

I. Medizinische Klinik und Poliklinik der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A Schömig)

**Die Rolle der thrombozytären Kollagenrezeptoren Glycoprotein VI und
 $\alpha 2\beta 1$ -Integrin für die Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation an
atheromatöser Plaque**

Christof Herbert Wolfgang Hoffmann

I. Medizinische Klinik und Poliklinik der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A Schömig)

**Die Rolle der thrombozytären Kollagenrezeptoren Glycoprotein VI und
 $\alpha 2\beta 1$ -Integrin für die Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation an
atheromatöser Plaque**

Christof Herbert Wolfgang Hoffmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. St. Maßberg
 2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 06.03.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 19.11.2008 angenommen.

Verwendete Abkürzungen

ADP	Adenosin 5`Diphosphat
AU	aggregation units
CD	cluster of differentiation
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
DAB	Di-Aminobenzidine Tetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FcR	Fc-Receptor
FCS	Flow Chamber System
G	Erdbeschleunigung
GP	Glycoprotein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hz	Hertz
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IE	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin Klasse G
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif
kDa	Kilodalton
LAT	Adaptor Linker of T cell activation
LDL	Low Density Lipoprotein
LMU	Ludwig-Maximilian Universität
M	Molar
MCP	monocyte chemoattractant protein
mM	Millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NFκB	nuclear factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
P	Wahrscheinlichkeit

PBS	phosphate-buffered saline
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ (= Prostacyclin)
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
POD	Peroxidase
PPP	platelet poor plasma
PRP	platelet rich plasma
S.E.M.	standard error of the mean (Standardabweichung des Mittelwertes)
SLP 76	SH ₂ domain containing leukocyte protein of 76 kDa
Syk	spleen tyrosine kinase
TF	tissue factor
TxA ₂	Thromboxan A ₂
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vol. %	Volumenprozent
vWF	von Willebrand Fraktor

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	
1.1 Epidemiologie	6
1.2 Thrombozyten	6
1.2.1 Aufbau und Funktion	6
1.2.2 Thrombozyten und Hämostase	8
1.2.3 Thrombozyten und Atherosklerose	12
1.3 Atherosklerotische Plaque und akutes Koronarsyndrom	13
1.3.1 Pathoanatomie der atherosklerotischen Plaque	13
1.3.2 Pathophysiologie des akuten Koronarsyndroms	13
1.4 Untersuchte Kollagenrezeptoren	18
2 Methoden	
2.1 Immunhistochemie	21
2.2 Messung der Bindung von GPVI an immobilisiertes Kollagen und atherosklerotische Plaque	22
2.3 Durchflusskammerversuche	
2.3.1 Allgemeine Prinzipien	23
2.3.2 Montage der Durchflusskammer	25
2.3.3 Beschichtung der Deckgläser mit Kollagen und Plaquematerial	27
2.3.4 Vorbereitung der Blutproben	
2.3.4.1 Blutentnahme	29
2.3.4.2 Thrombozytenfärbung	29
2.3.5 Rezeptorblockade	
2.3.5.1 Inkubation der Blutproben mit 5C4-Fab, IB4 und 2D1	30
2.3.5.2 Vorinkubation Kollagenoberfläche mit GPVI-Fc und Fc-Fragment	30
2.3.6 Versuchsablauf	30
2.3.7 Photographische Dokumentation	32
2.3.8 Auswertung	32

2.4 Thrombozytenaggregation	
2.4.1 Thrombozytenpräparation	34
2.4.2 Versuchsablauf	34
2.5 Statistik	37
3 Resultate	
3.1 Verteilung von Kollagen I/III und GPVI-Bindungsstellen in einer atheromatösen Plaque	38
3.2 Quantitative Analyse der Bindung von GPVI-Fc an humanes Plaquematerial und Kollagen I/III	41
3.3 Rolle von GPVI und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin für die Plaque- und Kollagen-induzierte Plättchenaggregation	42
3.4 Beeinflussung der Thrombozytenadhäsion an Kollagen I und III unter Flussbedingungen durch Blockade von GPVI und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin	43
3.5 Hemmung der Thrombozytenadhäsion an Kollagen I und III unter Flussbedingungen durch GPVI-Fc und Fc-Fragment	47
3.6 Auswirkung der Hemmung von GPVI und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin auf die Thrombozytenadhäsion an humane atheromatöse Plaque	
3.6.1 Direkte Blockade des GPVI-Rezeptors durch Antikörper	50
3.6.2 Blockade von GPVI-Bindungsstellen auf Plaque und Kollagenoberflächen durch GPVI-Fc	52
4 Diskussion	54
5 Zusammenfassung	62
6 Literaturverzeichnis	64
7 Abbildungsverzeichnis	69
8 Danksagungen	71
9 Lebenslauf	72

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2002 stellten die kardiovaskulären Erkrankungen mit 46,8% die Haupttodesursache in der Bundesrepublik Deutschland dar (Todesursachenstatistik 2002, Statistisches Bundesamt). Dabei verstarben insgesamt ca. 70000 Patienten an einem Herzinfarkt und eben so viele an einem apoplektischen Insult, einer pathogenetisch ähnlichen Erkrankung. Yusuf et. al. konnten zeigen, dass die Erkrankungen des Herzkreislaufsystems auch in den Entwicklungsländern deutlich an Bedeutung zugenommen haben⁴¹. Schätzungen ergaben, dass jährlich mehr als 19 Millionen Menschen weltweit an dem so genannten akuten Koronarsyndrom versterben²⁵.

1.2 Thrombozyten

Thrombozyten sind für die physiologische Blutstillung im Rahmen einer Gefäßwandläsion von zentraler Bedeutung. Sie sind aber auch wichtiger Bestandteil der Pathomechanismen der arteriellen Thrombose. Neben der Bildung des plättchenreichen Thrombus, der zum Gefäßverschluss führt, sind Plättchen an der Entstehung und Progression einer atherosklerotischen Plaque, an Mikroembolisationen in nachgeschalteten Gefäßen, Vasokonstriktion und chronischen Entzündungsreaktionen beteiligt^{10,40}.

1.2.1 Aufbau und Funktion

Mit einem Durchmesser von 2-3,5µm stellen die Blutplättchen den kleinsten korpuskulären Bestandteil des Blutes dar. Es handelt sich um scheibenförmige, kernlose Plättchen mit einer Dicke von 0,5-0,75µm. Sie werden im Knochenmark von Megakaryozyten durch Abschnürung gebildet. Je nach Zellgröße und Chromosomenzahl entstehen aus einem Megakaryozyten 500-5000 Plättchen, wobei die Bildung von Thrombozyten hauptsächlich durch den Botenstoff Thrombopoetin und Zytokine wie Interleukin 3 und 6 gesteuert wird. Die Erneuerungsrate der zirkulierenden Blutplättchen beträgt 15% pro Tag. Die

Überlebenszeit von Thrombozyten im peripheren Blut beträgt 7 Tage, der Abbau findet im retikuloendothelialen System von Leber, Milz und Lunge statt.

Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren Thrombozyten im Gefäßsystem ohne relevante Interaktion mit der Gefäßwand. Eine Adhäsion und Aktivierung der Plättchen wird durch Oberflächen-Eigenschaften der intakten Endothelschicht verhindert. Zusätzlich hemmt das Endothel durch die Freisetzung von vasoaktiven und antithrombogenen Mediatoren, insbesondere Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI₂), die physiologische Reaktivität der Thrombozyten.

Der morphologische Aufbau der Plättchen kann in vier Bereiche gegliedert werden: als *periphere Zone* wird die Plasmamembran mit der angrenzenden Glykokalyx bezeichnet. Die Zellmembran besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht in die Membranglykoproteine bzw. -Rezeptoren eingebettet sind. Bei Aktivierung können Thrombozyten die Zusammensetzung und den Aufbau der Zellmembran verändern und durch Änderung der Phospholipidorientierung die Bindung von plasmatischen Gerinnungsfaktoren an die Thrombozytenoberfläche ermöglichen. Der ausgebildete katalytische Komplex bildet die Grundlage für die plasmatische Gerinnung¹¹.

Im Elektronenmikroskop erkennt man unter der Zellmembran die *strukturelle Zone* oder Hyalomer. Dort befinden sich Mikrotubuli und Strukturproteine, die die Formveränderungen der Plättchen ermöglichen. Die *Zone der Organellen*, das Granulomer, beinhaltet Mitochondrien, Glykogenspeicher und drei verschiedene Granula-Typen, die als Speicherort für Signalbotenstoffe, Enzyme, Wachstums- und Koagulationsfaktoren sowie adhäsive Proteine dienen. Es werden elektronendichte Granula, α -Granula, und Lysosomen unterschieden. Die Freisetzung der Inhaltsstoffe der elektronendichten Granula und α -Granula spielt bei der Plättchenaggregation und Blutstillung eine zentrale Rolle. Die Bedeutung der lysosomalen Enzyme der Thrombozyten ist noch nicht geklärt. Das *Membransystem* stellt die vierte morphologische Zone dar, wobei ein offenes kanalikuläres System von einem dichten tubulären System unterschieden wird. Bei dem dichten kanalikulären System handelt es sich um einen Abkömmling des rauhen endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten. Es ist ein Hauptspeicherort für freie Kalziumionen, die für Steuerung und Aktivierung des Plättchens wichtig sind.

Das offene kanalikuläre System besteht aus gewundenen Membrankanälen die weit in das Plättcheninnere reichen. Durch die Poren an der Membranoberfläche haben sie Anschluss an

den Extrazellulärraum. Werden Thrombozyten zur Sekretion von Granula-Inhaltsstoffen aktiviert, können die Speichervesikel durch Verschmelzung mit dem offenen kanalikulären System den Inhalt an den Extrazellulärraum abgeben.

Thrombozyten können durch das Fehlen von DNA und die nur geringen Reste an mRNA nur sehr eingeschränkt Proteine synthetisieren¹¹.

Plättchen können nach Aktivierung durch lösliche Faktoren oder Anheftung an stimulierende Oberflächen aktiv ihre Form verändern und durch Ausstülpfen der Plasmamembran Pseudopodien bilden („shape change“). Ihre Oberfläche vergrößert sich so auf bis zu 13µm². Dabei interagieren sie mittels einer Fülle von Rezeptoren untereinander, mit Strukturen der Gefäßwand (z.B. subendothelialer Matrix, Endothelzellen), plasmatischen Gerinnungsfaktoren sowie mit zirkulierenden korpuskulären Bestandteilen des Blutes (z.B. Leukozyten, Progenitorzellen)^{11,14}.

Die dabei beteiligten Membranglycoproteine lassen sich in verschiedene Klassen einteilen. Zu der Klasse der *Integrine* gehören Rezeptoren wie z.B. der klassische Kollagen-Rezeptor $\alpha 2\beta 1$ -Integrin, der Fibrinogenrezeptor $\alpha IIb\beta III$ -Integrin (GPIIb-IIIa) oder der Vitronektinrezeptor $\alpha V\beta 3$ -Integrin (GPav-IIIa). Zu den *leuzinreichen Glykoproteinen* zählt man u.a. den Kollagenrezeptor GPVI und den von-Willebrand-Faktor-(vWF)Rezeptor GPIb-V-IX. Daneben finden sich *Selektine*, *Immunglobulin-ähnliche Adhäsionsrezeptoren* und *lysosomale Membranproteine* auf der Thrombozytenoberfläche¹¹.

1.2.2 Thrombozyten und Hämostase

Nach Verletzungen, bei denen es zur Eröffnung kleiner Blutgefäße kommt, stoppt die Blutung beim Gesunden nach 1-3 Minuten (Blutungszeit). Die Reaktion von Thrombozyten auf den Kontakt mit subendothelialer Matrix, die nach Verletzung des Endothels exponiert wird, ist dabei für die physiologische Blutstillung von entscheidender Bedeutung.

Die subendotheliale extrazelluläre Matrix besteht aus einem Netzwerk verschiedener Komponenten (z.B. Kollagen, elastischen Fibrillen), das in ein viskös-elastisches Gel aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Wasser eingebettet ist. Kollagen ist mit einem Anteil von ca. 40% am Gesamtprotein sowohl Hauptbestandteil der Zellwand als auch Hauptadhäsionsprotein für Thrombozyten. Fibronectin und Laminin sind daneben die wichtigsten nicht-kollagenen Adhäsionsmoleküle. Das Anheften von Plättchen an die

verletzte Gefäßwand wird vor allem durch fibrillär strukturiertes Kollagen vermittelt³⁸. Der Aufbau der extrazellulären Matrix der Gefäßwand verändert sich sowohl mit zunehmendem Alter des Menschen als auch beim Auftreten von Atherosklerose. Der Anteil an Kollagen, insbesondere der Subtypen I und III nimmt zu^{29,31}.

Die Interaktion zwischen Thrombozyten und Zellwandläsion im Rahmen der Blutstillung kann in verschiedene Phasen unterteilt werden:

Zuerst kommt es zu einer transienten Bindung von Plättchen an die Gefäßwandläsion, dem so genannten „*platelet tethering*“. Nach *Aktivierung* und *fester Adhäsion* der Plättchen an die Gefäßwand wird dann die *Aggregation* und *Thrombusformation* eingeleitet.

In der ersten Kontaktphase wird die Interaktion über kollagenimmobilisierten von-Willebrand-Faktor (vWF) und den thrombozytären vWF-Rezeptor (GP Ib-V-IX) vermittelt. Die Interaktion von vWF mit dem entsprechenden Rezeptor ist durch eine sehr hohe Bindungsstärke gekennzeichnet. Dies ermöglicht vor allem in den Gefäßabschnitten des arteriellen Stromgebietes die Adhäsion von Plättchen an die Gefäßwand. Allerdings ist diese Bindung auch durch eine relativ hohe Dissoziationskonstante gekennzeichnet, was bedeutet, dass Plättchen nicht dauerhaft binden, sondern nur von ihrer Flussgeschwindigkeit abgebremst werden und über die freigelegte subendotheliale Matrix rollen. Neuere Untersuchungen zeigen dass auch der thrombozytäre Kollagenrezeptor GPVI eine direkte Adhäsion von Thrombozyten an die extrazelluläre Matrix vermitteln kann¹⁵.

Die Phase der Aktivierung wird durch die Bindung von Kollagenrezeptoren, besonders des GPVI-Rezeptors, an das Kollagen der Gefäßwand eingeleitet und führt zu einer Formveränderung der adhärenen Plättchen. Die Bindung von GPVI an Kollagen setzt intrazelluläre Signalwege in Gang, die andere Membranrezeptoren wie z.B. GPIIb/IIIa aktivieren und so eine feste Bindung der Thrombozyten ermöglichen. Der bereits oben beschriebene „*shape change*“ ist Zeichen der Aktivierung des Thrombozyten. Eine effektive Abdichtung der Gefäßwandläsion wird durch das Ausspreizen der Plättchen gewährleistet. Durch Freisetzen von verschiedenen Mediatoren (z.B. Thromboxan A₂, Serotonin, Prostaglandinen, NO) aus intrazellulären Granula und durch die parakrine sowie autokrine Wirkung der Mediatoren wird die Aktivierung der Thrombozyten verstärkt (Thromboxan) und eine Kontraktion der umgebenden Gefäßwand induziert (Serotonin)¹¹.

Membranständige Adhäsionsrezeptoren wie z.B. Kollagen-, Laminin- und Fibronektinrezeptoren stabilisieren die noch labile Bindung des Thrombozyten an Kollagen.

Die Sekretion von Granulainhaltsstoffen führt zusätzlich zur Rekrutierung von noch ruhenden Plättchen aus der Zirkulation. Diese werden zur Aggregation an die schon adhären Plättchen angeregt. Als Aggregation bezeichnet man den Vorgang der Koadhäsion zwischen Thrombozyten. Dieser Vorgang wird über den GPIIb-IIIa-Rezeptor und eine Fibrinogenbrücke vermittelt. Im Ruhezustand kann Fibrinogen nicht an den GPIIb-IIIa-Rezeptor binden. Erst nach Aktivierung des Blutplättchens und unter Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen kommt es im Bereich des Rezeptors zur Freilegung der entsprechenden Bindungsstellen.

Die primäre Aggregation stellt eine lockere und reversible Bindung dar. Die sekundäre, irreversible Stabilisierung der Bindung tritt zeitverzögert im Zuge der plasmatischen Gerinnung ein, die zu einer enzymatischen Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin führt.

Als Endstadium der Adhäsion wird die Phase bezeichnet, in der die Thrombozyten vollständig über die subendotheliale Matrix ausgespreizt sind¹¹.

Die beschriebenen Phasen laufen nicht zeitlich streng gestaffelt sondern parallel ab und gehen fließend ineinander über. Bei den Aktivierungsschritten erfolgen positive Rückkopplungsmechanismen, die zu einer Verstärkung der Blutstillung führen.

Eine Ausbreitung über den verletzten Gefäßbereich hinaus wird durch die Freisetzung von Mediatoren wie NO oder Prostazyklin aus dem umgebenden, noch intakten Endothel verhindert. Prostazyklin und NO wirken über die Aktivierung membranständiger Guanylylzyklasen und die Steigerung der intrazellulären cGMP-Konzentration des Thrombozyten einer Plättchenaktivierung entgegen.

Neben ihrer zentralen Rolle in der primären Blutstillung sind die Thrombozyten auch in das System der sekundären Hämostase (Blutgerinnung) integriert. Da das zunächst gebildete Plättchenaggregat relativ instabil ist (weißer Abscheidungsthrombus), ist eine weitere Konsolidierung des plättchenreichen Thrombus notwendig. Dies wird über eine lokale Aktivierung der Blutgerinnung erreicht¹¹.

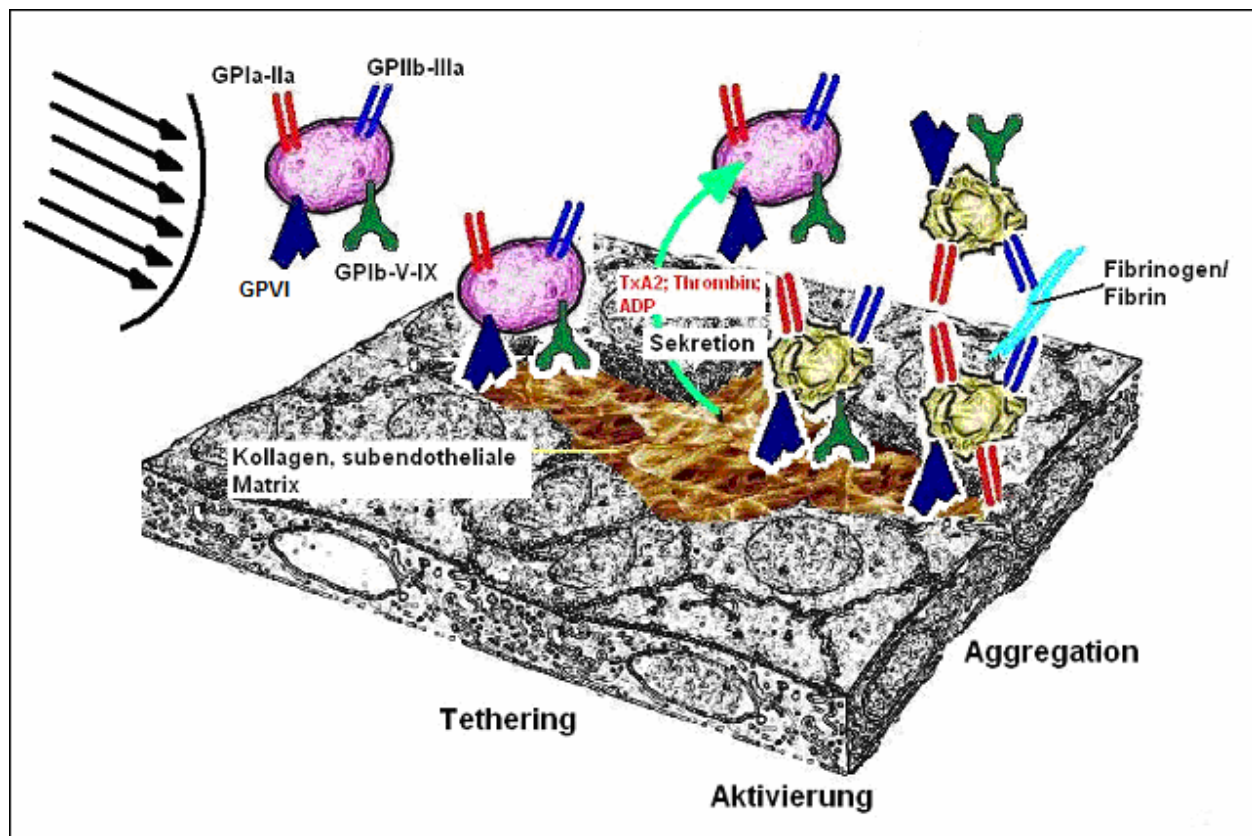


Abb.1: Schematische Darstellung der Plättchenadhäsion, Aktivierung und Aggregation nach Freilegung von subendothelialer Matrix durch eine Gefäßwandverletzung.

Die sekundäre Hämostase beginnt mit der Aktivierung der Gerinnungskaskade und der Bildung von Thrombin und Fibrin in der Umgebung des Thrombus. Die prokoagulatorische Aktivität des Thrombozyten wird durch Plättchenfaktor 3 vermittelt und basiert auf der Ausbildung des Prothrombinase-Komplexes. Dieser Komplex bildet sich nach Stimulation des Plättchens durch Neuorientierung von Membranphospholipiden auf der Thrombozytenoberfläche und katalysiert die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin. Thrombin wiederum wandelt Fibrinogen in Fibrin um. Die Anlagerung von Fibrin an das Plättchenaggregat führt zur mechanischen Stabilisierung des Thrombus und zur Anlagerung anderer Blutzellen (roter Abscheidungsthrombus). Von den Thrombozyten abgeschnürte Mikropartikel können die prokoagulatorische Aktivität verstärken.

1.2.3 Thrombozyten und Atherosklerose

Plättchen sind aber nicht nur zentraler Bestandteil der physiologischen Blutgerinnung, sondern sie sind auch wesentlich an der Entstehung und Progression der Atherosklerose beteiligt.

Der zentrale pathophysiologische Auslösemechanismus der Atherosklerose ist ein inflammatorischer Prozess in der Gefäßwand, der zu einer Dysfunktion des Endothels führt. Bedingt durch die Entzündung und die dadurch verminderte Ausschüttung von Thrombozyten-hemmenden Substanzen aus den Endothelzellen kommt es zum Umbau der Endothelzellschicht in den betroffenen Gefäßabschnitten. Die Umbauvorgänge erhöhen die Permeabilität der Interzellulärkontakte für Makromoleküle wie z.B. LDL-Partikel, die dadurch vermehrt zwischen den Endothelzellen in die subendotheliale Wandschicht diffundieren können und den chronischen Entzündungsprozess weiter unterstützen²⁰. Es folgt die Adhäsion von Monozyten an das veränderte Endothel, ihre Migration in die Intima, die Phagozytose von oxidierten LDL-Partikeln und die Differenzierung der Monozyten zu Schaumzellen¹¹.

