

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

**Einfluss von Osteopontin und dessen Fragmente auf die Adhäsion und
Aktivierung von Thrombozyten in der intraluminalen Thrombusformation und
Progression im abdominalem Aortenaneurysma**

Dissertation

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

vorgelegt von
Christopher Böddeker

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. Maria Grandoch, M.Sc.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Markus U Wagenhäuser, Joscha Mulorz, Kim J Krott, Agnes Bosbach, Tobias Feige, Yae H Rhee, Madhumita Chatterjee, Niklas Petzold, Christopher Bøddeker, Wiebke Ibing, Irena Krüger, Ana M Popovic, Ann Roseman, Joshua M Spin, Philip S Tsao, Hubert Schelzig, Margitta Elvers, 2024, Crosstalk of platelets with macrophages and fibroblasts aggravates inflammation, aortic wall stiffening, and osteopontin release in abdominal aortic aneurysm. *Cardiovascular Research*, Volume 120, Seite: 417-432

I Zusammenfassung

Das abdominale Aortenaneurysma (AAA) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, die zur Schwächung der Aortenwand führt. Dadurch kann diese im Verlauf der Erkrankung rupturieren. Die Ruptur führt fast immer zum Tod. Bislang kann nur die operative oder interventionelle Versorgung hiervor schützen. In der Pathogenese des AAA tritt in ungefähr 80% der Fälle ein aus Thrombozyten, Immunzellen, Erythrozyten und Proteinen bestehender intraluminaler Thrombus (ILT) auf, welcher biologisch aktiv ist. Es konnte zusätzlich festgestellt werden, dass Osteopontin (OPN) erhöht in den Blutplasmaspiegeln und vermehrt in den pathologisch veränderten Aortenwänden von AAA-Patienten vorkommt. OPN ist einerseits als Zytokin, andererseits in der extrazellulären Matrix (ECM) abgelagert für die Rekrutierung verschiedener Zellen verantwortlich. Außerdem ist es in der Lage u.a. thrombozytäre Integrine zu binden. OPN kann durch verschiedene Enzyme, z.B. Thrombin, Plasmin oder Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), hydrolisiert werden. Die entstehenden Fragmente zeigen teils verschieden Affinitäten zu Integrinen und damit eine andere Aktivität. In dieser Arbeit sollte der Einfluss von OPN und dessen Fragmente auf die Adhäsionsfähigkeit und Aktivierung von Thrombozyten und ein möglicher Beitrag von OPN für die Rekrutierung von Thrombozyten in den ILT des AAA untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch spezifische Färbungen OPN in Gefäßwandproben von AAA-Patienten nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass lösliches OPN keinen Einfluss auf die Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung bzw. Degranulierung von Thrombozyten hat. Allerdings konnte eine verstärkte Adhäsion von Thrombozyten auf immobilisiertem OPN nach Stimulation mit Adenosindiphosphat (ADP) oder *collagen-related peptide* (CRP) nachgewiesen werden. Die Inhibition des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ durch Tirofiban oder Eptifibatid führte unerwartet zu einer gesteigerten Adhäsion der aktivierten Thrombozyten auf immobilisiertem OPN. Die Osteopontin-vermittelte Thrombozytenadhäsion verläuft zum Teil über das Integrin $\alpha_v\beta_3$, da eine Inhibition dieses Integrins zu einer verringerten, wenn auch keiner kompletten, Reduktion der Adhäsion aktivierter Thrombozyten führte. Keinen Einfluss auf die Adhäsion der Thrombozyten auf immobilisiertem Kollagen hatte die Kostimulation mit löslichem Osteopontin. Des Weiteren konnte kein Unterschied in den Versuchen zwischen fragmentiertem (frag.) oder rekombinantem (rek.) Osteopontin gezeigt werden.

Zusammenfassend stellt immobilisiertes, rekombinantes und fragmentiertes OPN ein wichtiges Adhäsionsprotein dar, indem es – zumindest zum Teil – an aktivierten Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf der Oberfläche von Thrombozyten binden kann. Dadurch kann OPN aktivierte

Thrombozyten durch Bindung in den ILT im Aneurysma führen und die Ausbildung des ILTs fördern. Folglich bietet auf der einen Seite der ILT einen biomechanischen Schutz, kann aber auch auf der anderen Seite verschiedene Immunzellen rekrutieren und binden, die ihrerseits zum Bestehen der Entzündung und zur Wandschwächung beitragen könnten. Da noch nicht klar ist, wie dieser Einfluss auf den ILT in der Pathologie des AAA zu bewerten ist, sollte der ILT in dessen Entstehung und Auswirkung weiter erforscht werden.

II Summary

Abdominal Aortic Aneurysm (AAA) is a chronically inflammatory disease that leads to a weakening of the aortic wall, which may rupture over the course of the disease. Such a rupture is almost invariably fatal. Currently, only surgical or interventional treatment can provide protection against this outcome. In the pathogenesis of AAA, an intraluminal thrombus (ILT), composed of platelets, immune cells, erythrocytes, and proteins, develops in approximately 80% of cases. This ILT is biologically active. Furthermore, increased levels of osteopontin (OPN) have been detected both in the plasma and within the pathologically altered aortic walls of AAA patients. OPN acts both as a cytokine and as a component of the extracellular matrix (ECM), playing a role in the recruitment of various cell types. Additionally, OPN can bind, among others, to platelet integrins. It may be cleaved by several enzymes, such as thrombin, plasmin, and matrix metalloproteinases (MMPs). The resulting fragments may exhibit distinct affinities for integrins and thereby exert differential biological effects. This study aimed to investigate the influence of OPN and its fragments on platelet adhesion and activation, as well as a potential contribution of OPN to platelet recruitment into the ILT of AAA.

In this study, specific staining techniques demonstrated the presence of OPN in vessel wall samples from AAA patients. Moreover, it was shown that soluble OPN does not affect $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin activation or platelet degranulation. However, platelet adhesion to immobilized OPN was enhanced following stimulation with adenosine diphosphate (ADP) or collagen-related peptide (CRP). Interestingly, inhibition of $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin by tirofiban or eptifibatide unexpectedly led to an increased adhesion of activated platelets to immobilized OPN. OPN-mediated platelet adhesion occurs, at least in part, via the $\alpha_v\beta_3$ integrin, as its inhibition resulted in a reduced, though not completely abolished, adhesion of activated platelets. Co-stimulation with soluble OPN had no effect on platelet adhesion to immobilized collagen. Furthermore, no differences were observed between the effects of fragmented (frag.) and recombinant (rec.) OPN in the conducted assays.

In summary, immobilized recombinant and fragmented OPN represent important adhesion proteins, as they are capable—at least partially—of binding to activated $\alpha_v\beta_3$ integrin on the platelet surface. Consequently, OPN may contribute to the recruitment of activated platelets into the ILT within the aneurysmal vessel and thereby promote ILT formation. On the one hand, the ILT may offer biomechanical protection; on the other hand, it may serve as a reservoir for immune cell recruitment and binding, potentially perpetuating inflammation and contributing to wall degradation. Since the precise role of

this mechanism in AAA pathology remains unclear, further investigation into the formation and effects of the ILT is warranted.

III Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
/µl	pro Mikroliter
AAA	Abdominales Aortenaneurysma
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>
BMI	engl. <i>Body mass index</i>
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calciumion
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CD62P	P-Selektin
cm	Centimeter
CRP	engl. <i>Collagen-related peptide</i>
Cy3	engl. <i>Cyanine-3</i>
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIC	engl. <i>differential interference contrast</i>
EVAR	endovaskulären Aneurysmreparatur
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	engl. <i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
FERM-Domäne	<i>four-point-one</i> , Ezrin, Radixin, Moesin-Domäne
FITC	<u>Fluoresceinisothiocyanat</u>
frag. OPN	fragmentiertes Osteopontin
g	Gramm
Glu	Glutaminsäure

Gly	Glycin
GP IIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
GP VI	Glykoprotein VI
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
IEGF1-4	engl. <i>integrin epidermal growth factor 1-4</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ILT	Intraluminaler Thrombus
IP3	Inositoltrisphosphat
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
Leu	Leucin
m	Meter
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>mitogen activated protein</i> Kinase
MFI	engl. <i>Mean fluorescence intensity</i>
Mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
MLKK	Myosin-Leicht-Ketten-Kinase
MLKP	Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MoGeMa	Molekulargewichtsmarker
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mU/μl	Milliunits pro Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid

NADPH-Oxidase	Nikotinamadenin dinukleotidphosphat-Oxidase
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
nm	Nanometer
nmol/ml	Nanomol pro Milliliter
NO	Stickstoffmonoxid
OPN	Osteopontin
PAR 1	Protease-aktivierter Rezeptor 1
PAR 4	Protease-aktivierter Rezeptor 4
PBS	engl. <i>Phosphate buffered saline</i>
PE	R-Phycoerythrin
PGE ₁	Prostaglandin E1
PGI ₂	Prostacyclin
pH	lat. <i>pondus Hydrogenii</i>
Phe	Phenylalanin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC γ 2	Phospholipase γ 2
PPACK	D-Phenylalanyl-N-[(1s)-4-[[[(Z)-Amino(Imino)methyl-amino]-1 (Chloroacetyl)butyl]-L-Prolinamid Dihydrochlorid
Pro	Prolin
PRP	plättchenreiches Plasma
rek. OPN	rekombinantes Osteopontin
RGD-Sequenz	Aminosäuresequenz, die aus der Abfolge von Arg-Gly-Asp besteht
ROCK	Rho Kinase
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SEM	engl. <i>Standard error of the mean</i>
SFK	Src-Familienkinase
SNARE-Komplex	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i> -Komplex
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TIMP	engl. <i>Tissue inhibitors of matrix metalloproteinasen</i>

Thr	Threonin
tPA	gewebsspezifischen Plasminogenaktivator
TP	Thromboxan A2 Rezeptor
Tr	Thrombin
Tyr	Tyrosin
TxA2	Thromboxan A2
U	Units
uPA	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator
V	Volt
Val	Valin
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µU	Mikrounits
µU/µl	Mikrounits pro Mikroliter
µl	Mikroliter

IV Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung.....	I
II Summary.....	III
III Abkürzungsverzeichnis.....	V
IV Inhaltsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Thrombozyten	1
1.1.1 Physiologie und Funktion von Thrombozyten	1
1.1.2 Primäre und sekundäre Hämostase	1
1.1.3 Integrine der Thrombozyten	4
1.1.4 Das Zytoskelett und <i>shape change</i>	6
1.2 Abdominales Aorten Aneurysma (AAA).....	8
1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	9
1.2.2 Pathophysiologie.....	9
1.3 Osteopontin.....	12
1.3.1 Die Rolle des Osteopontins im abdominalem Aortenaneurysma	13
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Material	15
2.1.1 Geräte.....	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3 Chemikalien und Proteine	17
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	18
2.1.5 Antikörper und Farbstoffe.....	19
2.1.6 Software.....	19
2.2 Humane Proben	19
2.3 Methoden	20
2.3.1 Thrombozytenisolation	20
2.3.2 Das Fragmentieren von Osteopontin.....	20
2.3.3 Durchflusszytometrie.....	20

2.3.4	Adhäsionsversuche.....	21
2.3.5	SDS- Page.....	24
2.3.6	Silberfärbung.....	24
2.3.7	Immunfluoreszenzfärbung von Osteopontin in den abdominalen Aortenwänden von Aneurysmapatienten.....	25
2.3.8	Statistische Auswertung.....	25
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Thrombin hydrolysiert Osteopontin.....	27
3.2	Osteopontin(nachweis) in der abdominalen Aortenwand von Aneurysmapatienten.....	29
3.3	Osteopontin zeigt keinen Einfluss auf die Aktivierung humaner Thrombozyten 30	
3.4	Stimulierte humane Thrombozyten adhären auf immobilisiertem Osteopontin.....	32
3.4.1	Einfluss des thrombozytären Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf die Adhäsion humaner Thrombozyten auf Osteopontin.....	34
3.4.2	Reduktion der Adhäsion auf immobilisiertem Osteopontin durch Hemmung des humanen Thrombozytenintegrins $\alpha_v\beta_3$	38
3.5	Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien stimulierter Thrombozyten auf immobilisiertem Osteopontin.....	40
3.6	Kein Einfluss von löslichem rekombinanten Osteopontin auf die Adhäsion von Thrombozyten auf einer Kollagenmatrix.....	42
4	Diskussion.....	44
4.1	Der Einfluss von Osteopontin auf die Thrombozytenaktivierung und -degranulierung.....	44
4.2	Adhäsionsfähigkeit von Thrombozyten auf immobilisiertem Osteopontin.....	44
4.3	Lösliches Osteopontin führt zu keiner gesteigerter Anzahl adhärenter Thrombozyten.....	47
4.4	Relevanz der Ergebnisse für die Pathogenese des abdominale Aortenaneurysma.....	47
5	Literaturverzeichnis.....	50

1 Einleitung

1.1 Thrombozyten

1.1.1 Physiologie und Funktion von Thrombozyten

Thrombozyten wurden bereits 1865 von M. Schultze und 1882 von G. Bizzozero erstmals beschrieben [1]. Thrombozyten bilden neben Erythrozyten und Leukozyten den korpuskulären Bestandteil, den Hämatokrit, im Blut. Mit ihrer diskoiden Form in der Größe von $1-3\ \mu\text{m} \times \geq 1\ \mu\text{m}$ und einer Anzahl von ca. 180.000-410.000 / μl zirkulieren sie im Blut [2]. Die Entstehung der Thrombozyten (Thrombozytopoese) erfolgt im Knochenmark mittels zytoplasmatischer Abschnürung aus den Megakaryozyten. Da nur Zytoplasma abgeschnürt wird, sind Thrombozyten anukleär und haben eine Lebensdauer von 5 bis 10 Tagen [3, 4]. Neben dem Knochenmark ist, seit 2017 durch Lefrançois *et al.*, auch die Lunge als Ort der Thrombozytopoese bekannt [5]. Wesentliche Merkmale der Thrombozyten sind die 40-80 α -, 3-8 δ - oder dichte Granula, Lysosomen und das offene Kanalsystem [6, 7]. Dieses System besteht aus Kanälen, die vom Inneren des Thrombozyten bis an die Thrombozytenmembran führen und dem Transport der Granula in und aus dem Thrombozyten dienen [6]. „Alte“ Thrombozyten werden aus dem Blutfluss durch Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in der Leber und der Milz entfernt [4, 5, 8]. Thrombozyten sind Teil vieler physiologischer und pathophysiologischer Prozesse im Organismus. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort und Inflammation [9]. Außerdem sind sie wesentlicher Bestandteil in der Pathophysiologie von Karzinomen und Metastasierungen [10, 11]. Die Hauptaufgabe von Thrombozyten hingegen ist die Hämostase (Blutstillung). Diese wird in eine primäre und sekundäre Hämostase unterteilt.

1.1.2 Primäre und sekundäre Hämostase

Die Hämostase im Organismus soll nur dann einsetzen, wenn eine Gefäßverletzung, also eine Unterbrechung des Gefäßendothels, vorliegt. Unter physiologischen Bedingungen ist das Endothel intakt. Damit keine akzidentuelle Thrombozytenaktivierung ausgelöst wird, verhindern die Inhibitoren Prostacyclin (oder auch Prostglandin I_2 (PGI_2)) und Stickstoffmonoxid (NO) eine Aktivierung [12]. PGI_2 , durch Endothelzellen freigesetzt, bindet an den thrombozytären PGI_2 -Rezeptor (IP -Rezeptor) und führt dabei zu einem intrazellulären Anstieg des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP). NO, durch Endothelzellen und Thrombozyten freigesetzt, durchdringt die Thrombozytenmembran und führt zu einem intrazellulären Anstieg des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP). Die höheren Konzentrationen der zyklischen Nukleotide unterdrücken schließlich die Aktivierung [13].

Kommt es zur Verletzung des Endothels wird die subendotheliale extrazelluläre Matrix (EZM) mit verschiedenen Proteinen freigelegt, an denen Thrombozyten adhären können. Zu diesen Proteinen zählen verschiedene Kollagentypen, der von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibronectin, Laminin, Fibulin und Thrombospondin [14]. Außerdem werden Fibrinogen und Vitronectin, die nicht primärer Bestandteil der EZM sind, in dieser bei Gefäßschaden aus dem Plasma immobilisiert und bieten den Thrombozyten eine weitere Adhäsionsmöglichkeit [14-16].

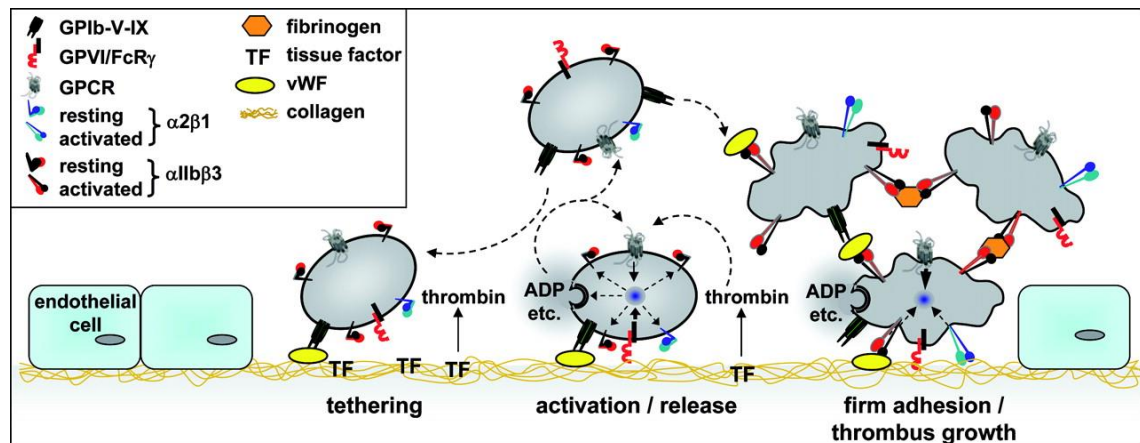


Abb. 1: Primäre Hämostase nach Gefäßverletzung. Kommt es zu einer Verletzung der Gefäßwand und damit zur Freilegung des subendothelialen Gewebes, kommt es zum *tethering*, indem der am subendothelialen EZM gebundene vWF an dem thrombozytären Glykoprotein Ib-IX-V bindet. Daraufhin kann das thrombozytäre GPII an dem subendothelialen Kollagen binden und induziert durch eine intrazelluläre Signalkaskade die Thrombozytenaktivierung. Die Folge ist eine Freisetzung von α- und δ-Granula, Aktivierung von Integrinen und Formänderung (*shape change*) der Thrombozyten. Durch Rekrutierung weiterer Thrombozyten, kommt es zur Aggregation, Thrombusbildung und damit zum Verschluss der Gefäßwand. Entnommen von: Varga-Szabo *et al.*, 2008 [18]

Zu Beginn kommt es zu einer instabilen transienten Adhäsion, dem sogenannten *Tethering* [19]. Dies wird ermöglicht, indem der an Kollagen gebundene, also immobilisierte, vWF an dem Glykoprotein Ib-IX-V-Rezeptorkomplex bindet [14, 18, 20]. Diese Verlangsamung ermöglicht das Binden von Glykoprotein VI (GPII) und Integrin α₂β₁ an das Kollagen. Damit wird die starke Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten initiiert [20, 21]. Die ausgelöste Signalkaskade von GPII führt über Phosphorylierungsschritte, unter anderem durch die Syk Tyrosinkinase, zu einer Aktivierung der Phospholipase Cγ₂ (PLCγ₂), welche wiederum Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. Dieser Mechanismus führt zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration (Ca²⁺), zu der Umstrukturierung des Zytoskeletts, zu der Degranulierung und zu der Konformationsänderung der Integrine auf der Thrombozytenoberfläche [22]. Durch eine solche Konformationsänderung

postintrazellulärer Aktivierungen gelangt das Integrin aus einem niedrigen in einen hochaffinen Zustand (genauer Hintergrund, siehe Kapitel 2.1.3) [23]. Dieser Prozess wird als „*Inside-Out Signalling*“ bezeichnet [24]. Als wichtigstes Integrin der Hämostase wird das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, auch bezeichnet als Glykoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), beschrieben, welches in der Lage ist, die RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) von Fibrinogen, Fibrin, vWF oder Fibronektin zu binden, wobei Fibrinogen als der wesentliche Ligand beschrieben wird. Durch eine Ligandenbindung an das aktive Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die zu einer irreversiblen Thrombozytenadhäsion und -aggregation führt. In diesem Zusammenhang wird von einem „*Outside-In Signalling*“ gesprochen [25]. Dieses *Outside-In Signalling* ist dabei entscheidend an der Zytoskelettumstrukturierung von Thrombozyten, dem sogenannten *shape change*, beteiligt. Neben der Integrinaktivierung induziert die GPVI vermittelte Thrombozytenaktivierung die Ausschüttung von α - und δ -Granula (Degranulierung). Hierbei kommt es zu einer Fusionierung der Granula- mit der Thrombozytenmembran über den *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*-Komplex (SNARE-Komplex) [7, 26]. Die α -Granula beinhalten primär große Polypeptide (u.a. Fibrinogen, vWF und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$), wohingegen die δ -Granula Bestandteile mit geringem Molekulargewicht (u.a. ADP, Serotonin und Calcium) beinhalten [27]. Kommt es durch die Thrombozytenaktivierung zur Degranulierung, translozieren Oberflächenproteine der Granulamembran, beispielsweise P-Selektin (CD62P) im α -Granula, an die Thrombozytenoberfläche. Damit stellt P-Selektin ein Marker für die Degranulierung aktivierter Thrombozyten dar [28]. Außerdem werden aus den Granula sekundäre Mediatoren freigesetzt, die ihrerseits intakte Thrombozyten aus dem Blutstrom aktivieren. Diese Mediatoren binden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) der Thrombozyten und können dadurch verschiedene heterotrimere G-Proteine aktivieren. Diese auto- und parakrine Aktivierung wiederum induziert den *shape change* von Thrombozyten, das „*Inside-Out-Signalling*“ und die Degranulierung. Ein sekundärer Mediator, das ADP bindet die Rezeptoren P2Y₁, der G_q -, und P2Y₁₂, der G_i assoziiert ist. Ein anderer sekundärer Mediator, Thromboxan A2 (TxA2), bindet an den TxA2 Rezeptor (TP), welcher G_q und G_{12/13} assoziiert ist [29]. Durch diese Amplifizierung werden weitere Thrombozyten aus dem Blutstrom rekrutiert und es können interthrombozytäre Vernetzungen über das Binden des aktiven Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ an den vWF oder Fibrinogen aufgebaut werden. Dies führt zur Thrombozytenaggregation [20]. Dabei entsteht ein instabiler Thrombus der anschließend durch Fibrineinlagerung im Rahmen der sekundären Hämostase stabilisiert wird [30].

