

Aus der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor Univ.-Prof. Dr.med. Hubert Schelzig

**Der Einfluss des Extrazellulären
Matrixproteins Biglykan auf die Adhäsion
und Aggregation von Thrombozyten**

Dissertation

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

vorgelegt von
Nadine Maurus
2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der 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.med. Maria Grandoch, M.Sc.

Meiner Familie gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht.

Hoermann H, Krueger I, Maurus N, Reusswig F, Sun Y, Kohlmorgen C, Grandoch M, Fischer JW, Elvers M. The Proteoglycan Biglycan Modulates Platelet Adhesion and Thrombus Formation in a GPVI-Dependent Manner. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 10;22(22):12168. doi: 10.3390/ijms222212168. PMID: 34830059; PMCID: PMC8622445.

Zusammenfassung

Die Rolle, die Thrombozyten in der Hämostase spielen, ist essenziell. Eine gesteigerte Aktivität der Thrombozyten kann jedoch zu pathologischen Ereignissen führen, die ursächlich für die Entstehung von Herzinfarkten und Schlaganfällen ist. Die Adhäsion von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand ist ein komplexer Vorgang, bei dem unterschiedliche Extrazelluläre Matrixproteine eine Rolle spielen. Biglykan (BGN) ist ebenfalls ein Extrazelluläres Matrixprotein (EZM), das zur Gruppe der *small leucinerich proteoglynas* (SLRP's) gehört. BGN bewirkt durch seine Bindung an Kollagenfibrillen eine Veränderung in deren Durchmesser und auch in ihrem Vernetzungsverhalten, was wiederum zu einer gesteigerten Kollagenstabilität führt. Erste Experimente lassen bereits vermuten, dass der Kollagenrezeptor Glykoprotein VI (GPVI) an der Bindung von BGN beteiligt ist. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle und Bedeutung des Proteins BGN in der Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung zu untersuchen. Anhand verschiedener Adhäsionsversuche wurde zunächst gezeigt, dass es eine gesteigerte Adhäsion humaner Thrombozyten auf einer BGN-Kollagen-Matrix gibt, im Vergleich zu Kollagen allein. Im nächsten Schritt wurde gezeigt, dass BGN Thrombozyten nicht nur in ihrem Adhäsionsverhalten, sondern auch in ihrer zytoseklettalen Veränderung, dem sog. *Spreading* beeinflusst. Die Adhäsion der Thrombozyten auf Fibrinogen wird durch BGN hingegen nicht beeinflusst. Frühere Experimente der Arbeitsgruppe ließen vermuten, dass BGN über den GPVI- Rezeptor wirken könnte. Daher wurde der zugrundeliegende Signalweg durch Phosphorylierungsstudien genauer untersucht. Eine erhöhte Gesamtphosphorylierung der Proteine, v.a. in der Stimulation durch BGN in Kombination mit CRP wurde sichtbar. Als nächstes wurde der GPVI-Signalweg genauer untersucht. Hier zeigten sich verstärkte Aktivierungen bei SRC, PLC γ ². Eine Beeinflussung der Blutpfropfbildung, der sog. *Clot Retraction*, durch BGN konnte nicht festgestellt werden. Um eine mögliche Rolle des BGN als neues antithrombotisches Mittel genauer definieren zu können, sind noch weitere Untersuchungen nötig.

Summary

Platelets play a major role in hemostasis. However, an increased platelet activity can lead to pathological events which can cause myocardial infarction and stroke. The adhesion of platelets to the damaged vessel wall is a complex process in which different proteins of the extracellular matrix (ECM) play an important role. Biglycan (BGN) is a protein of the ECM as well and belongs to the small leucinerich proteoglycans. After binding to collagen fibrils BGN causes a change in their diameter and in their networking behavior, which leads to an increased collagen stability. First experiments suggest that the collagen receptor GPVI is part of the binding of BGN. Aim of this study was to investigate the role and importance of BGN in platelet adhesion and thrombus formation. Different adhesion experiments showed that the adhesion of human platelets was enhanced on a collagen-biglycan matrix in comparison to a collagen matrix alone. In the next step it was shown that BGN not only influences the adhesion of platelets but also their skeletal shape change, the so-called spreading. The adhesion of platelets on fibrinogen wasn't influenced by BGN. Earlier experiments of the group suggested that BGN induced cell activation through glycoprotein VI (GPVI). Because of that the signaling pathway of GPVI was analyzed by investigating the phosphorylation cascade after stimulation with BGN. Enhanced tyrosine phosphorylation was detected in samples with BGN and CRP. Further analysis of tyrosine phosphorylated proteins showed that BGN was able to induce the phosphorylation of SRC, PLC γ ². All of them become phosphorylated upon GPVI activation. A role of BGN in clot retraction wasn't detectable. To investigate the role of BGN as a new antithrombotic target way more investigations are necessary.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| μ | mikro |
| μg | Mikrogramm |
| μL | Mikroliter |
| μm | Mikrometer |
| AA | Acrylamid |
| Abb. | Abbildung |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AK | Antikörper |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BGN | Biglykan (engl. <i>biglycan</i>) |
| BSA | Rinder-Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| d.h. | das heißt |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| Engl. | Englisch |
| EZM | Extrazelluläre Matrix |
| FcRγ-chain | Fragment crystalized receptor γ-chain (engl. für Fc-Rezeptor-γ- Kette) |
| g | g-Kraft |
| GP | Glykoprotein |
| GPVI | Glykoprotein VI |
| h | Stunden |
| IGPAL | Octylphenoxypolyethoxyethanol |
| IL | Interleukin |
| IP3 | Inositol-1,4,5-triphosphat |

| | | |
|------------------|--|---------------------------------------|
| ITAM | Immunrezeptor aktivierendes Motiv (engl.: tyrosine-based activation motive) | Tyrosin-basierendes immunoreceptor |
| kD | Kilodalton | |
| KO | Knock-out | |
| l | Liter | |
| LAT | <i>Linker for activation of T cells</i> | |
| MFI | Mean fluorescence intensity (gemittelte Fluoreszenzintensität) | |
| mg | Milligram | |
| min | Minuten | |
| ml | Milliliter | |
| mM | Millimolar | |
| MW | Mittelwert | |
| NaCl | Natriumchlorid | |
| NaN ₃ | Natriumazid | |
| NaOH | Natronlauge | |
| nm | Nanometer | |
| OD | optische Dichte | |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese | |
| PAR4 | <i>Protease-activated receptor 4</i> | |
| PBS | <i>phosphate buffer saline</i> | |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion | |
| PFA | Paraformaldehyd | |
| pH | <i>potentia hydrogenii</i> | |
| PIP2 | Posphatidylinositol-4,5-bisphosphat | |
| PKC | Proteinkinase C | |
| PLC γ 2 | Phospholipase C γ 2 | |
| PRP | Thrombozyten-reiches Plasma (engl.: platelet rich plasma) | |
| rpm | <i>rounds per minute</i> | |
| RT | Raumtemperatur | |

| | |
|------------------|---------------------------------|
| s | Sekunden |
| s. | siehe |
| SEM | Standardfehler des Mittelwerts |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SLRP | Small leucine-rich proteoglycan |
| SYK | <i>Spleen tyrosine kinase</i> |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N, N, N-Tetramethylendiamin |
| TLR2 | <i>Toll-like-receptor-2</i> |
| TLR4 | <i>Toll-like-receptor-4</i> |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor-alpha |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminoethan |
| TXA ₂ | Thromboxan-A ₂ |
| U | Einheit |
| u.a. | unter anderem |
| üN | über Nacht |
| V | Volt |
| vWF | Von-Willebrand -Faktor |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |
| WT | Wildtyp |
| z.B. | Zum Beispiel |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| Zusammenfassung | I |
| Summary | II |
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| Abbildungsverzeichnis | VIII |
| Tabellenverzeichnis | IX |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Die pathologische Thrombozytenaktivität..... | 1 |
| 1.2 Die Hämostase..... | 1 |
| 1.2.1 Der Thrombozyt..... | 1 |
| 1.2.2 Die primäre Hämostase | 3 |
| 1.2.3 Die sekundäre Hämostase..... | 5 |
| 1.3 Der Kollagenrezeptor GPVI | 6 |
| 1.3.1 Der Aufbau | 6 |
| 1.3.2 Die Signalübermittlung | 6 |
| 1.4. Die extrazelluläre Matrix (EZM) | 8 |
| 1.5 Das Proteoglykan Biglykan (BGN) als Bestandteil der EZM..... | 8 |
| 1.5.1 Die molekulare Struktur von BGN..... | 8 |
| 1.5.2 Die Funktionen des BGN | 9 |
| 1.6 Die Zielsetzung dieser Arbeit..... | 10 |
| 2 Material | 11 |
| 2.1 Geräte | 11 |
| 2.2 Gebrauchsmaterialien | 12 |
| 2.3 Chemikalien, Puffer, Lösungen..... | 12 |
| 2.4 Antikörper | 17 |
| 2.5 Kits..... | 18 |
| 3 Methoden | 19 |
| 3.1 Tierexperimentelles Arbeiten | 19 |
| 3.1.1 Versuchstiere..... | 19 |
| 3.1.2 Die murine Blutentnahme..... | 19 |
| 3.2 Humanes Probenmaterial | 20 |
| 3.3 Die Zellbiologischen Methoden..... | 20 |
| 3.3.1 Die Isolation muriner Thrombozyten..... | 20 |
| 3.3.2 Die Isolation humaner Thrombozyten..... | 21 |
| 3.3.3 Das Spreading humaner Thrombozyten..... | 21 |
| 3.3.4 Die Adhäsion humaner Thrombozyten | 22 |
| 3.3.5 Die Aktinfärbung humaner Thrombozyten..... | 22 |
| 3.3.6 Die Adhäsion muriner Thrombozyten auf Fibrinogen..... | 23 |
| 3.3.7 Die <i>Clot Retraction</i> | 23 |
| 3.4 Die Proteinbiochemischen Methoden..... | 24 |
| 3.4.1 Die Herstellung muriner Zellysate..... | 24 |
| 3.4.2 Die Herstellung humaner Zellysate..... | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.3 Die SDS-PAGE (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>) | 25 |
| 3.4.4 Der Western Blot | 26 |
| 3.4.5 Die Gradientengelelektrophorese | 28 |
| 4 Ergebnisse | 31 |
| 4.1 Erhöhte Adhäsion humaner Thrombozyten auf einer BGN-Kollagen-Matrix | 31 |
| 4.2 Humane Thrombozyten zeigen Veränderungen im Zytoskelett auf einer BGN-Kollagen-Matrix | 33 |
| 4.3 BGN hat keinen signifikanten Einfluss auf das Adhäsionsverhalten muriner Thrombozyten auf Fibrinogen | 35 |
| 4.4 Veränderte zytoskelettale Reorganisation humaner Thrombozyten auf einer BGN-Matrix | 37 |
| 4.5 Erhöhte Tyrosinphosphorylierung bei BGN/CRP | 39 |
| 4.6 Erhöhte Phosphorylierung von SRC und PLC γ ₂ nach BGN/CRP Stimulation im humanen und murinen System | 41 |
| 4.7 BGN hat keinen Einfluss auf die <i>Clot Retraction</i> von Bgn-/- Mäusen | 43 |
| 5 Diskussion | 45 |
| 5.1 BGN induziert eine vermehrte Adhäsion von Thrombozyten | 45 |
| 5.2 Der GPVI Signalweg wird durch BGN Stimulation aktiviert | 47 |
| 5.3 Potentielle Rolle von BGN als Modulator von Rho-GTPasen | 48 |
| 5.4 Der Zusammenhang zwischen BGN und GPVI in der Thrombozytenvermittelten Inflammation | 49 |
| 5.5 Zusammenfassung und Ausblick | 50 |
| 6 Literaturverzeichnis | 51 |
| Danksagung | 55 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Verschiedene Zustandsformen der Thrombozyten..... | 4 |
| Abb. 2: Thrombozytenadhäsion und-aggregation auf der extrazellulären Matrix (EZM)..... | 5 |
| Abb. 3: Die Aktivierungskaskade des GPVI-Rezeptors..... | 7 |
| Abb. 4: Die molekulare Struktur von BGN..... | 9 |
| Abb. 5: Blotaufbau des Western-Blot..... | 27 |
| Abb. 6: Adhäsion von isolierten humanen Thrombozyten auf einer BGN-Matrix, einer Kollagen-Matrix und einer BGN-Kollagen-Matrix..... | 32 |
| Abb. 7: Humane Thrombozyten zeigen eine erhöhte Oberflächenvergrößerung auf einer BGN-Kollagen-Matrix nach 20 min Inkubationszeit bei RT..... | 34 |
| Abb. 8: Adhäsion von isolierten murinen Thrombozyten nach 5, 20 und 60 min Inkubation bei RT auf einer Fibrinogen-Matrix und einer BGN-Fibrinogen-Matrix..... | 36 |
| Abb. 9: Veränderungen der Zytoskelett-Reorganisation humaner Thrombozyten auf einer BGN-Matrix..... | 38 |
| Abb. 10: Erhöhte Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine in humanen und murinen Thrombozyten | 40 |
| Abb. 11: Western Blot Analysen zur Bestimmung der Phosphorylierung von Src und PLC γ 2 | 42 |
| Abb. 12: Unveränderte statische Thrombusbildung bei WT und <i>Bgn</i> ⁻⁰ . Mäusen..... | 44 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Geräte | 11 |
| Tabelle 2: Gebrauchsartikel..... | 12 |
| Tabelle 3: Chemikalien,Puffer, Lösungen | 12 |
| Tabelle 4: Antikörper für Western -Blot..... | 17 |
| Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kits..... | 18 |
| Tabelle 6: Die Bestandteile der Gele..... | 26 |
| Tabelle 7: Die Bestandteile der Blotpuffer..... | 27 |

1 Einleitung

1.1 Die pathologische Thrombozytenaktivität

Circa 8,9 Millionen Menschen sind laut der World Health Organisation (WHO) im Jahr 2019 an kardiovaskulären Erkrankungen verstorben [1]. In Deutschland sind laut statistischem Bundesamt 2019 331 211 Menschen an einer Herz-/Kreislauferkrankung verstorben. Somit sind chronisch ischämische Herzkrankheiten und der akute Herzinfarkt die häufigsten Todesursachen in Deutschland [2]. Die Hämostase soll den physiologischen Blutfluss regulieren und die Integrität der Gefäßwände sicherstellen [3]. Hierbei spielen Thrombozyten eine essenzielle Rolle [4]. Eine pathologische Thrombozytenaktivität führt jedoch häufig zu thrombotischen Ereignissen, welche die Hauptursachen für das Auftreten von Schlaganfällen und Herzinfarkten sind [3].

1.2 Die Hämostase

Im physiologischen Zustand gibt es keine Interaktion zwischen den zirkulierenden Thrombozyten im Blutkreislauf und der Gefäßwand [5]. Durch eine Gefäßwandverletzung und dem damit verbundenen Integritätsverlust kommt es zur Einblutung in das umliegende Gewebe. Um Gefäßschäden zu vermeiden und einen möglichen Blutverlust zu verringern, formieren sich Thrombozyten in Verbindung mit verschiedenen anderen Komponenten, wie Fibrin, zu einem Thrombus, der die Blutstillung herbeiführt. Die Hämostase beschreibt diesen physiologischen Prozess der Thrombusbildung, der die benötigte Stillung der Blutung erzeugt [6].

1.2.1 Der Thrombozyt

Thrombozyten gehören zu den kleinsten kernlosen Zellen des menschlichen Blutkreislaufs mit einem Durchmesser von ca. $4\mu\text{m}$ und sind, wie bereits erwähnt, maßgebliche Regulatoren der Hämostase [6]. Ihre durchschnittliche Konzentration beträgt 150.000-300.000 Thrombozyten pro Mikroliter Blut [7]. Durch Abschnürung von Megakaryozyten entstehen sie im Knochenmark und in der Lunge und sind durch ihre diskoide Form und das Fehlen eines Zellkerns charakterisiert [6,8].

Nach ihrer 5-7-tägigen Lebenszeit im menschlichen Körper werden sie in Leber und Milz abgebaut [9]. Die morphologische Thrombozytenstruktur ist in 4 Bereiche untergliedert:

- die periphere Zone
- die strukturelle Zone
- die Zone der Organellen
- das Membransystem

Die periphere Zone besteht aus der Zytoplasmamembran, der Glykokalyx, die auf einer Phospholipidschicht sitzt. Diese sogenannte „*lipid bilayer*“ enthält *tissue factor*, ein wichtiges Signalmolekül der Gerinnungskaskade [10].

Die strukturelle Zone ist, mit den in ihr enthaltenen Mikrotubuli und anderen Strukturproteinen, verantwortlich für die diskoide Ruheform der Thrombozyten und durch ihre Aktinfilamente auch für die Ausformung des Zytoskelettes.