Massberg et. al. konnten 2002 zeigen, dass Thrombozyten an das Gefäßendothel von Mäusen anheften, *bevor* sich atherosklerotische Läsionen in den betroffenen Bereichen ausbilden²¹. Um mit der veränderten Endothelzellschicht interagieren zu können, müssen die Plättchen in einem aktivierten Zustand vorliegen. Die Anwesenheit von oxidiertem LDL in der subendothelialen Matrix unterdrückt die Produktion von NO in den benachbarten Endothelzellen und ermöglicht so eine lokale Aktivierung von Plättchen²⁰. Daneben sind kardiovaskuläre Risikofaktoren für Atherosklerose wie z.B. arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder Nikotinabusus mit einer erhöhten basalen Aktivierung und Hyperaggregabilität der zirkulierenden Blutplättchen assoziiert.

Thrombozyten setzen nach Kontakt mit der verletzten Endotheloberfläche inflammatorische Botenstoffe frei, die eine Aktivierung der Endothelzellen und eine Veränderung ihrer adhäsiven Eigenschaften bewirken. Dadurch werden die Diffusion von LDL-Partikeln und die Monozytenmigration in die subendotheliale Matrix erleichtert. Die Endothelzellen und glatten Muskelzellen werden zur Freisetzung von „monocyte chemoattractant protein 1“ (MCP1) und zur Expression von „intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM-1) Rezeptoren auf ihrer Oberfläche angeregt. Beide sind für die Adhäsion von Monozyten an der Gefäßwand notwendig. Außerdem wandern glatte Muskelzellen, durch

Thrombozyten über Botenstoffe angeregt, von der Media in die Intima ein und steigern ihre Transskription von NF- κ B abhängigen Genprodukten. NF- κ B ist ein zellulärer Transkriptionsfaktor, der für die Aktivierung verschiedener Genorte auf der DNA verantwortlich ist. Dazu gehören Gene, die bei einer Immunantwort, Entzündungsreaktionen oder Zelladhäsion und -wachstum beteiligt sind. Dadurch werden Intimaproliferation, atherosklerotischer Gefäßwandumbau und eine chronische Entzündung im betreffenden Gefäßwandabschnitt gefördert ¹¹.

1.3 Atherosklerotische Plaque und akutes Koronarsyndrom

1.3.1 Pathoanatomie der atherosklerotischen Plaque

Eine atherosklerotische Gefäßwandveränderung besteht aus einem Lipidkern und einer zentralen Kernregion, die in der Mitte der exzentrisch verdickten Intima gelegen sind. Dieser Kernbereich wird auf seiner luminalen Seite von einer fibrösen, kollagenreichen Kappe, an seinem Rand von einer Schulterregion und an seiner vom Lumen abgewandten Seite von der Plaquebasis begrenzt. Im Zentrum der Plaque sind zahlreiche Schaumzellen enthalten. Dabei handelt es sich um Makrophagen die von Monozyten abstammen und sich durch Phagozytose von lipidreichem Material differenzieren. Sie bilden große Mengen an „tissue factor“ (Gewebsthromboplastin) und präsentieren diesen auf ihrer Oberfläche ¹⁷. Die fibröse Kappe besteht aus Kollagenfibrillen, die von den glatten Muskelzellen der Intima gebildet werden (*siehe Abbildung 2*)

1.3.2 Pathophysiologie des akuten Koronarsyndroms

Das Konzept der Plaqueruptur als Ursache für das akute Koronarsyndrom wurde erstmals 1926 von Benson vorgeschlagen ². Den schlüssigen Beweis für die Entstehung von koronaren Thromben aus rupturierten Plaques lieferte schließlich Constandinides 1966 im Rahmen von Autopsiestudien ⁷. Brown et. al konnten 1986 zeigen, dass es in der Regel nicht die hochgradigen Stenosen sind, die zur Plaqueruptur und koronarer Thrombenbildung führen, sondern dass der Stenosegrad Ruptur-gefährdeter Plaqueareale im Mittel nur etwa 56% beträgt ⁶. Andere Kriterien mussten daher für die Vulnerabilität und Instabilität einer Plaque entscheidend sein. Es resultierte daraus der Grundsatz, dass sich vom Schweregrad einer

Koronarstenose keine Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit eines Herzinfarktes treffen lässt.

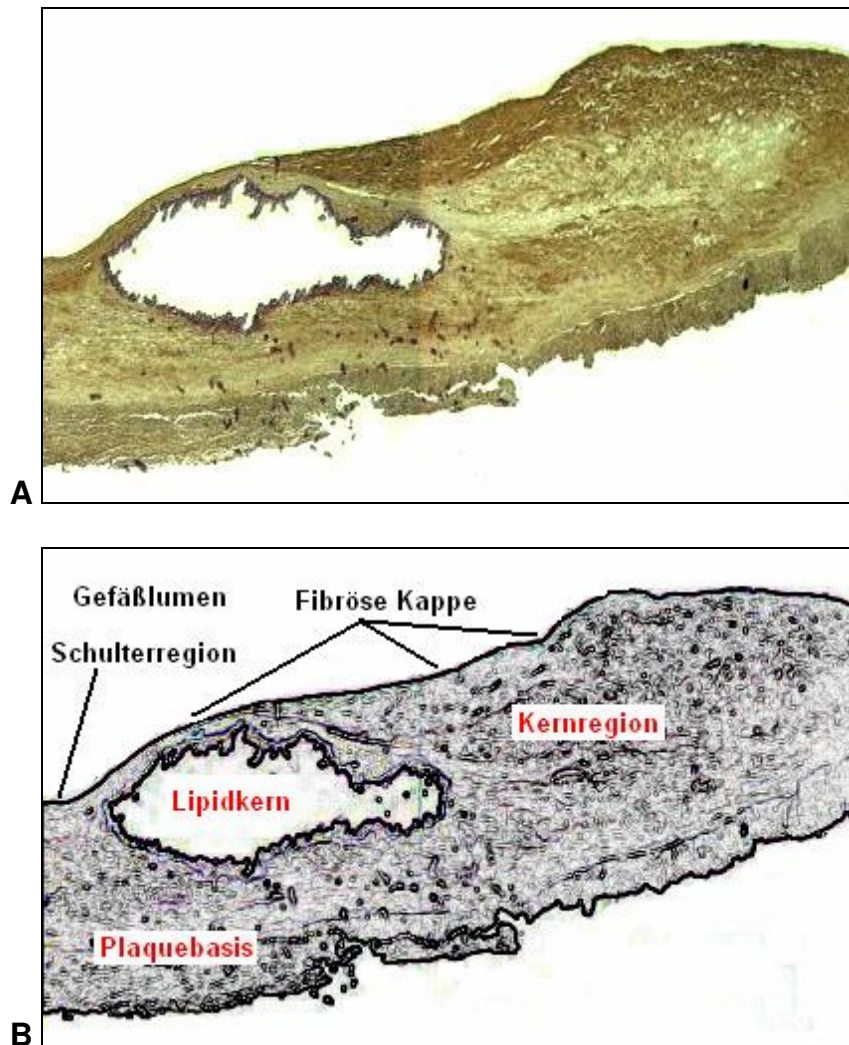


Abb.2: Histologischer Schnitt durch eine humane atherosklerotische Plaque. In der Plaquemitte sieht man den Lipidkern und die lipid- und makrophagenreiche Kernregion. Bei dem oberen Schnitt(A) wurde Kollagen I selektiv angefärbt und erscheint in der Abbildung rot-braun. Deutlich zu erkennen ist die bevorzugte Lokalisation von Kollagen I in der fibrösen Kappe, wohingegen in der Kernregion nur wenig Kollagen I enthalten ist (siehe Resultate).

In der überwiegenden Zahl der Fälle ist die Ruptur der fibrösen Kappe der Auslöser für einen akuten thrombotischen Gefäßverschluss. Weit weniger häufig ist die Thrombusbildung aufgrund einer oberflächlichen Plaque-Erosion.

Die Schwächung der fibrösen Kappe, die der Ruptur vorausgeht, stellt ein multifaktorielles Geschehen dar. Lipoproteine bzw. oxidierte Derivate von Lipoproteinen verursachen im Zusammenspiel mit Thrombozyten eine chronische Entzündung in der atherosklerotischen Läsion, die zur Aktivierung von T-Zellen führt. Die stimulierten T-Zellen schütten verschiedene Mediatoren wie z.B. Interferon- γ aus, welches die Kollagensynthese durch glatte Muskelzellen hemmt. Gleichzeitig werden Makrophagen und glatte Muskelzellen aktiviert und setzen Enzyme (z.B. Kollagenasen, Gelatinasen) frei, die die fibröse Kappe durch gesteigerten Abbau von Kollagen schwächen¹⁷.

Pathologische Studien haben gezeigt, dass die Plaque meist an der dünnsten Stelle der fibrösen Kappe aufbricht, wobei es sich bei exzentrischer Plaquestruktur meist um die „Schulterregion“ am Plaquerand handelt. Diese Stelle zeigt häufig eine starke Infiltration mit Schaumzellen und ist deshalb zusätzlich geschwächt¹.

Pathoanatomische und biomechanische Untersuchungen haben darüber hinaus gezeigt, dass die Plaquevulnerabilität von der zirkumferentiellen Wandspannung des Gefäßes, der Lokalisation der Plaque in der Gefäßstrombahn, der Größe und Zusammensetzung des atheromatösen Kerns und von Blutflusscharakteristika abhängt. Es konnte nachgewiesen werden, dass rupturgefährdete Plaques eine höhere Konzentration an Cholesterinestern im Vergleich zu freien Cholesterinmonohydratkristallen in ihrem Lipidkern aufweisen¹⁹. Bei den Blutflusscharakteristika sind vor allem die Strömungsverhältnisse im proximalen Abschnitt der Plaque entscheidend. Eine unregelmäßige Plaquekonfiguration sowie ein Lipidreichtum des atherosklerotischen Kerns führen zu einer ungleichmäßigen Verteilung der mechanischen Belastung und kritisch erhöhter Wandspannung in bestimmten Arealen der fibrösen Kappe. Sowohl eine chronische als auch eine plötzliche Zunahme der Wandspannung können die Plaqueruptur triggern³².

Die Freilegung von thrombogenem Material durch die Plaqueruptur verursacht die Aktivierung und Aggregation von Blutplättchen und führt so zu einem akuten thrombotischen Gefäßverschluss. In angiographischen Studien konnte gezeigt werden, dass beim akuten Koronarsyndrom vermehrt plättchenreiche Thromben („white clots“) zu finden sind und weniger häufig durch Fibrin und Erythrozyten organisierte Blutgerinnsel („red clots“) vorliegen. Bei Patienten mit instabiler Angina pectoris oder Myokardinfarkt lassen sich zusätzlich periphere Mikroaggregate im Versorgungsgebiet der betroffenen Koronararterie nachweisen, was für eine Embolisierung von thrombotischem Material in die Peripherie in Folge der Plaqueruptur spricht^{11, 36}.

Der hohe Gehalt an tissue-factor in der lipidreichen Core-Region macht eine zentrale Rolle dieses thrombogenen Faktors für die Thrombozytenaktivierung wahrscheinlich. Bei dem „tissue factor“ handelt es sich um ein Membranprotein, das als Kofaktor der Blutgerinnung dient und mit dem plasmatischen Gerinnungsfaktor VII einen Komplex auf Zelloberflächen bildet. Die Produktion und Expression von tissue factor auf Endothelzellen und Schaumzellen kann durch die Anwesenheit von oxidiertem LDL und Interaktion von Endothelzellen mit Entzündungszellen über CD 40-Rezeptoren gesteigert werden³⁶.

Das aktuelle Modell nimmt an, dass auf der Basis einer lokal gesteigerten Gerinnung eine Stimulation des Plättchensystems stattfindet. In den tissue-factor reichen Plaquarealen wird durch die Bildung des TF-VIIa Komplexes und die Aktivierung von Faktor X und IX die Bildung von Thrombin katalysiert. Bereits geringe Mengen Thrombin bewirken eine Thrombozytenaktivierung und Aggregatbildung und vermitteln die enzymatische Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Zusätzlich induziert Thrombin die Anlagerung der Gerinnungsfaktoren V und VIII an die Thrombozytenoberfläche. Das bildet die Grundlage für das Entstehen von weiteren prokoagulatorischen Faktorenkomplexen auf der Plättchenoberfläche.

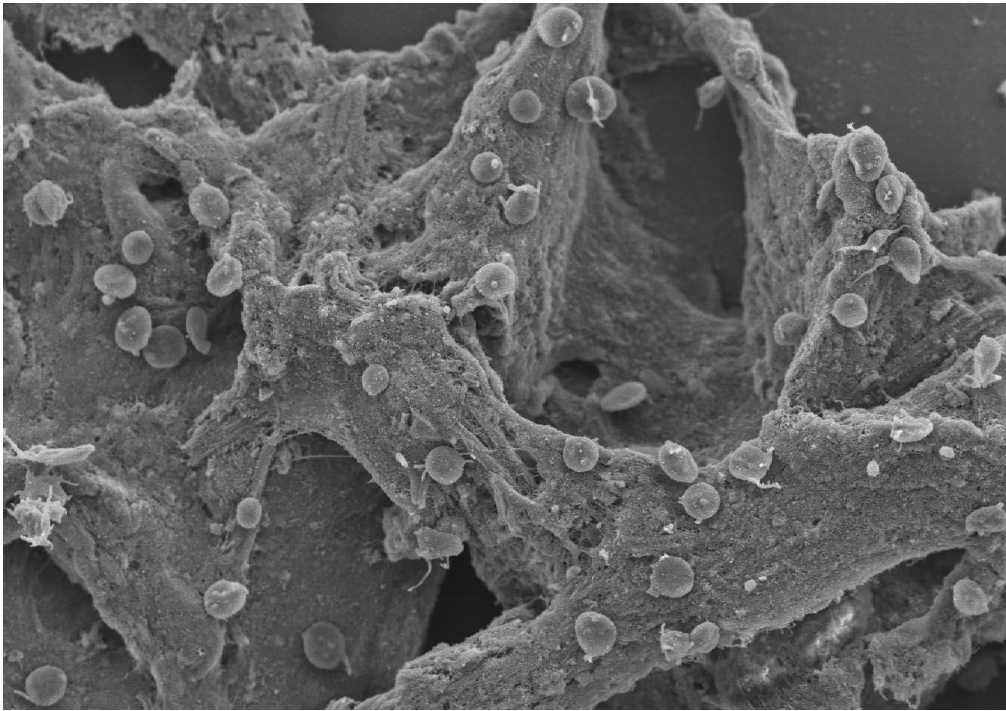


Abb.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten, die an humanes Plaquematerial gebunden haben (2000fache Vergrößerung). Einige Thrombozyten haben bereits Pseudopodien als Zeichen der Aktivierung ausgebildet

Die Adhäsion von Thrombozyten an vulnerable Plaques führt aber nicht immer zum Gefäßverschluss oder zu einer klinischen Beschwerdesymptomatik. Oft finden sich wandständige Plättchenaggregate die zwar klinisch inapparent sind, jedoch die Progression von atherosklerotischen Läsionen beschleunigen und proinflammatorisch wirken.

Arbeiten von Maseri und Mitarbeitern zeigen, dass der koronare Vasospasmus neben dem eigentlichen thrombogenen Gefäßverschluss eine wichtige Rolle für den Verlauf und die Prognose des akuten Koronarsyndroms spielt. Thrombozyten induzieren durch Freisetzung von Serotonin und Thromboxan A₂ im Bereich des thrombotischen Gefäßverschlusses Koronarspasmen und tragen so zusätzlich zu einer Verschlechterung der Gefäßdurchgängigkeit bei.

1.4 Untersuchte Kollagenrezeptoren

Die beiden wichtigsten Kollagenrezeptoren, die für Plättchenanheftung und Aktivierung von Bedeutung sind, wurden in dieser Arbeit genauer untersucht.

Der Kollagenrezeptor GPVI ist ein für Plättchen- und Megakaryozyten spezifischer Kollagenrezeptor, der als Hauptrezeptor des Blutplättchens für die Interaktion mit Kollagen gilt (Nieswandt et al. ²⁷). Kollagen induziert die Aktivierung des Thrombozyten über eine Quervernetzung zweier benachbarter GPVI-Rezeptoren.

Auf molekularer Ebene stellt sich der Rezeptor als ein Komplex aus einer Immunglobulin-Untereinheit und einer FcR γ -Kette dar. Die FcR γ -Kette ist für die Signalvermittlung in das Zellinnere verantwortlich. Die Signalkaskade vereint das Zusammenspiel verschiedener Kinasen wie z.B. „Lyn“ und „Fyn“. Diese sind im Ruhezustand an die intrazelluläre Domäne des GPVI-Rezeptors gebunden und phosphorylieren nach Aktivierung des Rezeptors bestimmte Regionen der FcR γ -Kette. Das ermöglicht das Binden der „Syk“-Kinase an die FcR γ -Kette die dadurch aktiviert wird und nachfolgende Signalwege durch Phosphorylierung von Proteinen (z.B. LAT, SLP 76) in Gang setzt ¹³.

Der Rezeptor $\alpha 2\beta 1$ -Integrin (GPIa-IIa) besteht aus 2 Polypeptid-Untereinheiten, die jeweils aus einer extrazellulären, einer Transmembran- und einer Zytoplasmadomäne aufgebaut sind. Er gehört in die Rezeptorenfamilie der Integrine, die zu den Hauptrezeptoren für interzelluläre und Zell-Matrix Interaktionen zählen. Integrine liegen in inaktiven und aktiven Zustandsformen vor und können Signale von außen ins Zellinnere („outside-in signaling“) und von intra- nach extrazellulär („inside-out signaling“) übermitteln. $\alpha 2\beta 1$ -Integrine werden auf Plättchen, Leukozyten, Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert. Auf Plättchen ist $\alpha 2\beta 1$ -Integrin hauptsächlich ein Kollagen-Rezeptor, auf anderen Zelltypen kann er als Kollagen- und Laminin-Rezeptor agieren ³⁷.

Ursprünglich wurde angenommen, dass $\alpha 2\beta 1$ -Integrin die zentrale Rolle bei der thrombozytären Interaktion mit Kollagen, der Adhäsion und der Aktivierung spielt. Das Modell basierte auf der Annahme, dass $\alpha 2\beta 1$ -Integrin nur in einem hoch-affinen Zustand existiert. Diese Vorstellung wurde von Jung et al. widerlegt, die zeigen konnten, dass die Affinität des Rezeptors für Kollagen von intrazellulären Signalen abhängig ist ¹⁴. Weitere Untersuchungen führten zu dem aktuellen Modell, dass der $\alpha 2\beta 1$ -Rezeptor erst nach

vorhergehender Aktivierung des Plättchens über den GPVI-Rezeptor einen hochaffinen Bindungszustand erreicht und nur in diesem Zustand eine stabile Bindung an Kollagen vermitteln kann¹³. Die Rolle von GPVI als wichtigster Kollagenrezeptor der Thrombozyten wurde in mehreren Arbeiten belegt^{18,22, 27,28}.

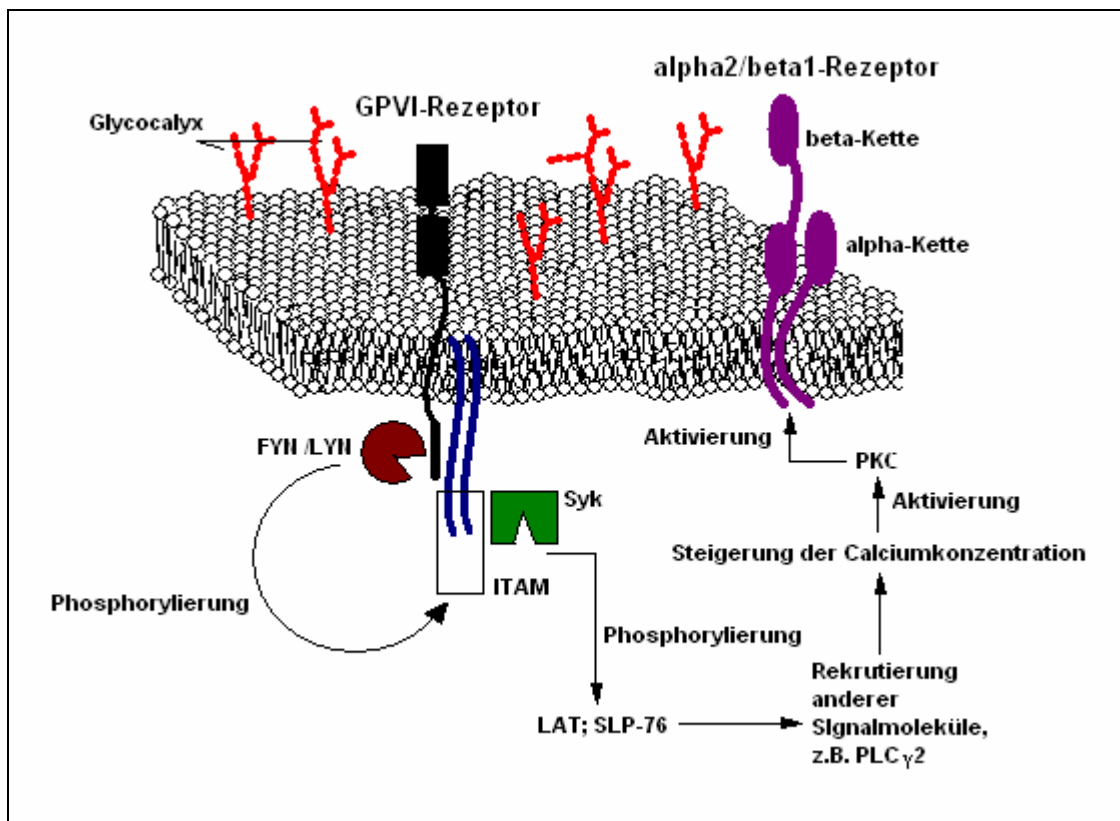


Abb.4: Schematische Darstellung des Zusammenspiels der Kollagen-Rezeptoren GPVI und $\alpha_2\beta_1$ -Integrin. Über die Bindung von GPVI an Kollagen werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die zu einer Erhöhung der zellulären Calciumkonzentration und u.a. zur Aktivierung des $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptors führen. Beteiligt an der Signalkette sind die Proteinkinasen Fyn und Lyn, die Adaptermoleküle SLP-76 und LAT, Phospholipase $C\gamma_2$ (PLC γ_2) und Proteinkinase C (PKC).

Wie bereits oben (S.15/16) angeführt nimmt das aktuelle Modell der Plaqueruptur an, dass die Thrombozytenaktivierung und -aggregation im Rahmen der Ruptur einer koronaren Plaque ein sekundärer Prozess hervorgerufen durch eine lokal aktivierte plasmatische Gerinnung ist. Dabei spielt gewebsgebundener tissue-factor und Faktor VII eine zentrale Rolle.

