

Der Einfluss des bispezifischen GPVI-Fc-Aptamer Konstruktes  
auf die Adhäsion von murinen Progenitorzellen  
in einem Verletzungsmodell der Maus

Untersuchungen mit Hilfe der Intravitalmikroskopie

**Birte Melzer**

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere,  
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik,  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Andreas Moritz

und

aus der Medizinischen Klinik, Abteilung III, Kardiologie und Kreislaufkrankungen,  
Eberhard-Karls Universität Tübingen

Betreuer: PD Dr. Stephan Lindemann

**Der Einfluss des bispezifischen GPVI-Fc-Aptamer Konstruktes  
auf die Adhäsion von murinen Progenitorzellen in einem  
Verletzungsmodell der Maus**

**- Untersuchungen mit Hilfe der Intravitalmikroskopie -**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Birte Melzer**

Tierärztin aus Hamburg

Gießen, 2010

Mit der Genehmigung des Fachbereichs der Veterinärmedizin  
Justus- Liebig- Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Moritz

PD Dr. Stephan Lindemann

Tag der Disputation: 15.04.2010

Gewidmet meinen Eltern, meinem Bruder  
und meinem Mann



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>1</b>
--------------------------	----------

## EINLEITUNG

<b>1. Anatomischer Wandaufbau der Arterien</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Funktion des Endothels</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Hämatopoetische Stammzellen</b> .....	<b>7</b>
3.1 Embryonale endotheliale Progenitorzellen .....	7
3.2 Reendothelialisierung .....	8
<b>4. Thrombozyten</b> .....	<b>10</b>
<b>5. Physiologie der Hämostase</b> .....	<b>11</b>
5.1 Primäre Hämostase .....	11
<b>6. Thrombozytäre Membranglykoproteine</b> .....	<b>15</b>
6.1 Glykoprotein VI (GPVI) .....	15
6.2 Lösliches GPVI .....	16
<b>7. Atherosklerose</b> .....	<b>17</b>
7.1 Atherogenese .....	18
<b>8. Akutes Koronarsyndrom und Myokardinfarkt</b> .....	<b>19</b>
<b>9. Therapie von atherosklerotischen Gefäßstenosen</b> .....	<b>20</b>
<b>10. Stammzelltherapie</b> .....	<b>21</b>
<b>11. Ziel der Arbeit</b> .....	<b>23</b>

## MATERIAL UND METHODEN

<b>1. Zellkultivierung der T17b- und MHE-Zellen</b> .....	<b>24</b>
<b>2. Fusion von GPVI-Fc mit dem Aptamer</b> .....	<b>25</b>
2.1 Generierung von GPVI-Fc .....	25
2.2 Herstellung des Aptamers durch das SELEX-Verfahren (= Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung) .....	25
2.2.1 Selektion und Separation .....	26
2.2.2 Durchflusszytometrische Analysen .....	27
2.2.3 Amplifikation .....	27
2.3 Generierung eines bispezifischen GPVI-Fc-Aptamer Konstruktes .....	28
2.3.1 Nonsense- bzw. BSA-Aptamer .....	29

<b>3. Flusskammer</b> .....	<b>30</b>
3.1 Vorbereitung der Coverslips .....	30
3.2 Versuchsaufbau der Flusskammer .....	31
3.3 Experimentelle Durchführung .....	32
<b>4. Intravitalmikroskopie am Carotismodell</b> .....	<b>33</b>
4.1 Versuchstiere .....	33
4.2 Fluoreszenzfärbung .....	33
4.2.1 DCF-Farbstoff .....	33
4.2.2 DCF-Färbung der Zellen .....	34
4.3 Das Carotismodell .....	35
4.3.1 Narkose .....	35
4.3.2 Vorbereitung der Mäuse .....	35
4.3.2.1 Legen des Venenkatheters .....	35
4.3.2.2 Präparation der A. carotis .....	36
4.3.3 Arbeitsplatz der Intravitalmikroskopie .....	37
4.3.4 Experimentelle Durchführung .....	38
4.3.4.1 Versuchsgruppen .....	38
4.3.4.2 Intravitalmikroskopische Aufnahmen .....	39
4.3.4.3 Auswertung der Aufnahmen .....	39
<b>5. Statistische Auswertung</b> .....	<b>40</b>

## **ERGEBNISSE**

<b>I. Flusskammerversuche</b> .....	<b>41</b>
<b>1. Die Bindungsaffinität von T17b-Zellen über einen Zeitraum von 10 Minuten</b> .....	<b>41</b>
<b>2. Die Adhäsion von T17b-Zellen an unterschiedlichen Beschichtungen (an GPVI-Fc-Aptamer und seinen Einzelkomponenten)</b> .....	<b>43</b>
<b>3. Das Bindungsverhalten der T17b-Zellen in Abhängigkeit von der GPVI-Fc-Aptamer-Konzentration</b> .....	<b>45</b>

<b>II. Untersuchungen im Carotismodell mit Hilfe der Intravitalmikroskopie .....</b>	<b>46</b>
<b>1. MHEC und T17b-Zellen im Vergleich .....</b>	<b>46</b>
1.1 Transient adhärenente Zellen .....	47
1.2 Rollende Zellen .....	47
1.3 Adhärenente Zellen .....	48
<b>2. T17b-Zellen inkubiert mit GPVI-Fc-Aptamer bzw. Nonsense-Aptamer im Vergleich ..</b>	<b>50</b>
2.1 Transient adhärenente T17b-Zellen .....	50
2.2 Rollende Zellen .....	51
2.3 Adhärenente T17b-Zellen .....	51
<b>DISKUSSION</b>	
<b>1. Diskussion der Versuchsdurchführung .....</b>	<b>54</b>
1.1 Verwendung von hämatopoetischen Stammzellen .....	54
1.2 Einsatz des GPVI-Fc-Aptamers .....	58
1.3 Flusskammer .....	59
1.4 Carotismodell .....	59
<b>2. Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>60</b>
2.1 Flusskammer .....	60
2.1.1 Die Bindungsaffinität von T17b-Zellen über einen Zeitraum von 10 Minuten ...	60
2.1.2 Die Adhäsion von T17b-Zellen an unterschiedlichen Beschichtungen (an GPVI-Fc-Aptamer und seinen Einzelkomponenten .....	60
2.1.3 Das Bindungsverhalten der T17b-Zellen in Abhängigkeit von der GPVI-Fc-Aptamer-Konzentration .....	61
2.2 Carotismodell .....	61
2.2.1 Vergleich MHE-Zellen mit murinen T17b-Progenitorzellen im Carotismodell ...	62
2.2.2 Vergleich T17b-Progenitorzellen vorinkubiert mit GPVI-Fc-Aptamer bzw. Nonsense-Aptamer .....	63
<b>3. Schlussfolgerung und Ausblick .....</b>	<b>65</b>

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>66</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>68</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>69</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>81</b>
<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>83</b>

## Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
cGMP	cyclisches Guaninmonophosphat
DCF	5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate
DNA	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
eEPCs	Embryonale endotheliale Progenitorzellen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GP	Glykoprotein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethanolsulfonsäure
HSCs	hematopoetic stem cells = hämatopoetischen Stammzellen
ICAM-1	<b>I</b> ntercellular <b>a</b> dhesion <b>m</b> olecule-1
KGW	Körpergewicht
LDL	Low-density lipoproteins
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MHECs	Murine Herzendothelzellen
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
NO = EDRF	Stickstoffmonoxid = <b>E</b> ndothelium <b>d</b> erived <b>r</b> elaxing <b>f</b> actor
n.s.	nicht signifikant
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PF4	Plättchenfaktor 4
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PSGL-1 Integrin	P-selectin glycoprotein ligand-1
RANTES	<b>r</b> egulated-on-activation, <b>n</b> ormal <b>T</b> -cell-expressed and <b>s</b> ecreted chemokine
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
SDF-1/ CXCR4-Rezeptor	Stromal cell-derived factor 1 receptor/ <b>C</b> X <b>C</b> -Motiv- Chemokinrezeptor 4

SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
SEM	standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwertes
TNF- $\alpha$	<b>T</b> umor <b>n</b> ecrosis factor- $\alpha$
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
VCAM	<b>V</b> ascular <b>c</b> ell <b>a</b> dhesion <b>m</b> olecule
VEGF	<b>v</b> ascular <b>e</b> ndothelial <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
VLA-4 Integrin	Very Late Antigen-4 = Integrin alpha4beta1
vWF	von Willebrand Faktor

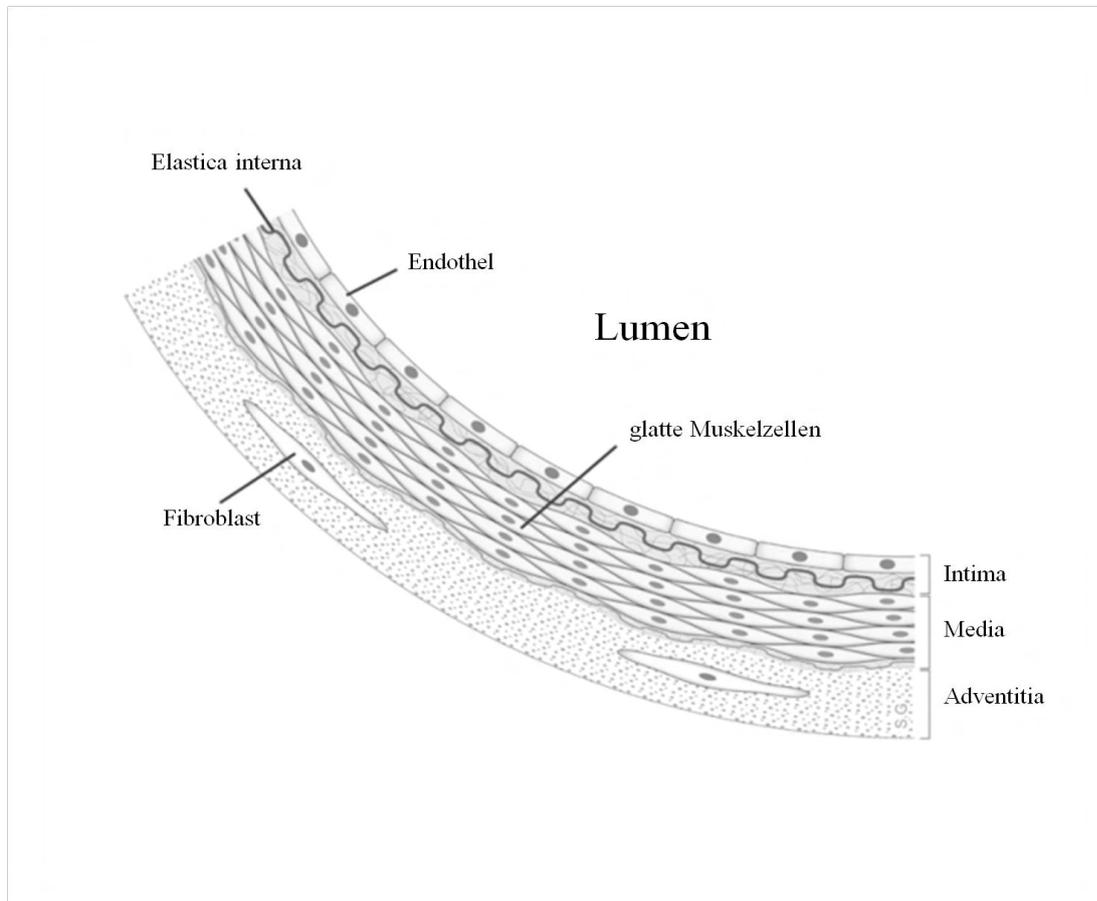
# **EINLEITUNG**

Trotz Primär- und Sekundärprävention verursachen schwerwiegende kardiovaskuläre Erkrankungen wie die instabile Angina oder der Myokardinfarkt ein Drittel aller Todesfälle weltweit (Keeley et al. 2003). Kardiovaskuläre Erkrankungen werden durch Störungen des Herzens sowie der Blutgefäße verursacht und schließen Bluthochdruck, koronare Herzkrankheit, Schlaganfall, Herzversagen und kongenitale Herzdefekte mit ein (Rosamond et al. 2008). Die Hauptursache für kardiovaskuläre Erkrankungen ist die Atherosklerose, die als eine chronische entzündliche Erkrankung angesehen wird. Im Verlauf der Atherosklerose bilden sich in der Endothelschicht der großen und mittelgroßen Arterien Plaques, welche aus Lipiden, entzündlichen Zellen, Bindegewebe, glatten Muskelzellen, Thromben sowie Kalzium bestehen. Dies führt schließlich zur neointimalen Hyperplasie, die nach und nach den intraluminalen Raum verengt. Plaques können rupturieren, dadurch eine verhängnisvolle Verlegung eines Gefäßes im Körper bewirken, welche z.B. einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall nach sich ziehen kann. Zusätzlich kann es durch endotheliale Erosion zur Thrombusformation an der Stelle der Plaque kommen. Therapiemöglichkeiten sind unter anderem Ballondilatation oder Stentimplantation. Hierbei kommt es zu Gefäßwandverletzungen, die durch den Einsatz endothelialer Progenitorzellen eine verbesserte Heilung erfahren könnten, wodurch eine Restenose vermieden werden könnte (Avci-Adali et al. 2008).

## **1. Anatomischer Wandaufbau der Arterien**

Die arteriellen Gefäßwände sind aus drei Schichten aufgebaut. An der blutführenden Seite liegt die Tunica intima (Intima), die sich in ein einschichtiges Endothel, das bindegewebige Stratum subendotheliale und die Membrana elastica interna unterteilen lässt. Anschließend folgt die Tunica media (Media), die aus mehreren, ringförmig und schräg gewundenen Muskelschichten aufgebaut ist. Außerdem enthält sie elastische Fasern sowie solche aus Kollagen. Zwischen Media und der angrenzenden Tunica adventitia (Adventitia) befindet sich bei einigen Arterien die Membrana elastica externa. Die Adventitia ist vor allem aus Bindegewebe vom Kollagen Typ I zusammengesetzt. Über ihre Vasa vasorum und die Nerven versorgt bzw. steuert die Adventitia das gesamte Blutgefäß (Abb. 1).

Die Funktion der Intima besteht darin, den Stoff-, Flüssigkeits- und Gasaustausch durch die Gefäßwand zu regulieren. Die Media reguliert die Blutbewegung, und mit der Adventitia sind die Gefäße mit dem umliegenden Gewebe verbunden (Leonhardt, 1990).



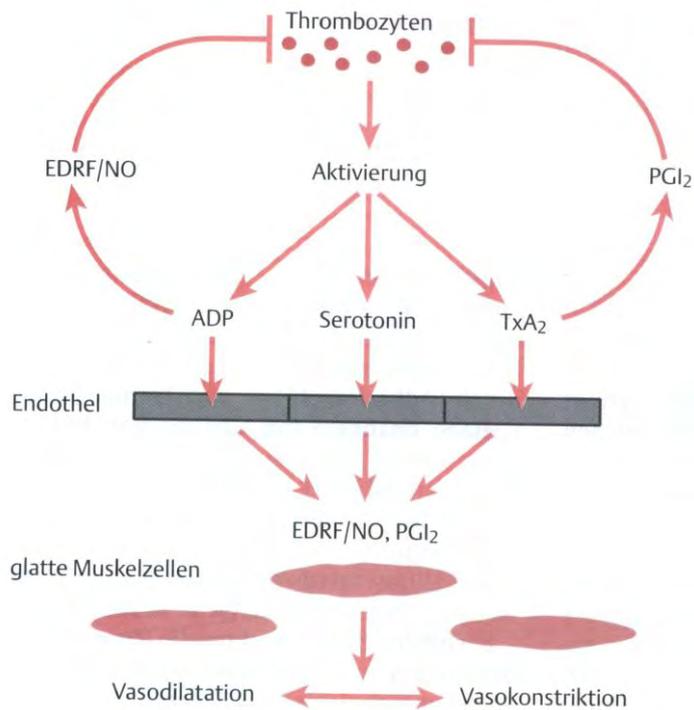
**Abb. 1:** Gefäßwandaufbau der Arterien (modifiziert nach <http://de.wikipedia.org/wiki/Arterie>, 18.04.09).

## 2. Funktion des Endothels

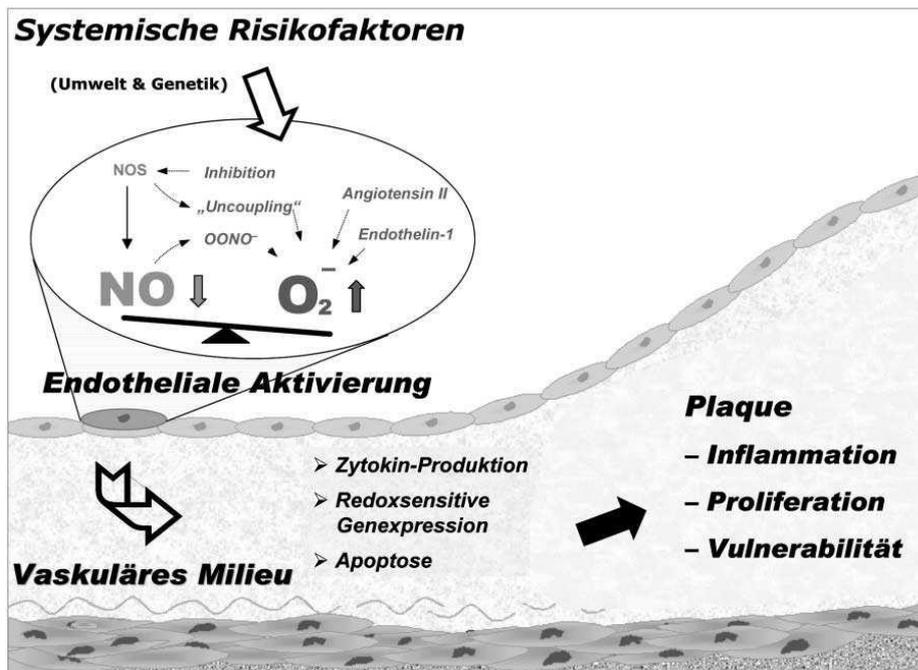
Die Blutgefäße werden von einer einlagigen Endothelzellschicht ausgekleidet. Das Endothel stellt eine semipermeable Barriere zwischen dem Blut und dem Interstitium dar. Es erleichtert somit den Austausch von Wasser und kleinen Molekülen. Darüber hinaus besitzt das Endothel eine Reihe lebenswichtiger hämostatischer Funktionen (Petty et al. 1989). Diese umfassen die Steuerung der Interaktion der Thrombozyten und Leukozyten mit der Gefäßwand und die Regulation des Gefäßtonus (Moncada et al. 1991, Yanagisawa et al. 1988).

Das Endothel reagiert auf physikalische und chemische Reize mit der Synthese oder Freisetzung von vasoaktiven und thromboregulatorischen Molekülen und Wachstumsfaktoren (Abb. 2). Diese Substanzen sind u.a. das Prostazyklin ( $\text{PGI}_2$ ), Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}$  = *Endothelium derived relaxing factor* [EDRF]), die Endotheline, die *Endothelial cell growth factors*, die Interleukine, die Plasminogeninhibitoren und der von Willebrand Faktor (Celermajer et al. 1997).  $\text{PGI}_2$  und  $\text{NO}$  sind Vasodilatoren, die den Gefäßtonus durch Relaxation der unter dem Endothel liegenden glatten Muskelzellschicht senken (Moncada et al. 1977, Moncada 1982, Furchgott et al. 1980, Vanhoutte 1989). Demgegenüber steht die vasokonstriktorische Wirkungsweise der Substanzen Thromboxan  $\text{A}_2$ , Serotonin, ADP und ATP, die von aktivierten Thrombozyten freigesetzt werden (Jaffe 1987, Ryan et al. 1984, Gawaz 2001). Diese Substanzen rufen eine erhöhte Synthese von cGMP in den Endothelzellen hervor, woraus eine Steigerung der  $\text{NO}$ /EDRF-Produktion resultiert. Es kommt im Falle des  $\text{NO}$  durch einen Feedback-Mechanismus zur Eindämmung einer überschießenden Thrombozytenaktivierung und zur Vasodilatation, da  $\text{NO}$  wie auch  $\text{PGI}_2$  Inhibitoren der Thrombozytenaktivität sind (Gawaz 2001).

Darüber hinaus führen kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie z.B. die Hypercholesterinämie, zur Reduktion der  $\text{NO}$ -Synthese und durch die Bildung von Sauerstoffradikalen zur Inaktivierung von bereits gebildetem  $\text{NO}$  (Abb. 3). Durch dieses Redoxungleichgewicht (niedriges  $\text{NO}$ , erhöhte Sauerstoffradikale) wird unter anderem die endothelabhängige Gefäßdilatation eingeschränkt. Eine weitere Konsequenz dieser endothelialen Aktivierung ist die Bildung von Zytokinen wie Interleukin- $1\beta$ , *Tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), MCP-1 oder Interferon- $\gamma$ , um Monozyten anzulocken. Die *Vascular cell adhesion molecules* (VCAM) oder *Intercellular adhesion molecules-1* (ICAM-1) unterstützen die Migration von Monozyten in die Gefäßwand, wo diese sich in Makrophagen umwandeln. Folglich hat die endotheliale Aktivierung charakteristische Eigenschaften eines entzündlichen Prozesses und ist Ausgangspunkt für die weitere Progression der Atherosklerose (Schächinger and Zeiher 2001).



**Abb. 2:** Thrombozytenabhängige Regulation des Gefäßwandtonus (nach Müller-Eckardt, Transfusionsmedizin, Springer Verlag Heidelberg 1996).



**Abb. 3:** Die endotheliale Aktivierung moduliert das vaskuläre Milieu (nach Britten, Schächinger, Zeiher; „Endotheliale Dysfunktion der Koronargefäße“; J Kardiol 2003; 10: 325-7).

### **3. Hämatopoetische Stammzellen**

Während der embryonalen Entwicklung wandern die hämatopoetischen Stammzellen (hematopoetic stem cells = HSC) von der fötalen Leber über die Milz zum Knochenmark, wo im adulten Organismus die Hämatopoese stattfindet. Diese beinhaltet die Selbsterneuerung, Proliferation oder Differenzierung der HSCs (Chan et al. 2001).

Die „long term-HSCs“ sind ein Leben lang reproduzierbar, wohin gegen die „short term-HSCs“ nur für einen begrenzten Zeitraum erneuerbar sind. Letztere differenzieren sich in multipotente Progenitorzellen, welche bis zur ausgereiften Zelle einen irreversiblen Entwicklungsprozess durchlaufen (Passegué et al. 2003). Sie bilden jeden Tag mehr als eine Milliarde Blutzellen und stellen somit das Blutssystem eines Lebens dar (Chan et al. 2001). Multipotente Progenitorzellen entwickeln sich entweder zu myeloischen oder lymphatischen Progenitorzellen. Im weiteren Verlauf gehen aus myeloischen Progenitorzellen zum einen myelomonozytäre Progenitorzellen, die sich zu Monozyten/Makrophagen und Granulozyten differenzieren und zum anderen megakaryozytäre/erythoide Progenitorzellen hervor, die sich wiederum zu Thrombozyten und Erythrozyten entwickeln. Aus lymphatischen Progenitorzellen leiten sich T-, B-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen ab. Myeloische wie auch lymphatische Progenitorzellen besitzen die Fähigkeit zur Bildung von dendritischen Zellen. Die aufgeführten Zellpopulationen werden durch Zelloberflächenmarker identifiziert (Passegué et al. 2003).

Stammzellen sind die Grundlage für alle Zellen des Körpers und daher für die Organ- und Gewebeentwicklung essentiell (Chan et al. 2001). Eine kleinere Population von hämatopoetischen Stammzellen hält sich periphär im zirkulierenden Blut auf, wohin gegen ihr Hauptanteil im Knochenmark lokalisiert ist (Dar et al. 2006).

#### **3.1 Embryonale endotheliale Progenitorzellen**

Das Mikromilieu des Knochenmarks beinhaltet mesenchymale, hämatopoetische und endotheliale Stammzellen (Fuchs and Segre 2000). Embryonale endotheliale Progenitorzellen (eEPCs) weisen eine Pflastersteinmorphologie auf und sind befähigt, röhrenartige Strukturen zu bilden (Hatzopoulos et al. 1998). Unter anderem verfügen sie über ein nahezu unbegrenztes Wachstum. Darüber hinaus exprimieren eEPCs endotheliale Oberflächenmarker, entwickeln sich zu maturaen Endothelzellen und sind während der Embryogenese zur Blutgefäßbildung befähigt (Vajkoczy et al. 2003).

Des Weiteren konnten Vasa et al. zeigen, dass Patienten mit einer reduzierten Anzahl an zirkulierenden EPCs ein erhöhtes Risiko für koronare arterielle Erkrankungen hatten. Die Reduktion der EPCs hat eine Verschlechterung der Angiogenese zur Folge und begünstigt somit ein Fortschreiten der Atherosklerose (Vasa et al. 2001, Rauscher et al. 2003).

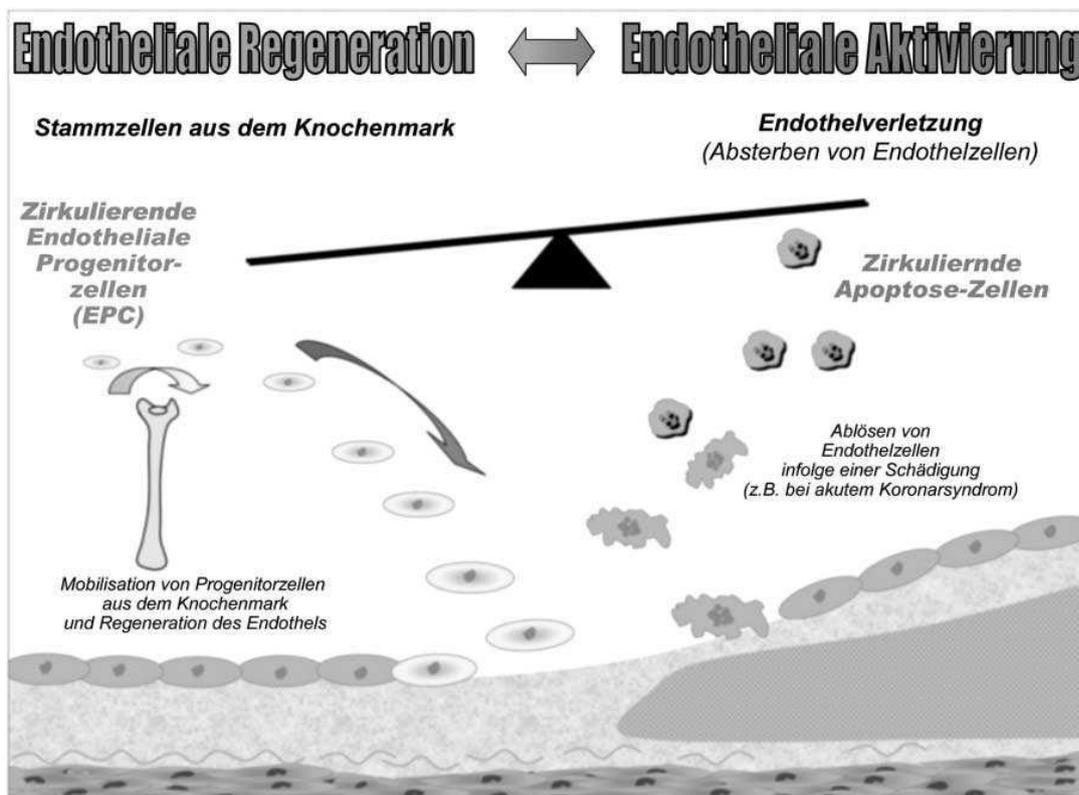
In der vorliegenden Arbeit wurden murine, embryonale endotheliale T17b-Progenitorzellen verwendet. T17b-Zellen zeigen einen stabilen morphologischen Phänotyp und zeichnen sich durch ein robustes Wachstum im Kulturmedium sowie eine problemlose Isolierung aus, welche die Erhaltung einer reinen Zelllinie ermöglicht. Darüber hinaus gelingt bei ihnen die Differenzierung zu ausgereiften Endothelzellen. Außerdem konnten Langer et al. zeigen, dass Thrombozyten für die Chemotaxis, Adhäsion und Differenzierung von T17b-Zellen verantwortlich gemacht werden können (Langer et al. 2006).

