

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

# **Neue Funktionen des Thrombozyten im Rahmen systemischer Infektion und Inflammation**

Kumulative Habilitationsschrift

zum Erlangen der Lehrbefugnis (venia legendi)  
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt von

Dr. med. Björn Krämer

2014

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

# **Neue Funktionen des Thrombozyten im Rahmen systemischer Infektion und Inflammation**

Kumulative Habilitationsschrift

zum Erlangen der Lehrbefugnis (venia legendi)  
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt von

Dr. med. Björn Krämer

2014

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Verzeichnis der in der Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen</b>	<b>3</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>3. Charakterisierung der Fähigkeit des Thrombozyten zur gerichteten Migration</b>	<b>7</b>
3.1. Identifizierung einer SDF-1-vermittelten Signalkaskade, die die Migrationsfähigkeit der Thrombozyten steuert	7
3.2. Fluss-induzierte Thrombozytenmigration	9
3.3. Ionenkanal-vermittelte Regulation der Thrombozytenmigration	11
<b>4. Charakterisierung der Rolle des Thrombozyten hinsichtlich Funktionen der angeborenen Immunität zur Abwehr bakterieller Infektionen</b>	<b>13</b>
<b>5. Charakterisierung molekularer Mechanismen des programmierten Zelltodes (Apoptose) im Thrombozyten</b>	<b>17</b>
5.1. Identifizierung molekularer Signalwege der Thrombozytenapoptose im Rahmen systemischer bakterieller Infektionen	17
5.2. Korrelation von Markern der Thrombozytenapoptose bei Patienten mit bakterieller Sepsis hinsichtlich der Schwere der Infektion und des klinischen Outcomes	21
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>25</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>28</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>34</b>

## 1. Verzeichnis der in der Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen

**Kraemer BF**, Borst O, Gehring EM, Schoenberger T, Urban B, Ninci E, Seizer P, Schmidt C, Bigalke B, Koch M, Martinovic I, Daub K, Merz T, Schwanitz L, Stellos K, Fiesel F, Schaller M, Lang F, Gawaz M, Lindemann S (2010). PI3 kinase-dependent stimulation of platelet migration by stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Mol Med (Berl)* 88: 1277-1288.

**Kraemer BF**, Schmidt C, Urban B, Bigalke B, Schwanitz L, Koch M, Seizer P, Schaller M, Gawaz M, Lindemann S (2011). High shear flow induces migration of adherent human platelets. *Platelets* 22: 415-421.

**Schmidt EM, Kraemer BF**, Borst O, Munzer P, Schonberger T, Schmidt C, Leibrock C, Towhid ST, Seizer P, Kuhl D, Stournaras C, Lindemann S, Gawaz M, Lang F (2012). SGK1 sensitivity of platelet migration. *Cell Physiol Biochem* 30: 259-268.

**Kraemer BF**, Campbell RA, Schwertz H, Cody MJ, Franks Z, Tolley ND, Kahr WH, Lindemann S, Seizer P, Yost CC, Zimmerman GA, Weyrich AS (2011). Novel anti-bacterial activities of beta-defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *PLoS Pathog* 7: e1002355.

**Kraemer BF**, Campbell RA, Schwertz H, Franks ZG, Vieira de Abreu A, Grundler K, Kile BT, Dhakal BK, Rondina MT, Kahr WH, Mulvey MA, Blaylock RC, Zimmerman GA, Weyrich AS (2012). Bacteria differentially induce degradation of Bcl-xL, a survival protein, by human platelets. *Blood* 120: 5014-5020.

**Kraemer BF**, Weyrich AS, Lindemann S (2013). Protein degradation systems in platelets. *Thromb Haemost* 110: 920-924.

Grundler K, Angstwurm M, Hilge R, Baumann P, Annecke T, Crispin A, Sohn HY, Massberg S, **Kraemer BF** (2014). Platelet mitochondrial membrane depolarization reflects disease severity in patients with sepsis and correlates with clinical outcome. *Crit Care* 18: R31.

## 2. Einleitung

Thrombozyten bilden das wesentliche Element der zellulären Hämostase und interagieren in komplexer Weise mit dem plasmatischen Gerinnungssystem und dem Gefäßendothel. Es sind kernlose Zellen, mit einer Größe von 2-5  $\mu\text{m}$ , die sich während der Thrombopoese vom Megakaryozyten abspalten und in die Zirkulation freigesetzt werden. Thrombozyten sind in großer Zahl im Blut vorhanden (100 – 300.000/ $\mu\text{l}$ ), obwohl eine weitaus geringere Zahl für eine funktionelle Hämostase ausreichen würde. Daher erscheint es sinnvoll, dass Thrombozyten auch andere Funktionen, die über die Hämostase hinausgehen, wahrnehmen können. In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten auch in vielfältiger Weise an entzündlichen, immunologischen, angiogenetischen und tumor-assoziierten Prozessen beteiligt sind [34]. Weyrich und Mitarbeiter zeigten, dass Thrombozyten durch splicing präformierter RNA eine Vielzahl von Proteinen de novo synthetisieren können und damit ein bedeutend erweitertes Funktionsspektrum aufweisen [9]. Weiterhin zeigen jüngste Erkenntnisse, dass Megakaryozyten durch selektive Zuordnung genetischer Information in neu produzierte Thrombozyten diese kurzfristig mit bedarfsgerechter genetischer Information ausstatten können [5]. Durch Speicherung und Freisetzung einer Vielzahl von Chemokinen (z.B. SDF-1, RANTES) [36] wirken Thrombozyten zusätzlich an der Regulation von inflammatorischen Prozessen mit und kommunizieren so mit anderen hämatopoetischen Zellen. Thrombozyten-Leukozytenkoagregate wurden dementsprechend bei einer Vielzahl inflammatorischer Prozesse nachgewiesen [11, 56]. Thrombozyten tragen so unter anderem zur Progression entzündlicher Erkrankungen wie der Multiple Sklerose durch Rekrutierung und Extravasation inflammatorischer Zellen bei [27].

Desweiteren wurde gezeigt, dass Thrombozyten angiogenetische Faktoren exprimieren können [39] und am Prozess der Tumorextravasation und Tumorprogression beteiligt sind [30]. Zunehmend geraten Thrombozyten auch durch ihre Funktion als Zelle der angeborenen Immunität in den Blickpunkt immunologischer und infektiologischer Überlegungen [10]. Thrombozyten wirken durch Freisetzung antibakterieller Proteine (z.B. thrombin-induced platelet microbicidal peptides (tPMPs), Defensine) [46] und ihre Fähigkeit zur Thrombusbildung direkt an der Abwehr von Infektionen mit und interagieren wie kürzlich gezeigt mit Immunzellen wie z.B. dendritischen Zellen [6]. Beta-Defensine wurden jüngst als neue Klasse antibakterieller Peptide im Thrombozyten identifiziert [17, 49]. Aufgrund ihrer einzigartigen Hämostasefunktion stellen Thrombozyten ein ideales Bindeglied zwischen Hämostase und Infektabwehr dar. Dabei können neben den erwünschten anti-infektiösen Prozessen auch prothrombotische Ereignisse auftreten und gerinnungsaktivierende Mikropartikel freigesetzt werden [41].

Die Inhibition der thrombozytären Hämostasefunktion mit Thrombozytenaggregationshemmern stellt heutzutage die wesentliche Säule der medikamentösen Therapie im Rahmen akuter vaskulärer Ereignisse wie dem Myokardinfarkt und Schlaganfall dar. Daher erscheint ein fundiertes Verständnis der komplexen systemischen Funktionen des Thrombozyten und eine präzise Kenntnis des Zusammenspiels mit Immunsystem und Gerinnungssystem sowie zellulärer Regulationsvorgänge des Thrombozyten von großer Wichtigkeit. Das Spektrum der thrombozytären Funktionen und Fähigkeiten geht weit über vereinfachte Vorstellungen des Thrombozyten als kernlose Zelle hinaus. Die systemischen Funktionen des Thrombozyten sind aber bei Weitem nicht

erschöpfend untersucht und bieten eine Fülle von Ansatzmöglichkeiten zur Untersuchung neuer Eigenschaften und Fähigkeiten.

Ziel dieser Habilitationsschrift ist es, einen Beitrag zu einem verbesserten Verständnis bestehender und neuer zellbiologischer Funktionen des Thrombozyten im komplexen System vaskulärer Inflammation und Infektion zu leisten und zugrundeliegende Regulationsmechanismen zu entschlüsseln.

Folgende Funktionen des Thrombozyten wurden im Rahmen der Arbeit untersucht und charakterisiert.