In dieser Arbeit soll die direkte Interaktion von Thrombozyten mit humanem Plaquematerial untersucht werden. Ziel war es herauszufinden, ob Plättchen mit Kollagen und atherosklerotischem Plaquematerial direkt interagieren können und welche Rezeptoren bei dieser Interaktion entscheidend beteiligt sind. Um die beteiligten Rezeptoren genauer identifizieren zu können, wurden diese mit Antikörpern selektiv inhibiert.

Da Kollagen I und III in hoher Konzentration in der Plaque vorhanden sind, wurde ihre Thrombogenität jeweils getrennt untersucht. Gleichzeitig wurden die räumliche Verteilung dieser beiden Kollagenuntergruppen und die Verteilung der Bindungsstellen des GPVI-Rezeptors in der atheromatösen Plaque untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Immunhistochemie

Die Lokalisation von Kollagen I, Kollagen III und der Bindungsstellen des GPVI-Rezeptors in einer humanen atheromatösen Plaque wurden mit einer immunhistochemischen Färbung untersucht.

Zunächst wurde operativ gewonnenes Plaquematerial in einer 4 %igen, neutral gepufferten Paraformaldehydlösung (pH 7.0) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Zur weiteren Untersuchung wurden Gewebeschnitte von 3µm Dicke angefertigt und die Schnitte entparaffiniert und dehydriert.

Um die Antigenität der mit Formaldehyd fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (Antigenretrieval) zu steigern und um die durch die Fixation veränderten Antigenstrukturen zu demaskieren, wurden die Plaqueschnitte in einer Citrat-Pufferlösung (pH 6.0) in der Mikrowelle bei hoher Energieleistung (700 Watt) für 20 Minuten erhitzt.

Nach Blocken der endogenen Peroxidase durch Zugabe von 3%igem H₂O₂ wurden die Plaqueschnitte mit Anti-Kollagen-I- und III-Antikörpern (Kaninchen Anti-Kollagen-I/III – Antikörper, Fa. Rockland) oder einem Kontroll-IgG-Antikörper inkubiert.

Bei einer anderen Versuchsreihe sollte die Verteilung der GPVI-Bindungsstellen in den Plaques sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Proben nach entsprechender Vorbehandlung zuerst mit löslichem GPVI-Fc (humanes GPVI-Fc, 1mg/ml, 1:20 verdünnt) für eine Stunde inkubiert und anschließend ein Anti-GPVI-Vollantikörper (5C4-Ratten Anti-Human-GPVI-Antikörper, 2mg/ml, 1:200 verdünnt) für 30 Minuten zugegeben. Als Negativkontrolle wurde eine Versuchsreihe mit humanem Fc-Fragment anstelle von GPVI-Fc durchgeführt.

Die eigentliche chemische Reaktion, die zum Visualisieren der gebundenen Antikörper führt, wird durch eine antikörpergebundene Peroxidase katalysiert. Den Plaqueproben mit Kollagenantikörpern wurden dafür Peroxidase-konjugierte Anti-IgG-Fc-Fragment spezifische Antikörper (ChemMate Detectionkit Peroxidase/DAB Dako K5001, Dianova, Hamburg, Deutschland) zugegeben. Den Plaqueproben mit den Anti-GPVI-Antikörpern

wurden Anti-Ratten-Antikörper (ChemMate Detectionkit Peroxidase/DAB Dako, Dianova, Hamburg, Deutschland) zugesetzt.

Die Peroxidase katalysiert das Substrat 3,3`Di-Aminobenzidine Tetrahydrochlorid (DAB) und macht die antikörpermarkierten Strukturen sichtbar.

2.2 Messung der Bindung von GPVI an immobilisiertes Kollagen und atherosklerotische Plaque

Um die direkte Bindung des GPVI-Rezeptors an immobilisiertes Kollagen und an atheromatöse Plaques nachzuweisen, wurde ein GPVI-ELISA-Test (*Enzyme Linked Immonosorbent Assay*) durchgeführt.

Dafür wurden zunächst 96-Well Zellkulturplatten (Immulon 2HB-ELISA-Platten, Fa. Thermo Hybaid) über Nacht bei 4°C entweder mit 30µl homogenisiertem humanem Plaquematerial (5mg/ml) oder 100µl Kollagen-I- oder III-Puffer (0,01 mg/ml, Puffer: 1,59 g/l Na₂CO₃, 2,93 g/l NaHCO₃, 0,2 g/l NaN₃, pH 9,6) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten jeweils zweimal mit je 200µl PBS-0,05% Tween20-Lösung gewaschen, um nicht gebundenes Kollagen bzw. Plaquematerial zu entfernen. Dann wurden unspezifische Bindungsstellen für Antikörper auf den Oberflächen mit jeweils 200µl Roti-Block-Lösung (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) durch Einwirken bei 4°C über Nacht blockiert. Nachdem die Platten am folgenden Tag wiederum zweimal mit PBS-0,05% Tween20-Lösung (Tween20 20 %=PolyaethylenglycolSORBITANMONOLAUrat) gewaschen worden waren, konnten sie für den ELISA-Test verwendet werden.

Zuerst wurde auf die ELISA-Platten in jedes Well 100µl GPVI-Fc-Lösung aufgetragen und die Platten für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. GPVI-Fc ist ein lösliches Dimer, das aus der extrazellulären Domäne des GPVI-Rezeptors und dem Fc-Teil eines IgG-Antikörpers aufgebaut ist. Lösliches GPVI-Fc bindet spezifisch an immobilisiertes Kollagen. Die Bindung von GPVI an Kollagen wird kompetitiv durch lösliches GPVI-Fc, aber nicht durch Kontroll-Fc (Fehlen der externen GPVI-Domäne), gehemmt. Damit sollte überprüft werden, ob GPVI-Rezeptoren an entsprechende Bindungsstellen von Kollagen-I und -III sowie von Plaqueoberflächen binden. Nach fünf aufeinander folgenden Waschschr

PBS-0,05%-Tween20, in denen nicht gebundene GPVI-Fc Konstrukte entfernt werden sollten, wurden je 100µl eines Ratten-Anti-GPVI-Antikörpers (Klon 5C4, gelöst in PBS-0,05% Tween20, 1µg/ml) zugegeben und die Platten eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Um die an den GPVI-Fc-Konstrukten anheftenden Antikörper sichtbar zu machen, wurden im Anschluss jeweils 100µl eines Antikörpers zugegeben, der gegen den Rattenantikörper gerichtet ist (goat anti-rat-Peroxidase-antibody, 1µg/µl, Santa Cruz). Dieser Antikörper ist mit Peroxidase (POD) gekoppelt, wobei es sich um ein Enzym handelt, das die Oxidation eines Chromogens unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid katalysiert. Das Chromogen erzeugt bei dieser Reaktion Chemilumineszenz, die spektrometrisch erfasst werden kann.

Nach fünf weiteren Waschschritten in denen nicht gebundene mit Peroxidase markierte Antikörper entfernt wurden, wurden die Zellkulturplatten mit jeweils 100µl 3,3', 5,5-Tetramethylbenzidine Lösung (POD-Substrat, BM blue POD-Substrat, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bedeckt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Substratlösung färbte sich mit zunehmender Konzentration von gebundener Peroxidase blau. Nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von H₂SO₄ trat eine Gelbfärbung der Lösung auf, die mit einem ELISA-Reader (Dynatech MR 5000 Spectrophotometer, Pharmacia Dynatech, Denkendorf, Deutschland) bei 450nm gemessen werden konnte. Als Referenzfilter diente ein 630nm Filter. Die GPVI-Bindung wurde als Prozentwert der Bindung des Kontroll-Fc-Fragmentes angegeben. Als Positivkontrolle wurde ein Versuchsablauf mit rekombinantem GPVI-Fc-Fragment durchgeführt, als Negativkontrolle diente eine Versuchsreihe bei der nur der Fc-Teil des Konstruktes zugegeben wurde.

2.3 Durchflusskammerversuche

2.3.1. Allgemeine Prinzipien

Um die Anheftung von Thrombozyten an Kollagen- und Plaqueoberflächen unter physiologischen Flussbedingungen untersuchen zu können, wurden zwei verschiedene Durchflusskammern verwendet. Durchflusskammern ermöglichen es, Zellsuspensionen mit einem bestimmten Scherstress über Oberflächen strömen zu lassen und die Adhäsion der Zellen an den Oberflächen mikroskopisch zu beobachten. Dabei kann in der Flusskammer

über Beeinflussung der Flussrate der Perfusionsflüssigkeit eine definierte Wandschubspannung („shear stress“) erzeugt werden.

Die Wandschubspannung τ errechnet sich nach dem Reibungsgesetz für Newton'sche Flüssigkeiten aus der Formel:

$$\tau = \eta \cdot \gamma$$

η = Viskosität der Perfusionsflüssigkeit [Pa · s]

γ = Scherrate der Flüssigkeit [s⁻¹]

τ stellt den Quotienten aus der Kraft K und der Fläche F dar. K ist die Kraft, mit der die Perfusionsflüssigkeit auf die Oberfläche F wirkt. Die Scherrate γ kennzeichnet das Geschwindigkeitsgefälle der Flüssigkeit in Flussrichtung in Abhängigkeit vom Abstand zur Gefäßwand. Sie errechnet sich aus folgender Gleichung:

$$\gamma = \frac{6 \cdot Q}{w \cdot h^2}$$

Q = Flussrate der Perfusionsflüssigkeit [l/s]

w = Breite des Flusskanals

h = Höhe des Flusskanals

Somit ergibt sich als Formel für die Wandschubspannung

$$\tau = \frac{6 \cdot \eta \cdot Q}{w \cdot h^2}$$

Da durch die Kammergeometrie die Höhe h und Breite w des Strömungskanals festgelegt waren und durch die Verwendung von Vollblut als Perfusionsmedium die Viskosität η nicht beeinflusst werden konnte, wurden über die Auswahl einer Flussrate von 7,5 ml/h die Strömungsverhältnisse des arteriellen Gefäßbettes simuliert. Die erzeugte Scherrate betrug 1000s⁻¹. Da die Viskosität des Blutes der Spender nicht bestimmt wurde, wurde an Stelle der Schubspannung mit der Scherrate (Einheit s⁻¹) als Zielgröße gearbeitet.

2.3.2 Montage der Durchflusskammer

Für die Kollagenversuchsreihen wurde die Durchflusskammer FCS 1c der Firma Oligene, Berlin, Deutschland verwendet. Diese Durchflusskammer besteht aus 5 Teilen: einem Kammerträger (1), ein transparenter Kammerkörper (2), eine Silikondichtung (3), ein Federspannring (4) und zu- und abführende Schläuche (5). Der Kammerträger und der Kammerkörper sind fest über 2 Fixierschrauben (6) miteinander verbunden (*siehe Abbildung 5*)

Zuerst wurde der Silikondichtungsring mit einer Pinzette so auf den Kammerkörper gelegt, dass die Dichtung mit ihren Bohrungen durch die überstehenden Fixierschraubenköpfe exakt positioniert wurde. Nach Andrücken des Dichtungsringes wurde das Glasplättchen (Coverslip) mit der zu perfundierenden Seite nach unten auf den Dichtungsring gelegt und ebenfalls leicht festgedrückt.

Um das Deckglas auf dem Kammerkörper zu fixieren und so eine dichte Perfusionskammer zu erhalten, wurde der Federspannring über das Glasplättchen auf den Kammerkörper gespannt.

Anschließend wurde kontrolliert, ob das Glasplättchen durch die Fixierung gesprungen war, ob sich Risse gebildet hatten und ob der Ring fest auf dem Kammerkörper aufsaß. Dann wurde die Flusskammer umgedreht und auf den Kammerträger gestellt. Die zu perfundierende Oberfläche des Glasplättchens stellte damit den Boden der Perfusionskammer dar, den oberen Abschluss bildete der transparente Kammerkörper.

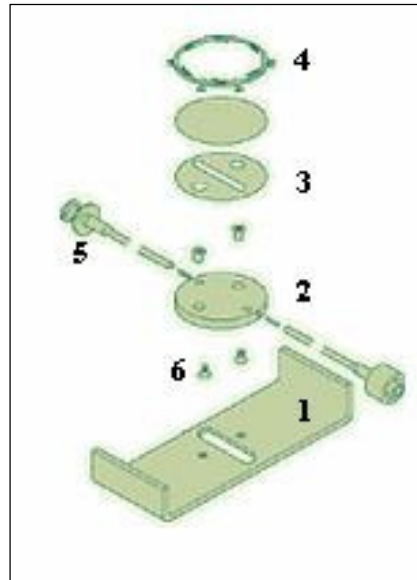


Abb.5: Durchflussskammer FCS 1c der Firma Oligene, Berlin, Deutschland. Das beschichtete Deckglas wird mit dem Federspannring (4) auf dem Kammerkörper (2) fixiert. Zur Abdichtung dient eine Silikonformscheibe (3). In den Kammerkörper münden die zu- und ableitenden Rohrstützen, an die die Schläuche angeschlossen werden (5). Die Flusskammer wird von einem Kammerträger(1) getragen; Abbildung modifiziert nach Oligene

Die Plaque-Versuchsreihen wurden mit der Durchflussskammer FCS2 (Bioptechs Focht Chamber System 2, Butler, PA, USA) durchgeführt. Diese weiterentwickelte Durchflussskammer besteht aus einer mit einem Schraubverschluss versehenen Kammerbasis (8), einem Dichtungsring (4), einer Silikonformscheibe ((6); rechteckige Aussparung 14 x 22 x 1,5 mm), einem „Microaqueduct“-Objektträger (5) und einem Plastikring (2) mit einem zuführenden und einem ableitenden Verbindungstück (3). Die zu perfundierenden Glasplättchen (7) haben einen Durchmesser von 40mm und werden in die Kammerbasis gelegt.

Ein Vorteil dieser Durchflussskammer gegenüber der Durchflussskammer FCS 1c ist, dass der Aufbau der Flusskammer nahezu laminare Strömungsverhältnisse ermöglicht und ein Beheizen der perfundierten Lösung zulässt.

Vor dem Versuchsbeginn wurde zuerst der obere Teil der Durchflussskammer zusammengesetzt. Dazu wurde der Plastikring (2) mit der Unterseite nach oben auf den Tisch gelegt und der erste Dichtungsring positioniert. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass der Dichtungsring durch die überstehenden Rohrenden der zu- und ableitenden Röhren exakt ausgerichtet wurde. Anschließend wurde der „Mikroaqueduct“-Objektträger auf den

Dichtungsring gelegt und leicht angedrückt. Nachdem der Form-Silikondichtungsring auf dem Objektträger platziert worden war, wurde das beschichtete Deckglas (40mm Durchmesser, Menzel/Deutschland) in die untere Hälfte gelegt. Der durch die Plaquepräparation an den Deckgläsern anhaftende Flüssigkeitsfilm bewirkte eine ausreichende Adhäsion des Glasplättchens an der unteren Kammerhälfte, so dass der untere Teil gefahrlos umgedreht und vorsichtig auf den oberen Teil gelegt werden konnte. Anschließend wurde die obere Hälfte mit dem Schraubgewinde der Kammerbasis fixiert und die Flusskammer umgedreht.

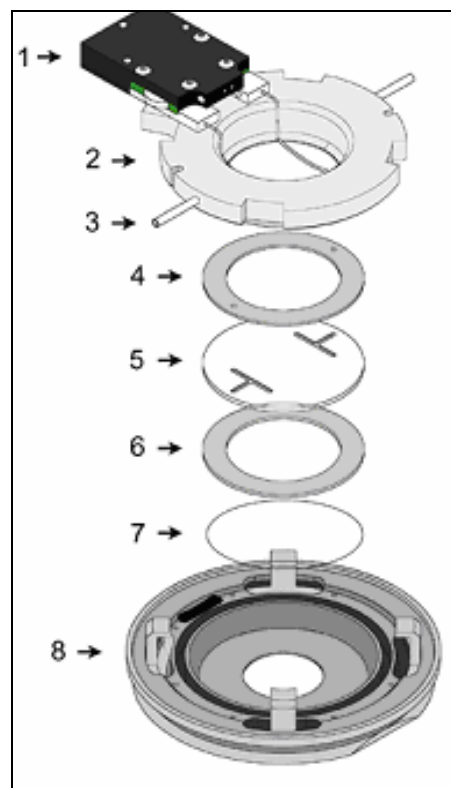


Abb.6: Durchflusskammer FCS2 der Firma Bioptechs (Butler, PA, USA); in den oberen Plastikring (2) münden die zu- und abführenden Röhrchen (3). Das Mikroaquaedukt-Deckgläschen (5) liegt zwischen zwei Silikondichtungsringen (4,6). Das beschichtete Glasplättchen (7) wird in die Kammerbasis (8) gelegt. Abbildung modifiziert nach Bioptechs.

2.3.3 Beschichtung der Deckgläser mit Kollagen und Plaquematerial

Für die erste Versuchsreihe wurden die Glasplättchen mit Kollagen-I- und Kollagen-III-Lösungen beschichtet, wobei die gewünschte Endkonzentration jeweils bei 0,2mg/ml lag.

Um die Kollagen-I-Lösung anzusetzen, wurden 4750 µl destilliertes Wasser unter einer Sicherheitswerkbank Typ 2 (Hera-Safe Heraeus, Kendro Laboratory Products) nach Abflammen des Flaschenhalses (Heraeus Vulcan, Kendro Laboratory Products) in ein 10 ml Kunststoffgefäß (Falcon, BD, USA) pipettiert. Im Anschluss wurden 250 µl Rattenschwanz-Kollagen Typ I (Kollagen Typ I, Konzentration 3,8mg/ml, BD) zu dem destillierten Wasser gegeben und gemischt. Alle Pipettierschritte wurden mit Pipetten der Firma Eppendorf, Deutschland durchgeführt.

Nach Umfüllen der Lösung in eine 6cm-Schale, wurden 20 Deckgläschen (Assistent Cover-Glases, 25mm Durchmesser) in der Kollagen-Lösung gewendet und am Rand einer 15cm-Schale auf ihrer Kante zum Trocknen aufgestellt. Während des Trocknens wurden die Glasplättchen mehrmals gedreht, um eine ungleichmäßige Beschichtung durch Tropfenbildung zu vermeiden. Nach ca. 10 Minuten Trockenzeit wurden die Glasplättchen noch einmal beschichtet.

Da die Kollagen III-Lösung (19,8 mg/ml, BD) bei -20°C gelagert werden musste, wurde sie vor der Verarbeitung zunächst auf Eis aufgetaut. Nach Auftauen wurden 50 µl der Lösung mit 4950µl destilliertem Wasser gemischt. Die weitere Vorgehensweise war mit der Beschichtung der Glasplättchen mit Kollagen I identisch.

Die beschichteten Coverslips wurden im Kühlschrank bei -18°C über maximal 3 Wochen gelagert.

Für die Plaqueversuche wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Brandl (Klinikum Schwabing, LMU München) humane atheromatöse Plaques von Patienten mit hochgradiger Stenose der Arteria carotis interna gewonnen. Unter Anwendung einer besonderen Technik der intraoperativen Endarterektomie konnte das Plaquematerial vollständig erhalten entnommen und anschließend mikrochirurgisch in die verschiedenen Bestandteile wie z.B. fibröse Kappe oder Lipidkern aufgetrennt werden. Die lipidreichen, weichen Plaques wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Siess (Institut für Epidemiologie und Prophylaxe von Kreislauferkrankungen, LMU München) isoliert, homogenisiert, in PBS (mit 15mM Albumin) gelöst, auf Glasplättchen beschichtet und 16 Stunden bei 4°C in PBS-Albumin (75mM) inkubiert. Die Endkonzentration des Plaquematerials betrug 50 mg/ml. Der Versuch fand jeweils am Folgetag der Beschichtung statt, um möglichst frisches Material zu untersuchen.

2.3.4 Vorbereitung der Blutproben

2.3.4.1 Blutentnahme

Die Cubitalvene von gesunden Spendern, die zuvor mindestens 10 Tage lang keine Medikamente eingenommen hatten, wurde nach Sprühdesinfektion mit einem Butterfly (BD Value-set, BD Infusion Therapy – Schweden) punktiert, der zuvor mit einem Multi-Adapter (pyrogenfrei, Sarsted – Nürnberg) verbunden worden war. Nach Entlüftung des Schlauchs wurden jeweils 7,5ml Vollblut in drei Heparin-Monovetten (S-Monovette Ammonium-Heparin 7,5ml, 16 IE. Heparin/ml Blut, Sarsted - Nürnberg) gefüllt. Die Endkonzentration des Heparins lag bei 0,5 Vol.%. Um eine vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten durch eine hohe Scherrate zu vermeiden wurde das Blut langsam und bei geringer venöser Stauung abgenommen. Im Anschluss an die Blutentnahmen wurden die Röhren vorsichtig geschwenkt, um eine Durchmischung des Blutes mit Heparin zu erreichen.

2.3.4.2 Thrombozytenfärbung

Um die Thrombozyten durch Fluoreszenz sichtbar zu machen, wurden diese mit Rhodamin 6G gefärbt. Dabei handelt es sich um einen lipophilen Farbstoff, der von Mitochondrien verstoffwechselt wird, ohne dass cytotoxische Abbauprodukte entstehen. Das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 528 nm. Da Thrombozyten neben Leukozyten die einzigen Blutbestandteile sind, die Mitochondrien besitzen, ist dieser Farbstoff für die Markierung und Untersuchung sowohl von isolierten Thrombozyten als auch Thrombozyten im Vollblut geeignet.

Um den Farbstoff anzusetzen wurden zunächst 200mg Rhodamin 6G (Molecular Probes, USA) mit 100ml 0,9% isotonischer Natriumchlorid-Lösung (DeltaSelect, Pullingen) gemischt. Anschließend wurde die Lösung mit einer Corning 250ml Sterilfiltrationseinheit (Corning 430767, Corning Incorporated, USA) sterilfiltriert und in ein 50 ml Falcon gefüllt. Um eine Abschwächung der Fluoreszenzwirkung zu vermeiden, wurden die Falcons mit Alufolie umwickelt und im Kühlschrank bei -18°C gelagert.

Die Endkonzentration des Rhodamins in der Perfusionslösung lag bei 0,2g/l. Die ebenfalls durch Rhodamin gefärbten Leukozyten konnten aufgrund ihres größeren Durchmessers

(Leukozytendurchmesser 12-25 μm) von den deutlich kleineren Thrombozyten (Durchmesser 2,0-3,5 μm) eindeutig abgegrenzt werden. Vor Versuchsbeginn wurden die Vollblutproben 15 Minuten bei 37°C mit Rhodamin inkubiert.