In der Zone der Organellen sind Mitochondrien, Glykogenspeicher und Speichergranula enthalten. Zu diesen Speichergranula gehören die α -Granula, die Koagulationsfaktoren, Thrombospondin und adhäsive Proteine, wie z.B. Glykoprotein (GP) IIb-IIIa oder das Glykoprotein (GP) VI, welche membrangebunden in den Granula vorliegen und nach Aktivierung externalisiert werden, die Dichte Granula mit ADP, ATP, Kalzium und Serotonin, sowie die Lysosomen, welche hydrolytische Enzyme enthalten [10].

Das Membransystem dient z.B. der Aufnahme verschiedenster Signalmoleküle aus dem Plasma (z.B. Serotonin) für deren Transport und deren Bereitstellung an peripheren Wirkstellen, sowie der Speicherung eines intrazellulären Ca^{2+} -Reservoirs [10].

1.2.2 Die primäre Hämostase

1.2.2.1 Die Adhäsion der Thrombozyten

Durch eine Gefäßwandverletzung mit einhergehender Endothelschädigung kommt es zur Exposition der subendothelialen Matrix, v.a. von Kollagen. Die durch den von Willebrand Faktor (vWF) vermittelte Bindung von Kollagen löst die initiale Plättchenadhäsion aus. Als entscheidender Rezeptor ist hierbei der, auf der Thrombozytemembran gelegene, GP) Ib-IX-V-Komplex zu nennen [11]. Zwei weitere Kollagenrezeptoren stabilisieren diese Bindung: GPIa-IIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_1$) und GPVI [12]. Nach dem „Two Step- TwoSite Modell“ ist GPIa-IIa für die Adhäsion der Blutplättchen an Kollagen und GPVI für die Aktivierung der bereits gebundenen Thrombozyten zuständig [13]. Das Ergebnis ist die thrombozytäre Bedeckung des Endothelschadens.

1.2.2.2 Die Aktivierung der Thrombozyten

Die durch GPVI angestoßene Signalkaskade (s. Abschnitt 1.3) führt zur Freisetzung einiger Mediatoren wie ADP und Thromboxan-A₂ (TXA₂) [11]. Durch die Bindung der Mediatoren an spezifische Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche wird über Second-Messenger-Systeme, bei denen vorwiegend G-Protein- gekoppelte Rezeptorkomplexe als Übermittler fungieren, die Signalkaskade initiiert. Im Zuge dessen kommt es außerdem zur Freisetzung von Kalzium aus den Granula durch Phospholipase C [14]. Dies führt nicht nur zu einer zytoskelettalen Reorganisation der Thrombozyten, sondern auch dazu, dass der wichtige Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa aktiviert wird [15,16]. Der *Shapechange* der Thrombozyten resultiert vor allem aus der Bindung an die thrombozytären Kollagenrezeptoren und durch den Anstieg des zytoplasmatischen Kalziumspiegels [17]. Hierbei erfolgt durch den Stimulus verschiedener Agonisten, wie z.B. Kollagen, die Aktivierung der Familie der Rho-GTPasen. Hierzu gehören RhoA, Rac1 und Cdc42. Cdc42 kann über das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP), v.a. über N-WASP die Ausbildung von Filopodien aktivieren [18]. Rac1 wird durch verschiedene G-Protein- gekoppelte Rezeptoren (Thromboxanrezeptor oder Proteaseaktivierter Rezeptor) über Phospholipase aktiviert [19]. Das aktivierte Rac1 spielt über den Signalweg der Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteine (WAVE), die zur Familie der WASP-Proteine gehören eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Lamellipodien [20,21]. Dadurch können Thrombozyten ihre Oberfläche vergrößern und somit den Kontakt zur Gefäßwand und zu anderen Plättchen erheblich steigern (Abb.1) [22].

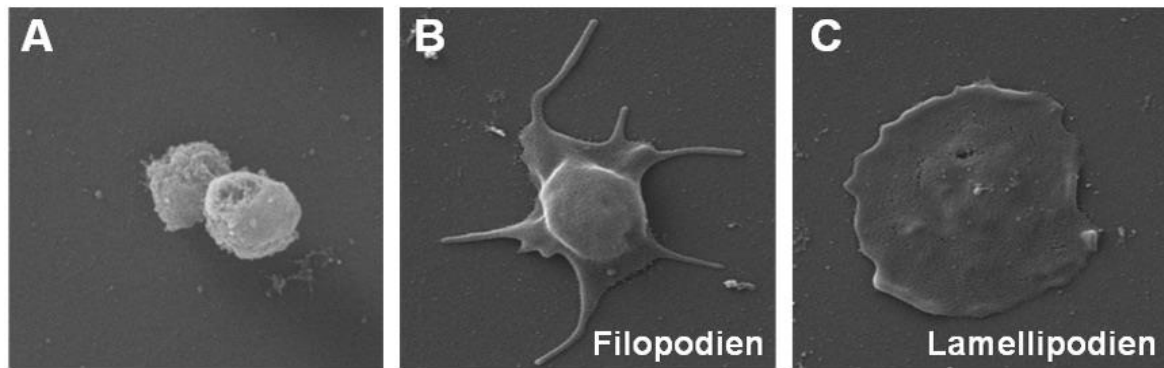


Abb. 1: Verschiedene Zustandsformen der Thrombozyten

A: Im Ruhezustand besitzen die Thrombozyten eine diskoide Form **B:** Thrombozyten bilden nach Aktivierung Filopodien **C:** Thrombozyten bilden nach Aktivierung Lamellipodien. Abb (modifiziert) aus Elvers [23]; Genehmigung vermittelt durch Copyright Clearance Center, Inc.

1.2.2.3 Die Aggregation der Thrombozyten

Durch die Thrombozytenaktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung des Fibrinogen-Rezeptors auf der Thrombozytenmembran. Dadurch kann der Fibrinogenrezeptor Fibrinogen binden und es kommt zur Quervernetzung der Thrombozyten durch Fibrinogenbrücken [24]. Das Ergebnis ist ein dichtes zelluläres Netzwerk (Abb. 2). Die Aufnahme weiterer Thrombozyten wird durch die Sezernierung verschiedener Agonisten, wie ADP oder TXA₂ sichergestellt [24].

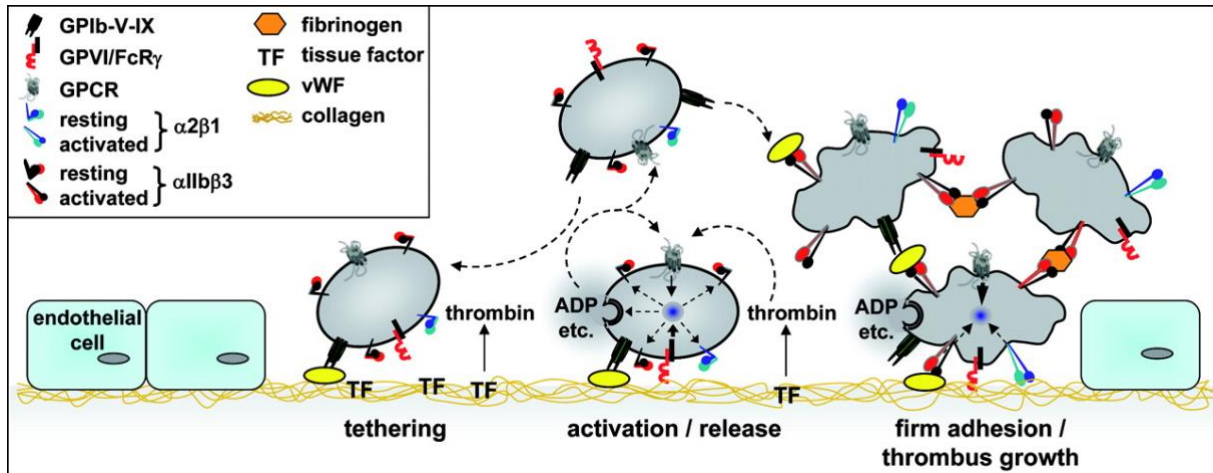


Abb. 2: Thrombozytenadhäsion und -aggregation auf der extrazellulären Matrix (EZM). Durch die Gefäßverletzung kommt es zu einer Freilegung der subendothelialen Matrix. Eine erste Bindung der Thrombozyten im Bereich der verletzten Gefäßwand erfolgt durch die Interaktion von vWF und GPIIb. Die aktivierten Thrombozyten setzen verschiedene Signalmoleküle wie ADP und TXA₂ frei, wodurch es zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten kommt. Die Ausbildung von Pseudopodien unterstützt die Adhäsion und es entsteht der sog. weiße Thrombus. Dieser wird nachfolgend durch die Bildung von Fibrinfasern verstärkt [11]. Abb. veröffentlicht mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc., aus Varga-Szabo et al. [11]. Genehmigung vermittelt durch Copyright Clearance Center, Inc.

1.2.3 Die sekundäre Hämostase

Die sekundäre Hämostase führt zur Bildung eines stabilen Fibrinnetzes, in welches Thrombozyten und Erythrozyten eingelagert sind. Dieses Gebilde wird auch als roter Thrombus bezeichnet. Ausgelöst wird die sekundäre Hämostase durch eine Abfolge von Aktivierungsschritten bestimmter Gerinnungsfaktoren, die sogenannte Gerinnungskaskade, welche in intakten Gefäßen inaktiv ist. Um diese Kaskade auszulösen sind der extrinsische und der intrinsische Weg bekannt, die beide in der Bildung von Fibrin resultieren. Initiiert durch Thromboplastin (*Tissue factor*) beschreibt der extrinsische Weg die exogene Aktivierung der Gerinnungskaskade [25]. Der intrinsische Weg beschreibt die endogene Aktivierung. Der Endschritt sowohl des extrinsischen als auch des intrinsischen Aktivierungsweg ist die Fibrinpolymerisierung. Im Zuge dieser Fibrinpolymerisierung erfolgt die Umwandlung von löslichem Fibrinogen in unlösliches Fibrin [25].

1.3 Der Kollagenrezeptor GPVI

1.3.1 Der Aufbau

GPVI ist der Hauptrezeptor für Kollagen Typ I an der Oberfläche von Thrombozyten und ist maßgeblich an der, durch Kollagen erzeugten, Thrombozytenaktivierung und -aggregation beteiligt [12,26]. Das aus 319 Aminosäuren bestehende Glykoprotein GPVI ist, mit einer Größe von 60 bis 65 kDa, der Familie der Immunglobuline zugehörig [10]. Die kodierende RNA für GPVI wurde bislang nur in Megakaryozyten und Thrombozyten gefunden [27].

GPVI bildet einen Komplex mit der *fragment crystalized receptor (FcR)γ-chain* (FcRγ-Kette,) ohne die eine Signalübermittlung nicht möglich wäre [10]. GPVI ist unabdingbar für die Adhäsion und Aggregation [26] und durch direkte Interaktion mit Kollagen ist GPVI essenziell für die initiale Thrombozytenadhäsion [28]. Eine weitere wichtige Funktion von GPVI ist die Initiierung der Formänderung der Thrombozyten, dem sogenannten *Shapechange* [29].

1.3.2 Die Signalübermittlung

Die Thrombozytenaktivierung erfolgt durch die Bindung von GPVI an Kollagen. Es kommt zu einer Phosphorylierung der ITAM-Domäne (*immunoreceptor tyrosine based activation motif*), u.a. durch Src-Kinasen. Die ITAM-Domäne liegt am zytoplasmatischen Teil der GPVI assoziierten FcRγ-Kette. Daraufhin folgt die Aktivierung der Tyrosinkinase *Spleen tyrosine kinase* (SYK), sowie die Phosphorylierung und somit Aktivierung der Phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) durch SYK, vermittelt durch das Transmembranprotein *Linker of Activated T cells* (LAT) [29]. Das nun aktivierte PLC γ 2 hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in die *Second Messenger* Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und 1,2-Diacylglycerol(DAG). Durch IP3 wird Kalzium aus den Granula freigesetzt [12], was zu einem Kalziumanstieg im Zytosol und somit zu Aggregation, Sekretion und *Shapechange* führt (Abb. 3) [30].

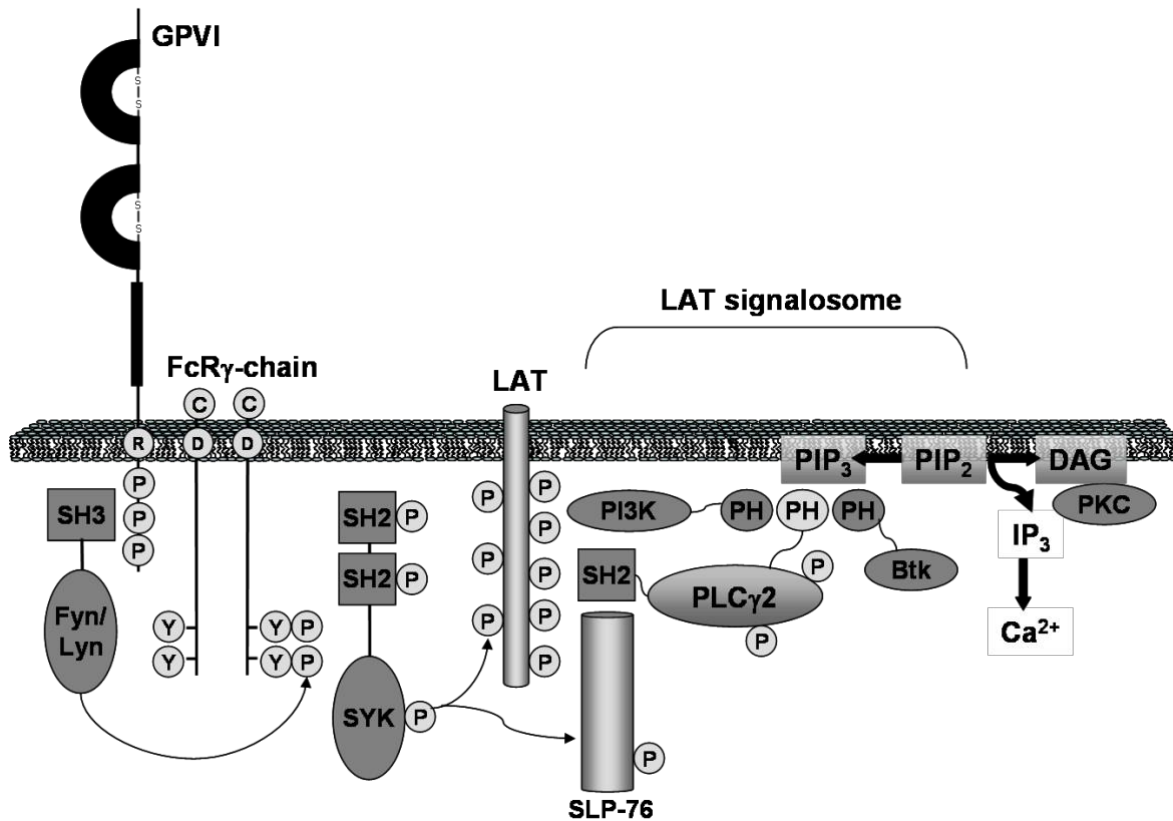


Abb.3: Die Aktivierungskaskade des GPVI-Rezeptors. Nach Aktivierung des GPVI-Rezeptors, kommt es durch Anlagerung der FcR γ -Untereinheiten zu einer Phosphorylierung der Tyrosinreste. Dies hat eine Aktivierungskaskade zur Folge, die u.a. über SYK und LAT läuft und zur Freisetzung von *second wave* Mediatoren wie IP₃ und DAG und initial zu einem Anstieg der Ca²⁺-Konzentration und somit zum *Shapechange* der Thrombozyten führt [30,31]. Abb. veröffentlicht mit Genehmigung von EUREKA SCIENCE (FZC), aus Bigalke et al [31].

Durch den Anstieg des Kalziumspiegels wird zusätzlich Arachidonsäure freigesetzt, die nachfolgend durch Cyclooxygenasen zu TXA₂ metabolisiert wird [32]. TXA₂ ist nicht nur ein Vasokonstriktor, sondern auch ein Thrombozytenaktivator, da es durch seine Bindung an die Oberflächenrezeptoren anderer Thrombozyten, G-Protein vermittelt zum *Shapechange* und zu einer zytoskelettalen Reorganisation führt [17].

Darüber hinaus kann es auch GPVI vermittelt zum *Shapechange* der Thrombozyten kommen. Hierbei kommt es durch Aktivierung von SYK zu einer Umwandlung des Zytoskelettes der Thrombozyten [32], d.h. zu einem Übergang in die Form aktivierter Echinosphärozyten.