- Charakterisierung der Fähigkeit des Thrombozyten zur Migration und die Identifizierung neuer chemotaktischer (SDF-1) und mechanotaktischer Stimuli, sowie die Entschlüsselung der zugrundeliegenden Signalwege
- Charakterisierung der Rolle des Thrombozyten im Rahmen der angeborenen Immunität und die Identifizierung neuer antibakterieller Eigenschaften des Thrombozyten (Defensine) zur Abwehr systemischer Infektionen
- Charakterisierung von molekularen Mechanismen des programmierten Zelltodes (Apoptose) des Thrombozyten und die diagnostische und prognostische Untersuchung von Apoptosemerkmalen in der Sepsis-induzierten Thrombozytopenie

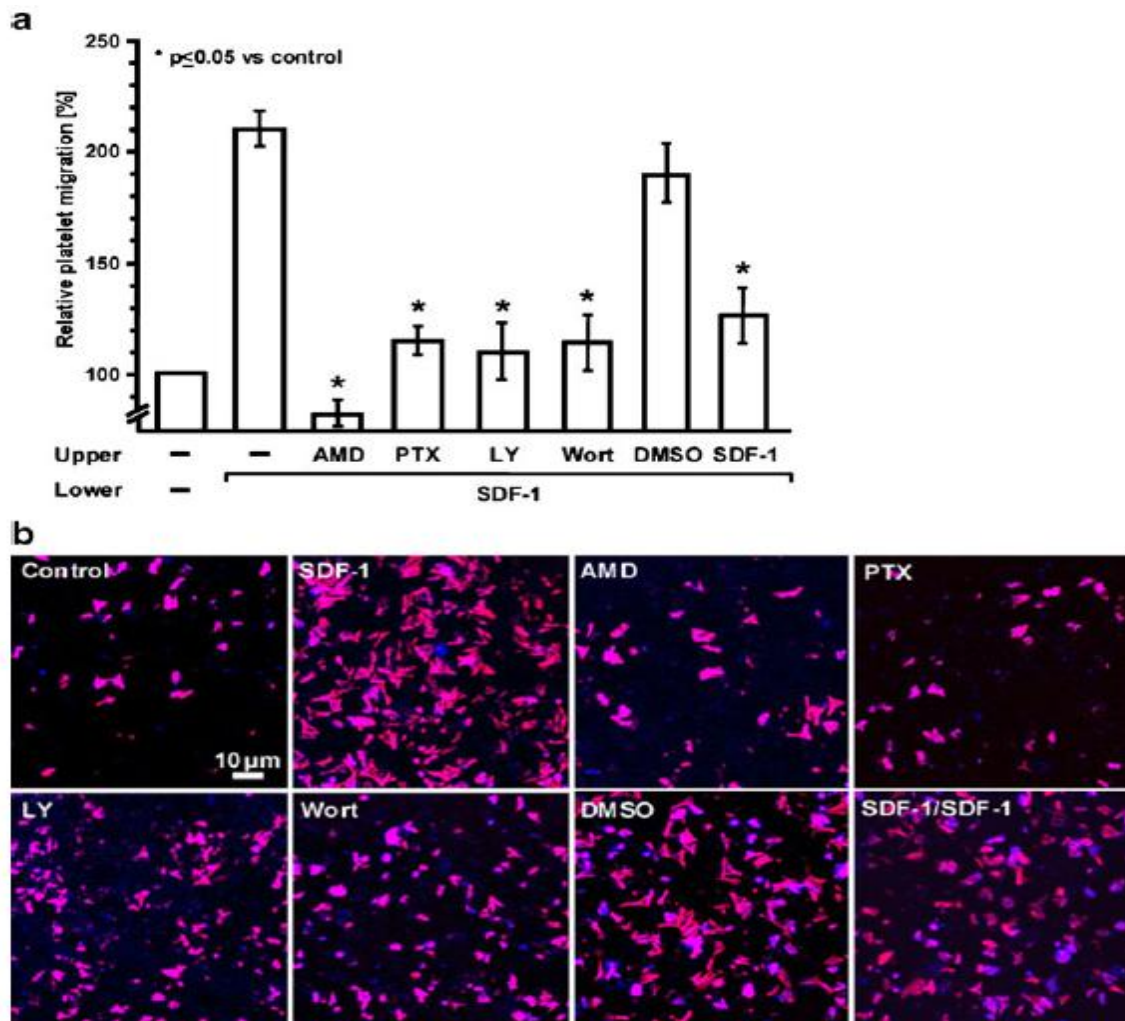
### **3. Charakterisierung der Fähigkeit des Thrombozyten zur gerichteten Migration und die Identifizierung zugrundeliegender Signalwege**

#### **3.1 Identifizierung einer SDF-1 vermittelten Signalkaskade, die die Migrationsfähigkeit des Thrombozyten steuert.**

Seit längerem ist bekannt, dass Thrombozyten grundsätzlich in der Lage sind zu migrieren [8, 52], wobei die zugrundeliegenden Mechanismen hierzu aber weitgehend unverstanden blieben. In Migrationsassay wurde vor einigen Jahren gezeigt, dass Thrombozyten zur ungerichteten Migration befähigt sind und dass fMLP (formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) chemotaktische Wirkung auf Thrombozyten ausübt, ohne dass die Regulationsvorgänge dieses Phänomens bekannt wären. In den vorgelegten Arbeiten konnten wir erstmals zeigen, dass Thrombozyten gezielt entlang eines SDF-1- Gradienten (Stromal cell-derived factor 1) migrieren können und dass es sich hierbei um einen CXCR4-receptor, PI3-kinase und G-Protein vermittelten Signalweg handelt [16]. Durch spezifische Inhibition der genannten Signalstellen konnte die SDF-1-vermittelte Migration wirkungsvoll gehemmt werden (Abb. 1). Weiterhin konnten wir nachweisen, dass es unter dem Einfluss von SDF-1 zu einer Aktivierung (Phosphorylierung) wichtiger Zytoskelettregulatoren wie WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) kommt, die an der Steuerung der Migration mitwirken. Die Wirkung von SDF-1 auf die Migrationsfähigkeit wurde zuvor eindrucksvoll für Megakaryozyten [14] und andere Stammzellen gezeigt und gilt als wesentliches Chemokin für die Homingfunktion von Stammzellen [51]. SDF-1 kommt nicht nur als externer Ligand vor, sondern wird zusätzlich in thrombozytären Vesikeln gespeichert, die durch Aktivierung freigesetzt werden können [33]. Dadurch können Thrombozyten diese



chemotaktisch wirksamen Mediatoren auch selbst freisetzen. Interessanterweise finden sich hohe Konzentrationen von SDF-1 in atherosklerotischen Plaqueläsionen [1], was chemotaktische Wirkung auf SDF-1-sensible Zellen wie Thrombozyten und Leukozyten ausüben könnte. Thrombozyten könnten auf diese Weise in entzündlich veränderte Gefäßabschnitte mit hoher SDF-1-Konzentration einwandern und subendotheliale Infiltrate ausbilden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass Thrombozyten in der Lage sind, in vitro und in vivo aktiviertes Endothel zu überwinden und subendothelial zu akkumulieren. Durch Aktivierung des Endothels mit IL-1 $\beta$  konnte die Transmigration von Thrombozyten durch die Endothelschicht zusätzlich gesteigert werden. Die Extravasation von Thrombozyten wurde auch für andere inflammatorische Erkrankung wie z.B. die Multiple Sklerose und allergische Reaktionen nachgewiesen [27]. Auf diese Weise könnten migratorisch aktive Thrombozyten durch die gezeigten Mechanismen an der Progression von Gefäßläsionen, aber möglicherweise auch an Reendothelialisierungsvorgängen mitwirken. So wurde gezeigt, dass Thrombozyten neben pro-inflammatorischen Zellen auch Stammzellen rekrutieren, die sich im Kontakt mit Thrombozyten in Endothelzellen differenzieren und zur Reendothelialisierung führen können [48].

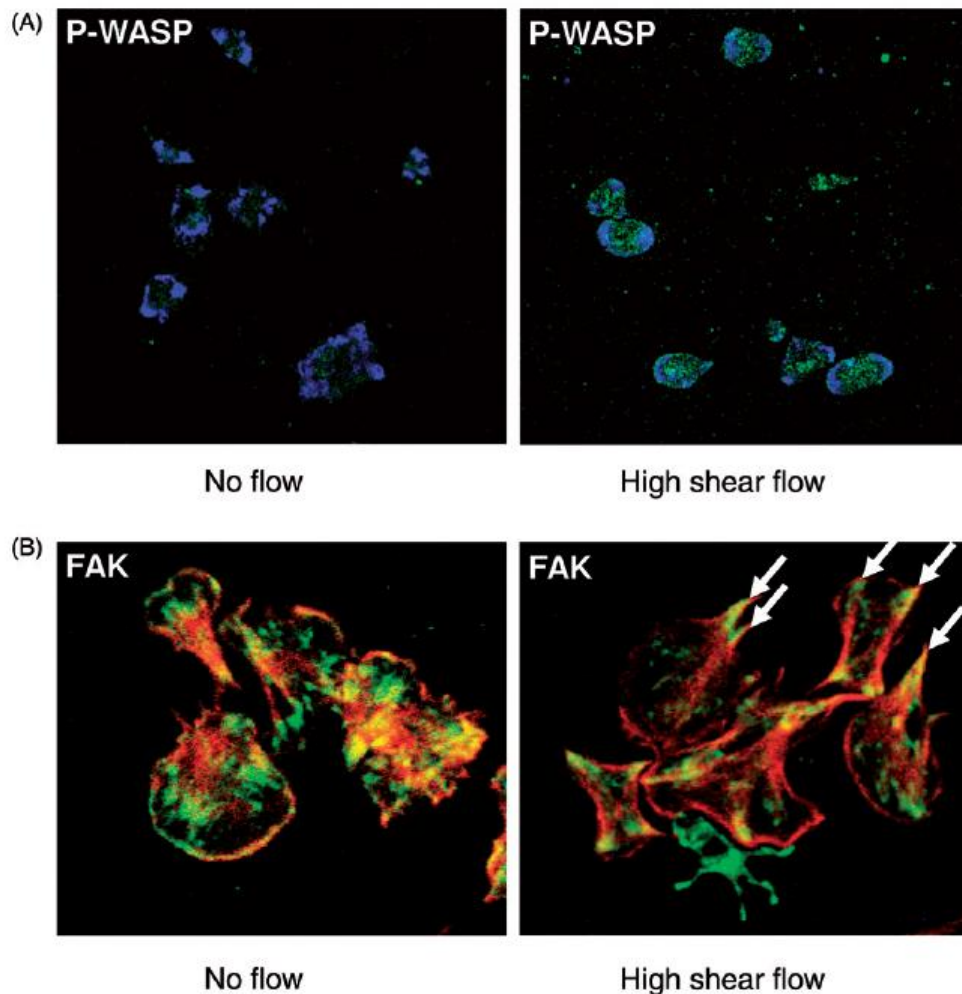


**Abbildung 1:** Durch Zugabe von SDF-1 konnte eine signifikante Zunahme der Transmigration von Thrombozyten im Transmigrationsexperiment induziert werden. Durch Inhibition des CXCR4-rezeptors (AMD3100), G-Proteinen (PTX, Pertussis-Toxin) und der PI-Kinase (LY294002, Wortmannin) oder durch Aufhebung des SDF-1 Gradienten (SDF1-SDF1) konnte die Migration wirkungsvoll gehemmt werden (a) (\*  $p \leq 0,05$ ). Im Bild gezeigt ist die Anzahl transmigrierter Thrombozyten an der Unterseite der Transmigrationsmembran (b) [aus 16]