Für die sekundäre Hämostase sind die sogenannten Gerinnungsfaktoren essenziell. Über eine Kaskade werden diese aktiviert und bilden einen Prothrombinasekomplex aus,

der aus dem Proenzym Prothrombin die enzymatisch aktive Serinprotease Thrombin bildet. Aus Fibrinogen spaltet Thrombin anschließend Fibrinmonomere, die dann wieder über Fibrinpolymere zu einem Fibrinnetz umgewandelt werden, das den Thrombus festigt. Dieser Prozess führt über positive Feedbackmechanismen zu einer Amplifikation der Gerinnung. Außerdem aktiviert Thrombin den Gerinnungsfaktor XIII, der die Fibrinpolymere zu einem Netz kovalent verbindet [31]. Zusätzlich ist Thrombin der stärkste Thrombozytenaktivator, indem er über eine n-terminale Abspaltung an den Protease-aktivierten Rezeptoren 1 und 4 (PAR 1 und 4) einen gebundenen Liganden freilegt, der wiederum die Signalkaskade aktiviert. Als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind die Proteine G_q , $G_{12/13}$ und G_i involviert [29, 32]. Damit allerdings keine Hyperkoagulabilität entsteht, bindet Thrombin auch an Thrombomodulin auf Endothelzellen und induziert dabei die Aktivierung von Protein C, das mithilfe von Protein S die aktivierten Gerinnungsfaktoren VIII und V inaktiviert [33]. Ein weiterer wichtiger Inhibitor der Gerinnungskaskade ist Antithrombin, welches den aktivierten Gerinnungsfaktor X und Thrombin inaktiviert [34]. Um eine Einengung oder sogar den Verschluss des Gefäßes zu verhindern, muss der Thrombus abgebaut werden. Die für den Prozess verantwortliche Serinprotease Plasmin spaltet das Fibrinnetz auf. Plasminogen wird durch den gewebspezifischen Plasminogenaktivator (tPA) oder durch den Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (Urokinase, uPA) zu Plasmin gespalten und dadurch wird die Fibrinolyse aktiviert [33].

1.1.3 Integrine der Thrombozyten

Thrombozyten bilden fünf verschiedene Integrine aus, die sich jeweils aus zwei heterodimeren Untereinheiten α und β zusammensetzen. Diese werden anhand ihrer β -Untereinheit klassifiziert. Zum einen werden die Integrine der β_1 -Familie: $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$, an die Kollagen, Fibronectin und Laminin binden können, exponiert. Zum anderen werden die der β_3 -Familie: $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_v\beta_3$ exponiert. Hierbei binden Fibrinogen, vWF, Fibronectin und Vitronectin an $\alpha_{IIb}\beta_3$. An das Integrin $\alpha_v\beta_3$ dagegen können Vitronectin und Osteopontin binden [35].

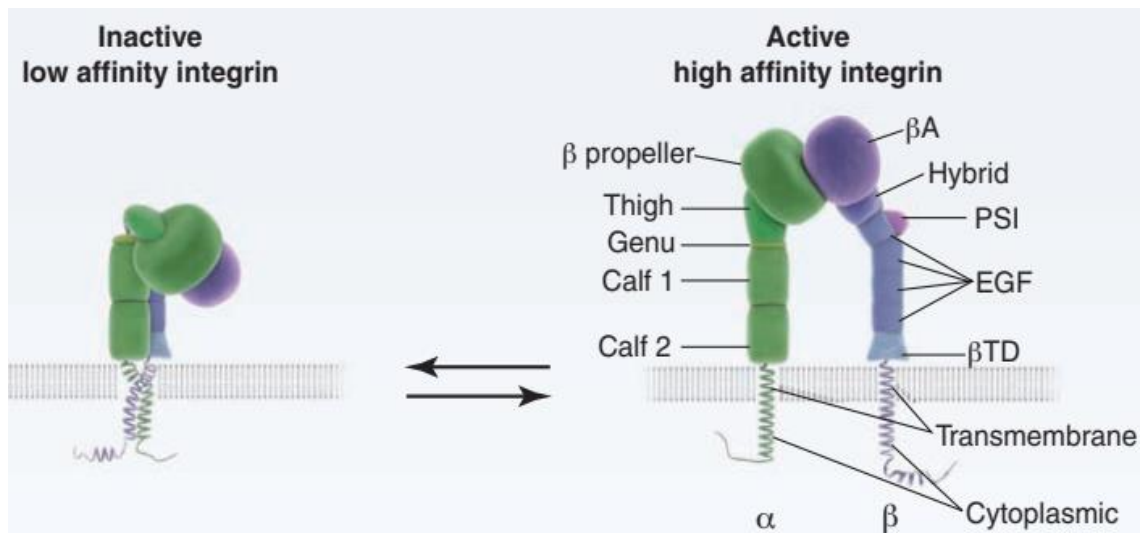


Abb. 2: Struktur und Konformationsänderung eines Integrins am Beispiel des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Das Heterodimer besteht aus einer extrazellulären, einer Transmembran- und einer zytoplasmatischen Domäne. Sofern die extrazelluläre Domäne im *Genu* (Knie) gebeugt ist, liegt es inaktiv vor. Weichen die α (grün)- und die β (blau)-Untereinheit auseinander, führt dies zur Streckung im Knie und Aktivierung des Integrins. Entnommen von: Moser *et al.*, 2009 [36]

1.1.3.1 Die Struktur der Integrine

Sowohl die α - als auch β -Untereinheiten besitzen eine extrazelluläre Domäne (ca. 800 Aminosäuren), eine Transmembran-Domäne (ca. 20 Aminosäuren) und einen zytoplasmatischen Schwanz (13-70 Aminosäuren). Alle drei Domänen regulieren die Affinität der Integrine für die einzelnen Liganden [36].

Die extrazellulären Domänen zeichnen sich durch die Bindung des Liganden aus. Hierbei ist die Stellung der Domänen relevant. Sind die extrazellulären Domänen der Untereinheiten im *Genu* „gebeugt“ so ist die Ligandenaffinität gering. Bei „Streckung“ wird die Ligandenaffinität wiederum gesteigert. Die extrazelluläre Domäne besteht aus einem *Head*, einem *Upper Leg* und einem *Lower Leg*. Am *Head* der extrazellulären Domäne binden die Liganden und zwischen dem *Upper*- und *Lower Leg* liegt das *Genu*. [35, 37]. Es ist noch unklar, in welchem Zusammenhang es zur Konformationsänderung in der extrazellulären Domäne kommt. Hierbei werden zwei Modelle diskutiert: Das *switchblade*- („Springmesser“) [38] und das *deadbolt*- („Schließriegel“) Modell [39]. Das *switchblade*-Modell geht davon aus, dass nur gestreckte Integrine Liganden binden, wobei das *deadbolt*-Modell davon ausgeht, dass die Streckung erst nach Ligandenbindung erfolgt [36, 38, 39].

Der transmembranöse Anteil verankert ein Integrin in der Zellmembran. Hierbei ordnen sich die α - und β -Untereinheiten im inaktiven Zustand reißverschlussartig an. Bei der Aktivierung der Integrine hingegen kommt es zu einer Trennung der Untereinheit [35].

Der im Zytosol liegende Teil der Integrine dient vor allem der Bindung von zytoplasmatischen Proteinen und dadurch der Aktivierung des Integrins. Die zwei wesentlichen Proteine hierbei sind das Zytoskelettprotein Talin-1 und das Adhäsionsprotein Kindlin-3. Beide können über ihre FERM (*four-point-one*, Ezrin, Radixin, Moesin)-Domäne an dem zytoplasmatischen Teil der β_3 -Untereinheit binden [35]. Wenn nun die FERM-Subdomäne F3 von Talin-1 an dem membrannahen NPLY (Asparagin, Prolin, Leucin, Tyrosin)-Motiv von β_3 bindet, führt dies zu der Unterbrechung einer Salzbrücke zwischen der α - und β -Untereinheit. Zusätzlich löst eine F2-Subdomäne von Talin-1 durch eine positiv geladene Oberfläche folgend eine Unterbrechung des heterodimeren Integrin-Transmembrankomplex aus, sodass eine Trennung der beiden Untereinheiten und ein *Inside-Out Signalling* ermöglicht wird [35, 40, 41]. Kindlin-3 bindet mit seiner FERM-Domäne ein weiter distal gelegenes NxxY(Asparagin, „nicht näher bezeichnet“, „nicht näher bezeichnet“, Tyrosin)-Motiv [35, 36]. Moser *et al.* konnten bei auftretender Kindlin-3 Defizienz schwere Blutungsstörung in Mäusen feststellen und somit Kindlin-3 eine wesentliche physiologische Funktion zusprechen. Außerdem kommt es bei Kindlin-3 Defizienz in Mäusen zu keiner starken Bindung über die Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ oder $\alpha_2\beta_1$ [42].

1.1.3.2 Signalwege der Integrine

Die Ligandenbindung an das Integrin führt zur Konformationsänderung, Clusterbildung und Induktion des *Outside-In Signalling*. Dabei bindet die durch GPCR-aktivierte $G_{\alpha 13}$ -Untereinheit an die zytoplasmatische Domäne der β_3 -Untereinheit und dies führt zur Aktivierung der Src-Familienkinasen (SFKs), im Besonderen an β_3 gebundene c-Src. C-Src vermittelt in der Folge Tyrosinphosphorylierungen der β_3 -Untereinheit. Die Tyrosin₇₄₇-Phosphorylierung reguliert die Talinbindung negativ und die Tyrosin₇₅₉-Phosphorylierung schützt vor der Spaltung durch die Protease Calpain. Beides sind wichtige Mechanismen für den *shape change* und der Thrombuskontrolle. Ein weiterer Mechanismus ist die c-Src induzierte Phosphorylierung und Aktivierung des p190 Rho GTPase aktivierendes Protein, welches RhoA inaktiviert. Diese Inaktivierung ist ein wichtiger Signalweg zur Initiierung des *shape change*. Außerdem führt aktiviertes c-Src zur Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase-Weges (PI3K) und des *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)-Weges, die ihrerseits eine wichtige Rolle in der Degranulierung der Thrombozyten spielen. [43-45]

1.1.4 Das Zytoskelett und *shape change*

Im inaktiven Zustand zirkulieren Thrombozyten diskoid im Blutstrom. Für diese Form sind die ringförmig am Rand der Plättchen angeordnete Mikrotubuli und das im Zytoplasma verteilte Aktin, welches an das Membranskelett bindet, verantwortlich [46].

Der *shape change*, also die Formveränderung, wird nach Aktivierung als der erste messbare, physiologische Schritt angesehen [47]. Die Formveränderung zeichnet sich durch eine Neuordnung der Aktinfilamente aus. Zunächst wird das Membranskelett abgebaut und daraufhin wird das kortikale Aktinfilamentnetzwerk unterbrochen. Daraufgehend wird der Aufbau neuer Aktinfilamente, die an der Plasmamembran enden, eingeleitet. Die Thrombozyten formen sich sphärisch und bilden sogenannte Filopodien aus. Im weiteren Verlauf lassen sich zeitgleich in statischen *in vitro* Versuchen Filo- und Lamellipodien beobachten. Am Ende des *shape change* zeigen sich nur noch Lamellipodien. Filopodien beschreiben finger- oder fadenförmige Ausstülpungen der Thrombozytenmembran, die aus parallel zueinander angeordneten Aktinfilamenten bestehen. Lamellipodien hingegen stellen flache wellenförmige Ausstülpung der Thrombozytenmembran dar, die aus kurzen orthogonal zueinander angeordneten Aktinfilamenten bestehen [46, 48].

Der *shape change* mit dem Prozess der Filo- und Lamellipodienausbildung ist ein Ausdruck der Kontraktion von Aktomyosin. Das nichtmuskuläre Myosin der Klasse II ist ein Dimer. Dieses wird aus zwei schweren Ketten mit je einem Paar leichten Ketten gebildet. Das reversible Binden der Myosinköpfe der leichten Ketten an das Aktin führt zu einem Kraftschlag und letztlich zur Kontraktion der Zelle. Die benötigte Energie wird durch das Hydrolysieren von Adenosintriphosphat (ATP) generiert [49, 50]. Diese ATPase-Aktivität mit der resultierenden Kontraktion wird durch das Gleichgewicht aus Phosphorylierung und Dephosphorylierung der leichten Ketten des Myosins reguliert. Die Phosphorylierung ist der initiale Schritt für die Aktivierung der Aktomyosinkontraktion [51]. Die notwendigen Signalkaskaden hierfür können in calciumabhängig und -unabhängig unterschieden werden. Durch die Thrombozytenaktivierung kommt es zum zytosolischen Anstieg der Calciumkonzentration, sodass calcium-calmodulinabhängige Komplexe Myosin-Leicht-Ketten-Kinasen (MLKK) aktivieren und diese das Serin₁₉ der leichten Ketten des Myosins phosphorylieren. Durch eine calciumunabhängige Aktivierung der Rho-Kinase (ROCK) kann diese die Myosin-Leicht-Kette phosphorylieren. Die phosphorylierte Myosin-Leicht-Kette bindet an die Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase (MLKP) und deaktiviert diese dadurch. Durch die resultierende Runterregulation der Dephosphorylierung der leichten Ketten des Myosins durch die MLKP liegen mehr phosphorylierte leichte Ketten vor [50].

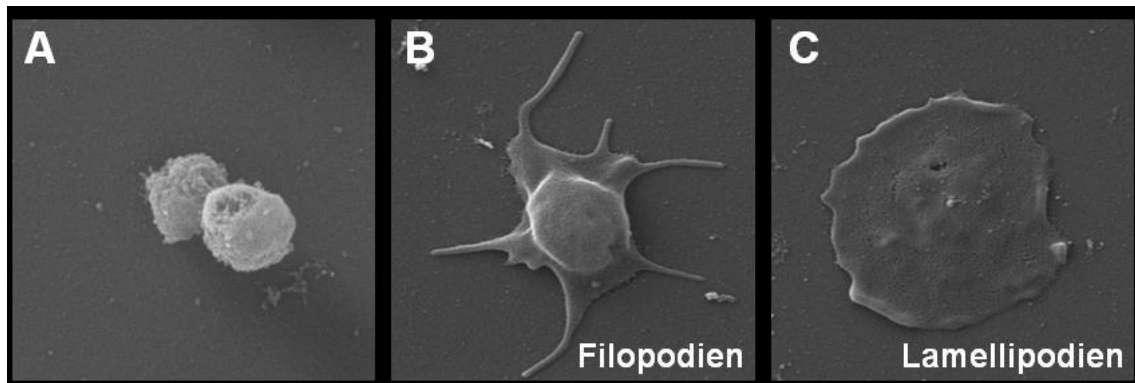


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von der Formveränderung der Thrombozyten nach Aktivierung. In Ruhe (A) liegen Thrombozyten diskoid vor. Nach erfolgter Thrombozyten-aktivierung bilden diese Filopodien (B) und Lamellipodien (C) aus. Entnommen und modifiziert von: Elvers, 2015 [52]

1.2 Abdominales Aorten Aneurysma (AAA)

Ein Aneurysma beschreibt die lokale Aussackung eines Gefäßes, welche aufgrund einer Schwächung bzw. Schädigung des Gefäßgewebes entwickelt. Wenn alle drei Wandschichten (Intima, Media, Adventitia) dilatiert sind, wird von einem Aneurysma verum gesprochen. Wenn die abdominale Aorta entweder den Durchmesser von 3 cm übersteigt oder über dem 1,5-fachen des ursprünglichen Durchmessers liegt und dem Aneurysma verum entspricht, liegt ein abdominelles Aortenaneurysma (AAA) vor [53]. Die häufigste Form des AAA ist die infrarenale (83,7 % der intakten AAA in Deutschland im Jahre 2019 [54]). Hierbei liegt das Aneurysma unterhalb der Arteriarum renalium. Seltener sind juxta- oder supraenale Aortenaneurysmata [55].

Im AAA kommt es über die Zeit durch die Krankheitsprozesse zur Schwächung der Gefäßwand. Mit zunehmender Schwächung und der damit verbundenen Dilatation nimmt der Radius der Aorta zu und die Wanddicke der Aorta ab. Dadurch kommt es zur Steigerung der Wandspannung innerhalb der Aorta. Übersteigt in der Folge die Wandspannung die eigentliche Wandstärke, so kommt es zu einer Ruptur des Aneurysmas. Eine Ruptur führt in ca. 80% der Fälle zum Tod durch Verbluten des Patienten und weist damit eine sehr hohe Letalität auf [56]. In vielen Fällen bleibt das AAA asymptomatisch, weswegen Männern über 65 Jahren und Frauen über 65 Jahren mit zusätzlicher mit Raucheranamnese ein Screening mittels sonographischer Kontrolle zur Detektion eines AAA angeboten wird. Spätestens, wenn der Durchmesser 5,5 cm übersteigt, soll eine Versorgung durch eine Operation oder endovaskulären Aneurysmareparatur (EVAR) erfolgen [53].

1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Die Prävalenz betrug in der englischen Stadt Chichester im Jahre 2002 bei Männern zwischen 65 und 80 Jahren 7,6% und bei Frauen 1,3% und war hiermit sechsmal niedriger [57]. Allerdings zeigen neuere Studien aus Schweden bei 65-jährigen Männern eine Prävalenz von 1,7%, die bei Männern zwischen 65 und 74 Jahren auf 3,3% ansteigt [58, 59]. Neben dem männlichen Geschlecht stellt die „S3-Leitlinie zu Screening, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Bauchaortenaneurysmas“ das Rauchen und das Alter als wesentliche Risikofaktoren dar [53]. Allerdings ist die Diskrepanz der Geschlechter immer geringer ausgeprägt. Die Gründe werden im vermehrten Rauchen bei Frauen und dem Östrogenmangel nach der Menopause vermutet [60]. Daneben sind noch weitere Risikofaktoren für das AAA wie z.B.: ein positive Familienanamnese, koronare Herzerkrankung, periphere arterielle Verschlusskrankheit, arterielle Hypertonie und Hypercholesterinämie bekannt [61-64]. Diabetes mellitus hingegen ist kein relevanter Risikofaktor, sondern scheint protektiv zu wirken [65].

Das rupturierte AAA ist in den USA die 15.-häufigste Todesursache und bei Männern über 55 Jahren sogar die 10.-häufigste [66]. Mit einer Letalität von 80% ist es die schwerwiegendste Komplikation des Aortenaneurysmas [67]. Hierbei gilt: je größer der Durchmesser des Aneurysmas, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Ruptur. Bei einem Durchmesser von 30 mm liegt diese Häufigkeit bei 0,5 pro 1000 Personenjahre für Männer und 2,2 für Frauen. Ab einem Durchmesser von 50 mm steigt die Häufigkeit auf 6,4 pro 1000 Personenjahre für Männer und 29,7 für Frauen. Des Weiteren erhöhen das weibliche Geschlecht, das Rauchen, ein erhöhter mittlerer Blutdruck, höheres Alter und ein geringerer BMI die Wahrscheinlichkeit für eine Ruptur [68].

1.2.2 Pathophysiologie

Das AAA ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung [56, 69, 70]. Diese ist gekennzeichnet durch die Infiltration von Immunzellen wie zum Beispiel Neutrophile Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen, natürlichen Killerzellen, T- und B-Lymphozyten [71]. Dadurch kommt es zur Elastinfragmentierung, Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells* (VSMC)), eine Erhöhung des oxidativen Stresses und Bildung eines ILT [56].

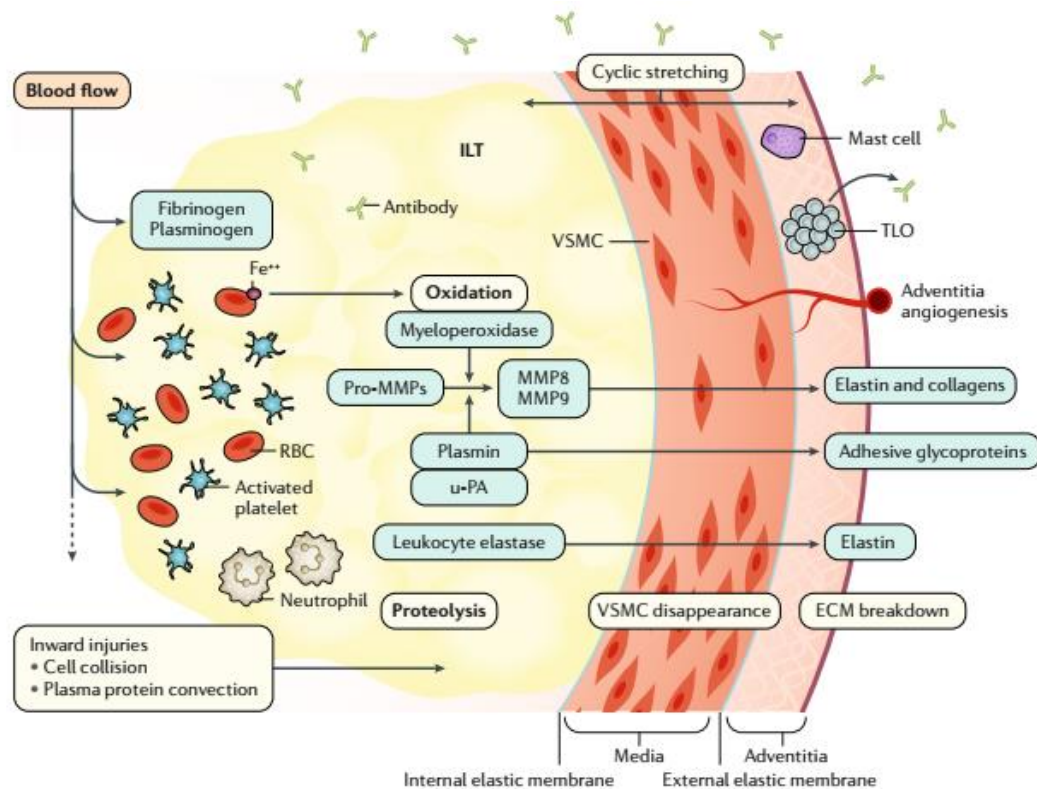


Abb. 4: Pathogenese des abdominalen Aortenaneurysmas. Die Bildung des ILT zwischen dem Blutfluss und der Aortenwand ist ein typischer Prozess. In diesem finden sich aktivierte Thrombozyten, die proinflammatorische Zytokine freisetzen und zur Rekrutierung von Immunzellen beitragen. Eingewanderte Leukozyten setzen ebenfalls Zytokine und Proteasen, wie MMPs frei. Darüber hinaus generieren Erythrozyten oxidativen Stress. Durch diesen entzündlichen Einfluss kommt es zu Degradation von Elastin, Kollagen und anderen adhäsiven Glykoproteinen. Außerdem kommt es durch Apoptose zu dem Verlust der glatten Gefäßmuskelzellen. Diese Entzündungsprozesse führen zur Erweiterung und zum Wandspannungsanstieg in der Aorta. Entnommen von: Sakalihasan *et al.*, 2018 [56]

1.2.2.1 Einwandern von Immunzellen

Die mediale Aorta ist frei von *vasa vasorum* (gefäßversorgende Gefäße) und damit nur schwer für Immunzellen zugänglich. Im AAA finden sich allerdings Prozesse der Neoangiogenese in der Adventitia bis teilweise in die Media, die den Zugang für Immunzellen ermöglichen [72, 73]. Zusätzlich ist der Zugang über den ILT gegeben, da neutrophile Granulozyten an dem Fibrin-Fibronectin-Netzwerk oder an P-Selektin von aktivierten Thrombozyten binden können. Diese inflammatorischen Zellen sind an den folgend beschriebenen Prozessen maßgeblich mitbeteiligt [73].

