in human plasma: Identification and incorporation into the clot. *J Biol Chem*. 2014;289(10):6526-6534. doi:10.1074/jbc.M113.517904
128. Talens S, Leebeek FWG, Demmers JAA, Rijken DC. Identification of fibrin clot-bound plasma proteins. *PLoS One*. 2012;7(8). doi:10.1371/journal.pone.0041966
129. Talens S, Leebeek FWG, Veerhuis R, Rijken DC. Decoration of Fibrin with Extracellular Chaperones. *Thromb Haemost*. 2019;19(10):1624-1631. doi:10.1055/s-0039-1693701
130. Smith EB, Thompson WD. Fibrin as a factor in atherogenesis. *Thromb Res*. 1994;73(1):1-19. doi:10.1016/0049-3848(94)90049-3
131. Smith EB. Fibrinogen, fibrin and fibrin degradation products in relation to atherosclerosis. *Clin Haematol*. 1986;15(2):355-370. doi:10.1016/S0308-2261(18)30021-3
132. Undas A, Ariëns RAS. Fibrin clot structure and function: A role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(12). doi:10.1161/ATVBAHA.111.230631
133. Kaptoge S, White IR, Thompson SG, et al. Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: Individual participant meta-analysis of 154,211 adults in 31 prospective studies. *Am J Epidemiol*. 2007;166(8):867-879. doi:10.1093/aje/kwm191
134. Fatah K, Silveira A, Tornvall P, Karpe F, Blombäck M, Hamsten A. Proneness to formation of tight and rigid fibrin gel structures in men with myocardial infarction at a young age. *Thromb Haemost*. 1996;76(4):535-540. doi:10.1055/s-0038-1650618
135. Ariëns RAS. Fibrin(ogen) and thrombotic disease. *J Thromb Haemost*. 2013;11(SUPPL.1):294-305. doi:10.1111/jth.12229
136. Wilhelmsen L, Svärdsudd K, Korsan-Bengtson K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. Fibrinogen as a Risk

Factor for Stroke and Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 1984;311(8):501-505.
doi:10.1056/nejm198408233110804

137. Stone MC, Thorp JM. Plasma fibrinogen--a major coronary risk factor. *J R Coll Gen Pract*. 1985;35(281):565-569. /pmc/articles/PMC1961456/?report=abstract. Accessed December 12, 2020.
138. Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'agostino RB. Fibrinogen and Risk of Cardiovascular Disease: The Framingham Study. *JAMA J Am Med Assoc*. 1987;258(9):1183-1186.
doi:10.1001/jama.1987.03400090067035
139. Sumaya W, Wallentin L, James SK, et al. Fibrin clot properties independently predict adverse clinical outcome following acute coronary syndrome: a PLATO substudy. *Eur Heart J*. 2018;39(13):1078-1085. doi:10.1093/eurheartj/ehy013
140. Wolberg AS, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Elevated prothrombin results in clots with an altered fiber structure: A possible mechanism of the increased thrombotic risk. *Blood*. 2003;101(8):3008-3013. doi:10.1182/blood-2002-08-2527
141. Undas A, Zawilska K, Ciesla-Dul M, et al. Altered fibrin clot structure/function in patients with idiopathic venous thromboembolism and in their relatives. *Blood*. 2009;114(19):4272-4278.
doi:10.1182/blood-2009-05-222380
142. De Moerloose P, Boehlen F, Neerman-Arbez M. Fibrinogen and the risk of thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(1):7-17. doi:10.1055/s-0030-1248720
143. Sadoshima S, Tanaka K. Fibrinogen and low density lipoprotein in the development of cerebral atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1979;34(2):93-103. doi:10.1016/0021-9150(79)90133-3
144. Smith EB, Alexander KM, Massie IB. Insoluble "fibrin" in human aortic intima. Quantitative studies on the relationship between insoluble "fibrin", soluble fibrinogen and low density lipoprotein. *Atherosclerosis*. 1976;23(1):19-39. doi:10.1016/0021-9150(76)90116-7
145. Smith EB, Staples EM, Dietz HS, Smith RH. ROLE OF ENDOTHELIUM IN SEQUESTRATION OF LIPOPROTEIN AND FIBRINOGEN IN AORTIC LESIONS, THROMBI, AND GRAFT PSEUDO-INTIMAS. *Lancet*. 1979;314(8147):812-816. doi:10.1016/S0140-6736(79)92173-1
146. Borissoff JI, Spronk HMH, Ten Cate H. *Mechanisms of Disease The Hemostatic System as a Modulator of Atherosclerosis*. Vol 364.; 2011.
147. Smith EB, Keen GA, Grant A, Stirk C. Fate of fibrinogen in human arterial intima. *Arterioscler An Off J Am Hear Assoc Inc*. 1990;10(2):263-275. doi:10.1161/01.ATV.10.2.263
148. Lorenzet R, Sobel JH, Bini A, Witte LD. Low molecular weight fibrinogen degradation products stimulate the release of growth factors from endothelial cells. *Thromb Haemost*. 1992;68(3):357-363. doi:10.1055/s-0038-1656380
149. Tavora F, Cresswell N, Li L, Ripple M, Burke A. Immunolocalisation of fibrin in coronary atherosclerosis: Implications for necrotic core development. *Pathology*. 2010;42(1):15-22.
doi:10.3109/00313020903434348
150. Bender M, Hagedorn I, Nieswandt B. Genetic and antibody-induced glycoprotein VI deficiency equally protects mice from mechanically and FeCl 3-induced thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011;9(7):1423-1426. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04328.x
151. Onselae MB, Hardy AT, Wilson C, et al. Fibrin and D-dimer bind to monomeric GPVI. *Blood Adv*. 2017;1(19):1495-1504. doi:10.1182/bloodadvances.2017007732
152. Induruwa I, Moroi M, Bonna A, et al. Platelet collagen receptor Glycoprotein VI-dimer recognizes fibrinogen and fibrin through their D-domains, contributing to platelet adhesion and activation