### **3.2 Reendothelialisierung**

Die strukturelle und funktionelle Intaktheit des Endothels wird durch die Balance zwischen endothelialer Verletzung und Reparatur bestimmt (Abb. 4). Dabei führt eine persistierende Exposition von kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hyperlipidämie, Hypertonie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus zu oxidativem Stress, erhöhtem Endothelzellumsatz und schließlich zum Endothelzelltod. Vaskuläre Progenitorzellen, die von verschiedenen Geweben stammen, besitzen die Fähigkeit, beschädigte Gefäße zu reparieren, da die lokale Mikroumgebung der Progenitorzellen eine entscheidende Rolle bei Zellhoming (Wanderung von Effektorzellen zu den Zielgeweben, in denen sie ihre Funktion aufnehmen) und -differenzierung spielt (Xu Q 2007). Studien haben gezeigt, dass die Atherosklerose ein pathophysiologischer Prozess ist, der durch den Endothelzelltod in speziellen Bereichen wie Bifurkationen ausgelöst wird und dem sich der Ersatz durch endotheliale Progenitorzellen anschließt (Xu Q 2006). Die Anzahl der Beweise dafür, dass zirkulierende endotheliale Progenitorzellen zur Reendothelialisierung beitragen, steigt (Asahara et al. 1997, Asahara et al. 1999, Urbich und Dimmeler 2004).

Massberg et al. konnten zeigen, dass Thrombozyten in der Lage sind, P-Selektin-Glykoprotein IIb Integrin vermittelt Progenitorzellen zu den arteriellen Thromben *in vivo* zu rekrutieren. Außerdem fördert SDF-1, welches von aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird, die Migration und die Akkumulation von murinen embryonalen endothelialen Progenitorzellen im plättchen-reichen Thrombus *in vivo* (Massberg et al. 2006). Des Weiteren

reguliert das Chemokin SDF-1 die Rekrutierung, die Proliferation und die Differenzierung von Progenitorzellen; ein Mechanismus, der wahrscheinlich zur Gefäßreparatur und Regeneration von ischämischem Myokard beiträgt (Massberg et al. 2006, Stellos et al. 2007, Stellos et al. 2008). Zudem wird bei der Inhibition der SDF-1/CXCR4-Achse die Rekrutierung von Progenitorzellen an Gefäßverletzungen *in vivo* verhindert (Stellos et al. 2008, Zerneck et al. 2005). Beispielsweise bindet das thrombozytäre SDF-1 an seinen Rezeptor CXCR4 und induziert dadurch die Differenzierung von CD34<sup>+</sup>-Progenitorzellen in reife Endothelzellen *in vitro* (Stellos et al. 2007, Stellos et al. 2008).

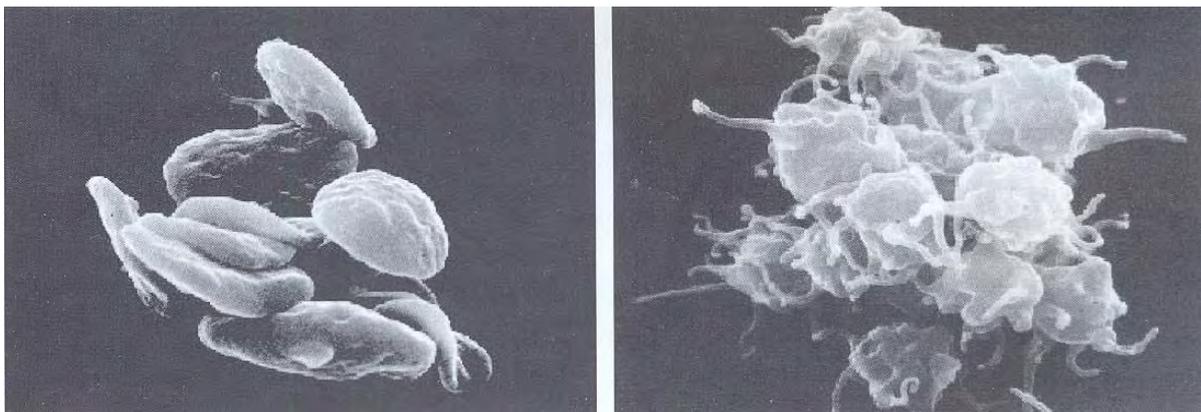


**Abb. 4:** Endotheliale Progenitorzellen regenerieren vaskuläre Endothelschäden (nach Britten, Schächinger, Zeiher; „Endotheliale Dysfunktion der Koronargefäße“; J Kardiol 2003; 10: 325-7).

#### 4. Thrombozyten

Thrombozyten sind die kleinsten Blutzellen und stellen anukleäre Zellen dar. Ihre Produktion findet im Knochenmark durch Abschnürung aus Megakaryozyten statt (George 2000, Italiano et al. 2007, Junt et al. 2007). Nachdem sie durchschnittlich 10 Tage im Blut zirkulieren, werden sie durch Makrophagen in der Milz und der Leber abgebaut (Varga-Szabo et al. 2008). Fast eine Trillion Thrombozyten befinden sich im Blut eines Menschen. Sie reagieren auf Blutgefäßverletzungen, indem sie sich verformen („shape change“), granulären Inhalt freisetzen und aggregieren (George 1990). Somit spielen die Thrombozyten eine entscheidende Rolle bei der Hämostase (Ackroyd 1955).

Ruhende Thrombozyten haben eine durchschnittliche Oberfläche von  $8 \mu\text{m}^2$  und weisen eine diskoide Form auf (Abb. 5). Demgegenüber erfahren aktivierte Thrombozyten eine Formänderung („shape change“), indem sie Pseudopodien ausbilden. In diesem Zustand beträgt ihre Oberfläche bis zu  $13 \mu\text{m}^2$  (White 1994). Die Formänderung wird durch die Überschreitung der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytoplasma hervorgerufen. Ihre dynamische Grundlage bildet das Aktinomyosin als kontraktilem Apparat, wie es auch in glatten Muskelzellen vorkommt (Hartwig et al. 1999).



**Abb. 5:** Ruhende (links) und aktivierte (rechts) Thrombozyten (Elektronenmikroskopische Aufnahmen nach (Gawaz 2001)).

## **5. Physiologie der Hämostase**

Unter Hämostase versteht man den Prozess der Beendigung einer Blutung. Sie lässt sich in die primäre Hämostase, die sekundäre Hämostase und die Fibrinolyse unterteilen. Der Hauptauslöser für die Formation eines blutstillenden Thrombus nach einer traumatischen Gefäßverletzung oder einer pathologischen Veränderung, wie z.B. bei der Atherosklerose, ist der Verlust der Endothelzellbarriere zwischen der extrazellulären Matrix und dem zirkulierenden Blut. Unter diesen Bedingungen werden Bestandteile der subendothelialen extrazellulären Matrix wie Kollagen, Fibronektin und von Willebrandt-Faktor freigelegt. Die resultierende Antwort der Thrombozyten schließt die Phasen der Adhäsion, Aktivierung und Aggregation ein (Ruggeri 2002, Varga-Szabo et al. 2008). Diese drei Phasen werden als das Stadium der primären Hämostase bezeichnet, in welcher ein instabiler, plättchenreicher Thrombus (weißer Thrombus) vorübergehend weiteres Bluten verhindert. In der folgenden sekundären Hämostase wird dieser durch einen stabilen, fibrinreichen Thrombus (roter Thrombus) ersetzt. Er entsteht durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade, wobei durch die proteolytische Spaltung von Prothrombin Thrombin gebildet wird und es im weiteren Verlauf durch Degradation von Fibrinogen zur Bildung von Fibrin kommt. Durch die anschließende Fibrinolyse wird ein Teil des hämostatischen Thrombus wieder abgebaut und somit der erste Schritt des Heilungsprozesses ausgeführt.

Unter physiologischen Bedingungen befinden sich pro- und antithrombotische Mechanismen im Gleichgewicht und verhindern folglich das unkontrollierte Wachstum eines Thrombus. Wenn aber eine Verschiebung des Gleichgewichts vorliegt, kann dies entweder zur Thrombose oder zur Hämorrhagie führen (Müller-Eckardt 1996).

### **5.1 Primäre Hämostase**

Die primäre Hämostase wird auch als die Zeit bis zur Entstehung eines hämostatischen Thrombus bezeichnet und somit als Blutungszeit definiert (Heimpel et al. 1994). Bei Erwachsenen beträgt die Blutungszeit  $7 \pm 2$  Minuten (Riess and Riewald 1994).

Eine Gefäßverletzung oder die hervorgerufene Fissur oder Ruptur einer atherosklerotischen Plaque führt zur endothelialen Denudation und zur Freilegung der thrombogenen subendothelialen Matrix gegenüber den zirkulierenden Thrombozyten (Ruggeri 2002). Hierdurch wird der erste Schritt der primären Hämostase, die sog. primäre Adhäsion, ausgelöst (Abb. 6), bei der noch ruhende Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand

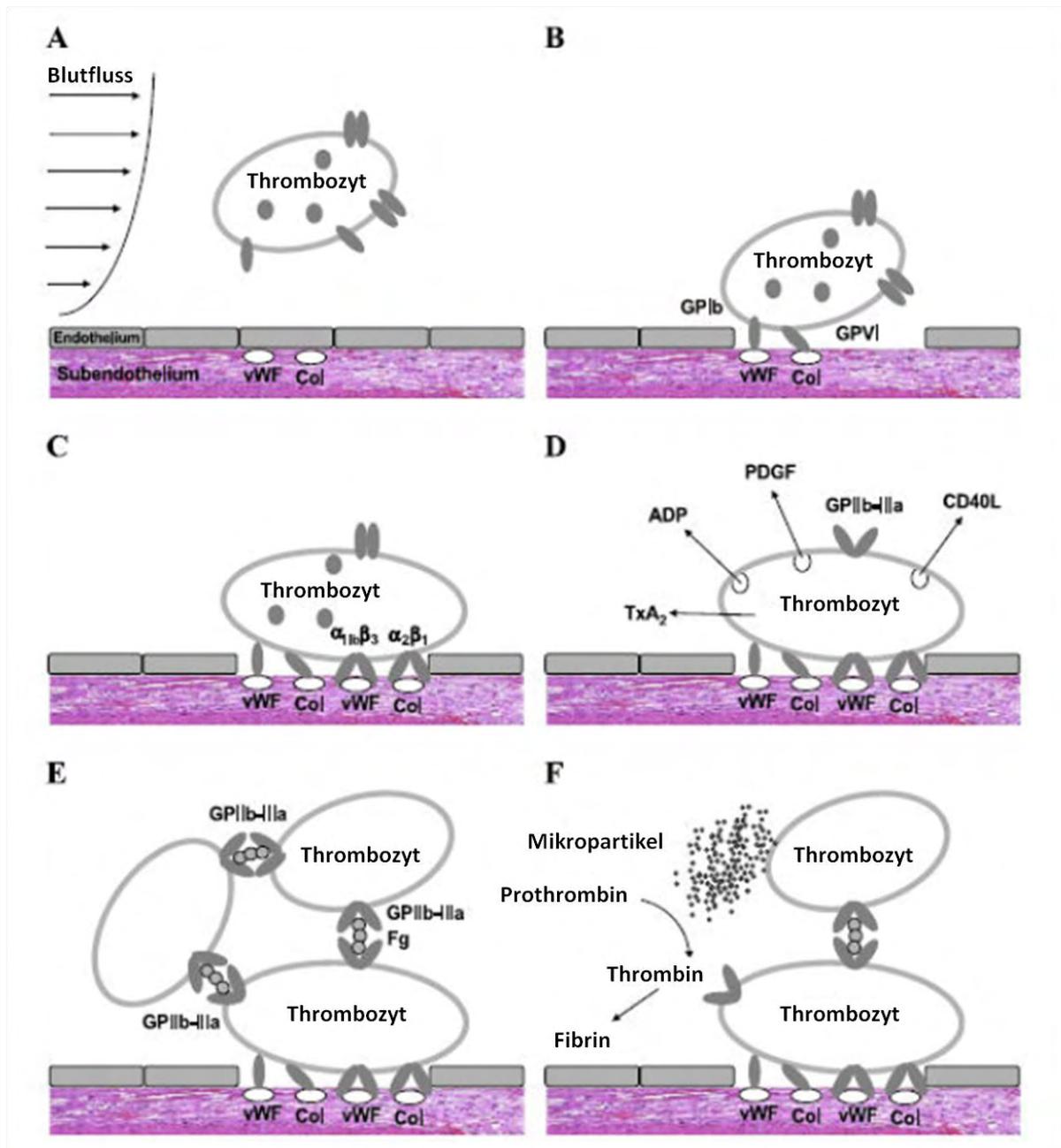
adhärieren (Andrews et al. 1997). Die Anlagerung der bereits aktivierten Thrombozyten an die Strukturen des Subendothels wird sekundäre Adhäsion genannt (Bithell 1993).

Unter den Bestandteilen der subendothelialen Matrix spielt fibrilläres Kollagen eine bedeutende Rolle für die Thrombozytenadhäsion und -aggregation (Ruggeri 2002). Mit zunehmendem Alter und bei Atherosklerose ändert sich die Zusammensetzung des Gefäßwandkollagens, indem die Menge an Kollagen vom Typ I zunimmt (DeGroot et al. 1990, Luscis 2000). Die erste Kontaktphase zwischen zirkulierenden Thrombozyten und der Gefäßwandverletzung („platelet tethering“) wird durch die Interaktion des thrombozytären Rezeptors Glykoprotein Ib-V-IX mit dem kollagenimmobilisiertem vWF vermittelt (Abb. 6B). Die Interaktion von vWF mit GP Ib-V-IX ist durch eine sehr hohe Affinität gekennzeichnet, die die Thrombozyten an der Gefäßwand besonders in den Regionen mit hohen Scherkräften reversibel adhären lässt (Ruggeri 2002). Die Bedeutung der Interaktion zwischen vWF und GP Ib-V-IX für die primäre Hämostase spiegelt sich in den Patienten mit einem kongenitalen Funktionsdefekt des vWF (von Willebrand-Krankheit) oder seines Rezeptors (Bernard-Soulier Syndrom) wieder, die unter einer erhöhten Blutungstendenz leiden (Nurden 1999). Abgesehen von GPIb-V-IX ist ein weiterer thrombozytärer Kollagenrezeptor, das Glykoprotein VI, für die Thrombozytenadhäsion und -aggregation auf freigelegtem Kollagen essentiell. Die zentrale Rolle des GPVI ließ sich durch GPVI-defiziente Mäuse bestätigen. Thrombozyten dieser Mäuse war es nicht möglich auf der verletzten Gefäßwand zu adhären und aggregieren, obwohl die Expression und Funktion von GPIb-V-IX unter den experimentellen Bedingungen nicht verändert wurden (Gawaz 2003). Anders als GPIb-V-IX bindet GPVI direkt an subendotheliales Kollagen und vermittelt die Aktivierung verschiedener Adhäsionsrezeptoren einschließlich Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und  $\alpha_2\beta_1$ , die für eine stabile, irreversible Thrombozytenadhäsion erforderlich sind (Massberg et al. 2003). Diese Bindung der Thrombozyten über Integrine an Kollagen führt insbesondere zur Aktivierung und zu morphologischen Änderungen der adhärenenden Thrombozyten. Während der Formänderung werden Pseudopodien ausgebildet, die zu einem effektiven Verschluss der Gefäßwandverletzung führen. Der Aktivierungsprozess der Thrombozyten wird durch  $TxA_2$  verstärkt (Abb. 6D).  $TxA_2$  wird von Thrombozyten aus Arachidonsäure (AA) gebildet, in den extrazellulären Raum abgegeben und bindet dort an einen spezifischen thrombozytären Rezeptor. Des Weiteren besitzt  $TxA$  eine vasokonstriktive Wirkung, wodurch der Blutfluss verlangsamt und die Thrombusbildung gefördert wird. Außerdem geben Thrombozyten während der Adhäsion granuläre Bestandteile, insbesondere ADP ab (Abb. 6D). Dadurch wird zum einen der Adhäsionsprozess verstärkt, zum anderen werden weitere

Thrombozyten stimuliert und somit rekrutiert (Gawaz 2003). Diese zirkulierenden Thrombozyten interagieren mit den bereits adhärennten Thrombozyten über die aktivierten GPIIb-IIIa-Rezeptoren ("Fibrinogenbrücken") und es kommt dadurch zur primären Aggregation (Abb. 6E) (Plow et al. 1999). Anschließend folgt die Sekundär aggregation, die mit der Freigabe granulärer Bestandteile der Thrombozyten einsetzt. Bei Patienten mit einem Defekt der Speichergranula wird die Sekundär aggregation verringert oder fehlt vollständig, wodurch eine erhöhte Blutungstendenz vorliegt. Drei Bedingungen sind für den Aggregationsprozess entscheidend: Scherkräfte, welche die Wahrscheinlichkeit des Kontaktes zwischen zwei Thrombozyten erhöhen,  $Ca^{2+}$  und Fibrinogen. Wenn einer dieser drei Komponenten nicht vorhanden ist, kann es nicht zur Thrombozytenaggregation kommen. Normalerweise enthält das Thrombozytenplasma genügend  $Ca^{2+}$  und Fibrinogen für die Aggregation. Bei Patienten mit Hypo- oder Afibrinogenemie ist die Fähigkeit für die Aggregation trotz der normalen Thrombozytenfunktion stark begrenzt oder fehlt (Nurden 1999).

Der Glykoprotein-IIb IIIa-Komplex spielt eine zentrale Rolle bei der Aggregation. Die Bindungsstellen für Fibrinogen in der Region des Glykoprotein-IIb IIIa-Komplexes werden nur nach Aktivierung der Thrombozyten zugänglich. Die Bindung von GPIIb IIIa ist stark  $Ca^{2+}$ -abhängig und tritt bei dessen Fehlen nicht auf (Abb. 6E). Die Bedeutung von GPIIb IIIa für die Aggregation wurde bei Patienten mit Thrombasthenie (Glanzmann-Naegeli-Krankheit) erkannt, die keinen oder nur einen nichtfunktionalen GPIIb IIIa-Rezeptor besitzen und daher eine erhöhte Blutungstendenz aufweisen. Die anfängliche Bindung des Fibrinogens an GPIIb IIIa ist ein reversibler Prozess, dem sich Sekunden bis Minuten später eine irreversible Stabilisierung der Fibrinogenbindung an den GPIIb IIIa-Komplex anschließt.

Des Weiteren geben aktivierte Thrombozyten von ihrer Membranoberfläche Mikropartikel ab, die durch eine hohe prokoagulatorische Aktivität gekennzeichnet sind. Die Mikropartikel katalysieren die Anordnung des Thrombins um ein Thrombozytenmikroaggregat, wodurch es zur Generierung von Fibrin kommt (Abb. 6F) (Ruggeri 2002).



**Abb. 6:** Hämostase: Thrombozytenadhäsion und –aggregation an Gefäßwandverletzungen (nach Gawaz 2003, Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium, Review, Cardiovascular Research).

## 6. Thrombozytäre Membranglykoproteine

Im Prozess der Hämostase interagieren Thrombozyten, Endothel, plasmatische Gerinnungsfaktoren und die extrazelluläre Matrix miteinander. Diese Interaktionen finden über spezifische Adhäsionsrezeptoren statt, die bei Thrombozyten die Glykoproteine auf der Membranoberfläche darstellen. Sie lassen sich aufgrund ihrer Molekülstruktur in die Integrine, leuzinreichen Glykoproteine, Selektine und die Rezeptoren vom Immunglobulintyp gruppieren. GPIIb-IIIa aus der Gruppe der Integrine hat z.B. die Aufgabe, die Coadhäsion zwischen zwei Thrombozyten zu vermitteln. Das leuzinreiche Glykoprotein-Ib-V-IX sorgt über die Bindung an den vWF-Kollagenrezeptor für die Thrombozytenadhäsion an die subendotheliale Matrix. Unter anderem wird die Adhäsion von Leukozyten an Thrombozyten oder das Endothel durch P-Selektion vermittelt (Gawaz 2001).

### 6.1 Glykoprotein VI (GPVI)

Außer GPIIb-V-IX und Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , die indirekt über vWf an Kollagen (Savage et al. 1998) binden, ist eine Vielzahl an Kollagenrezeptoren auf Thrombozyten identifiziert worden, eingeschlossen der wichtigsten Integrin  $\alpha_2\beta_1$  (Santoro 1986), GPV (Moog et al. 2001) und GPVI (Moroi et al. 1989). GPVI, welches durch Gel-Elektrophorese identifiziert wurde (Clemetson et al. 1982), ist auch als zentraler thrombozytärer Kollagenrezeptor bekannt, der für Thrombozytenadhäsion und -aggregation auf freigelegtem Kollagen *in vitro* essentiell ist; da er die Aktivierung der verschiedenen anhaftenden Rezeptoren, einschließlich der Integrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und  $\alpha_2\beta_1$ , vermittelt (Gibbins et al. 1997, Nieswandt et al. 2000, Nieswandt et al. 2001). GPVI ist ein 60-65- kD Typ I transmembranes Glykoprotein und gehört zur Unterfamilie der Immunglobuline (Clemetson et al. 1999, Jandrot-Perrus et al. 2000). Es bildet einen Komplex mit der FcR-Kette an der Zelloberfläche der Menschen- und Mäusethrombozyten (Gibbins et al. 1997, Nieswandt et al. 2000). Die Thrombozytenaktivierung durch GPVI erfolgt über einen Signaltransduktionsweg, der dem der Immunorezeptoren ähnlich ist. Hierbei wird das Tyrosin des *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif* der FcR  $\gamma$  Kette durch src-Kinase phosphoryliert (Watson et al. 2001). Der monoklonale Antikörper JAQ1 (Nieswandt et al. 2000) blockiert die Hauptkollagenbindungsstelle des murinen GPVI und hemmt somit die stabile Thrombozytenadhäsion an Kollagen unter niedrigen wie hohen Scherbedingungen des Blutstroms (Nieswandt et al. 2001). *In vivo*-Applikation von JAQ1 verursacht eine außerordentliche Verminderung der GPVI-Präsentation auf Mäusethrombozyten. Solche GPVI-armen Mäuse weisen eine erheblich verlängerte Blutungszeit auf und ihre

Thrombozyten können nicht ausreichend mit Kollagen, jedoch aber mit anderen Agonisten reagieren (Nieswandt et al. 2001).

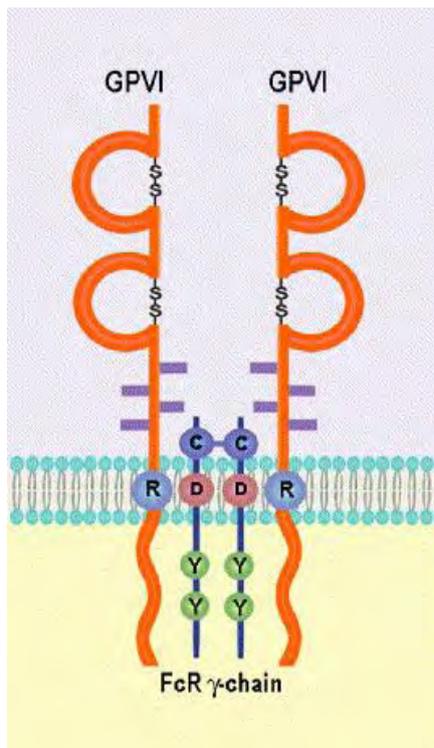
Aufgrund dessen wurde in einer Studie die *in vivo*-Bedeutung der Thrombozyten-Kollagen-Interaktionen im dynamischen Prozess von Thrombozytenadhäsion und -aggregation an den Orten der arteriellen Verletzung erforscht. Hierbei zeigte sich, dass durch Hemmung oder Fehlen von GPVI die Thrombozytenadhäsion und -aggregation nach endothelialer Denudation der A. carotis in Mäusen fast aufgehoben wird. Es stellte sich heraus, dass die Bindung oder die langsame Oberflächentranslokation der Thrombozyten in Abwesenheit von GPVI ebenfalls stark gehemmt ist. Diese Funktionen des GPVI spielen eine entscheidende Rolle für die Thrombozytenrekrutierung an den Ort der Gefäßverletzung und liefern den ersten *in vivo* Beweis, dass die Thrombozyten-Kollagen Interaktion von entscheidender Bedeutung für die arterielle Thrombusformation ist (Massberg et al. 2003).

## **6.2 Lösliches GPVI**

Die Hemmung der GPVI-Ligand-Interaktion könnte eine vielversprechende Strategie darstellen, um arterielle Thrombose unter dem Hintergrund der Atherosklerose zu verhindern. Jedoch wurde über die Antikörper, die gegen GPVI gerichtet sind, berichtet, dass sie Thrombozytenaktivierung (Schulte et al. 2001) und Immuno-thrombozytopenie verursachen, wodurch ihr Einsatz in der Klinik erschwert wird.

In einer Studie wurde das antithrombotische Potenzial einer löslichen Form von GPVI bewertet. Dazu wurde ein fusioniertes Protein geklont und charakterisiert, welches aus der extrazellulären Domäne von GPVI und aus humanem Fc zusammengesetzt ist (Abb. 7).

Die lösliche Form von humanem GPVI geht eine spezifische und hochaffine Bindung zu Kollagen ein und vermindert dadurch die Thrombozytenadhäsion zu immobilisiertem Kollagen *in vitro* und zu den Orten der Gefäßverletzung *in vivo*. Somit stellt lösliches GPVI ein vielversprechendes Werkzeug für die Verhinderung der arteriellen Thrombose bei Patienten mit fortgeschrittener Atherosklerose dar (Massberg et al. 2003).



**Abb. 7:** Aufbau des Glykoprotein VI-FcR $\gamma$ -chain-Komplexes (nach Moroi und Jung (2004), Platelet glycoprotein VI: its structure and function. Thromb Res; 114: 221-233).

## 7. Atherosklerose

Die Atherosklerose stellt die Hauptursache für das Auftreten von Herzinfarkt, Schlaganfall und Gangrän an den Extremitäten dar und ist somit für 50% der Todesfälle in den USA, Europa und Japan verantwortlich. Die atherosklerotische Läsion entsteht aufgrund einer erhöhten inflammatorischen-fibroproliferativen Reaktion von Endothel- und glatten Muskelzellen der Arterienwand. Folglich kommt es zum Verschluss der Arterie, der zu verschiedenen Formen des Infarkts führt (Ross 1993).