1.2.2.2 Elastinfragmentierung

Die EZM der Aorta besteht im Wesentlichen aus Elastin, Kollagen, Proteoglykanen und Glykoproteinen [74]. Hierbei zeigen elastische Fasern die Eigenschaft der Dehnbarkeit, wohingegen die Kollagenfasern (Typ I und III) für die Zugfestigkeit zuständig sind [75].

Bereits 1984 wurde gezeigt, dass die Elastinfragmentierung zur Dilatation und der Kollagenabbau zur endgültigen Ruptur des AAA führen [76].

Verantwortlich für diese Proteolyse der EZM sind Proteasen. Diese werden von Immunzellen freigesetzt oder gelangen als Zymogene direkt aus dem Plasma und werden aufgrund des Druckgradienten zwischen dem zirkulierenden Blut im aortalen Lumen (≥ 80 -120 mmHg) und dem interstitiellen Druck der Adventitia (10 mmHg) durch die Aortenwand konvektiert [56, 77]. Dabei sind zwei verschiedene Arten an Proteasen zu unterscheiden: Serinproteasen und Matrix-Metalloproteinasen. Zu den Serinproteasen wird unter anderem Plasmin gezählt. Das aktive Plasmin wird aus dem Vorläuferprotein Plasminogen, mithilfe der uPA und tPA gespalten. Sobald Plasmin aktiviert ist, kann es adhäsive Proteine, wie zum Beispiel Fibronectin und Fibrillin abbauen und MMPs aus deren Vorläufern aktivieren [56]. Außerdem induziert Plasmin die Anoikis der Gefäßmuskelzellen [78].

Einige MMPs sind an dem Abbau der EZM beteiligt z.B.: MMP 2, 9 und 12. Diese werden im AAA-Gewebe vermehrt exprimiert [79-81]. Zusätzlich weisen AAA-Patienten einen erhöhten MMP 9 Plasmaspiegel auf [82]. MMPs werden von *Tissue inhibitors of matrixmetalloproteinasen* (TIMP) gehemmt. TIMPs sind zwar im AAA-Gewebe erhöht, aber im Verhältnis weniger als die MMPs. Aus diesem Missverhältnis entsteht der verstärkte Abbau der EZM und damit Schwächung der Gefäßwand und Erhöhung der Gefäßsteifigkeit [83, 84].

1.2.2.3 Oxidativer Stress

Als ein weiterer wesentlicher Faktor für die Pathophysiologie wird der oxidative Stress angesehen [56]. Beispielsweise konnten in histologischen humanen AAA Präparaten im Vergleich zu benachbarten nicht aneurysmatischen Segmenten eine 2,5-fach höhere Superoxidkonzentration und eine erhöhte Aktivität der Nikotinamidadenindinukleotidphosphat(NADPH)-Oxidase festgestellt werden [85]. Grundsätzlich entsteht oxidativer Stress aus einer Dysbalance von prooxidativen Elementen, wie z.B.: der NADPH-Oxidase, Xanthinoxidase oder der mitochondrialen Atmungskette, und antioxidativen Enzymen, wie z.B.: Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Hämoxygenase, Thioredoxinperoxidase, Katalase und Paraoxonase [86]. Dabei gibt es zwei Hauptquellen des oxidativen Stresses. Zum einen die NADPH-Oxidase- und Myeloperoxidaseaktivität von Granulozyten und zum anderen zweiwertige Eisenionen, die von Erythrozyten im ILT freigesetzt werden. Die Eisenionen gelten als Katalysator für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies [56]. Aber auch das Dehnen von glatten Gefäßmuskelzellen führt zu einer gesteigerten Produktion reaktiver

Sauerstoffspezies durch die NADPH-Oxidase und zur gesteigerten Ausschüttung des MMP 2 Vorläuferproteins, pro-MMP 2 [87].

Reaktive Sauerstoffspezies sind in der Lage die Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen zu beeinflussen und die Rekrutierung von Leukozyten in die Aortenwand zu regulieren [88]. Darüber hinaus können reaktive Sauerstoffspezies MMPs aktivieren und die Apoptose der glatten Gefäßmuskelzellen induzieren [89, 90].

1.2.2.4 Der intraluminale Thrombus

In 70 bis 80 % aller AAA tritt ein ILT auf [91]. Der ILT lässt sich im Bezug zum Gefäßlumen der Aorta in drei Schichten (luminal, medial und abluminal) unterteilen [92]. In dieser Schichtung weist die luminal Schicht Thrombozyten und ein dichtes Fibrinnetzwerk auf, welches von Erythrozyten und Leukozyten durchsetzt ist [93]. Im Gegensatz dazu nimmt die Thrombusfestigkeit und -steifigkeit durch den Verlust von zellulären Bestandteilen und einer gesteigerten Fibrinolyse in der medialen und abluminalen Schicht ab [94]. Außerdem wird unter anderem ein Netzwerk aus Canaliculi gebildet, die von Makromolekülen passiert werden können [94, 95]. Der ILT ist dabei biologisch aktiv. In klinischen Studien zeigte sich eine Korrelation zwischen der Dicke des ILT und dem Durchmesser des AAA, dem Plasmaspiegel von MMPs, der Elastinfragmentierung und der Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen [92, 96, 97]. Des Weiteren führt der Thrombus, korrelierend zur eigenen Dicke, zu zunehmender Hypoxie in der aortalen Gefäßwand [98]. Unter diesen hypoxischen Bedingungen, die sich von luminal zu abluminal verstärken, kann eine vermehrte Neoangiogenese, ein größerer Anteil inflammatorischer Zellen und eine reduzierte Synthese von Tropoelastin und Kollagen durch glatte Gefäßmuskelzellen festgestellt werden [98-100].

1.3 Osteopontin

Osteopontin (OPN) ist ein Protein, welches erstmalig als Sialoprotein 1 von Franzén *et al.* im Jahre 1985 beschrieben worden ist [101]. Dieses Protein besteht aus 314 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 44 kDa bzw. 75 kDa auf, was sich durch alternatives Splicing und posttranslationale Modifikation begründen lässt. OPN besitzt viele Aspartat-, Glutamat- und Serinreste und einige Calciumbindungsstellen. In der Sekundärstruktur weist es 8 α -Helices und 6 β -Faltblätter auf [17, 102, 103]. OPN bindet mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen an verschiedene Integrine von Zellen. Die RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) von OPN ermöglicht die Bindung an die Integrine $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_8\beta_1$, und $\alpha_5\beta_1$ [104-107]. Weiter C-terminal folgt die SVVYGLR¹⁵²-Sequenz (Ser-Val-Val-Tyr-Gly-Leu-Arg) die an die Integrine $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_4\beta_7$ binden kann [108-110]. Als weitere, n-terminal der RGD-Sequenz gelegene, Aminosäuresequenz gilt die ELVTDFTDLPAT-Sequenz (Glu-Leu-Val-Thr-Asp-Phe-

[illegible]

OPN wird in verschiedenen Zellen exprimiert: Makrophagen, aktivierte T Lymphozyten, natürliche Killerzellen, neutrophilen Granulozyten, Adipozyten, Neuronen, glatten Gefäßmuskelzellen, Epithelzellen und Endothelzellen [118-121]. OPN hat Einfluss auf Entzündungsprozesse, Wundheilung, Biomineralisation, Diabetes, Krebs, Nephrolitiasis und auch kardiovaskuläre Erkrankungen [122, 123].

Bereits 2007 konnten Gollidge *et al* in AAA-Patienten einen erhöhten OPN-Plasmaspiegel feststellen. Des Weiteren korrelierte die Höhe des Plasmaspiegels

mit der Wachstumsrate kleinerer Aortenaneurysmata (Durchmesser zwischen 3 cm und 5 cm) [124]. Darauffolgend konnten Wang *et al* 2018 mittels Färbungen eine erhöhte OPN-Konzentration im Aortengewebe von AAA-Patienten im Vergleich zu gesundem aortalen Gewebe feststellen. Zusätzlich konnte Zigarettenrauch als stärkster Stimulator für die OPN-Sekretion von glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro* herausgearbeitet werden. Außerdem konnten Sie zeigen, dass regulatorische T-Lymphozyten vom Typ T_R1, die vor allem antiinflammatorisches Interleukin (IL) 10 sekretieren, im Blut von AAA-Patienten deutlich reduziert waren. *In vitro* Versuche zeigten, dass OPN auch zu einer verminderten Induktion von T_R1-Zellen führt. Durch das Blockieren von OPN konnte *in vitro* eine Reinduktion der T_R1-Zellen, die mit Homogenaten des AAAs versetzt worden sind, festgestellt werden. Somit scheint OPN zusätzlich die Immunsuppression in AAA zu beeinflussen [125].

Lai *et al* konnten 2006 *in vitro* zeigen, dass OPN über die Superoxidgenerierung und Oxylipidbildung ein parakrines Signal liefert, das die pro-MMP 9 Aktivität in mesenchymalen Zellen der Aorta erhöht [126].

OPN zeigt in humanen AAA-Gefäßwandproben eine 125-fach erhöhte *messenger ribonucleic acid* (mRNA) Gewebsexpression im Vergleich zu gesundem Gewebe und stellt damit den stärksten Faktor der in der Arbeit untersuchten Gene dar. In selbiger Studie konnten Zheng *et al.* zeigen, dass eine erhöhte Autophagozytose von glatten Gefäßmuskelzellen in AAA-Geweben besteht und konnten *in vitro* mit hemmenden OPN Antikörpern über den integrin/CD44 und p38 *mitogen activated protein* Kinase (MAPK) Signalweg die Autophagozytose von glatten Gefäßmuskelzellen aufheben [127].

In einem AAA-Mausmodell (ApoE Defizienz mit Angiotensin-II Infusion) wurde die hetero- (*OPN*^{+/-}) und homozygote (*OPN*^{-/-}) Defizienz von OPN untersucht. Hier zeigten beide Gruppen weniger atherosklerotische Plaques im Vergleich zu *OPN*^{+/+} Mäusen. Außerdem führte die Angiotensin-II Infusionen in *ApoE*^{-/-}, *OPN*^{+/+} Mäusen zu einer signifikant erhöhten CD68 mRNA Expression (Marker für Makrophagenakkumulation) in der Aortenwand im Vergleich zu *ApoE*^{-/-}, *OPN*^{+/-} Mäusen oder *ApoE*^{-/-}, *OPN*^{-/-} Mäusen. Zusätzlich zeigten sich geringere IL 12 mRNA und erhöhte IL 10 mRNA-Expressionen in der Aortenwand von *ApoE*^{-/-}, *OPN*^{-/-} Mäusen [128].

All diese beschriebenen Prozesse deuten darauf hin, dass OPN einen Einfluss auf die Rekrutierung von Immunzellen, Induktion von Inflammation und die Viabilität von Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen besitzt. Der Einfluss auf Thrombozyten wird in dieser Arbeit ermittelt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Automatischer Hämatologie-Analysator	KX-21N; Sysmex
Durchflusszytometer (FACS)	FACS Calibur; Becton Dickinson
Inkubatoren	BE300; Memmert Melag 206; neoLab
Magnetrührer	RET basic; IKA Labortechnik
Mikropipetten	peQlab, ErgoOne, Eppendorf
Mikroskop	Axio Observer D1 (invers); Zeiss
Mikroskop-Lampenmodul	HXP 120C; Zeiss
Mikroskop-Farbkamera	Axiocam 503 color; Zeiss
Mikrowelle	Panasonic; NN-E 201 WM
Objektiv (10x Vergrößerung)	A-Plan 10x/0,25 Ph1; Zeiss
Objektiv (40x Vergrößerung)	LD Plan Neofluar 40x Objektiv; Zeiss
Objektiv (100x Vergrößerung)	Plan-Apochromat Ölimmersionsobjektiv; Zeiss
pH-Meter	1.1.1.1.1 pH526; WTW
Rollmischer	RM5; CAT
Thermoschüttler	TS-100C; bioSan Themomixer comfort; eppendorf
Tischzentrifuge	D-6020; neolab
Vortex	Cenco instrumenten (Breda, Niederlande)
Waagen	AE166; Mettler Secura®; Sartorius Practum®; Sartorius
Elektrophorese Kammer	Mini-Protean Tetra System; BioRad
Elektrophorese Stromzufuhr	Power PAC HC; BioRad
Zentrifugen	2-16; Sigma 5415-C; Eppendorf 5804-R; Eppendorf

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Citratröhrchen (0,129 M Natriumcitrat)	BD Vacutainer; Becton Dickinson
Deckgläser	24x60 mm; Engelbrecht
FACS-Röhrchen	5 ml, PS, 75x12 mm; Sarstedt
Mikroreaktionsgefäße (0,2; 0,5; 1,5; 2 ml)	Sarstedt

Objektträger	76x26 mm; Engelbrecht
Pipettenspitzen (10-20; 200; 1000 µl)	TipOne
Spritzen (1; 2; 5; 10; 20 ml)	Injekt®; Braun
Stabpipetten (2; 5; 10; 25 ml)	Stripetten; Corning
Zentrifugenröhrchen (15; 50 ml)	Polypropylen conical tube; Falcon®

2.1.3 Chemikalien und Proteine

3', 3'', 5', 5'' – Tetrabromphenolsulfoxiphthalein (Bromphenolblau)	AppliChem
Acrylamid	Serva
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich
Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3)	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Apyrase 500 U	Sigma-Aldrich
Aquatex®	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Carl-Roth
Collagen related peptide (CRP)	University of Cambridge, UK
Citronensäure	Carl Roth
Destilliertes Wasser (dH_2O)	DEMI Wasser Otto Fischar
Eptifibatid	GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG
Ethanol 100 %	VWR chemicals
Fibrinogen 250 mg	Sigma-Aldrich
Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium	Sigma-Aldrich
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycerol	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Kollagen	Horm; Takeda
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Carl Roth
Molekulargewichtsmarker	Page Ruler von Thermo Fisher
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS) Pellets	Carl-Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck
D-Phenylalanyl-N-[(1s)-4-[(Z)- Amino(Imino)methyl]amino}-1- (Chloroacetyl)butyl]-L-Prolinamid Dihydrochlorid (PPACK Dihydrochlorid)	Sigma-Aldrich
Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate buffered saline</i> , PBS)	Sigma-Aldrich
Prostaglandin E1 (PGE_1)	Sigma-Aldrich
Rekombinantes humanes Osteopontin	PEPROTECH
ROTI®Histofix 4 % (Formaldehyd)	Carl Roth
ROTI®Histol	Carl Roth
SKF-Lösung	Horm®, Takeda
Thrombin (20 U/ml)	Roche
Tirofiban	Hexal
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth
Tris-HCL	Sigma-Aldrich
Tris-Base	Sigma-Aldrich
Ziegen Serum	Invitrogen

2.1.4 Puffer und Lösungen

ADP-Lösung (20 mM)	0,1 g ADP 11,7 ml PBS Mit NaOH auf pH-Wert 7,40 einstellen
Citratpuffer (10 M)	41 ml 0,1 M Tri-Natrumcitrat-Dihydrat (2,94 g/ 100 ml) 9 ml 0,1 M Citronensäure (1,92g/ 100 ml) 450 ml destilliertes Wasser → pH 6,0
Fibrinogen (2 mg/ml)	250 mg Fibrinogen 112,5 ml 0,9 %-ige NaCl in destilliertem Wasser
Humane Tyrode 1 x (zur Anwendung)	18 ml dH ₂ O 2 ml 10x Tyrode Stock 180 µl 0,1 M MgCl ₂ 200 µl 10 % Glukose pH 7,40
Humane Tyrode 10 x	1,01 g NaHCO ₃ 208,8 mg KCl 55,2 mg NaH ₂ PO ₄ 100 ml dH ₂ O
Laemmli-Puffer 4 x	8 g SDS-Pellets Tris-HCL pH 6,8 40 ml Glycerol 8 ml β-Mercaptoethanol Spatelspitze Bromphenolblau Ad 100 ml dH ₂ O
Lower buffer (500 ml)	90,885 g 1,5 M Tris Base 2,0 g 0,4 % SDS Ad 400 ml dH ₂ O → pH 8,8
PGE ₁ Stock-Lösung (15 mM)	1 mg PGE 188.1 µl Ethanol absolut
Sammelgel	3,78 ml Upper Buffer 2,25 ml Acrylamid 8,82 ml dH ₂ O 14,99 µl TEMED 149,9 µl 10 % APS
Trenngel (12 %)	7,47 ml Lower Buffer 12 ml Acrylamid 10,35 ml dH ₂ O 14,99 µl TEMED 149,9 µl 10 % APS
Upper buffer (500 ml)	30,285 g 0,5 M Tris Base 20 g 4 % SDS Ad 500 ml dH ₂ O → pH 6,8

2.1.5 Antikörper und Farbstoffe

Anti-Osteopontin Antikörper (ab8448)	abcam
Anti-Osteopontin Antikörper - N-terminal (ab181440)	abcam
Integrin $\alpha\beta_3$ monoklonaler Antikörper <i>Mouse Anti-Human</i> , Klon LM609	Millipore
CD62P <i>Mouse Anti-Human</i> (PE-gelabelt), Klon AC 1.2	BD Biosciences
DAPI 3 mg/ml	Roche
Immunglobulin G, monoklonal, ab172730, Klon EPR25A, <i>Recombinant Rabbit</i> ,	abcam
PAC1 <i>Mouse Anti-Human</i> (FITC-gelabelt)	BD Biosciences
Pierce™ Silber Färbe-Kit	Thermo Scientific™
Rhodamin-Phalloidin	Invitrogen
Sekundärantikörper, <i>goat anti-Rabbit</i> 555	Invitrogen

2.1.6 Software

Für die Auswertung und graphische Darstellung der in dieser Arbeit gezeigten Daten sowie der Erstellung von Abbildungen wurden GraphPadPrims 8, Zen (Version 2 *blue edition*) und Microsoft Office 365 (Version 18.2303.1201.1) verwendet.

2.2 Humane Proben

Alle Experimente mit humanem Gewebe und Blut wurden vorab durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geprüft und genehmigt. Die Entnahme und Analyse der Gewebeproben erfolgte ausschließlich nach erteilter Zustimmung durch die Kommission. Alle Teilnehmenden gaben vor ihrer Studienteilnahme eine schriftliche, informierte Einwilligung (Einwilligungserklärung der Patient:innen) ab.

Die folgenden Ethikvoten wurden eingeholt und genehmigt:
2018-140-KFogU,

5731R,

2018-248-FmB.

Die Studie wurde im Einklang mit den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki sowie gemäß den Richtlinien zur Guten Klinischen Praxis (*Good Clinical Practice, GCP*) der *International Council for Harmonisation (ICH)* durchgeführt.

2.3 Methoden

2.3.1 Thrombozytenisolation

Die hier verwendeten Blutproben wurden ausschließlich aus der Thrombozytenspende der Blutspendezentrale der Universitätsklinik Düsseldorf bezogen (Ethikvotum; Studiennummer.: 2018-140-KFogu). Das Blut (2 ml) wurde durch eine Armvenenpunktion in Citratröhrchen (0,129 M Natriumcitrat) entnommen. Die Isolation erfolgte bei Raumtemperatur. Die Röhrchen wurden in der Zentrifuge bei 1200 Umdrehungen/min (200 g) bei deaktivierter Bremse für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde 1 ml des plättchenreichen Plasmas (PRP) abpipettiert und in einem 15 ml Falcon mit 1 ml PBS (pH-Wert: 6,5), Apyrase (2 U/ml) und PGE₁ (1 nmol/ml) vorsichtig gemischt, um eine vorzeitige Aktivierung zu verhindern. Anschließend wurde das Gemisch bei 2300 Umdrehungen/min (850 g) bei deaktivierter Bremse für 6 min erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf das verbliebene Pellet wurden 200-400 µl humane Tyrode (1x) gegeben. Diese Mischung wurde vorsichtig resuspendiert. Nach einer 1:10 Verdünnung der Probe mit PBS wurde die Zellzahl automatisch an einem Hämatologieanalysator (Sysmex KX21N) bestimmt. Die isolierten Thrombozyten wurden bis zu den Versuchen bei 37 °C gelagert.

2.3.2 Das Fragmentieren von Osteopontin

Da OPN durch Proteasen, wie z.B.: Thrombin, Plasmin oder MMP enzymatisch fragmentiert werden kann und eben diese auch in der Pathogenese des AAAs relevant sind, fragmentierten wir OPN durch Thrombin, um einen möglichen Einfluss des fragmentierten Osteopontins (frag. OPN) zu überprüfen. Thrombin hydrolisiert OPN zwischen den Aminosäuren Arg¹⁵²-Ser¹⁵³. Für die enzymatische Fragmentierung des OPNs wurden 18 µl Ammoniumbicarbonat (0,1 M), 1 µl Thrombin (12,5 mU/µl) und 1 µl OPN (1 µg/µl) in ein Eppi gefüllt. Für das rekombinante Osteopontin (rek. OPN) wurde anstatt von Thrombin 1 µl destilliertes Wasser verwendet. Als Negativkontrolle wurde das OPN durch humane Tyrode (1x) ersetzt. Die Proben wurden für ca. 2 s zentrifugiert und anschließend bei 37 °C für 4 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde das frag. und rek. OPN direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse der Größe und Granularität einzelner Zellen in einer Flüssigkeit. Die einzelnen Zellen werden durch eine Messküvette angesaugt und dadurch separiert. Die Zellen werden in der Küvette mit Laser angestrahlt und brechen das Licht. Dadurch entstehen das Seitwärtstreulicht (*Side Scatter*; SSC), das ein Maß für die Granularität darstellt, und das Vorwärtstreulicht

(*Foward Scatter*; FSC), welches für das Volumenmaß hinzugezogen wird. Der Detektor wertet die die gestreuten Strahlen aus.

In dieser Arbeit wurden fluoreszierende Antikörper zur Detektion bestimmter Oberflächenproteinen (oder -rezeptoren) von Thrombozyten verwendet. Die verwendeten Antikörper emittieren Photonen verschiedener Wellenlänge, was eine zeitgleiche Messung der Oberflächenproteine ermöglicht.

Für die Messung am Durchflussszytometer wurden isolierte Thrombozyten, (siehe Kapitel 2.3.1), mit humaner Tyrode auf 50.000 / μ l verdünnt, verwendet. In die einzelnen FACS-Röhrchen wurden ein Antikörpermischung gegen PAC1 (Aktivierungsmarker für das aktivierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) und CD62P (Degranulierungsmarker für P-Selektin) mit je 6 μ l und ein Agonist (Endkonzentration: ADP 5 μ M, ADP 10 μ M, CRP 0,1 μ g/ml, CRP 1 μ g/ml oder CRP 5 μ g/ml) mit je 3 μ l vorgelegt. Je nach Versuch wurden die isolierten und verdünnten Thrombozyten mit frag. (Endkonzentration: 1 μ g/ml) oder rek. OPN (Endkonzentration: 1 μ g/ml oder 10 μ g/ml) gemischt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die FACS-Röhrchen wurden mit 21 μ l des Thrombozytengemisches auf 30 μ l aufgefüllt. Die 30 μ l Emulsion wurde dunkel für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion mit 300 μ l PBS abgestoppt. Vor jeder Messung wurde die jeweilige Probe kurz gevortext. Am Durchflussszytometer wurden jeweils 10.000 positive Ereignisse gemessen. Für die Datenauswertung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (engl. *Mean fluorescence intensity*; MFI) herangezogen.

