

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Karsten Schrör

**AUSWIRKUNG DES STRUKTURELLEN AUFBAUS
DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX
AUF DIE ADHÄSION VON THROMBOZYTEN**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

HENRIK ENDT-KNAUER

(2006)

**„ Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf „**

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Weber
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Hennersdorf

Mündliche Prüfungen:

05. Oktober 2006: Priv.-Doz. Dr. med. Artur-Aron Weber, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
18. Oktober 2006: Priv.-Doz. Dr. med. Markus Hennersdorf, Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
18. Oktober 2006: Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Mödder, Institut für Diagnostische Radiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	3
1.	Einleitung	4
1.1	Bedeutung atherosklerotischer Veränderungen als Ursache von später folgenden Organschäden	4
1.2	Thrombozyten und ihr Verhalten an defekten Gefäßwänden	4
1.3	Die extrazelluläre Matrix	6
1.3.1	Die extrazelluläre Matrix als ein Teil des subendothelialen Gewebes und Trigger zur Ausbildung von Thromben	6
1.3.2	Decorin und Biglykan, zwei Proteoglykane mit Einfluss auf EZM und benachbarte Zellen	7
1.4	Kalziumablagerungen in Gefäßen	9
1.4.1	Gefäßwandverkalkungen, eine Erkrankung mit erheblichen Folgeschäden	9
1.4.2	Mineralisation der Umgebung durch glatte Muskelzellen	9
1.5	Fragestellungen dieser Arbeit	10
2.	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Zelllinien	11
2.1.2	Substanzen	12
2.1.3	Lösungen	13
2.1.4	Geräte	14
2.1.5	Thrombozytenisolation	14
2.2	Methoden	14
2.2.1	Allgemeine Bedingungen für die Zellkultur	14
2.2.2	Kalzifizierung der Zellen	15
2.2.3	Quantifizierung des Kalzifizierungsgrades der Zellen bzw. der EZM	15
2.2.4	Beladung der Thrombozyten mit Calcein-AM	16
2.2.5	Thrombozytenadhäsion an Zellen bzw. an der EZM	16
2.2.6	Quantifizierung der Thrombozytenadhäsion	17
2.2.7	Thrombozytenadhäsionsversuche im Anschluss an den Abbau der Glykosaminoglykane durch die Chondroitinase ABC	18
2.2.7.1	Radioaktive Markierung der Glykosaminoglykane mit $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ und anschließender Behandlung mit Chondroitinase ABC	18
2.2.7.2	Thrombozytenadhäsion an Chondroitinase ABC-behandelten Zellen	18
2.2.8	Zellkernanfärbung zur Bestimmung der Zelldichte	19
2.2.9	Statistische Auswertung der Ergebnisse	19
3.	Ergebnisse	20
3.1	Kalzifizierungsprozess	20
3.1.1	Beta-Glycerolphosphat induzierte Kalzifizierung verschiedener Zelllinien	20
3.1.2	Quantifizierung des Kalziumgehaltes bei den CRL-Fibro	22
3.2	Vorversuche zur Messung der Thrombozytenadhäsion	22
3.3	Einfluss der EZM-Kalzifizierung auf die Thrombozytenadhäsion	24

3.3.1	Thrombozytenadhäsion an Beta-Glycerolphosphat behandelten CRL-Fibro bzw. deren EZM	24
3.3.2	Thrombozytenadhäsion an Beta-Glycerolphosphat behandelten RA-SMC bzw. deren EZM	26
3.4	Einfluss der Proteoglykanzusammensetzung auf die Thrombozytenadhäsion	28
3.4.1	Thrombozytenadhäsion an RA-SMC, Bigly-RA-SMC und Dec-RA-SMC bzw. deren EZM	28
3.4.2	Thrombozytenadhäsion nach Abbau der Glykosaminoglykane durch Chondroitinase ABC	31
4.	Diskussion	33
4.1	Kalzifizierungsprozesse und deren Auswirkung auf die Thrombozytenadhäsion	33
4.2	Decorin und Biglykan, zwei wichtige Proteoglykane der EZM	36
4.2.1	Die Proteoglykane Biglykan und Decorin nehmen nicht nur modulierend Einfluss auf das sie umgebende Gewebe, sondern beeinflussen zusätzlich die Thrombozytenadhäsion	36
4.2.2	Die Glykosaminoglykane an den Proteoglykanen Decorin und Biglykan tragen wahrscheinlich nicht direkt durch den Kontakt mit Thrombozyten zu deren vermehrten Adhäsion bei	39
5.	Zusammenfassung der Arbeit	41
6.	Literaturverzeichnis	42
7.	Publikation	47
	Danksagung	48
	Lebenslauf	49

Abkürzungsverzeichnis

ACD	“acidic citrate dextrose”
ALP	Alkalinephosphatase
β-GP	Beta-Glycerolphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	fetales Rinderserum
GAG	Glykosaminoglykan(e)
GP	Glykoprotein
LDL	“low density lipoprotein”
PBS	Phosphatpuffer
PGI ₂	Prostacyclin
PRP	plättchenreiches Plasma
SLRP	“small leucin-rich proteoglycan”
TF	“tissue factor”
TGF-β	“transforming growth factor-β”
TM	Testmedium
TxA ₂	Thromboxan A ₂
vWF	von-Willebrand-Faktor

1. Einleitung

1.1 Bedeutung atherosklerotischer Veränderungen als Ursache von später folgenden Organschäden

Myokardinfarkte und Apoplexien sind wesentliche Erkrankungen der zunehmend älter werdenden Bevölkerung. Gravierende Einschränkungen der Lebensqualität aufgrund von Residualsymptomen und hohe Mortalität dieser Erkrankungen machen wissenschaftliche Erkenntnisse zur Ursache und Prävention von großer Bedeutung. Die bekannt multifaktorielle Genese dieser Erkrankungen sowie die ebenfalls multifaktoriell bedingten atherosklerotisch veränderten Gefäßabschnitte sind häufig der Grundstein für spätere Infarkte und folgende Organschäden (Badimon et al., 1993; Goldschmidt et al., 2002). Als Grundlage der Atherogenese gilt heute immer noch die „response-to-injury-Hypothese“ (Ross, 1993). Diese beschreibt eine endotheliale Dysfunktion, die zur Ausbildung von Lipidplaques, fibrösen Plaques oder adhärenenten Plättchenthromben führt. Diese drei Formen der Gefäßschädigung können ineinander übergehen oder nebeneinander vorkommen.

1.2 Thrombozyten und ihr Verhalten an defekten Gefäßwänden

Thrombozyten gehören zum korpuskulären Bestandteil des Blutes. Diese kernlosen Zellen entstehen aus Abschnürungen von Megakaryozyten im Knochenmark. Physiologisch normwertig ist eine Konzentration an Thrombozyten von 150.000-300.000/ μl im Blut des adulten Menschen. Bei der Hämostase kommt den Thrombozyten eine zentrale Rolle zu, so dass bei deutlichen Thrombozytopenien das Risiko von Blutungen erheblich erhöht ist. Ihre normale Funktion besteht in der primären Hämostase, um Blutungen bzw. Blutverluste durch Verletzungen der Gefäßintegrität schnell zu minimieren. Dies geschieht in drei Schritten:

Der erste Schritt ist die **Adhäsion** der Plättchen an der nicht mehr intakten Gefäßwand durch Interaktionen von Rezeptoren auf der Oberfläche der Thrombozyten mit der extrazellulären Matrix der verletzten Gefäßwand (de Groot & Sixma, 1990). Dieser erste Kontakt bewirkt die **Aktivierung** der Plättchen, was nicht nur zur Aktivierung von weiteren Rezeptoren und intrazellulären Signalwegen führt, sondern ebenfalls zu einer Veränderung der Thrombozytenmorphologie. Die glatten, scheibenförmigen Thrombozyten verändern ihre Form („shape change“) durch Ausstülpungen der Plasmamembran, sogenannte Pseudopodien. Durch die Ausbildung dieser Pseudopodien vergrößert sich die Oberfläche der Thrombozyten. Die Pseudopodien ermöglichen den aktivierten Thrombozyten untereinander in engen Kontakt zu treten und weitere Thrombozyten zu aktivieren. Diese aktivierten Thrombozyten setzen wiederum Signalmoleküle frei.

Es kommt zur **Aggregation** und somit zum Wachstum des Thrombus, der durch die parallel verlaufende Aktivierung des Gerinnungssystems durch Fibrinstränge die über die GPIIb/IIIa-Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran interagieren, weiter stabilisiert wird. Letztendlich führen diese Prozesse zum Wundverschluss.

Das Gefäßlumen ist unter physiologischen Bedingungen mit Endothel ausgekleidet und beugt einer Thrombusbildung vor. Die Thrombozyten kommen bei ungeschädigtem

Endothel nicht in Kontakt mit der prothrombotischen subendothelial gelegenen **extrazellulären Matrix (EZM)**, wie z.B. Kollagen.

Außerdem produziert das Endothel Stoffe wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) oder PGI₂, die inhibitorisch auf die zuvor beschriebene Hämostase wirken.

Der zuvor beschriebene Adhäsionsvorgang wird durch thrombozytäre Membranglykoproteine gesteuert (Andrews et al., 1997). Die Membran der Thrombozyten besitzt viele dieser Adhäsionsrezeptoren. Die EZM exprimiert prothrombotische Komponenten, wie z.B. den von-Willebrand-Faktor (vWF), Laminin, Kollagen und Fibronectin. Diese interagieren mit den Membranglykoproteinen der Thrombozyten. Beispielsweise kommt es durch die Interaktion zwischen dem vWF mit dem Glykoprotein Ib-V-IX auf der Thrombozytenmembran zu einem ersten Kontakt, zwischen den Thrombozyten und der EZM. Dieser erste Kontakt muss bereits aufgrund der hohen Scherkräfte im arteriellen Gefäßsystem recht stabil sein. Dabei kommt es aufgrund der hohen der Scherkräfte die im arteriellen Gefäßsystem vorherrschen auch häufig zum so genannten „Rolling“ der Thrombozyten entlang der Gefäßwand bevor es zur festen Adhäsion kommt. Die Hämostase wird durch den Kontakt subendothelialer Komponenten mit Membranglykoproteinen der Thrombozyten eingeleitet (**Abb. 1**).

Ein intaktes Endothel ist aufgrund der zuvor beschriebenen Vorgänge von außergewöhnlicher Wichtigkeit, da es als eine Art Schutzschicht für Thrombozyten vor der prothrombotisch wirkenden EZM des subendothelialen Gewebes fungiert.

Vor allem Erkrankungen der heutigen „Wohlstandsgesellschaft“ die unter dem Begriff des metabolischen Syndroms subsumiert werden und zu denen die Hyperlipoproteinämie, die Adipositas, der Diabetes mellitus, die arterielle Hypertonie und die Hyperurikämie gehören, führen zu Endothelschäden. Das Endothel geht zugrunde mit der Folge, dass subendothelial prothrombotisches Gewebe in Kontakt mit dem Blutstrom kommt. An diesen Stellen ist durch die Verletzung der Gefäßintegrität mit einer Thrombozytenadhäsion zu rechnen und somit letztendlich ebenfalls eine durch diese induzierte Thrombusbildung zu erwarten. Das Endothel fungiert nicht mehr als antithrombotische Schutzschicht, es entsteht ein Ungleichgewicht zugunsten der prothrombotischen Seite (Ruggeri, 2002).

Die Hyperlipoproteinämie ist in Bezug auf die Endothelschädigung und deren bereits beschriebenen Auswirkungen besonders hervorzuheben. Durch intimale Lipideinlagerungen kommt es zu einer Intimaverdickung und damit verbunden zum Untergang des Endothels mit Freilegung der prothrombotisch wirkenden extrazellulären Matrix. Auch Erkrankungen wie die arterielle Hypertonie oder auch der Diabetes mellitus führen zu einem signifikant gesteigerten Atheroskleroserisiko mit Endothelschädigungen. Die daraus resultierende Plaque- bzw. Thrombusbildung in den Gefäßen, erhöht die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse (z.B. Myokardinfarkt) bei diesen Krankheitsbildern signifikant (Dzau, 1990; Colwell, 1991).

Verletzungen der Gefäßintegrität erhöhen signifikant das Risiko für die Ausbildung von Thromben die letztendlich zu Gefäßverschlüssen führen können.

1.3. Die extrazelluläre Matrix

1.3.1 Die extrazelluläre Matrix als ein Teil des subendothelialen Gewebes und Trigger zur Ausbildung von Thromben

Kommt es zu Verletzungen des Endothels so treten tiefer gelegene Zellverbände in Kontakt mit dem Blutstrom. Zu ihnen gehören unter anderem glatte Muskelzellen und Fibroblasten. Die Muskelzellen regulieren den Gefäßtonus. Fibroblasten sind Teil des Bindegewebes und verleihen dem Gefäß durch die Produktion von Kollagen eine gewisse Stabilität. Neben vielen anderen Zellarten produzieren Muskelzellen und Fibroblasten auch Komponenten für die Zusammensetzung der **EZM**. Die EZM besteht aus vielen Komponenten vor allem aber aus den festen Bestandteilen wie dem Kollagen und elastischen Fibrillen, die in ein viskös-elastisches Gel, bestehend aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Wasser, eingebettet sind (Piez & Reddi, 1984). Nach heutigem Erkenntnisstand sind Kollagen, Proteoglykane und strukturelle Glykoproteine auch nur Obergruppen unter denen sich viele weitere Subkomponenten differenzieren lassen. So sind bereits achtzehn verschiedene Kollagen – Typen bekannt aber auch Proteoglykane und strukturelle Glykoproteine zweigen sich weiter auf.

Die EZM verleiht dem Gefäß seine biomechanische Stabilität. Dabei ist die strukturelle Zusammensetzung der einzelnen Komponenten dem jeweiligen Gewebe optimal angepasst und kann sogar bei veränderten Ansprüchen an das Gewebe in ihrer Zusammensetzung der einzelnen Komponenten modifizierend umgebaut werden. Die Zusammensetzung und das Gleichgewicht der einzelnen Komponenten sind von großer Wichtigkeit für das umliegende Gewebe (Hay, 1991).

Der Morbus Ehlers-Danlos, die Osteogenesis imperfecta und die Epidermolysis bullosa sind Beispiele für Erkrankungen, die durch Mutationen an Genen für die Kollagensynthese verursacht werden (Steinmann et al., 1993; Byers, 1993; Bruckner-Tudermann, 1993). Es ist bekannt, dass die EZM nicht nur die Architektur eines entstehenden Gewebes beeinflusst, sondern zusätzlich die einzelnen Gewebe durch ständige Modifikationen dem Bedarf des Organismus anpasst.

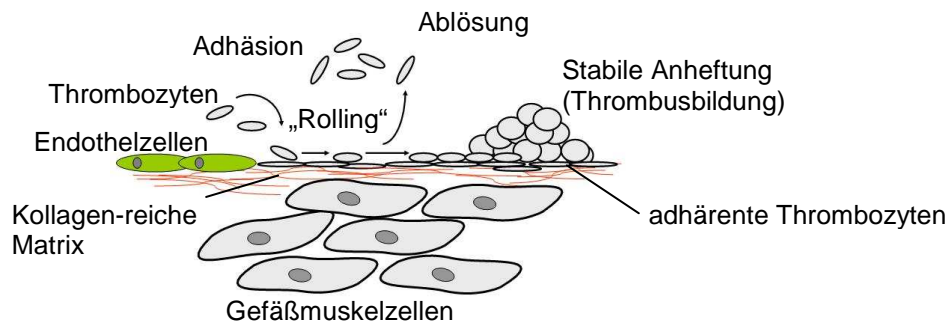
Ebenfalls greift die EZM über Rezeptoren, z.B. Integrine, regulierend in Stoffwechselprozesse der Zellen ein (Ruoslahti, 1991).

Die Kollagene I, III und VI, welche überwiegend in der subendothelialen Gefäßwand vorkommen, interagieren mit Membranglykoproteinrezeptoren der Thrombozyten. Sie aktivieren durch die Rezeptoren $\alpha_2\beta_1$ bzw. GPVI auf der Oberfläche der Thrombozyten intrazelluläre Signalwege und fördern so die Hämostase (Saelman et al., 1994; Moroi et al., 1996). Kollagen hat einen prothrombotischen Einfluss auf Thrombozyten und führt in Gefäßabschnitten, in denen das Endothel zerstört ist, z.B. in atherosklerotischen Bereichen, zu einer raschen Thrombusbildung (**Abb. 1**).

Die EZM ist kein unveränderliches homogenes Wirksystem, sondern ein hochdifferenziertes, aus vielen Makromolekülen bestehendes System, welches ständig modulierend auf die Gewebsstrukturen wirkt (Juliano & Haskill, 1993).

So gewinnen die einzelnen Komponenten der EZM auch an Bedeutung für die Thrombusentstehung. Viele Studien und Erkenntnisse über den bekanntesten Vertreter - das Kollagen – liegen bereits vor. Daher soll in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die Auswirkungen der **Proteoglykane** auf Thrombozyten und die dadurch möglicherweise quantitativ veränderte Thrombozytenadhäsion gelegt werden.

a)



b)

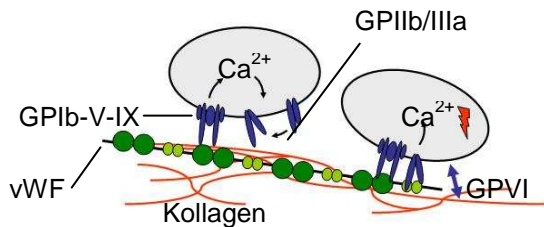


Abb. 1

Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten durch den Kontakt mit der extrazellulären Matrix und nachfolgend die Aggregation von Thrombozyten auf den bereits adhärenen Thrombozyten

a) Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaktivierung mit anschließender Aggregation und Thrombusbildung. b) Thrombozytenadhäsion und -aktivierung durch Interaktionen von vWF mit GPIIb-V-IX bzw. Kollagen mit GPVI. Expression von GPIIb/IIIa auf der Thrombozytenmembran welches durch Interaktionen mit Fibrinsträngen, die Verbindungen der Thrombozyten untereinander weiter verstärkt und so zur Thrombusstabilisierung beiträgt.

1.3.2 Decorin und Biglykan, zwei Proteoglykane mit Einfluss auf EZM und benachbarte Zellen

Proteoglykane bestehen aus einem Proteinkern, an den über kovalente Bindungen ein oder mehrere Glykosaminoglykane (GAG) angehängt sind (Haralson & Hassel, 1995). Dabei variiert bei den verschiedenen Proteoglykanen nicht nur die Primärstruktur des Kerns, sondern auch seine Größe. Generell unterscheidet man zwischen Proteoglykanen auf der Oberfläche der exprimierenden Zellen, deren Kernprotein transmembranöse Segmente hat (Syndecan-Familie) und Proteoglykanen, die vollkommen extrazellulär liegen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit zwei Proteoglykanen, die vollkommen

extrazellulär liegen und zur Gruppe der leucinreichen Familie gehören, dem **Decorin** (Krusius & Ruoslahti, 1986) und dem **Biglykan** (Fischer et al., 1989) (**Abb. 2**).