2.3.5 Rezeptorblockade

2.3.5.1 Inkubation der Blutproben mit 5C4-Fab, IB4 und 2D1

Zunächst wurden 2ml Vollblut in eine Perfusorspritze (OPS 50ml, Luer Lock, Braun Melsungen AG) aufgezogen. Anschließend wurden 200 μl Rhodaminlösung und die jeweilige Antikörperlösung hinzugefügt. Um die gewünschte Endkonzentration der Antikörper von 10 $\mu\text{g/ml}$ zu erreichen, mussten 6,8 μl 2D1-Antikörper (Stock 3,24mg/ml), 16,9 μl 5C4-Antikörper/Fab-Fragment (Stock 1,3mg/ml) und 38,6 μl IB4-Antikörper (Stock 0,57mg/ml) den 2 ml Vollblut zugegeben werden.

Vor Verwendung wurden die Perfusorspritzen in einem Wasserbad (Julabo Labortechnik, Deutschland) bei 37°C für 10 Minuten vorgewärmt.

2.3.5.2 Vorinkubation der Kollagenoberfläche mit GPVI-Fc und Fc-Fragment

Bei der entsprechenden Versuchsreihe wurden die Kollagen- und Plaqueoberflächen mit löslichem GPVI-Fc und Fc-Fragment inkubiert. Beide Reagenzien sollten in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt werden. Es wurden 60,4 μl GPVI-Fc-Konstrukt (Stock 2,12 mg/mL, Procorde, Martinsried, Deutschland) mit 99,6 μl PBS gemischt. Die Endkonzentration von GPVI-Fc-Konstrukt betrug 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Da das Fc-Fragment ein im Vergleich zu GPVI-Fc vierfach geringeres Molekulargewicht hat, wurden 12,8 μl Fc-Fragment (Stock 2,5mg/mL, Procorde, Martinsried, Deutschland) mit 147,2 μl PBS verdünnt. Für den Versuch wurden jeweils 50 μl GPVI-Fc bzw. Fc-Fragment-Lösung auf die Perfusionsstrecke des Glasplättchens pipettiert und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.3.6 Versuchsablauf

Die Adhäsion wurde mit einem Lichtmikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Deutschland) bei zwanzigfacher Vergrößerung und Phasenkontrast PH2 beobachtet. Um die mit Rhodamin

gefärbten Thrombozyten zur Fluoreszenz anzuregen, wurde eine Fluoreszenzlampe der Firma Zeiss verwendet. Diese musste mindestens 10 Minuten vor Versuchsbeginn zum Vorwärmen eingeschaltet werden. Der verwendete Fluoreszenzfilter (Texas Red, Zeiss, Deutschland) hat eine Bandbreite von 530-585nm.

Die blutgefüllte Perfusorspritze wurde mit einem Dreiwegehahn verbunden und in den Perfusor (Perfusor fm, Braun, Software PFAE) eingespannt. Durch vorsichtiges Vorfahren des Schlittens wurde der Dreiwegehahn entlüftet. Anschließend konnte der zuführende Schlauch der Durchflusskammer an den Dreiwegehahn angeschlossen werden. Die Perfusionsgeschwindigkeit am Perfusor wurde auf 7,5ml/h gestellt.

Um im Anschluss an die Perfusion die Flusskammer mit PBS-Lösung (*Dublecco's phosphate buffered saline*, Sigma) spülen zu können, wurde eine mit PBS gefüllte Perfusorspritze über eine entlüftete Heidelberger-Verlängerung ebenfalls an den Dreiwegehahn angeschlossen. Nach der Perfusion mit Blut wurde die Flusskammer für 4 Minuten und bei einer Scherrate von 1000s^{-1} bei pulslosem Fluss gespült. Nach einer Minute Spülung wurde mit der photographischen Dokumentation des Versuchsergebnisses begonnen.

Die Versuchsdurchführung mit Plaquematerial unterschied sich vom oben beschriebenen Versuchsablauf wie folgt. Da vor Versuchsbeginn ein Bild der Plaque ohne Thrombozyten aufgenommen werden musste, wurde zunächst eine geeignete Stelle mit mittlerer Plaquedichte auf dem Deckglas gesucht. Neben einem Fluoreszenz-Leerbild wurde ein Durchlichtbild des ausgewählten Plaqueareals aufgenommen.

Nach 10 Minuten Perfusion wurden mehrere Bilder unter Spülfluss photographiert. Im Anschluss an die Dokumentation des Leer-Bildes durfte die Flusskammer nicht mehr berührt bzw. verschoben werden, da nur durch ein exaktes Einhalten der Einstellung eine Subtraktion des Leer-Bildes von dem 10min-Bild möglich war.

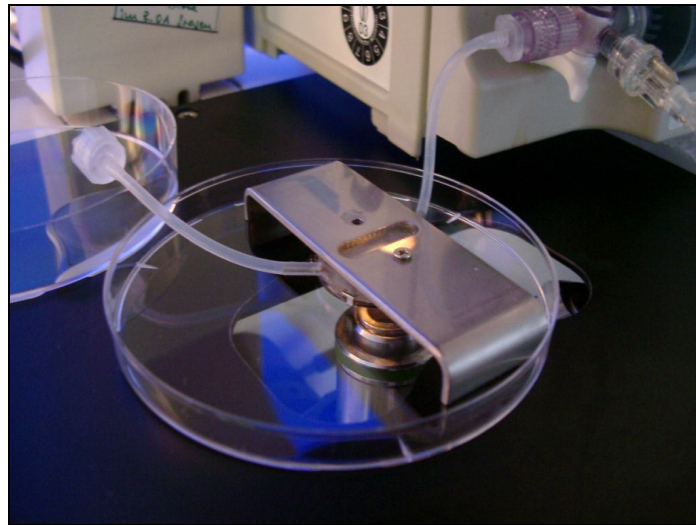


Abb.7: Arbeitsplatz mit FCS1c-Flusskammer. Die zu- und abführenden Schläuche sind an die Flusskammer angeschlossen, der Spülvorgang ist bereits abgeschlossen. In der Plastikschaale befindet sich die klare Spülflüssigkeit.

2.3.7 Photographische Dokumentation

Die Bilder der fluoreszenzmarkierten Thrombozyten und Leukozyten wurden mit einer digitalen Photokamera aufgenommen. Dazu wurde eine Farb-Kamera (AxioCam, Zeiss, Jena, Germany) mit passender Computersoftware (Axiovision, Zeiss, Germany) verwendet.

Da ein möglichst repräsentativer Querschnittswert für die Thrombozytenanheftung auf Kollagenoberflächen ermittelt werden sollte, wurden 3 Bilder von verschiedenen Stellen der Perfusionstrecke aufgenommen. Wenn die Anheftung sehr unregelmäßig war, wurden mindestens 5 Bilder zur Berechnung verwendet oder der Versuch verworfen. Wie oben angesprochen wurde erst nach Spülung der Durchflusskammer photographiert, um nicht adhärenente Blutplättchen zu entfernen.

Die Thrombozytenadhäsion an dem Plaquematerial wurde nach 5 und 10 Minuten Perfusion dokumentiert.

2.3.8 Auswertung

Die Bilder wurden mit der Computersoftware Cap-Image 7.4® (Firma Dr. Zeintl, Deutschland) ausgewertet. Diese Software ermöglicht das Berechnen von benutzerdefinierten

Flächen. Dazu werden dem Programm Helligkeitsschwellenwerte vorgegeben und anschließend alle Flächen des Bildes, die den Schwellenwert erreichen oder überschreiten, in die Flächenberechnung einbezogen. Der ermittelte Flächenwert der definierten Bildfläche kann mit dem Flächenwert der ganzen Bildfläche verrechnet und so ein Prozentwert für die Thrombozytenanheftung bestimmt werden.

Die Anheftung der Thrombozyten entlang der Perfusionsstrecke erfolgte nie vollkommen gleichmäßig. Um trotzdem eine repräsentative Aussage über die Thrombozytenanheftung treffen zu können, wurden mindestens drei Aufnahmen von verschiedenen Punkten der perfundierten Oberfläche angefertigt. Aus den jeweils ermittelten Prozentwerten der Thrombozytenadhäsion wurde ein Durchschnittswert errechnet.

Bevor die Bilder der beschichteten Plaque mit Cap-Image ausgewertet werden konnten, mussten sie zuerst entsprechend vorbereitet werden. Dazu wurden mit der Computersoftware Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) die farbigen Fluoreszenzbilder in schwarz/weiß Bilder umgewandelt und anschließend das Leer-Bild von dem 10-Minuten-Bild subtrahiert. In der Differenz wurden nun die neu adhären gewordenen Thrombozyten-Aggregate sichtbar.

Die Thrombozytenadhäsion an Kollagen- und Plaqueoberflächen wurde für jeden Spender einzeln quantifiziert und ausgewertet. Dazu wurden die mit Antikörpern und löslichem GPVI behandelten Blutproben ausgewertet und das Ergebnis ins Verhältnis zur Adhäsion der Thrombozyten der Kontrollprobe (Blut ohne Antikörper) gesetzt.

2.4 Thrombozytenaggregation

Die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch die beiden Kollagenrezeptor-Antikörper antiGPVI (5C4) und antiGPIa-IIa (IB4) wurde zusätzlich in einer Aggregationsstudie untersucht. Dabei wurde das turbimetrische Verfahren nach Born (Born 1962, Born 1963) angewendet. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass die optische Dichte einer Partikelsuspension im Wesentlichen von der Partikelzahl und nicht von deren Größe abhängig ist. Die durch Plättchenaktivierung und -aggregation bedingte Zunahme der Lichttransmission der Thrombozytensuspension wurde photometrisch registriert.

2.4.1 Thrombozytenpräparation

Zunächst wurde eine periphere Vene von gesunden Spendern, die zuvor für mindestens 10 Tage keine Medikation eingenommen hatten, mit einem Butterfly punktiert und das Blut in Citratröhrchen (Citrat 5ml Monovette, 0,5ml Citrat-Lösung, Sarsted-Nürnbrecht) aufgezogen. Die Abnahme erfolgte unter möglichst geringem Sog sowie geringer venöser Stase um eine vorzeitige Thrombozytenstimulation zu vermeiden. Das gewonnene Blut wurde in ein 15ml Falcon umgefüllt und anschließend für 15 Minuten bei 160 G (1000U/min), Raumtemperatur und ohne Bremse zentrifugiert. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt setzte sich an der Oberfläche plättchenreiches Plasma (*platelet rich plasma = PRP*) als obere Phase ab. Das PRP wurde vorsichtig in ein 15ml Falcon abpipettiert.

Um plättchenarmes Plasma (*platelet poor plasma = PPP*) zu gewinnen, wurden 500µl PRP gewonnen und für drei Minuten bei 13000 U/min (16000G) zentrifugiert. Der sich absetzende Überstand (500µl) wurde abgenommen und in ein Aggregationsröhrchen ohne Magnetprüher gegeben. Die Lichttransmission des PPP-Röhrchens stellt bei der Messung der Thrombozytenaggregation den Referenzwert dar, wobei der Messwert als maximale Lichttransmission gewertet wurde.

Da die blockierende Wirkung der Antiköper 5C4 und IB4 untersucht werden sollte, wurden den PRP-Proben die jeweiligen Antiköper in einer Konzentration von 10µg/ml zugesetzt.

2.4.2 Versuchsablauf

Der Versuchsaufbau bestand aus einem Aggregometer vom Typ Chronolog 560 Ca (Firma Nobis Labordiagnostika, Eendingen) mit jeweils zwei Kanälen. Zur Messung der Proben wurden silikonisierte Glasküvetten (Firma BioData, Horsham, USA) mit 1ml Fassungsvermögen verwendet. Das Aggregometer war in einen Mess- und in einen Wärmebereich unterteilt: Der Messbereich bestand für jeden Kanal aus einem gekoppelten Zweikammersystem, wobei in der ersten Kammer die Transmission des plättchenarmen Plasmas und in der zweiten Kammer die Transmission der PRP-Probe bestimmt wurde. Das thrombozytenreiche Plasma wurde während der Messung mit einem Magnetprüher kontinuierlich durchmischt. Die Drehgeschwindigkeit des Prühers lag bei 1000 U/min. Das

hierbei verursachte Signalrauschen wurde mittels eines 1 Hz-Filters unterdrückt, welcher zwischen Aggregometer und Schreiber geschaltet worden war.

Im Wärmebereich des Aggregometers wurden die Proben auf 37°C vorgewärmt, die anschließende Messung erfolgte ebenfalls bei 37°C.

Die gewonnenen Transmissionsdaten wurden mit der Computersoftware Aggro/Link® (Version 4.75, 1997, Chronolog-Group) aufgezeichnet. Diese Software ermöglicht eine automatische Auswertung der registrierten Daten und berechnet prozentuale Aggregationswerte. Darüber hinaus kann die Dauer des Aggregationsversuches festgelegt werden.

Zu Beginn der Messung, noch vor Zugabe des stimulierenden Agens, erfolgte die Einstellung der Messkanäle. Dabei wurde die auf dem Schreiber registrierte Transmissionsdifferenz zwischen der PRP- und PPP-Probe mit Hilfe eines im Gerät eingebauten Nullabgleiches auf die Ausgangslinie gesetzt, dieser Wert entsprach 0% Transmission. Der zuvor gemessene Transmissionswert der plättchenarmen Probe entsprach 100% Lichttransmission.

Sobald vom Schreiber-Programm eine gleichmäßige Kurve registriert wurde, die keine Anzeichen einer vorzeitigen Thrombozytenaktivierung zeigte, wurden die Aggregation durch Zusetzen von Kollagen I, Kollagen III oder humanem Plaquematerial gestartet. Die eingesetzte Kollagenkonzentration betrug 1µg/ml, die Konzentration des homogenisierten Plaquematerials lag bei 1,25 mg/ml.

Bei den jeweiligen Versuchsreihen wurden den Thrombozytenproben vor Versuchsstart entweder 5C4Fab-Fragment (10mg/ml) oder Ratten-Kontrollantikörper (10µg/ml), 6F1-Fab-Fragment (20 µg/ml) oder Mäuse-Kontrollantikörper IgG (20µg/ml) zugesetzt.

Die kollageninduzierte Thrombozytenaggregation tritt normalerweise erst mit einer deutlichen Latenzzeit auf, der „lag phase“ (1). Es wird angenommen, dass es sich hierbei um die Zeitspanne handelt, die für die Polymerisation der Kollagenfibrillen, die Adhäsion der Thrombozyten an die Fibrillen und die folgende Ausschüttung plättcheneigener, thrombogener Substanzen (z.B. Thromboxan A₂) erforderlich ist. Die Aufwärtsbewegung der Kurve vor der Aggregation kennzeichnet den Formenwandel der Thrombozyten, den „shape change“ (2), der der Aggregation vorausgeht. Die durch Kollagen verursachte Aggregation zeigt einen monophasischen Verlauf als Zeichen einer irreversiblen Thrombozytenaggregation.

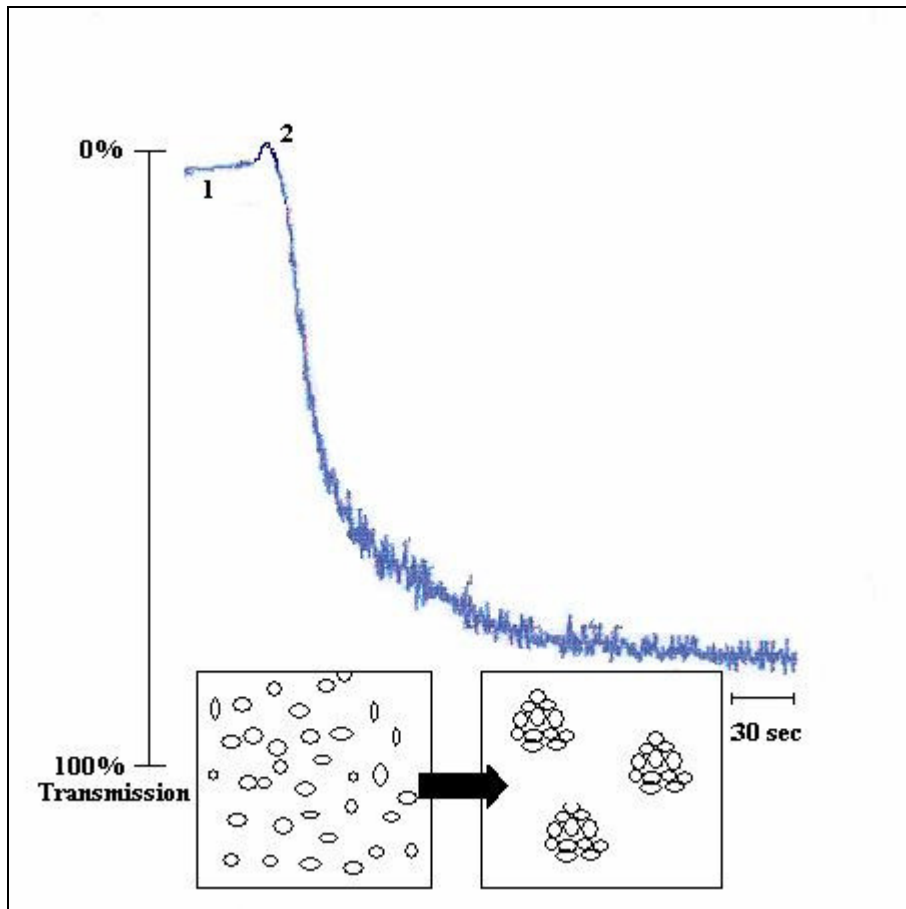


Abb.8: Monophasischer Kurvenverlauf einer Aggregationskurve mit Kollagen als Thrombozyten-Aktivator. Die Aggregation beginnt deutlich verzögert mit einer „lag-Phase“ (1). Darauf folgt der „shape change“ (2), bei dem die Thrombozyten noch nicht agglutinieren, sondern nur ihre Form verändern.

2.5 Statistik

Aus den in den Experimenten gewonnenen Daten wurden die Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung des Mittelwertes (S.E.M) nach folgender Formel berechnet.

$$S.E.M = \frac{\sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}}}{\sqrt{n}} \quad \bar{x} = \frac{\sum x}{n} = \text{Mittelwert aus den Einzelversuchen}$$

n = Anzahl der Versuche

x = Einzelwert

Die Daten wurden mit einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA-Test) mit einem nachfolgenden Tukey Post-hoc Test analysiert. Bei einem p-Wert unter 0,05 wurde das Ergebnis als signifikant, bei einem p-Wert kleiner 0,01 als hochsignifikant angesehen.

3 Resultate

3.1. Verteilung von Kollagen I, Kollagen III und GPVI-Bindungsstellen in einer atheromatösen Plaque

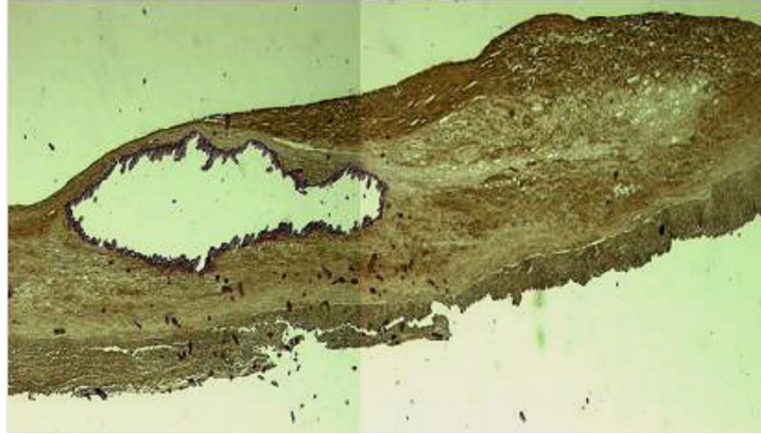
Zur Untersuchung der Lokalisation von Kollagen I und III sowie der Bindungsstellen des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI in einer atherosklerotischen Plaque, wurde intraoperativ durch Endatherektomie gewonnenes humanes Plaquematerial immunhistochemisch aufbereitet und gefärbt. Die Strukturen, die jeweils den peroxidase-konjugierten Antikörper gebunden hatten, färbten sich durch Zugabe einer Detektionslösung braun an.

Eine humane atheromatöse Plaque enthält kollagenhaltige Strukturen. Beide untersuchten Kollagentypen wurden sowohl in der Kappen- als auch in der zentralen Kernregion gefunden. Hierbei unterschieden sich aber die beiden Kollagenunterarten in ihrer quantitativen Verteilung. Bei der spezifischen Färbung Kollagen-I-haltiger Strukturen mittels eines anti-Kollagen-I-Antikörpers färbte sich besonders der Bereich der fibrösen Kappe an. Bei der Färbung mit einem anti-Kollagen-III-Antikörper trat vor allem die zentrale Kernregion farblich hervor. Daraus lässt sich ableiten, dass Kollagen III hauptsächlich in der zentralen Kernregion der Plaque lokalisiert ist, wohingegen Kollagen I die vorherrschende Kollagenart der fibrösen Kappe ist.

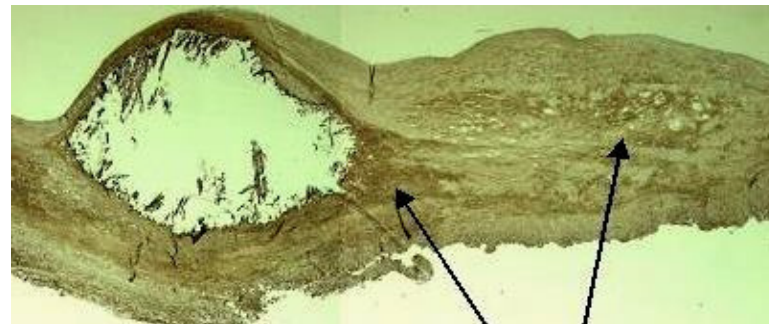
Die Bindung von löslichem GPVI-Fc an humanes Plaquematerial erfolgte ebenfalls vorwiegend an die zentrale Kernregion der Plaque und deutlich weniger an der fibrösen Kappe. Damit ergab sich eine überraschend auffällige Übereinstimmung mit der Verteilung von Kollagen III in der Plaque.

Verteilung von Kollagen I, Kollagen III und GPVI in einer humanen Karotis-Plaques

1. Kollagen I-Färbung



2. Kollagen III-Färbung



3. GPVI-Färbung

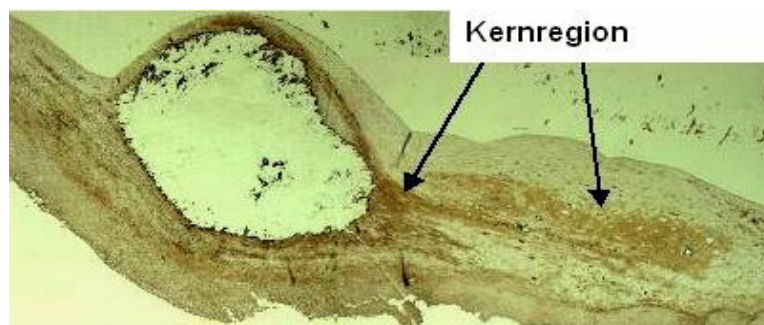


Abb.9: Immunhistochemische Färbung eines histologischen Schnittes (3µm-Dicke) einer humanen atheromatösen Plaques. Die Behandlung mit anti-Kollagen I-Antikörpern führte nach Inkubation mit Peroxidase-konjugierten Antikörpern zu einer Färbung der fibrösen Kappe, die Behandlung mit anti-Kollagen III-Antikörpern und anti-GPVI-Antikörpern führte zu einer Färbung von zentral gelegenen Strukturen in der Kernregion des Präparats.