- during thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 2018;16(2):389-404. doi:10.1111/jth.13919
153. Ebrahim M, Jamasbi J, Adler K, et al. Dimeric Glycoprotein VI Binds to Collagen but Not to Fibrin. *Thromb Haemost.* 2018;118(2):351-361. doi:10.1160/th17-04-0302
 154. Slater A, Perrella G, Onselaer MB, et al. Does fibrin(ogen) bind to monomeric or dimeric GPVI, or not at all? *Platelets.* 2019;30(3):281-289. doi:10.1080/09537104.2018.1508649
 155. ZAHID M, MANGIN P, LOYAU S, et al. The future of glycoprotein VI as an antithrombotic target. *J Thromb Haemost.* 2012;10(12):2418-2427. doi:10.1111/jth.12009
 156. Gardiner E, Arthur J, Andrews R. Targeting GPVI as a novel antithrombotic strategy. *J Blood Med.* 2014;5:59. doi:10.2147/jbm.s39220
 157. Dütting S, Bender M, Nieswandt B. Platelet GPVI: A target for antithrombotic therapy?! *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(11):583-590. doi:10.1016/j.tips.2012.07.004
 158. Arthur JF, Dunkley S, Andrews RK. Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. *Br J Haematol.* 2007;139(3):363-372. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06799.x
 159. Borst O, Gawaz M. Glycoprotein VI - novel target in antiplatelet medication. *Pharmacol Ther.* 2020;217:107630. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107630
 160. Karl A, Schönfeld Aus Heidelberg R. *Glykoprotein VI-Ein Neuer Thrombozytärer Marker Im Akuten Koronarsyndrom?*; 2009.
 161. Massberg S, Konrad I, Bültmann A, et al. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB J.* 2004;18(2):397-399. doi:10.1096/fj.03-0464fje
 162. Matsumoto Y, Takizawa H, Gong X, et al. Highly potent anti-human GPVI monoclonal antibodies derived from GPVI knockout mouse immunization. *Thromb Res.* 2007;119(3):319-329. doi:10.1016/j.thromres.2006.01.023
 163. Matsumoto Y, Takizawa H, Nakama K, et al. Ex vivo evaluation of anti-GPVI antibody in Cynomolgus monkeys: Dissociation between anti-platelet aggregatory effect and bleeding time. *Thromb Haemost.* 2006;96(08):167-175. doi:10.1160/th06-05-0266
 164. Mangin PH, Tang CJ, Bourdon C, et al. A humanized glycoprotein VI (GPVI) mouse model to assess the antithrombotic efficacies of anti-GPVI agents. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;341(1):156-163. doi:10.1124/jpet.111.189050
 165. Jamasbi J, Megens RT, Bianchini M, et al. Differential Inhibition of Human Atherosclerotic Plaque-Induced Platelet Activation by Dimeric GPVI-Fc and Anti-GPVI Antibodies: Functional and Imaging Studies. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(22):2404-2415. doi:10.1016/j.jacc.2015.03.573
 166. Denorme F, Rondina MT. Targeting Glycoprotein VI for Thromboembolic Disorders: All Gain with No Pain? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(5):839-840. doi:10.1161/ATVBAHA.119.312621
 167. Voors-Pette C, Lebozec K, Dogterom P, et al. Safety and Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of ACT017, an Antiplatelet GPVI (Glycoprotein VI) Fab. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2019;39(5):956-964. doi:10.1161/atvbaha.118.312314
 168. Ungerer M, Rosport K, Bültmann A, et al. Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation.* 2011;123(17):1891-1899. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.980623
 169. Lebozec K, Jandrot-Perrus M, Avenard G, Favre-Bulle O, Billiald P. Design, development and

