

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin III  
Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie Innere Medizin III

**Charakterisierung von Rezeptor-beschichteten  
Nanopartikeln und deren Einfluss auf die in vitro dependente  
Thrombusentstehung**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Nestele, Jeremy Andreas**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. F. Konrad

3. Berichterstatter: Professor Dr. M. Seyfarth

Tag der Disputation: 21.11.2023

## **Widmung**

Ich widme diese Doktorarbeit meinem Großvater, Bempa. Danke für deine unermüdliche Unterstützung während meiner Zeit in Antwerpen. Für mich warst, bist und bleibst du für immer meine größte Inspiration. Ich vermisse dich.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Thrombozyten	7
1.2 Hämostase	8
1.2.1 Physiologie	8
1.2.2 Pathophysiologie	9
1.3 Antithrombozytäre Therapie	10
1.3.1 Aktueller Forschungsstand	12
1.3.2 Glykoprotein VI	12
1.3.3 Ektonukleotidase CD39	14
1.3.4 Fusionsprotein GPVI-CD39	15
1.4 Nanopartikel	16
1.4.1 Klinische Anwendungsmöglichkeiten	17
1.4.2 Anwendung im Bereich der Herz-Kreislauf-Erkrankungen	18
1.5 Zielsetzung	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Fabrikation der Nanopartikel	21
2.2 Elektronenmikroskopie	22
2.3 Durchflusszytometrie	23
2.4 Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie	25
2.5 Perfusionsversuche	27
2.5.1 Analyse der Thrombogenese im Perfusionsmodell	29
2.5.2 Analyse der Nanopartikeladhäsion an Kollagenfasern	31
2.6 Rastersondenmikroskopie	32
2.6.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie	32
2.6.2 Rasterkraftmikroskopie	33
2.7 Lichttransmissionsaggregometrie	34

2.8	T-TAS®	37
2.8.1	Prinzip	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Fabrikation funktionalisierter Nanopartikel	39
3.2	Morphologische Charakterisierung	41
3.2.1	Elektronenmikroskopische Darstellung der Nanopartikel	41
3.2.2	Morphologische Analyse der Nanopartikel mittels AFM	43
3.3	Fluoreszenz	44
3.3.1	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung	44
3.3.2	Durchflusszytometrische Erfassung der Nanopartikel	45
3.4	GPVI-Fc-beschichtete Nanopartikel binden an Kollagenfasern unter statischen und dynamischen Bedingungen	47
3.4.1	Kollagenbindung im statischen Modell	47
3.4.2	Adhäsionseigenschaften unter dynamischen Bedingungen	49
3.5	Inhibierung der <i>in vitro</i> induzierten Thrombozytenaggregation durch Rezeptor-beschichtete Nanopartikel	52
3.6	Beeinflussung der Thrombusentstehung im Perfusionsmodell	54
3.7	Analyse der Thrombogenese mittels T-TAS®	60
4	Diskussion	63
5	Zusammenfassung	68
6	Literaturverzeichnis	69
7	Erklärung zum Eigenanteil	75
8	Veröffentlichungen	76
9	Danksagung	77

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische Repräsentation der molekularen Zusammensetzung von GPVI-Fc und GPVI-CD39.....	16
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Nanopartikel mit ihren jeweiligen Beschichtungen.....	39
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Nanopartikel-induzierten Modifikation der Hämostase bei Endothelschaden.....	40
Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nanopartikel.....	41
Abbildung 5: Atomic force microscopy (AFM)-Kontaktmessungen.....	43
Abbildung 6: Zusammengeführte DIC- und Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der Nanopartikel nach Inkubation auf Kollagen-beschichteten Deckgläschen...	44
Abbildung 7: Pseudocolour Plots der Nanopartikel sowie einer 1 µm Beads enthaltenden Probe in FSC- und SSC-Detektionskanälen.....	45
Abbildung 8: Fluoreszenzsignale je Nanopartikelprobe in den Fluorochromkanälen Phycoerythrin (PE) und Peridininchlorophyllprotein (PerCP) nach Anregung durch einen 488 nm Laser.....	46
Abbildung 9: DIC-Mikroskopische Sichtfeldaufnahmen der Nanopartikel nach vorausgegangener Inkubation auf Kollagen-beschichteten Deckgläschen.....	47
Abbildung 10: Quantitative Analyse der durch Nanopartikel eingenommenen Fläche (in %), Nanopartikelanzahl sowie Anzahl Nanopartikel pro 50 µm Kollagenfaser.....	49
Abbildung 11: Repräsentative Zeitreihe der Nanopartikel-Kollagenfaser-Interaktion und -Adhäsion im Perfusionsmodell.....	50
Abbildung 12: Statistische Auswertung der durch Nanopartikel eingenommenen Fläche sowie der Gesamtzahl detektierbarer Nanopartikel pro Scherrate.....	51
Abbildung 13: Rezeptor-beschichtete Nanopartikel inhibieren die Thrombozytenaggregation in der Lichttransmissionsaggregometrie.....	53

Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung generierter Thromben im Flusskammermodell.....	56
Abbildung 15: Auswertung der Flusskammerversuche je Scherrate.....	57
Abbildung 16: Intensitätsoberflächendiagramme nach erfolgter Perfusion.....	58
Abbildung 17: Topographische Wiedergabe der sich auf den Deckgläschen befindlichen Thromben nach erfolgter Perfusion im Falle von NP-BSA und NP-GPVI-CD39 mittels scanning ion-conductance microscopy (SICM).....	59
Abbildung 18: Progrediente Thrombogenese mit folglich Obstruktion der Mikrokapillaren im Total Thrombus-formation Analysis System® (T-TAS®).....	61
Abbildung 19: Statistische Auswertung nach erfolgten T-TAS®-Versuchen mit Bestimmung der Okklusionsstartzeit, der Okklusionszeit sowie der AUC pro Scherrate.....	62

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Materialien im Rahmen der Nanopartikelfabrikation .....	22
Tabelle 2: Materialien im Rahmen der Versuche am Durchflusszytometer .....	23
Tabelle 2: Materialien im Rahmen der Differentialinterferenzkontrastversuche	25
Tabelle 4: Materialien im Rahmen der Flusskammerversuche .....	27
Tabelle 5: Materialien im Rahmen der Lichttransmissionsaggregometrie .....	34
Tabelle 6: Versuchsansätze am Lichttransmissionsaggregometer.....	36
Tabelle 7: Materialien im Rahmen der T-TAS <sup>®</sup> -Versuche .....	37



## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl	Kalziumchlorid
CD39	Cluster of Differentiation 39
COX-1	Cyclooxygenase-1
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CRP	Collagen-related peptide
DiOC6	3,3'-Dihexyl-oxacarbocyaniniodide
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMA	European Medicines Agency
ENTPDase1	Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 1
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FDA	U.S. Food and Drug Administration
GFP	Green fluorescent protein
GpIa-IIa	Glykoprotein Ia-IIa
GpIb-V-IX	Glykoprotein-V-IX
GpIIb-IIIa	Glykoprotein IIb-IIIa
GPVI	Glykoprotein VI
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
MA	Maimale Aggregation
MW	Molekulargewicht (engl. Molecular weight)
NP-BSA	BSA-beschichtete Nanopartikel
NP-GPVI	Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel
NP-GPVI- CD39	Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel

OST	Okklusionsstartzeit
OT	Okklusionszeit
PAR-1	Protease-aktivierter Rezeptor 1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PE	Phykoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PerCP	Peridininchlorophyllprotein
Pi	Inorganic phosphate
PI3Kb	Phosphatidylinositol 3-Kinase b
PLA	Poly(lactic acid)
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPP	Platelet poor plasma
PRP	Platelet rich plasma
scFv	Single-chain variable fragment
SICM	Scanning ion-conductance microscopy
t-PA	Tissue plasminogen activator
T-TAS®	Total Thrombus-formation Analysis System®
TxA2	Thromboxan A2
VCAM-1	vascular adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	World Health Organization

# 1 Einleitung

## 1.1 Thrombozyten

Mit mehr als 300.000 Fällen im Jahr 2019 stellen Herz-Kreislauf-Erkrankungen deutschlandweit unverändert die häufigste Todesursache dar (1). Ischämische Herzerkrankungen sowie zerebrovaskuläre Erkrankungen formen in dieser Gruppe dominierende Entitäten und zählen auch weltweit, der World Health Organization (WHO) zufolge, zu den führenden Todesursachen (2, 3). In ihrer Pathogenese eint sie die zentrale Rolle der Thrombozyten-vermittelten Thrombogenese und der daraus resultierenden vaskulären Ischämie im Rahmen der Atherothrombose (4, 5). Die medikamentöse Einstellung mittels Thrombozytenaggregationshemmer bildet folglich heutzutage auf primär- sowie sekundärprophylaktischer Grundlage einen festen Bestandteil der Behandlung Herz-Kreislauf-erkrankter Patienten (6). So findet sich ein breites Spektrum an unterschiedlichen antithrombotischen Präparaten mit jeweils individuellen Indikationen, Wirkungsmechanismen und Nebenwirkungen (6). Das konstitutionell erhöhte Blutungsrisiko und damit einhergehende Blutungen unterschiedlichen Ausmaßes sind hierbei als klinisch relevante, mögliche Komplikation hervorzuheben (7, 8). Im Zuge der Optimierung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses der antithrombotischen Therapie forschen Wissenschaftler an neuartigen Therapieansätzen (9).

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind, neben den Erythrozyten und Leukozyten, elementarer Bestandteil der im Blut enthaltenen Zellen. Sie werden durch Megakaryozyten im Knochenmark gebildet und haben einen Durchmesser von etwa 2-5  $\mu\text{m}$  (10, 11). Einen Zellkern besitzen Thrombozyten nicht, sie gehören also zu den anukleären Zellen. Im peripheren Blut beträgt ihre Anzahl beim gesunden Menschen ca. 150.000 – 400.000 Zellen pro Mikroliter. Hiervon befinden sich etwa ein Drittel in der Milz, welche zusammen mit der Leber Teil des retikuloendothelialen Systems ausmacht. In diesem findet auch der Thrombozytenabbau statt. Im thrombozytären Zytoplasma befinden sich neben Mitochondrien und Glykogenspeichern verschiedene Formen von Speichergranula:  $\alpha$ -Granula, Lysosomen und dichte Granula. Sie beinhalten

prothrombotische Stoffe wie Adenosindiphosphat (ADP) oder Adhäsionsproteine wie Fibrinogen und den von-Willebrand-Faktor (vWF), deren Freisetzung durch Thrombozytenaktivierung in der Thrombusentstehung im Rahmen der primären Hämostase eine zentrale Rolle spielt (4, 5). Ebenso stellen in der thrombozytären Plasmamembran enthaltene Membranproteine als Rezeptoren für lösliche Agonisten oder Adhäsionsproteine elementare Bausteine der primären Hämostase dar. So finden sich unter anderem Integrin- $\alpha 2\beta 1$  (Gp1a-IIa) und Glykoprotein VI (GPVI) auf der Thrombozytenmembran wieder (4). Sie interagieren mit und binden direkt an Kollagenfasern. Der vWF-Rezeptor GpIb-V-IX sorgt für die Bindung an vWF, P2Y<sub>12</sub>-Rezeptoren fungieren als ADP-Rezeptoren.

## **1.2 Hämostase**

### **1.2.1 Physiologie**

Die Hämostase beschreibt den Prozess der Entstehung eines Gefäßwandthrombus in Reaktion auf Gefäßwandschädigungen und stellt somit einen elementaren Bestandteil der Blutungsstillung dar (4, 11). Sie wird unterteilt in die primäre und sekundäre Hämostase, gefolgt von der Fibrinolyse. Im Zuge endothelialer Schädigung der Gefäßwand, erfolgt im ersten Schritt die Formierung eines plättchenreichen Thrombus im Rahmen der primären Hämostase. Thrombozyten binden über ihre Transmembranproteine an subendothelial gelegene Strukturen der extrazellulären Matrix, die im Falle von Endothelschäden in direkten Kontakt mit dem Gefäßlumen geraten. Hierbei handelt es sich primär um Kollagene vom Typ I und III, Fibronectin, Laminin sowie den vWF. Insbesondere über den thrombozytären vWF-Rezeptor GpIb-V-IX binden Thrombozyten unter arteriellen Flussbedingungen an den subendothelialen, kollagenimmobilisierten vWF und führen so zur Thrombozytenadhäsion. Der thrombozytäre Kollagenrezeptor GPVI führt durch Bindung an exponierte, subendotheliale Kollagenfasern zur solidierten Adhäsion. Anschließend kommt es zum sogenannten „shape change“. Im Rahmen der thrombozytären Aktivierung kommt es zur Ausbildung von Pseudopodien.

Folglich erfolgt auf Basis auto- sowie parakriner Sekretion die Freisetzung löslicher Thrombozytenaktivationsagonisten wie Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) und ADP (12). Letztlich werden auf diese Weise sich im Blut befindliche Thrombozyten rekrutiert, sodass diese ebenso aktiviert und zur Aggregation angeregt werden. Dabei sorgt unter anderem GpIIb-IIIa für die Koadhäsion der Plättchen untereinander, resultierend in der Entstehung eines plättchenreichen Thrombus. Dieser wird in der anschließenden sekundären Hämostase in einen fibrinreichen Thrombus umgebaut. Durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade mit ihren Gerinnungsfaktoren wird Prothrombin zu Thrombin (Faktor IIa) umgesetzt. Thrombin vermittelt folglich die Umsetzung von Fibrinogen zu Fibrin, welches sich an dem zuvor geformten Thrombus anlagert. Dies resultiert in der Quervernetzung der Thrombozyten und Konsolidierung des Thrombus. Im weiteren Verlauf führt die Fibrinolyse durch Plasmin zur Modellierung und zum Umbau des geformten Thrombus.

### **1.2.2 Pathophysiologie**

Aufgrund ihres großen Interaktionspotenzials spielen Thrombozyten eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie unterschiedlichster Krankheitsbilder. Im Rahmen der Atherosklerose sind Thrombozyten für die Entstehung akuter thrombotischer Gefäßverschlüsse verantwortlich. Infolge disruptiver, fortgeschrittener atherosklerotischer Plaques werden Plättchen aktiviert und führen letztlich mittels Atherothrombose zu akuten Ischämien in verschiedensten Organen. Dieser Vorgang bildet die pathophysiologische Grundlage akuter Koronarsyndrome oder Schlaganfälle. Zudem spielen Thrombozyten eine Schlüsselrolle in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen (13). Diese basieren auf endothelialer Dysfunktion und entzündlichen Veränderungen des Endothels, charakterisiert durch die Migration inflammatorisch aktiver Zellen wie Makrophagen und Megakaryozyten in die Gefäßwand mit Entwicklung sogenannter, Lipid-beladener Schaumzellen. Hierbei initiieren Thrombozyten die Transformation der Makrophagen zu Megakaryozyten und fördern die Entstehung von Schaumzellen.

Störungen der Hämostase unterliegen in den häufigsten Fällen medikamentöse Wechselwirkungen sowie vererbliche Blutungskrankheiten zugrunde. Die antithrombozytäre Behandlung mittels Cyclooxygenase 1 (COX-1) - oder GpIIb/IIIa-Hemmern resultiert in reduzierter Thrombozytenaggregation und eingeschränkter primärer Hämostase. Durch die Modifikation der Gerinnungskaskade sowie Inhibierung unterschiedlichster Gerinnungsfaktoren führen Antikoagulanzen wie Heparine, Vitamin K-Antagonisten oder Faktor Xa-Inhibitoren zur inadäquaten sekundären Hämostase. Das Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom ist die häufigste, hereditäre Blutungskrankheit. Genetische Mutationen führen zu qualitativen oder quantitativen Defekten des vWF, wodurch es zur ineffektiven Thrombozytenadhäsion im Rahmen der primären Hämostase kommt (14). Durch die reduzierte Bindung an Faktor VIII ist ebenso die sekundäre Hämostase potenziell betroffen.

Die thrombozytäre Dysfunktion macht sich im Rahmen von Thrombozytopathien bemerkbar (14). Es handelt sich um qualitative Defekte der Thrombozyten mit klinischen Blutungsstigmata ohne abnorme Veränderung der Thrombozytenanzahl. Ursächlich sind hauptsächlich medikamentöse Interaktionen, zum Beispiel im Falle der antithrombozytären Therapie, vererbliche Thrombozytendefekte, Nierenversagen oder hämatologische Malignitäten. Die Thrombozytose beziehungsweise Thrombozytopenie beschreiben quantitative Veränderungen (14). In beiden Fällen sind entweder eine abnorme Produktion, Abbau oder die Plättchensequestration ursächlich. Das Spektrum an Grunderkrankungen reicht von medikamentösen Einwirkungen über hämatologische Malignitäten bis hin zu Autoimmunerkrankungen.

### **1.3 Antithrombozytäre Therapie**

Die antithrombozytäre Therapie senkt das atherothrombotische Risiko durch den Einsatz Plättchen-hemmender Substanzen, basierend auf der pharmakologischen Inhibierung der Thrombozytenfunktion über unterschiedliche Wirkungsmechanismen. Sie stellt einen Grundpfeiler der primär- sowie sekundärprophylaktischen Behandlung kardiovaskulär erkrankter Patienten dar

(15, 16). Dominierende Indikationen sind die Primär- sowie Sekundärprophylaxe der koronaren Herzerkrankung, der zentralen sowie peripheren arteriellen Verschlusskrankheit oder der zerebralen Ischämien. Ebenso stellt die intravaskuläre Stentimplantation eine bedeutsame Indikation zur Einleitung einer antithrombozytären Therapie dar. Die heutzutage gängigsten Plättchenhemmer lassen sich auf Basis ihrer pharmakodynamischen Eigenschaften unterscheiden (17). Acetylsalicylsäure (ASS), das am häufigsten verschriebene Antithrombotikum, inhibiert mittels irreversibler Hemmung der thrombozytären COX-1 die Produktion von Prostaglandinen und somit die Bildung thrombozytärer Agonisten wie TxA<sub>2</sub> (18). Im Rahmen der dualen Plättchenhemmung nach Stentimplantation, spielen irreversible ADP-Rezeptor P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Antagonisten wie Clopidogrel, Prasugrel oder Ticagrelor durch Inhibierung der ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung eine entscheidende Rolle in der Prävention von In-Stent-Restenosen. GpIIb/IIIa-Rezeptor-Blocker inhibieren die Plättchenaggregation und kommen vor allem beim akuten Koronarsyndrom mit hoher intrakoronarer Thrombuslast zum Einsatz. Vertreter dieser Gruppe sind Tirofiban, Abciximab und Eptifibatid und stehen nur in intravenöser Formulierung zur Verfügung. Alle beschriebenen Präparate interagieren an zirkulierenden Thrombozyten und wirken somit auf systemische Weise. Hieraus resultiert deren kollektive Nebenwirkung eines konstitutionell erhöhten Blutungsrisikos. Baigent *et al.* konnten nachweisen, dass die primärprophylaktische Behandlung mittels ASS das Risiko einer gastrointestinalen oder extrakraniellen Blutung um 0,1 % beziehungsweise 0,07 % ( $p < 0,05$ ) erhöht (19). Sørensen *et al.* analysierten in einer retrospektiven Studie das jährliche Risiko einer Hospitalisierung aufgrund eines Blutungsereignisses unter sekundärprophylaktischer antithrombozytärer Behandlung bei Patienten nach akutem Koronarsyndrom (7). Dieses lag bei Patienten unter ASS-Monotherapie bei 2,6 %, im Falle der Clopidogrel-Monotherapie bei 4,6 %. Unter dualer Plättchenhemmung (ASS plus Clopidogrel) lag das Risiko bei 3,7 %. Unter den ADP-Antagonisten zeichnen sich Prasugrel und Ticagrelor durch deren gesteigerte Effektivität bezüglich der Prävention atherothrombotischer Ereignisse im Vergleich zu Clopidogrel aus (20). Hierbei führt insbesondere die Behandlung mittels Prasugrel, im Vergleich zu Ticagrelor

(21), zu einem signifikant erhöhten Blutungsrisiko (22). Ebenso führen GpIIb/IIIa-Antagonisten zu einem signifikant erhöhten Blutungsrisiko (23).

### **1.3.1 Aktueller Forschungsstand**

Auf Basis neuester Erkenntnisse hinsichtlich thrombozytärer Rezeptoren und Signalwege, führte der stetige wissenschaftliche Fortschritt in den letzten Jahren zur Entwicklung neuartiger antithrombozytärer Substanzen (24). Die sich größtenteils in präklinischen sowie klinischen Studienphasen befindlichen Präparate zeichnen sich unter anderem durch deren hohe antithrombotische Potenz bei nur geringfügigen hämostatischen Interaktionen aus. Durch Inhibierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase b (PI3Kb) kommt es durch die gehemmte Signaltransduktion vorausgeschalteter thrombozytärer Rezeptoren zur inhibierten Plättchenaggregation (25). Protein-Disulfid-Isomerase (PDI)-Inhibitoren schränken die Fibrinogenbindung an aktivierte Thrombozyten sowie die GpIIb/IIIa-vermittelte Thrombozytenaggregation ein (26). Schwarz *et al.* erreichten mittels single-chain variable fragment (scFv) Antikörpern die spezifische Inhibierung des GpIIb/IIIa-Rezeptors ohne Verlängerung der *in vivo* Blutungszeit (27). Der Protease-aktivierte Rezeptor 1 (PAR-1) Blocker Vorapaxar ist bereits zugelassen, erhöht jedoch das Blutungsrisiko signifikant. Neuartige Paramodule fungieren als PAR-1-Antagonisten und erreichen die durch Vorapaxar generierte antithrombotische Wirkung, ohne dabei die Blutungszeit zu beeinflussen (28). Ebenso befinden sich vWF-Antagonisten wie Caplacizumab in klinischen Studien (29). Der thrombozytäre Kollagenrezeptor GPVI erwies sich aufgrund seiner Beteiligung an der Thrombozytenadhäsion im Rahmen des Adhäsionsvorgangs während der primären Hämostase als vielversprechendes, pharmakologisches Ziel neuartiger, antithrombozytärer Präparate.

### **1.3.2 Glykoprotein VI**

GPVI ist ein physiologisches Transmembranprotein der Thrombozyten und Megakaryozyten (30-32). 1977 wurde der Transmembrankomplex erstmals durch Phillips *et al.* mittels Gel-Elektrophorese-Untersuchungen entdeckt (33). 10 Jahre später folgten Berichte über GPVI-defizitäre Patienten, die eine leicht erhöhte Blutungstendenz aufwiesen (34). GPVI spielt eine zentrale Rolle in der



primären Hämostase und fungiert hauptsächlich als Kollagenrezeptor (35). Darüber hinaus konnten weitere bindungsaffine Liganden wie beispielsweise Fibrin, Laminin und Fibronectin identifiziert werden (36-38). Als thrombozytärer Kollagenrezeptor führt GPVI, infolge der Exponierung kollagenhaltiger, subendothelialer Matrix in geschädigten Gefäßwandabschnitten, beispielsweise im Falle von atherosklerotischen Plaques, zur solidierten Thrombozytenadhäsion und -aktivierung (31, 35, 39). Im Rahmen atherothrombotischer Vorgänge folgt die Thrombogenese. Des Weiteren wurde GPVI als Faktor bei thromboinflammatorischen Prozessen, wie beispielsweise der Entstehung von Reperfusionsschäden im koronaren und zerebralen Gefäßsystem, identifiziert (40, 41). Das Molekulargewicht des Rezeptors beträgt etwa 62 kDa und setzt sich aus 319 Aminosäuren zusammen (42). Aufgrund seiner sich extrazellulär befindlichen Immunglobulin-Domänen macht GPVI einen Teil der Immunglobulin-Superfamilie aus (31). Auf intrazellulärer Ebene binden beide Immunglobulinketten an eine Fc-Rezeptor  $\gamma$ -Kette. Diese ist wiederum an den Immunrezeptor Tyrosin-basierte Aktivierungssequenz Komplex (Engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM) assoziiert. Die Aktivierung des GPVI-Rezeptors durch Bindung der Immunglobulin-Domänen an seine Liganden führt zur Tyrosinphosphorylierung des ITAM-Komplexes. Es folgt eine intrazelluläre Signalkaskade, die in der Thrombozytenaktivierung und folglich der Thrombusentstehung resultiert. Ein einzelner Thrombozyt exprimiert zwischen 3.000 und 4.000 GPVI-Rezeptoren (43). Allerdings variiert die Menge an GPVI-Molekülen bei ruhenden Blutplättchen erheblich (44, 45), erst die Aktivierung führt schließlich einheitlich zur gesteigerten Expressierung der GPVI-Rezeptoren.