Decorin hat einen 36-kDa großen Proteinkern an den ein Chondroitin/Dermatan-GAG angehängt ist. Aus mehreren Studien ging hervor, dass diesem Proteoglykan eine Schlüsselrolle in der Zusammensetzung und Regulation der EZM zukommt (Iozzo, 1999). Nicht nur die Kollagenfibrillogenese wird von Decorin über dessen Bindungsstellen wesentlich beeinflusst (Weber et al., 1996), sondern noch weitere Proteine der EZM, wie Fibronectin (Schmidt et al., 1991) und Thrombospondin (Winnemöller et al., 1992). Decorin nimmt ebenfalls über Wachstumsfaktoren wie z.B. den TGF- β Einfluss auf die Zellproliferation (Yamaguchi et al., 1990). Alle diese Erkenntnisse sind Indizien für den großen Einfluss, den dieses Proteoglykan sowohl auf die EZM als auch auf umliegende Zellsysteme hat. Auch von Endothelzellen ist bekannt, dass sie während der Angiogenese, besonders in Verbindung mit einer inflammatorischen Reaktion, vermehrt Decorin exprimieren (Nelimarkka et al., 2001). So gewinnt dieses „small leucin-rich proteoglykan“ (SLRP) auch an Bedeutung in Bezug auf die Entstehung atherosklerotisch veränderter Gefäßabschnitte.

Biglykan ist strukturell dem Decorin sehr ähnlich. Der wesentliche Unterschied liegt darin, dass an den Proteinkern (38 kDa) des Biglykans zwei Chondroitin/Dermatan GAG angehängt sind. So moduliert auch dieses SLRP über spezifische Interaktionen Kollagen (Kresse et al., 1994) und beeinflusst ähnlich wie Decorin die benachbarten Zellsysteme (Tufvesson & Westergren-Thorsson, 2003). In einer verwundeten Endothelschicht geht die Zellmigration mit einer vermehrten Synthese von Biglykan einher (Kinsella and Wight, 1988). Auch in der Entstehung der Atherosklerose scheint Biglykan involviert zu sein. O'Brien et al. (1998) haben gezeigt, dass Biglykan vermehrt in atherosklerotischen Gefäßabschnitten zu finden ist und über Apolipoproteine LDL bindet. Somit trägt Biglykan zur Ausbildung von Lipidplaques und letztendlich auch zur Entstehung von Atherosklerose bei.

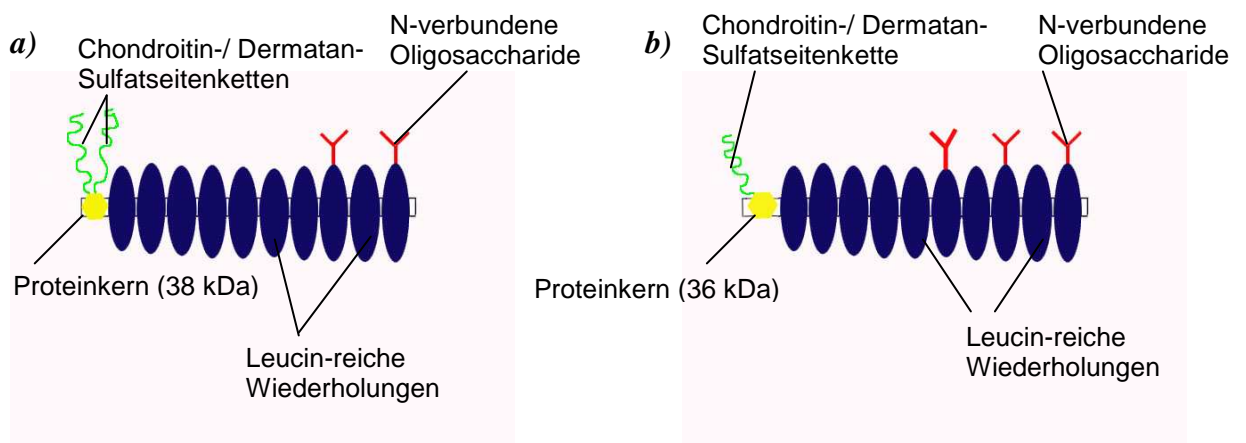


Abb. 2

Struktureller Aufbau der extrazellulär liegenden Proteoglykane

a) Biglykan b) Decorin

1.4 Kalziumablagerungen in Gefäßen

1.4.1 Gefäßwandverkalkungen, eine Erkrankung mit erheblichen Folgeschäden

Gefäßwandverkalkungen werden durch ektope Kalzifizierungsprozesse hervorgerufen. Dabei kommt es zu einer inadäquat starken Mineralisation bzw. Ablagerung von Hydroxyapatitkristallen in den Gefäßen (Giachelli, 1999). Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Formen. Die erste zeichnet sich durch eine vermehrte Mineralisation im Bereich der Intima aus. Dort kommt sie gehäuft in Verbindung mit atherosklerotischen Ablagerungen vor. Die zweite Form ist gekennzeichnet durch vermehrte Mineralisation in der Media, die so genannte Mönckeberg-Atherosklerose. Sie bewirkt eine Gefäßwandversteifung. Diese bewirkt eine Störung der Anpassung des Gefäßtonus an den Blutdruck. Beide Gefäßwandverkalkungen gehen mit einem signifikant erhöhten Risiko für die Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen und Herzinfarkten einher (Block, 2001).

Die Hyperphosphatämie, z.B. bei Niereninsuffizienz, geht mit einer im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich gesteigerten Gefäßwandverkalkung einher. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass der erhöhte Phosphatspiegel im Blut dafür verantwortlich ist (Giachelli et al., 2001). So versterben bei diesem Krankheitsbild auch knapp 50% an kardiovaskulären Erkrankungen und nicht am Nierenversagen (Giachelli, 2003).

Auch der Diabetes mellitus, bei dem die Rate an Ischämie bedingten Organschäden im Vergleich zur gesunden Bevölkerung signifikant erhöht ist, ist für eine gesteigerte Gefäßverkalkung bekannt (Lehto, 1996).

Generell ist bekannt, dass mit zunehmendem Alter vermehrt Kalziumkristalle in Gefäßwänden eingelagert werden. Ob dies jedoch eine Ursache für eine forcierte Atherosklerose mit der Folge von Gefäßverschlüssen durch Thrombusbildung ist, ist noch nicht geklärt. Ischämie-bedingte Insulte sind jedoch gesteigert.

Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl primäre Gefäßdissektionen als auch Dissektionen im Anschluss an Angioplastien signifikant häufiger an Gefäßwandverkalkungen auftreten (Fitzgerald et al., 1992).

Gefäßwandverkalkungen sind daher besonders wegen ihrer Folgeschäden und wegen ihrer Häufigkeit in der Bevölkerung eine sehr ernst zunehmende Erkrankung. Ihre Entstehung und Prävention werden daher im Focus vieler weiterer Untersuchungen in der Zukunft stehen.

1.4.2 Mineralisation der Umgebung durch glatte Muskelzellen

In mehreren *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass glatte Muskelzellen aus Gefäßen in der Lage waren, ihre Umgebung zu kalzifizieren. Dieses bedarf besonderer Bedingungen wie z.B. der bereits erwähnten Hyperphosphatämie. Shioi et al. (1995) haben in *in vitro*-Experimenten gezeigt, dass durch die Zugabe von Beta-Glycerolphosphat als Phosphatdonator zum Nährmedium eine Mineralisation durch glatte Muskelzellen ausgelöst werden kann. Dabei kommt es auch zu einer Mineralisation der oben beschriebenen EZM. Hydroxyapatitkristalle bilden sich besonders entlang der Kollagenfibrillen aus. Es ist daher gut möglich in Experimenten Mineralisationen, wie sie in Gefäßen vorkommen, nachzuahmen.

Muskelzellen verändern dabei nicht nur ihren Phänotyp sondern auch viele ihrer Stoffwechselprozesse. Insgesamt nähern sie sich dabei dem Charakter eines Osteoblasten an (Steitz et al., 2001).

Wie bereits zuvor erwähnt, sind Mineralisationsvorgänge in Gefäßwänden nicht selten und sie werden häufig assoziiert mit kardiovaskulären Erkrankungen. Es ist daher verständlich, dass die Inhibition der Mineralisationsvorgänge in Gefäßwänden Gegenstand intensiver Forschung ist. Osteopontin wird vermehrt von mineralisierten Muskelzellen exprimiert und wirkt inhibitorisch auf die Kalzifikation bzw. Ablagerung von Kristallen (Wada et al., 1999). So scheint es, als gäbe es *in vivo* ein Wechselspiel von inhibitorisch (Osteopontin) und stimulierend (Phosphat) wirkenden Substanzen bei deren Ungleichgewicht es zu Gefäßwandverkalkungen kommen kann.

1.5 Fragestellungen dieser Arbeit

In den letzten Jahren sind viele neue Erkenntnisse über den Einfluss der einzelnen Komponenten der EZM auf deren Aufbau und die umliegenden Gewebe zusammengetragen worden. So ist heute bekannt, dass Decorin und Biglykan sehr wichtige Aufgaben in der Modulation und Gestaltung der EZM zukommen. Zusammenhänge zwischen diesen beiden Proteoglykanen und der Atherosklerose werden gesucht. Die Erforschung der Entstehung der Atherosklerose ist aufgrund ihrer Prävalenz in der Bevölkerung von großer Wichtigkeit. Williams & Tabas (1995) haben die bekannt multifaktorielle Genese dieser Erkrankung zusammengefasst und gezeigt, dass viele Fragen noch offen sind. Den Proteoglykanen kommt dabei vermehrt Bedeutung zu, da Kunjathoor et al. (2002) gezeigt haben, dass in der EZM atherosklerotischer Gefäßabschnitte vermehrt Biglykan zu finden ist.

In atherosklerotischen Gefäßabschnitten kommen Thrombozyten vermehrt in Kontakt mit den in der subendothelialen EZM gelegenen Proteoglykane Decorin und Biglykan. Ob eine Überexpression dieser beiden Proteoglykane in der EZM Auswirkungen auf die Thrombozytenadhäsion hat, ist noch nicht bekannt.

Daher wurden in dieser Studie Experimente durchgeführt, die die Thrombozytenadhäsion auf Decorin und Biglykan überexprimierenden glatten Muskelzellen untersuchten. In dieser Arbeit wurde der Fragestellung nachgegangen:

Wirkt sich eine Überexpression von Decorin bzw. Biglykan in der EZM auf die Thrombozytenadhäsion aus?

Gefäßwandverkalkungen werden wie oben beschrieben häufig gesehen und erhöhen das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse deutlich (Blacher et al., 2001). Der Blutstrom und damit verbunden die Thrombozyten kommen in diesen Bereichen des Gefäßsystems vermehrt in Kontakt mit kalzifiziertem subendotheliales Gewebe. Ob der Kontakt von Thrombozyten mit kalzifiziertem subendotheliales Gewebe zu einer vermehrten Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten im Vergleich zum Kontakt von Thrombozyten an einem nicht kalzifizierten subendotheliales Gewebe führt, ist noch nicht geklärt.

In dieser Studie wurde daher ein *in vitro*-Kalzifizierungsprozess der Zellen stimuliert und im Anschluss daran die Thrombozytenadhäsion auf diesen Zellen in Experimenten untersucht. Es wurde der Fragestellung nachgegangen:

Wirkt sich eine vermehrte Kalzifizierung an den Zellen bzw. deren EZM auf die Thrombozytenadhäsion aus?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Humane Fibroblasten CRL-1635 (Fibroblasten) ATCC (American Type Collection Culture), USA

Bovine koronar-arterielle glatte Muskelzellen (bovine SMC)
(Schlachthof Düsseldorf in Explant-Technik entnommen und kultiviert)

LXSN- aortale glatte Muskelzellen von Ratten (Kontroll-SMC)

Glatte Muskelzellen aus der Aorta von Ratten mit transfiziertem Rinder-Biglykan-Gen (Biglycan-SMC)

Es handelt sich hierbei um retroviral mit einem Rinder Biglykan-Gen transfizierte Zellen, die dadurch Biglykan überexprimieren.

Glatte Muskelzellen aus der Aorta von Ratten mit transfiziertem Rinder-Decorin-Gen (Decorin-SMC)

Es handelt sich hierbei um retroviral mit einem Rinder Decorin-Gen transfizierte Zellen, die dadurch Decorin überexprimieren (Fischer et al., 2001 **Abb. 3**).

Die drei letztgenannten Zelllinien wurden von Prof. Dr. Jens W. Fischer (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

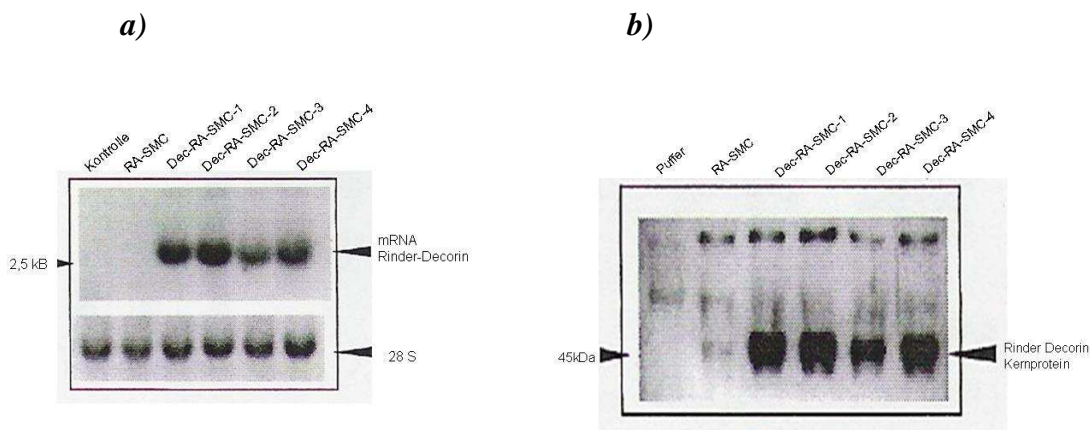


Abb. 3

Expression von mRNA Rinder-Decorin und dessen Kernprotein in aortalen SMC aus Fischer 344 Ratten.

a) Northern Blot mit cDNA von Rinder-Decorin. Die Kontrolle entspricht der mRNA aus aortalen SMC. RA-SMC: mRNA aus aortalen SMC mit transfiziertem RA-SMC-Vektor. Dec-RA-SMC-1 bis RA-SMC-4: vier verschiedene Zelllinien mit transfiziertem Rinder-Decorin-Gen (cDNA). Die endogene mRNA von Rinder-Decorin oder von

Ratten liegt bei ca. 1,8 kb. Nach Transfektion mit dem RA-SMC-Vektor enthält das Transkript von Decorin-mRNA Sequenzen von Neomycinphosphotransferase (794 bp). Erhöhung der mRNA auf ca. 2,6 kb. **b)** Western Blot mit dem Spezies-spezifischem Antikörper LF-94 (24 h inkubiert) gegen Rinder-Decorin. Vor dem Western Blot wurden die Proben mit Chondroitinase-ABC-Lyase behandelt. (modifiziert aus Fischer et al., 2001)

2.1.2 Substanzen

Substanz	Hersteller
DMEM mit Natriumpyruvat	GIBCO™ Invitrogen, Karlsruhe
Ham's F-12	GIBCO™ Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe GIBCO™ Invitrogen, Karlsruhe
FBS	PAA Laboratories, Cölbe GIBCO™ Invitrogen, Karlsruhe
MEM nicht essentielle Aminosäuren	PAA Laboratories, Cölbe GIBCO™ Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe GIBCO™ Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Cölbe
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
NH ₃ OH 25 %	Merck, Darmstadt
Calcein-AM	Alexis® Biochemicals, Lausanne, Schweiz
DMSO	Sigma, Deisenhofen
ACD	Biotest Pharma, Dreieich
BSA	Roth, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Thrombo-Plus-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
AgNO ₃	Merck, Karlsruhe
Pufferlösung: Borsäure 34 mM Monoethanolamin 880 mM Farbreagenz: o-Kresolphthlein-Komplexon 0,6 mM 8-Hydroxychinolon 69 mM Salzsäure 200 mM	Wako, Neuss
Kalzium-Standard: Kalzium 10 mg/dl Salzsäure Trichloressigsäure	Wako, Neuss
Bisbenzimid (1mg/ml)	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt

MgCl ₂ x 6 H ₂ O;	Merck, Darmstadt
Hepes	Merck, Darmstadt
Trisnatriumcitrat	Merck, Darmstadt
Zitronensäure x H ₂ O	Merck, Darmstadt
Glucose x H ₂ O	Merck, Darmstadt
BSA	New England BioLabs, Frankfurt
³⁵ SO ₄ ²⁻ (sulphuric acid)	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
Gel-Blotting-Papier	Schleicher/Schüll, Dassel
Lumasafe Plus	Lumac, Groningen, Niederlande
Cetylpyridiniumchlorid	Sigma, München
Chondroitinase ABC	ICN Biomedicals, Inc., Ohio, USA
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt

2.1.3 Lösungen

DMEM mit Natriumpyruvat, L—Glutamin und 4,5 g/l Glucose, FBS (10%), Penicillin G (100 U/ml) und Streptomycin (0,1 mg/ml)

400 ml Ham's F-12, 100 ml DMEM und in den oben angegebenen Konzentrationen FBS, Penicillin und Streptomycin zugesetzt.

“phosphate-buffered saline” (PBS)-Puffer: NaCl, 138 mM; KCl 2,3 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; pH 7,4

25 mM NH₄OH

“acidic citrate dextrose” (ACD): Trisnatriumcitrat x 2 H₂O, 85 mM ; Zitronensäure x H₂O, 65 mM; Glucose x H₂O, 111 mM

10 x Testmedium (TM): NaCl, 1,34 M; NaHCO₃, 120 mM; KCl, 29 mM; NaH₂PO₄ x H₂O , 3,6 mM; MgCl₂ x 6 H₂O , 10 mM; Hepes, 50 mM, pH 7,4. 10 x TM einige Wochen bei 4°C haltbar.

Komplett Testmedium: 10 ml TM, 100 µl BSA 40%, 200 µl CaCl₂ 200 mM

5% AgNO₃: 0,5 g AgNO₃ in 10 ml aqua dest.

HCl 0,6 N: 1,9724 ml 37% HCl ad 40 ml aqua dest.

ABC-Puffer-Lösung für die Chondroitinase: Tris Base, 50 mM; Na Acetat x 3 H₂O, 97 mM; NaCl 51 mM; pH 8; ad BSA 1 mg/ml ABC-Puffer

Cetylpyridiniumchlorid (CPC) – Waschlösung: NaCl, 50 mM; CPC, 29 mM

Harnstoffpuffer zur Zell-Lyse: Harnstoff, 8 M; NaCl, 0,25 M; 0,5% Triton X-100

2.1.4 Geräte:

Zentrifugen:

Tischzentrifuge Centrifuge 5415C, Eppendorf, Köln
Zentrifuge, Megafuge 1.0, Heraeus Sepatech, Osterode

Fluoreszenzmessung :

Fluoreszenzpolarisationssystem, Beacon 2000, Panvera, Madison, MI, USA
Disposable Borosilicate Glass Culture Tubes 6*50 mm, Kimble, Illinois, USA

Mikroskope:

Olympus IX 50/IX 70, Olympus Optical Co., Hamburg
Olympus BX 50, Olympus Optical Co., Hamburg
Olympus U-RFL-T Vorschaltgerät für Quecksilberbrenner, Olympus Optical Co., Hamburg

Digitale Bilddokumentation:

Olympus Camedia C-4040 Zoom, Olympus Optical Co., Hamburg

Nachweis des Kalzifizierungsgrades:

UV-Lampe: Pharmacia Biotech Repro Set, San Francisco, California, USA
Mikroplattenleser BIO-RAD Model 550, BIO-RAD Laboratories GmbH, München

Zähler zur Bestimmung der Radioaktivität (Counter):

Beckman LS 6000 IC, Beckman Instruments, Inc., CA, USA

Zellzählkammern:

Thoma-Zählkammer
Neubauer-Zählkammer

2.1.5 Thrombozytenisolation

Nach mündlicher Einverständniserklärung der freiwilligen Probanden erfolgte eine Blutentnahme aus der Vena mediana cubiti. Den Probanden wurde ca. 10 ml Blut entnommen. Zur Vermeidung der Koagulation des Blutes diente eine 1:9 (V/V) ACD-Vorlage. Die Blutentnahme wurde mit einem W.I.N. 19 G (Abbott, Sligo, Irland) Butterfly durchgeführt.