2.3.4 Adhäsionsversuche

2.3.4.1 Adhäsion isolierter Thrombozyten auf immobilisiertem Osteopontin

Für die Adhäsion auf immobilisiertem OPN wurden am Vortag das frag. und rek. OPN (siehe Kapitel 2.3.2) vorbereitet. Dem frag. OPN (1 μ g/20 μ l) wurden pro 20 μ l 1 μ l PPACK (Endkonzentration: 1,52 nmol/ml) hinzugefügt, um in 8 min Inkubationszeit das Thrombin abzufangen. Thrombin sollte vorher abgefangen werden, weil es ein Agonist für Thrombozyten ist. Danach wurde das frag. und rek. OPN mit PBS auf 200 μ l aufgefüllt (Endkonzentration: 5 μ g/ml). Nun konnten als Adhäsionsmatrizen 1%-iges BSA, 100 μ g/ml Fibrinogen, das fragmentierte und rek. OPN mit je 60 μ l auf Deckgläser pipettiert werden. Die Matrizen wurden über Nacht bei 4 °C adhärirt. Am nächsten Tag wurden die überschüssige Lösung abgekippt und die Deckgläschen mit je 100 μ l 1%-igem BSA für 1 h blockiert. Die Thrombozyten wurden nach dem obenstehenden Protokoll (siehe Kapitel 2.3.1) isoliert und mit humaner Tyrode (1x) auf 40.000 / μ l verdünnt. Für die Stimulation der Thrombozyten wurden die Agonisten ADP (Endkonzentration 5 μ M) und CRP (Endkonzentration 1 μ g/ml) verwendet. Für die Adhäsion unstimulierter Thrombozyten wurde das Volumen der Agonisten durch humane Tyrode (1x) ersetzt.

Die vorbereiteten Proben (Thrombozyten mit ADP, CRP oder humaner Tyrode) wurden mit je 70 μl auf die einzelnen Matrizen pipettiert und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend konnten die Thrombozyten ohne Färbung eingedeckt werden (siehe Kapitel 2.3.4.3). Für die Zytoskelettdarstellung wurde allerdings die Färbung mit Rhodamin Phalloidin durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.4.4).

2.3.4.1.1 Präinkubation mit Tirofiban

Um eine mögliche Bindung von OPN an das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ zu überprüfen, ist der Inhibitor des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ Tirofiban verwendet worden. Die Versuche sind, wie bereits in Kapitel 2.3.4.1 erläutert, durchgeführt worden. Allerdings wurde auf die Beschichtung mit frag. OPN verzichtet. Zusätzlich wurden die isolierten Thrombozyten (Endkonzentration: 40.000 / μl) mit Tirofiban (Endkonzentration: 1 μg pro $1 \cdot 10^6$ Thrombozyten) oder mit humaner Tyrode als Kontrolle versetzt und für 15 Minuten bei 37 °C präinkubiert. Anschließend folgte wiederum die Aktivierung durch ADP (Endkonzentration 5 μM) und CRP (Endkonzentration 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und für die unstimulierten Proben wurde humane Tyrode (1x) verwendet. Ohne Färbung (Kapitel 2.3.4.3) sind die Deckgläser eingedeckt und Aufnahmen unter dem Mikroskop angefertigt worden.

2.3.4.1.2 Präinkubation mit Eptifibatid

Ein weiterer Inhibitor des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ist Eptifibatid. Die Versuche sind nach dem in Kapitel 2.3.4.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt worden. Allerdings wurden die isolierten Thrombozyten (Endkonzentration: 20.000 / μl) mit Eptifibatid (Endkonzentration: 20 μM) oder humane Tyrode (1x) als Kontrolle, für 30 Minuten bei 37 °C präinkubiert. Nach Aktivierung mit ADP (Endkonzentration 5 μM) oder CRP (Endkonzentration 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. unstimuliert mit humaner Tyrode konnten die Deckgläser mit Färbung (siehe Kapitel 2.3.4.4) eingedeckt und Aufnahmen unter dem Mikroskop angefertigt werden.

2.3.4.1.3 Präinkubation mit dem Antikörper LM 609

Ein weiteres Integrin, an dem OPN bindet, ist das Integrin $\alpha_v\beta_3$. Auch hier wurde ein Inhibitor verwendet: der monoklonale Antikörper LM 609. Die Versuche sind nach dem Kapitel 2.3.4.1 durchgeführt worden. Der Antikörper LM 609 (Endkonzentration: 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder die Kontrolle mit humaner Tyrode sind mit Thrombozyten (Endkonzentration 20.000 / μl) für 30 Minuten bei 37 °C präinkubiert worden. Nach Aktivierung mit ADP (Endkonzentration 5 μM) oder CRP (Endkonzentration 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. unstimuliert mit humaner Tyrode konnten die Deckgläser mit Färbung (siehe Kapitel 2.3.4.4) eingedeckt und Aufnahmen unter dem Mikroskop angefertigt werden.

2.3.4.2 Adhäsion der mit löslichem Osteopontin inkubierten Thrombozyten auf Kollagen

Am Vortag wurden einzelne Deckgläser mit 60 µl 1-%igem BSA oder 200 µg/ml Kollagen (verdünnt in einer SKF-Lösung) bei 4 °C über Nacht beschichtet. Am darauffolgenden Tag konnte die überschüssige Lösung abgekippt werden und die Deckgläser wurden mit 100 µl 1-%iges BSA bei Raumtemperatur 1 h blockiert. Die Thrombozyten wurden isoliert (siehe Kapitel 2.3.1) und mit humaner Tyrode verdünnt, sodass 40.000 Thrombozyten /µl in der Endkonzentration auf die Deckgläser gegeben werden konnten. Die Thrombozyten wurden entweder mit frag. (Endkonzentration: 1 µg/ml) oder rek. OPN (Endkonzentration: 1 oder 10 µg/ml) bzw. zur Kontrolle mit humaner Tyrode gemischt. Diese wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die präinkubierten Thrombozyten wurden mit je 70 µl für 5 bzw. 20 min bei 37 °C auf die Deckgläser gegeben. Anschließend wurden die Proben weiterbehandelt. Die Proben mit rek. OPN mit der Endkonzentration von 1 µg/ml sind ohne (siehe Kapitel 2.3.4.3) und die Proben mit frag. (Endkonzentration 1 µg/ml) und rek. OPN (Endkonzentration 10 µg/ml) sind mit der Phalloidininfärbung (siehe Kapitel 2.3.4.4) eingedeckt worden.

2.3.4.3 Adhäsion ohne Phalloidininfärbung

Die Behandlung auf den Deckgläsern wurden abgekippt und dreimal mit 100 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die adhärenenten Thrombozyten auf den Deckgläsern mit je 100 µl 1%iger Formaldehyd-Lösung für 10 min bei 4 °C fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 100 µl PBS wurden die Deckgläser mit Aquatex eingedeckt und bei 4 °C in Dunkelheit gelagert.

2.3.4.4 Adhäsion mit Phalloidininfärbung

Die Behandlung auf den Deckgläsern wurden abgekippt und dreimal mit je 100 µl PBS abgespült. Danach wurden die Thrombozyten auf den Deckgläsern mit 100 µl 4%-iger Formaldehyd Lösung bei Raumtemperatur für 10 min fixiert. Anschließend wurden diese mit 80 µl 0,5%-iger Triton-X100 (in 0,5%-iger BSA-Lösung) bei Raumtemperatur für 10 min permeabilisiert. Nach zweimaligen Spülen mit je 100 µl PBS wurden je 50 µl Rhodamine Phalloidin (1:400 Verdünnung mit PBS) auf die Deckgläser gegeben und bei Raumtemperatur für 35 min in Dunkelheit inkubiert. Nach der Färbung wurden die Deckgläschen dreimal mit 100 µl PBS abgewaschen, mit Fluormount eingedeckt und bei 4 C in Dunkelheit gelagert.

2.3.4.5 Auswertung der Adhäsion

Es wurden pro Behandlung mindestens fünf repräsentative Aufnahmen mit Differentialinterferenzkontrast (*differential interference contrast; DIC*) und, bei Verwendung der Phalloidininfärbung zusätzlich, im Cy3-Fluoreszenzkanal bei 555 nm

Wellenlänge am Mikroskop angefertigt. Für die Aufnahmen mit Ausnahme der Zytoskelettaufnahmen, ist die 400-fache Vergrößerung mit dem LD Plan Neofluar 40x Objektiv (numerische Aperatur 0,6) gewählt worden. Die Zytoskelettaufnahmen erfolgten in 1000-facher Vergrößerung mit dem Plan-Apochromat Ölimmersionsobjektiv (numerische Apertur 1,4). Die Anzahl der Thrombozyten sind auf den fünf aufgenommenen repräsentativen Bildern ausgezählt worden. Aus dieser Anzahl ist dann der Mittelwert ermittelt worden, der anschließend in die weitere Auswertung eingeflossen ist.

2.3.5 SDS- Page

Die Sammel- und Trenngele (12%) wurden vorbereitet und in die Kammern gegossen. Diese härteten über 30 min aus. Die Osteopontinfragmentierung wurde für 3 und 24 h mit den Thrombinkonzentrationen: 30 mU/μl, 12,5 mU/μl, 1 mU/μl, 500 μU/μl, 50 μU/μl, 1 μU/μl durchgeführt. Anschließend sind 20μl der einzelnen Aliquots mit 6μl des Laemmlipuffers (vierfach konzentriert) zusammengemischt worden. Nach der Denaturierung für 5 min bei 95°C konnten die einzelnen Proben in die Taschen des Sammelgels pipettiert werden. Zusätzlich wurde 1 μl eines Molekulargewichtsmarkers auf das Gel aufgetragen. Bei 120 V Spannung lief das SDS-Gel über ca. 75 Minuten, um die Proben aufzutrennen. Anschließend wurde das Gel den Glasscheiben entnommen und konnte in destilliertem Wasser gelagert werden. Anschließend konnte eine Silberfärbung durchgeführt werden (siehe Kaptiel 2.3.6).

2.3.6 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde mit Hilfe des Silver Stain Kits von Thermo Fischer® durchgeführt. Hierfür wurde das Gel zweimal für 5 min im destillierten Wasser geschwenkt. Anschließend wurde das Gel zweimal für je 15 min in einer Lösung (30%igen Ethanol, 10%ige Essigsäure in destilliertem Wasser) fixiert. Darauf folgten Inkubationsschritte für zweimal 5 min in einer vorbereiteten Lösung (10%iger Ethanol in destilliertem Wasser) und zweimal 5 min in destilliertem Wasser. Das Gel wurde mit der vorbereiteten Sensitizer Working Solution (50 μl Sensitizer-Lösung auf 50 ml Wasser) für 1 min inkubiert und anschließend zweimal jeweils 1 min lang mit destilliertem Wasser abgewaschen. Danach folgte eine Inkubation in der *Stain Working Solution* (0,5 ml *Silver Stain Enhancer* in 25 ml *Silver Stain*) für 30 min. Darauf folgten zweimal für 20 s das Waschen in destilliertem Wasser. Für den Entwicklungsschritt inkubierten die Gele in der *Developer Working Solution* (0,5 ml *Silver Stain Enhancer* in 25 ml *Silver Stain Developer*) für ca. 2-3 min, bis die Proteinbanden erschienen. War der gewünschte Kontrast vorhanden, konnte die Stopplösung (5%ige Essigsäure in destilliertem Wasser) für einige Sekunden inkubieren und wurde dann ausgetauscht, um für weitere 10 min zu

inkubieren. Die Gele konnten dann in destilliertem Wasser gelagert werden. Von den Gelen wurden anschließend Fotoaufnahmen mit einer Smartphonekamera angefertigt.

2.3.7 Immunfluoreszenzfärbung von Osteopontin in den abdominalen Aortenwänden von Aneurysmapatienten

Um OPN in humanen AAA nachzuweisen, sind Proben aus der Biobank der Gefäßchirurgie aus der Uniklinik Düsseldorf verwendet worden (Ethikvotum; Studiennummern: 5731R; 2018-248-FmB). Hierbei handelte es sich um drei Patientenproben, die jeweils bei einer Operation eines AAA per Laparotomie versorgt wurden. Die vorher bereits paraffinierten und 5 µm dick geschnittenen Proben wurden über Nacht bei 37 °C hitzefixiert und anschließend entparaffiniert. Hierfür wurden die Schnitte für 10 min in ROTI®Histol gegeben und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Dafür sind die Schnitte für je 2 min in 100 %-igem Ethanol, 2 min in 96 %-igem Ethanol, 2 min in 70 %-igem Ethanol und kurz in destilliertes Wasser gegeben worden. Anschließend konnte die Antigendemaskierung stattfinden. In einem Citratpuffer (0,1 M) wurden die Schnitte für 5 min bei 360 W in einer Mikrowelle aufgeköcht und für weitere 5 min bei 95 °C weiter erhitzt werden. Anschließend wurden die Schnitte in 5%-igem Ziegenserum mit 0,3 %-igem Triton X-100 (in PBS) für 90 min blockiert. Nach der Blockierung wurden die Schnitte mit einem Primärantikörper (Endkonzentration: 20 µg/ml) in 1 % BSA über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Primärantikörper wurde ein Immunglobulin G und ein Anti-Osteopontin-Antikörper (AB 181440), der n-terminal bindet, verwendet. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte mit PBS dreimal gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper *Goat Anti-Rabbit* 555, (in 1%-igem Ziegenserumin, mit 0,3 %-igem Triton X-100 in PBS), in einer Verdünnung von 1:100, für 1 h bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Darauf folgten erneut dreimalig das Waschen mit PBS. Zusätzlich wurden die Zellkerne im Gewebe mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) in einer 1:3000 Verdünnung mit 1%-igem Ziegenserum und 0,3 %-igem Triton X-100 (in PBS) für 5 min angefärbt. Erneut wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte mit Fluormount eingedeckt und bei 4 °C dunkel gelagert. Hierfür wurden pro Behandlung Aufnahmen mit Differentialinterferenzkontrast (*differential interference contrast; DIC*) und für die Osteopontinfärbung in Cy3-Fluoreszenzkanal mit 555 nm Wellenlängen und im DAPI Fluoreszenzkanal mit 358 nm Wellenlänge mit 100-facher Vergrößerung mit dem A-Plan 10x/0,25 Ph1 Objektiv angefertigt.

2.3.8 Statistische Auswertung

Zur graphischen Darstellung der Daten werden Standardfehler (engl. *Standard error of the mean*; SEM) als Fehlerbalken gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen den

Mittelwerten verschiedener Daten wurden mittels *Two-way ANOVA* ermittelt. Die Kennzeichnung erfolgte nach den folgenden Signifikanzniveaus:

0,05 bis 0,01: * (signifikant)

0,01 bis 0,001: ** (hoch signifikant)

0,001 bis 0,0001: *** (sehr hoch signifikant)

< 0,0001: **** (extrem hoch signifikant)

3 Ergebnisse

3.1 Thrombin hydrolysiert Osteopontin

Da OPN durch verschiedene Proteasen hydrolysiert werden kann und unter anderem Thrombin im ILT des AAA vorkommt, sollte auch der Einfluss des durch Thrombin fragmentiertes OPN auf Thrombozyten evaluiert werden [113, 129]. Um eine minimale Thrombinkonzentration, die das verwendete OPN komplett fragmentieren kann, zu verwenden, ist ein SDS-Page mit anschließender Silbernitratfärbung durchgeführt worden. Hierbei zeigte sich bei der Lösung mit rek. OPN-Banden zwischen 60-65 kDa, was dem Molekulargewicht von OPN entspricht. Bei Verwendung von 30 und 12,5 mU Thrombin erscheint in diesem Bereich keine Bande, aber dafür zwischen 25 und 35 kDa, was auf das frag. OPN hinweist. Beim Verwenden von 1 mU oder 500 μ U Thrombin zeigen sich Banden im Bereich von 65 kDa sowie zwischen 25 und 35 kDa. Dies weist auf das Vorliegen von sowohl fragmentiertem als auch rekombinantem OPN hin. Die geringeren Thrombinkonzentrationen (1 oder 50 μ U) führen dagegen nicht zu einer Fragmentierung des OPN. Diese Ergebnisse zeigen sich unabhängig von der Inkubationszeit von 3 bzw. 24 Stunden. (siehe **Abb. 6**)

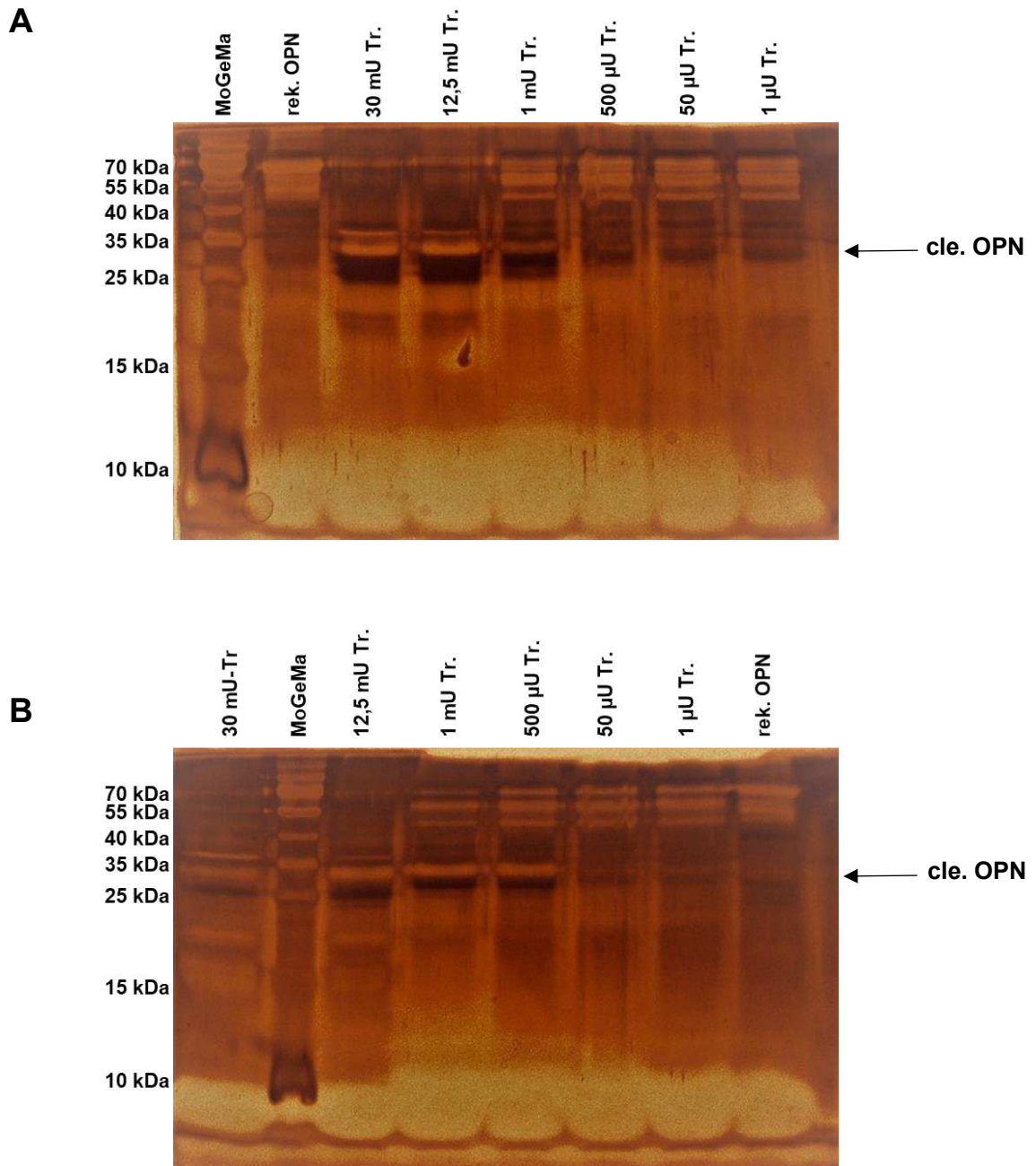


Abb. 6: Osteopontinfragmentierung mittels Thrombin. Um OPN zu hydrolysieren, ist Thrombin verwendet worden. Hierfür wurde OPN und Thrombin in verschiedenen Konzentrationen (1 µU, 50 µU, 500 µU, 1 mU, 12,5 mU und 30 mU) für 3h (**A**) und 24 h (**B**) bei 37 °C inkubiert. Die OPN-Fragmentierung wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Silbernitratfärbung analysiert.

3.2 Osteopontin(nachweis) in der abdominalen Aortenwand von Aneurysmapatienten

Das Vorhandensein von OPN in den Gefäßwänden des AAA ist die Grundvoraussetzung für einen möglichen Einfluss von immobilisiertem OPN auf Thrombozyten in dieser Pathologie. Daher wurden histologische Paraffinschnitte von offen operierten Patienten mit eben dieser Erkrankung auf OPN gefärbt. Mithilfe dieser Färbung konnte OPN in den Schnitten nachgewiesen werden. Es verteilt sich gleichmäßig über die Media (links unten) bis in die Adventitia (rechts oben). Die Intima und der ILT sind nicht sichtbar, da diese im Rahmen der Operation „ausgeschält“ werden. (siehe **Abb. 7**)

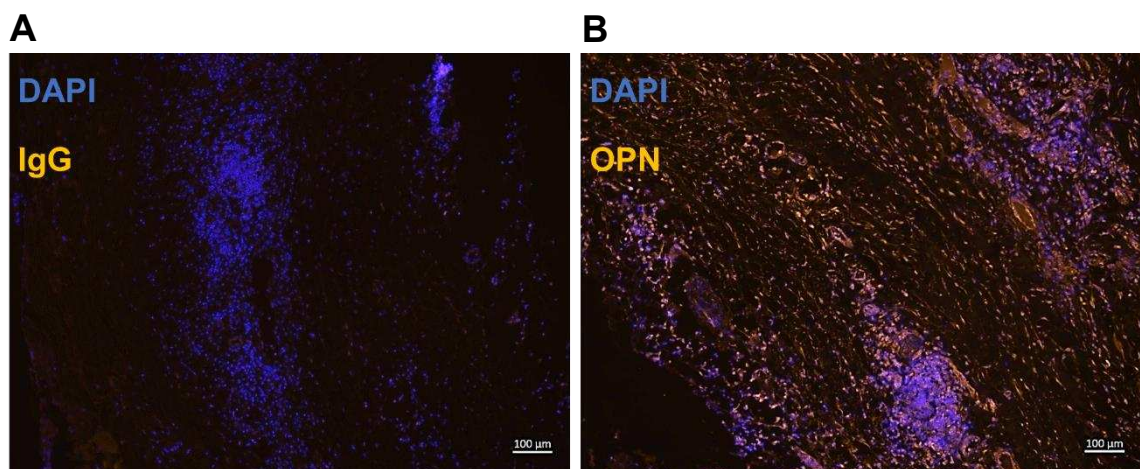


Abb. 7: Nachweis von OPN in Gefäßwänden von AAA-Patienten. Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von Paraffinschnitte eines Kontrollantikörper (IgG; **A**) oder dem Osteopontinantikörper (AB 181440; **B**; orange) und mit DAPI markierte Zellkerne (blau). (n=3)

3.3 Osteopontin zeigt keinen Einfluss auf die Aktivierung humaner Thrombozyten

Da OPN nicht nur in der aneurysmatischen Aortenwand, sondern auch im Blutplasma von AAA-Patienten nachweisbar ist, ist die Aktivierung der Thrombozyten unter Einfluss von löslichem frag. oder rek. OPN überprüft worden [124]. Zur Messung des Aktivierungsgrades von humanen Thrombozyten nach Zugabe von Agonisten wie ADP oder CRP kann die Durchflusszytometrie verwendet werden. Als Marker für die Aktivierung von Thrombozyten können die Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung und die Exposition von P-Selektin bestimmt werden. Für den Einfluss von OPN auf die Aktivierung wurden im Folgenden isolierte humane Thrombozyten mit rek. und frag. OPN vorbehandelt und anschließend mit ADP oder CRP in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung über einen PAC-1 Antikörper (bindet ausschließlich an aktiviertes Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) und der P-Selektin Exposition (Degranulierungsmarker) mit einem Antikörper gegen P-Selektin (CD62P). Abbildung **8A** stellt den Effekt von 1 $\mu\text{g/ml}$ rek. OPN auf unstimulierte bzw. aktivierte Thrombozyten dar. Die Behandlung der Thrombozyten mit rek. OPN zeigt keinen signifikanten Unterschied, weder in der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung noch der P-Selektin Exposition, zu jeweiligen Kontrolle. Dies ist sowohl für unstimulierte Thrombozyten, sowie nach Aktivierung durch ADP bzw. CRP zu beobachten. Auch die Behandlung mit 10 $\mu\text{g/ml}$ rek. OPN (siehe **Abb. 8B**) zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Thrombozytenaktivierung. Der Versuch unter Behandlung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ frag. OPN zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (siehe **Abb. 8C**).