characterization of ACT017, a humanized Fab that blocks platelet's glycoprotein VI function without causing bleeding risks. *MAbs*. 2017;9(6):945-958. doi:10.1080/19420862.2017.1336592

170. Tyrosinkinasen: Meister der Kommunikation | PZ – Pharmazeutische Zeitung. <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-362012/meister-der-kommunikation/>. Accessed January 3, 2021.
171. Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;315(3):971-979. doi:10.1124/jpet.105.084145
172. Pottier C, Fresnais M, Gilon M, Jérusalem G, Longuespée R, Sounni NE. Tyrosine kinase inhibitors in cancer: Breakthrough and challenges of targeted therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3). doi:10.3390/cancers12030731
173. Tullemans BME, Heemskerk JWM, Kuijpers MJE. Acquired platelet antagonism: off-target antiplatelet effects of malignancy treatment with tyrosine kinase inhibitors. *J Thromb Haemost*. 2018;16(9):1686-1699. doi:10.1111/jth.14225
174. Levade M, Severin S, Gratacap M-P, Ysebaert L, Payrastre B. Targeting Kinases in Cancer Therapies: Adverse Effects on Blood Platelets. *Curr Pharm Des*. 2016;22(16):2315-2322. doi:10.2174/1381612822666160226132630
175. Lhermusier T, Rothem VJ, Garcia C, Gratacap MP, Payrastre B. Targeted drug therapy: The platelet side. *Platelets*. 2011;22(7):479-484. doi:10.3109/09537104.2011.567423
176. Abdul Sater H. Receptor Tyrosine Kinases in Human Platelets: A Review of Expression, Function and Inhibition in Relation to the Risk of Bleeding or Thrombocytopenia from Phase I through Phase III Trials. *J Cancer Prev Curr Res*. 2017;8(6). doi:10.15406/jcpcr.2017.08.00298
177. Stegner D, Haining EJ, Nieswandt B. Targeting glycoprotein vi and the immunoreceptor tyrosine-based activation motif signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(8):1615-1620. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303408
178. Rigg RA, Aslan JE, Healy LD, et al. Oral administration of bruton's tyrosine kinase inhibitors impairs GPVI-mediated platelet function. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2016;310(5):C373-C380. doi:10.1152/ajpcell.00325.2015
179. Busygina K, Denzinger V, Bernlochner I, Weber C, Lorenz R, Siess W. Btk Inhibitors as First Oral Atherothrombosis-Selective Antiplatelet Drugs? *Thromb Haemost*. 2019;119(8):1212-1221. doi:10.1055/s-0039-1687877
180. Pal Singh S, Dammeijer F, Hendriks RW. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. *Mol Cancer*. 2018;17(1):57. doi:10.1186/s12943-018-0779-z
181. Shatzel JJ, Olson SR, Tao DL, McCarty OJT, Danilov A V., DeLoughery TG. Ibrutinib-associated bleeding: pathogenesis, management and risk reduction strategies. *J Thromb Haemost*. 2017;15(5):835-847. doi:10.1111/jth.13651
182. Liu J, Fitzgerald ME, Berndt MC, Jackson CW, Gartner TK. Bruton tyrosine kinase is essential for botrocetin/VWF-induced signaling and GPIb-dependent thrombus formation in vivo. *Blood*. 2006;108(8):2596-2603. doi:10.1182/blood-2006-01-011817
183. Durrant TN, Van Den Bosch MT, Hers I. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ outside-in signaling. *Blood*. 2017;130(14):1607-1619. doi:10.1182/blood-2017-03-773614
184. Busygina K, Jamasbi J, Seiler T, et al. Oral Bruton tyrosine kinase inhibitors selectively block atherosclerotic plaque-triggered thrombus formation in humans. *Blood*. 2018;131(24):2605-2616. doi:10.1182/blood-2017-09-808808