1.4. Die extrazelluläre Matrix (EZM)

Als EZM bezeichnet man das dreidimensionale Netzwerk, das von extrazellulären Makromolekülen gebildet wird. Sie setzt sich aus Kollagenen, Adhäsionsmolekülen, retikulären und elastischen Fasern, extrazellulärer Flüssigkeit und Proteoglykanen zusammen. Struktur und Aufbau der EZM sind gewebsspezifisch [33]. Die Funktionen der EZM sind vielfältig, z.B. verleiht sie organischen Strukturen Elastizität und Stabilität und unterliegt dabei selbst kontrollierten, dynamischen Umbauprozessen [34]. Zudem ist die EZM auch wichtig für den Informationsfluss, z.B. als Ligand für Integrine und dient als Funktionshilfe [34]. Auch während der Hämostase spielen die EZM-Proteine eine wichtige Rolle, denn zu ihnen gehören u.a. Kollagen und Fibrinogen, zwei der bedeutendsten Proteine für die Hämostaseprozesse [35].

1.5 Das Proteoglykan Biglykan (BGN) als Bestandteil der EZM

1.5.1 Die molekulare Struktur von BGN

Ein wichtiger Bestandteil der EZM sind Proteoglykane. Proteoglykane werden in fünf Klassen eingeteilt. In die Klasse 1 gehören die sogenannten kleinen leucinreichen Proteoglykane (*small leucine rich proteoglycan*, SLRP), zu denen auch das Proteoglykan BGN gehört [36]. BGN wurde vor 30 Jahren entdeckt [37]. Es ist ca. 42 kDa groß und sein Grundgerüst besteht aus Leucin-reichen Stücken mit 1 oder 2 Glykosaminoglykanseitenketten, die entweder aus Chondroitinsulfat oder Dermatansulfat bestehen (Abb. 4) [38]. In die Klasse 2 gehört u.a. Fibromodulin, in die Klasse 3 Osteoglycan, in die Klasse 4 Chondroadherin und in die Klasse 5 Podocan [36].

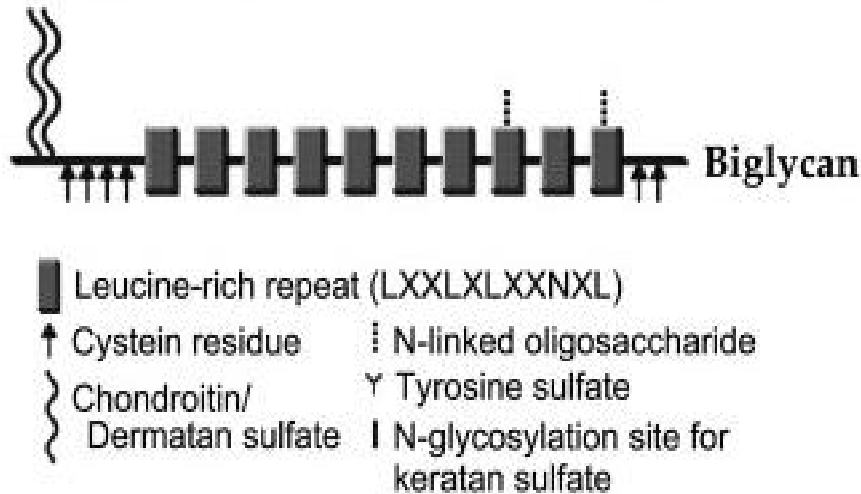


Abb.4.: Die molekulare Struktur von BGN. BGN besteht aus einer Leucin-reichen Hauptkette mit Glykosaminseitenketten und einer Carboxygruppe an dem einen, sowie einer Aminogruppe an dem anderen Ende; Abb. (modifiziert) aus Ni et al. [39]; Genehmigung vermittelt durch Copyright Clearance Center, Inc.

1.5.2 Die Funktionen des BGN

Seine biologischen Funktionen sind vielfältig, aber noch nicht komplett erforscht. Zum einen kann es als Ligand von Toll-like-Rezeptoren (TLR2 und TLR4) als proinflammatorischer Stimulus wirken. Hierbei bindet BGN an diese Rezeptoren, wodurch Zytokine freigesetzt werden und Makrophagen angelockt werden, welche wiederum mehr BGN synthetisieren und die Inflammation verstärken. So kann BGN, TLR2/4 abhängig, zum Beispiel nach einer Gewebsverletzung, die Inflammation verstärken [40]. Auch während des myokardialen Umbaus spielt BGN eine Rolle. Nach einem Myokardinfarkt ist der Umbau des Gewebes durch einen Auf- und Umbauprozess der EZM gekennzeichnet. Der *Transforming growth factor* β (TGF β -1) stimuliert hierbei die Produktion von Kollagenen [41] und dient außerdem der Stimulation der Biglykanexpression, was zu einem erhöhten Aufkommen von BGN im Infarktgebiet führt und Teil der fibrotischen Narbe ist [42].

1.6 Die Zielsetzung dieser Arbeit

Das EZM Protein BGN spielt in verschiedenen Bereichen des menschlichen und tierischen Organismus eine entscheidende Rolle. Über seine Rolle in der Hämostase ist bis dato noch wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle und Bedeutung des Proteins BGN in der Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung weiter aufzuschlüsseln.

Wie bereits gezeigt werden konnte, ist die Adhäsion muriner Thrombozyten auf einer BGN-Kollagen-Matrix erhöht im Vergleich zu einer reinen Kollagen-Matrix. Des Weiteren lassen erste Experimente vermuten, dass der Kollagenrezeptor GPVI an der Bindung von Kollagen an Thrombozyten beteiligt sein könnte.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle und Bedeutung des Proteins BGN in der Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung weiter aufzuschlüsseln, sowie die eingehende Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Entsprechend wurden Analysen zu skelletalen Reorganisation von Thrombozyten in Bezug auf BGN vorgenommen. Um die Signalwege dahinter genauer zu verstehen, sollten neben der Gesamttyrosinphosphorylierung in biglykanabhängiger Aktivierung auch GPVI spezifische Tyrosinkinase genauer untersucht werden. Dabei soll das humane System im direkten Vergleich mit dem murinen System als Modelorganismus gesetzt werden.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|--|
| Automatischer Hämatologie-Analysator (KX-21N) | Sysmex |
| Blotkammer | Perfekt blue Semi Dray Elektroblotter; PeqLab |
| Imager | Chemi Doc XRS; Bio Rad |
| Inkubator | D06059 Modell 300; Memmert |
| Magnetrührer | RCT IKA Mag |
| Mikroskop(e) | Axiobserver; Zeiss |
| pH-Meter | pH526; WTW |
| Pipetten | peQlab, ErgoOne |
| Thermomixer | Eppendorf AG |
| Vortexmischer | Cenco Instrumente |
| Waage(n) | DKD-K-100502; Sartorius AE166; Mettler |
| Zentrifuge(n) | Centrifuge 5424R; Eppendorf Zentrifuge 2-16P; Sigma |

2.2 Gebrauchsmaterialien

Alle verwendeten Plastikwaren und Einwegprodukte wurden, wenn nicht gesondert vermerkt, von folgenden Firmen erworben: BD, Braun, GE Healthcare, Kindler, Sarstedt oder VWR.

Tabelle 2: Gebrauchsartikel

| Bezeichnung | Hersteller |
|-----------------------------------|---|
| Citratröhrchen | BD Vacutainer; BD |
| Deckgläser | Engelbrecht Medizin - und Labortechnik GmbH |
| Falkons (50ml) | Sigma -Aldrich |
| Objektträger (76x26x1mm) | PaulMarienfeld GmbH und CoKG |
| PVDF - Membran | Nitrocellulose Blotting Membran GE Healthcare |
| Reaktionsgefäße (Safe Seal 1,5ml) | Sarstedt |

2.3 Chemikalien, Puffer, Lösungen

Tabelle 3: Chemikalien, Puffer, Lösungen

| Bezeichnung | Hersteller |
|----------------------|--|
| 4 x Sammelgel-Puffer | 6.05 g Trisbase 100 ml <i>A.dest</i> 0.4 g SDS pH = 6,8 |
| 4 x Trenngel-puffer | 91 g Trisbase 500 ml <i>A. dest</i> 2 g SDS pH = 8,8 |

Material und Methoden

| | |
|----------------------------|--|
| 5 x TGE - Laufpuffer | 15.1 g Trisbase 72 g Glycin 25 ml 20 % SDS (1000 ml A. <i>dest</i> pH = 8,3 (auf 1 x mit A. <i>dest</i> verdünnen zur Anwendung) |
| 6 x Lämmli-Puffer | 0,93 g DTT 1 g SDS 7 ml 4x Sammelgelpuffer 3 ml Glycerin Spatelspitze Bromphenolblau |
| Acrylamid | Carl ROTH GmbH |
| Alexa Phalloidin 568 #R415 | Thermo Fischer Scientific |
| APS | Sigma -Aldrich |
| Apyrase 500U | Sigma-Aldrich |
| Biglycan | R&D Systems |
| Blotpuffer A | 36,3 g Tris-Base 200 ml MeOH 800 ml dH ₂ O pH 10,4 |
| Blotpuffer B | 3,03 g Tris-Base 200 ml MeOH 800 ml dH ₂ O pH 10,4 |
| Blotpuffer C | 5,2 g ε-Aminicarbonsäure 200 ml MeOH 800 ml dH ₂ O |
| Bovine Serum Albumin (BSA) | Sigma -Aldrich |

Material und Methoden

| | |
|--------------------------------|---|
| Bromphenolblau | VWR |
| Citratpuffer | 41 ml 0.1 M tri-Na-Citrat 9 ml 0.1 M Citronensäure 450 ml <i>A. dest</i> pH 6.0 |
| Collagen Related Peptide (CRP) | University of Cambridge, UK |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich |
| EDTA | Sigma Aldrich |
| EGTA | Sigma Aldrich |
| Entwicklerlösung | Clarity Western ECL Substrate; Bio Rad |
| Fibrinogen | Sigma-Aldrich |
| Glycin | Carl ROTH GmbH |
| HCL | Merck Schuchardt |
| Heparin Natrium 2500 | Ratiopharm GmbH |
| Hepes | Carl ROTH GmbH |
| IGEPAL | Sigma-Aldrich |
| IP-Puffer | 15 mM Tris – HCl 155 mM NaCl 1 mM EDTA 0.005% NaN ₃ 1 l <i>A. dest</i> |
| Isofluran | Pirmala critical care |
| Kollagen | Kollagenreagens Horm, Takeda |

Material und Methoden

| | |
|---|---|
| Lysepuffer (humane Thrombozyten) 5x | 100 mM Tris-HCl 2,5% Natriumdeoxycholat 5% TritonX-100 725 mM NaCl 25 mM EDTA Proteinaseinhibitor Cocktail -Tablette 5 mM Na ₃ VO ₄ 0,5 mM NaF |
| Lysepuffer (murine Thrombozyten) 5x | 5 x IP-Puffer 5 % IGPAL 5 mM Na ₃ VO ₄ |
| Magnesiumchlorid | Carl Roth GmbH |
| Milchpulver | Frema Reform Sprühmagermilch |
| Molekulargewichtsmarker (Precision Plus Pretein Dual Color Standards) | Bio Rad |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma Aldrich |
| Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄) | Sigma-Aldrich |
| NP-40 | Thermo Fischer Scientific |
| Phosphat buffered saaline (PBS) | Sigma- Aldrich |
| Paraformaldehyd (PFA) | Carl ROTH GmbH |
| PIPES | Carl ROTH GmbH |

Material und Methoden

| | |
|--|--|
| PHEM | 100mM PIPES 5,25mM HEPES 10mM EGTA 20mM MgCl ₂ |
| PHEM-Puffer | 4,5ml PHEM 1,5ml 4% PFA 20 µl 10% NP-40 |
| PGI ₂ (Prostaglandin I ₂) | Calbiochem |
| Ponceau-Lösung | Sigma-Aldrich |
| Proteinase-Inhibitor | Roche |
| Rhodamin Phalloidin | Thermo Fischer Scientific |
| Sodium dodecyl sulfate (SD) | Sigma-Aldrich |
| Streptactin | BioRad |
| TBS-Puffer 5x | 15,8 g Tris-HCl 45 g NaCl 1 l dH ₂ O pH 7,6 |
| TBS-T | 100 ml 5x TBS-Puffer 500 µl Tween 400 ml dH ₂ O |
| Trizma-Base (Tris) | Sigma -Aldrich |
| Thrombin | Roche |
| Tween20 | VWR |

Material und Methoden

| | |
|--|---|
| Tyrode - Puffer (human) 10x | 8,01 g NaCl 1,01 g NaHCO ₃ 208,8 mg KCl 55,2 mg NaH ₂ PO ₄ 100 ml dH ₂ O |
| Tyrode (human) | 18 ml dH ₂ O 2 ml 10x Tyrode Stock 180 µl 0,1 M MgCl ₂ 200 µl 10 % Glucose pH 7,40 |
| Tyrode - Puffer (murin) Stock 20x | 160 g NaCl 20 g NaHCO ₃ 4 g KCl 1,16 g NaH ₂ PO ₄ 119 g HEPES 1 l dH ₂ O |
| Tyrode (murin) (1 x, zur Anwendung) | 18 ml dH ₂ O 2 ml 20 x Tyrode Stock (1x) 200 µl 0,1 M MgCl ₂ 200 µl 10 % Glucose 0,1 M CaCl ₂ pH 7,35 |
| β - Mercaptoethanol | Carl ROTH GmbH |

2.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper für Western -Blot

| Primärantikörper | Generierungsspezies | Hersteller |
|--------------------------|---------------------|----------------|
| α-Tubulin Antibody #2144 | <i>rabbit</i> | Cell Signaling |
| β-Aktin Antibody #4979 | <i>rabbit</i> | Cell Signaling |

Material und Methoden

| | | |
|---|---------------|----------------|
| Phosphotyrosine Antibody clone 4G10 | <i>mouse</i> | Merck 05-321 |
| Phospho-SRC Family (Tyr416) Antibody #2101 | <i>rabbit</i> | Cell Signaling |
| Phospho-PLC γ 2 (Tyr1217) Antibody #3874 | <i>rabbit</i> | Cell Signaling |
| PLC γ 2 Antibody#3872 | <i>rabbit</i> | Cell Signaling |
| SRC (36D10) rabbit m Ab #2109 | <i>rabbit</i> | Cell Signaling |
| Sekundärantikörper | | |
| Anti-rabbit-HRP | | Invitrogen |
| Anti-mouse HRP | | Invitrogen |

2.5 Kits

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kits

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---------------------------|
| XCell <i>SureLock</i> ® Mini-Cell Systems | Thermo Fischer Scientific |

3 Methoden

3.1 Tierexperimentelles Arbeiten

3.1.1 Versuchstiere

Herr Prof. Dr. Jens W. Fischer aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf stellte die Versuchmäuse mit dem Genotyp Bgn^{-/0} (männlich) und Bgn^{-/-} (weiblich) für diese Arbeit zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um transgene Mäuse, bei denen das für BGN kodierende Gen mittels ‚Knockout‘-Technologie ausgeschaltet wurde. Das BGN-Gen wird in diesen Tieren nicht mehr transkribiert. Sowohl die transgenen Mäuse als auch die Kontrolltiere (Wildtyp) beruhen auf dem Stamm „C57Bl6/J“ und entstammen der gleichen Zucht. Alle Mäuse wurden während des gesamten Versuchszeitraums in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Für die Gewährleistung biologischer *circadianer* Rhythmen erfolgte die Belichtung in einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus, sowie durch eine Fütterung *ad libitum*. Die Durchführung aller wissenschaftlicher Versuche erfolgte gemäß den Richtlinien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science) und des Deutschen Tierschutzgesetzes und wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW genehmigt (AZ 84-02.05.40.16.073).

3.1.2 Die murine Blutentnahme

Nachdem die Spendermäuse mit Isofluran anästhesiert wurden, wurde den Tieren durch Punktierung des retrobulbären Plexus, mittels einer Mikrokapillare Blut entnommen. Um eine vorzeitige Aggregation zu verhindern wurde das Blut in Reaktionsgefäßen aufgefangen, in denen 300µl Heparin (20U/ml) vorgelegt waren.

3.2 Humanes Probenmaterial

Die Gewinnung humaner Thrombozyten erfolgte aus frischem venösem Blut gesunder, freiwilliger Spender der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf. Die Proben wurden für die vorliegende Arbeit irreversibel anonymisiert, die Spende selbst erfolgte nicht anonym. Hierbei wurde venöses Blut aus einer oberflächlichen Vene mit einer Butterfly Kanüle, im Bereich der Ellenbeuge unter aseptischen Bedingungen entnommen. Die Blutproben wurden in Citratblutröhrchen gesammelt und nach der Entnahme vorsichtig geschwenkt, um einer vorzeitigen Koagulation vorzubeugen.

3.3 Die Zellbiologischen Methoden

3.3.1 Die Isolation muriner Thrombozyten

Die Isolierung der Thrombozyten erfolgte durch mehrere aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte. Zuerst wurde das Vollblut für 5min bei 250g zentrifugiert, was zu einer Auftrennung der Phasen führte. Daraufhin wurde die obere gelbliche Phase gemeinsam mit einem geringen Teil der Erythrozytenphase in ein neues Eppi gegeben und für 5 min bei 50g zentrifugiert. Durch eine so entstandene erneute Phasenauftrennung wurde abermals die obere thrombozytenreiche Phase, auch *platelet rich plasma* (PRP) genannt ohne Erythrozytenphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der erythrozytenreiche Unterstand wurde mit 200µl Tyrode vermischt und wieder für 5 min bei 50g zentrifugiert. Der dadurch neu entstandene Überstand wurde dem zuvor gewonnenen PRP zugeführt. Anschließend wurde der Suspension Apyrase (0.02 U/ml, Sigma) und PGI₂ (0.5µM, Calbiochem) beigefügt, um eine vorzeitige Plättchenaktivierung zu verhindern. Nach dem darauffolgendem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 650 g, wurde der entstanden Überstand abgenommen und das gewonnene Pellet mit 1ml Tyrode und der oben genannten Menge Apyrase und PGI erneut für 5 min bei 650g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Thrombozyten in Tyrode mit Ca²⁺ resuspendiert. Die Thrombozytenzahl wurde in einer (1:10) Verdünnung in PBS mit einem automatischen Hämatologie-Analysator (Sysmex-KX21N, Sysmex Corporation) bestimmt.

3.3.2 Die Isolation humaner Thrombozyten

Durch mehrere aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte konnten anschließend die Plättchen isoliert werden. Zuerst wurde das Vollblut für 10min bei 1200rpm zentrifugiert, was zu einer Auftrennung der Phasen führte. Währenddessen wurde 2ml PBS mit einem PH 6,5 und 10µl Apyrase (2.5U/ml) und 2 µl PGE (1mM) in einem Falcon vorgelegt. Daraufhin wurde die obere gelbliche Phase in den vorbereiteten Falcon gegeben und für 6min bei 2500rpm zentrifugiert. Nach der so entstandenen erneuten Phasenauftrennung wurde der Überstand abgeschüttet und die restliche Flüssigkeit vorsichtig abpipettiert. Das thrombozytenreiche Pellet wurde daraufhin mit 300µl Tyrode für 5 min bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig resuspendiert. Die Thrombozytenzahl wurde in einer (1:10) Verdünnung in PBS mit einem automatischen Hämatologie-Analysator (Sysmex-KX21N, Sysmex Corporation) bestimmt.

3.3.3 Das *Spreading* humaner Thrombozyten

Nach Aktivierung von Thrombozyten kommt es durch das sogenannte *Spreading* zu einer Oberflächenvergrößerung der Thrombozyten. Hierbei lassen sich drei Stadien unterscheiden: ruhende nicht aktivierte Thrombozyten, Filopodienbildung und Lamellipodienbildung. Um dieses *Spreading* zu untersuchen wurden vollständig isolierte Thrombozyten (80.000/µl) auf einem, am Vortag, mit BGN (10µg/ml) beschichteten Deckglas (24mm/60mm) für 5, 20 und 60 min bei RT inkubiert. Unspezifische Bindungen wurden durch vorheriges Blocken mit 1%BSA für 60 min bei RT vermieden. Nach der Inkubationszeit wurden nicht adhärente Thrombozyten durch zweimaliges Waschen mit PBS abgespült und mit 4%-igen PFA für 10 min bei 4°C inkubiert und somit fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die adhärenen Plättchen sofort durch Eindeckeln mit Fluoromount fixiert. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte am Folgetag mit 1000-facher Vergrößerung. Die unterschiedlichen Stadien der Plättchen wurden manuell mittels 4 Bildern pro Ansatz ausgezählt und prozentual zur Gesamtzahl verrechnet.

3.3.4 Die Adhäsion humaner Thrombozyten

Um das Adhäsionsverhalten humaner Thrombozyten zu ermitteln wurden vollständig isolierte Thrombozyten (40.000/ μ l) auf einem, am Vortag, mit BGN (10 μ g/ml), Kollagen (200 μ g/ml) und BGN/Kollagen(10 μ g/ml)/(200 μ g/ml) beschichteten Deckglas (24mm/60mm) für 20 min bei RT inkubiert. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde zunächst mit 1%BSA für 60 min bei RT geblockt. Nach der Inkubationszeit wurden nicht adhärenente Thrombozyten mit PBS ab gespült und mit 4%-igem PFA für 10 min bei 4°C inkubiert und somit fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die adhärenenten Thrombozyten sofort durch Eindeckeln mit Fluoromount. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte am Folgetag mit 400-facher Vergrößerung. Es wurden je 4 Bilder pro Ansatz aufgenommen und diese anhand der Zählfunktion von Zeiss (ZEN 2012; blue edition) manuell ausgezählt.

3.3.5 Die Aktinfärbung humaner Thrombozyten

Um die Veränderungen des Zytoskeletts der Thrombozyten darzustellen, wurde das Zytoskelett über eine Färbung des Aktins analysiert. Hierbei wurden zunächst vollständig isolierte Thrombozyten (40.000/ μ l) auf ein, am Vortag mit BGN (10 μ g/ml), Kollagen (200 μ g/ml) und BGN/Kollagen beschichtetes, Deckglas (24mm/60mm) gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Deckgläser zuvor für 60 min mit 1% BSA bei RT geblockt. Die inkubierten Thrombozyten wurden mit einem PHEM-Puffer für 10 min bei 4°C inkubiert und somit fixiert. Anschließend wurden die nicht adhärenenten Thrombozyten durch dreimaliges Waschen mit PBS ab gespült und das fluoreszierende Phalloidin Konjugat Alexa 568 (Thermo Fischer Scientific) auf die Plättchen gegeben. Phalloidin, das aus dem Giftpilz *Amanita phalloides* gewonnen wird, bindet selektiv an das F-Aktin selektiv und das Tetramethylrhodamin liefert eine rot-orange Fluoreszenz. Nach der Inkubationszeit, die üN bei 4°C erfolgte, wurden nach einem erneuten Waschen mit PBS die angefärbten adhärenenten Thrombozyten mit Fluormont eingedeckelt und somit fixiert. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte am Folgetag mit 1000-facher Vergrößerung. Es wurden je 4 Bilder pro Ansatz aufgenommen und diese anhand der Zählfunktion von Zeiss (ZEN2; blue edition) manuell ausgezählt.

Anhand von Image J (Image J-win64) wurde die durchschnittliche Oberflächenbedeckung bestimmt, indem die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes durch die Anzahl der Thrombozyten pro Sichtfeld geteilt wurde.

3.3.6 Die Adhäsion muriner Thrombozyten auf Fibrinogen

Um eine mögliche Interaktion zwischen BGN und Fibrinogen zu ermitteln, wurden vollständig isolierte Thrombozyten (80.000/ μ l) auf einem, am Vortag mit BGN (10 μ g/ml), Fibrinogen (200 μ g/ml) und BGN/Fibrinogen (10 μ g/ml)/(200 μ g/ml) beschichteten Deckglas (24mm/60mm), für 20 min bei RT inkubiert. Unspezifische Bindungen wurden durch Blocken mit 1%BSA für 60 min bei RT vermieden. Nach der Inkubationszeit wurden nicht adhärenente Thrombozyten mit PBS abgespült und die adhärenente Plättchen sofort durch Eindeckeln mit Fluormont fixiert Die mikroskopische Dokumentation erfolgte am Folgetag mit 400-facher Vergrößerung. Es wurden je 4 Bilder pro Ansatz aufgenommen und diese anhand der Zählfunktion von Zeiss (ZEN2; blue edition) manuell ausgezählt.

3.3.7 Die *Clot Retraction*

Der Einfluss von BGN auf die Retraktion eines Blutpfropf wurde anhand sog. *Clot Retraction* Assays durchgeführt. Zuerst wurde das Vollblut für 5 min bei 250g zentrifugiert, was zu einer Auftrennung der Phasen führte. Daraufhin wurde die obere gelbliche Phase gemeinsam mit einem geringen Teil der Erythrozytenphase in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und für 6 min bei 60g zentrifugiert. Durch eine so entstandene erneute Phasenauftrennung wurde die thrombozytenreiche Phase, auch *platelet rich plasma* (PRP) genannt, mit einer geringen Anzahl von Erythrozyten, gewonnen. Dem gewonnenem PRP (300.000/ μ l) wurden Thrombin (5U/ml), CaCl₂ (20mM) und BGN (10 μ g/ml) zugegeben. Die Proben inkubierten bei 37 °C. Um die *Clot Retraction* bildlich darzustellen, wurden Bilder bei 0,60,120,300 min gemacht. Final wurde das verbleibende Volumen in den Reaktionsgefäßen mit dem Ausgangsvolumen in Relation gesetzt.

3.4 Die Proteinbiochemischen Methoden

3.4.1 Die Herstellung muriner Zelllysate

Für die Herstellung muriner Zelllysate wurden, die nach 3.3.1 beschriebenen Isolation gewonnenen, 40 Millionen Thrombozyten/Probe bei 37°C für 2 min und 400rpm mit den Agonisten BGN, CRP und BGN/CRP inkubiert. Die Reaktion wurde mit 3µl Lysepuffer abgestoppt. Nachdem die Proben für 10 min auf Eis inkubiert wurden, wurden sie für 5 min bei 4°C und 10.000 rcf abzentrifugiert. Das entstandene Pellet enthielt Zelltrümmer, die verworfen wurden; der Überstand war das Zelllysate, welches in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde und für 5 min bei 90°C und 400 rpm mit 6x Lämmli-puffer inkubiert und anschließend bei -20°C weggefroren wurde.

Der Lysepuffer enthält zusätzlich verschiedene Protease- bzw. Phosphatase-inhibitoren, um den Abbau bzw. die Dephosphorylierung der Zielproteine durch zelleigene Enzyme zu hemmen.

3.4.2 Die Herstellung humaner Zelllysate

Für die Herstellung humaner Zelllysate wurden, die nach 3.3.2 beschriebenen Isolation gewonnenen, 15 Millionen Thrombozyten/Probe bei 37°C für 2 min und 400rpm mit den Agonisten BGN, CRP und BGN/CRP inkubiert. Die Reaktion wurde mit 6µl Lysepuffer abgestoppt und die Zellen lysiert. Nachdem die Proben für 15 min auf Eis gelagert wurden, wurden sie für 10 min bei 4°C und 140.000 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Pellet enthielt Zelltrümmer, die verworfen wurden; der Überstand war das Zelllysate, welches in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde und für 5 min bei 90°C und 400 rpm mit 6x Lämmli-puffer inkubiert und anschließend bei -20°C weggefroren wurde.

Der Lysepuffer enthält zusätzlich verschiedene Protease- bzw. Phosphatase-Inhibitoren, um den Abbau bzw. die Dephosphorylierung der Zielproteine durch zelleigene Enzyme zu hemmen.

3.4.3 Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

Durch einen Western Blot können Proteine zunächst auf eine Trägermembran übertragen und anschließend über verschiedene Reaktionen nachgewiesen werden. Zuerst muss jedoch das Proteingemisch elektrophoretisch, entsprechend der jeweiligen Proteingröße, aufgetrennt werden. Hier wurde die Methode der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) angewandt.

Die SDS-PAGE ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes in einem elektrischen Feld. Die Proteine werden durch die Verwendung des SDS das an die hydrophoben Proteinbereiche bindet, denaturiert und negative Ladungen in die denaturierten Polypeptidketten eingeführt, damit deren Wanderung zur Anode im elektrischen Feld möglich ist

Zuerst wurde das Trenngel gegossen, auf welches nach dem Auspolymerisieren das Sammelgel gegossen wurde (Tabelle 6). Das Sammelgel dient der Konzentrierung der Proben. Nach der Auspolymerisierung des Trenngels hat es durch seine kleinporige Struktur einen Siebeffekt. In die Elektrophoresekammer wurde ein 1x TGE Laufpuffer eingefüllt und das Gel mit den Proben und einem Molekulargewichtsmarker beladen. Dabei werden, nach Anlegen einer Spannung von 25mA, die negativ geladenen Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Der Lauf wurde gestoppt sobald die Lauffront, welche durch das im Laemmli-puffer enthaltene Bromphenolblau sichtbar wurde, aus der Elektrophoresekammer herausgelaufen war.

Tabelle 6: Die Bestandteile der Gele

| Bestandteile | Trenngel 10% | Sammelgel |
|---------------------------------|--------------|-----------|
| 4× Sammelgel-Puffer pH = 6,8 | | 1,25 ml |
| 4× Trenngel-Puffer pH = 8,8 | 3,75ml | - |
| dest. Wasser | 6,25ml | 3,05 ml |
| Acrylamid 30 % | 5ml | 650 µl |
| APS 10 % | 150µl | 25 µl |
| TEMED | 15µl | 5 µl |

3.4.4 Der Western Blot

Der Proteintransfer von dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran erfolgte nach dem *semi-dry* Verfahren. Der luftblasenfreie Aufbau der Blottingkammer erfolgt dabei nach folgendem Schema: Kathode, drei Whatman-Filterpapiere in Blotpuffer A befeuchtet, drei Whatman-Filterpapiere in Blotpuffer B befeuchtet, in Blotpuffer B aktivierte PVDF-Membran, in Blotpuffer C äquilibriertes Gel, drei in Blottpuffer C befeuchtete Whatman-Filterpapiere, Anodenplatten (Abb. 5), (Tabelle 7). Die Spannung von 70mA pro Membran wurde senkrecht angelegt, dadurch wanderten die negativ geladenen Proteine zur Anode und blieben auf der Membran hängen. Damit wurde das Laufmuster der Proteine auf die Membran transferiert.

Tabelle 7: Die Bestandteile der Blotpuffer

| Bestandteile | Blotpuffer A | Blotpuffer B | Blotpuffer C |
|------------------|--------------|--------------|--------------|
| Tris | 18,15g | 1,515 | - |
| Aminocraponsäure | | | 2,6g |
| MeOH | 100ml | 100ml | 100ml |
| A.dest | 400ml | 400ml | 400ml |
| PH-Wert | 10,4 | 10,4 | 10,4 |

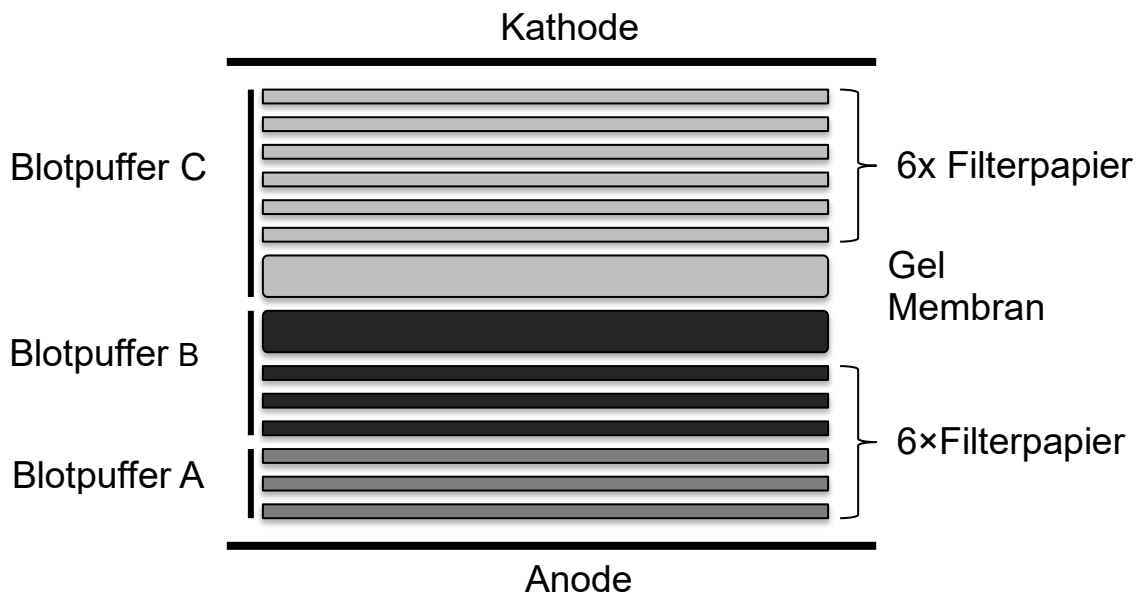


Abb.5: Blotaufbau des Westernblot. Das Gel wird 1 min in Blotpuffer C äquilibriert, die Membran für 15 sek in Blotpuffer B und die Filterpapiere der Abb. entsprechend.