Aufgrund seiner Funktion als Signaltransduktor der spezifischen, Kollagen-induzierten Thrombozytenaktivierung, trat der GPVI-Rezeptor in den letzten Jahren hervor als potenzielle Basis neuartiger, antithrombotischer Therapieansätze. Forscher machten sich den physiologischen Wirkungsmechanismus zunutze und entwickelten ein rekombinantes, dimerisches Glykoprotein (GPVI-Fc; Revacept®) (46, 47). Nach intravenöser Verabreichung bindet GPVI-Fc kompetitiv an exponierte, kollagenhaltige Matrix

im vaskulären Endothel, blockiert damit potenzielle Bindungsstellen thrombozytärer GPVI-Rezeptoren und verhindert auf diese Weise die Thrombusentstehung im Frühstadium. Da das Protein nicht aktiv mit Thrombozyten interagiert, sind keine systemischen Nebenwirkungen, insbesondere ein erhöhtes Blutungsrisiko, zu erwarten. In der Phase-I-Studie bestätigte sich die Hemmung der spezifisch durch Kollagen induzierten Plättchenaktivierung bei einem Ausbleiben relevanter klinischer oder biochemischer Nebenwirkungen (46). Es wurden keine signifikanten Auswirkungen auf die Blutungszeit beobachtet. Dies bestätigte sich in der darauffolgenden ISAR-PLASTER Phase-II-Studie (48). Jamasbi *et al.* untersuchten in experimentellen Perfusionsversuchen die Wirkung von rekombinantem GPVI-Fc sowie Anti-GPVI-Antikörpern auf die durch humane, atherosklerotische Plaques induzierte Thrombozytenaktivierung (49). Bei beiden Wirkstoffen konnte eine Inhibierung der Plättchenaktivierung beobachtet werden. Besonders bei hohen Scherraten zeigte sich die inhibierende Wirkung beider Substanzen in Flusskammerversuchen am deutlichsten.

### **1.3.3 Ektonukleotidase CD39**

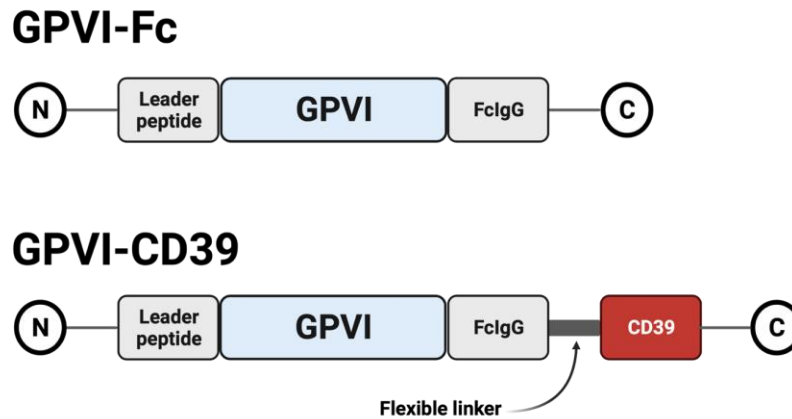
Ebenso wie GPVI, stellt der Wirkungsmechanismus der Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 1 (ENTPDase1), auch Cluster of Differentiation 39 (CD39), eine attraktive Basis der antithrombotischen Behandlung dar. CD39 ist ein enzymatisch aktives Oberflächenprotein und befindet sich an den Endothelzellen des menschlichen Gefäßsystems (50). Aufgrund starker Glykosylierung lässt sich das Molekulargewicht der CD39 auf etwa 50-70 kDa beziffern und ist damit vergleichbar zum molekularen Gewicht des GPVI-Komplexes (50). CD39 ist mittels zweier trans- sowie intrazellulärer Ausläufer auf der endothelialen Oberfläche verankert. Der extrazelluläre Bestandteil des Membrankomplexes im Gefäßlumen fungiert als enzymatisch aktives Element. In seiner Funktion als Nukleotidase steht CD39 für die Degradierung von sowohl Adenosintriphosphat (ATP) als auch ADP zu Adenosinmonophosphat (AMP) und anorganischem Phosphat (Engl. *inorganic phosphate*, Pi) ein (51, 52). Die divalenten Kationen Kalzium und Magnesium dienen als Co-Faktoren der Nukleotidase und steigern dessen Enzymaktivität um

64 % beziehungsweise 22 % (50). Wie in Abschnitt 1.2.1 bereits beschrieben, beruht die Thrombusentstehung und -propagation wesentlich auf der thrombozytären ADP-Freisetzung im Rahmen der Thrombozytenrekrutierung. Aufgrund ihrer oberflächlichen ADPase-Aktivität trägt die extrazelluläre Degradierung von prothrombotischem ADP zur Hemmung der Plättchenrekrutierung bei und garantiert auf diese Weise ein antithrombotisches Milieu in Endothelnähe (53, 54). Somit spielt CD39, neben Prostaglandinen und Stickstoffmonoxid (NO), eine zentrale Rolle bei der intravaskulären Thromboregulation und wirkt simultan kardio- und zerebroprotektiv (52). Zudem wiesen Jalkanen *et al.* eine signifikante Assoziation zwischen reduzierter CD39-Aktivität und Krankheitsprogression bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit nach (55). Es folgte die Entwicklung von rekombinatem, löslichem CD39, dessen hemmender Effekt auf die Plättchenaggregation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden konnte (56, 57). Allerdings konnte aufgrund der unspezifischen Funktionsweise bei systemischer Applikation eine Steigerung der Blutungsneigung beobachtet werden (58, 59).

#### **1.3.4 Fusionsprotein GPVI-CD39**

In einem nun folgenden, neuartigen Ansatz entwickelten Degen *et al.* das bifunktionelle Fusionsprotein GPVI-CD39 mittels Anbindung von rekombinatem, löslichem CD39 an GPVI-Fc mithilfe einer Proteinbrücke (Abbildung 1) (60). Durch die Vereinigung beider Moleküle miteinander soll die aggregationshemmende Wirkung von GPVI-Fc potenziert werden. Indem CD39 an strikt lokal wirkendes GPVI-Fc gebunden ist, wird dessen systemische Wirkung und die damit erhöhte Blutungsneigung aufgehoben. In *in vitro* Versuchen konnte die plättchenhemmende Wirkung des Fusionsproteins erfolgreich nachgewiesen werden (60). Ebenfalls bestätigte sich das Ausbleiben einer erhöhten Blutungszeit (60). In Mausversuchen zeigten sich zudem eine verspätete Thrombusentstehung und eine unveränderte Blutungszeit. Das rekombinante Fusionsprotein GPVI-CD39 vermittelt somit als bifunktionelles Molekül mit läsionsgerichtetem und nebenwirkungsarmem Wirkungsmechanismus einen vielversprechenden Ansatz einer neuartigen,

antithrombozytären Therapie in der Behandlung atherothrombotischer Erkrankungen.



**Abbildung 1: Schematische Repräsentation der molekularen Zusammensetzung von GPVI-Fc und GPVI-CD39.** GPVI-Fc: Dimerisches Glykoprotein VI; Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein; FcIgG: Immunglobulin G Fc-Fragment; CD39: Ektonukleotidase CD39; N: Stickstoff; C: Kohlenstoff. Adaptiert von Degen *et al.* (60). Generiert mit Biorender.com.

#### 1.4 Nanopartikel

Als Nanopartikel werden zusammengesetzte molekulare Verbindungen bezeichnet, deren Größe sich im Nanometerbereich einordnen lässt. Sie machen Teil der Nanoobjekte aus und weisen die drei räumlichen Dimensionen Länge, Breite und Höhe auf (61). Hierbei ist die längste Achse eines Nanopartikels maximal dreimal größer als seine kürzeste Achse, wodurch sich diese durch eine gewisse räumliche Kompaktheit kennzeichnen. Nanopartikel unterscheiden sich in ihrem Herstellungsprozess und Aufbau. So finden sich Polymer-basierte, Lipid-basierte und nicht-Polymer-basierte Nanopartikel, die sich in ihren pharmakodynamischen – sowie kinetischen Eigenschaften wie Bioverfügbarkeit, Biodegradierbarkeit, Immunogenität sowie Toxizität auszeichnen (62). Polymere, beispielsweise Polylactide, hemmen die drohende Opsonisierung durch das Komplementsystem, sodass die biologische Verfügbarkeit gesteigert wird und der therapeutische Nutzen länger erhalten bleibt. Darüber hinaus ist es möglich, Nanopartikel mit Therapeutika zu beladen, um sie auf diese Weise als

therapeutischen Vektor zu aktivieren. Sogenannte „Nanocapsules“ internalisieren bioaktive Wirkstoffe und schirmen diese mittels einer stabilen Wand ab. Im Falle von „Nanospheres“ lassen sich bioaktive Stoffe sowohl innerhalb der Nanopartikel als auch auf deren Oberfläche identifizieren. Daraus lassen sich einige der von der Nanomedizin erhofften Entwicklungen und Meilensteine ableiten. Mithilfe von nicht-immunogenen, metabolisierbaren sowie widerstandsfähigen Nanopartikeln, konstruiert spezifisch für die Bindung am Zielorgan, sollen Therapeutika gezielt, sicher und kontrolliert an Ihr Ziel transportiert werden, wo sie folglich lokal einwirken. Dadurch sollen systemische Nebenwirkungen und Risiken minimiert, Verabreichungsdosen reduziert und die therapeutische Wirkung maximiert werden.

#### **1.4.1 Klinische Anwendungsmöglichkeiten**

Nanopartikel finden, dank individuell modulierbarer Eigenschaften, immer häufiger Anwendung im klinischen Alltag. Gerade im therapeutischen Bereich steigt die Zahl der durch die Europäische Arzneimittel-Agentur (European Medicines Agency, EMA) sowie die amerikanische U.S. Food and Drug Administration (FDA) kontinuierlich. Seit 2009 wurden bereits mehr als 15 Arzneimittel, die unter die Bezeichnung therapeutischer Nanopartikel fallen, zugelassen. Über 20 % der bereits zugelassenen, sowie in Studien befindliche Nanopartikelpräparate, wurden für die Anwendung in der Krebstherapie entwickelt (63). Nicht zuletzt in der Onkologie wurden seither große Hoffnungen auf nanotechnologische Fortschritte gesetzt (64, 65). Nanopartikel stehen klassischen Chemotherapeutika gegenüber klar im Vorteil durch zielgerichtete, effiziente Behandlungsmöglichkeiten sowie reduzierter, durch Chemotherapie verursachter, systemischer Toxizität. Auch in anderen medizinischen Fachgebieten finden Nanopartikel Einzug. In der Infektiologie führt die Kombination Polymer- oder Lipid-basierter Nanopartikel und antimikrobieller Medikamente, beispielsweise Antibiotika, zur Potenzierung der antimikrobiellen Aktivität und Bioverfügbarkeit (66). Im Falle der retroviralen Therapie bei AIDS-Patienten könnten Nanopartikel-basierte antivirale Wirkstoffe zu verbesserter Wirkung und limitierter Nebenwirkungen führen. Dutta *et al.* konjugierten Efavirenz, ein antiretroviraler Wirkstoff, an Polymer-basierte Nanopartikel und

konnten dadurch eine gesteigerte Aufnahme des Medikaments in HIV-infizierte Makrophagen erreichen (67). Im Bereich der rheumatischen Erkrankungen konnten Horton *et al.* belegen, dass Certulizumab in Polyethylenglycol (PEG)-Nanopartikel-Formulierung zur Steigerung der Halbwertszeit auf etwa 14 Tage führt und damit positiv zur Behandlung rheumatoider Arthritis beiträgt (68). Indem Nanopartikel so konstruiert werden, dass sie kontrolliert und effizient die Blut-Hirn-Schranke passieren, erhofft man sich ebenso Fortschritte in der Neurologie (69). Die medikamentöse Therapie bei neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose oder Multiple Sklerose erhält durch die Integrierung von Nanotechnologie neue Perspektiven (70, 71). Darüber hinaus gelingt es, mittels Anwendung inhalativer Nanotherapeutika die Bioverfügbarkeit in den Atemwegen an Asthma bronchiale sowie chronisch obstruktiver Lungenerkrankung erkrankter Patienten zu optimieren und damit die Inhalationsfrequenz zu reduzieren (72, 73).

#### **1.4.2 Anwendung im Bereich der Herz-Kreislauf-Erkrankungen**

Im Bereich der Herz-Kreislauf-Erkrankungen befinden sich Nanotechnologie-basierte Entwicklungen vorläufig noch im Studienrahmen. So konnten Formiga *et al.* nachweisen, dass die Nanopartikel-vermittelte Therapie mit vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), verglichen mit freiem VEGF, in Ischämie-modellen eine signifikante Steigerung der Angiogenese aufweist (74). Ebenso zeigte sich eine deutlich gesteigerte Remodellingskapazität des Myokards in der Nanopartikel-Kohorte. Arzani *et al.* untersuchten den Effekt der Konjugation des Beta-Blockers Carvedilol an eine Nanopartikel-formulierung (75). Carvedilol findet Anwendung in unterschiedlichen Patientengruppen, unter anderem in der Therapie von Herzrhythmusstörungen, koronarer Herzerkrankung oder Herzinsuffizienz. Seine geringe Wasserlöslichkeit und der ausgeprägte, hepatische First-Pass-Effekt schränken jedoch dessen Bioverfügbarkeit deutlich ein. Die mit Carvedilol versetzten Nanopartikel führten in den Tierversuchen zu einer Steigerung der Plasmakonzentration um den Faktor 1,7 - 2,3 und folglich zur verbesserten therapeutischen Wirkung. In einem Halsschlagaderverletzungsmodell bei

Mäusen zeigte sich, dass mit Sirolimus-beladene Lipid-basierte Nanopartikel zu einer Verminderung des Grades an Restenose um bis zu 62 % führen (76). Das Risiko einer (In-Stent) Restenose könnte somit auf diese Weise gezielt minimiert werden. Schließlich können Nanopartikel auch im diagnostischen Bereich von Vorteil sein, wie Tierversuche von Kelly *et al.* zeigen (77). Mittels magnetofluoreszenten, Kontrastmittel-beladenen Nanopartikeln gelingt es, mittels vaskulären Adhäsionsmolekül-1-Rezeptoren (Engl. *vascular adhesion molecule-1*, VCAM-1) gezielt an atherosklerotische Plaques zu binden. Dadurch konnte der Kontrast der folglich durchgeführten Magnetresonanztomographie-Aufnahmen verstärkt und so atherosklerotische Plaques detailgetreuer dargestellt und visualisiert werden.

Im Zuge der beschriebenen Entwicklungen im Bereich der antithrombozytären Therapie, sowie auch auf dem Fachgebiet der Nanotechnologie, folgte nun die Fusion beider Forschungszweige. Im Sinne der Maximalisierung der therapeutischen Effizienz bei einem minimalen Nebenwirkungsprofil entstanden neuartige, antithrombotische Nanotherapeutika durch synergistische Wechselwirkungen untereinander. Korin *et al.* entwickelten Flussgeschwindigkeits-abhängige Nanopartikelaggregate, die bei hohen Flussraten in thrombotisch veränderten Gefäßabschnitten desintegrieren und folglich lokal einwirken (78). Die mit gewebespezifischem Plasminogenaktivator (Engl. *tissue plasminogen activator*, t-PA) versetzten Nanopartikel führten in Tiermodellen bei durch Gefäßschädigung-induzierten Thromben zur rapiden Thrombolyse. Ebenfalls konnte ein Überlebensvorteil bei einem Lungenembolie-Modell bei Mäusen beobachtet werden. Levi *et al.* konnten zudem mittels *in vitro* sowie *in vivo* Experimenten bereits belegen, dass mit GPVI-Fc beladene Nanopartikel unter physiologischen Flussbedingungen effizient und gezielt an geschädigte Gefäßwandabschnitte im arteriellen Gefäßsystem binden können (79). Ebenso konnte die spezifische Bindung von mit GPVI-Fc beladenen Nanopartikeln an zerebrale Aneurysmata bestätigt werden (80).

## 1.5 Zielsetzung

Die antithrombozytäre Therapie stellt einen Grundpfeiler in der Behandlung atherothrombotischer Erkrankungen dar. Bewährte antithrombozytäre Präparate, wie ASS oder Clopidogrel, sind daher fester Bestandteil des kardiologisch-angiologischen Behandlungsarsenals. Allerdings führt deren kollektiver, systemischer Wirkungsmechanismus zu einem signifikant erhöhten Blutungsrisiko. Auf der Suche nach neuartigen, nebenwirkungsärmeren Wirkstoffen im Bereich der antithrombozytären Therapie haben sich dimerisches GPVI-Fc sowie das Fusionsprotein GPVI-CD39 als potenzielle Hoffnungsträger erwiesen. Zielsetzung meiner Doktorarbeit war es, die Nanopartikel-vermittelte Hemmung der *in vitro* Thrombusentstehung, insbesondere in Kombination mit dem Fusionsprotein GPVI-CD39, zu untersuchen. Folglich entwickelten wir mit GPVI-Fc- und GPVI-CD39-beschichtete, funktionalisierte Nanopartikel. Diese wurden im Folgenden auf ihre strukturellen Eigenschaften, Adhäsionseigenschaften sowie Plättchen-hemmende Wirkung hin in einem experimentellen Forschungsansatz im Vergleich zu mit bovinem Serumalbumin (BSA)-beladenen Kontrollnanopartikeln untersucht (81).



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Fabrikation der Nanopartikel

Polymere Nanopartikel wurden auf Basis des Öl-in-Wasser Emulsion – Lösungsmittel Evaporationsverfahrens hergestellt (81). Das Grundgerüst besteht aus Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), einem Copolymer aus den cyclischen Diestern Lactid und Glycolid (Säure-Terminus, Lactid: Glycolid – 50:50, Molekulargewicht (engl. *molecular weight*, MW): 24.000 - 38.000; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). PLGA und der Fluoreszenzfarbstoff Nile Red (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), ein im roten Farbspektrum fluoreszierender Fluoreszenzfarbstoff, wurden in Dichlormethan (Bio-Lab Ltd., Jerusalem, Israel) aufgelöst und tröpfchenweise in eine 1 %-ige Polyvinylalkohollösung (87 - 90 % hydrolysiert, MW: 30.000 - 70.000; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) übertragen. Anschließend wurde die Lösung mittels Sonifizierung (Vibra-Cell™ Ultrasonic, Sonics, USA) emulsifiziert und evaporiert. Die Nanopartikel wurden mit drei unterschiedlichen Molekülen mittels NHS-EDC-Reaktion beladen. In ihrer ersten Formulierung wurde den Nanopartikeln rekombinantes, dimerisches GPVI-Fc beigefügt (NP-GPVI). In einer zweiten Variante wurde das Fusionsprotein GPVI-CD39 verwendet (NP-GPVI-CD39). Als letzte Ausführung in der Reihe unterschiedlicher Nanopartikel kam BSA als Kontrollsubstanz zum Einsatz (NP-BSA). Die Menge gebundener Oberflächenmoleküle wurde mittels Bradford Assay Kit - Pierce™ Coomassie Plus (TS-23236, Thermo scientific, Waltham, USA) bestimmt. Die Partikelgrößenverteilung wurde mithilfe dynamischer Lichtstreuung bei 25 °C und einem Streuwinkel von 173° bestimmt. Zur Messung des Partikeloberflächenpotentials (Zeta-Potential) kam die Laser-Doppler-Mikroelektrophorese mithilfe des Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, Vereinigtes Königreich) zum Einsatz. Die Nanopartikel wurden in Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) suspendiert und in einer Ausgangskonzentration von 5 mg/ml bei -20 °C gelagert.

Tabelle 1: Materialien im Rahmen der Nanopartikelfabrikation

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Resomer® RG 503 H, Poly(D,L-lactid-co-glycolid)	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, Missouri, USA
Nile Red	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, Missouri, USA
Poly(vinyl alcohol)	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, Missouri, USA
Dichlormethan	Bio Lab Ltd., Jerusalem, Israel
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (Modified, without CaCl <sub>2</sub> and MgCl <sub>2</sub> )	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, Missouri, USA
<b>Geräte</b>	
Vibra-Cell™ Ultrasonic	Sonics, Newtown, USA
Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Zetasizer Nano-ZS	Malvern Instruments, Malvern, UK

## 2.2 Elektronenmikroskopie

Im Rahmen der primären morphologischen Analyse der drei Nanopartikelformulierungen wurden transmissionselektronenmikroskopische sowie fluoreszenzelektronenmikroskopische Aufnahmen erzeugt (81). Die detaillierte Visualisierung der Nanopartikel gelang mittels Transmissionselektronen-mikroskopie, basierend auf einem Negativstaining- sowie Ultradünnschnittverfahren. Im Falle des Negativstaining wurden die unterschiedlichen Nanopartikelsuspensionen auf Elektronenmikroskopie-Grids platziert. Nach Adsorption erfolgte die Spülung mittels doppelt-destilliertem Wasser sowie einer 1 %-igen Uranylazetatlösung. Im Zuge des Ultradünnschnittverfahrens wurden die Nanopartikel in einer Fixierlösung nach Karnovsky über 40 Minuten bei 4 °C fixiert. Danach erfolgte die Postfixierung basierend auf 1 %-igem Osmiumtetroxid mit 1,5 % K-Ferrocyanid in einem 0,1 M

Kakodylsäurepuffer über 2 Stunden. Anschließend wurden Blöcke in Glyzidether eingebettet. 30 nm schmale Schnitte wurden mittels Ultramikrotom (Ultracut, Reichert, Wien, Österreich) erstellt und auf Kupfergrids fixiert. Aufnahmen erfolgten schließlich mit dem LIBRA 120 Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland). Für die Fluoreszenzelektronenmikroskopie kam das LSM 800 (Zeiss, Jena, Deutschland) zum Einsatz.

### 2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt ein labortechnisches Verfahren zur quantitativen Analyse von Suspensionen dar. Das Durchflusszytometer misst dabei mithilfe eines Laserstrahls die in der Suspension enthaltenen Bestandteile, beispielsweise Zellen oder, wie in dieser Arbeit, Nanopartikel (82). Dabei ermöglicht die Durchflusszytometrie mit dem hier verwendeten BD FACSLyric™ die kosteneffiziente, informative und zeitsparende Erfassung der Nanopartikel. Innerhalb kürzester Zeit können verschiedenste Informationen bezüglich der morphologischen Zusammensetzung sowie der Fluoreszenzeigenschaften der hier untersuchten Nanopartikel ermittelt werden. Hierbei bedarf es keiner größerer Vorbereitungen vor Versuchsdurchführung. Zudem zeichnet sich das BD FACSLyric™ durch seine überlegene Sensitivität und Auflösungsseigenschaften, Präzision und Reproduzierbarkeit aus (83).

Tabelle 2: Materialien im Rahmen der Versuche am Durchflusszytometer

Reagenzien	Hersteller
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (Modified, without CaCl <sub>2</sub> and MgCl <sub>2</sub> )	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, Missouri, USA
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Spritzenpumpenfilter 0,22 µm	Merck Millipore Ltd., Cork, Irland
Falcon™ 5 ml Polystyrol Röhrchen	Corning Incorporated, Corning, New York, USA

Flow Cytometry Size Calibration Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
<b>Geräte</b>	
BD FACSLyric™	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
<b>Software</b>	
CellQuest Pro, Version 5.3.3f4b	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
FlowJo Version 10.5.3	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Nanopartikel wurden diese in gefilterter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) ohne Kalzium in einer Zielkonzentration von 5 µg/ml und einem Zielvolumen von 300 µL suspendiert (81). Mithilfe eines sterilen Spritzenvorsatzfilters mit einer Porengröße von 220 nm wurden vorsorglich größere Mikropartikel im PBS-Puffer vor Hinzugabe der Nanopartikel extrahiert. Die Zielsuspension wurde anschließend in für das Durchflusszytometer kompatible Röhrchen gegeben. Als Kontrolle wurden 1 µm große Beads zur Verwendung im Durchflusszytometer in gefiltertem PBS resuspendiert. Die Durchflusszytometrie erfolgte an einem fluorescence-activated cell sorting (FACS)-fähigen Durchflusszytometer. Alle Proben wurden sowohl im FSC/SSC-Kanal als auch mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie über eine Messdauer von drei Minuten analysiert. Die Auswertung der ermittelten Messdaten erfolgte mittels FlowJo Version 10.5.3. Für alle Proben wurden die im FSC und SSC-Kanal detektierten Daten in sogenannten Pseudocolour Plots graphisch dargestellt, mit dem FSC-Signal auf der X-Achse, und dem SSC-Signal auf der Y-Achse. Die Fluoreszenzdaten können ebenfalls graphisch dargestellt werden.