Die Thrombozytenisolation erfolgte jeweils kurz vor den Versuchen. Das Blut wurde aus der Spritze in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und anschließend 45 s bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das im Überstand befindliche plättchenreiche Plasma wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dem plättchenreichen Plasma wurde noch einmal 30% ACD zugesetzt, um eine Aktivierung der Thrombozyten vor Beginn der Experimente zu vermeiden.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Bedingungen für die Zellkultur

Die Passagierung auf neue 24-Well-Platten erfolgte, je nach Konfluenz der Zellen, in den Falconflaschen. Die konfluenten Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mittels Trypsin-EDTA abgelöst. Die abgelösten Zellen in Nährmedium aufgenommen und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert, das Zellpellet anschließend in frischem Nährmedium resuspendiert. Mittels der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl im Nährmedium

mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes bestimmt und anschließend so verdünnt, dass die Zellen in der für die jeweilige Zelllinie entsprechenden Zellzahl pro Well ausgesät werden konnten.

Es wurden 7.500 Fibroblasten pro Well bzw. 10.000 bovine SMC pro Well ausgesät. Kontroll-SMC, Biglykan-überexprimierende SMC und Decorin-überexprimierende SMC wurden in Konzentrationen von 15.000 pro Well ausgesät. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37° C in einer mit Wasserdampf angereicherten Atmosphäre, die 5% CO₂ enthielt, kultiviert.

Die unterschiedlichen Zellmedien wurden jeden dritten bis vierten Tag erneuert, dies entsprach 500 µl Nährmedium pro Well.

Alle Versuche wurden bei Konfluenz der Zellen durchgeführt. Dabei waren die Zeiträume der einzelnen Zelllinien bis zum Erreichen dieses Stadiums in etwa gleich.

2.2.2 Kalzifizierung der Zellen

Shioi et al. (1995) hatten gezeigt, dass Beta-Glycerolphosphat in einer Konzentration von 10 µM im Nährmedium der Zellen über einen ALP-abhängigen Mechanismus in der Lage ist die Kalzifizierung von glatten Muskelzellen zu induzieren.

Als Zelllinien wurden bovine SMC, Fibroblasten und Kontroll-SMC verwendet. Dem Nährmedium der zu kalzifizierenden Zellen wurde nach dem Erreichen der Konfluenz zusätzlich 5 µl einer 1 M Beta-Glycerolphosphat-Lösung zugesetzt (EK 10 µM). Zur Kontrolle dienten die gleichen Zellen deren Nährmedium keinen Zusatz von Beta-Glycerolphosphat erhalten hatte.

Bei jedem Wechsel des Nährmediums wurde neues Beta-Glycerolphosphat zugesetzt. Nach 9-11- bzw. 15-17-tägiger Behandlung der Zellen mit diesem speziellen Nährmedium wurde der Kalzifizierungsprozess beendet.

Wada et al. (1999) hatten an ihren Zellen gezeigt, dass es nach diesem Zeitraum zu einer durch Beta-Glycerolphosphat induzierten Kalzifizierung in Form von granulären Kalziumablagerungen besonders in der EZM gekommen ist.

2.2.3 Quantifizierung des Kalzifizierungsgrades der Zellen bzw. der EZM

Zwei unterschiedliche Methoden wurden für den Nachweis bzw. für die Quantifizierung der Kalzifizierung benutzt. Zum einen wurde eine Färbung nach von Kossa durchgeführt. Dabei werden die Kalziumkristalle mit einer 5%-igen AgNO₃ Lösung geschwärzt.

Zunächst wurde das Nährmedium aus den Wells entfernt und die Zellen dreimal mit aqua dest. gespült. Danach wurden 200 µl der 5%-igen AgNO₃ Lösung auf die Zellen gegeben und für 10 min unter eine UV-Lampe gestellt. Anschließend wurden die Zellen erneut gründlich (dreimal) mit aqua dest. gespült. Es erfolgte eine mikroskopische Beurteilung der Menge an Kalziumablagerungen mit dem Phasenkontrastmikroskop. Als Kontrolle dienten Zellen, denen normales Nährmedium ohne Beta-Glycerolphosphat gegeben wurde. Sie wurden ebenfalls nach von Kossa gefärbt. Die von-Kossa-Färbung diente einer ersten Orientierung über die Menge an Kalziumablagerungen die sich durch den Kalzifizierungsprozess gebildet hatten.

Im Anschluss wurde eine Bestimmung des Kalziumgehalts pro Well vorgenommen. Das Prinzip dieser Bestimmung beruht auf der Tatsache, dass Kalziumionen mit o-Kresolphthalein in alkalischer Lösung einen violetten Farbkomplex bilden, dessen Intensität der Kalziumkonzentration proportional ist.

Für diese Versuche wurde das Nährmedium aus den Wells abpipettiert und anschließend gründlich mit PBS gespült (dreimal). In die jeweiligen Wells wurden nun 100 µl einer 0,6 N HCl-Lösung gegeben und für 24 h bei 37°C inkubiert. Durch den Zusatz von HCl kommt es zur Auflösung der Kalziumapatitkristalle, so dass Kalziumionen in Lösung gehen. Nach Ablauf der 24 h wurden die 100 µl HCl aus dem Well in ein Eppendorfgefäß überführt. 10 µl dieses HCl Überstandes wurden in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und mit 1000 µl der Pufferlösung gut durchmischt. Im Anschluss wurden 100 µl des o-Kresolphtalein enthaltenden Farbreagenzes zugesetzt und nochmals durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden 200 µl dieses Gemisches abgenommen und in eine 96-Well-Platte gegeben. Es erfolgte die Messung der Extinktion zur Bestimmung der Farbintensität bei einer Wellenlänge von 595 nm mit dem Mikroplatten-Leser.

Ein Standard wurde benutzt, dessen Konzentration 0,1 µg Ca²⁺ / 10µl entsprach. 10 µl wurden ebenso wie die zuvor beschriebenen einzelnen Proben mit Puffer und o-Kresolphtalein-Farbreagenz gemischt und anschließend in der 96-Well-Platte mitvermessen, was die genaue Quantifizierung des Kalziumgehaltes in den einzelnen Wells ermöglichte. Als Kontrolle dienten Zellen, deren Nährmedium kein Beta-Glycerolphosphat zugesetzt worden war.

2.2.4 Beladung der Thrombozyten mit Calcein-AM

Im Anschluss an die Gewinnung des Thrombozyten reichen Plasmas erfolgte die Beladung der Thrombozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM.

Calcein-AM ist ein lipophiler, nicht fluoreszierender Ester, welcher in lebende Zellen aufgenommen wird. Durch intrazelluläre Esterasen wird Calcein-AM zu einem fluoreszierenden Salz gespalten. In dem hydrolysierten Zustand ist Calcein-AM nicht mehr lipophil und kann somit nicht mehr die intakte Zellmembran von lebenden Zellen durchdringen. Somit ist Calcein-AM ein geeigneter Stoff zur Bestimmung der Fluoreszenz in Zellen.

Für die Beladung der Thrombozyten wurden 2 µl Calcein-AM, gelöst in DMSO in einer Konzentration von 4 mM, in 1 ml plättchenreiches Plasma gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37° C wurde für 35 s bei 6000 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet in 2 ml TM überführt. 20 µl davon wurden in ein Thrombo Plus®-Röhrchen gegeben, kurz gemischt und anschließend in eine Thoma-Zählkammer gegeben. Zur Sedimentierung der Thrombozyten wurde die Zählkammer für 10 min in eine feuchte Kammer gestellt. Im Anschluss wurden die Thrombozyten mit einem Phasenkontrastmikroskop gezählt. Es erfolgte eine Verdünnung der Thrombozytenkonzentration mit TM auf die jeweilige Thrombozytenzahl pro µl.

2.2.5 Thrombozytenadhäsion an Zellen bzw. an der EZM

Nachdem die Zellen in den Wells konfluent waren bzw. der Kalzifizierungsprozess abgeschlossen war, wurden die bovinen SMC, Kontroll-SMC, Biglykan-überexprimierende SMC und Decorin-überexprimierende SMC nach Abnahme des Nährmediums zunächst mit PBS gespült, bevor ihnen für 60 h Hungermedium zugesetzt wurde. Den Fibroblasten wurde vor den Versuchen kein Hungermedium zugesetzt.

Vor den Experimenten wurde das Nährmedium bzw. Hungermedium aus den Wells abgezogen und mit PBS gespült.

Danach wurden die 24-Well-Platten in Hälften unterteilt, wobei in die eine Hälfte der Wells für 10 min bei Raumtemperatur 25 mM NH₄OH (500 µl) zugegeben wurde. Im Anschluss wurde das NH₄OH abgenommen und noch mal mit PBS gespült. Durch die Behandlung mit NH₄OH wurde erreicht, dass sich die Zellen ablösten, jedoch die darunter liegende EZM nicht.

Dies ermöglichte Adhäsionsversuche an der reinen EZM durchzuführen. Nach dem Absaugen des PBS wurden 250 µl Calcein-AM-beladener Thrombozyten auf die EZM gegeben.

Bei der anderen Hälfte wurden die Zellen nicht abgelöst, so dass hier nach Abnahme des PBS sofort 250 µl Calcein-AM-beladener Thrombozyten auf die Zellen gegeben werden konnte. Es erfolgte eine Inkubation von 45 min bei 37° C. Anschließend wurde das TM abgesaugt und jedes Well mit PBS (dreimal) gespült.

2.2.6 Quantifizierung der Thrombozytenadhäsion

Zur Quantifizierung der adhärenzten Thrombozyten dienten drei verschiedene Methoden.

Zunächst wurden die Wells einzeln kurz unter dem Mikroskop betrachtet. Dies diente einer ersten Überprüfung, ob die Zellen während der zuvor beschriebenen vorbereitenden Behandlungen Schaden genommen hatten. Ebenfalls wurde überprüft, ob eine EZM-Schicht den Boden des Wells nach NH₄OH-Behandlung noch bedeckte. Die einzelnen Wells wurden mit einem 10`er bzw. 20`er Objektiv betrachtet, dies entspricht einer 100- bzw. 200-fachen Vergrößerung.

Zusätzlich war es möglich, sich mikroskopisch einen ersten Eindruck über das Ausmaß der Thrombozytenadhäsion zu verschaffen. Die mit Calcein-AM beladenen adhärenzten Thrombozyten erschienen durch den zuvor intrazellulär aufgenommenen Fluoreszenzfarbstoffes unter Zwischenschaltung einer Quecksilberlampe grün. Die Thrombozytenadhäsion von repräsentativen Bereichen wurde durch Anfertigung von Bildern mit einer Digitalkamera fotodokumentiert.

Bei der zweiten Methode wurde eine Messung der Gesamtfluoreszenz in den einzelnen Wells vorgenommen. Die Gesamtfluoreszenz wurde mit dem Fluoreszenzpolarisierungssystem bestimmt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei 21°C mit einem Extinktionsfilter (492 nm) und einem Emissionsfilter (520 nm).

Im Anschluss an die zuvor beschriebene Fotodokumentation der Thrombozytenadhäsion wurde das PBS aus den Wells entfernt, die 24-Well-Platten bei -20° C eingefroren und wieder aufgetaut, um die Thrombozyten zu lysieren. Nach Aufnahme in 200 µl aqua dest. wurde die Gesamtfluoreszenz quantifiziert.

Ein anderes Vorgehen wurde bei der Quantifizierung der Thrombozytenadhäsion an der EZM bei den Zelllinien Kontroll-SMC, Biglykan-überexprimierende SMC und Decorin-überexprimierende SMC gewählt. Da sich nach Ablösung der Zellen auch immer wieder größere Bereiche der EZM bei diesen Zelllinien mit ablösten, war eine sichere Quantifizierung der Adhäsion mittels Messung der Gesamtfluoreszenz nicht möglich. Daher wurden hier repräsentative Bereiche der Wells digital fotodokumentiert und die Thrombozyten ausgezählt.

2.2.7 Thrombozytenadhäsionsversuche im Anschluss an den Abbau der Glykosaminoglykane durch die Chondroitinase ABC

2.2.7.1 Radioaktive Markierung der Glykosaminoglykane mit $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ und die anschließende Behandlung mit Chondroitinase ABC

Nach dem Erreichen der Konfluenz der Kontroll-SMC, wurde den Zellen für 48 h Hungermedium gegeben. Nach dieser zweitägigen Inkubation, wurde das Hungermedium abgenommen und frisches Hungermedium mit dem radioaktiv markierten Sulfat ($^{35}\text{SO}_4^{2-}$) für 24 h auf die Zellen gegeben. Die Radioaktivität entsprach 0,5 $\mu\text{Ci}/\text{Well}$. Das radioaktive Sulfat wird in die GAG inkorporiert. Dadurch werden diese markiert. Anschließend wurde den Zellen zusätzlich für 3 h die in ABC-Puffer gelöste Chondroitinase ABC (0,02 U/Well) zugegeben.

Durch die Behandlung der Zellen mit Chondroitinase ABC werden Dermatan-sulfatseitenketten und Chondroitin-sulfatketten abgebaut. Die Chondroitinase ABC ist eine Endolyase, die durch eine β -Eliminierungs-Reaktion β -1,4-glykosidische Bindungen zwischen N-Acetylhexosamin und Glukuronsäure bzw. Iduronsäure spaltet (Yamagata et al., 1968).

Im Anschluss an die Inkubation der Zellen mit Chondroitinase ABC wurde der Überstand abgenommen, in Eppendorfgefäße überführt und die in den Wells verbliebenen Zellen gründlich mit PBS gespült. Es erfolgte nun die Zelllyse mit 200 μl des Harnstoffpuffers für 15 min bei Raumtemperatur. 50 μl vom Zelllysats wurden in Eppendorfgefäßen aufgenommen. Die 50 μl des Chondroitinase-Überstandes bzw. des Zelllysats wurde auf jeweils 3 x 3 cm große Quadrate des Gel-Blotting-Papiers aufpipettiert und die Quadrate im Anschluss für 5 h trocknen gelassen. Danach wurden die Quadrate in der CPC-Waschlösung gewaschen. Dies diente der Elimination des nicht inkorporiertem $^{35}\text{SO}_4^{2-}$. Der gesamte Waschvorgang dauerte 10 h, wobei die CPC-Waschlösung insgesamt fünfmal gewechselt wurde. Nach dem Waschvorgang wurde das Papier für insgesamt 5 h trocknen gelassen und im Anschluss jedes Quadrat in 16 kleinere Quadrate geschnitten. Diese wurden in Szintillationsröhrchen gegeben und danach 5 ml der Lumasafe Plus (Szintillationslösung) zugesetzt. Es erfolgte die Messung der Radioaktivität aus den Szintillationsröhrchen im Counter.

Dieses Experiment diente dem Nachweis der Effektivität des Chondroitinase ABC-Verdau an lebenden Zellen. Da die reduzierte Radioaktivität der mit Chondroitinase ABC behandelten Zellen mit dem enzymatischen Abbau der GAG korreliert.

2.2.7.2 Thrombozytenadhäsion an Chondroitinase ABC-behandelten Zellen

Für die Thrombozytenadhäsion wurden die Zelllinien: Kontroll-SMC, Biglykan-überexprimierende SMC und Decorin-überexprimierende SMC genommen. Nachdem die Zellen in den Wells konfluent waren, wurde ihnen für 60 h Hungermedium gegeben. Danach wurde das Hungermedium abgezogen und frisches Hungermedium mit der in ABC-Puffer gelösten Chondroitinase ABC (0,02 U/Well) für 3 h zugegeben. Im Anschluss wurde das Hungermedium abgenommen und die Zellen mit PBS (dreimal) gespült. Es erfolgte die Durchführung der Thrombozytenadhäsionsversuche an den Zellen wie bereits in 2.2.5 beschrieben. Die Adhäsionsversuche im Anschluss an die Chondroitinasebehandlung der Zellen wurden nicht an der reinen EZM (nach NH_4OH -Behandlung) durchgeführt.

2.2.8 Zellkernanfärbung zur Bestimmung der Zelldichte

Das Nährmedium bzw. Hungermedium wurde aus den Wells abgezogen und die Zellen 5 min in Methanol fixiert. Im Anschluss wurde das Methanol verworfen und die Wells für ca. 15 min luftgetrocknet. Das Bisbenzimid (1mg/1ml), ein Farbstoff zur Zellkernanfärbung, wurde in PBS 1: 100 verdünnt. 250 µl von dieser verdünnten Lösung wurden für weitere 15 min in die einzelnen Wells gegeben. Nach dieser 15-minütigen Inkubation wurde der Farbstoff abgenommen und die Wells erneut luftgetrocknet, um sie dann einzeln unter dem Mikroskop bei einer 40-fachen Vergrößerung zu betrachten. Die mit Bisbenzimid beladenen Zellen erschienen durch die Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes unter Zwischenschaltung einer Quecksilberlampe blau.

Mittels der Digitalkamera wurden Bilder von repräsentativen Bereichen der Wells angefertigt.

2.2.9 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Messdaten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Einweg-ANOVA und dem Bonferroni-Test überprüft. Das Signifikanzniveau wurde mit 0,05 festgesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Kalzifizierungsprozess

3.1.1 Beta-Glycerolphosphat-induzierte Kalzifizierung verschiedener Zelllinien

Alle in diesem Kapitel gezeigten Aufnahmen wurden nach einer von-Kossa-Färbung angefertigt. Es wurde jeweils die 200-fache Vergrößerung gewählt. In den Bildern, in denen sich Kalziumkristalle (Schwärzungen) darstellten, wurde beispielhaft jeweils ein markantes Areal mit einem Pfeil markiert.

Es zeigte sich, dass ein Kalzifizierungsprozess durch die Zugabe von Beta-Glycerolphosphat zum Nährmedium bei den bovinen SMC induziert werden konnte. Sowohl an den Zellen als auch in der von ihnen gebildeten EZM zeigten sich nach der von-Kossa-Färbung massive Kalziumablagerungen. Jedoch wurde diese zweiwöchige Behandlung zu einem großen Prozentsatz von den Zellen nicht überlebt. So lösten sich größere abgestorbene Zellverbände immer wieder vom Boden des Wells ab. Diese Zelllinie wurde daher für die Thrombozytenadhäsionsversuche an kalzifizierten Zellen nicht verwendet (**Abb. 4**).

