

Aus der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig

**Die Rolle des extrazellulären Matrixproteins Biglykan  
in der Thrombozytenadhäsion und arteriellen  
Thrombusbildung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Henrike Hörmann  
2020

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Margitta Elvers

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Dr. rer. nat. Miriam Cortese-Krott

Die Wissenschaft ist ewig in ihrem Quell, unermesslich in ihrem Umfang, endlos in ihrer Aufgabe, unerreichbar in ihrem Ziel.

Karl Ernst von Baer (1792-1876)

Teile dieser Arbeit wurden bereits zur Veröffentlichung eingereicht. Das folgende Manuskript befindet sich seit dem 13.08.2019 in Revision bei ATV B (*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*):

“The proteoglycan biglycan modulates platelet GPVI signaling in platelet adhesion and thrombus formation”

Henrike Hoermann, Nadine Maurus, Irena Krueger, Yi Sun, Christina Kohlmorgen, Maria Grandoch, Hubert Schelzig, Jens W. Fischer, Margitta Elvers

## Zusammenfassung

Zu den häufigsten Todesursachen weltweit zählen Erkrankungen wie der akute Myokardinfarkt und der Schlaganfall. Die Erforschung der physiologischen als auch der pathologischen Vorgänge der Hämostase und der arteriellen Thrombose sind daher von großer klinischer Relevanz. Thrombozyten sind essenziell an der Thrombusbildung beteiligt, allerdings spielen auch der Aufbau und die Beschaffenheit der Gefäßwände eine wichtige Rolle bei der Entstehung eines arteriellen Thrombus. Neben Kollagen, welches ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix (EZM) von arteriellen Gefäßen darstellt, werden zunehmend auch andere extrazelluläre Matrixproteine wie z.B. Decorin und Biglykan (BGN), welche zur Gruppe der *Small leucine-rich proteoglycans* (SLRPs) gehören, hinsichtlich ihrer Rolle bei der Entstehung von arteriellen Thromben untersucht. BGN ist Teil der Gefäßwand von Arterien. Es ist bekannt, dass es mit verschiedenen Bestandteilen der EZM, wie z.B. Kollagen Typ I, II, III und IV interagieren kann und Teil zahlreicher physiologischer und pathologischer Vorgänge im Körper ist. Seine Rolle als SLRP in der Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung ist derzeit allerdings weitestgehend unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Rolle das extrazelluläre Matrixprotein BGN in der Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung spielt. Es wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Versuche mit *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen, die durch das komplette Fehlen von BGN im Körper charakterisiert sind, durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten BGN nicht sezernieren können, aber an dieses adhären können. Zudem konnte eine vermehrte Thrombusbildung auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zu einer Kollagen-Matrix gesehen werden. Bei der Untersuchung von *Bgn*<sup>-0</sup> und Wildtyp (WT) Mäusen konnte demonstriert werden, dass *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse verlängerte Blutungszeiten, eine reduzierte Thrombozytenadhäsion und verlängerte Okklusionszeiten nach Gefäßverletzung haben. Dass die Ursache dafür am ehesten im Fehlen von BGN in der Gefäßwand und nicht in Veränderungen der Thrombozyten der *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse liegt, konnte durch Versuche mit Knochenmarkchimären bestätigt werden. In ersten Analysen zeigte sich zudem, dass Glykoprotein (GP)VI sich als ein möglicher Rezeptor für die Interaktion zwischen Thrombozyten und BGN erweist.

## Summary

Acute myocardial infarction and stroke are amongst the most common causes of death in the world. The study of the physiology and pathophysiology of haemostasis and arterial thrombosis are therefore of great clinical relevance. As well as platelets, the structure and surface of the vessel wall play an important role in the processes of thrombus formation. In addition to collagen, which is a major component of the extracellular matrix (EZM) of arterial vessels, other extracellular matrix proteins such as the small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) decorin and biglycan (BGN) are increasingly being investigated, regarding their role in the development of arterial thrombosis. BGN is located in the vessel wall of arteries. It can interact with different components of the extracellular matrix such as collagen type I, II, III and IV and is part of numerous physiological and pathophysiological processes in the human body. Its role as a SLRP in platelet adhesion and thrombus formation is mainly unknown to date.

The aim of this work was to elucidate the role of the extracellular matrix protein BGN in platelet adhesion and thrombus formation. *In vitro* experiments as well as *in vivo* experiments with *Bgn*<sup>-0</sup> mice, who have a complete lack of BGN, were performed. Analysis of murine platelets revealed that the platelets were not able to secrete BGN, but were able to adhere to immobilized BGN. In addition, increased thrombus formation was seen on a biglycan-collagen matrix compared to a collagen-matrix. *Bgn*<sup>-0</sup> mice showed prolonged bleeding times, reduced platelet adhesion and prolonged occlusion times after vessel injury compared to wild-type littermates (WT). Experiments with bone marrow chimeric mice confirmed that the cause of this was most likely to be the absence of BGN in the vessel wall and not alterations in the platelets of *Bgn*<sup>-0</sup> mice. In first experiments this work could reveal that glycoprotein (GP)VI functions as a possible receptor for the interaction between platelets and BGN.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>ACD</b>	<i>Acid-Citrate-Dextrose</i>
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AK</b>	Antikörper
<b>ApoE</b>	Apolipoprotein E
<b>BGN</b>	Biglykan (engl. <i>biglycan</i> )
<b>BMP-1</b>	<i>Bone morphogenetic protein 1</i> (engl. für knochenmorphogenetisches Protein 1)
<b>BMP-4</b>	<i>Bone morphogenetic protein 4</i> (engl. für knochenmorphogenetisches Protein 4)
<b>bp</b>	Basenpaar(e)
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>CD31</b>	<i>Cluster of differentiation 31</i>
<b>CD38</b>	<i>Cluster of differentiation 38</i>
<b>CD41/61</b>	<i>Cluster of differentiation 41/61</i>
<b>cDNA</b>	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<b>CFSE</b>	<i>5-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester</i>
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>COX-1</b>	Cyclooxygenase-1
<b>CRP</b>	<i>Collagen Related Peptide</i>
<b>CTI</b>	<i>Corn Trypsin Inhibitor</i>
<b>Ct-Wert</b>	<i>Cycle threshold-Wert</i>
<b>DAG</b>	1,2-Diacylglycerol
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (engl. für Desoxyribonukleinsäure)
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i> (engl. für Epidermaler Wachstumsfaktor)
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<b>Engl.</b>	Englisch

<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>EZM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
<b>FcR<math>\gamma</math>-chain</b>	<i>Fragment crystalized receptor <math>\gamma</math>-chain</i> (engl. für Fc-Rezeptor- $\gamma$ -Kette)
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (engl. für Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
<b>g</b>	g-Kraft
<b>G</b>	Gauge
<b>GAG</b>	Glykosaminoglykan(e)
<b>GP</b>	Glykoprotein(e)
<b>GPVI</b>	Glykoprotein VI
<b>GPIb<math>\alpha</math></b>	Glykoprotein Iba
<b>Gy</b>	Gray
<b>HRP-Avidin</b>	<i>Horseradish Peroxidase Avidin</i>
<b>IE</b>	Internationale Einheit
<b>IP3</b>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
<b>ITAM</b>	Immunrezeptor Tyrosin-basierendes aktivierendes Motiv (engl. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> )
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>kg KG</b>	Kilogramm Körpergewicht
<b>kPa</b>	Kilopascal
<b>LAT</b>	<i>Linker for activation of T cells</i>
<b>LRR</b>	<i>Leucine-rich-repeats</i> (engl. für Leucin-reiche Wiederholungen)
<b>M</b>	Molare Masse
<b>MFI</b>	<i>Mean fluorescence intensity</i> (engl. für gemittelte Fluoreszenzintensität)
<b>min</b>	Minute(n)
<b>MIP-2</b>	<i>Macrophage-inflammatory-protein-2</i>
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mm<sup>2</sup></b>	Quadratmillimeter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloprotease(n)

<b>mRNA</b>	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
<b>nm</b>	Nanometer
<b>Par-4</b>	<i>Protease-activated receptor 4</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> (engl. für Polymerase-Kettenreaktion)
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandin I <sub>2</sub> (Synonym: Prostazyklin)
<b>PGK1</b>	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>
<b>PH</b>	<i>Pleckstrin homology domain</i>
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PLC<math>\gamma</math>2</b>	Phospholipase C $\gamma$ 2
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>PSGL-1</b>	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
<b>RDB</b>	<i>RNA-Dilution Buffer</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s</b>	Sekunde(n)
<b>SEM</b>	Standardfehler des Mittelwerts
<b>SH2</b>	<i>Src homology 2</i>
<b>SH3</b>	<i>Src homology 3</i>
<b>SLP-76</b>	<i>SH2 domain-containing leucocyte protein of 76 kDa</i>
<b>SLRP</b>	<i>Small leucine-rich proteoglycan</i>
<b>SYK</b>	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor beta</i> (engl. für Transformierender Wachstumsfaktor Beta)
<b>TG-Puffer</b>	Thioglycerol-Puffer
<b>Thr.</b>	Thrombozyten
<b>TLR2</b>	<i>Toll-like-Receptor-2</i> (engl. für Toll-ähnlicher Rezeptor-2)
<b>TLR4</b>	<i>Toll-like-Receptor-4</i> (engl. für Toll-ähnlicher Rezeptor-4)
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor-alpha

<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (THAM)
<b>T-TAS®</b>	<i>Total Thrombus-formation Analysis System</i>
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Thromboxan-A <sub>2</sub>
<b>U</b>	<i>Unit</i>
<b>vWF</b>	Von-Willebrand-Faktor
<b>WHO</b>	<i>World Health Organisation</i> (engl. für Weltgesundheitsorganisation)
<b>WISP-1</b>	<i>Wnt-1-induced secreted protein-1</i>
<b>WT</b>	Wildtyp

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	I
<b>Summary</b> .....	II
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	III
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	VII
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	XI
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	XII
<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Klinische Bedeutung von Hämostase und arterieller Thrombose .....	1
1.2 Thrombozyten.....	1
1.2.1 Aufbau von Thrombozyten .....	2
1.2.2 Funktion von Thrombozyten.....	3
1.2.3 Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung .....	3
1.2.4 Glykoprotein VI.....	4
1.3 Aufbau der arteriellen Gefäßwand.....	7
1.4 Die extrazelluläre Matrix .....	9
1.4.1 Kollagen .....	10
1.4.2 Proteoglykane .....	11
1.4.3 Glykoproteine der extrazellulären Matrix.....	12
1.5 Biglykan .....	13
1.6 Ziele der Arbeit .....	15
<b>2 Material und Methoden</b> .....	16
2.1 Geräte und Arbeitsmaterialien .....	16
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	18
2.3 Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	19
2.4 Kits .....	21
2.5 Antikörper .....	22

2.6	Primer .....	22
2.7	Software .....	22
2.8	Versuchstiere.....	23
2.9	Zellbiologische Methoden.....	24
2.9.1	Blutabnahme bei Mäusen .....	24
2.9.2	Isolation von murinen Thrombozyten .....	24
2.9.3	Statische Adhäsions-Versuche .....	25
2.9.4	Flusskammersystem .....	26
2.9.5	<i>Total Thrombus-formation Analysis System (T-TAS®)</i> .....	28
2.9.6	Durchflusszytometrie.....	30
2.10	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i> .....	32
2.11	Molekularbiologische Techniken.....	34
2.11.1	Isolierung von Ribonukleinsäure aus murinen Thrombozyten.....	34
2.11.2	Isolierung von Ribonukleinsäure aus murinen Herzen .....	35
2.11.3	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA)-Synthese.....	36
2.11.4	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion .....	37
2.11.5	Genotypisierung der Blutzellen von Knochenmarkchimären.....	38
2.12	Tierversuche.....	41
2.12.1	Blutungszeiten.....	41
2.12.2	Ligatur der <i>Arteria carotis communis</i> .....	41
2.12.3	Okklusionsmodell der <i>Arteria carotis communis</i> .....	43
2.12.4	Generierung von Knochenmarkchimären.....	45
2.13	Statistik.....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
3.1	Untersuchung der Interaktion von Thrombozyten und Biglykan <i>in vitro</i> .	48
3.1.1	Thrombozyten sezernieren kein Biglykan .....	48

3.1.2	Adhäsionsverhalten von Thrombozyten auf einer Biglykan-Matrix unter statischen Bedingungen.....	49
3.1.3	Statische Adhäsion von Thrombozyten auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zur Kollagen-Matrix.....	50
3.1.4	Thrombusbildung auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zur Kollagen-Matrix im Flusskammermodell .....	52
3.2	Untersuchung der Auswirkung von löslichem Biglykan auf die Aktivierung von Thrombozyten und die Thrombusbildung.....	54
3.2.1	Einfluss von rekombinantem Biglykan auf die Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ .....	54
3.2.2	Untersuchung der Thrombusbildung mit dem <i>Total Thrombus-formation Analysis System</i> nach Vorinkubation mit Biglykan.....	55
3.3	Untersuchung von GPVI in Bezug auf die Thrombozytenadhäsion an Biglykan .....	55
3.4	Untersuchung der Thrombozyten von <i>Bgn</i> <sup>-0</sup> Mäusen <i>in vitro</i> .....	57
3.4.1	Bei der Thrombusbildung unter Flussbedingungen mit Blut von <i>Bgn</i> <sup>-0</sup> Mäusen zeigt sich kein signifikanter Unterschied zur Thrombusbildung mit Blut von WT Mäusen .....	57
3.4.2	Untersuchung der Expression von Oberflächenproteinen auf Thrombozyten von <i>Bgn</i> <sup>-0</sup> Mäusen .....	61
3.4.3	Durchflusszytometrische Untersuchung der Aktivierung von Thrombozyten von <i>Bgn</i> <sup>-0</sup> Mäusen anhand der Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ .....	62
3.5	Untersuchung von <i>Bgn</i> <sup>-0</sup> Mäusen in Bezug auf die Thrombozytenadhäsion und die arterielle Thrombusbildung .....	65
3.5.1	Bestimmung der Blutungszeiten von <i>Bgn</i> <sup>-0</sup> Mäusen .....	65
3.5.2	Untersuchung der Thrombozytenadhäsion in <i>Bgn</i> <sup>-0</sup> Mäusen mittels <i>in-vivo</i> -Videomikroskopie .....	66
3.5.3	Untersuchung der Thrombusbildung <i>in vivo</i> in <i>Bgn</i> <sup>-0</sup> Mäusen nach Gefäßverletzung mit FeCl <sub>3</sub> .....	68

3.6	Untersuchung von <i>Bgn</i> <sup>-0</sup> - und WT- Knochenmarkchimären.....	70
3.6.1	Kontrolle der Genotypen aus dem Blut nach vollzogener Knochenmarktransplantation .....	70
3.6.2	Bestimmung der Thrombozytenzahl von Knochenmarkchimären .	71
3.6.3	Bestimmung der Blutungszeiten der Knochenmarkchimären.....	72
3.6.4	Untersuchung der Thrombusbildung <i>in vivo</i> in den <i>Bgn</i> <sup>-0</sup> - und WT- Knochenmarkchimären nach Gefäßverletzung mit FeCl <sub>3</sub> .....	73
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>75</b>
4.1	Interaktion zwischen Thrombozyten und Biglykan <i>in vitro</i> .....	75
4.2	Auswirkungen von löslichem BGN auf die Aktivierung von Thrombozyten und die Thrombusbildung .....	77
4.3	Auswirkungen der Defizienz von Biglykan auf die Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung.....	78
4.4	Auswirkungen der Defizienz von Biglykan auf die Thrombozytenadhäsion und die Thrombusbildung <i>in vivo</i> .....	80
4.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	82
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>84</b>
	<b>Danksagung</b>	

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Geräte und Arbeitsmaterialien .....	16
<b>Tabelle 2:</b> Auflistung der Verbrauchsmaterialien .....	18
<b>Tabelle 3:</b> Auflistung der verwendeten Chemikalien, Puffer und Lösungen ....	19
<b>Tabelle 4:</b> Auflistung der verwendeten Kits .....	21
<b>Tabelle 5:</b> Auflistung der verwendeten Antikörper .....	22
<b>Tabelle 6:</b> Auflistung der verwendeten Primer .....	22
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Software-Programme.....	22
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete Flussgeschwindigkeiten und Schergeschwindigkeiten in der Flusskammer .....	27
<b>Tabelle 9:</b> Liste der Agonisten für die Aktivierung von Thrombozyten zur Analyse der Expression von Oberflächenproteinen mittels FACS.....	30
<b>Tabelle 10:</b> Auflistung der Antikörper für die FACS-Analysen von Oberflächenproteinen auf Thrombozyten.....	31
<b>Tabelle 11:</b> Auflistung der Ansätze für die Untersuchung der Expression von P- Selektin und Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ auf Thrombozyten mittels FACS.....	32
<b>Tabelle 12:</b> Liste der Agonisten für die Thrombozyten-Stimulation .....	33
<b>Tabelle 13:</b> Zusammensetzung Mastermix für cDNA-Synthese für einen Ansatz .....	36
<b>Tabelle 14:</b> Programm im Thermozykler für die cDNA-Synthese .....	37
<b>Tabelle 15:</b> Programm qRT-PCR .....	37
<b>Tabelle 16:</b> Ansatz pro <i>Well</i> für Aktin (qRT-PCR).....	38
<b>Tabelle 17:</b> Ansatz pro <i>Well</i> für Biglykan (qRT-PCR).....	38
<b>Tabelle 18:</b> Ansatz pro <i>Well</i> für TNF- $\alpha$ (qRT-PCR) .....	38
<b>Tabelle 19:</b> Zusammensetzung eines Ansatzes für die PCR zur Genotypisierung .....	40
<b>Tabelle 20:</b> Protokoll für die PCR im Thermozykler bei der Genotypisierung der Knochenmarkchimären .....	40

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung. ....	4
<b>Abb. 2:</b> Modell des GPVI/Fc-Rezeptor- $\gamma$ -Ketten Komplexes. ....	5
<b>Abb. 3:</b> Schema der von GPVI induzierten Signalkaskade in Thrombozyten. ...	7
<b>Abb. 4:</b> Schematischer Wandaufbau einer Arterie. ....	9
<b>Abb. 5:</b> Modell der extrazellulären Matrix. ....	10
<b>Abb. 6:</b> Schematische Darstellung der molekularen Struktur von Vertretern der SLRPs. ....	12
<b>Abb. 7:</b> Exemplarisches Bild einer Druckkurve des <i>Total Thrombus-formation Analysis Systems</i> bei der Untersuchung der Thrombusbildung mit Blut von einer WT Maus bei einer Scherrate von $240 \text{ s}^{-1}$ . ....	28
<b>Abb. 8:</b> Freipräparierte <i>Arteria carotis communis</i> mit Kontrastplättchen und Ligatur. ....	43
<b>Abb. 9:</b> Versuchsaufbau der <i>in-vivo</i> -Videomikroskopie. ....	43
<b>Abb. 10:</b> Versuchsaufbau des Okklusionsmodells. ....	45
<b>Abb. 11:</b> Schematische Darstellung der Generierung der Knochenmarkchimären. ....	47
<b>Abb. 12:</b> Thrombozyten sezernieren kein Biglykan und exprimieren keine BGN-mRNA. ....	48
<b>Abb. 13:</b> Thrombozyten adhären an BGN. ....	49
<b>Abb. 14:</b> Untersuchung der statischen Adhäsion von Thrombozyten auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zur Kollagen-Matrix. ....	51
<b>Abb. 15:</b> Vermehrte Thrombusbildung auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zu einer Kollagen-Matrix. ....	53
<b>Abb. 16:</b> Die Inkubation von Thrombozyten mit Biglykan hat keinen Einfluss auf die Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . ....	54
<b>Abb. 17:</b> Die Vorinkubation von Blut mit rekombinantem Biglykan führt nicht zu einer verkürzten Okklusionszeit bei einer Scherrate von $240 \text{ s}^{-1}$ im <i>Total Thrombus-formation Analysis System</i> . ....	55
<b>Abb. 18:</b> Signifikant reduzierte Adhäsion von Thrombozyten an Biglykan nach Blockade von GPVI mittels JAQ1. ....	56

<b>Abb. 19:</b> In der Flusskammer zeigt sich kein Unterschied in der Thrombusbildung bei Verwendung von Vollblut aus <i>Bgn<sup>-0</sup></i> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen. ....	58
<b>Abb. 20:</b> Kein signifikanter Unterschied in der Okklusionszeit der künstlichen Gefäße bei der Analyse der Thrombusbildung aus Blut von <i>Bgn<sup>-0</sup></i> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen mit dem <i>Total Thrombus-formation Analysis System</i> . ....	60
<b>Abb. 21:</b> Reduzierte Expression von GPVI auf Thrombozyten von <i>Bgn<sup>-0</sup></i> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen. ....	61
<b>Abb. 22:</b> Signifikant reduzierte Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ auf mit CRP aktivierten Thrombozyten aus <i>Bgn<sup>-0</sup></i> Mäusen, bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von „ungewaschenem“ Blut. ....	63
<b>Abb. 23:</b> Kein Unterschied in der Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ auf aktivierten Thrombozyten aus <i>Bgn<sup>-0</sup></i> Mäusen im Vergleich zu Thrombozyten aus WT Mäusen bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von „gewaschenem“ Blut. ....	64
<b>Abb. 24:</b> Signifikant verlängerte Blutungszeiten in <i>Bgn<sup>-0</sup></i> Mäusen. ....	65
<b>Abb. 25:</b> Reduzierte Thrombozytenadhäsion in <i>Bgn<sup>-0</sup></i> Mäusen nach Gefäßverletzung via Ligatur. ....	67
<b>Abb. 26:</b> <i>Bgn<sup>-0</sup></i> Mäuse zeigen teilweise keine okkludierende Thrombusbildung nach Gefäßverletzung mittels $\text{FeCl}_3$ . ....	69
<b>Abb. 27:</b> Exemplarisches Bild eines Gels bei der Genotypisierung von Blutzellen der Knochenmarkchimären. ....	71
<b>Abb. 28:</b> Knochenmarkchimären haben im Vergleich zu WT und <i>Bgn<sup>-0</sup></i> Mäusen keine signifikant erniedrigte oder erhöhte Thrombozytenzahl. ....	71
<b>Abb. 29:</b> Signifikant verlängerte Blutungszeiten in <i>Bgn<sup>-0</sup></i> -Knochenmarkchimären, die Spenderknochenmark von WT-Mäusen erhalten haben. ....	72
<b>Abb. 30:</b> <i>Bgn<sup>-0</sup></i> -Knochenmarkchimären mit WT-Spenderknochenmark zeigen teilweise keine okkludierende Thrombusbildung nach Gefäßverletzung mittels $\text{FeCl}_3$ . ....	74

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Bedeutung von Hämostase und arterieller Thrombose

Nach einer Gefäßverletzung stellen die Thrombozytenadhäsion und die Thrombusbildung essentielle Prozesse in der Hämostase dar [1]. Die Hämostase ist ein physiologischer Vorgang, der den Blutverlust bei einer Verletzung limitieren soll [2]. Wenn jedoch Feedback-Mechanismen, die die Größe und Stabilität des Thrombus regulieren, nicht mehr richtig funktionieren, kommt es zu einer pathologischen Version der Hämostase, der Thrombose, die zu lebensbedrohlichen Gefäßverschlüssen führen kann [3]. Wie wichtig die Forschung auf diesem Gebiet ist, zeigen die aktuellen Statistiken in Bezug auf die Mortalität weltweit. Erkrankungen, wie der akute Myokardinfarkt oder der Schlaganfall, zählen zu den häufigsten Todesursachen [4]. Laut den *World Health Statistics* der *World Health Organisation* (WHO) von 2018 sind 2016 geschätzt 17,9 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen verstorben, was 44 % aller Todesfälle durch nichtübertragbare Erkrankungen ausmacht [5]. In Deutschland führt laut dem Statistischen Bundesamt (Destatis) die chronisch ischämische Herzkrankheit gefolgt vom akuten Myokardinfarkt die Liste der häufigsten Todesursachen im Jahr 2015 an [6].

## 1.2 Thrombozyten

Thrombozyten sind kleine anukleäre Zellen des Blutes, die im Knochenmark und in der Lunge von ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, abgeschnürt werden [7]. Die Thrombozyten verbleiben für ca. 5-7 Tage im Blutkreislauf bevor sie nach Aktivierung und Bildung eines Thrombus oder nach Erreichen der maximalen Lebensdauer von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in die Milz transportiert und abgebaut werden [8]. Die Normwerte von Thrombozyten beim gesunden erwachsenen Menschen liegen bei ca. 150.000-350.000/ $\mu$ l Blut [9]. Bei Mäusen liegt die durchschnittliche Thrombozytenzahl bei ca. 1.140.000/ $\mu$ l Blut [10].

### 1.2.1 Aufbau von Thrombozyten

Der durchschnittliche Durchmesser von humanen Thrombozyten beträgt ca. 2-5  $\mu\text{m}$  und die Dicke ca. 0,5  $\mu\text{m}$  [11]. Die Membranoberfläche der Thrombozyten enthält eine Glykokalyx [12]. Die dazu gehörenden exprimierten Glykoproteine sind essentiell für die Thrombozytenadhäsion und die damit einhergehende Aktivierung der Thrombozyten bei einer Gefäßverletzung [11]. Zu den wichtigsten Glykoproteinen für die Thrombozytenadhäsion in Mäusen zählt unter anderem der Hauptrezeptor für Kollagen, das Glykoprotein VI (GPVI) [13] (siehe Abschnitt 1.2.4). Ein weiterer wichtiger Rezeptor ist das Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , welches auch Glykoprotein (GP)IIb/IIIa genannt wird, das auf nicht aktivierten Thrombozyten in einer inaktiven Form vorliegt [14]. Erst nach Aktivierung der Thrombozyten, z.B. durch Thrombin, Kollagen oder Adenosindiphosphat (ADP) wird es aktiviert [14]. Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  fungiert unter anderem als Rezeptor für Fibrinogen, Fibronektin und von-Willebrand-Faktor (vWF) [14]. Es spielt eine wichtige Rolle in der Thrombozytenaggregation und manifestiert sich bei Verlust oder Vorliegen eines Defektes in der autosomal-rezessiv vererbten Glanzmann-Thrombasthenie, bei der die betroffenen Patienten eine stark erhöhte Blutungsneigung aufweisen [15].

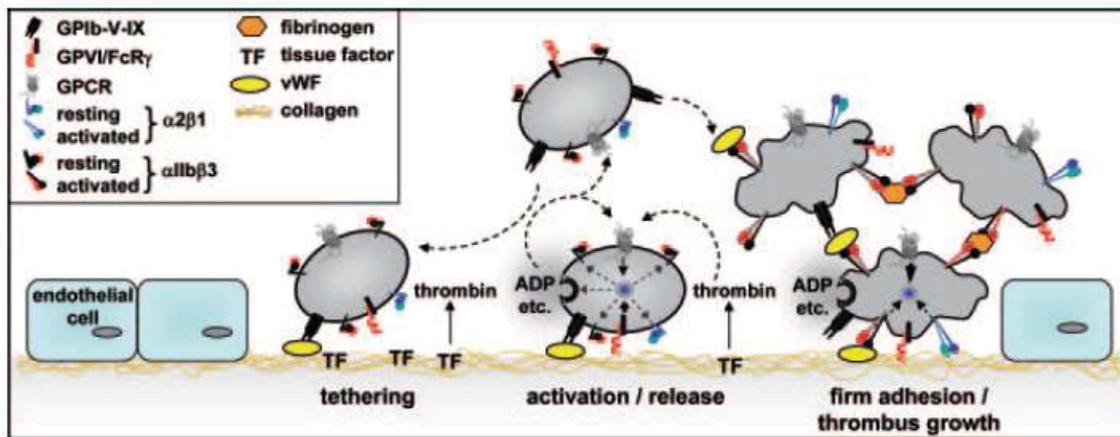
In den Thrombozyten finden sich drei verschiedene Arten von Speicher-Granula, die in  $\alpha$ -Granula, elektronendichte Granula und Lysosomen eingeteilt werden können [16]. In diesen Granula werden Proteine gespeichert, die meist erst nach Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt werden [16]. In den  $\alpha$ -Granula finden sich unter anderem der vWF, Fibronektin, Fibrinogen,  $\beta$ -Thromboglobulin und Plättchenfaktor 4 [17, 18]. In ruhenden Thrombozyten findet sich zudem das P-Selektin in den  $\alpha$ -Granula, ein Protein, das bei Aktivierung der Thrombozyten, z.B. durch ADP, auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert wird [19, 20]. P-Selektin führt unter anderem zu einer Rekrutierung von Leukozyten und über den P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL-1) zur Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten [21, 22]. Aufgrund der schnellen Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung der Thrombozyten, zählt P-Selektin zu den wichtigsten Aktivierungsmarkern von Thrombozyten [23].

### 1.2.2 Funktion von Thrombozyten

Die Hauptaufgabe von Thrombozyten liegt in der Blutstillung bei einer Gefäßverletzung [24]. Voraussetzung hierfür ist die Bildung eines Thrombus durch die Adhäsion der Thrombozyten an die geschädigte Gefäßwand und eine schnelle Aktivierung der Thrombozyten [24]. Neben dieser wichtigen Rolle in der Hämostase, die in Abschnitt 1.2.3 noch näher beschrieben wird, sind Thrombozyten noch an vielen weiteren physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt. So ist unter anderem bekannt, dass Thrombozyten bei inflammatorischen Prozessen [25], bei der Progression der Alzheimer-Krankheit [26] und bei der Metastasierung von Tumoren [27] eine Rolle spielen.

### 1.2.3 Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung

Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren Thrombozyten im Blutkreislauf und es kommt in der Regel zu keiner festen Bindung der Thrombozyten an die Gefäßwand [28]. Bei einer Verletzung der Gefäßwand kommt es zur Exposition der subendothelialen Matrix und so werden unter anderem Kollagenfibrillen, Laminin, Fibronectin und der vWF freigelegt [28] (Abb. 1). Initial interagieren die Thrombozyten über den GPIb-V-IX-Rezeptorkomplex mit dem an Kollagen gebundenen vWF [28, 29]. Diese Interaktion führt nicht zu einer stabilen Thrombozytenadhäsion, sorgt aber dafür, dass die Thrombozyten entlang der Oberfläche der exponierten subendothelialen Matrix "rollen" können [28]. Dies ermöglicht es den Thrombozyten über den Hauptkollagenrezeptor GPVI an Kollagen zu binden [13, 28]. Die durch GPVI aktivierte intrazelluläre Signalkaskade (siehe Abschnitt 1.2.4) führt zu einer Freisetzung verschiedener Mediatoren wie ADP und Thromboxan-A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) sowie zur Aktivierung von Integrinen, die in einen hochaffinen Zustand versetzt werden [4]. Zusammen mit lokal produziertem Thrombin führen ADP und TXA<sub>2</sub> über autokrine und parakrine Wege zur vollständigen Aktivierung der Thrombozyten über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub>, G<sub>12/13</sub>) sowie zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Thrombozyten [4, 30]. Die feste Bindung der Thrombozyten an die extrazelluläre Matrix (EZM) wird durch die Integrine  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  und  $\alpha 11\beta 3$  gewährleistet [28]. Die Thrombozyten-Thrombozyten-Adhäsion findet vor allem über die Bindung von Integrin  $\alpha 11\beta 3$  an Fibrinogen statt [4].