185. Jooss NJ, Simone I De, Provenzale I, et al. Role of platelet glycoprotein VI and Tyrosine Kinase Syk in thrombus formation on collagen-like surfaces. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11). doi:10.3390/ijms20112788
186. Spalton JC, Mori J, Pollitt AY, Hughes CE, Eble JA, Watson SP. The novel Syk inhibitor R406 reveals mechanistic differences in the initiation of GPVI and CLEC-2 signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2009;7(7):1192-1199. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03451.x
187. Van Eeuwijk JMM, Stegner D, Lamb DJ, et al. The novel oral Syk inhibitor, BI1002494, protects mice from arterial thrombosis and thromboinflammatory brain infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(6):1247-1253. doi:10.1161/ATVBAHA.115.306883
188. van Zanten GH, de Graaf S, Slootweg PJ, et al. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest.* 1994;93(2):615-632. doi:10.1172/jci117014
189. Jamasbi JM. *Vergleich Bekannter Und Entwicklung Neuer Therapeutischer Ansätze Zur Hemmung Der Interaktion von Thrombozytärem Glykoprotein VI Mit Atherosklerotischem Plaque. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät.;* 2016.
190. Reiningger AJ, Bernlochner I, Penz SM, et al. A 2-step mechanism of arterial thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(11):1147-1158. doi:10.1016/j.jacc.2009.11.051
191. Van Kruchten R, Cosemans JMEM, Heemskerk JWM. Measurement of whole blood thrombus formation using parallel-plate flow chambers a practical guide. *Platelets.* 2012;23(3):229-242. doi:10.3109/09537104.2011.630848
192. Elia N, Ott C, Lippincott-Schwartz J. Incisive Imaging and Computation for Cellular mysteries: Lessons from Abscission. *Cell.* 2013;155(6):1220-1231. doi:10.1016/j.cell.2013.11.011
193. Soslau G, Class R, Morgan DA, et al. Unique Pathway of Thrombin-induced Platelet Aggregation Mediated by Glycoprotein Ib. *J Biol Chem.* 2001;276(24):21173-21183. doi:10.1074/jbc.M008249200
194. Blankenship JC. Bleeding complications of glycoprotein IIb-IIIa receptor inhibitors. *Am Heart J.* 1999;138(4):S287-S296. doi:10.1053/HJ.1999.V138.A100461
195. Reiningger AJ. Thrombusformation im Blutfluss. In: *Hämostaseologie.* Springer Berlin Heidelberg; 2010:73-80. doi:10.1007/978-3-642-01544-1_9
196. Schönberger T, Ziegler M, Borst O, et al. The dimeric platelet collagen receptor GPVI-Fc reduces platelet adhesion to activated endothelium and preserves myocardial function after transient ischemia in mice. <https://doi.org/10.1152/ajpcell000602012>. 2012;303(7):757-766. doi:10.1152/AJPCCELL.00060.2012
197. Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50(4):326-336. doi:10.3109/10409238.2015.1050550
198. Onselae MB, Hardy AT, Wilson C, et al. Fibrin and D-dimer bind to monomeric GPVI. *Blood Adv.* 2017;1(19):1495-1504. doi:10.1182/bloodadvances.2017007732
199. Meinrad Gawaz, Elisabeth Kremmer GM. *Europäisches Patentamt European Patent Office *EP001538165A1*;* 2003.
200. Endenburg SC, Hantgan RR, Lindeboom-Blokzijl L, et al. On the role of von Willebrand factor in promoting platelet adhesion to fibrin in flowing blood. *Blood.* 1995;86(11):4158-4165. doi:10.1182/blood.v86.11.4158.bloodjournal86114158
201. Gardiner EE, Arthur JF, Shen Y, et al. GPIb-selective activation of platelets induces platelet signaling events comparable to GPVI activation events. *Platelets.* 2010;21(4):244-252. doi:10.3109/09537101003695339