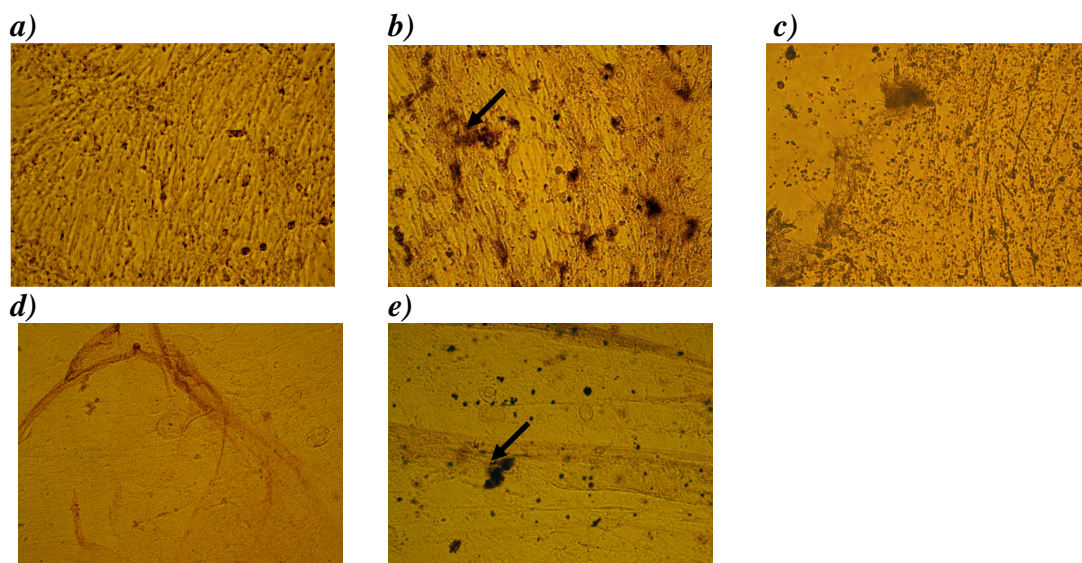


Abb. 4

Effekte von β -GP (10 μ M) auf den Kalzifizierungsprozess der bovinen SMC.

a) Kontrolle (Zellen) *b)* β -GP (Zellen) *c)* Ablösung der Zellen vom Boden des Wells
d) Kontrolle (EZM) *e)* β -GP (EZM)

Die zweite Zelllinie die, hinsichtlich des Kalzifizierungsprozesses, ausgetestet wurde, waren die Fibroblasten. In diesem Experiment zeigte sich ebenfalls eine deutliche Kalzifizierung dieser Zellen und der von ihnen gebildeten EZM durch den Zusatz von Beta-Glycerolphosphat. In der von-Kossa-Färbung zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle Ablagerungen von geschwärzten Hydroxyapatitkristallen (**Abb. 5**).

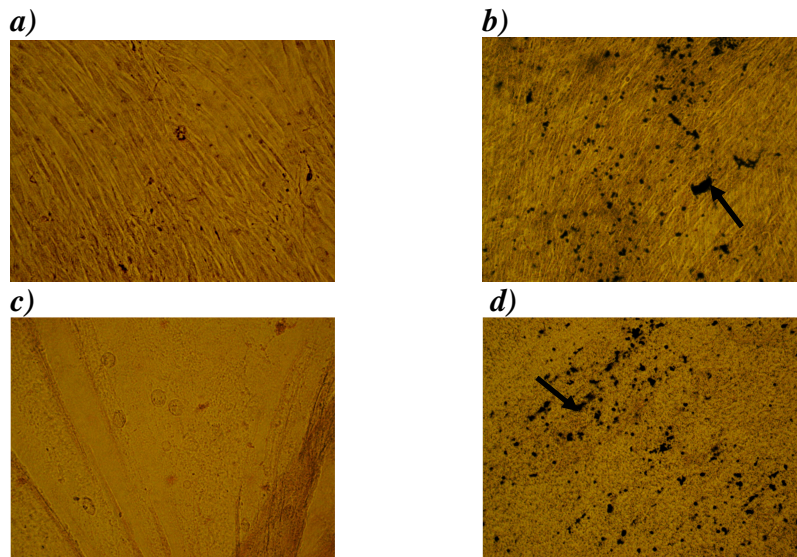


Abb. 5

Effekte von β -GP (10 μ M) auf den Kalzifizierungsprozess der Fibroblasten

a) Kontrolle (Zellen) *b)* β -GP (Zellen) *c)* Kontrolle (EZM) *d)* β -GP (EZM)

An der dritten Zelllinie, den Kontroll-SMC, konnte durch die zweiwöchige Beta-Glycerolphosphat Behandlung keine Kalzifizierung induziert werden. In der von-Kossa-Färbung war kein Unterschied zwischen Kontrolle und Beta-Glycerolphosphat behandelten Zellen zu erkennen (**Abb. 6**).

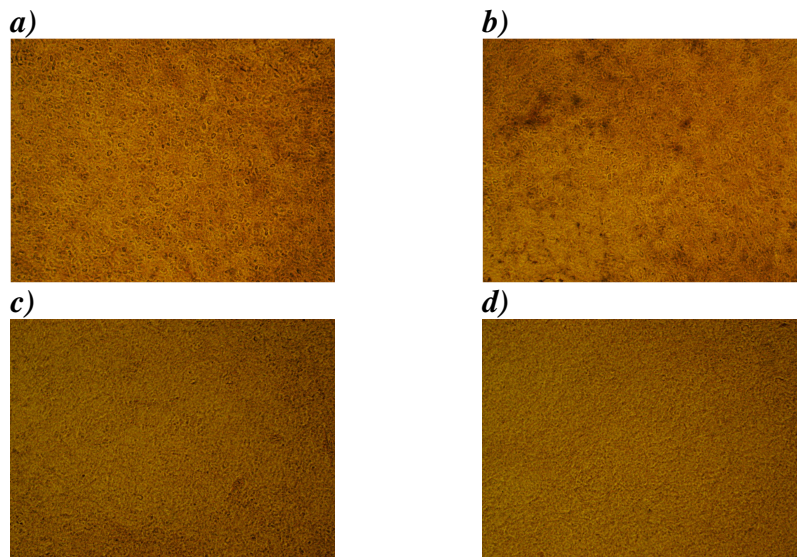


Abb. 6

Effekte von β -GP (10 μ M) auf den Kalzifizierungsprozess der Kontroll-SMC

a) Kontrolle (Zellen) *b)* β -GP (Zellen) *c)* Kontrolle (EZM) *d)* β -GP (EZM)

Nach diesen Pilotexperimenten wurden zwei Zelllinien für die Messung der Thrombozytenadhäsion verwendet. Die Fibroblasten wurden genommen, da diese durch den Zusatz von Beta-Glycerolphosphat zum Nährmedium einen im Vergleich zur Kontrolle deutlich gesteigerten Kalzifizierungsprozess zeigten.

Die Kontroll-SMC wurden trotz ausgebliebener Kalzifizierung für die statischen Adhäsionsversuche genommen, um zu überprüfen, ob mögliche Unterschiede in der Thrombozytenadhäsion auf die Behandlung mit Beta-Glycerolphosphat zurückzuführen sind, ohne dass sich Kalziumkristalle ausgebildet haben.

3.1.2 Quantifizierung des Kalziumgehaltes bei den Fibroblasten

Bei den Fibroblasten wurde eine genaue Quantifizierung des Kalziumgehaltes durchgeführt. Es zeigte sich bereits tendenziell eine Erhöhung des Kalziumgehaltes nach 9-10-tägiger Beta-Glycerolphosphat-Gabe zum Nährmedium. Signifikant wurde der Unterschied nach 15-17-tägiger Behandlung. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich im Well der mit Beta-Glycerolphosphat behandelten Zellen eine im Vergleich zur Kontrolle vierfach höheren Gehalt an Kalzium (**Abb. 7**).

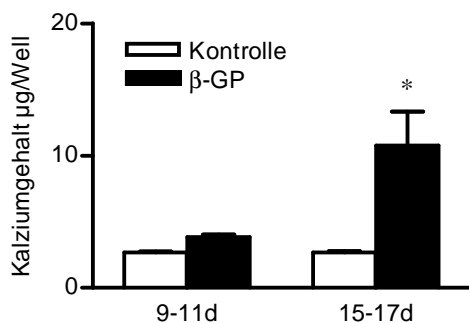


Abb. 7

Quantifizierung des Kalziumgehaltes in µg pro Well zu verschiedenen Zeitpunkten mit und ohne Zusatz von β-GP zum Nährmedium der Fibroblasten

Mittelwerte ± SEM, n = 5-10, *, p < 0,05 versus Kontrolle

3.2 Vorversuche zur Messung der Thrombozytenadhäsion

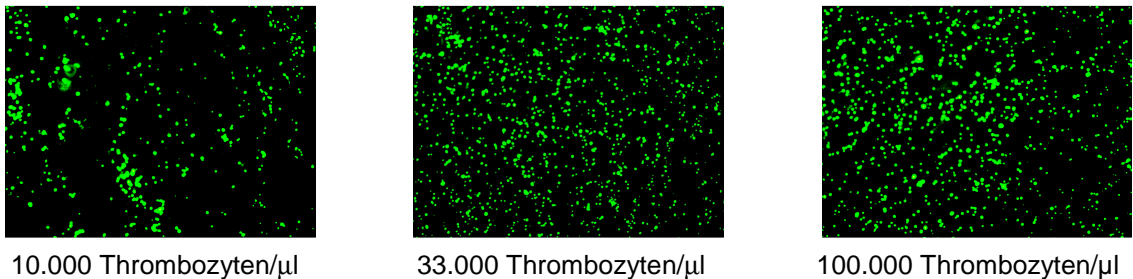
Alle in diesem und dem nächsten Kapitel gezeigten mikroskopischen Abbildungen wurden mit 200-facher Vergrößerung gemacht und mit einer Digitalkamera fotodokumentiert. Die Thrombozyten sind mit Calcein-AM beladen. Der Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM erscheint in den adhärenierten Thrombozyten grün. Es wurden jeweils repräsentative Aufnahmen für die einzelnen Experimente ausgewählt.

Die Fotodokumentation der Zellkernfärbung wurde mit einer 100-fachen Vergrößerung gemacht. Zur Quantifizierung der Zellzahl pro Well wurden die Zellen mit Bisbenzimid behandelt. Die Bisbenzimidfluoreszenz erscheint blau. Auch hier wurden jeweils repräsentative Aufnahmen für die einzelnen Experimente ausgewählt.

Zunächst wurden Pilotexperimente durchgeführt in denen unterschiedliche Konzentrationen von Thrombozyten verwendet wurden. Die Thrombozyten wurden wie in der oben genannten Methode gewonnen, ein Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM dazugegeben und auf die konfluenten Fibroblasten in die Wells gegeben. Die Konzentrationen betragen 10.000 Thrombozyten/µl, 33.000 Thrombozyten/µl und 100.000 Thrombozyten/µl. Insgesamt wurden von jeder Konzentration 250 µl in ein Well gegeben. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigte sich bereits ein Unterschied in der Menge an adhärenierten Thrombozyten bei den unterschiedlichen Konzentrationen von 10.000 Thrombozyten/µl, 33.000 Thrombozyten/µl und 100.000 Thrombozyten/µl.

Dieser bestätigte sich dann auch in einer dementsprechend erhöhten Gesamtfluoreszenz. Es zeigte sich, dass dieses Verfahren in der Lage ist, quantitative Unterschiede an adhärierten Thrombozyten aufgrund unterschiedlicher Mengen des von Thrombozyten freigesetzten Fluoreszenzfarbstoffes (Gesamtfluoreszenz) zu erkennen (**Abb. 8**).

a)



b)

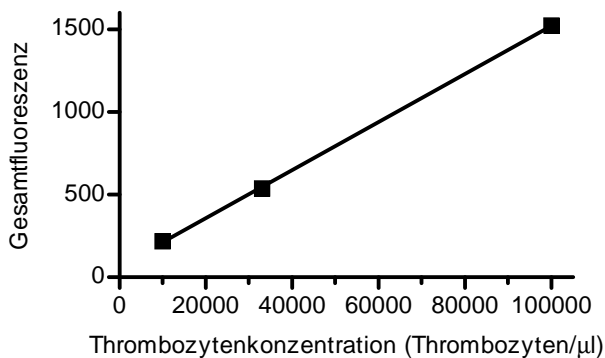


Abb. 8

Unterschiede in der Calceinfluoreszenz aus adhärierten Thrombozyten bei verschiedenen Thrombozytenkonzentrationen.

a) Mikroskopische Darstellung der mit Calcein-AM beladenen Thrombozyten (200-fache Vergrößerung). b) Quantitative Analyse der gemessenen Calceinfluoreszenz (lineare Regression, Mittelwerte aus zwei-fach Bestimmungen).

Nach Auswertung dieser Pilotexperimente wurden die weiteren Thrombozytenadhäsionsversuche mit der niedrigsten Konzentration (siehe **Abb. 8 a**) von 10.000 Thrombozyten/μl durchgeführt, da bei dieser Konzentration die objektive, mikroskopische Beurteilung über die Thrombozytenadhäsion am günstigsten erschien. Bei den höheren Konzentrationen von 33.000 Thrombozyten/μl bzw. 100.000 Thrombozyten/μl war die mikroskopische Beurteilung bezüglich quantitativer Unterschiede in der Thrombozytenadhäsion schwierig. Der Calcein-AM Fluoreszenzfarbstoff erschien bei den großen Mengen an adhärierten Thrombozyten sehr dominant und machte es von daher unmöglich, geringe quantitative Unterschiede in der Thrombozytenadhäsion mikroskopisch zu erkennen.

3.3 Einfluss der EZM-Kalzifizierung auf die Thrombozytenadhäsion

Die Adhäsionsversuche wurden aufgrund der zuvor dargestellten Ergebnisse bei der Quantifizierung des Kalziumgehaltes, zu drei verschiedenen Zeitpunkten während des Kalzifizierungsprozesses durchgeführt. Dies diente der zusätzlichen Überprüfung inwieweit möglicherweise unterschiedliche Thrombozytenadhäsionsmengen mit unterschiedlichen Mengen an Kalziumablagerungen korrelieren. Die Adhäsionsversuche wurden zu Beginn (0 Tage), nach 9-11-Tagen und nach Abschluss des Kalzifizierungsprozesses (15-17-Tag) durchgeführt.

3.3.1 Thrombozytenadhäsion an Beta-Glycerolphosphat behandelten Fibroblasten bzw. deren EZM

An den kalzifizierten Zellen zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine vermehrte Thrombozytenadhäsion. Die Tendenz zu einer vermehrten Adhäsion wurde bereits an den Zellen sichtbar, bei denen für 9-11 Tage eine Kalzifizierung durch Beta-Glycerolphosphat induziert wurde. Signifikant mit einer um 25% gesteigerten Thrombozytenadhäsion wurde der Unterschied nach 15-17-tägiger Kalzifizierung. Dies zeigte sich sowohl bei der mikroskopischen Betrachtung als auch bei der im Anschluss durchgeführten Bestimmung der Gesamtfluoreszenz. Die mit Bisbenzimid durchgeführte Zellkernfärbung zeigte, dass dieser signifikante Unterschied nicht auf unterschiedliche Zellzahlen in den Wells, aufgrund möglicher unterschiedlich starker Zellproliferationen während der Beta-Glycerolphosphat Behandlung, zurückzuführen ist (**Abb. 9**).

Die an der kalzifizierten EZM, nach vorheriger Ablösung der Zellen durch 25 mM NH_4OH , durchgeführten Adhäsionsversuchen zeigten keinen quantitativen Unterschied bezüglich der Menge an adhärenierten Thrombozyten im Vergleich zur Kontrolle (**Abb. 10**).

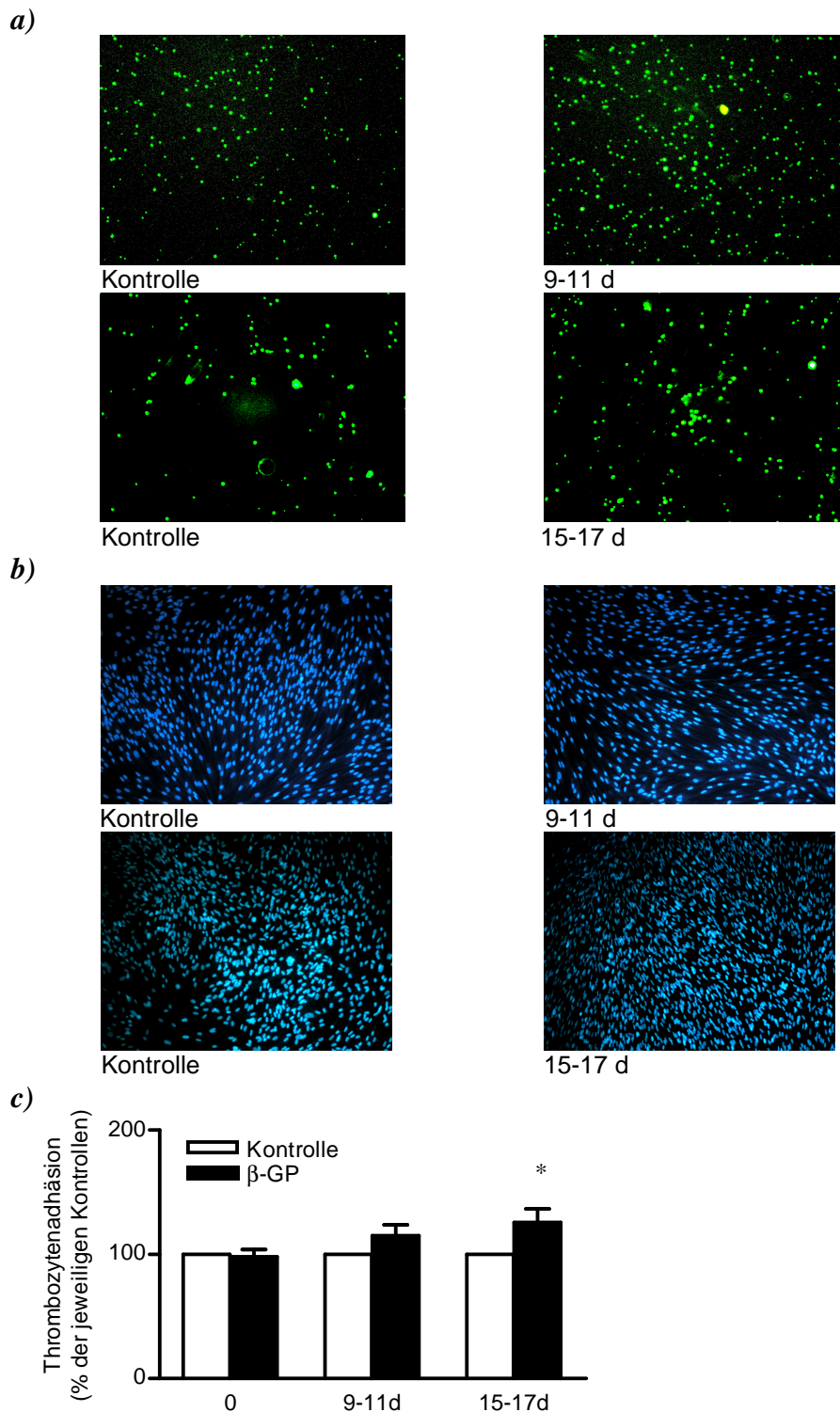


Abb. 9

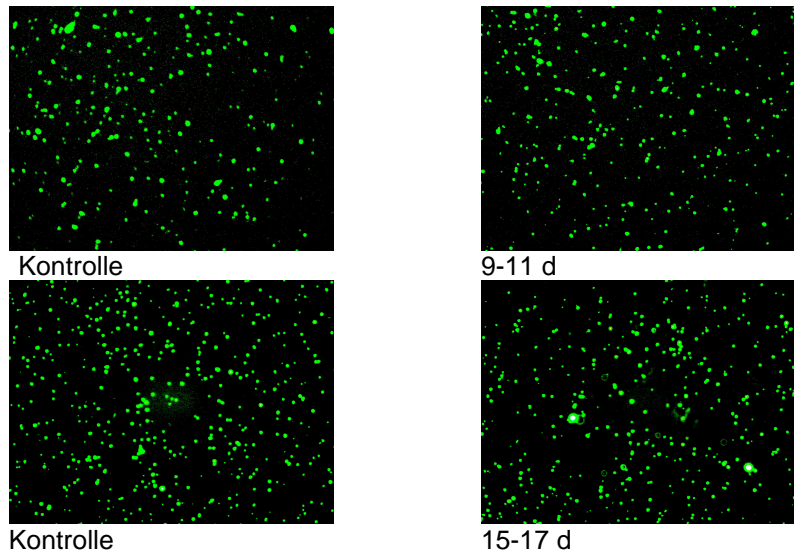
Effekte der β -GP-Behandlung der Fibroblasten auf die Adhäsion der mit Calcein-AM beladenen Thrombozyten.

a) Mikroskopische Darstellung der Thrombozytenadhäsion (200-fache Vergrößerung).

b) Mikroskopische Darstellung der mit Bisbenzimidazole beladenen Fibroblasten (100-fache Vergrößerung).

c) Quantitative Auswertung (Gesamtfluoreszenz der Kontrollen gleich 100%, Mittelwert \pm SEM, n= 6-7, *, p < 0,05 versus Kontrolle).

a)



b)

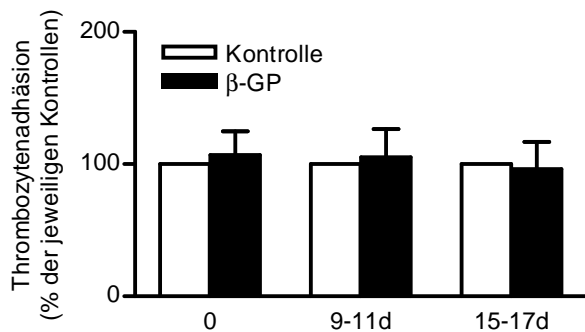


Abb. 10

Effekte der β -GP-Behandlung an der von Fibroblasten gebildeten EZM (nach Ablösung der Zellen mit 25 mM NH_4OH) auf die Adhäsion der mit Calcein-AM beladenen Thrombozyten.

a) Mikroskopische Darstellung der Thrombozytenadhäsion (200-fache Vergrößerung).

b) Quantitative Auswertung (Gesamtfluoreszenz der Kontrollen gleich 100%, Mittelwert \pm SEM, n= 6-7).

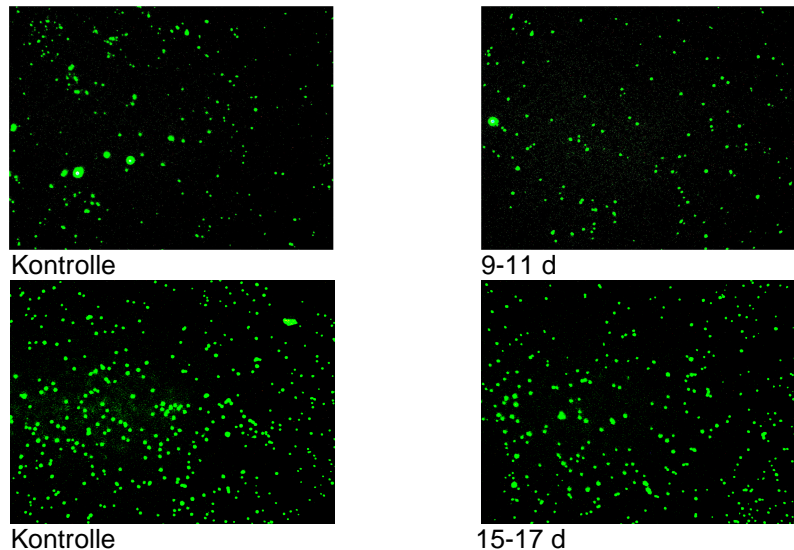
3.3.2 Thrombozytenadhäsion an Beta-Glycerolphosphat behandelten Kontroll-SMC bzw. deren EZM

Wie bereits zuvor beschrieben konnte keine Kalzifizierung der Kontroll-SMC durch Beta-Glycerolphosphat induziert werden (siehe Abb. 6).

Aufgrund dieser Eigenschaft der Kontroll-SMC wurde diese Zelllinie als Negativkontrolle für die statischen Adhäsionsversuche verwendet. An den Fibroblasten hatte sich durch die Behandlung mit Beta-Glycerolphosphat und der dadurch beschleunigten Ablagerung von Kalziumkristallen eine vermehrte Thrombozytenadhäsion gezeigt. Daher sollte jetzt überprüft werden, ob Unterschiede in der Thrombozytenadhäsion möglicherweise nur auf die Behandlung mit Beta-Glycerolphosphat zurückzuführen sind, ohne dass sich jedoch vermehrt Kalziumkristalle abgelagert hatten.

Bezüglich der Thrombozytenadhäsion an den Kontroll-SMC bzw. nach Ablösung der Zellen durch NH_4OH an deren EZM war kein Unterschied zwischen Kontrolle und Beta-Glycerolphosphat-Behandlung nachzuweisen. Weder bei der Messung der Gesamtfluoreszenz und damit indirekt in der Thrombozytenadhäsion noch bei der mikroskopischen Betrachtung fiel ein Unterschied auf (**Abb. 11 & 12**).

a)



b)

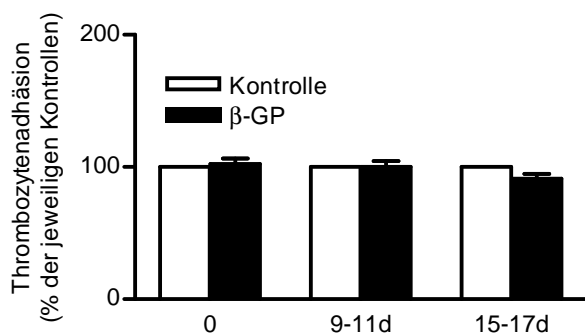


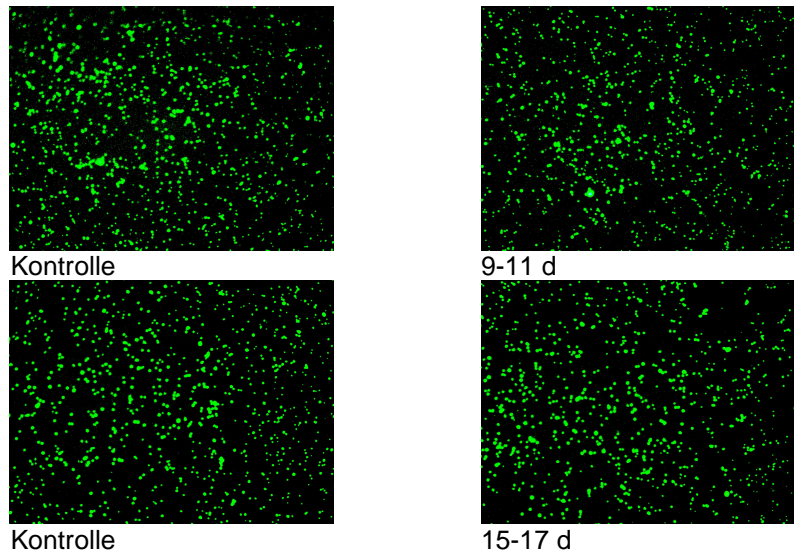
Abb. 11

Effekte der β -GP-Behandlung der Kontroll-SMC auf die Adhäsion der mit Calcein-AM beladenen Thrombozyten.

a) Mikroskopische Darstellung der Thrombozytenadhäsion (200-fache Vergrößerung).

b) Quantitative Auswertung (Gesamtfluoreszenz der Kontrollen gleich 100%, Mittelwert \pm SEM, n= 3-5)

a)



b)

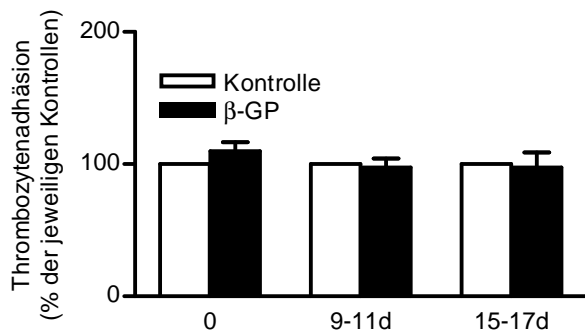


Abb.12

Effekte der β -GP-Behandlung an der von Kontroll-SMC gebildeten EZM (nach Ablösung der Zellen mit 25 mM NH_4OH) auf die Adhäsion der mit Calcein-AM beladenen Thrombozyten.

a) Mikroskopische Darstellung der Thrombozytenadhäsion (200-fache Vergrößerung).

b) Quantitative Auswertung (Gesamtfluoreszenz der Kontrollen gleich 100%, Mittelwert \pm SEM, n= 3-5).

3.4. Einfluss der Proteoglykanzusammensetzung auf die Thrombozytenadhäsion

3.4.1 Thrombozytenadhäsion an Kontroll-SMC, Biglykan-überexprimierenden SMC und Decorin-überexprimierenden SMC bzw. deren EZM

Es wurden Thrombozytenadhäsionsversuche an drei verschiedenen Zelllinien (glatte Muskelzellen aus der Aorta) durchgeführt, da glatte Muskelzellen auch *in vivo* zur Produktion von Proteoglykanen der EZM der Gefäße beitragen. Es wurde daher in diesen *in vitro*-Versuchen versucht bei der Auswahl der Zelllinien möglichst nah an die *in vivo*-Verhältnisse zu gelangen. Zwei dieser Zelllinien überexprimierten Proteoglykane. Die Decorin-überexprimierenden SMC überexprimierten Decorin und die Biglykan-überexprimierenden SMC überexprimierten Biglykan. Als Kontrolle

dienten normale Kontroll-SMC welche keine Proteoglykane überexprimierten. So war es möglich die Auswirkungen der unterschiedlichen Proteoglykanzusammensetzungen auf die Thrombozytenadhäsion zu testen.

Bei den Adhäsionsversuchen zeigte sich eine signifikant vermehrte Thrombozytenadhäsion an den Biglykan-überexprimierenden SMC bzw. den Decorin-überexprimierenden SMC.

Dies zeigte sich sowohl in der Bestimmung der Gesamtfluoreszenz als auch bei der mikroskopischen Betrachtung. Dieser signifikante Unterschied ist nicht auf unterschiedliche Zellzahlen in den Wells zurückzuführen. Dies zeigte sich bei der im Anschluss durchgeführten Zellkernfärbung (**Abb. 13**).

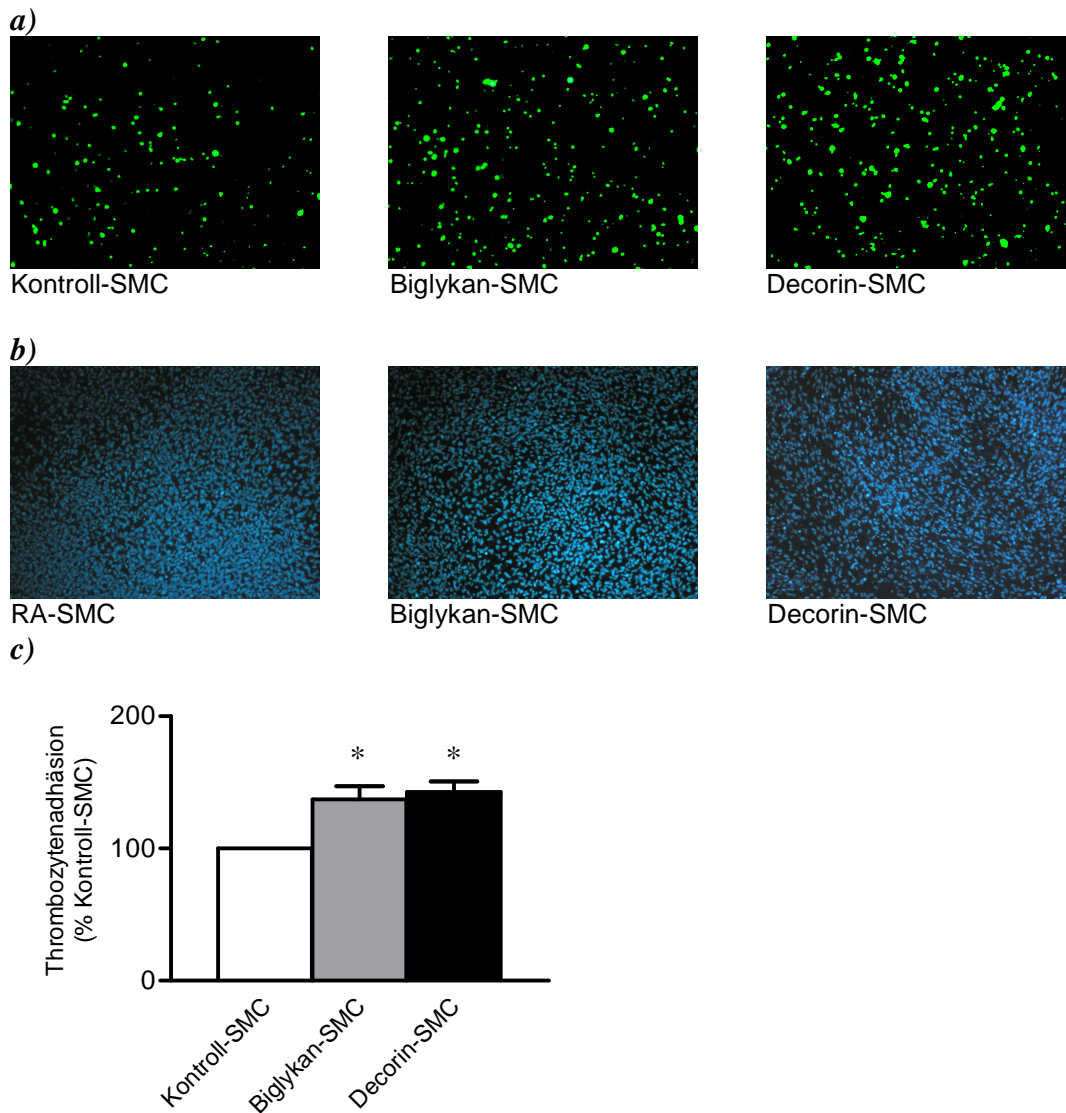


Abb. 13

Effekte einer Überexpression von Biglykan-SMC bzw. Decorin-SMC im Vergleich zur Kontroll-SMC in Bezug auf die Adhäsion der mit Calcein-AM beladenen Thrombozyten.

a) Mikroskopische Darstellung der Thrombozytenadhäsion (200-fache Vergrößerung).

b) Mikroskopische Darstellung der mit Bisbenzimidazole beladenen Zellen (100-fache Vergrößerung).

c) Quantitative Auswertung (Gesamtfluoreszenz der Kontrolle (Kontroll-SMC) gleich 100% Mittelwert \pm SEM, n=9-15, *, p < 0,05 versus Kontroll-SMC)

Nach der Ablösung der Zellen mit 25 mM NH₄OH lösten sich zusätzlich immer wieder größere Bereiche der EZM vom Boden des Wells ab. So war die Fläche an intakter EZM, an der die Thrombozyten adhären konnten, nicht in allen Wells gleich groß. Dies machte eine Bestimmung der Gesamtfluoreszenz bei diesen Experimenten ungenau. Daher wurde diese Methode nicht verwendet. Stattdessen wurden repräsentative Bereiche abfotografiert und die adhären Thrombozyten auf diesen Aufnahmen gezählt.

Bei den Adhäsionsversuchen an der von diesen drei Zelllinien gebildeten EZM zeigten sich Tendenzen in Richtung einer gesteigerten Adhäsion an der EZM der Biglykan-überexprimierenden SMC bzw. der Decorin-überexprimierenden SMC. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht gezeigt werden (**Abb. 14**).

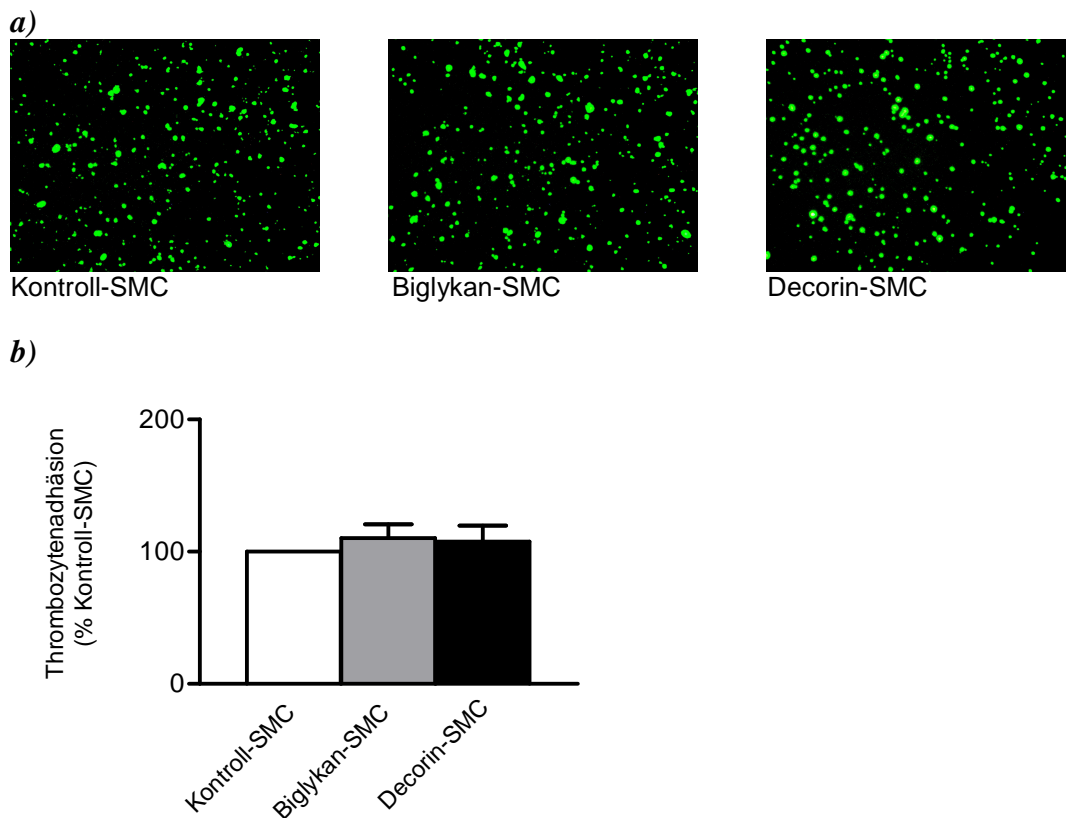


Abb. 14

Effekte der vermehrten Expression von Biglykan-SMC bzw. Decorin-SMC im Vergleich zur Kontroll-SMC nach Ablösung der Zellen mit 25 mM NH₄OH auf die Adhäsion der mit Calcein-AM beladenen Thrombozyten an der von ihnen gebildeten EZM.

a) Mikroskopische Darstellung der Thrombozytenadhäsion (200-fache Vergrößerung).

b) Quantitative Auswertung (Gesamtzahl der Thrombozyten von repräsentativen Bereichen der Kontrollen gleich 100%, Mittelwert ± SEM, n=8-9).