**Abb. 1: Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung.**

Bei Verletzung der Gefäßwand kommt es zur Exposition der subendothelialen Matrix. Über den GPIIb-V-IX-Rezeptorkomplex interagieren die Thrombozyten mit dem an Kollagen gebundenen vWF. Über GPVI können die Thrombozyten an Kollagen binden, was zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade führt. Dabei wird Integrin  $\alpha IIb\beta 3$  aktiviert und Mediatoren wie ADP und TXA<sub>2</sub> ausgeschüttet, die zur Rekrutierung und Aktivierung von weiteren Thrombozyten führen und so die Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung fördern [28]. Abbildung veröffentlicht mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc., aus Varga-Szabo *et al.* [28], Genehmigung vermittelt durch Copyright Clearance Center, Inc.

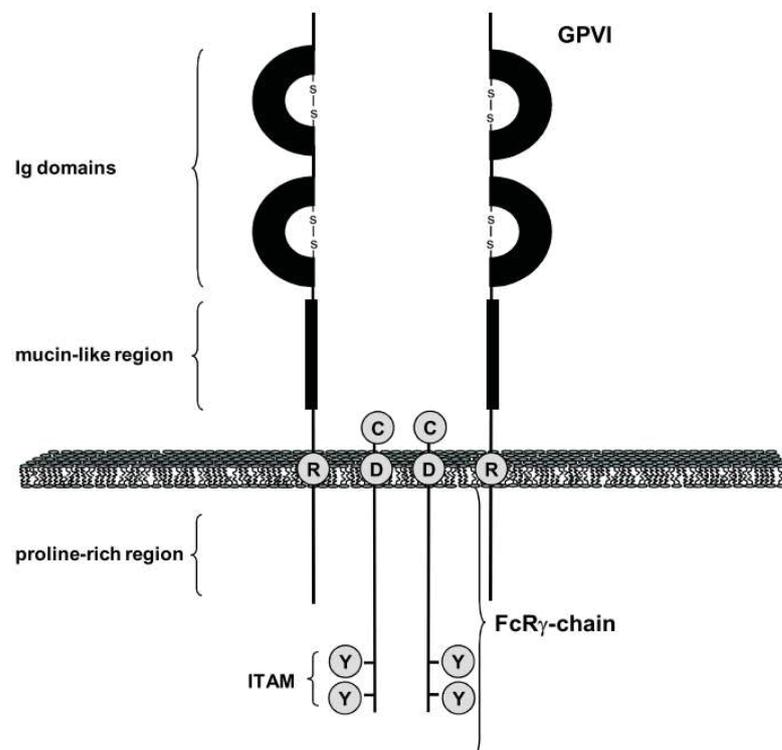
ADP bindet als sogenannter *second-wave mediator* an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> [11, 31]. Über die Aktivierung von P2Y<sub>1</sub> induziert ADP die Calcium-Mobilisation aus intrazellulären Speichern und führt zu einer Veränderung der Thrombozytenform (engl. *shape change*) sowie zur Thrombozytenaggregation [11, 32]. Eine Aktivierung von P2Y<sub>12</sub> führt zur Amplifikation und Stabilisierung der Aggregation [11].

TXA<sub>2</sub> gehört zur Gruppe der Eicosanoide und wird mithilfe der Cyclooxygenase-1 (COX-1) in Thrombozyten gebildet [33]. Über die Bindung an den Thromboxan-Rezeptor auf Thrombozyten aktiviert TXA<sub>2</sub> weitere Thrombozyten und fördert deren Aggregation. Zudem führt es zu einer Vasokonstriktion von Gefäßen und trägt dadurch einen wichtigen Beitrag zur Hämostase bei [33, 34].

#### 1.2.4 Glykoprotein VI

GPVI ist ein Protein auf der Oberfläche von Thrombozyten. 1982 wurde das ca. 60 Kilodalton (kDa) große Protein erstmals mittels Gelelektrophorese detektiert [13, 35]. Fünf Jahre später wurde bei einem Patienten mit GPVI-Mangel entdeckt,

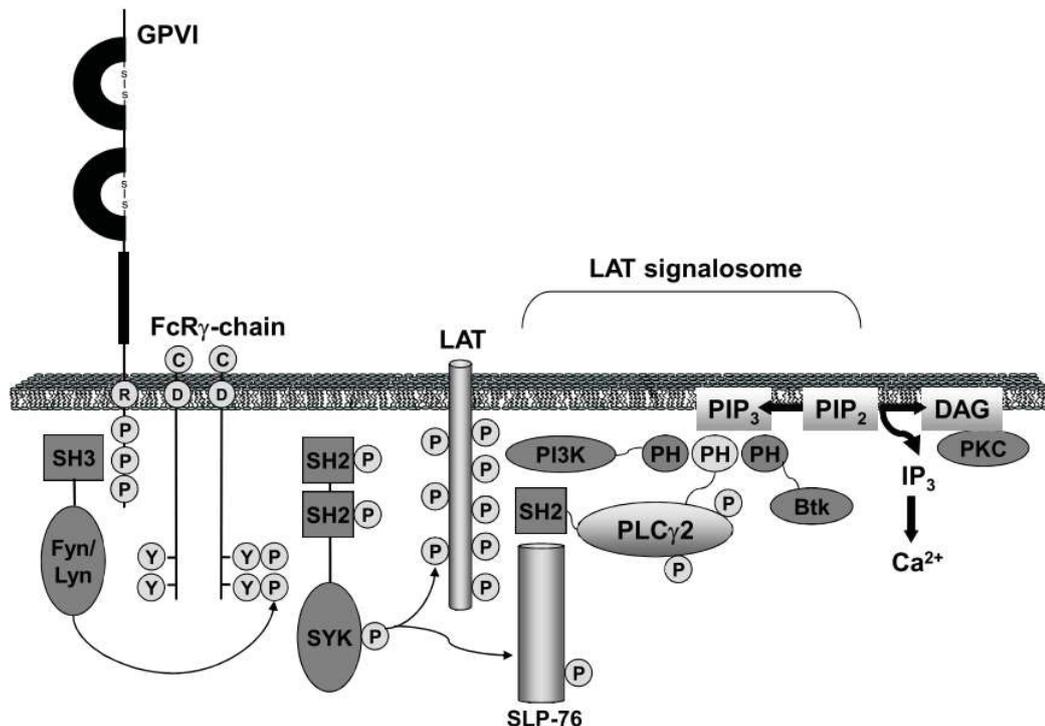
dass seine Thrombozyten eine verminderte Adhäsion an Kollagen zeigen [36]. Heute ist bekannt, dass GPVI der Hauptrezeptor für Kollagen ist [13]. GPVI bindet jedoch ebenfalls an Fibrin [37] und Laminin [38]. Jandrot-Perrus *et al.* konnten zeigen, dass GPVI nur auf Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert wird [39]. GPVI gehört zur Immunglobulin-Superfamilie [40] und wird kontinuierlich auf Thrombozyten in Form von Dimeren exprimiert [41] (Abb. 2). Nach Gefäßverletzung und Freilegung von Kollagenfasern binden die Thrombozyten über GPVI an diese und es kommt zu einem Clustering von GPVI Dimeren [41]. Dadurch erlangen die Thrombozyten eine höhere Affinität zu Kollagen [41, 42].



**Abb. 2: Modell des GPVI/Fc-Rezeptor- $\gamma$ -Ketten Komplexes.**

Der GPVI/fragment crystalized receptor (FcR) $\gamma$ -chain (engl. für Fc-Rezeptor- $\gamma$ -Kette) Komplex besteht aus zwei GPVI Molekülen und einem Fc-Rezeptor- $\gamma$ -Ketten Dimer. Die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen induziert das Clustern von GPVI Dimeren. Die Bildung von Cluster führt zu einer erhöhten Affinität zu Kollagen [41, 42]. Am Ende der FcR $\gamma$ -Kette ist das Immunrezeptor Tyrosin-basierende aktivierende Motiv (ITAM, engl. *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), welches eine entscheidende Rolle für die Signaltransduktion der Thrombozytenaktivierung spielt [42]. Abbildung veröffentlicht mit Genehmigung von EUREKA SCIENCE (FZC), aus Bigalke *et al.* [42], Genehmigung vermittelt durch Copyright Clearance Center, Inc.

Die Signalübertragung erfolgt über die dem GPVI assoziierte *fragment crystallized receptor (FcR)γ-chain* (engl. für Fc-Rezeptor-γ-Kette), an dessen Ende sich das Immunrezeptor Tyrosin-basierende aktivierende Motiv (ITAM, engl. *Immuno-receptor tyrosine-based activation motif*) befindet [41, 42] (Abb. 3). Durch die Bindung von GPVI an Kollagen bindet der sich im Zytosol befindende Teil des Rezeptors spezifisch an die *Src homology 3 (SH3)* Domänen von Fyn und Lyn, die zu den Kinasen der Src-Familie gehören [43] (Abb. 3). Diese führen zu einer Phosphorylierung des ITAM. An das phosphorylierte ITAM bindet die *Spleen tyrosine kinase (SYK)*, die unter anderem durch Phosphorylierung aktiviert wird [44] und die weitere Signalkaskade induziert. Ziel ist die Formierung eines Signalkomplexes (Signalosom), dem verschiedene Proteine wie z.B. *Linker for activation of T cells (LAT)*, *SH2 domain-containing leucocyte protein of 76 kDa (SLP-76)* und Phospholipase C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) angehören [42]. Die aktivierte PLC $\gamma$ 2 spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$ ) mittels Hydrolyse in die beiden sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$ ) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) [42, 45]. DAG führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) während IP $_3$  die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum triggert. Dies führt zu einer starken Integrinaktivierung sowie der Freisetzung von Mediatoren wie ADP und TXA $_2$  und spielt damit eine wichtige Rolle in der Thrombusbildung [42, 46].



**Abb. 3: Schema der von GPVI induzierten Signalkaskade in Thrombozyten.**

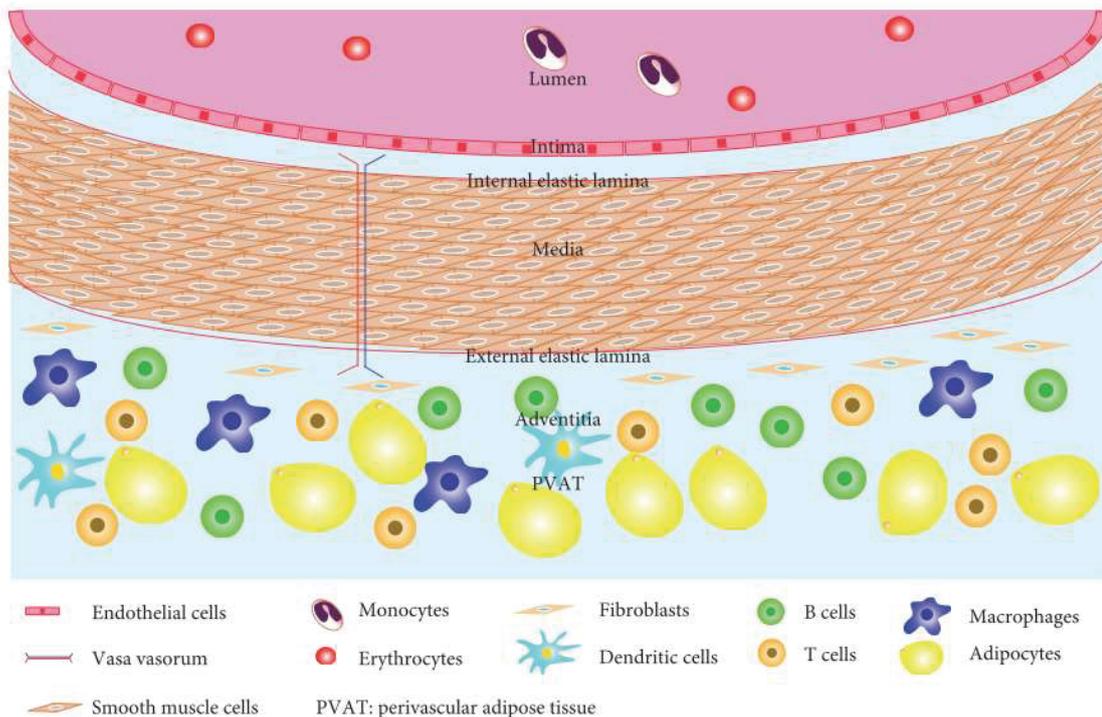
Durch das Andocken von GPVI an Kollagen bindet der sich im Zytosol befindende Anteil von GPVI selektiv an die SH3 Domäne von Fyn und Lyn und induziert die Phosphorylierung des ITAM. Daraus resultiert eine Aktivierung der SYK, die wiederum zur Phosphorylierung verschiedener Proteine führt. Unter anderem werden LAT und PLC $\gamma$ 2 phosphoryliert. Abkürzungen: PH = *Pleckstrin homology domain*; SH2, SH3 = *Src homology domain* [42]. Abbildung veröffentlicht mit Genehmigung von EUREKA SCIENCE (FZC), aus Bigalke *et al.* [42], Genehmigung vermittelt durch Copyright Clearance Center, Inc.

### 1.3 Aufbau der arteriellen Gefäßwand

Der Wandaufbau von Arterien unterscheidet sich je nach Lage, Größe und Funktion. Sie können in Arterien vom elastischen Typ (*Arteriae elastotypicae*) und Arterien vom muskulären Typ (*Arteriae myotopicae*) eingeteilt werden [47]. Zu den Arterien des elastischen Typs zählen z.B. die Aorta und die *Arteria carotis communis* [48]. Diese herznahen Gefäße, insbesondere die Aorta, können durch ihren elastischen Wandaufbau einen Teil des in der Systole ausgeworfenen Blutes speichern und es während der Diastole freigeben [49]. Durch diesen Mechanismus, der als Windkesseneffekt bezeichnet wird, werden Blutdruckspitzen in der Peripherie verhindert und ein kontinuierlicher Blutfluss erreicht [49, 50]. Die Arterien vom muskulären Typ, zu denen z.B. die *Arteria femoralis* zählt, haben im

Vergleich zu den Arterien vom elastischen Typ einen höheren Anteil an glatten Muskelzellen in ihrer Gefäßwand [51]. Sie dienen vor allem zur Verteilung des Blutes im Körper und können durch ihre vasokonstriktorisches und dilatativen Eigenschaften die Blutzufuhr situationsbedingt anpassen [51].

Die Wand von Arterien besteht aus drei Schichten [52]. Von innen nach außen wird sie eingeteilt in *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia* [52] (Abb. 4). Die *Tunica intima* besteht aus einer Schicht Endothelzellen, die der Basalmembran, welche unter anderem Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin enthält, aufliegt [53]. Auch der vWF ist Teil der Basalmembran [54]. In der *Tunica media* finden sich Schichten mit glatten Muskelzellen, Elastin und diverse Komponenten der EZM (siehe Abschnitt 1.4), wie Kollagen Typ I, III und V und verschiedene Proteoglykane [52, 53]. In der *Tunica adventitia* finden sich unter anderem Fibroblasten, Kollagen Typ I und III, Elastin, Fibronectin und viele weitere Proteine der EZM [53, 54]. Der hohe Kollagengehalt in der Adventitia trägt wesentlich zur Verhinderung von Gefäßrupturen bei hohen intraarteriellen Drücken bei [49].



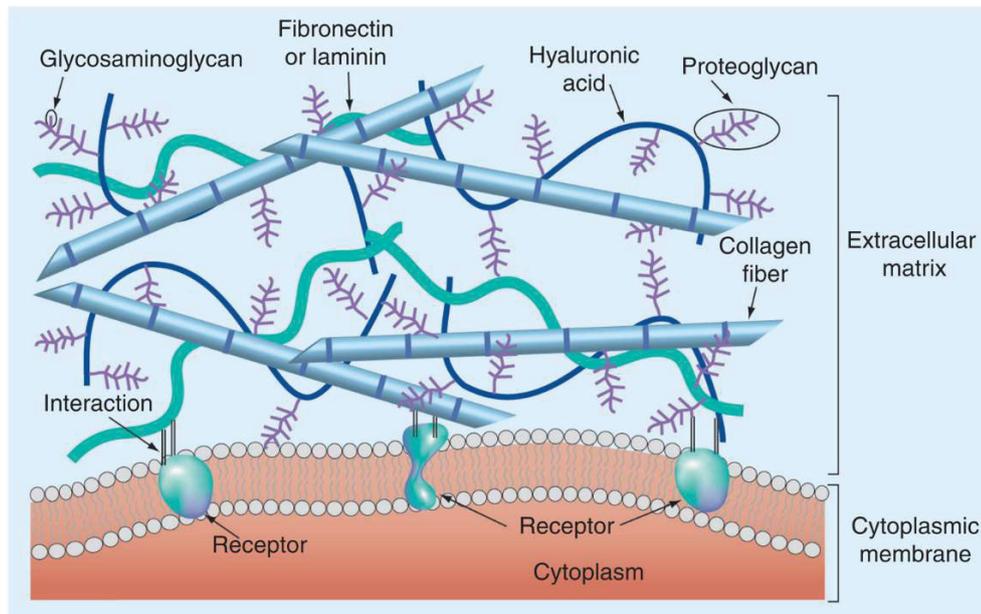
**Abb. 4: Schematischer Wandaufbau einer Arterie.**

Die arterielle Gefäßwand besteht aus der *Tunica intima*, *Tunica media* und der *Tunica adventitia*, die von einer Schicht Fettgewebe umgeben ist. Neben Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Adipozyten finden sich auch Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen in der Gefäßwand [55]. Abbildung mit Genehmigung veröffentlicht, aus Wang *et al.* [55].

## 1.4 Die extrazelluläre Matrix

Die EZM ist eine dreidimensionale azelluläre Struktur, die in jedem Organ in unterschiedlicher und einzigartiger Zusammensetzung vorkommt [56]. Sie gibt Organen und Geweben Struktur und Stabilität und unterliegt ständigen dynamischen Umbauprozessen [57]. Darüber hinaus kann die EZM auch Wachstumsfaktoren wie den Epidermalen Wachstumsfaktor (engl. *Epidermal Growth Factor* (EGF)), Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (engl. *Fibroblast Growth Factor* (FGF)) und andere Signalmoleküle wie z.B. den *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ , engl. für Transformierender Wachstumsfaktor Beta) freisetzen [56]. Teile der EZM interagieren mit Epithelzellen, da sie z.B. als Liganden für Integrine fungieren. Durch diese Interaktion werden Signale vermittelt, die an der Regulierung von Adhäsion, Migration, Proliferation, Apoptose und Differenzierung von Zellen beteiligt sind [56].

Die EZM wird in Säugetieren aus ca. 300 Proteinen gebildet [58] (Abb. 5). Zusätzlich gibt es zahlreiche assoziierte Proteine, wie z.B. Enzyme, die die EZM modifizieren, sowie EZM-bindende Wachstumsfaktoren [58].



**Abb. 5: Modell der extrazellulären Matrix.**

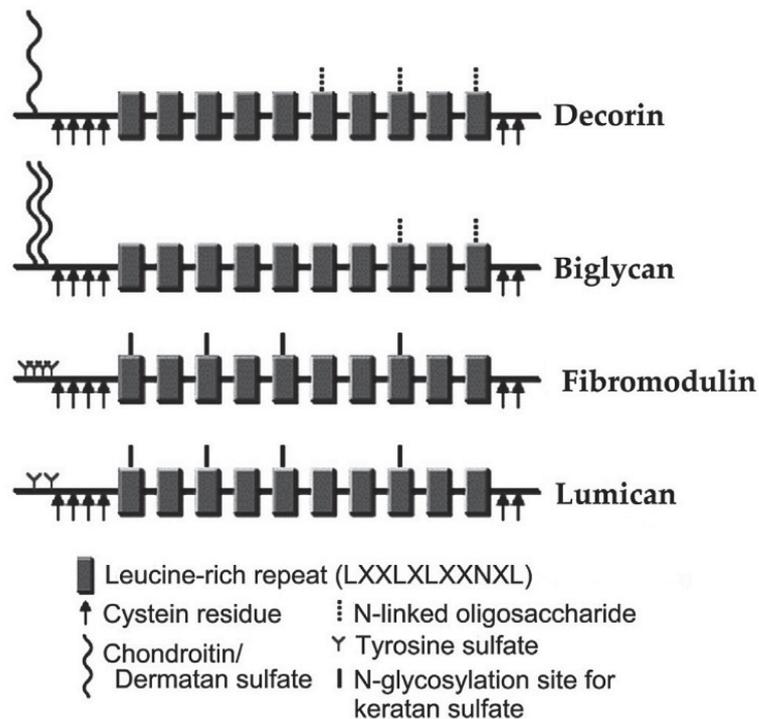
Die extrazellulären Matrixproteine wie Kollagen, Laminin und Fibronectin sind eingebettet in Glykosaminoglykane und Proteoglykane. Um an Oberflächenrezeptoren von Zellen binden zu können, besitzen die extrazellulären Matrixproteine verschiedene Zelladhäsions-Domänen für z.B. Integrine und Selektine [59]. Abbildung veröffentlicht mit Genehmigung von der Taylor and Francis Group (<https://www.tandfonline.com>), Abbildung aus Zhu *et al.* [59].

### 1.4.1 Kollagen

Wichtiger Bestandteil der EZM ist Kollagen. Es macht fast 40 % der gesamten Proteinmenge in Gefäßwänden aus [60] und fungiert hier unter anderem als wichtiger Stabilisator. Bisher sind 28 verschiedene Kollagentypen bekannt [61]. In der Gefäßwand findet sich vor allem Kollagen Typ I, III, IV, V und VI [60, 62]. Die Kollagenfasern liegen im physiologischen Zustand subendothelial und haben dadurch keinen Kontakt zu dem in den Gefäßen fließenden Blut [60]. Erst bei Gefäßverletzung kommt es zu einer Exposition der Kollagenfibrillen gegenüber den Blutzellen und sie spielen dann eine wichtige Rolle in der Hämostase [60] (siehe Abschnitt 1.2.3).

### 1.4.2 Proteoglykane

Proteoglykane sind Glykoproteine, die aus einem Kernprotein bestehen, an das Glykosaminoglykan (GAG)-Seitenketten kovalent gebunden sind [58, 63]. Diese Glykosaminoglykane sind lange Kohlenhydratgruppen, die aus sich wiederholenden Disacchariden bestehen [58] und je nach Zusammensetzung in verschiedene Untergruppen wie z.B. Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Keratansulfat eingeteilt werden können [64]. Nach ihrer Lokalisation lassen sich Proteoglykane in vier Gruppen einteilen: Intrazelluläre, auf der Zelloberfläche liegende, perizelluläre und extrazelluläre Proteoglykane [65]. Die Proteoglykane liegen meist zwischen den Kollagenfibrillen und können durch ihre in der Regel negativ geladenen GAG-Seitenketten Kationen anziehen und Wassermoleküle binden [58, 63]. Die sogenannten kleinen Leucin-reichen Proteoglykane (*small leucine-rich proteoglycans* (SLRPs)) machen die größte Gruppe der Proteoglykane aus und werden zu den extrazellulären Proteoglykanen gezählt [65]. Zu den SLRPs werden 18 Genprodukte gezählt, die wiederum in fünf Klassen eingeteilt werden [65]. Ihre biologischen Funktionen sind sehr vielfältig [65]. Sie haben eine wichtige strukturgebende Funktion [66], unter anderem spielen sie z.B. eine wichtige Rolle in der Fibrillogenese des Kollagens [67-69]. Darüber hinaus sind sie an zahlreichen Signaltransduktionswegen beteiligt [70-72]. Wichtige Vertreter der SLRPs sind unter anderem Decorin, Biglykan (BGN) (siehe Abschnitt 1.5), Fibromodulin und Lumican [65] (Abb. 6).



**Abb. 6: Schematische Darstellung der molekularen Struktur von Vertretern der SLRPs.**

Die SLRPs sind durch ihre Unterschiede in der Zusammensetzung der Aminosäuren und der *leucine-rich-repeats* (LRR, engl. für Leucin-reiche Wiederholungen) des Kernproteins charakterisiert [73]. Decorin und BGN haben eine oder zwei Chondroitinsulfat- oder Dermatansulfat-Seitenketten angehängt. Bei Fibromodulin und Lumican sind es ein bis vier Keratansulfat-Seitenketten [74]. Abbildung aus Ni *et al.* [74], veröffentlicht mit Genehmigung von Elsevier und Glycoword ([www.gak.co.jp](http://www.gak.co.jp)).

### 1.4.3 Glykoproteine der extrazellulären Matrix

Zu der EZM werden neben Kollagen und Proteoglykanen auch ca. 200 Glykoproteine gezählt [58]. Wie auch die anderen extrazellulären Matrixproteine haben sie eine Vielzahl an Funktionen. Sie spielen eine Rolle bei der Anordnung und Verbindung der EZM, fördern die Zelladhäsion, sind Teil von Signalwegen und können Wachstumsfaktoren binden [58]. Zu den Glykoproteinen zählen z.B. Laminin, Elastin, Fibronectin, Vitronectin und der vWF [58].

Der vWF wird von Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert [54]. Er liegt im Blutplasma vor, ist Teil der Basalmembran von Gefäßen und wird in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten sowie den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert [75, 76]. Eine entscheidende Rolle spielt er bei der initialen Thrombozytenadhäsion bei Gefäßverletzung (siehe Abschnitt 1.2.3) und

dient zudem als Transporter für den Blutgerinnungsfaktor VIII in der Zirkulation [75].

## 1.5 Biglykan

BGN gehört zur Klasse-1 Familie der SLRPs [77]. Das für BGN codierende Gen (Biglykan-Gen) liegt auf dem X-Chromosom [65]. An das 42 kDa große Kernprotein, bestehend aus *leucine-rich repeats* (LRR, engl. für Leucin-reiche Wiederholungen), sind eine oder zwei GAG-Seitenketten kovalent gebunden [78, 79] (Abb. 6). Es können sowohl Chondroitinsulfat- als auch Dermatan-sulfat-Glykosaminoglykan-Ketten an das Kernprotein gebunden sein [78].

BGN wird als ein ubiquitär exprimiertes Protein beschrieben [78]. Es interagiert mit verschiedenen Bestandteilen der EZM, wie Kollagen Typ I, II, III und VI sowie Elastin [78]. BGN spielt in zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen eine wichtige Rolle. So ist es unter anderem an adaptiven Umbauprozessen im Herz nach Myokardinfarkt [80], dem Knochenaufbau und Knochenwachstum [81] und der Formierung der Skelettmuskulatur [82] beteiligt.

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass BGN in der Gefäßwand von unterschiedlich großen Arterien lokalisiert ist. So wurde BGN unter anderem in der Wand von Koronararterien [83, 84] und der Aorta [85] detektiert. Heegard *et al.* konnten in der aortalen Wand von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen in Größe und Form veränderte Kollagenfibrillen zeigen und dass diese Mäuse vermehrt spontane Aortendissektionen und -rupturen erleiden [85]. Tang *et al.* untersuchten ebenfalls BGN-defiziente Mäuse und sahen, dass das Fehlen von BGN zu einer erhöhten Rate an Aortenaneurysmata in Mäusen führt [86].

In verschiedenen Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass BGN in atherosklerotischen Plaques bei Atherosklerose exprimiert wird [87-89]. BGN konnte außerdem in humanem Blutplasma detektiert werden und bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom zeigten sich im Vergleich zu herzgesunden Probanden erhöhte BGN-Konzentrationen im Plasma [90]. Diese Daten zeigen, dass BGN eine Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen spielt. Allerdings gibt es bisher keine Untersuchungen dazu ob, bzw. welche Rolle BGN bei einer akuten Gefäßverletzung in Bezug auf die Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung spielt.

Neben seiner Rolle als Strukturprotein fungiert BGN auch als Signalmolekül [78]. Bei einer Gewebeverletzung wird es proteolytisch aus der EZM oder durch Neusynthese in aktivierten Makrophagen freigesetzt [91]. Es wurden diverse proteolytische Enzyme beschrieben, die in der Lage sind, das Kernprotein von BGN zu spalten. Dazu zählen unter anderem das *bone morphogenetic protein 1* (BMP-1, engl. für knochenmorphogenetisches Protein 1) [92], die Matrix-Metalloprotease (MMP)-13 [93] und die MMP-3 [94]. BGN interagiert mit zahlreichen Zytokinen, wie dem TGF- $\beta$ , BMP-4, *Wnt-1-induced secreted protein-1* (WISP-1) und dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) [91]. Als endogener Ligand für *Toll-like-Receptor-2* (TLR2, engl. für Toll-ähnlicher Rezeptor-2) und *Toll-like-Receptor-4* (TLR4, engl. für Toll-ähnlicher Rezeptor-4) führt BGN in Makrophagen zu einer Aktivierung von p38, *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) und *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B), was die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und *macrophage-inflammatory-protein-2* (MIP-2) stimuliert [95].

## 1.6 Ziele der Arbeit

Für die Hämostase und damit für die Vermeidung größerer Blutverluste bei Gefäßverletzungen, spielt vor allem die Freilegung der subendothelialen EZM eine entscheidende Rolle. Über verschiedene Rezeptoren können die Thrombozyten an die EZM binden und werden dadurch aktiviert. Das SLRP BGN ist Teil der EZM und wurde bereits in der Gefäßwand verschiedener Arterien detektiert [83-85]. Im Zusammenhang mit chronischen atherosklerotischen Erkrankungen gibt es bereits Untersuchungen bezüglich BGN und seiner Rolle in der Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung [90]. Es gibt allerdings bisher keine Daten dazu, welche Rolle BGN bei der akuten Gefäßverletzung spielt. Da aber bereits bei Decorin, einem dem BGN verwandten Proteoglykan, bekannt ist, dass Thrombozyten an dieses binden können, und es durch die Bindung zu einer Aktivierung der Thrombozyten kommt [96], ist es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, welche Rolle das extrazelluläre Matrixprotein BGN in der Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung spielt.

Zunächst soll in dieser Arbeit mittels *in vitro* Versuchen untersucht werden, ob Thrombozyten selbst eine Quelle für BGN sind. Unter statischen als auch unter Flussbedingungen soll zudem analysiert werden, ob Thrombozyten an BGN binden können und welchen Einfluss BGN auf die Expression verschiedener für die Hämostase wichtiger Oberflächenproteine auf Thrombozyten hat.