## 2.4 Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie

Die Differentialinterferenzkontrast (DIC)-Mikroskopie nach Normanski stellt ein lichtmikroskopisches Verfahren zur Visualisierung transparenter Phasenobjekte dar und ermöglicht auf diese Weise die hochauflösende Darstellung der Nanopartikel unter 100x-facher Vergrößerung. In Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie können die Nanopartikel optisch hervorgehoben und somit differenzierter betrachtet werden. Zudem kann das Adhäsionsverhalten der Nanopartikel an Kollagenfasern auf mikroskopischer Ebene detailliert observiert und analysiert werden.

Tabelle 3: Materialien im Rahmen der Differentialinterferenzkontrastversuche

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (Modified, without CaCl <sub>2</sub> and MgCl <sub>2</sub> )	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, Missouri, USA
Collagen Reagens HORM® Suspension (KRH)	Takeda Austria GmbH, Linz, Österreich
Albumin (BSA) Fraction V (pH 7,0)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskopische Deckgläser (Abmessungen: 24 x 60 mm)	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
<b>Geräte</b>	
Mikroskop: Nikon Eclipse Ti2	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande
Kamera: Nikon DS-Qi2	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande
SOLA light engine	Lumencor, Inc., Beaverton, Oregon, USA
<b>Software</b>	

NIS-Elements BR (Version 5.21.00)	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande
NIS-Elements AR (Version 5.21.00)	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande
ImageJ (Version 1.52)	National Institutes of Health, USA
GraphPad Prism (Version 8.4.0)	GraphPad Software, San Diego, USA

Im ersten Schritt wurden Hoch-Präzisions-Deckgläschen zirkulär mit Kollagenreagens (25 µg/ml) beschichtet (81). Zur Unterbindung unspezifischer Bindungen folgte die Blockierung mittels einer 1 %-igen BSA-Lösung. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Nanopartikel (500 µg/ml) bei 37 °C über 1 Stunde. Um ungebundene Nanopartikel zu entfernen, wurden die Deckgläschen abschließend mittels PBS gespült. Unter Einsatz einer 100-fachen Vergrößerung und Ölimmersionsmikroskopie erfolgte am Lichtmikroskop die Visualisierung der Kollagenfasern. Hierbei wurde der DIC-Polarisator eingestellt, die Belichtungszeit betrug 80 ms. Nach Scharfstellen der Kollagenfasern wurde eine statische Aufnahme erstellt. Nun erfolgte der Wechsel zur Fluoreszenzmikroskopie. Durch Einstellen des TxRed-4040C-Fluoreszenzfilterblocks (Anregungswellenlänge 562/20 nm) bei einer Belichtungszeit von 200 ms, ließen sich die im selben Lichtfeld befindlichen Nanopartikel visualisieren. Es erfolgte ebenfalls eine statische Aufnahme. Dieser Vorgang wurde an fünf unterschiedlichen Positionen durchgeführt. Die zur Auswertung vorausgesetzte Verarbeitung der Bilder gelang mittels NIS-Elements AR (Version 5.21.00). Hier wurden die jeweils korrespondierenden DIC- und Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen zusammengeführt, sodass fluoreszierende Nanopartikel in der grau-belegten DIC-Aufnahme zu sehen sind. Die quantitative Analyse erfolgte mittels Ermittlung der durch Nanopartikel eingenommenen, fluoreszierenden Fläche (in %) sowie der Gesamtanzahl aller sich in einer Aufnahme befindlichen Nanopartikel. Zur näheren Objektivierung der Nanopartikel-Kollagen-Interaktion, wurde mittels ImageJ (Version 1.52) eine Gesamtlänge von jeweils 500 µm Kollagenfaser pro Aufnahme hinsichtlich der Anzahl gebundener Nanopartikel analysiert. Somit wurde anschließend die durchschnittliche Anzahl gebundener Nanopartikel pro

50 µm Kollagenfaser als Maßstab der Kollagenbindungsaffinität ermittelt. Die ermittelten Parameter wurden abschließend mittels GraphPad Prism (Version 8.4.0) einer Signifikanzanalyse mithilfe des Ordinary One-way ANOVA test und Tukey's multiple comparisons test (\*p ≤ 0.05, \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001) unterzogen.

## 2.5 Perfusionsversuche

Flusskammerversuche stellen eine *ex vivo* Methode zur Evaluierung der Thrombozytenadhäsion sowie Thrombusformation unter dynamischen Bedingungen dar. Nach vorausgegangener Färbung der Thrombozyten mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs, gelingt es, die Thrombozytenadhäsion, gefolgt von Thrombozytenaktivierung und daraus resultierender Thrombusformation, mittels Fluoreszenzmikroskopie in Echtzeit zu beobachten.

Tabelle 4: Materialien im Rahmen der Flusskammerversuche

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Albumin (BSA) Fraction V (pH 7,0)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (With CaCl <sub>2</sub> and MgCl <sub>2</sub> )	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, Missouri, USA
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (Modified, without CaCl <sub>2</sub> and MgCl <sub>2</sub> )	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, Missouri, USA
Collagen Reagens HORM® Suspension (KRH)	Takeda Austria GmbH, Linz, Österreich
DiOC <sub>6</sub>	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, Missouri, USA
DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	

S-Monovette® 8.5 ml CPDA	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Mikroskopische Deckgläser (Abmessungen: 24 x 60 mm)	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Injekt®-F Luer Solo, 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Injekt® 5 Luer Solo, 5 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
SafeSeal Reagiergef. 2 ml, PP	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße ROTILABO® 1,5 ml schwarz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
50 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
15 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Injectomat Leitung, 200 cm	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Pur-Zellin®	PAUL HARTMANN AG, Heidenheim, Deutschland
<b>Geräte</b>	
Mikroskop: Nikon Eclipse Ti2	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande
Kamera: Nikon DS-Qi2	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande
SOLA light engine	Lumencor, Inc., Beaverton, Oregon, USA
Flusskammer	FlowChamber B.V., Maastricht, Niederlande



Perfusor: KDS100 laboratory syringe pump	KD Scientific Inc., Holliston, Massachusetts, USA
<b>Software</b>	
NIS-Elements BR (Version 5.21.00)	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande
NIS-Elements AR (Version 5.21.00)	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande
ImageJ (Version 1.52)	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
GraphPad Prism (Version 8.4.0)	GraphPad Software, San Diego, USA
<b>Untersuchungsmaterial</b>	
Humanes Vollblut	Gesunde Spender

### **2.5.1 Analyse der Thrombogenese im Perfusionsmodell**

Durch zwei aufeinanderfolgende Verdünnungsschritte wurden die Nanopartikel mittels PBS auf eine Zielkonzentration von 5 µg/ml verdünnt (81). Anschließend wurden Deckgläschen in einer mit feuchten Tüchern bestückten Feuchtekammer platziert. Die für die Kollagenbeschichtung erforderliche Kollagensuspension wurde im Verhältnis von 1:10 aus dem Kollagenreagenz **HORM®** und der dazugehörigen SKF-Lösung angesetzt. Auf die Deckgläschen wurden schließlich je 200 µL der Kollagenlösung verteilt. Bei wahlweise 4°C über Nacht, beziehungsweise 37°C über 2 Stunden, erfolgte die Adhäsion der Kollagenfasern an das Deckglas. Der Überstand wurde folglich verworfen. Nun erfolgte die Applikation von jeweils 200 µL je Nanopartikellösung auf die Deckgläschen, woraufhin ein 1-stündiger Inkubationsschritt folgte. Der Überstand wurde erneut verworfen. Schließlich wurden 200 µL einer 1 %-igen BSA-Lösung zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 1 Stunde auf den Deckgläschen inkubiert. Eine Spritzenpumpenleitung wurde nah am Spritzenende beschnitten und am Einlass- beziehungsweise Auslasskanal der Flusskammer übergestülpt. Das abführende Ende der Spritzenpumpenleitung wurde in einer Gewindeflasche platziert. Der Perfusor wurde neben der Trägerfläche des Lichtmikroskops auf

derselben Höhe platziert. Aufnahmen der Flusskammer erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dafür wurde ein GFP-4050B-Fluoreszenzfilterblock (green fluorescent protein; Anregungswellenlänge 466/40 nm) vor das Objektiv mit 20-facher Vergrößerung appliziert und die Lichtquelle (SOLA light engine) auf 25 %-iger Intensität eingestellt. Die Belichtungszeit wurde auf 200 ms festgelegt. Da die Flusskammer in ihrem Stabilisierungsrahmen auf der Objektträgerfläche eine leicht erhöhte Position einnimmt, erfolgte die Korrektur des Arbeitsabstands mittels Einstellung des Ausgleichrings am Objektiv. Vor Versuchsdurchführung wurde jeweils 1 ml humanes, mittels Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA) antikoaguliertes Vollblut in 1,5 ml Reaktionsgefäße umverteilt und in einem Verhältnis von 5:1 mit PBS/Ca<sup>2+</sup> angesetzt. Der Umgang sowie die Durchführung wissenschaftlicher Experimente mit den in meiner Doktorarbeit verwendeten humanen Blutproben erfolgte gemäß den ethischen Grundsätzen und Leitlinien der Deklaration von Helsinki und wurde durch die Ethikkommission der Eberhard Karls Universität Tübingen unter der Projekt-Nummer 141/2018B02 genehmigt. Anschließend erfolgte eine Fluoreszenzfärbung über 10 Minuten mittels in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöstem 3,3'-Dihexyl-oxacarbocyaniniodide (DiOC<sub>6</sub>). Durch die Spritzenpumpenleitung wurde PBS/Ca<sup>2+</sup> mithilfe der 5 ml Spritze gespült, bis ein etwa 1 cm breiter Tropfen am Einlasskanal der Flusskammer entsteht. Nach dem Verwerfen des Überstands auf einem Deckgläschen, wurde dieses auf die Flusskammer gelegt. Anschließend wurde die Flusskammer in ihrer Stabilisierungshalterung platziert und immobilisiert. Nachdem das Gestell über dem Objektiv auf der Trägerfläche des Mikroskops platziert wurde, wurde nach abgeschlossener Inkubationszeit 1 mL Blut in eine Spritze gesogen und am zuführenden Spritzenpumpenleitungsende eingesetzt. Durch Befestigung dieser Spritze im Perfusor erfolgte die gleichmäßige Perfusion über den Zuführschlauch durch die Flusskammer. So gelang es, die Thrombozytenaktivierung und die daraus resultierende Thrombenbildung in Echtzeit zu beobachten. Die hier aufgeführten Perfusionsversuche erfolgten unter folgenden zwei Schergeschwindigkeiten: 1000 s<sup>-1</sup>, entsprechend einem Fluss von 7,53 ml/h, sowie 1700 s<sup>-1</sup>, entsprechend 12,75 ml/h. Sobald die mit Blut gefüllte Spritze nahezu leergelaufen war, wurde sie entfernt und mit einer mit PBS/Ca<sup>2+</sup> befüllten

1 mL Spritze ersetzt. Dadurch wird der Eintritt von Luft in die Flusskammer verhindert und die gleichmäßige Spülung der Flusskammer ermöglicht. Pro Durchgang wurden an verschiedenen Positionen fünf repräsentative Aufnahmen getätigt, die später zur Versuchsauswertung dienen. Die Auswertung der zuvor getätigten Aufnahmen wurde durch das Programm NIS-Elements AR (Version 5.21.00) ermöglicht. Mittels präziser Erfassung des Fluoreszenzsignals durch Anpassung des Signalerfassungsgrenzwerts, übereinstimmend mit dem Fluoreszenzsignal, gelang es, alle Thromben zu erfassen und zu analysieren. Die gesamte Thrombusfläche (in %), die mittlere Thrombusgröße (in  $\mu\text{m}^2$ ) sowie die Thrombusanzahl wurden ermittelt. Zusätzlich gelang es, die verschiedenen Intensitätsstufen pro Aufnahme mittels Intensitätsoberflächendiagrammen in einem dreidimensionalen Modell graphisch darzustellen. Dies ist sowohl für Standbilder als auch Videoaufnahmen möglich und zeichnet sich als visuellen Auswertungsansatz aus. Zur statistischen Analyse wurde GraphPad Prism (Version 8.4.0) herangezogen. Da die einzelnen Versuchsreihen aufgrund bestehender Spendervariabilität nur eingeschränkt miteinander vergleichbar sind, erfolgte die Signifikanzanalyse unter Durchführung des Repeated Measures One-way ANOVA test und Tukey's multiple comparisons test (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

### **2.5.2 Analyse der Nanopartikeladhäsion an Kollagenfasern**

Zur Perfusion der Nanopartikel wurden diese in PBS ohne Kalzium in einer Zielkonzentration von 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  suspendiert. Die Präparation der Deckgläschen für diesen Versuchsansatz erfolgte äquivalent zur Beschreibung in Abschnitt 2.5.1, jedoch ohne Applikation einer Nanopartikellösung (81). Der Versuchsaufbau gleicht dem in Abschnitt 2.5.1 beschriebenen Versuchsaufbau. Aufnahmen der Nanopartikelperfusion erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskopie. Der TxRed-4040C-Fluoreszenzfilterblock (Anregungswellenlänge 562/20 nm) wurde vor das Objektiv mit 20-facher Vergrößerung appliziert und die Lichtquelle (SOLA light engine) auf 10 %-iger Intensität eingestellt. Die Belichtungszeit wurde auf 100 ms festgelegt. Die Durchführung der Perfusionsversuche erfolgte gemäß den in Abschnitt 2.5.1 beschriebenen Versuchsvorgängen. Die Nanopartikelsuspension wurde hierbei als Versuchsmedium in den Perfusor

eingelegt. Die Perfusionsversuche erfolgten unter folgenden zwei Schergeschwindigkeiten:  $1000\text{ s}^{-1}$ , entsprechend einem Fluss von 7,53 ml/h, sowie  $1700\text{ s}^{-1}$ , entsprechend 12,75 ml/h. Die Auswertung der getätigten statischen und dynamischen Aufnahmen erfolgte durch das Programm NIS-Elements AR (Version 5.21.00). Die ermittelten Parameter waren die durch Nanopartikel eingenommene, fluoreszierende Fläche (in %) sowie die absolute Anzahl erfasster Nanopartikel. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben. Da der Faktor Spendervariabilität in diesen Versuchen ohne Spendermaterial irrelevant ist, erfolgte die Signifikanzanalyse unter Durchführung des Ordinary One-way ANOVA test und Tukey's multiple comparisons test (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

## **2.6 Rastersondenmikroskopie**

### **2.6.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie**

Die Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie (engl. *scanning ion-conductance microscopy*, SICM) stellt eine Form der Rastersondenmikroskopie dar und ermöglicht es, die Oberflächenbeschaffenheit biologischer Proben im Mikro- und Nanometerbereich präzise darzustellen. Hierfür wird eine Elektrolytlösung auf die zu untersuchenden Proben gegeben. Anschließend werden eine mit einer Elektrode bestückte Pipette sowie eine weitere Elektrode in die Elektrolytlösung eingeführt. Sobald beide dieser Elektroden unter Spannung gebracht werden, fließt ein Ionenstrom durch die Pipettenspitzenöffnung. Das Messprinzip basiert dabei auf Veränderungen des elektrischen Widerstandes zwischen beiden Elektroden durch Bewegung der Pipette über das Versuchsmedium. Je höher die zu untersuchende Struktur, desto näher ragt die Pipette an diese heran. Somit schmälert sich der verfügbare Raum, durch den Ionen strömen können. Dies resultiert in einer Widerstandszunahme und spiegelt auf diese Weise die Größenbeziehungsweise Höhenzunahme der unterliegenden Struktur. Mittels SICM wurden durch Perfusionsversuche erzeugte Thromben in einer maßgefertigten Versuchsaufstellung morphologisch analysiert (81). Zuvor wurden diese mittels Paraformaldehyd auf ihren Deckgläschen fixiert, in Petrischalen befestigt und mit

PBS inkubiert. Zur seitlichen Positionierung der Probe wurde ein 200  $\mu\text{m}$  xy-Scanner (P-527.3CL; Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die vertikale Ausrichtung der Nanopipette erfolgte mittels eines 25  $\mu\text{m}$  z-Scanners (P-753.21C; Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland). Mithilfe eines Patch-Clamp-Verstärkers (EPC-800; HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) wurden die Ionenstrommessungen vorgenommen. Eine Brosilikatnanopipette mit einem internen Durchmesser von 50 nm (P-2000; Sutter Instrument, Novato, Kalifornien, USA) kam zum Einsatz. Mithilfe des Nikon Inverted Microscope Eclipse Ti-U (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande) wurden die sich auf den Deckgläschen befindlichen Thromben und die Nanopipette optisch erfasst. Der Scanbereich wurde auf 100 x 100  $\mu\text{m}^2$  mit einer Pixelanzahl von 150 x 150 Pixeln festgelegt, um auf diese Weise eine möglichst große Anzahl an Thromben gleichzeitig abzubilden. Die Analyse der Thrombusmorphologie erfolgte über IGOR PRO 8 (WaveMetrics, Inc., Oregon, USA).

### **2.6.2 Rasterkraftmikroskopie**

Die Rasterkraftmikroskopie (Engl. *atomic force microscopy*, AFM) gehört ebenfalls zum Bereich der Rastersondenmikroskopie. Basierend auf Kontaktmessungen zwischen einer Blattfeder (Engl. Cantilever) und der sich unterhalb befindlichen Struktur, lassen sich Informationen zur topographischen Beschaffenheit generieren. Dabei werden Höhenunterschiede mittels Verbiegung der Blattfeder und daraus resultierender Laserreflektion ermittelt. Mithilfe von AFM-Kontaktmessungen wurden an Kollagenasern gebundene Nanopartikel (Abschnitt 2.1.4) morphologisch untersucht (81). Hierfür wurden die Deckgläschen nach erfolgter Perfusion unter einer Sterilbank eingetrocknet. AFM-Kontaktmessungen erfolgten mit dem Rasterkraftmikroskop MFP3D-BIO (Asylum Research, Santa Barbara, Kalifornien, USA) und einem Cantilever D ( $k = 5 \text{ pN/nm}$ ; MLCT; Brucker AFM, Camarillo, Kalifornien, USA) mit einer Scanrate von 0,1 Hz durchgeführt. Es wurde zunächst ein Scanbereich von 90 x 90  $\mu\text{m}^2$  gewählt und ein zufällig ausgewählter Bereich stetig vergrößert. Im Rahmen der Messungen wurde eine Auflösung von 512 Points/Lines eingestellt. Die Deflektion wurde auf 1 V gesetzt. Die Auswertung des Durchmessers und der

Höhe der Nanopartikel erfolgte mittels der freien Software Gwyddion über Linienprofile.

## 2.7 Lichttransmissionsaggregometrie

Die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) stellt eine *in vitro* Untersuchungsmethode zur Evaluierung der Thrombozytenaggregation dar. Sie basiert auf der Erfassung eines Lichttransmissionsgradienten durch unterschiedliche Medien mithilfe von Silikon-Fotodioden. In diesem Versuch wurden plättchenreiches Plasma (Engl. *platelet rich plasma*, PRP) und plättchenarmes Plasma (Engl. *platelet poor plasma*, PPP) als Untersuchungsmaterial verwendet. Als Referenzwert für maximale Lichtdurchlässigkeit dient dabei die Lichttransmission durch das klarere PPP und wird mit 100 % beziffert. Das PRP ist aufgrund der hohen Menge an Thrombozyten relativ trüb und führt dadurch zu einer vermehrten Lichtstreuung, wodurch weniger Licht ungehindert von der einen zur anderen Photodiode gelangt. In diesem Zustand wird das Maß an Lichttransmission durch die PRP-Probe mit 0 % beziffert. In Reaktion auf die Thrombozytenaktivierung erfolgt die Thrombozytenaggregation in der PRP-Suspension, wodurch diese graduell lichtdurchlässiger wird und der Grad an ungehinderter Lichttransmission stetig zunimmt. Die Thrombozytenaktivierung erfolgte dabei nach Hinzugabe unterschiedlicher Agonisten, unter anderem Kollagen, ADP und *collagen-related peptide* (CRP). Die dadurch entstehende Kurve dient als Korrelat für den Grad an Thrombozytenaggregation in der aktivierten PRP-Suspension.

Tabelle 5: Materialien im Rahmen der Lichttransmissionsaggregometrie

Reagenzien	Hersteller
COLtest Kollagenreagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
CRP	CambColLaboratories, Cambridge, UK

ADP	Chrono-log Corporation, Havertown, Pennsylvania, USA
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (With CaCl <sub>2</sub> and MgCl <sub>2</sub> )	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, Missouri, USA
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
S-Monovette® 10 ml 9NC	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
15 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhren	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pasteur-Plast Pipetten 2,5 ml	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
nerbe plus GmbH & Co. KG	nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen/Luhe, Deutschland
Chrono-log Glasküvetten (450 µL)	Chrono-log Corporation, Havertown, Pennsylvania, USA
Chrono-log Stir Bars	Chrono-log Corporation, Havertown, Pennsylvania, USA
<b>Geräte</b>	
Chrono-log Aggregometer 490-X	Chrono-log Corporation, Havertown, Pennsylvania, USA
Sysmex KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland
Multifuge 1s	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
<b>Software</b>	
AGGRO/LINK (Version 5.2.1)	Chrono-log Corporation, Havertown, Pennsylvania, USA
GraphPad Prism (Version 8.4.0)	GraphPad Software, San Diego, USA
<b>Untersuchungsmaterial</b>	
Humanes Serum	Gesunde, humane Spender

Humanes Blut wurde in 10 ml Citrat-Röhrchen abgenommen und anschließend bei 1000 rpm, beziehungsweise 209 xg, über 20 Minuten zentrifugiert (81). Dadurch erfolgte die Separierung der einzelnen Zellpopulationen im Blut. Das sich nun oben befindliche PRP wurde extrahiert. In einem zweiten Zentrifugationsschritt bei 3500 rpm, beziehungsweise 2561 xg, über 10 Minuten, erfolgte die Separierung der Thrombozyten und dem Serum, sodass das sich nun oben befindliche PPP ebenfalls entnommen werden konnte. Mittels Sysmex Hämatologie-Analysator wurde die im PRP befindliche Anzahl der Thrombozyten bestimmt. Anschließend wurden PRP und PPP miteinander vermischt, sodass die absolute Thrombozytenanzahl in einem Endvolumen von 480 µL etwa 100 Millionen Thrombozyten beträgt. Die Zielsuspension wurde anschließend in mit Rührstäbchen gefüllten Glasküvetten verteilt. Vor Versuchsbeginn erfolgte eine Prä-Inkubationsphase des Agonisten mit den verschiedenen Nanopartikeln unter spezifischen Konditionen, welche in Tabelle 5 näher beschrieben werden. Die Erfassung der Messdaten erfolgte im Programm AGGRO/LINK (Version 5.2.1). Indem die PPP- und die PRP-Proben in die für sie bestimmte Sockel positioniert wurden, erfolgte die Kalibrierung des Aggregometers durch Einstellung der Baseline des Messsignals auf die 0 %-Linie.