202. Loscalzo J, Inbal A, Handin RI. von Willebrand protein facilitates platelet incorporation in polymerizing fibrin. *J Clin Invest*. 1986;78(4):1112-1119. doi:10.1172/JCI112668
203. Briedé JJ, Wielders SJH, Heemskerk JWM, Baruch D, Hemker HC, Lindhout T. von Willebrand factor stimulates thrombin-induced exposure of procoagulant phospholipids on the surface of Fibrin-Adherent platelets. *J Thromb Haemost*. 2003;1(3):559-565. doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00077.x
204. Miszta A, Pelkmans L, Lindhout T, et al. Thrombin-dependent Incorporation of von Willebrand factor into a Fibrin network. *J Biol Chem*. 2014;289(52):35979-35986. doi:10.1074/jbc.M114.591677
205. Massberg S, Gawaz M, Grüner S, et al. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med*. 2003;197(1):41-49. doi:10.1084/jem.20020945
206. Revacept in Symptomatic Carotid Stenosis (Revacept/CS/02) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01645306>. Accessed June 4, 2020.
207. Mayer K, Hein-Rothweiler R, Schüpke S, et al. Efficacy and Safety of Revacept, a Novel Lesion-Directed Competitive Antagonist to Platelet Glycoprotein VI, in Patients Undergoing Elective Percutaneous Coronary Intervention for Stable Ischemic Heart Disease: The Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled ISAR-PLASTER Phase 2 Trial. *JAMA Cardiol*. 2021;6(7):753-761. doi:10.1001/JAMACARDIO.2021.0475

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der wichtigsten Thrombozyten-Rezeptoren und ihre intra-zellulären Signalwege; modifiziert nach Stegner et al. 2011	13
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines monomeren GPVI; modifiziert nach Nieswandt et al. 2003 ..	17
Abbildung 3: Schematische Darstellung des GPVI-Dimers und der intrazellulären Signalwege bis zur Thrombozytenaktivierung (vereinfachte Darstellung); modifiziert nach Nieswandt et al. 2003	19
Abbildung 4: schematischer Aufbau von Fibrinogen; modifiziert nach Köhler et al. 2015	21
Abbildung 5: vereinfachte schematische Darstellung der Fibrinbildung	21
Abbildung 6: Aufbau des Flussexperimentes	34
Abbildung 7: GPVI-AK 5C4 hat keinen Effekt auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen	39
Abbildung 8: Der Syk-Inhibitor II hat keinen Effekt auf die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen	40
Abbildung 9: BTKi Ibrutinib hemmt die Fibrinogen-induzierte Thrombozyten--Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)	41
Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahmen der Thrombozyten-Adhäsion an Fibrinogen von Minute 1 bis 542	
Abbildung 11: Minütliche Repräsentation der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation auf Fibrin	43
Abbildung 12: Kinetik der Thrombozytenadhäsion/-aggregation auf Fibrinogen und Fibrin unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)	43
Abbildung 13: Der GPVI-AK 5C4 hemmt die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)	44
Abbildung 14: Syk-Inhibitor II hemmt die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)	45
Abbildung 15: GPIb-AK 6B4 hemmt die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)	46
Abbildung 16: Wirkung der Kombinationshemmung von 5C4/Syk-Inhibitor II und 6B4/Syk-Inhibitor II auf die Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen im Vergleich zu den Einzelsubstanzen (600/s).....	48
Abbildung 17: BTKi Ibrutinib hemmt die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)	49
Abbildung 18: GPVI-AK 5C4 (5µg/ml) hemmt die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s).	50
Abbildung 19: Syk-Inhibitor II (2µM) hemmt die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation	51
Abbildung 20: GPIb-AK 6B4 (5µg/ml) hemmt die Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s).....	52
Abbildung 21: BTKi Ibrutinib (1µM) hemmt die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s).....	53
Abbildung 22: Minütliche Repräsentation der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation auf Plasmafibrin	55
Abbildung 23: Wirkung des GPVI-AK 5C4 (5µg/ml) auf die Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)	55
Abbildung 24: GPVI-AK 5C4 hemmt nicht signifikant die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellem Fluss (600/s).....	56
Abbildung 25: Syk-Inhibitor II (2µM) hemmt nicht signifikant die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellem Fluss (600/s).	57
Abbildung 26: GPIb-AK 6B4 (5µg/ml) hemmt die Plättchen-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen.....	58