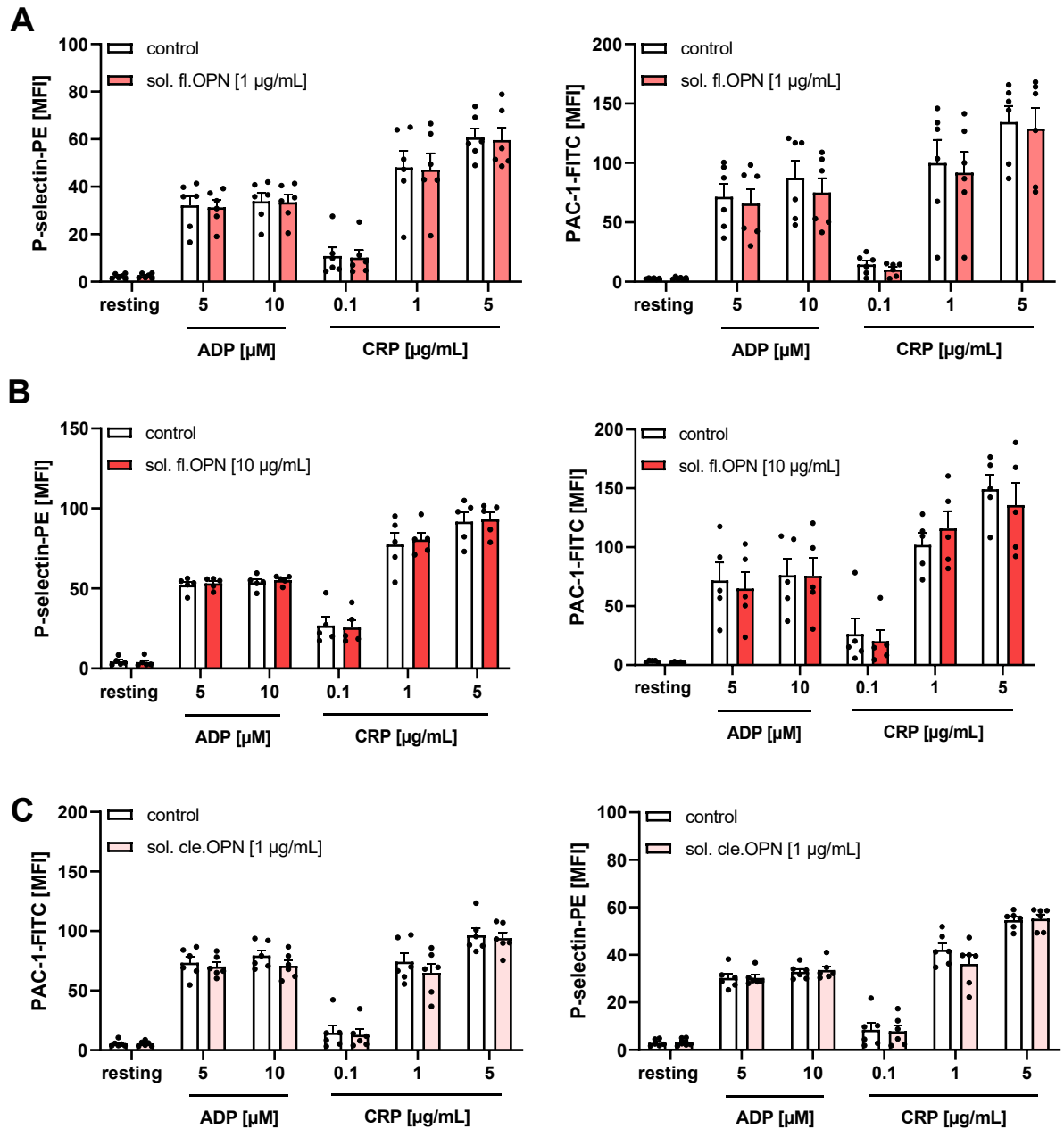


Abb. 8: Einfluss von Osteopontin auf die Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ Aktivierung und Degranulierung von humanen Thrombozyten nach Stimulation. Isolierte humane Thrombozyten wurden mit rek. (**A** 1 $\mu\text{g/ml}$ bzw. **B** 10 $\mu\text{g/ml}$), bzw. frag. (**C** 1 $\mu\text{g/ml}$) OPN für 15 min vorbehandelt. Als Kontrolle diente humane Trypse. Anschließend wurden die vorbehandelten Thrombozyten für 15 min mit ADP (5 μM bzw. 10 μM) oder CRP (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ oder 5 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Die Thrombozytenaktivierung wurde über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des PAC-1-FITC Antikörpers ermittelt (bindet spezifisch an aktiviertes Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$). Die Thrombozytendegranulierung wurde über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des P-Selektin-PE Antikörpers bestimmt (Degranulierungsmarker). Balkendiagramme zeigen den Mittelwert $\pm$ SEM (A und C: n=6; B: n=5); Two-way ANOVA. Post-hoc-Test: Tukey. **A** und **C** entnommen von: Wagenhäuser et al., 2024 [130].

3.4 Stimulierte humane Thrombozyten adhärieren auf immobilisiertem Osteopontin

Um die Adhäsionsfähigkeit von humanen Thrombozyten auf OPN zu überprüfen, wurden Adhäsionsversuche durchgeführt. Hierbei sind Deckgläser mit 5 µg/ml rek. oder frag. OPN, 100 µg/ml Fibrinogen (positive Kontrolle) oder, bei unstimulierten Thrombozyten (negative Kontrolle) zusätzlich mit 1%-igem BSA beschichtet worden. Anschließend wurden die isolierten Thrombozyten nicht oder mit 5 µM ADP oder 1 µg/ml CRP aktiviert. Zeigen sich im unstimulierten Zustand noch wenige Thrombozyten auf immobilisiertem OPN adhäsiv, so führt eine Stimulation der Thrombozyten zu einer gesteigerten Adhäsion. Dabei zeigen sich die Stimulationen durch ADP auf rek. OPN und auf frag. OPN signifikant ausgeprägter. Im Vergleich zu unstimulierten Thrombozyten zeigt ebenfalls die Aktivierung durch CRP sowohl auf rek. als auch auf frag. OPN eine signifikante Erhöhung auf. Unstimulierte Thrombozyten, die auf mit Fibrinogen beschichteten Deckgläsern gegeben werden, zeigen im Vergleich zu den anderen Behandlungen eine starke Adhäsion (jeweils $p > 0,0001$). Die zusätzlichen Aktivierungen durch 5 µM ADP oder 1 µg/ml CRP führen bei der Thrombozytenadhäsion auf mit Fibrinogen beschichteten Deckgläsern im Vergleich zu unstimulierten Thrombozyten zu keiner signifikant verstärkten Adhäsion (jeweils $p > 0,9999$) (siehe **Abb. 9A**)

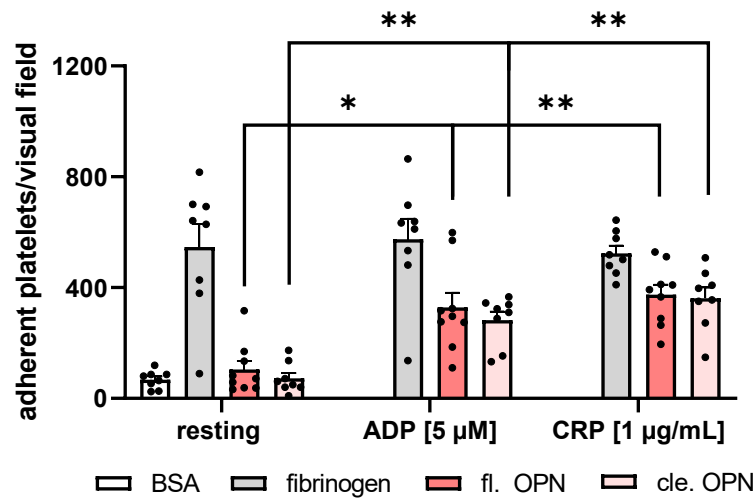
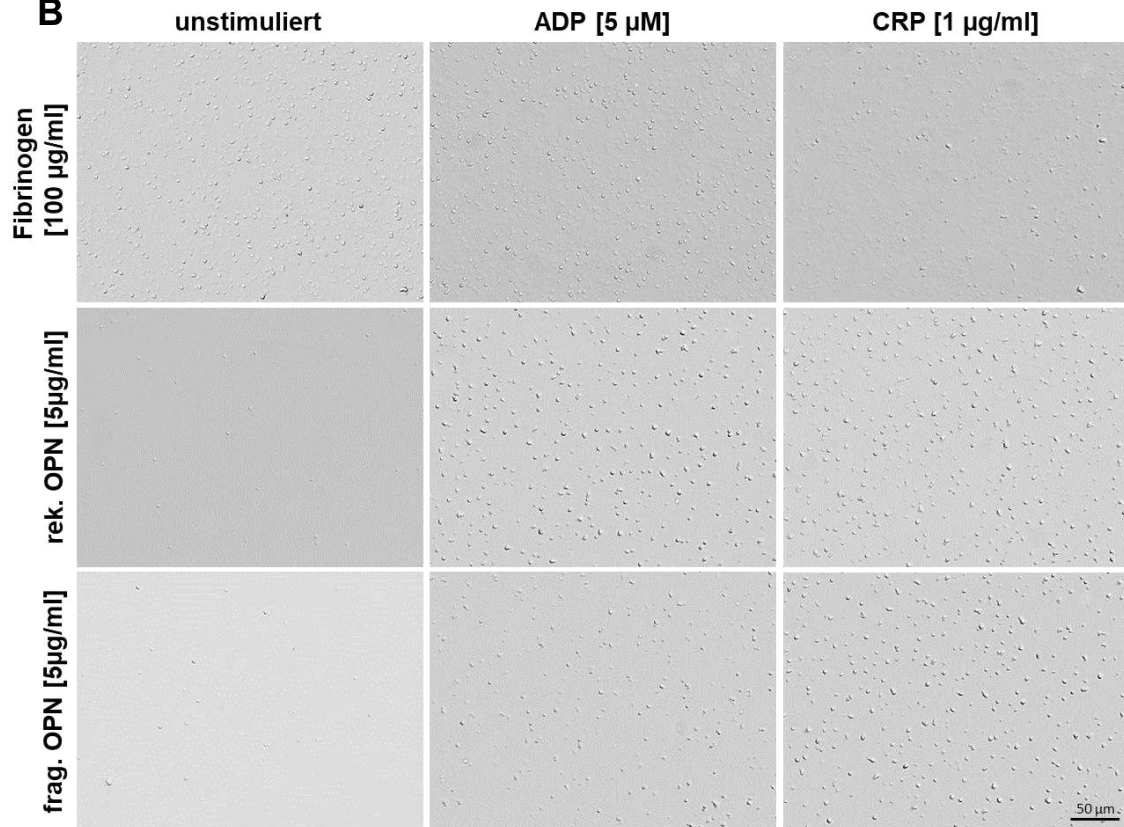
A**B**

Abb. 9: Einfluss von immobilisiertem Osteopontin auf die Adhäsion von humanen Thrombozyten. **A** Die Deckgläser wurden mit frag. oder rek. OPN (Konzentration jeweils 5 µg/ml), 100 µg/ml Fibrinogen oder 1-%igem BSA beschichtet. Isolierte humane Thrombozyten wurden unstimuliert oder mit ADP (5 µM) bzw. CRP (1 µg/ml) für 30 min bei 37 °C auf den Deckgläsern inkubiert. Anschließend wurden DIC-Aufnahmen in 400-facher Vergrößerung angefertigt und die Anzahl der Thrombozyten pro Bildfeld bestimmt. **B** Repräsentative DIC-Aufnahmen der Thrombozytenadhäsion (Thrombozyten auf OPN-Matrix: siehe Anhang). Balkendiagramme zeigen den Mittelwert ± SEM (n=8). Two-way ANOVA, Post-hoc-Test: Tukey. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. A entnommen von: Wagenhäuser et al., 2024 [130]

3.4.1 Einfluss des thrombozytären Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf die Adhäsion humaner Thrombozyten auf Osteopontin

Um eine mögliche Bindung von immobilisiertem OPN an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf der Thrombozytenoberfläche zu überprüfen, wurden humane Thrombozyten vor der Aktivierung mit Tirofiban oder Eptifibatid, zwei Inhibitoren des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, vorbehandelt.

3.4.1.1 Verstärkte Adhäsion humaner Thrombozyten auf immobilisiertem Osteopontin nach Präinkubation mit Tirofiban

Die Behandlung von Thrombozyten mit Tirofiban ermöglicht eine Inhibition des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$. Es ist ein peptidomimetisches Analogon des Tyrosins, das auf der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) basiert [131]. Damit bindet es an die β_3 Domäne und *loops*, die durch den Komplex der α_{IIb} - und β_3 -Domänen am Integrinkopf gebildet werden [132]. Zunächst wurde der Effekt auf rek. OPN geprüft. Hierbei zeigt die Behandlung mit Tirofiban bei unstimulierten Thrombozyten keine Änderung der Adhäsion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf der rek. Osteopontinmatrix. Im Gegensatz dazu zeigt sich durch die Tirofibanbehandlung und Agonistenzugabe eine signifikante Steigerung der adhäsiven Thrombozyten im Vergleich zu den unbehandelten Thrombozyten (siehe **Abb. 10**).

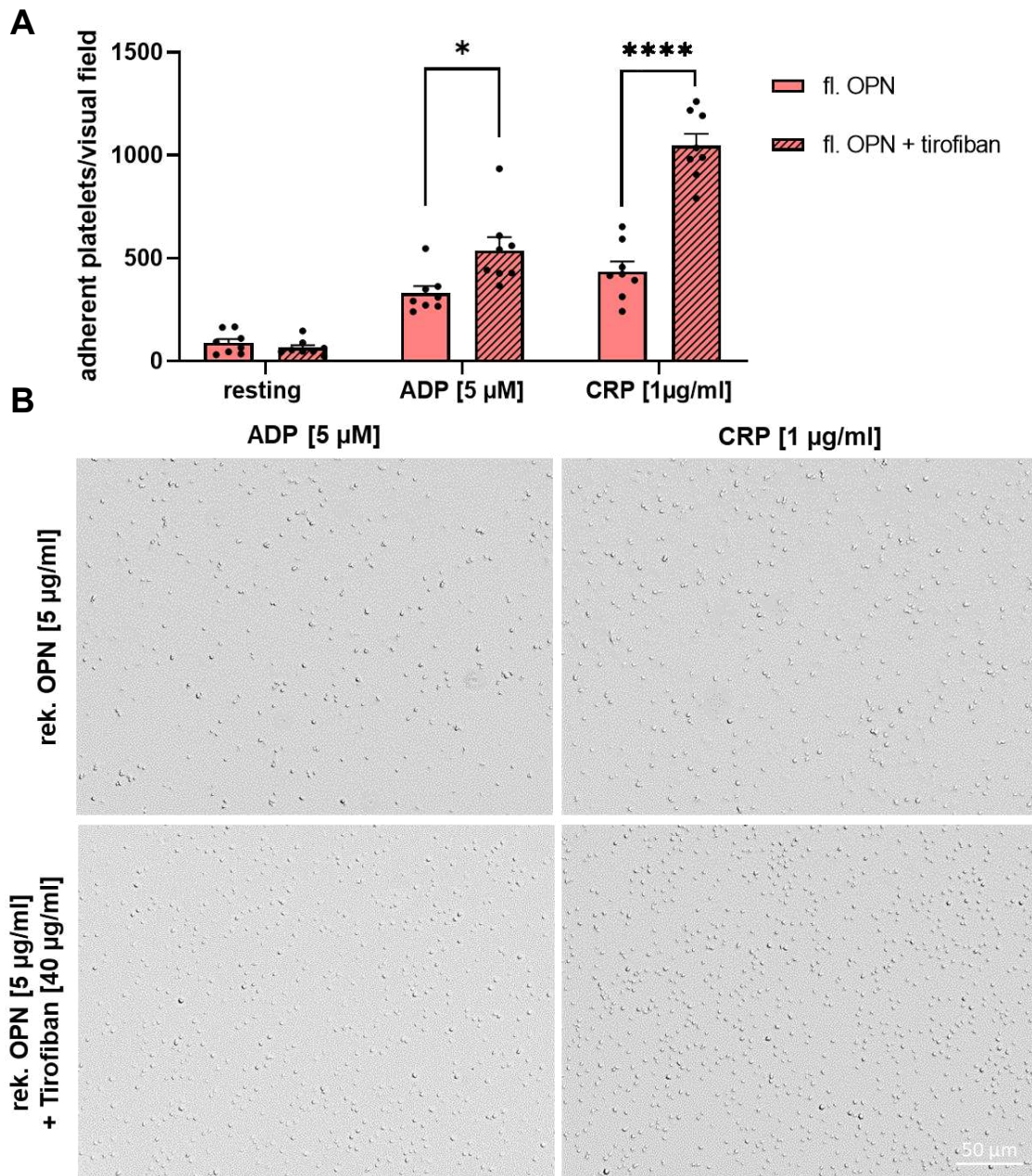


Abb. 10: Einfluss von Tirofiban auf die Adhäsion stimulierter oder unstimulierter Thrombozyten auf immobilisiertem Osteopontin. **A** Deckgläser wurden mit rek. OPN (Konzentration 5 µg/ml), beschichtet. Isolierte humane Thrombozyten (Endkonzentration 40.000 /µl) wurden mit Tirofiban (Endkonzentration 40 µg/ml) oder zur Kontrolle mit humaner Tyrode bei 37 °C für 15 min vorinkubiert und anschließend unstimuliert oder mit ADP (Endkonzentration 5 µM) bzw. mit CRP (Endkonzentration 1 µg/ml) aktiviert und für 30 min bei 37 °C auf den Deckgläsern adhärirt. Anschließend wurde die Anzahl der Thrombozyten pro Bildfeld bestimmt. Balkendiagramme zeigen den Mittelwert ± SEM (n=8). Two-way Anova, Post-hoc-Test: Tukey. **B** Repräsentative DIC-Aufnahmen der Thrombozytenadhäsion. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ **** $P < 0.0001$

3.4.1.2 Verstärkte Adhäsion humaner Thrombozyten auf immobilisiertem Osteopontin nach Präinkubation mit Eptifibatid

Als ein weiterer Inhibitor des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ wurde Eptifibatid verwendet. Eptifibatid ist ein synthetisches zyklisches Heptapeptid, das auf der Aminosäuresequenz Lysin-Glycin-Asparaginsäure (KGD) des Schlangengift-Desintegrins Barbourin basiert und in der Ligandentasche des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ bindet und dadurch hemmt [131, 133]. Neben rek. OPN ist als weitere Matrix frag. OPN ergänzt worden. Außerdem sollte eine Fluoreszenzfärbung (Rhodamin gekoppelt an das an Aktin bindende Phalloidin) die adhären Thrombozyten deutlicher hervorheben. Auch die Behandlung mit Eptifibatid zeigt bei unstimulierten Thrombozyten im Vergleich zu nicht mit Eptifibatid behandelten Thrombozyten keine signifikant veränderte Adhäsion. Nach Eptifibatidbehandlung führt die zusätzliche Aktivierung der Thrombozyten im Vergleich zu den aktivierten, nicht behandelten Thrombozyten zu einer erhöhten Anzahl an adhäsiven Thrombozyten. Diese erhöhte Anzahl zeigt sich bei der Aktivierung mit CRP auf rek. oder frag. OPN signifikant. Auch die Aktivierung mit ADP zeigt auf frag. OPN eine signifikante Erhöhung. Auf rek. OPN ist nach einer ADP-Stimulation eine tendenzielle Zunahme an adhären Zellen erkennbar (siehe **Abb. 11**).

A

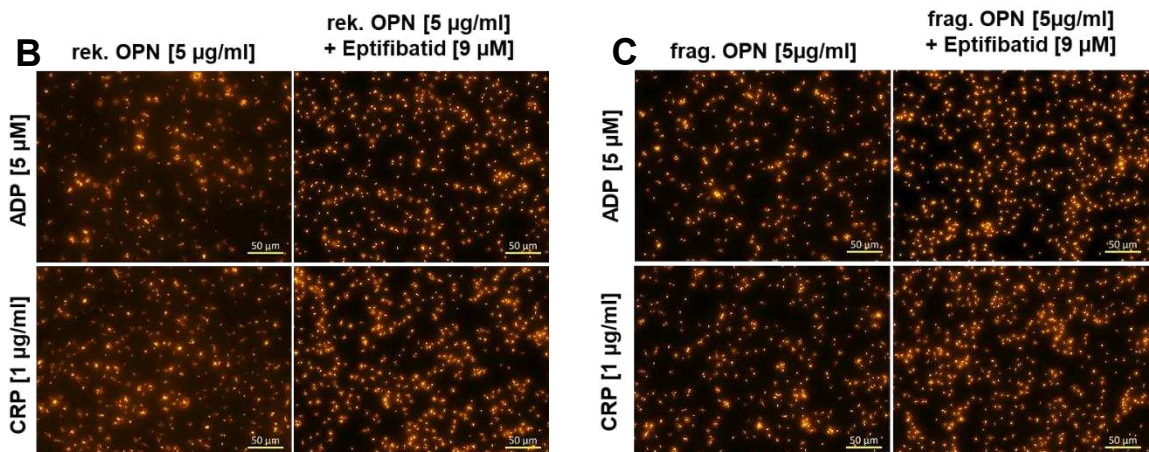
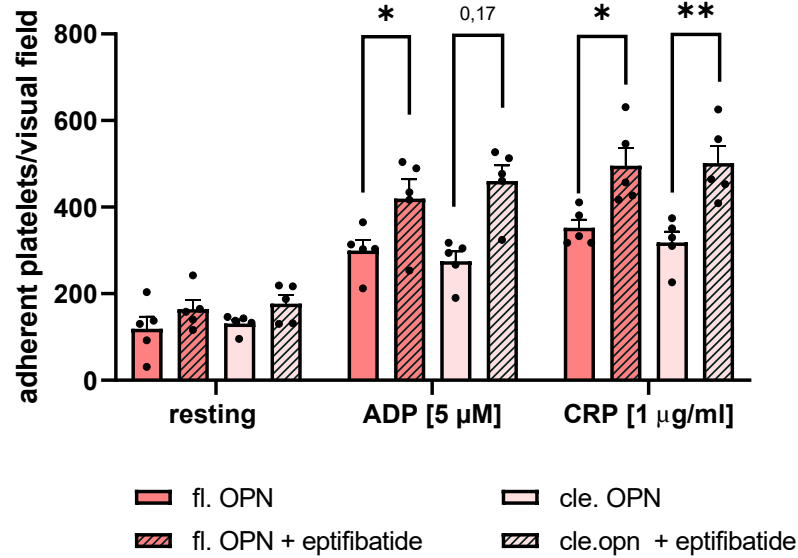


Abb. 11: Einfluss von Eptifibatid auf die Adhäsion stimulierter oder unstimulierter Thrombozyten auf immobilisiertem Osteopontin. **A** Deckgläser wurden mit rek. oder frag. OPN (Konzentration jeweils 5 µg/ml) beschichtet. Isolierte humane Thrombozyten (Endkonzentration 20.000 /µl) wurden mit Eptifibatid (Endkonzentration 9 µM) oder zur Kontrolle mit humaner Tyrode bei 37 °C für 15 min vorinkubiert, anschließend unstimuliert oder mit ADP (Endkonzentration 5 µM) bzw. mit CRP (Endkonzentration 1 µg/ml) aktiviert und für 30 min bei 37 °C auf den Deckgläsern adhärirt und mit Rhodamin Phalloidin fluoreszenzgefärbt. Anschließend wurde die Anzahl der Thrombozyten pro Bildfeld bestimmt. Balkendiagramme zeigen den Mittelwert ± SEM (n=5). Two-way Anova, Post-hoc-Test: Tukey. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen mit 555 nm Wellenlänge der adhäsiven Thrombozyten auf **B** rek. und **C** frag. OPN.

3.4.2 Reduktion der Adhäsion auf immobilisiertem Osteopontin durch Hemmung des humanen Thrombozytenintegrins $\alpha_v\beta_3$

Es ist bereits bekannt, dass OPN an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf Thrombozyten binden kann [134]. Zur Untersuchung des Einflusses des Integrins $\alpha_v\beta_3$ auf die Adhäsion von immobilisiertem, rek. oder frag. OPN wurde der monoklonale Antikörperklon LM 609 verwendet, der seines Zeichens dieses Integrin hemmt. Dazu wurden isolierte, humane Thrombozyten mit dem Antikörper vorbehandelt. Zusätzlich wurden diese vorbehandelten Thrombozyten mit ADP stimuliert. Als Kontrolle dienten auch hier unstimulierte Thrombozyten. Anschließend wurde erneut die fluoreszierende Aktinfärbung zur besseren Darstellung genutzt. Die Präinkubation mit dem Antikörper LM 609 führt, verglichen zur Nichtbehandlung, bei unstimulierten Thrombozyten zu keiner Änderung der Adhäsion auf rek. oder frag. OPN. Allerdings führt die Stimulation durch ADP bei mit dem Antikörper präinkubierten Thrombozyten im Vergleich zu nicht präinkubierten Thrombozyten zu einer signifikant reduzierten Adhäsion auf rek. ($p=0,0114$) und frag. OPN ($p=0,0019$). Eine vollständige Reduktion der der Adhäsion wird hingegen nicht erreicht. Auch hier kommt es unabhängig der OPN Varianten oder Vorbehandlung des Antikörpers zu einer signifikanten Steigerung der adhäsiven stimulierten Thrombozyten im Vergleich zu den unstimulierten Thrombozyten (p jeweils $<0,0001$) (siehe **Abb. 12**).

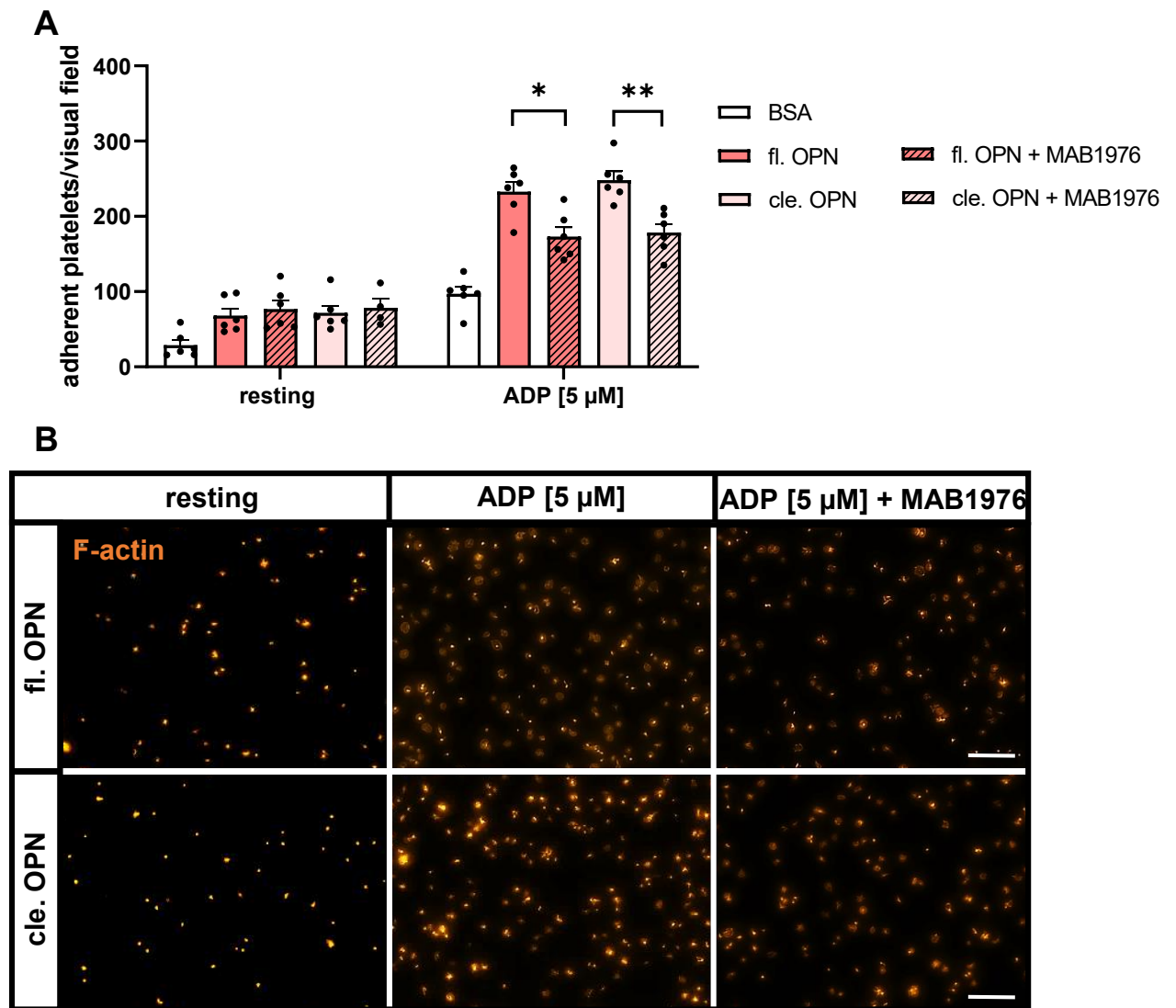


Abb. 12: Einfluss von Klon LM 609 auf die Adhäsion stimulierter oder unstimulierter Thrombozyten auf immobilisiertem Osteopontin. **A** Deckgläser wurden mit rek. oder frag. OPN (Konzentration jeweils 5 µg/ml), beschichtet. Isolierte humane Thrombozyten (Endkonzentration 20.000 /µl) wurden mit dem monoklonalen Antikörper LM609 (Endkonzentration 30 µg/ml) oder zur Kontrolle mit humaner Tyrode bei 37 °C für 15 min vorinkubiert, anschließend unstimuliert oder mit ADP (Endkonzentration 5 µM) aktiviert und für 30 min bei 37 °C auf den Deckgläsern adhärirt und mit Rhodamin Phalloidin fluoreszenzgefärbt. Anschließend wurde die Anzahl der Thrombozyten pro Bildfeld bestimmt. Balkendiagramme zeigen den Mittelwert ± SEM (n=6). Two-way Anova, Post-hoc-Test: Tukey. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ **B** Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen mit 555 nm Wellenlänge der adhäsiven Thrombozyten auf Osteopontin. **A** und **B** entnommen von: Wagenhäuser et al., 2024 [130]

3.5 Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien stimulierter Thrombozyten auf immobilisiertem Osteopontin

Thrombozyten durchlaufen während der Adhäsion einen *shape change*. Damit ist die Reorganisation des Zytoskeletts, die zur Adhäsion und Stabilisierung des Thrombus beiträgt, gemeint [46]. Im Folgenden sollte untersucht werden, welchen Einfluss rek. bzw. frag. OPN auf den *shape change* hat. Der hier durchgeführte Versuch ist, wie bereits unter (siehe 2.2.4.1) beschrieben, durchgeführt worden. Zur Auswertung des *shape change* wurden erneut die Aktinfilamente der adhärenen Zellen mittels Rhodamin Phalloidin angefärbt. Die Versuche zeigen, dass es nach der Aktivierung durch verschiedene Agonisten zu einer verstärkten Ausbildung an Lamellipodien (rek. Osteopontin: mit ADP: 55,7 %; mit CRP 65,4 %; frag. Osteopontin: mit ADP: 50,6 %, mit CRP: 61,3%) kommt. Nach Stimulation mit CRP bilden die Filopodien sowohl auf rek. (22,1 %) als auch auf frag. OPN (27,8 %) den zweitgrößten Anteil. Die restlich adhärenen Thrombozyten, die keinen *shape change* durchlaufen haben, besitzen auf rek. (12,5 %) und frag. (10,9 %) OPN den geringsten Anteil nach CRP-Aktivierung. Im Gegensatz dazu bilden die adhärenen Thrombozyten nach der Stimulation mit ADP den zweitgrößten Anteil auf rek. (29 %) und frag. (33,6 %) OPN. Damit bilden die Filopodien nach der Behandlung mit ADP den kleinsten Anteil auf rek. (15,3 %) und frag. (15,8 %) OPN. Dabei ist kein signifikanter Unterschied des *shape change* von Thrombozyten erkennbar, die auf rek. oder frag. OPN adhäreren (siehe **Abb. 13**).

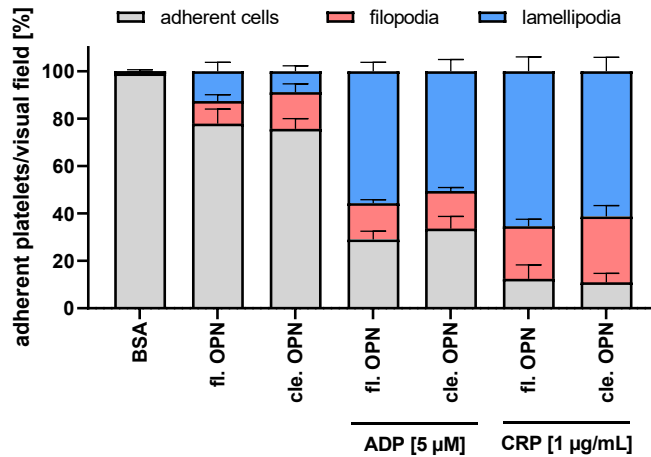
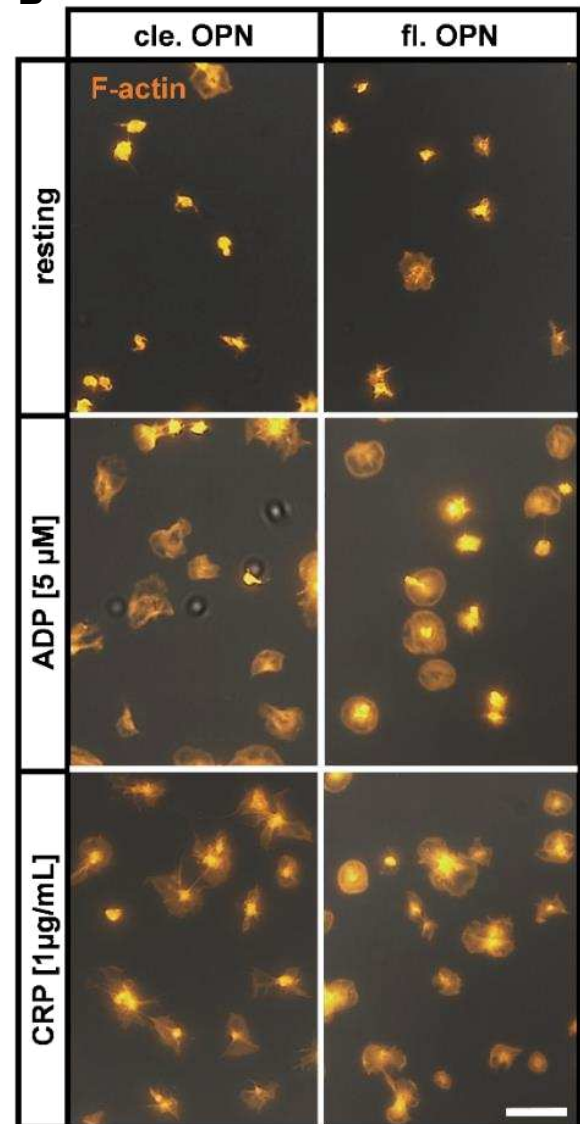
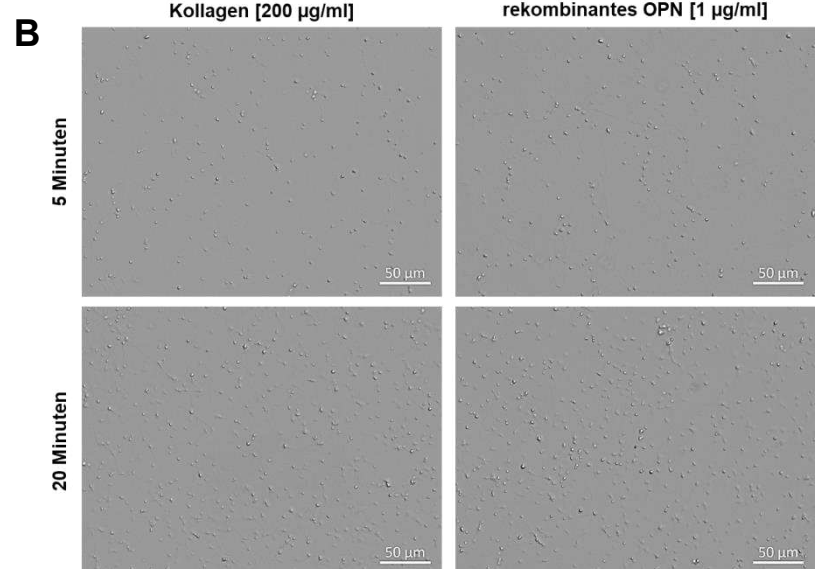
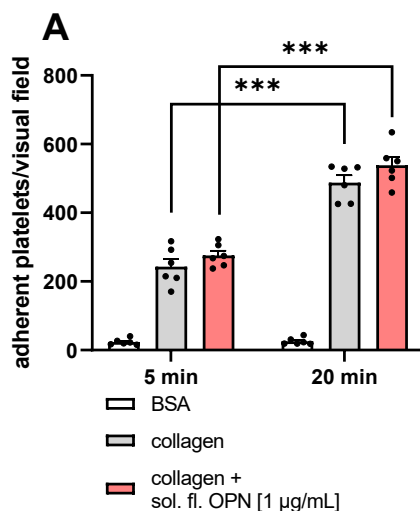
A

Abb. 13: Einfluss von immobilisiertem Osteopontin auf das Zytoskelett stimulierter oder unstimulierter Thrombozyten. **A** Deckgläser wurden mit rek. oder frag. OPN (Konzentration jeweils 5 µg/ml), beschichtet. Isolierte humane Thrombozyten (Endkonzentration 20.000 /µl) wurden unstimuliert oder mit ADP (Endkonzentration 5 µM) bzw. CRP (Endkonzentration 1 µg/ml) aktiviert und für 30 min bei 37 °C auf den Deckgläsern adhärirt und mit Rhodamin Phalloidin fluoreszenzgefärbt. Anschließend wurde die Anzahl der Thrombozyten pro Bildfeld bestimmt. Balkendiagramme zeigen den Mittelwert ± SEM (n=5). Two-way Anova, Post-hoc-Test: Tukey. **B** Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen im bei einer Wellenlänge von 555 nm bei 1000-facher Vergrößerung. **A** und **B** entnommen von: Wagenhäuser et al., 2024 [130]

B

3.6 Kein Einfluss von löslichem rekombinanten Osteopontin auf die Adhäsion von Thrombozyten auf einer Kollagenmatrix

In dieser Arbeit konnte OPN als Bestandteil der Aortenwand von AAA-Patienten nachgewiesen und der Einfluss von immobilisiertem OPN auf die Thrombozytenadhäsion überprüft werden. Ein weiterer wesentlicher Bestandteil der EZM in der Aortenwand ist Kollagen [56]. Da lösliches OPN in den Blutplasmaspiegeln von AAA-Patienten nachweisbar erhöht ist, überprüften wir den Einfluss von löslichem rek. und frag. OPN hinsichtlich der Adhäsion humaner Thrombozyten auf einer Kollagenmatrix [124]. Dafür wurden Thrombozyten mit rek. oder frag. OPN vorinkubiert und adhärten zu verschiedenen Zeitpunkten (5 min bzw. 20 min) auf Kollagen. Eine Präinkubation der Thrombozyten mit oder ohne rek. OPN (Endkonzentration 1 µg/ml) führt hierbei zu keiner signifikanten Änderung der Adhäsion auf Kollagen, weder nach 5 min noch nach 20 min. Dies ist ebenfalls nach erfolgter Präinkubation mit frag. OPN zu beobachten (1 µg/ml). Auch eine Erhöhung der Konzentration an rek. OPN (10 µg/ml) zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl adhärrierender Thrombozyten auf Kollagen, zu beiden Zeitpunkten. (siehe **Abb. 14**)



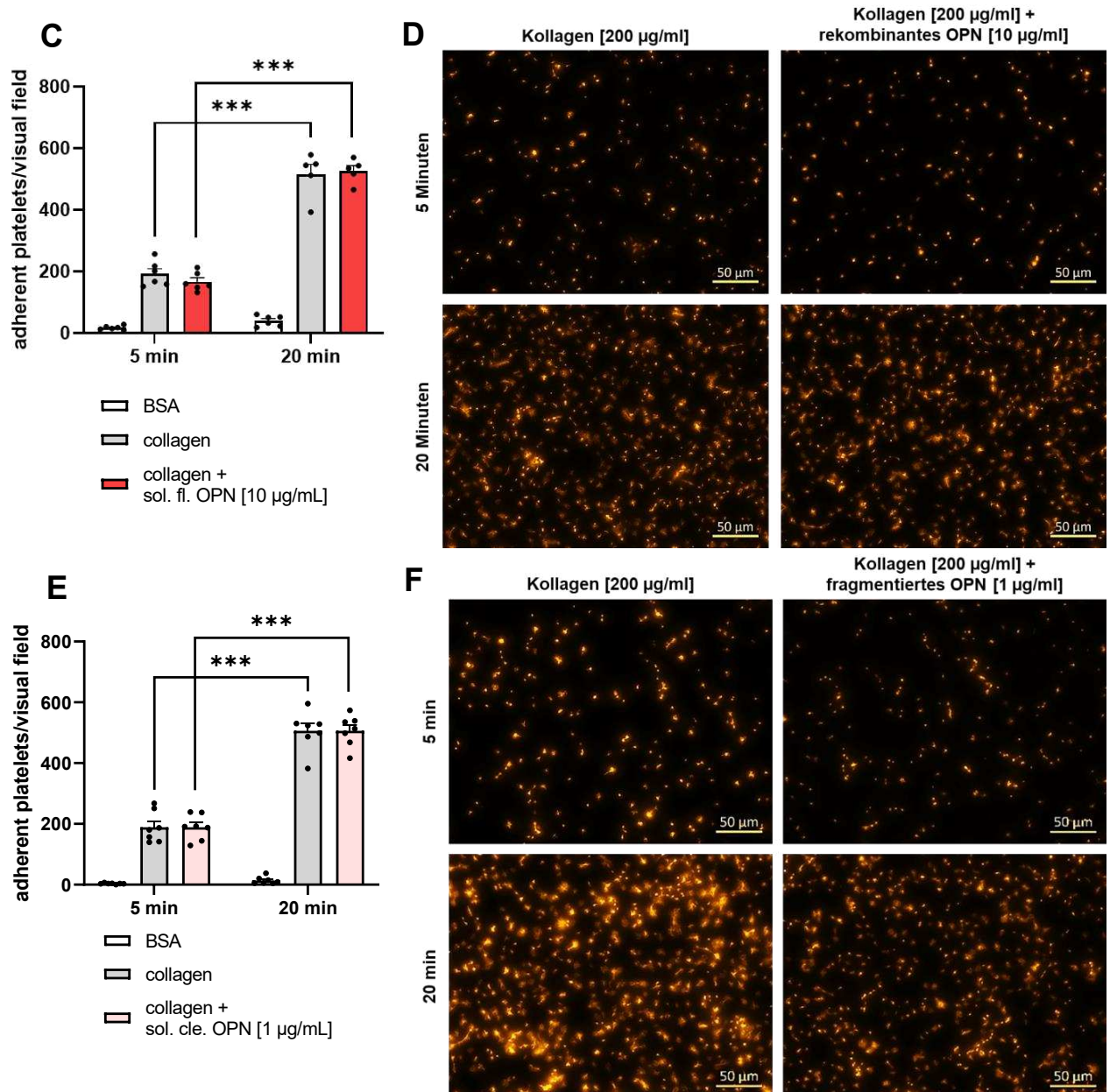


Abb. 14: Einfluss von löslichem Osteopontin auf die Adhäsion stimulierter und unstimulierter Thrombozyten auf Kollagen. Deckgläser wurden mit 200 µg/ml Kollagen oder mit BSA [1%] als Kontrolle beschichtet. Isolierte humane Thrombozyten (Endkonzentration 40.000 /µl) wurden unbehandelt, mit rek. (Endkonzentration **A** 1 µg/ml oder **C** 10 µg/ml) oder frag. (Endkonzentration **E** 1 µg/ml) OPN für 20 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden die behandelten Thrombozyten für 5 oder 20 min adhärirt und **C**, **E** mit Rhodamin Phalloidin oder **A** ohne behandelt. Es wurde die Anzahl der Thrombozyten pro Bildfeld bestimmt. Balkendiagramme zeigen den Mittelwert ± SEM (A und C: n=6 E: n=7). Two-way Anova, Post-hoc-Test: Turkey. *** $P < 0.001$. Repräsentative Aufnahmen **B** im DIC oder **D**, **F** Fluoreszenzkanal mit 555 nm Wellenlänge der adhäsiven Thrombozyten auf Kollagen in 400-facher Vergrößerung. **A** und **E** entnommen von: Wagenhäuser et al., 2024 [130]

4 Diskussion

Das AAA ist auch heutzutage nur operativ oder interventionell zu behandeln und birgt bei Nichtbehandlung das Risiko einer Ruptur mit konsekutivem Versterben des Patienten. Für weitere Behandlungsmöglichkeiten ist damit das Erforschen des Pathomechanismus von AAA höchst relevant. Im Laufe der Jahre spielte im AAA die Entstehung des ILT und der Aspekt der chronischen Inflammation eine immer größere pathophysiologische Rolle. Thrombozyten als Bestandteil des ILT werden nicht mehr nur als wesentliche Beteiligte in der Hämostase und Thrombose, sondern auch in der Inflammation betrachtet. Ein im Serum von AAA-Patienten erhöhtes und in der Aortenwand von AAA-Patienten vermehrt exprimiertes Protein, das Osteopontin, wird in weiteren Erkrankungen, teils als Zytokin und teils als Adhäsionsprotein verstanden. Ziel der Arbeit war es den Einfluss von Osteopontin auf Thrombozyten zu untersuchen und eben diesen Einfluss herauszustellen und mögliche Auswirkungen auf den ILT und die Pathophysiologie des AAA zu erörtern.

4.1 Der Einfluss von Osteopontin auf die Thrombozytenaktivierung und -degranulierung

Der ILT im AAA wird als biologisch aktives Gewebe verstanden, welches unter anderem aktivierte Thrombozyten beinhaltet [135]. Da außerdem bekannt ist, dass AAA-Patienten einen erhöhten OPN-Serumspiegeln aufweisen, wurde hier ein möglicher Einfluss von OPN als Aktivator von Thrombozyten überprüft [124]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl eine alleinige als auch eine Kostimulation *in vitro* durch OPN oder dessen Fragmente keinen Einfluss auf die thrombozytäre Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung bzw. Degranulierung zeigt. Allerdings überprüften wir nicht die Aktivierung des Integrin $\alpha_v\beta_3$. Gerade diese Interaktion wird in der Literatur nach Kostimulation beschrieben [134, 136]. Womöglich würde sich hierbei eine Aktivierung zeigen. Außerdem könnten noch weitere Zeiträume überprüft werden. Eine Verdoppelung der Inkubationszeit könnte gegebenenfalls bestätigen, dass es sich bei der Thrombozytenaktivierung durch OPN um einen Langzeitprozess handelt. Zumindest wurden bei den Adhäsionsversuchen auf OPN-Matrizen 30 min gewählt und es konnte ein Effekt gezeigt werden. Ebenfalls könnte eine Erhöhung der OPN-Konzentration gegebenenfalls einen Einfluss auf die Aktivierung haben.

4.2 Adhäsionsfähigkeit von Thrombozyten auf immobilisiertem Osteopontin

Neben der Aktivierung von Thrombozyten ist ein weiterer wesentlicher Bestandteil die Adhäsion. Golledge *et al.*, sowie Wang *et al.* konnten bereits in Wänden von AAA-

Patienten einen erhöhten OPN-Gehalt nachweisen [124, 125]. Auch unsere Arbeitsgruppe konnte in Immunfluoreszenzuntersuchungen OPN in Aortenwänden von AAA-Patienten nachweisen. Damit ist eine Voraussetzung geschaffen, dass Thrombozyten mit OPN in Kontakt treten können. Bereits 1997 konnten Bennett *et al.* die Adhäsion von Thrombozyten nach Stimulation mit ADP auf immobilisiertem OPN nachweisen [134]. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Zudem wurde dieses um zwei Aspekte ergänzt. Zum Einen nutzten wir das *collagen related peptide* als weiteren Stimulator und können zum Anderen auch hiermit eine verstärkte Adhäsion auf immobilisiertem OPN zeigen. Als Kollagenderivat löst CRP die Bindung des Kollagens über das *Inside-Out Signalling* eine GPVI-vermittelte Aktivierung der Integrine und damit eine Affinitätssteigerung dieser aus. Das ermöglicht folgend die Bindung an OPN und damit einen zweiten Signalweg zur Aktivierung. Diese Erhöhung der Affinität des Integrins $\alpha_v\beta_3$ führten Litvinov *et al.* bereits 2003 auf eine durch ADP induzierte Konformationsänderung des Integrins zurück [136]. In der vorliegenden Arbeit ergänzten wir in unseren Versuchen die Beschichtungen um durch Thrombin fragmentiertes OPN. Das Schneiden durch Thrombin betrifft nicht die RGD-Sequenz, die an Integrine bindet. In diesem Zusammenhang fanden Yokosaki *et al.* heraus, dass das Integrin $\alpha_v\beta_3$ keine Affinitätsänderung zu frag., im Vergleich zum rek. OPN *in vitro* aufweist. Allerdings zeigten sowohl Yokosaki *et al.* als auch Barry *et al.*, dass Thrombin frag. OPN, im Vergleich zu rek. OPN eine erhöhte Affinität für das Integrin $\alpha_5\beta_1$ besitzt [106, 137]. Die zuvor genannten Integrine sind ebenfalls auf der Oberfläche von Thrombozyten zu finden. Daher sind zwei OPN-Varianten gewählt worden [41]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine ähnliche Adhäsion von Thrombozyten auf beiden OPN-Varianten. Dies weist auf keine Affinitätsunterschiede der beteiligten Integrine auf die OPN-Varianten hin. Dies könnte auf eine untergeordnete Rolle des Integrin $\alpha_5\beta_1$ hinweisen und hat vielleicht in der absoluten Anzahl adhärrierender Thrombozyten keine starke Auswirkung. Janus-Bell *et al.* beschreiben einen geringen Einfluss des Integrins $\alpha_5\beta_1$ auf die Hämostase [138]. Gegebenenfalls könnte dies zu einer früheren Adhäsion der Thrombozyten führen. Somit wäre es eventuell vielversprechend kürzere Adhäsionszeitpunkte in Bezug auf die OPN vermittelte Thrombozytenadhäsion zu untersuchen. Bennett *et al.* stellten fest, dass der spezifische Antikörper gegen das Integrin $\alpha_5\beta_1$ auf Thrombozyten nicht inhibitorisch wirksam war [134]. Folglich scheint das Integrin $\alpha_5\beta_1$ keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion von Thrombozyten zu haben. Daher konnte in diesen Versuchen kein signifikanter Unterschied zwischen frag. und rek. OPN auf die Adhäsion von Thrombozyten festgestellt werden, obwohl frag. OPN eine stärkere Affinität zum Integrin $\alpha_5\beta_1$ vorweist.

Außerdem nutzten Bennett *et al.* zwei verschiedene Antikörper gegen das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Nach Antikörperbehandlung konnte eine geringere Adhäsion der Thrombozyten, aber keine vollständige Inhibierung, auf einer Osteopontinmatrix nachgewiesen werden. Dies führten Bennett *et al.* auf eine mögliche Kreuzreaktivität zu dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ zurück. Zur Untersuchung der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ abhängigen Thrombozytenaggregation auf OPN wurde in dieser Arbeit der Aggregationshemmer Tirofiban verwendet, bei dem es sich um ein ausschließlich an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ bindende L-Tyrosin Derivat handelt [131, 132]. Paradoxe Weise zeigte Tirofiban nach der Aktivierung auf beiden Osteopontinmatrices, frag. oder rek., eine massiv gesteigerte Thrombozytenadhäsion. Ebenfalls resultierte die Verwendung des Aggregationshemmer Eptifibatid, ein zyklisches Heptapeptid, welches spezifisch die Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung hemmt, in einer verstärkten Adhäsion [131, 132]. Bassler *et al.* berichteten 2007 in einer Arbeit, dass die Verwendung von Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten mit ADP zu einer paradoxen Aktivierung von Thrombozyten führte [139]. Legler *et al.* zeigten 2001 *in vitro*, dass ein blockierendes zyklisches RGD-Peptid in niedrigen Konzentrationen agonistisch auf das Integrin $\alpha_v\beta_3$ wirkte. Hierbei wird ein Konformationswechsel des Integrins nach Bindung von Proteinen mit der RGD-Sequenz angenommen [140]. Dies erklärt Sen *et al.* mit einer Carboxylgruppe in der RGD-Sequenz, die sowohl bei natürlichen Liganden als auch bei inhibierenden *small-molecules* vorhanden seien [141]. Damit könnte eine zusätzliche Aktivierung von Thrombozyten vorliegen, die die gesteigerte Adhäsion erklärt. Die Inhibitoren können zu einem Konformationswechsel im Integrin $\alpha_v\beta_3$ führen, die anschließend noch mittels ADP oder *CRP* aktiviert worden sind. Diese Adhäsion zeigt sich daher auch nicht über das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Außerdem konnten wir das Ergebnis von Bennett *et al.* bestätigen, dass Osteopontin und dessen Fragmente an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet, da die Inhibierung des Integrin $\alpha_v\beta_3$ mittels eines spezifischen Antikörpers zu einer verringerten Adhäsion auf immobilisiertem frag. oder rek. OPN führte [134]. Nichtsdestotrotz blieb eine vollständige Adhäsionsreduktion auch nach Inhibierung des Integrin $\alpha_v\beta_3$ aus. Auch wenn sich zwischen dem rek. und frag. OPN keine Unterschiede zeigten, bleibt fraglich, ob OPN das Integrin $\alpha_5\beta_1$ bindet und daher nach Blockierung vom Integrin $\alpha_v\beta_3$ zur Adhäsion der Thrombozyten auf OPN führt. Dies bedarf weiterer Erforschung und könnte mit spezifisch inhibierenden Antikörpern weiter evaluiert werden.

Nach der Stimulation durch ADP oder *CRP* bilden Thrombozyten Lamelli- und Filopodien aus. Unabhängig von der Agonistenwahl und der Beschichtung mit rek. oder frag. OPN weisen die Thrombozyten zum größten Teil Lamellipodien auf. Damit zeigen sie die ausgeprägteste Zytoskelettform, die adhäsive Thrombozyten *in vitro* erreichen können [46]. Der Agonist *CRP* bedingt dabei höhere Anteile an Filo- und Lamellipodien als ADP. Ein Vergleich zwischen den Agonisten hinsichtlich der ausgeprägteren Adhäsion ist nicht

möglich, da jeweils nur eine Agonistenkonzentration gewählt worden ist. Eine Konzentrationsreihe würde eine mögliche Vergleichbarkeit schaffen. OPN bestätigt sich als Protein, an dem aktivierte Thrombozyten gut adhären können. Auch hier muss konstatiert werden, dass der Zeitraum von 30 Minuten fest gewählt war. Demnach lässt sich nicht ausschließen, dass es je nach OPN-Variante oder Agonistenwahl zu einer schnelleren Adhäsion bzw. einem anderen *shape change*-Verhalten kommen könnte.

4.3 Lösliches Osteopontin führt zu keiner gesteigerten Anzahl adhärenter Thrombozyten

Auch wenn immobilisiertes OPN ein Adhäsionspartner der Thrombozyten darstellt, zeigt sich lösliches OPN nicht unterstützend für adhärierende Thrombozyten. Dies zeigen unsere Adhäsionsversuche auf einer Kollagenmatrix. Auch hier verhielten sich die beiden löslichen OPN-Varianten nicht unterschiedlich. Damit zeigte lösliches OPN im Gegensatz zum immobilisierten OPN keinen Einfluss auf die Adhäsion von Thrombozyten. Ng *et al.* konnten in ihren Versuchen mit immobilisiertem aber nicht mit löslichem OPN signifikante Effekte zeigen und gehen davon aus, dass die für die Bindung von OPN relevante RGD-Sequenz in löslichem OPN nicht frei zugänglich für Bindungspartner ist und begründen mit Liu *et al.*, dass immobilisiertes OPN eine Orientierung mit Zugang zur RGD-Sequenz bietet [142, 143]. Daher scheint immobilisiertes- aber nicht lösliches OPN für Integrine zugänglich zu sein und daher nur dann einen signifikanten Effekt auszulösen. Für eine Adhäsion auf immobilisiertem OPN war eine Präaktivierung der Thrombozyten notwendig. Diese blieb bei der Adhäsion auf Kollagen aus. Womöglich hätte eine Präaktivierung eine Konformationsänderung der Integrine zur Folge gehabt und dadurch wäre eine Bindung der RGD-Sequenz vom löslichen OPN an dem Integrin möglich gewesen und das hätte die Adhäsion unterstützen können.

4.4 Relevanz der Ergebnisse für die Pathogenese des abdominale Aortenaneurysma

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass OPN in den Gefäßwänden von AAA-Patienten nachweisbar ist. In diesem Zusammenhang wäre es von hoher Relevanz die hier gezeigten Ergebnisse mit dem OPN-Gehalt in Aortenwänden von gesunden Spendern zu vergleichen, um die erhöhte Konzentration von OPN als Rekrutierungspartner von Thrombozyten und Immunzellen zu bestätigen. Im AAA-Mausmodell mit *ApoE*^{-/-} *OPN*^{+/+} Mäusen zeigten diese im Vergleich zu *ApoE*^{-/-} *OPN*^{-/-} Mäusen vermehrte atherosklerotische Plaques und ein erniedrigtes antiinflammatorisches Zytokinprofil [128]. Zu einem inflammatorischen Milieu können aktivierte Thrombozyten beitragen, indem sie unter anderem über das Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf

immobilisiertem rek. bzw. frag. OPN adhären können. Lösliches OPN hingegen scheint keinen Einfluss auf die Aktivierung oder Adhäsion von Thrombozyten zu haben. Weiterführende Versuche unserer Arbeitsgruppe konnten OPN auch in intraluminalen Thromben nachweisen [130]. Im Bereich des Thrombus, der aus Thrombozyten, Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten besteht, können unter anderem MMPs nachgewiesen werden. Sakalihasan *et al.* konnten im ILT überwiegend MMP 9 mit einer erhöhten Gelatinaseaktivität mit einem abnehmenden Aktivitätsgradienten von luminal nach abluminal nachweisen [144]. Außerdem wird auch Thrombin im ILT vermutet [145]. Der Nachweis von Thrombin und gegebenenfalls die Aktivität im ILT und der Aortenwand wären noch genauer zu untersuchen. MMPs werden über einen Druckgradienten von luminal nach abluminal konvektiert und wären in der Lage luminal abgelagertes OPN zu hydrolisieren. Thrombin wird über aktivierte Thrombozyten freigesetzt und ist ebenfalls in der Lage OPN zu hydrolisieren [56, 77].

Immobilisiertes OPN in der Aortenwand und im ILT kann zur Rekrutierung von Thrombozyten aus dem Blut beisteuern, indem präaktivierte Thrombozyten mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ an der RGD-Sequenz des OPN binden. Die Thrombozyten müssten aktiviert sein, um mit einem *Inside-Out-Signalling* das Integrin $\alpha_v\beta_3$ in einem höheren Affinitätszustand zu versetzen. Kommt es dann zur Rekrutierung über immobilisiertes OPN des aktivierten Thrombozyten, kann dieser nun weitere Immunzellen rekrutieren und somit zu inflammatorischen Prozessen in der Aortenwand bzw. im ILT beitragen. Aus den α -Granula der Thrombozyten können die Chemokine Plättchenfaktor 4 und RANTES freigesetzt werden, die ihrerseits funktionelle Heterodimere bilden und somit neutrophile Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen rekrutieren [146, 147]. Die Plättchenfaktor 4- und RANTES-Konzentrationen im Plasma von AAA-Patienten sind erhöht und finden sich in hohen Konzentrationen in den luminalen Schichten des ILT. Thrombozyten und neutrophile Granulozyten sind in den luminalen Thrombusschichten des Aneurysmas kolokalisiert [147, 148]. Mausmodelle zeigen, dass die Hemmung von dem Plättchenfaktor 4-RANTES-Heterodimer durch den Peptidinhibitor MKEY vor oder nach der Induktion von AAA die Entwicklung von AAA wirksam verhindern beziehungsweise dessen Fortschreiten aufhalten kann [147, 149]. Aktivierte Thrombozyten können dann die rekrutierten Immunzellen über P-Selektin, das bei Aktivierung an die äußere Membran mobilisiert wird, binden [147, 150]. P-Selektin konnte in Lysaten des ILT und in seiner löslichen Form im Plasma nachgewiesen werden [147, 151]. Durch diese Prozesse kann nun die chronische Entzündung aufrechterhalten werden, die durch OPN rekrutierte Thrombozyten initiiert worden sind.

Es wird immer noch diskutiert, ob der ILT einen positiven oder negativen Einfluss im AAA besitzt. In einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2021 bewerten Boyd *et al.* den ILT ambivalent. Zu Beginn bietet dieser noch biomechanischen Schutz gegen die steigende Wandspannung. Allerdings verliert der Thrombus seine Schutzstärke im Laufe der Zeit. Dabei bleibt die ständige biologische Aktivität bestehen, die die aneurysmatische Wand weiter schwächt [135]. OPN kann in diesem Zusammenhang ein weiterer möglicher Adhäsions- und Migrationspartner für Thrombozyten, sowie für Immunzellen in das AAA sein. Also kann OPN zu Beginn für den Aufbau des zunächst schützenden Thrombus beitragen, wäre aber für den späteren Verlauf auch für die Schwächung der Aortenwand mitverantwortlich, wenn es zu einer weiteren Rekrutierung von Immunzellen über Thrombozyten käme. Auch wenn OPN in der löslichen Form keinen Einfluss auf Thrombozyten im AAA zu haben scheint, zeigt es sich dennoch als Zytokin wirksam, indem es z.B. die Autophagozytose von VSMCs initiieren kann [127]. Wie groß dieser Effekt von OPN im AAA und ob dieser Effekt nun als positiv oder negativ für den Krankheitsprogress zu werten ist, bleibt offen und bedarf weiterer Forschung.

5 Literaturverzeichnis

1. Brewer, D.B., *Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet*. British Journal of Haematology, 2006. **133**(3): p. 251-258.
2. E.-J. Speckmann, J.H., R. Köhling, *Physiologie*. 6 ed. 2013: Elsevier Urban & Fischer.
3. Holinstat, M., *Normal platelet function*. Cancer and Metastasis Reviews, 2017. **36**(2): p. 195-198.
4. George, J.N., *Platelets*. Lancet, 2000. **355**(9214): p. 1531-9.
5. Lefrançois, E., et al., *The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors*. Nature, 2017. **544**(7648): p. 105-109.
6. Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Platelets: Production, Morphology and Ultrastructure*. 2012, Springer Berlin Heidelberg. p. 3-22.
7. Flaumenhaft, R., *Platelet Secretion*, in *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*, P. Gresele, et al., Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 353-366.
8. Kehrel, B.E., *[Blood platelets: biochemistry and physiology]*. Hamostaseologie, 2003. **23**(4): p. 149-58.
9. Storey, R. and M. Thomas, *The role of platelets in inflammation*. Thrombosis and Haemostasis, 2015. **114**(09): p. 449-458.
10. Buerge, D., et al., *Tumor-platelet interaction in solid tumors*. International Journal of Cancer, 2012. **130**(12): p. 2747-2760.
11. Schlesinger, M., *Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis*. Journal of Hematology & Oncology, 2018. **11**(1).
12. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nature Medicine, 2002. **8**(11): p. 1227-1234.
13. Smolenski, A., *Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2012. **10**(2): p. 167-176.
14. Ruggeri, Z.M. and G.L. Mendolicchio, *Adhesion Mechanisms in Platelet Function*. Circulation Research, 2007. **100**(12): p. 1673-1685.
15. Guadiz, G., L.A. Sporn, and P.J. Simpson-Haidaris, *Thrombin Cleavage-Independent Deposition of Fibrinogen in Extracellular Matrices*. Blood, 1997. **90**(7): p. 2644-2653.
16. Schvartz, I., D. Seger, and S. Shaltiel, *Vitronectin*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1999. **31**(5): p. 539-544.
17. Kazanecki, C.C., D.J. Uzwiak, and D.T. Denhardt, *Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding*. Journal of Cellular Biochemistry, 2007. **102**(4): p. 912-924.
18. Varga-Szabo, D., I. Pleines, and B. Nieswandt, *Cell Adhesion Mechanisms in Platelets*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2008. **28**(3): p. 403-412.
19. Savage, B., F. Almus-Jacobs, and Z.M. Ruggeri, *Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow*. Cell, 1998. **94**(5): p. 657-66.
20. Scharf, R., *Platelet Signaling in Primary Haemostasis and Arterial Thrombus Formation: Part 1*. Hämostaseologie, 2018. **38**(04): p. 203-210.
21. Nieswandt, B. and S.P. Watson, *Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?* Blood, 2003. **102**(2): p. 449-461.
22. Stegner, D. and B. Nieswandt, *Platelet receptor signaling in thrombus formation*. Journal of Molecular Medicine, 2011. **89**(2): p. 109-121.
23. Scharf, R., *Platelet Signaling in Primary Haemostasis and Arterial Thrombus Formation: Part 2*. Hämostaseologie, 2018. **38**(04): p. 211-222.
24. Ginsberg, M.H., X. Du, and E.F. Plow, *Inside-out integrin signalling*. Curr Opin Cell Biol, 1992. **4**(5): p. 766-71.

25. Huang, J., et al., *Platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting*. Journal of Hematology & Oncology, 2019. **12**(1).
26. Xu, X. and B. Sun, *Platelet granule secretion mechanisms: Are they modified in sepsis?* Thrombosis Research, 2015. **136**(5): p. 845-850.
27. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates*. Blood Reviews, 2009. **23**(4): p. 177-189.
28. Linden, M.D., et al., *Application of Flow Cytometry to Platelet Disorders*. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2004. **30**(5): p. 501-511.
29. Offermanns, S., *Activation of Platelet Function Through G Protein–Coupled Receptors*. Circulation Research, 2006. **99**(12): p. 1293-1304.
30. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *Platelets: Physiology and Biochemistry*. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2005. **31**(04): p. 381-392.
31. Riddel, J.P., et al., *Theories of Blood Coagulation*. Journal of Pediatric Oncology Nursing, 2007. **24**(3): p. 123-131.
32. Coughlin, S.R., *Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1800-14.
33. Gale, A.J., *Continuing education course #2: current understanding of hemostasis*. Toxicol Pathol, 2011. **39**(1): p. 273-80.
34. Quinsey, N.S., et al., *Antithrombin: in control of coagulation*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(3): p. 386-9.
35. Bennett, J.S., *$\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GPIIb/IIIa) Structure and Function, in Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*, P. Gresele, et al., Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 99-112.
36. Moser, M., et al., *The tail of integrins, talin, and kindlins*. Science, 2009. **324**(5929): p. 895-9.
37. Zhu, J., et al., *Structure of a Complete Integrin Ectodomain in a Physiologic Resting State and Activation and Deactivation by Applied Forces*. Molecular Cell, 2008. **32**(6): p. 849-861.
38. Luo, B.-H., C.V. Carman, and T.A. Springer, *Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling*. Annual Review of Immunology, 2007. **25**(1): p. 619-647.
39. Xiong, J.-P., et al., *New insights into the structural basis of integrin activation*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1155-1159.
40. Anthis, N.J., et al., *The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction*. The EMBO Journal, 2009. **28**(22): p. 3623-3632.
41. Nieswandt, B., D. Varga-Szabo, and M. Elvers, *Integrins in platelet activation*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2009. **7**: p. 206-209.
42. Moser, M., et al., *Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation*. Nature Medicine, 2008. **14**(3): p. 325-330.
43. Li, Z., et al., *Signaling During Platelet Adhesion and Activation*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2010. **30**(12): p. 2341-2349.
44. Estevez, B., B. Shen, and X. Du, *Targeting Integrin and Integrin Signaling in Treating Thrombosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2015. **35**(1): p. 24-29.
45. Estevez, B. and X. Du, *New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling*. Physiology, 2017. **32**(2): p. 162-177.
46. Hartwig, J.H., *The platelet: form and function*. Semin Hematol, 2006. **43**(1 Suppl 1): p. S94-100.
47. Kim, S. and S.P. Kunapuli, *Negative Regulation of Gq-mediated Pathways in Platelets by G12/13 Pathways through Fyn Kinase*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(27): p. 24170-24179.
48. Bender, M. and R. Palankar, *Platelet Shape Changes during Thrombus Formation: Role of Actin-Based Protrusions*. Hämostaseologie, 2021. **41**(01): p. 014-021.

49. Murrell, M., et al., *Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015. **16**(8): p. 486-498.
50. Aslan, J.E., *Platelet shape change*, in *Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders*. 2017, Springer. p. 321-336.
51. Nachmias, V.T., J. Kavalier, and S. Jacobowitz, *Reversible association of myosin with the platelet cytoskeleton*. Nature, 1985. **313**(5997): p. 70-72.
52. Elvers, M., *RhoGAPs and Rho GTPases in platelets*. Hamostaseologie, 2016. **36**(3): p. 168-77.
53. Debus, E.S., *S3-Leitlinie zu Screening, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Bauchaortenaneurysmas*, in AWMF online. 2018.
54. Schmitz-Rixen, T., et al., *Versorgung des abdominalen Aortenaneurysmas (AAA) 2019*. Gefäßchirurgie, 2021. **26**(1): p. 41-48.
55. McGregor JC, P.J., Anton HC *The Value of Ultrasonography in the Diagnosis of Abdominal Aortic Aneurysm*. Scottish Medical Journal, 1975: p. 133-137.
56. Sakalihasan, N., et al., *Abdominal aortic aneurysms*. Nature Reviews Disease Primers, 2018.
57. Scott, R.A.P., S.G. Bridgewater, and H.A. Ashton, *Randomized clinical trial of screening for abdominal aortic aneurysm in women*. British Journal of Surgery, 2002. **89**(3): p. 283-285.
58. Svensjö, S., et al., *Low Prevalence of Abdominal Aortic Aneurysm Among 65-Year-Old Swedish Men Indicates a Change in the Epidemiology of the Disease*. Circulation, 2011. **124**(10): p. 1118-1123.
59. Grøndal, N., R. Sjøgaard, and J.S. Lindholt, *Baseline prevalence of abdominal aortic aneurysm, peripheral arterial disease and hypertension in men aged 65–74 years from a population screening study (VIVA trial)*. British Journal of Surgery, 2015. **102**(8): p. 902-906.
60. Norman, P.E. and J.T. Powell, *Abdominal Aortic Aneurysm*. Circulation, 2007. **115**(22): p. 2865-2869.
61. Larsson, E., et al., *A population-based case-control study of the familial risk of abdominal aortic aneurysm*. Journal of Vascular Surgery, 2009. **49**(1): p. 47-51.
62. Cornuz, J., *Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: Systematic review and meta-analysis of population-based screening studies*. The European Journal of Public Health, 2004. **14**(4): p. 343-349.
63. Hernesniemi, J.A., V. Vänni, and T. Hakala, *The prevalence of abdominal aortic aneurysm is consistently high among patients with coronary artery disease*. Journal of Vascular Surgery, 2015. **62**(1): p. 232-240.e3.
64. Stackelberg, O., et al., *Lifestyle and Risk of Screening-Detected Abdominal Aortic Aneurysm in Men*. Journal of the American Heart Association, 2017. **6**(5): p. e004725.
65. Lederle, F.A., *The Strange Relationship between Diabetes and Abdominal Aortic Aneurysm*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2012. **43**(3): p. 254-256.
66. Joseph L. Bobadilla, M., K. Craig Kent, MD, *Screening for Abdominal Aortic Aneurysms*. Advances in Surgery, 2012: p. 101-109.
67. Sweeting, M.J., et al., *Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms*. British Journal of Surgery, 2012. **99**(5): p. 655-665.
68. Thompson, S., et al., *Systematic review and meta-analysis of the growth and rupture rates of small abdominal aortic aneurysms: implications for surveillance intervals and their cost-effectiveness*. Health Technology Assessment, 2013. **17**(41).
69. Juvonen, J., et al., *Elevated Circulating Levels of Inflammatory Cytokines in Patients With Abdominal Aortic Aneurysm*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1997. **17**(11): p. 2843-2847.

70. Thompson, M.M., et al., *Angiogenesis in abdominal aortic aneurysms*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 1996. **11**(4): p. 464-469.
71. Liu, B., et al., *Pathogenic mechanisms and the potential of drug therapies for aortic aneurysm*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020. **318**(3): p. H652-h670.
72. Holmes, D.R., et al., *Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: A histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications*. Journal of Vascular Surgery, 1995. **21**(5): p. 761-772.
73. Michel, J.B., et al., *Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans*. Cardiovascular Research, 2011. **90**(1): p. 18-27.
74. Jana, S., et al., *Extracellular matrix, regional heterogeneity of the aorta, and aortic aneurysm*. Experimental & Molecular Medicine, 2019. **51**(12): p. 1-15.
75. Wagenseil, J.E. and R.P. Mecham, *Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics*. Physiological Reviews, 2009. **89**(3): p. 957-989.
76. Dobrin, P.B., W.H. Baker, and W.C. Gley,, *Elastolytic and Collagenolytic Studies of Arteries: Implications for the Mechanical Properties of Aneurysms*. Archives of Surgery, 1984. **119**: p. 405 - 409.
77. Busuttil, R.W., et al., *Elastase activity: The role of elastase in aortic aneurysm formation*. Journal of Surgical Research, 1982. **32**(3): p. 214-217.
78. Michel, J.-B., *Anoikis in the Cardiovascular System*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2003. **23**(12): p. 2146-2154.
79. Davis, V., et al., *Matrix Metalloproteinase-2 Production and Its Binding to the Matrix Are Increased in Abdominal Aortic Aneurysms*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1998. **18**(10): p. 1625-1633.
80. Thompson, R.W., et al., *Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages*. Journal of Clinical Investigation, 1995. **96**(1): p. 318-326.
81. Curci, J.A., et al., *Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms*. Journal of Clinical Investigation, 1998. **102**(11): p. 1900-1910.
82. McMillan, W.D. and W.H. Pearce, *Increased plasma levels of metalloproteinase-9 are associated with abdominal aortic aneurysms*. Journal of Vascular Surgery, 1999. **29**(1): p. 122-129.
83. Pearce, N.A.T.W.D.M.V.P.S.W.H., *Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta*. Surgery, 1997. **122**(2): p. 264-272.
84. Vorp, D.A. and J.P. Vande Geest, *Biomechanical determinants of abdominal aortic aneurysm rupture*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(8): p. 1558-66.
85. Miller, F.J., et al., *Oxidative Stress in Human Abdominal Aortic Aneurysms*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2002. **22**(4): p. 560-565.
86. Förstermann, U., *Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies*. Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine, 2008. **5**(6): p. 338-349.
87. Grote, K., et al., *Mechanical Stretch Enhances mRNA Expression and Proenzyme Release of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species*. Circulation Research, 2003. **92**(11): p. 80e-86.
88. Roebuck, H.L.K.A., *Oxidant stress and endothelial cell dysfunction*. American Journal of Physiology-Cell Physiology 2001: p. C719-C741.
89. Rajagopalan, S., et al., *Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **98**(11): p. 2572-2579.

90. Thompson, A.L.-C.D.R.H.S.L.M.J.S.S.A.W.R.W., *Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms* American Journal of Pathology,, 1997. **150**: p. 993-1007.
91. Harter, L.P., Gross, B. H., Callen, P. W., & Barth, R. A., *Ultrasonic evaluation of abdominal aortic thrombus*. Journal of Ultrasound in Medicine, 1992: p. 315–318.
92. Piechota-Polanczyk, A., et al., *The Abdominal Aortic Aneurysm and Intraluminal Thrombus: Current Concepts of Development and Treatment*. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 2015. **2**.
93. Wang DH, M.M., Webster MW, Vorp DA, *Mechanical Properties and Microstructure of Intraluminal Thrombus From Abdominal Aortic Aneurysm*. Journal of Biomechanical Engineering, 2001. **123**: p. 536-539.
94. R Adolph 1 , D.A.V., D L Steed, M W Webster, M V Kameneva, S C Watkins, *Cellular content and permeability of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm* Journal of vascular surgery, 1997. **25**: p. 916-925.
95. O'Leary, S.A., Kavanagh, E. G., Grace, P. A., McGloughlin, T. M., & Doyle, B. J. , *The biaxial mechanical behaviour of abdominal aortic aneurysm intraluminal thrombus: Classification of morphology and the determination of layer and region specific properties*. Journal of Biomechanics, 2014: p. 1430–1437.
96. Khan, J.A., et al., *Intraluminal Thrombus has a Selective Influence on Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases) in the Wall of Abdominal Aortic Aneurysms*. Annals of Vascular Surgery, 2012. **26**(3): p. 322-329.
97. Kazi, M., et al., *Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall*. Journal of Vascular Surgery, 2003. **38**(6): p. 1283-1292.
98. Vorp, D.A., et al., *Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening*. Journal of Vascular Surgery, 2001. **34**(2): p. 291-299.
99. Durmowicz, A.G., Badesch, D. B., Parks, W. C., Mecham, R. P., & Stenmark, K. R., *Hypoxia-induced Inhibition of Tropoelastin Synthesis by Neonatal Calf Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 1991. **5**: p. 464-469.
100. Pietila, K. and O. Jaakkola, *Effect of hypoxia on the synthesis of glycosaminoglycans and collagen by rabbit aortic smooth muscle cells in culture*. Atherosclerosis, 1984. **50**(2): p. 183-190.
101. Franzén, A. and D. Heinegård, *Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix*. Biochemical Journal, 1985. **232**(3): p. 715-724.
102. Clemente, N., et al., *Osteopontin Bridging Innate and Adaptive Immunity in Autoimmune Diseases*. Journal of Immunology Research, 2016. **2016**: p. 1-15.
103. Kläning, E., et al., *Osteopontin binds multiple calcium ions with high affinity and independently of phosphorylation status*. Bone, 2014. **66**: p. 90-5.
104. Liaw, L., et al., *The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro*. Journal of Clinical Investigation, 1995. **95**(2): p. 713-724.
105. Denda, S., L.F. Reichardt, and U. Müller, *Identification of Osteopontin as a Novel Ligand for the Integrin $\alpha 8\beta 1$ and Potential Roles for This Integrin–Ligand Interaction in Kidney Morphogenesis*. Molecular Biology of the Cell, 1998. **9**(6): p. 1425-1435.
106. Yokosaki, Y., et al., *Distinct structural requirements for binding of the integrins $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 9\beta 1$ to osteopontin*. Matrix Biol, 2005. **24**(6): p. 418-27.
107. Hu, D.D., et al., *A Biochemical Characterization of the Binding of Osteopontin to Integrins $\alpha v\beta 1$ and $\alpha v\beta 5$* . Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(44): p. 26232-26238.

108. Yokosaki, Y., et al., *The Integrin $\alpha 9\beta 1$ Binds to a Novel Recognition Sequence (SVVYGLR) in the Thrombin-cleaved Amino-terminal Fragment of Osteopontin*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(51): p. 36328-36334.
109. Ito, K., et al., *The differential amino acid requirement within osteopontin in $\alpha 4$ and $\alpha 9$ integrin-mediated cell binding and migration*. Matrix Biol, 2009. **28**(1): p. 11-9.
110. Green, P.M., et al., *Structural elements of the osteopontin SVVYGLR motif important for the interaction with $\alpha 4$ integrins*. FEBS Letters, 2001. **503**(1): p. 75-79.
111. Bayless, K.J. and G.E. Davis, *Identification of Dual $\alpha 4\beta 1$ Integrin Binding Sites within a 38 Amino Acid Domain in the N-terminal Thrombin Fragment of Human Osteopontin*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(16): p. 13483-13489.
112. Senger, D.R., et al., *Secreted phosphoproteins associated with neoplastic transformation: close homology with plasma proteins cleaved during blood coagulation*. Cancer Res, 1988. **48**(20): p. 5770-4.
113. Senger, D.R., et al., *Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin*. Biochim Biophys Acta, 1989. **996**(1-2): p. 43-8.
114. Agnihotri, R., et al., *Osteopontin, a Novel Substrate for Matrix Metalloproteinase-3 (Stromelysin-1) and Matrix Metalloproteinase-7 (Matrilysin)*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(30): p. 28261-28267.
115. Takafuji, V., et al., *An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 2007. **26**(44): p. 6361-6371.
116. Dean, R.A. and C.M. Overall, *Proteomics Discovery of Metalloproteinase Substrates in the Cellular Context by iTRAQ™ Labeling Reveals a Diverse MMP-2 Substrate Degradome*. Molecular & Cellular Proteomics, 2007. **6**(4): p. 611-623.
117. Christensen, B., et al., *Osteopontin Is Cleaved at Multiple Sites Close to Its Integrin-binding Motifs in Milk and Is a Novel Substrate for Plasmin and Cathepsin D*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(11): p. 7929-7937.
118. Ikeda, T., et al., *Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta*. Journal of Clinical Investigation, 1993. **92**(6): p. 2814-2820.
119. O'Brien, E.R., et al., *Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques*. Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology, 1994. **14**(10): p. 1648-1656.
120. Kaleta, B., *The role of osteopontin in kidney diseases*. Inflammation Research, 2019. **68**(2): p. 93-102.
121. Denhardt, D.T. and X. Guo, *Osteopontin: a protein with diverse functions*. Faseb j, 1993. **7**(15): p. 1475-82.
122. Lok, Z.S.Y. and A.N. Lyle, *Osteopontin in Vascular Disease*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2019. **39**(4): p. 613-622.
123. Icer, M.A. and M. Gezmen-Karadag, *The multiple functions and mechanisms of osteopontin*. Clinical Biochemistry, 2018. **59**: p. 17-24.
124. Golledge, J., et al., *Association Between Osteopontin and Human Abdominal Aortic Aneurysm*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2007. **27**(3): p. 655-660.
125. Wang, S.K., et al., *Osteopontin may be a driver of abdominal aortic aneurysm formation*. Journal of Vascular Surgery, 2018. **68**(6): p. 22S-29S.
126. Lai, C.-F., et al., *An Osteopontin–NADPH Oxidase Signaling Cascade Promotes Pro–Matrix Metalloproteinase 9 Activation in Aortic Mesenchymal Cells*. Circulation Research, 2006. **98**(12): p. 1479-1489.
127. Zheng, Y.H., et al., *Osteopontin stimulates autophagy via integrin/CD44 and p38 MAPK signaling pathways in vascular smooth muscle cells*. J Cell Physiol, 2012. **227**(1): p. 127-35.

128. Bruemmer, D., et al., *Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice*. J Clin Invest, 2003. **112**(9): p. 1318-31.
129. Ghulam, Q.M., et al., *von Willebrand Factor and Prekallikrein in Plasma Are Associated With Thrombus Volume in Abdominal Aortic Aneurysms*. Vasc Endovascular Surg, 2016. **50**(6): p. 391-7.
130. Wagenhäuser, M.U., et al., *Crosstalk of platelets with macrophages and fibroblasts aggravates inflammation, aortic wall stiffening, and osteopontin release in abdominal aortic aneurysm*. Cardiovascular Research, 2024. **120**(4): p. 417-432.
131. Hook, K.M. and J.S. Bennett, *Glycoprotein IIb/IIIa antagonists*. Handb Exp Pharmacol, 2012(210): p. 199-223.
132. Giordano, A., et al., *Effects Of Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists: Anti Platelet Aggregation And Beyond*. Curr Drug Metab, 2016. **17**(2): p. 194-203.
133. Schrör, K. and A.A. Weber, *Comparative pharmacology of GP IIb/IIIa antagonists*. J Thromb Thrombolysis, 2003. **15**(2): p. 71-80.
134. Bennett, J.S., et al., *Agonist-activated $\alpha v \beta 3$ on Platelets and Lymphocytes Binds to the Matrix Protein Osteopontin*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(13): p. 8137-8140.
135. Boyd, A.J., *Intraluminal thrombus: Innocent bystander or factor in abdominal aortic aneurysm pathogenesis?* JVS Vasc Sci, 2021. **2**: p. 159-169.
136. Litvinov, R.I., et al., *Quantitative Analysis of Platelet $\alpha v \beta 3$ Binding to Osteopontin Using Laser Tweezers*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(51): p. 51285-51290.
137. Barry, S.T., et al., *A Regulated Interaction between $\alpha 5 \beta 1$ Integrin and Osteopontin*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **267**(3): p. 764-769.
138. Janus-Bell, E., et al., *Characterization of the Role of Integrin $\alpha 5 \beta 1$ in Platelet Function, Hemostasis, and Experimental Thrombosis*. Thrombosis and Haemostasis, 2022. **122**(05): p. 767-776.
139. Bassler, N., et al., *A Mechanistic Model for Paradoxical Platelet Activation by Ligand-Mimetic $\alpha IIb \beta 3$ (GPIIb/IIIa) Antagonists*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2007. **27**(3): p. E9-E15.
140. Legler, D.F., et al., *Superactivation of integrin (α)v(β)3 by low antagonist concentrations*. Journal of Cell Science, 2001. **114**(8): p. 1545-1553.
141. Sen, S., et al., *Structure-Based Discovery of a Novel Class of Small-Molecule Pure Antagonists of Integrin $\alpha V \beta 3$* . J Chem Inf Model, 2022. **62**(22): p. 5607-5621.
142. Ng, C.W., et al., *Immobilized Osteopontin Enhances Adhesion but Suppresses Cytokine Release of Anti-IgE Activated Human Mast Cells*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1109.
143. Liu, L., et al., *Controlling osteopontin orientation on surfaces to modulate endothelial cell adhesion*. J Biomed Mater Res A, 2005. **74**(1): p. 23-31.
144. Sakalihasan, N., et al., *Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms*. J Vasc Surg, 1996. **24**(1): p. 127-33.
145. Tong, J. and G.A. Holzapfel, *Structure, Mechanics, and Histology of Intraluminal Thrombi in Abdominal Aortic Aneurysms*. Annals of Biomedical Engineering, 2015. **43**(7): p. 1488-1501.
146. Bakogiannis, C., et al., *Platelet-derived chemokines in inflammation and atherosclerosis*. Cytokine, 2019. **122**: p. 154157.
147. Sun, W., J. Zheng, and Y. Gao, *Targeting Platelet Activation in Abdominal Aortic Aneurysm: Current Knowledge and Perspectives*. Biomolecules, 2022. **12**(2): p. 206.
148. Houard, X., et al., *Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms*. Cardiovascular Research, 2009. **82**(3): p. 532-541.
149. Iida, Y., et al., *Peptide Inhibitor of CXCL4–CCL5 Heterodimer Formation, MKEY, Inhibits Experimental Aortic Aneurysm Initiation and Progression*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2013. **33**(4): p. 718-726.
150. André, P., *P-selectin in haemostasis*. Br J Haematol, 2004. **126**(3): p. 298-306.

151. Touat, Z., et al., *Renewal of mural thrombus releases plasma markers and is involved in aortic abdominal aneurysm evolution*. Am J Pathol, 2006. **168**(3): p. 1022-30.

6 Danksagung

Hiermit möchte ich allen Menschen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation in vielfältiger Weise unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Margitta Elvers für die hervorragende Betreuung und die große Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit. Ihre Expertise, ihre kritischen Anmerkungen und ihre kontinuierliche Begleitung waren für mich von unschätzbarem Wert.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. Hubert Schelzig, der mir den Weg zur Promotion geebnet und den Kontakt zu Herrn Prof. Dr. med. Markus Wagenhäuser ermöglicht hat. Durch Herrn Prof. Dr. med. Markus Wagenhäuser erhielt ich erst die Möglichkeit, Teil dieses Projekts zu werden.

Des Weiteren danke ich Frau Spelleken, Frau Dr. rer. nat. Wiebke Ibing und Frau Astrid Hoffmann, die mich im Labor bei Planung und Durchführung der Versuche tatkräftig unterstützt haben und stets ein offenes Ohr für meine Anliegen hatten.

Auch Herrn Dr. med. Kim Jürgen Krott und Herrn Tobias Feige gilt mein herzlicher Dank für die konstruktive und inspirierende Zusammenarbeit, für bereichernde Diskussionen sowie für die über die Laborzeit hinausgehende Unterstützung bei der Abfassung dieser Dissertation.

Agnes Bosbach danke ich für ihre engagierte Mithilfe bei einem zentralen Versuch sowie für die gemeinsam durchgeführten Färbungen von Osteopontin in Aortenwänden.

Meinen Eltern, Geschwistern und Freunden gilt mein tief empfundener Dank für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre stete Ermutigung – sowohl während meines Studiums als auch während der intensiven Phase dieser Dissertation.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank Luisa, meiner Freundin, die mir unabhängig von Labor- oder Schreibzeit stets Kraft, Gehör und Vertrauen geschenkt hat – besonders in den Momenten, in denen ich es am meisten brauchte.

Abschließend möchte ich diese Danksagung mit dem Zitat *Per aspera ad astra* – durch die Rauheit zu den Sternen (Seneca) beschließen. Dieser Leitspruch, den mir meine Großeltern mit auf den akademischen Weg gegeben haben und der zugleich Wahlspruch meiner Studentenverbindung ist, begleitete mich durch viele Phasen dieser Arbeit. Er war nicht nur Ansporn in herausfordernden Zeiten, sondern spiegelt auch den persönlichen Weg wider, den ich mit der Unterstützung all dieser Menschen gehen durfte.