Tabelle 6: Versuchsansätze am Lichttransmissionsaggregometer

<b>Agonist</b>	<b>Endkonzentration des Agonisten</b>	<b>Endkonzentration der Nanopartikel</b>	<b>Prä-Inkubation</b>
Kollagen	2 µg/ml	20 µg/ml	30 min / 37 °C + CaCl <sub>2</sub> (2 mM)
ADP	5 µM	5 µg/ml	30 min / 37 °C + CaCl <sub>2</sub> (2 mM)
CRP	0,125 µg/ml	20 µg/ml	30 min / 37 °C + CaCl <sub>2</sub> (2 mM)

Die Thrombozytenaggregation erfolgte durch Injektion des Agonisten in die PRP-Suspension. Über fünf Minuten erfolgte nun die Messung der zum Lichttransmissionsgradienten korrelierenden Thrombozytenaggregation. Mittels



GraphPad Prism (Version 8.4.0) erfolgte die graphische Darstellung der Aggregationskurven sowie deren statistische Auswertung. Um die maximale Aggregation (MA) pro Aggregationskurve zu bestimmen, wurde eine deskriptive Analyse der Datensätze durchgeführt. Die dadurch ermittelten Nadir-Werte pro Messreihe wurden von 100 % subtrahiert und folglich einander gegenübergestellt. Des Weiteren wurde die Fläche unter der Kurve (engl. *area under the curve*, AUC) bestimmt. Die Signifikanzanalyse erfolgte mithilfe des Repeated Measures One-way ANOVA test post Test (\*p ≤ 0.05, \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001).

## 2.8 T-TAS®

### 2.8.1 Prinzip

Das Total Thrombus-Formation Analysis System (T-TAS®) ermöglicht die automatisierte *in vitro* Analyse der Thrombusentstehung, basierend auf Perfusionsexperimenten. Vollblut wird über 26 parallel-geschaltete, Kollagen-beschichtete Mikrokapillaren des PL-Chips für T-TAS® unter physiologischen, arteriellen Flussraten perfundiert (low shear: 1000 s<sup>-1</sup>; high shear: 2000 s<sup>-1</sup>). Der Prozess der Thrombusentstehung wird hierbei mittels kontinuierlicher Druckmessungen (in kPa) objektiviert, es entstehen Druck-Zeit-Diagramme: Je höher der gemessene Druck, desto ausgeprägter die Thrombusformation.

Tabelle 7: Materialien im Rahmen der T-TAS®-Versuche

Reagenzien	Hersteller
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (Modified, without CaCl <sub>2</sub> and MgCl <sub>2</sub> )	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, Missouri, USA
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
S-Monovette® 1,6 ml Hirudin	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
PL-Chips for T-TAS®	Fujimori Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan

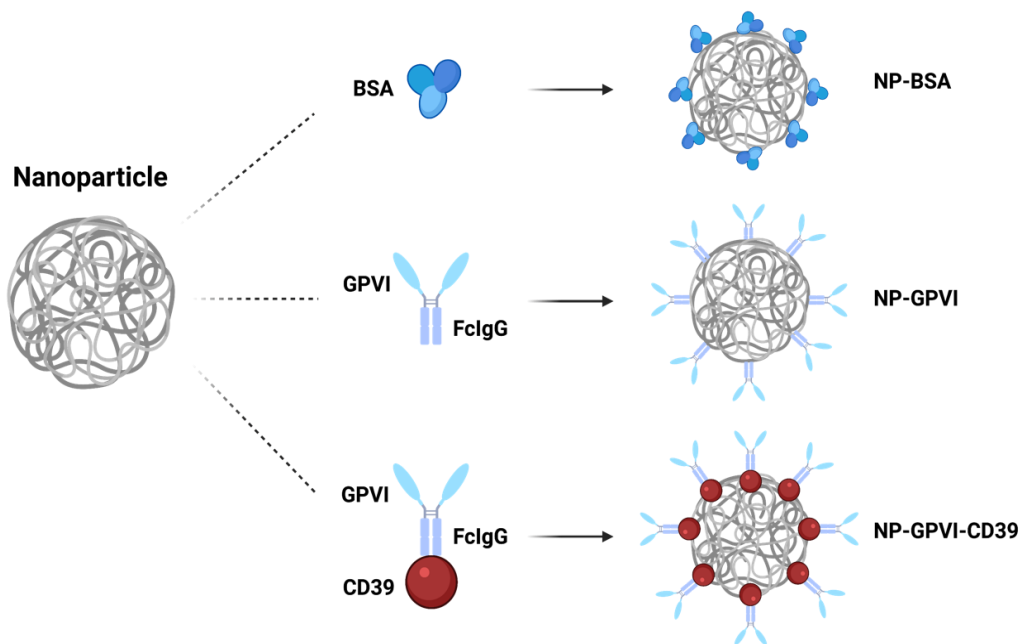
PL-Chip reservoir set for T-TAS®	Fujimori Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan
<b>Geräte</b>	
T-TAS® plus	Fujimori Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan
<b>Software</b>	
T-TAS 1.01.1	Fujimori Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan
GraphPad Prism (Version 8.4.0)	GraphPad Software, San Diego, USA
<b>Untersuchungsmaterial</b>	
Humanes Serum	Gesunde, humane Spender

Vor Perfusion wurden die jeweiligen Nanopartikel mittels Hinzugabe von PBS bei einem Zielvolumen von 10 mL vorverdünnt (81). Im nächsten Schritt erfolgte die Resuspension der Nanopartikel in antikoaguliertes, humanes Vollblut bei einer Zielkonzentration von 20 µg/ml. 320 mL der vorbereiteten Ziellösung wurden zur Perfusion in entsprechende Reservoirs appliziert. Anschließend erfolgte die automatisierte Perfusion. Folgende Parameter wurden erhoben: Okklusionsstartzeit (Engl. *occlusion start time*, OST; Zeit zum Erreichen von 10 kPa), Okklusionszeit (Engl. *occlusion time*, OT; Zeit zum Erreichen von 60 kPa) sowie die AUC. Der Versuchsdurchlauf wird bei Erreichen von 80 kPa oder einer maximalen Versuchsdauer von 10 Minuten automatisch beendet. Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism (Version 8.4.0). Die Signifikanzanalyse gelang mithilfe des Repeated Measures One-way ANOVA test und Tukey's multiple comparisons test (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

### 3 Ergebnisse

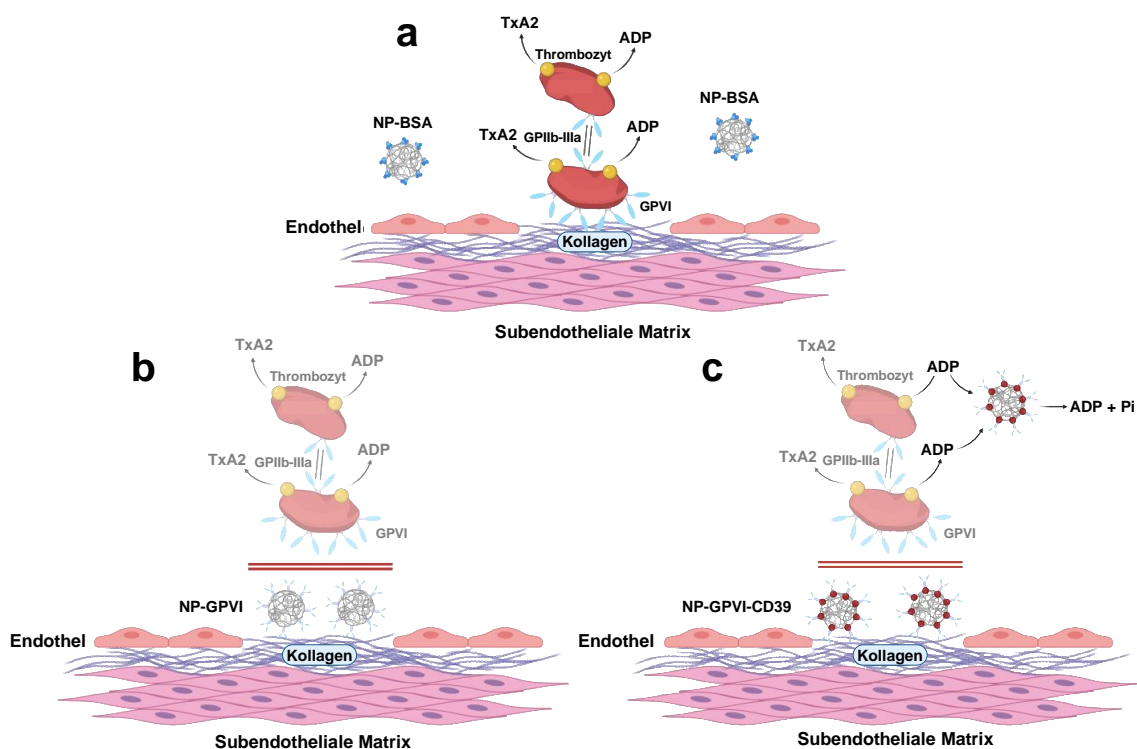
#### 3.1 Fabrikation funktionalisierter Nanopartikel

Im ersten Schritt meiner Forschungsarbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Technion Israel Institute of Technology die Herstellung dreier unterschiedlicher, 200 nm großer PLGA-Nanopartikel mittels dem Öl-in-Wasser Emulsion – Lösungsmittel Evaporationsverfahren (Abbildung 2) (81). Hierfür wurden BSA, GPVI-Fc und GPVI-CD39 als Effektormoleküle an die Nanopartikel gebunden. Im Rahmen der näheren Betrachtung der Nanopartikel nach deren Herstellung erwies sich für NP-BSA ein mittlerer Nanopartikeldiameter von  $207 \pm 95$  nm mit einem Zeta-Potential von  $-21.7 \pm 6.3$  mV, NP-GPVI  $261 \pm 105$  nm mit einem Zeta-Potential von  $-24.1 \pm 4.2$  mV und NP-GPVI-CD39:  $314 \pm 78$  nm mit einem Zeta-Potential von  $-17 \pm 4.2$  mV. Die mittlere Anzahl der pro Nanopartikel gebundenen BSA-, GPVI-Fc- und GPVI-CD39-Moleküle wurde mittels einem Bradford Assay auf je 17.000, 1.500 und 1.000 bestimmt.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Nanopartikel mit ihren jeweiligen Beschichtungen.** NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; BSA: Bovines Serumalbumin; GPVI: Glykoprotein VI; FcIgG: Immunglobulin G Fc-Fragment; CD39: Ectonukleotidase CD39; NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel. Generiert mit Biorender.com.

In Abbildung 3 wird die Wirkungsweise der jeweiligen Nanopartikel auf die primäre Hämostase schematisch wiedergegeben (81). Sowohl NP-GPVI als auch NP-GPVI-CD39 besetzen mithilfe ihres dimerischen GPVI-Fc-Rezeptors Kollagenbindungsstellen und hemmen somit die Thrombusentstehung. Mithilfe seiner CD39-Untereinheit hemmt NP-GPVI-CD39 zusätzlich den Plättchen-Aktivator ADP. Somit fungiert NP-GPVI-CD39 durch Inhibierung der Thrombozytenaktivierung und -adhäsion als bifunktionelles antithrombotisches Agens. Da BSA nicht mit der Hämostase interferiert, wurden NP-BSA als Kontrollformulierung verwendet.

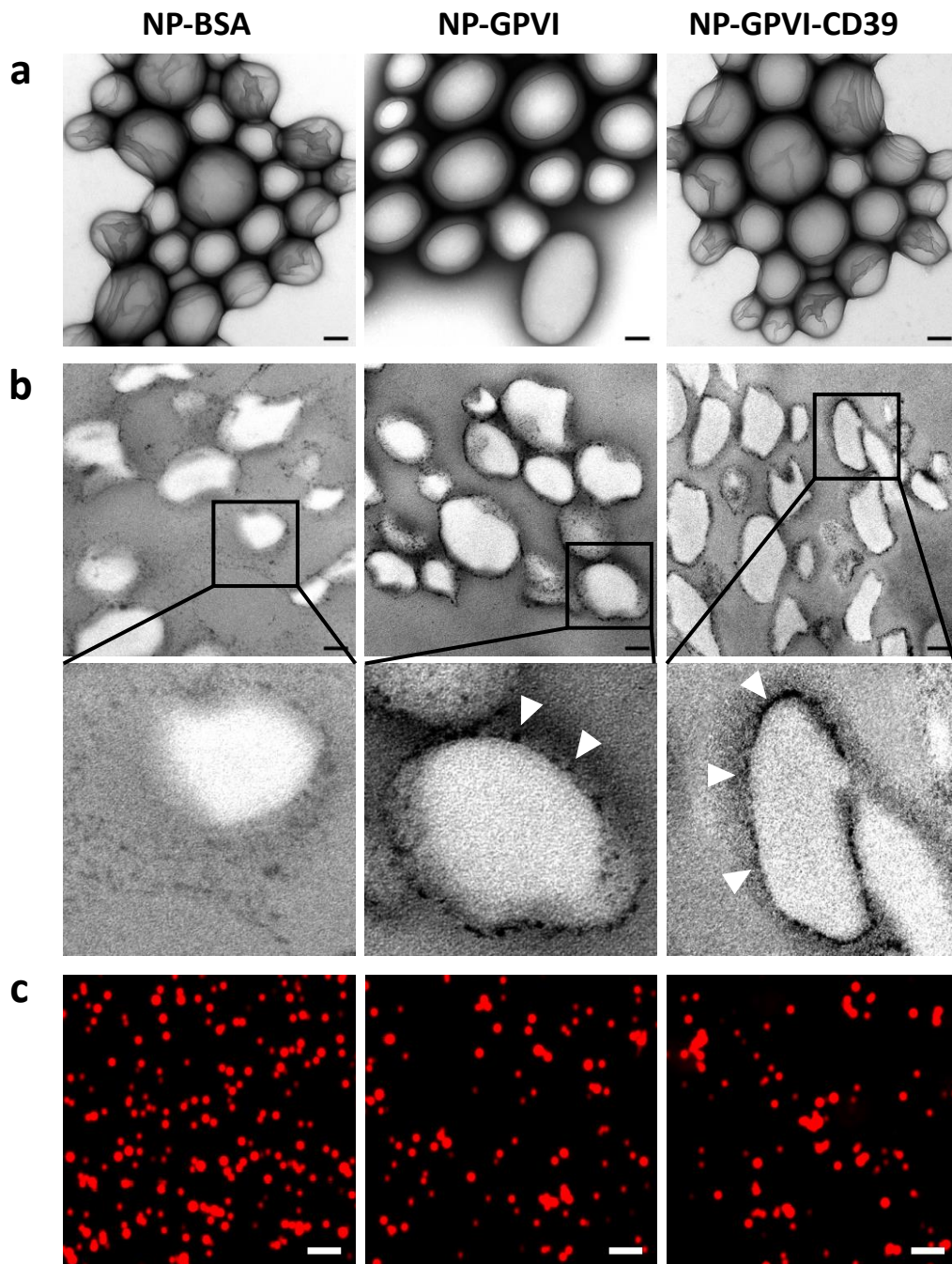


**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Nanopartikel-induzierten Modifikation der Hämostase bei Endothelschaden.** Aufgrund des dimerischen Kollagen-Rezeptors GPVI-Fc binden NP-GPVI (b) und NP-GPVI-CD39 (c) an subendothelial gelegene Kollagenfasern. Somit kommt es zur kompetitiven Inhibierung der Thrombozytenadhäsion. NP-GPVI-CD39 degradiert zusätzlich durch Thrombozyten sekretiertes ADP durch Ektonukleotidase CD39 und kompromittiert auf diesem Wege die Thrombozytenaktivierung bifunktional. NP-BSA (a) beeinflusst die Thrombozytenadhäsion nicht. NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel. ADP: Adenosindiphosphat; Pi: Inorganisches Phosphat; TxA2: Thromboxan A2; GP IIb/IIIa: Glykoprotein IIb/IIIa. Adaptiert von Degen *et al.* (60). Generiert mit Biorender.com.

## **3.2 Morphologische Charakterisierung**

### ***3.2.1 Elektronenmikroskopische Darstellung der Nanopartikel***

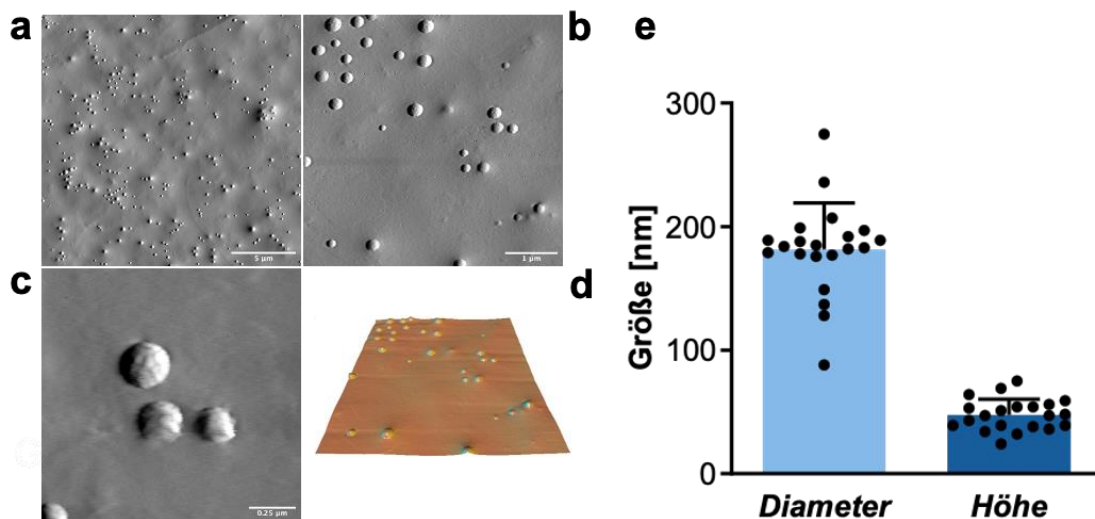
Im nächsten Schritt erfolgte eine eingehende Betrachtung der Nanopartikel im Hinblick auf deren morphologische Eigenschaften. Im Zuge dessen erfolgte zunächst eine elektronenmikroskopische Erfassung der unterschiedlich beschichteten Nanopartikel (81). Eine Zusammenstellung elektronenmikroskopischer Aufnahmen wird in Abbildung 4 wiedergegeben. Hierbei werden insbesondere in den Ultradünnschnitten feine morphologische Unterschiede sichtbar, da sowohl NP-GPVI als auch NP-GPVI-CD39 ein zirkuläres Beschichtungsmuster aufweisen, im Gegenteil zu NP-BSA (Abbildung 4, Pfeilspitzen). In der Konfokalmikroskopie hingegen zeigen sich bezüglich der Fluoreszenz keine Unterschiede.



**Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Nanopartikel.** (a) Negativstaining, Skala: 100 nm; (b) Ultradünnschnitte, Skala: 100 nm; (c) Konfokalmikroskopie fluoreszierender Nanopartikel, Skala: 2  $\mu$ m. Insbesondere Ultradünnschnitte (b) illustrieren Beschichtungsunterschiede: NP-GPVI und NP-GPVI-CD39 weisen ein zirkuläres Beschichtungsmuster auf (Pfeilspitzen). Alle Aufnahmen erfolgten durch Frau B. Fehrenbacher der Core Facility Elektronenmikroskopie des Universitätsklinikums Tübingen. NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel.

### 3.2.2 Morphologische Analyse der Nanopartikel mittels AFM

Um die dimensionalen Ausmaße der Nanopartikel differenzierter bestimmen zu können, erfolgten im Rahmen der erweiterten morphologischen Analyse AFM-Kontaktmessungen (81). In Abbildung 5 werden topographische Aufnahmen der Nanopartikel nach Erfassung in unterschiedlicher Vergrößerung dargestellt. Die statistische Auswertung ergibt einen mittleren Nanopartikeldurchmesser von  $182 \pm 37$  nm. Die mittlere Höhe wurde auf  $48 \pm 13$  nm beziffert. Diese Messwerte stimmen demzufolge im Wesentlichen mit den während des Herstellungsprozesses ermittelten dimensional Parameter überein.



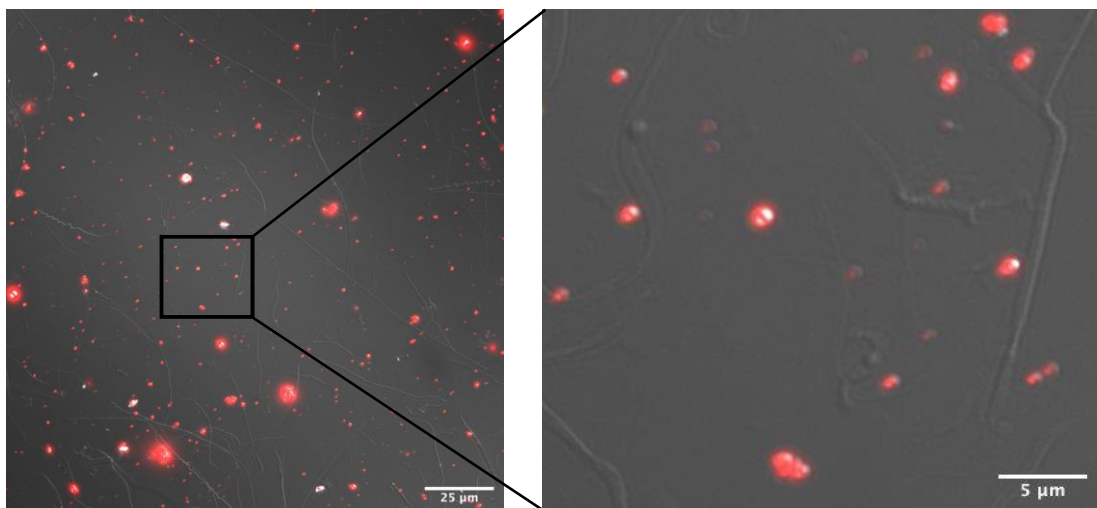
**Abbildung 5: Atomic force microscopy (AFM)-Kontaktmessungen.** (a)-(d): Topographische Aufnahmen der Nanopartikel mittels AFM in aufsteigender Vergrößerung; Skala: (a) 5 µm; (b) 1 µm; (c) 0,25 µm; (d) Dreidimensionale Transformation von (b); (e) Quantitative Analyse der Morphologieparameter Diameter und Höhe, basierend auf AFM-Kontaktmessungen. Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 21$ . Alle Daten wurden durch Herrn K. Krutzke der Arbeitsgruppe T. Schäffer des Instituts für Angewandte Physik der Universität Tübingen generiert.



### 3.3 Fluoreszenz

#### 3.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung

Nachdem die Analyse der morphologischen Eigenschaften der Nanopartikel abgeschlossen war, erfolgte nun, basierend auf dem in den Nanopartikeln integrierten Fluoreszenzfarbstoff Nile Red, eine Analyse der Fluoreszenzeigenschaften (81). Um die Nanopartikel diesbezüglich zu visualisieren, wurden lichtmikroskopische Aufnahmen mittels DIC-Mikroskopie unter 100-facher Vergrößerung und Immersionstechnik gefertigt. Indem diese nun in einem weiteren Schritt mit fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen im TxRed-4040C-Fluoreszenzfilterblock (Anregungswellenlänge 562/20 nm) desselben Sichtfeldes zusammengeführt wurden, konnten fluoreszierende Nanopartikel auf mit Kollagen beschichteten Deckgläschen optisch dargestellt werden (Abbildung 6).

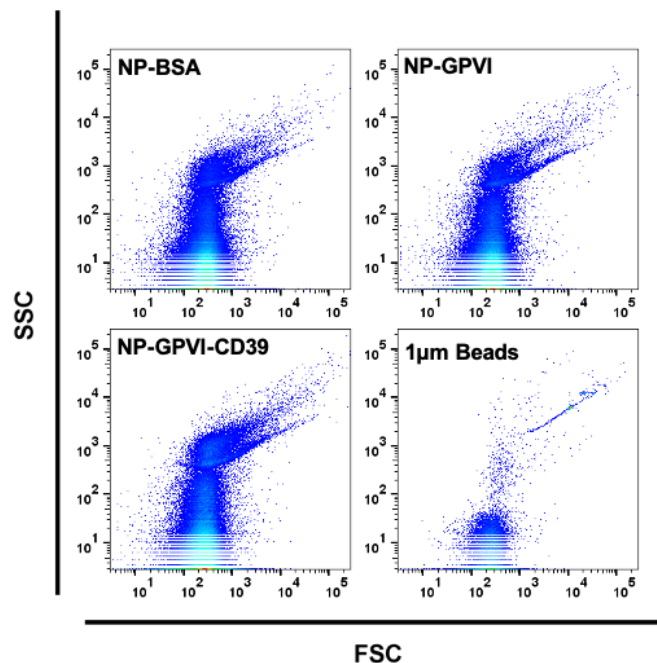


**Abbildung 6: Zusammengeführte DIC- und Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der Nanopartikel nach Inkubation auf Kollagen-beschichteten Deckgläschen.** Aufgrund der Emissionswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffs Nile-red, erscheinen die Nanopartikel bei Anregung rötlich. 100x Vergrößerung; Skala: 25 µm.