Anschließend wurde die Membran zur Überprüfung des Proteintransfers mit einer 0,1%igen Ponceau S-Lösung angefärbt. Hierbei bindet Ponceau S reversibel an positiv geladene Aminosäuren. Nach der Dokumentation der gefärbten Proteinbanden wurde die Membran mit NaOH-Lösung vollständig entfärbt.

Um die unspezifischen Bindungsstellen vollständig abzusättigen, wurde die Membran anschließend in 5%-Milchpulver (in 0,1% TBS-T) für 1 h bei RT auf dem Schüttler geblockt. Daraufhin wurde die Membran für 3x 5 min in TBS-T gewaschen.

Für die nachfolgende Detektion der gewünschten Proteine wurde die Membran üN bei 4°C mit den Primärantikörpern, bzw. den gegen die phosphorylierte Isoform von SRC bzw. PLCy2 gerichteten Primärantikörpern schwenkend inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen (3x 5 min), um überschüssige nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Danach folgte eine Inkubation für 1 h bei RT in einer Mischung aus einem Sekundärantikörper, der Spezies-spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet und mit *der horse radish peroxidase* (HRP) konjugiert ist, und Strep-Tactin (1:2500). Überschüssige Antikörper wurden erneut durch Waschen mit TBS-T (3x 5 min) entfernt. Die Detektion der Zielproteine erfolgte durch eine Enzym-Substrat-Reaktion der HRP mit dem ECL-Reagenz (*enhanced chemoluminescence*). Die bei dieser Reaktion freiwerdende Energie in Form von Licht konnte durch ein Imager System (Bio Rad) auf einem Film sichtbar gemacht werden.

3.4.5 Die Gradientengelelektrophorese

Bei der Gradientengelelektrophorese handelt es sich um eine Variante der SDS-PAGE, einer analytischen Methode zur Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld, wie oben beschrieben. Während die SDS-Page einen konstanten Polymeranteil im Trenngel hat, weist dieses Gel einen ansteigenden Acrylamidanteil auf, um die Molmassen heterogener Proteingemische optimal aufzuteilen. Nach dem Ablösen der Tapes und dem Waschen mit destilliertem Wasser der vorgegossenen Gele des XCell *SureLock*® Mini-Cell Systems (Thermo Fischer Scientific) wurden beide Gelkassetten in die Pufferkammer eingebracht. Die XCell *SureLock*® Mini-Cell sichert Gele mit einer einfachen Gel-Haltevorrichtung. Der Hebel der Gel-Spannungshalterung wurde zum Verriegeln nach vorn geschoben, um so einen gleichmäßigen Halt zu erzeugen. Damit wird die Gel-/Puffer-Anordnung fest in der unteren Pufferkammer gesichert und ein auslaufsicherer Gellauf ermöglicht.

Nachdem die Kammern mit 600ml 1x MOPS-Laufpuffer gefüllt wurden, wurde der Plastikkamm der Gelkassetten in einer fließenden Bewegung entfernt und das Gel mit den Proben und dem Molekulargewichtsmarker vorsichtig beladen. Dabei werden, nach Anlegen einer Spannung von 200V die negativ geladenen Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Der Lauf wird automatisch nach 45 min gestoppt.

Der Proteintransfer erfolgte wie oben beschrieben. Anschließend wurde die Membran zur Überprüfung des Proteintransfers mit einer 0,1%igen Ponceau S-Lösung angefärbt. Hierbei bindet Ponceau S reversibel an positiv geladene Aminosäuren. Nach der Dokumentation der gefärbten Proteinbanden wurde die Membran mit NaOH-Lösung vollständig entfärbt. Um die unspezifischen Bindungsstellen vollständig abzusättigen, wurde die Membran anschließend in 5%-Milchpulver in PBST (PBS in 0,1% Tween 20) für 1 h bei RT auf dem Schüttler geblockt. Daraufhin wurde die Membran für 3x 5 min in PBST gewaschen. Für die nachfolgende Detektion der gewünschten Proteine wurde die Membran in 4°C oder für 2 h bei RT mit dem Primärantikörper Phosphotyrosine Antibody 4G10 (Tabelle 4) schwenkend inkubiert. Anschließend wurde die Membran gewaschen (3x 5 min in PBST), um überschüssige nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach folgte eine Inkubation für 1 h bei RT in einer Mischung aus einem Sekundärantikörper, der Spezies-spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet und mit der *horse radish peroxidase* (HRP) konjugiert ist, und Streptactin (1:2500). Überschüssige Antikörper wurden erneut durch Waschen mit PBST (3x 5 min) entfernt. Die Detektion der Zielproteine erfolgte durch eine Enzym-Substrat-Reaktion der HRP mit dem ECL-Reagenz (*enhanced chemoluminescence*). Die bei dieser Reaktion freiwerdende Energie in Form von Licht konnte auf einem Photofilm sichtbar gemacht werden.

Die Phosphorylierung von Tyrosinresten verschiedener Proteine gilt als ein Schlüsselschritt in der Signaltransduktion. Durch Anti-Phosphotyrosine Antikörper ist es möglich diese Signaltransduktion zu analysieren.

Durch den hier benutzten Anti-Phosphotyrosin Antikörper konnte man die gesamte Änderung in dem Tyrosin-Phosphorylierungsmuster des Proteoms der Proben nach der Behandlung mit bestimmten Agonisten zeigen. Die Herstellung der Lysate erfolgte wie bereits oben beschrieben.

4 Ergebnisse

4.1 Erhöhte Adhäsion humaner Thrombozyten auf einer BGN-Kollagen-Matrix

Vorherige Versuche in der Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass BGN einen Effekt auf das Adhäsionsverhalten von murinen Thrombozyten aufweist. Daher wurde zunächst überprüft, ob auch humane Thrombozyten ein verändertes Adhäsionsverhalten auf immobilisiertem BGN aufweisen. Dazu wurden humane Thrombozyten isoliert und für 20 min auf verschiedenen Matrices aufgetragen. Bei diesen Matrices handelte es sich um BGN, Kollagen und BGN-Kollagen mit den angegebenen Konzentrationen (Abb. 6). Die humanen Thrombozyten zeigen eine deutlich erhöhte Adhäsion auf einer BGN-Kollagen-Matrix im Vergleich zu einer Kollagen-Matrix (Abb. 6). Diese erhöhte Adhäsion deutete auf eine mögliche Interaktion zwischen BGN und einem Kollagenrezeptor hin.

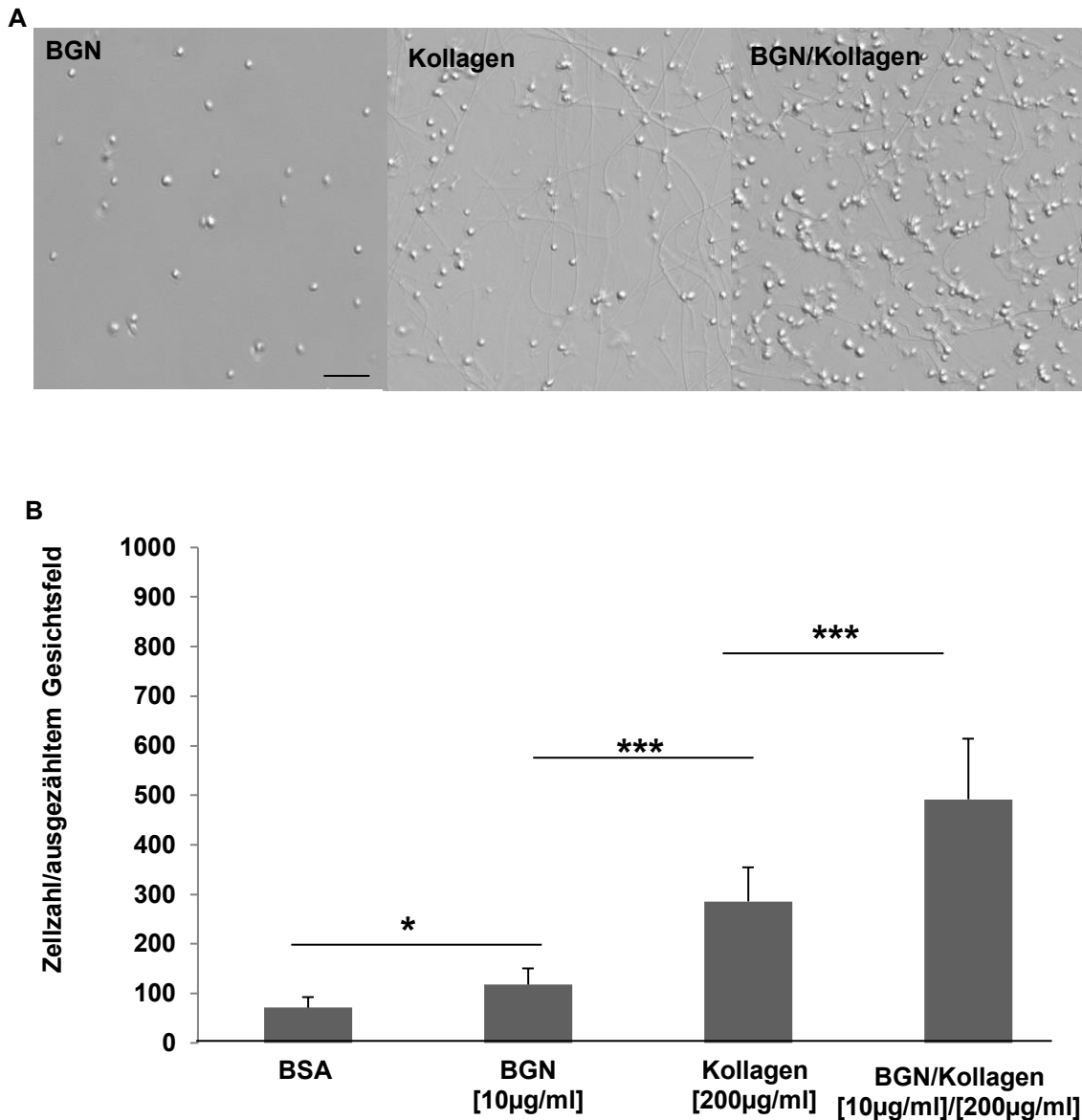


Abb. 6: Adhäsion von isolierten humanen Thrombozyten auf einer BGN-Matrix, einer Kollagen-Matrix und einer BGN-Kollagen-Matrix. Isolierte Thrombozyten wurden auf einer BGN-Matrix, einer Kollagen-Matrix und einer BGN-Kollagen-Matrix für 20 min inkubiert. Am Folgetag wurde mittels Mikroskopie und der Carl Zeiss Software „ZEN 2012“ (blue edition) die Anzahl der adhärenen Zellen bestimmt. **A** Exemplarische Bilder der Thrombozyten zeigen eine vermehrte Adhäsion auf einer BGN-Kollagen-Matrix. Maßstabsbalken=20µm. **B** Statistische Auswertung des Adhäsionsverhalten der humanen Thrombozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte + s.e.m. von mindestens 4 ausgezählten Gesichtsfeldern/ Spender. Statistische Auswertung erfolgte über Student's Ttest, n=5, $p < 0.05 = *$; $p < 0.01 = **$; $p < 0.001 = ***$.

4.2 Humane Thrombozyten zeigen Veränderungen im Zytoskelett auf einer BGN-Kollagen-Matrix

Während den vorangegangenen Adhäsionsversuchen ließen sich Oberflächenvergrößerungen der humanen Thrombozyten auf der BGN-Kollagen-Matrix erkennen. Um diese genauer zu untersuchen wurden Thrombozyten auf die oben genannten Matrices adhärert, um anschließend eine Färbung von Aktinfilamenten durchzuführen. Durch das Pilzgift Phalloidin, das an offene Aktinendungen (filamentöses (F) Aktin) bindet, welches an einen Fluoreszenzfarbstoff, das Rhodamin, gekoppelt ist, konnten die Aktinfilamente sichtbar gemacht werden. Die Thrombozyten wurden nach der Adhäsion mit Alexa Phalloidin 568 gefärbt und mikroskopiert, um das Aktin-Zytoskelett darzustellen. Anhand von Image J wurde die durchschnittliche Oberflächenbedeckung bestimmt, indem die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes durch die Anzahl der Thrombozyten pro Sichtfeld geteilt wurde. Hierbei zeigt sich eine signifikante Oberflächenvergrößerung der humanen Thrombozyten auf einer BGN-Kollagen-Matrix im Vergleich zu einer Kollagen-Matrix (Abb. 7). Somit erhöht sich durch BGN nicht nur die absolute Anzahl der adhärenenten Thrombozyten, sondern auch die Oberfläche dieser Thrombozyten. Daraus lässt sich schließen, dass durch eine Kostimulation mit BGN auf einer Kollagen-Matrix ein erhöhtes *Spreading* der Thrombozyten zu sehen ist. Dies deutet darauf hin, dass BGN nicht nur über Kollagenrezeptoren die Adhäsion von Thrombozyten beeinflusst, sondern auch Einfluss auf das Zytoskelett der Thrombozyten und dessen Organisation nimmt.

Ergebnisse

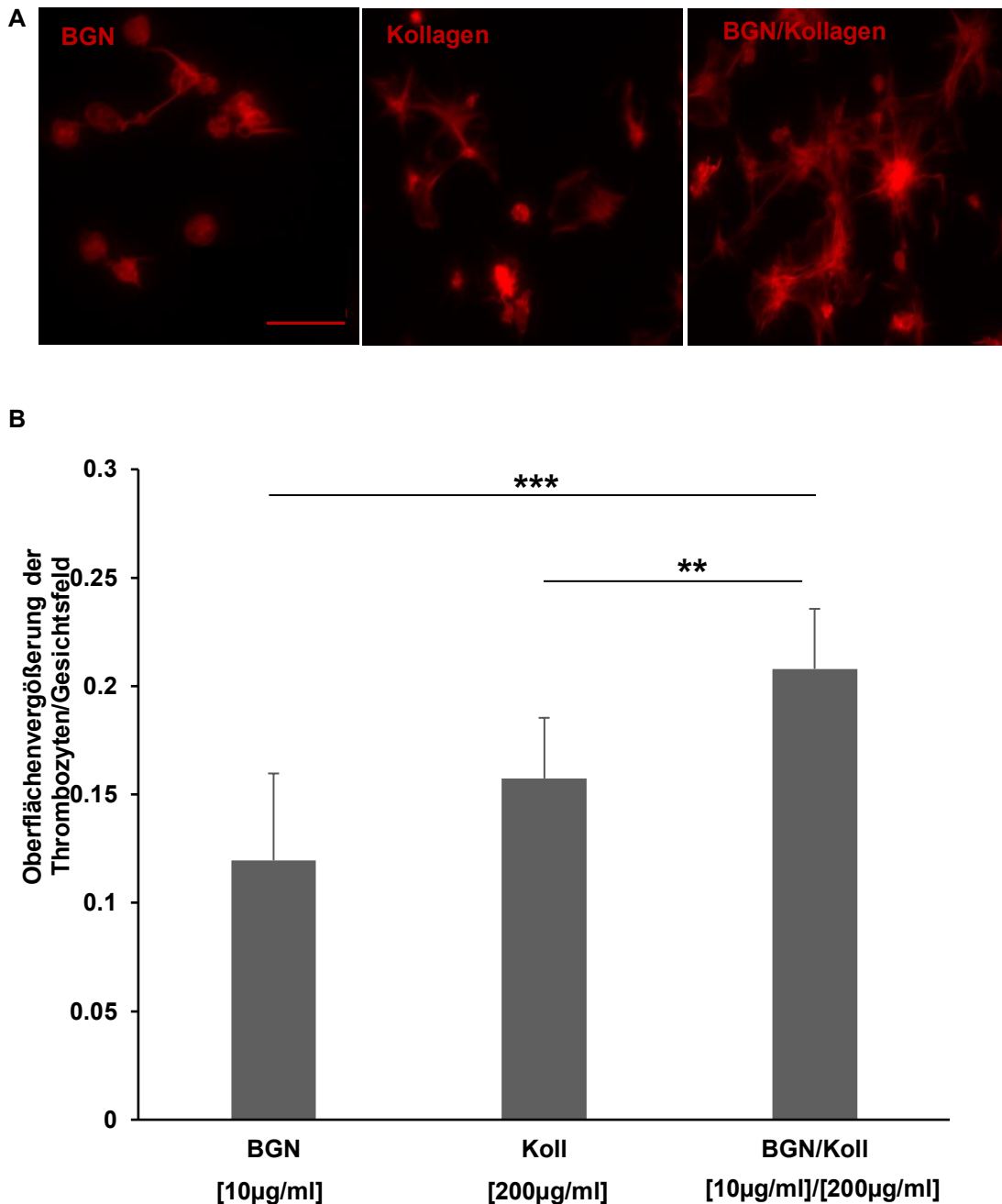


Abb. 7: Humane Thrombozyten zeigen eine erhöhte Oberflächenvergrößerung auf einer BGN-Kollagen-Matrix nach 20 min Inkubationszeit bei RT. Isolierte Thrombozyten wurden auf einer BGN-Matrix, einer Kollagen-Matrix und einer BGN-Kollagen-Matrix für 20 min inkubiert. Am Folgetag wurde mittels Mikroskopie und der Carl Zeiss Software „ZEN 2012“ (blue edition) die Anzahl der adhärennten Zellen und deren Oberflächenvergrößerung bestimmt **A** Exemplarische Bilder der Thrombozyten zeigen eine erhöhte Oberflächenvergrößerung auf einer BGN-Kollagen-Matrix. Maßstabsbalken=10µm. **B** Statistische Auswertung der thrombozytären Oberflächenvergrößerung humaner Thrombozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte + s.e.m. von 4 ausgezählten Gesichtsfeldern/ Spender. Statistische Auswertung erfolgte über Student's Ttest, n=9, p<0.05=*; p<0.01=**; p< 0.001=***.

4.3 BGN hat keinen signifikanten Einfluss auf das Adhäsionsverhalten muriner Thrombozyten auf Fibrinogen

Da in den vorangegangenen Versuchen eine Beeinflussung der thrombozytären Adhäsion durch das immobilisierte extrazelluläres Matrixprotein BGN nachgewiesen werden konnte, wurde im nächsten Schritt Fibrinogen, ein weiteres extrazelluläres Matrixprotein, in Bezug auf seine mögliche Beeinflussung des thrombozytären Adhäsionsverhalten untersucht. Hierfür wurden zunächst isolierte murine Thrombozyten auf einer Fibrinogen und einer BGN-Fibrinogen-Matrix aufgetragen und nach 5,20 und 60 min Inkubationszeit mit einer 4%-igen PFA Lösung fixiert und anschließend nach der oben beschriebenen Methode ausgezählt. Hierbei zeigte sich zwar auf der BGN-Fibrinogen-Matrix eine erhöhte Adhäsion, diese war jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikant (Abb. 8).

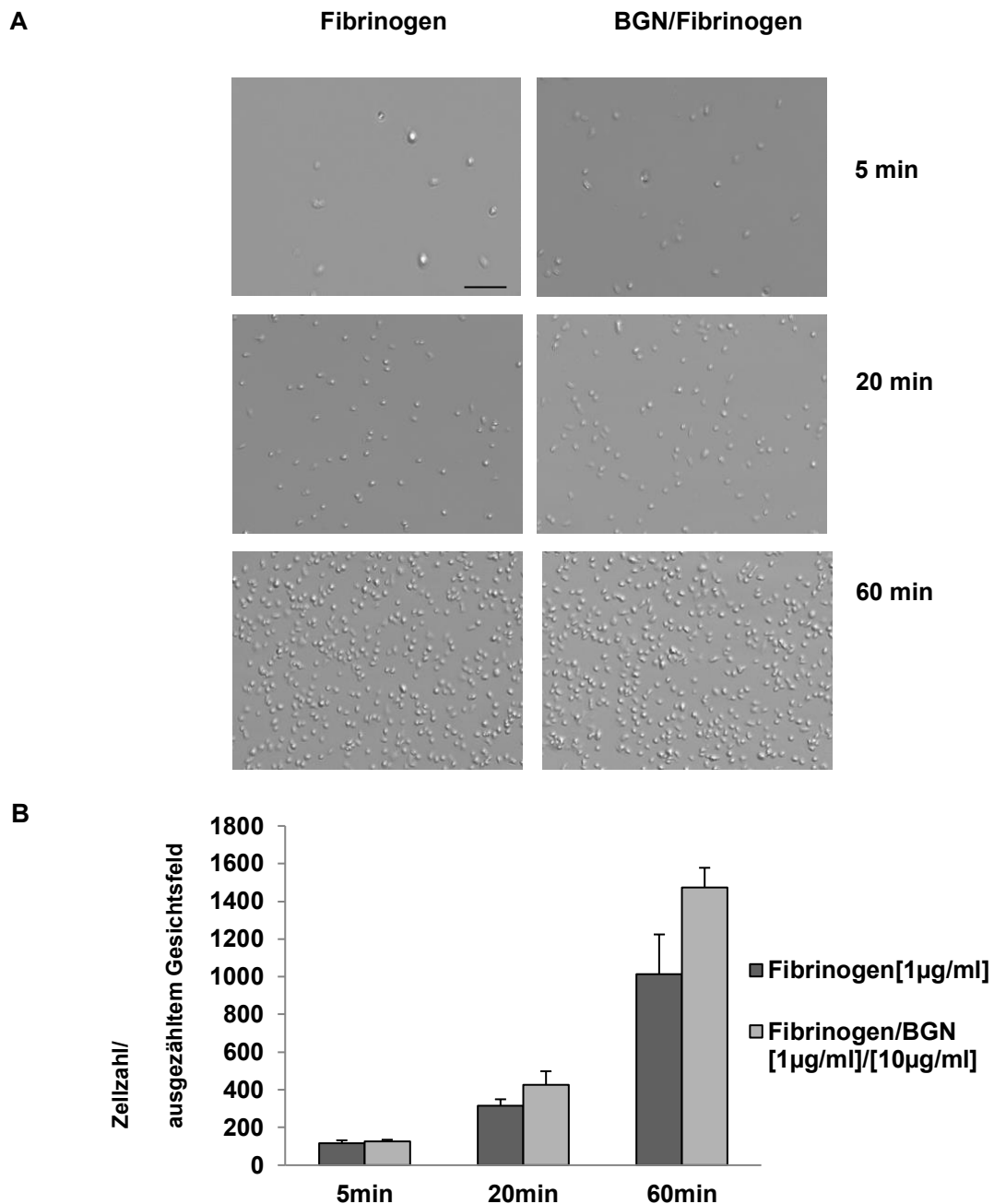


Abb. 8: Adhäsion von isolierten murinen Thrombozyten nach 5, 20 und 60 min Inkubation bei RT auf einer Fibrinogen-Matrix und einer BGN-Fibrinogen-Matrix. Isolierte Thrombozyten wurden auf einer Fibrinogen-Matrix und einer BGN-Fibrinogen-Matrix für 5, 20, 60 min inkubiert. Am Folgetag wurde mittels Mikroskopie und der Carl Zeiss Software „ZEN 2012“ (blue edition) die Anzahl der adhärenenten Zellen bestimmt. **A** Exemplarische Bilder der Thrombozyten zeigen eine vermehrte, aber keine statistisch signifikant erhöhte Adhäsion auf einer BGN-Fibrinogen-Matrix. Maßstabsbalken =20µm. **B** Statistische Auswertung des Adhäsionsverhalten der murinen Thrombozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte + s.e.m. von 4 ausgezählten Gesichtsfeldern/ Spender. Statistische Auswertung erfolgte über Student's Ttest, n=5, p<0.05=*; p<0.01=**; p< 0.001=***.

4.4 Veränderte zytoskelettale Reorganisation humaner Thrombozyten auf einer BGN-Matrix

Um einen Effekt auf das thrombozytäre Zytoskelett durch den Einfluss von BGN zu untersuchen, wurde die morphologische Oberflächenvergrößerung durch Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien, das sog. *Spreading*, humaner Thrombozyten auf einer BGN-Matrix untersucht. Hierbei wurden nach 5, 20 und 60 min die adhärenenten Thrombozyten, sowie die Thrombozyten ausgezählt, die bereits Filopodien und/oder Lamellipodien gebildet hatten und das Verhältnis zu der Gesamtzahl der Thrombozyten errechnet. Hierbei zeigte sich, dass nach 5 min nur 7,6% der Thrombozyten Lamellipodien ausbildeten, die Zahl der Lamellipodien-bildenden Thrombozyten nahm jedoch mit der Länge der Inkubationszeit zu. So lag ihr Anteil nach 60 min bei 31,58%. Die Filopodienbildung war nach 20 min (51,32%) ebenfalls im Vergleich zum ersten Zeitpunkt (5 min, 33,49%) signifikant erhöht (Abb. 9). Insgesamt lässt sich also erkennen, dass humane Thrombozyten auf einer BGN-Matrix eine erhöhte Adhäsionsrate aufweisen und gleichzeitig die Bildung von Filopodien und v.a. von Lamellipodien verstärkt wird.

Ergebnisse

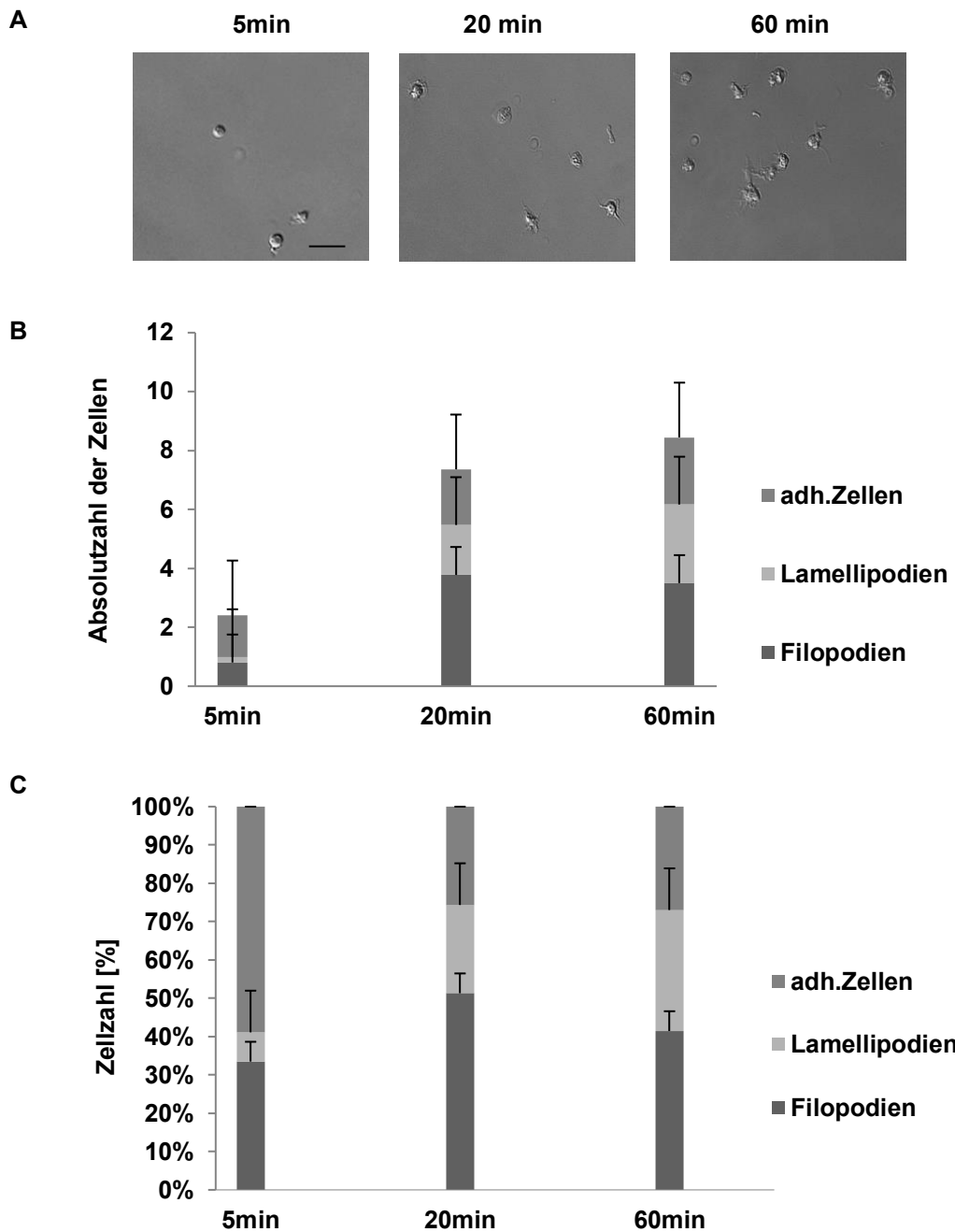


Abb. 9: Veränderungen der Zytoskelett-Reorganisation humaner Thrombozyten auf einer BGN-Matrix. Die Thrombozyten wurden aus humanem Vollblut isoliert und auf einer BGN-Matrix [200µg/ml] für 5,20 und 60 min inkubiert, um das sog. *Spreading* zu untersuchen. Anschließend wurden die Zellen ausgezählt und kategorisiert nach Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien sowie nur adhärenenten Thrombozyten ausgezählt. **A.** Exemplarische Bilder des *Spreadings* von Thrombozyten nach 5,20 und 60 min Inkubationszeit. Maßstabsbalken =10µm. **B.** Gezeigt werden die ausgezählten adhärenenten Zellen nach 5,20 und 60 min von 4 ausgezählten Gesichtsfeldern/ Spender. Statistische Auswertung erfolgte über Student's Ttest, n=5, p<0.05= *; p<0.01=**; p< 0.001=***. **C.** Die Thrombozyten wurden nach 5,20 und 60 min ausgezählt und zur Gesamtzahl aller im Versuch verwendeten Zellen gesetzt, n=5.

4.5 Erhöhte Tyrosinphosphorylierung bei BGN/CRP

Wie bereits unter 4.4 beschrieben waren in der Zytoskelett-Reorganisation der humanen Thrombozyten Unterschiede erkennbar. Um diese Ergebnisse weiter zu untersuchen, sollte im nächsten Schritt die zugrundeliegende Signalkaskade untersucht werden, die für die Wirkung von BGN auf das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten verantwortlich ist. Daher wurde zunächst der Einfluss von BGN auf die Phosphorylierung der Tyrosinreste von thrombozytären Proteinen analysiert. Hierfür wurde ein Antikörper verwendet, der die phosphorylierten Tyrosinreste aller Proteine detektiert und diese in einem modifiziertem Western-Blot Verfahren nachgewiesen. Die Lysate wurden zuvor mit BGN [10µg/ml] und BGN/ CRP [10µ/ml]/[200µg/ml] stimuliert und anschließend wie im oben genannten Verfahren beschrieben lysiert. Im Vergleich zu der Signalstärke der nicht stimulierten Kontrollen, sowie zu den Proben mit CRP Stimulation, zeigten die mit BGN/CRP inkubierten Proben eine deutlich erhöhte Phosphorylierung der Tyrosinreste. Dies deutet darauf hin, dass der CRP spezifische GPVI Signalweg durch BGN verstärkt wird und somit BGN als Kostimulator des CRP Signals wirkt. Dieses Ergebnis konnte in humanen (Abb. 10A) und auch in murinen Thrombozyten (Abb. 10B) nachgewiesen werden.

Ergebnisse

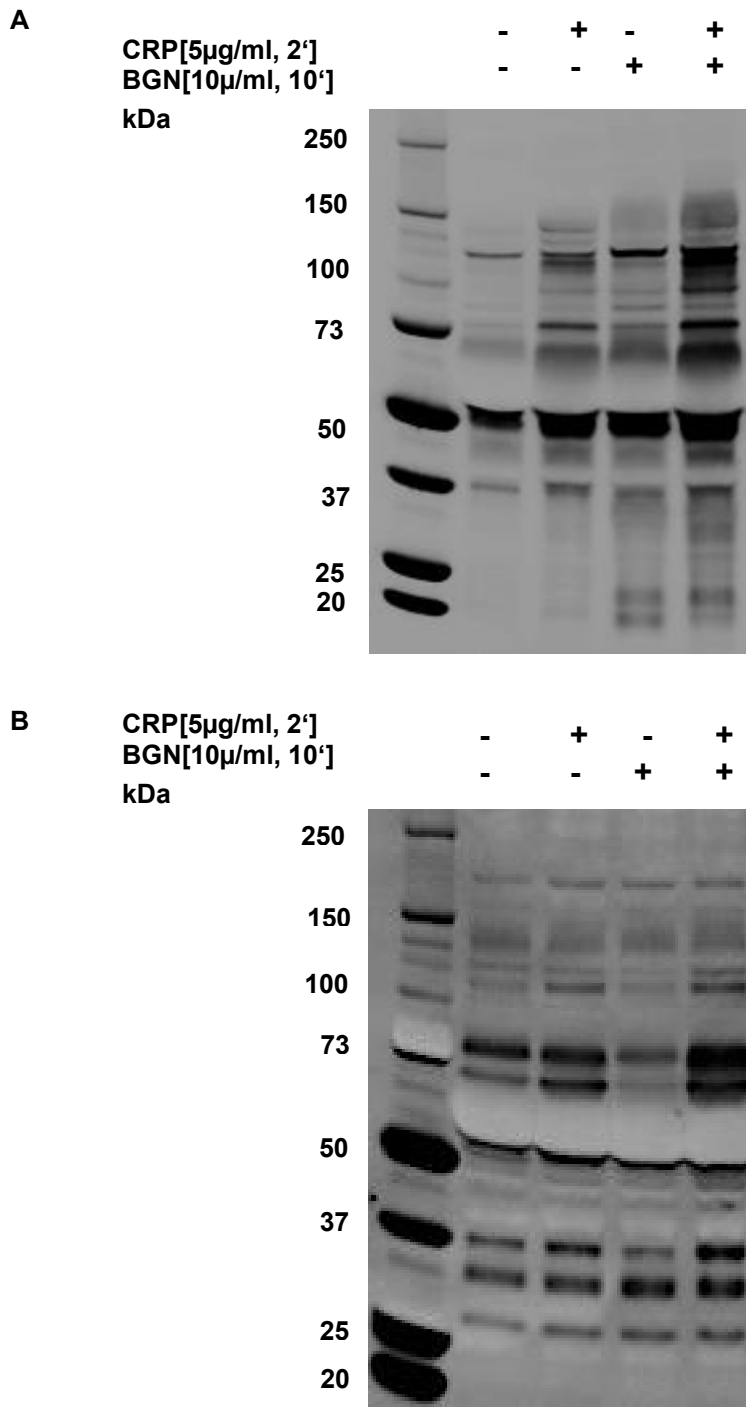


Abb. 10: Erhöhte Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine in humanen und murinen Thrombozyten. Murine und humane Thrombozyten wurden isoliert und auf eine Zellzahl von 40×10^6 Zellen/ μ l bzw. 15×10^6 Zellen/ μ l eingestellt. Die Zellen wurden mit CRP für 2 min und mit BGN für 10 min inkubiert und anschließend lysiert. Im Anschluss wurde über eine SDS-PAGE und Western Blot Analyse der Gesamtphosphorylierungsgrad der Tyrosinreste ermittelt. **A** Gezeigt sind repräsentative Western Blot Analysen zu der Tyrosinphosphorylierung im murinen System, n=4 **B** Gezeigt sind repräsentative Western Blots Analysen zu der Tyrosinphosphorylierung im humanen System, n=3.

4.6 Erhöhte Phosphorylierung von Src und PLC γ 2 nach BGN/CRP Stimulation im humanen und murinen System

Um zu untersuchen, ob BGN die Thrombozyten über den GPVI-Signalweg beeinflusst, wurde die Aktivierung der GPVI-Signalkaskade genauer untersucht. Nach Aktivierung des GPVI-Signalweges werden unter anderem die Kinasen Src und PLC γ 2 phosphoryliert und somit aktiviert. Diese spielen eine große Rolle in der GPVI-Signalkaskade und somit in der Aktivierung der Thrombozyten. Um diese Aktivierung nachzuweisen wurden sowohl murine, als auch humane Thrombozyten isoliert und mit BGN [10 μ g/ml] und BGN/ CRP [10 μ /ml]/[200 μ g/ml] stimuliert und anschließend lysiert. Western-Blot Analysen mit humanen und murinen Thrombozyten zeigten, dass BGN nur eine sehr schwache Phosphorylierung der untersuchten Kinasen Src und PLC γ 2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle induziert. Die Kostimulation mit CRP und BGN zeigte eine verstärkte Phosphorylierung von Src im Gegensatz zur unbehandelten oder nur mit CRP stimulierten Probe. Jedoch zeigte sich zur CRP-stimulierten Probe keine erhöhte Phosphorylierung von PLC γ 2, wenn die humanen Thrombozyten mit CRP und BGN stimuliert wurden. Aus diesem Ergebnis (Abb. 11) kann geschlossen werden, dass BGN auch in humanen Thrombozyten eine nur sehr schwache Phosphorylierung induziert. Des Weiteren weisen die Daten daraufhin, dass BGN den GPVI-Signalweg nicht wesentlich beeinflusst, BGN aber vermutlich über die Aktivierung von SRC die Reorganisation des Zytoskeletts moduliert.

Ergebnisse

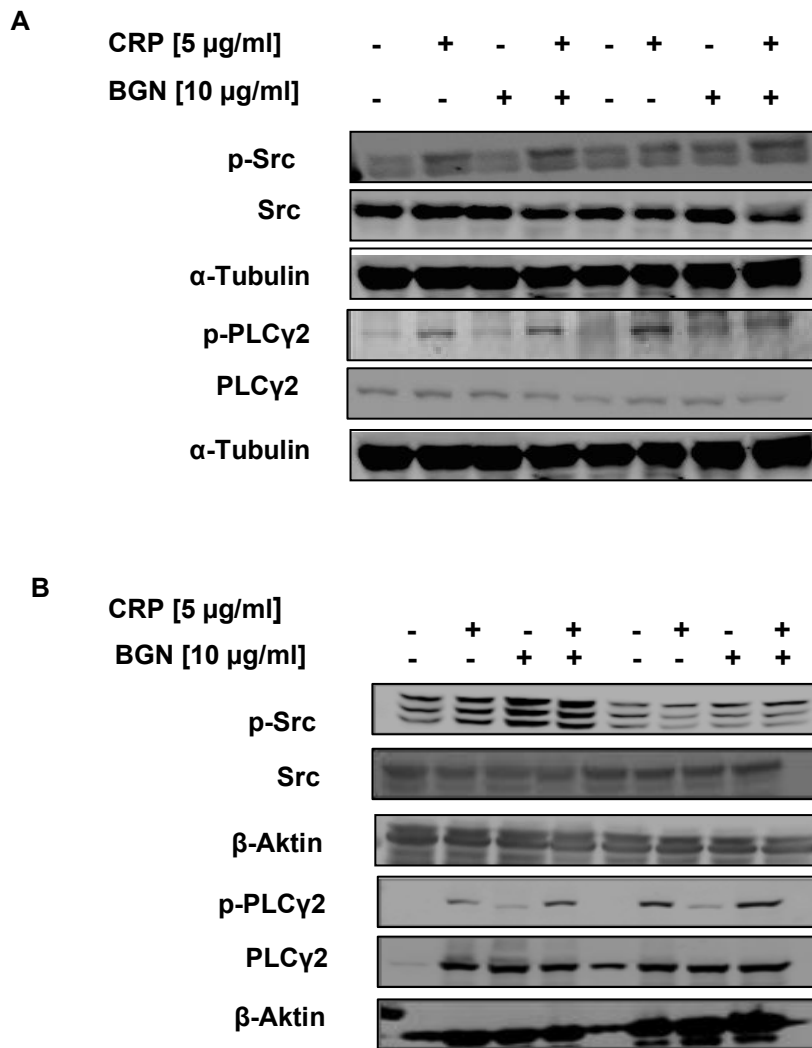


Abb. 11: Western Blot Analysen zur Bestimmung der Phosphorylierung von Src und PLC γ 2. Humane und murine Thrombozyten wurden isoliert und auf eine Zellzahl von 40×10^6 Zellen/ μ l bzw. 15×10^6 Zellen/ μ l eingestellt. Die Zellen wurden für 2 bzw. 10 min mit den angegebenen Agonisten (CRP und BGN) inkubiert und lysiert. Im Anschluss wurde über eine SDS-PAGE und Western Blot Analyse der Phosphorylierungsgrad der Zielproteine PLC γ 2 und Src ermittelt. **A** Gezeigt sind repräsentative Western Blot Analysen humaner Thrombozyten zu beiden Zielproteinen, α -Tubulin diente als Ladekontrolle, n=4. **B** Gezeigt sind repräsentative Western Blot Analysen muriner Thrombozyten zu beiden Zielproteinen, β -Aktin diente als Ladekontrolle.

4.7 BGN hat keinen Einfluss auf die *Clot Retraction* von Bgn^{-/-} Mäusen

Der Einfluss von BGN auf die Retraktion des Blutpropfs (*Clot Retraction*) wurde untersucht, indem Thrombin und Kalzium dem PRP von WT und Bgn^{-/-} Mäusen zugegeben und über mehrere Stunden bei 37 °C, ohne Agitation inkubiert wurde. Zur besseren visuellen Darstellung der Thrombusbildung wurde eine minimale Menge an Erythrozyten im PRP belassen. Nach definierten Zeitintervallen wurde die statistische Thrombusbildung untersucht und fotografisch festgehalten. Nach 300 min wurde das verbleibende Flüssigkeitsvolumen entnommen und gemessen. Dies ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen dem PRP von WT und Bgn^{-/-} Mäusen (Abb.12).

Ergebnisse

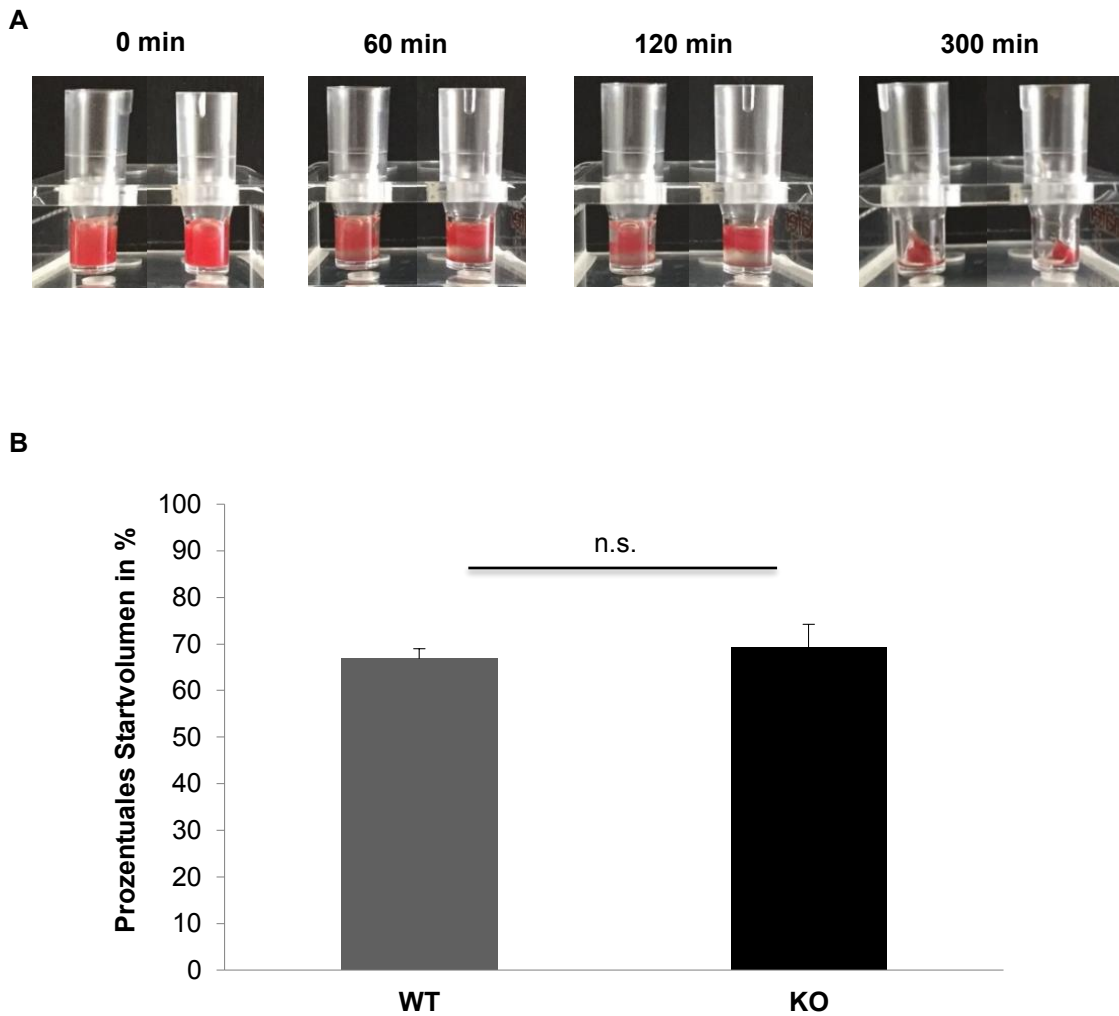


Abb. 12: Unveränderte statistische Thrombusbildung bei WT und *Bgn*^{-/-}. Nach der Stimulation des PRP von WT und *Bgn*^{-/-} Mäusen mit Thrombin wurde die Thrombusbildung unter statistischen Bedingungen nach 0,60,120 und 300 min festgehalten und final das verbleibende Flüssigkeitsvolumen entnommen und gemessen. **A** Exemplarische Bilder zeigen die Clotbildung nach 0, 60, 120 und 300 min **B** Statistische Auswertung der Thrombusbildung muriner Thrombozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte + s.e.m. von mindestens 10 ausgezählten Versuchstieren. Statistische Auswertung erfolgte über student's Ttest, n=10-11, n.s.=nicht signifikant.

5 Diskussion

Da die kardiovaskulären Erkrankungen zu einer der Haupttodesursachen in Deutschland und auch weltweit gehören, ist eine genaue Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen und somit eine bessere klinische Medikation wichtig [1,2]. Die Untersuchung aller Aspekte der Blutgerinnung und die dazugehörigen Grundlagen ist daher unabdingbar. Die in dieser Doktorarbeit beschriebenen Ergebnisse liefern neue Informationen über die Rolle von BGN in der Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung.

Der Einfluss von BGN auf das kardiovaskuläre System wurde schon in einigen anderen Arbeiten erforscht. So führt ein Abfall des BGN-Spiegels in atherosklerotischen Mäusen zu einer verstärkten Generierung von Thrombin, da BGN den Heparin-Cofaktor II aktiviert und somit Thrombin inaktiviert. Die daraus resultierende verstärkte Thrombozytenaktivierung wurde in APOE/BGN knock-out Mäusen festgestellt, was wiederum darauf hindeutet, dass BGN eine Rolle in der Atherosklerose spielt. Ebenso wurden in APOE/BGN knock-out Mäusen vermehrt proinflammatorische Zytokine im Blutplasma detektiert, welches eine proinflammatorische Rolle von BGN vermuten lässt [43]. Westermann *et al.* zeigten, dass BGN unabdingbar für eine stabile Kollagen-Matrix und für die Funktionstüchtigkeit des linken Herzventrikels ist [42]. Eine Beeinflussung des pro-inflammatorischen Systems durch BGN wird auch in anderen Untersuchungen gezeigt. Hierbei wurde festgestellt, dass BGN an TLR2 und TLR4 binden kann und somit die Ausschüttung des Tumornekrosefaktors (TNF- α) initiiert [44].

5.1 BGN induziert eine vermehrte Adhäsion von Thrombozyten

Die Adhäsion von Thrombozyten wurde in den oben genannten Ergebnissen v.a. auf einer kombinierten BGN-Kollagen-Matrix beeinflusst. Im Vergleich zur Adhäsion von Thrombozyten auf einer Kollagen-Matrix wurde nach einer 20-minütigen Inkubationszeit eine signifikant gesteigerte Adhäsion auf einer BGN-Kollagen-Matrix, sowohl im murinen, als auch im humanen System, detektiert.

Die Beeinflussung der Thrombozytenadhäsion wurde bisher nur für Decorin, ein weiteres *small leucine-rich repeat proteoglycan* (SLRPP) gezeigt.

Decorin gehört ebenso wie BGN zu den Klasse 1 SLRRP, bestehend aus einer 40-kDa Hauptkette und einer Chondroitin/Dermatan-Seitenkette und ähnelt BGN somit in struktureller Hinsicht zu 57% [45]. Wie Guidetti *et al.* zeigten gibt es auch eine vermehrte Adhäsion humaner Thrombozyten auf einer Decorin-Matrix im Vergleich zu einer BSA-Matrix [46]. Ein Anstieg der Adhäsion, im Vergleich zur BSA-Kontrolle, wurde bereits nach einer Adhäsionszeit von 30 min festgestellt. Hierbei wurden jedoch die Thrombozyten vor der Inkubation mit Decorin, aktiviert und die erhöhte Adhäsion v.a. bei der Inkubation mit der isolierten Decorinhauptkette nachgewiesen, diese Ergebnisse sind daher vergleichbar mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen. Humane Thrombozyten, die auf einer kombinierten Matrix aus BGN-Kollagen adhärten zeigten eine deutlich höhere Anzahl an adhärenen Thrombozyten bereits nach 20-minütiger Adhäsion im Vergleich zu einer BGN-Matrix. Ein ähnliches Ergebnis konnte in vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe auch schon mit murinen Thrombozyten gezeigt werden. Murine Thrombozyten zeigten ebenfalls eine verstärkte Adhäsion auf einer BGN-Matrix nach 20-minütiger Adhäsion. Entsprechend lässt sich zusammenfassen, dass beide Klasse I SLRP-Proteine einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten nehmen, wobei kein Unterschied zwischen murinen und humanen Thrombozyten festgestellt werden konnte. Trotz kurzer Aktivierungszeit zeigte sich eine bis zu 65,75% verstärkte Adhäsion. Eine mögliche Erklärung dafür, dass beide SLRPPs die Adhäsion von Thrombozyten beeinflussen, könnte deren strukturelle Ähnlichkeit sein, da beide SLRRPs einen zu 57% homologen Aufbau aufweisen. Im Endeffekt lässt die Gemeinsamkeit von BGN und Decorin eine bisher unbekannt wichtige Funktion als Cofaktor für die Thrombozytenadhäsion deutlich werden. Interessanterweise wurde von Guidetti *et al.* beschrieben, dass Decorin als Cofaktor in der Integrin $\alpha 2\beta 1$ vermittelten Thrombozytenadhäsion eine Rolle spielt [46]. Integrin $\alpha 2\beta 1$ spielt dabei lediglich eine Rolle in der Thrombozytenadhäsion und hat nur geringe Auswirkungen auf die Thrombozytenaktivierung [47].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BGN den GPVI Signalweg stimuliert, was eine wichtige Rolle von BGN in der GPVI vermittelten Thrombozytenadhäsion-, und Aktivierung vermuten lässt. Daher ist anzunehmen, dass die Sequenzhomologie der beiden Moleküle vermutlich nicht ausschlaggebend für den Bindungscharakter an den jeweiligen Rezeptor ist, sondern auf die sonstigen Funktionen zurückzuführen ist.

5.2 Der GPVI Signalweg wird durch BGN Stimulation aktiviert

Vorangegangene Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass die murine Adhäsion von Thrombozyten auf einer BGN-Matrix durch einen inhibierenden GPVI-Antikörper geblockt werden kann. Dies gab einen ersten Hinweis darauf, dass der zugrunde liegende Aktivierungsmechanismus von BGN auf die Thrombozytenadhäsion in Zusammenhang mit GPVI steht. Die Rolle des Kollagenrezeptors GPVI für die Blutgerinnung und auch klinische Therapie von Blutgerinnungsstörungen ist seit jeher bekannt [25]. Durch seine Komplexität werden immer noch neue Liganden des GPVI-Rezeptors identifiziert. Onselaer *et al.* benannten in ihrer Arbeit monomeres GPVI als den Hauptrezeptor für Fibrin im humanen System [48]. GPVI liegt in ruhenden Thrombozyten zu 80% in seiner monomeren Form vor [49]. Eine Aktivierung von Thrombozyten über freilegendes Kollagen induziert dabei ein *clustering* von GPVI Molekülen zu Dimeren, wodurch eine Transphosphorylierung des FcR γ Rezeptors zu einer aktivierenden Signalkaskade in Thrombozyten führt [49].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Aktivierung von Thrombozyten mit BGN zu einer vermehrten Phosphorylierung von GPVI abhängigen Kinasen führt. Dies legt eine GPVI vermittelte Aktivierungskaskade nahe. Decorin hingegen bindet nicht an GPVI, sondern an Integrin $\alpha 2\beta 1$, um dadurch eine Thrombozytenaktivierung zu vermitteln. Hierbei war jedoch die Bindeaffinität des Integrins an die isolierte Hauptkette des Decorins insgesamt höher als an das gesamte Protein [46]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Präinkubation des Probenmaterials mit Decorin zu einer vermehrten Phosphorylierung der Tyrosinkinase-PLC $\gamma 2$ führt [46].

In dieser Arbeit konnte deutlich gezeigt werden, dass eine Stimulation von humanen Thrombozyten mit BGN generell zu einer vermehrten Tyrosinphosphorylierung führt. Gezielte Analysen von GPVI abhängigen Tyrosinkinase zeigten, dass auch BGN PLC γ 2, sowie Src phosphoryliert und somit aktiviert. Ob diese erneuten Ähnlichkeiten in der Phosphorylierungskaskade der beiden SLRRPs eventuell der strukturellen Ähnlichkeiten zuzuschreiben ist, sollte in Zukunft geprüft werden. Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch der GPVI vermittelte Signalweg durch eine Stimulation mit einem SLRRP in Thrombozyten aktiviert wird. Um eine detailliertere Aussage über den BGN vermittelten Effekt auf die Stimulation von GPVI, dem Adhäsionsverhalten und der Phosphorylierung von Tyrosinresten von Zielproteinen des GPVI Signalweges treffen zu können, sollten GPVI defiziente Mäuse in naher Zukunft untersucht werden.

5.3 Potentielle Rolle von BGN als Modulator von Rho-GTPasen

Wie oben bereits beschrieben induziert BGN eine zytoskelettale Veränderung, das sog. *Spreading* der Thrombozyten. So kommt es nach der Adhäsion von Thrombozyten auf einer BGN-Matrix zur Ausbildung von Filopodien und Lammelipodien. Diese Reorganisation des thrombozytären Zytoskeletts ist von enormer Bedeutung für die Hämostase, da sie entscheidend ist für die Oberflächenvergrößerung der Thrombozyten während deren Aktivierung. Essenziell für diese zytoskelettale Reorganisation sind Rho-GTPasen, kleine G-Proteine, die durch die wechselnde Bindung der Nukleotide Guanosindiphosphat oder Guanosintriphosphat als Signalmoleküle agieren [23].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BGN einen direkten Einfluss auf die zytoskelettale Reorganisation der Thrombozyten nach Aktivierung nimmt. Wie unter 4.4 beschrieben, trat auf einer BGN-Matrix eine vermehrte Bildung von Lammelipodien und Filopodien auf. Entsprechend den zugrundeliegenden Mechanismen ist es von größtem Interesse sich den Aktivierungsstatus der Rho-GTPasen nach BGN Stimulus genauer zu analysieren.

Ein Assay zur Messung der Aktivitäten von Rac1 und Cdc42 wurde bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt) und deutet auf eine gezielte Aktivierung der Rho-GTPasen durch Aktivierung mit BGN in Kombination mit CRP hin. Da die morphologischen Veränderungen der Thrombozyten oft auch mit pathologischen Zuständen einhergehen [50], wäre ein antithrombotischer Ansatz mit BGN sicherlich denkbar. Hierfür wären Bindungsstudien interessant, um zu untersuchen auf welche Art BGN mit den Thrombozyten agiert. Dies muss aber in weiterführenden Studien untersucht werden.

5.4 Der Zusammenhang zwischen BGN und GPVI in der Thrombozyten -vermittelten Inflammation

In den Phosphorylierungsstudien zeigte sich nach einer Stimulation mit CRP und BGN eine deutliche Phosphorylierung der Tyrosinreste in der Phosphorylierungskaskade der Zielproteine des GPVI-Signalweges, als auch von einigen Zielproteinen anderer Phosphorylierungskaskaden. Bisher ist noch nicht bekannt, ob BGN den GPVI-Rezeptor direkt beeinflusst oder ob BGN den natürlichen Liganden Kollagen über eine Konformationsänderung beeinflusst und es zu einem verstärkten GPVI-Signal kommt. Dass BGN eine Konformationsänderung des Rezeptors induzieren kann, zeigten Babelova *et al* [51]. In dieser Arbeit wurde durch Immunpräzipitation demonstriert, dass BGN die TLR2 und TLR4 aktiviert. Diese TLRs dienen dem angeborenem Immunsystem zur Erkennung der Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) und der daraus resultierenden Ausschüttung verschiedener Zytokine [51]. Um Interleukin1 β (IL-1 β) zu produzieren benötigen Makrophagen die Stimulation der TLRs [51]. Babelova *et al* zeigten, dass BGN als alleiniger Stimulus der TLRs genügt, um die Inflammasome zu aktivieren und somit durch eine erhöhte Ausschüttung von IL-1 β ein pro-inflammatorisches Signal zu erzeugen [51]. Interessanterweise besitzen Thrombozyten ebenfalls den TLR4. Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass in der LPS induzierten Sepsis eine Stimulation von thrombozytärem TLR4 über LPS zu einer erhöhten Aktivierung von Thrombozyten führte [52].

Entsprechend sollte genauer untersucht werden, ob BGN einen Einfluss auf den TLR4 von Thrombozyten hat und ob der GPVI Signalweg evtl. dadurch weiter beeinflusst wird. Um zu untersuchen, ob und wie BGN an den GPVI-Rezeptor bindet, wären direkte Bindungsstudien von BGN an einen isolierten GPVI-Rezeptor notwendig. Diese Ergebnisse könnten Erkenntnisse darüber liefern, ob durch eine Inhibierung der BGN- Bindung an GPVI ein neues antithrombotisches Target identifiziert werden kann.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung und die Rolle des EZM Proteins BGN für die Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung zu entschlüsseln und die zugrunde liegenden Mechanismen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass humane Thrombozyten verstärkt auf einer BGN-Kollagen-Matrix adhären. Außerdem wurde ersichtlich, dass BGN einige Zielproteine des GPVI-Signalweges aktiviert, sowohl im murinen, als auch im humanen System. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit die ersten Ergebnisse dafür geliefert wurden, dass BGN zu einer Aktivierung von Thrombozyten *in vitro* führt und der zugrunde liegende Mechanismus durch eine Interaktion mit dem Thrombozyten-spezifischen GPV-Rezeptor vermittelt wird.

In der Zukunft wäre es sicherlich interessant mittels Bindungsstudien zu untersuchen, ob und wie BGN an den GPVI-Rezeptor bindet und ob GPVI der einzige Rezeptor auf der Oberfläche der Thrombozyten ist mit dem BGN interagieren kann. Zudem wären weitere Versuche von Interesse, die den Gehalt von BGN im Plasma von thrombektomierten Patienten untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 WHO. Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>.
- 2 Destatis; statistisches Bundesamt. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html>.
- 3 Koupenova M. Thrombosis and platelets: an update. *Eur Heart J* 2017 Mar 14;38(11):785-791.
- 4 Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *ScientificWorldJournal*. 2014 Mar 3;2014:781857.
- 5 Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews* 2011;25:155-67.
- 6 Gawaz M (1999). *Das Blutplättchen Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung*. G. Thieme-Verlag, Stuttgart; New York.
- 7 George JN. Platelets. *Lancet (London, England)* 2000;355:1531-9.
- 8 Lefrançais E, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* 2017;544:105-9.
- 9 Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer metastasis reviews* 2017;36:195-8.
- 10 Gremmel T, Frelinger AL, 3rd, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost*. 2016 Apr;42(3):191-204.
- 11 Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 ;28(3):403-12.
- 12 Watson SP, Gibbins J. Collagen receptor signalling in platelets extending the role of the ITAM. *Immunol Today*. 1998;19(6):260-4.
- 13 Santoro SA et al. Distinct determinants on collagen support integrin mediated platelet adhesion and platelet activation. *Cell Regul*. 1991;2(11):905-13.
- 14 Brass LF, Molino M. Protease activated G-protein-coupled receptors on human platelets and endothelial cells. *Thromb Haemost*. 1997;78(1):234-41.
- 15 Knight DE, Niggli V, Scrutton MC. Thrombin and activators of protein kinase C modulate secretory responses of permeabilised human platelets induced by Ca²⁺. *Eur J Biochem*. 1984;143(2): 437-446.
- 16 Davies TA, et al. Cytoplasmic Ca²⁺ is necessary for thrombin-induced platelet activation *J Biol Chem*. 1989 Nov 25;264(33):19600-6.

- 17 Gallet C, et al. Tyrosine phosphorylation of cortactin associated with syk accompanies thromboxane analogue-induced platelet shape change. *J Biol Chem* . 1999 Aug 13;274(33):23610-6.
- 18 Heasman SJ, et al. Multiple roles for RhoA during T cell transendothelial migration. *Small GTPases*. 2010; 1(3): 174–179.
- 19 Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res*. 2006;99(12):1293-304.
- 20 Miki H, Suetsugu S, Takenawa T. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J*. 1998;17(23):6932-41.
- 21 Soderling SH, Scott JD. WAVE signalling: from biochemistry to biology. *Biochemical Soc. Trans*. 2006;34(Pt1):73–6.
- 22 McCarty O JT. Rac1 Is Essential for Platelet Lamellipodia Formation and Aggregate Stability under Flow. *J Biol Chem* . 2005;280(47):39474-84.
- 23 Elvers M. RhoGAPs and Rho GTPases in platelets. *Hamostaseologie*. 2016;36(3):168-77.
- 24 Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res*. 2004 Feb 15;61(3):498-511.
- 25 Gale AJ. Current Understanding of Hemostasis. *Toxicol Pathol*. 2011 ; 39(1): 273–280.
- 26 Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003; ;102(2):449-61.
- 27 Jandrot-Perrus M, 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(5):1798-807.
- 28 Massberg S, et al. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB J*. 2004;18(2):397-9.
- 29 Javris GE, et al. Distinct roles of GPVI and integrin $\alpha 2\beta 1$ in platelet shape change and aggregation induced by different collagens. *Br J Pharmacol*. 2002;137(1):107-17.
- 30 Watson S, et al. GPVI and integrin $\alpha 11\text{b}\beta 3$ signaling in platelets. *J Thromb Haemost* .2005;3(8):1752-62.
- 31 Bigalke B, et al. Platelet and soluble glycoprotein VI - novel applications in diagnosis and therapy. *Current drug targets* 2011;12:1821-30.
- 32 Watson SP. Collagen Receptor Signaling in Platelets and Megakaryocytes. *Thromb Haemost* 1999; 82(2): 365- 376
- 33 Shuppan D, et al. The extracellular matrix in cellular proliferation and differentiation. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;733:87-102.

- 34 Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 2014;15:786- 801.
- 35 Bergmeier W, Hynes RO. Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4(2):a005132.
- 36 Merline R, Schaefer RM, Schaefer L. The matricellular functions of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs). *J. Cell Commun. Signal.* (2009); 3(3-4):323–335.
- 37 Fischer LW, et al. Proteoglycans of Developing Bone. *J Biol Chem* .1983;258(10):6588-94.
- 38 Bianco P, et al. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem.* 1990; 38(11):1549-63.
- 39 Ni G-X, Li Z, Zhou Y-Z. The role of small leucine-rich proteoglycans in osteoarthritis pathogenesis. *Osteoarthritis and cartilage* 2014;22(7):896-903.
- 40 Schaefer L, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages *Clin Invest.* 2005;115(8):2223-33.
- 41 Schönherr E, et al. Interaction of biglycan with type I collagen. *J Biol Chem.* 1995;270(6):2776-83.
- 42 Westermann D, et al. Biglycan is required for adaptive remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 2008;117(10):1269-76.
- 43 Grandoch M, et al. Loss of Biglycan Enhances Thrombin Generation in Apolipoprotein E-Deficient Mice: Implications for Inflammation and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(5):e41-50.
- 44 Nastase MV, Young MF, Schaefer L. Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals. *J Histochem Cytochem.* 2012;60(12):963-75.
- 45 Iozzo RV. The Biology of the Small Leucine-rich Proteoglycans. *J Biol Chem.*1999;274(27):18843-6.
- 46 Guidetti G, et al. The small proteoglycan decorin supports adhesion and activation of human platelets. *Blood* 2002;100(5):1707-14.
- 47 Jung M, et al. Constitutive Dimerization of Glycoprotein VI (GPVI) in Resting Platelets Is Essential for Binding to Collagen and activation in flowing blood. *J Biol Chem* 2012;287(35):30000-13.
- 48 Onselar M-B, et al. Fibrin and D-dimer bind to monomeric GPVI. *Blood Adv.*2017;1(19):1495-1504.
- 49 Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(7): 1457–67.

- 50 Shin E-K. Platelet Shape Changes and Cytoskeleton Dynamics as Novel Therapeutic Targets for Anti-Thrombotic Drugs. *Biomol Ther (Seoul)*. 2017;25(3):223-230.
- 51 Babelova A, et al. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem*. 2009;284(36):24035-48.
- 52 Urbahn M-A, et al. Phospholipase D1 regulation of TNF-alpha protects against responses to LPS. *Sci Rep*. 2018; 8(1):10006.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Margitta Elvers, meiner Doktormutter und Betreuerin, für die Chance meine Dissertation an ihrem Institut anzufertigen und für die Unterstützung während der Anfertigung dieser bedanken.

Ein riesengroßes Dankeschön auch an die Arbeitsgruppe, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Wirklich jeder von euch hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen. Danke! Ein besonderer Dank geht an Martina Spelleken und Irena Krüger, die nie müde wurden mir selbst banale Dinge zu erklären.

Ebenfalls möchte ich dem SFB 116 danken, der mir die Chance gegeben hat Einblicke in den wissenschaftlichen Teil unseres Studiums und Berufes zu erlangen.

Friedrich, ohne dich hätte ich es wirklich nicht geschafft, ich denke das weißt du auch. Danke !

Zuletzt möchte ich meiner Familie und David danken, die mich immer unterstützt haben und an mich geglaubt haben, auch wenn der Weg lang war. Danke !