3.4.2 Thrombozytenadhäsion nach Abbau der Glykosaminoglykane durch Chondroitinase ABC

Da sich ein signifikant gesteigerter Unterschied bezüglich der Menge der Adhäsion an den Biglykan und Decorin überexprimierenden Zellen gezeigt hatte, wurden zusätzlich Thrombozytenadhäsionsversuche an Chondroitinase ABC-behandelten Zellen durchgeführt. Die Chondroitinase ABC ist ein Enzym, das in der Lage ist, einige GAG an Biglykan und Decorin abzubauen.

Die GAG wurden wie bereits zuvor beschrieben durch das radioaktive $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ markiert. Bei den im Anschluss mit Chondroitinase ABC-behandelten Zellen zeigte sich gegenüber der Kontrolle eine deutlich reduzierte Radioaktivität (> 20%). Dieser Rückgang der Radioaktivität entspricht dem enzymatischen Abbau der GAG durch Chondroitinase ABC. Zuvor wurde bereits erwähnt, dass die Chondroitinase ABC nicht alle GAG abbaut. Daher war ein stärkerer Abbau der GAG auch nicht zu erwarten. Allerdings werden die Dermatan- und Chondroitinsulfatseitenketten, welche die GAG an Decorin und Biglykan sind, von der Chondroitinase ABC abgespalten. Es konnte also in diesen Versuchen gezeigt werden, dass die Chondroitinase ABC in der Lage ist einige GAG an den Proteoglykanen der getesteten Zellen abzubauen (**Abb. 15**).

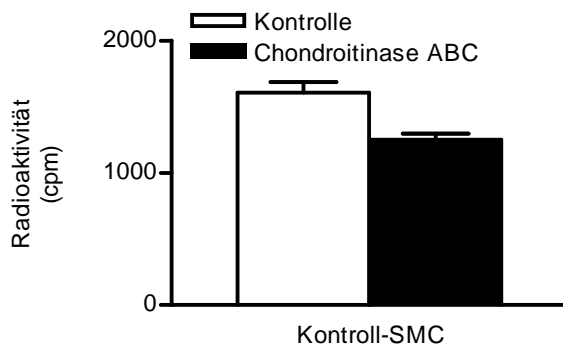
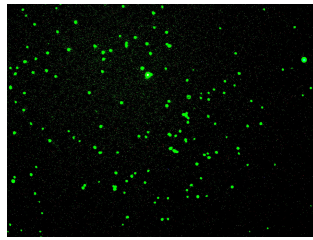


Abb. 15

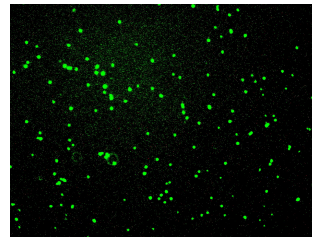
Effekte der Chondroitinase ABC auf die radioaktiv markierten GAG der Kontroll-SMC. (Radioaktivität gemessen in cpm = counts per minute, Mittelwert \pm SEM aus Zweifachbestimmung, n = 1)

Nach der Inkubation der Zellen (Kontroll-SMC, Biglykan-überexprimierende SMC, Decorin-überexprimierende SMC) mit Chondroitinase ABC wurden im Anschluss Adhäsionsversuche durchgeführt. Dabei zeigte sich bei den Kontroll-SMC und den Biglykan-überexprimierenden SMC durch die Chondroitinase ABC-Behandlung eine, im Vergleich zur Kontrolle die dieses Enzym nicht erhalten hatte, gesteigerte Adhäsion. Bei den Decorin-überexprimierenden SMC zeigte sich eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion der Adhäsion durch die Chondroitinase ABC-Behandlung (**Abb. 16**)

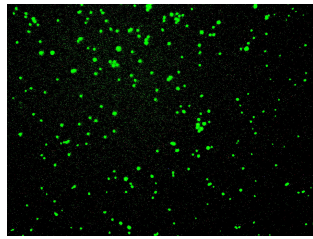
a)



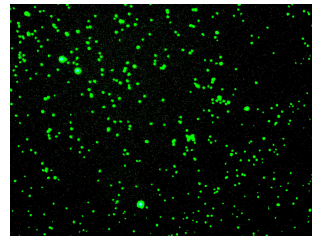
Kontroll-SMC ohne
Chondroitinase ABC



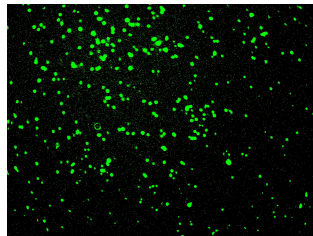
Kontroll-SMC mit
Chondroitinase ABC



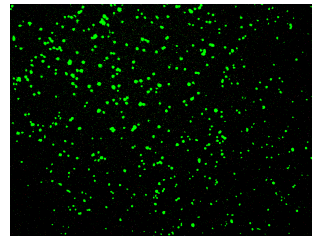
Biglykan-SMC ohne
Chondroitinase ABC



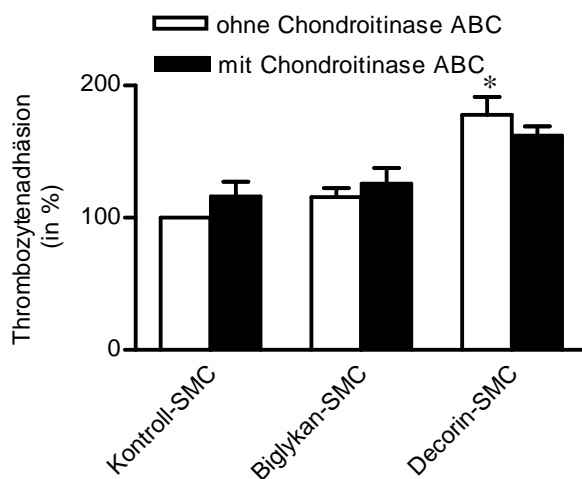
Biglykan-SMC mit
Chondroitinase ABC



Decorin-SMC ohne
Chondroitinase ABC



Decorin-SMC mit
Chondroitinase ABC



b)

Abb. 16

Effekte der Chondroitinase ABC-Behandlung der Kontroll-SMC, Biglykan-SMC und Decorin-SMC in Bezug auf die Adhäsion der mit Calcein-AM beladenen Thrombozyten.

a) Mikroskopische Darstellung der Thrombozytenadhäsion (200-fache Vergrößerung).

b) Quantitative Auswertung (Gesamtfluoreszenz der Kontrolle (Kontroll-SMC) gleich 100% Mittelwert \pm SEM, n=3-4, *, p < 0,05 versus Kontroll-SMC)

4. Diskussion

4.1 Kalzifizierungsprozesse und deren Auswirkungen auf die Thrombozytenadhäsion

In einigen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der Hyperphosphatämie und der vaskulären Kalzifizierung gezeigt werden (Jono et al., 2000a). Die beschriebenen Gefäßwandverkalkungen korrelieren positiv mit den bereits in der Einleitung beschriebenen Folgeerkrankungen wie z.B. dem Herzinfarkt (Itani et al., 2004). Dabei reichen erhöhte Phosphatspiegel, wie sie bei niereninsuffizienten Patienten vorkommen, aus um solche Gefäßwandverkalkungen zu verursachen (Floege & Ketteler, 2004).

In dieser Studie wurde dem Nährmedium der Zellen inorganisches Phosphat in Form von Beta-Glycerolphosphat zugesetzt. Es zeigte sich bei den bovinen SMC und vor allem bei den Fibroblasten eine deutliche Kalzifizierung, mit der Ausbildung von Hydroxyapatitkristallen an den Zellen und in der sie umgebenden EZM. Auch bei der Bestimmung des Gesamtkalziumgehaltes pro Well zeigte sich bei den Fibroblasten nach zweiwöchiger Behandlung eine signifikante Zunahme.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Kontroll-SMC, trotz Zugabe von inorganischem Phosphat zum Nährmedium und einer ebenfalls zweiwöchigen Behandlungsdauer, keine durch Beta-Glycerolphosphat induzierte Kalzifizierung. Wissenschaftliche Studien konnten bislang noch nicht klären warum es bei einigen Zelllinien zu einer induzierten Kalzifizierung bei erhöhtem Phosphatspiegel kommt während andere Zelllinien diese Veranlagung nicht zeigen.

Jono et al. (2000b) haben gezeigt, dass phosphoryliertes Osteopontin, welches besonders von glatten Muskelzellen in kalzifizierten Gefäßwänden exprimiert wird, in der Lage ist, eine Inhibition des Kalzifizierungsprozesses hervorzurufen, dies könnte möglicherweise eine Erklärung für die ausgebliebene Kalzifizierung sein.

Es stellte sich auch in den hier durchgeführten *in vitro*-Experimenten heraus, dass nicht alle Zellen auf den erhöhten Spiegel an inorganischem Phosphat mit einer signifikant gesteigerten Kalzifizierung ihrer Umgebung reagieren. Eine gewisse Disposition muss in der Zelllinie bereits vorhanden sein. Der Kalzifizierungsprozess wurde eindeutig durch den erhöhten Spiegel an inorganischem Phosphat induziert, da sich bei den Kontrollen keine Mineralisation in Form von Hydroxyapatitkristallen zeigte. Welche Faktoren dafür genau verantwortlich sind, ist noch nicht geklärt und bedarf von daher weiterer wissenschaftlicher Studien.

Die in dieser Studie durch *in vitro*-Experimente bezüglich eines Kalzifizierungsprozesses getesteten Zelllinien, humanen Fibroblasten und glatten Muskelzellen (bovine SMC) wurden ausgewählt, da sie repräsentative Zellen der Gefäßwand darstellen.

Glatte Muskelzellen sind Hauptbestandteil der Gefäßwände und obwohl die genauen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind, nimmt man an dass sie *in vivo* unter bestimmten Bedingungen (Hyperphosphatämie) zu Wandverkalkungen beitragen (Trion & van der Laarse, 2004). In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass zumindest *in vitro* auch humane Fibroblasten auf den erhöhten Phosphatspiegel mit einem induzierten Kalzifizierungsprozess reagieren.

Giachelli (2003) konnte in ihren *in vitro*-Experimenten ebenfalls eine deutlich induzierte Kalzifizierung ihrer glatten Muskelzellen, aus Gefäßen, durch den erhöhten Spiegel an inorganischem Phosphat zeigen. Dabei beschrieb Giachelli (2003) bei ihren prädisponierten glatten Muskelzellen eine phänotypische Umwandlung von glatten Muskelzellen zu osteoblastenähnlichen Zellen. Welche genaue Prädisposition für die

Umwandlung der glatten Muskelzellen bei erhöhtem Spiegel an inorganischem Phosphat verantwortlich ist, ist noch nicht geklärt.

Sowohl bei den zuvor bereits erwähnten niereninsuffizienten Patienten als auch bei an Diabetes mellitus erkrankten Patienten beobachtet man häufig ektope Kalzifizierungsprozesse in Gefäßen, die durch eine Hyperphosphatämie bedingt sind (Block, 2000a; Lehto et al., 1996). Die daraus entstehende Gefäßwandversteifung erschwert die optimale Anpassung des Gefäßtonus an den Blutdruck (Guerin et al., 2000, London et al., 2004). Ebenfalls kommen Gefäßdissektionen signifikant häufiger an verkalkten Stellen der Gefäße vor (Fitzgerald et al., 1992). So ist es nicht verwunderlich, dass ektope Kalzifizierungsprozesse in Gefäßwänden mit einer erhöhten Inzidenz an arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen, kardiovaskulären Erkrankungen und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit einhergehen (Block & Port, 2000b, Sangiorgi et al., 1998, Niskanen et al., 1990).

Caldwell et al. (2003) konnten eine erhöhte Rate an Gefäßwandverkalkung im Anschluss an eine Gefäßdilatation mit Stentimplantation, im Vergleich zu unbehandelten Gefäßabschnitten, zeigen. Solche therapeutischen Interventionen werden in der Zukunft sicherlich noch zunehmen, und damit womöglich auch die Anzahl an Patienten mit Gefäßwandverkalkungen.

Gerade die ektope Kalzifizierungsprozesse in arteriellen Gefäßwänden korrelieren mit arteriosklerotischen Ablagerungen (Sangiorgi et al., 1998).

In atherosklerotischen Gefäßabschnitten kommen Thrombozyten, durch Endothelschäden, vermehrt mit der subendothelial gelegenen EZM, gebildet von Fibroblasten bzw. glatten Muskelzellen, in Kontakt.

Dem subendothelialen Gewebe und insbesondere der EZM kommt eine entscheidende Rolle sowohl beim Aufbau des Gefäßes als auch bei der bereits in der Einleitung beschriebenen Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten zu.

Eine Beteiligung von aktivierten Thrombozyten an der Pathogenese und Progression verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen (koronare Herzkrankheit, Atherosklerose) ist unumstritten (Gawaz, 1999). So sezernieren aktivierte Thrombozyten vasokonstriktorische Substanzen wie Serotonin und TxA_2 und sind an entzündlichen Prozessen der Gefäßwand beteiligt. Die Thrombozyten nehmen bei der Entstehung und Progression atherosklerotischer Plaques sowie in der Pathogenese akuter Koronarsyndrome eine zentrale Stellung ein.

In dieser Studie wurden aufgrund dieser Erkenntnisse *in vitro*-Thrombozytenadhäsionsversuche an kalzifizierten humanen Fibroblasten durchgeführt. Es sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob der zuvor induzierte Kalzifizierungsprozess an Zellen und deren EZM Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion hat.

Dabei stellte sich eine signifikant erhöhte Thrombozytenadhäsion an den zuvor durch Beta-Glycerolphosphat kalzifizierten Fibroblasten heraus.

In vivo korrelieren Gefäßwandverkalkungen positiv mit der Ausbildung von atherosklerotischen Plaques (Rumberger et al., 1995). Atherosklerotische Plaques sind zum Teil aus Bindegewebe, welches durch eine Proliferation von Fibroblasten bedingt ist, aufgebaut. Im Anschluss wurde an die jeweiligen Adhäsionsexperimente eine Zellkernfärbung durchgeführt. Dies diente der Überprüfung, ob die Beta-Glycerolphosphat-Behandlung über einen Zeitraum von zwei Wochen, möglicherweise über Wachstumsfaktoren eine vermehrte Zellproliferation induziert hat. In der durchgeführten Zellkernfärbung zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle.

Daher scheidet eine unterschiedliche Fibroblastenproliferation als Ursache für die hier *in vitro* festgestellten Unterschiede der Thrombozytenadhäsionsmenge aus.

Vor jedem Adhäsionsversuch wurde geprüft, ob bzw. wie stark ein Kalzifizierungsprozess im Laufe der zweiwöchigen Beta-Glycerolphosphat-Behandlung induziert werden konnte. Die hier durchgeführte quantitative Bestimmung ergab, dass der Kalziumgehalt nach 15-17-tägiger Beta-Glycerolphosphat-Behandlung signifikant zunahm. Ein leicht induzierter Kalzifizierungsprozess war bereits nach 9-11-tägiger Behandlung zu erkennen, nach 15-17-tägiger Behandlung war der Kalziumgehalt ca. vierfach höher als in der Kontrolle.

Auch bei den zuvor beschriebenen Thrombozytenadhäsionsversuchen zeigte sich nach einer 9-11-tägigen Beta-Glycerolphosphat-Behandlung bereits eine Zunahme der Adhäsionsmenge von 15%. Signifikant, mit einer Erhöhung der Thrombozytenadhäsionsmenge um 25%, wurde der Unterschied nach 15-17-tägiger Behandlung.

Die Resultate dieser beiden Versuchsreihen lassen vermuten, dass die Menge an Kalziumablagerungen positiv mit der vermehrten Thrombozytenadhäsion korreliert.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden zusätzliche Adhäsionsversuche an der Kontroll-SMC Zelllinie durchgeführt. An den Kontroll-SMC konnte wie bereits zuvor beschrieben, kein Kalzifizierungsprozess durch die Beta-Glycerolphosphat-Behandlung induziert werden. Die durchgeführten Thrombozytenadhäsionsversuche zeigten keinen Unterschied bezüglich der Menge an adhärenierten Thrombozyten im Vergleich zur Kontrolle.

Die Resultate dieser *in vitro*-Versuchsreihe zeigen, dass die Beta-Glycerolphosphat-Behandlung (erhöhter Spiegel an inorganischem Phosphat) alleine noch nicht zu einer vermehrten Thrombozytenadhäsion führt. Nur bei den für einen Kalzifizierungsprozess prädisponierten Zellen, bei denen durch den erhöhten Phosphat Spiegel eine Kalzifizierung in Form von Ablagerungen von Hydroxyapatitkristallen in der EZM induziert werden konnte, zeigen eine gesteigerte Thrombozytenadhäsion.

Zusätzliche Adhäsionsversuche wurden an reiner EZM nach Ablösung der Zellen (Behandlung mit 25 mM NH₄OH) durchgeführt. Dabei zeigte sich sowohl bei der kalzifizierten EZM der Fibroblasten als auch bei der EZM der mit Beta-Glycerolphosphat behandelten Kontroll-SMC kein Unterschied in der Adhäsionsmenge im Vergleich zur Kontrolle.

Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte in der Behandlung bzw. Ablösung der Zellen durch NH₄OH zu finden sein, da durch die Ablösung der Zellen mit Sicherheit ebenfalls ein Teil der EZM entfernt wurde. Zusätzlich ist noch nicht bekannt ob NH₄OH die Kalziumablagerungen strukturell verändert.

Die Resultate dieser Versuchsreihe können von daher nicht unbedingt im Widerspruch mit der zuvor gezeigten vermehrten Thrombozytenadhäsion an kalzifizierten Fibroblasten gesehen werden.

In dieser Studie konnte durch *in vitro*-Experimente gezeigt werden, dass durch den erhöhten Spiegel an inorganischem Phosphat ein Kalzifizierungsprozess bei den hier benutzten Fibroblasten ausgelöst wurde. Zusätzlich stellte sich als neue Erkenntnis heraus, dass dieser Kalzifizierungsprozess eine vermehrte Thrombozytenadhäsion bewirkt hat.