Abbildung 27: Ibrutinib hemmt die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s) nicht signifikant.....	59
Abbildung 28: GPVI-AK 5C4 hemmt die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s) nicht.....	60
Abbildung 29: Syk-Inhibitor II (2µM) hemmt die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s) nicht.....	61
Abbildung 30: Der GPIb-AK 6B4 (5µg/ml) hemmt die Plättchen-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s)	62
Abbildung 31: Ibrutinib hemmt die Plasmafibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s) nicht	63
Abbildung 32: Repräsentative Darstellung des Tissue Factor-Fibrins.....	64
Abbildung 33: Repräsentative Darstellung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation auf den verschiedenen Fibrinarten nach 4 min.....	64
Abbildung 34: GPVI-AK 5C4 hemmt die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s) nicht.....	65
Abbildung 35: Syk-Inhibitor II (2µM) hemmt die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s) nicht	66
Abbildung 36: GPIb-AK 6B4 (5µg/ml) hemmt die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (600/s)	67
Abbildung 37: Ibrutinib hemmt die TF-Fibrin-induzierte Thrombozyten-Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen (1265/s) nicht	68
Abbildung 38: Silberfärbung der Proteine. Plasma-Fibrin inkorporiert im Vergleich zu rekombinantem und reinem (pure) Fibrin zusätzliche Proteine	70
Abbildung 39: Immunoblots der Proteine in den verschiedenen Fibrinnetzwerken. Plasmafibrin inkorporiert im Vergleich zu rekombinantem und reinem (pure) Fibrin zusätzliche Proteine.....	71
Abbildung 40: Plasmafibrin (links) und Fibrin (rechts) unterscheiden sich in der Netzstruktur und der Faserdicke. SIM-Bildgebung	72
Abbildung 41: Aufnahmen der Fibrinnetze in der Maximal Intensity Projection (MIP). Confocal Laser Scanning Mikroskopie (TPSLM-Aufnahmen)	73
Abbildung 42: Repräsentative Bilder der Thrombozytenadhäsion auf Plasmafibrin und reinem Fibrin unter arteriellen Flussbedingungen. SIM-Bildgebung.....	74
Abbildung 43: Repräsentative Bilder einzelner adhätierender Thrombozyten auf Plasmafibrin und reinem Fibrin unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 1265/s).	75
Abbildung 44: Co-Lokalisation von Albumin und Fibrin. SIM-Bildgebung	76
Abbildung 45: Adhäsion von Thrombozyten unter Flussbedingungen bevorzugt an „Albumin-freies“ Fibrin (SIM: Structured Illumination Microscopy)	77

10 Videoverzeichnis

Auf dem beigelegten USB-Stick befinden sich folgende Videos.

Video 1: Thrombozytenadhäsion und -Aggregation auf Fibrin: stark aktiviert

Fibrin (rot) wurde mit Fibrin Alexa Fluor-647 *conjugate* und Thrombozyten (grün) mit anti-CD41-Alexa-Fluor 488 *conjugate* angefärbt. Nach 2 min arterieller Perfusion (Scherrate: 1265/s) mit Hirudinblut wurde das Präparat mit *Prolong Diamond Antifade Mountant* fixiert. Die Aufnahmen wurden mittels Structured Illumination Microscopy (SIM) und dem ELyra PS.1 Mikroskop durchgeführt. Das Video wurde mit der Software Software ZEN Black Edition (CarlZeiss Microimaging) konstruiert.