Mittels *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen, die durch ein vollständiges Fehlen von BGN gekennzeichnet sind, soll weiterhin untersucht werden, welchen Einfluss BGN *in vivo* auf die Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung hat.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Arbeitsmaterialien

**Tabelle 1: Verwendete Geräte und Arbeitsmaterialien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma (Sitz)</b>
Autoklav Typ 3870 ELV	Tuttnauer (Breda, Niederlande)
Automatischer Hämatologie-Analysator (KX-21N)	Sysmex (Norderstedt, Deutschland)
Binokular (Mod.A1; s/n 250023)	Exacta + Optech Labcenter SpA (San Prospero, Italien)
BioPhotometer® D30	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Chirurgische Schere gerade spitz-stumpf BC 112 R	Aesculap AG (Tuttlingen, Deutschland)
Doppler-Sonde (Transonic® Flowprobe; 0,5 PSB448)	Transonic Systems Inc. (Ithaca, New York, USA)
Durchflusszytometer FACS-Calibur	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
<i>Electrophoresis Power Supply EV231</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Feuchtekkammer	Simport (Beloeil, Kanada)
Flussskammer	Maastricht Instruments (Maastricht, Niederlande)
Gamma-Bestrahlungsgerät Biobeam GM 2000	Gamma-Service Medical GmbH (Leipzig, Deutschland)
<i>High Temperature Cautery Power Handle (CHANGE-A-TIP™)</i>	Bovie Medical Corporation (Purchase, New York, USA)
Horizontales Minigelsystem (PerfectBlue™, Mini L 40-1214)	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
IKA® MS 1 <i>shaker</i> (Vortexer)	IKA®- Werke GmbH & CO. KG (Staufen, Deutschland)
<i>Universal Hood II Molecular Imager GEL System</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien, USA)
Kaltlichtquelle 1500 LCD	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
Kontinuierliche Spritzenpumpe KDS-100-CE	Kd Scientific (Holliston, Massachusetts, USA)
Labormikrowelle (NN-E201WM)	Panasonic Corporation (Kadoma, Japan)
Leica Mikroskop (DM 2500 MH; 206 <i>water immersion objective</i> , W 206 / 0.5)	Leica Mikrosystems (Wetzlar, Deutschland)

<i>Mastercycler Nexus Gradient Thermal Cycler</i>	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Mikro-Knüpfpinzette, gebogen, FD 281 R	Aesculap AG (Tuttlingen, Deutschland)
Mikro Pinzette (07.61.12)	Medicon eG, Chirurgiemechaniker-Genossenschaft (Tuttlingen, Deutschland)
Mikroplattenleser <i>Sunrise</i>	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Mikroskop Axio Observer.D1	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
Mikroskop Axioskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
neoLab Mini Star Zentrifuge D-6020	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer ( <i>Neubauer improved</i> )	LO-Laboroptik Ltd. (Lancing, England)
pH Meter pH 526	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co, KG, WTW (Weilheim, Deutschland)
Schablone für Blutungszeiten (Durchmesser ca. 1,5 mm)	Zu Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. Maria Grandoch (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland)
Sterilisierbehälter S150	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
Stereomikroskop Zeiss Stemi 2000-C	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
ThermoLux® Wärmeunterlagen	Witte + Sutor GmbH (Murrhardt, Deutschland)
Thermoschüttler TS-100C	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
<i>TS 420 Transit time-perivascular flowmeter</i>	Transonic Systems Inc. (Ithaca, New York, USA)
<i>Total Thrombus-formation Analysis System (T-TAS®)</i>	Fujimori Kogyo Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
Vortexmischer	Cenco Instrumenten (Breda, Niederlande)
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, Deutschland)
Wärmeschrank BE 300	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Wärmeschrank	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Wippschüttler ( <i>Mini-Rocker-Shaker</i> )	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
Zentrifuge Eppendorf 5415C	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Eppendorf 5424R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Sigma 2-16 P	Sigma Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland)
<i>7500 Fast Real-Time PCR System</i>	Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien, USA)

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Auflistung der Verbrauchsmaterialien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma (Sitz)</b>
1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml Spritzen	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
AR-Chips	Fujimori Kogyo Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
BD Vacutainer® Citratröhrchen (4,5 ml) (Mit Citrat-Lösung 0,129 M gepuffertes Natrium-Citrat (= 3,8 %))	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Chiurgischer Faden (Prolene* Polypropylene Suture 6-0 (0.7 Ph. Eur.))	Ethicon, Inc. (Somerville, New Jersey, USA)
Deckgläschen (24 x 60 mm)	Engelbrecht, Medizin und Labortechnik GmbH (Edermünde, Deutschland)
Einmalkanülen Sterican® Gr. 20, G 27 x 3/4'' / Ø 0,40 x 20 mm, grau	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Einweg-Glaskapillaren	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co (Eberstadt, Deutschland)
Einwegskalpelle ( <i>Feather Disposable Scalpel</i> , Nr. 15)	Feather Safety Razor CO., LTD. (Osaka, Japan)
Filterpapier (S & S Faltenfilter)	Whatmann Schleicher & Schuell Micro Science GmbH (Dassel, Deutschland)
„Flow Cytometry“ Röhrchen (5 ml, 75 x 12 mm, PS)	Sarstedt AG & CO (Nümbrecht, Deutschland)
<i>Greiner centrifuge tubes</i> (Falkons) 50 ml	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
UVette® PCR-clean und proteinfrei	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
<i>MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate</i> (0,1 ml)	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Mikroreaktionsgefäße ( <i>SafeSeal</i> Gefäß, 1,5ml)	Sarstedt AG & CO (Nümbrecht, Deutschland)
Nylonfilter ( <i>Falcon® 100 µm Cell Strainer, Yellow, Sterile</i> )	Corning (Corning, New York, USA)
Objektträger (76 x 26 x 1 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co (Lauda-Königshofen, Deutschland)
<i>Optical Adhesive Covers</i> (PCR kompatibel)	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
<i>PCR Soft Tubes</i> , 0,2 ml (DNase-, RNasefrei)	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Wattestäbchen (MaiMed®-Tip (kleiner Kopf))	MaiMed GmbH (Neuenkirchen, Deutschland)

## 2.3 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalie, Puffer, Lösung	Zusammensetzung, Firma (Sitz)
<i>Acid-Citrate-Dextrose</i> (ACD)-Puffer	85 mM Na <sub>3</sub> -Citrat (Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)) 71 mM Citronensäure (Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)) 2 % Glucose (Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)) pH 4,69
<i>Adenosine 5'-diphosphate</i> (ADP)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Agarose	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Apyrase (= <i>adenosine diphosphatase</i> )	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Blockierungslösung	1 % BSA (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)) in <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland))
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
<i>5-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester</i> (CFSE)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Chloroform	VWR (Radnor, Pennsylvania, USA)
<i>Collagen related peptide</i> (CRP)-XL	University of Cambridge (Cambridge, England)
Ca-CTI ( <i>Corn Trypsin Inhibitor</i> )	300 mM CaCl <sub>2</sub> , 1250 µg/ml CTI (Fujimori Kogyo Co., Ltd. (Tokyo, Japan))
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
<i>DNase I recombinant, RNase-free</i>	Roche (Basel, Schweiz)
Eisen (III)-chlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Erythrozytenlyse-Puffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl (Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)) 10 mM KHCO <sub>3</sub> (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)) 0,1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)) pH 7,2-7,4 mit HCl (Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)) einstellen
Ethanol	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Heparin-Natrium 25000 IE	Ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland)
Isopropanol (= 2 Propanol)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Isoamylalkohol (= 3-Methyl-1-butanol)	VWR (Radnor, Pennsylvania, USA)
Isofluran	Actavis (Langenfeld, Deutschland)

Ketavet (Ketamin) 100 mg/ml	Zoetis (Parsippany-Troy Hills Township, New Jersey, USA)
Kollagenreagens Horm Suspension (enthält 1 mg/ml native Kollagenfibrillen aus Pferdeseren in isotoner Glukoselösung)	Takeda (Osaka, Japan)
Lysepuffer für Thrombozyten	15 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)) 155 mM NaCl (Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)) 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)) 0,005 % NaN <sub>3</sub> (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)) 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)) Proteaseinhibitor Mini Cocktail Tablette (Roche (Basel, Schweiz)) IGEPAL® CA-630 (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA))
<i>Midori Green Advance</i>	Nippon Genetics Europe (Düren, Deutschland)
Natriumchlorid 0,9 %	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
<i>Neomycin solution</i> (10 mg/ml in 0,9 % NaCl)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
<i>Protease-activated receptor (Par)4 activated peptide</i>	JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, Deutschland)
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Prostazyklin (PGI <sub>2</sub> )	Calbiochem (San Diego, Kalifornien, USA)
Rekombinantes humanes Biglykan (BGN) (Purity > 95 %)	R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA)
SKF Lösung (isotone Glukoselösung) (pH 2,7-2,9)	Takeda (Osaka, Japan)
Stock I (für Tyrode-Puffer)	2,73 M NaCl (Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)) 53,6 mM KCl (Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)) 238 mM NaHCO <sub>3</sub> (Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)) 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)) 0,5 M Hepes (Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)) auf 1 l destilliertes Wasser auffüllen
Thrombin aus humanem Plasma	Roche (Basel, Schweiz)
TRI Reagent®	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)

TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) (50 x)	121 g Trisbase (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)) 28,5 ml 100 %ige Essigsäure (Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)) 50 ml 0,5 M EDTA (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)) pH = 8,3
<i>Trypan blue solution</i> (0,4 %)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Tyrode-Puffer ohne CaCl <sub>2</sub>	1 ml Stock I 18 ml destilliertes Wasser, 200 µl 0,1 M MgCl <sub>2</sub> (Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)) 200 µl 10 % Glucose (Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)) 720 µl 10 % BSA (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)) pH 7,35 mit NaOH einstellen (Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland))
Tyrode-Puffer + CaCl <sub>2</sub>	2 ml Tyrode-Puffer 40 µl 0,1 M CaCl <sub>2</sub> (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA))
U 46619	Tocris Bioscience (Bristol, Vereinigtes Königreich)
UltraPure™ destilliertes Wasser DNase/RNase frei	Invitrogen AG (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Xylazin 2 % (Xylazinhydrochlorid)	Serumwerk Bernburg AG (Bernburg (Saale), Deutschland)
100 bp-DNA-Leiter	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

## 2.4 Kits

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Kits

Name	Firma (Sitz)
<i>Fast SYBR™ Green Master Mix</i>	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
<i>ImProm-II™ Reverse Transcription System</i>	Promega (Fitchburg, Wisconsin, USA)
<i>KAPA Mouse Genotyping Kit</i>	KAPA Biosystems (Wilmington, Massachusetts, USA)
Maus Biglykan (BGN) ELISA Kit	Cusabio Biotech Co (Wuhan, China)
<i>ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System</i>	Promega (Fitchburg, Wisconsin, USA)
<i>ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System</i>	Promega (Fitchburg, Wisconsin, USA)

## 2.5 Antikörper

**Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Antikörper**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma (Sitz)</b>
<i>FITC-labeled Rat Anti-Mouse GPVI Monoclonal Antibody (JAQ1 / Rat (Wistar) IgG2a – FITC)</i>	EMFRET Analytics GmbH & Co. KG (Eibelsstadt, Deutschland)
<i>FITC-labeled Rat Anti-Mouse/Human Integrin <math>\alpha 5</math> chain (CD49e) Monoclonal Antibody (Tap. A12 / Rat (Wistar) IgG1)</i>	EMFRET Analytics GmbH & Co. KG (Eibelsstadt, Deutschland)
<i>FITC-labeled Rat Anti-Mouse/Human Integrin <math>\beta 3</math> (GPIIIa, CD61) Monoclonal antibody (Luc.H11 / Rat (Wistar) IgG2b)</i>	EMFRET Analytics GmbH & Co. KG (Eibelsstadt, Deutschland)
<i>FITC-labeled Rat Anti-Mouse P-selectin (CD62P) Monoclonal Antibody (Wug.E9 / Rat (Wistar) IgG1)</i>	EMFRET Analytics GmbH & Co. KG (Eibelsstadt, Deutschland)
<i>Phycoerythrin (PE)-labeled Rat Anti-Mouse GPIIb (CD42b) (Xia.G5 / Rat (Wistar) IgG2b)</i>	EMFRET Analytics GmbH & Co. KG (Eibelsstadt, Deutschland)
<i>PE-labeled Rat Anti-Mouse Integrin <math>\alpha IIb\beta 3</math> (GPIIb/IIIa, CD41/61) Monoclonal Antibody (JON/A Rat (Wistar) IgG2b)</i>	EMFRET Analytics GmbH & Co. KG (Eibelsstadt, Deutschland)
<i>Purified Rat Anti-Mouse GPVI Monoclonal Antibody (JAQ1 / Rat (Wistar) IgG2a)</i>	EMFRET Analytics GmbH & Co. KG (Eibelsstadt, Deutschland)

## 2.6 Primer

**Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primer**

<b>Gen</b>	<b>Vorwärtsprimer (5' → 3')</b>	<b>Rückwärtsprimer (5' → 3')</b>
Aktin	ctaaggccaaccgtgaaaag	accagaggcatacagggaca
Biglykan	ctgagggaacttcacttggga	cagatagacaacctggaggag
TNF- $\alpha$	gccccactctgacccttt	gggctggctctgtgaggaa

## 2.7 Software

**Tabelle 7: Verwendete Software-Programme**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma (Sitz)</b>
Adobe® Photoshop® Elements 9	Adobe Systems (San Jose, Kalifornien, USA)
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)

LabChart Reader 8.1.6 Windows	ADInstruments (Dunedin, Neuseeland)
Magellan™- Data Analysis Software	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA)
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA)
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA)
ZEN 2012 (blaue Edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
7500 Software v2.0	Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien, USA)

## 2.8 Versuchstiere

Es wurden BGN-Knockout-Mäuse mit einer gezielten Deletion des BGN Gens [17] und einem *C57BL/6J*-Hintergrund verwendet, sowie männliche Wildtyp *littermates* (WT). Da das für BGN codierende Gen (Biglykan-Gen) auf dem X-Chromosom liegt, wird das vollständige Fehlen von BGN bei den Biglykan-Knockout-Mäusen mit dem Terminus *Bgn*<sup>-0</sup> angegeben [65]. Die Mäuse wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Jens W. Fischer (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zu Verfügung gestellt. Alle Arbeiten mit den Versuchstieren erfolgten gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz und den Richtlinien der FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Association*) und wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW genehmigt (Genehmigung von Versuchen an Wirbeltieren gemäß § 8 Abs. 1 TierSchG i.V.m. § 33 TierSchVersV) (Aktenzeichen 84-02.04.2014.A303).

Es liegt eine Ausnahmegenehmigung gemäß § 16 Abs. 1 Satz 5 TierSchVersV vor, die es Frau Henrike Hörmann erlaubt, die in der oben genannten Genehmigung (Aktenzeichen 84-02.04.2014.A303) beschriebenen Versuche durchzuführen (Aktenzeichen 39/11-102\_7 Hörmann). Frau Henrike Hörmann hat einen Versuchstierkursekurs gemäß Richtlinien der FELASA (Kategorie B) absolviert.

Für Blutentnahmen und Organentnahmen wurden *C57BL/6J* Mäuse (von Janvier Labs erworben) verwendet. Die Blutentnahmen erfolgten nach Anzeige gemäß § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 Tierschutzgesetz (TierSchG) und Genehmigung (Aktenzeichen 84-02.05.20.12.284). Die Organentnahmen erfolgten mit Genehmigung der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität, Aktenzeichen O86/12.

## **2.9 Zellbiologische Methoden**

### **2.9.1 Blutabnahme bei Mäusen**

Unter Inhalationsnarkose mittels Isofluran wird den Mäusen mit Hilfe einer dünnen Glaskapillare Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus abgenommen. Um die Gerinnung des Blutes zu verhindern, wird das Blut in Mikroreaktionsgefäßen mit blutgerinnungshemmenden Substanzen aufgefangen. Diese unterscheiden sich je nach Verwendungszweck. Für die statischen Adhäsionsversuche, die Flusskammer-Experimente und die Genotypisierung wird das Blut in 300 µl Heparin (20 U/ml) aufgenommen. Für die *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISAs) wird das Blut in 200 µl *Acid-citrate-dextrose* aufgenommen. Um eine ausreichende Menge an Blut zu erhalten, wird Blut von mehreren Mäusen mit gleichem Genotyp, Geschlecht und Alter gepoolt.

### **2.9.2 Isolation von murinen Thrombozyten**

Das murine Blut wird in einem Mikroreaktionsgefäß mit 250 g-Kraft (g) für 5 min bei 22 °C zentrifugiert. Der davon gewonnene Überstand wird mit 50 g für 6 min bei 22 °C zentrifugiert. Anschließend wird dem neuen Überstand Apyrase (0,02 U/ml) und Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) (0,5 µM) hinzugefügt und das verbliebene Pellet in 200 µl Tyrode-Puffer resuspendiert. Das Mikroreaktionsgefäß mit dem resuspendierten Pellet wird mit 50 g für 6 min bei 22 °C zentrifugiert und der neu gewonnene Überstand dem Überstand, der in Schritt 3 gewonnen wurde, hinzugefügt. Diese Suspension wird mit 650 g für 5 min bei 22 °C zentrifugiert. Der hierbei entstehende Überstand wird verworfen und das verbleibende Pellet in Tyrode-Puffer, Apyrase (0,02 U/ml) und PGI<sub>2</sub> (0,5 µM) aufgenommen. Nach 5 min bei 37 °C im Wärmeschrank wird die Suspension erneut mit 650 g für 5 min bei 22 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das verbleibende Pellet erneut

vorsichtig in Tyrode-Puffer + CaCl<sub>2</sub> (0,1 M) resuspendiert. Die Anzahl der isolierten Thrombozyten wird anschließend mit einem automatischen Hämatologie-Analysator bestimmt.

### 2.9.3 Statische Adhäsions-Versuche

Die statischen Adhäsions-Versuche dienen hier der Untersuchung der Thrombozytenbindung an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine. Dafür werden zunächst Deckgläschen (24 x 60 mm) in einem definierten Areal von 1 x 1 Zentimeter (cm) mit 70 µl Kollagen (200 µg/ml), 70 µl BGN (10 µg/ml) oder 70 µl BGN (10 µg/ml) plus Kollagen (200 µg/ml) beschichtet und in einer Feuchtekammer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Das Kollagen (Kollagenreagens Horm Suspension) und das BGN werden zuvor mit der SKF-Lösung bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Am folgenden Tag wird die Flüssigkeit vorsichtig von den Deckgläschen abgegossen und die verbleibende Kollagen-, BGN-, und BGN-Kollagen-Matrix mit 400 µl Blockierungslösung (1 % *Bovine Serum Albumin* (BSA)) für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) bedeckt. Für jeden Ansatz werden  $8 \times 10^4$  Thrombozyten in 70 µl Tyrode-Puffer + CaCl<sub>2</sub> verwendet. Die Isolation der Thrombozyten von *C57BL/6J* Mäusen erfolgt wie in Abschnitt 2.9.2 beschrieben. Die Inkubationszeiten der Thrombozyten auf der Matrix betragen je nach Ansatz 5 min, 20 min oder 60 min. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Flüssigkeit von den Deckgläschen abgegossen und die nicht adhärenen Thrombozyten mit 90 µl *phosphate buffered saline* (PBS) vorsichtig abgewaschen. Die Deckgläschen werden umgedreht und mit der beschichteten Matrixseite auf einen Objektträger gelegt. Anschließend können mit Hilfe des Mikroskops *Axio Observer.D1*, mit einer 400-fachen Vergrößerung die adhärenen Thrombozyten dokumentiert werden. Die anschließende Auswertung der Bilder erfolgt mit der Carl Zeiss Software „ZEN 2012“ (blaue Edition). Es erfolgt die Bestimmung der Anzahl der adhärenen Thrombozyten in einem definierten Areal. Dazu werden 3-5 Bilder ausgewertet und anschließend der Mittelwert gebildet.

Für die statischen Adhäsionsversuche mit dem GPVI-Inhibitor (JAQ1-Antikörper (AK)) werden die Deckgläschen wie oben beschrieben vorbereitet und die Thrombozyten wie in Abschnitt 2.9.2 beschrieben aus murinem Blut (von WT und

*Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen) isoliert. Auch hier werden je Ansatz  $8 \times 10^4$  Thrombozyten verwendet. Vor der Inkubation auf den verschiedenen Beschichtungen erfolgt eine 5-minütige Inkubation der Thrombozyten mit 2  $\mu$ l JAQ1-AK (0,5 mg/ml), bzw. Tyrode-Puffer + CaCl<sub>2</sub> in der Kontrollgruppe, bei 37 °C. Der JAQ1-AK ist ein monoklonaler Ratte-Anti-Maus AK, der die Kollagen vermittelte Aggregation von murinen Thrombozyten inhibiert, indem er an GPVI bindet [97]. Anschließend erfolgt die weitere Durchführung des Versuches wie oben beschrieben, allerdings werden die Thrombozyten hier in jedem Ansatz für 20 min auf den verschiedenen Beschichtungen inkubiert.

#### 2.9.4 Flusskammersystem

Die Experimente mit der Flusskammer dienen dazu das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten sowie die Thrombusbildung unter Flussbedingungen zu untersuchen. Die Flusskammer imitiert mit ihrer Objektträgerkammer (50  $\mu$ m x 5 mm) ein Blutgefäß. Unterschiedlich beschichtete Deckgläschen dienen als EZM, die auch bei einer Gefäßverletzung freigelegt werden kann und je nach Zusammensetzung zu einer Adhäsion von Thrombozyten führt. Mithilfe einer kontinuierlichen Spritzenpumpe kann das Blut mit verschiedenen Flussgeschwindigkeiten durch das „künstliche“ Blutgefäß fließen. Dieses Verfahren ist wesentlich physiologischer als die statischen Adhäsionsversuche, da hier auch die dynamischen Eigenschaften, die bei der Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung eine wichtige Rolle spielen, nicht vernachlässigt werden.

Wie auch bei den statischen Adhäsionsversuchen werden zunächst Deckgläschen (24 x 60 mm) in einem definierten Areal von 1 x 1 cm mit 70  $\mu$ l Kollagen (200  $\mu$ g/ml) oder 70  $\mu$ l BGN (10  $\mu$ g/ml) plus Kollagen (200  $\mu$ g/ml) beschichtet und in einer Feuchtekammer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird die verbliebene Flüssigkeit von den Deckgläschen abgegossen und die Matrix mit 400  $\mu$ l Blockierungslösung (1 % BSA in PBS) für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wird die Blockierungslösung abgekippt, das Deckgläschen mit der beschichteten Seite auf die Objektträgerkammer gelegt und in das Aluminiumgehäuse eingebaut. Die beim Einbau entstandenen Luftbläschen werden mithilfe von destilliertem Wasser aus der Objektträgerkammer gespült. Anschließend erfolgt das vorsichtige Spülen mit Tyrode-Puffer + CaCl<sub>2</sub>. Der Zu- und Abfluss in

das System erfolgt über dünne Schläuche, die in einem Winkel von 20° in die Kammer münden. Dadurch kommt es zu einer Reduktion von Verwirbelungen.

Da für einen Flusskammerdurchlauf 0,9 ml Vollblut in Heparin benötigt werden, wird das Blut von mehreren Mäusen gepoolt um eine ausreichende Menge zu erreichen (700 µl Blut in 300 µl Heparin (20 U/ml)). Die 0,9 ml werden in eine 1 ml Spritze aufgenommen. Hierbei ist besonders darauf zu achten, dass keine Bläschen in der Spritze sind. Die Spritze wird in die kontinuierliche Spritzenpumpe eingebaut, die Flusskammer auf das Mikroskop gestellt und an die Spritze angeschlossen.

Die gewünschte Flussgeschwindigkeit wird an der Spritzenpumpe eingestellt (7,5 ml/h oder 12,75 ml/h) und die Pumpe gestartet. Sobald das Blut die Objektträgerkammer erreicht hat, wird die Zeit gestoppt. Nach 3 min werden an mindestens 5 verschiedenen repräsentativen Stellen Bilder mit Hilfe des Mikroskops *Axio Observer.D1* (mit Plan-Neofluar 40x Objektiv) mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) mit einer 400-fachen Gesamtvergrößerung aufgenommen. Die Auswertung der Bilder erfolgt mithilfe der Carl Zeiss Software „ZEN 2012“ (blaue Edition).

Um die Schergeschwindigkeiten zu berechnen, die auf das Blut wirken, wird folgende Formel verwendet [98]:

$$\gamma = \frac{100 Q}{h^2 \times w \times 60}$$

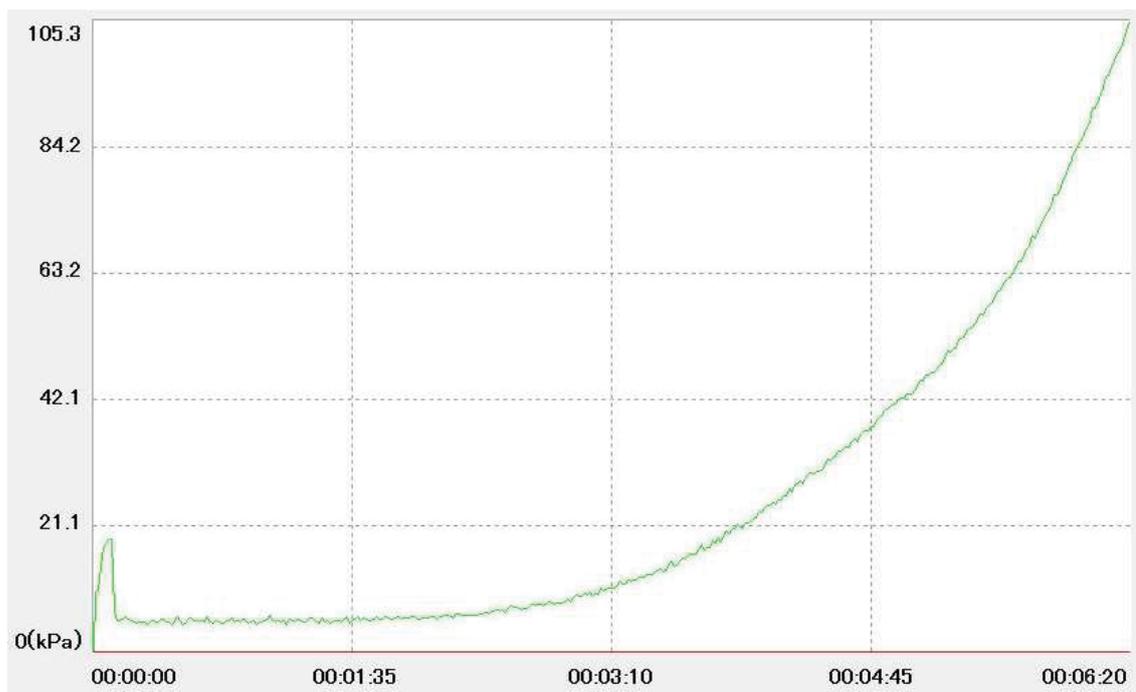
- $\gamma$  = Schergeschwindigkeit in s<sup>-1</sup>  
 $Q$  = Flussgeschwindigkeit des Blutes in ml/h  
 $h$  = Höhe der Kammer in mm  
 $w$  = Breite der Kammer in mm

**Tabelle 8: Verwendete Flussgeschwindigkeiten und Schergeschwindigkeiten in der Flusskammer**

Flussgeschwindigkeit $Q$ [ml/h]	Schergeschwindigkeit $\gamma$ [s <sup>-1</sup> ]
7,5	1000
12,75	1700

### 2.9.5 Total Thrombus-formation Analysis System (T-TAS®)

Mit dem T-TAS® lässt sich die Thrombusbildung unter verschiedenen Flussbedingungen analysieren. In dieses Flusskammersystem werden Mikrochips eingesetzt, die ein Gefäß imitieren und mit verschiedenen Substanzen beschichtet sind. Der hier verwendete AR-Chip (300 µm breit, 80 µm tief und 15 mm lang) ist mit Kollagen sowie Thromboplastin beschichtet. Die Thrombusbildung kann nicht nur über die Video-Mikroskopie (10x) beobachtet und analysiert werden, sondern es werden auch mit Hilfe eines Drucksensors die Veränderungen des Druckes im Mikrochip aufgezeichnet (Abb. 7). Beim Erreichen eines je nach Versuchsaufbau vorher definierten Druckes, gilt das „Gefäß“ als vollständig verschlossen. Die Versuche werden durch eine im System integrierte Heizung unter thermostabilen Bedingungen bei 37 °C durchgeführt.



**Abb. 7: Exemplarisches Bild einer Druckkurve des Total Thrombus-formation Analysis Systems bei der Untersuchung der Thrombusbildung mit Blut von einer WT Maus bei einer Scherrate von 240 s<sup>-1</sup>.**

Die Messung wurde bei ca. 100 kPa abgebrochen. Die x-Achse gibt die Zeit in Minuten an und die y-Achse gibt den Druck im künstlichen Gefäß in kPa an.

### 2.9.5.1 Analyse der Thrombusbildung mit Blut von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen

Das Blut wird, wie in 2.9.1 beschrieben, von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen und WT Mäusen abgenommen. Es wird 425 µl Blut in 75 µl Citrat-Lösung (0,129 M gepuffertes Natriumcitrat (= 3,8 %)) aufgenommen. Das Natriumcitrat bindet die im Blutplasma enthaltenen Calciumionen und verhindert dadurch die vorzeitige Gerinnung.

Pro Lauf werden 480 µl des Blut-Citrat-Gemisches verwendet und mit 20 µl *Ca-Corn Trypsin Inhibitor* (CTI) (final 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 µg/ml CTI) recalcifiziert, wodurch eine Gerinnung wieder ermöglicht wird. 450 µl des Blutes werden in einen kleinen Behälter gefüllt, der mit einer Hochpräzisions-Mikropumpe gekoppelt ist. Mithilfe der Pumpe wird Öl in den Blutbehälter gepumpt und dadurch das Blut in den Mikrochip geleitet. Es werden Schergeschwindigkeiten von 240 s<sup>-1</sup> und 600 s<sup>-1</sup> verwendet.

Das Blut fließt durch den Mikrochip und kommt dadurch in Kontakt mit dem Kollagen sowie dem Thromboplastin mit dem das künstliche „Gefäß“ beschichtet ist. Durch das Kollagen werden unter anderem die Thrombozyten aktiviert. Durch das Thromboplastin kommt es aber auch zu einer Aktivierung des extrinsischen Systems der Blutgerinnung. Die Thrombusbildung wird in Echtzeit mithilfe des Videomikroskops dokumentiert und kann zudem anhand der Druckkurve analysiert werden. Bei Erreichen eines Druckes von ca. 100 Kilopascal (kPa) gilt das künstliche Gefäß als komplett okkludiert und der Versuch wird automatisch beendet. Die Zeit bis zum Erreichen der 100 kPa wird als Okklusionszeit bezeichnet.

### 2.9.5.2 Analyse der Thrombusbildung nach Vorinkubation mit Biglykan

Für diese Ansätze wird Blut von *C57BL/6J* Mäusen abgenommen (425 µl Blut in 75 µl Citrat-Lösung (0,129 M gepuffertes Natrium-Citrat (= 3,8 %)). 475 µl des Blut-Citrat-Gemisches werden mit 20 µl Ca-CTI recalcifiziert. Das Blut wird für 5 min bei RT mit 5 µl BGN (10 µg/ml) inkubiert. Als Kontrolle dienen Proben mit 5 µl PBS. Die darauffolgenden Schritte erfolgen wie in Abschnitt 2.9.5.1 beschrieben. Für die Versuche wird eine Scherrate von 240 s<sup>-1</sup> verwendet.

## 2.9.6 Durchflusszytometrie

### 2.9.6.1 Analyse der Aktivierung von Thrombozyten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen

Von WT Mäusen und *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen wird, wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben, je 100 µl Blut abgenommen und in 300 µl Heparin (20 U/ml) aufgenommen. Für die Ansätze mit ungewaschenem Blut werden davon je 200 µl direkt in 300 µl Tyrode-Puffer + CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Für die Ansätze mit gewaschenem Blut wird das heparinisierte Blut zunächst mit 500 µl Tyrode-Puffer versetzt und mit 650 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das verbleibende Pellet erneut in 500 µl Tyrode-Puffer aufgenommen und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Waschschrift wird noch zwei Mal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wird das Pellet in 500 µl Tyrode-Puffer + CaCl<sub>2</sub> aufgenommen.

Für die *Fluorescence-activated cell sorting*- (FACS) Analysen werden pro Ansatz je 4 µl des P-Selektin-AK (*Fluorescein isothiocyanate* (FITC)-markiert), 4 µl des JON/A-AK (Phycoerythrin (PE)-markiert) (Konzentration 0,5 mg/ml) sowie 3,5 µl einer der Agonisten aus Tabelle 9, bzw. 3,5 µl Tyrode-Puffer + CaCl<sub>2</sub> in der Kontrollgruppe („ruhend“), hinzugefügt. Der JON/A-AK, ein monoklonaler Ratte anti-Maus Integrin αIIbβ3 (GPIIb/IIIa, *Cluster of differentiation* (CD) 41/61) AK, bindet an aktiviertes Integrin αIIbβ3 auf aktivierten Thrombozyten, nicht jedoch an das nicht aktivierte Integrin αIIbβ3 auf ruhenden Thrombozyten [99] und ist deswegen neben dem P-Selektin-AK [23] ein wichtiger Aktivierungsmarker für Thrombozyten.

**Tabelle 9: Liste der Agonisten für die Aktivierung von Thrombozyten zur Analyse der Expression von Oberflächenproteinen mittels FACS**

Agonist	Finale Konzentration
CRP	0,1 µg/ml
CRP	1 µg/ml
CRP	5 µg/ml
ADP	10 mM
ADP / U46	10 mM / 3 µM
<i>Par-4 activated peptide</i>	75 µM
<i>Par-4 activated peptide</i>	100 µM
<i>Par-4 activated peptide</i>	200 µM

Zu den AK und Agonisten werden 23,5 µl des verdünnten Blutes hinzugegeben. Es folgt ein Inkubationsschritt für 7 min bei 37 °C und ein weiterer Inkubationsschritt für 7 min bei RT. Beide Inkubationsschritte erfolgen lichtgeschützt. Die Antikörperbindungsreaktion wird mit 400 µl PBS gestoppt und die Proben im Durchflusszytometer gemessen. Mithilfe der gemessenen gemittelten Fluoreszenzintensität (engl. *mean fluorescence intensity* (MFI)) können die Proben verglichen werden.

### 2.9.6.2 Analyse der Expression von Oberflächenproteinen auf ruhenden Thrombozyten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen

Den Mäusen wird, wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben, je 100 µl Blut abgenommen und in 300 µl Heparin (20 U/ml) aufgenommen. Es folgt die Hinzugabe von 300 µl Tyrode-Puffer. In jedes „*Flow Cytometry*“ Röhrchen werden 5 µl einer der AK aus Tabelle 10 sowie 30 µl des verdünnten Blut-Heparin-Gemisches gegeben. Die Proben werden anschließend für 15 min bei RT inkubiert. Eine weitere Bindung wird anschließend mittels der Zugabe von 400 µl PBS verhindert. Die Messung der Proben erfolgt mittels Durchflusszytometer. Es wird die MFI bestimmt.

**Tabelle 10: Auflistung der Antikörper für die FACS-Analysen von Oberflächenproteinen auf Thrombozyten**

Antikörper gegen	Fluoreszenzfarbstoff
GPIb $\alpha$	PE
Integrin $\beta$ 3	FITC
Integrin $\alpha$ 5	FITC
GPVI	FITC

### 2.9.6.3 Analyse der Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin $\alpha$ IIb $\beta$ 3 auf Thrombozyten nach Vorinkubation mit Biglykan

Es werden 100 µl Blut von *C57BL/6J* Mäusen, wie in 2.9.1 beschrieben, abgenommen und in 300 µl Heparin (20 U/ml) aufgenommen. Das Blut wird wie in Abschnitt 2.9.6.1 beschrieben „gewaschen“. Pro Ansatz werden je 4 µl des P-Se-

lektin-AK (FITC-markiert), 4 µl des JON/A-AK (PE-markiert), 3,5 µl einer der Substanzen aus Tabelle 11 sowie 23,5 µl des „gewaschenen“ Blutes in ein „*Flow Cytometry*“ Röhrchen gegeben. Die weiteren Schritte erfolgen wie in Abschnitt 2.9.6.1 beschrieben.

**Tabelle 11: Auflistung der Ansätze für die Untersuchung der Expression von P-Selektin und Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  auf Thrombozyten mittels FACS**

Ansätze	Finale Konzentration
Tyrode-Puffer + $\text{CaCl}_2$ (ruhend)	
ADP	5 µM
BGN	10 µg/ml
ADP / BGN	5 µM / 10 µg/ml

## 2.10 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur quantitativen Bestimmung von BGN in den Überständen von stimulierten Thrombozyten, wird ein ELISA verwendet. Dafür wird das Maus Biglykan ELISA Kit von Cusabio nach Herstellerangaben verwendet. Dieses Kit beruht auf der sogenannten Sandwich-ELISA-Methode. Hier werden zwei spezifische AK verwendet, die beide an das nachzuweisende Protein binden können. Der erste AK wird als Fangantikörper bezeichnet (engl. *capture antibody*) und ist fest mit der Mikrotiterplatte verbunden. Nach Zugabe der zu untersuchenden Probe bindet er spezifisch das Antigen. Der anschließend hinzugefügte zweite AK dient der Detektion (engl. *detection antibody*) und bindet an ein anderes Epitop desselben Proteins. An diesem AK hängt ein Enzym, das in diesem Kit durch Zugabe des passenden Substrats zu einem Farbumschlag führt. Diese Reaktion wird durch Hinzugabe einer Stopplösung zu einem definierten Zeitpunkt beendet. Durch das Erstellen einer Standardreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen entsteht eine Kalibrierungs-Kurve anhand derer die Konzentration des nachzuweisenden Antigens bestimmt werden kann. Mithilfe eines Photometers wird die Absorption bei einer spezifischen Wellenlänge gemessen und so das Signal quantifiziert.

Für die Gewinnung der Überstände von stimulierten Thrombozyten wird zunächst Blut von *C57BL/6J* Mäusen, wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben, abgenommen

und in Mikroreaktionsgefäßen in 200 µl *Acid-Citrate-Dextrose* (ACD)-Puffer aufgenommen. Die Thrombozyten werden anschließend wie in Abschnitt 2.9.2 beschrieben isoliert. Für jeden Ansatz werden  $7 \times 10^5$  Thrombozyten/µl in 220 µl verwendet. Zu den isolierten Thrombozyten werden in unterschiedlichen Ansätzen je ein Agonist aus Tabelle 12 bzw. bei der Kontrollgruppe Tyrode-Puffer + CaCl<sub>2</sub> gegeben. Die Inkubation der Proben erfolgt für 10 min bei 37 °C in einem Thermoschüttler. Anschließend werden die Proben mit 845 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der dabei gewonnene Überstand wird bei -20 °C gelagert. Das verbleibende Pellet im Mikroreaktionsgefäß wird in 220 µl Thrombozyten-Lysepuffer aufgenommen und bei 4 °C über Nacht gelagert. Am folgenden Tag werden die Proben in den Vortexmischer gestellt und anschließend mit 9.391 g für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird entnommen und wenn nicht direkt verwendet bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 12: Liste der Agonisten für die Thrombozyten-Stimulation**

Agonist	Finale Konzentration
CRP	1 µg/ml
CRP	10 µg/ml
Thrombin	0,02 U/ml
Thrombin	0,1 U/ml

Die in der folgenden Beschreibung benutzen Substanzen sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, alle im Maus Biglykan ELISA Kit von Cusabio enthalten.

Da in diesem Kit die Mikrotiterplatten (mit 96 Lochungen (engl. *wells*)) bereits mit dem *capture antibody* beschichtet sind, wird direkt mit der Probenauftragung begonnen. In jedes *Well* werden je 100 µl der zuvor hergestellten Standardlösungen bzw. der zu untersuchenden Proben pipettiert und anschließend für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wird die Flüssigkeit ausgekippt und je 100 µl des Biotin-AK (*detection antibody*) hinzugefügt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgen drei Waschschritte mit je 200 µl Waschpuffer. Nach dem letzten Waschschritt wird der in den *Wells* verbliebene Waschpuffer aus den *Wells* geklopft und anschließend pro *Well* 100 µl Meerrettichperoxidase (engl. *Horseradish Peroxidase Avidin* (HRP-Avidin)) hinzugefügt und bei 37 °C für eine Stunde

inkubiert. Nach der Inkubationszeit folgen fünf Waschschriffe mit je 200  $\mu\text{l}$  Waschpuffer. Anschließend wird in jedes *Well* 90  $\mu\text{l}$  3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB-Substrat) hinzugefügt und lichtgeschützt für 20 min bei 37 °C inkubiert. In diesem Schritt erfolgt die Spaltung des Chromogens TMB durch die HRP, was sich durch einen blauen Farbumschlag zeigt. Anschließend wird die Enzymreaktion durch Hinzugabe von je 50  $\mu\text{l}$  Stopplösung beendet. Dies geht mit einem gelben Farbumschlag einher. Zuletzt erfolgt die Messung der Absorption mithilfe des Mikroplattenlesers *Sunrise* (Tecan (Männedorf, Schweiz)) bei einer Wellenlänge von 450 nm und die Auswertung mit der Software *Magellan<sup>TM</sup>- Data Analysis* (Tecan (Männedorf, Schweiz)).

## 2.11 Molekularbiologische Techniken

### 2.11.1 Isolierung von Ribonukleinsäure aus murinen Thrombozyten

Die Blutabnahme von *C57BL/6J* Mäusen erfolgt wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben. Das Blut wird in Mikroreaktionsgefäßen mit je 300  $\mu\text{l}$  Heparin (20 U/ml) aufgenommen. Nach der Isolation der Thrombozyten, wie in Abschnitt 2.9.2 beschrieben, werden die isolierten Thrombozyten von 3 Mäusen gepoolt, um eine größere Zellzahl zu erreichen. Die gepoolten Proben werden mit 650 g für 5 min bei 22 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das verbleibende Pellet in 100  $\mu\text{l}$  Lysepuffer aufgenommen und mit dem Vortexmischer gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4 °C wird 800  $\mu\text{l}$  TRI Reagent<sup>®</sup> hinzugefügt und die Proben durch Schütteln gemischt. Die Proben werden 10 min bei RT inkubiert und anschließend wird 200  $\mu\text{l}$  Chloroform hinzugegeben. Erneut werden die Proben durch Schütteln gemischt und bei RT für 10 min inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt mit 9.391 g für 10 min bei 4 °C. Es werden verschiedene Phasen im Reaktionsgefäß sichtbar. Die obere wässrige Phase wird vorsichtig entnommen und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und 800  $\mu\text{l}$  Chloroform-Isoamylalkohol (Verdünnung 24:1) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei RT erfolgt eine erneute Zentrifugation der Proben mit 9.391 g für 10 min bei 4 °C. Erneut wird die obere wässrige Phase entnommen und in ein neues Mikroreaktionsgefäß gegeben. Nach der Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol werden die Proben kräftig geschüttelt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgt die Zentrifugation der Proben mit 16.464 g für 10 min bei 4 °C. Das

Isopropanol wird anschließend abgekippt und das verbleibende Pellet 10-30 min an der Luft getrocknet und danach in 20 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Für die photometrische Bestimmung der Ribonukleinsäure- (RNS, engl. *ribonucleic acid* (RNA)) Konzentration und der Reinheit erfolgt eine 1:10 Verdünnung mit RNase-freiem Wasser. Die RNA wird bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **2.11.2 Isolierung von Ribonukleinsäure aus murinen Herzen**

Die Herzentnahme erfolgt an narkotisierten (Ketavet [90 mg/Kilogramm Körpergewicht (kg KG)] und Xylazin [10 mg/kg KG] in NaCl aufgezogen) *C57BL/6J* Mäusen nach Eröffnung des Thorax und Spülung des Herzens mit ca. 4 ml gekühlter Heparinlösung (20 U/ml in *Phosphate buffered saline* (PBS)) durch Frau Dr. rer. nat. Meike Klier. Diese Spülung wird durchgeführt, um eine Thrombusbildung im Gefäßsystem und im Herz zu verhindern. Appliziert wird die Heparinlösung in die Herzspitze (*Apex cordis*) bei noch schlagendem Herzen. Zudem wird der rechte Vorhof des Herzens eröffnet, um das Durchspülen zu gewährleisten. Das entnommene Herz wird mit gekühltem PBS gespült und der linke Ventrikel abgetrennt und gewogen. Mittels Mörser und Flüssigstickstoff wird er pulverisiert.

Die RNA-Isolierung wird mit dem *ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System* (Promega (Fitchburg, Wisconsin, USA)) gemäß der Empfehlung des Herstellers durchgeführt. Der pulverisierte linke Ventrikel wird mit dem LBA- und TG-(1-Thioglycerol) Puffer gewichtsadaptiert vermischt und durch 7-10-maliges auf- und abpipettieren lysiert. Ein Teil des Lysats kann jetzt für spätere Versuche weggefroren werden. Dem verbleibenden Lysat wird volumenadaptiert der *RNA-Dilution Buffer* (RDB) hinzugefügt und für 10 s mittels Vortexmischer vermischt. Anschließend folgt eine 1-minütige Inkubation bei RT. Um nicht-lysierte Bestandteile aus der Probe zu entfernen erfolgt ein 3-minütiger Zentrifugationsschritt mit 14.000 g. Der klare Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und an das Volumen angepasstes Isopropanol (100 %) hinzugefügt. Zur Vorbereitung der weiteren Schritte wird die Säule in ein Auffangröhrchen platziert und 700 µl der Probe auf die Säule gegeben. Es folgt ein Zentrifugationsschritt mit 14.000 g für 1 min bei 20-25 °C. Der Unterstand wird verworfen. Die Säule wird erneut auf

einem Auffangröhrchen platziert und 500 µl der *RNA Wash Solution* werden hinzugefügt. Die anschließende Zentrifugation erfolgt mit 14.000 g für 30 s. Das Auffangröhrchen wird geleert und 30 µl des *DNase I incubation mix* auf die Säule gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wird der Säule 200 µl der *Column Wash Solution* hinzugefügt und für 15 s mit 14.000 g zentrifugiert. Die gebundene RNA wird nun zweimalig mit 500 µl bzw. 300 µl *RNA Wash Solution* für 30 s bzw. 2 min bei 14.000 g gewaschen. Die Säule wird dann in ein *Elution tube* gestellt und über einen Zentrifugationsschritt bei 14.000 g über 1 min in 20 µl RNase freiem Wasser aufgenommen. Die Menge und Reinheit werden photometrisch in einer 1:10 Verdünnung bestimmt. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

### 2.11.3 Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA)-Synthese

Die cDNA-Synthese aus RNA mittels Reverser Transkriptase schließt sich der RNA-Isolierung an. Für die Synthese wird unter anderem das *ImProm-II™ Reverse Transcription System Kit* (Promega (Fitchburg, Wisconsin, USA)) eingesetzt. Pro Ansatz werden 0,165 µg RNA in 18 µl RNase freiem Wasser eingesetzt.

Vor Beginn der cDNA-Synthese werden jeder Probe 2 µl *DNase I* hinzugefügt und im Thermozykler (*Mastercycler Nexus Gradient Thermal Cycler* (Eppendorf (Hamburg, Deutschland))) für 30 min bei 37 °C und anschließend für 10 min bei 75 °C erhitzt. Dadurch wird ein DNase-Verdau erreicht und damit eine etwaige Kontamination der isolierten RNA-Proben mit DNA beseitigt.

Für die cDNA-Synthese wird zunächst ein Mastermix, wie in Tabelle 13 beschrieben, hergestellt.

**Tabelle 13: Zusammensetzung Mastermix für cDNA-Synthese für einen Ansatz**

Name	Volumen
<i>ImProm-II™ 5X Reaction Buffer</i>	4,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (7 mM)	2,5 µl
dNTP Mix (0,5 mM)	1,0 µl
<i>Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor</i>	0,5 µl
<i>ImProm-II™ Reverse Transcriptase</i>	1,0 µl

Jeder Probe werden 2 µl des Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primers (aus dem Kit) sowie 9 µl des Mastermixes hinzugefügt. Während dieser Schritte befinden sich die Proben auf Eis, um das Risiko für eine Schädigung der RNA zu reduzieren.

Anschließend erfolgt die Synthese der cDNA im Thermozykler (*Mastercycler Nexus Gradient Thermal Cycler* (Eppendorf (Hamburg, Deutschland))) mit dem Programm welches in Tabelle 14 beschrieben ist. Die cDNA wird, wenn nicht direkt verwendet, bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 14: Programm im Thermozykler für die cDNA-Synthese**

Phase	Temperatur [°C]	Dauer [min]
<i>Annealing</i>	25	5
<i>Extension</i>	42	60
Inaktivierung der Reversen Transkriptase	72	15

#### 2.11.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction* (qRT-PCR)) wird mit dem *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien, USA)) und dem in Tabelle 15 beschriebenen Programm durchgeführt. Als Fluoreszenzfarbstoff wird SYBR Green verwendet (*Fast SYBR<sup>TM</sup> Green Master Mix* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA))). Aktin wird als sogenanntes Haushaltsgen (engl. *housekeeping gene*) verwendet, welches hier als interne Kontrolle dient und die relative Quantifizierung ermöglicht. Es wird kontinuierlich, unabhängig von äußeren Einflüssen, exprimiert. Pro Well der 96-Well-Platte werden 20 µl der zu untersuchenden Ansätze eingesetzt. Die Zusammensetzungen für die verschiedenen Ansätze sind in Tabelle 16, Tabelle 17 und Tabelle 18 beschrieben.

**Tabelle 15: Programm qRT-PCR**

Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
95	20	<i>hold</i>
95	3	40
60	30	

Tabelle 16: Ansatz pro *Well* für Aktin (qRT-PCR)

Name	Volumen
<i>Fast SYBR™ Green Master Mix</i>	10 µl
Aktin Vorwärtsprimer	1 µl
Aktin Rückwärtsprimer	1 µl
UltraPure™ Destilliertes Wasser DNase/RNase frei	6 µl
cDNA	2 µl

Tabelle 17: Ansatz pro *Well* für Biglykan (qRT-PCR)

Name	Volumen
<i>Fast SYBR™ Green Master Mix</i>	10 µl
BGN Primer-Mix (2,5 pmol/µl Vorwärtsprimer + 2,5 pmol/µl Rückwärtsprimer)	5 µl
UltraPure™ Destilliertes Wasser DNase/RNase frei	3 µl
cDNA	2 µl

Tabelle 18: Ansatz pro *Well* für TNF-α (qRT-PCR)

Name	Volumen
<i>Fast SYBR™ Green Master Mix</i>	10 µl
TNF-α Vorwärtsprimer	1 µl
TNF-α Rückwärtsprimer	1 µl
UltraPure™ Destilliertes Wasser DNase/RNase frei	6 µl
cDNA	2 µl

Mithilfe der *Cycle threshold* (Ct)-Werte und der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode wird die relative Genexpression im Vergleich zur internen Kontrolle (hier Aktin) berechnet. Dafür wird die *7500 Software v2.0* (Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien, USA)) verwendet.

### 2.11.5 Genotypisierung der Blutzellen von Knochenmarkchimären

Um zu kontrollieren, ob die Generierung der Knochenmarkchimären erfolgreich war, werden die Blutzellen der Knochenmarkchimären genotypisiert. Dazu werden 200 µl heparinisiertes Blut verwendet, das den Mäusen, wie in 2.9.1 beschrieben, abgenommen wird.

### **2.11.5.1 Herstellung der Eluate mithilfe des *ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep Systems***

Die heparinisierten Blutproben werden zunächst für 10 min auf einem Wippschüttler bei RT zur Durchmischung geschwenkt. Anschließend werden 200 µl des heparinisierten Blutes mit 20 µl Proteinase K versetzt. Es werden 200 µl des Zellysepuffers aus dem Kit hinzugefügt und die Proben für 10 s in den Vortexmischer gestellt. Die Proben werden dann für 10 min in einen Wärmeschrank bei 56 °C gestellt.

Währenddessen wird die Bindungssäule in das Auffangröhrchen gestellt. Die Proben werden aus dem Wärmeschrank genommen und es werden 250 µl Bindepuffer hinzugefügt. Erneut werden die Proben für 10 s in den Vortexmischer gestellt. Der Inhalt eines Mikroreaktionsgefäßes wird nun in eine Bindungssäule überführt und bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Das Lysat wird durch die Zentrifugation vollständig durch die Membran gepresst. Das Auffangröhrchen wird mit Inhalt verworfen. Die Bindungssäule wird in ein neues Auffangröhrchen gestellt und es werden 500 µl einer Waschlösung hinzugefügt. Erneut folgt ein Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit für diesmal 3 min. Anschließend wird der Waschschrift noch zwei Mal wiederholt.

Die Bindungssäule wird dann in ein neues Mikroreaktionsgefäß gestellt und es werden 50 µl DNase/RNase-freies Wasser hinzugefügt. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wird die Bindungssäule verworfen und das Eluat bis zur Durchführung der PCR eingefroren.

### **2.11.5.2 PCR für die Genotypisierung**

Die Durchführung der PCR für die Genotypisierung der Blutzellen der Knochenmarkchimären erfolgt nach dem Protokoll des *KAPA Mouse Genotyping Kits* (KAPA Biosystems (Wilmington, Massachusetts, USA)). In Tabelle 19 ist die Zusammensetzung für einen Ansatz dargestellt.

**Tabelle 19: Zusammensetzung eines Ansatzes für die PCR zur Genotypisierung**

Name	Volumen
Destilliertes Wasser DNase/RNase frei	7,75 µl
BGN Vorwärtsprimer	1,25 µl
BGN Rückwärtsprimer	1,25 µl
<i>Phosphoglycerate kinase</i> (PGK)1 Primer (tggatgtggaatgtgtgcgagg)	1,25 µl
KAPA-Mix	12,5 µl
DNA Eluat	1 µl

Die Ansätze werden mit dem Protokoll aus Tabelle 20 im Thermozykler (*Mastercycler Nexus Gradient Thermal Cycler* (Eppendorf (Hamburg, Deutschland))) bearbeitet.

**Tabelle 20: Protokoll für die PCR im Thermozykler bei der Genotypisierung der Knochenmarkchimären**

	Temperatur [°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	3 min	
Denaturierung	95	15 s	
<i>Annealing</i>	60	15 s	38
Elongation	72	15 s	
Finale Elongation	72	1 min	

Mittels Gelelektrophorese werden die entstandenen Produkte (für *Bgn*<sup>-0</sup> 319 bp und für WT 212 bp groß) nachgewiesen. Es wird dazu ein 1 %iges Agarosegel/TAE-Puffer mit *Midori Green Advance* (Nippon Genetics Europe (Düren, Deutschland)) verwendet.

## 2.12 Tierversuche

### 2.12.1 Blutungszeiten

Die Blutungszeiten werden bei WT Mäusen, *Bgn*<sup>-/-</sup> Mäusen und Knochenmarkchimären, deren Generierung in Abschnitt 2.12.4 beschrieben ist, bestimmt. Für die Narkose wird den Tieren ein Ketavet-Xylazin Gemisch (Ketavet [90 mg/kg KG] und Xylazin [10 mg/kg KG] in NaCl aufgezogen) intraperitoneal gespritzt. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wird die Schwanzspitze mithilfe einer Schablone an einem definierten Durchmesser mittels eines scharfen Skalpells abgeschnitten. Die Schwanzspitze wird in ein Falcon® mit 37 °C warmen 0,9 % NaCl gelegt. Um die Temperatur von 37 °C zu halten, stehen die Falcons® in einem warmen Wasserbad. Da der Rand des Wasserbades auf dem die Mäuse liegen auch gewärmt ist, wird ein Auskühlen der Mäuse verhindert. Es wird die Zeit gemessen bis die Blutung vollständig gestoppt hat. Anschließend werden die Mäuse bis zum Erwachen auf eine Wärmematte gelegt.

### 2.12.2 Ligatur der *Arteria carotis communis*

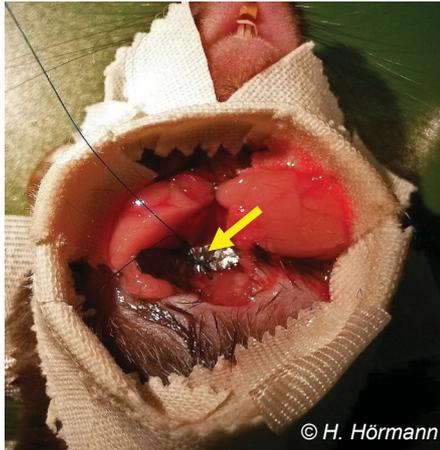
Zur Untersuchung des Einflusses von BGN auf die Thrombozytenadhäsion *in vivo* wird das Ligatur-Modell in der Maus angewendet. Durch die Ligatur wird eine Gefäßwandverletzung der *Arteria carotis communis* induziert. Mithilfe von fluoreszenzmarkierten Thrombozyten, die intravenös injiziert werden, lässt sich mit einem *in-vivo*-Videomikroskop die Adhäsion der Thrombozyten live in der Maus untersuchen.

Zunächst erfolgt die Blutabnahme von WT und *Bgn*<sup>-/-</sup> Mäusen wie in 2.9.1 beschrieben. Anschließend erfolgt die Isolation von Thrombozyten wie in 2.9.2 erklärt. Pro Ansatz werden  $8 \times 10^6$  Zellen in 200 µl PBS aufgenommen. Diese werden mit 50 µl 5-Carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE) (4,48 mM; gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO)) für 30 min bei 37 °C inkubiert und dadurch fluoreszenzmarkiert.

Während der Inkubationszeit erfolgt die Präparation der Mäuse. Diese werden mit einem Ketavet-Xylazin Gemisch (Ketavet [90 mg/kg KG] und Xylazin [10

mg/kg KG] in NaCl aufgezo- gen), welches intraperitoneal gespritzt wird, narkotisiert. Nach Erreichen einer tiefen Narkose erfolgt die Präparation der rechten *Arteria carotis communis* unter einem Binokular. Die Maus wird dazu in Rückenlage mit Klebestreifen fixiert. Es folgt ein kleiner senkrechter Hautschnitt unterhalb des Kinns. Dieser Hautschnitt darf nicht zu groß gewählt werden, da sonst kein ausreichend hoher Wasserspiegel im Operationsgebiet hergestellt werden kann. Dieser ist aber essenziell für die *in-vivo*-Mikroskopie. Sollte das Wasser dennoch ablaufen, kann mithilfe von Klebestreifen nach der fertigen Präparation ein „Pool“ gebaut werden, der das Abfließen des Wassers verhindert (Abb. 8 und Abb. 9).

Nach dem Hautschnitt erfolgt die Freipräparation der Speicheldrüsen. Diese werden mittig voneinander getrennt und zur jeweiligen Seite gelegt. Um zur *Arteria carotis communis* zu gelangen muss die *Vagina carotica* vorsichtig eröffnet werden. Nach Freipräparation der *Arteria carotis communis* wird vorsichtig ein dünnes Plättchen unter die Carotis gelegt (Abb. 8). Dies erleichtert die Durchführung der Ligatur mit einem chirurgischen Faden. Vor Ausführung der Ligatur werden den Mäusen die fluoreszenzmarkierten Thrombozyten intravenös injiziert (je Maus 250  $\mu$ l). Die WT Mäuse bekommen die fluoreszenzmarkierten WT-Thrombozyten und die *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse die fluoreszenzmarkierten *Bgn*<sup>-0</sup> Thrombozyten gespritzt. Die Ligatur der rechten *Arteria carotis communis* wird mit einem chirurgischen Faden (*Polypropylene Suture 6-0*) für 5 min durchgeführt und anschließend wieder geöffnet. Dadurch wird eine Gefäßverletzung induziert.



**Abb. 8: Freipräparierte *Arteria carotis communis* mit Kontrastplättchen und Ligatur.**

Gelber Pfeil markiert rechte *Arteria carotis communis*.



**Abb. 9: Versuchsaufbau der *in-vivo*-Videomikroskopie.**

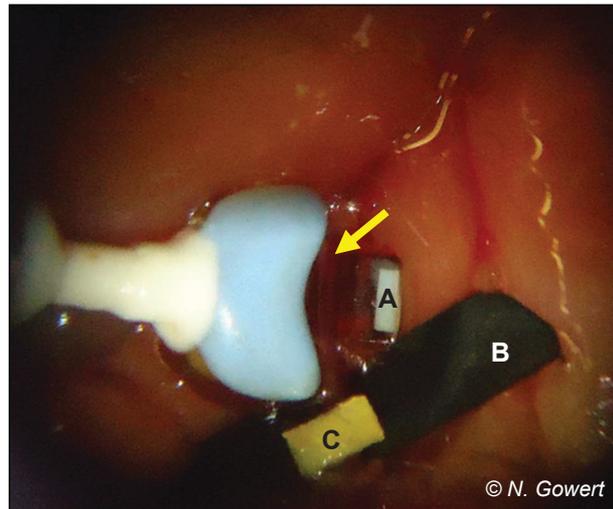
Durch die Wandverletzung kommt es zur Adhäsion von Thrombozyten, die durch die Fluoreszenzmarkierung mittels *in-vivo*-Fluoreszenzmikroskopie (Leica Mikroskop (DM 2500 MH; 206 *water immersion objective*, W 206/0.5) (Leica Mikrosystems (Wetzlar, Deutschland))) dokumentiert werden kann. Es werden Videosequenzen 5 min, 10 min und 30 min nach Ligatur an der Stelle der Gefäßverletzung aufgenommen. Anschließend werden die adhärenenten Thrombozyten in einem definierten Areal gezählt.

### 2.12.3 Okklusionsmodell der *Arteria carotis communis*

Mit diesem Versuch wird die Zeit bis zur kompletten Okklusion durch die Generierung eines Thrombus in der rechten *Arteria carotis communis* nach einer Gefäßverletzung mittels  $\text{FeCl}_3$  bestimmt. Die Versuche werden an WT Mäusen, *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen und Knochenmarkchimären, deren Generierung in Abschnitt 2.12.4 beschrieben ist, durchgeführt. Zur Messung des Flusses in der *Arteria carotis communis* wird eine Doppler-Sonde verwendet, die unter dem Gefäß platziert wird. Vor Beginn einer Messung wird die Flusssonde kalibriert. Gemessen wird der Fluss im Gefäß in ml/min sowie die Herzfrequenz in Schläge/min. Die Messung des Flusses beruht auf dem Doppler-Prinzip.

Die Mäuse werden zunächst mit einem Ketavet-Xylazin Gemisch (Ketavet [90 mg/kg KG] und Xylazin [10 mg/kg KG] in NaCl aufgezo-gen), welches intrape-ritoneal gespritzt wird, narkotisiert. Anschließend erfolgt die mikrochirurgische Freipräparation der rechten *Arteria carotis communis* unter dem Mikroskop (Ster-eomikroskop Zeiss Stemi 2000-C, Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutsch-land)), wie in Abschnitt 2.12.2 beschrieben. Die Doppler-Sonde (Transonic® Flowprobe; 0,5 PSB448) wird vorsichtig unter die rechte *Arteria carotis communis* gelegt (Abb. 10). Mit isotoner Kochsalzlösung wird ein Wasserspiegel im Opera-tionsgebiet aufgebaut und der Blutfluss im Gefäß gemessen. Anschließend wird distal der Dopplersonde ein Kontrastplättchen unter die rechte *Arteria carotis communis* gelegt und das Gefäß sowie die Umgebung vorsichtig mit einem Wat-testäbchen getrocknet. Dieser Trocknungsvorgang ist für den nächsten Schritt wichtig, denn hier wird ein Filterpapier (1x2 mm groß), das mit 15 %iger FeCl<sub>3</sub>-Lösung getränkt ist, auf Höhe des Kontrastplättchens auf die *Arteria carotis com-munis* gelegt und für 3 min dort belassen (Abb. 10). Wäre die Umgebung nicht trocken, würde sich die FeCl<sub>3</sub>-Lösung unkontrolliert im Operationsgebiet verbrei-ten und der gewünschte Effekt einer lokalen chemischen Gefäßverletzung durch das FeCl<sub>3</sub> wäre nicht mehr gegeben.

Nach 3 min wird das Filterpapier sowie das Kontrastplättchen vorsichtig entfernt und im Operationsgebiet wieder ein Wasserspiegel mit isotoner Kochsalzlösung hergestellt. Nur so ist eine Messung durchführbar. Die Flussrate wird in ml/min aufgezeichnet. Anhand der sich verändernden Flussrate wird sichtbar, wann die Thrombusbildung gestartet hat und wann es zu einer vollständigen Okklusion des Gefäßes durch einen Thrombus gekommen ist. Wenn es nicht zu einer Okklusion kommt wird der Versuch nach 3.600 s abgebrochen.



**Abb. 10: Versuchsaufbau des Okklusionsmodells.**

Gelber Pfeil zeigt rechte *Arteria carotis communis*, **A** zeigt die Doppler-Sonde, **B** zeigt das Kontrastplättchen, **C** zeigt das mit  $\text{FeCl}_3$  getränkte Filterpapier. Foto veröffentlicht mit Genehmigung von N. Gowert.

#### 2.12.4 Generierung von Knochenmarkchimären

Die Generierung der Knochenmarkchimären erfolgt mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (Aktenzeichen 84-02.04.2013.A210).

Die Durchführung der Generierung erfolgt mit Hilfe der institutsinternen Tierärztinnen Nina Gowert und Irena Krüger.

Es werden ca. 12 Wochen alte WT Mäuse und *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse mit dem Gamma-Bestrahlungsgerät Biobeam GM 2000 (Gamma-Service Medical GmbH (Leipzig, Deutschland)) einmalig mit 10 Gray (Gy) für 3.25 min am ganzen Körper bestrahlt. Durch die Bestrahlung wird das körpereigene Knochenmark zerstört.

Nach zervikaler Dislokation der Spendertiere (ebenfalls WT Mäuse und *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse) erfolgt die Präparation von Femur und Tibia. Zunächst wird das die Knochen umgebende Gewebe entfernt und die Hinterbeine aus dem Hüftgelenk luxiert. Anschließend wird das Femur direkt distal des *Caput ossis femoris* sowie proximal des *Condylus medialis* und *Condylus lateralis* abgetrennt. Bei der Tibia wird ebenfalls das *Caput tibiae* (proximales Ende der Tibia) sowie das distale

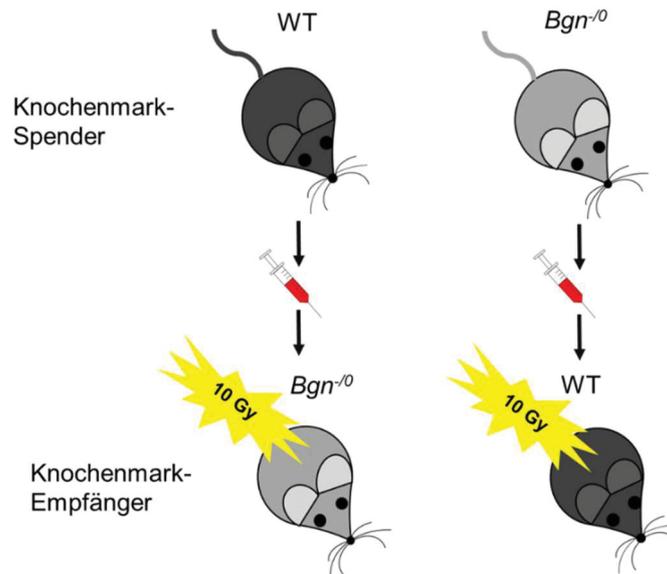
Ende mit dem *Malleolus medialis* vom Schaft abgetrennt. Dadurch sind Femurschaft und Tibiaschaft am proximalen sowie distalen Ende „offen“ und das Knochenmark kann mit gekühltem sterilem PBS (in einer 20 ml Spritze mit einer 27 G Kanüle) aus dem Knochen durch einen Nylonfilter in ein 50 ml fassendes konisches Zentrifugenröhrchen gespült werden.

Es folgt eine Zentrifugation mit 500 g für 10 min. Der entstehende Überstand wird abgenommen und verworfen. Das verbleibende Pellet wird mit 1 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgt eine erneute Zentrifugation mit 500 g für 10 min. Der Überstand wird wieder verworfen und das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert.

Da jedes Empfängertier  $5 \times 10^6$  Knochenmarkzellen erhalten soll, wird die Zellzahl des gespendeten Knochenmarks mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Aus der 500 µl Zellsuspension werden 10 µl entnommen und in 990 µl PBS aufgenommen. Aus dieser Verdünnung werden wiederum 10 µl abgenommen und mit 10 µl Trypanblau versetzt. Durch das Trypanblau werden die Zellen angefärbt und lassen sich in der Neubauer-Zählkammer besser zählen.

Die  $5 \times 10^6$  Zellen werden den zuvor bestrahlten Empfängertieren in 150 µl intravenös appliziert. Die WT Mäuse erhalten Knochenmark von *Bgn*<sup>-/-</sup> Mäusen und die *Bgn*<sup>-/-</sup> Mäuse Knochenmark von WT Mäusen (Abb. 11). Da die Empfängertiere aufgrund der Knochenmark-Depletion eine hohe Infektionsgefahr haben, erfolgt eine prophylaktische antibiotische Therapie mit Neomycin (65,2 mg/ 50 ml Trinkwasser) für 2 Wochen.

6 Wochen nach der Knochenmarktransplantation erfolgt eine Genotypisierung aus den Blutzellen wie in 2.11.5 beschrieben. Die Genotypisierung erfolgt zur Kontrolle ob die Knochenmarktransplantation erfolgreich war und die Blutzellen der Empfängermäuse den Genotyp der Spendermäuse haben.



**Abb. 11: Schematische Darstellung der Generierung der Knochenmarkchimären.**

Um festzustellen, ob beide Gruppen der Knochenmarkchimären annähernd die gleiche Anzahl an Thrombozyten im Blut haben, wird 6 Wochen nach der Knochenmarktransplantation mit einem automatischen Hämatologie-Analysator ein Blutbild erstellt. Das Blut, das untersucht wird, wird den Mäusen zuvor wie in 2.9.1 beschrieben abgenommen und in 300  $\mu$ l Heparin (20 U/ml) aufgenommen.

### 2.13 Statistik

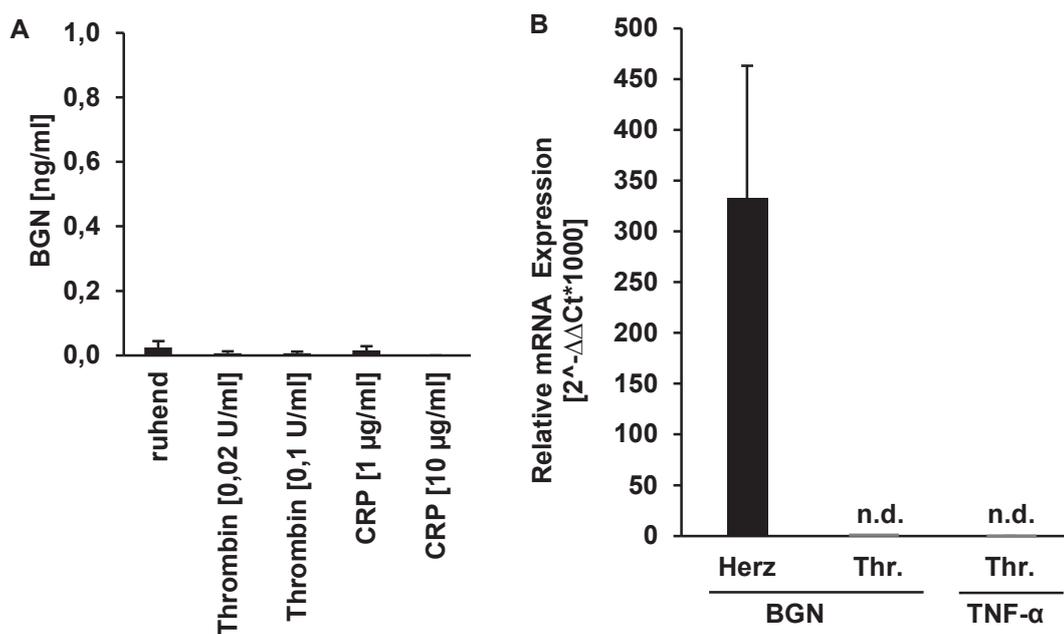
Die Auswertung der Daten erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem *student's t-test* mit der Software Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA)). Die Daten werden als Mittelwert + Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Bei p-Werten  $< 0,05$  wird statistische Signifikanz angenommen. Folgende Einteilung wird vorgenommen: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung der Interaktion von Thrombozyten und Biglykan *in vitro*

##### 3.1.1 Thrombozyten sezernieren kein Biglykan

Um zu untersuchen, ob Thrombozyten BGN sezernieren können, wurde zunächst mit den Überständen von aktivierten Thrombozyten aus *C57BL/6J* Mäusen ein Biglykan-ELISA durchgeführt. Hier konnte kein BGN nachgewiesen werden (Abb. 12A) [100]. Zusätzlich wurde RNA aus Thrombozyten von *C57BL/6J* Mäusen isoliert und eine qRT-PCR durchgeführt. In den murinen Thrombozyten zeigte sich keine Expression von Biglykan-mRNA (Abb. 12B) [100].

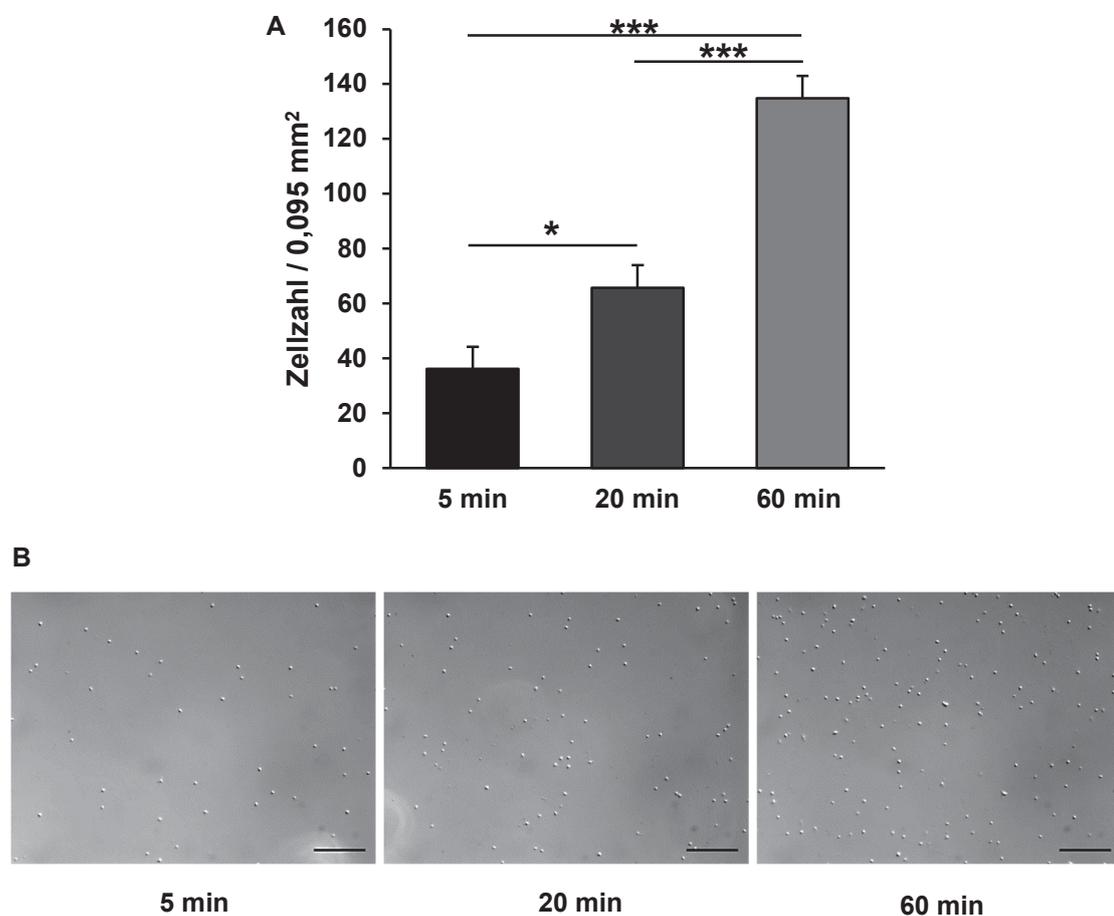


**Abb. 12: Thrombozyten sezernieren kein Biglykan und exprimieren keine BGN-mRNA.**

(A) Quantitative Bestimmung von BGN in den Überständen von aktivierten Thrombozyten aus *C57BL/6J* Mäusen mittels ELISA. (B) Die mRNA wurde aus Thrombozyten (Thr.) von *C57BL/6J* Mäusen isoliert. Als Positivkontrolle diente isolierte mRNA aus murinem Herzgewebe. TNF-α wurde als Negativkontrolle verwendet. n.d. = nicht detektierbar, n = 4-6, Mittelwert + SEM. Abb. 12 A und B modifiziert in Hoermann *et al.* (nicht publiziert, in Revision) [100].

### 3.1.2 Adhäsionsverhalten von Thrombozyten auf einer Biglykan-Matrix unter statischen Bedingungen

Da BGN Teil der subendothelialen Matrix in Gefäßen ist [83], wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Thrombozyten an BGN adhären können. Dazu wurden Deckgläschen mit BGN (10 µg/ml) beschichtet und isolierte Thrombozyten von *C57BL/6J* Mäusen für 5 min, 20 min und 60 min auf den beschichteten Deckgläschen inkubiert. Es zeigte sich, dass Thrombozyten an BGN adhären können. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei längeren Inkubationszeiten signifikant mehr Thrombozyten an BGN adhären (Abb. 13) [100].

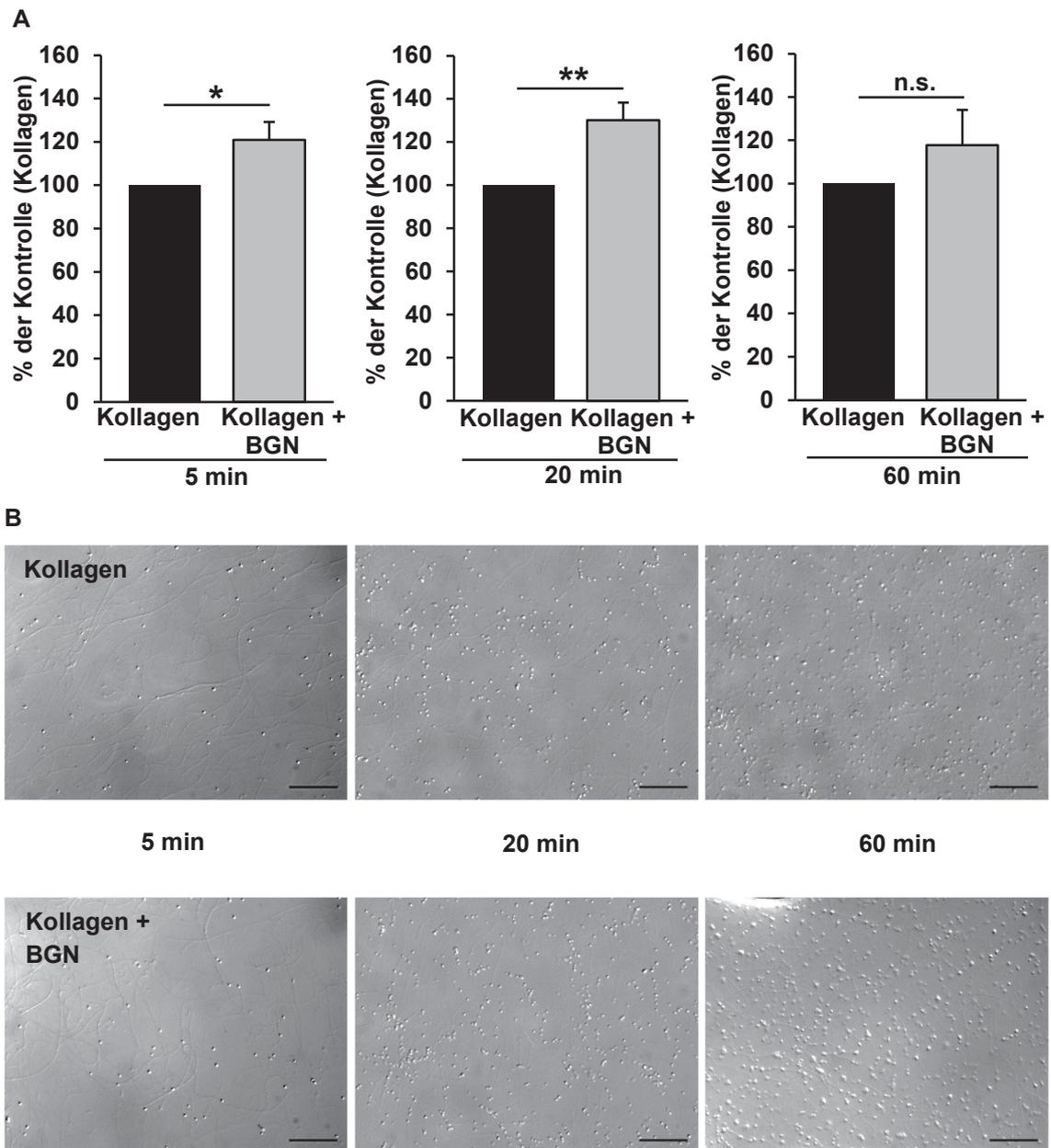


**Abb. 13: Thrombozyten adhären an BGN.**

Eine definierte Anzahl an isolierten Thrombozyten von *C57BL/6J* Mäusen wurde für 5 min, 20 min und 60 min auf mit BGN beschichteten Deckgläschen inkubiert. **(A)** Die totale Anzahl an adherenten Zellen pro 0,095 mm<sup>2</sup> wurde mittels Mikroskopie (400-fache Vergrößerung) bestimmt. **(B)** Repräsentative Bilder nach 5 min, 20 min und 60 min Inkubationszeit. Maßstabsbalken  $\cong$  50 µm, n = 8-9, Mittelwert + SEM, \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001. Abb. 13 A modifiziert in Hoermann *et al.* (nicht publiziert, in Revision) [100].

### 3.1.3 Statische Adhäsion von Thrombozyten auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zur Kollagen-Matrix

Es ist bekannt, dass Biglykan in der Gefäßwand als Teil der subendothelialen Matrix [83] mit Kollagenfibrillen interagieren kann [85]. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Thrombozytenadhäsion auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zu einer Kollagen-Matrix untersucht. Die Versuche erfolgten unter statischen Bedingungen und die Adhäsion wurde zu unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten analysiert. Es wurden Thrombozyten aus *C57BL/6J* Mäusen verwendet. 5 min und 20 min nach Beginn der Inkubation zeigten sich signifikant mehr adhärenente Thrombozyten auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zu einer Kollagen-Matrix (Abb. 14) [100]. Nach einer längeren Inkubation von 60 min zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der adhärenenten Thrombozyten auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zu einer Kollagen-Matrix (Abb. 14) [100].

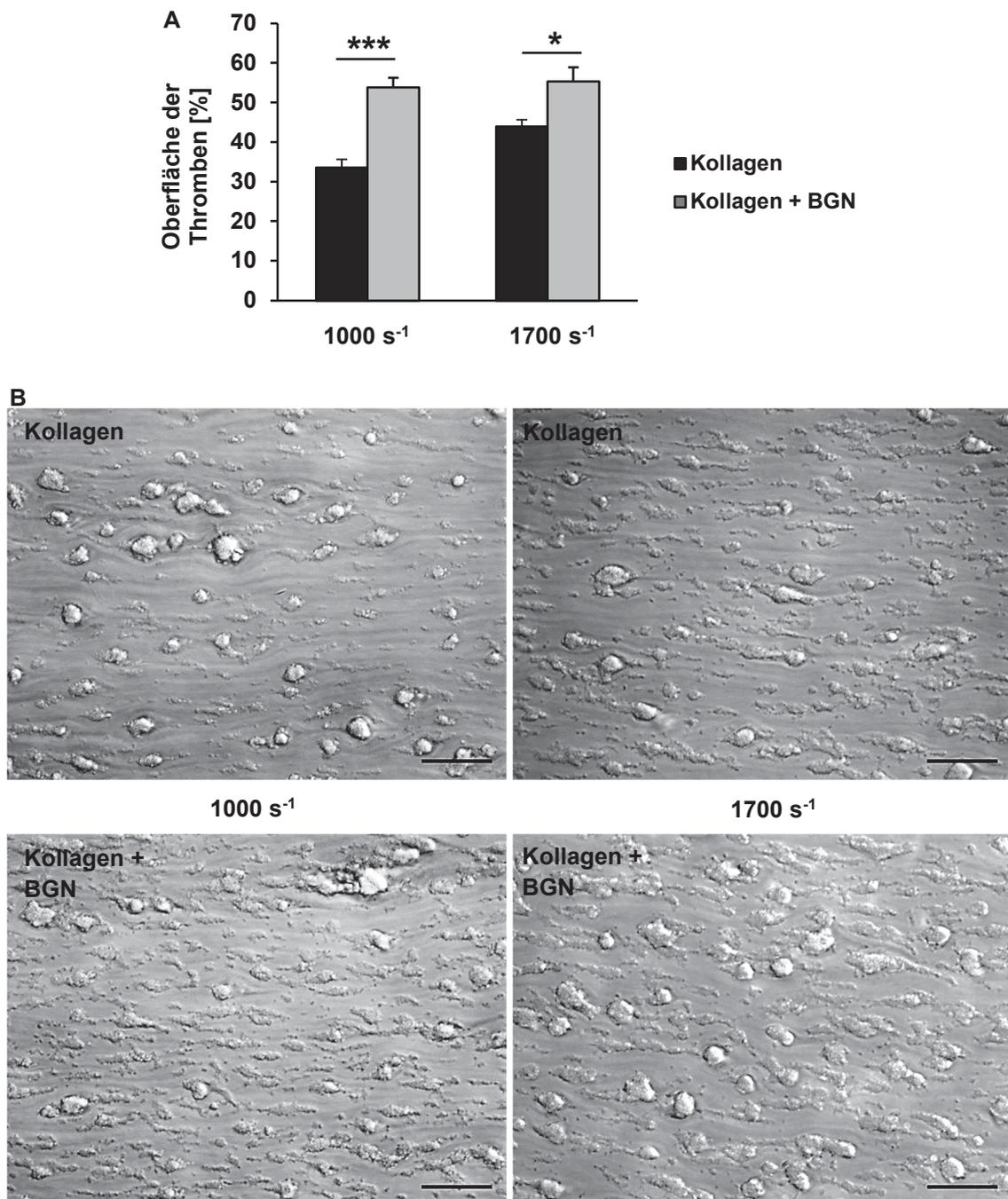


**Abb. 14: Untersuchung der statischen Adhäsion von Thrombozyten auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zur Kollagen-Matrix.**

Die mit Kollagen + BGN und Kollagen beschichteten Deckgläschen wurden mit einer definierten Anzahl an isolierten Thrombozyten bedeckt und für 5 min, 20 min und 60 min auf den Deckgläschen in einer Feuchtekammer inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde mittels Mikroskopie (400-fache Vergrößerung) und der Carl Zeiss Software „ZEN 2012“ (blaue Edition) die totale Anzahl an adhärenen Zellen pro 0,095 mm<sup>2</sup> bestimmt. **(A)** Adhärenente Thrombozyten auf der Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zur Kollagen-Matrix (in %), 5 min, 20 min und 60 min nach Beginn der Inkubation. **(B)** Repräsentative Bilder der adhärenenten Thrombozyten 5 min, 20 min und 60 min nach Beginn der Inkubation auf der Kollagen-Matrix und Biglykan-Kollagen-Matrix. Maßstabsbalken  $\pm$  50  $\mu$ m, n.s.= nicht signifikant, n = 9, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01. Abb. 14 A modifiziert in Hoermann *et al.* (nicht publiziert, in Revision) [100].

### **3.1.4 Thrombusbildung auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zur Kollagen-Matrix im Flusskammermodell**

Unter statischen Bedingungen konnte bereits gezeigt werden, dass signifikant mehr Thrombozyten auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix adhären als auf einer Kollagen-Matrix (Kapitel 3.1.3). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde mittels des Flusskammermodells die Thrombusbildung auf der Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zur Kollagen-Matrix unter Flussbedingungen untersucht. Das verwendete Blut wurde zuvor von *C57BL/6J* Mäusen entnommen. Die Untersuchung der Thrombusbildung erfolgte mit den arteriellen Scherraten von  $1000\text{ s}^{-1}$  und  $1700\text{ s}^{-1}$ . Es wurde die Gesamtoberfläche der Thromben in % zur Gesamtfläche des analysierten Bildausschnittes bestimmt. Wie Abb. 15 zeigt, findet sich sowohl bei einer Scherrate von  $1000\text{ s}^{-1}$  als auch bei einer Scherrate von  $1700\text{ s}^{-1}$  eine deutlich signifikant größere Gesamtoberfläche der Thromben auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zu einer Kollagen-Matrix [100].



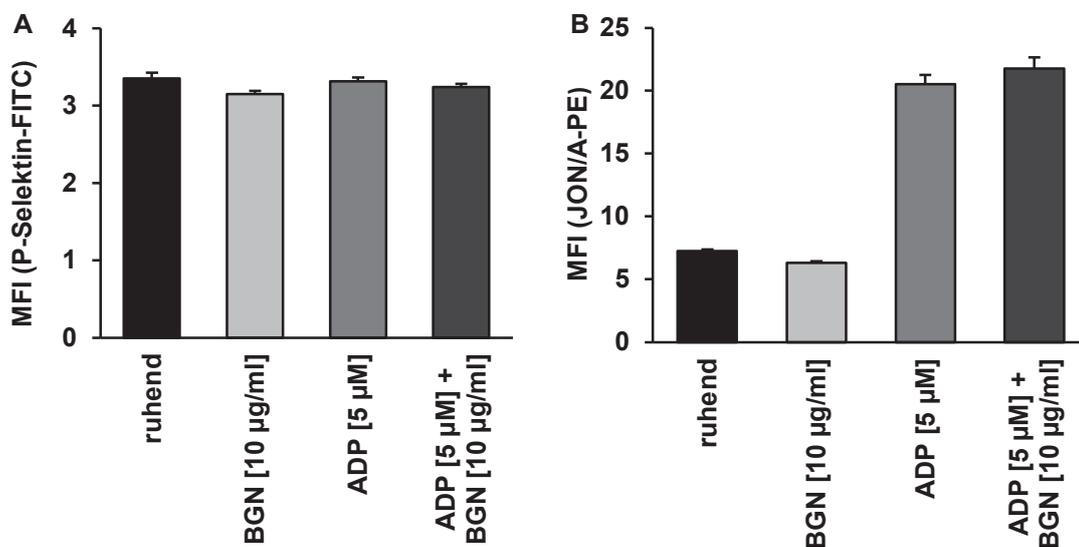
**Abb. 15: Vermehrte Thrombusbildung auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zu einer Kollagen-Matrix.**

Das von *C57BL/6J* Mäusen entnommene Blut wurde mittels kontinuierlicher Spritzenpumpe durch das Flusskammersystem geleitet. Die Thrombusbildung wurde bei Scherraten von 1000 s<sup>-1</sup> und 1700 s<sup>-1</sup> untersucht. Mittels Mikroskopie wurden zu definierten Zeitpunkten repräsentative Bilder aufgenommen. **(A)** Mithilfe der Carl Zeiss Software „ZEN 2012“ (blaue Edition) wurde die Gesamtoberfläche der Thromben im Verhältnis zur Gesamtfläche bestimmt. **(B)** Repräsentative Bilder (400-fache Vergrößerung). Maßstabsbalken  $\cong$  50  $\mu$ m, n = 5-8 (1000 s<sup>-1</sup>), n = 7-10 (1700 s<sup>-1</sup>), Mittelwert + SEM, \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001. Abb. 15 A und B modifiziert in Hoermann *et al.* (nicht publiziert, in Revision) [100].

## 3.2 Untersuchung der Auswirkung von löslichem Biglykan auf die Aktivierung von Thrombozyten und die Thrombusbildung

### 3.2.1 Einfluss von rekombinantem Biglykan auf die Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$

Blut von *C57BL/6J* Mäusen wurde mit BGN, ADP und ADP plus BGN inkubiert. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression von P-Selektin sowie aktiviertem Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  untersucht. Hier zeigte sich sowohl bei der Inkubation mit BGN als auch bei der Co-Inkubation von ADP und BGN bei der Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  keine Erhöhung im Vergleich zu ruhenden Thrombozyten bzw. Thrombozyten, die nur mit ADP aktiviert wurden (Abb. 16).

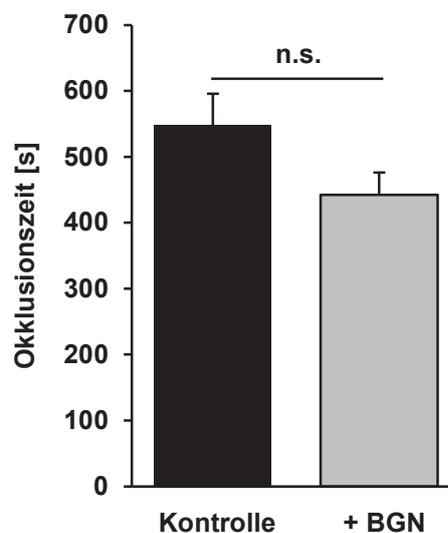


**Abb. 16: Die Inkubation von Thrombozyten mit Biglykan hat keinen Einfluss auf die Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ .**

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von P-Selektin (A) und aktiviertem Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  (B) auf Thrombozyten von *C57BL/6J* Mäusen nach Vorinkubation mit BGN, ADP und ADP plus BGN untersucht.  $n = 14$ , Mittelwert + SEM.

### 3.2.2 Untersuchung der Thrombusbildung mit dem *Total Thrombus-formation Analysis System* nach Vorinkubation mit Biglykan

Um zu untersuchen ob lösliches rekombinantes BGN einen Einfluss auf die Thrombusbildung unter Flussbedingungen hat, wurde Blut von *C57BL/6J* Mäusen mit BGN (10 µg/ml) für 5 min inkubiert und dann die Thrombusbildung bei einer Scherrate von 240 s<sup>-1</sup> untersucht. Bei den mit BGN inkubierten Proben zeigte sich keine signifikant verkürzte Okklusionszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 17).



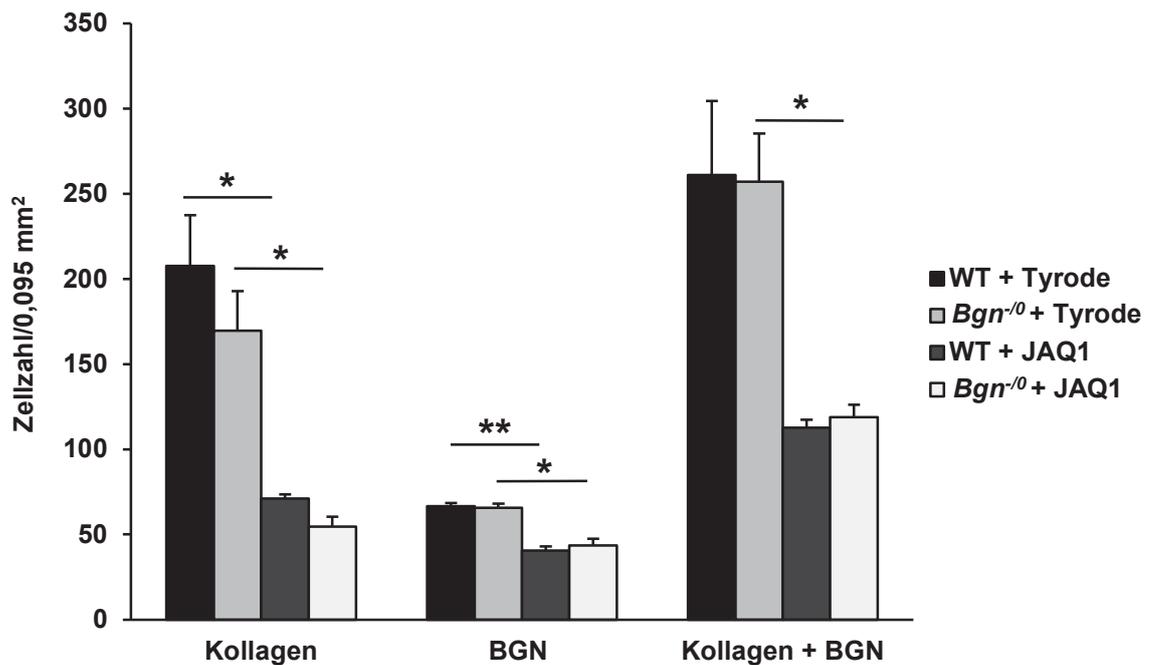
**Abb. 17:** Die Vorinkubation von Blut mit rekombinatem Biglykan führt nicht zu einer verkürzten Okklusionszeit bei einer Scherrate von 240 s<sup>-1</sup> im *Total Thrombus-formation Analysis System*.

Blut von *C57BL/6J* Mäusen wurde vor der Untersuchung für 5 min mit BGN (10 µg/ml) inkubiert. Als Kontrolle diente Blut von *C57BL/6J* Mäusen, dem anstelle von BGN PBS hinzugefügt wurde. Es wurde eine Scherrate von 240 s<sup>-1</sup> verwendet. Das künstliche Gefäß galt bei 100 kPa als komplett verschlossen und die Zeit, die bis dahin gemessen wurde, ist die Okklusionszeit. n.s. = nicht signifikant, n = 6-7, Mittelwert + SEM.

### 3.3 Untersuchung von GPVI in Bezug auf die Thrombozytenadhäsion an Biglykan

Es ist bekannt, dass GPVI neben seiner Funktion als Hauptrezeptor für Kollagen [13] unter anderem auch an Fibrin [37] und Laminin [38] binden kann. Ob GPVI auch als Rezeptor für die Bindung der Thrombozyten an BGN fungiert, wurde in dieser Arbeit mittels statischer Adhäsionsversuche auf einer Kollagen-, BGN- und

BGN-Kollagen-Matrix mit und ohne Inhibition von GPVI durch den JAQ1-AK untersucht. Nach einer 5-minütigen Vorinkubationszeit der isolierten Maus-Thrombozyten mit dem JAQ1-AK zeigten sich auf der Kollagen-Matrix, der Biglykan-Matrix und der Biglykan-Kollagen-Matrix eine signifikant reduzierte Thrombozytenadhäsion im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne JAQ1-AK (Abb. 18) [100].



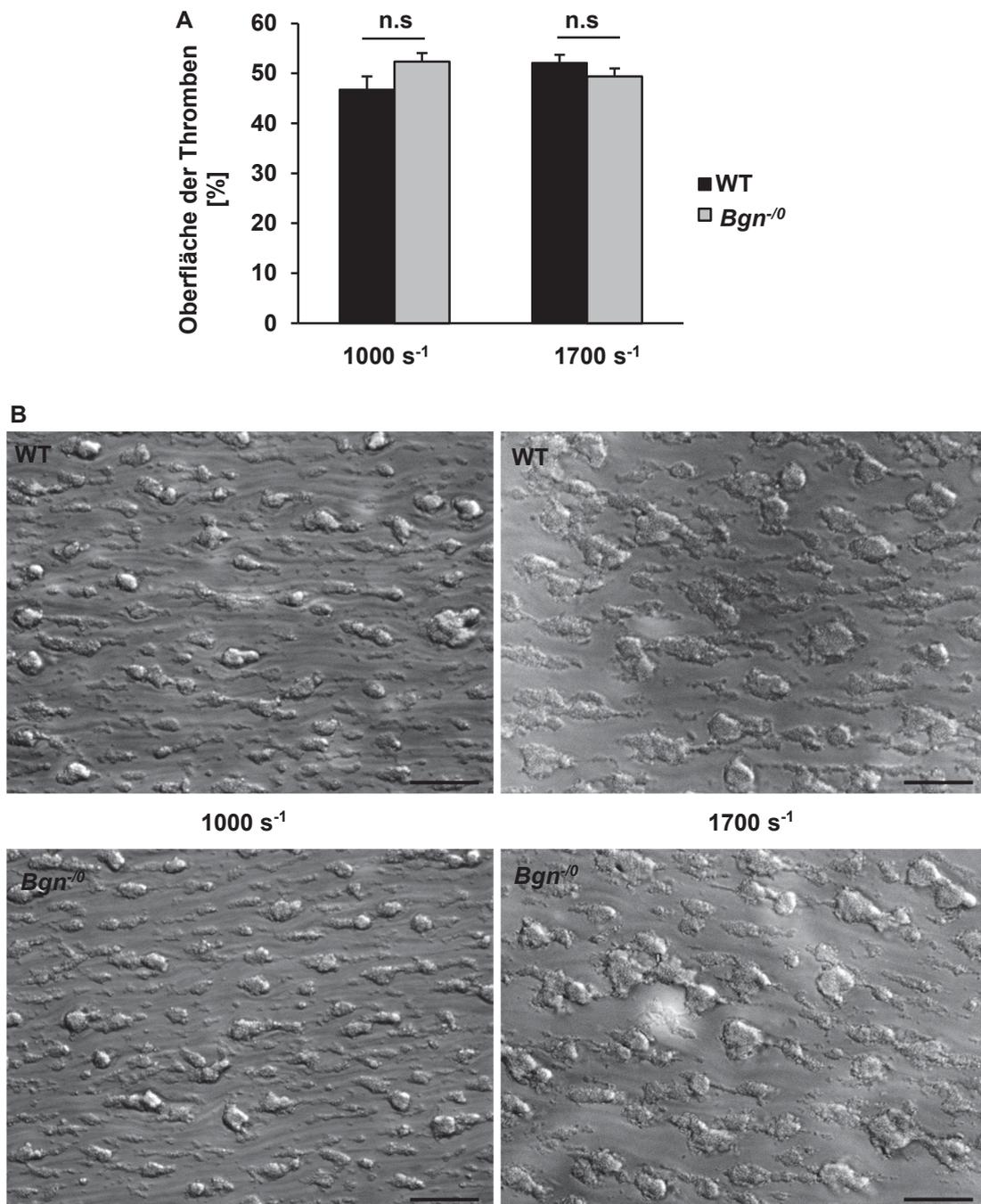
**Abb. 18: Signifikant reduzierte Adhäsion von Thrombozyten an Biglykan nach Blockade von GPVI mittels JAQ1.**

Den aus WT bzw. *Bgn*<sup>-/-</sup> Mäusen isolierten Thrombozyten wurde vor Inkubation auf den mit Kollagen, BGN oder Kollagen + BGN beschichteten Deckgläschen der JAQ1-AK hinzugefügt. Die Thrombozyten wurden nach einer Inkubationsdauer von 5 min auf die beschichteten Deckgläschen aufgetragen. Nach einem Waschschrift wurde mittels Mikroskopie (400-fache Vergrößerung) und der Carl Zeiss Software „ZEN 2012“ (blaue Edition) die Anzahl an adhären Zellen pro 0,095 mm<sup>2</sup> auf der Kollagen-, BGN- und Kollagen-BGN-Matrix mit und ohne JAQ1-AK 20 min nach Beginn der Inkubation bestimmt. n = 3, Mittelwert + SEM, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

### **3.4 Untersuchung der Thrombozyten von *Bgn*<sup>-/-</sup> Mäusen *in vitro***

#### **3.4.1 Bei der Thrombusbildung unter Flussbedingungen mit Blut von *Bgn*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigt sich kein signifikanter Unterschied zur Thrombusbildung mit Blut von WT Mäusen**

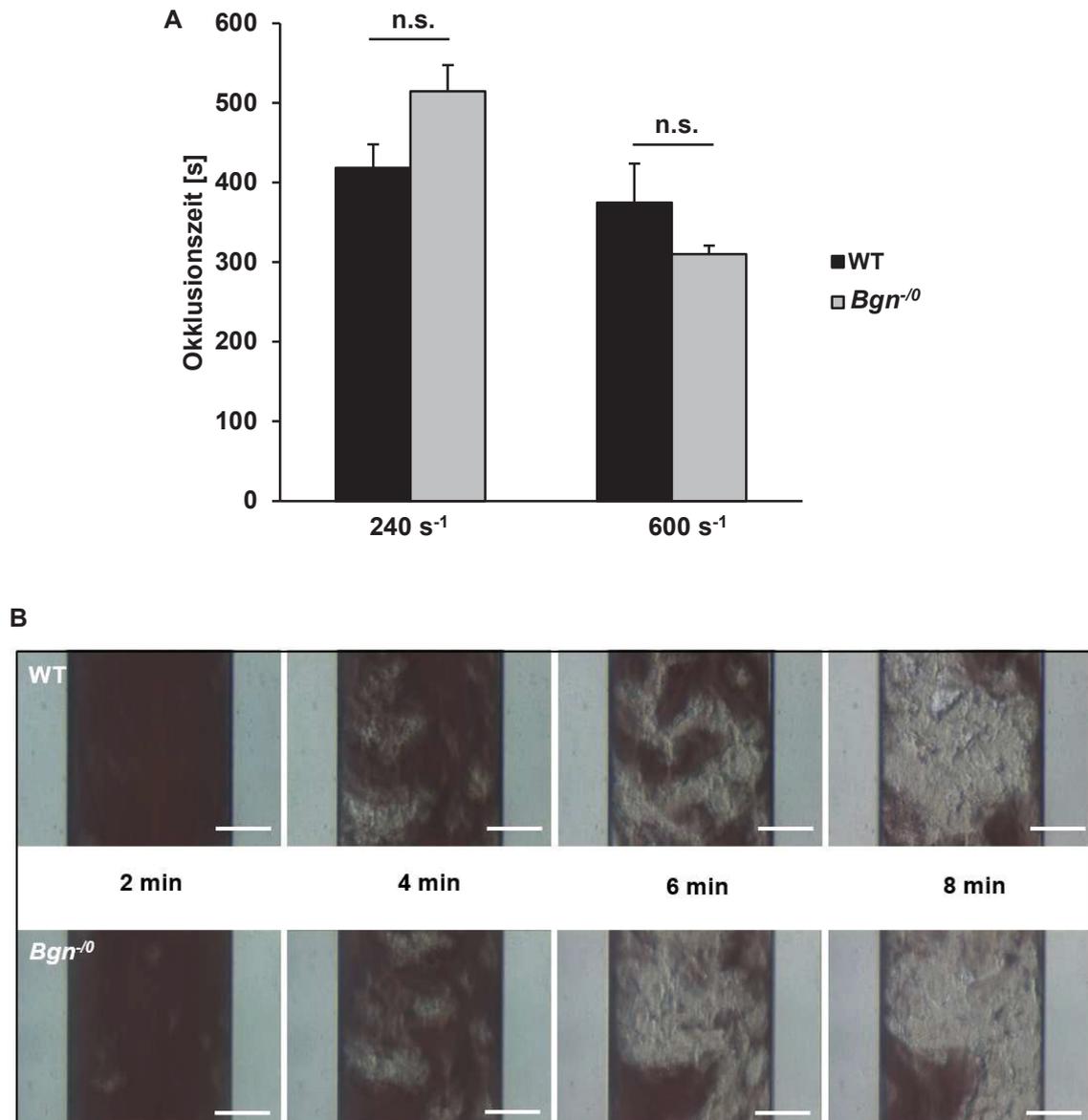
Um zu analysieren, ob das Blut von *Bgn*<sup>-/-</sup> Mäusen *in vitro* unter Flussbedingungen ein anderes Verhalten bei der Thrombusbildung zeigt als das Blut von WT Mäusen, wurde den unterschiedlichen Genotypen eine definierte Menge Blut abgenommen und in Heparin aufgenommen. Anschließend wurde das Blut mittels kontinuierlicher Spritzenpumpe durch ein Flusskammersystem geleitet, in dem ein beschichtetes Deckgläschen mit Kollagen eingebaut war. Sowohl bei einer Scherrate von 1000 s<sup>-1</sup>, als auch bei einer Scherrate von 1700 s<sup>-1</sup>, zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der Thrombusbildung mit Blut von *Bgn*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen (Abb. 19) [100].



**Abb. 19: In der Flusskammer zeigt sich kein Unterschied in der Thrombusbildung bei Verwendung von Vollblut aus *Bgn*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen.**

Das von den *Bgn*<sup>-/-</sup> Mäusen und WT Mäusen entnommene Blut wurde mittels kontinuierlicher Spritzenpumpe durch das Flusskammersystem geleitet. Die Thrombusbildung wurde bei den Scherraten von 1000  $s^{-1}$  und 1700  $s^{-1}$  untersucht. Mittels Mikroskopie wurden zu definierten Zeitpunkten repräsentative Bilder aufgenommen. **(A)** Mithilfe der Carl Zeiss Software „ZEN 2012“ (blaue Edition) wurde die Gesamtoberfläche der Thromben im Verhältnis zur Gesamtfläche bestimmt [100]. **(B)** Repräsentative Bilder (400-fache Vergrößerung), Maßstabsbalken  $\cong$  50  $\mu$ m, n.s. = nicht signifikant, n = 5-6, Mittelwert + SEM. Abb. 19 A modifiziert in Hoermann *et al.* (nicht publiziert, in Revision) [100].

Um die Thrombusbildung mit Blut von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen bei niedrigeren Scherraten zu untersuchen, wurde das T-TAS® verwendet. Durch den Fluss durch die vorbeschichteten Mikrochips kommt das Blut in Kontakt mit Kollagen und Thromboplastin. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der Thrombozyten und zur Thrombusbildung. Diese kann durch die Videomikroskopie direkt beobachtet werden. Zudem kann durch die durch das System aufgezeichnete Druckkurve die Thrombusbildung analysiert werden. Beim Erreichen eines Druckes von 100 kPa gilt das künstliche Gefäß als vollständig okkludiert und der Versuch wird automatisch beendet. Die Zeit bis zur vollständigen Okklusion kann an der Druckkurve abgelesen werden. Hier wurde die Thrombusbildung des Blutes von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen mit WT Mäusen verglichen. Dabei wurden Scherraten von 240 s<sup>-1</sup> und 600 s<sup>-1</sup> verwendet. Bei beiden Scherraten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Dauer bis zur vollständigen Okklusion des künstlichen Gefäßes bei *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen (Abb. 20) [100].

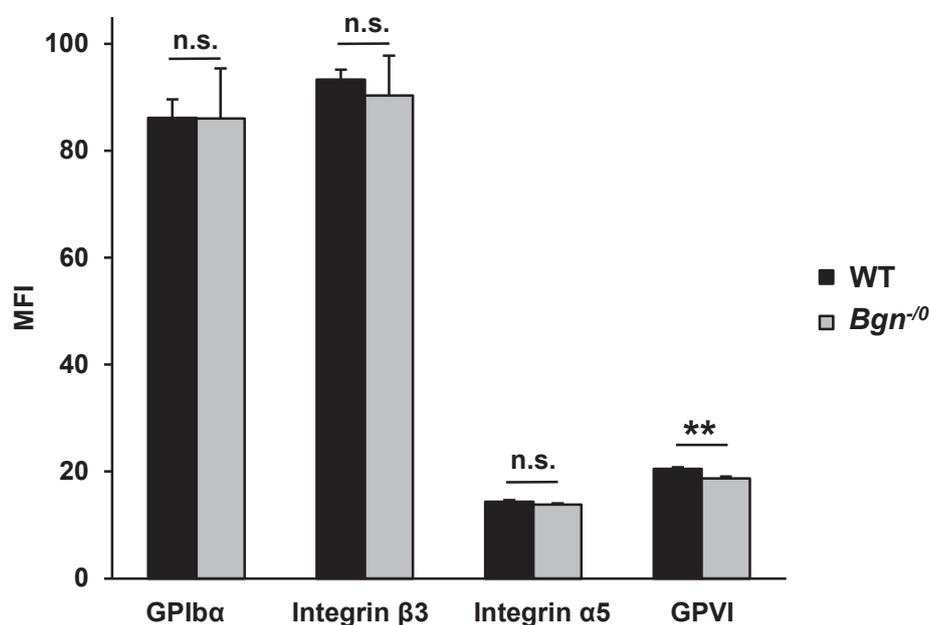


**Abb. 20: Kein signifikanter Unterschied in der Okklusionszeit der künstlichen Gefäße bei der Analyse der Thrombusbildung aus Blut von *Bgn*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen mit dem *Total Thrombus-formation Analysis System*.**

**(A)** Zeit bis zur vollständigen Okklusion des künstlichen Gefäßes. Verwendet wurden Scherraten von 240  $s^{-1}$  und 600  $s^{-1}$ . **(B)** Repräsentative Bilder, die die Okklusion des künstlichen Gefäßes bei einer Scherrate von 240  $s^{-1}$  zeigen. Das Weiße in den Bildern zeigt den Thrombus, der letztendlich zum Verschluss des künstlichen Gefäßes führt. Maßstabsbalken  $\triangleq$  100  $\mu m$ . n.s. = nicht signifikant,  $n = 4-7$ , Mittelwert + SEM. Abb. 20 A und B modifiziert in Hoermann *et al.* (nicht publiziert, in Revision) [100].

### 3.4.2 Untersuchung der Expression von Oberflächenproteinen auf Thrombozyten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von GPIb $\alpha$ , Integrin  $\beta$ 3, Integrin  $\alpha$ 5 und GPVI auf nicht aktivierten Thrombozyten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen untersucht. Hier zeigte sich eine signifikant reduzierte Expression von GPVI auf Thrombozyten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen, jedoch kein Unterschied in der Expression von GPIb $\alpha$ , Integrin  $\beta$ 3 und Integrin  $\alpha$ 5 (Abb. 21) [100].

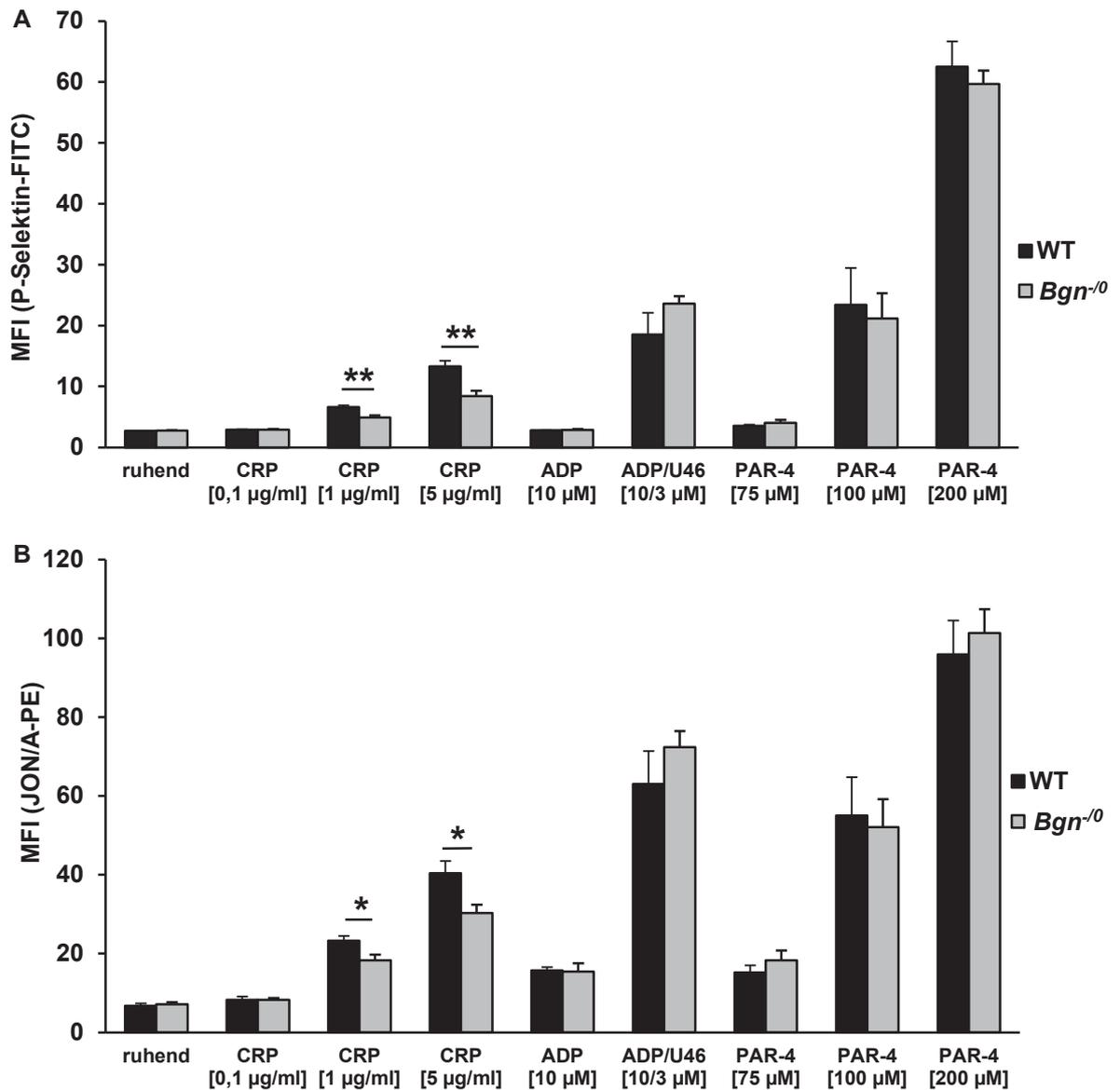


**Abb. 21: Reduzierte Expression von GPVI auf Thrombozyten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen.**

Die Expression der Oberflächenproteine GPIb $\alpha$ , Integrin  $\beta$ 3, Integrin  $\alpha$ 5 und GPVI wurde mittels FACS untersucht. Mithilfe der gemessenen gemittelten Fluoreszenzintensität (MFI) konnten die beiden Kohorten verglichen werden. n.s. = nicht signifikant, n = 9-15, Mittelwert + SEM \*\*p < 0,01. Abb. 21 modifiziert in Hoermann *et al.* (nicht publiziert, in Revision) (*supplemental data*) [100].

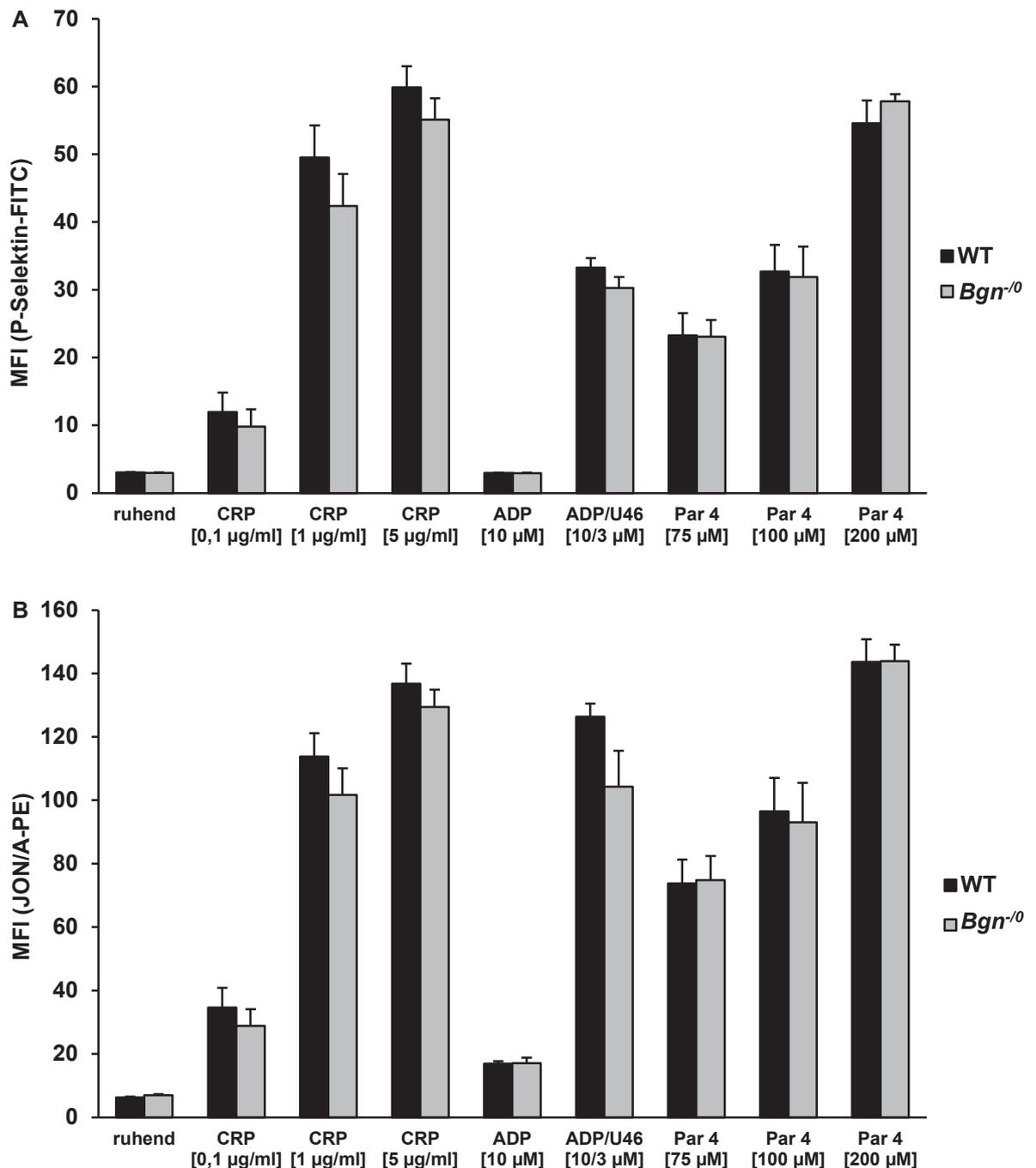
### 3.4.3 Durchflusszytometrische Untersuchung der Aktivierung von Thrombozyten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen anhand der Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin $\alpha$ IIb $\beta$ 3

Die Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 auf Thrombozyten wurde mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht und ist eine Methode zur Bestimmung der Aktivierung von Thrombozyten. Die Thrombozyten wurden zuvor mit verschiedenen Agonisten (CRP, ADP ADP/U46 und *Par-4 activated peptide*) mit unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Es wurde die Aktivierung von Thrombozyten aus *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen mit der Aktivierung von Thrombozyten von WT Mäusen verglichen. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden sowohl mit „ungewaschenem“ Blut als auch mit „gewaschenem“ Blut durchgeführt. Nur bei Aktivierung mit 1  $\mu$ g/ml CRP und 5  $\mu$ g/ml CRP zeigte sich eine signifikant reduzierte Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 auf den Thrombozyten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen bei „ungewaschenem“ Blut (Abb. 22). Bei der Untersuchung der Thrombozytenaktivierung von „gewaschenem“ Blut zeigte sich kein Unterschied zwischen den Thrombozyten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen und WT Mäusen (Abb. 23) [100].



**Abb. 22: Signifikant reduzierte Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  auf mit CRP aktivierten Thrombozyten aus *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen, bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von „ungewaschenem“ Blut.**

Die Thrombozyten aus *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen sowie aus WT Mäusen wurden mit verschiedenen Agonisten stimuliert und die Expression von P-Selektin (**A**) und aktiviertem Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (**B**) mittels Durchflusszytometrie analysiert.  $n = 7$ , Mittelwert + SEM, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .



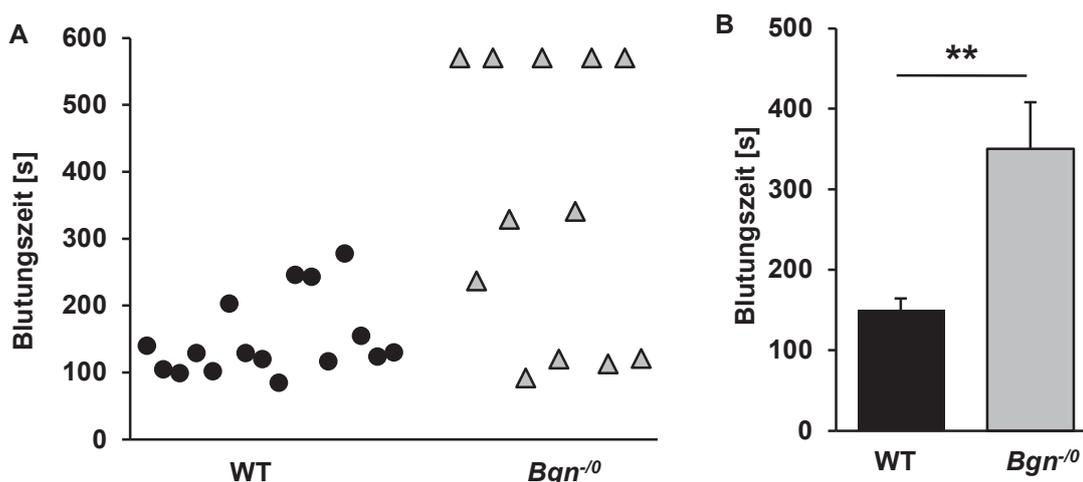
**Abb. 23: Kein Unterschied in der Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  auf aktivierten Thrombozyten aus *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen im Vergleich zu Thrombozyten aus WT Mäusen bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von „gewaschenem“ Blut.**

Die Thrombozyten aus *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen sowie aus WT Mäusen wurden vor der Inkubation mit verschiedenen Agonisten durch mehrere Waschschriffe gewaschen. Anschließend wurde die Expression von P-Selektin (**A**) und aktiviertem Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (**B**) mittels Durchflusszytometrie bestimmt.  $n = 8-13$ , Mittelwert + SEM. Abb. 23 A und B modifiziert in Hoermann *et al.* (nicht publiziert, in Revision) (*supplemental data*) [100].

### 3.5 Untersuchung von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen in Bezug auf die Thrombozytenadhäsion und die arterielle Thrombusbildung

#### 3.5.1 Bestimmung der Blutungszeiten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen

Da in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass Thrombozyten an BGN adhären können (Kapitel 3.1.2) und dass sowohl unter statischen als auch unter Flussbedingungen eine vermehrte Thrombozytenadhäsion bzw. Thrombusbildung auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zur Kollagen-Matrix zu sehen ist (Kapitel 3.1.3 und 3.1.4), sollte untersucht werden, ob *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen veränderte Blutungszeiten und somit eine veränderte Hämostase aufweisen. Dafür wurde den Mäusen unter Narkose die Schwanzspitze mithilfe einer Schablone an einem definierten Durchmesser mit einem Skalpell abgeschnitten und die Zeit bis zum vollständigen Sistieren der Blutung gemessen. Bei nicht-sistierender Blutung musste der Versuch nach 570 s gemäß Tierschutzaufgaben aufgrund eines zu starken Blutverlustes abgebrochen werden und die Blutung mittels Kauterisation gestoppt werden. Bei 5 von 12 *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen stoppte die Blutung nicht von allein. Es zeigten sich signifikant verlängerte Blutungszeiten im Vergleich zu den WT Mäusen (Abb. 24) [100].