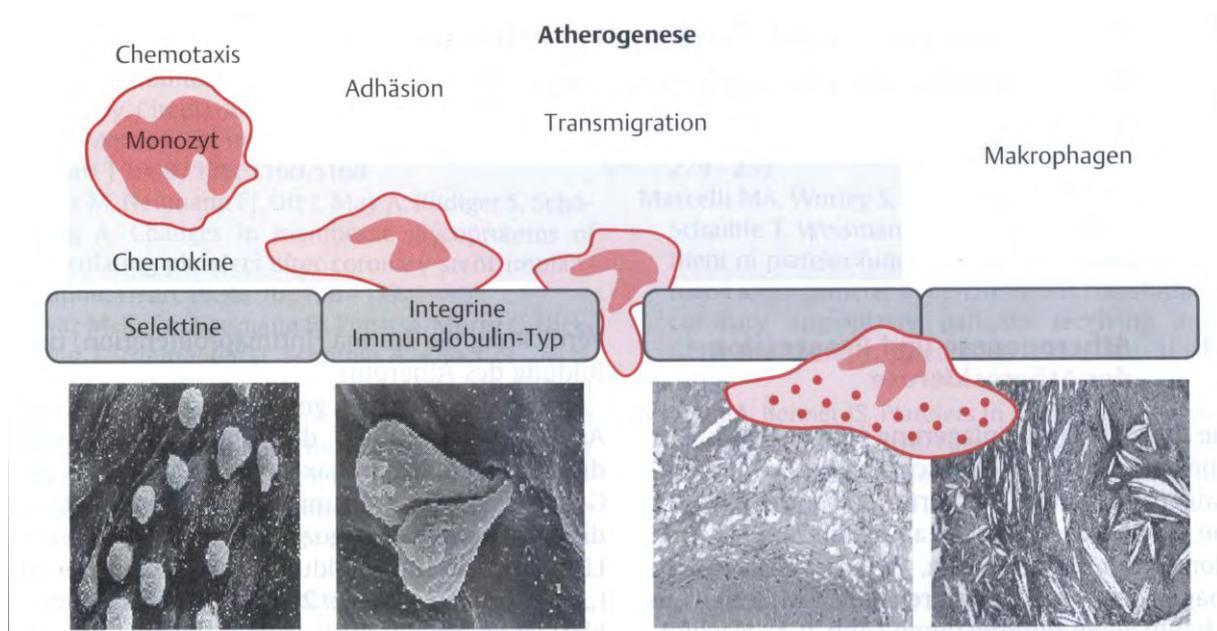
Zu den kardiovaskulären Risikofaktoren, welche eine Entstehung der Atherosklerose durch die verstärkte Thrombozytenaktivierung und -aggregation insbesondere an Gefäßaufzweigungen begünstigen, zählen Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie und Nikotinabusus (Gawaz 2001).

## 7.1 Atherogenese

Am Prozess der Atherogenese sind Monozyten, Makrophagen (Ross 1999, Luis 2000) und Thrombozyten (Crompton 1963) beteiligt (Abb. 8). Die pathologische Veränderung der Intima der Arterienwand wird durch die Chemotaxis, die Adhäsion, die Transmigration, die Differenzierung in Makrophagen und die Schaumzellbildung aus Monozyten an der Gefäßwand hervorgerufen (Gawaz 2001). Die Thrombozytenadhäsion an aktivierte Endothelzellen erfolgt über GPIIb-V-IX an den von-Willebrand-Faktor (Massberg et al. 2003, Nieswandt et al. 2001, Nieswandt et al. 2003). Des Weiteren werden auf der Thrombozytenoberfläche GPIIb-IIIa-Rezeptoren exprimiert, über welche die Thrombozyten miteinander aggregieren (siehe Kapitel 6) (Gawaz et al. 1991). Dieser Prozess wird durch die Interaktion der Thrombozyten mit Zytokinen, Chemokinen und anderen Mediatoren reguliert (Weber 2005), wodurch unter anderem immer mehr Thrombozyten aktiviert und rekrutiert werden. RANTES (*regulated-on-activation, normal T-cell-expressed and secreted chemokine*) veranlasst die Rekrutierung von Monozyten an inflammatorisches Endothel. Die anschließende Haftung der Monozyten wird durch P-Selektin vermittelt (von Hundelshausen et al. 2005, Schober et al. 2002). Außerdem setzen die aktivierten Thrombozyten den Plättchenfaktor 4 (PF4) frei. PF4 induziert die Differenzierung der Monozyten in Makrophagen, welches ein Schlüsselereignis in der Entwicklung einer atherosklerotischen Plaque ist. Darüber hinaus führt PF4 zur Retention der Low-density lipoproteins (LDL), indem er an den LDL-Rezeptor bindet und somit den LDL-Abbau inhibiert. Auch erleichtert PF4 die Veresterung von oxidiertem LDL und fördert dessen Aufnahme durch Makrophagen und dadurch die Schaumzellbildung (Nassar et al. 2003).

Patienten mit einem erhöhten Ligand CD40-Serumspiegel (CD40L) zeigen ein akutes Risiko für eine koronare Erkrankung (Heeschen et al. 2003). Thrombozyten speichern und geben innerhalb der ersten Sekunden nach Aktivierung hohe Mengen von CD40L ab und verursachen dadurch eine inflammatorische Reaktion des Endothels (Henn et al. 1998). Die Bindung von CD40L an den endothelialen CD40-Rezeptor führt zur Freigabe von Interleukin-8 und MCP-1, die hauptchemotaktischen Faktoren für neutrophile Granulozyten und Monozyten. Zusätzlich kommt es dadurch zur erhöhten Expression von endothelialen Adhäsionsrezeptoren wie E-Selektin, VCAM-1 und ICAM. Diese Adhäsionsmoleküle vermitteln die feste Adhäsion neutrophiler Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Sie werden innerhalb von vier Stunden nach Aktivierung von Endothelzellen durch den Tumornekrosefaktor und andere Faktoren exprimiert (Lindemann et al. 2000). Zusätzlich verursacht der CD40L der Thrombozyten die Expression des endothelialen *tissue factors*

(Slupsky et al. 1998). Folglich verhält sich der CD40-Ligand der Thrombozyten wie IL-1 $\beta$ , das durch aktivierte Thrombozyten synthetisiert und freigegeben wird. Beide Zytokine sind bei geringen Konzentrationen wirksam und locken chemotaktisch Leukozyten und Monozyten an. CD40L induziert ferner die Expression und die Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Diese Proteinase bauen verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix ab, die dem Blutstrom im Falle einer endothelialen Verletzung ausgesetzt werden. Dadurch begünstigen sie die Inflammation und die Zerstörung des verletzten Gewebes erheblich (Fernandez-Patron et al. 1999, Sawicki et al. 1997).



**Abb. 8:** Atherogenese: Monozytenchemotaxis, -adhäsion, -transmigration, Differenzierung in Makrophagen und Schaumzellbildung (nach Gawaz 1999, Blutplättchen, Thieme Verlag Stuttgart).

## 8. Akutes Koronarsyndrom und Myokardinfarkt

Der plötzliche Herztod ist ein häufiges Resultat einer schwerwiegenden koronaren Herzkrankheit, die vielfach durch akute koronararterielle Thrombose verursacht wird. Die Plaqueruptur ist die häufigste Ursache von koronaren Thrombosen (Falk et al. 1995, Davies et al. 1985). Eine rupturgefährdete atherosklerotische Plaque enthält ein dichtes Infiltrat von Makrophagen, eine geringere Anzahl an Lymphozyten und eine diese umgebende azelluläre Masse von Lipiden innerhalb einer fibrinösen Kappe. Ein anderer Mechanismus von koronarer Thrombose, die Plaquerosion, ist als weitere wichtige Ursache für den plötzlichen Herztod identifiziert worden (Farb et al. 1996, Fuster 1995).

Die antithrombotische Behandlung ist ein wesentlicher Bestandteil der Prävention rezidivierender koronarer Ereignisse (Rapaport and Gheorghide 1996). Der Einsatz von hohen Acetylsalicylsäure(ASS)-Dosen bewirkt eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in Endothelzellen, wodurch ASS unter Umständen in die ersten Schritte der Atherogenese eingreifen kann. In klinischen Studien konnte bei einer hohen im Vergleich zu einer niedrigen Acetylsalicylsäure-Dosierung eine Reduktion von atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (Ranke et al. 1993).

## **9. Therapie von atherosklerotischen Gefäßstenosen**

Die koronare Bypassoperation ist eine der chirurgischen Behandlungsmethoden im Falle von verschlossenen Koronararterien. Hierbei werden Blutgefäße von anderen Körperteilen genommen, um den Blutfluss um die Obstruktion herum zu führen. Einige Okklusionen können durch Ballonangioplastie geöffnet werden, indem ein Katheter am Ort der Obstruktion eingesetzt wird, um die Plaque in Richtung der Arterienwand herauszudrücken. Diese durch Ballondilatation geöffneten Arterien verschließen sich häufig im Laufe der Zeit wieder. Restenose tritt innerhalb von 3-6 Monaten bei 40-50% der Patienten nach Ballonangioplastie auf. Die Inzidenz kann durch Anwendung eines dehnbaren Stents aus rostfreiem Stahl um 20-30% erheblich reduziert werden (Erbel et al. 1998, Fischman et al. 1994, Serruys et al. 1994). Dennoch bleibt die Restenose ein Hauptnachteil der koronaren Angioplastie. Der kleine Gefäßdurchmesser und die große Verletzungslänge sind die wichtigsten Faktoren, um eine Restenose zu prognostizieren (Bhargava et al. 2003). Die Kompression der Plaque ist kein schonender Prozess und nach Stentimplantation tritt, infolge der Gewebeverletzung, ein Trauma um die Implantationsregion auf. Die vier Hauptursachen Thrombose, Entzündung, neointimale Proliferation und Gefäßumbau (Ward et al. 2007) führen zur Restenose. Der Mechanismus, der zur Restenose führt, ist die neointimale Proliferation innerhalb des Stents infolge der Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen. Dieses Phänomen tritt innerhalb der ersten 3-6 Monate nach Stentimplantation auf. Endotheliale Verletzungen, nicht-biokompatibles Stentmaterial und Entzündungen führen zur Thrombinfreisetzung, zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch aktivierte Thrombozyten und durch Entzündungszellen. Diese Faktoren regen die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen an und erhöhen die Produktion der extrazellulären Matrix, wodurch das Risiko für einen weiteren Gefäßverschluss drastisch erhöht wird (Bhargava et al. 2003). Seit der ersten Stentimplantation in eine menschliche Koronararterie 1987 durch Sigwart et al.

(Sigwart et al. 1987) erweiterte sich der Markt bezüglich Stentmaterialentwicklung und -design ständig. Um eine effektive Behandlung der Stenose zu garantieren, muss das Stentmaterial unterstützend, flexibel, fähig zur Expansion, und biokompatibel sein. Momentan bestehen die meisten Stents aus Edelstahl 316L. Jedoch ist dieser Stahl nicht völlig biokompatibel und verursacht ein hohes Vorkommen von Restenose und Thrombose. Folglich suchen Wissenschaftler nach biokompatiblen Materialien, wie z.B. Gold, Titan, Kobaltchrom, Tantal, Nitinol, Magnesium und verschiedene Polymer-Plastiken wie erweitertes Polytetrafluoroäthylen (ePTFE) oder Polyäthylenterephthalatfaser (Dacron). Außerdem können Stents entweder passiv oder aktiv beschichtet sein. Passive (fixierte) Beschichtungen wie Polymer, Silikonkarbid (Heublein et al. 1998), Carbon (Antoniucci et al. 2000) oder Gold (Cremonesi et al. 2000) liefern eine biologisch reaktionsträge Barriere zwischen der Stentoberfläche, dem zirkulierenden Blut und der Gefäßwand. Aktive Beschichtungen beinhalten biologisch aktive Substanzen wie Heparin (Begovac et al. 2003, Hardhammar et al. 1996, Lin et al. 2004, Vrolix et al. 2000) oder setzen Medikamente frei (z.B. Paclitaxel oder (Sousa et al. 2001)), durch die neointimale Hyperplasie gehemmt und somit die Restenose vermindert wird.

## **10. Stammzelltherapie**

Die endothelialen Progenitorzellen werden an Gefäßverletzungen rekrutiert und beschleunigen somit die Reendothelialisierung und die Reparatur dieser Verletzung (Fujiyama et al. 2003). In diabetischen Mäusen waren CD34<sup>+</sup>-Zellen (EPCs) in der Lage, die Wiederherstellung der Durchblutung der ischämischen Hintergliedmaßen zu beschleunigen (Sivan-Loukianova et al. 2003).

Außerdem sind erste klinische Studien durchgeführt worden, bei denen verschiedene Zellpopulationen für die Behandlung von Herzkrankheiten eingesetzt wurden. In den drei größten Studien wurden gemischte Knochenmarkszellen verwendet, die während der myokardialen Infarktbildung intrakoronar injiziert wurden. Die Stammzellbehandlung ist mit einer Zunahme des Auswurfes der linken Herzkammer verbunden (Fernandez-Aviles et al. 2004, Wollert et al. 2004). Jedoch enthalten gemischte Knochenmarkszellen auch andere Zelltypen, wie z.B. Leukozyten, die an der Progression der atherosklerotischen Erkrankung beteiligt sind (Ross 1999). Aufgrund dessen wurden in anderen Studien ausgewählte Knochenmarkzellpopulationen für die klinische Anwendung benutzt. In der TOPCARE-AMI Studie wurden gemischte einkernige Blutzellen (Knochenmarkszellen) mit zirkulierenden

hämatopoetischen Progenitorzellen (meistens endotheliale Progenitorzellen) verglichen und eine gleichwertige Sicherheit und Wirksamkeit festgestellt (Assmus et al. 2002, Schachinger et al. 2004). Stamm et al. injizierte  $1,5 \times 10^6$  autologe CD133<sup>+</sup>-Stammzellen in die Infarkttrandzone während der Herzchirurgie bei Patienten mit Myokardinfarkt (Stamm et al. 2003). In dieser Studie wurde die linke Kammerfunktion bei 4 von 6 Patienten erhöht und die Durchblutung des Infarktgewebes bei 5 Patienten verbessert. Die genauen Mechanismen, die für die Verbesserung der linken Kammerfunktion verantwortlich sind, sind noch nicht bekannt. Einige Studien zeigen, dass weniger als 3% der implantierten Zellen im Infarktbereich verbleiben (Wollert and Drexler 2005). Demzufolge wurden parakrine Effekte zum Teil für die Erfolge der Stammzelltherapie verantwortlich gemacht (Heil et al. 2004, Kinnaird et al. 2004, Lang et al. 2004).

Ein anderer Ansatz der Stammzelltherapie ist es, die Stammzellmobilisierung durch Zytokine wie GM-CSF zu verbessern. Jedoch sind die Resultate nicht sehr vielversprechend, da Patienten eine erhöhte Restenose entwickeln, und zudem der Serumkreatinkinase-MB-Spiegel steigt (Kang et al. 2004). Ein anderer konträrer Ansatz versucht, die Zahl der Stammzellen zu steigern, indem CD34<sup>+</sup>-Zellen nicht innerhalb des Blutes sondern direkt im kritischen Stentbereich durch die Beschichtung des intrakoronaren Metallstents mit CD34<sup>+</sup>-Antikörpern erhöht wird. In dieser Studie, die mit 16 Patienten mit stabiler oder instabiler Angina pectoris sicher und praktikabel hinsichtlich negativer kardialer und zerebrovaskulärer Auswirkungen durchgeführt wurde, wurde die Implantation eines mit CD34<sup>+</sup>-Antikörpern beschichteten Metallstents vorgenommen. Sechs Monate später ist der Lumenverlust bzw. die Obstruktion des Stentvolumens dadurch gegenüber der Vergleichsgruppe verringert worden (Aoki et al. 2005).

## 11. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, das Homing von endothelialen Progenitorzellen mit Hilfe eines spezifischen Protein-Aptamer-Konstruktes an verletzte Gefäßwände zu verbessern und damit in Zukunft eine schnellere Regeneration dieser Gefäßwände zu ermöglichen. Das Aptamer bindet einerseits murine T17b-Progenitorzellen und besitzt andererseits das lösliche GPVI-Fc; GPVI ist ein Thrombozytenrezeptor und ein starker Kollagenligand. Die Konstruktion eines solchen bispezifischen Adhäsionsmoleküls könnte die Möglichkeit bieten, endotheliale Progenitorzellen an Gefäßwände zu rekrutieren, die z.B. durch medizinische Eingriffe oder fortgeschrittene atherosklerotische Ablagerungen in ihrer Funktion stark gestört sind. In der gegenwärtigen kardiovaskulären Therapie führt die Behandlung eines stenosierten Gefäßes durch Stentimplantation oder Ballondilatation zur Freilegung eines kollagenreichen Areals zum Gefäßlumen hin. Das GPVI-Fc-Aptamer ist über seinen GPVI-Fc-Rezeptor in der Lage, an dieses freigelegte Kollagen zu binden. Es wird somit eine beschleunigte Gefäßwandwundheilung sowie eine verringerte Thrombusbildung erwartet.

In der vorliegenden Arbeit werden diese Hypothesen zum einen durch die Flusskammer als ein *in vitro*-Modell und zum anderen durch das ligaturinduzierte Verletzungsmodell der A. carotis an C57BL/6J Mäusen (*in vivo*) mit Hilfe der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie überprüft.

## MATERIAL UND METHODEN

In der vorliegenden Arbeit kommt die Flusskammer als *in vitro*-Modell zum Einsatz, um die Interaktion der T17b-Zellen mit Kollagen darzustellen. Um die daraus resultierenden Ergebnisse unter physiologischen Bedingungen *in vivo* untersuchen zu können, wird anschließend das Verletzungsmodell an der A. carotis der Maus verwendet.

### 1. Zellkultivierung der T17b- und MHE-Zellen

In den folgenden Flusskammerexperimenten wie auch im Carotismodell kamen murine embryonale endotheliale Progenitorzellen der Zelllinie T17b zum Einsatz. Die ursprüngliche Isolierung wurde wie folgt durchgeführt: Nach Feststellung des Vaginalpfropfes, der einen halben Tag nach der Befruchtung auftritt, wurden die Zellen aus ca. 8 Tage alten Mäuseembryonen isoliert, wie bei Hatzopoulos et al. 1998 beschrieben wurde. Die MHE-Zellen (murine Herzendothelzellen) dienen in den folgenden Experimenten des Carotismodells als Negativkontrolle und wurden aus dem Myokard von zwei Wochen alten Mäusen kultiviert, wie bei Plendl et al. 1995 beschrieben.

Die T17b- wie auch die MHE-Zellen wurden nach dem gleichen Verfahren kultiviert. Ein 1,5 ml Cryoröhrchen, das ca. 1 Million Zellen enthielt, wurde durch Zugabe von warmen Medium (37°C) aufgetaut. Das T17b-Zellmedium bestand aus 385 ml DMEM (Gibco 42430-025), 100 ml FBS (20%), 5 ml 2 mmol L-Glutamin (1%), 5 ml Pen/Strep (1%), 5 ml nicht essentielle Aminosäure und 3,5 µl β-Mercaptoethanol. Hingegen beinhaltete das MHE-Zellmedium 450 ml DMEM (Gibco 41965-039), 50 ml FCS (10%), 5 ml 2 mmol L-Glutamin und 10 ml Pen/Strep (2%). Nach dem Auftauen wurde eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 0,2%iger Gelatine beschichtet und die Zellen darauf ausgesät. Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, der im weiteren Verlauf alle 2 Tage erfolgte. Nach 3 Tagen war eine Wachstumsdichte der Zellen von 70-80% erreicht. Dichter sollten die Zellen nicht wachsen, da sie sonst zur Verklumpung neigen. Im Folgenden wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, danach mittels Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und die Reaktion anschließend mit Vollmedium gestoppt. Danach wurde die Zellanzahl anhand der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die passende Zellanzahl entnommen.

Der Tyrodepuffer für die T17b-Zellen der Flusskammerversuche wurde hergestellt, indem man 0,1 g D(+)-Glucose (Merk KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 0,1 g bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) in 10 ml Tyrode 10x (Merk KGaA, Darmstadt, Deutschland) löste und mit 90 ml Wasser auffüllte. Danach erfolgte die Einstellung des pH-Werts auf 7,4 mit HEPES (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Es wurden  $12,5 \times 10^6$  T17b-Zellen in 25 ml Tyrodepuffer überführt.

## **2. Fusion von GPVI-Fc mit dem Aptamer**

### **2.1 Generierung von GPVI-Fc**

Um eine lösliche Form von GPVI zu generieren, wurde der extrazelluläre Anteil von humanen GPVI mit der humanen Fc-Domäne verbunden. Zuerst wurde das Fc aus einer menschlichen Herz cDNA Bibliothek durch Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Das aufgereinigte PCR-Fragment wurde in den Plasmidvektor pADTrack CMV kloniert. Für die Klonierung der extrazellulären Domäne des humanen GPVI wurde zunächst die Gesamt-RNA von kultivierten Megakaryozyten isoliert und durch PCR amplifiziert. Danach wurde das PCR-Fragment über eine Schnittstelle mit BglII/NotI in das Plasmid pADTrack CMV Fc kloniert. Das hergestellte Plasmid kodierte somit für humanes extrazelluläres GPVI, das mit der humanen Fc-Domäne einschließlich einer spezifischen Scharnierregion verbunden ist. Des Weiteren wurde das Plasmid in HELA-Zellen transfiziert, um das Protein zu exprimieren. Der Zellkulturüberstand wurde zentrifugiert und danach das Protein isoliert (Massberg et al. 2003).

### **2.2 Herstellung des Aptamers durch das SELEX-Verfahren (= Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung)**

Das SELEX-Verfahren besteht aus einem Kreislauf, in dem die folgenden drei Schritte der Selektion, Separation und Amplifikation bis zu ca. 9-12mal wiederholt werden (Abb. 9).

### 2.2.1 Selektion und Separation

Das SELEX-Verfahren wurde entsprechend eines geänderten Versuchsablaufs einer zuvor veröffentlichten Arbeit durchgeführt (Blank et al. 2001). Zu Beginn des SELEX-Prozesses bestand die Molekülbibliothek aus einer zentralen, randomisierten Sequenz von 60 Nukleotiden, an deren beiden Enden ein Primer von 18 Nukleotiden angrenzte (5'-ATACCAGCTTATTCAATT-60-nt-AGATAGTAAGTGCAATCT-3') (Operon, Köln, Deutschland). Ein FITC-markierten 5'-Primer (5'-FITC-18C-ATACCAGCTTATTCAATT-3' mit einem 18-Carbonethylenglycol-Spacer (18C)) und ein Biotin-markierten 3'-Primer (5'-Biotin-AGATTGCACTTACTATCT-3') (beide von Operon, Köln, Deutschland) wurden in den PCR-Reaktionen für die Synthese der zweifach-markierten und doppelsträngigen DNA-Moleküle benutzt. Die dsDNA-Stränge wurden durch eine 15 minütige Inkubation mit 0.2M NaOH voneinander getrennt und mit Hilfe von Streptavidin beschichteten, magnetischen Beads (M-280 Dynabeads, Invitrogen, Karlsruhe) konnten die Biotin-markierten ssDNA-Teile selektiert werden. Anschließend wurden die verbliebenen FITC-markierten ssDNA-Teile mit 0.2M HCl neutralisiert. Indem man den ssDNA-Pool für 10 Minuten in einem 1 ml Selektionspuffer, der 50 mM Tris HCl (pH 7.4), 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, und 0.1% NaN<sub>3</sub> enthielt, auf 80°C erhitze, wurde er denaturiert. Danach wurde dieser renaturiert, indem man den Pool für 10 Minuten einer Temperatur von 0°C aussetzte. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurde vor der Zellinkubation ein 5fach molarer Überschuss an tRNA (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) sowie bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) hinzugefügt. Anschließend wurden die Aptamere mit T17b Zellen (10<sup>6</sup> in der ersten Runde und 10<sup>5</sup> in den darauffolgenden Runden) bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, um den Aptameren eine Bindung mit den T17b-Zellen zu ermöglichen. Durch Zentrifugation (5 min bei 200xg, Zentrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde eine Trennung von gebundenen und ungebundenen Aptameren erreicht, um die Aptamere mit den besten Bindungseigenschaften für die T17b-Zellen zu selektieren. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml Selektionspuffer (mit 0.2% Bovine Serumalbumin, BSA) wurden zellgebundene Aptamere durch Einsatz der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und unter Verwendung eines Master-Mix-Reagenz (Promega, Mannheim, Deutschland) amplifiziert. PCR-Amplifikation [25 Zyklen von 20 Sekunden bei 94°C (Denaturierung), 20 sek. bei 48°C (Annealing), 20 sek. bei 72°C (Elongation)]; gefolgt von einer finalen Elongation von 10 Minuten bei 72°C] mit FITC-markierten Primern kam bei späteren

durchflusszytometrischen Analysen zum Einsatz, eine Amplifikation mit Biotin-markierten Primern bei der Untersuchung der dsDNA-Separation.

### **2.2.2 Durchflusszytometrische Analysen**

Um die Anzahl an Aptamer-EPCs in den einzelnen SELEX-Runden festzustellen, wurden die nach jeder Runde durchflusszytometrischen Analysen durchgeführt (beginnend von der zweiten Runde an) und damit der Anstieg der Fluoreszenz und die Bindungskapazität überwacht. Nach der Inkubation von  $10^5$  EPCs mit 200 pmol Aptamer in 200  $\mu$ L des Selektionspuffers (mit einem 5fachen molaren Übermaß an tRNA und BSA) bei 37°C für 30 Minuten wurden die Zellen dreimal in 1 ml Selektionspuffer (mit 0.2% BSA) gewaschen und die FITC-Fluoreszenz durch ein FACScan Zytometer (Becton Dickinson, Franklin Seen, USA) überwacht. Zusätzlich wurden die gleichen durchflusszytometrischen Analysen nach Abschluss des SELEX-Verfahren durchgeführt, um die Bindungsfähigkeit der einzelnen Aptamere zu klassifizieren. Dafür wurden  $10^5$  T17b Zellen mit dem Selektionspuffer, der 1  $\mu$ g/ $\mu$ L tRNA enthielt, für 20 Minuten vorinkubiert und danach mit 50  $\mu$ M Lösung, die einzelne FITC-Aptamere enthielt, für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dieser experimentelle Teil wurde übereinstimmend mit der Publikation von Blank et al. 2001 durchgeführt.

### **2.2.3 Amplifikation**

Die letzte Selektionsrunde wurde durch den maximalen Anstieg der Fluoreszenz festgelegt. Die Aptamere, die nach dieser letzten Runde ausgewählt wurden, wurden nach Klonierung mittels des TOPO-TA Cloning Kits (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in *Escherichia coli* transformiert. Nach Kultivierung der plasmidhaltigen Bakterien in Selektionsmedium erfolgte eine Präparation der Plasmid-DNA mittels des Plasmid Isolation Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland). Danach wurde das Plasmid mittels PCR für Sequenzierungsverfahren (ABI PRISM 377 DNA Sequenzer, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) sowie für nachfolgende Experimente im Anschluss des SELEX-Verfahrens amplifiziert. Einzelne Aptamere wurden von isolierten Plasmiden generiert, und ihre absolute Bindungsaffinität wurde durchflusszytometrisch geprüft.