Der genaue Mechanismus der zu der zuvor beschriebenen vermehrten Thrombozytenadhäsion geführt hat, bedarf weiterer Studien. An dieser Stelle sollten zwei mögliche Erklärungen kurz erörtert werden. Die erste mögliche Erklärung liegt in der phänotypischen Umwandlung von Zellen während des Kalzifizierungsprozesses (Giachelli, 2003). Bedingt durch die Umwandlung des Phänotyps der Zellen kann es zu einer veränderten Expressierung der EZM-Komponenten und daraus resultierend zu einer veränderten strukturellen Zusammensetzung der EZM kommen. Auch für atherosklerotische Gefäßabschnitte ist bereits bekannt, dass es zu einer veränderten

Zusammensetzung der EZM kommt (Gawaz, 1999). Einige Komponenten der EZM (z.B. Kollagen) haben auf der Oberfläche Adhäsionsproteine. Diese führen durch den Kontakt mit Thrombozyten zu deren Adhäsion und Aktivierung. Daher wäre eine durch den Kalzifizierungsprozess unterschiedlich zusammengesetzte EZM durchaus eine Erklärung für die vermehrte Thrombozytenadhäsion. Die zweite mögliche Erklärung wäre, dass die durch den Kalzifizierungsprozess entstandenen Hydroxyapatitkristalle selbst eine vermehrte Adhäsion bewirken. Die momentane Studienlage kann aktuell keine eindeutige Erklärung für die in dieser Studie beobachtete vermehrte Thrombozytenadhäsion an kalzifizierten Zellen geben, es bedarf daher weiterer Studien. Die zuvor bereits erwähnten Erkrankungen, welche mit einem signifikant erhöhten Risiko an ektopen Kalzifizierungsprozessen in arteriellen Gefäßen einhergehen, sind in der heutigen Gesellschaft keine Seltenheit. Daher wäre eine genauere Klärung der Prozesse, die zu der hier beschriebenen vermehrten Thrombozytenadhäsion geführt haben, von Interesse.

4.2 Decorin und Biglykan, zwei wichtige Proteoglykane der EZM

4.2.1 Die Proteoglykane Biglykan und Decorin nehmen nicht nur modulierend Einfluss auf das sie umgebende Gewebe, sondern beeinflussen zusätzlich die Thrombozytenadhäsion

Atherosklerotische Gefäßabschnitte in denen es zu Endothelschädigungen gekommen ist stellen einen erheblichen Risikofaktor für eine dort induzierte Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung dar. Die Thrombozytenadhäsion wird induziert über subendotheliale Adhäsionsproteine (z.B. vWF) (Gawaz, 1999). Das Endothel fungiert als Schutzschicht zwischen Blutstrom und subendothelialer EZM. Daher wirkt es, in Bezug auf eine Thrombenbildung im Gefäß, protektiv (Badimon et al., 1992).

Studien haben gezeigt, dass dem Kollagen als einem der festen Bestandteile der subendothelialen EZM über sein oberflächlich gelegenes GPVI eine besondere Rolle in Bezug auf eine induzierte Thrombozytenaktivierung zukommt (Nieswandt et al., 2001). In dieser Studie wurde der Fokus auf zwei Proteoglykane Decorin und Biglykan gelegt. Es sollte getestet werden, inwieweit eine Überexpression dieser Proteoglykane Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion nehmen kann.

Bekannt ist, dass dem Decorin wichtige Aufgaben bei der Zusammensetzung der EZM zukommen. So interagiert dieses SLRP mit Kollagen und sorgt für eine koordinierte Fibrillogenese (Weber et al., 1996). Ebenfalls konnten sowohl Fischer et al. (2001) als auch Yamaguchi et al. (1990) zeigen, dass Decorin mit TGF- β interagiert und so in die Zellproliferation glatter Muskelzellen eingreift. Dem Decorin kommen daher mannigfaltige Aufgaben in der Gestaltung der EZM zu.

Inflammatorische Reaktionen der Gefäßwände werden zum Teil für die Entstehung von Atherosklerose verantwortlich gemacht (Ross, 1999) und gehen gehäuft mit einer gesteigerten Angiogenese einher. Die Expression von Decorin während einer inflammatorisch bedingten Angiogenese ist erhöht (Nelimarkka et al., 2001; Gutierrez et al., 1997). Welche Rolle dem Decorin dabei genau zukommt ist noch nicht geklärt. Zusammenhänge zwischen einer Überexpression von Decorin und der Atherosklerose werden daher gesucht.

Wie bereits zuvor erwähnt, ist eine Beteiligung von aktivierten Thrombozyten an der Atherosklerose unumstritten.

Aufgrund der Studienlage wurden in dieser Studie *in vitro*-Thrombozytenadhäsionsversuche an Decorin-überexprimierenden SMC durchgeführt. Es stellte sich eine signifikante, um 42% erhöhte, Thrombozytenadhäsion an den Decorin-überexprimierenden SMC im Vergleich zur Kontrolle heraus.

Zuvor wurde bereits erwähnt, dass Decorin Einfluss auf die Zellproliferation nimmt. Daher wurde im Anschluss an die Adhäsionsversuche eine Zellkernfärbung durchgeführt. Bei der durchgeführten Zellkernfärbung zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Menge an glatten Muskelzellen im Vergleich zur Kontrolle. Daher scheidet in den hier durchgeführten *in vitro*-Adhäsionsexperimenten eine unterschiedliche Zellzahl als Grund für die vermehrte Thrombozytenadhäsion wohl aus. Zusätzlich wurden Thrombozytenadhäsionsversuche an der EZM nach Ablösung der Zellen durchgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, aber dennoch Tendenzen zugunsten einer vermehrten Adhäsion an der von Decorin-überexprimierenden Zellen gebildeten EZM. So kam zu einer im Durchschnitt um 7% erhöhten Thrombozytenadhäsion an den Decorin- überexprimierenden SMC.

Durchgängig zeigten sich erhöhte Mengen an adhärirten Thrombozyten bei den Versuchen an der reinen EZM (nach Ablösung der Zellen) im Vergleich zu den Adhäsionsversuchen, die an Zellen durchgeführt wurden.

Diese Beobachtung liefert ein weiteres Indiz für die derzeitige Studienlage, wonach die EZM bzw. deren Zusammensetzung wesentlich für eine beschleunigte Thrombozytenadhäsion und Aktivierung verantwortlich gemacht wird. So erscheint es in den hier gezeigten *in vitro*-Experimenten als ob die glatten Muskelzellen, ähnlich wie das mehrfach erwähnte Endothel *in vivo*, durch Abdeckung zumindest eines kleinen Bereiches der EZM, zu einer verminderten Thrombozytenadhäsion führt.

Der genaue Wirkmechanismus der zu der in dieser Studie gezeigten signifikant erhöhten Thrombozytenadhäsion an den Dec-RA-SMC geführt hat, ist noch nicht abschließend geklärt. Mögliche Erklärungen für die erheblich gesteigerte Thrombozytenadhäsion sollen hier diskutiert werden. Guidetti et al. (2002) haben einen Effekt von Decorin auf die Thrombozytenadhäsion beschrieben. In ihrer Studie konnten sie zeigen, dass der Proteinkern des Decorin mit dem Membranglykoprotein $\alpha_2\beta_1$ auf der Thrombozytenmembran interagiert und so zu dessen Adhäsion führt. Außerdem zeigten Guidetti et al. (2002), dass Decorin über eine Thyrosinkinase in der Lage ist Thrombozyten zu aktivieren. Ob dies jedoch die alleinige Erklärung für die hier festgestellte erheblich induzierte Thrombozytenadhäsion ist, bleibt abzuwarten.

Decorin nimmt *in vivo*, wie zuvor erwähnt, Einfluss auf die Fibrillogenese von Kollagen, die Zellproliferation und auf viele weitere Stoffwechselfvorgänge in der EZM. Bislang ist noch nicht geklärt inwieweit die Überexpression von Decorin in dieser Studie Auswirkungen auf den Aufbau der EZM hatte. Möglicherweise ist die vermehrte Thrombozytenadhäsion in einer veränderten Zusammensetzung der EZM begründet.

Es bedarf daher weiterer Studien zur Klärung der hier gezeigten erheblich vermehrten Thrombozytenadhäsion. Festzuhalten bleibt aus dieser Studie das Decorin einen gewichtigen Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion zu haben scheint.

Biglykan ist strukturell dem Decorin sehr ähnlich. Der wesentliche Unterschied zum Decorin besteht darin, dass Biglykan zwei GAG an den Proteinkern über kovalente Bindungen angehängt hat.

Auch Biglykan interagiert mit Kollagen und beeinflusst so den Aufbau der EZM (Schönherr et al. 1995). In atherosklerotisch veränderten Gefäßabschnitten werden in den Gefäßwänden bzw. den Plaques vermehrt Biglykanablagerungen verbunden mit den Apolipoproteinen B und E gefunden (Riessen et al., 1994; O'Brien et al., 2003). Kunjathoor et al. (2001) konnten zeigen, dass Biglykan über das Apolipoprotein B in der Lage ist LDL zu binden und dadurch in die Gefäßwand einzulagern.

Lipideinlagerungen in den Gefäßen sind der Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose.

Da aus den zuvor genannten Studien anzunehmen ist, dass Biglykan eine wichtige Rolle in der Entstehung der Atherosklerose einnimmt, soll in dieser Studie überprüft werden, ob Biglykan zusätzlich die Thrombozytenadhäsion beeinflusst. Es wurden daher wie zuvor beim Decorin beschrieben, *in vitro*-Thrombozytenadhäsionsexperimente durchgeführt.

Es zeigte sich auch hier eine signifikant um 37% gesteigerte Thrombozytenadhäsion an den Biglykan überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontroll-SMC heraus. Aufgrund des zuvor beschriebenen Einflusses von Decorin auf die Zellproliferation wurde auch hier die ungefähre Zellzahl bestimmt. Zellzahlunterschiede der überexprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle waren nicht zu erkennen. In der hier gezeigten Studie scheiden unterschiedliche Zellzahlen bedingt durch verschiedene Zellproliferationsraten als Grund für die erheblich gesteigerte Thrombozytenadhäsion aus.

Die Adhäsionsexperimente die nach Ablösung der Zellen an der EZM durchgeführt wurden, zeigten ähnlich wie beim Decorin eine Tendenz in Richtung einer gesteigerten Thrombozytenadhäsion an Biglykan-überexprimierenden SMC. Es konnte eine Zunahme der Thrombozytenadhäsion von 10% gezeigt werden, die jedoch statistisch noch nicht signifikant war.

Bislang liegen keine Studien vor, die eine vermehrte Thrombozytenadhäsion ausgelöst durch eine Überexpression von Biglykan in der EZM beschreiben. Der genaue Wirkmechanismus der zu dieser gesteigerten Thrombozytenadhäsion geführt hat, ist noch nicht bekannt. Da Biglykan einen ähnlich modulierenden Einfluss auf den Aufbau der EZM hat wie Decorin, ist auch hier zu vermuten, dass es durch die Überexpression des Biglykans zu Veränderungen im Aufbau der EZM gekommen ist, welcher zu der signifikant induzierten Thrombozytenadhäsion geführt hat.

Es bedarf zur genauen Klärung bezüglich des Einflusses von Biglykan auf die Thrombozytenadhäsion weiterer Studien.

In den hier durchgeführten *in vitro*-Experimenten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Überexpression dieser beiden Proteoglykane zu einer gesteigerten Thrombozytenadhäsion geführt hat. Ob die vermehrte Thrombozytenadhäsion allerdings alleine durch den direkten Kontakt der Thrombozyten mit dem Proteinkern von Decorin bzw. Biglykan induziert wurde ist fraglich. Vergleicht man die Thrombozytenadhäsion nur zwischen beiden überexprimierenden Zelllinien so fällt auf, dass es an den Decorin-überexprimierenden SMC im Vergleich zu den Biglykan-überexprimierenden SMC zu einer um 5% erhöhten Adhäsion gekommen ist. Es bleibt zu vermuten, dass dieser in dem hier durchgeführten Experiment nicht signifikante Unterschied auf den adhäsionsfördernden Einfluss des Proteinkerns von Decorin zurückzuführen ist. Allerdings sind sich Decorin und Biglykan im strukturellen Aufbau des Proteinkerns sehr ähnlich. Eine weitere wahrscheinlichere Vermutung wäre, dass beide Proteinkerne adhäsionsfördernde Einflüsse auf Thrombozyten haben, es allerdings durch die zwei GAG die an den Proteinkern von Biglykan angehängt sind, zu weniger Kontakt zwischen Thrombozyten und adhäsionsförderndem Proteinkern als beim Decorin (eine GAG) gekommen ist.

Allerdings sind die Unterschiede in der Thrombozytenadhäsion zwischen den beiden überexprimierenden Zelllinien gering im Vergleich zu den Unterschieden, die zwischen beiden überexprimierenden Zelllinien und der Kontrollzelllinie festgestellt wurden.

Aufgrund der Erkenntnisse bislang durchgeführter Studien ist es wahrscheinlicher, dass es durch die Überexpression der Proteoglykane zu einer veränderten EZM gekommen ist, die wiederum ursächlich für eine verstärkt induzierte Thrombozytenadhäsion ist.

Der genaue Wirkmechanismus der zu der gesteigerten Thrombozytenadhäsion geführt hat, bleibt offen und bedarf weiterer Studien. Jedoch werden die Erkenntnisse dieser Studie wohl beide Proteoglykane zukünftig vermehrt in den Fokus von Studien bezüglich einer gesteigerten Thrombusbildung in atherosklerotischen Gefäßabschnitten bringen.

4.2.2 Die Glykosaminoglykane an den Proteoglykanen Decorin und Biglykan tragen wahrscheinlich nicht direkt durch den Kontakt mit Thrombozyten zu deren vermehrten Adhäsion bei

In der Einleitung wurde bereits erwähnt, dass an den Proteinkern der Proteoglykane Decorin und Biglykan Chondroitin/Dermatan-GAG angehängt sind (Choi et al., 1989). An den Dermatansulfatseitenketten kommt es post-translational zu modifizierenden Veränderungen in ihrem Aufbau (Silbert, 1996). Dadurch sind sie an die jeweilige Umgebung optimal angepasst. Besonders der prozentuale Anteil an Iduronsäure in der Dermatansulfatseitenkette variiert in verschiedenen Geweben. So beträgt der Anteil an Iduronsäure in den Dermatansulfatseitenketten in der Haut ca. 80% während der Anteil im Knorpelgewebe nur 35% beträgt (Choi et al., 1989).

Dermatansulfatseitenketten werden vermehrt in atherosklerotischen Ablagerungen gefunden (Wagner, 1985). Sowohl für Decorin als auch für Biglykan konnte gezeigt werden, dass die angehängten Dermatansulfatseitenketten mit Heparin-Cofaktor II interagieren. Durch diese Interaktion kommt es zur Aktivierung des Heparin-Cofaktors II und somit zu einer Inhibition von Thrombin (Tollefsen et al., 1983). Dermatansulfatseitenketten greifen über diesen Mechanismus inhibierend in das Gerinnungssystem ein.

Allerdings konnten Shirk et al. (2000) in ihrer Studie zeigen, dass es in atherosklerotischen Ablagerungen zu strukturellen Veränderungen bezüglich des Aufbaus der Dermatansulfatseitenketten von Biglykan kommt. Dabei nimmt besonders der Anteil an Iduronsäure ab. Diese strukturellen Veränderungen bewirken eine Reduktion der Aktivierung von Heparin-Cofaktor II und folglich kommt es auch zu einer verringerten Inhibition von Thrombin in diesen Bereichen des Gefäßsystems. Die GAG (z.B. Dermatansulfat) an den Proteoglykanen scheinen demnach zumindest in gesunden Gefäßen einen eher protektiven Effekt in Bezug auf die Thrombenbildung zu haben, den sie jedoch in atherosklerotischen Gefäßabschnitten verlieren. Guidetti et al. (2002) beschrieben den Proteinkern und nicht die GAG von Decorin als aktivierenden Faktor für Thrombozyten. Der genaue Einfluss der GAG am Proteinkern der Proteoglykane in Bezug auf ihre Umgebung ist noch nicht genau geklärt. Allerdings scheint der strukturelle Aufbau der GAG an den Proteoglykanen Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion zu haben.

Aufgrund der zuvor gezeigten, in dieser Studie festgestellten Auswirkungen von Decorin und Biglykan auf die Thrombozytenadhäsion, wurden nun Adhäsionsversuche an Zellen durchgeführt, deren GAG abgebaut worden waren. Dies sollte Aufschluss darüber liefern, inwiefern die GAG Einfluss auf die gesteigerte Thrombozytenadhäsion genommen hatten.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass es durch die Behandlung der Zellen mit Chondroitinase ABC zu einem Abbau der GAG gekommen ist. Insgesamt kam es durch die Chondroitinase ABC zu einem Abbau der GAG um 22%.

Bei den im Anschluss an den Abbau der GAG durchgeführten Thrombozytenadhäsionsversuchen zeigte sich an den Kontroll-SMC und an den Biglykan-überexprimierenden SMC eine Zunahme der Thrombozytenadhäsion von 16%

bzw. 10% im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. An den Decorin-überexprimierenden SMC zeigte sich nach Abspaltung der GAG eine Reduktion der Thrombozytenadhäsion von 15%. Insgesamt waren die Unterschiede der Thrombozytenadhäsion nach Chondroitinase ABC-Behandlung statistisch nicht signifikant.

Vergleicht man auch in dieser Versuchsreihe nur die Thrombozytenadhäsion der drei Zelllinien Kontroll-SMC, Biglykan-überexprimierenden SMC und Decorin-überexprimierenden SMC ohne Chondroitinase ABC- Behandlung, so zeigt sich auch hier wieder eine deutlich gesteigerte Thrombozytenadhäsion zu Gunsten der Biglykan-überexprimierenden SMC und Decorin-überexprimierenden SMC.

Eindeutige Ergebnisse über eine verstärkt oder vermindert induzierte Thrombozytenadhäsion durch den Abbau der GAG an Proteoglykanen konnte die Versuchsreihe nicht erbringen.

Durch die Behandlung der Zellen mit der Chondroitinase ABC wurden, wie zuvor erwähnt nicht nur die Dermatan-sulfatseitenketten abgebaut, sondern zusätzlich weitere GAG (z.B Chondroitinsulfatketten). Hier könnte eine Erklärung für die nicht eindeutigen Ergebnisse dieser Versuchsreihe liegen. Zusätzlich muss man festhalten, dass die hier durchgeführten Experimente *in vitro* durchgeführt wurden (ohne Zusatz von Thrombin und Heparin-Cofaktor II).

Festzuhalten auch aus dieser Versuchsreihe bleibt, dass die Thrombozytenadhäsion an den überexprimierenden Zellen erneut erhöht war. Der Abbau der GAG und die damit verbundene Freilegung der Proteinkerne von Decorin und Biglykan hat keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich einer dadurch weiter vermehrten oder verminderten Adhäsion gebracht. Daher liefern diese Ergebnisse ein Indiz dafür, dass der Proteinkern nicht allein für die hier gezeigte erhöhte Adhäsion verantwortlich ist.