### 3.2. Fluss-induzierte Thrombozytenmigration

Neben der chemotaktischen Induktion und Regulation der Migration können auch flussbedingte Scherkräfte die gerichtete Migration von Zellen induzieren [24, 29]. Insbesondere für Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass sich diese in Richtung der Scherkräfte polarisieren und so dynamisch entsprechend der

Flussbedingungen ausrichten [2]. Diese Fähigkeit ist für Prozesse der Reendothelialisierung und zur Anpassung auf dynamische Prozesse in der Zirkulation von großer Wichtigkeit. Die Übertragung der mechanotaktischen Signale der Scherkräfte auf die Zellfunktion ist aber noch unvollständig verstanden. In unserem Projekt konnten wir zeigen, dass Thrombozyten unter Flussbedingungen gerichtet entlang der Flussrichtung migrieren. Thrombozyten heften sich dabei zunächst passiv oder unter Chemokineinfluss (z.B. SDF-1) an extrazelluläre Matrix und können sich dann koordiniert entlang der Flussrichtung fortbewegen [19]. Dabei nahm die Anzahl der migrierenden Thrombozyten mit zunehmenden Flussraten zu. Im Flusskammerexperiment konnten wir zeigen, dass Thrombozyten vermehrt in Bereichen mit hoher SDF-1 Konzentration adhären, wie sie im Plaquetgewebe und in Arealen hoher entzündlicher Aktivität vorkommen [1]. Unter dem Einfluss von SDF-1 beobachteten wir im Thrombozyten eine lokale Ansammlung des Arp2/3-Komplexes, der die Regulation des Zytoskeletts steuert. Unter Flussbedingungen erfolgte eine Polarisierung und Translokation der Focal-adhesion kinase (FAK) und eine Aktivierung des Wiskott-Aldrich Syndrome Proteins (WASP), die ebenfalls die dynamische Anpassung des Zytoskeletts regulieren (Abb. 2). Diese molekularen Merkmale wurden auch in anderen Zellen unter Flussbedingungen beobachtet [29, 37]. Durch diese Mechanismen könnten sich Thrombozyten unter Flussbedingungen entsprechend des Flussprofils dynamisch ausrichten oder eine Strecke intravasal durch Migration überbrücken. Diese Fähigkeiten könnten im Hinblick auf die zentrale Hämostasefunktion des Thrombozyten zum primären Verschluss von Gefäßläsionen und die dynamischen Eigenschaften von Thromben (clot retraction) von Interesse sein.

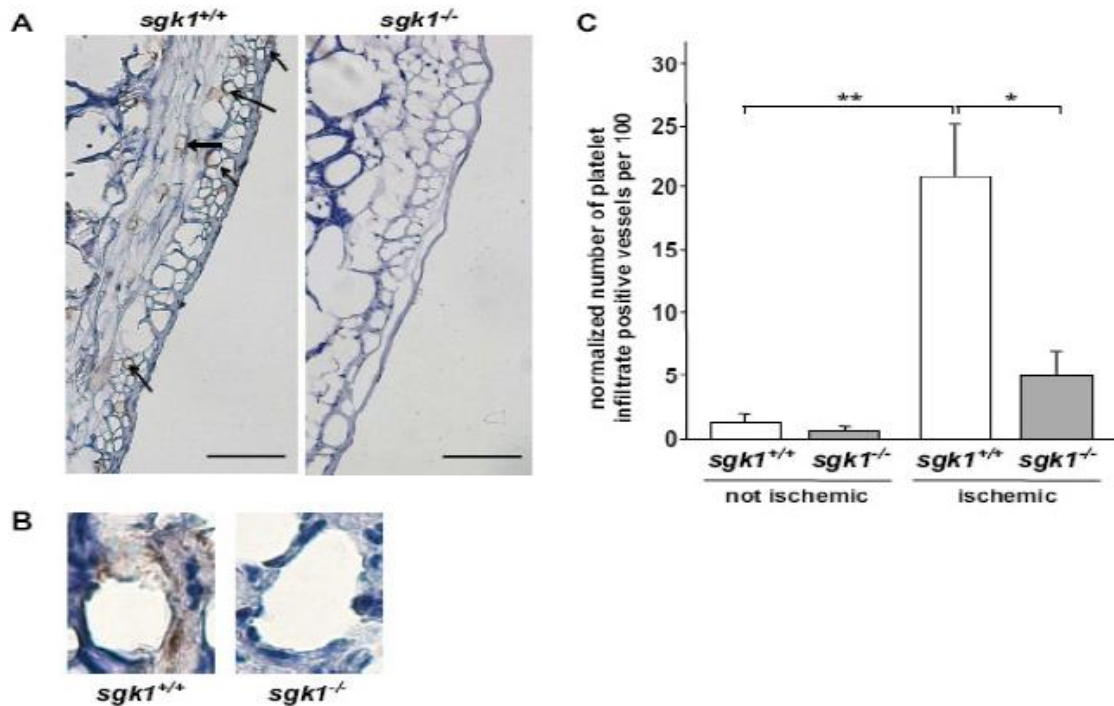


**Abbildung 2:** Unter dem Einfluss mechanischer Scherkräfte (High shear flow) kommt es zu einer Aktivierung (Phosphorylierung) des Zytoskelettregulators WASP (oben) und zur Polarisierung und Translokation der Fokal-adhesion Kinase (FAK) (Pfeile) im Thrombozyten [aus 19]

### 3.3. Ionenkanal-vermittelte Regulation der Thrombozytenmigration

Ein präzise koordinierter Ionenfluss durch Ionenkanäle ermöglicht die für die Migration erforderlichen Veränderungen des Zytoskeletts [45]. In eigenen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass die Migrationsfähigkeit des Thrombozyten und die Aktivierung des Zytoskeletts von einer Regulation durch

Ionenkanäle abhängt [44]. Dabei scheinen Calciumkanäle und Kaliumkanäle eine wesentliche Rolle zu spielen. Für die Vermittlung der Calciumregulation im Thrombozyten wurde der SOCE-Kanal Orai identifiziert, der in direktem Zusammenhang mit der Serum- und Glukokortikoid induzierbaren Kinase 1 (sgk1) steht [3]. In anderen Zellen wirkt die sgk1 direkt an der Ionenkanalregulation von Natrium- und Calciumkanälen mit [26, 35, 38]. Die sgk1, die vermutlich durch Translokation von Ionenkanälen an der Steuerung der Ionenkanalaktivierung beteiligt ist, wurde in unserer Arbeit als zentrale Schaltstelle für die Regulation der Thrombozytenmigration identifiziert [43]. Thrombozyten, die aus Mäusen mit genetischem knock-out für die sgk1 isoliert wurden, zeigten eine signifikant reduzierte Migrationsfähigkeit in Richtung eines SDF-1-Gradienten in vitro. Ebenso fielen Thrombozyten mit defizienter sgk1 durch eine deutlich reduzierte Phosphorylierung von WASP nach Aktivierung mit SDF-1 und eine vermehrte Phosphorylierung von Vinculin auf. Beides deutet auf eine eingeschränkte Zytoskelettaktivierung und damit reduzierte Migrationsfähigkeit hin. Für andere Zellen wurde gezeigt, dass eine verminderte Phosphorylierung von Vinculin zu einer Zunahme der Migrationsfähigkeit führt [23]. Im Mausmodell konnten wir demonstrieren, dass Thrombozyten aus Mäusen mit genetischen knock-down der sgk1 eine reduzierte Transmigrationsfähigkeit durch das Endothel aufwiesen [43] (Abb. 3). Hierzu wurde durch eine vorübergehende Gefäßischämie eine inflammatorische Reaktion erzeugt und anschließend die Infiltration von sgk<sup>+/+</sup> und sgk<sup>-/-</sup>-Thrombozyten in die Gefäßwand quantitativ ausgewertet. Damit konnte neben den gezeigten Signalwegen die sgk1 als eine weitere wichtige Signalstelle für die Regulation der Thrombozytenbeweglichkeit charakterisiert werden.