Kontrollfärbungen von Plaquematerial mit Fc-Fragment, Rabbit IgG und Rabbit-Anti-Goat-Antikörpern

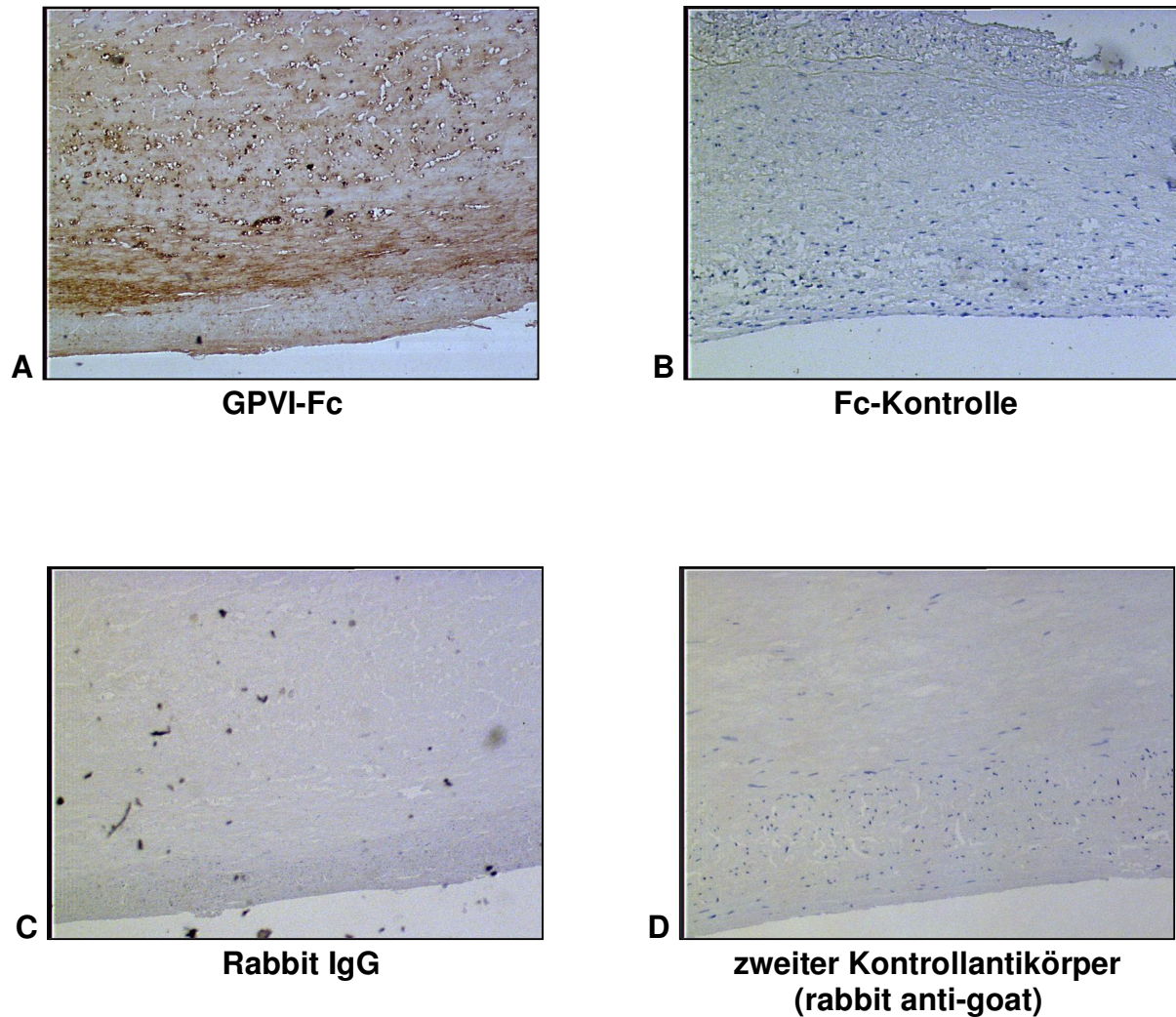


Abb.10: Immunhistochemische Kontrollfärbungen der atherosklerotischen Plaque. Um unspezifische Antikörperbindung als Ursache für die Anfärbung des Plaquematerials bei der GPVI-Färbung auszuschließen, wurden Plaqueproben mit einem Fc-Fragment und zwei unspezifischen Antikörpern inkubiert. Es erfolgte keine Anfärbung von Plaquestrukturen bei den Kontrollversuchen.

3.2 Quantitative Analyse der Bindung von GPVI-Fc an humanes Plaquematerial und Kollagen I/III

Um die Bindung von GPVI-Fc an humanes Plaquematerial sowie an Kollagen I und III zu quantifizieren, wurde ein ELISA durchgeführt. Da aufgrund der immunhistochemischen Untersuchungen eine unterschiedliche Verteilung der GPVI-Bindungsstellen in der humanen Plaque angenommen wurde, wurde die Plaque in die zentrale Kernregion und fibröse Kappe aufgetrennt und diese Bestandteile jeweils einzeln als Beschichtungsmaterial verwendet. Die Anheftung eines unspezifischen Fc-Teils diente als Negativkontrolle. Die Bindungswerte für GPVI-Fc an die einzelnen Komponenten wurden als Prozentwerte der unspezifischen Fc-Bindung berechnet, wobei die Bindung des Fc-Fragments als 100% gesetzt wurde.

Im ELISA zeigte GPVI-Fc eine starke Anheftung an Kollagen III (580%), wohingegen die Anheftung an Kollagen I schwächer ausfiel (450%). Darüber hinaus konnte eine signifikante Bindung von GPVI-Fc an humane Plaques nachgewiesen werden. Die stärkste Adhäsion fand an Material der fibrösen Kapsel statt, allerdings waren die Unterschiede bezüglich der Bindung von GPVI-Fc an die einzelnen Plaquekomponenten nicht signifikant. Diese Daten lassen vermuten, dass GPVI an die Kollagenstrukturen der humanen atherosklerotischen Plaque bindet.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Bindung von GPVI-Fc an Plaques untersucht, welche im Anschluss aggregometrisch als „aktive“ oder „weniger aktive“ Plaques klassifiziert wurden (Daten nicht gezeigt). Als „aktiv“ wurde Plaquematerial bezeichnet, welches eine Plättchenaggregation in PRP von mindestens 80% hervorrufen konnte. Als „weniger aktiv“ wurde Material eingestuft, das eine Aggregation von weniger als 80% induzieren konnte. Damit sollte untersucht werden, ob die Aktivität einer Plaque und ihre Fähigkeit eine Plättchenaggregation auszulösen, mit ihrer GPVI-Bindungsfähigkeit korreliert.

Obwohl kein signifikanter Zusammenhang zwischen GPVI-Bindungsfähigkeit und plaqueinduzierter Aggregation beobachtet werden konnte, fiel auf, dass Plaquematerial mit einem hohen Aggregationspotential (>80%) signifikant mehr GPVI-Fc bindet ($193 \pm 36\%$) als Plaquematerial, das weniger stark Plättchenaggregation induzierte ($90 \pm 60\%$).

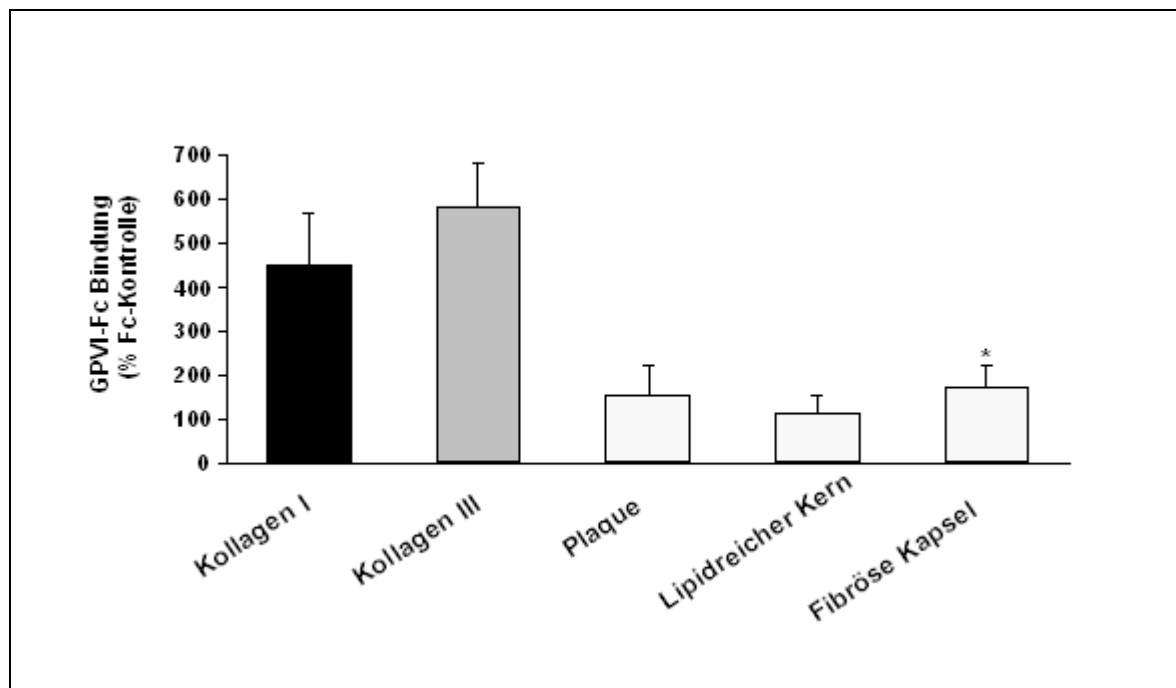


Abb.11: Bindung von GPVI-Fc an einzelne Teilbereiche einer atheromatösen Plaque sowie, als Vergleichsmöglichkeit, an Kollagen I und III im ELISA. Die Histogrammbalken repräsentieren die spezifische Bindung von GPVI-Fc (% von nichtspezifischer Bindung von Fc-Kontrolle) an atheromatöse Plaque bzw. deren Untereinheiten. Die Resultate werden als Durchschnittswerte \pm Standardabweichung dargestellt. 2. Versuchsreihe mit AP-Material, das in Aggregationsversuchen in aktive oder nicht aktive Plaque eingeteilt wurde (n=4)

3.3 Rolle von GPVI und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin für die Plaque-und Kollagen-induzierte Plättchenaggregation

Mit Hilfe einer Aggregationsstudie sollte untersucht werden, ob Plaquematerial eine Plättchenaggregation in antikoaguliertem PRP auslösen kann und welchen Stellenwert der GPVI-Rezeptor und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin für die plaqueinduzierte Plättchenaktivierung und Aggregation haben. Durch Zugabe von Plaquematerial (1,25mg/ml) und Kollagen (1 μ g/ml) zu Plättchen-reichem Plasma wurde eine Thrombozytenaggregation ausgelöst und diese photometrisch gemessen. Bei den entsprechenden Versuchsreihen wurden der anti-GPVI-Antikörper 5C4Fab oder der anti- $\alpha 2\beta 1$ -Antikörper 6F1 dem PRP zugegeben. Als Kontrolle dienten Aggregationsversuche mit unspezifischen Ratten- und Mausantikörpern.

Kollagen und humanes Plaquematerial können in PRP eine Plättchenaggregation auslösen. Obwohl sich die Absolutwerte unterscheiden, lassen sich Parallelen bezüglich der

hemmenden Wirkung von anti-GPVI-Antikörpern und anti- $\alpha 2\beta 1$ -Antikörpern feststellen. Sowohl bei kollagen- als auch bei plaqueinduzierter Plättchenaggregation zeigt der anti-GPVI-Antikörper eine deutliche Hemmwirkung, wohingegen eine Blockade des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins ohne signifikante Wirkung bleibt. Der Maus-Kontrollantikörper zeigte bei beiden Versuchsansätzen keine Reduktion der Aggregation, der Ratten-Kontrollantikörper führte zu einer nicht signifikanten Reduktion der kollagen-vermittelten Aggregation ($p > 0,05$).

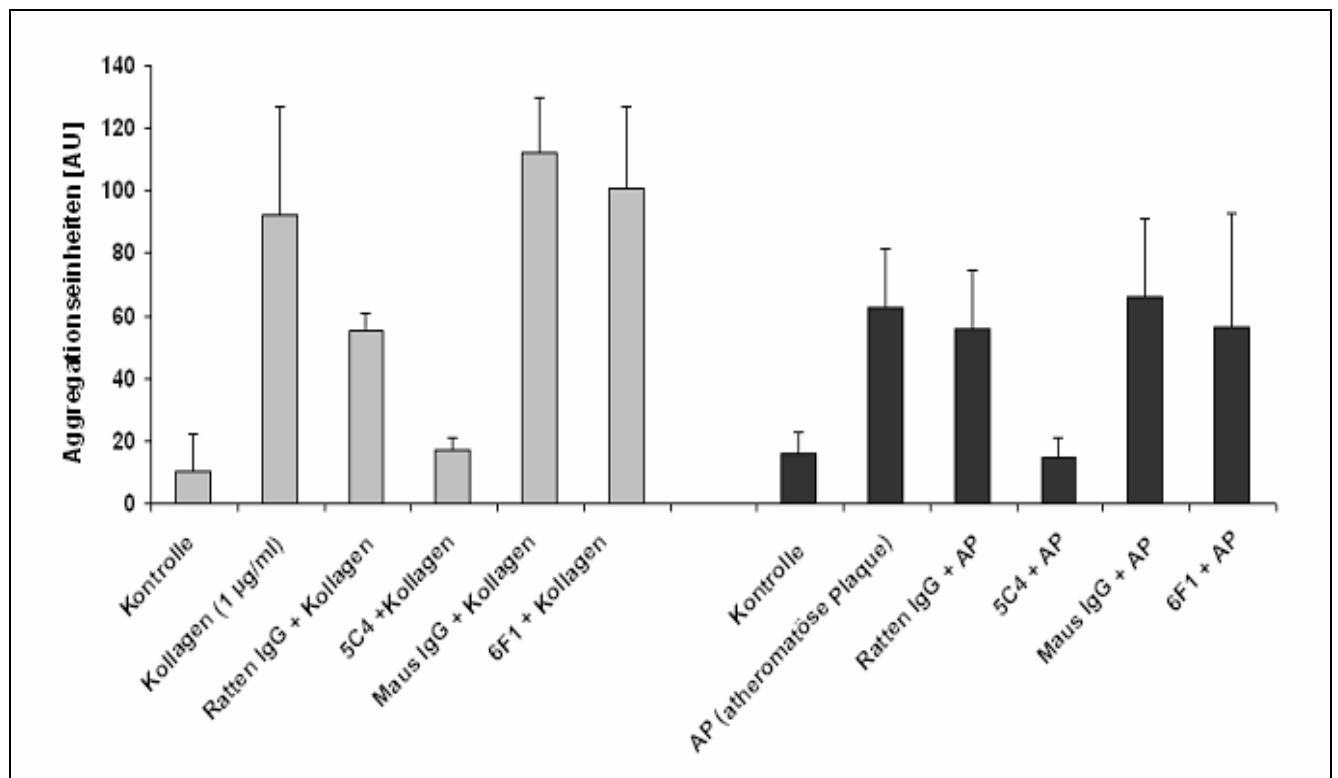


Abb.12: Kollagen- und plaqueinduzierte Plättchenaggregation unter Hemmung von GPVI (5C4), $\alpha 2\beta 1$ -Integrin (6F1) und bei Zugabe von Kontrollantikörpern (Maus- und Ratten IgG). Die Aggregationswerte werden in Aggregationseinheiten [AU] \pm Standardabweichung angegeben.

3.4 Beeinflussung der Thrombozytenadhäsion an Kollagen I und III unter Flussbedingungen durch Blockade von GPVI und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin

Der GPVI-Rezeptor und der $\alpha 2\beta 1$ -Rezeptor sind zentrale Vermittler der Interaktion zwischen Thrombozyten und der Kollagenmatrix der Gefäßwand. In Flusskammerversuchen untersuchten wir daher die Bedeutung der einzelnen Rezeptoren für die Adhäsion von Plättchen an Kollagen I und Kollagen III getrennt im Detail unter arteriellen

Strömungsverhältnissen (Scherrate 1000s^{-1}). Die Thrombozyten wurden mit Rhodamin 6G angefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop photographiert.

Um die Bedeutung des GPVI-Rezeptors für die Thrombozytenadhäsion in vitro an Kollagen I und Kollagen III abschätzen zu können, wurde die Auswirkung einer Blockade des GPVI-Rezeptors durch 5C4-Fab mit der Hemmung von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin durch den IB4-Antikörper verglichen. Sowohl der IB4- als auch der 5C4Fab-Antikörper sind aus Vorversuchen als wirkungsvolle Antagonisten an den jeweiligen Rezeptoren bekannt. Als Positivkontrolle dienten Blutproben ohne Antikörperzusatz und Proben mit einem identisch hergestellten Fab-Kontrollantikörper (2D1), der keine hemmende Wirkung auf die Kollagenrezeptoren hat.

Um durch Blutproben bedingte Einflussfaktoren zu eliminieren, wurde der Adhäsionswert der Blutprobe ohne Antikörperzusatz als Referenzwert (100%-Adhäsion) festgelegt. Die unter Rezeptorblockade ermittelten Werte sind als Prozentwerte der Maximaladhäsion angegeben.

Die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen I wurde sowohl durch das 5C4Fab-Fragment als auch durch den IB4-Antikörper signifikant gehemmt. Der verwendete Kontrollantikörper zeigte keine hemmende Wirkung. Die Anheftung von Plättchen unter Blockade des $\alpha 2\beta 1$ -Rezeptors betrug durchschnittlich ca. 1 % der Maximaladhäsion. Eine Blockade des GPVI-Rezeptors durch 5C4-Fab reduzierte die Adhäsion um durchschnittlich 64% (36% der Maximaladhäsion).

Im Gegensatz dazu fiel die hemmende Wirkung des anti-GPVI-Antikörpers auf die Thrombozytenadhäsion an Kollagen-III-Oberflächen stärker aus. Die Blockade des GPVI-Rezeptors reduzierte die Adhäsion um durchschnittlich 87 %, während die Blockade von $\alpha 2\beta 1$ nur eine Reduktion von durchschnittlich 30 % ergab. Eine Hemmung der Plättchenadhäsion durch den 2D1-Antikörper konnte auch hier nicht beobachtet werden.

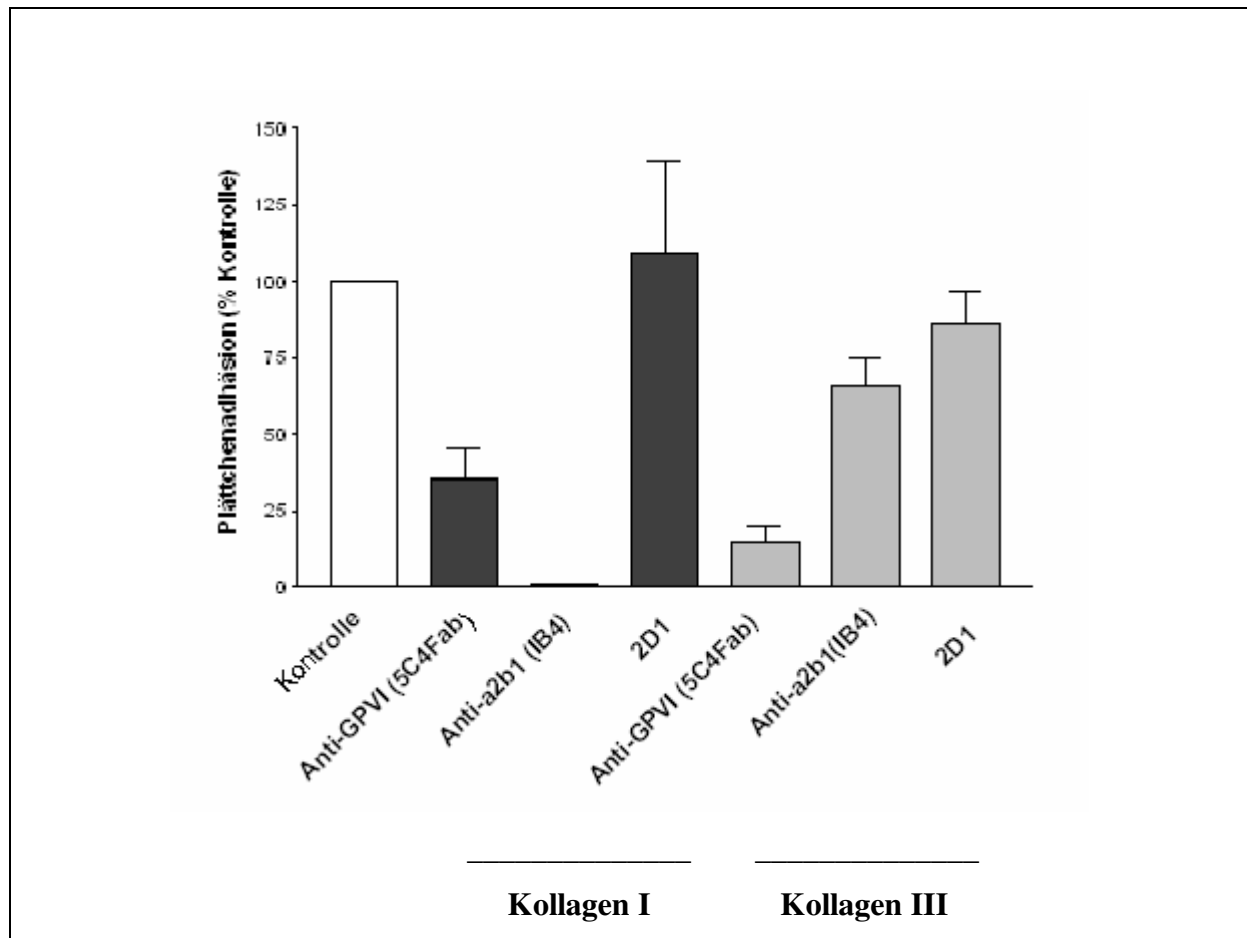


Abb.13: Bindung von Thrombozyten an Kollagen I und Kollagen III nach Inkubation der Blutproben mit anti-GPVI-Antikörpern (5C4-Fab) und anti- $\alpha 2\beta 1$ -Antikörpern (IB4). Die Bindungswerte ($n=6$) werden als mittlere Prozentwerte (\pm Standardabweichung) der Positivkontrolle (Blutprobe ohne Antikörper) angegeben. Um unspezifische Hemmwirkungen auszuschließen, wurden Versuchsreihen mit dem Kontrollantikörper 2D1 durchgeführt. Es ergab sich eine signifikante Hemmung auf beiden Oberflächen für 5C4Fab ($p<0,01$).