Video 2: Repräsentativer aktivierter Thrombozyt auf Fibrin: stark aktiviert

Durchführung s. Video 1. Zoom auf einen aktivierten Thrombozyten.

Video 3: Thrombozytenadhäsion und -Aggregation auf Plasmafibrin: gering aktiviert

Plasmafibrin (rot) wurde mit Fibrin Alexa Fluor-647 *conjugate* und Thrombozyten (grün) mit anti-CD41-Alexa-Fluor 488 *conjugate* angefärbt. Nach 2 min arterieller Perfusion (Scherrate: 1265/s) mit Hirudinblut wurde das Präparat mit *Prolong Diamond Antifade Mountant* fixiert. Die Aufnahmen wurden mittels Structured Illumination Microscopy (SIM) und dem ELyra PS.1 Mikroskop durchgeführt. Das Video wurde mit der Software Software ZEN Black Edition (CarlZeiss Microimaging) konstruiert.

Video 4: Repräsentativer aktivierter Thrombozyt auf Plasmafibrin: gering aktiviert

Durchführung s. Video 3. Zoom auf einen aktivierten Thrombozyten.

Video 5: 3D-Darstellung Thrombozyten-Adhäsion an Fibrin

AlexaFluor-594 Fibrinogen (rot) wurde vor der Fibrinherstellung der Fibrinogen-Lösung hinzugefügt (*Enzyme Research*). Fibrin wurde anschließend auf die Deckglässchen aufgetragen und mit hirudinierten Blut mit einer Scherrate von 600/s perfundiert. Nach 2 min wurde das Präparat mit *Prolong Diamond Antifade Mountant* fixiert. Die Thrombozyten wurden schließlich mit anti-CD41 AlexaFluor-488 *conjugate* (grün) gefärbt. The Videos zeigen TPSLM Bilder, die mit folgenden z-Abschnitten (z-sections) aufgenommen worden sind ($z = 0,2\mu\text{m}$).

Video 6: 3D-Darstellung Thrombozyten-Adhäsion an Plasmafibrin

AlexaFluor-594 Fibrinogen (rot) wurde vor der Fibrinherstellung dem Spender-Plasma. Das Plasmafibrin wurde anschließend auf die Deckglässchen aufgetragen und mit hirudinierten Blut mit einer Scherrate von 600/s perfundiert. Nach 2 min wurde das Präparat mit *Prolong Diamond Antifade Mountant* fixiert. Die Thrombozyten wurden schließlich mit anti-CD41 AlexaFluor-488 *conjugate* (grün) gefärbt. The Videos zeigen TPSLM Bilder, die mit folgenden z-Abschnitten (z-sections) aufgenommen worden sind ($z = 0,2\mu\text{m}$).

11 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof Siess bedanken, der mich stets mit brillanten Ideen und seinem unerschöpflichen Wissen (nicht nur über Thrombozyten) unterstützt hat. Durch seine zahlreichen Anregungen und auch Kritik ist diese Arbeit entstanden.

Auch meinen Kollegen am IPEK bin ich ausgesprochen dankbar. Durch euren mentalen und intellektuellen Beistand hatte ich die Gelegenheit, viel Neues und Spannendes in meiner Zeit im „Gartenhäusschen“ zu lernen. Vor allem Xavier stellte immer eine wesentliche Stütze bei jeglicher Art von wissenschaftlichen Fragen dar.

Besonders danken möchte ich auch meinen Labor-Kolleginnen, nun gute Freundinnen, Janina und Mariam. Es war immer eine Freude, ins Labor zu kommen, und trotz der oft frustrierten Versuche, war es mir dank euch stets möglich, Spaß zu haben und motiviert zu bleiben. Während unserer gemeinsamen Zeit und darüber hinaus, stand und steht gerade Janina mir durch ihren unendlichen Erfahrungsschatz immer mit Rat und Tat zur Seite.

Sehr von Herzen danken möchte ich an dieser Stelle zudem meinen Freunden (v.a. Lexi), meinen Eltern und vor allem Donny und Pranjal, die mich während der gesamten Zeit begleitet und unermüdlich angetrieben haben.