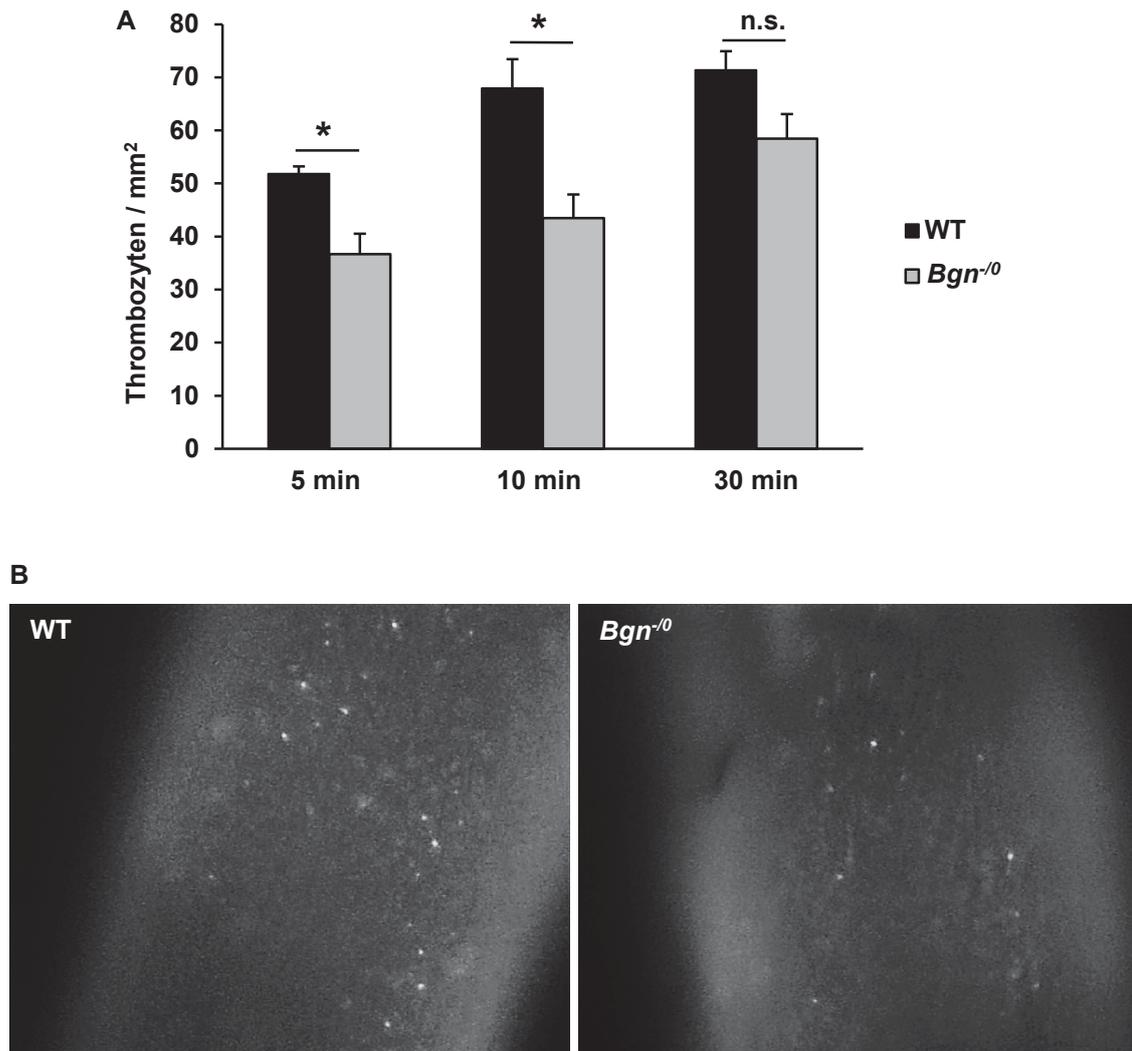
**Abb. 24: Signifikant verlängerte Blutungszeiten in *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen.**

Die Blutungszeiten wurden an narkotisierten Mäusen gemessen, nachdem ein Stück vom Schwanz an einem definierten Durchmesser abgetrennt wurde. Aufgrund von zu starkem Blutverlust wurden die Messungen bei noch nicht eingetretener Blutstillung nach 570 s abgebrochen.

(A) Vergleich der Blutungszeiten von WT Mäusen und *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen. Jeder Punkt repräsentiert die gemessene Blutungszeit von einem Tier. (B) Vergleich der Blutungszeiten von WT Mäusen und *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen. n = 12-16, Mittelwert + SEM, \*\*p < 0,01. Abb. 24 A und B modifiziert in Hoermann *et al.* (nicht publiziert, in Revision) [100].

### 3.5.2 Untersuchung der Thrombozytenadhäsion in *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen mittels *in-vivo*-Videomikroskopie

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Biglykan-defiziente Mäuse signifikant verlängerte Blutungszeiten aufweisen (Kapitel 3.5.1). Um die Thrombozytenadhäsion in *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen *in vivo* genauer zu untersuchen, wurde ein sogenanntes Ligatur-Modell verwendet. Dazu wurden von WT und *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen isolierte und mit CFSE Fluoreszenz-markierte Thrombozyten dem jeweiligen Genotyp intravenös injiziert. Die Ligatur der rechten *Arteria carotis communis* erfolgte passager für 5 min mittels chirurgischen Fadens. Durch die Ligatur wurde eine Gefäßverletzung induziert. Anschließend erfolgte die Aufnahme von Videosequenzen mittels *in-vivo*-Videomikroskopie 5 min, 10 min und 30 min nach Ligatur und die Anzahl der adhärenenten Thrombozyten wurde pro mm<sup>2</sup> im Bereich der Gefäßverletzung in einem definierten Areal bestimmt. In den *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen zeigte sich eine signifikant reduzierte Thrombozytenadhäsion 5 min und 10 min nach Ligatur (Abb. 25) [100].

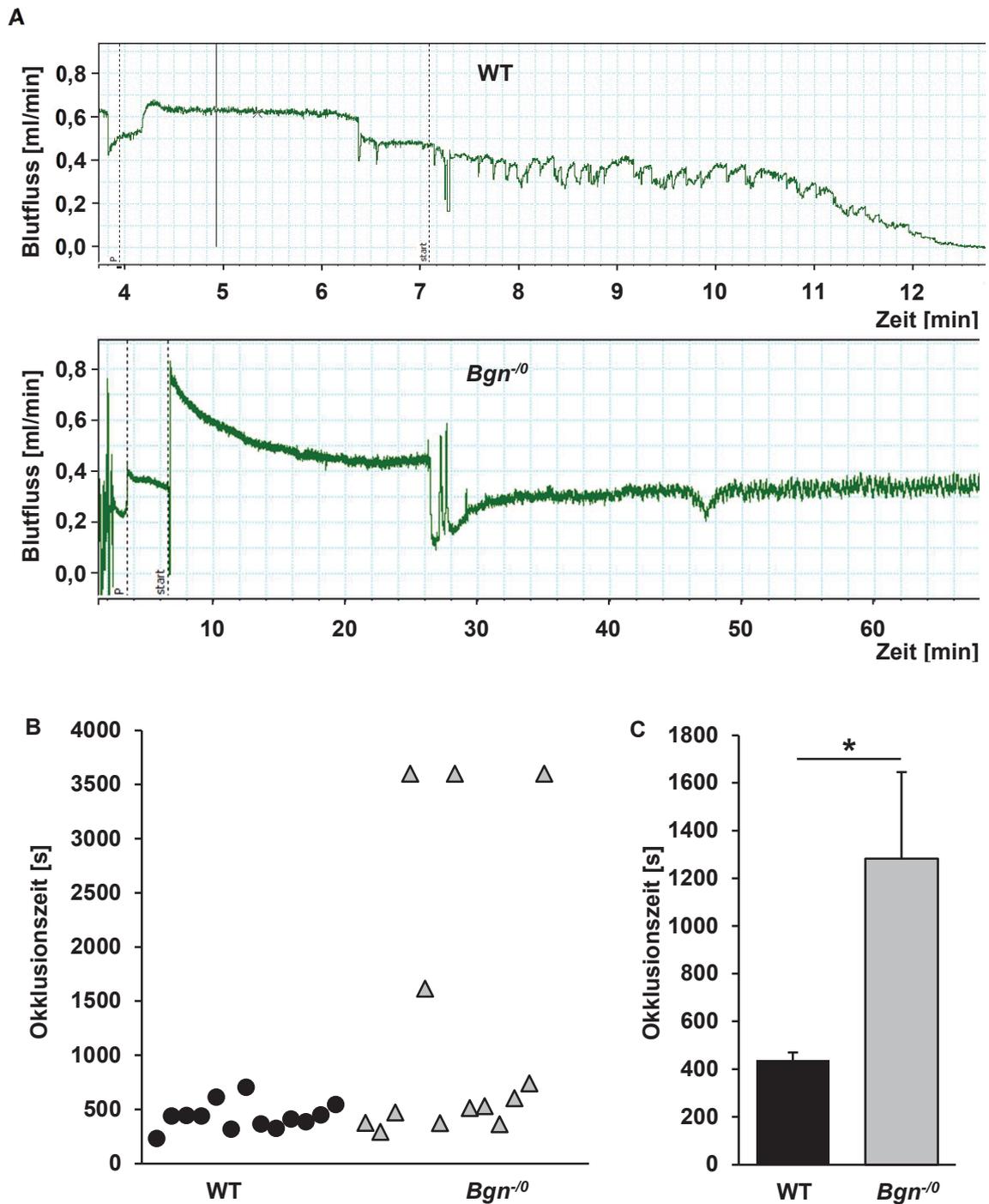


**Abb. 25: Reduzierte Thrombozytenadhäsion in *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen nach Gefäßverletzung via Ligatur.**

Vergleich der Adhäsion von fluoreszenzmarkierten Thrombozyten (mit CFSE) in *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen und WT Mäusen nach Gefäßverletzung der rechten *Arteria carotis communis* via vorübergehender Ligatur mit einem chirurgischen Faden für 5 min. Nach 5 min, 10 min und 30 min wurden *in-vivo*-videomikroskopische Aufnahmen gemacht (20x Wasser Immersionsobjektiv) und die Anzahl der adhärenen Thrombozyten/mm<sup>2</sup> in einem definierten Areal bestimmt. **(A)** Vergleich der Anzahl an adhärenen Thrombozyten/mm<sup>2</sup> in WT Mäusen und *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen 5 min, 10 min und 30 min nach Ligatur. **(B)** Repräsentative Bilder 10 min nach Ligatur. n.s. = nicht signifikant, n = 4-5, Mittelwert + SEM, \*p < 0,05. Abb. 25 A und B modifiziert in Hoermann *et al.* (nicht publiziert, in Revision) [100].

### 3.5.3 Untersuchung der Thrombusbildung *in vivo* in *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen nach Gefäßverletzung mit FeCl<sub>3</sub>

Nachdem in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse signifikant verlängerte Blutungszeiten nach Gefäßverletzung aufweisen (Kapitel 3.5.1) und eine reduzierte Thrombozytenadhäsion nach mechanischer Gefäßverletzung zeigen (Kapitel 3.5.2), wurde im Folgenden die Thrombusbildung in *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen nach chemischer Verletzung mittels FeCl<sub>3</sub> im Vergleich zu WT Mäusen analysiert. Dazu wurde bei narkotisierten Mäusen die rechte *Arteria carotis communis* freipräpariert und mittels FeCl<sub>3</sub> die Gefäßverletzung induziert. Dabei wurde konstant mittels Doppler-Sonde, die unter die *Arteria carotis communis* gelegt wurde, der Blutfluss im Gefäß in ml/min sowie die Herzfrequenz aufgezeichnet. Nach 3600 s wurden die Versuche bei nicht stattgefundenener Gefäßokklusion abgebrochen. Bei den *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen zeigten 3 von 13 Tieren keine Okklusion des Gefäßes mittels Thrombus nach Gefäßverletzung. Bei Betrachtung aller Tiere zeigt sich eine signifikant verlängerte Okklusionszeit bei den *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen (Abb. 26).



**Abb. 26:  $Bgn^{-/0}$  Mäuse zeigen teilweise keine okkludierende Thrombusbildung nach Gefäßverletzung mittels  $FeCl_3$ .**

Mittels  $FeCl_3$  wurde eine Gefäßverletzung der rechten *Arteria carotis communis* bei narkotisierten Mäusen induziert. Anhand des mittels Doppler-Sonde gemessenen Flusses konnte gesehen werden, wann das Gefäß vollständig okkludiert war und es wurde die Zeit bis zur vollständigen Okklusion gemessen. **(A)** Repräsentative Graphiken einer WT Maus sowie einer  $Bgn^{-/0}$  Maus. Gezeigt wird der Fluss in ml/min (y-Achse) über die Zeit (min) (x-Achse). **(B)** Gemessene Okklusionszeit, jeder Punkt repräsentiert ein Tier. **(C)** Mittelwerte der gemessenen Okklusionszeit.  $n = 13$ , Mittelwert + SEM, \* $p < 0,05$ .

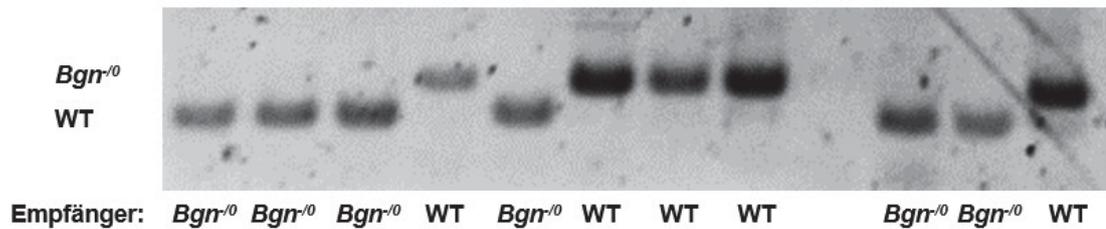
### 3.6 Untersuchung von *Bgn*<sup>-0</sup>- und WT- Knochenmarkchimären

Dass *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse verlängerte Blutungszeiten haben (Kapitel 3.5.1), eine verminderte Thrombozytenadhäsion nach Gefäßverletzung aufweisen (Kapitel 3.5.2) und verlängerte Okklusionszeiten bzw. keine Okklusion nach chemischer Gefäßverletzung zeigen (Kapitel 3.5.3), konnte in dieser Arbeit bereits demonstriert werden. Zudem zeigen die vorangegangenen Untersuchungen, dass die Thrombozyten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen eine verminderte Expression von GPVI (Kapitel 3.4.2) und eine signifikant reduzierte Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  nach Aktivierung mit CRP aufweisen (Kapitel 3.4.3).

Um zu untersuchen, ob die verlängerten Blutungszeiten, die verminderte Thrombozytenadhäsion und die verlängerten Okklusionszeiten in den *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen durch Änderungen der Thrombozytenfunktion oder durch das Fehlen von BGN in den Gefäßwänden verursacht werden, wurden Knochenmarkchimären generiert. WT Mäuse haben nach Bestrahlung Knochenmarkzellen von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen erhalten und *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse nach Bestrahlung Knochenmarkzellen von WT Mäusen. Somit konnte selektiv untersucht werden, ob die veränderte Thrombozytenfunktion der *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse oder das Fehlen von BGN in der Gefäßwand ursächlich für die veränderte Hämostase in den *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen ist.

#### 3.6.1 Kontrolle der Genotypen aus dem Blut nach vollzogener Knochenmarktransplantation

Zur Kontrolle der erfolgreichen Generierung der Knochenmarkchimären erfolgte sechs Wochen nach der Knochenmarktransplantation eine Genotypisierung der Blutzellen um sicher zu stellen, dass die Blutzellen der Empfängertiere den Genotyp der Spendertiere hatten und somit die Transplantation erfolgreich war (Abb. 27).

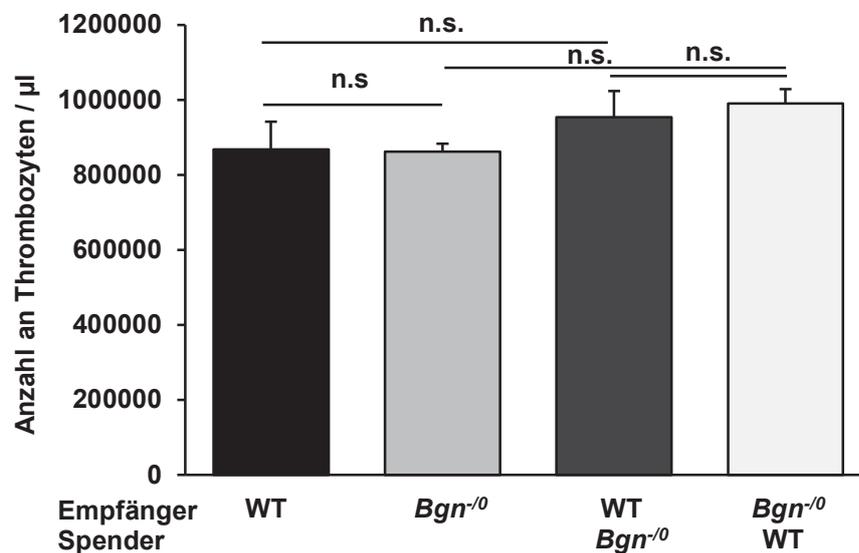


**Abb. 27: Exemplarisches Bild eines Gels bei der Genotypisierung von Blutzellen der Knochenmarkchimären.**

Die Genotypisierung aus Blut der Knochenmarkchimären erfolgte sechs Wochen nach der Knochenmarktransplantation.

### 3.6.2 Bestimmung der Thrombozytenzahl von Knochenmarkchimären

Um sicherzugehen, dass die Mäuse durch die Knochenmarktransplantation keine veränderte Anzahl an Thrombozyten aufweisen, wurde mit dem automatischen Hämatologie-Analysator ein Blutbild der Mäuse erstellt. Die Thrombozytenzahl wurde zudem noch mit der Anzahl an Thrombozyten in WT Mäusen und *Bgn*<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen. Es zeigte sich zwischen allen Kohorten kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Thrombozyten (Abb. 28) [100].



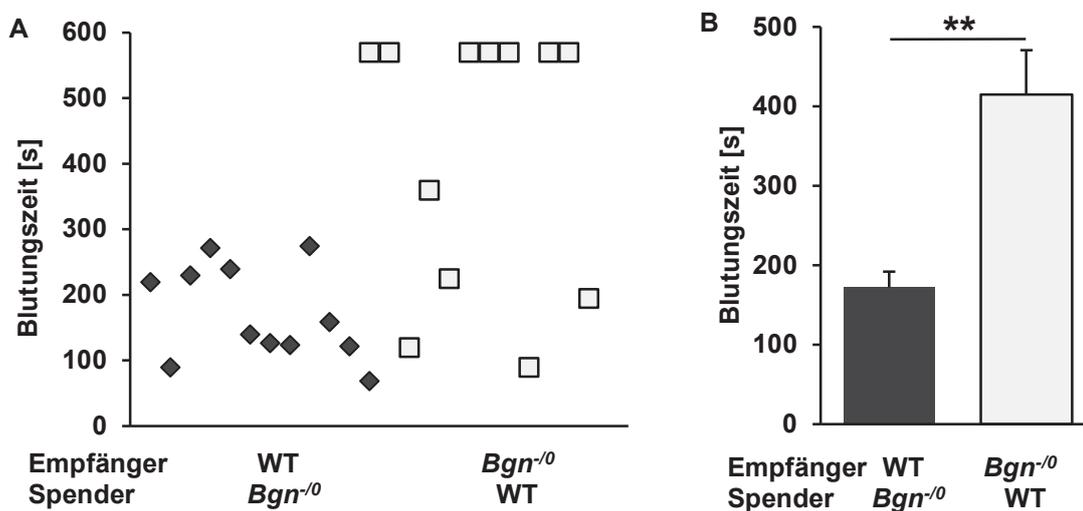
**Abb. 28: Knochenmarkchimären haben im Vergleich zu WT und *Bgn*<sup>-/-</sup> Mäusen keine signifikant erniedrigte oder erhöhte Thrombozytenzahl.**

Die Anzahl der Thrombozyten wurde mit dem automatischen Hämatologie-Analysator (KX-21N) aus Vollblut, welches in Heparin aufgenommen wurde, bestimmt. n.s. = nicht signifikant, n = 4-12, Mittelwert + SEM. Abb. 28 modifiziert in Hoermann *et al.* (nicht publiziert, in Revision) (*supplemental data*) [100].

### 3.6.3 Bestimmung der Blutungszeiten der Knochenmarkchimären

Nachdem bereits bei den *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen die Blutungszeiten nach Amputation der Schwanzspitze bestimmt wurden (3.5.1) und sich hier signifikant verlängerte Blutungszeiten bei den *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen gezeigt haben, wurden auch die Blutungszeiten der Knochenmarkchimären bestimmt. Dazu wurde auch hier die Schwanzspitze mittels Schablone und Skalpell an einem definierten Durchmesser abgeschnitten und die Zeit bis zum vollständigen Sistieren der Blutung gemessen.

Bei den *Bgn*<sup>-0</sup>-Knochenmarkchimären, die Knochenmarkzellen von WT Tieren erhalten haben, zeigten sich signifikant verlängerte Blutungszeiten im Vergleich zu den WT-Knochenmarkchimären, die Knochenmarkzellen von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen erhalten haben. (Abb. 29) [100].

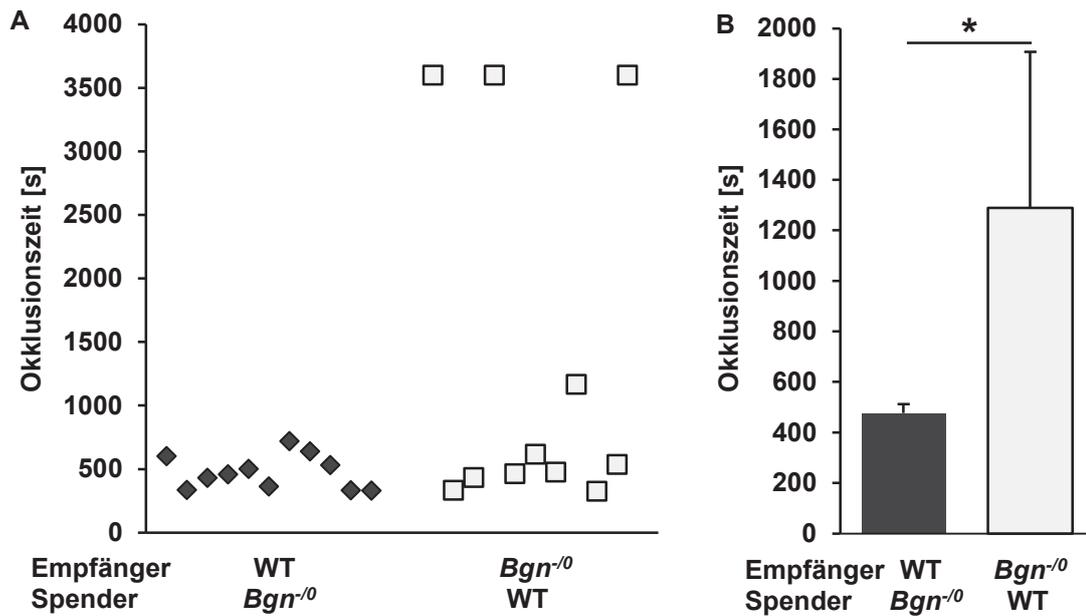


**Abb. 29: Signifikant verlängerte Blutungszeiten in *Bgn*<sup>-0</sup>-Knochenmarkchimären, die Spenderknochenmark von WT-Mäusen erhalten haben.**

Die Blutungszeiten wurden an narkotisierten Mäusen gemessen, nachdem ein Stück vom Schwanz an einem definierten Durchmesser abgetrennt wurde. Aufgrund von zu starkem Blutverlust wurden die Messungen bei noch nicht eingetretener Blutstillung nach 570 s abgebrochen. **(A)** Vergleich der Blutungszeiten von WT Mäusen, die nach Bestrahlung Knochenmark von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen bekommen haben und *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen, die nach Bestrahlung Knochenmark von WT Mäusen erhalten haben. Jeder Punkt repräsentiert die gemessene Blutungszeit von einem Tier. **(B)** Vergleich der Blutungszeiten von WT Mäusen, die nach Bestrahlung Knochenmark von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen bekommen haben und *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen, die nach Bestrahlung Knochenmark von WT Mäusen erhalten haben, n = 12, Mittelwert + SEM, \*\*p < 0,01. Abb. 29 A und B modifiziert in Hoermann *et al.* (nicht publiziert, in Revision) [100].

### 3.6.4 Untersuchung der Thrombusbildung *in vivo* in den *Bgn*<sup>-0</sup>- und WT-Knochenmarkchimären nach Gefäßverletzung mit FeCl<sub>3</sub>

In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse deutlich verlängerte Okklusionszeiten, bzw. teilweise keine Okklusion mittels Thrombusbildung nach Gefäßverletzung zeigen (Kapitel 3.5.3). Zudem konnte gezeigt werden, dass *Bgn*<sup>-0</sup>-Knochenmarkchimären mit WT-Spenderknochenmark deutlich verlängerte Blutungszeiten im Vergleich zu den WT-Knochenmarkchimären mit *Bgn*<sup>-0</sup>-Spenderknochenmark nach einer Schwanzspitzenamputation haben (Kapitel 3.6.3). Um zu analysieren, wie sich die Thrombusbildung in *Bgn*<sup>-0</sup>-Knochenmarkchimären, die Knochenmarkzellen von WT Mäusen erhalten haben, darstellt, wurde das Okklusionsmodell verwendet. Die rechte *Arteria carotis communis* der narkotisierten Mäuse wurde mikrochirurgisch freipräpariert, mittels FeCl<sub>3</sub> eine Gefäßverletzung induziert und der Blutfluss bis zur vollständigen Okklusion der *Arteria carotis communis* mittels Doppler-Sonde gemessen. Dabei zeigten sich bei den *Bgn*<sup>-0</sup>-Knochenmarkchimären mit WT-Spenderknochenmark bei 3 von 11 Tieren kein Verschluss der *Arteria carotis communis* mittels Thrombus. In der Zusammenfassung aller Tiere zeigt sich eine signifikant verlängerte Okklusionszeit bei den *Bgn*<sup>-0</sup>-Knochenmarkchimären mit WT-Spenderknochenmark im Vergleich zu den WT-Knochenmarkchimären mit *Bgn*<sup>-0</sup>-Spenderknochenmark (Abb. 30).



**Abb. 30:** *Bgn*<sup>-0</sup>-Knochenmarkchimären mit WT-Spenderknochenmark zeigen teilweise keine okkludierende Thrombusbildung nach Gefäßverletzung mittels FeCl<sub>3</sub>.

Bei den narkotisierten Mäusen wurde mittels FeCl<sub>3</sub> eine Gefäßverletzung der rechten *Arteria carotis communis* induziert. Anhand des mittels Doppler-Sonde gemessenen Flusses konnte gesehen werden, wann das Gefäß vollständig okkludiert war und es wurde die Zeit bis zur vollständigen Okklusion gemessen. **(A)** Gemessene Okklusionszeit, jeder Punkt repräsentiert ein Tier. **(B)** Mittelwerte der gemessenen Okklusionszeit. n = 11, Mittelwert + SEM, \*p < 0,05.

## 4 Diskussion

Akute Blutungen und arterielle Thrombosen sind im klinischen Alltag allgegenwärtig. Sowohl die Erforschung der physiologischen als auch der pathophysiologischen Vorgänge der Hämostase und der arteriellen Thrombose sind daher von großer Relevanz. Es gibt bereits unzählige Veröffentlichungen hierzu und dennoch bleiben aufgrund der Komplexität immer wieder Fragen offen.

Dass bei der Hämostase neben den Thrombozyten auch die extrazellulären Matrixproteine der Gefäßwand, wie z.B. Kollagen, eine wichtige Rolle spielen, ist bekannt [54]. Guidetti *et al.* konnten anhand von Decorin bereits zeigen, dass auch SLRPs mit Thrombozyten interagieren können [96]. Durch die Adhäsion an Decorin kommt es zu einer Aktivierung der Thrombozyten [96]. Ob auch das SLRP BGN für die Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung eine Rolle spielt, ist bisher allerdings weitestgehend unbekannt. Derzeit gibt es lediglich Untersuchungen dazu in einem atherosklerotischen Mausmodell [90]. Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, welche Rolle BGN in der Thrombozytenadhäsion und arteriellen Thrombusbildung, insbesondere nach einer akuten Gefäßverletzung, spielt.

### 4.1 Interaktion zwischen Thrombozyten und Biglykan *in vitro*

Da bekannt ist, dass Thrombozyten in ihren Granula eine Vielzahl von Proteinen, unter anderem auch EZM-Proteine, speichern können [16-18], war es von großer Bedeutung herauszufinden, ob aktivierte Thrombozyten auch BGN sezernieren können, da dies bisher noch nicht untersucht wurde. Mithilfe des zunächst durchgeführten ELISAs ließ sich kein BGN detektieren [100]. Dies könnte jedoch auch an einer zu niedrigen Sensitivität des ELISAs liegen, weshalb zusätzlich eine qRT-PCR durchgeführt wurde. In dieser konnte keine Biglykan-mRNA detektiert werden [100]. Daraus lässt sich schließen, dass aktivierte Thrombozyten kein BGN sezernieren können. Das in der Gefäßwand [83-85] und im Plasma [90] lokalisierte BGN muss also von anderen Zellen synthetisiert werden. Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Makrophagen BGN synthetisieren können [101-104] und somit mögliche Quellen für BGN im Zusammenhang mit der Hämostase darstellen.

Dass es eine Interaktion zwischen der Thrombozytenadhäsion und Proteoglykanen gibt, konnten Guidetti *et al.* 2002 zum ersten Mal zeigen [96]. Sie untersuchten das dem BGN verwandte SLRP Decorin und konnten zeigen, dass humane Thrombozyten an immobilisiertes Decorin binden können [96]. Die Adhäsionsversuche wurden unter statischen Bedingungen durchgeführt und die Auswertung erfolgte nach einer Inkubationszeit von 90 min [96]. In der hier vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls statische Adhäsionsversuche durchgeführt, um zu untersuchen, ob Thrombozyten auch an BGN binden können. Allerdings wurden die Inkubationszeiten im Vergleich zur Veröffentlichung von Guidetti *et al.* mit 5 min, 20 min und 60 min deutlich kürzer gewählt um eine physiologischere Situation zu demonstrieren, da es bei einer Gefäßverletzung zu einer schnellen Thrombozytenadhäsion kommen muss, um einen größeren Blutverlust zu verhindern. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass Thrombozyten bereits nach 5-minütiger Inkubationsdauer an BGN adhären können und die Anzahl der adhären Thrombozyten nach längeren Inkubationszeiten deutlich zunimmt [100]. Dass BGN mit verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen Typ I, II, III und VI interagiert [78] und auch einen Einfluss auf die Fibrillogenese [85] hat, ist bereits bekannt. Dass es allerdings eine direkte Interaktion zwischen Thrombozyten und BGN gibt, war bisher unbekannt.

Die Interaktion zwischen BGN und Kollagen Typ I konnten Schonherr *et al.* bereits 1995 zeigen [105]. Es stellte sich deswegen die Frage, ob es zu einer vermehrten Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zu einer alleinigen Kollagen-Matrix kommt. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst unter statischen Bedingungen untersucht. Hier zeigten sich signifikant mehr adhären Thrombozyten auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zu einer Kollagen-Matrix [100]. Auch unter Flussbedingungen zeigten sich eine signifikant größere Thrombusbildung auf einer Biglykan-Kollagen-Matrix im Vergleich zu einer Kollagen-Matrix [100]. Obwohl die Untersuchungen im Flusskammermodell im Vergleich zu den statischen Adhäsionsversuchen sicherlich bereits physiologischer sind, könnte hier bemängelt werden, dass in diesem Modell durch die Spritzenpumpe ein kontinuierlicher Fluss und kein pulsatile Fluss erzeugt wird, wie wir ihn im humanen Herz-Kreislaufsystem

finden [106]. Das heißt *in vivo* sind zirkulierende Thrombozyten durch den Blutfluss sich kontinuierlich veränderndem *shear stress* (engl. für Scherung) ausgesetzt [107]. Durch diese dynamischen Veränderungen der Scherraten kommt es auch zu Veränderungen in der Aktivierung der Thrombozyten [106, 107]. Diese dynamischen Veränderungen können durch die kontinuierliche Spritzenpumpe, die in dem in dieser Arbeit verwendeten Flusskammermodell eingesetzt wurde, nicht erzeugt werden.

## 4.2 Auswirkungen von löslichem BGN auf die Aktivierung von Thrombozyten und die Thrombusbildung

Die Inkubation von isolierten murinen Thrombozyten mit BGN führte im Vergleich zu ruhenden Thrombozyten nicht zu einer erhöhten Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . Auch bei einer Co-Inkubation der murinen Thrombozyten mit ADP plus BGN zeigte sich im Vergleich zu Thrombozyten, die nur mit ADP stimuliert wurden, keine erhöhte Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . Ebenfalls zeigte sich die Thrombusbildung im T-TAS® nach Vorinkubation mit BGN im Vergleich zur Kontrolle bei einer niedrigen Scherrate nicht verändert. Da aber in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass Thrombozyten an BGN binden können, stellte sich die Frage, ob die eingesetzten Konzentrationen zu niedrig waren, bzw. ob die Inkubationszeiten vielleicht zu kurz gewählt wurden. Guidetti *et al.* untersuchten ebenfalls den Einfluss von löslichem Decorin auf Thrombozyten [96]. Anders als in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten sie die Aggregation einer Thrombozytensuspension und nicht die Expression von Aktivierungsmarkern [96]. Aber auch hier zeigte sich nach Zugabe von Decorin keine vermehrte Thrombozytenaggregation [96]. Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit konnten sie aber zeigen, dass es durch vorherige Stimulation der Thrombozyten mit ADP zu einer verstärkten Interaktion zwischen Thrombozyten und Decorin kommt [96]. ADP aktiviert Thrombozyten und überführt Integrin  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$  in einen hoch affinen Zustand [108]. Die Aktivierung von Integrin  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$  wiederum kann das *spreading* von Thrombozyten induzieren [109]. Interessanterweise konnten Guidetti *et al.* auch zeigen, dass Integrin  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$  ein Rezeptor ist, über den die Thrombozyten an Decorin binden können [96]. Der Einsatz von inhibitorischen AK gegen den GPIb-V-IX Komplex, Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ,

*Cluster of differentiation* (CD)38 und *Cluster of differentiation* (CD)31 zeigte jedoch keinen Effekt auf die Thrombozytenadhäsion an Decorin, so dass bisher nur Integrin  $\alpha 2\beta 1$  als Rezeptor für Decorin bekannt ist [96].

Welcher Rezeptor bzw. welche Rezeptoren allerdings für die Adhäsion der Thrombozyten an BGN verantwortlich sind, ist bisher nicht untersucht worden. Dies ist aber für das Verstehen der Rolle von BGN im Rahmen der Hämostase und möglicher therapeutischer Optionen von großer Bedeutung. Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass BGN in seiner Rolle als Signalmolekül an verschiedene Rezeptoren, wie z.B. TLR2, TLR4 [95] und P2X-Rezeptoren [110], binden kann. In statischen Adhäsionsversuchen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nach Zugabe des inhibierenden GPVI Antikörpers JAQ-1 weniger Thrombozyten an BGN adhäreren [100]. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass der auf Thrombozyten exprimierte Kollagenrezeptor GPVI [13] ebenfalls ein Rezeptor für BGN darstellt. Hier sind jedoch weitere Experimente notwendig, um die Bedeutung von GPVI für die Bindung von Thrombozyten an BGN zu verstehen.

Ob neben GPVI noch weitere Rezeptoren die Bindung von Thrombozyten an BGN ermöglichen, ist bisher nicht bekannt. Weitere Untersuchungen sind hier notwendig. Insbesondere sollte analysiert werden, ob das für die Thrombozytenadhäsion an Decorin verantwortliche Integrin  $\alpha 2\beta 1$  [96] auch eine Rolle bei der Adhäsion an BGN spielt.

### **4.3 Auswirkungen der Defizienz von Biglykan auf die Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung**

Dass *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse in Bezug auf ihre Gefäßwände Veränderungen, wie z.B. eine vermehrte Neigung zu Aneurysmata oder Dissektionen zeigen, ist bereits bekannt [85, 86]. Ob das Fehlen von BGN auch einen Einfluss auf die Thrombozyten bei Gefäßverletzung hat, wurde bislang nicht untersucht. Dies ist allerdings vor allem im Hinblick auf *in vivo* Versuche von entscheidender Bedeutung, da dadurch gezeigt werden kann, ob die Ursache für eine potenzielle Veränderung in der Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung in *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen in einer veränderten Thrombozytenaktivierung oder im Fehlen von BGN in der Gefäß-

wand liegt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich in beiden Flusskammermodellen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, bei allen eingesetzten Scherraten, kein Unterschied in der Thrombusbildung bei Verwendung des Blutes von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen zeigt [100]. Allerdings zeigte sich bei der Untersuchung der Expression von Oberflächenproteinen auf nicht aktivierten Thrombozyten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen eine signifikant reduzierte Expression von GPVI im Vergleich zu nicht aktivierten Thrombozyten von WT Mäusen [100]. Hingegen zeigte sich kein Unterschied in der Expression von GPIb $\alpha$ , Integrin  $\beta$ 3 und Integrin  $\alpha$ 5 [100]. Warum die Expression von GPVI auf den Thrombozyten signifikant reduziert ist, ist bisher nicht bekannt. Der Unterschied in der Expression von GPVI ist mit ca. 9 % allerdings auch nur sehr gering ausgeprägt. Dennoch zeigen die Thrombozyten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen nach Aktivierung mit 1  $\mu$ g/ml CRP und 5  $\mu$ g/ml CRP eine signifikant reduzierte Expression von P-Selektin und aktiviertem Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 bei Verwendung von „ungewaschenem“ Blut. CRP ist ein Agonist von GPVI, dem Hauptrezeptor für die Bindung von Thrombozyten an Kollagen [13]. Möglicherweise kommt es durch die verminderte Expression von GPVI auf den Thrombozyten der *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse zu einer verminderten Aktivierung der Thrombozyten bei Stimulation mit dem GPVI Agonisten CRP. Warum dieser Effekt aber nur bei „ungewaschenem“ Blut und nicht bei „gewaschenem“ Blut auftritt, bleibt unklar. Eine mögliche Erklärung wäre allerdings, dass die Thrombozyten durch die Waschschriffe bereits aktiviert werden. Des Weiteren wäre es auch denkbar, dass sich bei den „ungewaschenen“ Proben der *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse Substanzen im Plasma befinden oder fehlen, die eine stärkere Thrombozytenaktivierung durch CRP verhindern bzw. für diese benötigt werden. Diese Hypothesen müssten in weiteren Versuchen allerdings noch näher untersucht werden. Trotz dieser leicht verminderten Expression von GPVI auf Thrombozyten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen und die verminderte Aktivierung der Thrombozyten durch CRP zeigte sich, wie schon oben beschrieben, kein Unterschied in der Thrombusbildung in den Flusskammer-Versuchen, was darauf schließen lässt, dass der Einfluss der reduzierten Expression von GPVI an der Oberfläche der transgenen Thrombozyten keine wesentliche Bedeutung für die physiologische Thrombusbildung hat.

#### 4.4 Auswirkungen der Defizienz von Biglykan auf die Thrombozytenadhäsion und die Thrombusbildung *in vivo*

Ob das Fehlen von BGN in Mäusen einen Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung hat, wurde bisher nur im Zusammenhang mit Atherosklerose untersucht. Grandoch *et al.* [90] verwendeten für ihre Untersuchungen *ApoE<sup>-/-</sup>/Bgn<sup>-/0</sup>* Doppel-Knockout Mäuse. Die Apolipoprotein E (ApoE) defizienten Mäuse, bei denen gezielt das ApoE Gen ausgeschaltet ist, zeigen eine schwere Hypercholesterinämie sowie Atherosklerose [111]. Das Fehlen von BGN in den *ApoE<sup>-/-</sup>* Mäusen führt zu einer verstärkten Ausbildung der Atherosklerose [90]. Zudem ist bekannt, dass BGN über seine Dermatansulfat-Seitenketten den Heparin-Cofaktor II aktivieren kann und dadurch Thrombin inhibiert [112]. Thrombin wiederum spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose sowie bei akuten thrombotischen Ereignissen [90]. Grandoch *et al.* konnten zeigen, dass BGN bei Atherosklerose als Thrombin-Inhibitor fungiert und dadurch auch zu einer verringerten Aktivierung von Thrombozyten und einer reduzierten Inflammation führt [90]. Dennoch zeigten sich in ihren Untersuchungen, dass die Inhibition von Thrombin scheinbar keinen Effekt auf die Hämostase hat und *ApoE<sup>-/-</sup>/Bgn<sup>-/0</sup>* Mäuse keinen prothrombotischen Phänotyp aufweisen [90]. So zeigte sich, sowohl beim Vergleich der Blutungszeiten als auch beim Vergleich der Okklusionszeiten in einem photochemischen Modell der arteriellen Thrombose, kein Unterschied zwischen *ApoE<sup>-/-</sup>/Bgn<sup>-/0</sup>* und *ApoE<sup>-/-</sup>* Mäusen [90]. Deutlich hervorgehoben werden sollte hier allerdings die Tatsache, dass es sich um Untersuchungen an Mäusen mit Atherosklerose handelt, einer schweren chronischen arteriellen Gefäßerkrankung [113], und nicht um Untersuchungen der Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung bei einer rein akuten arteriellen Gefäßschädigung, wie sie in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden.

Bei der Untersuchung der Blutungszeiten der *Bgn<sup>-/0</sup>* Mäuse im Vergleich mit den WT Mäusen zeigten 5 von 12 *Bgn<sup>-/0</sup>* Mäusen kein spontanes Sistieren der Blutung und die Versuche mussten nach 570 s aufgrund eines zu hohen Blutverlustes abgebrochen werden [100]. Bei den WT Mäusen hingegen sistierte die Blutung bei allen Tieren spontan [100]. Auch bei der Untersuchung der Thrombozytenad-

häsion *in vivo* zeigten sich nach Gefäßverletzung mittels Ligatur signifikant weniger adhärenente Thrombozyten bei den *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen [100]. Zudem zeigten sich *in vivo* nach Gefäßverletzung mit FeCl<sub>3</sub> signifikant verlängerte Okklusionszeiten bis zum vollständigen Verschluss des Gefäßes durch einen Thrombus in den *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Versuche mit den *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen, dass diese Tiere durch das Fehlen von BGN teilweise vor arterieller Thrombose geschützt sind.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die reduzierte Expression von GPVI auf den Thrombozyten aus *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen zumindest *in vitro* nicht zu einer verringerten Thrombusbildung führt, liegt die Ursache für die verlängerten Blutungszeiten in *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen vermutlich in der Defizienz von Biglykan in der Gefäßwand. Um dies zu verifizieren wurden Knochenmarkchimären generiert. *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse haben nach Bestrahlung Knochenmarkzellen von WT Mäusen erhalten und WT Mäuse haben nach Bestrahlung Knochenmarkzellen von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen erhalten. Die Knochenmarktransplantation ist eine gut entwickelte, effiziente und vielseitig anwendbare Methode, die es erlaubt, die Funktion von hämatopoetischen Zellen im Zusammenhang mit metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen zu untersuchen [114]. Da die Rekonstitution der hämatopoetischen Zellen je nach Genotyp und Alter der Mäuse variieren kann [114, 115], war es wichtig, neben der Kontrolle des Genotyps auch die Anzahl der Thrombozyten der Knochenmarkchimären zu kontrollieren, um auszuschließen, dass es aufgrund einer zu geringen bzw. erhöhten Anzahl von Thrombozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer verringerten bzw. erhöhten Thromboseneigung kommen kann. Sowohl beim Vergleich der Knochenmarkchimären untereinander als auch mit WT Mäusen und *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Thrombozytenzahl sechs Wochen nach der Knochenmarktransplantation, so dass die weiteren Untersuchungen durchgeführt werden konnten [100]. Wie bei den *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen zeigten auch einige der *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse mit WT-Spender-Knochenmark (7 von 12 Mäusen) keine adäquate Blutstillung bei der Untersuchung der Blutungszeiten und auch hier mussten nach 570 s aufgrund eines zu hohen Blutverlustes die Messungen abgebrochen werden [100]. Die WT Mäuse mit

*Bgn*<sup>-0</sup> Spender-Knochenmark hingegen zeigten eine adäquate Blutstillung nach durchschnittlich 172 s [100].

Auch bei der Untersuchung der Thrombusbildung *in vivo* nach Verletzung der Carotis mit FeCl<sub>3</sub>, zeigte ein Teil der *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse mit WT-Spender-Knochenmark keine Okklusion des Gefäßes mittels Thrombus. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die verlängerten Blutungszeiten und die reduzierte Thrombusbildung in den *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen auf das Fehlen von BGN in der Gefäßwand zurückzuführen sind. Die reduzierte Expression von GPVI auf den Thrombozyten trägt eventuell ebenfalls einen kleinen Teil dazu bei, ist aber wahrscheinlich aufgrund der Geringfügigkeit der reduzierten Expression [100] zu vernachlässigen.

#### **4.5 Zusammenfassung und Ausblick**

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Rolle BGN für die Thrombozytenadhäsion und arterielle Thrombusbildung spielt. Es konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten keine Quelle für BGN sind, allerdings an BGN binden können und dass es zu einer verstärkten Thrombusbildung auf einer Kollagen-BGN Matrix im Vergleich zur reinen Kollagen Matrix kommt [100]. Zudem konnte gesehen werden, dass die Thrombozyten von *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen GPVI im Vergleich zu WT Mäusen vermindert exprimieren [100] und dass sie bei Stimulierung mit CRP einen Aktivierungsdefekt aufweisen. Da dieser Effekt nur bei „ungewaschenem“ Blut auftritt, liegt die Vermutung nahe, dass eine Veränderung im Plasma bei den *Bgn*<sup>-0</sup> Mäusen dazu führt. *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse zeigen außerdem im Vergleich zu WT Mäusen verlängerte Blutungszeiten [100], eine reduzierte Thrombozytenadhäsion [100] und verlängerte Okklusionszeiten nach Gefäßverletzung. Die Versuche mit den Knochenmarkchimären bestätigten, dass das Fehlen von BGN in der Gefäßwand ursächlich für die verlängerten Blutungszeiten und die verlängerten Okklusionszeiten ist und nicht die veränderten Thrombozyten der *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse [100]. Bei der Suche nach einem Rezeptor, über den Thrombozyten an BGN binden können, zeigte sich in ersten Analysen, dass Thrombozyten vermutlich über GPVI mit BGN interagieren können [100].

Für die Zukunft wäre es sicherlich interessant zu untersuchen, ob GPVI tatsächlich der Rezeptor für BGN ist und ob noch weitere Rezeptoren für BGN auf den Thrombozyten zu finden sind. Zudem wären histologische Untersuchungen der arteriellen Gefäßwand von großer Bedeutung, um zu sehen, in wie weit BGN bzw. das Fehlen von BGN zu Strukturveränderungen der subendothelialen Matrix beiträgt. Um zu untersuchen, ob die Überexpression von BGN in der arteriellen Gefäßwand zu einem prothrombotischen Phänotyp führt, könnten transgene Mäuse verwendet werden, die eine Überexpression von BGN in der Gefäßwand zeigen, wie sie z.B. bei Thompson *et al.* für Untersuchungen der Atherosklerose verwendet wurden [116].

## 5 Literaturverzeichnis

1. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews* 2011;25:155-67.
2. Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 2015;50:326-36.
3. Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thrombosis research* 2012;129:220-4.
4. Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nature medicine* 2011;17:1423-36.
5. WHO. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization.2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
6. Destatis. Todesursachen in Deutschland 2015. Fachserie 12 Reihe 4. Statistisches Bundesamt (Destatis)2017.
7. Lefrancais E, Ortiz-Munoz G, Caudrillier A, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* 2017;544:105-9.
8. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer metastasis reviews* 2017;36:195-8.
9. George JN. Platelets. *Lancet (London, England)* 2000;355:1531-9.
10. Peters LL, Cheever EM, Ellis HR, et al. Large-scale, high-throughput screening for coagulation and hematologic phenotypes in mice. *Physiological genomics* 2002;11:185-93.
11. Gremmel T, Frelinger AL, 3rd, Michelson AD. Platelet Physiology. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2016;42:191-204.

12. Nurden AT. Platelet membrane glycoproteins: a historical review. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2014;40:577-84.
13. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003;102:449-61.
14. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673-87.
15. Solh T, Botsford A, Solh M. Glanzmann's thrombasthenia: pathogenesis, diagnosis, and current and emerging treatment options. *Journal of blood medicine* 2015;6:219-27.
16. Reed GL. Platelet secretory mechanisms. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2004;30:441-50.
17. Sander HJ, Slot JW, Bouma BN, Bolhuis PA, Pepper DS, Sixma JJ. Immunocytochemical localization of fibrinogen, platelet factor 4, and beta thromboglobulin in thin frozen sections of human blood platelets. *The Journal of clinical investigation* 1983;72:1277-87.
18. Wencel-Drake JD, Painter RG, Zimmerman TS, Ginsberg MH. Ultrastructural localization of human platelet thrombospondin, fibrinogen, fibronectin, and von Willebrand factor in frozen thin section. *Blood* 1985;65:929-38.
19. Hsu-Lin S, Berman CL, Furie BC, August D, Furie B. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *The Journal of biological chemistry* 1984;259:9121-6.
20. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *The Journal of clinical investigation* 1989;84:92-9.
21. Andre P. P-selectin in haemostasis. *British journal of haematology* 2004;126:298-306.

22. Qi C, Wei B, Zhou W, et al. P-selectin-mediated platelet adhesion promotes tumor growth. *Oncotarget* 2015;6:6584-96.
23. Jirouskova M, Shet AS, Johnson GJ. A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2007;5:661-9.
24. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine* 2002;8:1227-34.
25. Lindemann S, Kramer B, Seizer P, Gawaz M. Platelets, inflammation and atherosclerosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2007;5 Suppl 1:203-11.
26. Donner L, Falker K, Gremer L, et al. Platelets contribute to amyloid-beta aggregation in cerebral vessels through integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-induced outside-in signaling and clusterin release. *Science signaling* 2016;9:ra52.
27. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nature reviews Cancer* 2011;11:123-34.
28. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008;28:403-12.
29. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996;84:289-97.
30. Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2011;9 Suppl 1:92-104.
31. Puri RN, Colman RW. ADP-induced platelet activation. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 1997;32:437-502.
32. Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:2030-4.

33. Crescente M, Menke L, Chan MV, Armstrong PC, Warner TD. Eicosanoids in platelets and the effect of their modulation by aspirin in the cardiovascular system (and beyond). *British journal of pharmacology* 2018.
34. Reilly M, Fitzgerald GA. Cellular activation by thromboxane A<sub>2</sub> and other eicosanoids. *European heart journal* 1993;14 Suppl K:88-93.
35. Clemetson KJ, McGregor JL, James E, Dechavanne M, Luscher EF. Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *The Journal of clinical investigation* 1982;70:304-11.
36. Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, Uchino H. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 1987;69:1712-20.
37. Alshehri OM, Hughes CE, Montague S, et al. Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood* 2015;126:1601-8.
38. Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJ, et al. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood* 2006;107:1405-12.
39. Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue AH, et al. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 2000;96:1798-807.
40. Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TN, Clemetson KJ. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcalphaR and the natural killer receptors. *The Journal of biological chemistry* 1999;274:29019-24.
41. Poulter NS, Pollitt AY, Owen DM, et al. Clustering of glycoprotein VI (GPVI) dimers upon adhesion to collagen as a mechanism to regulate GPVI

- signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH 2017;15:549-64.
42. Bigalke B, Elvers M, Schonberger T, Gawaz M. Platelet and soluble glycoprotein VI - novel applications in diagnosis and therapy. *Current drug targets* 2011;12:1821-30.
43. Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, et al. Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:21561-6.
44. Mocsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nature reviews Immunology* 2010;10:387-402.
45. Yacine Boulaftali BHTN, Martine Jandrot-Perrus, Pierre H. Mangin. Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders. *Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update. Chapter: GPVI.* : Springer International Publishing AG 2017; 2017.
46. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circulation research* 2006;99:1293-304.
47. Tucker WD, Bhimji SS. *Anatomy, Blood Vessels.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, StatPearls Publishing LLC.; 2018.
48. Thorin-Trescases N, Thorin E. Lifelong Cyclic Mechanical Strain Promotes Large Elastic Artery Stiffening: Increased Pulse Pressure and Old Age-Related Organ Failure. *The Canadian journal of cardiology* 2016;32:624-33.
49. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiological reviews* 2009;89:957-89.
50. Dobrin PB. Mechanical properties of arteries. *Physiological reviews* 1978;58:397-460.
51. Leloup AJ, Van Hove CE, Heykers A, Schrijvers DM, De Meyer GR, Franssen P. Elastic and Muscular Arteries Differ in Structure, Basal NO

- Production and Voltage-Gated Ca(2+)-Channels. *Frontiers in physiology* 2015;6:375.
52. Seidelmann SB, Lighthouse JK, Greif DM. Development and pathologies of the arterial wall. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2014;71:1977-99.
53. Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN. Vascular extracellular matrix in atherosclerosis. *Cardiology in review* 2013;21:270-88.
54. Bergmeier W, Hynes RO. Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2012;4.
55. Wang D, Wang Z, Zhang L, Wang Y. Roles of Cells from the Arterial Vessel Wall in Atherosclerosis. *Mediators of inflammation* 2017;2017:8135934.
56. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 2014;15:786-801.
57. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science (New York, NY)* 2009;326:1216-9.
58. Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2012;4:a004903.
59. Zhu J, Marchant RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert review of medical devices* 2011;8:607-26.
60. Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, de Groot PG. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2004;2:561-73.
61. Fidler AL, Boudko SP, Rokas A, Hudson BG. The triple helix of collagens - an ancient protein structure that enabled animal multicellularity and tissue evolution. *Journal of cell science* 2018;131.

62. Barnes MJ, Farndale RW. Collagens and atherosclerosis. *Experimental gerontology* 1999;34:513-25.
63. Prydz K. Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. *Biomolecules* 2015;5:2003-22.
64. Wight TN. A role for proteoglycans in vascular disease. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2018.
65. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2015;42:11-55.
66. Chen S, Birk DE. The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly. *The FEBS journal* 2013;280:2120-37.
67. Reed CC, Iozzo RV. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconjugate journal* 2002;19:249-55.
68. Kalamajski S, Oldberg A. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2010;29:248-53.
69. Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *The Biochemical journal* 1984;223:587-97.
70. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *The FEBS journal* 2010;277:3864-75.
71. Merline R, Moreth K, Beckmann J, et al. Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21. *Science signaling* 2011;4:ra75.
72. Moreth K, Iozzo RV, Schaefer L. Small leucine-rich proteoglycans orchestrate receptor crosstalk during inflammation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2012;11:2084-91.

73. Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature reviews Molecular cell biology* 2014;15:771-85.
74. Ni GX, Li Z, Zhou YZ. The role of small leucine-rich proteoglycans in osteoarthritis pathogenesis. *Osteoarthritis and cartilage* 2014;22:896-903.
75. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annual review of biochemistry* 1998;67:395-424.
76. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* 2015;125:2019-28.
77. Schaefer L, Iozzo RV. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *The Journal of biological chemistry* 2008;283:21305-9.
78. Nastase MV, Young MF, Schaefer L. Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2012;60:963-75.
79. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1990;38:1549-63.
80. Westermann D, Mersmann J, Melchior A, et al. Biglycan is required for adaptive remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 2008;117:1269-76.
81. Xu T, Bianco P, Fisher LW, et al. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nature genetics* 1998;20:78-82.
82. Brandan E, Cabello-Verrugio C, Vial C. Novel regulatory mechanisms for the proteoglycans decorin and biglycan during muscle formation and muscular dystrophy. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2008;27:700-8.

83. Merrilees MJ, Beaumont B, Scott LJ. Comparison of deposits of versican, biglycan and decorin in saphenous vein and internal thoracic, radial and coronary arteries: correlation to patency. *Coronary artery disease* 2001;12:7-16.
84. 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. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 1997;6:271-8.
85. Heegaard AM, Corsi A, Danielsen CC, et al. Biglycan deficiency causes spontaneous aortic dissection and rupture in mice. *Circulation* 2007;115:2731-8.
86. Tang T, Thompson JC, Wilson PG, et al. Biglycan deficiency: increased aortic aneurysm formation and lack of atheroprotection. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2014;75:174-80.
87. O'Brien KD, Olin KL, Alpers CE, et al. Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques: colocalization of biglycan with apolipoproteins. *Circulation* 1998;98:519-27.
88. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, et al. Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2002;22:1642-8.
89. Marzoll A, Melchior-Becker A, Cipollone F, Fischer JW. Small leucine-rich proteoglycans in atherosclerotic lesions: novel targets of chronic statin treatment? *Journal of cellular and molecular medicine* 2011;15:232-43.
90. Grandoch M, Kohlmorgen C, Melchior-Becker A, et al. Loss of Biglycan Enhances Thrombin Generation in Apolipoprotein E-Deficient Mice: Implications for Inflammation and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2016;36:e41-50.
91. Schaefer L. Extracellular matrix molecules: endogenous danger signals as new drug targets in kidney diseases. *Current opinion in pharmacology* 2010;10:185-90.

92. Scott IC, Imamura Y, Pappano WN, et al. Bone morphogenetic protein-1 processes biglycan. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:30504-11.
93. Monfort J, Tardif G, Reboul P, et al. Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloproteinase-13: identification of a new biglycan cleavage site. *Arthritis research & therapy* 2006;8:R26.
94. Boukpepsi T, Menashi S, Camoin L, Tencate JM, Goldberg M, Chaussain-Miller C. The effect of stromelysin-1 (MMP-3) on non-collagenous extracellular matrix proteins of demineralized dentin and the adhesive properties of restorative resins. *Biomaterials* 2008;29:4367-73.
95. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *The Journal of clinical investigation* 2005;115:2223-33.
96. 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;100:1707-14.
97. Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H. Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:23998-4002.
98. Van Kruchten R, Cosemans JM, Heemskerk JW. Measurement of whole blood thrombus formation using parallel-plate flow chambers - a practical guide. *Platelets* 2012;23:229-42.
99. Bergmeier W, Schulte V, Brockhoff G, Bier U, Zirngibl H, Nieswandt B. Flow cytometric detection of activated mouse integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 with a novel monoclonal antibody. *Cytometry* 2002;48:80-6.
100. In Revision: Hoermann H, Maurus N, Krüger I, Sun Y, Kohlmorgen C, Grandoch M, Schelzig H, Fischer J.W, Elvers, M. The proteoglycan biglycan modulates platelet GPVI signaling in platelet adhesion and thrombus formation. In Revision at *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*

101. Jarvelainen HT, Kinsella MG, Wight TN, Sandell LJ. Differential expression of small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans, PG-I/biglycan and PG-II/decorin, by vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *The Journal of biological chemistry* 1991;266:23274-81.
102. Chang MY, Potter-Perigo S, Tsoi C, Chait A, Wight TN. Oxidized low density lipoproteins regulate synthesis of monkey aortic smooth muscle cell proteoglycans that have enhanced native low density lipoprotein binding properties. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:4766-73.
103. Tiede K, Melchior-Becker A, Fischer JW. Transcriptional and posttranscriptional regulators of biglycan in cardiac fibroblasts. *Basic research in cardiology* 2010;105:99-108.
104. Schaefer L, Macakova K, Raslik I, et al. Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction. *The American journal of pathology* 2002;160:1181-91.
105. Schonherr E, Witsch-Prehm P, Harrach B, Robenek H, Rauterberg J, Kresse H. Interaction of biglycan with type I collagen. *The Journal of biological chemistry* 1995;270:2776-83.
106. Wootton DM, Ku DN. Fluid mechanics of vascular systems, diseases, and thrombosis. *Annual review of biomedical engineering* 1999;1:299-329.
107. Yin W, Bond K, Rouf F, Rubenstein DA. Altered Flow Changes Thrombin Generation Rate of Circulating Platelets. *Annals of biomedical engineering* 2015;43:2827-37.
108. Jung SM, Moroi M. Activation of the platelet collagen receptor integrin  $\alpha(2)\beta(1)$ : its mechanism and participation in the physiological functions of platelets. *Trends in cardiovascular medicine* 2000;10:285-92.
109. Inoue O, Suzuki-Inoue K, Dean WL, Frampton J, Watson SP. Integrin  $\alpha2\beta1$  mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLC $\gamma2$ . *The Journal of cell biology* 2003;160:769-80.

110. Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, et al. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:24035-48.
111. Imaizumi K. Diet and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2011;75:1023-35.
112. 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. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:18085-92.
113. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011;473:317-25.
114. Aparicio-Vergara M, Shiri-Sverdlov R, de Haan G, Hofker MH. Bone marrow transplantation in mice as a tool for studying the role of hematopoietic cells in metabolic and cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* 2010;213:335-44.
115. Duran-Struuck R, Dysko RC. Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 2009;48:11-22.
116. Thompson JC, Tang T, Wilson PG, Yoder MH, Tannock LR. Increased atherosclerosis in mice with increased vascular biglycan content. *Atherosclerosis* 2014;235:71-5.

## Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Prof. Dr. Margitta Elvers für die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Dissertation. Ich bedanke mich zudem für die vielen Gespräche, Anregungen und Diskussionen, die diese Arbeit vorangebracht haben.

Frau Prof. Dr. Dr. Miriam Cortese-Krott danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herr Prof. Dr. Jens W. Fischer und Frau Prof. Dr. Maria Grandoch für die nette Kooperation, die Einbringung neuer Ideen und die zur Verfügungstellung der *Bgn*<sup>-0</sup> Mäuse sowie der Räumlichkeiten und Geräte für die Durchführung der Operationen.

Ich danke meinen Kollegen und ehemaligen Kollegen im Labor für die gute Einarbeitung, die große Hilfsbereitschaft, die fachlichen Diskussionen und die netten Gespräche. Insbesondere möchte ich mich bei Martina Spelleken bedanken, die immer ein offenes Ohr für Fragen hatte und einem stets mit fachlichem und menschlichem Rat zur Seite stand. Besonderer Dank gilt auch Irena Krüger und Nina Gowert, die mich bei den Mausversuchen unterstützt haben.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt dem IRTG1902 unter der Leitung von Herr Prof. Dr. Axel Gödecke. Ich danke nicht nur für das Stipendium, welches es mir ermöglicht hat, mich monatelang Vollzeit auf die Forschung zu konzentrieren, sondern vielmehr möchte ich mich dafür bedanken, dass es mir ermöglicht wurde, in diesem großartigen Netzwerk aus begeisterten Wissenschaftlern zu lernen, was es heißt wissenschaftlich zu arbeiten. Die vielen Meetings, Netzwerktreffen, Summer Schools, Kurse und Vorlesungen waren eine große Bereicherung. Insbesondere möchte ich mich auch bei Frau Dr. Sandra Berger bedanken, die mir jederzeit mit großer Menschlichkeit und mit guten Ratschlägen zur Seite stand.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich über die Jahre immer bedingungslos unterstützt haben, mich stets ermutigt haben meine Ziele zu verwirklichen und immer für mich da waren. Danke!