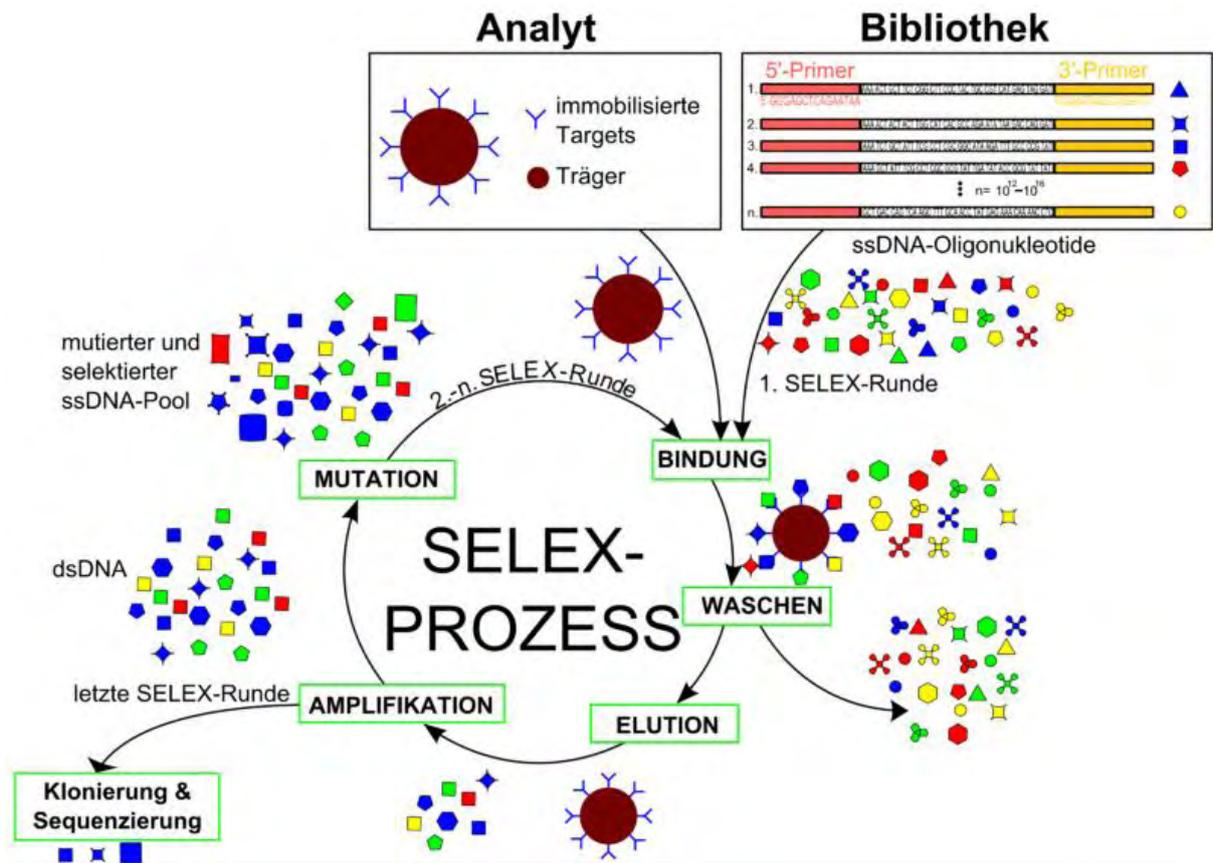


Abb. 9: Das SELEX-Verfahren (<http://de.wikipedia.org/wiki/SELEX>, 20.04.09)

### 2.3 Generierung eines bispezifischen GPVI-Fc-Aptamer Konstruktes

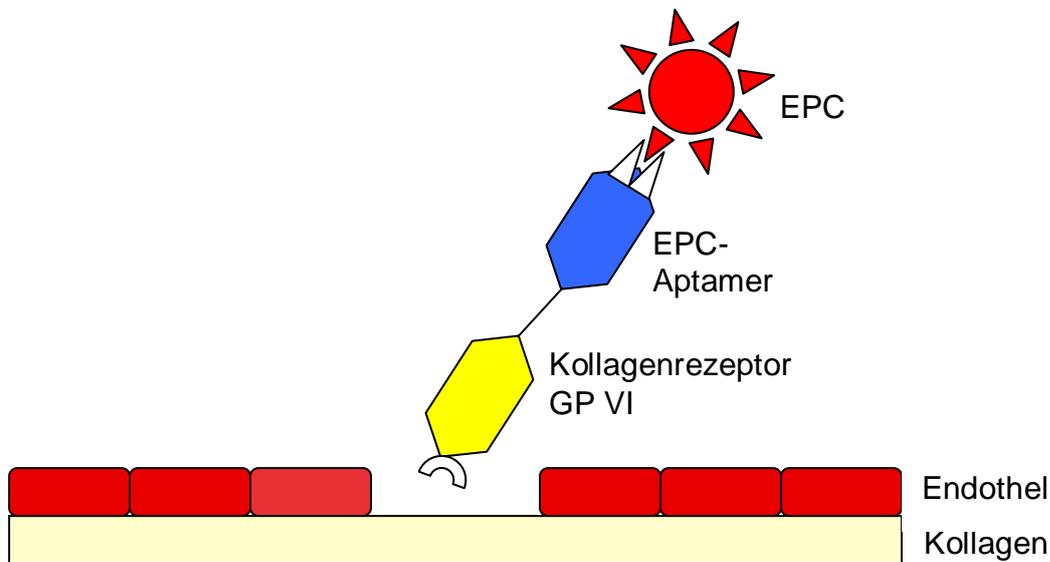
Das GPVI-Fc-Aptamer wie auch die Kontrollen wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Wendel (Universitätsklinikum Tübingen, Herz- und Thoraxchirurgie) hergestellt und uns freundlicherweise für unsere Experimente zur Verfügung gestellt.

Um die Rekrutierung der Stammzellen zu freigelegtem Kollagen zu verbessern, wurde ein chimäres Konstrukt, bestehend aus löslichem GPVI-Fc und einem Aptamer speziell für T17b Zellen, hergestellt (Abb. 10). Das lösliche GPVI-Fc wurde, wie zuvor beschrieben, generiert. Es waren biochemische Änderungen notwendig, um das Protein mit dem Aptamer unter Zuhilfenahme eines heterobifunktionellen Crosslinkers (Unter chemischem Cross-Linking von Proteinen versteht man das Einführen einer kovalenten Bindung zwischen funktionellen Gruppen von Aminosäuren innerhalb eines Proteins (intramolekular), oder zwischen interagierenden Proteinen (intermolekular) mittels eines chemischen Reagenzes. Voraussetzung hierfür ist, dass sich geeignete funktionelle Gruppen von Aminosäureresten

entsprechend nahe kommen.) zu verbinden. Um dies zu ermöglichen, wurde die Disulfidbrücke des synthetisch hergestellten Aptamers mouseclone-6-thiol gespalten, wodurch eine freie Sulfhydrylgruppe entstand, die an die Maleinimid-Gruppe des Crosslinkers mal-sac-HNSA gebunden wurde. Ferner wurde eine weitere Kopplung mit den freien Aminogruppen von Lysin des Aptamers an den Crosslinker mit Hilfe einer Peptidbindung vorgenommen. Das entstandene GPVI-Fc-Aptamer ist durch Polyacrylamid-Gelelektrophoresen mit anschließender Silberfärbung, UV-Absorptionsspektroskopie sowie Q-TOF detektierbar.

### **2.3.1 Nonsense- bzw. BSA-Aptamer**

Das BSA-Aptamer wie auch das Nonsense-Aptamer stellen Kontrollen gegenüber dem GPVI-Fc-Aptamer dar. Die Kontrollen wurden nach dem gleichen Prinzip wie das GPVI-Fc-Aptamer hergestellt. Das BSA-Aptamer enthält das gleiche Aptamer wie das GPVI-Fc-Aptamer, das eine Bindungsstelle für T17b-Progenitorzellen besitzt. Beim BSA-Aptamer wurde GPVI-Fc jedoch durch das BSA ersetzt. BSA bewirkt im Gegensatz zum speziellen Kollagenrezeptor GPVI-Fc eine unspezifische Bindung an Kollagen. Das Nonsense-Aptamer besitzt wie auch das GPVI-Fc-Aptamer die GPVI-Fc-Komponente und stellt somit die spezifische Bindung an Kollagen sicher. Hier liegt der Unterschied im Aptamer; da das Nonsense-Aptamer eine der T17b-Zellbindungsstelle differente Bindungsstelle besitzt.



**Abb. 10:** Struktur des bispezifischen GPVI-Fc-Aptamers (nach Wendel, unveröffentlicht).

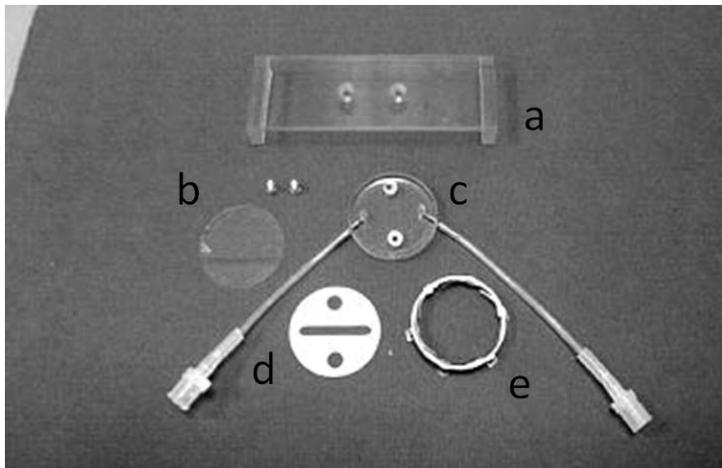
### 3. Flusskammer

#### 3.1 Vorbereitung der Deckgläser

Zuerst wurden die Deckgläser ( $\varnothing$  25 mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht AG, Sondheim, Deutschland) für die Flusskammer mit Kollagen beschichtet. Dafür wurden diese für eine Stunde zur Sterilisation in 70%igen Alkohol gelegt. Danach wurden sie über dem Bunsenbrenner (Gasprofi 1SCS micro, WLD-Tec GmbH, Arenshausen, Deutschland) abgeflammt und in eine 6-Well-Platte (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) gelegt. Anschließend erfolgte das Bedecken der Deckgläser mit jeweils 1000  $\mu$ l Kollagen-Lösung (10  $\mu$ g/ml; Kollagen, Bovine, Typ I, BD Biosciences, Bedford, England) und die Inkubation über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde das Kollagen abgesaugt und die Deckgläser einmal mit jeweils 1000  $\mu$ l Phosphate Buffered Saline (PBS Dulbecco, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gewaschen. Danach wurde jeweils 1000  $\mu$ l 2%iges bovines Serumalbumin (BSA, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Deutschland) zur Blockierung unspezifischer Bindungen auf die Deckgläser gegeben und diese bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach Absaugung des BSA wurden die Deckgläser einmal mit PBS gewaschen.

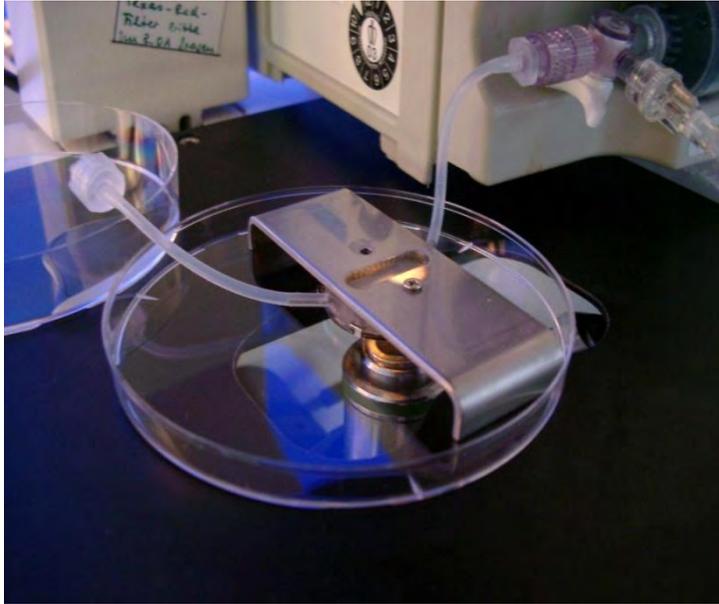
### 3.2 Versuchsaufbau der Flusskammer

Die vorbereiteten Deckgläser wurden in die Flusskammer (Flow Chamber System FCS<sup>1c</sup>, Provitro GmbH, Berlin, Deutschland) eingesetzt (Abb. 11). Auf den Kammerkörper wurde die Silikonscheibe fest aufgelegt; danach das Deckglas mit der beschichteten Seite nach unten auf die Silikonscheibe gelegt. Um eine Arretierung zu erlangen, wurde ein Federspannring darüber gespannt. Darüber hinaus wurde die Flusskammer in einer Petrischale (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) auf den Objektisch des Mikroskops (Axiovert 200, Zeiss, Göttingen, Deutschland) gestellt (Abb. 12). An der einen Seite wurde der Schlauch der Flusskammer auf die 50 ml Spritze (Original-Perfusor-Spritze OPS 50 ml Luer Lock, B. Braun, Melsungen AG, Deutschland) mit Zellsuspension aufgeschraubt, die sich im Perfusor (Perfusor® fm, B. Braun, Melsungen AG, Deutschland) befindet. Unter die andere Seite des Schlauches wurde eine Petrischale gestellt, um die Flüssigkeit aufzufangen, die die Flusskammer bereits durchlaufen hat. Auf dem Mikroskop ist eine CCD- Kamera montiert, welche die optischen Daten erfasst und an den CD-Rekorder weiterleitet. Dieser stellt dann die Daten auf dem Monitor bildlich dar.



**Abb. 11:** Bestandteile der Flusskammer (aus der Gebrauchsanweisung Flow Chamber System FCS<sup>1c</sup>, Provitro GmbH, Berlin, Deutschland, leicht geändert)

*a: Führungsplatte, b: Deckglas, c: Flusskammerkörper mit Schläuchen, d: Silikonscheibe, e: Federspannring.*



**Abb. 12:** Versuchsaufbau der Flusskammer.

### 3.3 Experimentelle Durchführung

Es wurden drei unterschiedliche Experimente in der Flusskammer durchgeführt. Im ersten Experiment wurde auf die mit Kollagen beschichteten Deckgläser zusätzlich jeweils 1000  $\mu\text{l}$  GPVI-Fc-Aptamer (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), GPVI-Fc-BSA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), GPVI-Fc (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder Aptamer (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gegeben und für vier Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dieser Zeit wurde der Überstand abgesaugt, und es folgte eine einmalige Waschung mit PBS und die erneute Befüllung der Wells mit jeweils 1000  $\mu\text{l}$  PBS. Im zweiten Experiment wurden die T17b-Zellen im Vergleich einmal mit GPVI-Fc- Aptamer (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und zum anderen mit BSA-Aptamer (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) vorinkubiert. Das dritte Experiment beinhaltete eine halbstündige Inkubation der T17b-Zellen mit GPVI-Fc-Aptamer oder GPVI-Fc-Nonsense-Aptamer, wobei jeweils entweder eine Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  oder 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eingesetzt wurde.

Sobald die Spritze mit den T17b-Zellen im Perfusor eingespannt und die Flusskammer angeschlossen war, wurde der Perfusor gestartet, und die T17b-Zellen flossen mit einer Geschwindigkeit von 15 ml/h durch die Flusskammer über den beschichteten Coverslip. Nun wurden die Zellen mit Hilfe des 20er Objektivs scharf gestellt und eine mittlere Position der Flusskammer gewählt. Der Flussvorgang wurde für 10 min aufrechterhalten. Im Anschluss wurden 4 Aufnahmen von jeweils 30 Sekunden entlang der Flusskammer von verschiedenen

Positionen gemacht. Es wurden jeweils die adhärennten Zellen pro Aufnahme gezählt und dann der Mittelwert errechnet. Im zweiten Experiment erfolgte die Auszählung der adhärennten Zellen minütlich über einen Zeitraum von 10 Minuten.

#### **4. Intravitalmikroskopie am Carotismodell**

##### **4.1 Versuchstiere**

In den intravitalmikroskopischen Versuchen kamen männliche Wildtypmäuse vom Stamm C57BL/6J (Charles River Deutschland GmbH, D-97633 Sulzfeld) im Alter von zehn bis dreizehn Wochen zum Einsatz. Bei Ankunft wurden jeweils fünf Mäuse in einen Käfig vom Makrolon-Typ II long gesetzt, wo sie in der Zeit bis zum Versuch gehalten wurden. Als Einstreumaterial wurde entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat aus Espenholz (Fa. ABEDD-LAB & VET Service GmbH, Wien; Österreich) verwendet; als Nestbaumaterial wurde den Tieren ein Stück sterilisierten Zellstoff (Nestlets, Fa. Indulab AG, Gams, Schweiz) in den Käfig gelegt. Beides wurde jeweils einmal pro Woche gewechselt. Futter (Fa. Provimi Kliba, Kaiseraugst, Schweiz) und Wasser stand den Mäusen ad libitum zur Verfügung. In der Tierhaltung liegt die Luftfeuchtigkeit zwischen 50% und 60% und die Raumtemperatur bei 21°C. Eine Beleuchtungsanlage regelt den Hell-Dunkel-Rhythmus, wobei in der Helligkeitsphase 50 Lux im Käfig vorhanden sind.

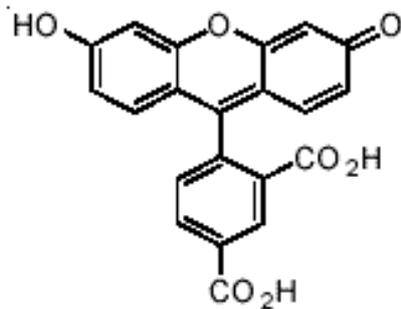
Das vorliegende Versuchsvorhaben wurde am 27.09.05 vom Regierungspräsidium Tübingen gemäß § 8 Tierschutzgesetz (Neufassung vom 25.08.1998) unter der Versuchsnummer M3/05 genehmigt.

##### **4.2 Fluoreszenzfärbung**

###### **4.2.1 DCF-Farbstoff**

Der Fluoreszenzfarbstoff besitzt biochemische Eigenschaften, die besonders gut für die Anwendung in den folgenden intravitalmikroskopischen Versuchen geeignet sind. Der DCF-Farbstoff (5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, Fa. Molecular Probes, USA) besteht aus einem Fluoresceinmolekül, welches zwei Azetatreste und eine Esterfunktionsgruppe enthält (Abb. 13). In dieser Form ist es membrangängig und nichtfluoreszierend. Nach Diffusion in das intrazelluläre Milieu entfernen endogene Esterasen die Azetatgruppen und machen das

Molekül dadurch in hohem Grade fluoreszierend und nicht membrangängig. Zusätzlich reagiert der Ester mit den freien Aminogruppen der intrazellulären Proteine und bildet ein gefärbtes Proteinaddukt. Diese Proteine haben eine niedrige Umsatzrate und besitzen außerdem einige Zytoskelettbestandteile. Sie sind wahrscheinlich für die sehr langlebige Färbung, die durch DCF hervorgebracht wird, verantwortlich (Lyons et al. 2000).



**Abb. 13:** Strukturformel von DCF.

#### 4.2.2 DCF-Färbung der Zellen

Die DCF-Färbung wurde an den MHE-Zellen (murine Herzendothelzellen) und den T17b-Zellen (murine Progenitorzellen) vorgenommen. Diese Färbung der Zellen erfolgte mit dem Farbstoff DCF, die später in den Versuchen der Intravitalmikroskopie verwendet wurden. Im ersten Schritt wurden die adhärennten Zellen abtrypsinisiert (2-3 ml Trypsin) und anschließend mit Phosphat Buffered Saline (PBS) gewaschen. Im weiteren Verlauf wurde die Zellsuspension bei 270 x g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen, resuspendiert und danach die Zellzahl bestimmt. Nun erfolgte eine weitere Zentrifugation in geringerem Volumen der benötigten Menge der Zellsuspension unter gleichen Bedingungen. Das resultierende Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert. Hierzu wurde im Folgenden 180 µl Fluoreszenzfarbstoff DCF in einer finalen Konzentration von 2,5 mg/ml zugegeben und für 10 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde nochmals eine Waschung mit 14 ml PBS vorgenommen, die Zellen unter der oben genannten Weise zentrifugiert und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Nach den vorangegangenen Schritten stand die Zellsuspension für die jeweiligen Versuche bereit. Es wurden pro Maus bei den Versuchen der Intravitalmikroskopie 50.000 Zellen verwendet, die in 250 µl PBS gelöst waren.

### **4.3 Das Carotismodell**

Die Interaktion von fluoreszenzmarkierten Zellen mit dem Gefäßendothel wird anhand des ligaturinduzierten Verletzungsmodells der A. carotis communis vorgestellt, welches die Makrozirkulation darstellt.

#### **4.3.1 Narkose**

Zu Beginn des Versuchs der Intravitalmikroskopie am Verletzungsligaturmodell der Carotis wurde den Tieren eine Injektionsnarkose verabreicht. Die Mäuse wurden narkotisiert, indem ihnen eine Injektion einer Lösung bestehend aus 0,5 mg/kg KGW Medetomidin (Domitor®, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 5,0 mg/kg KGW Midazolam (Midazolam-ratiopharm 5 mg/1ml®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) und 0,05 mg/kg KGW Fentanyl (Fentanyl 0,5 mg curamed®, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) intraperitoneal injiziert wurde. Im Anschluss daran wurden die Mäuse an ein Inhalationsnarkosegerät (Völker GmbH, Kaltenkirchen, Deutschland) angeschlossen, aus dem sie mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch (Isofluran: Isoba®, ESSEX Pharma GmbH, München, Deutschland; Sauerstoff: Linde AG, Pullach, Deutschland) versorgt wurden. Die Tiere lagen die gesamte Zeit des Experiments über in Narkose.

#### **4.3.2 Vorbereitung der Mäuse**

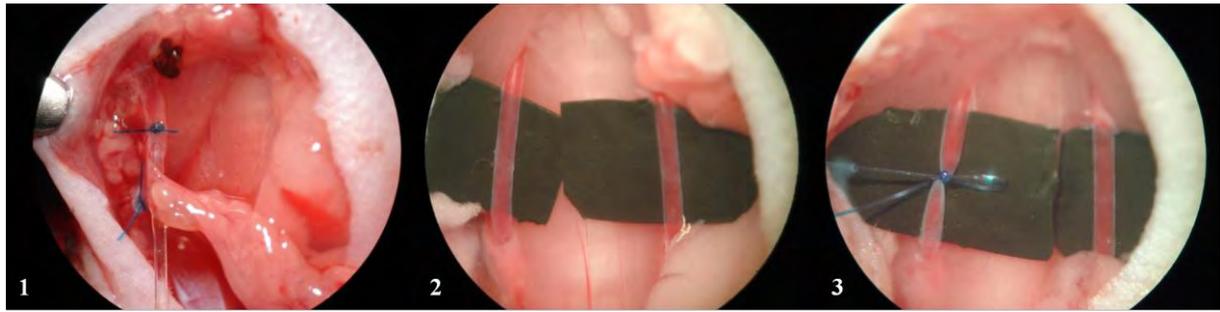
##### **4.3.2.1 Legen des Venenkatheters**

Während dieser Zeit lagen die Mäuse auf dem Rücken und waren auf einer Wärmematte (ThermoLux® Wärmeunterlage, Witte&Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland) mit Klebeband (Leukopor®, BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) an allen Extremitäten befestigt. Um die Augen vor Austrocknung zu schützen, wurde eine Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Fa. Bayer, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Danach wurden die Haare des ventralen Halsbereichs mittels einer Enthaarungscreme entfernt, diese mit einem Wattestäbchen abgetragen und anschließend die Haut mit einer Alkohollösung (Softasept N, Hautdesinfektionsmittel, Fa. B. Braun, Melsungen AG, Deutschland) desinfiziert. Im nächsten Schritt setzte man einen ca. 1 cm langen medianen Hautschnitt vom Kinnwinkel in Richtung caudal. Die weitere Präparation der Maus wurde unter einem Stereomikroskop (Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland) mit einer Kaltlichtquelle (Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland) fortgeführt. Sie begann mit der stumpfen Trennung der Glan-

dulae salivariae majores, die nach lateral aus dem Operationsfeld verlagert wurden. Danach wendete man sich der linken Seite der Drüse zu. Die kleineren Gefäße, die am cranialen Ende der Speicheldrüse in die Tiefe ziehen, wurden durch die Anwendung eines Elektrokauters (Elektrotom®505, Integra™, Plainsboro, NJ, USA) verschlossen. Bei den größeren Gefäßen, wie die V. jugularis interna und anterior, die sich weiter caudal befinden, wurde die Blutzufuhr durch eine Ligatur unterbunden. Als nächstes wurde die Vena jugularis externa sinistra freipräpariert und ein Faden (Prolene®, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) um das Gefäß gelegt, die der späteren Katheterfixierung diene. Danach wurde der Katheter (Polythene Tubing, 0,28 mm ID, 0,61 mmOD, Ref. 800/110/100, Fa. Portex) mit isotoner Natriumchloridlösung (Fa. Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) durchgespült und unter dem Mikroskop auf Luftblasen untersucht. Mittels einer Mikroschere wurde eine kleine Inzision in die V. jugularis externa sinistra gesetzt und der Katheter in diese vorgeschoben (Abb. 16.1). Durch die Spülung des Katheters mit isotoner Natriumchloridlösung konnte sein richtiger Sitz festgestellt werden. Später sollte über den Venenkatheter die systemische Applikation von fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgen.

#### **4.3.2.2 Präparation der A. carotis**

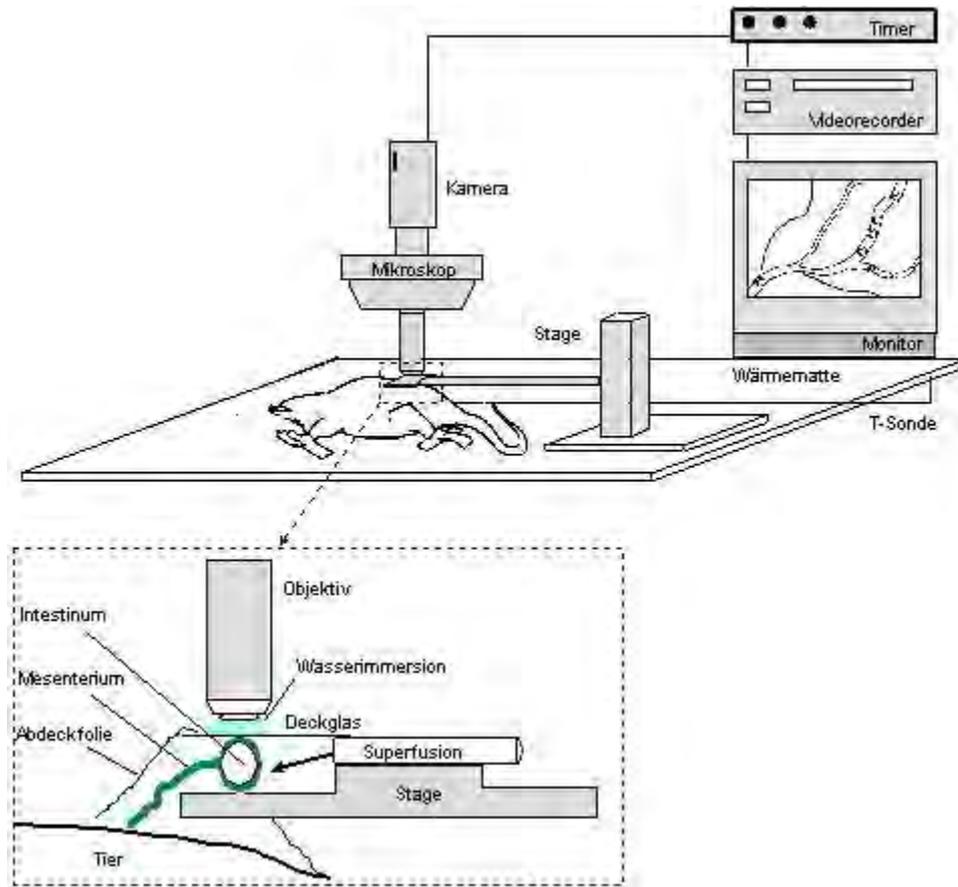
Nach der Positionierung des Venenkatheters wurde mit der Präparation der Arteria carotis communis begonnen (Abb. 16.2). Diese erfolgte mittels einer gebogenen und einer nicht gebogenen Pinzette entlang der Trachea. Hierbei war aufgrund des Nervus vagus äußerste Vorsicht geboten. Wobei man dann die gebogene Pinzette unter die A. carotis communis führte, diese anhob und die Pinzette auseinanderspreizte. Mit dieser Pinzette zog man ein schwarzes Stück Röntgenfilmfolie unter die Arterie, die zur Vorverlagerung der Carotiden und zur Verbesserung des Kontrasts bei den Aufnahmen nötig ist. Dieses Vorgehen wurde an beiden Carotiden durchgeführt, um die Zahl der Versuchstiere zu reduzieren. Eine ständige Befeuchtung der Gefäße mit Natriumchloridlösung war notwendig, um einer Austrocknung vorzubeugen. Danach wurde die Maus unter das Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland) gelegt und ihr über den Venenkatheter 50.000 DCF (5 (and - 6)-carboxyfluorescein diacetate, Fa. Molecular Probes, USA) - markierte Zellen in 250 µl PBS gelöst systemisch verabreicht.