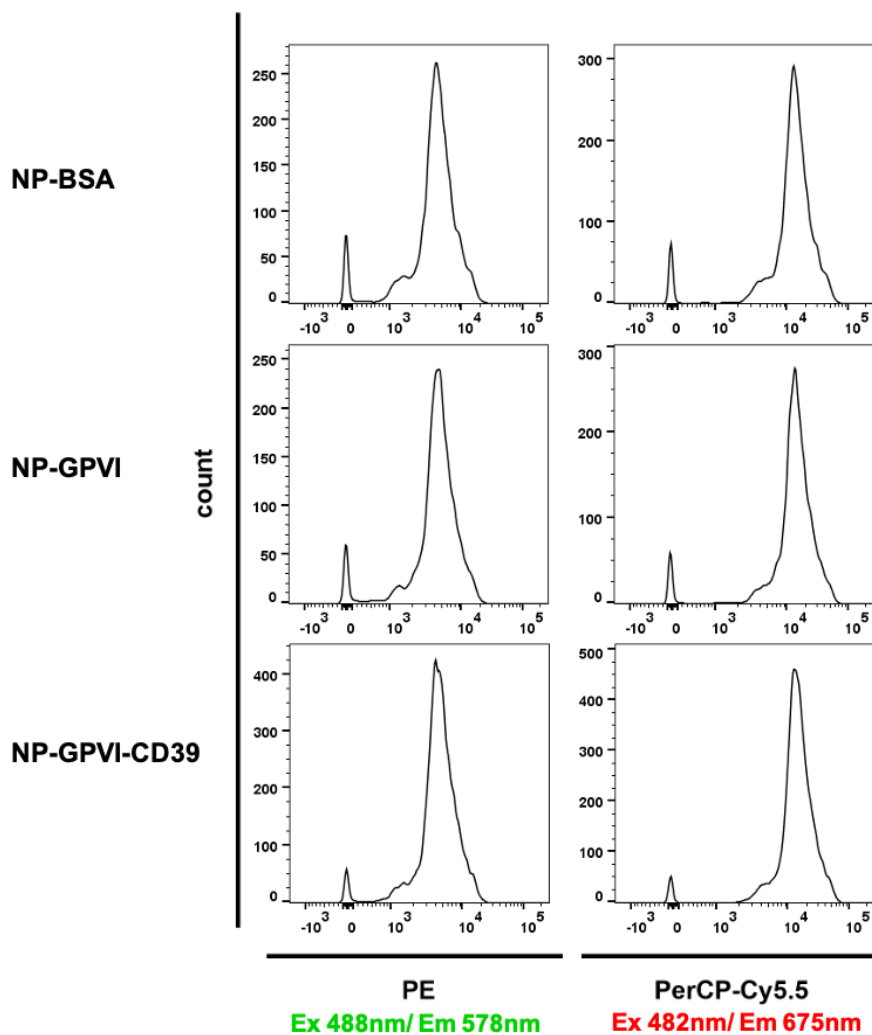


### 3.3.2 Durchflusszytometrische Erfassung der Nanopartikel

Aufgrund ihrer gegebenen Fluoreszenz ergibt sich auf Basis der Durchflusszytometrie eine weitere Möglichkeit der detaillierten Analyse der Morphologie sowie der Fluoreszenz selbst (81). In Abbildung 7 sind Pseudocolour Plots der jeweiligen Nanopartikelproben sowie einer 1  $\mu\text{m}$  großen Beads enthaltenden Lösung dargestellt. Hierbei zeigt sich weder im FSC-, noch im SSC-Detektionskanal, ein wesentlicher Unterschied zwischen NP-BSA, NP-GPVI und NP-GPVI-CD39. Somit lässt sich auf äquivalente Größen- sowie Granularitätseigenschaften der Nanopartikel schließen. Die 1  $\mu\text{m}$  großen Beads weisen sowohl im FSC- als im SSC-Kanal ein höheres Signal auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Nanopartikel im Durchschnitt kleiner als 1  $\mu\text{m}$  sein müssen. Nanopartikelkonglomerate könnten höhere FSC-Werte erklären. In den Fluorochromdetektionskanälen PE und PerCP erweisen sich die Fluoreszenzsignale der Nanopartikelproben als übereinstimmend (Abbildung 8).



**Abbildung 7: Pseudocolour Plots der Nanopartikel sowie einer 1  $\mu\text{m}$  Beads enthaltenden Probe in FSC- und SSC-Detektionskanälen.** Es zeigt sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den Nanopartikeln, entsprechend äquivalenter Größe und Granularität. Da der Großteil des Verteilungsmusters der Nanopartikel sich links der 1  $\mu\text{m}$  Beads-Probe im FSC-Kanal befindet, müssen die Nanopartikel kleiner als 1  $\mu\text{m}$  sein. NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel. FSC: Vorwärtsstreulicht; SSC: Seitwärtsstreulicht.

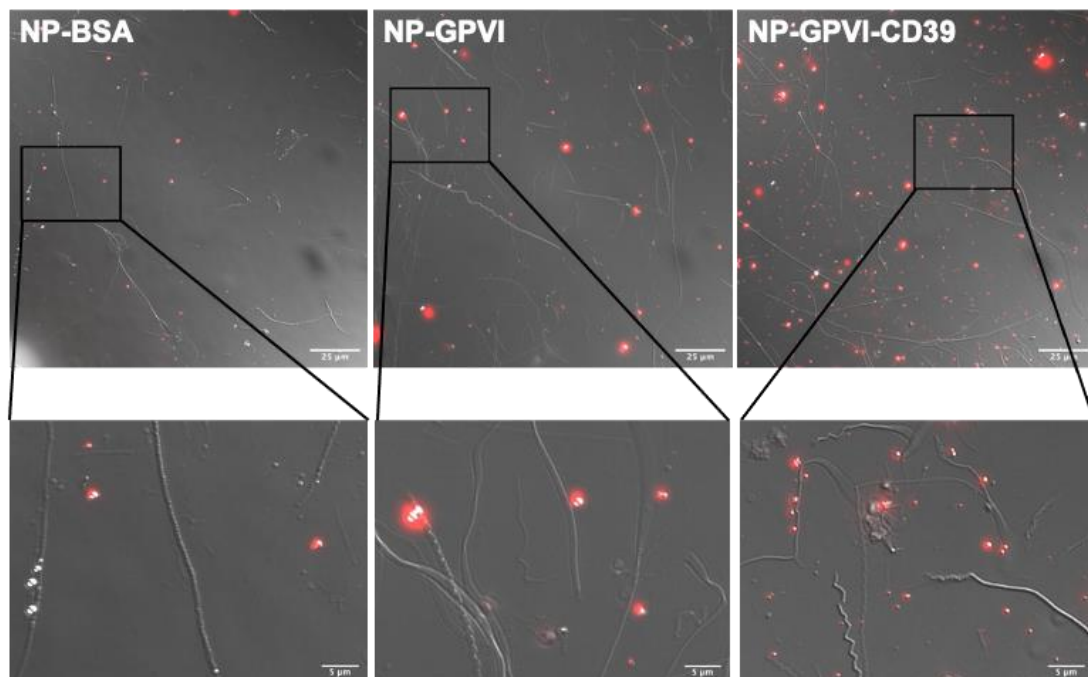


**Abbildung 8: Fluoreszenzsignale je Nanopartikelprobe in den Fluorochromkanälen Phycoerythrin (PE) und Peridininchlorophyllprotein (PerCP) nach Anregung durch einen 488 nm Laser. Es zeigt sich ein übereinstimmendes Fluoreszenzsignal. NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel. Ex: Exmissionsmaximum; Em: Emissionsmaximum; PE: Phycoerythrin; PerCP-Cy.5.5: Peridininchlorophyllprotein.**

### 3.4 GPVI-Fc-beschichtete Nanopartikel binden an Kollagenfasern unter statischen und dynamischen Bedingungen

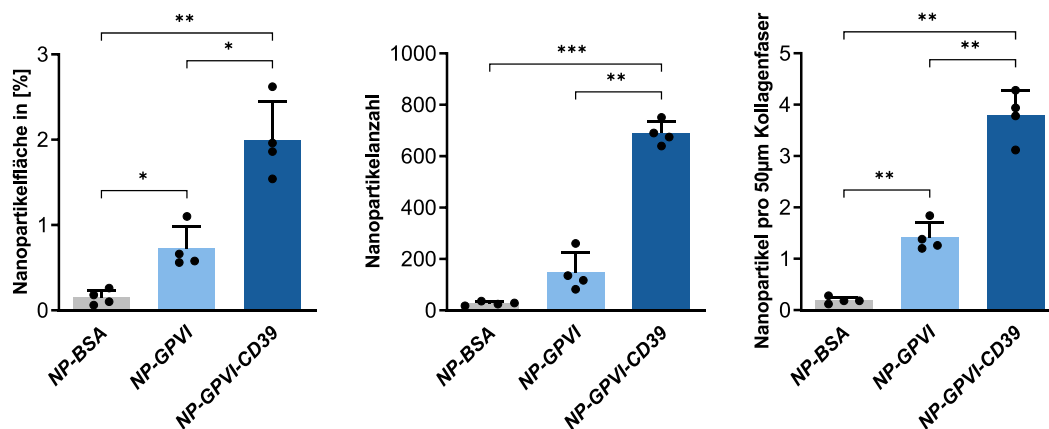
#### 3.4.1 Kollagenbindung im statischen Modell

Um den Einfluss der Nanopartikel auf die *in vitro* Thrombusentstehung zu untersuchen, wurden die Nanopartikel im folgenden Schritt meiner Doktorarbeit auf ihre funktionellen Eigenschaften hin untersucht (81). Beginnend mit der Analyse der Adhäsionsaffinität der Nanopartikel an Kollagenfasern, soll deren GPVI-Fc-vermittelter Bindungsmechanismus bestätigt werden. Im ersten Schritt wurden die Nanopartikel auf mit Kollagen-beschichteten Deckgläschen inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Abbildung der Nanopartikel mittels DIC-Mikroskopie (Abbildung 9). Hierbei zeigt sich die im Vergleich zu den mit dimerischem Kollagenrezeptor GPVI-Fc ausgestatteten Nanopartikeln NP-GPVI und NP-GPVI-CD39 defizitäre Kollagenbindungskapazität von NP-BSA. NP-GPVI-CD39 erweist sich zusätzlich als deutlich Kollagenbindungs-affiner als NP-GPVI.



**Abbildung 9: DIC-Mikroskopische Sichtfeldaufnahmen der Nanopartikel nach vorausgegangener Inkubation auf Kollagen-beschichteten Deckgläschen.** NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel. 100x Vergrößerung; Skala – Obere Reihe; 25 µm, untere Reihe: 5 µm.

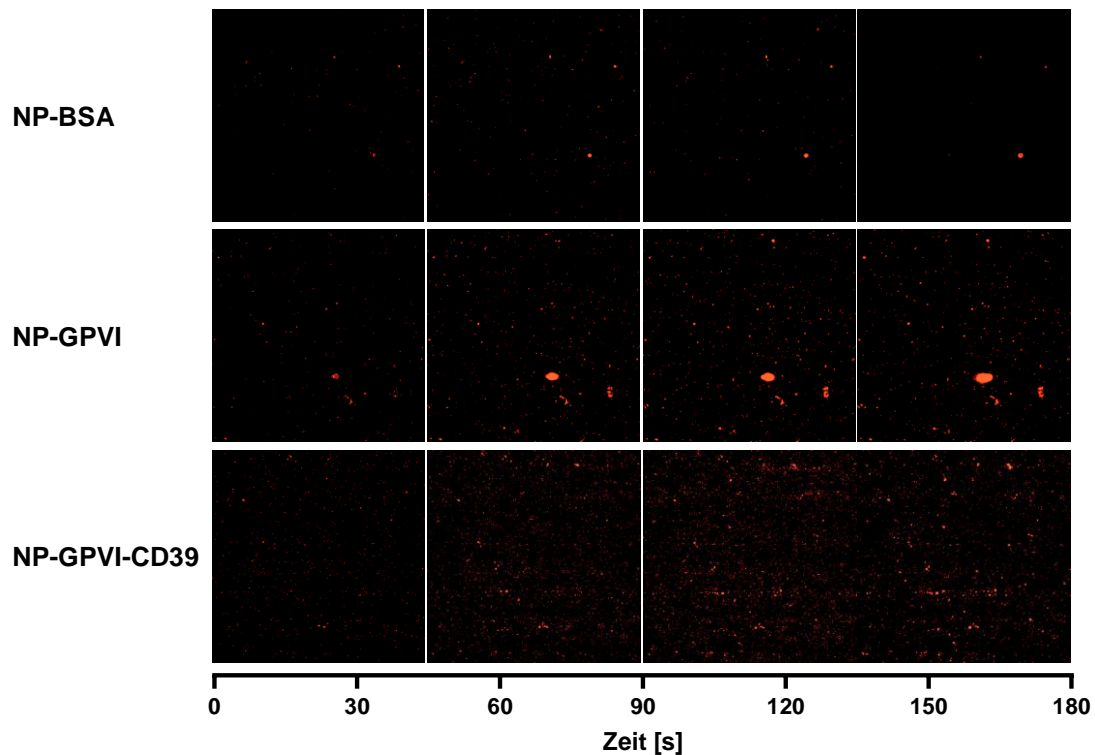
Die Ergebnisse der statistischen Auswertung decken sich mit den Befunden der vorausgegangenen mikroskopischen Darstellung (Abbildung 10) (81). Die durch Nanopartikel eingenommene Fläche beträgt für NP-BSA durchschnittlich  $0,15 \pm 0,09$  % (95 % CI: 0,01 % - 0,29 %) und ist damit im Vergleich zu NP-GPVI ( $0,73 \pm 0,25$  %; 95 % CI: 0,32 % - 1,13 %) und NP-GPVI-CD39 ( $1,99 \pm 0,45$  %; 95 % CI: 1,27 % - 2,72 %) geringer. Sowohl der Unterschied zwischen NP-BSA und NP-GPVI sowie NP-GPVI-CD39 (NP-BSA vs. NP-GPVI:  $p = 0,0192$ ; NP-BSA vs. NP-GPVI-CD39:  $p = 0,0046$ ), als auch der Unterschied zwischen NP-GPVI und NP-GPVI-CD39 ( $p = 0,0033$ ) fällt signifikant aus. Ein vergleichbares Muster zeigt sich auch bei der absoluten Anzahl detektierbarer Nanopartikel. Im Schnitt konnten  $26,8 \pm 7,89$  NP-BSA (95 % CI: 14,25 - 39,35) pro Sichtfeld observiert werden. NP-GPVI und NP-GPVI-CD39 wurden im Schnitt  $149,0 \pm 77,8$  (95 % CI: 25,2 - 272,7) beziehungsweise  $688,9 \pm 46,79$  (95 % CI: 614,4 - 763,3) Mal detektiert. Der Unterschied zwischen NP-GPVI-CD39 und den anderen Nanopartikeln erweist sich erneut als statistisch signifikant (NP-BSA vs. NP-GPVI-CD39:  $p = 0,0001$ ; NP-GPVI vs. NP-GPVI-CD39:  $p = 0,0036$ ). Auf einer mittleren Kollagenfaserlänge von  $50 \mu\text{m}$  binden zudem durchschnittlich  $0,19 \pm 0,07$  NP-BSA (95 % CI: 0,08 - 0,29). Im Vergleich dazu ist die Menge gebundener Nanopartikel auf derselben Länge um den Faktor 7,5 bei NP-GPVI ( $1,42 \pm 0,29$ ; 95 % CI: 0,96 - 1,88) beziehungsweise 19,9 bei NP-GPVI-CD39 ( $3,78 \pm 0,49$ ; 95 % CI: 3,01 - 4,56) erhöht. Diese Unterschiede erweisen sich als statistisch signifikant (NP-BSA vs. NP-GPVI:  $p = 0,0042$ ; NP-BSA vs. NP-GPVI-CD39:  $p = 0,0012$ ; NP-GPVI vs. NP-GPVI-CD39:  $p = 0,0012$ ).



**Abbildung 10: Quantitative Analyse der durch Nanopartikel eingenommenen Fläche (in %), Nanopartikelanzahl sowie Anzahl Nanopartikel pro 50 µm Kollagenfaser.** Hierbei bestätigt sich die spezifische Kollagenbindungskapazität von NP-GPVI und NP-GPVI-CD39. Mittelwert ± SD; n = 4; Ordinary one-way ANOVA; \*p ≤ 0.05, \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001. NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel.

### 3.4.2 Adhäsionseigenschaften unter dynamischen Bedingungen

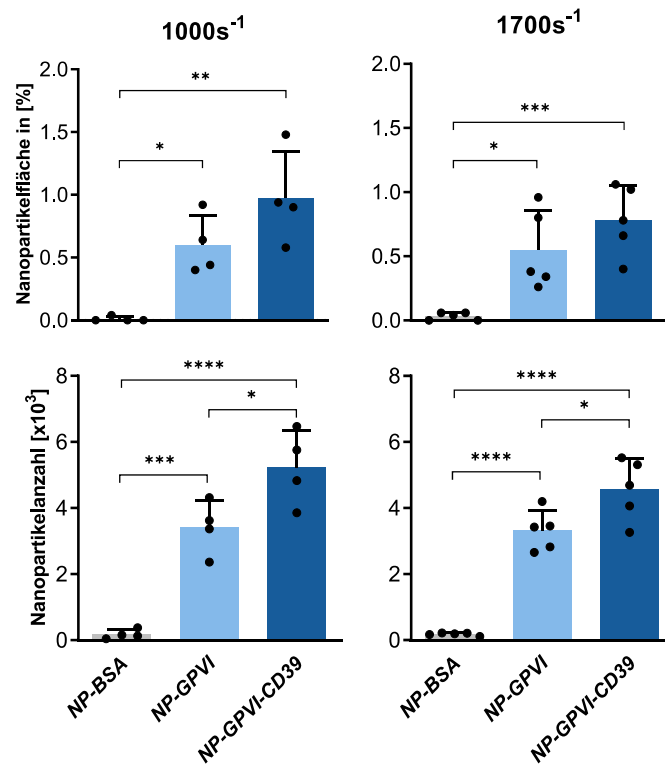
Nachdem die Kollagenfaserbindungseigenschaften der Nanopartikel im ruhenden Modell objektiviert wurden, erfolgte die selbige Analyse ebenso im dynamischen Versuchsaufbau (81). Ziel hierbei war es, die Bindungsfähigkeiten der Nanopartikel auch unter physiologischen Strömungsbedingungen zu verifizieren. Hierfür wurden die Nanopartikel in einer PBS-Suspension durch die Flusskammer über Kollagen-beschichtete Deckgläschen perfundiert, um somit die Interaktion beider Komponenten miteinander im dynamischen Modell beobachten zu können. Abbildung 11 gibt eine repräsentative Zeitreihe der Nanopartikel-Kollagenfaser-Interaktion je Nanopartikel über 3 Minuten dar. NP-GPVI und insbesondere NP-GPVI-CD39 erweisen sich dabei als deutlich adhäsionspotenter.



**Abbildung 11: Repräsentative Zeitreihe der Nanopartikel-Kollagenfaser-Interaktion und -Adhäsion im Perfusionsmodell.** Nach 3 Minuten zeigt sich bei hoher Scherrate ( $1.700 \text{ s}^{-1}$ ) bei NP-GPVI-CD39 die größte Menge adhärenter Nanopartikel. NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel. 20x Vergrößerung.

Dies spiegelt sich in der statistischen Auswertung wider (Abbildung 12) (81). Die durch Nanopartikel eingenommene Fläche war, im Vergleich zu NP-BSA ( $1000 \text{ s}^{-1}$ :  $0,01 \pm 0,02 \%$ ;  $1700 \text{ s}^{-1}$ :  $0,032 \pm 0,030 \%$ ), im Falle von NP-GPVI bei niedrigen Scherraten um das 60-fache, bei hohen Scherraten um das 17-fache ( $1000 \text{ s}^{-1}$ :  $0,60 \pm 0,24 \%$ ;  $1700 \text{ s}^{-1}$ :  $0,55 \pm 0,31 \%$ ), und bei NP-GPVI-CD39 um das 98- beziehungsweise 25-fache ( $1000 \text{ s}^{-1}$ :  $0,98 \pm 0,37 \%$ ;  $1700 \text{ s}^{-1}$ :  $0,78 \pm 0,27 \%$ ) erhöht. Übereinstimmend ist die Gesamtzahl detektierbarer Nanopartikel bei NP-GPVI bei niedrigen sowie hohen Scherraten um das jeweils 19-fache ( $1000 \text{ s}^{-1}$ :  $3,42 \pm 0,81 \times 10^3$ ;  $1700 \text{ s}^{-1}$ :  $3,31 \pm 0,61 \times 10^3$ ), bei NP-GPVI-CD39 sogar um das 30- beziehungsweise 26-fache ( $1000 \text{ s}^{-1}$ :  $5,23 \pm 1,14 \times 10^3$ ;  $1700 \text{ s}^{-1}$ :  $4,57 \pm 0,93$

$\times 10^3$ ) erhöht, verglichen mit NP-BSA ( $1000 \text{ s}^{-1}$ :  $0,1766 \times 10^3$ ;  $1700 \text{ s}^{-1}$ :  $0,1788 \times 10^3$ ). Somit konnte die potente Kollagenbindungsfähigkeit der funktionalisierten Nanopartikel nachgewiesen werden. Im Folgenden wurde deren erwartete Hemmung der *in vitro* Thrombozytenaggregation und Thrombusformation überprüft.

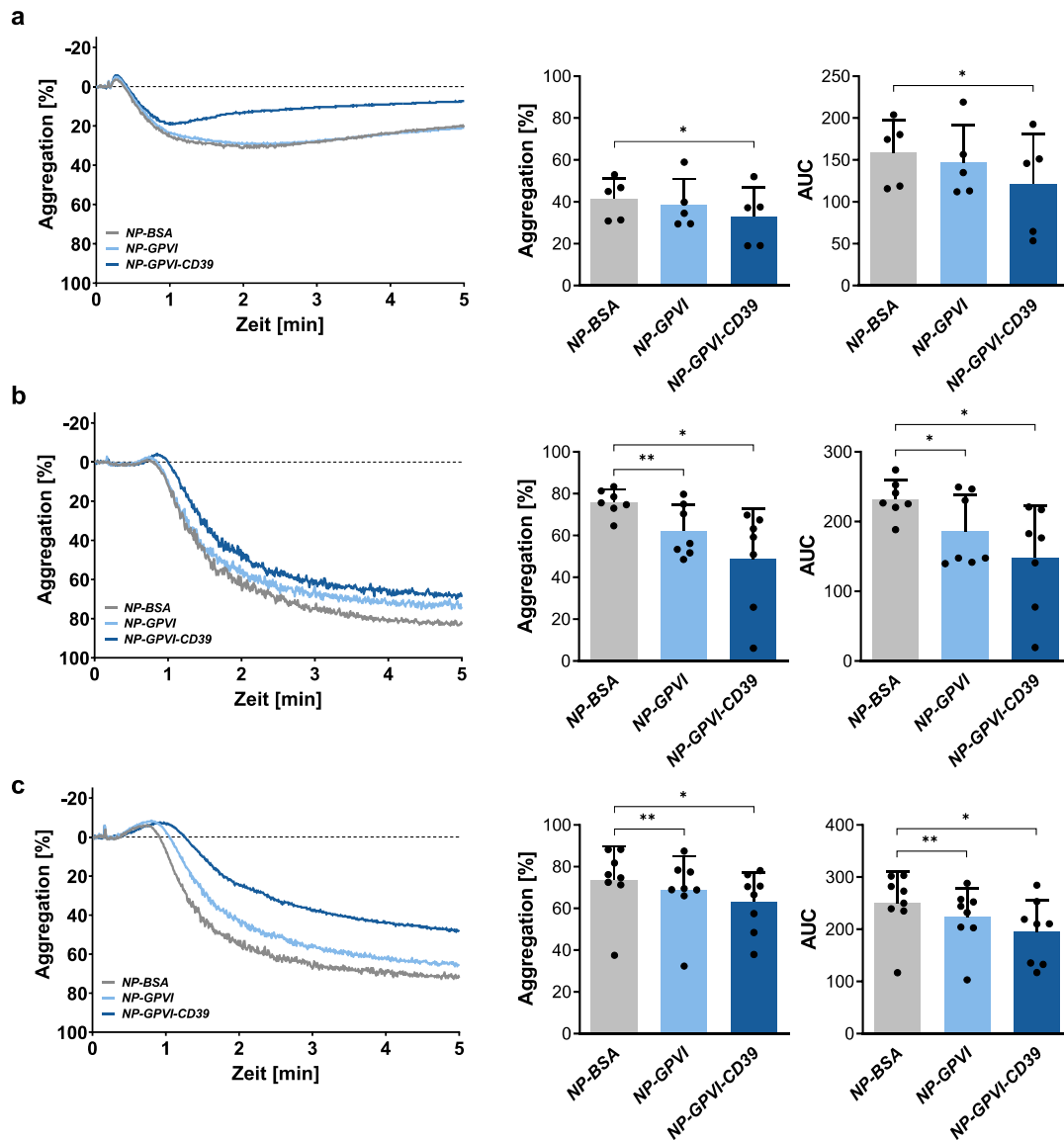


**Abbildung 12: Statistische Auswertung der durch Nanopartikel eingenommenen Fläche sowie der Gesamtzahl detektierbarer Nanopartikel pro Scherrate.** Hierdurch bestätigt sich das Kollagenbindungsvermögen von NP-GPVI und NP-GPVI-CD39 unter dynamischen Bedingungen. Mittelwert  $\pm$  SD;  $1000 \text{ s}^{-1}$ :  $n = 4$ ;  $1700 \text{ s}^{-1}$ :  $n = 5$ ; Ordinary one-way ANOVA; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel.

### 3.5 Inhibierung der *in vitro* induzierten Thrombozytenaggregation durch Rezeptor-beschichtete Nanopartikel

Um nun folglich den erwarteten Wirkungsmechanismus der Nanopartikel zu überprüfen, wurden im Rahmen der erweiterten funktionellen Analyse LTA-Versuche zur Objektivierung des durch die Nanopartikel ausgeübten Einflusses auf die *in vitro* Thrombozytenaktivierung und -aggregation durchgeführt (81). In Abbildung 13 werden repräsentative Aggregationskurven pro Nanopartikelprobe nach Vorinkubation durch die Thrombozytenagonisten ADP, Kollagen und CRP wiedergegeben. Dabei kann eine signifikante Reduktion der MA sowie der AUC nach ADP-Aktivierung durch NP-GPVI-CD39 um durchschnittlich 20 % (MA:  $32,98 \pm 14,05$  %) beziehungsweise 23 % (AUC:  $121,6 \pm 60,1$ ), im Vergleich zu NP-BSA (MA:  $41,39 \pm 9,82$  %; AUC:  $158,7 \pm 39,36$ ), beobachtet werden. Sowohl die MA als auch die AUC erwiesen sich nach Vorinkubation mit NP-GPVI als unbeeinflusst (MA:  $38,47 \pm 12,22$  %; AUC:  $147,1 \pm 44,22$ ). Im Falle der Kollagen-induzierten Aggregation führten sowohl NP-GPVI (MA:  $62,12 \pm 12,58$  %, AUC:  $186,1 \pm 52,75$ ) als auch NP-GPVI-CD39 (MA:  $48,91 \pm 24,03$  %, AUC:  $147,8 \pm 74,93$ ) zur signifikanten Reduktion der MA um 18 % (NP-GPVI) beziehungsweise 36 % (NP-GPVI-CD39) sowie der AUC um 20 % (NP-GPVI) beziehungsweise 36 % (NP-GPVI-CD39), verglichen mit NP-BSA (MA:  $75,87 \pm 6,16$  %, AUC:  $147,8 \pm 74,93$ ). Selbiges zeigt sich nach CRP-Aktivierung. Verglichen mit NP-BSA (MA:  $73,82 \pm 16,08$  %; AUC:  $250,2 \pm 59,96$ ), führt die Prä-Inkubation mit sowohl NP-GPVI (MA:  $68,64 \pm 16,25$  %; AUC:  $223,0 \pm 56,04$ ) als auch NP-GPVI-CD39 (MA:  $63,23 \pm 14,11$  %; AUC:  $195,4 \pm 60,81$ ) zur signifikanten Reduktion der MA um 7 % (NP-GPVI) beziehungsweise 14 % (NP-GPVI-CD39) sowie der AUC um 10 % (NP-GPVI) beziehungsweise 22 % (NP-GPVI-CD39). Damit konnte der inhibierende Effekt der funktionalisierten Nanopartikel auf die *in vitro* Thrombozytenaggregation verifiziert werden. Zudem bestätigt sich die additive Wirkung der CD39-Untereinheit.





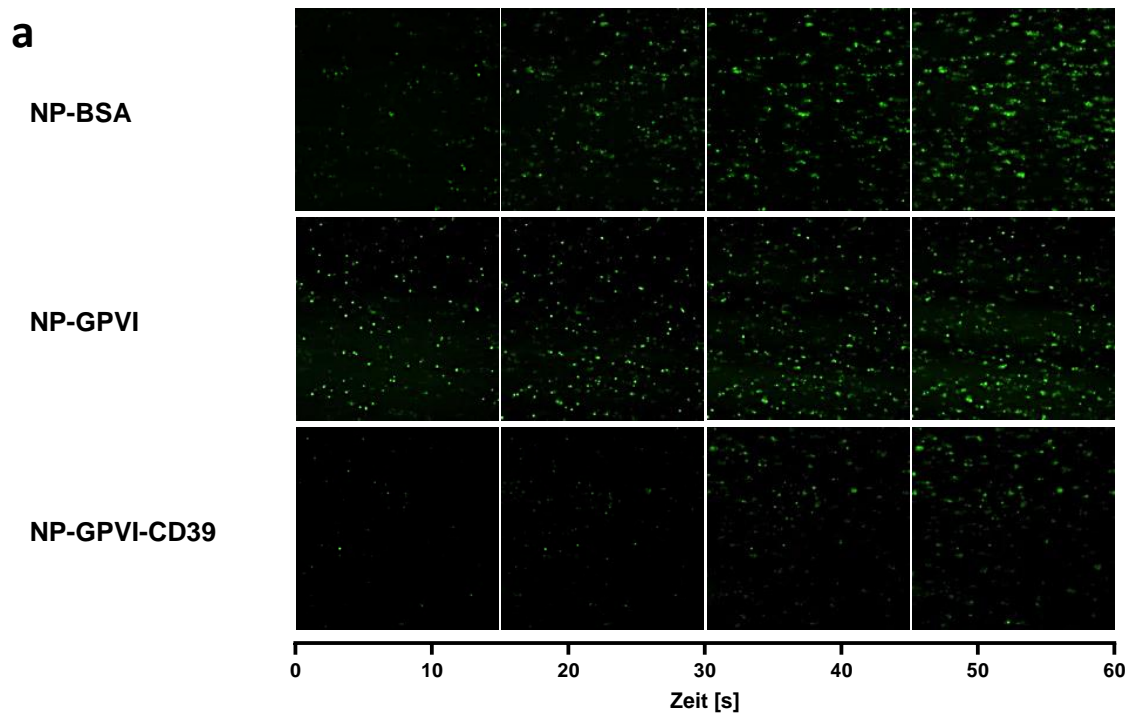
**Abbildung 13: Rezeptor-beschichtete Nanopartikel inhibieren die Thrombozytenaggregation in der Lichttransmissionsaggregometrie.** Repräsentative PRP-Aggregationskurven nach Aktivierung durch ADP (a), Kollagen (b) und CRP (c) und entsprechende statistische Auswertung der maximalen Aggregation (in %) und der AUC pro Nanopartikel und Aktivator. Bifunktionelles NP-GPVI-CD39 inhibiert die Thrombozytenaggregation nach ADP-Aktivierung signifikant. Sowohl NP-GPVI als auch NP-GPVI-CD39 führen zur signifikanten Reduktion der durch Kollagen und CRP hervorgerufenen Thrombozytenaggregation. Mittelwert  $\pm$  SD; ADP: n = 5, Kollagen: n = 7, CRP: n = 8; Repeated measures one-way ANOVA; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel. ADP: Adenosindiphosphat; CRP: Collagen-related peptide.

### 3.6 Beeinflussung der Thrombusentstehung im Perfusionsmodell

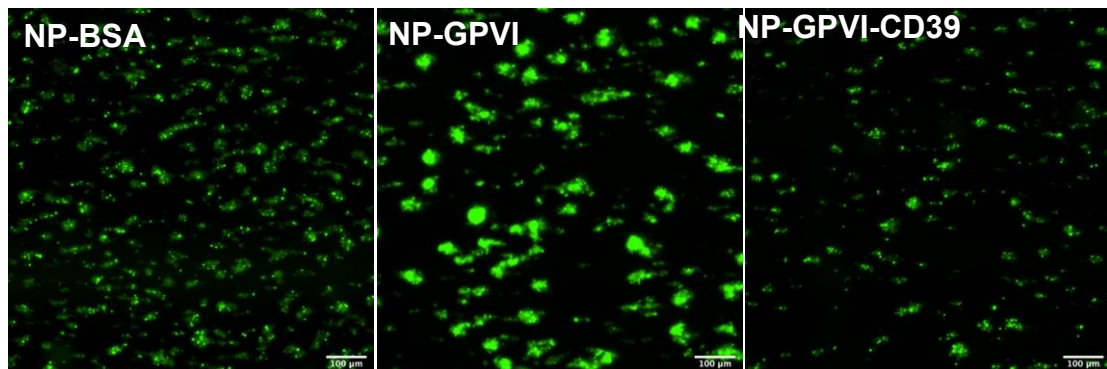
Mittels Flusskammerversuchen gelingt es, den Einfluss der Nanopartikel auf die *in vitro* Thrombusentstehung unter verschiedenen Flussgeschwindigkeiten zu beobachten. Somit wurden diese ebenso im Rahmen der Funktionsanalyse der Nanopartikel zur Erweiterung der biologischen Signifikanz herangezogen (81). Auf Basis der in Abbildung 14 dargestellten, repräsentativen Zeitreihe der Thrombusentstehung über 1 Minute und den finalen Sichtfeldaufnahmen nach erfolgter Perfusion, lässt sich die im Vergleich zu NP-BSA verringerte Thrombusformation der funktionalisierten Nanopartikel veranschaulichen.

Die statistische Auswertung ergab bei einer Scherrate von  $1000 \text{ s}^{-1}$  nach vorausgegangener NP-BSA-Inkubation die, im Vergleich zu NP-GPVI und NP-GPVI-CD39, größte gesamte Thrombusfläche mit  $8,09 \pm 0,83 \%$  (95 % CI: 7,33 % - 8,87 %) (Abbildung 15). Im Vergleich dazu fällt die gesamte Thrombusfläche auf NP-GPVI-vorinkubierten Deckgläschen um 15 % ( $6,89 \pm 1,16 \%$ ; 95 % CI: 5,81 % - 7,96 %) und bei NP-GPVI-CD39 ( $5,67 \pm 1,23 \%$ ; 95 % CI: 5,53 % - 6,81 %) um 30 % geringer aus. Diese Unterschiede erweisen sich als statistisch signifikant (NP-BSA vs. NP-GPVI:  $p = 0,0011$ ; NP-BSA vs. NP-GPVI-CD39:  $p = 0,0002$ ; NP-GPVI vs. NP-GPVI-CD39:  $p = 0,0004$ ). Die mittlere Thrombusfläche erweist sich im Falle von NP-GPVI-CD39 ( $20,86 \pm 6,19 \mu\text{m}^2$ ; 95 % CI:  $16,92 \mu\text{m}^2$  -  $24,81 \mu\text{m}^2$ ) als signifikant reduziert (NP-BSA vs. NP-GPVI-CD39:  $p = 0,0013$ ; NP-GPVI vs. NP-GPVI-CD39:  $p = 0,0024$ ). Bei NP-BSA beträgt die mittlere Thrombusfläche  $30,47 \pm 4,71 \mu\text{m}^2$  (95 % CI:  $26,12 \mu\text{m}^2$  -  $34,82 \mu\text{m}^2$ ), bei NP-GPVI  $20,86 \pm 6,19 \mu\text{m}^2$  (95 % CI:  $24,17 \mu\text{m}^2$  -  $35,62 \mu\text{m}^2$ ). Die Analyse der Anzahl gebildeter Thromben ergibt untereinander keine statistisch signifikanten Unterschiede. Entsprechend den Resultaten bei einer Scherrate von  $1000 \text{ s}^{-1}$ , zeigt sich bei einer Scherrate von  $1700 \text{ s}^{-1}$  die größte, absolute Thrombusfläche auf NP-BSA-vorinkubierten Deckgläschen ( $8,4 \pm 1,15 \%$ ; 95 % CI: 6,58 % - 10,22 %). Die Vorinkubation mit NP-GPVI resultiert in einer Verringerung der gesamten Thrombusfläche um 25 % ( $6,29 \pm 1,78 \%$ ; 95 % CI: 3,46 % - 9,12 %), im Falle NP-GPVI-CD39 um 42 % ( $4,87 \pm 1,52 \%$ ; 95 % CI: 2,46 % - 7,29 %). Dabei erweist sich die Reduktion der gesamten Thrombusfläche durch NP-GPVI-CD39 als statistisch signifikant (NP-BSA vs. NP-GPVI-CD39:  $p = 0,03$ ; NP-GPVI vs.

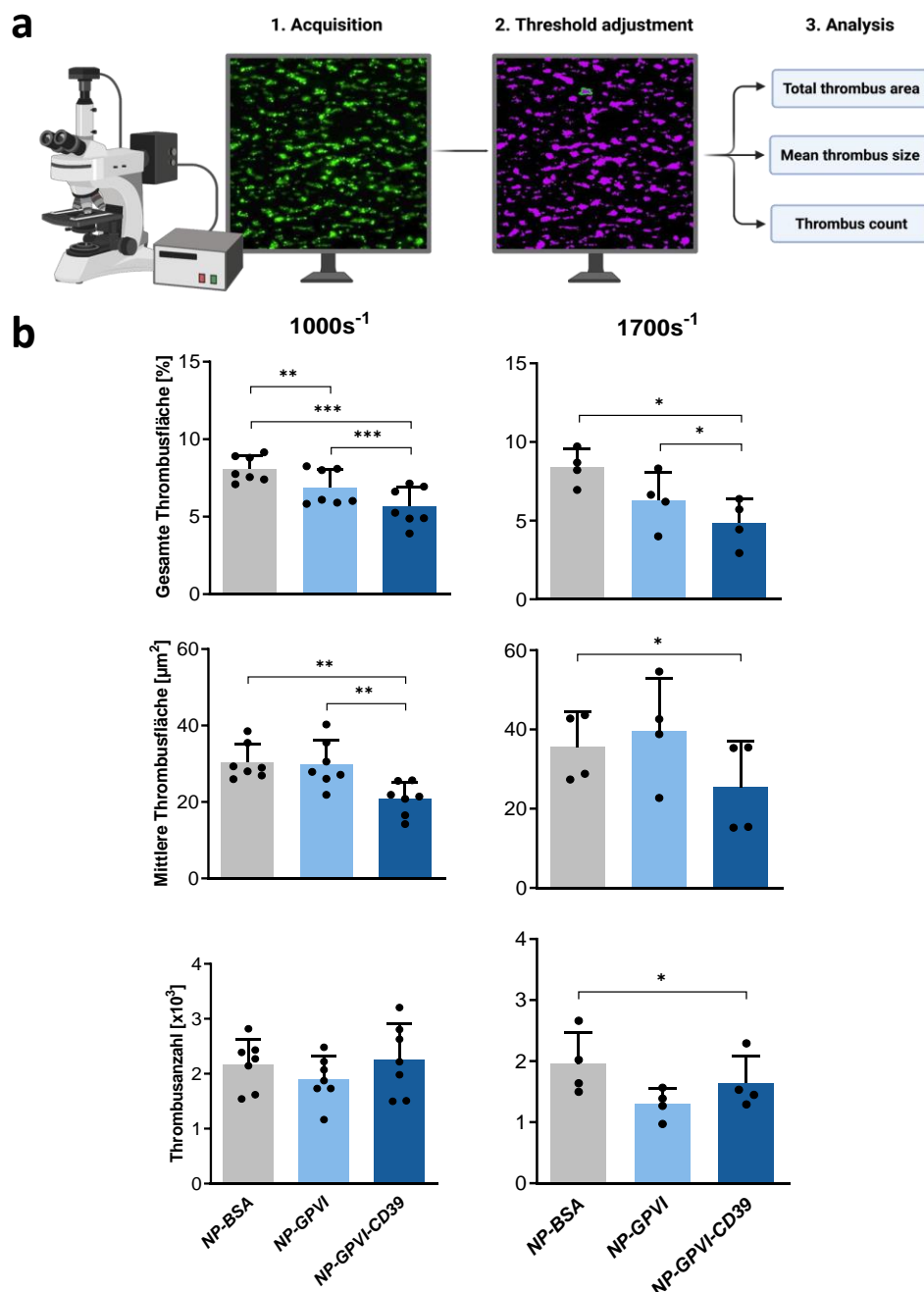
NP-GPVI-CD39:  $p = 0,0226$ ). Des Weiteren zeigt sich bei NP-GPVI-CD39 die geringste, mittlere Thrombusfläche mit  $25,36 \pm 11,59 \mu\text{m}^2$  (95 % CI:  $6,91 \mu\text{m}^2 - 43,81 \mu\text{m}^2$ ) vs. NP-BSA:  $35,64 \pm 8,75 \mu\text{m}^2$ ; 95 % CI:  $21,72 \mu\text{m}^2 - 49,56 \mu\text{m}^2$  vs. NP-GPVI:  $39,69 \pm 13,16 \mu\text{m}^2$ ; 95 % CI:  $18,74 \mu\text{m}^2 - 60,63 \mu\text{m}^2$ ). Der Unterschied zwischen NP-BSA und NP-GPVI-CD39 erweist sich als statistisch signifikant (NP-BSA vs. NP-GPVI-CD39:  $p = 0,0122$ ). Abschließend zeigt sich die absolute Thrombenanzahl zwischen NP-BSA ( $1.955 \pm 521$ ) und NP-GPVI-CD39 ( $1.640 \pm 445$ ) als signifikant unterschiedlich (NP-BSA vs. NP-GPVI-CD39:  $p = 0,044$ ). Damit bestätigt sich die Hemmung der Thrombusformation durch NP-GPVI und NP-GPVI-CD39. Die Reduktion der mittleren Thrombusgröße durch NP-GPVI-CD39, verglichen mit NP-GPVI, deutet dabei auf einen ergänzenden Effekt der CD39-Untereinheit durch die lokale Inhibierung der durch Thrombozyten induzierten, autokrinen ADP-Thrombozytenaktivierung hin.



**b**

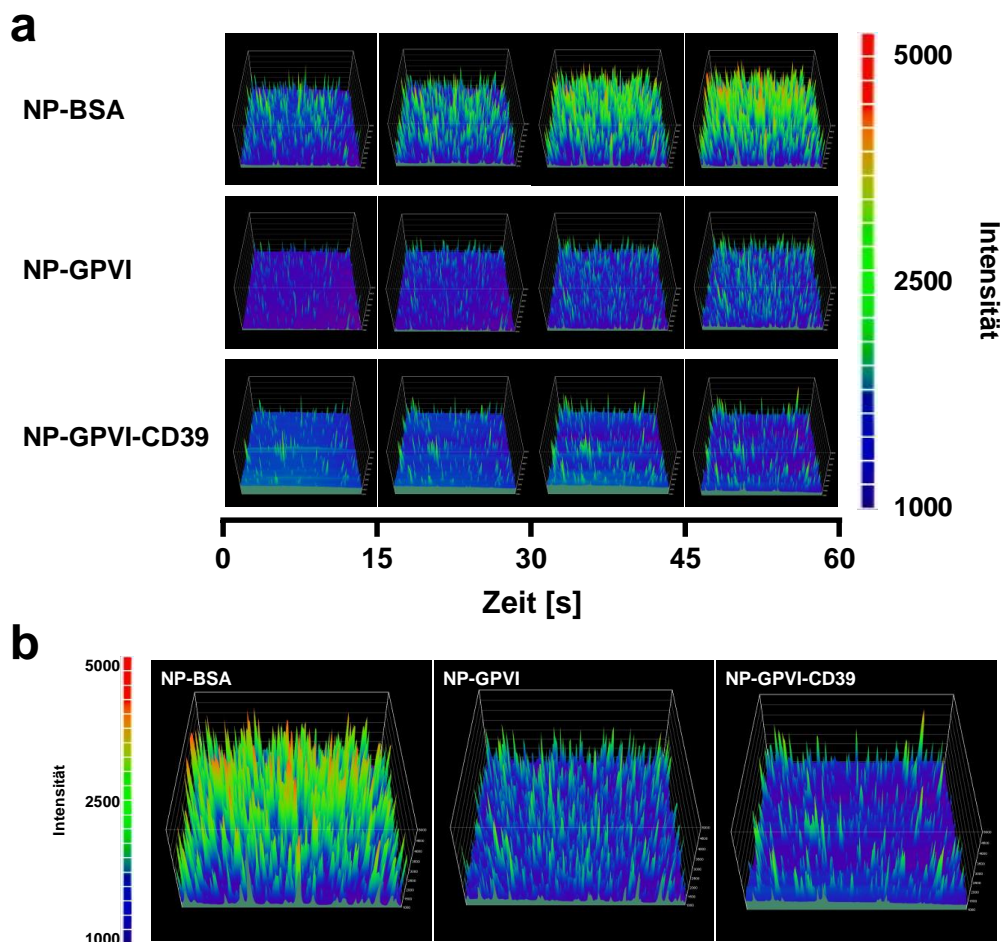


**Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung generierter Thromben im Flusskammermodell.** (a) Repräsentative Zeitreihe der progredienten Thrombusformation auf mit Kollagen-beschichteten Deckgläschen nach Nanopartikel-Vorinkubation im Perfusionsmodell; 20x Vergrößerung (b) Repräsentative, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der generierten Thromben nach erfolgter Perfusion. Hieraus wird die reduzierte Thrombogenese nach Vorinkubation mittels NP-GPVI und NP-GPVI-CD39 ersichtlich. 20x Vergrößerung; Skala: 100 µm. NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel.



**Abbildung 15: Auswertung der Flusskammerversuche je Scherrate.** (a) Schematische Illustration des Auswertungsvorgangs mittels Fluoreszenzmikroskopie akquirierter Aufnahmen nach Perfusion. Im Zuge planimetrischer Vermessungen wird ein green fluorescent protein (GFP)-Signal erkennender Schwellenwert so gewählt, dass ein Maximum an generierten Thromben erfasst wird. Generiert mit Biorender.com; (b) Statistische Analyse der gesamten, fluoreszierenden Thrombusfläche (in %), mittleren Thrombusfläche (in µm<sup>2</sup>) sowie absolute Thrombenanzahl je Scherrate. Hieraus ergibt sich eine signifikante Reduktion der Thrombogenese durch NP-GPVI und NP-GPVI-CD39. Mittelwert ± SD; 1000 s<sup>-1</sup>: n = 7, 1700 s<sup>-1</sup>: n = 4; repeated measures one-way ANOVA, \*p ≤ 0.05, \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001. NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel.

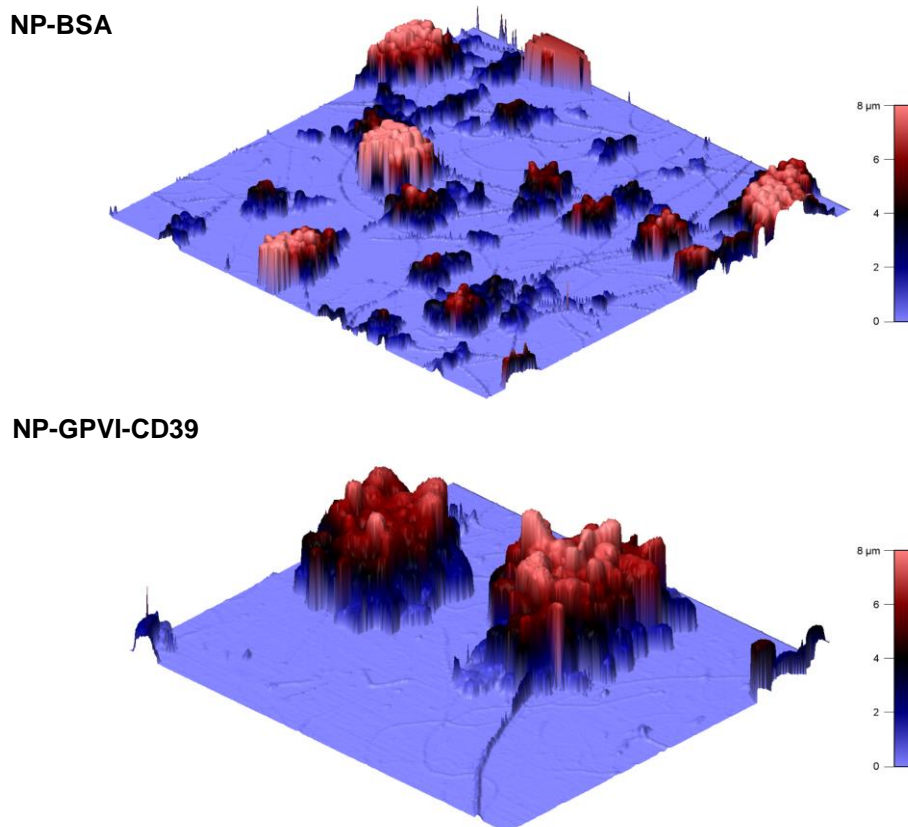
Intensitätsoberflächendiagramme zuvor getätigter statischer und dynamischer Aufnahmen der Thrombogenese bieten eine zusätzliche Form der Informationsdarstellung. Sie liefern eine Indikation bezüglich Höhe und Größe der Thromben auf Basis akkumulierter Plättchen und daraus resultierender verstärkter Fluoreszenz. In Abbildung 16 wird die dynamische, auf Intensitätsstufen basierende Zeitreihe der Thrombusentstehung dargestellt (81). Hierbei werden Unterschiede in der Thrombogenese akzentuiert. Erneut zeigen sich im Falle der funktionalisierten Nanopartikel deutlich weniger und kleinere Thromben, entsprechend der statischen Auswertung.



**Abbildung 16: Intensitätsoberflächendiagramme nach erfolgter Perfusion.** (a) Repräsentative Zeitreihe transformierter Intensitätsoberflächendiagramme mit Darstellung der progredienten Thrombogenese; (b) Intensitätsoberflächendiagramme nach kompletierter Perfusion mit Verdeutlichung der Unterschiede in der Thrombusentstehung. NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel.



Im Anschluss an die komplettierten Perfusionsversuche erfolgte die topographische Darstellung der sich nach Perfusion auf den Deckgläschen befindlichen Thromben mittels SICM (81). Hiermit können die morphologischen Eigenschaften der gebildeten Thromben detailliert ermittelt werden. In Abbildung 17 werden topographische Ausschnitte der Thrombus-behafteten Deckgläschen nach Behandlung mittels NP-BSA sowie NP-GPVI-CD39 wiedergegeben. Hierin reflektiert sich die statistische Auswertung der Flusskammerversuche. Im Vergleich zur NP-BSA-Probe sind auf den NP-GPVI-CD39 Deckgläschen weniger und zudem niedrigere Thromben zu sehen (siehe Farbskala) bei äquivalenter Ausschnittsgröße.



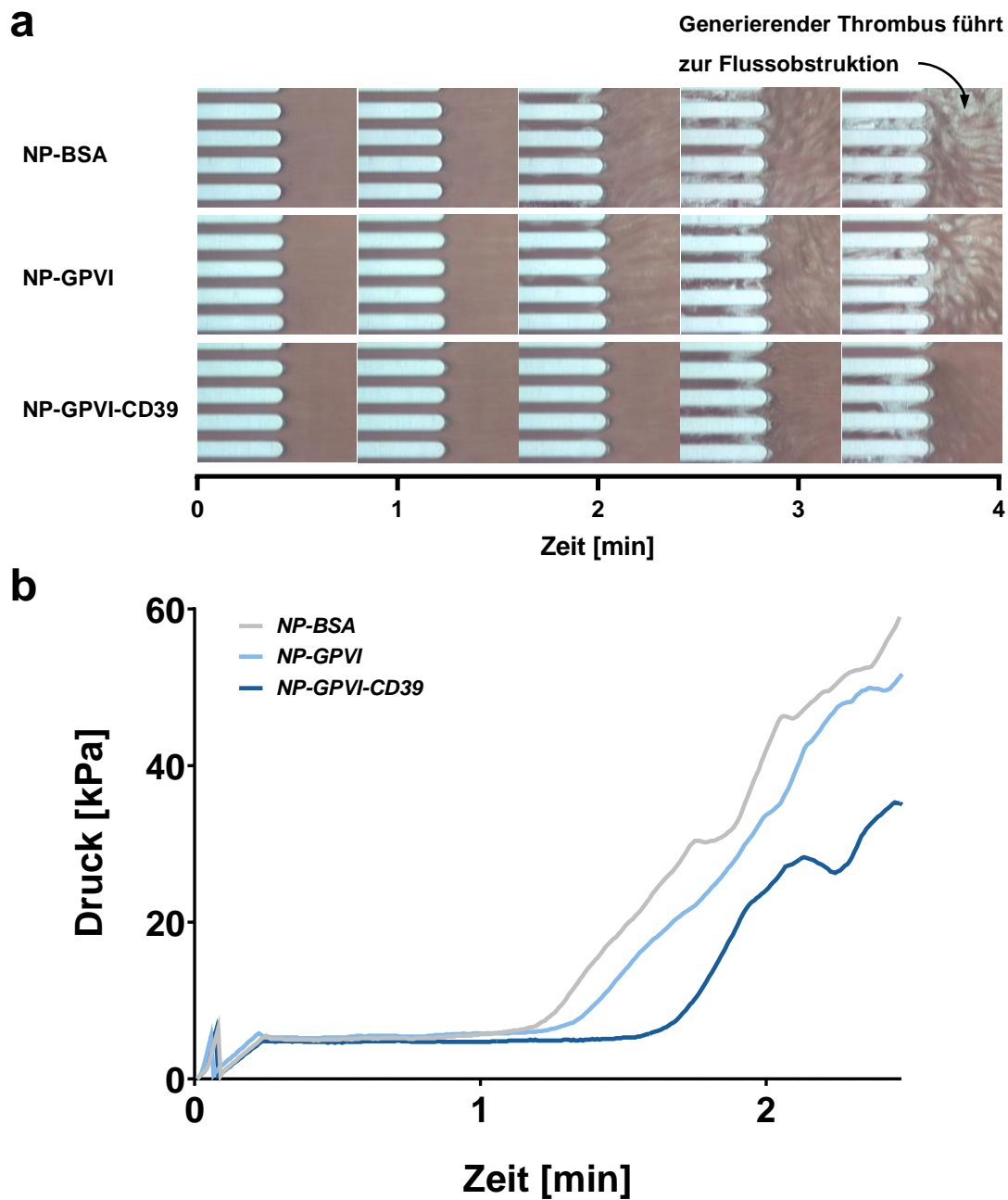
**Abbildung 17: Topographische Wiedergabe der sich auf den Deckgläschen befindlichen Thromben nach erfolgter Perfusion im Falle von NP-BSA und NP-GPVI-CD39 mittels scanning ion-conductance microscopy (SICM). Weniger und niedrigere Thromben sind auf der NP-GPVI-CD39-Probe nach Perfusion bei hohen Scherraten ( $1.700 \text{ s}^{-1}$ ) erkennbar. NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel.**

### 3.7 Analyse der Thrombogenese mittels T-TAS®

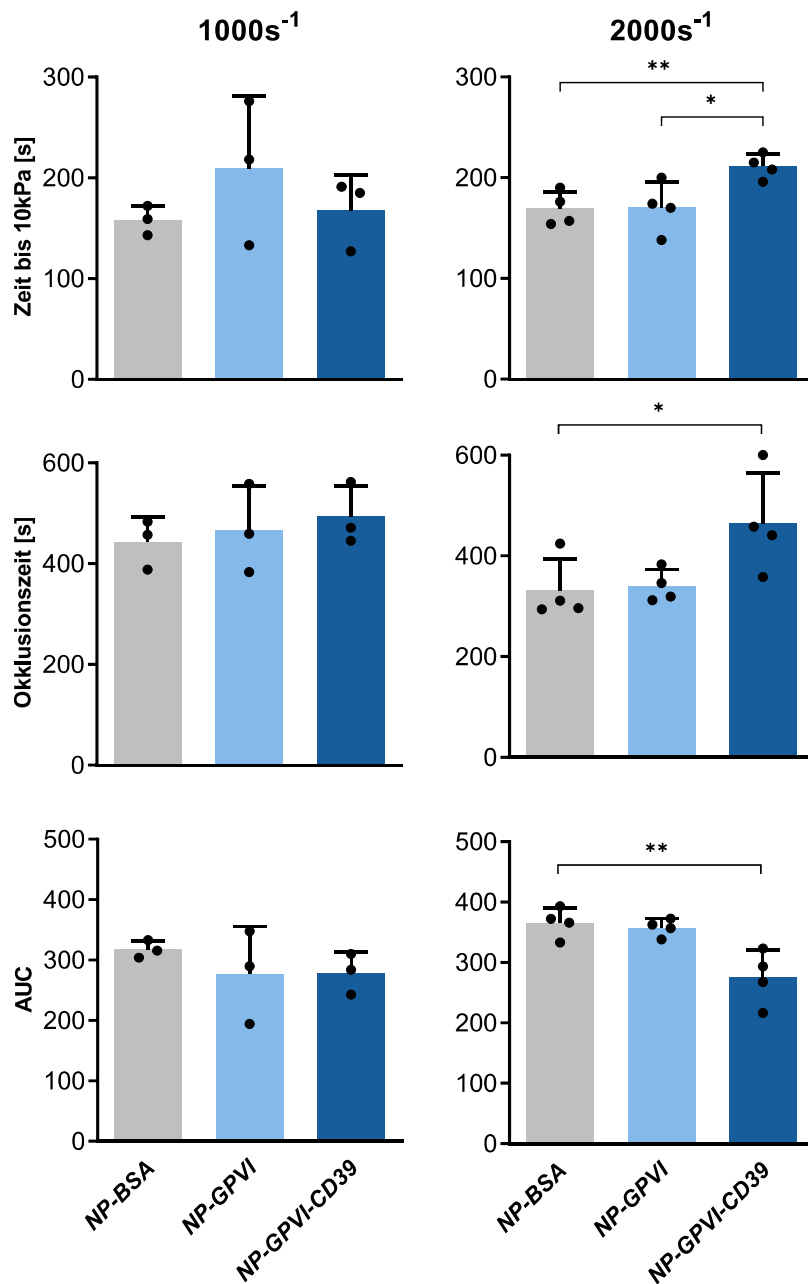
Zum Abschluss der Funktionsanalyse wurde auf Basis automatisierter Perfusionsversuche mittels T-TAS® der Einfluss der Nanopartikel auf die *in vitro* Thrombusentstehung in Vollblut unter variablen Schergeschwindigkeiten objektiviert (81). In Abbildung 18 wird die graduell zunehmende Thrombusentstehung mit progredienter Verstopfung der Mikrokapillaren demonstriert. Hierbei ist vor allem die verzögerte Thrombusentstehung durch NP-GPVI-CD39 eindrücklich. Dieser Befund reflektiert sich in den Druck-Zeit-Kurven, wie aus der repräsentativen Darstellung in Abbildung 18 ersichtlich wird.

In der statistischen Auswertung (Abbildung 19) bestätigt sich die durch NP-GPVI und insbesondere NP-GPVI-CD39 inhibierende Wirkung auf die *in vitro* Thrombogenese vor allem bei hohen Scherraten ( $2000\text{ s}^{-1}$ ). NP-GPVI-CD39 erreicht eine signifikante Prolongierung der OST sowie der absoluten OT um 25 % beziehungsweise 40 % (OST:  $211,0 \pm 12,19\text{ s}$ ; OT:  $464,3 \pm 100,5\text{ s}$ ), im Vergleich zu NP-BSA (OST:  $169,3 \pm 16,92\text{ s}$ ; OT:  $331,3 \pm 62,3\text{ s}$ ). Im Vergleich zu NP-GPVI (OST:  $170,5 \pm 25,42\text{ s}$ ; OT:  $340,0 \pm 32,20\text{ s}$ ) ist die OST bei NP-GPVI-CD39 um 24 % signifikant prolongiert. Bei Betrachtung der AUC fällt abschließend eine signifikante Reduktion um 25 % bei NP-GPVI-CD39 (AUC:  $275,2 \pm 45,2$ ) im Vergleich zu NP-BSA (AUC:  $366,1 \pm 24,80$ ) auf. Bei niedrigen Scherraten ( $1000\text{ s}^{-1}$ ) zeigen sich hingegen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Abschließend erweist sich NP-GPVI-CD39 insbesondere bei hohen Scherraten als potentes, bifunktionell aktives, antithrombotisches Agens in Vollblut.





**Abbildung 18: Progrediente Thrombogenese mit folglich Obstruktion der Mikrokapillaren im Total Thrombus-formation Analysis System® (T-TAS®).** (a) Repräsentative Zeitreihe der progressiven Thrombusentstehung mit folglich Obstruktion der Mikrokapillaren; (b) Generierte Druck-Zeit-Kurven pro Nanopartikelprobe spiegeln die kompromittierte Thrombogenese und Thrombusstabilität nach Einwirken von NP-GPVI und insbesondere NP-GPVI-CD39 wider. NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel.



**Abbildung 19: Statistische Auswertung nach erfolgten T-TAS<sup>®</sup>-Versuchen mit Bestimmung der Okklusionsstartzeit, der Okklusionszeit sowie der AUC pro Scherrate.** Hieraus wird vor allem der inhibierende Einfluss von NP-GPVI-CD39 auf die *in vitro* Thrombusentstehung insbesondere bei hohen Scherraten (2000 s<sup>-1</sup>) ersichtlich. Mittelwert ± SD; 1000 s<sup>-1</sup>: n = 3, 2000 s<sup>-1</sup>: n = 4; repeated measures one-way ANOVA, \* p ≤ 0.05, \*\* p ≤ 0.01, \*\*\* p ≤ 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001. NP-BSA: Bovines Serumalbumin-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI: Dimerisches Glykoprotein VI-beschichtete Nanopartikel; NP-GPVI-CD39: Dimerisches Glykoprotein VI/ CD39 Fusionsprotein-beschichtete Nanopartikel.

## 4 Diskussion

Die Gruppe der Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellt die dominierende Todesursache weltweit dar (2, 3). Hierzu zählen unter anderem Krankheitsbilder wie die koronare Herzerkrankung oder Schlaganfälle, welche kombiniert für über 85 % aller Todesfälle in dieser Gruppe unterschiedlicher Krankheitsbilder verantwortlich sind. Dementsprechend spielt die primär- und sekundärprophylaktische Therapie der Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine essenzielle Rolle für die globale Gesundheitsagenda. Der Fokus der primären Krankheitsprävention liegt auf der Einstellung kardiovaskulärer Risikofaktoren (84). Hierzu gehören unter anderem Lebensstilfaktoren wie Nikotinabusus, eine ungesunde Diät, Adipositas oder unzureichende körperliche Aktivität, sowie physiologische Faktoren wie die arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie und Diabetes Mellitus. Im Rahmen der medikamentösen Therapie spielen Antithrombotika, neben Antihypertensiva und Statinen, eine entscheidende Rolle in der Vorbeugung kardiovaskulärer Erkrankungen (84). In der Pathophysiologie der koronaren Herzerkrankung spielt die Thrombozyten-vermittelten Thrombogenese und die hieraus resultierende, vaskuläre Ischämie im Falle der Atherothrombose eine zentrale Rolle (4, 5). Folglich haben sich antithrombozytäre Präparate durch Hemmung der Thrombozytenfunktion als Hauptvertreter der Antithrombotika etabliert. Durch die Interaktion mit zirkulierenden Thrombozyten liegt klassischen Plättchenhemmern wie Azetylsalizylsäure oder ADP-Rezeptor-Blockern ein systemischer Wirkungsmechanismus zugrunde. Hierdurch erschließt sich im Umkehrschluss ein konstitutionell erhöhtes Blutungsrisiko als klinisch relevante Komplikation der traditionellen antithrombozytären Therapie (7, 8). Um das Blutungsrisiko zu verringern, setzen neuartige Antithrombotika auf einen selektiveren und gezielteren Wirkungsmechanismus. Ungerer *et al.* entwickelten lösliches dimerisches GPVI-Fc (Revacept®), welches über den thrombozytären GPVI-Rezeptor lokal und gezielt an subendothiales Kollagen bindet und damit als kompetitiver Inhibitor der thrombozytären Kollagenbindung antithrombotisch wirkt (46, 47). Im Hinblick auf eine möglichst selektive und gezielte medikamentöse Therapie treten ebenso Nanotherapeutika hervor. Im Bereich der Onkologie erwies sich die Nanopartikel-

vermittelte Therapie bereits als vielversprechender, neuartiger Ansatz der gezielten, lokalen und hochpräzisen Therapie bei einem milden Nebenwirkungsprofil (64, 65). Nanopartikel haben gegenüber herkömmlichen Pharmaka den Vorteil, dass sie sich bezüglich ihrer biochemischen und physikalischen Eigenschaften individuell und spezifisch modifizieren lassen. Sie zeichnen sich also durch Vorteile hinsichtlich Pharmakodynamik und -kinetik, Biodegradierbarkeit, Toxizität sowie Immunogenität aus (62). Auf dem Gebiet kardiovaskulärer Erkrankungen ist die gegenwärtig bestehende Evidenz hinsichtlich Nanotherapeutika jedoch gering. Obwohl weltweit etwa 30 % aller Todesfälle auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurückzuführen sind und diese damit die dominierenden Todesursachen darstellen (3), wurde bis dato im Hinblick auf nanomedizinische Entwicklungen in diesem Bereich nur wenig geforscht. Dies ist umso erstaunlicher, da Nanotherapeutika direkt in das menschliche Gefäßsystem appliziert und transportiert werden können. Die experimentelle Arbeit mit biologisch aktiven Nanopartikeln, die über die Kollagenbindung mit atherothrombotischen Prozessen interferieren, könnte somit zur Entwicklung neuer antithrombotischer Therapieansätze führen. Von daher wurden im Rahmen meiner Doktorarbeit unterschiedlich beschichtete, funktionalisierte Nanopartikel entwickelt (81). Diese wurden sowohl an den rekombinanten Kollagenrezeptor dimerisches GPVI-Fc, als auch an das bifunktionelle Fusionsprotein GPVI-CD39, welches zur Degradierung prothrombotischen, extrazellulären ADPs führt, gebunden. Levi *et al.* konnten bereits die durch NP-GPVI induzierte lokalisierte Kollagenbindung mittels *in vitro* sowie *in vivo* Versuchen nachweisen (79). Zudem belegten Epshtein *et al.* die potenzierte, lokalisierte Adhäsion von NP-GPVI an zerebrale Aneurysmata im *in vitro* Modell (80). Die in dieser Doktorarbeit erarbeiteten Ergebnisse stützen nicht nur diese Hypothesen, sondern bestätigen die hemmende Wirkung von NP-GPVI und NP-GPVI-CD39 auf die *in vitro* dependente Thrombogenese (81). Somit konnte der hypothetisierte, antithrombotische Wirkungsmechanismus durch an Nanopartikel gebundenes, rekombinantes, dimerisches GPVI-Fc sowie bimodales Fusionsprotein GPVI-CD39 letztlich verifiziert werden.

Sowohl rekombinantes, dimerisches GPVI-Fc als auch das rekombinante Fusionsprotein GPVI-CD39 wurden bereits durch Ungerer *et al.* und Degen *et al.* auf ihre Wirksamkeit hin in *in vitro* und *in vivo* Modellen untersucht (46, 47, 60). Eine Vergleichsstudie zwischen GPVI-Fc beziehungsweise GPVI-CD39 in löslicher versus Nanopartikel-gebundener Form besteht allerdings noch nicht. Im Rahmen zukünftiger Forschung sollte dies, insbesondere im Hinblick auf den Grad an antithrombotischer Wirkung, erarbeitet werden.

In der primären morphologischen Analyse mithilfe von elektronen- und rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen sowie durchflusszytometrischen Vermessungen konnte, bei im Wesentlichen vergleichbarer Morphologie, ein spezifisches Beschichtungsmuster im Falle von NP-GPVI und NP-GPVI-CD39 nachgewiesen werden (81). Sowohl NP-GPVI als auch NP-GPVI-CD39 zeichnen sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen durch einen umschriebenen, elektronendichten Halo um den Nanopartikelkern herum aus. NP-BSA hingegen weist diesen Phänotyp nicht auf. Bei etwa 200 nm großen Nanopartikeln ergab sich für die Höhenvermessung mittels Rasterkraftmikroskopie ein Wert, der deutlich niedriger liegt als erwartet. Dies ist am ehesten dadurch zu erklären, dass die Nanopartikel vor topographischer Ausmessung in ihrer Kollagenhaltigen Trägerlösung eingesunken sind. Dadurch erstreckt sich die Nullebene über den maximalen Nanopartikeldiameter, wodurch Höhenmessungen letztlich unterschätzt werden. Die Fluoreszenzeigenschaften erwiesen sich zwischen den unterschiedlich beschichteten Nanopartikeln untereinander als äquivalent.

Sowohl unter statischen sowie dynamischen Bedingungen konnte das spezifische *in vitro* Kollagenbindungsvermögen von NP-GPVI und NP-GPVI-CD39 nachgewiesen werden (81). Hierbei zeichnete sich NP-GPVI-CD39 durch sein im Vergleich zu NP-GPVI potenziertes Kollagenbindungsvermögen aus. Sowohl NP-GPVI als auch NP-GPVI-CD39 weisen hierbei den spezifischen dimerischen Kollagenrezeptor GPVI-Fc auf. Die Ektonukleotidase CD39 interferiert nicht mit Kollagen. Die Menge an gebundenen Rezeptormolekülen scheint hierfür nicht ursächlich zu sein, da diese mittels Bradford Assay im Falle von NP-GPVI-CD39 geringer beziffert wurden als es für NP-GPVI der Fall ist. Fabrikationstechnische Aspekte, insbesondere hinsichtlich der

Oberflächenexpression der Rezeptormoleküle auf ihren entsprechenden Nanopartikeln, stellen hierfür am ehesten eine Erklärung dar. Des Weiteren könnten erhöhte Rezeptorbeschichtungsdichten auf den Nanopartikeln zur vermehrten unselektiven, ungezielten Adhäsion an nicht-kollagenöse Strukturen führen (85). Somit könnte das durch NP-GPVI-CD39 potenzierte Kollagenbindungsvermögen, im Vergleich zu NP-GPVI, auf der vermehrten unspezifischen Bindung von NP-GPVI beruhen.

Um den Einfluss der funktionalisierten Nanopartikel NP-GPVI und NP-GPVI-CD39 auf die *in vitro* Thrombozytenaggregation und Thrombogenese zu untersuchen, erfolgten unterschiedliche *in vitro* Versuche (81). Basierend auf Lichttransmissionsaggregometrierversuchen zeigten sowohl NP-GPVI als auch NP-GPVI-CD39 eine inhibitorische Wirkung auf die Thrombozytenaggregation nach Aktivierung durch die Agonisten Kollagen und CRP. Die durch das Fusionsprotein GPVI-CD39 erwartete ADP-degradierende Wirkung bestätigte sich im Rahmen der Aggregationsaktivierung durch exogenes ADP: NP-GPVI-CD39 erwies sich als einzig effektiver Hemmer der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation. Somit führte die Vorinkubation von ADP mit NP-GPVI-CD39 über dessen Ektonukleotidase-Untereinheit CD39 zur ADP-Degradierung und -Inaktivierung. Zudem konnte eine Hemmung der ADP-Aktivierungs-Kaskade, basierend auf der autokrinen Sekretion thrombozytären ADPs, durch das lokal einwirkende, enzymatisch aktive CD39 observiert werden.