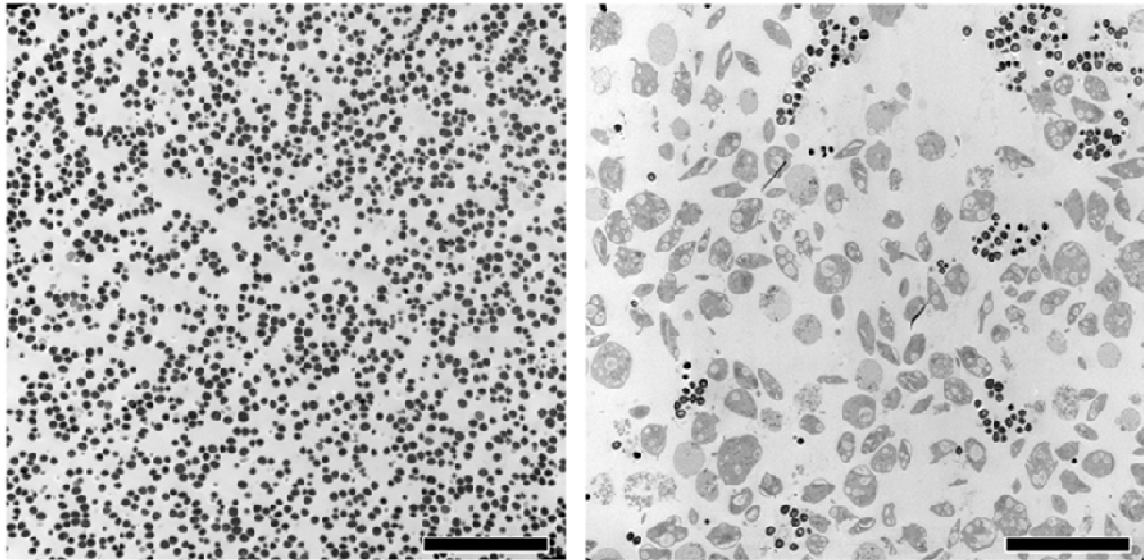
**Abbildung 3:** Thrombozyten mit genetischem knock-out der *sgk1* (*sgk1*<sup>-/-</sup>) zeigen eine signifikant reduzierte Transmigration in post-ischämisch veränderte Gefäßabschnitte in vivo (C) (\*  $p \leq 0,05$ ). Die Thrombozyteninfiltrate wurden nach Entnahme der Gefäße mit einem Thrombozyten-spezifischen Antikörper (anti-GPIb) mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht (A). (B) Ausschnittsvergrößerung der Thrombozyteninfiltrate in der Gefäßwand [aus 43]

#### 4. Charakterisierung der Rolle des Thrombozyten hinsichtlich Funktionen der angeborenen Immunität zur Abwehr bakterieller Infektionen

*Thrombozyten hemmen das Wachstum von Bakterien durch Freisetzung von Beta-defensin 1 und induzieren die Freisetzung von NETs aus Neutrophilen.*

Thrombozyten üben neben ihrer primären hämostatischen Funktion auf vielfältige Weise Funktionen im System der angeborenen Immunität aus. Thrombozyten exprimieren eine Reihe von Proteinen mit antibakterieller Wirkung wie z.B. tPMPs

(Thrombin-induced platelet microbicidal proteins) und wirken so an der Abwehr bakterieller Infektionen mit [21, 46, 55]. Kürzlich wurde auch die Fähigkeit des Thrombozyten zur Antigenpräsentation erstmalig beschrieben [6]. Durch Koinkubation von *S. aureus* mit humanen Thrombozyten konnte das Wachstum von *S. aureus* signifikant gehemmt werden (Abb. 4). Diese und weitere Beobachtungen unterstützen die Vorstellung einer aktiven Rolle des Thrombozyten im System der angeborenen Immunität [46]. Beta-defensin-1, ein Protein mit antibakterieller Wirkung, das typischerweise in Zellen mit Schutzfunktion für Körperoberflächen exprimiert wird, konnte im Rahmen unserer Arbeit erstmals auch im Thrombozyten nachgewiesen werden [17]. Defensine hemmen das Wachstum von Bakterien durch Integration und Porenbildung in die bakterielle Zellwand, was zur Zerstörung der Bakterien führt. Darüberhinaus vermitteln Defensine, wie auch andere antibakterielle Peptide, über verschiedene Rezeptorinteraktionen immunmodulierende Signale. Defensine werden in mehrere Untergruppen unterteilt, wobei  $\alpha$ -Defensine typischerweise von Neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden und  $\beta$ -Defensine von epithelialen Zellen exprimiert werden. Defensine zeichnen sich durch eine sehr effektive bakterizide Wirkung auf gram-positive und gram-negative Erreger aus, was Defensine in den Fokus auch klinischer Forschung zur Entwicklung neuer Antibiotika gerückt hat [40]. Beta-defensin 1, das aus Thrombozyten isoliert wurde, führte in unserer Arbeit zu einer wirkungsvollen Reduktion des Wachstums von *Staphylococcus aureus* ( $p < 0,05$ ), einem häufigen und gefährlichen Erreger der Endokarditis und grampositiven Sepsis.



**S. aureus**

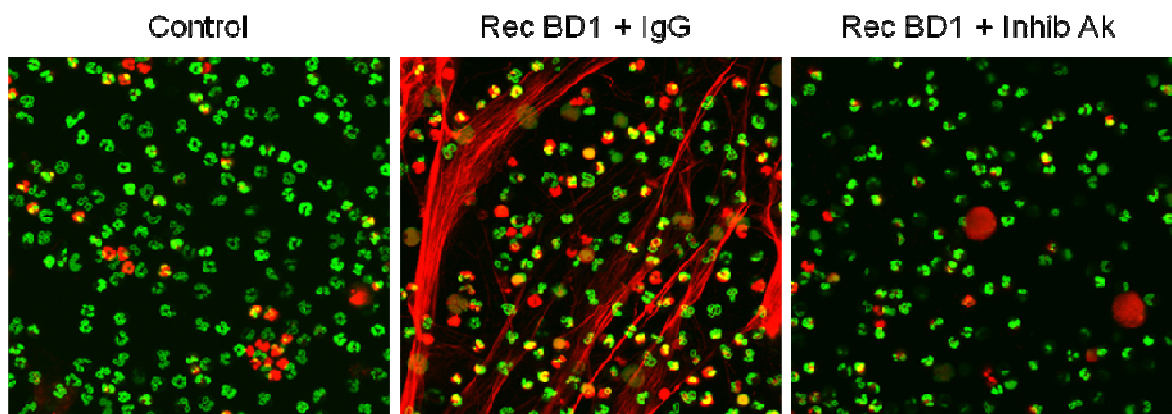
**S. aureus + Thrombozyten**

**Abbildung 4:** Thrombozyten hemmen das Wachstum von *S. aureus*-Bakterien, die aus Patienten mit bakterieller Sepsis isoliert wurden signifikant (Elektronenmikroskopie) [aus 17].

Wir konnten zeigen, dass humanes  $\beta$ -Defensin 1 (hBD1) aus Thrombozyten auch hochwirkungsvoll das Wachstum multiresistenter *S. aureus*-Stämme (MRSA) verhinderte, was das bakterizide Spektrum und Potential von Defensinen unterstreicht. Beta-Defensin 1 wird dabei nicht durch klassische Thrombozytenaktivatoren (TRAP, PAF) freigesetzt, was vermutlich als Sicherungsfunktion gegen akzidentielle Freisetzung der hochpotenten Defensine zu deuten ist. Bakterielle Exotoxine wie  $\alpha$ -Toxin, das als Pathogenitätsfaktor von *S. aureus* sezerniert wird, führen hingegen zur Freisetzung von  $\beta$ -Defensin 1. Als zusätzliche Funktion von  $\beta$ -Defensin 1 konnten wir erstmals nachweisen, dass aus Thrombozyten isoliertes  $\beta$ -Defensin 1 die Freisetzung anti-bakterieller DNA-Strukturen (Neutrophil extracellular traps, NETs) aus neutrophilen Granulozyten induziert [17]. Vorarbeiten hatten nachgewiesen, dass  $\alpha$ -Defensine zur



Steigerung der bakteriziden Wirkung in NETs inkorporiert werden [42]. Weitere Arbeiten zeigten, dass Thrombozyten die Freisetzung von NETs induzieren können, ohne dass jedoch der genaue Mechanismus nachgewiesen werden konnte [7]. Durch Neutralisierung des freigesetzten Beta-defensin 1 aus Thrombozyten, konnte in unserer Arbeit die Bildung von NETs in Neutrophilen Granulozyten nahezu vollständig unterdrückt werden (Abb. 5). Interessanterweise konnte die Freisetzung von NETs nicht durch andere  $\beta$ -Defensine wie z.B.  $\beta$ -Defensin 2 oder 3 induziert werden. Neben einer antibakteriellen Funktion von NETs wurden diese auch vermehrt in inflammatorischen Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes [25], der Präeklampsie [13] und akuter Lungenschädigung beobachtet [4], was sowohl Folge als auch Ursache der Erkrankungen sein könnte. Bislang bleibt ungeklärt, ob die Freisetzung von NETs durch Defensine über einen Rezeptor-vermittelten Prozess erfolgt und welche Rezeptoren hierbei involviert sind. Der Nachweis von  $\beta$ -Defensin 1 im Thrombozyten könnte neue Hinweise für die Rolle des Thrombozyten in der Abwehr von Infektionen und auf mögliche weitere Mechanismen zur Interaktion mit klassischen Immunzellen ergeben.