**Abb. 16:** Legen des Venenkatheters (1), Präparation der A. carotis (2), Setzen der Ligatur (3) (nach Gauß).

### 4.3.3 Arbeitsplatz der Intravitalmikroskopie

Die erste Einheit des Arbeitsplatzes der Intravitalmikroskopie bildet die Maus als Versuchstier, die unter dem Fluoreszenzmikroskop liegt und mit dem Narkosegerät verbunden ist. Die folgende optische Einheit setzt sich aus dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Fa. Zeiss, Göttingen) und der CCD-Kamera (Charged Coupled Device-Kamera, FK 6990-IQ-S, Fa. Pieper GmbH, Schwerte) zusammen. Im Fluoreszenzmikroskop wird ein Strahl aus der Lichtquelle durch den Exzitationsfilter und den Farbteiler auf das Versuchstier gelenkt. Von diesem werden emittierte Strahlen durch den Emissionsfilter in die CCD-Kamera geschickt. Die letzte Einheit stellt der CD-Rekorder dar, der die optischen Daten der CCD-Kamera aufzeichnet sowie der Monitor, der diese dann visualisiert (Abb. 17).



**Abb. 17:** Aufbau des Arbeitsplatzes der Intravitalmikroskopie am Darmmodell (modifiziert nach [http://edoc.huberlin.de/habilitationen/lehmann-christian-2001-07-17/HTML/lehmann\\_html\\_11290526.gif](http://edoc.huberlin.de/habilitationen/lehmann-christian-2001-07-17/HTML/lehmann_html_11290526.gif)).

#### 4.3.4 Experimentelle Durchführung

##### 4.3.4.1 Versuchsgruppen

In der ersten Gruppe wurden murine T17b-Progenitorzellen verwendet. Als Kontrolle der Versuchsreihe beinhaltete die zweite Gruppe murine MHECs (Mäuseherzendothelzellen). Die Experimente der beiden zuvor angeführten Gruppen sind als Vorversuche zu betrachten. In der dritten Gruppe wurden murine T17b-Progenitorzellen eingesetzt, die mit dem bispezifischen GPVI-Fc-Aptamer (20 µg/ml) 30 Minuten vorinkubiert wurden. In der vierten Gruppe wurden murine T17b-Progenitorzellen injiziert, die mit dem GPVI-Fc-Nonsenseaptamer (20 µg/ml) 30 Minuten vorinkubiert wurden. Diese ist als Kontrollgruppe gegenüber der dritten Versuchsgruppe anzusehen. Es wurden jeweils 50.000 DCF gefärbte Zellen über den Venenkatheter appliziert.

#### **4.3.4.2 Intravitalmikroskopische Aufnahmen**

Zuerst wurde eine Übersichtsaufnahme der jeweiligen Arteria carotis communis mit einem 10x Objektiv angefertigt. Bei der anschließenden Auswertung diente diese Aufnahme der Bestimmung des Gefäßdurchmessers. Für die folgenden intravitalmikroskopischen Aufnahmen von jeweils 30 Sekunden Länge wurde ein 20x Objektiv benutzt. Danach wurden vier Aufnahmen vor Ligatur gemacht, die herzwärts beginnen und entlang der A. carotis communis in Richtung cranial ausgeführt wurden. Nun wurde eine fünfminütige Ligatur gesetzt, wodurch eine Endothelschädigung hervorgerufen wurde (Abb. 16.3). Nach dem Lösen der Ligatur wurden vier Aufnahmen pro Zeitfenster zu den Zeitpunkten 5, 10, 30 und 60 Minuten nach Ligatur aufgenommen. Eine Kamera, die am Fluorezenzmikroskop angebracht war, übertrug die Aufnahmen auf einen Monitor. Es erschien ein schwarz-weiß Bild, wobei die Endothelwand sich als fast schwarz und die Zellen als weiß leuchtend darstellten. Die Aufnahmen wurden auf CD aufgezeichnet und nach Ende der Versuchsreihe ausgewertet.

#### **4.3.4.3 Auswertung der Aufnahmen**

Während der Versuche wurde ein Datenblatt für jede Maus erstellt und darauf die Tracks zu den jeweiligen Zeitpunkten eingetragen, um so jeden einzelnen Versuchsablauf exakt nachvollziehen zu können. Durch die Beschriftung der CDs mit dem jeweiligen Versuchsdatum und der Projektbezeichnung konnte auch nach den Experimenten eine genaue Zuordnung erfolgen.

Die Auswertung der Aufnahmen wurde in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Der Gefäßdurchmesser der A. carotis wurde mit Hilfe einer Schablone mit Mikrometerskala auf dem Monitor ermittelt. Danach wurden die einzelnen Videosequenzen ausgewertet, indem auf dem Monitor eine Schablone mit einem Fenster von entsprechend 150  $\mu\text{m}$  Länge und 100  $\mu\text{m}$  Breite angebracht wurde. Zuerst wurden die transient adhärenenten Zellen gezählt. Diese Art von Zellen wurde dadurch definiert, dass sie weniger als 15 Sekunden am Endothel haften bleiben. Im Gegensatz dazu wurden Zellen, die mindestens 15 Sekunden oder länger an der gleichen Stelle am Endothel haften, als adhärenente Zellen bezeichnet. Zuletzt wurden noch alle Zellen ausgezählt, die über die gesamte Strecke des Auszählfensters rollten.

## 5. Statistische Auswertung

Alle Messwerte der Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM = standard error of the mean) angegeben. Dieser ist ein Streuungsmaß für die Verteilung der arithmetischen Mittelwerte in Stichproben des Umfangs n.

Berechnung des Standardfehlers des Mittelwerts: 
$$SEM = \frac{\text{Standardabweichung}}{\sqrt{\text{Stichprobenumfang}}}$$

Der Vergleich der Mittelwerte der jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppe wurden mit dem t-Test ausgewertet und auf ihre statistische Signifikanz hin überprüft. Ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen und in den Schaubildern mit einem Stern gekennzeichnet. Die Durchführung der statistischen Berechnungen erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (Version 3.0, Fa. GraphPad Software Incorporated).

# ERGEBNISSE

## I. Flusskammerversuche

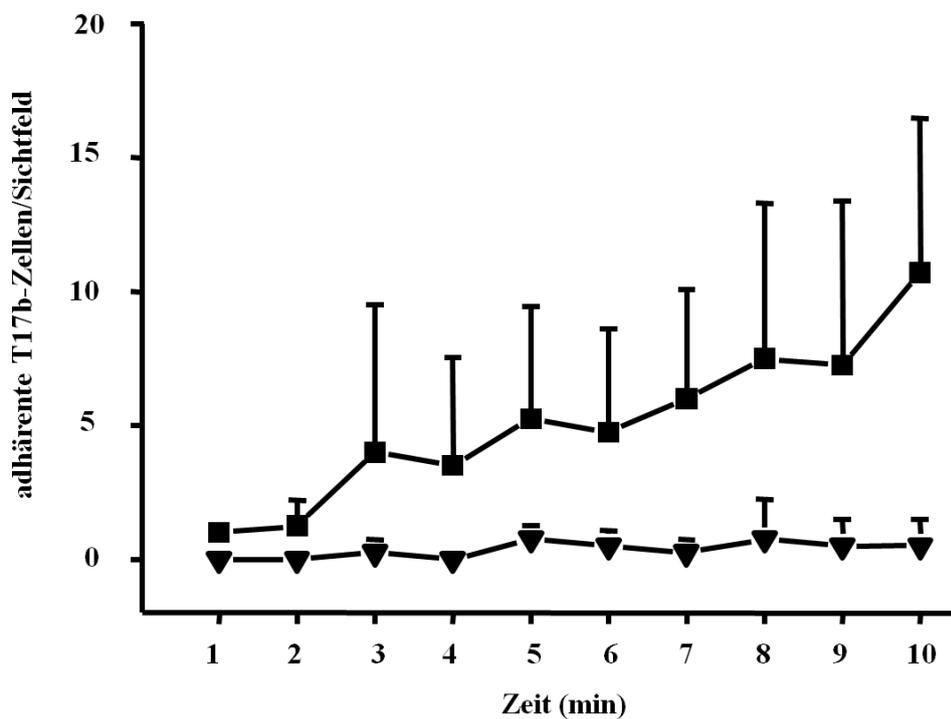
Um das entworfene chimäre Konstrukt unter physiologischen Flussbedingungen zu untersuchen, wurde eine Parallelplatten-Flusskammer verwendet. Durch dieses *in vitro*-Modell sollte eine Gefäßverletzung imitiert werden, bei der Kollagen freiliegt. Mit Kollagen beschichtete Deckgläser wurden zusätzlich mit dem chimären Konstrukt (10 µg/ml) oder im Vergleich dazu mit anderen Substanzen inkubiert und kamen in der Flusskammer zum Einsatz. Außerdem wurden in weiteren Flusskammerversuchen die T17b-Zellen mit dem Konstrukt vorinkubiert.

Die T17b-Zellen flossen mit einer Scherrate von 15 ml/h über die Deckgläser. Dabei hafteten diese murinen Progenitorzellen unter Flussbedingungen in zunehmende Maße steigend innerhalb des Zeitraumes von 10 Minuten auf dem GPVI-Fc-Aptamer, aber nur in geringem Maße auf Kollagen Typ I allein. Nach der Ermittlung der Adhäsionskinetik wurde die Durchströmung der Flusskammer für die folgenden Experimente auf 10 Minuten festgelegt. Im Anschluss an diese Zeit wurden dann 4 Aufnahmen von jeweils 30 Sekunden von nicht überlappenden Abschnitten der Flusskammer angefertigt. Für die Auswertung wurden jeweils die adhärenen Zellen pro Aufnahme gezählt und dann der Mittelwert errechnet. In den folgenden Schaubildern sind alle Werte mit einem Stern (\*) gekennzeichnet, die als signifikant mit  $p < 0,05$  eingestuft werden.

### 1. Die Bindungsaffinität von T17b-Zellen über einen Zeitraum von 10 Minuten

T17b Zellen wurden hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens innerhalb eines Zeitverlaufs von 10 Minuten untersucht. Im Vergleich zur Negativkontrolle (chimäres Aptamer-BSA Konstrukt) zeigten T17b Zellen, die mit dem chimären Aptamer-GPVI-Fc Konstrukt vorinkubiert wurden, in den ersten 10 Minuten eine erhöhte und ansteigende Bindungsfähigkeit auf einer Kollagenmatrix. Dieser Versuch wurde in der Flusskammer durchgeführt (Abb. 18). Beim BSA-Aptamer wurde das GPVI-Fc als spezieller Kollagenrezeptor durch BSA ersetzt, welches unspezifisch an Kollagen bindet.

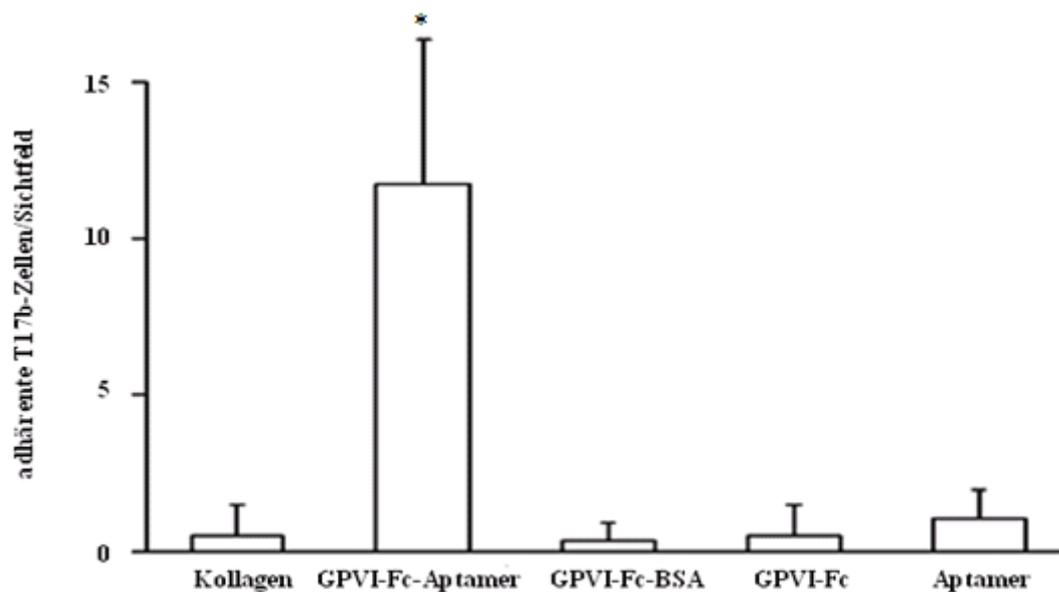
Die mit GPVI-Fc-Aptamer inkubierten T17b-Zellen starten in der ersten Minute mit dem Wert 1, der dann in der 7. Minute bei 6 liegt und bis zur 10. Minute bis auf 10,67 ansteigt. Im Gegensatz dazu beginnen die mit BSA-Aptamer inkubierten T17b-Zellen mit dem Wert 0 und pendeln sich dann bis zur 10. Minute um den Wert 0,5 ein. Hierbei unterliegen die mit BSA-Aptamer vorinkubierten T17b-Zellen im gesamten Zeitraum von 10 Minuten keinen größeren Schwankungen.



**Abb. 18:** Bindungseigenschaften der T17b-Zellen, die mit GPVI-Fc-Aptamer ( ■ ) (10 µg/ml) und als Negativkontrolle mit BSA-Aptamer ( ▼ ) vorinkubiert wurden, im Zeitraum von 10 Minuten (n = 4); n.s.

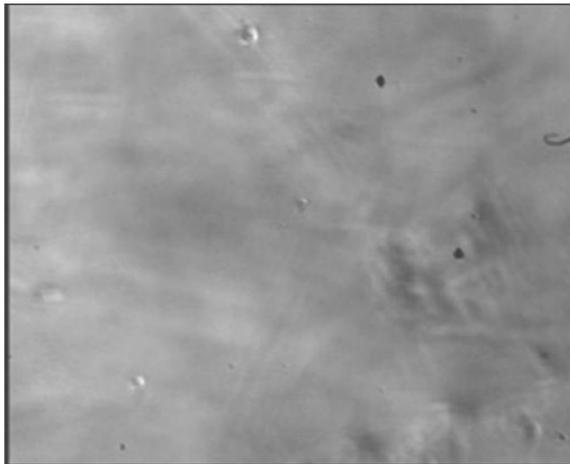
## 2. Die Adhäsion von T17b-Zellen an unterschiedlichen Beschichtungen (an GPVI-Fc-Aptamer und seinen Einzelkomponenten)

Im Vergleich zur Kontrolle (GPVI-Fc-BSA) konnte eine 10-fach erhöhte Adhäsion der T17b-Zellen nach Vorinkubation der Deckgläser mit dem GPVI-Fc-Aptamer beobachtet werden. Die Adhäsion der T17b-Zellen auf Kollagen allein, auf GPVI-Fc vorinkubiertem Kollagen oder auf Aptamer vorinkubiertem Kollagen war unerheblich (Abb. 19).

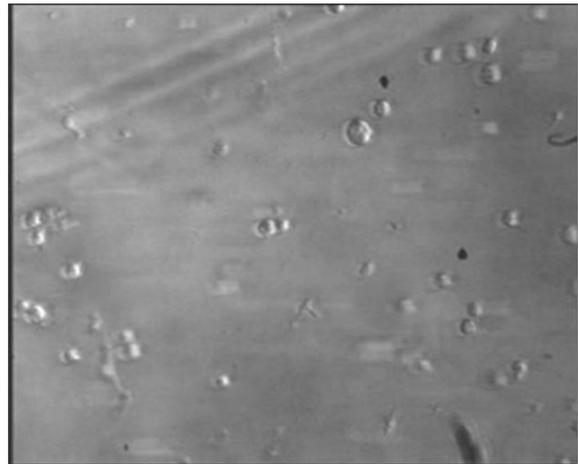


**Abb. 19:** Anzahl der adhärenen T17b-Zellen in Abhängigkeit der Beschichtung der Deckgläser mit Kollagen allein, zusätzlich mit GPVI-Fc-Aptamer, GPVI-Fc-BSA, GPVI-Fc oder Aptamer (10 µg/ml) inkubiert (n = 4), \* p < 0,05.

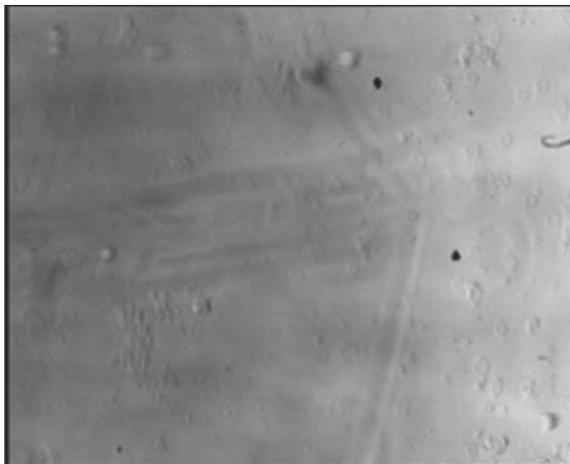
Die in der Abbildung 20 dargestellten Photographien aus dem vorangegangenen Flusskammerversuch veranschaulichen die unterschiedliche Anzahl der adhärenen T17b-Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen, wie Kollagen, GPVI-Fc-Aptamer, GPVI-Fc-BSA, GPVI-Fc und Aptamer. Es ist deutlich erkennbar, dass das Bild mit der GPVI-Fc-Aptamer Beschichtung die meisten adhärenen T17b-Zellen aufweist.



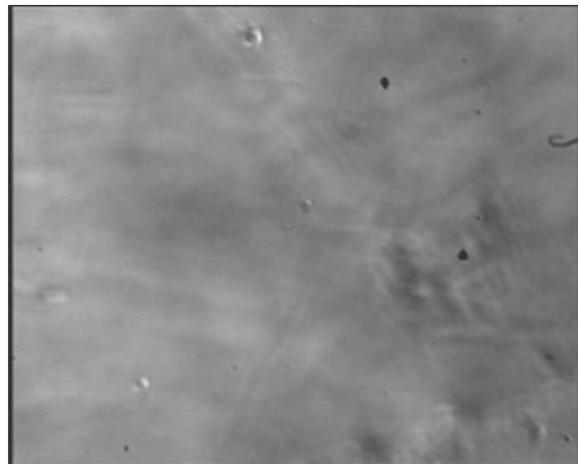
**Kollagen**



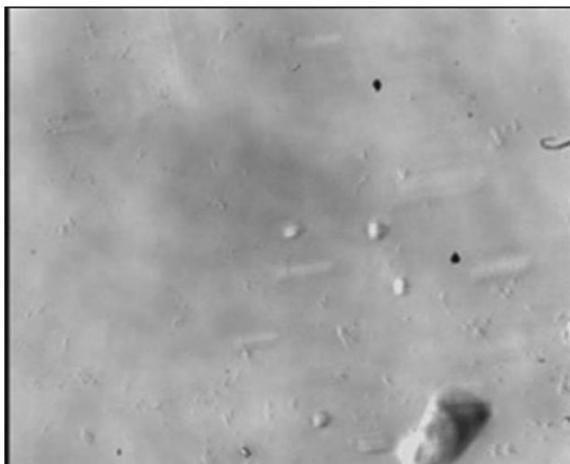
**GPVI-Fc-Aptamer**



**GPVI-Fc-BSA**



**GPVI-Fc**



**Aptamer**

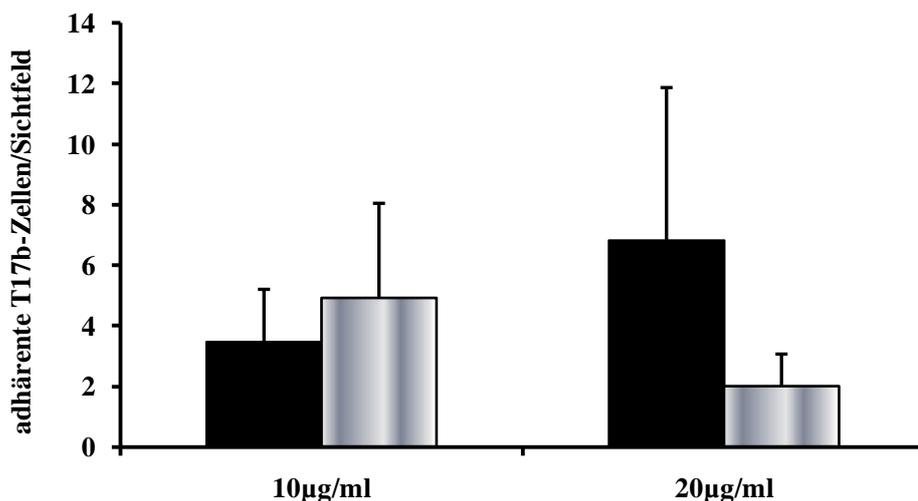
**Abb. 20:** Mikroskopische Bilder von adhärennten T17b-Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen. Die Daten sind in Abb. 19 zusammenfassend dargestellt.

### 3. Das Bindungsverhalten der T17b-Zellen in Abhängigkeit von der GPVI-Fc-Aptamer-Konzentration

In einem weiteren Flusskammerversuch wurden T17b-Zellen zum einen mit dem GPVI-Fc-Aptamer und zum anderen als Kontrolle mit dem Nonsense-Aptamer vorinkubiert. Das Nonsense-Aptamer ist mit dem GPVI-Fc-Aptamer nahezu identisch und enthält somit auch das GPVI-Fc. Allerdings wurde beim Nonsense-Aptamer die T17b-Zellbindungsstelle modifiziert. In diesem Versuch wurden die Auswirkungen der Konzentrationen von 10 µg/ml und 20 µg/ml gegenübergestellt. Die Deckgläser waren wiederum mit Kollagen beschichtet.

Im Gegensatz zur Konzentration von 10 µg/ml ( $3 \pm 2$  adhärenente Zellen) haften bei der eingesetzten Konzentration von 20 µg/ml ( $7 \pm 5$  adhärenente Zellen) ca. doppelt so viele T17b-Zellen, die mit GPVI-Fc-Aptamer vorinkubiert waren. Auch ist hierbei der Unterschied gegenüber der Kontrolle ersichtlich. Beim Nonsense-Aptamer mit einer Konzentration von 20 µg/ml liegt der Mittelwert bei  $2 \pm 1$  und im Gegensatz dazu bei einer Konzentration von 10 µg/ml bei  $5 \pm 3$  adhärenenten T17b-Zellen (Abb. 21).

Diese Ergebnisse liefern die Grundlage für die im Carotismodell eingesetzte Konzentration von 20 µg/ml.



**Abb. 21:** Anzahl der adhärenenten T17b-Zellen, vorinkubiert mit GPVI-Fc-Aptamer (■) oder Nonsense-Aptamer (▒); Konz. von 10 und 20 µg/ml im Vergleich (n = 3); n.s.

## **II. Untersuchungen im Carotismodell mit Hilfe der Intravitalmikroskopie**

Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurden an C57BL/6J Mäusen durchgeführt. An der A. carotis dieser Mäuse wurde eine Endothelverletzung mittels einer fünfminütigen Ligatur hervorgerufen. Hierbei wurde durch die Zerstörung der Endothelzellschicht Kollagen freigelegt. Dies führte zur Adhäsion von Endothel- bzw. Progenitorzellen. Die verwendeten Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF markiert und machen somit eine Interaktion mit dem Endothel durch das Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Es wurden intravitalmikroskopische Aufnahmen vor Ligatur, 5, 10, 30 und 60 Minuten nach Lösen der Ligatur angefertigt. Bei Auswertung dieser Aufnahmen wurde eine Differenzierung in transient adhärenente, rollende und adhärenente Zellen vorgenommen. Die transient adhärenenten Zellen wurden durch das Haften an der Gefäßwand weniger als 15 Sekunden definiert. Des Weiteren wurden als rollende Zellen bezeichnet, welche über das gesamte Auswertungsfenster (150 x 100 µm) entlang rollten. Zuletzt sind noch die adhärenenten Zellen zu charakterisieren, die länger als 15 Sekunden an der Gefäßwand haften bleiben.

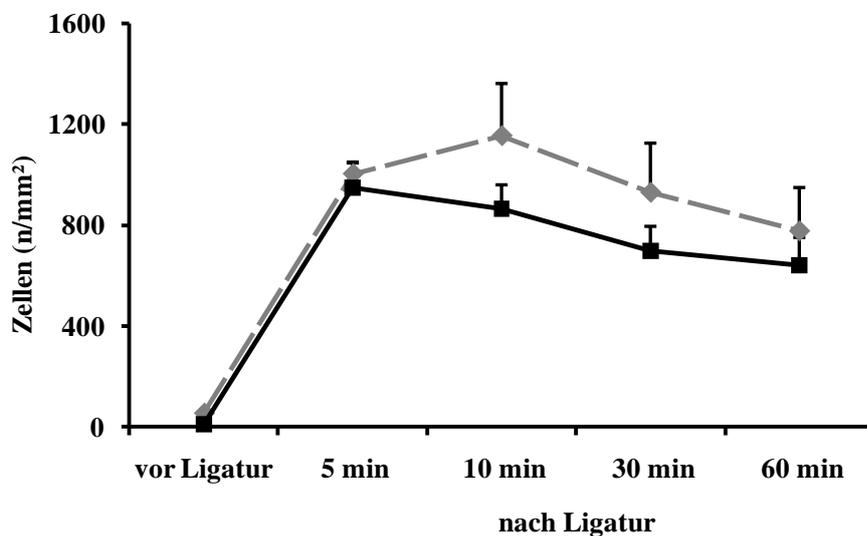
Im ersten Teil der Versuche im Carotismodell wurden die MHEC mit den T17b-Zellen verglichen. Anschließend daran wurden im zweiten Teil T17b-Zellen zum einen mit GPVI-Fc-Aptamer und zum anderen als Kontrolle mit Nonsense-Aptamer vorinkubiert. Signifikante Werte ( $p < 0,05$ ) sind in den folgenden Abbildungen mit einem Stern (\*) markiert.

### **1. MHEC und T17b-Zellen im Vergleich**

In den Vorversuchen wurden murine T17b-Progenitorzellen den murinen Herzendothelzellen (MHEC) gegenübergestellt. Hierbei wurden die intravitalmikroskopischen Aufnahmen mit der Differenzierung in transient adhärenente, rollende und adhärenente Zellen nach dem oben erwähnten Vorgehen ausgewertet.

## 1.1 Transient adhärenente Zellen

Die folgende Graphik zeigt, dass die Kurve der MHE-Zellen [ $53,488 \pm 45,845$ ;  $1005,104 \pm 206,848$ ;  $1156,106 \pm 195,467$ ;  $930,697 \pm 172,416$ ;  $777,506 \pm 152,844$ ] oberhalb der der T17b-Zellen [ $9,574 \pm 5,065$ ;  $948,981 \pm 98,488$ ;  $864,215 \pm 96,358$ ;  $696,997 \pm 98,810$ ;  $641,518 \pm 110,096$ ] in der Kategorie der transient adhärenente Zellen im Zeitverlauf innerhalb einer Stunde verläuft. Im Vergleich stellen die transient adhärenente Zellen den größten Teil an mit dem Endothel interagierenden Zellen insgesamt dar (Abb. 22).



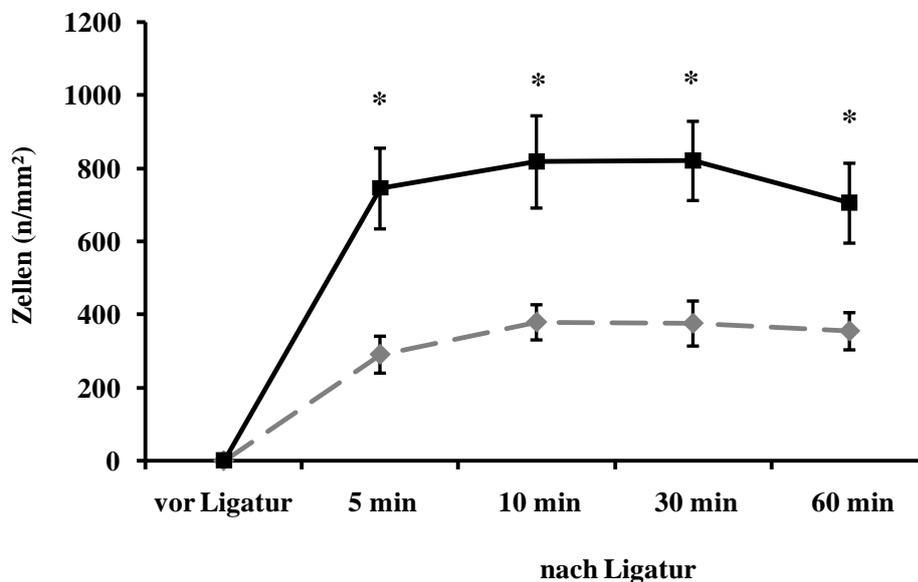
**Abb. 22:** Anzahl transient adhärenente Zellen bei Vergleich muriner Endothelzellen (MHEC) (—◆—) mit T17b-Progenitorzellen (—■—) im Carotismodell (MHEC: n = 12; T17b: n = 9); n.s.

## 1.2 Rollende Zellen

Die rollenden Zellen nehmen bei den MHE-Zellen (n = 12) bzw. den T17b-Zellen (n = 9) einen Wert von Null an (die Daten werden nicht graphisch dargestellt).

### 1.3 Adhärenente Zellen

Adhärenente T17b-Zellen haften vermehrt im Gegensatz zu adhärenenten MHE-Zellen. Beide Kurven starten bei dem Wert 0, vor Setzen der Ligatur. Der weitere Verlauf der adhärenenten T17b-Zellen liegt zu den weiteren Zeitpunkten 5 min; 10 min; 30 min und 60 min nach Ligatur bei  $744,925 \pm 110,337$ ;  $817,625 \pm 126,065$ ;  $820,354 \pm 108,232$  und  $704,865 \pm 109,145$ . Im Vergleich dazu nehmen die adhärenenten MHE-Zellen zu den genannten Zeitpunkten folgende Werte an:  $290,947 \pm 50,551$ ;  $379,320 \pm 48,052$ ;  $376,077 \pm 61,509$ ;  $354,967 \pm 50,822$ . Alle Werte dieser Graphik sind mit  $p < 0,05$  signifikant (Abb. 23).

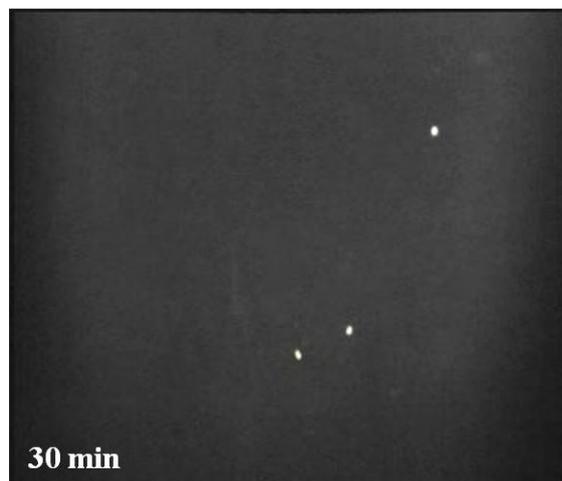
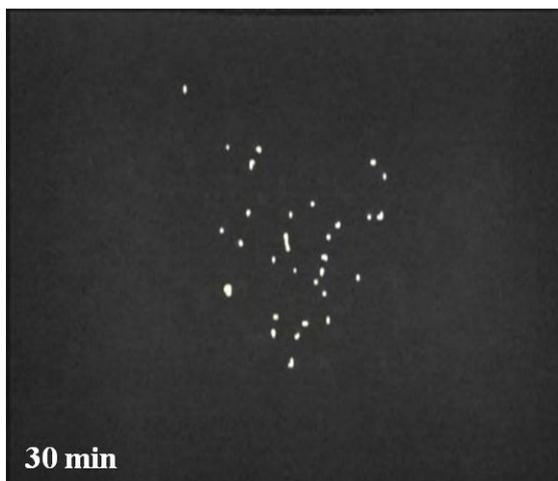
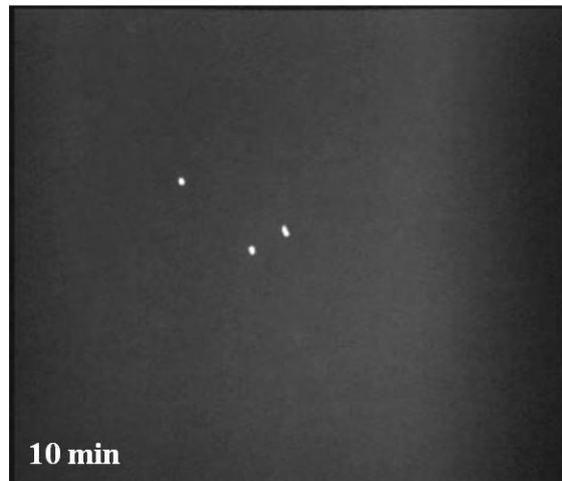
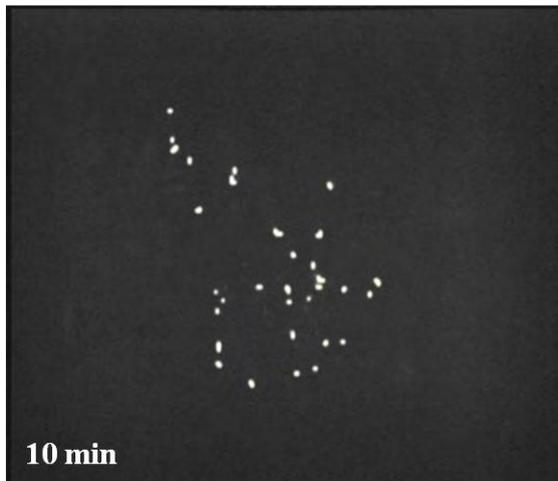
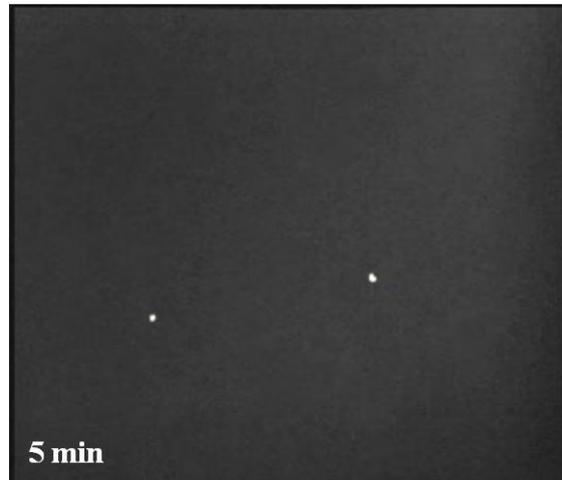
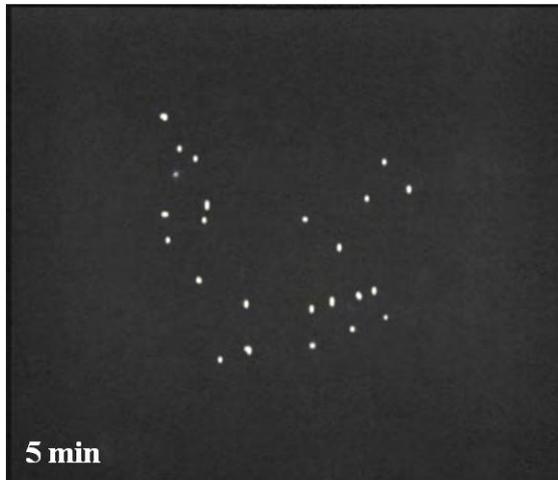


**Abb. 23:** Anzahl adhärenenter Zellen bei einem Vergleich muriner Endothelzellen (MHEC) (—◆—) mit T17b-Progenitorzellen (—■—) im Carotismodell (MHEC:  $n = 12$  ; T17b:  $n = 9$ ), \*  $p < 0,05$ .

Die Abbildung 24 zeigt beispielhaft Bilder aus den intravitalmikroskopischen Aufnahmen. Darauf ist die Arteria carotis einer Maus nach Ligatur abgebildet. Die weiß leuchtenden Punkte sind die adhärenenten T17b- bzw. MHE-Zellen, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF gefärbt wurden. Es ist im Zeitverlauf von 5, 10 und 30 Minuten nach Ligatur zu sehen, dass die T17b-Zellen im Vergleich zu den MHE-Zellen vermehrt haften bleiben.

**T17b-Zellen**

**MHE-Zellen**



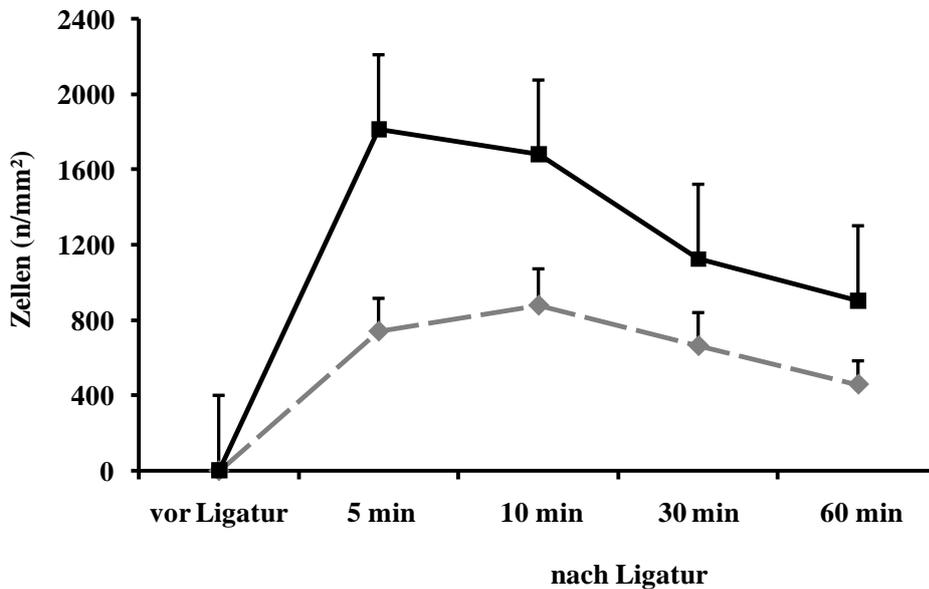
**Abb. 24:** Mikroskopische Bilder adhärenter T17b- und MHE-Zellen im Vergleich, nach *Ligatur* der *A. carotis*.

## **2. T17b-Zellen inkubiert mit GPVI-Fc-Aptamer bzw. Nonsense-Aptamer im Vergleich**

In den folgenden Abbildungen werden die Versuche veranschaulicht, bei welchen murine T17b-Progenitorzellen entweder mit GPVI-Fc-Aptamer oder mit Nonsense-Aptamer vorinkubiert wurden. Die dabei entstandenen intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurden, wie oben bereits beschrieben, ausgewertet. Bei der Auswertung wurde auch hier die Unterteilung in die Kategorien der transient adhären, rollenden und adhären Zellen vorgenommen.

### **2.1 Transient adhären T17b-Zellen**

Die Kurve der transient adhären T17b-Zellen steigt bis ungefähr zehn Minuten nach Lösen der Ligatur an und fällt dann im weiteren Verlauf wieder etwas ab (Abb. 25). Die Mittelwerte der T17b-Zellen, die mit GPVI-Fc-Aptamer vorinkubiert sind, betragen zu den jeweiligen Zeitpunkten [vor Ligatur; 5 min; 10 min; 30 min; 60 min nach Ligatur]:  $3,821 \pm 2,527$ ;  $1813,296 \pm 306,875$ ;  $1678,953 \pm 339,031$ ;  $1125,113 \pm 242,757$ ;  $904,883 \pm 257,417$  und liegen somit über denen der mit Nonsense-Aptamer vorinkubierten Zellen [ $0 \pm 0$ ;  $741,153 \pm 177,977$ ;  $878,731 \pm 197,146$ ;  $663,913 \pm 179,605$ ;  $459,544 \pm 127,531$ ]. Die transient adhären T17b-Zellen zählen zu der größten Gruppe an mit dem Endothel interagierenden Zellen insgesamt.



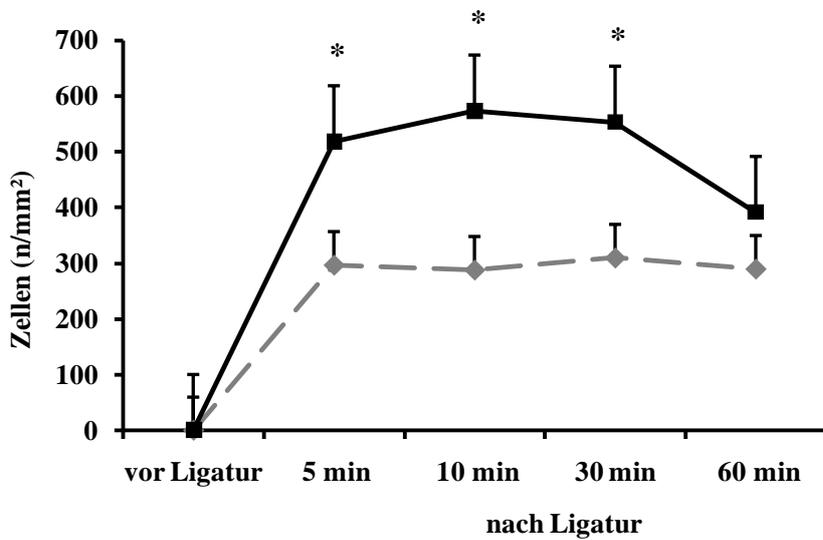
**Abb. 25:** Anzahl transient adhärenter Zellen bei einem Vergleich von T17b-Progenitorzellen mit GPVI-Fc-Aptamer (—■—) und als Kontrolle mit Nonsense-Aptamer (—◆—) im Carotismodell (GPVI-Aptamer: n = 9; Nonsense-Aptamer: n = 8); n.s.

## 2.2 Rollende Zellen

Bei den rollenden T17b-Zellen liegt der Wert für beide Gruppen bei Null (die Daten werden nicht graphisch dargestellt).

## 2.3 Adhärenente T17b-Zellen

Im anschließenden Schaubild (Abb. 26) verzeichnen die T17b-Zellen einen Anstieg bis ca. zur 10. Minute und bleiben dann im weiteren Verlauf auf gleicher Höhe, wobei sie um die 60. Minute wieder etwas abfallen. Wie auch zuvor dominiert hier die Haftung der vorinkubierten T17b-Zellen mit GPVI-Fc-Aptamer. Die adhärenenten T17b-Zellen mit GPVI-Fc-Aptamer nehmen die folgenden Mittelwerte  $0 \pm 0$ ;  $518,175 \pm 29,029$ ;  $573,258 \pm 69,462$ ;  $553,261 \pm 75,017$ ;  $391,339 \pm 44,129$  im Zeitraum von einer Stunde an. Im Gegensatz dazu sind die Werte der adhärenenten T17b-Zellen mit Nonsense-Aptamer als Kontrolle zu den verschiedenen Zeitpunkten  $0 \pm 0$ ;  $297,061 \pm 25,772$ ;  $288,247 \pm 20,247$ ;  $309,967 \pm 35,744$ ;  $290,019 \pm 30,795$ .

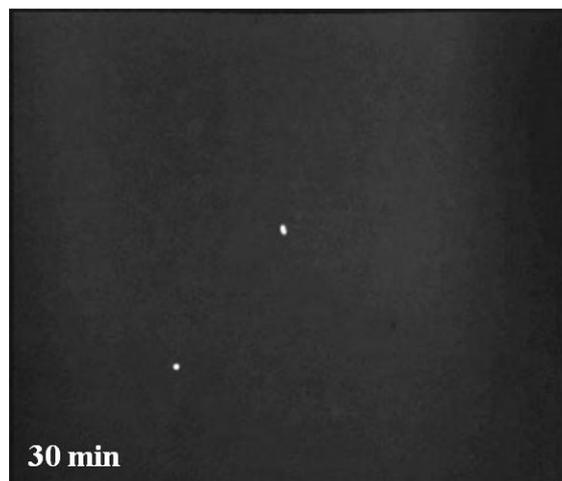
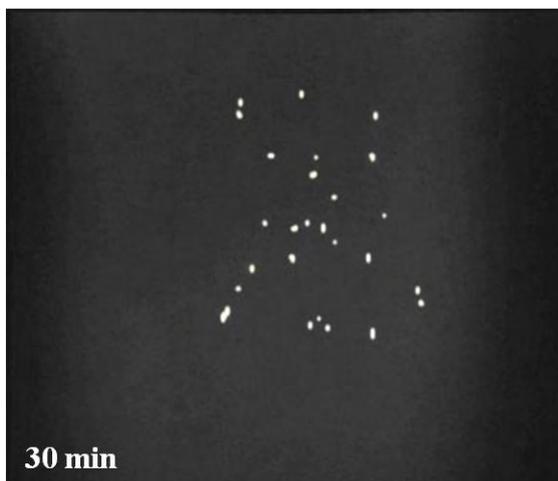
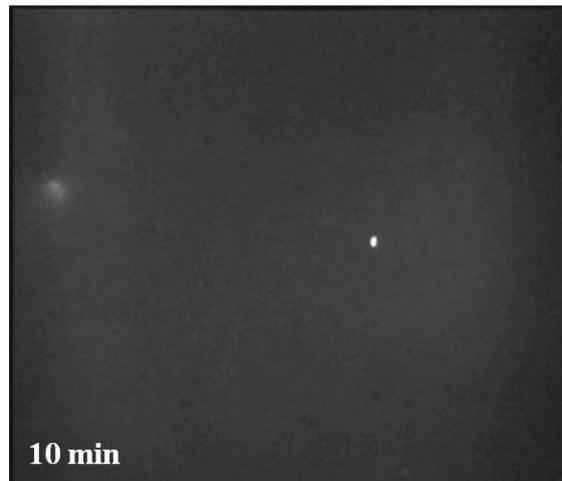
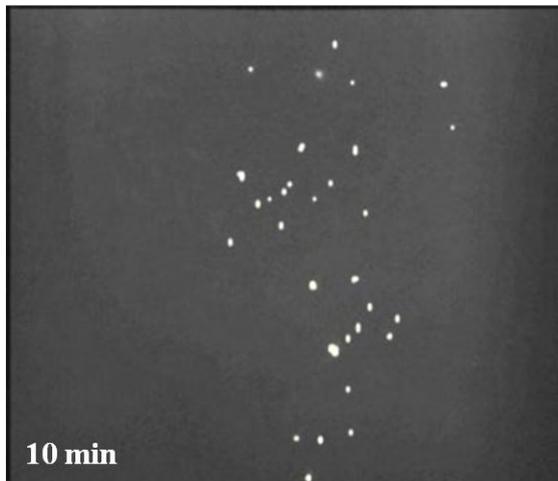
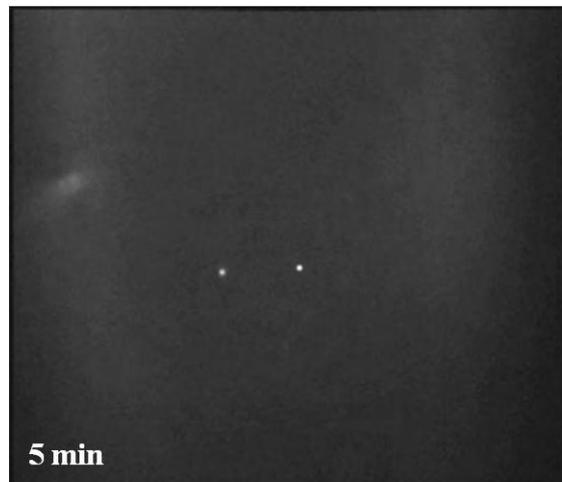
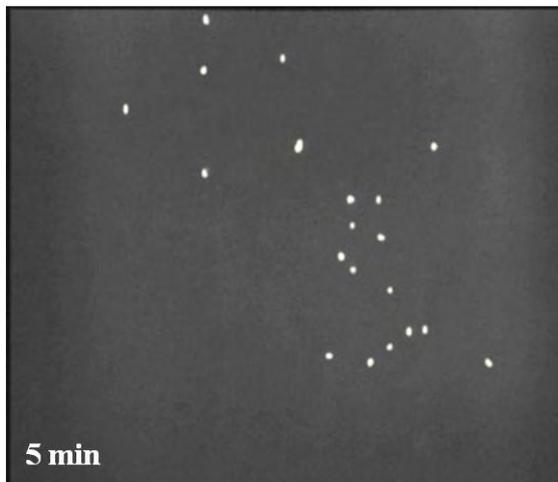


**Abb. 26:** Anzahl adhärenter Zellen bei einem Vergleich von T17b-Progenitorzellen mit GPVI-Fc-Aptamer (—■—) und als Kontrolle mit Nonsense-Aptamer (—◆—) im Carotismodell (GPVI-Aptamer: n = 9; Nonsense-Aptamer: n = 8), \* p < 0,05.

Die folgenden Photographien (Abb. 27) der intravitalmikroskopischen Aufnahmen stellen die Arteria carotis einer Maus zu den Zeitpunkten 5, 10 und 30 Minuten nach Ligatur dar. Die adhärenten T17b-Zellen werden durch die Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF als weiße leuchtende Punkte sichtbar. Es sind vermehrt adhärenente T17b-Zellen bei Verwendung des Adhäsionsmoleküls GPVI-Fc-Aptamer im Vergleich zur Kontrollgruppe (Nonsense-Aptamer) zu beobachten.

**GPVI-Aptamer**

**Nonsense-Aptamer**



**Abb. 27:** Mikroskopische Bilder von adhärennten T17b-Zellen zum einen inkubiert mit GPVI-Fc-Aptamer und zum anderen als Kontrolle mit dem Nonsense-Aptamer, *nach Ligatur* der A. carotis.

## **DISKUSSION**

Die Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität ist von entscheidender Bedeutung für das Verhindern der atherosklerotischen Plaquerosion und -ruptur, der myokardialen Infarktbildung und dem damit plötzlich verursachten kardiovaskulären Tod (Burke et al. 1997). Eine Unterbrechung dieser Barriere, z.B. durch eine Gefäßverletzung oder Ruptur einer atherosklerotischen Plaque, exponiert verschiedene Bestandteile der subendothelialen Matrix einschließlich Kollagen, Fibronectin oder vWF (Ruggeri 2002). Jedoch konnte in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass embryonale endotheliale Progenitorzellen *in vitro* nur in geringem Maß an exponiertem Kollagen haften. Sie exprimieren die Integrine VLA-4 und PSGL-1, über welche sie eine feste Adhäsion an Thrombozyten unter arteriellen Scherbedingungen erlangen (Langer et al. 2006). Die Adhäsion der murinen embryonalen endothelialen Progenitorzellen an die Kontrollsubstanzen ist wie auch an Kollagen nicht wesentlich erhöht. Gegründet auf diesem Wissen, wurde ein chimäres Konstrukt entwickelt, dass das lösliche Glykoprotein VI (GPVI = Thrombozytenkollagenrezeptor) (Massberg et al. 2004) sowie ein Aptamer spezifisch für die embryonalen endothelialen Progenitorzellen enthält.

### **1. Diskussion der Versuchsdurchführung**

#### **1.1 Verwendung von hämatopoetischen Stammzellen**

Embryonale endotheliale Progenitorzellen stellen eine zirkulierende, knochenmarksabgeleitete Zellpopulation der großen nichtleukozytären Zellen dar, die an der Gefäßreparatur und an der Hämostase beteiligt ist. Als Antwort auf Zytokinstimulation und Ischämie werden diese Zellen vom Knochenmark gebildet, dann erfolgt das Homing zum ischämischen Gewebe, um dort zur Neovaskularisation und Angiogenese beizutragen (Takahashi et al. 1999, Asahara et al. 1997, Kamihata et al. 2001, Gill et al. 2001). Außerdem spielen embryonale endotheliale Progenitorzellen eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität und fungieren als „Reparatur“-Zellen als Reaktion auf endotheliale Verletzungen (Walter et al. 2002, Hill et al. 2003). Einige Forschergruppen haben Kolonien von CD34<sup>+</sup>- Zellen *in vitro* bis zum Stadium von ausgereiften Endothelzellen kultiviert. Hiermit sollte gezeigt werden, dass embryonale endotheliale Progenitorzellen die Fähigkeit besitzen, die Endothelialisierung zu fördern (Herdeg 2003). Folglich wurden

verschiedene klinische Studien bezüglich des akuten Myokardinfarktes durchgeführt. Hierbei wurden selektierte oder unselektierte Knochenmarkzellen in die Koronararterien oder direkt in das Infarktgebiet injiziert (Stamm et al. 2003). Im Vergleich zu den Kontrollen verbesserte sich die linke Kammerfunktion der Patienten, die mit Stammzellen behandelt wurden, erheblich. Jedoch korrelierte die Zahl der rekrutierten Stammzellen zum Infarktgebiet nicht mit der Verbesserung der Herzfunktion. Außerdem wurden nur weniger als 3% der transplantierten Zellen im Infarktgebiet festgehalten (Wollert et al. 2005).

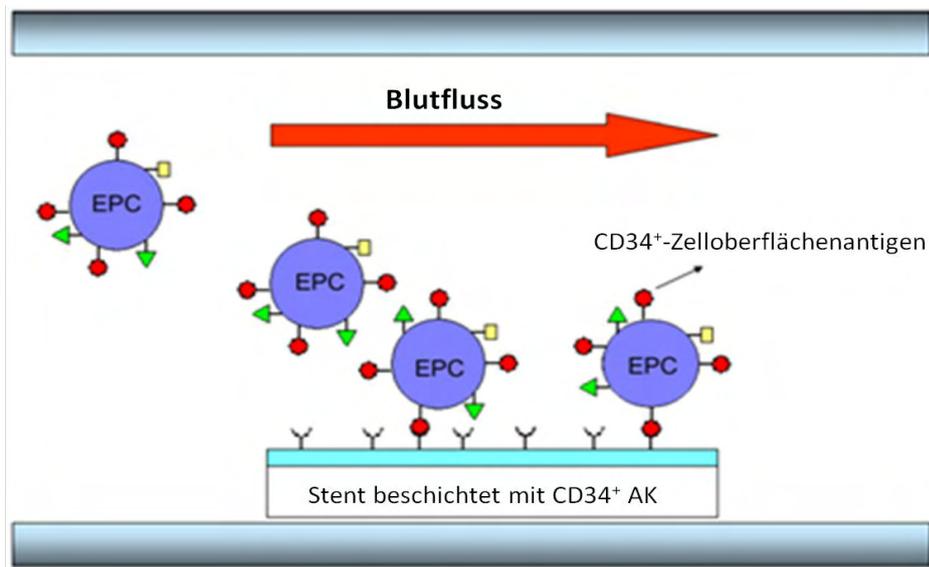
Momentan gibt es vier verschiedene Substanzen, mit denen Stents beschichtet sein können, um dadurch endotheliale Progenitorzellen anzulocken. Hierzu zählen cRGD Peptide, magnetische Moleküle, CD34<sup>+</sup>-Antikörper und Aptamere. Mit diesen Beschichtungen soll einer Restenose vorgebeugt und das Risiko für Stentthrombose drastisch reduziert werden (Avci-Adali et al. 2008).

In einer Studie wurden mit Integrin bindendes zyklisches RGD (Arginin-Glycin-Aspartat) Peptid beschichtete Stents *in vitro* und *in vivo* in einem Schweinemodell eingesetzt. Es wird vermutet, dass das Homing und die Differenzierung von endothelialen Progenitorzellen abhängig von der Adhäsion von Integrinen sind. Durch diese Stentbeschichtung konnte die Neointimabildung und die Stenose reduziert werden (Blindt et al. 2006). Gleiche Effekte der beschleunigten Reendothelialisierung *in vivo* konnten Walter et al. nach kurzer Behandlungsdauer mit Statinen beobachten. Da hierdurch die zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen und ihre Adhäsivität durch Steigerung der Integrine auf ihrer Oberfläche erhöht wird (Walter et al. 2002). Es ist zu erwähnen, dass Integrine nicht ausschließlich auf endothelialen Progenitorzellen gefunden werden, wodurch diese Therapiemethode unspezifisch ist (Avci-Adali et al. 2008).

In einer anderen Studie wurden durch Neodymium magnetisierte Stents in die Koronar- und Femoralarterie von Schweinen implantiert. Danach wurden mit magnetischen Substanzen (z.B. Eisen) markierte endotheliale Progenitorzellen lokal injiziert. Das Resultat zeigt, dass die Anzahl der markierten Zellen im Stentgebiet erhöht ist. Im Gegensatz zu den anderen Substanzen, aus denen die Beschichtung bestehen kann, erfordert die magnetische Beschichtung die Isolation und magnetische Markierung von endothelialen Progenitorzellen *in vitro*. Dieser Ansatz ist kostenintensiv, zeitaufwändig und kann bei einem Notfallpatienten nicht angewandt werden. Außerdem sind noch keine Langzeitversuche durchgeführt worden, welche Aufschluss über die Steigerung der Endothelialisierung zulassen. Auch ist die

Verwendung von biokompatiblen Partikeln notwendig, da durch die bisherigen magnetischen Substanzen u.a. Entzündungen hervorgerufen werden (Pislaru et al. 2006).

Darüber hinaus kamen in einer weiteren Studie mit CD34<sup>+</sup>-Antikörpern beschichtete koronare Stents zum Einsatz (Abb. 28), die bei Patienten mit Koronarstenosen implantiert wurden. Durch diese Beschichtung sollen die embryonalen endothelialen Progenitorzellen aus dem Blutstrom gezielt an das Stentgebiet gebracht werden. Diese Technik war praktikabel und sicher, obwohl nur ein Monat lang das antithrombotische Medikament Clopidogrel verabreicht wurde. Eine frühe Reendothelialisierung des Stentbereiches und Reparatur des Endothels nach Verletzung konnte beobachtet werden (Aoki et al. 2005). Bei Rotmans et al. kamen mit CD34<sup>+</sup>-Antikörper beschichtete Stents und Transplantate im Schweinemodell zum Einsatz. Hierbei konnte eine schnelle Endothelialisierung nachgewiesen, jedoch damit verbunden auch eine Erhöhung der neointimalen Hyperplasie festgestellt werden (Rotmans et al. 2005). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die durch CD34<sup>+</sup>-Antikörper angelockten CD34<sup>+</sup>-Zellen noch das Potential zur Differenzierung in vaskuläre glatte Muskelzellen besitzen (Shimizu et al. 2001, Simper et al. 2002). Des Weiteren geben endotheliale Progenitorzellen Zytokine, wie z.B. den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ab, der nicht nur die Proliferation und Migration von ihnen selbst sondern auch von vaskulären glatten Muskelzellen beeinflusst (Grosskreutz et al. 1999). Diese Studie ist als kritisch zu betrachten, weil hierbei unter anderem humane CD34<sup>+</sup>-Antikörper in Schweinen eingesetzt wurden. Interessanterweise haben nur ca. 0,4% von der gesamten CD34<sup>+</sup>-Population die Fähigkeit, sich zu ausgereiften adhärennten Endothelzellen zu differenzieren. Dies bedeutet, dass 99,6% der adhärennten Zellen nur vermeintlich endotheliale Progenitorzellen sind (Peichev et al. 2000).



**Abb. 28:** Stentbeschichtung mit CD34<sup>+</sup>-Antikörpern (AK) (nach Avci-Adali et al. (2008), New strategies for *in vivo* tissue engineering by mimicry of homing factors for self-endothelialisation of blood contacting materials. Biomaterials, Elsevier).

Eine neue molekulare Strategie zur Steigerung der Adhäsion von zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen an das Implantat ist das Nutzen der hohen Affinität zwischen den Aptameren und ihren Zielzellen. Hoffmann et al. generierte ein Aptamer, das zum einen porcine CD31<sup>+</sup>-Zellen bindet und zum anderen eine spezifische Bindung mit dem Stentmaterial eingeht. Dadurch konnte die Effizienz der Anlockung von endothelialen Progenitorzellen verbessert und die Zeit bis zur Selbstendothelialisierung *in vivo* reduziert werden. Dies konnte *in vitro* unter Flussbedingungen durch das modifizierte *Chandler loop model* (Chandler 1958) und *in vivo* im Schweinemodell bestätigt werden (Hoffmann et al. 2006 und 2007). Die Vorteile der Aptamere im Gegensatz zu den Antikörpern liegen in der analytischen und diagnostischen Anwendung. Außerdem wird ihre Identifizierung in einem *in vitro*-Prozess durchgeführt und ist somit nicht von Tieren oder Zellen abhängig. Es ist möglich, speziell gegen toxische und nicht immunogenetische Zielsubstanzen zu selektieren. Ansonsten sind Aptamere leicht chemisch präzise und reproduzierbar zu synthetisieren; und es ist möglich, ein aptamerspezifisches Antidot zu entwickeln, um die Bindung vom Aptamer an die Zielsubstanz wieder zu lösen. Ein weiterer Vorteil stellt die lange Haltbarkeit und die reversible Reaktion nach Denaturierung dar.

## 1.2 Einsatz des GPVI-Fc-Aptamers

Ein etwas anderer Ansatz, der in dieser Arbeit dargestellt wird, ist die Entwicklung eines löslichen chimären Konstrukts, das die Rekrutierung von Stammzellen zu Gefäßverletzungen unter Flussbedingungen ermöglicht. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass die Substanz direkt über einen Ballonkatheter appliziert werden könnte, wie es bei Herdeg et al. am Kaninchen mit Retinolsäure (Vitamin A-Derivat) bereits durchgeführt wurde (Herdeg et al. 2003); das Konstrukt könnte ferner zusammen mit der Stammzelllösung vor der Zellapplikation inkubiert werden, wodurch keine schwierige und teure Beschichtung des koronaren Stents notwendig wäre.

In der vorliegenden Arbeit wurde das chimäre Konstrukt GPVI-Fc-Aptamer eingesetzt. Es besteht zum einen aus dem löslichen GPVI-Fc und zum anderen aus einem Aptamer, welches eine spezifische T17b-Bindungsstelle besitzt. Das GPVI als Thrombozytenoberflächenrezeptor spielt eine besondere Rolle bei der Adhäsion an exponiertes Kollagen, so wie es bei einer Gefäßverletzung vorhanden ist (Massberg et al. 2003). Ein entgegengesetzter Ansatz, um Einfluss auf den GPVI-Thrombozytenrezeptor zu nehmen, ist die Unterbindung seiner Wirkung. Dies wurde bereits in den beiden folgenden Studien gezeigt. Hierbei ist das GPVI-Fc im Stande, die Neointimaformation bei drahtdenudierten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen zu inhibieren. Somit gilt lösliches GPVI-Fc als erfolgsversprechende Verbindung, um die Progression der Verletzung nach Plaqueruptur abzuschwächen (Schönberger et al. 2008). In einer anderen Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass EXP3179 ein spezifischer Inhibitor des thrombozytären GPVI-Rezeptors ist. Dies könnte ein neuer pharmakologischer Ansatz sein, bei dem durch Blockade des GPVI-Rezeptors der atherothrombotische Vorgang unterbunden wird (Grothusen et al. 2007).

### **1.3 Flusskammer**

Die Methode der Flusskammer wird vielfach in dieser Arbeitsgruppe angewandt (Massberg et al. 2003, Massberg et al. 2006, Langer et al. 2006, Schulz et al. 2008, Stellos et al. 2008, Friedrich et al. 2009). Ihr Vorteil liegt in der Standardisierung, der schnellen Durchführbarkeit und in der Tatsache, dass keine Versuchstiere benötigt werden. Im Vergleich dazu kann als nachteilig angesehen werden, dass in der Flusskammer bis auf die Fließgeschwindigkeit die physiologischen Bedingungen im Versuchstier nicht vollständig nachempfunden werden können.

Die Schwierigkeiten der Flusskammer lagen in dem Vorkommen von Luftblasen, die entweder den Fluss der Zelllösung blockierten oder ihn verlangsamen. Solche Aufnahmen wurden aus der Wertung ausgeschlossen, oder es wurde zuvor durch z. B. Spülung versucht, das Problem zu beheben.

### **1.4 Carotismodell**

Bei der Durchführung des Carotismodells wurde die Maus als Versuchstier ausgewählt. Mäuse eignen sich grundsätzlich für Tierversuche, da sie eine kurze Generationszeit, platzsparende Haltung, geringe Haltungskosten und eine einfache Handhabung aufweisen. Des Weiteren liegt der Substanzverbrauch deutlich niedriger als bei größeren Tieren.

Da die Interaktionen der Zellen mit der Gefäßwand im ligaturinduzierten Verletzungsmodell der A. carotis mit Hilfe der Intravitalmikroskopie veranschaulicht wurden, stellte die Dicke der Gefäßwand den limitierenden Faktor dar. Bei der Maus ist die zu durchdringende Schichtdicke im Gegensatz z.B. zur Ratte dünn genug, um dies technisch umsetzen zu können (Massberg et al. 1998).

Beim Carotismodell kann sich eine Problematik ergeben, die durch zu starkes Festziehen der Ligatur nach ihrem Lösen zur Thrombusformation führen kann. Wenn diese den Blutfluss unterbinden sollte, werden die Aufnahmen nicht in die Wertung mit einbezogen. Weitere Schwierigkeiten können bei der Präparation bzw. beim Unterlegen der schwarzen Folie unter die A. carotis durch Reizung des N. vagus auftreten, wodurch ein Spasmus der Atemmuskulatur hervorgerufen wird, der meistens eine weitere Durchführung des Experiments unmöglich macht. Im Carotismodell traten während der

intravitalmikroskopischen Untersuchungen bei den Wildtypmäusen C57BL/6J keine Unverträglichkeiten auf, da hierbei murine T17b- bzw. MHE-Zellen eingesetzt wurden.

## **2. Diskussion der Ergebnisse**

### **2.1 Flusskammer**

#### **2.1.1 Die Bindungsaffinität von T17b-Zellen über einen Zeitraum von 10 Minuten**

In einem Flusskammerexperiment konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion der mit GPVI-Fc-Aptamer vorinkubierten T17b-Progenitorzellen an eine kollagene Matrix innerhalb von 10 Minuten kontinuierlich zunahm. Im Gegensatz dazu bildeten die als Negativkontrolle mit BSA-Aptamer vorinkubierten adhärennten T17b-Progenitorzellen eine Parallele zur x-Achse und lagen mit dem Wert um 0,5 deutlich unter der ansteigenden Kurve (Abb.18). Hieraus resultierte für die folgenden Flusskammerversuche, dass erst nach einer Vorlaufzeit von 10 Minuten die adhärennten T17b-Progenitorzellen ausgewertet wurden. Bei Langer et al. wurde jeweils bereits nach 5 Minuten die Auswertung der adhärennten T17b-Progenitorzellen vorgenommen (Langer et al. 2006). Hingegen gibt es aber auch Beispiele, bei denen adhärennte CD34<sup>+</sup>-Zellen (humane Progenitorzellen) ebenfalls nach 10 Minuten gezählt wurden (Stellos et al. 2008).

#### **2.1.2 Die Adhäsion von T17b-Zellen an unterschiedlichen Beschichtungen (an GPVI-Fc-Aptamer und seinen Einzelkomponenten)**

Die Adhäsion der murinen T17b-Progenitorzellen an Kollagen oder im Vergleich an die Kontrollen, wie z.B. GPVI-Fc, Aptamer und GPVI-Fc-BSA, ist nicht wesentlich erhöht. Erst die Beschichtung der Deckgläser mit GPVI-Fc-Aptamer konnte eine 10-fach erhöhte Adhäsion der T17b-Progenitorzellen bewirken (Abb. 19). Die verminderte Adhäsion der T17b-Progenitorzellen auf Kollagen lässt sich laut Langer et al. 2006 dadurch erklären, dass die T17b-Zellen hierzu Thrombozyten benötigen. Thrombozyten sind für die Regulation der Chemotaxis, Adhäsion und Differenzierung von murinen endothelialen Progenitorzellen verantwortlich. Diese Erkenntnisse lassen sich auch auf humane CD34<sup>+</sup>-Progenitorzellen transferieren. Die murinen endothelialen Progenitorzellen (T17b-Zellen) adhärrieren an Thrombozyten durch PSGL-1 und VLA-4 unter hohen Fließgeschwindigkeiten. Dies wurde in der Flusskammer untersucht (Langer et al. 2006). Des Weiteren konnte mittels Intravitalmikroskopie im Carotismodell an der Maus ebenfalls bestätigt werden, dass der von

Thrombozyten sezernierte *Stromal cell derived factor 1 $\alpha$*  (SDF-1 $\alpha$ ) an der Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen zur Endothelverletzung und somit zu freigelegtem Kollagen beteiligt ist (Massberg et al. 2006, Stellos et al. 2008). Bei den Kontrollen wie auch beim Kollagen ist die Adhäsion sehr gering, da entweder die T17b-Bindungsstelle oder das GPVI-Fc (Massberg et al. 2003) fehlt, wohingegen beides beim GPVI-Fc-Aptamer vorhanden ist.

### **2.1.3 Das Bindungsverhalten der T17b-Zellen in Abhängigkeit von der GPVI-Fc-Aptamer-Konzentration**

Im Folgenden wurde ein Flusskammerexperiment durchgeführt, in dem T17b-Progenitorzellen mit GPVI-Fc-Aptamer und im Vergleich dazu als Kontrolle mit dem Nonsense-Aptamer vorinkubiert wurden. Es wurden jeweils die Konzentrationen von 10  $\mu\text{g/ml}$  und 20  $\mu\text{g/ml}$  gegenübergestellt (Abb. 21). Die Anzahl der adhärenen T17b-Progenitorzellen lag bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  beim Nonsense-Aptamer etwas höher, wohingegen bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  die Adhäsion der GPVI-Fc-Aptamer vorinkubierten T17b-Zellen um ca. das 3-fache erhöht war. Eine Begründung für die Umkehr des Verhältnisses zwischen dem GPVI-Fc-Aptamer und der Kontrolle bei der Konzentration 10  $\mu\text{g/ml}$  und im Gegensatz dazu bei der Konzentration 20  $\mu\text{g/ml}$  ist nicht vorhanden. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass im Carotismodell die Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  des GPVI-Fc-Aptamers bzw. des Nonsense-Aptamers zum Einsatz kam.

## **2.2 Carotismodell**

Die Intravitalmikroskopie ist eine gängige Methode zur optischen Darstellung von Zellinteraktionen mit dem Gefäßendothel. Sie kommt an verschiedenen Organen, wie z.B. Ohr (Sander et al. 2009), Darm (Massberg et al. 1998, Stellos et al. 2008), Niere (Kuligowski et al. 2009) oder Cremastermuskel (Seta et al. 2009) zum Einsatz. In der vorliegenden Arbeit wurde die Intravitalmikroskopie am Carotismodell mit standartisierter Ligatur von fünf Minuten durchgeführt (Massberg et al. 2003, Massberg et al. 2006, Grothusen et al. 2007, Stellos et al. 2008). Durch dieses Modell können, im Gegensatz zur Flusskammer, die tatsächlichen physiologischen und pathologischen Vorgänge des Blutflusses *in vivo* untersucht werden. Hierbei wurde für die Sichtbarmachung der Zellen der Fluoreszenzfarbstoff DCF benutzt, der mehrfach in der Literatur beschrieben ist (Massberg et

al. 2003, Massberg et al. 2003, Massberg et al. 2006, Stellos et al. 2008). Diese Zellen wurden nach ihrer Art der Endothelinteraktion in die Kategorien adhären, transient adhären und rollend eingeteilt. Somit sind transient adhären Zellen, solche die weniger als 15 Sekunden Kontakt mit dem Endothel aufnehmen, wohingegen die adhären Zellen länger als 15 Sekunden am Gefäßendothel haften. Die gleiche Kategorisierung der Zellen wurde auch bei Gauß vorgenommen (Gauß 2008). Nach Massberg et al. wurden länger als 10 Sekunden haftende Zellen bereits als adhären Zellen definiert (Massberg et al. 2003).

Es wird nur innerhalb der Gruppen MHE-Zellen/murine T17b-Progenitorzellen (siehe 2.1) und T17b-Progenitorzellen mit GPVI-Fc-Aptamer/Nonsense-Aptamer (siehe 2.2) ein Vergleich angestrebt, da zwischen den beiden Versuchsreihen ein Zeitraum von mehreren Monaten liegt, und somit auch Tiere aus einer anderen Bestellgruppe zum Einsatz kamen. Außerdem ist ein Vergleich innerhalb der Gruppen sinnvoll, da an einem Versuchstag an zwei Mäusen parallel das Carotismodell durchgeführt wurde. Wobei eine Maus immer die Kontrolle darstellt; auch kommen Zellen aus der gleichen Isolation in beiden Mäusen zum Einsatz.

### **2.2.1 Vergleich MHE-Zellen mit murinen T17b-Progenitorzellen im Carotismodell**

Die Kurve der adhären T17b-Zellen liegt wie zu erwarten deutlich über der Kurve von den adhären MHE-Zellen (Abb. 23). Nach dem Lösen der Ligatur bildet die Gruppe mit den MHE-Zellen eine Gerade um den Wert 350, wohin gegen die T17b-Zellen dazu eine Parallele um den Wert 800 darstellt. Zu allen Zeitpunkten sind signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen erkennbar. Diese Experimente im Carotismodell gelten als Vorversuche, da hierdurch die Interaktionsfähigkeit der T17b-Zellen mit dem Gefäßendothel bestätigt werden sollte.

Endotheliale Progenitorzellen sind eine Art von prädifferenten reifen Stammzellen, die das Potenzial besitzen, zu proliferieren und sich in ausgereifte Endothelzellen zu differenzieren (Asahara et al. 1997, Hristov und Weber 2004, Shi Q et al. 1998). Im Gegensatz zu ausgereiften Endothelzellen, die nur noch über ein begrenztes Potenzial zur Differenzierung und ein niedriges Potenzial zur Proliferation verfügen, wodurch deren Fähigkeit zur Regeneration von beschädigtem Endothel limitiert ist; haben endotheliale Progenitorzellen ein

hohes proliferierendes Potenzial mit der Kapazität Blutgefäße zu reparieren und zu bilden (Hristov und Weber 2004, Szmitko et al. 2003, Woywodt et al. 2002). Einige Adhäsionsmoleküle, wie z.B. der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand (PSGL)-1,  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine, regulieren die Adhäsion und Migration endothelialer Progenitorzellen (Vajkoczy et al. 2003, Beck et al. 2003, Chavakis et al. 2005). Bei den MHE-Zellen ist das VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*) herunterreguliert (Plendl et al. 1995), wodurch diese Zellen ihre Fähigkeit zur vermehrten Haftung verlieren.

In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits Versuche mit humanen Endothelzellen und humanen CD34<sup>+</sup>-Progenitorzellen im Carotismodell intravitalmikroskopisch durchgeführt. Diese lieferten ähnliche Ergebnisse (Gauß 2008).

Im Gegensatz zu den adhärennten Zellen kommen die rollenden Zellen beim Vergleich der T17b- mit den MHE-Zellen nicht vor. Dies lässt sich durch die erhöhten Geschwindigkeitsverhältnisse des Blutflusses in großen Gefäßen wie der A. carotis erklären. Hierbei können Turbulenzen auftreten, wie es auch unter pathophysiologischen Bedingungen bei Herzklappenfehlern oder Gefäßstenosen der Fall ist (Kuschinsky 1999). Im Vergleich dazu ist z.B. in den Arteriolen und Venolen des Dünndarms der Blutfluss wesentlich langsamer und somit kann hier eine große Menge an rollenden Zellen verzeichnet werden. Dies konnte innerhalb unserer Arbeitsgruppe mit CD34<sup>+</sup>-Zellen im Darmmodell mittels der Intravitalmikroskopie gezeigt werden (Gauß 2008).

### **2.2.2 Vergleich T17b-Progenitorzellen vorinkubiert mit GPVI-Fc-Aptamer bzw. Nonsense-Aptamer**

Im Carotismodell liegt die Kurve, der mit GPVI-Fc-Aptamer inkubierten T17b-Progenitorzellen, über der Kontrollkurve der mit Nonsense-Aptamer inkubierten T17b-Progenitorzellen. Dies gilt für die transient adhärennten (Abb. 25) und die adhärennten T17b-Zellen (Abb. 26). Zwischen beiden Gruppen sind nicht zu allen Zeitpunkten signifikante Unterschiede festzustellen, jedoch liegt eine deutliche Tendenz vor. Es konnte somit durch den Einsatz des GPVI-Fc-Aptamer eine Verbesserung der Adhäsion von T17b-Progenitorzellen an exponiertem Kollagen im Carotismodell erreicht werden, welches die Ergebnisse der Flusskammer bestätigt. Allerdings fallen die Kurven zum letzten Zeitpunkt von 60 Minuten wieder etwas ab. Die Interpretation dieser Ergebnisse lässt zwei Ansätze zu.

Einerseits könnte hierfür ein Lösen der bereits haftenden Zellen verantwortlich gemacht werden. Andererseits war während der Experimente eine Abnahme der Fluoreszenz der Zellen innerhalb des Zeitraums der Vorbereitung bis zum 60 Minuten Zeitpunkt feststellbar. Deshalb sind nicht mehr alle vorhandenen adhärennten Zellen auszumachen. Darüber hinaus könnten die vorhandenen Bindungsstellen bereits von z.B. Thrombozyten besetzt worden sein.

Zuvor wurde in unserer Arbeitsgruppe das rekombinante bispezifische Adhäsionsmolekül GPVI-aCD133 verwendet, um im ligaturinduzierten Verletzungsmodell der A. carotis an der Maus die Adhäsion von humanen CD34<sup>+</sup>-Progenitorzellen an geschädigtes Gefäßendothel zu steigern (Gauß 2008). Der Einsatz eines chimären Konstrukts konnte auch durch diese Arbeit eine Verbesserung der Adhäsion bestätigen. Auch wurden in anderen Studien bereits bispezifische Antikörper verwendet, um dadurch hämatopoetische Stammzellen zielgerichtet an ischämisches Myokard zu lenken (Lum et al. 2004, Lee et al. 2007). Des Weiteren konnten El-Aouni et al. zeigen, dass durch die lokale Vorbehandlung mit dem SDF-1-Fra-GPI Konstrukt die exogen bereitgestellten embryonalen endothelialen Progenitorzellen im ischämischen Gewebe erhöht sind. Durch das Zytokin SDF-1 wurden die Progenitorzellen rekrutiert, das Zytokin Fraktalkin lockt Monozyten an (dies muß noch genau abgeklärt werden) und GPI bindet an vWF des Subendothels. Dies konnte in der Flusskammer und *in vivo* am ligatur-induzierten Verletzungsmodell der A. femoralis im Kaninchen und der dadurch erzeugten Hinterextremitätenischämie dargestellt werden. Dieser Ansatz könnte nützlich sein, um die Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen in Verbindung mit der therapeutischen Neovaskularisierung des chronischen ischämischen Syndroms zu steigern (El-Aouni et al. 2009).

Die adhärennten T17b-Zellen treten im Gegensatz zu den transient adhärennten Zellen wesentlich weniger mit der Gefäßendothelfläche in Kontakt. Dies lässt sich durch den mehrstufigen Interaktionsprozess der T17b-Zellen mit dem Gefäßendothel erklären. Der erste lose Zellkontakt besteht aus dem sogenannten *tethering*. Danach rollen die Zellen am Endothel entlang, was durch P-Selektin vermittelt wird. Abschließend erfolgt über die  $\beta$ -Integrine die feste Adhäsion (Gawaz et al. 2005). Demnach erfahren viele Zellen den ersten Kontakt, wohingegen nur einige von ihnen den Prozess bis zur entgültigen Adhäsion durchlaufen. Da der Prozess des Rollens in der A. carotis aufgrund hoher Scherkräfte nicht besonders ausgeprägt ist, lässt sich das Nichtvorhandensein von rollenden Zellen (wie bereits im Abschnitt 2.1 zuvor) erklären.

### 3. Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das GPVI-Fc-Aptamer es möglich macht, embryonale endotheliale Progenitorzellen zu einer freigelegten Kollagenoberfläche zu rekrutieren. Die Hauptergebnisse der vorliegenden Arbeit sind: a) die Adhäsion der T17b-Zellen an Kollagen ist durch Vorinkubation mit dem chimären Konstrukt im Vergleich zu Kontrollen unter dynamischen Bedingungen unter Verwendung der arteriellen Scherrate erheblich erhöht, b) die Rekrutierung embryonaler endothelialer Progenitorzellen an Gefäßverletzungen kann unter Verwendung des entworfenen chimären Konstrukts forciert werden, wie durch intravitale Fluoreszenzmikroskopie in einem Verletzungsmodell der A. carotis an der Maus bestätigt werden konnte. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass das bispezifische Molekül ein nützliches Werkzeug für die Rekrutierung von Stammzellen an Gefäßverletzungen sein könnte und somit ein möglicher zukünftiger therapeutischer Ansatz für die Behandlung atherosklerotischer Erkrankungen. Außerdem kann durch Generierung eines Aptamers mit entsprechender Bindungsstelle ein chimäres Konstrukt entwickelt werden, das an jede beliebige andere Stammzelle bindet.

Das Projekt sollte weitergeführt werden, indem zuerst die Ergebnisse des Carotismodells dieser Arbeit im Darmmodell innerhalb des Ischämie-Reperfusionprozesses bestätigt werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob durch eine verlängerte Inkubation von murinen embryonalen endothelialen Progenitorzellen mit dem chimären Konstrukt eine Differenzierung in reife endotheliale Zellen *in vitro* induziert werden kann. Gleiches sollte ebenfalls durch Langzeitversuche mit immundefizienten Mäusen im Denudationsmodell bestätigt werden.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen zu Gefäßwandverletzungen ist die Voraussetzung für eine effiziente therapeutische Neovaskularisierung. Endothelverletzungen und die damit verbundene Freilegung der Kollagenmatrix können durch Stentimplantation, durch Ballondilatation oder durch Plaqueruptur infolge der Artherosklerose hervorgerufen werden. Aufgrund dessen wurde ein Adhäsionsmolekül bestehend aus löslichem GPVI-Fc (Thrombozytenkollagenrezeptor) und einem Aptamer mit einer Bindungsstelle für murine endotheliale T17b-Progenitorzellen konstruiert. Dieses wurde für die Steigerung der Rekrutierung von embryonalen endothelialen Progenitorzellen *in vitro* und *in vivo* eingesetzt.

In der Flusskammer (*in vitro*) wurde die Bindungsaffinität von mit GPVI-Fc-Aptamer und als Kontrolle mit BSA-Aptamer vorinkubierten T17b-Progenitorzellen über einen Zeitraum von 10 Minuten ermittelt. Hierbei zeigten die mit GPVI-Fc-Aptamer vorinkubierten T17b-Zellen im Gegensatz zur Kontrolle in den ersten 10 Minuten eine erhöhte und ansteigende Bindungsfähigkeit auf Kollagen. Außerdem wurde die Adhäsion von T17b-Zellen an unterschiedlichen Beschichtungen (an GPVI-Fc-Aptamer und seinen Einzelkomponenten) in der Flusskammer untersucht. Im Vergleich zu den Kontrollen konnte eine 10-fach erhöhte Adhäsion der T17b-Zellen nach Vorinkubation der Deckgläser mit dem GPVI-Fc-Aptamer beobachtet werden. In einem weiteren Flusskammerversuch wurde das Bindungsverhalten der T17b-Zellen in Abhängigkeit von der GPVI-Fc-Aptamer-Konzentration von 10 µg/ml und 20 µg/ml gegenübergestellt. Bei der Konzentration von 10 µg/ml haften im Gegensatz zu der eingesetzten Konzentration von 20 µg/ml ca. doppelt so viele T17b-Zellen, die mit GPVI-Fc-Aptamer vorinkubiert waren.