Durch Perfusionsversuche erfolgte der Nachweis der hemmenden Wirkung von NP-GPVI und NP-GPVI-CD39 auf die Thrombusformation unter variablen Scherraten (81). Beide funktionalisierten Nanopartikel führten zur effektiven Reduktion der gesamten Thrombusfläche und mittleren Thrombusgröße bei sowohl niedrigen als auch hohen Flussgeschwindigkeiten. Hierbei erwies sich NP-GPVI-CD39 als der im Vergleich zu NP-GPVI potentere Inhibitor der Thrombogenese, wodurch sich dessen bifunktionaler Wirkungsmechanismus erneut auszeichnet. Diese Beobachtung bestätigte sich abschließend im Rahmen der T-TAS<sup>®</sup>-Versuche, wobei einzig NP-GPVI-CD39 zur signifikanten Reduktion der Thrombogenese bei hohen Flussgeschwindigkeiten in Vollblut führte. Die endotheliale Dysfunktion und die damit einhergehende luminelle

Exponierung subendothelialer Kollagenfasern ist insbesondere in arteriellen oder stenotischen Gefäßabschnitten zu lokalisieren, wo hohe Flussgeschwindigkeiten herrschen. Die erarbeiteten Ergebnisse suggerieren diesbezüglich eine potente, lokalisierte Adhäsion und Inhibierung der Thrombogenese durch NP-GPVI-CD39 insbesondere in diesen Gefäßabschnitten (81).

Bei den in meiner Doktorarbeit durchgeführten Versuchen handelt es sich ausschließlich um *in vitro* Versuchsmethoden. Die nun ermittelten Ergebnisse belegen die hypothetisierte Hemmung auf die *in vitro* Thrombusentstehung durch die hier untersuchten, funktionalisierten Nanopartikel. Somit stellen diese eine innovative und vielversprechende Grundlage für neuartige Therapieansätze der gezielten antithrombotischen Therapie dar. Im Rahmen der translationalen Forschung ist folglich die *in vivo* Funktionalitätsanalyse der Nanopartikel anstehend (86, 87). Perspektivisch stellt ebenso die Hochskalierung der Nanopartikelsynthese- und Produktionsrate eine entscheidende Herausforderung in der Integration von experimentellen Nanotherapeutika in den klinischen Alltag dar. Abweichungen bezüglich Präzision und Reproduzierbarkeit könnten im Rahmen der hochskalierten Nanopartikelfabrikation zu Mängeln der Nanopartikeleigenschaften und -funktion führen.

Zusammenfassend erfolgte im Rahmen meiner Doktorarbeit die Entwicklung funktionalisierter Nanopartikel durch die Integration von rekombinanten Fusionsproteinen. Diese binden über GPVI-Fc an Kollagen und sind, im Falle von GPVI-CD39, an die Ekto-ADPase CD39, welche prothrombotisches, extrazelluläres ADP degradiert, gebunden. Dabei erweist sich NP-GPVI-CD39 in seiner antithrombotischen Aktivität in *in vitro* Versuchen als deutlich potenter als NP-GPVI. Somit treten bifunktionelle Fusionsproteine in Kombination mit der Nanopartikeltechnologie einen vielversprechender Therapieansatz der gezielten, antithrombotischen Therapie hervor (81).

## 5 Zusammenfassung

Klassische antithrombotische Präparate führen aufgrund ihrer systemischen Wirkungsweise zu einem konstitutionell erhöhten Blutungsrisiko. Innovative Forschungsansätze fokussieren sich daher auf die gezielte antithrombotische Therapie. Im Hinblick darauf wurden im Rahmen meiner Doktorarbeit mit dimerischem GPVI-Fc und dem bifunktionellen Fusionsprotein GPVI-CD39 funktionalisierte, polymere Nanopartikel entwickelt, charakterisiert und auf deren *in vitro* Beeinflussung der Thrombusentstehung hin, mit BSA-beschichteten Nanopartikeln als Kontrolle, untersucht. Die Charakterisierung wurde mittels Elektronen- und Rasterkraftmikroskopie sowie durchflusszytometrischen Analysen durchgeführt. Mithilfe von Versuchen am Lichttransmissionsaggregometer erfolgte zudem die Analyse der Thrombozytenaggregation. Perfusionsversuche ermöglichten abschließend die Objektivierung der *in vitro* Thrombogenese. Hierbei wiesen NP-GPVI und NP-GPVI-CD39 eine spezifische Oberflächenbeschichtung auf, die Fluoreszenzeigenschaften hingegen erwiesen sich als übereinstimmend. Beide funktionalisierten Nanopartikel hemmen die Thrombozytenaggregation, jedoch lediglich bifunktionelles NP-GPVI-CD39 inhibiert die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation. Die Thrombogenese zeigt sich bei variablen Scherraten durch NP-GPVI und insbesondere NP-GPVI-CD39 gehemmt. Zusammenfassend erzielen die funktionalisierten Nanopartikel NP-GPVI und insbesondere bifunktionelles NP-GPVI-CD39 eine signifikante Hemmung der *in vitro* Thrombusentstehung. Somit bestätigt sich der Nanopartikel-vermittelte antithrombotische Effekt von GPVI-Fc und dem Fusionsprotein GPVI-CD39 sowie der additive Nutzen der Ektonukleotidase CD39. Abschließend treten NP-GPVI und insbesondere bifunktionelles NP-GPVI-CD39 als vielversprechende, neuartige Therapieansätze im Rahmen der gezielten, antithrombotischen Therapie hervor.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Datenquelle: Statistisches Bundesamt (Destatis), Genesis-Online, Ergebnis 23211-0001 09.02.2021; Datenlizenz by-2-0.
2. World Health O. The atlas of heart disease and stroke / Judith Mackay and George Mensah ; with Shanthi Mendis and Kurt Greenland. Geneva: World Health Organization; 2004.
3. World health statistics 2021: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
4. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002;8(11):1227-34.
5. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *The Journal of Clinical Investigation.* 2005;115(12):3378-84.
6. Gulizia MM, Colivicchi F, Abrignani MG, Ambrosetti M, Aspromonte N, Barile G, et al. Consensus Document ANMCO/ANCE/ARCA/GICR-IACPR/GISE/SICOA: Long-term Antiplatelet Therapy in Patients with Coronary Artery Disease. *Eur Heart J Suppl.* 2018;20(Suppl F):F1-f74.
7. Sørensen R, Hansen ML, Abildstrom SZ, Hvelplund A, Andersson C, Jørgensen C, et al. Risk of bleeding in patients with acute myocardial infarction treated with different combinations of aspirin, clopidogrel, and vitamin K antagonists in Denmark: a retrospective analysis of nationwide registry data. *Lancet.* 2009;374(9706):1967-74.
8. Van de Werf F. Balancing benefit and bleeding risk of antithrombotic agents in the individual patient with an acute coronary syndrome. *Circulation.* 2010;121(1):5-7.
9. Majithia A, Bhatt DL. Novel Antiplatelet Therapies for Atherothrombotic Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(4):546-57.
10. Gremmel T, Frelinger AL, 3rd, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(3):191-204.
11. Gawaz M. Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung: Georg Thieme Verlag; 1999.
12. Puri RN, Colman RW. ADP-induced platelet activation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1997;32(6):437-502.
13. Lindemann S, Krämer B, Seizer P, Gawaz M. Platelets, inflammation and atherosclerosis. *J Thromb Haemost.* 2007;5 Suppl 1:203-11.
14. Krishnegowda M, Rajashekaraiyah V. Platelet disorders: an overview. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2015;26(5):479-91.
15. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes: The Task Force for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal.* 2019;41(3):407-77.
16. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-

segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 2017;39(2):119-77.

17. Gawaz M, Bigalke B., Fateh-Moghadam S., Geisler T., Langer H., May A., Zuern C. *Blood Platelets - Clinical Relevance*: Georg Thieme Verlag; 2010.

18. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, et al. Cyclooxygenase Inhibitors and the Antiplatelet Effects of Aspirin. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(25):1809-17.

19. Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2009;373(9678):1849-60.

20. Nathan AS, Sen S, Yeh RW. The risk of bleeding with the use of antiplatelet agents for the treatment of cardiovascular disease. *Expert Opin Drug Saf*. 2017;16(5):561-72.

21. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine*. 2009;361(11):1045-57.

22. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine*. 2007;357(20):2001-15.

23. Investigators PGI/IIARSUITPT. Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatid in patients with acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine*. 1998;339(7):436-43.

24. Tscharre M, Michelson AD, Gremmel T. Novel Antiplatelet Agents in Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2020;25(3):191-200.

25. Jackson SP, Schoenwaelder SM, Goncalves I, Nesbitt WS, Yap CL, Wright CE, et al. PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med*. 2005;11(5):507-14.

26. Essex DW, Li M. Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion. *Br J Haematol*. 1999;104(3):448-54.

27. Schwarz M, Meade G, Stoll P, Ylanne J, Bassler N, Chen YC, et al. Conformation-specific blockade of the integrin GPIIb/IIIa: a novel antiplatelet strategy that selectively targets activated platelets. *Circ Res*. 2006;99(1):25-33.

28. Aisiku O, Peters CG, De Ceunynck K, Ghosh CC, Dilks JR, Fustolo-Gunnink SF, et al. Parmodulins inhibit thrombus formation without inducing endothelial injury caused by vorapaxar. *Blood*. 2015;125(12):1976-85.

29. Bartunek J, Barbato E, Heyndrickx G, Vanderheyden M, Wijns W, Holz JB. Novel antiplatelet agents: ALX-0081, a Nanobody directed towards von Willebrand factor. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6(3):355-63.

30. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res*. 2004;114(4):221-33.

31. Rayes J, Watson SP, Nieswandt B. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2. *J Clin Invest*. 2019;129(1):12-23.

32. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003;102(2):449-61.

33. Phillips DR, Agin PP. Platelet plasma membrane glycoproteins. Identification of a proteolytic substrate for thrombin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977;75(4):940-7.

34. Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, Uchino H. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood*. 1987;69(6):1712-20.
35. Schulz C, Penz S, Hoffmann C, Langer H, Gillitzer A, Schneider S, et al. Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo. *Basic Res Cardiol*. 2008;103(4):356-67.
36. Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, Schaff M, Dumont B, Favier R, et al. Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood*. 2015;126(5):683-91.
37. Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJ, Moroi M, Ruggeri ZM, Kunicki TJ, et al. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood*. 2006;107(4):1405-12.
38. Bültmann A, Li Z, Wagner S, Peluso M, Schönberger T, Weis C, et al. Impact of glycoprotein VI and platelet adhesion on atherosclerosis--a possible role of fibronectin. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49(3):532-42.
39. Penz S, Reininger AJ, Brandl R, Goyal P, Rabie T, Bernlochner I, et al. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *Faseb j*. 2005;19(8):898-909.
40. Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, Bendszus M, Nieswandt B, Stoll G. Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation*. 2007;115(17):2323-30.
41. Pachel C, Mathes D, Arias-Loza AP, Heitzmann W, Nordbeck P, Deppermann C, et al. Inhibition of Platelet GPVI Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(4):629-35.
42. Ezumi Y, Uchiyama T, Takayama H. Molecular cloning, genomic structure, chromosomal localization, and alternative splice forms of the platelet collagen receptor glycoprotein VI. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;277(1):27-36.
43. Best D, Senis YA, Jarvis GE, Eagleton HJ, Roberts DJ, Saito T, et al. GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood*. 2003;102(8):2811-8.
44. Loyau S, Dumont B, Ollivier V, Boulaftali Y, Feldman L, Ajzenberg N, et al. Platelet glycoprotein VI dimerization, an active process inducing receptor competence, is an indicator of platelet reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(3):778-85.
45. Jung SM, Moroi M, Soejima K, Nakagaki T, Miura Y, Berndt MC, et al. Constitutive dimerization of glycoprotein VI (GPVI) in resting platelets is essential for binding to collagen and activation in flowing blood. *J Biol Chem*. 2012;287(35):30000-13.
46. Ungerer M, Rosport K, Bültmann A, Piechatzek R, Uhland K, Schlieper P, et al. Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation*. 2011;123(17):1891-9.
47. Ungerer M, Li Z, Baumgartner C, Goebel S, Vogelmann J, Holthoff HP, et al. The GPVI-Fc fusion protein Revacept reduces thrombus formation and

improves vascular dysfunction in atherosclerosis without any impact on bleeding times. *PLoS One*. 2013;8(8):e71193.

48. Mayer K, Hein-Rothweiler R, Schüpke S, Janisch M, Bernlochner I, Ndrepepa G, et al. Efficacy and Safety of Revacept, a Novel Lesion-Directed Competitive Antagonist to Platelet Glycoprotein VI, in Patients Undergoing Elective Percutaneous Coronary Intervention for Stable Ischemic Heart Disease: The Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled ISAR-PLASTER Phase 2 Trial. *JAMA Cardiology*. 2021;6(7):753-61.

49. Jamasbi J, Megens RT, Bianchini M, Münch G, Ungerer M, Faussner A, et al. Differential Inhibition of Human Atherosclerotic Plaque-Induced Platelet Activation by Dimeric GPVI-Fc and Anti-GPVI Antibodies: Functional and Imaging Studies. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(22):2404-15.

50. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, et al. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest*. 1997;99(6):1351-60.

51. Plesner L. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol*. 1995;158:141-214.

52. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Olson KE, Islam N, Pinsky DJ, et al. Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31(2):234-46.

53. Marcus AJ, Safier LB, Hajjar KA, Ullman HL, Islam N, Broekman MJ, et al. Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase. Thromboregulation by endothelial cells. *J Clin Invest*. 1991;88(5):1690-6.

54. Broekman MJ, Eiroa AM, Marcus AJ. Inhibition of human platelet reactivity by endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vein endothelial cells in suspension: blockade of aggregation and secretion by an aspirin-insensitive mechanism. *Blood*. 1991;78(4):1033-40.

55. Jalkanen J, Yegutkin GG, Hollmén M, Aalto K, Kiviniemi T, Salomaa V, et al. Aberrant circulating levels of purinergic signaling markers are associated with several key aspects of peripheral atherosclerosis and thrombosis. *Circ Res*. 2015;116(7):1206-15.

56. Gayle RB, 3rd, Maliszewski CR, Gimpel SD, Schoenborn MA, Caspary RG, Richards C, et al. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *J Clin Invest*. 1998;101(9):1851-9.

57. Buergler JM, Maliszewski CR, Broekman MJ, Kaluza GL, Schulz DG, Marcus AJ, et al. Effects of SolCD39, a novel inhibitor of Platelet Aggregation, on Platelet Deposition and Aggregation after PTCA in a Porcine Model. *J Thromb Thrombolysis*. 2005;19(2):115-22.

58. Hohmann JD, Wang X, Krajewski S, Selan C, Haller CA, Straub A, et al. Delayed targeting of CD39 to activated platelet GPIIb/IIIa via a single-chain antibody: breaking the link between antithrombotic potency and bleeding? *Blood*. 2013;121(16):3067-75.

59. Dwyer KM, Robson SC, Nandurkar HH, Campbell DJ, Gock H, Murray-Segal LJ, et al. Thromboregulatory manifestations in human CD39 transgenic mice and the implications for thrombotic disease and transplantation. *J Clin Invest*. 2004;113(10):1440-6.

60. Degen H, Borst O, Ziegler M, Mojica Munoz AK, Jamasbi J, Walker B, et al. ADPase CD39 Fused to Glycoprotein VI-Fc Boosts Local Antithrombotic Effects at Vascular Lesions. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(8).
61. Standardization IOF, Normalisation Old, Technical Committee ISO/TC 229 N. Nanotechnologies: Terminology and Definitions for Nano-objects - Nanoparticle, Nanofibre and Nanoplate: ISO; 2008.
62. Crucho CIC, Barros MT. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;80:771-84.
63. Yetisgin AA, Cetinel S, Zuvin M, Kosar A, Kutlu O. Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. *Molecules.* 2020;25(9).
64. Jahan ST, Sadat SMA, Walliser M, Haddadi A. Targeted Therapeutic Nanoparticles: An Immense Promise to Fight against Cancer. *J Drug Deliv.* 2017;2017:9090325.
65. Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(9):771-82.
66. Zazo H, Colino CI, Lanao JM. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J Control Release.* 2016;224:86-102.
67. Dutta T, Garg M, Jain NK. Targeting of efavirenz loaded tuftsin conjugated poly(propyleneimine) dendrimers to HIV infected macrophages in vitro. *Eur J Pharm Sci.* 2008;34(2-3):181-9.
68. Horton S, Walsh C, Emery P. Certolizumab pegol for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opinion on Biological Therapy.* 2012;12(2):235-49.
69. Wohlfart S, Gelperina S, Kreuter J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J Control Release.* 2012;161(2):264-73.
70. Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Kumar KP, Paramakrishnan N, Suresh B. Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2008;1200:159-68.
71. Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release.* 2016;235:34-47.
72. Nasr M, Najlah M, D'Emanuele A, Elhissi A. PAMAM dendrimers as aerosol drug nanocarriers for pulmonary delivery via nebulization. *Int J Pharm.* 2014;461(1-2):242-50.
73. Yhee JY, Im J, Nho RS. Advanced Therapeutic Strategies for Chronic Lung Disease Using Nanoparticle-Based Drug Delivery. *J Clin Med.* 2016;5(9).
74. Formiga FR, Pelacho B, Garbayo E, Abizanda G, Gavira JJ, Simon-Yarza T, et al. Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion model. *J Control Release.* 2010;147(1):30-7.
75. Arzani G, Haeri A, Daeihamed M, Bakhtiari-Kaboutaraki H, Dadashzadeh S. Niosomal carriers enhance oral bioavailability of carvedilol: effects of bile salt-enriched vesicles and carrier surface charge. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:4797-813.
76. Haeri A, Sadeghian S, Rabbani S, Anvari MS, Ghassemi S, Radfar F, et al. Effective attenuation of vascular restenosis following local delivery of chitosan decorated sirolimus liposomes. *Carbohydr Polym.* 2017;157:1461-9.

77. Kelly KA, Allport JR, Tsourkas A, Shinde-Patil VR, Josephson L, Weissleder R. Detection of vascular adhesion molecule-1 expression using a novel multimodal nanoparticle. *Circ Res*. 2005;96(3):327-36.
78. Korin N, Kanapathipillai M, Matthews BD, Crescente M, Brill A, Mammoto T, et al. Shear-activated nanotherapeutics for drug targeting to obstructed blood vessels. *Science*. 2012;337(6095):738-42.
79. Levi M, Epshtein M, Castor T, Gawaz M, Korin N. Glycoprotein VI (GPVI)-functionalized nanoparticles targeting arterial injury sites under physiological flow. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2020;29:102274.
80. Epshtein M, Levi M, Kraitem AM, Zidan H, King RM, Gawaz M, et al. Biophysical targeting of high-risk cerebral aneurysms. *Bioengineering & Translational Medicine*.n/a(n/a):e10251.
81. Nestele JA, Rohlfing AK, Dicenta V, Bild A, Eißler D, Emschermann F, et al. Characterization of GPVI- or GPVI-CD39-Coated Nanoparticles and Their Impact on In Vitro Thrombus Formation. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1).
82. Omana-Zapata I, Mutschmann C, Schmitz J, Gibson S, Judge K, Aruda Indig M, et al. Accurate and reproducible enumeration of T-, B-, and NK lymphocytes using the BD FACSLyric 10-color system: A multisite clinical evaluation. *PLoS One*. 2019;14(1):e0211207.
83. Sun L, Wu H, Pan B, Wang B, Guo W. Evaluation and validation of a novel 10-color flow cytometer. *J Clin Lab Anal*. 2021;35(11):e23834.
84. Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, Carballo D, Koskinas KC, Bäck M, et al. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: Developed by the Task Force for cardiovascular disease prevention in clinical practice with representatives of the European Society of Cardiology and 12 medical societies With the special contribution of the European Association of Preventive Cardiology (EAPC). *European Heart Journal*. 2021;42(34):3227-337.
85. Howard M, Zern BJ, Anselmo AC, Shuvaev VV, Mitragotri S, Muzykantov V. Vascular targeting of nanocarriers: perplexing aspects of the seemingly straightforward paradigm. *ACS Nano*. 2014;8(5):4100-32.
86. Heath JR. Nanotechnologies for biomedical science and translational medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(47):14436-43.
87. Feng J, Markwalter CE, Tian C, Armstrong M, Prud'homme RK. Translational formulation of nanoparticle therapeutics from laboratory discovery to clinical scale. *J Transl Med*. 2019;17(1):200.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Labor der Arbeitsgruppe Gawaz der Inneren Medizin III – Kardiologie und Angiologie unter Betreuung von Herrn Professor Dr. med. M. Gawaz durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Dr. med. M. Gawaz, Ärztlicher Direktor und Ordinarius für Innere Medizin und Kardiologie.

Die Entwicklung und Herstellung der Nanopartikel erfolgten durch Herrn Netanel Korin und Frau Moran Levi vom Technion Israel Institute of Technology. Die Flusskammerversuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Kyra Kolb von mir eigenständig durchgeführt. Die Versuche am Lichttransmissionsaggregometer wurden nach Einarbeitung durch Herrn Marcel Kremser von mir eigenständig durchgeführt. Die DIC-Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Alexander Bild durchgeführt. Die Durchflusszytometrieversuche wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Frederic Emschermann durchgeführt. Die T-TAS®-Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Frau Daniela Eißler der Arbeitsgruppe Borst durchgeführt. AFM- und SICM-Versuche erfolgten durch Herrn Konstantin Krutzke der Arbeitsgruppe T. Schäffer des Instituts für Angewandte Physik der Universität Tübingen. Die Aufnahmen mittels Elektronenmikroskopie erfolgten durch Frau Birgit Fehrenbacher der Core Facility Elektronenmikroskopie der Universität Tübingen.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig und nach Anleitung durch Herrn Professor Dr. med. M. Gawaz verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Pforzheim, den 29.10.2022

Jeremy Andreas Nestele

## 8 Veröffentlichungen

### **Publikation im Rahmen dieser Doktorarbeit:**

Nestele JA, Rohlfing AK, Dicenta V, Bild A, Eißler D, Emschermann F, Kremser M, Krutzke K, Schäffer TE, Borst O, Levi M, Korin N, Gawaz MP. Characterization of GPVI- or GPVI-CD39-Coated Nanoparticles and Their Impact on In Vitro Thrombus Formation. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 21;23(1):11. doi: 10.3390/ijms23010011. PMID: 35008437; PMCID: PMC8744670.



## 9 Danksagung

Die Erarbeitung meiner Doktorarbeit erforderte eine intensive Zeit im Labor der AG Gawaz. Dabei habe ich neue Freunde gemacht, ohne deren Unterstützung diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

Primär möchte ich mich herzlichst bei allen Mitgliedern der AG Gawaz für deren unschätzbare Unterstützung während meiner Zeit im Labor bedanken. Ohne eure Ideen, Ratschläge, Kreativität und Geduld säße ich wohl heute noch an der Flusskammer.

Meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn Prof. Dr. Gawaz, danke ich für die einmalige Chance, mich an der experimentellen Wissenschaft teilhaben dürfen zu lassen. Die regelmäßige Begleitung und Betreuung durch Sie war und ist alles andere als selbstverständlich und war für mich elementar als Einsteiger in der Laborwelt.

Des Weiteren gilt ein großer Dank Herrn Konstantin Krutzke der Arbeitsgruppe T. Schäffer des Instituts für Angewandte Physik der Universität Tübingen sowie Frau Birgit Fehrenbacher der Core Facility Elektronenmikroskopie der Universität Tübingen für deren wertvolle Beiträge zu dieser Doktorarbeit.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Netanel Korin und Herrn Moran Levi vom Technion Israel Institute of Technology bedanken für deren Zusammenarbeit und Bereitstellung der untersuchten Nanopartikel.

Abschließend danke ich meiner Freundin, Freunden und meiner Familie, die mich in dieser intensiven Zeit durchweg begleitet und unterstützt haben. Auch wenn viel Zeit in die Verfassung dieser Dissertation geflossen ist, so freue ich mich auf jeden einzelnen Moment, der uns noch bevorsteht.