Da die Thrombozytenadhäsion nach Abbau der GAG allerdings auch nicht auffällig reduziert war, kann man davon ausgehen, dass die GAG wohl nicht direkt durch den Kontakt mit den Thrombozyten zu deren vermehrten Adhäsion geführt haben. Inwieweit möglicherweise die GAG der Proteoglykane bereits zuvor Einfluss auf eine strukturell veränderte Zusammensetzung der EZM genommen hatten, und dadurch indirekt zu einer vermehrten Thrombozytenadhäsion geführt haben, ist nicht bekannt. Daher bedarf es auch hier weiterer Studien bezüglich eines Einflusses der GAG auf die Thrombozytenadhäsion.

5. Zusammenfassung

In dieser Studie konnten bislang unbekannte Erkenntnisse über die Proteoglykane Biglykan und Decorin gewonnen werden. Bislang war sowohl für Decorin als auch für Biglykan bekannt, dass sie wichtige Aufgaben für die strukturelle Zusammensetzung der EZM erfüllen. Bei den durchgeführten statischen Thrombozytenadhäsionsversuchen zeigte sich eindeutig eine signifikant vermehrte Thrombozytenadhäsion an den Zellen, die entweder Biglykan oder Decorin überexprimierten. Zur genauen Klärung wie die beiden Proteoglykane zu der stark induzierten Thrombozytenadhäsion geführt haben bedarf es weiterer Studien.

Als Fazit bleibt bislang festzuhalten, dass den beiden Proteoglykanen Biglykan und Decorin nicht nur wichtige Aufgaben für den strukturellen Aufbau der EZM zukommen. Sie tragen offensichtlich zusätzlich durch einen bislang noch nicht geklärten Mechanismus zu einer stark induzierten Thrombozytenadhäsion bei. Demnach könnten die beiden Proteoglykane bei Überexpression als Trigger für den ersten Schritt bei der Entstehung eines Thrombus fungieren.

Kalziumablagerungen an den Zellen und in der sie umgebenden EZM erwiesen sich in dieser Studie ebenfalls als positiver Stimulus in Bezug auf die Thrombozytenadhäsion. In dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass der Kontakt von Thrombozyten mit Zellen, an denen ein Kalzifizierungsprozess induziert wurde, zu einer vermehrten Thrombozytenadhäsion geführt hat. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Thrombozytenadhäsion positiv mit der Menge an Kalziumablagerungen korreliert. Der genaue Wirkmechanismus, der zu der hier gezeigten forcierten Adhäsion geführt hat, ist noch nicht geklärt und bedarf weiterer Studien.

Aus den Ergebnissen dieser Studie kann aber zumindest vermutet werden, dass Gefäßwandverkalkungen nicht nur zu Gefäßwandversteifungen und frühzeitiger Atherosklerose führen, sondern zusätzlich über eine forcierte Thrombozytenadhäsion prothrombotisch wirken könnten.

Viele Studien sind bislang über das komplexe Wirksystem EZM gelaufen. Auf den enormen Einfluss der EZM auf Zellen und Stoffwechselforgänge wurde mehrfach hingewiesen. Jüngere Studien haben auch Verbindungen zwischen strukturellen Veränderungen innerhalb der EZM und Atherosklerose aufgedeckt. In beiden hier durchgeführten Versuchsreihen konnte gezeigt werden, welchen Einfluss strukturelle Veränderungen der EZM ebenfalls auf die Thrombozytenadhäsion hat. Zukünftige Studien müssen zeigen zu welchen zusätzlichen strukturellen Veränderungen es durch die Überexpression der Proteoglykane Decorin und Biglykan, bzw. durch den Kalzifizierungsprozess gekommen ist. Da hier drin wohl der Schlüssel zur Lösung des genauen Wirkmechanismus bezüglich der hier gezeigten gesteigerten Thrombozytenadhäsion liegt.

6. Literaturverzeichnis

1. Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanism of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 1:91-105.
2. Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH, Fuster V. Endothelium and atherosclerosis. *J Hypertens Suppl* 1992; 10:43-50.
3. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. *Circulation* 1993; 87:II3-16.
4. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* 2001; 38:938-942.
5. Block GA. Control of serum phosphorus : implications for coronary artery calcification and calcific uremic arteriopathy (calciphylaxis). *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10:741-747.
6. Block GA. Prevalence and clinical consequences of elevated Ca X P product in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 2000; 54:318-324.
7. Block GA and Port FK. Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: Recommendations for a change in management. *Am J Kidney Dis* 2000; 35:1226-1237.
8. Bruckner-Tudermann L. Connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic, and medical aspects (ed. PM Royce and B Steinmann), *Wiley-Liss, New York* 1993, pp. 507-531.
9. Byers PH. Connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic, and medical aspects (ed. PM Royce and B Steinmann), *Wiley-Liss, New York* 1993, pp. 317-350.
10. Caldwell RA, Ainsworth SD, Langan EM 3rd, Sullivan TM, LaBerge M. Calcification and proteoglycan accumulation following balloon angioplasty and stenting. *J Endovasc Ther* 2003; 10:801-806.
11. Choi HU, Johnson TL , Pal S , Tang LH , Rosenberg L, Neame PJ. Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS- PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl- sepharose chromatography. *J Biol Chem* 1989; 264:2876-2884.
12. Colwell JA. Pathophysiology of vascular disease in diabetes: effects of gliclazide. *Am J Med* 1991; 90:50-54.
13. Dzau VJ. Atherosclerosis and hypertension: mechanisms and interrelationships. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 15:59-64.
14. De Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion. *Br J Haematol* 1990 ; 3 :308-312.
15. Fischer JW, Kinsella MG, Levkau B, Clowes AW, Wight TN. Retroviral overexpression of decorin differentially affects the response of arterial smooth muscle cells to growth factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:777-784.

16. Fisher LW, Termine JD, Young MF. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* 1989; 264:4571-4576.
17. Fitzgerald PJ, Ports TA, Yock PG. Contribution of localized calcium deposits to dissection after angioplasty. An observational study using intravascular ultrasound. *Circulation* 1992; 86:64-70.
18. Floege J and Ketteler M. Vascular calcification in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:59-66.
19. Gawaz M. Das Blutplättchen. Thieme, Stuttgart, 1999.
20. Giachelli CM. Ectopic calcification: gathering hard facts about tissue soft mineralization. *Am J Path* 1999; 154:671-675.
21. Giachelli CM, Jono S, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H. Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am J Kidney Dis* 2001; 38:34-37.
22. Giachelli CM. Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphat. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:300-304.
23. Goldschmidt PJ, Lopes N, Crawford LE. Atherosclerosis and coronary artery disease. *Platelets* 2002; 26:375-81, Elsevier Science USA.
24. Guerin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:1014-1021.
25. Guidetti G, Bertoni A, Viola M, Tira E, Balduini C, Torti M. The small proteoglycan decorin supports adhesion and activation of human platelets. *Blood* 2002; 100:1707-1714.
26. Gutierrez P, O'Brien KD, Ferguson M, Nikkari ST, Alpers CE, Wight TN. Differences in the distribution of versican, decorin and biglycan in atherosclerotic human coronary arteries. *Cardiovasc Pathol* 1997; 6:271-278.
27. Haralson MA and Hassel JR. Extracellular matrix: "a practical approach". *Oxford University Press Inc.*, 1995; chap. 1, New York, USA.
28. Hay ED. Cell biology of extracellular matrix in development (2nd edn) (ed. ED Hay). *Plenum Press, New York* 1991, pp. 419-462.
29. Iozzo RV. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. *J Biol Chem* 1999; 274:18843-18846.
30. Itani Y, Sone S, Nakayama T, Suzuki T, Watanabe S, Ito K, Takashima S, Fushimi H, Sanada H. Coronary artery calcification detected by a mobile helical computed tomography unit and future cardiovascular death: 4-year follow up of 6120 asymptomatic Japanese. *Heart Vessels* 2004; 19:161-163.
31. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2000a; 87:10-17.

32. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem* 2000b; 275:20197-20203.
33. Juliano RL and Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1993; 120:577-585.
34. Kinsella MG and Wight TN. Isolation and characterization of dermatan sulfate proteoglycans synthesized by cultured bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 1988; 263:19222-19231.
35. Kresse H, Hausser H, Schönherr E, Bittner K. Biosynthesis and interactions of small chondroitin/dermatan sulphate proteoglycans. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32:259-264.
36. Krusius T and Ruoslahti E. Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:7683-7687.
37. Kunjathoor VV, Chiu DS, O'Brien KD, LeBoeuf RC. Accumulation of biglycan and perlecan, but not versican, in lesions of murine models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:462-468.
38. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Rönnemaa T, Laakso M. Medial artery calcification, a neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:978-986.
39. London GM, Marchais SJ, Guerin AP. Arterial stiffness and function in end-stage renal disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2004; 11:202-209.
40. Moroi M, Jung SM, Shinmyozu K, Tomiyama Y, Ordinas A, Diaz-Ricart M. Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. *Blood* 1996; 88:2081-2092.
41. Nelimarkka L, Salminen H, Kuopio T, Nikkari S, Ekfors T, Laine J, Pelliniemi L, Järveläinen H. Decorin is produced by capillary endothelial cells in inflammation-associated angiogenesis. *Am J Pathol* 2001; 158:345-353.
42. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhoudt T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fässler R. Glycoprotein VI but not $\alpha_2\beta_1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001; 20:2120-2130.
43. Niskanen LK, Suhonen M, Siitonen O, Lehtinen JM, Uusitupa MIJ. Aortic and lower limb artery calcification in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients and non-diabetic control subjects: A five year follow-up study. *Atherosclerosis* 1990; 84:61-71.
44. O'Brien KD, Olin KL, Alpers CE, Chiu W, Ferguson M, Hudkins K, Wight TN, Chait A. Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998; 98:519-527.
45. O'Brien KD, Vueltic S, McDonald TO, Wolfbauer G, Lewis K, Tu AY, Marcovina S, Wight TN, Chait A, Albers JJ. Cell-associated and extracellular phospholipid transfer protein in human coronary atherosclerosis. *Circulation* 2003; 108:270-274.
46. Piez KA and Reddi AH. Extracellular matrix biochemistry. *Elsevier, New York* 1984.

47. Rauch U, Ossende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation of atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 2001; 134:224-238.
48. Riessen R, Isner JM, Blessing E, Loushin C, Nikol S, Wight TN. Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries. *Am J Pathol* 1994; 144:962-974.
49. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am J Heart* 1999; 138:419-420.
50. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-809.
51. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nature* 2002; 8:1227-1234.
52. Rumberger JA, Simons DB, Fitzpatrick LA, Sheedy PF, Schwartz RS. Coronary artery calcium area by electron-beam computed tomography and coronary atherosclerotic plaque area: A histological correlative study. *Circulation* 1995; 92:2157-2162.
53. Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest* 1991; 87:1-5.
54. Saelman EUM, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HFG, Sage EH, Williams S, McKeown L, Gralnick HR, Sixma JJ. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$ -integrin). *Blood* 1994; 83:1244-1250.
55. Sangiorgi G, Rumberger JA, Severson A, Edwards WD, Gregoire J, Fitzpatrick LA, Schwartz RS: Arterial calcification and not lumen stenosis is highly correlated with atherosclerotic plaque burden in humans: A histologic study of 723 coronary artery segments using nondecalcifying methodology. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:126-133.
56. Schmidt G, Hausser H, Kresse H. Interaction of the small proteoglycan decorin with fibronectin. Involvement of the sequence NKISK of the core protein. *Biochem J* 1991; 280:411-414.
57. Schönherr E, Witsch-Prehm P, Harrach B, Robenek H, Rautenberg J, Kresse H. Interaction of biglycan with type I collagen. *J Biol Chem* 1995; 270:2776-2783.
58. Shirk RA, Parthasarathy N, San Antonio JD, Church FC, Wagner WD. Altered dermatan sulfate structure and reduced heparin cofactor II-stimulating activity of biglycan and decorin from human atherosclerotic plaque. *J Biol Chem* 2000; 275:18085-18092.
59. Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. β -Glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:2003-2009.
60. Silbert JE. Organization of glycosaminoglycan sulfation in the biosynthesis of proteochondroitin sulfate and proteodermatan sulfate. *Glycoconj J* 1996; 13:907-912.
61. Steinmann B, Royce PM, Superti-Fugara A. Connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic, and medical aspects. *Wiley-Liss, New York* 1993, pp. 351-407.

62. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification. Upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 2001; 89:1147-1154.
63. Tollefsen DM, Pestka CA, Monafo WJ. Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. *J Biol Chem* 1983; 258:6713-6716.
64. Trion A and van der Laarse A. Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. *Am Heart J* 2004; 147:808-814.
65. Tufvesson E and Westergren-Thorsson G. Biglycan and decorin induce morphological and cytoskeletal changes involving signalling by the small GTPases RhoA and Rac1 resulting in lung fibroblast migration. *J Cell Sci* 2003; 116:4857-4864.
66. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res* 1999; 84:166-178.
67. Wagner WD. Proteoglycan structure and function as related to atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 454:52-68.
68. Weber IT, Harrison RW, Iozzo RV. Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem* 1996; 271:31767-31770.
69. Williams KJ and Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:551-561.
70. Winnemöller M, Schon P, Vischer P, Kresse H. Interactions between thrombospondin and the small proteoglycan decorin: interference with cell attachment. *Eur J Cell Biol* 1992; 59:47-55.
71. Yamagata T, Saito H, Habuchi O, Suzuki S. Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *J Biol Chem* 1968; 243:1523-1535.
72. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor- beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 1990; 346:281-284.

7. Publikation

Endt-Knauer H, Weber A-A, Wight TN, Fischer JW, Schrör K. Biglykan- und Decorin-Überexpression erhöht die Thrombozytenadhäsion an die extrazelluläre Matrix glatter Gefäßmuskelzellen. *Z Kardiol* 2005; 94:Suppl 1

Danksagung

Ich möchte hiermit Herrn Univ.-Prof. Dr. med Karsten Schrör, Direktor des Instituts für Pharmakologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für sein Einverständnis danken die Untersuchungen am oben genannten Institut ausführen zu dürfen.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Artur-Aron Weber bedanken, für die Überlassung des Themas sowie die zahlreichen wertvollen Hinweise sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch im Anschluss bei der Darstellung der Ergebnisse.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Jens-W. Fischer für die Bereitstellung der Zelllinien und die Hilfe während der Experimente.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Kerstin Freidel und Frau Peggy Mann für die Vermittlung wissenschaftlichen Arbeitens im Labor, die Einarbeitung in die verwendeten Methoden sowie die geduldige Hilfe bei Fragen aller Art.

Frau Michèle François danke ich ebenfalls ganz besonders für die vorbehaltlose Unterstützung und im Besonderen die zermürende Arbeit, die vorliegende Dissertation nach Rechtschreib- und Grammatikfehlern zu durchsuchen, sowie die liebevolle und geduldige Hilfe während des Studiums.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung auf meinem Lebensweg, für den finanziellen und emotionalen Rückhalt nicht nur während des Studiums sowie für die gewährte Chance, den Beruf ergreifen zu können.

Lebenslauf

Name: Henrik Endt-Knauer

Eltern: Christel Endt-Knauer (geb. Weber), Lehrerin

Günther Endt-Knauer, Arzt

geboren 20.01.1978 in Warendorf, NRW

1984-1988 Karl-Ernst-Osthaus Grundschule Hagen-Halden

1988-1994 Gymnasium Hohenlimburg

1994-1995 Dirigo High-School Dixfield, Maine, USA Abschluss „Diploma“

1995-1997 Gymnasium Hohenlimburg Abschluss Abitur

1997-1998 Ableistung des 13-monatigen Zivildienstes im Evangelischen Krankenhaus Hagen-Elsey

1998 Beginn des Humanmedizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

2000 Ärztliche Vorprüfung

2001 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Sommersemester 2003 wissenschaftliche Mitarbeit im Institut für klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität im Rahmen der Dissertation

April, 2004 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

April, 2004 Beginn des Praktischen Jahres im Evangelischen Krankenhaus Düsseldorf mit dem Wahlfach Pädiatrie

Mai 2005 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Seit Juli 2005 Assistenzarzt in der Kardiologie im Helios Klinikum Wuppertal

Wuppertal, Mai 2006

Henrik Endt-Knauer

Auswirkung des strukturellen Aufbaus der extrazellulären Matrix auf die Adhäsion von Thrombozyten

vorgelegt von

Henrik Endt-Knauer

Zusammenfassung

In dieser Studie konnten bislang nicht bekannte, Erkenntnisse über die Proteoglykane Biglykan und Decorin gewonnen werden. Bislang war sowohl für Decorin als auch für Biglykan bekannt, dass sie wichtige Aufgaben für die strukturelle Zusammensetzung der EZM erfüllen. Bei den durchgeführten statischen Thrombozytenadhäsionsversuchen zeigte sich eindeutig eine signifikant vermehrte Thrombozytenadhäsion an den Zellen, die entweder Biglykan oder Decorin überexprimierten. Die Rolle der thrombozytenadhäsionsfördernden Komponente innerhalb der EZM ist bislang in erster Linie dem Kollagen vorbehalten. Zur genauen Klärung wie die beiden Proteoglykane zu der stark induzierten Thrombozytenadhäsion geführt haben bedarf es weiterer Studien. Als Fazit bleibt festzuhalten, dass den beiden Proteoglykanen Biglykan und Decorin nicht nur wichtige Aufgaben für den strukturellen Aufbau der EZM zukommen. Sie tragen offensichtlich zusätzlich durch einen bislang noch nicht geklärten Mechanismus zu einer stark induzierten Thrombozytenadhäsion bei. Demnach könnten die beiden Proteoglykane als Trigger für den ersten Schritt bei der Entstehung eines Thrombus fungieren.

Kalziumablagerungen an den Zellen und in der sie umgebenden EZM erwiesen sich in dieser Studie ebenfalls als positiver Stimulus in Bezug auf die Thrombozytenadhäsion. In dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass der Kontakt von Thrombozyten mit Zellen, an denen ein Kalzifizierungsprozess induziert wurde, zu einer vermehrten Thrombozytenadhäsion geführt hat. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Thrombozytenadhäsion positiv mit der Menge an Kalziumablagerungen korreliert. Der genaue Wirkmechanismus der zu der hier gezeigten forcierten Adhäsion geführt hat, ist noch nicht geklärt und bedarf weiterer Studien. Aus den Ergebnissen dieser Studie kann aber zumindest vermutet werden, dass Gefäßwandverkalkungen nicht nur zu Gefäßversteifungen und frühzeitiger Atherosklerose führen, sondern zusätzlich über eine forcierte Thrombozytenadhäsion prothrombotisch wirken könnten.

Viele Studien sind bislang über das komplexe Wirksystem EZM gelaufen. Auf den enormen Einfluss der EZM auf Zellen und Stoffwechselfvorgänge wurde mehrfach hingewiesen. Jüngere Studien haben auch Verbindungen zwischen strukturellen Veränderungen innerhalb der EZM und Atherosklerose aufgedeckt. In beiden hier durchgeführten Versuchsreihen konnte gezeigt werden, welchen Einfluss strukturelle Veränderungen der EZM ebenfalls auf die Thrombozytenadhäsion hat. Zukünftige Studien müssen zeigen zu welchen zusätzlichen strukturellen Veränderungen es durch die Überexpression der Proteoglykane Decorin und Biglykan, bzw. den Kalzifizierungsprozess gekommen ist. Da hier drin wohl der Schlüssel zur Lösung des genauen Wirkmechanismus bezüglich der gesteigerten Thrombozytenadhäsion liegt.