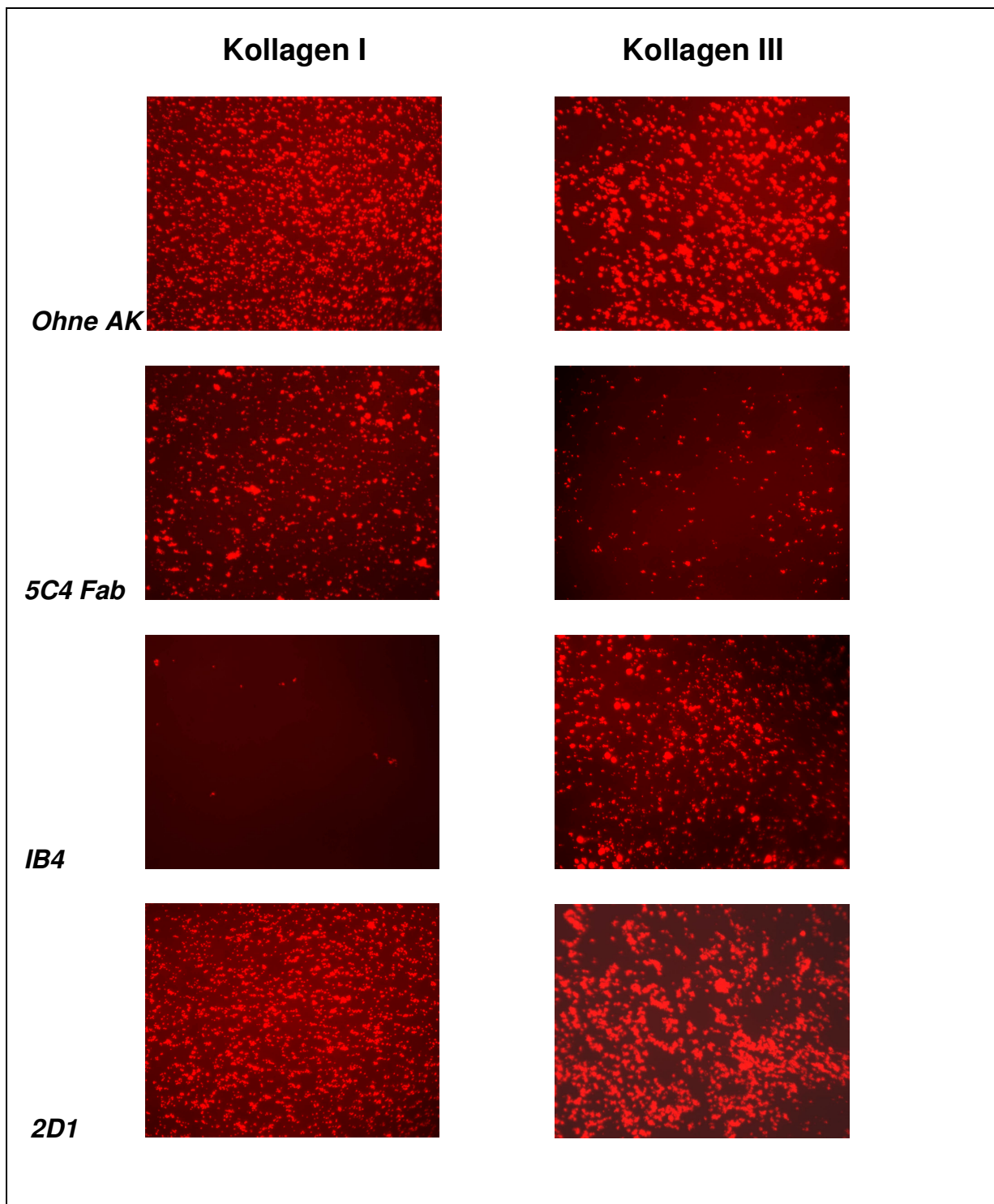


Abb.14: Effekte der GPVI- und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin Blockade auf die Thrombozytenadhäsion an Kollagen I und III unter arteriellen Flußbedingungen.

Anheftung von Thrombozyten an Kollagen-I- und Kollagen-III-Oberflächen *in vitro* unter arteriellen Flußbedingungen (Flussrate $1000s^{-1}$). Blockade der Kollagenrezeptoren durch 5C4Fab-Fragment (anti-GPVI-Antikörper) und IB4 (anti- $\alpha 2\beta 1$ -Antikörper). Die Plättchen wurden mit Rhodamin 6G für 10 Minuten bei $37^{\circ}C$ inkubiert und durch Verwendung eines Filters für den Wellenbereich von 530-580 nm die Fluoreszenz sichtbar gemacht ($n=8$).

3.5 Hemmung der Thrombozytenadhäsion an Kollagen I und III unter Flussbedingungen durch GPVI-Fc und Fc-Fragment

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Kollagenoberflächen mit einem löslichen GPVI-Fc-Konstrukt und einem Fc-Fragment vorbehandelt. Bei dem GPVI-Fc-Konstrukt handelt es sich um den extrazellulären Teil des GPVI-Rezeptors, der kovalent an den Fc-Teil eines Antikörpers gebunden ist. Als Kontrolle dienten zum einen Versuchsreihen, bei denen die Kollagenoberflächen mit einem Fc-Fragment ohne gekoppelten Rezeptor inkubiert worden waren und zum anderen Versuchsreihen ohne Vorbehandlung der Oberflächen. Es sollte untersucht werden, ob die GPVI-Bindungsstellen von Kollagen durch eine Vorinkubation mit löslichem GPVI-Konstrukt so abgesättigt werden, dass Thrombozyten nicht adhären können. Die Verwendung einer äquimolaren Menge eines Fc-Fragments als Negativkontrolle sollte ausschließen, dass eine unspezifische Bindung des Fc-Teils an Kollagen für die Hemmwirkung des GPVI-Fc-Konstruktes verantwortlich war.

Durch Inkubation mit GPVI-Fc konnte die Adhäsion von Blutplättchen an Kollagen-I-Oberflächen um durchschnittlich 58% reduziert werden. Die Vorbehandlung der Kollagenoberflächen mit Fc-Fragment zeigte keine hemmende Wirkung auf die Thrombozytenanheftung.

Gleiches konnte bei der Verwendung von Kollagen III als Beschichtungsmaterial gezeigt werden. Hier betrug die Thrombozytenanheftung nach Vorinkubation der Kollagenoberfläche mit GPVI-Fc durchschnittlich nur noch 2% der Anheftung ohne Vorbehandlung. Lediglich Leukozyten konnten an der Kollagenoberfläche adhären. Diese waren aber aufgrund ihrer Größe und Form leicht von den Thrombozyten zu unterscheiden. Der Einsatz von Fc-Fragment zeigte keine Reduktion der Adhäsion. Die erreichte Versuchszahl betrug insgesamt 6 Versuche.

Insgesamt zeigte sich unter Verwendung von löslichem GPVI-Fc ein vergleichbarer Effekt wie bei dem GPVI-Fab-Antikörper 5C4.

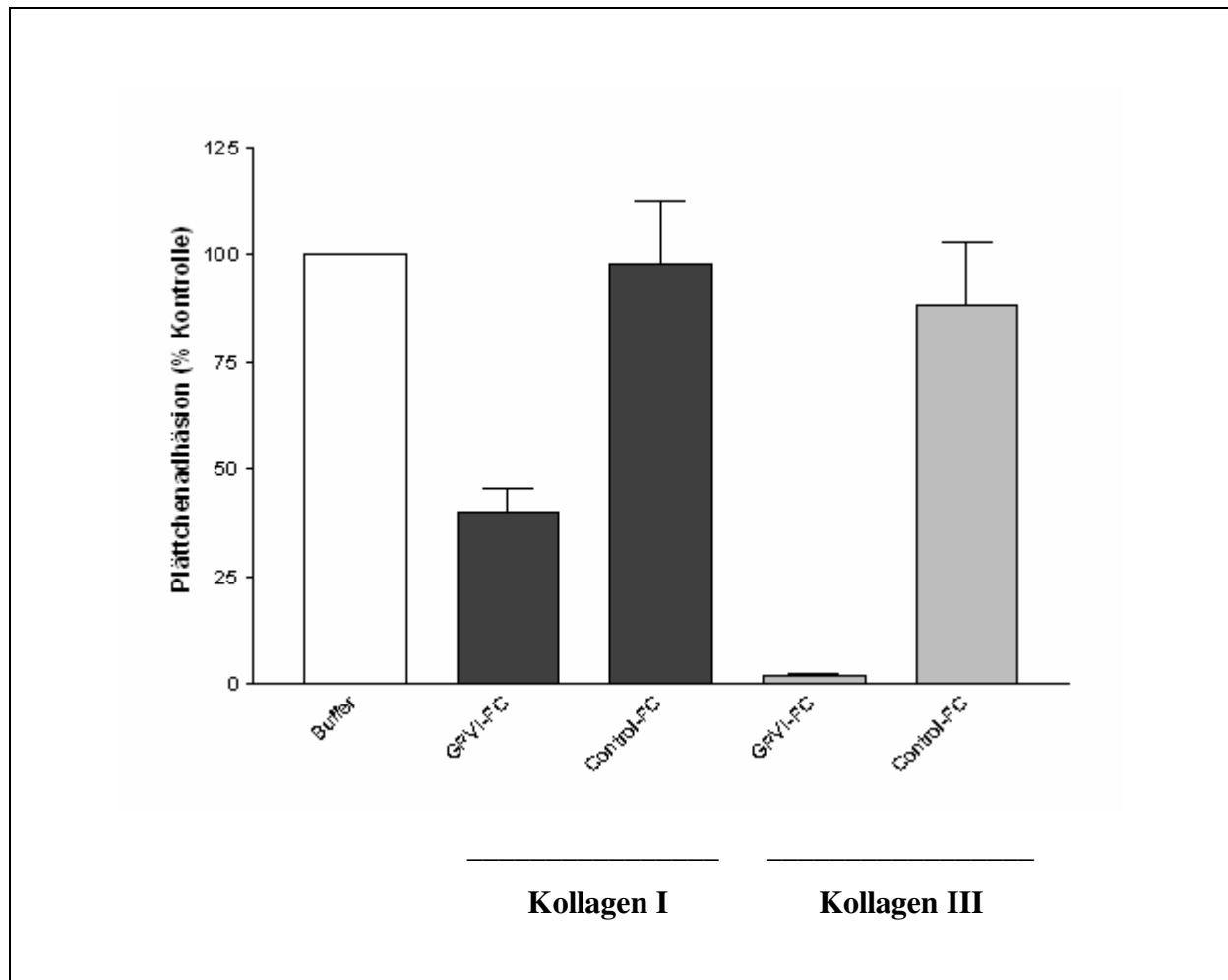


Abb.15: Bindung von Plättchen an Kollagen I und Kollagen III unter arteriellen Flussbedingungen nach Inkubation der Oberflächen mit GPVI-Fc und Kontroll-Fc. Als Positivkontrolle diente eine Versuchsreihe mit unbehandelten Kollagenoberflächen. Die Bindungswerte ($n=6$) werden als mittlere Prozentwerte (\pm Standardabweichung) der jeweiligen Positivkontrolle dargestellt. $P < 0,01$ für GPVI-Fc vs. Kontroll-Fc.

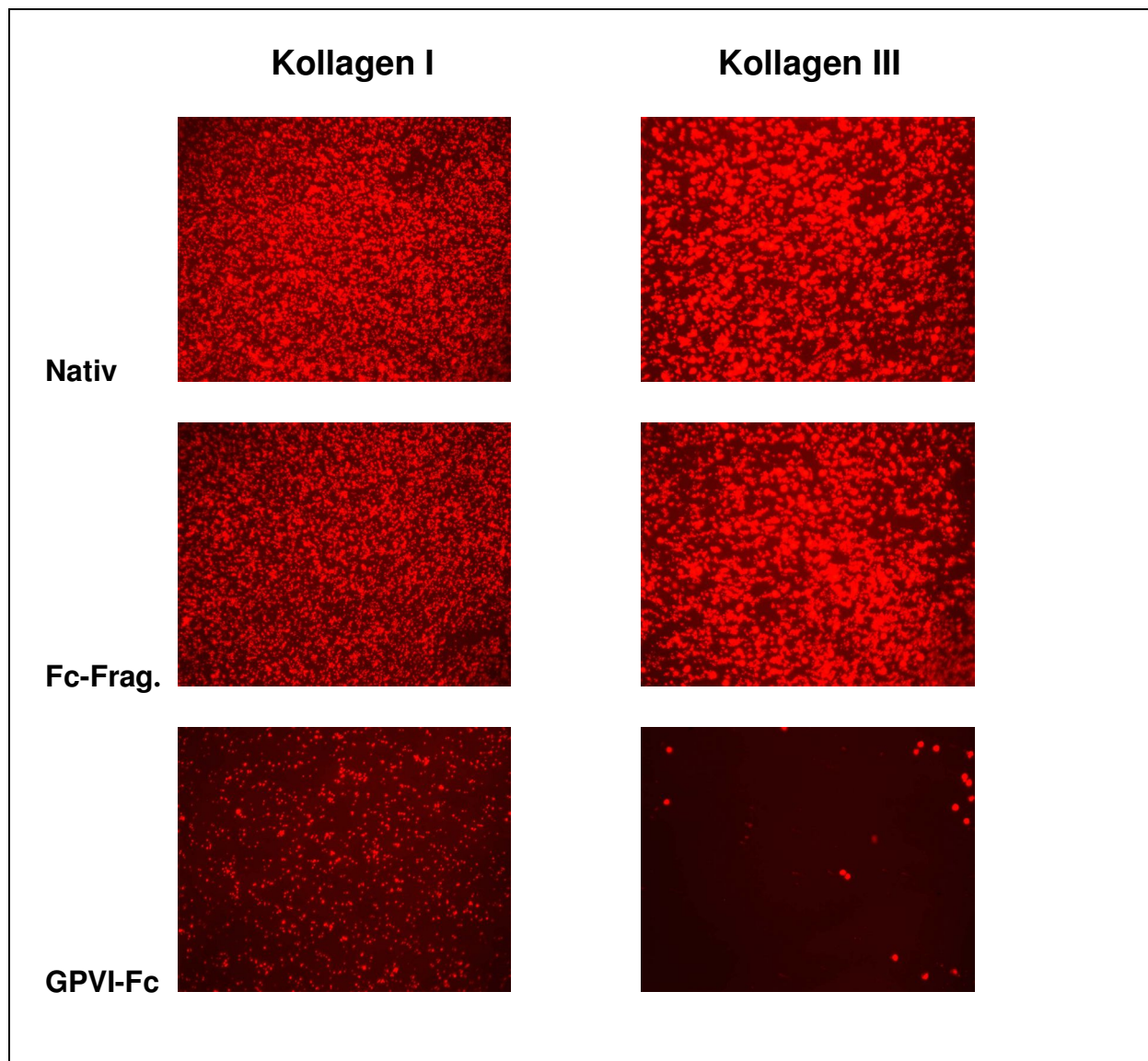


Abb.16: Blockade thrombozytärer Bindungsstellen an Kollagen I und Kollagen III durch GPVI-Fc und Kontroll-Fc.

Anheftung von Thrombozyten an Kollagen I und Kollagen III *in vitro* unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate $1000s^{-1}$). Inkubation der Oberflächen mit GPVI-Fc-Konstrukt (GPVI-Fc) und Fc-Fragment (Fc-Frag.). Versuchsreihen mit unbehandelten Kollagenoberflächen dienen als Positivkontrolle. Die Konzentration von GPVI-Fc betrug $0,8\mu g/\mu L$, die Konzentration von Fc-Fragment lag bei $0,2\mu g/\mu L$ (äquimolare Konzentration). Die Thrombozyten wurden mit Rhodamin 6G gefärbt und durch Verwendung eines Fluoreszenzfilters für den Wellenbereich von 530-580 nm die Rotfluoreszenz sichtbar gemacht.

3.6 Auswirkung der Hemmung von GPVI und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin auf die Thrombozytenadhäsion an humane atheromatöse Plaque

3.6.1 Direkte Blockade des GPVI-Rezeptors durch Antikörper

Um die Interaktion von Thrombozyten mit humanem Plaquematerial in vitro zu untersuchen, wurden Deckgläser mit operativ gewonnener Plaque beschichtet. Durch Vorinkubation der Blutproben mit 5C4- (anti-GPVI-Fab) und IB4-Antikörpern (anti- $\alpha 2\beta 1$) sollte die Bedeutung der entsprechenden Kollagenrezeptoren für die Plättchenadhäsion dargestellt werden. Die Plättchenanheftung wurde nach 10-minütiger Perfusion gemessen.

Die Rezeptorblockade der Kollagenrezeptoren durch 5C4Fab und IB4 konnte die Plättchenadhäsion unter Flussbedingungen an humane atheromatöse Plaque deutlich reduzieren. Die Zugabe von 5C4Fab verminderte die Thrombozytenanheftung an humane Plaque um durchschnittlich 70%, die Zugabe des anti- $\alpha 2\beta 1$ -Antikörpers IB4 führte zu einer durchschnittlichen Hemmung von 22%. Die Blockade des GPVI-Rezeptors führte zu einer signifikant stärkeren Hemmung der Adhäsion von Plättchen an Plaquematerial ($p < 0,05$) als IB4.

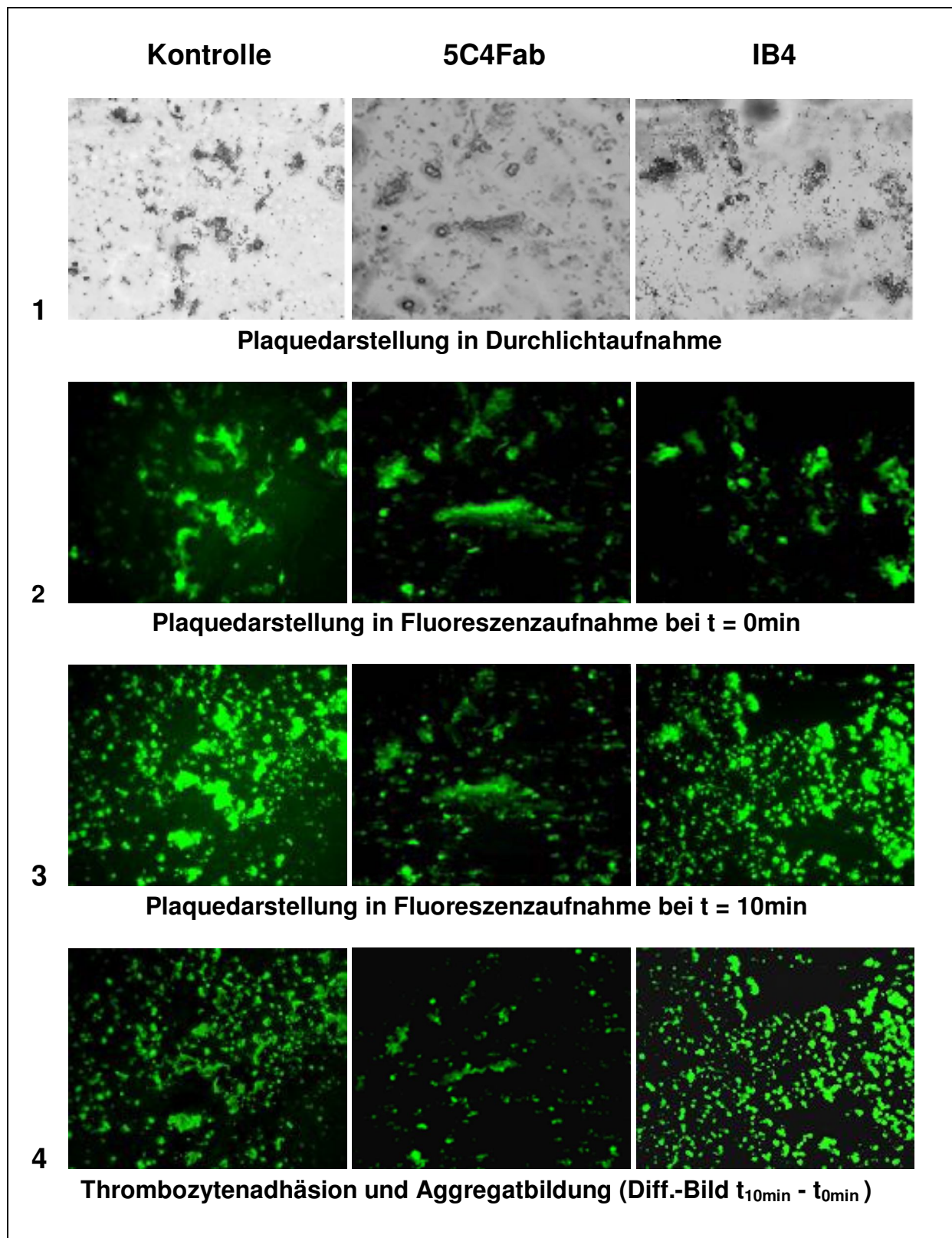


Abb.17: Anheftung rhodamingefärbter Thrombozyten an humanem Plaquematerial unter arteriellen Flussbedingungen (Wandscherrate $1000s^{-1}$). Blockade der Kollagenrezeptoren durch Inkubation der Thrombozyten mit 5C4Fab-Fragment (anti-GPVI-Antikörper) und IB4 (anti- $\alpha_2\beta_1$ -Antikörper). Durch Verwendung eines Fluoreszenzfilters wurden sowohl Plaquematerial als auch Thrombozyten zur Fluoreszenz angeregt.

3.6.2 Blockade von GPVI-Bindungsstellen auf Plaque- und Kollagenoberflächen durch GPVI-Fc

In weiteren Versuchsreihen wurde das beschichtete Deckglas ähnlich wie bei den Versuchen mit Kollagen-Oberflächen mit löslichem GPVI-Fc und Fc-Fragment für 10 Minuten vorbehandelt. Den Blutproben wurden bei diesen Versuchen keine Antikörper zugegeben. Damit sollte untersucht werden, ob durch die Bindung von GPVI-Fc an das Plaquematerial die Bindungsstellen für Thrombozyten so blockiert werden können, dass Plättchen nur noch vermindert adhären können.

Vorinkubation der beschichteten Deckgläser mit löslichem GPVI-Fc-Konstrukt reduzierte die Thrombozytenadhäsion signifikant um durchschnittlich 74%, vergleichbar zum anti-GPVI-Fab Antikörper 5C4. Fc-Fragment-Zugabe verursachte eine Reduktion der Anheftung um 24% ($P > 0,05$, n.s.).