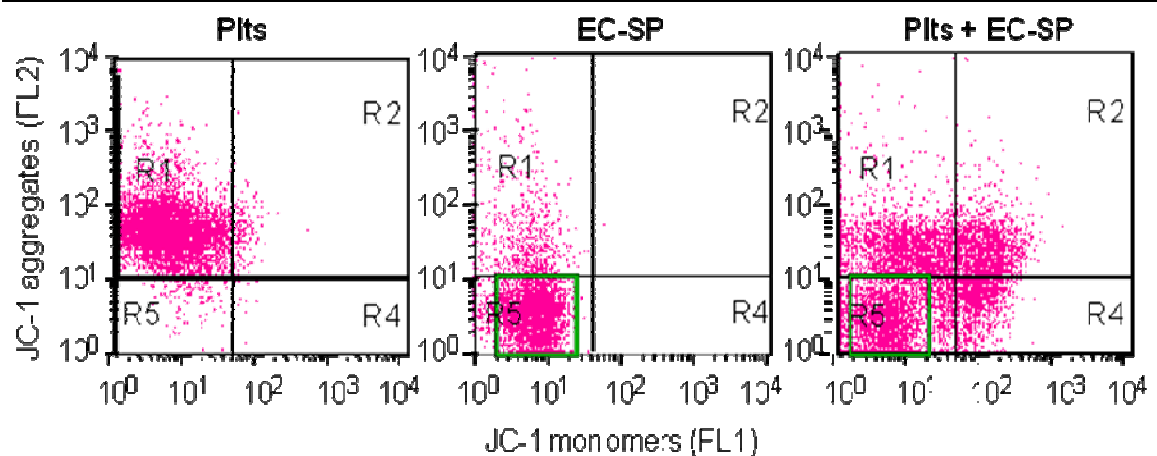
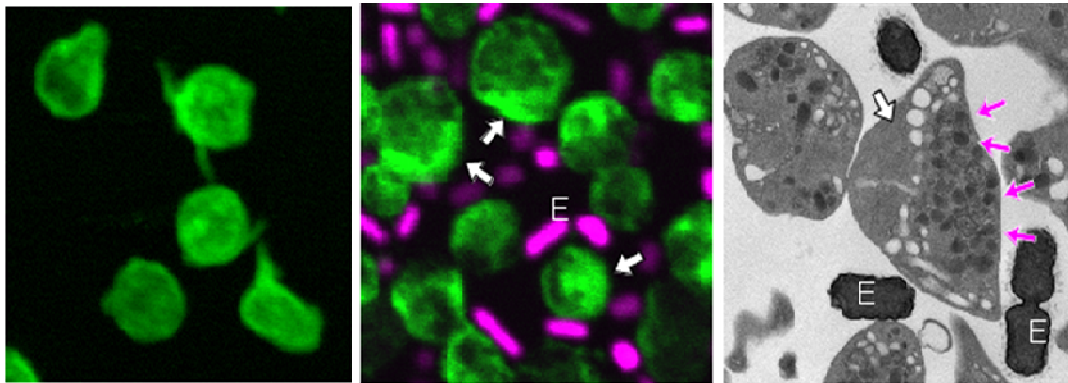
**Abbildung 5:** Beta-defensin 1 (BD1) induziert die Freisetzung von NETs aus Neutrophilen Granulozyten (Mitte), was durch neutralisierende Antikörper gegen BD1 (Inhib Ak) rückgängig gemacht werden kann [aus 17]

## **5. Charakterisierung molekularer Mechanismen des programmierten Zelltodes (Apoptose) im Thrombozyten**

### **5.1. Identifizierung molekularer Signalwege der Thrombozytenapoptose im Rahmen systemischer bakterieller Infektionen**

Die Thrombozytopenie stellt ein zentrales Merkmal systemischer Infektionen wie der Sepsis dar und deren Ausmaß korreliert eng mit der Schwere und dem klinischen Verlauf der Sepsis. Die molekularen Vorgänge, die zur Thrombozytopenie führen, sind jedoch nur unzureichend verstanden. In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten trotz des fehlenden Zellkerns einen programmierten Zelltod (Apoptose) durchlaufen [32]. Dabei wird die Apoptose durch einen intrinsischen Apoptoseweg unter Einbeziehung der Mitochondrien und des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL gesteuert [15]. Für eine Reihe von pharmakologischen Apoptoseinduktoren wurde gezeigt, dass sie Merkmale der Thrombozytenapoptose induzieren können [28, 57]. Auch rekombinante bakterielle Pathogenitätsfaktoren induzieren apoptotische Veränderungen im Thrombozyten [50]. In der vorgelegten Arbeit konnten wir zeigen, dass lebende E. coli-Bakterien in der Lage sind, durch Freisetzung von Exotoxinen wie  $\alpha$ -Hämolysin (HlyA) einen Calpain-vermittelten Signalweg zu aktivieren und so den Abbau von Bcl-xL und den Zelltod im Thrombozyten zu induzieren [18]. Ein beschleunigter Abbau des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL

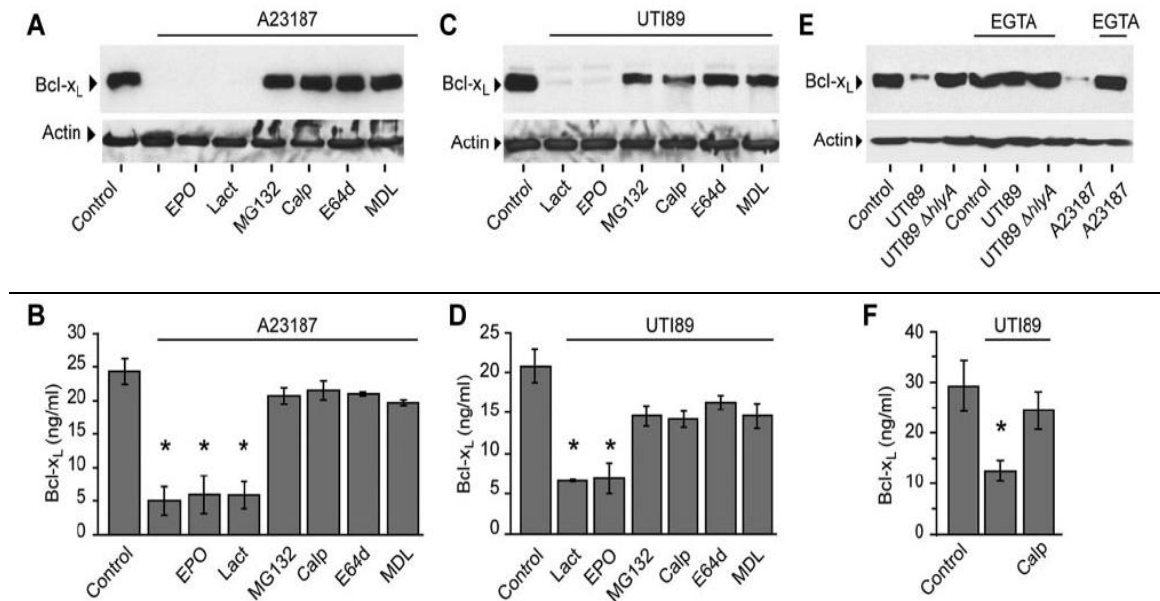
oder dessen Inhibition führt zu einem Übergewicht der proapoptotischen Faktoren wie z.B. Bax und Bak und leitet die Apoptose ein. Wir konnten weiterhin zeigen, dass die Koinkubation von Thrombozyten mit *E. coli* zu einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials und zur Kondensierung des Aktinzytoskeletts als zentrales Merkmal der Apoptose des Thrombozyten führt (Abb. 6).



**Abbildung 6:** Die Koinkubation von Thrombozyten (Plts), die aus Blutproben von Patienten mit bakterieller Sepsis isoliert wurden, mit *E. coli*-Bakterien (E, EC) induziert typische Merkmale apoptotischer Zellen bei den Thrombozyten wie z.B. Kondensierung des Aktinzytoskeletts und Zellschrumpfung (Pfeile, oben) sowie die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials (unten) [aus 18]

Damit konnte ein direkter Einfluss von bakteriellen Sepsiserregern auf die Vitalität des Thrombozyten und ein möglicher Apoptosemechanismus für die Entstehung schwerer septischer Thrombozytopenien aufgezeigt werden. Durch genetische Inaktivierung von HlyA in *E. coli* oder Expression eines funktionslosen HlyA in *E. coli* konnte der pro-apoptotische Effekt rückgängig gemacht werden. HlyA entfaltet seine pathogene Wirkung durch Porenbildung und Freisetzung von intrazellulärem Calcium, sodass wir mittels spezifischer Inhibitoren typischer Calcium-abhängiger Proteasen den proteolytischen Abbauweg untersucht haben. Hier zeigte sich, dass durch Inhibition von Calpain der HlyA-induzierte Abbau von Bcl-xL vollständig rückgängig gemacht werden konnte (Abb. 7). Calpain ist eine Calcium-abhängige Cysteinprotease, die an einer Vielzahl proteolytischer Prozesse und Regulationsvorgänge im Thrombozyten beteiligt ist [22]. Eine Inhibition des ebenfalls bedeutsamen Proteasomkomplexes hatte im Gegenzug keinen Effekt auf den Abbau von Bcl-xL. Wir konnten weiterhin zeigen, dass die proteolytische Wirkung durch Calciumfreisetzung (A23187) induziert und durch Zugabe von Calciumchelatoren wie EGTA rückgängig gemacht werden konnte, was den identifizierten Signalweg unterstützt (Abb. 7). Mehrere Arbeiten zeigten, dass der Mechanismus der Proteolyse als solcher für die Steuerung einer Vielzahl intrazellulärer Funktionen des Thrombozyten bedeutsam zu sein scheint [20]. Genauere Untersuchungen proteolytischer Systeme des Thrombozyten könnten so auch auf andere systemisch wirksame Erkrankung wie die Atherosklerose und assoziierte Akutereignisse wie den Myokardinfarkt ausgeweitet werden. Der hier gezeigte Mechanismus könnte eine Erklärung darstellen, wie sich das infektiöse Milieu der Sepsis auf die Vitalität von Blutzellen auswirkt und zu einem besseren Verständnis der komplexen Mechanismen der bakteriellen Sepsis beitragen. Die

gewonnenen Erkenntnisse bilden die Grundlage dafür, Marker der Thrombozytenapoptose auch bei Patienten mit Sepsis auf ihre Korrelation mit der Schwere der klinischen Erkrankung und auf ihren prognostischen Nutzen untersuchen zu können.