*In vivo* im ligaturinduzierten Verletzungsmodell an der A. carotis der Maus mittels der Methode der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurden zuerst in einem Vorversuch murine Herzendothelzellen (MHEC) im Vergleich zu murinen T17b-Progenitorzellen eingesetzt. Hierbei konnte eine erhöht Adhäsion der T17b-Zellen über einen Zeitraum von 60 Minuten nach Ligatur am Gefäßendothel festgestellt werden. Im Weiteren wurde mit Hilfe der gleichen Methode die vermehrte Haftung der mit GPVI-Fc-Aptamer gegenüber der als Kontrolle mit Nonsense-Aptamer vorinkubierten T17b-Zellen dargestellt.

In dieser Arbeit konnte eine erhöhte Adhäsion der murinen T17b-Zellen durch die Verwendung des chimären Konstrukts GPVI-Fc-Aptamer gezeigt werden. Durch diesen Ansatz könnte die Endothelialisierung beschleunigt und die Thrombusbildung reduziert werden. Dies eröffnet neue Perspektiven für das *Tissue-Engineering* und die regenerative Medizin dar.

## SUMMARY

Recruitment of endothelial progenitor cells to vessel wall lesions is a prerequisite to efficient therapeutic neovascularization. Endothelial injuries and associated exposure of the collagen matrix can be caused by stentimplantation, by angioplasty or by plaque rupture following atherosclerosis. To enhance recruitment of embryonic endothelial progenitor cells *in vitro* and *in vivo*, an adhesion molecule consisting of soluble GPVI-Fc (platelet collagen receptor) and an aptamer with a binding site for murine endothelial T17b progenitor cells was constructed.

In the flow chamber (*in vitro*) the binding affinity was determined by T17b cells which were incubated either with GPVI-Fc-aptamer or as control with BSA-aptamer, over a period of 10 minutes. Here T17b cells incubated with GPVI-Fc-aptamer showed an increased and rising bonding capacity to collagen compared to control in the first 10 minutes. In addition, the adhesion of T17b cells was examined on different coatings (at GPVI-Fc- aptamer and its single components) in the flow chamber. Compared to controls a 10fold enhanced adhesion of the T17b cells could be observed after incubation of the coverslips with the GPVI-Fc-aptamer. The binding behavior of the T17b cells in dependence of the GPVI-Fc-aptamer concentration (10 µg/ml versus 20 µg/ml) was investigated in a further flow chamber experiment. The number of adhering T17b cells incubated with GPVI-Fc-aptamer is increased approx. two-fold at an aptamer concentration of 20 µg/ml compared to the concentration of 10 µg/ml.

*In vivo*, in a mouse carotid artery ligation-induced injury model, the method of intravital fluorescence microscopy was used, first to test adhesion of murine heart endothelial cells (MHEC) in contrast to murine T17b progenitor cells. An increased adhesion of T17b cells to the endothelium could be determined during a period of 60 minutes after ligation. Using the same method an increased adhesion of GPVI-Fc-aptamer incubated T17b cells was detected compared to control nonsense aptamer.

In this dissertation an increased adhesion of murine T17b cells by using the chimeric construct GPVI-Fc-aptamer could be demonstrated. This approach could accelerate endothelialisation and reduce thrombus formation. Thus it opens up a new perspective for tissue engineering and regenerative medicine.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Ackroyd JF** (1955). Role of platelets in coagulation, thrombosis and haemostasis, with some observations on platelet dysfunction, including thrombasthenia. *Br Med Bull*; 11(1): 21-7.
- Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC** (1997). Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int j Biochem Cell Biol*; 29: 91-105.
- Antoniucci D, Bartorelli A, Valenti R, Montorsi P, Santoro GM, Fabbiocchi F, et al.** (2000). Clinical and angiographic outcome after coronary arterial stenting with the carbostent. *Am J Cardiol*; 85: 821-5.
- Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, Ong AT, McFadden EP, Sianos G, et al.** (2005). Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *J Am Coll Cardiol*; 45: 1574-9.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al.** (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*; 275: 964-967.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al.** (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*; 85: 221-228.
- Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al.** (2002). Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*; 106: 3009-3017.
- Avci-Adali M, Paul A, Ziemer G, Wendel HP** (2008). New strategies for in vivo tissue engineering by mimicry of homing factors for self-endothelialisation of blood contacting materials. *Biomaterials, Elsevier*; 29: 3936-3945.
- Beck K, Meyer-König U, Weidmann M, Nern C, Hufert FT** (2003). Human cytomegalovirus impairs dendritic cell function: a novel mechanism of human cytomegalovirus immune escape. *Eur J Immunol*; 33(6):1528-38.
- Begovac PC, Thomson RC, Fisher JL, Hughson A, Gallhagen A** (2003). Improvements in GORE-TEX vascular graft performance by Carmeda BioActive surface heparin immobilization. *Eur J Vasc Endovasc Surg*; 25: 432-7.
- Bhargava B, Karthikeyan G, Abizaid AS, Mehran R** (2003). New approaches to preventing restenosis. *BMJ*; 327: 274-9.
- Bithell TC** (1993). The physiology of primary hemostasis. In: Wintrobe's Clinical Hematology. 9th edn., Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens Jn, eds., Philadelphia: Lea & Febinger.
- Blank M, Weinschenk T, Priemer M et al.** (2001). Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels, selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen. *J Biol Chem*. 276: 16464-16468.

- Blindt R, Vogt F, Astafieva I, Fach C, Hristov M, Krott N, et al.** (2006). A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol*; 47: 1786–95.
- Burke AP, Farb A, Malcom GT et al.** (1997). Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med.*; 336: 1276-1282.
- Celermajer DS** (1997). Endothel Dysfunction: Does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol*; 30: 325-333.
- Chan JY, Watt SM** (2001). Adhesion receptors on haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol*; 112 (3): 541-57.
- Chandler AB** (1958). In vitro thrombotic coagulation of the blood: a method for producing a thrombus. *Lab Invest*; 7: 110–4.
- Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, Urbich C, Peters T, Scharffetter-Kochanek K, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S** (2005). Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med*; 201(1):63-72.
- Clemetson KJ, Mcgregor JL, James e Dechavanne M, Lüscher EF** (1982). Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier\_Syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J Clin Invest*; 70: 304-311.
- Clemetson, JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TN, Clemetson KJ** (1999). The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcalphaR and the natural killer receptors. *J Biol Chem.*; 274: 29019–29024.
- Cremonesi A, Benit E, Carlier M, Colombo A, Piva R, Probst P, et al.** (2000). Multicenter registry to evaluate the efficacy of the NIROYAL stent in de novo or restenotic coronary stenosis. *J Invasive Cardiol*; 12: 225–32.
- Crompton MR** (1963). Retinal emboli in stenosis of the internal carotid artery. *Lancet*; 1: 886.
- Dar A, Kollet O, Lapidot T** (2006). Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol*; 34(8): 967-75.
- Davies M, Thomas AC** (1985). Plaque fissuring — the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J*; 53: 363-73.
- DeGroot PG, Sixma JJ** (1990). Platelet adhesion. *BrJ Haematol*; 75: 308-312.
- El-Aouni C, Globisch F, Pfosser A, Stachel G, Hinkel R, Boekstegers P, Nelson P, Kupatt C** (2009). Funktional impact of pretreatment of ischemic tissue with artificial EPC recruiter molecule SDF-1-Fractalkine-GPI. *Clin Res Cardiol* (Abstract).

**Erbel R, Haude M, Hopp HW, Franzen D, Rupprecht HJ, Heublein B, et al.** (1998). Coronary-artery stenting compared with balloon angioplasty for restenosis after initial balloon angioplasty. Restenosis Stent Study Group. *N Engl J Med*; 339: 1672–8.

**Falk E, Shah P, Fuster V** (1995). Coronary plaque disruption. *Circulation*; 92: 657-71.

**Farb A, Burke AP, Tang AL, et al.** (1996). Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core: a frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation*; 93: 1354-63.

**Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J et al.** (2004). Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res.*; 95: 742-748.

**Fernandez-Patron C, Martinez-Cuesta MA, Salas E, Sawicki G, Wozniak M, Radomski MW, Davidge ST** (1999). Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2. *Thromb Haemost*; 82: 1730–5.

**Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, et al.** (1994). A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med*; 331: 496–501.

**Friedrich EB, Werner C, Walenta K, Böhm M, Scheller B** (2009). Role of extracellular signal-regulated kinase for endothelial progenitor cell dysfunction in coronary artery disease. *Basic Res Cardiol.*

**Fuchs E, Segre JA** (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell*; 100(1): 143-55.

**Fujiyama S, Amano K, Uehira K et al.** (2003). Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res.*; 93: 980-989.

**Furchgott RF, Zawadzki JV** (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*; 288: 373–6.

**Fuster V** (1995). Elucidation of the role of plaque instability and rupture in acute coronary events. *Am J Cardiol*; 76: 24C-33C.

**Gauß A** (2008). Der Einfluss des Adhäsionsmoleküls GPVI- aCD133 auf die Adhäsion von endothelialen Progenitorzellen in zwei Gefäßverletzungsmodellen der Maus, Untersuchungen mit Hilfe der Intravitalmikroskopie (Dissertation).

**Gawaz MP, Loftus JC, Bajt ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH** (1991). Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIB-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell–cell interactions. *J Clin Invest*; 88: 1128–34.

**Gawaz M** (2001). Blood Platelets. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

**Gawaz M** (2003). Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res*; 61: 498-511.

**Gawaz M, Langer H, May AE** (2005). Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*; 115: 3378-3384.

**George JN** (1990). Platelet immunoglobulin G: its significance for the evaluation of thrombocytopenia and for understanding the origin of alpha-granule proteins. *Blood* 1990; 76: 859.

**George JN** (2000). Platelets. *Lancet*; 355: 1531-1539.

**Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson SP** (1997). Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett.*; 413: 255–259.

**Gill M, Dias S, Hattori K et al.** (2001). Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res.*; 88: 167-174.

**Grosskreutz CL, Anand-Apte B, Duplaa C, Quinn TP, Terman BI, Zetter B, et al.** (1999). Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc Res*; 58: 128–36.

**Grothusen C, Umbreen S, Konrad I, Stellos K, Schulz C, Schmidt B, Kremmer E, Teebken O, Massberg S, Luchtefeld M, Schieffer B, Gawaz M** (2007). EXP3179 inhibits collagen-dependent platelet activation via glycoprotein receptor-VI independent of AT1-receptor antagonism: potential impact on atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 27(5):1184-90.

**Hardhammar PA, van Beusekom HM, Emanuelsson HU, Hofma SH, Albertsson PA, Verdouw PD, et al.** (1996). Reduction in thrombotic events with heparin-coated Palmaz–Schatz stents in normal porcine coronary arteries. *Circulation*; 93: 423–30.

**Hartwig JH, Barkalow K, Azim A, Italiano J** (1999). The elegant platelet: signals controlling actin assembly. *Thromb Haemost*; 82:392-398.

**Hatzopoulos AK, Folkman J, Vasile E, Eiselen GK, Rosenberg RD** (1998). Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development*; 125(8): p. 1457-68.

**Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML** (2003). Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*; 348: 1104–11.

**Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B et al.** (2004). A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. *Circ Res.*; 94: 573-574.

**Heimpel H, Hoelzer D, Lohrmann HP, Seifried E** (1994). Hämatologie in der Praxis. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

**Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroccek RA** (1998). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*; 391: 591–4.

**Herdeg C, Oberhoff M, Baumbach A et al.** (2003). Effects of local all-trans-retinoic acid delivery on experimental atherosclerosis in the rabbit carotid artery. *Cardiovasc Res.*; 57: 544-553.

**Heublein B, Ozbek C, Pethig K** (1998). Silicon carbide-coated stents: clinical experience in coronary lesions with increased thrombotic risk. *J Endovasc Surg*; 5: 32–6.

**Hill JM, Zalos G, Halcox JP et al.** (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.*; 348: 593-600.

**Hoffmann J, Groll J, Heuts J, Rong H, Klee D, Ziemer G, et al.** (2006). Blood cell and plasma protein repellent properties of star-PEG-modified surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed*; 17: 985–96.

**Hoffmann J, Paul A, Harwardt M, Groll J, Reeswinkel T, Klee D, et al.** (2007). Immobilized DNA aptamers used as potent attractors for porcine endothelial precursor cells. *J Biomed Mater Res A*; 84: 614–21.

**Hristov M, Weber C** (2004). Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*; 8(4):498-508.

**Italiano JE Jr, Patel-Hett S, Hartwig JH** (2007). Mechanics of proplatelet elaboration. *J Thromb Haemost.*; 5(Suppl 1): 18 –23.

**Jaffe EA** (1987). Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol*; 18: 234 –9.

**Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue AH, Xiong X, Debili N, Chickering T, Le Couedic JP, Goodearl A, Dussault B, Fraser C, et al.** (2000). Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood*; 96: 1798–1807.

**Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE Jr, Shivdasani RA, von Andrian UH** (2007). Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science.*; 317: 1767–1770.

**Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T et al.** (2001). Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*; 104: 1046-1052.

**Kang HJ, Kim HS, Zhang SY et al.** (2004). Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet.*; 363: 751-756.

**Keeley EC, Boura JA, Grines CL** (2003). Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet.*; 361: 13-20.

**Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS et al.** (2004). Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ Res.*; 95: 354-363.

**Kuligowski MP, Kwan RY, Lo C, Wong C, James WG, Bourges D, Ooi JD, Abeynaike LD, Hall P, Kitching AR, Hickey MJ** (2009). Antimyeloperoxidase antibodies rapidly induce  $\alpha$ 4-integrin-dependent glomerular neutrophil adhesion. *Blood*;113(25):6485-94.

**Kuschinsky W** (1999). Herz-Kreislauf-Funktion. In: Deetjen P, Speckmann EJ (Hrsg.): Physiologie. Aufl. 3, Urban & Fischer Verlag, München, 297-348.

**Lang P, Bader P, Schumm M et al.** (2004). Transplantation of a combination of CD133+ and CD34+ selected progenitor cells from alternative donors. *Br J Haematol.*; 124: 72-79.

**Langer H, May AE, Daub K et al.** (2006). Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. *Circ Res.*; 98: e2-10.

**Langer H, Gawaz M** (2006). The role of platelets for the pathophysiology of acute coronary syndromes. *Hamostaseologie*; 26: 114-118.

**Lee RJ, Fang Q, Davol PA, Gu Y, Sievers RE, Grabert RC, Gall JM, Tsang E, Yee MS, Fok H, Huang NF, Padbury JF, Larrick JW, Lum LG** (2007). Antibody targeting of stem cells to infarcted myocardium. *Stem Cells*; 25: 712-717.

**Leonhardt H** (1990). „Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen“; Thieme Verlag Stuttgart.

**Lin PH, Chen C, Bush RL, Yao Q, Lumsden AB, Hanson SR** (2004). Small-caliber heparin-coated ePTFE grafts reduce platelet deposition and neointimal hyperplasia in a baboon model. *J Vasc Surg*; 39: 1322–8.

**Lindemann S, Sharafi M, Spiecker M, Buerke M, Fisch A, Grosser T, Veit K, Gierer C, Ibe W, Meyer J, Darius H** (2000). NO reduces PMN adhesion to human vascular endothelial cells due to downregulation of ICAM-1 mRNA and surface expression. *Thromb Res*; 97: 113–23.

**Lum LG, Fok H, Sievers R, Abedi M, Quesenberry PJ, Lee RJ** (2004). Targeting of Lin-Sca+ hematopoietic stem cells with bispecific antibodies to injured myocardium. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*; 32: 82-87.

**Lusis AJ** (2000). Atherosclerosis. *Nature*; 407: 233–41.

**Lyons AB** (2000). Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of Immunological Methods*; 243:147–154.

**Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K** (1998). Platelet-Endothelial Cell Interactions During Ischemia/Reperfusion: The Role of P-Selectin. *Blood*; pp 507-515.

**Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zöhlhoyer D, Heinzmann U, Nieswandt B** (2003). A Crucial Role of Glycoprotein VI for Platelet Recruitment to the Injured Arterial Wall In Vivo. *J. Exp. Med.*; 197: 41-49.

**Massberg S, Konrad I, Bultmann A et al.** (2004). Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB J.*; 18: 397-399.

**Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zöhlhoefer D, Hoppe K, Schiemann M, Kennerknecht E, Sauer S, Schulz C, Kerstan S, Rudelius M, Seidl S, Sorge F, Langer H, Peluso M, Goyal P, Vestweber D, Emambokus NR, Busch DH, Frampton J, Gawaz M** (2006). Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*; 203: 1221-1233.

**Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR** (1977). Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall: an explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res*; 11: 323- 44.

**Moncada S** (1982). Biological importance of prostacyclin. *Br J Pharmacol*; 76: 3-31.

**Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA** (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*; 43: 109-42.

**Moog S, Mangin P, Lenain N, Strassel C, Ravanat C, Schuhler S, Freund M, Santer M, Kahn M, Nieswandt B, et al.** (2001). Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. *Blood*; 98: 1038-1046.

**Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K** (1989). A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest*; 84: 1440-1445.

**Müller-Eckardt** (1996). Transfusionsmedizin. Springer Verlag, Heidelberg.

**Nassar T, Sachais BS, Akkawi S, KowalskaMA, Bdeir K, Leitersdorf E, Hiss E, Ziporen L, Aviram M, Cines D, Poncz M, Higazi AA** (2003). Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells. *J Biol Chem*; 278: 6187-93.

**Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H** (2000). Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain. *J Biol Chem*; 275: 23998-24002.

**Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, Mokhtari-Nejad R, Rackebrandt K, Cazenave JP, Ohlmann P, Gachet C, Zirngibl H** (2001). Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med*; 193: 459-469.

**Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fassler R** (2001). Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J*; 20: 2120-2130.

- Nieswandt B, Watson SP** (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*; 102: 449–61.
- Nurden AT** (1999). Inherited abnormalities of platelets. *Thromb Haemost*; 82: 468-480.
- Passegué E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL** (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci*; 22: 11842-9.
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al.** (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(b) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*; 95: 952–8.
- Petty RG, Pearson JD** (1989). Endothelium—the axis of vascular health and disease. *J R Coll Physicians*; 23: 92–101.
- Pislaru SV, Harbuzariu A, Gulati R, Witt T, Sandhu NP, Simari RD, et al.** (2006). Magnetically targeted endothelial cell localization in stented vessels. *J Am Coll Cardiol*; 48: 1839–45.
- Plendl J, Sinowatz F, Auerbach R** (1995). A transformed murine myocardial vascular endothelial cell clone: characterization of cells in vitro and of tumours derived from the clone in situ. *Virchows Arch*; 426:619-628.
- Plow EF, Byzova T** (1999). The biology of glycoprotein IIb – IIIa. *Coron Artery Dis*; 10: 547– 51.
- Ranke C, Hecker H, Creutzig A, Alexander K** (1993). Dose-dependent effect of aspirin on carotid atherosclerosis. *Circulation*; 87: 1873-1879.
- Rapaport E, Gheorghide M** (1996). Pharmacologic therapies after myocardial infarction. *Am J Med*; 101: Suppl 4A: 61S-69S.
- Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Phippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA** (2003). Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation*; 108: 457-463.
- Riess H, Riewald M** (1994). The clinical impact of platelet function testing. *Thromb Res*; 74: S69-S78.
- Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, et al.** (2008). Heart disease and stroke statisticsd2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*; 117: e25–146.
- Ross R** (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature*; 362: 801-809.
- Ross R** (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*; 340: 115-126.

**Rotmans JI, Heyligers JM, Verhagen HJ, Velema E, Nagtegaal MM, de Kleijn DP, et al.** (2005). In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation*; 112: 12–8.

**Ruggeri ZM** (2002). Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*; 8: 1227-1234.

**Ryan JW, Ryan US** (1984). Endothelial surface enzymes and the dynamic processing of plasma substrates. *Int Rev Exp Pathol*; 26: 1–43.

**Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM** (1998). Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*; 94: 657–666.

**Sander AL, Henrich D, Muth CM, Marzi I, Barker JH, Frank JM** (2009). In vivo effect of hyperbaric oxygen on wound angiogenesis and epithelialization. *Wound Repair Regen.*; 17(2):179-84.

**Santoro SA** (1986). Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cationdependent adhesion of platelets to collagen. *Cell*; 46: 913–920.

**Sawicki G, Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW** (1997). Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature*; 386: 616–9.

**Schachinger V, Assmus B, Britten MB et al.** (2004). Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol*; 44: 1690-1699.

**Schächinger V, Zeiher AM** (2001). Prognostic implications of endothelial dysfunction: does it mean anything? *Coronary Artery Disease*; 12:435–443.

**Schober A, Manka D, von Hundelshausen P, Huo Y, Hanrath P, Sarembock IJ, Ley K, Weber C** (2002). Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation*; 106: 1523–9.

**Schönberger T, Siegel-Axel D, Bussl R, Richter S, Judenhofer MS, Haubner R, Reischl G, Klingel K, Münch G, Seizer P, Pichler BJ, Gawaz M**(2008). The immunoadhesin glycoprotein VI-Fc regulates arterial remodelling after mechanical injury in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Cardiovascular Research*; 80:131–137.

**Schulte V, Snell D, Bergmeier W, Zirngibl H, Watson SP, Nieswandt B** (2001). Evidence for two distinct epitopes within collagen for activation of murine platelets. *J Biol Chem*; 276: 364-368.

**Schulz C, Penz S, Hoffmann C, Langer H, Gillitzer A, Schneider S, Brandl R, Seidl S, Massberg S, Pichler B, Kremmer E, Stellos K, Schönberger T, Siess W, Gawaz M** (2008). Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo. *Basic Res Cardiol.*; 103(4):356-67.

- Seta F, Chung AD, Turner PV, Mewburn JD, Yu Y, Funk CD** (2009). Renal and cardiovascular characterization of COX-2 knockdown mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 296(6):R1751-60.
- Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP** (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*; 92(2):362-7.
- Sivan-Loukianova E, Awad OA, Stepanovic V et al.** (2003). CD34+ blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. *J Vasc Res*; 40: 368-377.
- Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, et al.** (1994). A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med*; 331: 489-95.
- Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, Fukumoto Y, Rabkin E, Libby P, et al.** (2001). Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med*; 7: 738-41.
- Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L** (1987). Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med*; 316: 701-6.
- Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM** (2002). Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*; 106: 1199-204.
- Slupsky JR, Kalbas M, Willuweit A, Henn V, Kroczeck RA, Muller-Berghaus G** (1998). Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost*; 80: 1008-14.
- Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IM, et al.** (2001). Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and threedimensional intravascular ultrasound study. *Circulation*; 103: 192-5.
- Stamm C, Westphal B, Kleine HD et al.** (2003). Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*; 361: 45-46.
- Stellos K, Gawaz M** (2007). Platelets and Stromal Cell-Derived Factor-1 in Progenitor Cell Recruitment. *Semin Thromb Hemost*; 33: 159-164.
- Stellos K, Langer H, Daub K, Schönberger T, Gauss A, Geisler T, Bigalke B, Mueller I, Schumm M, Schäfer I, Seizer P, Krämer BF, Siegel-Axel D, May AE, Lindemann S, Gawaz M** (2008). Platelet-Derived Stromal Cell Derived Factor-1 Regulates Adhesion and Promotes Differentiation of Human CD34+ Cells to Endothelial Progenitor Cells. *Circulation*; 117: 206-215.
- Szmitko PE, Fedak PW, Weisel RD, Stewart DJ, Kutryk MJ, Verma S** (2003). Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation*; 107(24):3093-100.

- Takahashi T, Kalka C, Masuda H et al.** (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*; 5: 434-438.
- Urbich C, Dimmeler S** (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*; 95: 343–353.
- Vajkoczy P, et al.** (2003). Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivoexpanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med*; 197(12): p. 1755-65.
- Vanhoutte PM** (1989). Endothelium and control of vascular function. *Hypertension*; 13: 658–67.
- Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B** (2008). Cell adhesion Mechanisms in Platelets Arteriosclerosis. *Thrombosis and Vascular Biology*; 28: 403-412.
- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher Am, Dimmeler S** (2001). Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*; 89: e1-e7.
- von Hundelshausen P, Koenen RR, Sack M, Mause SF, Adriaens W, Proudfoot AE, Hackeng TM, Weber C** (2005). Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood*; 105: 924–30.
- Vrolix MC, Legrand VM, Reiber JH, Grollier G, Schaliij MJ, Brunel P, et al.** (2000). Heparin-coated Wiktor stents in human coronary arteries (MENTOR trial). MENTOR Trial Investigators. *Am J Cardiol*; 86: 385–9.
- Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al.** (2002). Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*; 105: 3017–24.
- Ward MR, Stewart DJ, Kutryk MJ** (2007). Endothelial progenitor cell therapy for the treatment of coronary disease, acute MI, and pulmonary arterial hypertension: current perspectives. *Catheter Cardiovasc Interv*; 70: 983–98.
- Watson SP, Asazuma N, Atkinson B, Berlanga O, Best D, Bobe R, Jarvis G, Marshall S, Snell D, Stafford M, et al.** (2001). The role of ITAM- and ITIM-coupled receptors in platelet activation by collagen. *Thromb Haemost*; 86: 276–288.
- Weber C** (2005). Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res*; 96: 612–6.
- White JG** (1994). Anatomy and structural organization of the platelet. In: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 2nd edn., Colman RW, Hirsh J., Marder VJ, Salzman EW, eds, Philadelphia: JB Lippincott Co.

**Wollert KC, Meyer GP, Lotz J et al.** (2004). Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*; 364: 141-148.

**Wollert KC, Drexler H** (2005). Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res*; 96: 151-163.

**Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M** (2002). Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant*; 17(10):1728-30.

**Xu Q** (2006). The impact of progenitor cells in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*; 3: 94–101.

**Xu Q** (2007). Progenitor cells in vascular repair. *Curr Opin Lipidol*; 18: 534–539.

**Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al.** (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*; 332: 411–5.

**Zernecke A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Möpps B, Mericskay M, Gierschik P, Biessen EA, Weber C** (2005). SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res*; 96(7):784-91.

## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich in irgendeiner Form unterstützt und so zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben. Eine besondere Anerkennung gebührt:

Herrn Prof. Dr. Andreas Moritz für die motivierenden Worte, die Übernahme meiner Arbeit, deren Durchsicht und Einreichung an der tiermedizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Herrn PD Dr. Stephan Lindemann für die Übernahme meiner Betreuung, die Korrektur meiner Arbeit und seine kompetente Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz für die interessante Themenstellung, seine hilfreichen wissenschaftlichen Ratschläge, durch die die vorliegende Arbeit erst ermöglicht werden konnte.

Frau Dr. Tanja Schönberger für die Einführung in die Methode der Intravitalmikroskopie, die hervorragende Projektbetreuung, die sehr gute Unterstützung in jeder Hinsicht während der gesamten Doktorarbeit und die schnelle Korrektur meiner Arbeit.

Herrn Dr. Wendel für die Herstellung des GPVI-Fc-Aptamers, das in meiner Arbeit zur Anwendung kam.

Dr. Harald Langer für die Möglichkeit der Mitwirkung am T17b-Projekt und seiner fachlichen Unterstützung aus der Ferne per Telefon.

Frau Jadwiga Kwiatkowska für die parallele Vorbereitung der Zellen zu meinen Versuchen.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Medizinische Klinik III vom UKT für ihre freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Allen Tierpflegern für die gute Betreuung der Mäuse.

Meinen Eltern, die mich immer auf allen Wegen bedingungslos unterstützen, die ich erst durch Ihre Hilfe einschlagen konnte und dass sie mir eine Ausbildung in diesem Rahmen ermöglicht haben.

Meinem Bruder, der mich bisher in jeder Lebenslage unterstützt hat.

Meinem Mann vor allem für seine seelische Unterstützung, ohne die das Studium und dieses Vorhaben nicht möglich gewesen wären.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus -Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Tübingen, 15. Dezember 2009

Birte Melzer



*in Kooperation mit*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

ISBN: 978-3-8359-5589-9

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de



9 783835 955899

© Sebastian Kaulitzki - Fotolia.com