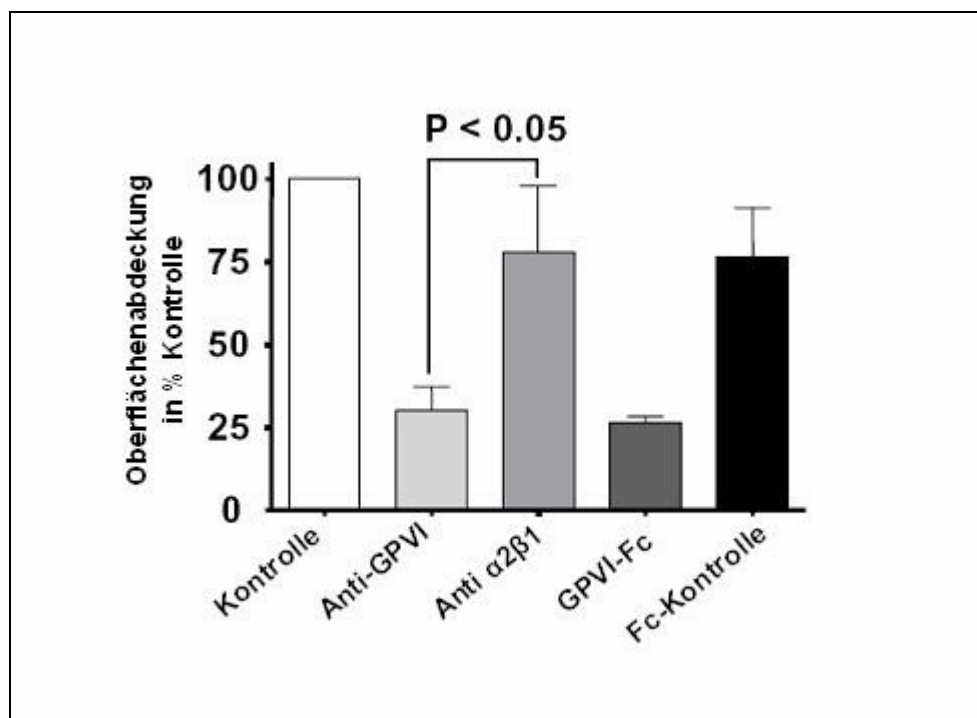


Abb.18: Thrombozytenadhäsion an humanes Plaquematerial unter arteriellen Flussbedingungen. Direkte Rezeptorblockade von GPVI mit 5C4Fab(Anti-GPVI) und von $\alpha 2\beta 1$ -Intergrin mit 2D1 (Anti- $\alpha 2\beta 1$). Blockade der Bindungsstellen mit GPVI-Fc oder Fc-Kontrolle. Die Plättchenadhäsion unter Antikörperblockade wird als Prozentwert der Plättchenanheftung einer Kontrollversuchsreihe ohne Antikörper angegeben ($n=6$).

In der dritten Versuchsreihe wurde die immobilisierte Plaque mit anti-Kollagen-I und anti-Kollagen-III-Antikörpern oder mit einer Kombination beider Antikörper für 10 Minuten inkubiert. Beide Antikörper konnten die Plättchenadhäsion hochsignifikant reduzieren ($p < 0,001$). Zwischen den einzelnen Antikörpertypen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der hemmenden Wirkung festgestellt werden.

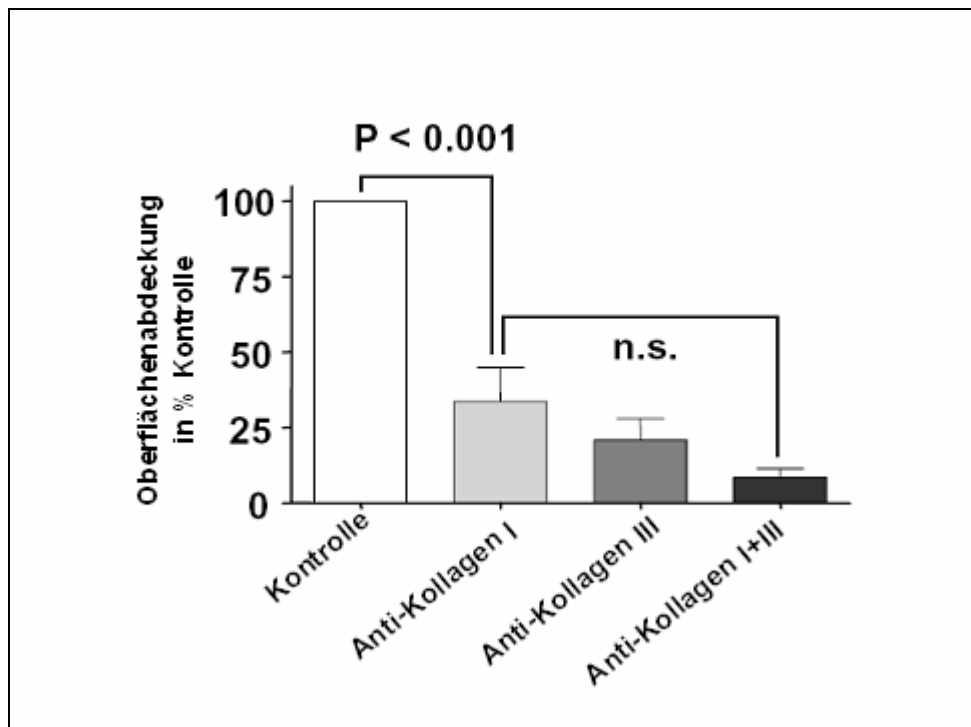


Abb.19: Thrombozytenadhäsion an humanes Plaquematerial unter arteriellen Flussbedingungen. Vorinkubation des Plaquematerials mit Anti-Kollagen I und Anti-Kollagen III-Antikörpern. Die Plättchenanheftung unter Antikörperblockade wird als Prozentwert der Plättchenanheftung einer Kontrollversuchsreihe ohne Antikörper angegeben.

4 Diskussion

Im bislang angenommenen Modell der Thrombusformation nach Ruptur einer atherosklerotischen Plaque werden Thrombozyten im Rahmen einer lokal übergewebsständigen Tissue Factor und Faktor VII gesteigerten plasmatischen Gerinnung aktiviert und zur Aggregation angeregt. Deshalb wurde die orale Antikoagulation mit Markumar solange als ausreichende Therapie des akuten Koronarsyndroms angesehen, bis anhand klinischer Studien nachgewiesen werden konnte, dass Patienten, die anstatt einer Antikoagulation eine gegen Plättchenaktivierung gerichtete Therapie erhielten, deutlich bessere Überlebensraten zeigten (Schömig et al. ³⁴). Auf diesen Untersuchungsergebnissen basiert die heutige Therapieempfehlung, die eine Kombination aus Antikoagulation und Thrombozytenhemmung als notwendige Therapie eines akuten Koronarsyndroms ansieht. Aber nicht nur das akute Koronarsyndrom entsteht in seiner Pathophysiologie durch die Ruptur einer atheromatösen Plaque. Sie ist auch beim ischämischen Schlaganfall und dem akuten peripher-arteriellen Verschluss von zentraler Bedeutung. Auch hier wird eine Thrombozytenaggregationshemmung als wichtig erachtet.

Aus verschiedenen Vorarbeiten ist bekannt, dass **I.** Thrombozyten direkt an Kollagen binden können, **II.** für diese Interaktion neben $\alpha 2\beta 1$ -Integrin der Kollagenrezeptor GPVI von zentraler Bedeutung ist (Nieswandt et al. ²⁸) und **III.** Kollagen in der atheromatösen Plaque in hoher Konzentration vorkommt.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Thrombozyten unabhängig von dem plasmatischen Gerinnungssystem mit Plaquematerial interagieren können und welche Rolle die wichtigsten Kollagenrezeptoren GPVI und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin bei dieser Interaktion einnehmen.

Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen konnte gezeigt werden, dass humane atherosklerotische Plaques Bindungsstellen für den thrombozytären GPVI-Rezeptor enthalten. Auffällig war, dass die Bindungsstellen nicht gleichmäßig über das gesamte Plaqueareal verteilt sind, sondern dass sie sich auf den zentralen Kernbereich der Plaque konzentrieren. Untersuchungen über die Verteilung von Kollagen III und Kollagen I in der Plaque führten zu

dem Ergebnis, dass die beiden Kollagenunterarten ebenfalls nicht gleichmäßig im Plaquareal verteilt sind, sondern dass der Kernbereich vorwiegend Kollagen III enthält. Kollagen I ist hauptsächlich in der fibrösen Kappe lokalisiert. So konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Konzentration der GPVI-Bindungsstellen in der Plaque an den Orten mit hohem Kollagen-III-Gehalt am höchsten ist. Kollagen-I-haltige Strukturen weisen weniger GPVI-Bindungsstellen auf.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Thrombozyten über den GPVI-Rezeptor direkt an humanes Plaquematerial binden können, und das Kollagen der Hauptbindungspartner im Plaquematerial ist. Damit stimmen die Versuchsergebnisse mit den Beobachtungen von Penz et al.³⁰ überein, die ebenfalls Kollagen als zentralen Plaquebestandteil für die Plättchenaggregation und Aktivierung beschrieben haben. Die Übereinstimmung der GPVI-Bindungsstellen mit der Verteilung von Kollagen III im Plaquareal könnte ein Hinweis darauf sein, dass vor allem Kollagen III Bindungsstellen für den thrombozytären GPVI-Rezeptor aufweist. Diese Beobachtung würde erklären, warum erst die Ruptur einer Plaque mit Freilegung von zentral gelegenen Kollagen III eine Thrombusformation auslöst und eine oberflächliche Plaqueerosion oft nicht ausreicht, einen gefäßverschießenden Thrombus zu bilden⁹.

Um die Bindungsfähigkeit von GPVI-Rezeptoren an humanes Plaquematerial bzw. an die unterschiedlichen Plaquareale quantifizieren zu können, wurde ein ELISA-Test durchgeführt. Das Plaquematerial wurde entweder in toto belassen oder in die Bereiche „lipidreicher Kern“ und „fibröse Kappe“ aufgetrennt. Parallel dazu wurde in Aggregationsstudien untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur Induktion einer Plättchenaggregation und der Anzahl der GPVI-Bindungsstellen einer Plaque besteht.

Lösliches GPVI-Fc konnte sowohl an die Kernbereiche der atheromatösen Plaque als auch an die fibröse Kappe signifikant binden. Beobachtete Unterschiede in der Bindungsstärke an die einzelnen Komponenten waren allerdings nicht signifikant. Ursachen für die zur Immunhistochemie unterschiedlichen Ergebnisse können eine zu geringe Anzahl an untersuchten Präparaten oder Schwierigkeiten bei der Trennung der einzelnen Plaquebereiche bei der Präparation für den ELISA sein. Beimengungen von Kernmaterial könnten so z.B. eine zu hohe GPVI-Bindung an die fibröse Kappe verursachen.

Auch in anderen Arbeiten waren Unterschiede bei untersuchten Plaques bezüglich deren Fähigkeit eine Aggregation auszulösen beobachtet worden³⁰. Diese Unterschiede korrelierten

allerdings nicht mit deren absoluten Kollagengehalt. Daher untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit, ob ein Zusammenhang zwischen der GPVI-Bindung des Plaquematerials und der Fähigkeit eine Aggregation zu induzieren besteht. Auffällig war, dass aktives Plaquematerial (induzierte Thrombozytenaggregation > 80% in der Methode nach Born) signifikant mehr GPVI-Bindungsstellen enthält als eine weniger aktive Plaque. Damit konnte ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Plättchenaggregation und der GPVI-Bindungsfähigkeit an das Plaquematerial nachgewiesen werden. Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass Kollagenstrukturen der Plaque über den GPVI-Rezeptor eine Plättchenaggregation auslösen können und dass weniger der absolute Kollagengehalt als die GPVI-Bindungsfähigkeit des Plaquematerials entscheidend ist.

Anhand von Aggregationsstudien sollte nun geklärt werden, ob die Bindung von Thrombozyten an Plaquematerial über den GPVI-Rezeptor eine Aktivierung und folglich eine Aggregation der Plättchen auslösen kann. Überraschenderweise konnten Kollagen und humanes Plaquematerial eine Thrombozytenaggregation auslösen, obwohl für die Versuchsdurchführung Plättchen-reiches Plasma aus Zitrat-antikoaguliertem Vollblut verwendet wurde und somit die plasmatische Gerinnung inaktiviert war.

Die Hemmung des thrombozytären GPVI-Rezeptors bewirkte eine starke Reduktion der Aggregation, wohingegen die Blockade von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin keine signifikante Verminderung hervorrufen konnte. Kollagen und die humane Plaque erwiesen sich gleichermaßen als starke Aktivoren der Blutplättchen mit konsekutiver Plättchenaggregation. Entscheidend bei dieser Beobachtung ist, dass die Aktivierung über eine direkte Interaktion zwischen Thrombozyten und Kollagen bzw. Plaquematerial zu erfolgen scheint, unabhängig vom plasmatischen Gerinnungssystem. Der GPVI-Rezeptor spielt hierbei offensichtlich eine zentrale Rolle, da eine Hemmung des Rezeptors durch Antikörper die Aggregation und Aktivierung fast vollständig unterdrücken konnte. Das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin scheint hingegen keine entscheidende Interaktion zu vermitteln, da eine Blockade dieses Rezeptors keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation hat. Dies belegt, dass GPVI nicht nur an Kollagenstrukturen der Plaque binden kann, sondern dass diese Adhäsion auch eine Plättchenaktivierung und Aggregation auslöst, die zur Thrombusformation führt.

Die bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Versuche hatten alle die Bindung von GPVI an das jeweilige Substrat unter statischen Bedingungen untersucht. Um die Bedeutung des GPVI-Rezeptors für die Thrombozytenadhäsion an Kollagen unter physiologischen arteriellen

Flussbedingungen festzustellen, wurden Kollagen I- und Kollagen III- beschichtete Deckgläser in einer Durchflusskammer mit humanem, heparinisiertem Vollblut perfundiert. Trotz Hemmung des plasmatischen Gerinnungssystems durch Heparin konnten Thrombozyten an Kollagen I und Kollagen III anheften.

Wir konnten zeigen, dass die direkte Antikörperblockade von GPVI-Rezeptoren mittels 5C4-Antikörpern die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen I und Kollagen III auch unter Flussbedingungen erheblich reduzieren kann. Die hemmende Wirkung von 5C4 war bei Kollagen-III-Oberflächen stärker ausgeprägt als bei mit Kollagen I beschichteten Deckgläsern. Dies unterstützt die Beobachtung aus den immunhistochemischen Färbungen, die mehr GPVI-Bindungsstellen in Kollagen III-haltigen Plaquarealen nachgewiesen hatten. Die Blockade von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin durch IB4-Antikörper hatte auf die Thrombozytenadhäsion an Kollagen III keinen signifikanten Einfluss, hemmte allerdings die Plättchenbindung an Kollagen I fast vollständig.

Parallel zu diesen Versuchen wurden die Kollagenoberflächen in einer anderen Versuchsreihe mit löslichem GPVI-Fc oder Fc-Fragment vorinkubiert, um so die GPVI-Bindungsstellen des Kollagens zu blockieren. Nur GPVI-Fc konnte die Bindung von Plättchen an Kollagen I und III signifikant senken, das Fc-Fragment blieb ohne Wirkung. Somit kann sowohl die direkte Rezeptorblockade von GPVI auf der Thrombozytenoberfläche als auch die Blockade der GPVI-Bindungsstellen auf Kollagen erfolgreich eine Thrombozytenadhäsion reduzieren. Die Wirkung von GPVI-Fc bei Kollagen III war dabei stärker ausgeprägt als bei Kollagen I, die stimmt mit den Ergebnissen aus der Immunhistochemie überein.

Der GPVI-Rezeptor stellt den zentralen Vermittler der primären Aktivierung von Plättchen durch Kollagen dar. Erst durch seine Bindung an Kollagen werden Integrin-Rezeptoren wie $\alpha 2\beta 1$ -Integrin aktiviert und eine feste Plättchenbindung an Kollagen über diese Rezeptoren ermöglicht²⁸. In Zusammenschau der oben beschriebenen Versuchsergebnisse der Flusskammerversuche und der Immunhistochemie kann angenommen werden, dass vor allem Kollagen III für die Plättchenaktivierung nach Plaqueruptur verantwortlich ist. Entsprechend führt die Hemmung der Interaktion von Thrombozyten mit Kollagen III über GPVI zu einer dramatischen Inhibition der Plättchenadhäsion.

Darüber hinaus scheinen jedoch weitere Signalwege zu existieren, die unabhängig von GPVI eine feste Adhäsion von Thrombozyten an Kollagenoberflächen vermitteln können. So adhären Thrombozyten trotz Blockade von GPVI an immobilisiertes Kollagen I, eine

Interaktion, die in unseren Untersuchungen insbesondere durch $\alpha 2\beta 1$ -Integrin vermittelt wird. Da hierbei eine GPVI-vermittelte Aktivierung von Thrombozyten durch den eingesetzten Antikörper verhindert wird, müssen die entsprechenden Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche (wie z.B. $\alpha 2\beta 1$ -Integrin) über andere Mechanismen als GPVI aktiviert und damit in einen hoch affinen Bindungszustand gebracht werden. Schulte et al. hatten bereits 2001 beobachtet, dass Signalwege existieren, die zwar an die Fc-Gammakette gekoppelt sind, jedoch auch unabhängig von GPVI aktiviert werden können³⁵. Dadurch könnte das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin in einen entsprechend affinen Zustand versetzt werden und die Bindung des Thrombozyten an Kollagen I vermitteln. In Anwesenheit einer funktionierenden Signalkaskade über GPVI scheint $\alpha 2\beta 1$ -Integrin jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Darüber hinaus kann auch die Struktur des für die Beschichtung verwendeten Kollagens eine Rolle für die Bindungsfähigkeit der verschiedenen Rezeptoren haben. Savage et al. wiesen nach, dass strukturelle Unterschiede im Kollagenaufbau die Bindungsfähigkeit von $\alpha 2\beta 1$ beeinflussen können³³. $\alpha 2\beta 1$ -Integrin ist demnach für die Thrombozytenanheftung an *lösliches* Kollagen I unverzichtbar, spielt aber bei Adhäsion an *fibrilläres* Kollagen I keine entscheidende Rolle. Da bei den vorliegenden Versuchsergebnissen eine nahezu vollständige Blockade der Thrombozytenadhäsion an Kollagen I durch IB4 (anti- $\alpha 2\beta 1$ -Antikörper) beobachtet werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass das verwendete Kollagen I-Präparat hohe Anteile an löslichen Kollagenstrukturen enthält. Der GPVI-Rezeptor hingegen ist vor allem für die Interaktion mit *fibrillärem* Kollagen zuständig. Dies könnte die abgeschwächte Wirkung der anti-GPVI-Antikörper bei der Thrombozytenadhäsion an Kollagen I in diesen Versuchen erklären.

Um die Thrombozyteninteraktion mit Plaquematerial unter physiologischen Flussbedingungen zu untersuchen, wurde intraoperativ gewonnenes Plaquematerial homogenisiert und auf Deckgläser aufgetragen. In Anlehnung an die Flusskammerversuche mit Kollagenoberflächen wurden sowohl der GPVI-Rezeptor direkt als auch seine Bindungsstellen an der Plaque geblockt. Auch hier führte die Hemmung der GPVI-vermittelten Interaktion zu einer signifikant stärkeren Reduktion der Anheftung von Thrombozyten an Plaquematerial als eine Blockade mit anti- $\alpha 2\beta 1$ -Antikörpern. Die zentrale Rolle von GPVI bei der Plättchenadhäsion an humane Plaque konnte bestätigt werden. Da das verwendete Plaquematerial hauptsächlich aus dem Kernbereich der Plaque entnommen

worden war, welcher überwiegend Kollagen III enthält, untermauern diese Daten die vorangehenden Ergebnisse aus dem Flusskammeruntersuchungen mit Kollagenoberflächen.

Auffällig war allerdings, dass 5C4 die Adhäsion von Thrombozyten an Plaquematerial nicht vollständig unterdrücken konnte. Andere Arbeiten (Weidtmann et al. ³⁹) haben bereits gezeigt, dass neben Kollagen auch noch andere Bestandteile in der Plaque enthalten sind, die Plättchen durch Bindung aktivieren können. Dazu gehören z.B. Thrombospondin, Fibrin, Fibrinogen, Vitronektin, oxidiertes LDL, Cholesterolsulfat und der von-Willebrand-Faktor. Dennoch untermauern die Versuchsergebnisse die zentrale Stellung der Kollagen-GPVI-Bindung für die Thrombozytenaktivierung und Thrombusentstehung im Rahmen der Ruptur einer atherosklerotischen Plaque, da durch Hemmung dieses Rezeptors die ausgeprägteste Reduktion der Plättchenanheftung erzielt werden konnte.

Durch Inkubation des Plaquematerials mit anti-Kollagen-I- und -III-Antikörpern konnte die Thrombozytenadhäsion hochsignifikant verringert werden. Unterschiede zwischen den beiden Antikörpern waren zwar vorhanden, aber nicht signifikant. Die Annahme einer vorwiegend durch Kollagen III-haltige Bestandteile der Plaque vermittelten Plättchenaktivierung konnte somit in dieser Versuchsreihe nicht bestärkt werden. Beide Kollagenunterarten erschienen hier gleichermaßen für eine Thrombozytenaktivierung wichtig zu sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass GPVI-Rezeptoren nicht nur für die Plättchenanheftung an die verletzte Gefäßwand und subendotheliale Matrix von entscheidender Bedeutung sind (Massberg et al. ²²), sondern auch bei der Thrombusentstehung nach Ruptur einer atherosklerotischen Plaque eine zentrale Rolle spielen. Plättchen binden über den GPVI-Rezeptor an Kollagenstrukturen der Plaque, werden aktiviert und können so verstärkt adhären, aggregieren und einen gefäßverschließenden Thrombus bilden, **unabhängig von einer vorherigen Aktivierung der plasmatischen Blutgerinnung**. Eine Hemmung des GPVI-Rezeptors scheint daher eine vielversprechende Möglichkeit zu sein, die Thrombusentstehung nach Plaqueruptur zu verhindern oder zumindest zu reduzieren. Dabei weisen die Ergebnisse unserer Untersuchungen auf eine besondere Bedeutung der Interaktion von GPVI mit Strukturen von Kollagen Typ III hin. Jedoch scheinen beide Kollagenarten (I und III) eine Plättchenaktivierung und Adhäsion vermitteln zu können. Neben dem Aufbau der atheromatösen Plaque (Kollagenverteilung und Gehalt der Kollagenarten) spielt möglicherweise auch der Aufbau der Kollagenmatrix selbst

(Anteil und Verteilung fibrillärer Strukturen) eine Rolle. Vor dem Hintergrund klinischer Studien (Schömig et al. ³⁴) weist die vorliegende Arbeit auf die wesentliche Bedeutung einer primär direkten Plättchenaktivierung durch die Interaktion mit atheromatöser Plaque hin. Die durch die Gerinnungskaskade und insbesondere die Freisetzung von "tissue factor" bedingte Thrombozyten-Aktivierung führt dann sekundär zu einer weiteren Verstärkung und Beschleunigung der Thrombusformation in vivo. Dieses Konzept wird bereits durch eine forcierte antithrombozytäre Therapie mit Acetylsalizylsäure und dem Thienopyridin Clopidogrel in der aktuellen klinischen Therapie von Patienten mit akutem Koronarsyndrom berücksichtigt. Die selektive Blockade einer Interaktion des thrombozytären GPVI-Rezeptors mit kollagenhaltigen Strukturen der Gefäßwand bzw. der atherosklerotischen Plaque stellt ein neues, attraktives Ziel einer Pharmakotherapie dar.