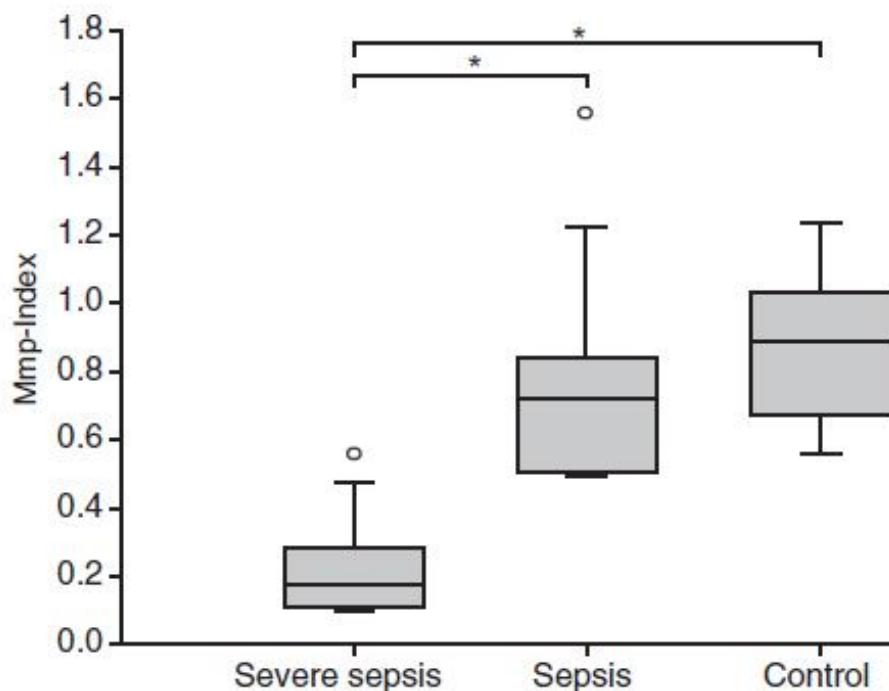


**Abbildung 7:** Nach Inkubation von Thrombozyten mit HlyA-exprimierenden *E. coli*-Bakterien (UTI89) kommt es zu einer raschen Degradation des anti-apoptischen Proteins Bcl-xL und zur Apoptose (C, D). Durch Inhibition der Cysteinprotease Calpain (Calpeptin, E64d, MDL28170, MG132) konnte der Abbau von Bcl-xL wirkungsvoll gehemmt werden (C, D, F). Eine Inhibition des Proteasoms (Lactacystin, Epoxomicin) zeigte keinen inhibitorischen Effekt auf den Abbau von Bcl-xL. Die Degradation von Bcl-xL konnte auch nach Apoptoseinduktion mit dem Calciumionophor A23187 beobachtet werden, die ebenfalls über einen Calpain-vermittelten Prozess abläuft (A, B). Die Degradation erwies sich desweiteren als Calcium-abhängiger Prozess, der durch Calciumkomplexierung (BAPTA) gehemmt werden konnte (\* $p \leq 0,05$ ). [aus 18]

## **5.2. Korrelation von Markern der Thrombozytenapoptose in Patienten mit bakterieller Sepsis hinsichtlich der Korrelation mit der Schwere der Infektion und des klinischen Outcome**

Die Thrombozytopenie ist ein häufiges Merkmal der bakteriellen Sepsis und die Schwere und Prognose der Erkrankung ist eng mit dem Ausmaß der Thrombozytopenie assoziiert [53]. Die Thrombozytopenie ist jedoch in den meisten klinischen Scores zur Abschätzung der klinischen Prognose von Patienten mit bakterieller Sepsis nicht berücksichtigt und molekulare Marker der Thrombozytenfunktion sind kaum untersucht. Vorarbeiten konnten zeigen, dass Merkmale der Thrombozytenapoptose bei Patienten mit bakterieller Sepsis nachzuweisen sind [31, 54]. Untersuchungen der mitochondrialen Integrität zeigen, dass die mitochondriale Atmungskette des Thrombozyten im Rahmen schwerer septischer Infektion kompromittiert ist und dies mit der Schwere der septischen Infektion korreliert [47]. Basierend auf eigenen Vorarbeiten, die zeigten, dass lebende Bakterien den programmierten Zelltodmechanismus des Thrombozyten aktivieren können [18], wurden Merkmale der Thrombozytenapoptose wie z.B. das mitochondriale Membranpotential und das anti-apoptotische Protein Bcl-xL in Patienten mit bakterieller Sepsis quantifiziert und mit Kontrollpatienten verglichen [12]. Die mitochondriale Depolarisation wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 in der Durchflusszytometrie gemessen, woraus ein Mmp-Index berechnet wurde. Ein niedrigerer Mmp-Index zeigt dabei eine vermehrte Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials an. 26 Patienten mit bakterieller Sepsis wurden untersucht, wobei 17 Patienten als schwere Sepsis/septischer Schock (SOFA-Score > 2) und 9 Patienten als Sepsis ohne Organversagen klassifiziert wurden. Als

Kontrollpatienten dienten Patienten, die aufgrund anderer internistischer Erkrankungen notfallmäßig aufgenommen wurden, aber keine Infektion hatten. Bei Aufnahme wurde das mitochondriale Membranpotential bzw. der Mmp-Index in der Durchflusszytometrie gemessen und Bcl-xL mittels Western-Blot quantifiziert. Es zeigte sich, dass das Maß der mitochondrialen Membrandepolarisation und entsprechend die mitochondriale Schädigung sehr gut mit der Schwere der septischen Erkrankung auf der Basis der APACHE II-, SOFA- und SAPS-Scores korrelierte ( $r=0,867$ ,  $r=0,856$ ,  $r=0,839$ ,  $p < 0,0001$ ). Patienten mit schwerer Sepsis wiesen eine signifikant stärkere mitochondriale Membrandepolarisation als Patienten mit Sepsis ohne Organversagen ( $0,18$  [ $0,12 - 0,25$ ] versus  $0,79$  [ $0,49 - 0,85$ ],  $p < 0,0001$ ) (Abb. 8) auf. Patienten mit Sepsis (ohne Organversagen) unterschieden sich dabei nicht von den Kontrollpatienten.

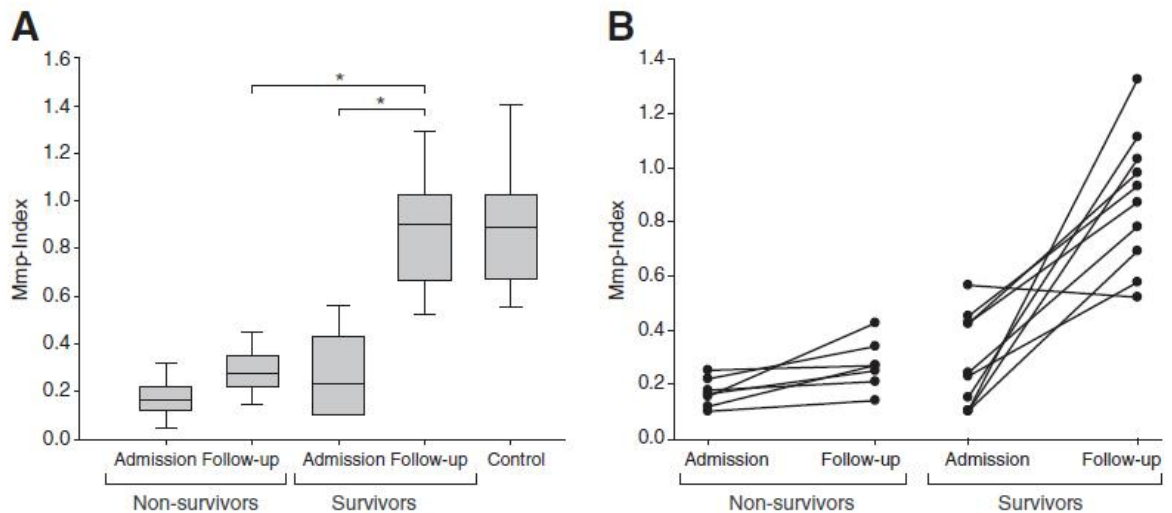


**Abbildung 8:** Thrombozyten aus Patienten mit schwerer Sepsis zeigen eine signifikant stärkere mitochondriale Membrandepolarisation bzw. einen niedrigeren Mmp-Index als Patientin mit Sepsis ohne Organversagen (\*  $p \leq 0,05$ ). Zwischen Patienten mit Sepsis

(ohne Organversagen) und Kontrollpatienten bestand kein signifikanter Unterschied. [aus 12]

Zur Bewertung der Korrelation der thrombozytären Apoptosemarker mit dem klinischen Outcome der Patienten mit schwerer Sepsis wurden dann die Werte der Überlebenden der Sepsis mit denen der Verstorbenen verglichen. Hier zeigte sich bei Klinikaufnahme eine vergleichbar starke Membrandepolarisation, jedoch kam es zu einer vollständigen Erholung des mitochondrialen Membranpotentials bei der Gruppe der Überlebenden, während die Werte bei der Gruppe der Verstorbenen beständig niedrig blieben (0,9 [0,713 – 1,017] versus 0,269 [0,230 – 0,305]) (Abb. 9). Es lässt sich hieraus schlussfolgern, dass die mitochondriale Membrandepolarisation im Thrombozyten ein effektiver Marker für die Schwere der septischen Erkrankung und die septische Aktivität sein könnte. Das anti-apoptotische Protein Bcl-xL war tendenziell ebenfalls in der Gruppe der Patienten mit schwerer Sepsis im Vergleich zu Patienten mit Sepsis ohne Organversagen reduziert. Zusammenfassend könnten molekulare Marker der Thrombozytenapoptose eine wertvolle diagnostische Ergänzung zur Bewertung der Schwere und des klinischen Verlaufs von Patienten mit bakterieller Sepsis darstellen und möglicherweise zukünftig Einzug in die Bewertung klinischer Risikoscores finden.





**Abbildung 8:** Darstellung der mitochondrialen Membrandepolarisation (Mmp-Index) bei Patienten mit schwerer bakterieller Sepsis. Bei Klinikaufnahme zeigte sich eine vergleichbar starke Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials zwischen der Gruppe der Überlebenden und der Verstorbenen. Jedoch kam es in der Gruppe der Überlebenden zu einer nahezu vollständigen Erholung des Membranpotentials auf das Niveau der Kontrollgruppe, wohingegen die Membrandepolarisation in der Gruppe der Verstorbenen fortbestand (A) (\*  $p \leq 0,05$ ). Einzeldarstellung der Patienten beider Gruppen bei Aufnahme (Admission) und im Verlauf (Follow-up) (B). [aus 12]

## **6. Zusammenfassung:**

Thrombozyten stellen das wesentliche Element der zellulären Hämostase dar und interagieren in komplexer Weise mit dem Endothel und dem plasmatischen Gerinnungssystem. Thrombozyten wirken durch Interaktion mit einer Vielzahl von hämatopoetischen Zellen und durch die Freisetzung zahlreicher Chemokine an komplexen vaskulären Prozessen mit. So konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten an der Angiogenese, der Abwehr von bakteriellen Infektionen, der Antigenpräsentation, der Rekrutierung von pro- und anti-inflammatorischer Zellen und an tumor-assoziierten Prozessen beteiligt sind. Dadurch hat sich die Sicht auf den Thrombozyten als reine Zelle der Hämostase deutlich gewandelt, wobei die komplexen Interaktionen und Funktionen des Thrombozyten im Rahmen vaskulärer Inflammation bei weitem noch nicht vollständig verstanden sind. Eine fundierte Kenntnis der „nicht-klassischen“ Thrombozytenfunktionen erscheint daher auch mit Blick auf den häufigen Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern von großer Wichtigkeit.

Im Rahmen der vorgelegten Habilitationsschrift konnten neue Funktionen des Thrombozyten im Rahmen inflammatorischer und infektiöser Prozesse identifiziert werden. Unter Einbeziehung von in vivo- und in vitro-Methoden konnten wir nachweisen, dass Thrombozyten in der Lage sind, entlang eines Chemokingradienten oder durch Flussinduktion zu migrieren und Endothel zu durchwandern. SDF-1 wurde als neuer chemotaktischer Faktor zur gerichteten Migration von Thrombozyten identifiziert, dessen Wirkung durch einen CXCR4-Rezeptor-, G-Protein- und PI3-Kinase-abhängigen Signalweg vermittelt wird. Wir konnten ferner zeigen, dass Thrombozyten unter simulierten Flussbedingungen gerichtet migrieren und es dabei zu einer charakteristischen Aktivierung und

Polarisierung von Zytoskelettregulatoren wie WASP und FAK kommt. Im Rahmen der Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Migrationsfähigkeit von Thrombozyten wesentlich von der Steuerung durch Ionenkanäle abhängt, und dass die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1 (sgk1) hierbei eine wesentliche Rolle spielt. Thrombozyten von Mäusen mit genetischem knock-out der sgk1 zeigten eine deutlich reduzierte Transmigration in die Gefäßwand post-ischämisch veränderter Gefäße.

Bezüglich der Funktion des Thrombozyten bei der Abwehr bakterieller Infektionen konnten wir erstmals zeigen, dass Thrombozyten das antibakterielle Protein  $\beta$ -Defensin 1 exprimieren und dass  $\beta$ -Defensin 1 aus Thrombozyten zu einer wirkungsvollen Hemmung des Wachstums bakterieller Sepsiserreger (*S. aureus*) und zur Freisetzung von Neutrophil extracellular traps (NETs) aus Leukozyten führt. Damit konnte ein weiterer Mechanismus identifiziert werden, durch den Thrombozyten unmittelbar an der bakteriellen Abwehr mitwirken und durch den die bislang ungeklärte Freisetzung von NETs aus Leukozyten erklärt werden könnte.

Die Thrombozytopenie stellt ein wesentliches Merkmal bakterieller Infektionen und der Sepsis dar, wobei die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen nahezu unverstanden sind. Im Rahmen der Arbeit gelang es einen Mechanismus aufzeigen, mit dem lebende Bakterien von Patienten mit bakterieller Sepsis den intrinsischen Apoptoseweg des Thrombozyten aktivieren und zum Zelltod führen. Obwohl Thrombozyten keinen Zellkern besitzen, beweisen Vorarbeiten, dass die Lebenserwartung von Thrombozyten, wie auch in kernhaltigen Zellen, durch das Verhältnis pro- und antiapoptotischer Proteine bestimmt wird und das antiapoptotische Protein Bcl-xL hierbei einen zentralen Stellenwert einnimmt. Wir

konnten zeigen, dass Sepsiserreger wie *E. coli* und *S. aureus* durch die Freisetzung von Exotoxinen einen Calpain-vermittelten proteolytischen Signalweg aktivieren, der in Folge zum beschleunigten Abbau von Bcl-xL und dem thrombozytären Zelltod führt. Auf diese Weise konnte ein unmittelbarer Hinweis erbracht werden, dass Bakterien im Rahmen septischer Prozesse direkt über einen regulierten Prozess auf das Überleben des Thrombozyten einwirken könnten. Zwischen dem Auftreten einer Thrombozytopenie und der Mortalität systemischer bakterieller Infektionen besteht ein enger Zusammenhang ohne dass hierfür molekulare Erklärungen vorliegen. In einer klinischen Untersuchung von Markern der Thrombozytenapoptose in 27 Patienten mit bakterieller Sepsis konnten wir beobachten, dass die Schwere der septischen Erkrankung und das klinische Outcome eng mit der Schädigung der mitochondrialen Funktion des Thrombozyten korrelieren. So normalisierten sich die mitochondrialen Membranpotentialwerte der Thrombozyten in der Gruppe der Überlebenden, während die Membrandepolarisation in der Gruppe der Verstorbenen fortbestand. Basierend auf diesen Erkenntnissen und anderen Vorarbeiten könnten molekulare Marker der Thrombozytenapoptose zukünftig Einzug in die Bewertung und Risikostratifizierung von Patienten mit bakterieller Sepsis finden.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der Habilitationsarbeit neue Mechanismen der Migration, der bakteriellen Infektabwehr und des programmierten Zelltodes bei Thrombozyten identifiziert und damit weiterführende Erkenntnisse zu Funktionen des Thrombozyten im komplexen System vaskulärer Inflammation und Infektion gewonnen werden.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD (2000). The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 86:131-138.
2. Albuquerque ML, Waters CM, Savla U, Schnaper HW, Flozak AS (2000). Shear stress enhances human endothelial cell wound closure in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H293-302.
3. Borst O, Schmidt EM, Munzer P, Schonberger T, Towhid ST, Elvers M, Leibrock C, Schmid E, Eylonstein A, Kuhl D, May AE, Gawaz M, Lang F (2012). The serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) influences platelet calcium signaling and function by regulation of Orai1 expression in megakaryocytes. *Blood* 119:251-261.
4. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney MR (2012). Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 122:2661-2671.
5. Cecchetti L, Tolley ND, Michetti N, Bury L, Weyrich AS, Gresele P (2011). Megakaryocytes differentially sort mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors into platelets: a mechanism for regulating synthetic events. *Blood* 118:1903-1911.
6. Chapman LM, Aggrey AA, Field DJ, Srivastava K, Ture S, Yui K, Topham DJ, Baldwin WM, 3rd, Morrell CN (2012). Platelets present antigen in the context of MHC class I. *J Immunol* 189:916-923.
7. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13:463-469.
8. Czapiga M, Gao JL, Kirk A, Lekstrom-Himes J (2005). Human platelets exhibit chemotaxis using functional N-formyl peptide receptors. *Exp Hematol* 33:73-84.
9. Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS (2005). Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* 122:379-391.
10. Engelmann B, Massberg S (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13:34-45.

11. Gawaz M, Reininger A, Neumann FJ (1996). Platelet function and platelet-leukocyte adhesion in symptomatic coronary heart disease. Effects of intravenous magnesium. *Thromb Res* 83:341-349.
12. Grundler K, Angstwurm M, Hilge R, Baumann P, Annecke T, Crispin A, Sohn HY, Massberg S, Kraemer BF (2014). Platelet mitochondrial membrane depolarization reflects disease severity in patients with sepsis and correlates with clinical outcome. *Crit Care* 18:R31.
13. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S (2005). Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol* 66:1146-1154.
14. Hamada T, Mohle R, Hesselgesser J, Hoxie J, Nachman RL, Moore MA, Rafii S (1998) Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation. *J Exp Med* 188:539-548
15. Kile BT (2009). The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death. *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1:214-217.
16. Kraemer BF, Borst O, Gehring EM, Schoenberger T, Urban B, Ninci E, Seizer P, Schmidt C, Bigalke B, Koch M, Martinovic I, Daub K, Merz T, Schwanitz L, Stellos K, Fiesel F, Schaller M, Lang F, Gawaz M, Lindemann S (2010). PI3 kinase-dependent stimulation of platelet migration by stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Mol Med (Berl)* 88:1277-1288.
17. Kraemer BF, Campbell RA, Schwertz H, Cody MJ, Franks Z, Tolley ND, Kahr WH, Lindemann S, Seizer P, Yost CC, Zimmerman GA, Weyrich AS (2011). Novel anti-bacterial activities of beta-defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *PLoS Pathog* 7:e1002355.
18. Kraemer BF, Campbell RA, Schwertz H, Franks ZG, Vieira de Abreu A, Grundler K, Kile BT, Dhakal BK, Rondina MT, Kahr WH, Mulvey MA, Blaylock RC, Zimmerman GA, Weyrich AS (2012). Bacteria differentially induce degradation of Bcl-xL, a survival protein, by human platelets. *Blood* 120:5014-5020.
19. Kraemer BF, Schmidt C, Urban B, Bigalke B, Schwanitz L, Koch M, Seizer P, Schaller M, Gawaz M, Lindemann S (2011). High shear flow induces migration of adherent human platelets. *Platelets* 22:415-421.
20. Kraemer BF, Weyrich AS, Lindemann S (2013). Protein degradation systems in platelets. *Thromb Haemost* 110:920-924.

21. Krijgsveld J, Zaat SA, Meeldijk J, van Veelen PA, Fang G, Poolman B, Brandt E, Ehlert JE, Kuijpers AJ, Engbers GH, Feijen J, Dankert J (2000). Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. *J Biol Chem* 275:20374-20381.
22. Kuchay SM, Chishti AH (2007). Calpain-mediated regulation of platelet signaling pathways. *Curr Opin Hematol* 14:249-254.
23. Kupper K, Lang N, Mohl C, Kirchgessner N, Born S, Goldmann WH, Merkel R, Hoffmann B (2010). Tyrosine phosphorylation of vinculin at position 1065 modifies focal adhesion dynamics and cell tractions. *Biochem Biophys Res Commun* 399:560-564.
24. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 100:782-794.
25. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, Meller S, Chamilos G, Sebasigari R, Ricciari V, Bassett R, Amuro H, Fukuhara S, Ito T, Liu YJ, Gilliet M (2011). Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 3:73ra19.
26. Lang F, Bohmer C, Palmada M, Seeböhm G, Strutz-Seeböhm N, Vallon V (2006). (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev* 86:1151-1178.
27. Langer HF, Choi EY, Zhou H, Schleicher R, Chung KJ, Tang Z, Gobel K, Bdeir K, Chatzigeorgiou A, Wong C, Bhatia S, Kruhlak MJ, Rose JW, Burns JB, Hill KE, Qu H, Zhang Y, Lehrmann E, Becker KG, Wang Y, Simon DI, Nieswandt B, Lambris JD, Li X, Meuth SG, Kubes P, Chavakis T (2012). Platelets contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Circ Res* 110:1202-1210.
28. Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, Gyulkhandanyan AV, Mykhaylov S, Freedman J (2009) Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *Lab Invest* 89:374-384
29. Li S, Huang NF, Hsu S (2005). Mechanotransduction in endothelial cell migration. *J Cell Biochem* 96:1110-1126.
30. Lonsdorf AS, Kramer BF, Fahrleitner M, Schonberger T, Gnerlich S, Ring S, Gehring S, Schneider SW, Kruhlak MJ, Meuth SG, Nieswandt B, Gawaz M, Enk AH, Langer HF (2012). Engagement of alphaIIb beta3 (GPIIb/IIIa) with

alphanubeta3 integrin mediates interaction of melanoma cells with platelets: a connection to hematogenous metastasis. *J Biol Chem* 287:2168-2178.

31. Lorente L, Martin MM, Lopez-Gallardo E, Iceta R, Sole-Violan J, Blanquer J, Labarta L, Diaz C, Jimenez A, Lafuente N, Hernandez M, Mendez F, Medina N, Ferrer-Aguero JM, Ferreres J, MC LL, Mora ML, Lubillo S, Sanchez-Palacios M, Montoya J, Ruiz-Pesini E (2011). Platelet cytochrome c oxidase activity and quantity in septic patients. *Crit Care Med* 39:1289-1294.

32. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, Kelly PN, Ekert PG, Metcalf D, Roberts AW, Huang DC, Kile BT (2007). Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 128:1173-1186.

33. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, Hoppe K, Schiemann M, Kennerknecht E, Sauer S, Schulz C, Kerstan S, Rudelius M, Seidl S, Sorge F, Langer H, Peluso M, Goyal P, Vestweber D, Emambokus NR, Busch DH, Frampton J, Gawaz M (2006). Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med* 203:1221-1233.

34. McNicol A, Israels SJ (2008). Beyond hemostasis: the role of platelets in inflammation, malignancy and infection. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 8:99-117.

35. Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Toth G (1999). sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial na<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* 274:16973-16978.

36. Nurden AT (2011). Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 105 Suppl 1:S13-33.

37. Okabe S, Fukuda S, Broxmeyer HE (2002). Activation of Wiskott-Aldrich syndrome protein and its association with other proteins by stromal cell-derived factor-1alpha is associated with cell migration in a T-lymphocyte line. *Exp Hematol* 30:761-766.

38. Palmada M, Poppendieck S, Embark HM, van de Graaf SF, Boehmer C, Bindels RJ, Lang F (2005). Requirement of PDZ domains for the stimulation of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel TRPV5 by the NHE regulating factor NHERF2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *Cell Physiol Biochem* 15:175-182.



39. Patzelt J, Langer HF (2012). Platelets in angiogenesis. *Curr Vasc Pharmacol* 10:570-577.
40. Prado Montes de Oca E (2013). Antimicrobial peptide elicitors: new hope for the post-antibiotic era. *Innate Immun* 19:227-241.
41. Reid VL, Webster NR (2012). Role of microparticles in sepsis. *Br J Anaesth* 109:503-513.
42. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Uehata T, Iwasaki H, Omori H, Yamaoka S, Yamamoto N, Akira S (2012). Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* 12:109-116.
43. Schmidt EM, Kraemer BF, Borst O, Munzer P, Schonberger T, Schmidt C, Leibrock C, Towhid ST, Seizer P, Kuhl D, Stournaras C, Lindemann S, Gawaz M, Lang F (2012). SGK1 sensitivity of platelet migration. *Cell Physiol Biochem* 30:259-268.
44. Schmidt EM, Munzer P, Borst O, Kraemer BF, Schmid E, Urban B, Lindemann S, Ruth P, Gawaz M, Lang F (2011). Ion channels in the regulation of platelet migration. *Biochem Biophys Res Commun* 415:54-60.
45. Schwab A, Nechyporuk-Zloy V, Fabian A, Stock C (2007). Cells move when ions and water flow. *Pflugers Arch* 453:421-432.
46. Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J (2011). Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 11:264-274.
47. Sjovall F, Morota S, Hansson MJ, Friberg H, Gnaiger E, Elmer E (2010). Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis. *Crit Care* 14:R214.
48. Stellos K, Gnerlich S, Kraemer B, Lindemann S, Gawaz M (2008). Platelet interaction with progenitor cells: vascular regeneration or inquiry? *Pharmacol Rep* 60:101-108.
49. Tohidnezhad M, Varoga D, Podschun R, Wruck CJ, Seekamp A, Brandenburg LO, Pufe T, Lippross S (2011). Thrombocytes are effectors of the innate immune system releasing human beta defensin-3. *Injury* 42:682-686.

50. Towhid ST, Nega M, Schmidt EM, Schmid E, Albrecht T, Munzer P, Borst O, Gotz F, Lang F (2012). Stimulation of platelet apoptosis by peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* 113. *Apoptosis* 17:998-1008.
51. Vagima Y, Lapid K, Kollet O, Goichberg P, Alon R, Lapidot T (2011). Pathways implicated in stem cell migration: the SDF-1/CXCR4 axis. *Methods Mol Biol* 750:277-289.
52. Valone FH, Austen KF, Goetzl EJ (1974). Modulation of the random migration of human platelets. *J Clin Invest* 54:1100-1106.
53. Vandijck DM, Blot SI, De Waele JJ, Hoste EA, Vandewoude KH, Decruyenaere JM (2010). Thrombocytopenia and outcome in critically ill patients with bloodstream infection. *Heart Lung* 39:21-26.
54. Yamakawa K, Ogura H, Koh T, Ogawa Y, Matsumoto N, Kuwagata Y, Shimazu T (2013). Platelet mitochondrial membrane potential correlates with severity in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J Trauma Acute Care Surg* 74:411-417; discussion 418.
55. Yeaman MR, Sullam PM, Dazin PF, Bayer AS (1994). Platelet microbicidal protein alone and in combination with antibiotics reduces *Staphylococcus aureus* adherence to platelets in vitro. *Infect Immun* 62:3416-3423.
56. Zarbock A, Singbartl K, Ley K (2006). Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J Clin Invest* 116:3211-3219.
57. Zhang W, Liu J, Sun R, Zhao L, Du J, Ruan C, Dai K (2011). Calpain activator dibucaine induces platelet apoptosis. *Int J Mol Sci* 12:2125-2137.