Interessanterweise haben frühere Arbeiten mit Mäusen gezeigt, dass ein Fehlen des GPVI-Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche durchaus mit dem Leben vereinbar ist und zu keiner signifikanten Verlängerung der Blutungszeit führt (Lockyer et al.¹⁸, Kato et al.¹⁵). Daher könnte man durch Blockade des GPVI-Rezeptors die pathophysiologisch bedeutsamen Interaktionen der Thrombozyten mit Plaquematerial unterbinden, ohne starke innere oder äußere Blutungen der Patienten zu riskieren. Massberg et al. etablierten 2003 im Rahmen von in vivo Versuchen mit Mäusen zum ersten Mal einen löslichen GPVI-Rezeptor als mögliche Therapieoption in der Behandlung der Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation nach Gefäßverletzung ²³. In Tierversuchen konnten sie durch Verabreichen von GPVI-Fc die Adhäsion und Aggregation von Plättchen an Endothelzelldefekte drastisch reduzieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte GPVI-Fc als möglicher Therapieansatz zur Behandlung der Atherothrombose identifiziert werden. GPVI-Fc konnte sowohl die Plättchenadhäsion an Kollagen als auch an *humanes* Plaquematerial deutlich reduzieren. Eine Übertragung der im Tierversuch vermuteten positiven Effekte einer anti-GPVI-Pharmakotherapie mittels eines Antikörpers scheint daher zulässig.

Anti-GPVI-Antikörper (z.B. 5C4-Fab) blockieren den Rezeptor nicht nur durch Bindung an die extrazelluläre Domäne, sondern sie führen auch zu einer Internalisierung der GPVI-Rezeptoren in die Thrombozyten. Damit verschwinden die Rezeptoren von der Plättchenoberfläche. Diese vollständige Unterbindung von GPVI-vermittelten Interaktionen führt im Gegensatz zur genetischen Defizienz zu einer signifikanten Verlängerung der Blutungszeit. Im Gegensatz zu den direkt gegen den GPVI-Rezeptor gerichteten Antikörpern, bei denen als Nebeneffekte Plättchenaktivierung, Immunthrombozytopenie und verlängerte

Blutungszeit beschrieben wurden (Schulte et al. ³⁵), hat GPVI-Fc eine lokal begrenzte Wirkung. Da es nur an exponiertes Kollagen bindet, scheint es daher für einen therapeutischen Einsatz besser geeignet zu sein.

Ausgehend von dem Ergebnis, dass Plaquematerial mit einem hohen Aggregationspotential signifikant mehr GPVI-Bindungsstellen aufweist als Material mit geringem Aggregationspotential, und dass GPVIFc spezifisch an stark thrombogene Strukturen der atheromatösen Plaque bindet (z.B. Kollagen III) lässt sich ein weiterer Anwendungsbereich von GPVI-Fc erschließen.

Aktuelle klinische Methoden zur Abschätzung des Ausmaßes einer Atherosklerose bei Patienten umfassen Angiographie, Ultraschall und Computertomographie. Mit diesen Methoden können Aussagen über die räumliche Ausdehnung, die Morphologie und den Stenosegrad des Plaqueareals getroffen werden. Eine Abschätzung der Neigung zur Plaqueruptur und der Thrombogenität ist allerdings ebenso wenig möglich wie ein Schluss vom Stenosegrad auf die Vulnerabilität der Plaque. Vielversprechend erscheint daher die Möglichkeit eines „biologischen“ Bildgebungsverfahrens, bei dem atheromatöse, vulnerable Plaques über Bindung von Tracer-markiertem, löslichem GPVI-FC spezifisch in vivo dargestellt werden können (Gawaz et al. ¹²). Durch Szintigraphie könnten diejenigen Plaqueareale visualisiert werden, die einen großen Anteil an thrombogenen Strukturen enthalten und bei denen durch starke Ausdehnung der zentralen Kernregion eine Ruptur wahrscheinlich ist. Dadurch wäre eine Abschätzung des Risikos einer Plaqueruptur möglich, wodurch vor allem Patienten mit multiplen Koronarplaques gezielt einer Intervention zugeführt werden könnten.

5 Zusammenfassung

Die Ruptur der atheromatösen Plaque führt rasch zu einer lokalen Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten im Bereich der Gefäßverletzung. Durch die einsetzende Thrombozytenaggregation formiert sich ein Thrombus, der zum akuten Gefäßverschluss führen kann. Dies ist ein zentraler Pathomechanismus in kardiovaskulären Erkrankungen wie dem akuten Myokardinfarkt und dem apoplektischen Insult. Bislang wurde die Aktivierung der Thrombozyten allerdings als ein rein sekundärer Prozess angesehen, der aus einer lokalen Aktivierung der Gerinnungskaskade resultiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Thrombozyten direkt und unabhängig von einer lokalen Koagulation an atheromatöse Plaque binden und durch diese aktiviert werden können. Insbesondere wurde die Bedeutung von Kollagenrezeptoren, vor allem von Glykoprotein (GP)VI, für die Interaktion von Thrombozyten mit humanem Plaquematerial und den in der Gefäßwand am stärksten repräsentierten Kollagensubtypen (Typ I und III) analysiert.

Das untersuchte Plaquematerial wurde von Patienten mit Stenosen der Arteria carotis im Rahmen einer operativ durchgeführten Thrombarterektomie gewonnen und die lipidreiche, atheromatöse Plaque präpariert. Mit Hilfe histochemischer Färbungen der humanen atheromatösen Plaque konnte erstmals gezeigt werden, dass die extrazelluläre Domäne des thrombozytären GPVI-Rezeptors an humanes Plaquematerial binden kann. Besonders auffällig war, dass die Bindungsstellen von GPVI nicht gleichmäßig im Plaquebereich verteilt waren, sondern fast ausschließlich im Kernbereich zu finden waren. Dies korrelierte sehr eng mit dem Vorkommen von nativem Kollagen III. Die fibröse Kappe, welche durch hohe Konzentrationen an Kollagen I gekennzeichnet ist, zeigte hingegen keine vermehrte GPVI-Bindung. Unter Anwendung eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA) konnten wir die direkte Interaktion von GPVI mit humanem Plaquematerial und Kollagen I/III bestätigen. Interessanterweise führt Plaquematerial über diesen Mechanismus zu einer

signifikanten Aggregation von Thrombozyten, dies war unabhängig von einer Hemmung der Koagulation

In weiteren Versuchen wurden isolierte Thrombozyten in einem Flusskammersystem über Kollagen und humanes Plaquematerial perfundiert. Hierbei konnten wir zeigen, dass Plättchen unter arteriellen Scherbedingungen direkt an Kollagen I und III sowie humanes Plaquematerial binden, auch wenn das plasmatische Gerinnungssystem durch gleichzeitige Antikoagulation gehemmt ist. Die lokale Adhäsion von Thrombozyten konnte durch Blockade der GPVI-vermittelten Interaktion, sei es durch Antikörperblockade des Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche oder durch Blockade der Bindungsstellen auf Kollagen I/III und der Plaqueoberfläche mit einem löslichen GPVI-Fc-Dimer, signifikant gehemmt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die im Rahmen einer Plaqueruptur einsetzende Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten ein primärer Prozess ist, der durch die direkte Interaktion von Thrombozyten und exponierter atheromatöser Plaque zustande kommt. Dieser Mechanismus ist auch wirksam wenn gleichzeitig die plasmatische Gerinnung durch Antikoagulation gehemmt ist. Der thrombozytäre Kollagenrezeptor GPVI stellt hierbei einen zentralen Vermittler der Thrombozyten-Plaque-Interaktion dar. Über ihn werden sowohl die Adhäsion als auch Aktivierung der Blutplättchen vermittelt. Eine selektive Blockade der GPVI-vermittelten Interaktion könnte somit eine viel versprechende Therapieoption in der Behandlung des akuten Myokardinfarktes und des apoplektischen Insults darstellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Auer J., Berent R., Eber B., Kirchgatterer A., Maurer E., Mayr H., Porodko M., Weber T. Koronare Atherosklerose und Plaqueinstabilität: pathophysiologische Konzepte und deren klinische Bedeutung; *Journal für Kardiologie* 2000; 10 : 394-401
2. Benson R.L., Present status of coronary artery disease; *Arch Pathol Lab Med* 1926; 2: 876–916
3. Bergmeier W., Bouvard D., Eble J.A., Mokhtari-Nejad R., Schulte V., Zirngibl H., Brakebusch C., Fassler R., Nieswandt B., Rhodocytin (aggrexin) activates platelets lacking $\alpha 2\beta 1$ integrin, glycoprotein VI, and the ligand-binding domain of glycoprotein Ib alpha; *J Biol Chem.* 2001 Jul 6;276(27):25121
4. Bikfalvi A.; *Vascular Biology and Pathology*, Springer, 2000
5. Chi L., Gibson G., Peng Y.-W., Bousley R., Brammer D., Rekhter M., Chen J., Leadley R., Characterization of a tissue factor/factor VIIa-dependent model of thrombosis in hypercholesterolemic rabbits; *J Thromb Haemos* 2004; 2;85
6. Cohn P.F., Sodums M.T., Lawson W.E., Vlay S.C., Brown E.J. Jr., Episodes of silent myocardial ischemia after apparently uncomplicated myocardial infarction; *J Am Coll Cardiol.* 1986 Oct;8(4):982-985
7. Constantinides P., Plaque fissuring in human coronary thrombosis; *J Atheroscler Res* 1966;6:1–6
8. Cronin L., Mehta S.-R., Zhao F., Pogue J., Budaj A., Hunt D., Yusuf S., Stroke in Relation to Cardiac Procedures in Patients With Non–ST-Elevation Acute Coronary Syndrome: A Study Involving >18 000 Patients; *Circulation*, Jul 2001; 104: 269-274

9. Davies M.J., Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995; *Circulation*. 1996 Oct 15;94(8):2013-2020
10. Fitzgerald D.J., Roy L., Catella F., Fitzgerald G.A., Platelet activation in unstable coronary disease; *N Engl J Med*. 1986 Oct 16;315(16):983-989
11. Gawaz Meinrad, "Das Blutplättchen", *Thieme-Verlag* 1999
12. Gawaz M., Konrad I., Hauser A.I., Sauer S., Li Z., Wester H.J., Bengel F.M., Schwaiger M., Schomig A., Massberg S., Haubner R., Non-invasive imaging of glycoprotein VI binding to injured arterial lesions; *Thromb Haemost*. 2005 May;93(5):910-913
13. Jackson S.P., Nesbitt W.S., Kulkarni S., Signaling events underlying thrombus formation; *J Thromb Haemost*. 2003 Jul;1(7):1602-1612
14. Jung S.M., Moroi M., Platelets interact with soluble and insoluble collagens through characteristically different reactions; *J Biol Chem*. 1998 Jun 12;273(24):14827-14837
15. Kato K., Kanaji T., Russell S., Kunicki T.J., Furihata K., Kanaji S., Marchese P., Reininger A., Ruggeri Z.M., Ware J., The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion; *Blood*. 2003 Sep 1;102(5):1701-1707
16. Kim R., Chakko S., Myerburg R.J., Kessler K.M., Links Clinical usefulness and cost of echocardiography in patients admitted to a coronary care unit; *Am J Cardiol*. 1997 Nov 15;80(10):1273-1276
17. Libby Peter, Molecular Bases of the Acute Coronary Syndromes; *Circulation* 1995 91: 2844-2850
18. Lockyer S., Okuyama K., Begum S., Le S., Sun B., Watanabe T., Matsumoto Y., Yoshitake M., Kambayashi J., Tandon N.N., GPVI-deficient mice lack collagen responses and are protected against experimentally induced pulmonary thromboembolism; *Thromb Res*. 2006;118(3):371-380

19. Loree H.M., Tobias B.J., Gibson L.J., Kamm R.D., Small D.M., Lee R.T., Mechanical properties of model atherosclerotic lesion lipid pools; *Arterioscler Thromb.* 1994 Feb;14(2):230-234
20. Lusis Aldons, Atherosclerosis; *Nature* 2000; 407; 233-241
21. Massberg S., Brand K., Gruner S., Page S., Muller E., Muller I., Bergmeier W., Richter T., Lorenz M., Konrad I., Nieswandt B., Gawaz M.; A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation; *J Exp Med.* 2002 Oct 7;196(7):887-896
22. Massberg S., Gawaz M., Gruner S., Schulte V., Konrad I., Zohlhofer D., Heinzmann U., Nieswandt B., A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo; *J Exp Med.* 2003 Jan 6;197(1):41-49
23. Massberg S., Konrad I., Bultmann A., Schulz C., Munch G., Peluso M., Lorenz M., Schneider S., Besta F., Muller I., Hu B., Langer H., Kremmer E., Rudelis M., Heinzmann U., Ungerer M., Gawaz M., Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo; *FASEB J.* 2004 Feb;18(2):397-399
24. Massberg S., Schulz C., Gawaz M., Role of Platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome; *Sem Vasc Medicine* 2003; 3;147-161
25. Myerburg R.J., Interian A. Jr., Mitrani R.M., Kessler K.M., Castellanos A., Frequency of sudden cardiac death and profiles of risk; *Am J Cardiol.* 1997 Sep 11;80(5B):10F-19F
26. Nieswandt B., Aktas B., Moers A., Sachs U.J., Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models; *J. Thromb Haemost.* 2005 Aug;3(8):1725-1736
27. Nieswandt B., Brakebusch C., Bergmeier W., Schulte V., Bouvard D., Mokhtari-Nejad R., Lindhout T., Heemskerk J., Zirngibl H. and Fässler R., Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen; *EMBO Jour.* 2001; 20; 2120-2130

28. Nieswandt B., Watson SP., Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003 Jul 15;102(2):449-461
29. Opsahl W.P., DeLuca D.J., Ehrhart L.A., Accelerated rates of collagen synthesis in atherosclerotic arteries quantified in vivo; *Arteriosclerosis*. 1987 Sep-Oct;7(5):470-476
30. Penz S., Reininger A.J., Brandl R., Goyal P., Rabie T., Bernlochner I., Rother E., Goetz C., Engelmann B., Smethurst P.A., Ouwehand W.H., Farndale R., Nieswandt B., Siess W. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI; *FASEB J*. 2005 Jun;19(8):898-909
31. Rekhter M.D., Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough; *Cardiovasc Res*. 1999 Feb;41(2):376-384
32. Richardson P.D., Davies M.J., Born G.V., Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques; *Lancet* 1989 Oct 21;2(8669):941-944
33. Savage B., Ginsberg M.H., Ruggeri Z.M., Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow; *Blood*. 1999 Oct 15;94(8):2704-2715
34. Schömig A., Neumann F.J., Kastrati A., Schühlen H., Blasini R., Hadamitzky M., Walter H., Zitzmann-Roth E.M., Richardt G., Alt E., Schmitt C., Ulm K., A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents; *N Engl J Med*. 1996 Apr 25;334(17):1084-1089
35. Schulte V., Snell D., Bergmeier W., Zirngibl H., Waston S.P., Nieswandt B., Evidence for two distinct epitopes within collagen for activation of murine platelets.; *J Biol Chem*, 2001 Jan 5;276(1):364-368
36. Slupsky J.R., Kalbas M., Willuweit A., Henn V., Kroczeck R.A., Müller Berghaus G.; Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40; *Thromb Haemost*. 1998 Dec;80(6):1008-1014

37. Van de Walle G.R., Vanhoorelbeke K., Majer Z., Illyes E., Baert J., Pareyn I., Deckmyn H., Two functional active conformations of the integrin $\alpha 2\beta 1$, depending on activation condition and cell type; *J Biol Chem.* 2005 Nov 4;280(44):36873-36882
38. van Zanten G.H., de Graaf S., Sloomweg P.J., Heijnen H.F., Connolly T.M., de Groot P.G., Sixma J.J.; Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries; *J Clin Invest.* 1994 Feb;93(2):615-632
39. Weidtmann A., Scheithe R., Hrboticky N., Pietsch A., Lorenz R., Siess W., Mildly oxidized LDL induces platelet aggregation through activation of phospholipase A2; *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Aug;15(8):1131-1138
40. Willerson J.T., Golino P., Eidt J., Campbell W.B., Buja L.M., Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions. Experimental evidence and potential clinical implications; *Circulation* 1989 Jul;80(1):198-205
41. Yusuf S., Reddy S., Ôunpuu S., Anand S., Burden of Cardiovascular Diseases; *Circulation.* 2001;104:2746

7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Plättchenadhäsion, -aktivierung und –aggregation
- Abbildung 2:** histologischer Schnitt durch eine atherosklerotische Plaque
(A) Kollagen I Färbung
(B) Schematische Darstellung
- Abbildung 3:** Plaquematerial mit gebundenen Thrombozyten
- Abbildung 4:** Zusammenspiel der Kollagenrezeptoren GPVI und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin
- Abbildung 5:** Durchflussskammer FCS1c der Firma Oligene
- Abbildung 6:** Durchflussskammer FCS2 der Firma Bioptechs
- Abbildung 7:** Arbeitsplatz mit FCS1c Flusskammer
- Abbildung 8:** Monophasische Aggregationskurve, Thrombozyten und Kollagen
- Abbildung 9:** Immunhistochemische Färbungen von Plaquearealen
- Abbildung 10:** Immunhistochemische Kontrollfärbungen mit
(A) GPVI-Fc
(B) Fc-Kontrolle
(C) Rabbit IgG
(D) Rabbit Anti Goat

- Abbildung 11:** GPVI-ELISA
Bindung von GPVI-Fc an Kollagen I/III, Plaque, Lipidreicher Kern und fibröse Kappe
- Abbildung 12:** Kollagen- und Plaque-induzierte Plättchenaggregation
- Abbildung 13:** Thrombozytenbindung an Kollagen I/III unter Flussbedingungen bei Blockade der Kollagenrezeptoren GPVI-Fc und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin;
Statistische Auswertung
- Abbildung 14:** Thrombozytenbindung an Kollagen I/III unter Flussbedingungen bei Blockade der Kollagenrezeptoren GPVI-Fc und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin;
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen
- Abbildung 15:** Thrombozytenbindung an Kollagen I/III unter Flussbedingungen bei Blockade der Bindungsstellen der Kollagenoberfläche durch GPVI-Fc;
Statistische Auswertung
- Abbildung 16:** Thrombozytenbindung an Kollagen I/III unter Flussbedingungen bei Blockade der Bindungsstellen der Kollagenoberfläche durch GPVI-Fc;
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen
- Abbildung 17:** Thrombozytenbindung an Plaquematerial unter Flussbedingungen bei Blockade der Kollagenrezeptoren GPVI-Fc und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin;
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen
- Abbildung 18:** Thrombozytenbindung an Plaquematerial unter Flussbedingungen bei Blockade der Kollagenrezeptoren GPVI-Fc und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin;
Statistische Auswertung
- Abbildung 19:** Thrombozytenbindung an Plaquematerial unter Flussbedingungen nach Inkubation der Oberfläche mit Anti-Kollagen I und III Antikörpern;
Statistische Auswertung

8 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Maßberg möchte ich mich sehr herzlich für die Unterstützung, Beratung und die Ermöglichung dieser Dissertation in den kardiologischen Forschungslabors der I. Medizinischen Klinik im Deutschen Herzzentrum München bedanken.

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt Herrn Dr. med. Christian Schulz für die stete, engagierte und freundliche Betreuung sowie die kompetente Unterstützung, die wesentlich zum erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation beigetragen haben.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Sandra Kerstan und Herrn Michael Lorenz für die kompetente Einführung in die Methoden sowie die freundliche und fachkundige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente bedanken. Frau Lena Orschiedt und Herrn Dr. med. Simon Schneider danke ich für die tatkräftige Hilfe bei den Vorbereitungen und Durchführung der Experimente.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Brandl, Klinikum München-Schwabing, möchte ich mich für die Bereitstellung des intraoperativ gewonnenen humanen Plaquematerials bedanken. Herrn Prof. Dr. med. Siess, Institut für Epidemiologie und Prophylaxe von Kreislauferkrankungen, LMU München, danke ich für die freundliche Kooperation bei der Durchführung der Aggregationsstudien.

Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt und gefördert von der Wilhelm-Vaillant Stiftung.

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Christof Herbert Wolfgang Hoffmann
Geburtsdatum: 08.07.1981
Geburtsort: Trostberg
Eltern: Irene Hoffmann, geb. Obermüllner
Dr. med. Wolfgang Hoffmann
Geschwister: Dr. med. Katrin Hoffmann
Dr. med. Eva Hoffmann
Familienstand: ledig
Nationalität: Deutsch

Schulbildung:

1987-1991 Heinrich-Braun-Grundschule Trostberg
1991-2000 Hertzthaimer-Gymnasium Trostberg
Juni 2000 Abitur

Zivildienst:

2000-2001 Rettungsdienst Bayrisches Rotes Kreuz, Kreisverband Traunstein

Hochschulausbildung:

2001-2003 Vorklinischer Studienabschnitt
Ludwig-Maximilian Universität München
März 2003 Ärztliche Vorprüfung
2003-2007 Klinischer Studienabschnitt
Technische Universität München, Klinikum rechts der Isar
Mai 2007 Staatsexamen

Famulaturen:

August 2003 Innere Medizin, Krankenhaus Agatharied
 Februar 2004 Orthopädie, Praxis Dr. Krebs/Dr. Wärtl, München
 August 2004 Anästhesie, Wexford General Hospital, Irland
 Februar 2005 Chirurgie, Städtisches Klinikum Rosenheim
 September 2005 Pädiatrie, Hospital General Universitario de Albacete, Spanien

Praktisches Jahr:

2006-2007	Anästhesie	Klinik für Anästhesie, Klinikum Rechts der Isar München Dept. of Anaesthesia, St. Josephs Health Center Toronto, Kanada
	Innere Medizin	Medizinische Klinik, Spitalzentrum Oberwallis, Brig, Schweiz
	Chirurgie	Chirurgische Klinik, Kantonsspital Frauenfeld Frauenfeld, Schweiz

Dissertationsthema:

Die Rolle der thrombozytären Kollagenrezeptoren Glycoprotein VI und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin für die Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation an atheromatöser Plaque.

Deutsches Herzzentrum München, Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. Maßberg,

I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München; Klinikum rechts der Isar, (Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig);