

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Herz-Kreislaufkrankungen

Klinikum der Universität München

Direktor Prof. Dr. med. Christian Weber

**Die Struktur-Funktionsbeziehung thrombozytärer Chemokine in der  
Atherogenese**



Kumulative Habilitationsschrift zur Erlangung der *venia legendi*  
im Fach Experimentelle Innere Medizin

an der medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Dr. med. Philipp von Hundelshausen

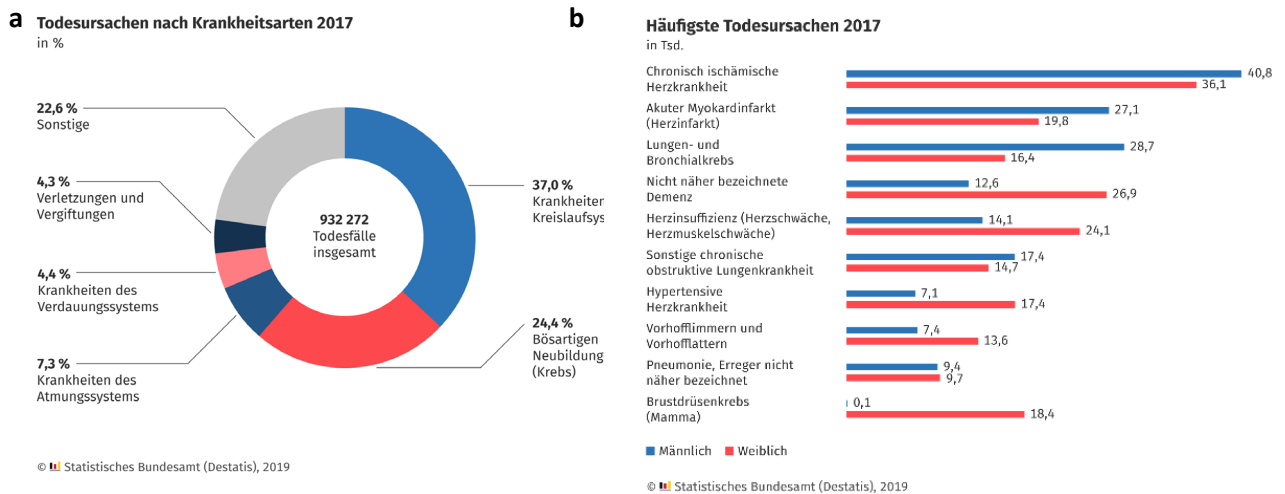
2020

## Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Einleitung .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>Stand der Forschung.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>Atherosklerose: von einer metabolischen zur inflammatorischen Erkrankung .</b>   | <b>5</b>  |
| Pathogenese .....   | 5         |
| Rekrutierung von Immunzellen: die Leukozyten Adhäsionskaskade .....   | 7         |
| <b>Chemokine .....</b>  | <b>9</b>  |
| Die Chemokinstruktur.....   | 9         |
| <b>Chemokinrezeptoren.....</b>  | <b>10</b> |
| Klassifikation .....  | 10        |
| Rezeptoraktivierung .....   | 10        |
| <b>Chemokine und ihre Rezeptoren in der Atherosklerose .....</b>  | <b>12</b> |
| Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen fördern die Atherogenese.....   | 15        |
| <b>Zusammenfassung.....</b>   | <b>17</b> |
| Additive und differenzielle Effekte thrombozytärer Chemokine für den Monozytenarrest .....                                  | 17        |
| CXCL4 und CCL5 formen Heterodimere vom CC-Typ, die Monozytenarrest synergistisch befördern .....                            | 18        |
| CXCL4L1, eine natürliche CXCL4 Variante mit Bindungsdefekt für CCL5 .....   | 19        |
| Thrombozytäre und neutrophile Effektoren in der Atherothrombose .....   | 20        |
| Die Kartierung des Chemokininteraktoms ermöglicht passgenaue Strategien für akute und chronische Entzündungsreaktionen..... | 21        |
| Chemokin-Galektin-Interaktionen: Galektin-3 antagonisiert CXCL12 durch Heterodimerisierung.....                             | 23        |
| <b>Perspektive .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>Verzeichnis eigener wissenschaftlicher Veröffentlichungen .....</b>  | <b>34</b> |
| Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor .....  | 34        |
| Originalarbeiten als Koautor .....  | 34        |
| Übersichtsartikel und Editorials .....  | 38        |
| <b>Danksagung .....</b>   | <b>39</b> |

## Einleitung

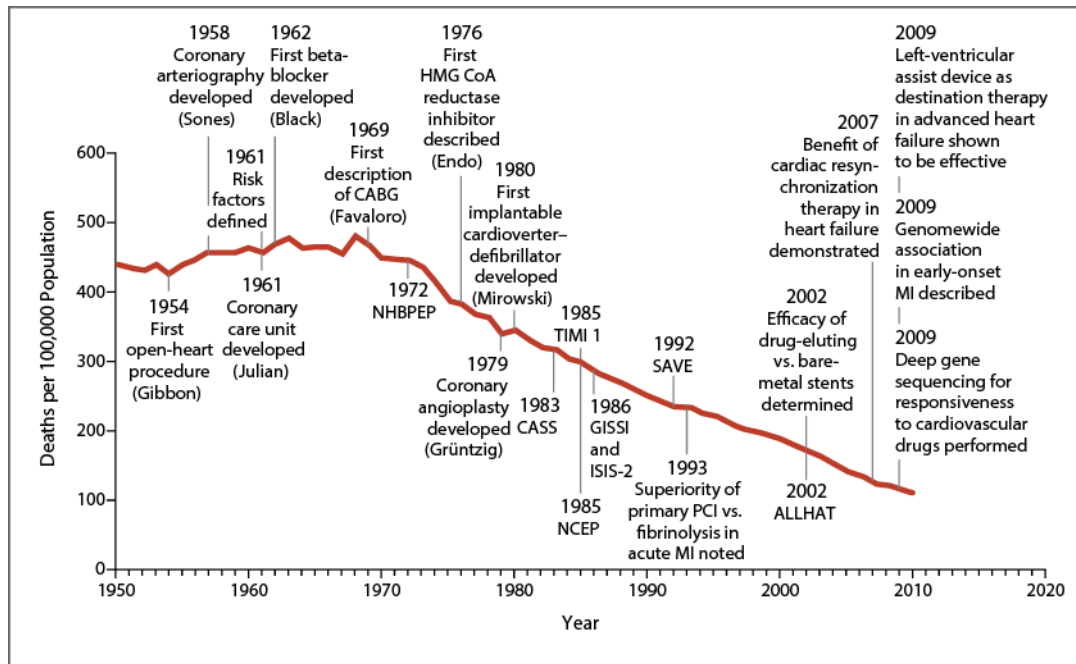
Atherosklerose ist eine vor allem in der industrialisierten Gesellschaft mit zunehmendem Lebensalter sehr häufig vorkommende Veränderung von Arterien, die durch progrediente Stenosen oder Plaqueruptur mit arterieller Thrombose ischämische Erkrankungen verursachen und damit führen auch in Deutschland immer noch Krankheiten des Kreislaufsystems (Abb. 1a) wie ischämische Kardiomyopathie und akuter Myokardinfarkt (Abb. 1b) die Todesursachenstatistik an. In Deutschland sind etwa ein Drittel aller Todesfälle kardiovaskulären Erkrankungen zuzuschreiben (Abb.1). Erst in der frühen Nachkriegszeit wurden mit den US-amerikanischen Framingham Studien systematisch Risikomarker und -faktoren für Herz-Kreislauserkrankungen erforscht. Die Erkenntnisse aus diesen und aus folgenden Studien ermöglichten eine grundlagenwissenschaftliche Analyse der



**Abbildung 1.** Todesursachen nach Krankheitsarten (a) und häufigste Todesursachen in Deutschland 2017. Statistisches Bundesamt (Destatis) 2020 Quelle:

[https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\\_inhalt.html#sprg229156](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#sprg229156)

molekularen und zellulären Mechanismen der Atherogenese, des Myokardinfarktes und des Schlaganfalls. Daraus entwickelten sich in den vergangenen Jahrzehnten weitgehende medizinische Verbesserungen. Besonders die sich vervielfältigenden Optionen eine arterielle Hypertonie medikamentös zu beherrschen, eine effektive Senkung von Cholesterin im Blut durch Statine zu erreichen sowie die sich stetig verbessernden interventionellen Möglichkeiten der koronaren Revaskularisation in Verbindung mit der antithrombozytären Therapie mit Aspirin und einem P2Y12-Hemmer im akuten Myokardinfarkt, haben zu einer deutlichen Abnahme der kardiovaskulären Mortalität geführt (Nabel and Braunwald, 2012).



**Abbildung 2.** Abnahme der kardiovaskulären Mortalität in Verbindung mit dem wissenschaftlichen Fortschritt (Nabel and Braunwald, 2012). Die Zeitkurve zeigt die stetige Abnahme kardiovaskulärer Todesfälle im Verlauf des 20. und frühen 21. Jahrhunderts zusammen mit den größten Errungenschaften in der kardiovaskulären Wissenschaft und Medizin. ALLHAT Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial, CASS Coronary Artery Surgery Study, GISSI Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico, HMG-CoA 1-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, ISIS-2 Second International Study of Infarct Survival, MI myocardial infarction, NCEP National Cholesterol Education Program, NHBPEP National High Blood Pressure Education Program, PCI percutaneous coronary intervention, SAVE Survival and Ventricular Enlargement, and TIMI 1 Thrombolysis in Myocardial Infarction 1.

Dennoch haben sich frühere Prognosen, dass gut eingestellte klassische Risikofaktoren die koronare Herzerkrankung zum Ende des 20. Jahrhunderts verhindern werden als zu optimistisch herausgestellt. Das statistische Bundesamt ermittelte zuletzt, dass in Deutschland im Jahr 2017 Herz-Kreislaufkrankungen, insbesondere die ischämische Kardiomyopathie und der akute Myokardinfarkt mit 37% immer noch den Spitzenplatz aller Todesursachen belegen. Sicherlich werden die etablierten prophylaktischen Maßnahmen bei weitem nicht ausgeschöpft. Darüber hinaus ist aber die Pathogenese der Atherosklerose in ihrer Komplexität nicht vollständig verstanden, so dass es neben der evidenzbasierten Behandlung metabolischer Risiken weitere therapeutische Ansatzpunkte geben muss.

Neben der Ansammlung von Lipiden und Schaumzellen in der Intima ist Atherosklerose durch eine stadienabhängig starkes begleitendes inflammatorisches Infiltrat gekennzeichnet. Sowohl die Schaumzellen, die sich von aus dem Blut ausgewanderten Monozyten ableiten als auch T Zellen charakterisieren Atherosklerose als chronische Entzündung. Es gibt inzwischen kaum einen Zelltyp aus dem Blut, dem nicht eine Beteiligung an der Atherosklerose zugeschrieben wird. Nicht alle haben sich direkt immunhistochemisch ohne weiteres im Plaque nachweisen lassen, wie zum Beispiel neutrophile Granulozyten oder Blutplättchen. Entweder weil sie kurzlebig sind oder sich ihre Rolle an der Entstehung eines Plaques außerhalb der Läsion abspielt.

Eine gezielte Beeinflussung des zellulären Infiltrats könnte ein weiterer wichtiger Baustein sein, atherosklerotische Läsionen zu stabilisieren, zu verhindern oder sogar wieder zurückzudrängen.

In dieser Habilitationsschrift steht die Erforschung von atherosklerotischen Prozessen im Vordergrund, die durch Chemokine beeinflusst werden. Chemokine sind die zentralen Effektoren einer gerichteten zellulären Migration. In der Entzündung betrifft das im Wesentlichen die gerichtete Bewegung der verschiedenen Leukozytentypen. Jede dieser Leukozytenarten exprimiert reifungs- und aktivierungsabhängig ein einzigartiges Profil von Chemokinrezeptoren und anderen, weniger spezifischen Bindungsplätzen, wie zum Beispiel Glykosaminoglykane. Die räumliche und zeitliche Steuerung des leukozytären Infiltrats ist evolutionär zur Immunabwehr von Pathogenen entstanden und muss sehr fein reguliert werden, damit ein schädliches Agens ohne Kollateralschäden beseitigt werden und es zur Resolution mit einer *restitutio ad integrum* kommen kann. Bei Atherosklerose kommt es jedoch nicht zur Resolution, sondern der Entzündungsprozess chronifiziert.

## Stand der Forschung

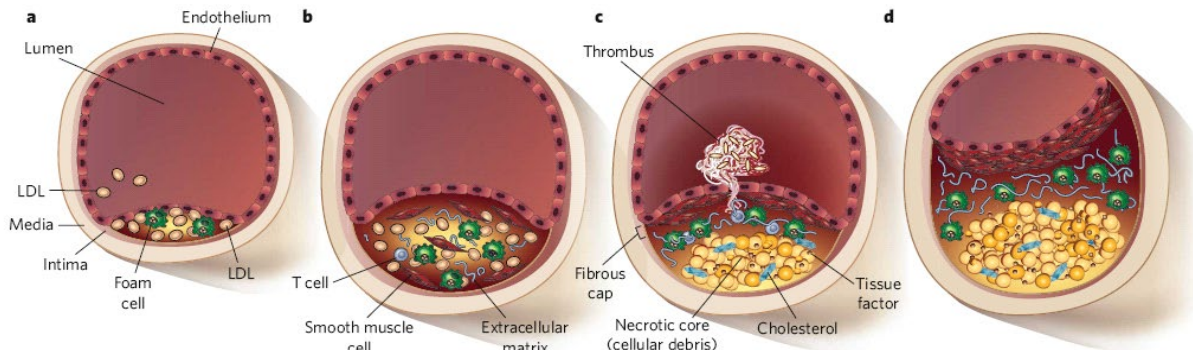
### **Atherosklerose: von einer metabolischen zur inflammatorischen Erkrankung**

Atherosklerose als Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen ist eine an Bedeutung zunehmende Zivilisationskrankheit. Myokard- und Hirninfarkte als ischämische Folgen entwickeln sich global und nicht nur in der westlichen Welt zur führenden Todesursache (Hansson, 2005; Naghavi et al., 2003b). Frühere Prognosen, wonach unter einer adäquaten medikamentösen Therapie gut eingestellte Blutdruck- und Cholesterinwerte die koronare Herzerkrankung zum Ende des 20. Jahrhunderts verhindern werden, haben sich als zu optimistisch herausgestellt.

#### *Pathogenese*

Wissenschaftliche Ergebnisse der letzten Jahre werfen ein neues Licht auf Atherosklerose, die traditionell als hauptsächlich metabolische Erkrankung aufgefasst wurde. Bereits in der Kindheit und mit dem Lebensalter zunehmend, bilden sich in der Intima, der innersten subendothelialen Schicht einer Arterie, *fatty streaks* (McGill et al., 2000; Strong et al., 1999). Diese bestehen aus Akkumulationen intra- und extrazellulärer Lipide, die sich vornehmlich an Gefäßabzweigungen und Orten mit veränderten Flussbedingungen bilden und potentiell reversibel sind oder in fortgeschrittenere atherosklerotische Stadien münden (Abb. 3). Makrophagen nehmen Lipide über *Scavenger-Rezeptoren* auf und differenzieren zu Schaumzellen. Besonders in der Schulterregion eines fortgeschrittenen Plaques finden sich in mikroskopischen Analysen unterschiedliche Immunzelltypen wie z. B. T Zellen, Monozyten und Mastzellen, um nur einige zu nennen (Sary et al., 1995). Moderne Methoden ermöglichen es die zelluläre Zusammensetzung und Genexpression auf dem Niveau einzelner Zellen zu untersuchen. In menschlichen Plaques wurden 18 verschiedene Leukozytentypen der angeborenen und adaptiven Immunantwort gefunden, die übereinstimmend mit den bisherigen Befunden zahlenmäßig überwiegend verschiedene T Zellen und Monozyten/Makrophagen Populationen repräsentierten (Fernandez et al., 2019). Die Zellen im Plaque zeigen im Vergleich zu den entsprechenden zirkulierenden Zellen im Blut deutliche Veränderungen ihrer Genexpression. Unterschiedliche Muster koexistieren, so dass T Zellen im Plaque teilweise aktivierter, differenzierter oder erschöpfter als ihre Mitspieler im Blut vorliegen.

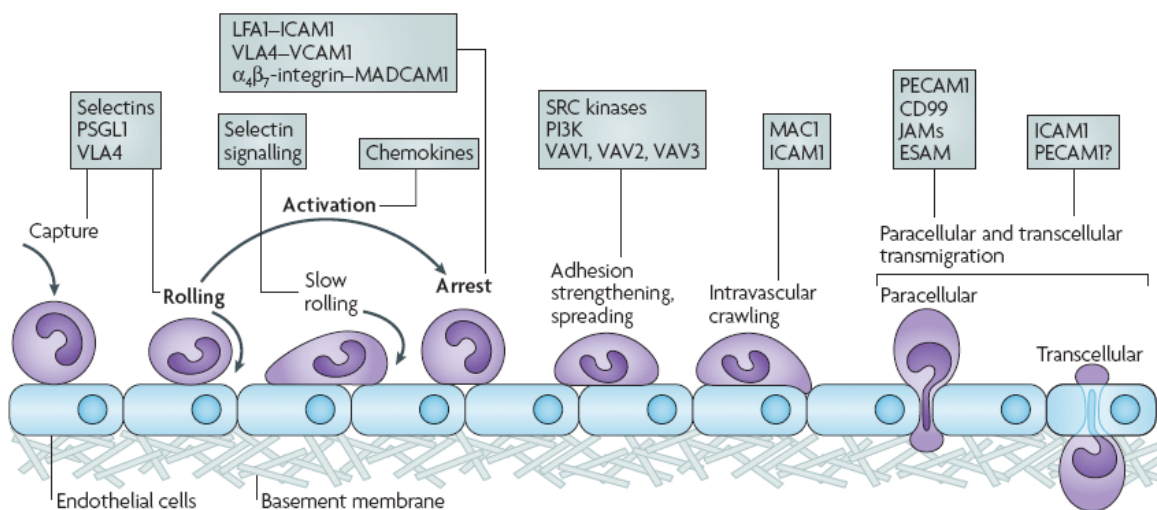
Glatte Muskelzellen vermehren sich in ihrer Nachbarschaft sowohl als eingewanderte Stammzellen als auch *in situ* proliferierend und bilden kollagenreiche extrazelluläre Matrix, die den fibrösen Plaques stabilisieren kann, unter Umständen aber auch nur eine dünne fibröse Kappe bildet. Die Gefahr eines arteriellen Verschlusses entsteht weniger durch die Größe des Plaques und zunehmende Lumeneinengung als vielmehr durch die Plaquezusammensetzung, die die Stabilität oder Vulnerabilität bewirkt (Mann and Davies, 1996). Die entzündliche Aktivität eines Plaques mit der Vielfalt inflammatorischer Zellen, die Proteasen freisetzen und durch Entzündungsmediatoren andere Zellen aktivieren, kann die fibröse Kappe ausdünnen und reißen lassen (Abb. 1). Daraufhin gelangen Teile des nekrotischen Kerns, der prothrombotische Substanzen wie *tissue factor*, aber auch plättchenaktivierenden Matrixmolekülen wie Kollagen und von Willebrand Faktor enthält, in Kontakt mit der Zirkulation und es entsteht eine arterielle Thrombose, die als Ursache für ca. 70% aller koronaren Todesfälle verantwortlich gemacht wird (Naghavi et al., 2003a). Ein okkludierender Thrombus muss jedoch nicht zwingend aus einer Plaqueruptur hervorgehen, denn bereits endotheliale Erosionen können zu Plättchenaktivierung und arterieller Thrombose führen.



**Abbildung 3.** Stadien der Atherogenese (Rader and Daugherty, 2008)

### Rekrutierung von Immunzellen: die Leukozyten Adhäsionskaskade in der Atherosklerose

Ein zentraler Mechanismus, wie Hyperlipidämie Atherosklerose verursacht, ist die entzündliche Aktivierung von Endothelzellen. ApoB100 enthaltende LDL-Partikel gelangen in den subendothelialen Raum und werden über ihre Affinität zu Proteoglykanen dort zurückgehalten (Skalen et al., 2002). Proteolytische und oxidierende Prozesse verändern die LDL-Partikel zu pro-inflammatorischem oxLDL und Phospholipiden, die die Endothelzellen zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen veranlassen. Adipositas, Rauchen, Hypercholesterinämie, Insulinresistenz oder generell Entzündung aktivieren Endothelzellen. Die veränderte Endotheloberfläche ist Teil einer komplexen Maschinerie, die gezielt die transendotheliale Migration verschiedener Leukozytenklassen beeinflusst (Abb. 4) (Ley et al., 2007).



**Abbildung 4.** Die Leukozyten Adhäsionskaskade (Ley et al., 2007)

Vier zentrale Schritte, die Zellen aus der Blutzirkulation in das umgebende Gewebe lenken, sind identifiziert worden. Die einzelnen molekularen Mechanismen können hierbei überlappen: (1) Rollen und *tethering*, (2) Adhäsion, (3) Adhäsionsverstärkung, (4) transendotheliale Migration (Springer, 1994). Die gängige Hypothese besagt, dass die Rekrutierung zirkulierender Blutzellen über die luminalen Seite erfolgt. Die Erkenntnisse in der Leukozytenadhäsionskaskade sind überwiegend in Modellen mit niedriger Flussgeschwindigkeit wie z. B. in postkapillären Venolen

entstanden, die für viele Entzündungsmodelle relevant sind, sich andererseits aber in einigen molekularen Mechanismen von der Rekrutierung im arteriellen Modell unterscheiden.

Der initiale Schritt der Adhäsionskaskade wird von Selektinen vermittelt, die als E- und P-Selektin von Endothelzellen und als L-Selektin von den meisten Leukozytenklassen exprimiert werden. Sie binden glykosylierte Proteinliganden, insbesondere PSGL-1, und vermitteln die Rekrutierung von Leukozyten aus der Zirkulation (*capturing*) über schnelle, scherflussabhängige Assoziations- und Dissoziationsphasen, die zu einer anfangs ruckhaften (*tethering*), dann kontinuierlich rollenden Bewegung führen.

Durch die Bindung an endotheliale Adhäsionsmoleküle der Superimmunglobulinfamilie stellen Integrine wichtige Arrestmoleküle dar, die den Schritt vom Rollen zum Arrest in der Adhäsionskaskade vermitteln (Ley et al., 2007). Integrine sind Proteine mit einer komplexen Konformationsdynamik, die sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzen. 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten kombinieren sich zu 24 eigenständigen Integrinen, die in multiplen biologischen Prozessen wesentliche Rollen spielen (Hynes, 2002). An der Leukozytenrekrutierung sind hauptsächlich  $\beta_2$ - und  $\alpha_4$ -Integrine beteiligt. Insbesondere LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$ ) und VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ) spielen in dieser Hinsicht in der Atherogenese eine wichtige Rolle. Durch intrazelluläre Signaltransduktion verändern Integrine die Konformation ihrer extrazellulären Domänen und gruppieren sich auf der Zelloberfläche (*inside-out signaling*).

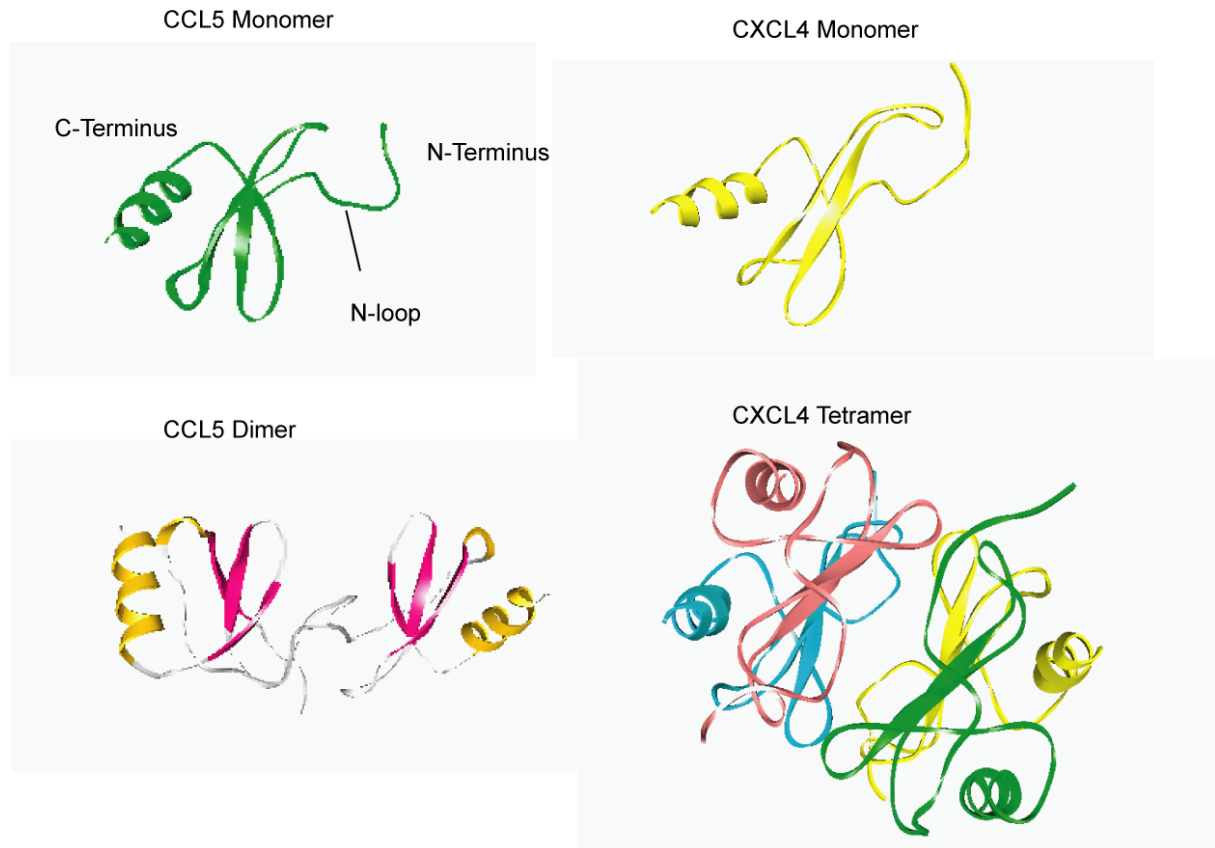
Chemokine spielen eine wesentliche Rolle für die Aktivierung von Integrinen durch *inside-out* Signaltransduktion (Laudanna and Alon, 2006). Chemokine sind eine Gruppe 8-10 kD großer Proteine mit knapp 50 Mitgliedern, die als homöostatisch oder inflammatorisch klassifiziert werden können und trotz ihrer Strukturhomologie eine immense Vielfalt an biologischen Prozessen steuern und einen wesentlichen Teil der atherogenen Zellrekrutierung beeinflussen (Weber et al., 2004). Sie können von aktivierten Endothelzellen sezerniert, aber auch mittels Transzytose von der abluminalen Seite aufgenommen und luminal präsentiert werden (Middleton et al., 2002). Überdies werden sie von aktivierten Plättchen und anderen Immunzellen sezerniert. Chemokine binden und aktivieren Chemokinrezeptoren auf den rollenden Zellen. Die folgenden intrazellulären Signalwege führen zu mehreren Konformationsänderungen von Integrinen, die den Zellarrest vorwiegend über die gesteigerte Affinität zu ihren Liganden, aber auch durch Steigerung der Avidität durch Gruppierung mehrerer Integrine bewerkstelligen.



## Chemokine

Unter den vielen intensiv untersuchten Entzündungsmediatoren, die eine Rolle in der Atherogenese spielen, haben besonders Chemokine großes Interesse gefunden (Zernecke et al., 2008). Sie gehören zu einer Gruppe mit etwa 50 Mitgliedern, die eine hohe Vielfalt an biologischen Funktionen erfüllen.

### Die Chemokinstruktur



**Abbildung 5.** Tertiär- und Quartärstrukturen von CCL5 und CXCL4. CC- und CXC-Chemokine ähneln sich in ihrer Monomer- unterscheidet sich aber deutlich in ihrer Quartär-Struktur.

Die einzelnen Mitglieder lassen sich nach ihrer Primärstruktur in zwei große Gruppen gliedern. Bei CC-Chemokinen sind die zwei N-terminalen Cysteinreste unmittelbar benachbart, bei den CXC-Chemokinen sind sie durch eine beliebige Aminosäure getrennt. Diese cysteinbasierte Klassifizierung hat zu einer Nomenklatur geführt, die das Strukturmotiv CC oder CXC mit der bereits bestehenden Gennummer kombiniert, so dass beispielsweise das Chemokin RANTES (Regulated upon Activation Normal T Cell Expressed and Secreted, Genname SCY5) CCL5 benannt wurde (Zlotnik and Yoshie, 2000). Es gibt Ausnahmen von diesem System, nämlich Fraktalkin (CX3CL1), dessen Cysteine von drei Aminosäuren getrennt werden und Lymphotaktin (XCL1), das nur ein N-terminales Cystein enthält. Die N-terminalen Cysteine bilden Disulfid-Brücken mit Cysteinen in der Betafaltblattregion, so dass sich die charakteristische Tertiärstruktur ausbildet, die auch als *Greek key* bezeichnet wird (Abb. 5). Die aus NMR-Experimenten und aus der Kristallographie gewonnenen Strukturen von Chemokinen zeigen bis auf möglicherweise monomeres MCP-3 (CCL7) (Kim et al., 1996) für beide Familien

oligomere Proteine, überwiegend Dimere. Interessanterweise dimerisieren CC-Chemokine ausnahmslos durch Assoziation ihrer N-termini während CXC-Chemokine sich über Apposition beider  $\beta$ -Faltblätter zu einem 6-fach  $\beta$ -Faltblatt dimerisieren (Clowse and Gronenborn, 1995). Welche Bedeutung diese regelhafte Struktur auf die biologische Funktion von Chemokinen hat ist Gegenstand aktueller Forschung. Sicher ist, dass Monomere wie für CXCL8 gezeigt, ihre volle Rezeptoraktivierungsfähigkeit behalten können (Rajaraman et al., 1994). Im Gegensatz zu den meisten Proteinen sind Chemokine über einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren insgesamt positiv geladen. Diese positive Ladung führt zu einer hohen Affinität für negativ geladene Glykosaminoglykane, wie etwa Heparan- oder Chondroitinsulfat. Für ihre Funktion ist dies als wichtige Andockstelle auf Zelloberflächen und für ihre Oligomerisierung von essentieller Bedeutung (Proudfoot et al., 2017).

## **Chemokinrezeptoren**

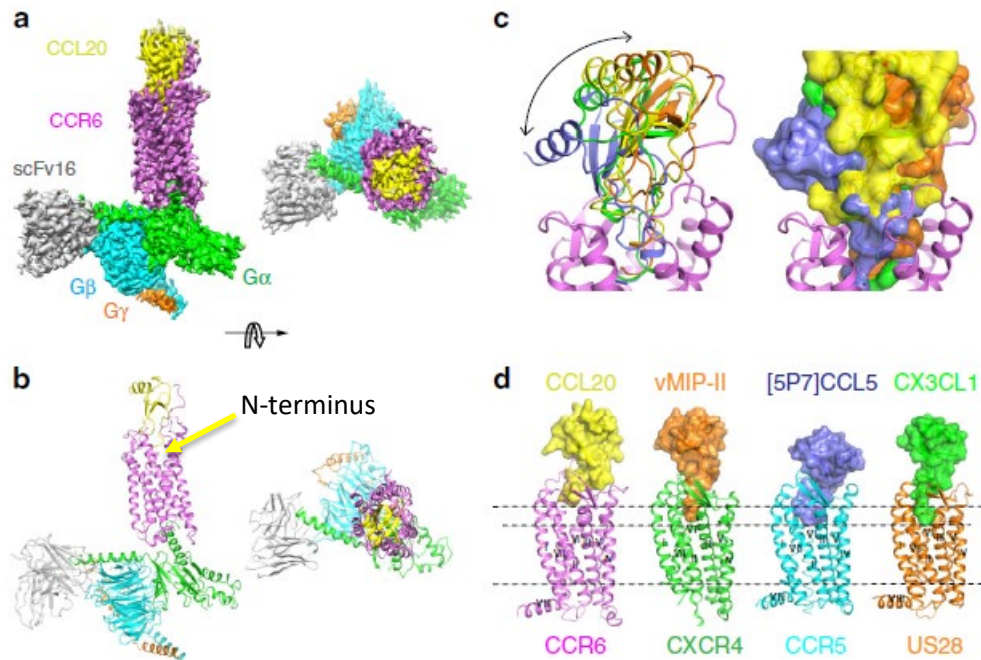
### *Klassifikation*

Die biologische Aktivität von Chemokinen wird maßgeblich über Chemokinrezeptoren vermittelt. Diese sind an G-Proteine, meistens  $G_i$ , gekoppelt. Wie bei anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) kann es durch Bindung des Liganden zu einer Kippschaltbewegung des Rezeptors (*toggle switch* Modell) kommen, der zum Andocken und zur Aktivierung eines G-Proteins führt (Katritch et al., 2013). Darüber hinaus sind unabhängig von G-Proteinen,  $\beta$ -Arrestine und Rezeptorkinasen für bestimmte Signale und Rezeptorinternalisierung wichtig. Die etwa 20 verschiedenen Rezeptoren werden je nach dem Bindungsverhalten der jeweiligen Chemokinfamilie in CXC- und CC-Rezeptoren unterteilt und der Rezeptor für XCL1 wird XCR1 genannt, der für CX3CL1 CX3CR1 (Murphy et al., 2000). Obwohl CC-Chemokine verschiedene Rezeptoren aktivieren können, sind es immer Rezeptoren der CC-Gruppe. Das gleiche gilt für CXC-Chemokine. So bindet und aktiviert CCL5 die Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5, während CXCL8 die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 aktiviert (Blanchet et al., 2012). Umgekehrt ist es häufig, dass ein Rezeptor mehrere Chemokinliganden besitzt, die aber alle der gleichen Familie angehören. So wird CCR5 von von CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL4L1, CCL4L2, CCL5, CCL7, CCL11 und CCL13 erkannt während beispielsweise CXCR2 von CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 und MIF erkannt wird (Blanchet et al., 2012). Es gibt Chemokin bindende Rezeptoren, die ebenfalls 7-transmembran Domänen besitzen, aber keine klassischen intrazellulären Signale vermitteln, weil sie nicht an G-Proteine koppeln und Mitglieder beider Chemokinfamilien binden und eigens als atypische Chemokinrezeptoren (ACKR) klassifiziert wurden (Bachelier et al., 2014). Der Duffy Blutgruppenantigen-Rezeptor (ACKR3) ist ein solcher Vertreter. Er bindet CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CCL14, CCL16, CCL17, CCL22, CXCL1, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL11 und CXCL13. Nach wie vor gibt die große kombinatorische Vielfalt Anlass zu Spekulationen über den Sinn dieser scheinbaren Redundanz.

### *Rezeptoraktivierung*

Aus Stabilitätsgründen ist es bis jetzt noch nicht gelungen die dreidimensionale Struktur eines Wildtyp-Chemokinrezeptors in Komplex mit einem löslichen Wildtyp-Chemokin aufzuklären. In Verbindung mit ortho- und allosterischen kleinmolekularen Antagonisten oder durch Verwendung von gentechnischen Varianten, die zu stabilen Komplexen führen, ist es jedoch gelungen Strukturen von CXCR4, CCR2, CCR5 und zuletzt auch CCR6 G-Protein assoziiert zu erhalten (Qin et al., 2015; Wasilko et al., 2020; Zheng et al., 2017; Zheng et al., 2016). Der

unstrukturierte N-terminus des Chemokins taucht in den Rezeptor ein (Abb. 5 und 6a,b). Überlagerungen der verschiedenen Komplexe enthüllen gravierende Unterschiede im Bindungsmodus und wie tief das Chemokin in die Bindungstasche eintaucht (Abb. 1c,d).



**Abbildung 6.** Struktur des Komplexes von CCR6/CCL20-Go-scFv16 mittels Kryo-Elektronenmikroskopie im Vergleich mit anderen Chemokin-GPCR Komplexen (Wasilko et al., 2020).

a CCR6, magenta; CCL20 gelb, Gαo, grün; Gβ cyan, Gγ, orange; scFv16 grau.

b Modell des CCR6/CCL20-Go Komplexes wie in (a).

c Überlagerung mehrerer Chemokin-Chemokinrezeptor Strukturen (CCR5/[5P7]CCL5, CXCR4/vMIP-II, US28/CX3CL1) zeigt gravierende Unterschiede der Chemokinbindung

d Vergleich der Tiefe der jeweiligen orthosterischen Tasche, in die der Chemokin-N-terminus eintaucht. CCL20 bindet in einer flachen Tasche mit minimalen Kontakten zum 7-

Transmembrankern. Die gepunkteten Linien zeigen die Membrangrenze und die tiefste Eintauchposition von US28/CX3CL1

Für die Rezeptoraktivierung wird ein zwei- oder dreistufiges Modell angenommen, bei dem der Chemokinkörper den ersten Bindungsschritt an den N-terminus des Rezeptors vermittelt. Erst anschließend taucht der bewegliche N-terminus mit dem *N-loop* (Abb. 5) in den Rezeptor ein und verursacht über eine Konformationsänderung (*toggle switch*) die eigentliche Rezeptoraktivierung (Bhusal et al., 2020). Manche Chemokinrezeptoren liegen konstitutiv als Dimere vor, wie etwa CXCR4. Die kombinatorische Vielfalt der Chemokin-Chemokinrezeptor-Wechselwirkungen wird zusätzlich dadurch erhöht, dass Chemokinrezeptoren als Heteromere vorliegen können, so dass über Konformationsänderungen Chemokine auch Rezeptoren aktivieren können, an die sie primär nicht binden (Thelen et al., 2010).

## **Chemokine und ihre Rezeptoren in der Atherosklerose**

LDL-Cholesterin kann die Expression und Sekretion von CCL2 (MCP-1) in Endothel- und glatten Muskelzellen induzieren (Cushing et al., 1990). Diese Erkenntnis führte zu ersten Untersuchungen über die Bedeutung von Chemokinen für die Entstehung von Immunzellinfiltraten in der experimentellen Atherosklerose. CCL2 und sein Rezeptor CCR2 waren die ersten Mitglieder der Chemokin-Rezeptor-Familie, deren zentrale Stellung in der Monozytenrekrutierung entdeckt wurde. Ihre Defizienz vermindert die Größe der Plaques und die Zahl der Monozyten in atherosklerotischen Läsionen (Boring et al., 1998; Gosling et al., 1999; Gu et al., 1998). Diese Befunde lösten eine Welle nachgeschalteter Experimente aus und die Bedeutung von Chemokinen und ihrer Rezeptoren ist inzwischen nicht nur für Monozyten sondern auch für u. a. T Zellen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten herausgearbeitet worden (Weber and Noels, 2011). Neben der CCL2-CCR2 Achse wurde die pathogenetische Relevanz von CXCL8-CXCR2 (Boisvert et al., 2006; Boisvert et al., 1998) und CX3CL1 (Fraktalkin)/ CX3CR1 auf Monozyten charakterisiert (Combadiere et al., 2003; Lesnik et al., 2003; Teupser et al., 2004). Monozyten existieren in zwei Hauptgruppen, die sich anhand ihrer Chemokinrezeptoren in inflammatorische klassische Monozyten einteilen lassen (in der Maus Ly6Chi, im Menschen CD14++), die CCR2 und CX3CR1 exprimieren und residente nicht-klassische Monozyten, die über CCR5 in den Plaque einwandern (Tacke et al., 2007). Die verschiedenen Chemokinrezeptoren ergänzen sich dabei gegenseitig, so dass CX3CR1 unabhängig von CCR2 für die Einwanderung von Monozyten in den Plaque wichtig ist und ein kombiniertes Fehlen dieser Rezeptoren die Entstehung von Plaques im Tiermodell praktisch vollständig verhindern (Combadiere et al., 2008; Saederup et al., 2008). Im Menschen existiert eine CX3CR1-Mutante (M280), die zu funktionellen Einbußen mit verringerter CX3CL1-abhängiger Adhäsion von Monozyten führt. In vergleichenden Kohortenstudien waren Menschen mit dieser angeborenen Variante vor kardiovaskulären Ereignissen besser geschützt (McDermott et al., 2003; Moatti et al., 2001). Einwandernde Monozyten sind in der Atherosklerose nicht notwendigerweise proatherogen. In Regressionsmodellen, wo atherosklerotische Aorta transplantiert wird, ist die Einwanderung und Differenzierung von inflammatorischen Monozyten in M2 Makrophagen beschrieben worden, die auch über CCR2 und CXCR1 gesteuert wird (Rahman et al., 2017). Das bedeutet, dass entsprechende CKR-Antagonisten sowohl die Entstehung aber gleichzeitig auch die Regression von Atherosklerose behindern würden.

Neben CX3CL1 sind auch CCR4 bindende Chemokine CCL22 und CCL17 in humanen Plaques nachweisbar (Greaves et al., 2001). Die atherogene Wirkweise von CCL17, das von dendritischen Zellen (DC) sezerniert wird, ist nicht - wie zu vermuten wäre - durch die direkte Rekrutierung von CCR4 positiven T Zellen vermittelt, sondern vor allem durch Apoptose regulatorischer T Zellen (Treg) (Weber et al., 2011).

CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) ist ein weiteres Chemokin, welches an den klassischen CKR CXCR4 und den atypischen Rezeptor CXCR7 (ACK3) bindet und in der Atherogenese eine Rolle spielt. Genetische Befunde aus genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) gaben ein signifikantes Signal für den CXCL12 Locus. Die relevanten Polymorphismen waren mit erhöhten CXCL12 Plasmakonzentrationen verbunden (Farouk et al., 2010). Anfängliche Hinweise für protektive Effekte von CXCL12 kamen aus einer klinischen Studie, die erniedrigte Konzentrationen von CXCL12 im Plasma von Patienten mit KHK und deutlicher noch bei instabiler Angina pectoris im Vergleich zu gesunden Kontrollen fand (Damas et al., 2002). Auch die Mobilisierung von

endothelialen Progenitorzellen und hämatopoietischen Progenitoren aus dem Knochenmark, die bei Gefäßverletzung über thrombozytär sezerniertes CXCL12 zu einer schnelleren Heilung beitragen passten zu einer eher protektiven Rolle (Massberg et al., 2006; Peled et al., 1999). Dazu steht im Widerspruch, dass nach einer Gefäßverletzung CXCL12 für eine gesteigerte Neointimabildung durch verstärktes Einwandern von Vorläufern glatter Muskelzellen verantwortlich ist (Sata et al., 2002; Schober et al., 2003). Inzwischen gibt es klare Belege für proatherogene Effekte von CXCL12 durch eine Mendelsche Randomisierungsstudie (Sjaarda et al., 2018). Die augenscheinlich widersprüchlichen Ergebnisse könnten durch zell-, bzw. gewebsspezifische Effekte und Expressionsmuster von CXCL12 und seinen Rezeptoren erklärt werden. CXCL12 wird stark im Knochenmark von CAR Zellen (CXCL12 Abundant Reticular cells) gebildet (Sugiyama et al., 2006), während in peripheren Geweben Endothelzellen als Quelle für die proatherogenen Effekte verantwortlich sind (Doring et al., 2019). Woher der überwiegende Teil des im Blutplasma zirkulierenden CXCL12 stammt, ist noch nicht abschließend geklärt. Die Quelle ist nicht bei Blutzellen oder Thrombozyten zu suchen, denn im hämatopoietischen Knockout sind die Plasmaspiegel unverändert (Doring et al., 2019). Dennoch spielt die Expression von CXCL12 sowie der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 in Thrombozyten und die Deposition von CXCL12 auf der Thrombozytenoberfläche eine Rolle für kardiovaskuläre Erkrankungen beispielsweise im akuten Koronarsyndrom, wo es den Aktivierungsgrad der Thrombozyten widerspiegelt (Rath et al., 2014; Stellos et al., 2009).

Neben CXCL12 exprimieren Thrombozyten weitere Chemokine wie CXCL4 und CCL5 (Karshovska et al., 2013). Die Aminosäuresequenz von CXCL4 (Plättchenfaktor 4, PF4) wurde erstmals 1977 als erstes Mitglied der Chemokinfamilie entdeckt, wobei die starke Affinität und die neutralisierenden Eigenschaften gegenüber Heparin im Vordergrund standen, da CXCL4 eher pleiotrope als klassisch chemotaktische Effekte ausübt (Deuel et al., 1977). Die initial geschilderte Chemotaxis von Neutrophilen und Monozyten bei hohen Konzentrationen von CXCL4 sind möglicherweise durch Kontaminationen mit anderen, zu diesem Zeitpunkt noch nicht entdeckten Chemokinen wie CCL5 oder CXCL7 geschuldet, die bei der Isolation aus dem Plasma nicht abgetrennt wurden (Brandt et al., 1989; Walz and Baggiolini, 1989). CXCL4 wird hauptsächlich in Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert. Daneben ist inzwischen in spezifischen Unterarten von Makrophagen im Plaque ebenfalls eine deutliche Expression von CXCL4 detektiert worden (Cochain et al., 2018; Gleissner et al., 2010a). Im Kontrast zu den übrigen chemotaktisch wirksamen Chemokinen, die bereits bei niedrigen nanomolaren Konzentrationen Migration auslösen, findet man eine relevante biologische Aktivität für CXCL4 erst ab 100-fach höheren Konzentrationen, so dass die Relevanz der CXCL4 Sekretion von Immunzellen im Vergleich zu Thrombozyten, die massiv CXCL4 aus ihren  $\alpha$ -Granula freisetzen noch unklar bleibt (von Hundelshausen et al., 2007). Das Produkt einer nicht-allelen Genvariante von CXCL4, CXCL4L1, wurde aus Thrombozytenkonzentraten isoliert und aufgereinigt (Struyf et al., 2004). Beide Proteine unterscheiden sich in nur drei Aminosäuren in der C-terminalen  $\alpha$ -Helix aber erheblich in der Sequenz des Signalpeptides, was möglicherweise zu einer unterschiedlichen intrazellulären Regulation der Expression und subzellulären Lokalisation führt mit Konsequenzen für die Art der Sekretion (Lasagni et al., 2007). Auch im Hinblick auf die intrazellulären Signalwege hebt sich CXCL4 von anderen Chemokinen ab, denn bisher ist kein Rezeptor mit hoher Affinität für CXCL4 bekannt. Eine der zuerst entdeckten Eigenschaften von CXCL4 war die hohe Affinität für Heparin und heparin-ähnliche Glykosaminoglykane, die an Proteoglykane auf Zellmembranen gekoppelt als Korezeptoren fungieren und für die biologische Aktivität wichtig sind (Petersen et al., 1998). CXCL4 beeinflusst eine Reihe verschiedener Zellen wobei die nicht-chemokinähnlichen

Funktionen überwiegen (von Hundelshausen et al., 2007). CXCL4 verlängert das Überleben von Stamm- und Progenitorzellen und ist ein Negativregulator für die Megakaryopoese (Han et al., 1997; Han et al., 1990). Überdies besteht eine antiproliferative Aktivität für Endothelzellen und Fibroblasten durch Inhibition der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF, die zumindest einen Teil der angiostatischen und antitumorale Wirkung von CXCL4 erklärt (Gengrinovitch et al., 1995; Maione et al., 1990; Tanaka et al., 1997; Watson et al., 1994).

CXCL4 fördert die angeborene Immunabwehr in der Bekämpfung von Bakterien durch Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Stimulation unspezifischer Phagozytose in Monozyten und Makrophagen (Pervushina et al., 2004). Der immunhistochemische Nachweis von CXCL4 in atherosklerotischen Läsionen korreliert mit klinischen Parametern und der Knockout führt zu geringerer experimenteller Atherosklerose (Pitsilos et al., 2003; Sachais et al., 2007). Aktivierte Thrombozyten setzen Chemokine frei und CXCL4 wird auf entzündetem und atherosklerotisch verändertem Endothel immobilisiert und bindet auch an Monozyten und Makrophagen, wo es für Atherosklerose kritische Differenzierungsprozesse auslöst, die zu einem eigenen Makrophagensubtyp M4 führen, der sich von M1- und M2-polarisierten Makrophagen unterscheidet (Gleissner et al., 2010a; Gleissner et al., 2010b; Huo et al., 2003; Scheuerer et al., 2000).

Auf der Suche nach spezifisch exprimierten T-Zell-Genen wurde die kodierende Sequenz von CCL5 in einer cDNA Bibliothek aus aktivierten T-Zellen isoliert und initial mit dem Akronym RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted) belegt (Schall et al., 1988). Dass CCL5 nicht selektiv von T-Zellen exprimiert wird, wurde durch den Nachweis eines chemotaktisch aktiven Proteins aus Thrombozyten offensichtlich, das nach Sequenzierung als CCL5 identifiziert wurde (Kameyoshi et al., 1992). Inzwischen ist die Sekretion von CCL5 aus vielen verschiedenen Zelltypen nach entzündlicher Aktivierung durch IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  gefunden worden. Im Unterschied zu CXCL4 besitzt CCL5 in geringerem Ausmaß pleiotrope Effekte. Durch Bindung und Aktivierung der Rezeptoren CCR1 und CCR5 werden Monozyten und T-Zellen rekrutiert. CCL5 wurde als Dimer vom CC-Typ kristallisiert, *in vitro* werden allerdings unter physiologischem pH konzentrationsabhängig Tetramere und höhergradige Oligomere und hochmolekulare Aggregate gefunden (Shaw et al., 1994; Skelton et al., 1995). Die negative Ladung der Glutamatreste an der Position 26 und 66 sind essentiell an dieser homophilen Interaktion beteiligt, wobei die Mutation von Glutamat 66 zu einer Mutante (E66A) mit maximal dimerer und an der Position 26 (E26A) zu maximal tetramerer Oligomerisierung führt (Czaplewski et al., 1999). Die Methylierung des N-terminalen Threonin 7 verhindert die N-terminale Anlagerung und Bildung des CC-Dimers, so dass diese Mutante eine monomere Struktur aufweist (Proudfoot et al., 2003). Positiv geladene Aminosäuren im 40er Bereich zwischen dem zweiten und dritten  $\beta$ -Faltblattstrang, die auch als BBXB-Motiv bezeichnet werden, sind ebenfalls an der Oligomerisierung beteiligt und sind für die hohe Affinität für negativ geladene Glykosaminoglykane (GAG) wie z. B. Heparin verantwortlich (Proudfoot et al., 2001). *In vitro* sind diese CCL5-Mutanten mit Defekten in der Oligomerisierung und/oder GAG-Affinität in ihrer Fähigkeit Rezeptoren zu aktivieren und Chemotaxis auszulösen nicht eingeschränkt (Proudfoot et al., 2001). *In vivo* Rekrutierungsexperimente belegen jedoch, dass diese Mutanten keinen oder nur einen geringen chemotaktischen Effekt auslösen, da die Möglichkeit, einen haptotaktischen Gradienten zu bilden, fehlt. Die Rezeptoraktivierung und -spezifität übt CCL5 maßgeblich über den N-terminus aus.

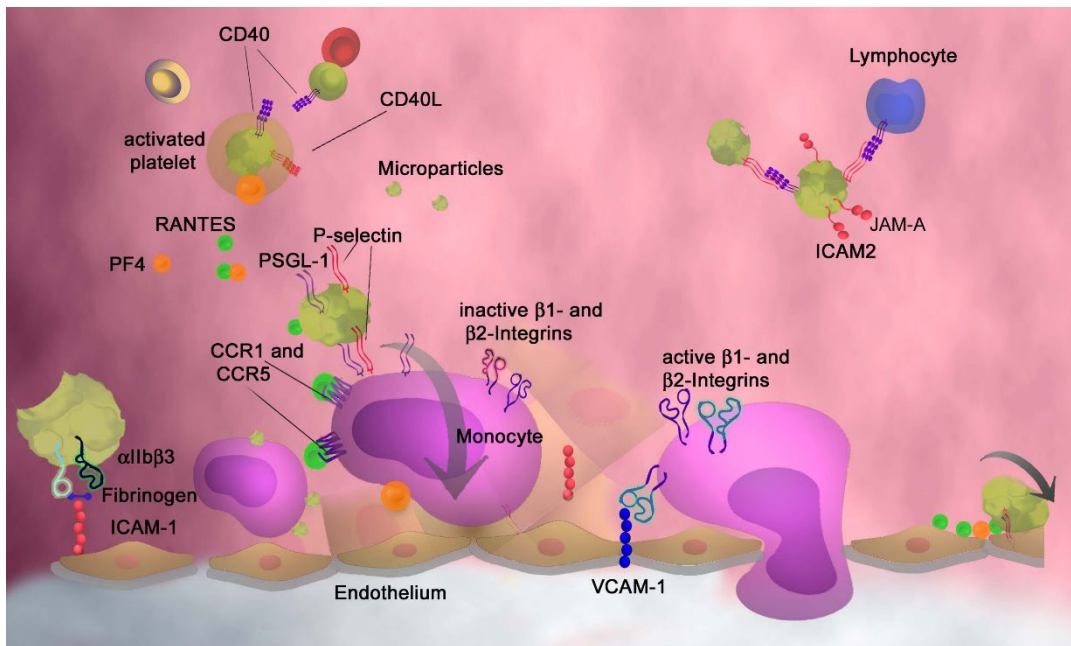
Deletionen oder Änderungen in dieser Region führen zu verminderter Rezeptoraktivierung (Gong et al., 1996). Ein potenter CCL5-Antagonist (Met-RANTES) entsteht, wenn bei der Aufreinigung des rekombinanten Proteins das N-terminale Methionin nicht abgespalten wird. Die Rezeptorbindung bleibt unverändert, ohne dass jedoch Signaltransduktion stattfinden kann (Proudfoot et al., 1996). Die parenterale Applikation von Met-RANTES führt im LDLR<sup>-/-</sup>-Mausmodell zu reduzierter Makrophageninfiltration und Atherosklerose (Veillard et al., 2004). Die genetische Defizienz von CCR5 schützt vor experimenteller Atherosklerose, aber nicht in frühen sondern erst in späten Stadien (Quinones et al., 2007). Interessanterweise ist CCR1 als zweiter wichtiger Rezeptor für CCL5 auf Monozyten und T-Zellen atheroprotektiv, so dass sich bei Transplantation CCR1-negativen Knochenmarks die Atherogenese beschleunigt (Potteaux et al., 2005). Das unterstreicht die Relevanz der unterschiedlichen Chemokinrezeptoren für das gleiche Chemokin in aufeinanderfolgenden Phasen der Atherogenese.

### *Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen fördern die Atherogenese*

Die Rolle der Thrombozyten in der kardiovaskulären Physiologie ist ein zweischneidiges Schwert. Einerseits sind sie in der primären Hämostase und bei Reparaturvorgängen nach Gefäßverletzungen unabdingbar, andererseits sind sie die entscheidende zelluläre Komponente, die arterielle Thrombosen verursacht und damit Schlaganfälle und Herzinfarkte (Ruggeri, 2002). Neben ihrer Funktion in der Hämostase sind Thrombozyten zelluläre Bindeglieder, die Entzündung, Thrombose und Atherogenese miteinander verknüpfen (Gawaz et al., 2005). Die generelle Bedeutung von Thrombozyten für Atherosklerose wird auch dadurch gezeigt, dass ihre Depletion in experimentellen Mausmodellen zu weniger Atherosklerose führt (Barrett et al., 2019). Thrombozyten exprimieren sehr viele Moleküle, die für die Hämostase nachrangig aber in Entzündungs- und immunologischen Prozessen bedeutsam sind, einige davon sind für beide Prozesse wichtig (von Hundelshausen and Weber, 2007). Mehrere von Thrombozyten abhängige Mechanismen der Atherogenese führen über die vielfältigen Wege, wie Thrombozyten nach ihrer Aktivierung (siehe Abb. 7) die Adhäsion von Leukozyten fördern (Langer and Gawaz, 2008; von Hundelshausen et al., 2009). So führen angeborene Defekte im von Endothelzellen präsentierten Protein von Willebrand Faktor (VWF) zu einer Blutungsneigung, da VWF den plasmatischen Gerinnungsfaktor VIII präsentiert und für dessen Funktion eine Rolle spielt, aber auch weil VWF an den Rezeptorkomplex GPIb-V-IX-auf Thrombozyten bindet. Die dadurch vermittelte Interaktion von Thrombozyten und Endothel verstärkt die Bildung atherosklerotischer Läsionen im Mausmodell (Massberg et al., 2002). Da im Menschen das von Willebrand-Jürgens Syndrom die häufigste genetisch bedingte Blutungsdiathese verursacht bieten sich Studien mit Patienten an, die am von Willebrand-Jürgens Syndrom erkrankt sind. Dies wurde in einer schwedischen Registerstudie untersucht (Holm et al., 2019). Die Ergebnisse werfen jedoch erneute Fragen auf, denn obwohl die kardiovaskuläre Mortalität der Patienten mit VWF-Defekt im Vergleich zu der Kontrollgruppe um 50% reduziert war, wurden insgesamt etwa 30% mehr Patienten wegen eines kardiovaskulären Ereignisses hospitalisiert.

Ein anderer Mechanismus, wird von P-Selektin vermittelt, das selektiv von Endothel und aktivierten Thrombozyten exprimiert wird. Die genetische Defizienz von P-Selektin führt zu verringertem Rollen und nachfolgender Adhäsion von aktivierten Thrombozyten und

Monozyten auf dem Endothel sowie verringerter Bildung von Thrombozyten-Monozyten Komplexen.



**Abbildung 7.** Die Interaktion von Thrombozyten mit verschiedenen Leukozytenklassen reguliert die intimale Rekrutierung. Eine Vielzahl molekularer Mechanismen und löslicher thrombozytärer Effektoren vermitteln die Infiltration der Gefäßwand. P-Selektin vermittelte Leukozyten-Thrombozyten-Komplexe, aber auch Adhäsionsmoleküle wie Integrine und nicht zuletzt die Deposition von Chemokinen, sind Schlüsselemente.

Die Aktivierung von Thrombozyten kann über multiple, meist G-Protein gekoppelte Rezeptoren erfolgen und resultiert in der Sekretion des Inhalts von  $\alpha$ - und  $\delta$ -Granula, der Aggregation über die Konformationsänderung des Integrins  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 und Generierung von Mikropartikeln (von Hundelshausen et al., 2009).

Beim adoptiven Transfer von P-Selektin defizienten Knochenmark in Wildtypmäuse und umgekehrt zeigt sich im Einklang damit eine Beteiligung sowohl von endothelialeem als auch thrombozytärem P-Selektin an der Atherogenese (Burger and Wagner, 2003). P-Selektin vermittelt den engen Kontakt und das Rollen der aktivierten Thrombozyten auf dem Endothel und zusätzlich Deposition von Chemokinen, was zur Exazerbation atherosklerotischer Läsionen führt (Huo et al., 2003). Die kompetitive Blockade von CCL5-Rezeptoren mit Met-RANTES führt dazu, dass Monozytenrekrutierung und Atherosklerose vermindert werden können (Veillard et al., 2004; von Hundelshausen et al., 2001).

Auch das Komplementsystem ist ein weiteres Beispiel für das Konzept, das Thrombozyten ein zentrales Bindeglied zwischen Entzündung und Thrombose darstellen, denn beide Systeme aktivieren sich gegenseitig und aktivierte Komplementkomponenten sind in Plaques zu finden (Patzelt et al., 2015).

Dies sind nur einige wenige Beispiele molekularer Abläufe die beschreiben, wie Thrombozyten entzündliche und atherogenetische Prozesse beeinflussen. Das Forschungsfeld entwickelt sich stetig und der Grad der Komplexität erhöht sich durch die Erkenntnis, dass zirkulierende Thrombozyten keine homogene Population darstellen und sich verschiedene Populationen funktionell unterscheiden (van der Meijden and Heemskerk, 2019).



## Zusammenfassung

### *Additive und differenzielle Effekte thrombozytärer Chemokine für den Monozytenarrest*

Plättchen sind eine Quelle für bestimmte Chemokine (Karshovska et al., 2013) wie z.B. CXCL4, CCL5, CXCL7, CXCL5 und CXCL12, die in ihren  $\alpha$ -Granula gespeichert zum Abruf vorliegen. Wir kennen eine Fülle verschiedenster Mediatoren, die in unterschiedlichem Ausmaß zur Plättchendegranulation und damit Sekretion von Chemokinen führen. Manche potente Stimulatoren wie z. B. ADP führen zu einer starken Aktivierung und Plättchenaggregation jedoch nur zu einer geringen Freisetzung von Chemokinen, während andere potente Aktivatoren wie Thrombin über Protease aktivierbare Rezeptoren PAR1 und PAR4 sowohl eine starke Aggregation als auch eine ausgeprägte Sekretion von Chemokinen verursachen (Blanchet et al., 2014). Im Querschnitt der Blutsäule eines Blutgefäßes verteilen sich zelluläre Partikel nicht gleichmäßig. Die Verteilung hängt von hydrodynamischen Faktoren wie der lokalen Scherrate, mechanischen Eigenschaften wie Größe, Form und der Deformierbarkeit der zirkulierenden Zellen und Kollisionen zwischen den Zellen ab (Zavodszky et al., 2019). Rigidere Zellen treiben diese Faktoren an den Rand während deformierbare Partikel ins Zentrum wandern, so dass die kleinen rigiden Plättchen konzentriert am Rand der Blutsäule in der Nähe zum Endothel zirkulieren, während sich die weichen Erythrozyten in der Mitte befinden. Diese räumliche Verteilung ist wichtig, damit eine intensive Interaktion von Plättchen mit dem Endothel stattfinden kann.

Wir hatten beschrieben, dass die Aktivierung von Plättchen unter Flussbedingungen dazu führt, dass das Chemokin CCL5 sezerniert und auf Endothelzellen deponiert wird, wofür eine unmittelbare räumliche Nähe erforderlich ist. Das dort akkumulierende CCL5 aktiviert Monozyten, die die passenden Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 exprimieren. Die Aktivierung der Monozyten allein führte in diesem System noch nicht zum vermehrten Rollen und Arrest auf dem Endothel. War das Endothel jedoch zusätzlich durch IL-1 $\beta$  entzündet, kam es zur vermehrten Adhäsion und Transmigration von Monozyten (von Hundelshausen et al., 2001). Auf diesen Ergebnissen basierend stellten wir uns die Frage, welche Effekte in komplexeren Systemen mit mehr als einem Chemokin zu erwarten wären und testeten *in vitro* die Chemokine CCL5, CXCL4, CXCL5 und Varianten von CXCL7, das in Form verschieden langer Chemokinvorläufer in Plättchen vorliegt (pro platelet basic protein, CTAPIII,  $\beta$ -Thromboglobulin), und nach Sekretion enzymatisch zu dem aktiveren NAP-2 gespalten werden kann (Gleissner et al., 2008; von Hundelshausen et al., 2007). Zusätzlich verglichen wir auch paarweise Kombinationen von Chemokinen.

Wir fanden, dass die Inkubation von mikrovaskulärem Endothel mit CCL5, CXCL4, in geringem Ausmaß auch CXCL7, jedoch nicht CXCL5 dosisabhängig zu einer festen Bindung an die Endotheloberfläche führte (Baltus et al., 2005). Die Bindung ans Endothel korrelierte mit der Fähigkeit des jeweiligen Chemokins Arrest von isolierten humanen Monozyten unter Flussbedingungen auszulösen. CCL5 war dabei das potenteste und effizienteste Arrestchemokin. Die Vorbehandlung des mikrovaskulären Endothels mit  $\beta$ -TG führte in Gegenwart der Protease Cathepsin G zur Bildung von NAP-2, welches ein Ligand für CXCR1 und CXCR2 ist, die beide nicht nur von Neutrophilen, sondern auch von Monozyten funktionell exprimiert werden (Gerszten et al., 1999; Weber et al., 1999). Die kombinierte Präinkubation mit niedrigen Konzentrationen von CCL5 und CXCL4 erhöhte die Adhäsion synergistisch (Baltus et al., 2005). Glykosaminoglykane wie Heparan- und Chondroitinsulfat sind ein Teil der Glycokalix (Reitsma et al., 2007). Über ihre negativ geladenen Sulfatgruppen gehören sie zu den

wichtigsten Interaktionspartnern von Chemokinen. Nachdem wir das Endothel enzymatisch vorbehandelt und Glycosaminoglykane mit Chondroitinase entfernt hatten, war auch die Deposition von CCL5, CXCL4 deutlich reduziert und der Monozytenarrest signifikant vermindert. Die Perfusion von Vollblut, das durch Stimulation mit einem PAR1-Agonisten aktivierte Plättchen enthielt resultierte in gesteigerter Monozytenadhäsion, die durch Chondroitinase, Met-RANTES oder blockierende CXCL4-Antikörper, nicht aber mit blockierenden CXCL5 Antikörpern vermindert werden konnte. Die Relevanz der thrombozytären Chemokine wurde in Adhäsionsexperimenten mit Vollblut unter Flussbedingungen bestätigt, wo Met-RANTES und in geringerem Umfang CXCL4- oder NAP-2-Antikörper den Arrest markierter CD14-positiver Monozyten inhibierte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass multiple thrombozytäre Chemokine und Vorläuferchemokine, die durch spezifische endotheliale Glycosaminoglykane präsentiert werden, unterschiedlich und teilweise kooperativ zum Monozytenarrest beitragen.

Der Befund einer kooperativen Wechselwirkung von Chemokinen gab auch den Antrieb die funktionellen Interaktionen zwischen Chemokinen weiter zu untersuchen, zunächst mit CCL5 und CXCL4 als zu kombinierenden Partnern.

#### *CXCL4 und CCL5 formen Heterodimere vom CC-Typ, die Monozytenarrest synergistisch befördern*

CCL5 entfaltet seine chemotaktische Aktivität durch Aktivierung von CCR1 und CCR5, die es mit hoher Affinität ( $KD < 1$  nM) bindet, während CXCL4 bislang keinem hochaffinen Rezeptor zugeordnet werden konnte. Unter Flussbedingungen auf aktiviertem Endothel, auf dem entweder CCL5 alleine oder in Kombination mit CXCL4 immobilisiert worden war, steigerte CXCL4 den durch CCL5 verursachten Monozytenarrest (von Hundelshausen et al., 2005), wobei CXCL4 selbst keinen Einfluss auf die Adhäsion von Monozyten hatte. Inkubiert mit Monozyten erhöhte CCL5 die Menge an CXCL4 auf der Zelloberfläche möglicherweise als Hinweis einer direkten Interaktion oder durch Freisetzung gebundenen Chemokins aus der Glycosaminoglykanbindung. Der enzymatische Verdau von GAGs mittels Chondroitinase verhinderte sowohl die Arrestwirkung von CCL5 als auch die Bindung von CXCL4 an Monozyten. Um der Hypothese einer Heteromerbildung zwischen CXCL4 und CCL5 nachzugehen, entwickelten wir antikörperbasierte Liganden Blots auf Nitrozellulosemembranen. CCL5 und rekombinant oder synthetisch hergestellte Varianten von CCL5 wurden immobilisiert und mit CXCL4 in der löslichen Phase beschickt, so dass wir Interaktionen zwischen diesen Chemokinen erstmals qualitativ nachwiesen. Eine bessere Einschätzung der Affinitäten gelang durch kinetische Bindungsdaten (Oberflächenplasmonresonanz) von Wildtyp-CCL5 auf immobilisiertem CXCL4. So ließ sich die  $KD$  von CCL5 und CXCL4 im niedrigen nanomolaren Bereich einordnen. CCL5 bildet in Abhängigkeit von der chemischen Umgebung mit steigendem pH und steigender Konzentration Dimere, Tetramere und auch höhergradige Oligomere. CCL5 Monomere bilden über die Anlagerung der unstrukturierten N-terminalen Sequenzen zu einem Betafaltblatt die Basis für das CC-Typ Dimer. Durch Methylierung von Threonin 7 (N-Me-<sup>7</sup>T) erhält man monomeres CCL5, da die Assoziation der N-terminalen Regionen über Wasserstoffbrückenbindungen blockiert wird (Proudfoot et al., 2003). Das am C-Terminus gelegene Glutamat 66 ist zentral für die Interaktion von Dimeren zu Tetrameren und E26 ist nach dem N-loop im ersten Betastrang

positioniert und vermittelt höhergradige Assoziationen bis hin zu Aggregaten (Wang et al., 2011). Die Umwandlung von E66 in neutrales Alanin (E66A) führt zum Überwiegen von Dimeren, während E26A die Oligomerisierung auf Tetramere begrenzt. In Interaktionsanalysen sowohl mit Ligandenblots als auch mit SPR zeigte sich die Bindung von CXCL4 an monomeres N-Me-<sup>7</sup>T aufgehoben und an E26A stark abgeschwächt (von Hundelshausen et al., 2005), so dass sich hier bereits die Hinweise verdichteten, dass CXCL4 mit CCL5 über eine CC-Typ Interaktion zu Heteromeren assoziieren. Zusätzlich konnte eine Variante von CCL5 mit einem Bindungsdefekt für GAG (CCL5<sup>44AANA47</sup>) ebenfalls nicht mehr mit CXCL4 interagieren. Die Effekte auf struktureller Ebene spiegelten dann auch die funktionelle Realität wieder, denn die Arrestfunktion der Mutanten mit aufgehobener oder geringer Affinität für CXCL4 waren durch Zugabe von CXCL4 nicht mehr steigerbar. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Rekrutierung von Monozyten durch Wildtyp CCL5 synergistisch. Die Stimulation von Monozyten mit Überständen aktivierter Thrombozyten führte sowohl zu einem CCL5- als auch CXCL4-abhängigen Arrest.

Um nähere Informationen über die Quartärstruktur des CCL5/CXCL4-Komplexes zu erhalten, verwendeten wir <sup>15</sup>N-markiertes CCL5 in <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H *heteronuclear single quantum coherence* (HSQC) Experimenten, bei denen man sich Verschiebungen (*chemical shifts*) im Kernspinresonanzspektrum zu Nutze macht. Diese entstehen, wenn ein nicht markiertes Protein, in diesem Fall CXCL4, zugegeben wird und mit dem markierten Partner interagiert (Koenen et al., 2009). Die Titration von CXCL4 zu <sup>15</sup>N-CCL5 führte zu einer Abnahme der CCL5 Monomere und es verschoben sich besonders die N-terminalen und im  $\beta$ 1-Strang gelegenen Aminosäuren im Spektrum. Das passt zu einer Bildung eines CCL5-CXCL4 Heterodimers, bei dem die N-terminalen Regionen einem CC-Typ Dimer entsprechend assoziieren.

Diese Ergebnisse belegen, dass die heterophile Interaktion von CCL5 mit CXCL4 strukturelle Motive benötigt, die auch an der Homooligomerisierung von CCL5 beteiligt sind und CCL5 induzierte Effekte auf den Monozytenarrest verstärken. Dies eröffnet einen Ausblick auf die Möglichkeit die von thrombozytären Chemokinen verursachte inflammatorische Rekrutierung von Monozyten und Immunzellen therapeutisch zu modulieren.

Darüberhinaus weisen diese Ergebnisse einmal mehr daraufhin, dass die Bedeutung von CXCL4 möglicherweise nicht durch klassische Chemokinaktivität erklärt werden kann, sondern durch Komplexbildung mit löslichen Effektoren und Bindung an GAGs.

#### *CXCL4L1, eine natürliche CXCL4 Variante mit Bindungsdefekt für CCL5*

Das Gen für CXCL4L1 (PF4Var1, PF4alt) wurde Ende der 80er Jahre entdeckt und kloniert (Eisman et al., 1990; Green et al., 1989) und die Proteinexpression in humanen Thrombozyten dann 2004 nachgewiesen (Struyf et al., 2004). CXCL4L1 hat eine Länge von 68 Aminosäuren und unterscheidet sich von CXCL4 an drei Positionen am Ende der C-terminalen  $\alpha$ -Helix. An der Position 58 wird Prolin durch Leuzin ersetzt, Lysin 66 wird zu Glutamat und Leuzin 67 zu Histidin. Wir untersuchten, welche Effekte diese Änderungen verursachen (Sarabi et al., 2011). Wir verwendeten rekombinant und synthetisch hergestelltes CXCL4L1, um zu zeigen, dass Angiogenese sowohl durch CXCL4 als auch durch CXCL4L1 inhibiert wird. Wir quantifizierten zu diesem Zweck die Ausbildung von kapillaren Strukturen im Matrigelmodell. Möglicherweise ist dennoch der angiostatische Mechanismus unterschiedlich,

denn im Gegensatz zu CXCL4 verursachte CXCL4L1 eine ungerichtete Migration von Endothelzellen während die Endothelzellproliferation nur durch CXCL4 jedoch nicht von CXCL4L1 inhibiert wurde. Dies könnte mit unterschiedlichen Affinitäten für lösliche Liganden wie Heparin, Wachstumsfaktoren oder Chemokinen in Zusammenhang stehen. Tatsächlich fehlte CXCL4L1 der typische synergistische Effekt von CXCL4 auf die CCL5-induzierte Monozytenrekrutierung (Sarabi et al., 2011). Weder in der Flusskammer noch im Peritonitismodell der Maus steigerte CXCL4L1 die Zahl der Monozyten. Wir bestimmten das Bindungsverhalten von CXCL4L1 und CCL5 in Lösung mit isothermer Fluoreszenztitration und fanden eine niedrigere Affinität für CCL5. Auch mit CCL5, das auf einem SPR-chip immobilisiert war interagierte CXCL4L1 kaum und CXCL4 stark (von Hundelshausen et al., 2017). Auch die Heparinaktivität (aktivierte Thromboplastinzeit, APC-Bildung) konnte durch CXCL4L1 weniger gehemmt werden als mit CXCL4. Das passt zu dem Befund, dass bei der chromatographischen Aufreinigung über die Heparinsäule CXCL4L1 früher eluiert als CXCL4. CXCL4L1 dient so eher als homöostatisches Chemokin mit geringen strukturellen Unterschieden jedoch unterschiedlichem funktionellen Profil zu CXCL4. Inzwischen ist die Struktur von CXCL4L1 durch Röntgenkristallographie aufgeklärt worden (Kuo et al., 2013). Vor allem die Substitution von Leuzin 67 in Histidin führt zu einer unterschiedlichen räumlichen Orientierung der Helix, die vom Chemokinbetafaltblatt herausschwingt und völlig in der wässrigen Umgebung exponiert wird. Dies führt zu einer verminderten Affinität für Heparin und ist vermutlich auch für die unterschiedliche Bindung an CCL5 verantwortlich.

In der Evolution muss es erst kürzlich zu der Duplikation des Pf4-Gens und der veränderten Sequenz gekommen sein, denn CXCL4L1 Pf4v1 findet sich nur in Primaten (Dubrac et al., 2010). Um die funktionellen Konsequenzen im Mausmodell simulieren zu können, generierten wir daher eine *knock-in/ knock-out* Maus, bei der das native *Pf4* durch ein artifizielles murines *Pf4alt* mit einer zum humanen System orthologen Sequenz ersetzt wurde (von Hundelshausen et al., 2017). Auf den *ApoE*<sup>-/-</sup>-Hintergrund gebracht, verglichen wir die Bildung von atherosklerotischen Läsionen bei Wildtypen, beim CXCL4-*knockout* mit der CXCL4L1-Maus und einer Kontrolle bei der *Cxcl4l1* unter dem Pf4-Promotor transgen im Rosa26-Lokus exprimiert wurde. Wir fanden, dass das Fehlen von CXCL4 die Bildung von Atherosklerose signifikant verminderte. Der Ersatz von CXCL4 mit CXCL4L1 zeigte vergleichbare Läsionen, während die gleichzeitige Expression von CXCL4 und CXCL4L1 in der transgenen Maus keinen Unterschied zum Wildtyp brachte (von Hundelshausen et al., 2017). Dies stützt unsere vorhandenen Daten (Koenen et al., 2009), dass CCL5-CXCL4 Heterodimere proatherogen sind und die natürliche Variante CXCL4L1 durch ihre reduzierte Interaktionsfähigkeit keine proatherogene Rolle spielt, aber auch nicht protektiv wirkt und somit im Gegensatz zu Inhibitoren einer Heterodimerisierung für einen therapeutischen Nutzen nicht in Frage käme.

#### *Thrombozytäre und neutrophile Effektoren in der Atherothrombose*

Abgesehen von ihrer unterschiedlichen Beteiligung beim chronisch entzündlichen Prozess der Atherogenese sind sowohl thrombozytäre Chemokine wie CXCL4, CXCL4L1 und CCL5 als auch von neutrophilen Granulozyten freigesetzte Effektoren wie MPO und Azurodinin möglicherweise prognostisch bedeutsame Parameter im akuten Koronarsyndrom (AKS). Wir analysierten die Plasmakonzentrationen dieser fünf löslichen Mediatoren in Abhängigkeit vom Vorliegen eines akuten Koronarsyndroms, einer KHK und unter Berücksichtigung weiterer Parameter wie medikamentöser Maßnahmen und begleitender klinischer oder laborchemischer Parameter sowie dem Progress der zugrundeliegenden koronaren Herzkrankheit

(Blanchet et al., 2014). Als Observationsstudie angelegt wurden bei 204 Patienten mit angiographischem Ausschluss einer KHK oder mit akutem Koronarsyndrom, die im Universitätsklinikum Aachen aufgenommen wurden, Blut zum Aufnahmezeitpunkt und 6 Stunden später abgenommen. Aus dem Plasma wurde die Konzentration von CXCL4, CXCL4L1, CCL5, Azurozidin und die Aktivität von MPO bestimmt. Da keine spezifischen kommerziellen Antikörper verfügbar waren, fanden wir über eine Phagenbibliothek (Morphosys) Fab-Fragmente, die spezifisch für CXCL4L1 waren und etablierten einen Sandwich-ELISA zur Messung von CXCL4L1 für humanes Citratplasma. Wir selektierten in einer multiplen linearen Regression relevante klinische und Basislaborparameter und erhielten für jeden der fünf Hauptparameter in einer schrittweisen Rückwärtsanalyse mittels bayesischem Informationskriterium (BIC) jeweils ein spezifisches Modell, welche Parameter den größten Einfluss hatten. Das Vorliegen eines akuten Koronarsyndroms erhöhte jeden der fünf Mediatoren signifikant. CXCL4 und CCL5 aber nicht CXCL4L1 oder MPO waren mit der Thrombozytenzahl und CRP assoziiert. Die klinische Gabe von Heparin, dass sehr stark an CXCL4 jedoch nur schwach an CXCL4L1 bindet, reduzierte folgerichtig auch besonders die Konzentration von CXCL4, nicht von CXCL4L1. Die Gabe von Heparin im akuten Koronarsyndrom könnte daher auch bisher unbekannte chemokinvermittelte Effekte haben. Nur erhöhte CCL5 Konzentrationen waren mit einer angiographisch messbaren Progression einer vorbestehenden KHK im Kontrollherzkatheter nach 6 Monaten assoziiert.

*In vitro* fanden wir, dass die Inkubation von Blut mit löslichem atherosklerotischen Plaquematerial, PAR1 oder PAR4 Aktivatoren eine viel deutlichere Sekretion von CXCL4, nicht aber CXCL4L1 und CCL5 induzierten als über eine ADP-vermittelte Plättchenaktivierung. Mit einer medikamentösen Plättchenhemmung durch P2Y12-Antagonisten wie etwa Clopidogrel wäre daher eine Hemmung der Freisetzung dieser Chemokine nicht zu rechnen, während alternative Therapiestrategien, die den Kollagensignalweg blockieren, wie zum Beispiel Inhibitoren von GPVI oder nachfolgenden Signalwegen, die von der Tyrosinkinase Btk reguliert werden, interessant zu untersuchen, weil sie nicht nur Atherothrombose sondern zeitgleich auch eine voranschreitende Atherosklerose verhindern könnten (Busygina et al., 2018; Goldmann et al., 2019). PAR1-Inhibitoren wie Voraxapar sollten diesbezüglich ebenfalls wirksam sein, waren aber in klinischen Studien mit einer erhöhten Rate schwerer Blutungen behaftet (Lievens and von Hundelshausen, 2011). Thrombozytäre Chemokine und Produkte von neutrophilen Granulozyten sind gleichzeitig im akuten Koronarsyndrom erhöht und werden durch Heparin unterschiedlich moduliert. Passend zu dem Befund, dass ein AKS die vaskuläre Entzündung fördert scheint die inflammatorische Antwort im AKS von Plättchensekretionsprodukten dominiert zu sein.

#### *Die Kartierung des Chemokininteraktoms ermöglicht passgenaue Strategien für akute und chronische Entzündungsreaktionen*

Wir und andere Arbeitsgruppen hatten anhand ausgewählter Beispiele gezeigt, dass Chemokine nicht nur zu Homodimeren assoziieren, sondern auch Heterodimere bilden, und dass diese Interaktionen sowohl inhibitorische als auch synergistische Konsequenzen entfalten können (Crown et al., 2006; Dudek et al., 2003; Nesmelova et al., 2005; von Hundelshausen et al., 2005). Für die Konformation der Heteromerisierung von CCL5 und CXCL4 fanden wir die Bildung eines proatherogenen Heterodimers vom CC-Typ, dass durch das zyklische Peptid CKEY inhibiert werden konnte (Koenen et al., 2009). Daraus entwickelte sich der Gedanke, zumindest die binären physikalischen Wechselwirkungen von Chemokinen

untereinander möglichst vollständig abzubilden, um ihre strukturelle Grundlage besser zu verstehen. Deshalb begannen wir über Ligandenblots systematisch umfassend immobilisierte Chemokinpanele gegen lösliche Einzelchemokine zu testen und die positiven Signale zu kartieren und mittels SPR als ergänzender Messmethode die Interaktionen anhand ausgewählter, atheroskleroserelevanter Chemokine zu validieren (von Hundelshausen et al., 2017). Die entstandene Interaktommatrix zeigte dabei Regionen mit im Wesentlichen inflammatorischen Chemokine (z.B. CCL2 oder CCL5), die überdurchschnittlich viele Interaktionen eingingen, während homöostatische (z.B. CCL19, CXCL13) oder membrangebundene Chemokine wie CX3CL1 seltener Heteromere bildeten. Da strukturelle Untersuchungen nicht für alle Paare möglich waren, selektierten wir einige Kandidaten mit erwiesener Bedeutung für Atherosklerose. Details der Kontaktfläche zwischen den Chemokinpaaren wurden durch NMR-Messungen analysiert, bei denen spektrale Veränderungen in der Intensität oder chemische Verschiebungen im HSQC-Spektrum eines isotoptenmarkierten Chemokins durch Titration des unmarkierten Partners aufgezeichnet wurden. Die Information, welche Aminosäurereste sich am deutlichsten veränderten, wurde in Computersimulationen (Molecular Dynamics) verwendet und mündeten in Modelle, die die Heterokomplexe darstellten. Auch hier waren weitere Einschränkungen in der Zahl der zu untersuchenden Paare notwendig, da die Methodik hohe Konzentrationen benötigt mit dem inhärenten Problem, dass einige Chemokine unter diesen Bedingungen Aggregate bilden, so dass Varianten wie z.B. CCL5<sup>E66S</sup> hergestellt wurden, die Dimere aber keine Oligomere bilden können. Wir fokussierten uns bei den NMR-Experimenten auf Interaktionen mit CCL5 bzw. CCL5<sup>E66S</sup>. In Abhängigkeit der molaren Verhältnisse, wie mit CCL5:CCL17 demonstriert, können Monomere, Homooligomere sowie Heterodimere beider Subtypen zeitgleich existieren, wobei für CCL5:CCL17 das CC-Dimer immer dominierte. Im Gegensatz dazu waren in der Kombination mit markiertem CXCL12 die *crosspeaks* der Aminosäuren im  $\beta$ 1-Strang und der  $\alpha$ -Helix einem CXC-Typ entsprechend, verändert. Ähnlich zeigte die Kombination mit CXCL4 die Bildung eines CXC-Typs. Andere Chemokine, wie etwa CXCL10 induzierten Veränderungen an fast allen Positionen, so dass hier von unspezifischen Effekten ausgegangen werden muss, die beispielsweise durch Änderung der Viskosität hervorgerufen werden können.

Basierend auf den Heterodimermodellen entnahmen wir der AS-Primärsequenz von CCL5 Sequenzen, die einen Teil der Kontaktfläche mit CXCL4, CCL17 oder CXCL12 beinhalteten und konzipierten daraus Peptide, die eine Heterodimerisierung verhindern sollten. CKEY (K25-R44) enthält Teile des N-loops und des  $\beta$ 2-Strangs (Koenen et al., 2009) zur Inhibition der Heterodimerisierung mit CXCL4, CAN (K33 bis N52), das den  $\beta$ 3-Strang enthält für CCL17 sowie VREY (E54-S68), das Teile der  $\alpha$ -Helix enthält für CXCL12. Dabei wurden CKEY und CAN zur Stabilisierung über Disulfidbrücken als geschlossene Ringform synthetisiert, während VREY als lineares Peptid hergestellt wurde. Um eine verbesserte Helixbildung und Löslichkeit zu erhalten, wurde das lineare VREY mit einem TASP-Gerüst fusioniert, das vier Ankerpunkte für VREY aufweist [VREY]<sup>4</sup>. CAN und CKEY interagierten mit CXCL4 bzw. CCL17 und reduzierten die im NMR sichtbaren Effekte einer Heterodimerisierung und die Zugabe von unmarkiertem [VREY]<sup>4</sup> zu N15-CXCL12 zeigte vergleichbare Änderungen der Amimosäuren der Dimerkontaktfläche, einer Assoziation mit CXCL12 entsprechend. In Experimenten zur CCL5:CXCL12 Heterodimerisierung zeigte [VREY]<sup>4</sup> auch eine Reduktion der Homodimerisierung von CXCL12 und einer Heterodimerisierung von CXCL12 und CCL5.

Funktionell untersuchten wir die Effekte einer Heteromerisierung in vitro mit Adhäsionsversuchen, Chemotaxis von aktivierten T Zellen und in Aggregationsexperimenten mit

Thrombozyten. Die Kombination mit CCL3 oder CXCL10, Chemokinen, die nicht oder zumindest nicht spezifisch mit CCL5 interagierten, änderte nicht die Zahl der migrierten T Zellen, dagegen erhöhten Chemokine, die CC-Typ Heterodimere präferieren die Migration. Umgekehrt verringerte die Kombination mit CXCL12 T Zell Chemotaxis und die CXCL12-induzierte Thrombozytenaktivierung wurde durch CCL5 inhibiert.

Synergismen der CC-Typ Heterodimere entstanden durch unterschiedliche Mechanismen. CCL5:CCL17 Heterodimere erhöhten die Heteromerisierung auf Chemokinrezeptorebene, so dass CCR5:CCR4 Heterodimere auf der Zelloberfläche länger verblieben und die Signaltransduktion nicht desensibilisiert wurde. Dagegen war der Synergismus, den CXCL4 auf CCL5 ausübte, auch mangels eines eigenen hochaffinen Rezeptors, nicht von Rezeptorheterodimeren abhängig, sondern von der Proteoglykanbindung. Der inhibitorische Effekt, den CCL5 auf CXCL12 ausübte war CXCR4-abhängig und eine geringere Gi-Aktivität war messbar, so dass möglicherweise die Bindung von CCL5 an CXCL12 zu einer inhibitorischen Konformationsänderung von CXCL12 und CXCR4 führt, ähnlich wie in weiterführenden Experimenten Galektin-3 und CXCL12 als Komplex an CXCR4 binden können (Eckardt et al., 2020). Die von CXCL12 verursachte Thrombozytenaggregation war durch [VREY]<sup>4</sup> inhibierbar. Wir generierten mittels chemischer Synthese nicht dissoziierbare Heterodimere von CCL5:CXC4 (OPRAH) und CCL5:CCL17 (ORATH), die funktionell aktiv und erwartungsgemäß nicht durch den jeweiligen Peptidantagonisten beeinflussbar waren.

Die Sekretion von Chemokinen aus Thrombozyten fördert bestimmte akute Entzündungsreaktionen wie sie etwa bei akuten Lungenschäden auftreten (Zarbock et al., 2006) (Looney et al., 2009) oder auch langsame, chronisch entzündliche Erkrankungen wie Atherosklerose. Die parenterale Gabe von CKEY mildert die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen im Mausmodell durch Verhinderung der CCL5:CXCL4 Heterodimerisierung (Koenen et al., 2009). Auch die Injektion von CAN reduzierte Atherosklerose, wobei die antiinflammatorische Wirkung über eine verstärkte Aktivität regulatorischer T Zellen vermittelt wurde (von Hundelshausen et al., 2017). CCL17 unterdrückt die Homöostase regulatorischer T Zellen, so dass der Mechanismus von CAN mit dem inhibitorischen Effekt auf das CCL5:CL17 Heterodimer erklärt werden kann (Weber et al., 2011).

Diese Befunde vermitteln einen Einblick in die vielschichtige Regulation in akuten und chronischen Entzündungserkrankungen. Der Nachweis multipler funktionell relevanter Chemokinheterodimere, nicht nur – aber auch – aus Thrombozyten, erhöht den Grad der Komplexität in der der Organismus die Aktivität von Chemokinen reguliert und mit der er auf die jeweilige Situation fein abgestimmt reagieren kann. Peptide sind eine Möglichkeit die Heterodimerisierung zu beeinflussen. Durch Inhibition von Heterodimeren, die die Rekrutierung von Leukozyten fördern, könnten akut entzündliche Lungenerkrankungen behandelt werden, andererseits können durch Bindung der Peptide an Chemokine auch inhibitorische Aktivitäten ausgelöst werden, die zur Hemmung der Aggregation von Thrombozyten führen. Auf diesem Konzept kann grundlagenwissenschaftlich und translational aufgebaut werden, um die Interaktionen von entzündlichen Effektoren weiter zu erforschen und Moleküle zu entwickeln, die perspektivisch therapeutisch nutzbar sind.

### *Chemokin-Galektin-Interaktionen: Galektin-3 antagonisiert CXCL12 durch Heterodimerisierung*

Physiologischerweise, besonders aber in entzündetem Gewebe, koexistieren multiple Entzündungsmediatoren, die jeder für sich eine spezielle Rolle in der Leukozytenrekrutierung

spielen und dadurch direkt und indirekt miteinander in Wechselwirkung treten können. Neben verschiedenen Chemokinen, die direkt miteinander interagieren und Heterodimere bilden, untersuchten wir das Bindungsverhalten von Chemokinen mit einer separaten Familie von Effektoren, den Galektinen. Diese Proteinfamilie erhielt ihren Namen aufgrund ihrer zuckerbindenden Eigenschaft. Sie erkennen spezifisch  $\beta$ -Galaktoside, die als posttranslationale Modifikation von Proteinen entstehen. Im Unterschied zu Chemokinen besitzen sie keine typischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Wir untersuchten das Bindungsverhalten von Chemokinen mit Galektin-1 und Galektin-3 (Gal-1, Gal-3) und der natürlich vorkommenden Spaltvariante Gal-3 CRD. Wir fanden, dass mehrere Chemokine mit Galektinen interagieren, unter anderem CXCL12. In Anbetracht der Relevanz von CXCL12 für viele homöostatische und inflammatorische Prozesse, sowie der schwachen Affinität von Gal-1, beschränkten wir uns für weitere Struktur- und Funktionsanalysen auf das Paar CXCL12 und Gal-3. Über SPR fanden wir, dass CXCL12 auch in Präsenz von Zuckerliganden an Gal-3 bindet und daher die Zuckerbindungsstelle (CRD) keinen zentralen Anteil haben konnte. Im NMR bestätigte sich dieser Befund und die Kontaktregion innerhalb Gal-3 fand sich auf der benachbarten aber gegenüberliegenden Seite des Faltblattes der CRD. Die Zugabe von Gal-3 zu CXCL12 behinderte die Chemotaxis von Jurkat T Zellen, nicht jedoch Mutanten mit einem Bindungsdefekt für CXCL12, dabei verhinderte Gal-3 nicht die Bindung an CXCR4 obwohl Gi-Signaling abgeschwächt wurde, was zu einer Komplexbildung von Gal-3 mit CXCL12 und CXCR4 passt. Dies ist der erste Bericht eines neuartigen Mechanismus in der Immunregulation, der die weitere Untersuchung des Chemokin-Galektin Interaktoms rechtfertigt.

## Perspektive

Die Arbeiten in diesem Habilitationsprojekt haben neue Erkenntnisse erbracht, wie im Organismus die Aktivität von Chemokinen reguliert wird. Wir haben diesen Aspekt vor allem für die chronisch entzündliche Erkrankung Atherosklerose untersucht. Chemokine haben jedoch ein breites Wirkungsfeld, so dass die Befunde für alle Bereiche von Bedeutung sein dürften, in denen Chemokine eine wichtige Rolle spielen. Obwohl Chemokine in ihrer Eigenschaft als Lockstoffe für Zellen, im Wesentlichen Immunzellen, seit den 70er Jahren bekannt sind, haben pharmakotherapeutische Ansätze trotz intensiver Bemühungen bislang nur einen untergeordneten Stellenwert in der Klinik erlangt. Bislang sind zwei Medikamente 2007/2008 zugelassen worden, die die Chemokinaktivität durch Rezeptorblockade blockieren: AMD3100, unter dem Namen Plerixafor vermarktet, hemmt CXCR4, den Rezeptor für CXCL12. Die Gabe von Plerixafor führt zu einer Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark und wird in Kombination mit G-CSF dazu verwendet, die Ausbeute von Stammzellen vor autologer Knochenmarktransplantation zu erhöhen. Das zweite zugelassene Medikament, Maraviroc, blockiert CCR5, das neben seiner physiologischen Rolle als Chemokinrezeptor für einige Chemokine wie CCL3/4/5/7 als Andockstelle für R5-tropes HIV dient und als Entryinhibitor zur HIV-Therapie gegeben wird. Das riesige Potential, Chemokine und ihre Rezeptoren als Targets in Entzündungserkrankungen zu adressieren, ist also bislang nicht ausgeschöpft worden. Ein wichtiger Grund für das Scheitern vieler klinischer Studien könnte sein, dass die Regulationsprinzipien von Chemokinen nur unvollständig verstanden sind. In den vorliegenden Untersuchungen wurde das Konzept herausgearbeitet, dass Chemokine miteinander Heteromere bilden, bislang immer in Form von Heterodimeren eines CC- oder CXC-Typs. Die Heterodimerisierung kann sowohl die Wirkung verstärken als auch abschwächen. Um die Relevanz dieser Befunde zu klären, soll in weiterführenden Projekten geklärt werden, in welchen Konzentrationen Chemokinheterodimere in Blut und Gewebe in



Bezug auf Monomere und Homodimere vorliegen. Auch die chemische Umgebung könnte einen wichtigen Einfluss ausüben. Kombinationen, wo ein Partner auf einer Oberfläche adsorbiert ist oder, wenn beide Partner in Lösung aufeinandertreffen, ergeben *in vitro* unterschiedliche Assoziations- und Dissoziationskonstanten und so soll erforscht werden, ob sich Chemokinheterodimere verstärkt auf Zelloberflächen bilden.

Die Antagonisten, die wir entwickelt haben, um eine Heterodimerisierung von Chemokinen zu verhindern, basieren auf einem Peptidgerüst, mit Vor- und Nachteilen. Sobald die Kontaktregionen der Partnerchemokine bekannt sind, lassen sich die erforderlichen Sequenzen gut ableiten und modifizieren. Peptide sind für klinische und langfristige Anwendungen jedoch schwieriger zu handhaben, da eine orale Applikation nicht möglich ist und sie im Gegensatz zu antikörperbasierten Therapien kurzlebiger und möglicherweise langfristig auch antigen wirksam sind. Um eine klinische Anwendbarkeit zu ermöglichen, sollen also in Zukunft Strategien entwickelt werden, das Wirkprinzip der Peptidantagonisten, bei gleichzeitig günstiger Pharmakokinetik, zu erhalten.

Ursprünglich entstammt unser Konzept der proatherogenen und synergistischen Effekte von Chemokinheterodimeren aus Interaktionen zweier thrombozytärer Chemokine, CCL5 und CXCL4. Im Rahmen unserer Experimente und durch bedeutsame experimentelle Studien vieler anderer Arbeitsgruppen hat sich die Sichtweise auf die Rolle von Thrombozyten in der Entzündung gewandelt. Thrombozyten wurden ursprünglich als zelluläre Partikel mit einer ausschließlichen Funktion in der primären Hämostase betrachtet. Der Erfolg, durch Plättchenhemmer arterielle Thrombosen vermeiden zu können, ist auf dieses Wissen zurückzuführen. Inzwischen ist aber eine wichtige Rolle von Thrombozyten in der Entzündung immer klarer herausgearbeitet worden, und es gibt einen breiten überlappenden Bereich in Thrombose und Entzündung. Thrombozyten sind an der Entstehung von Atherosklerose, akuten Entzündungen der Lunge und im Zusammenspiel mit verschiedenen Leukozytenarten maßgeblich beteiligt. Während die heute zu Verfügung stehenden antithrombozytären Medikamente selektiv auf die Hämostase abzielen und die Wirksamkeit anhand harter klinischer Endpunkte, meist jedoch nicht durch Messung der atherosklerotischen Plaquelast ermittelt wird, wird so ein möglicher anti-inflammatorischer Ansatz verpasst. Es wäre wünschenswert, antithrombozytäre Medikamente in der kardiovaskulären Prävention zu erproben, die auch eine starke anti-inflammatorische Wirkung erzielen.

Neben der Kartierung von Interaktionen zwischen Chemokinen haben wir auch Heteromere von Chemokinen mit anderen Entzündungsmediatoren gefunden, den Galektinen. Offensichtlich ist die Möglichkeit, dass lösliche Proteine nicht nur an Zelloberflächenrezeptoren binden, sondern sich direkt wechselseitig beeinflussen, viel weiter verbreitet als vermutet. Hier gilt es, das Chemokin-Galektin Interaktom im Detail zu charakterisieren und zu erforschen, in wieweit diese Heteromere sowohl für die Aktivität des jeweiligen Chemokins, als auch des Galektins physiologisch relevant sind.

## Literatur

- Bachelier, F., Graham, G.J., Locati, M., Mantovani, A., Murphy, P.M., Nibbs, R., Rot, A., Sozzani, S., and Thelen, M. (2014). New nomenclature for atypical chemokine receptors. *Nat Immunol* *15*, 207-208.
- Baltus, T., von Hundelshausen, P., Mause, S.F., Buhre, W., Rossaint, R., and Weber, C. (2005). Differential and additive effects of platelet-derived chemokines on monocyte arrest on inflamed endothelium under flow conditions. *J Leukoc Biol* *78*, 435-441.
- Barrett, T.J., Schlegel, M., Zhou, F., Gorenchtein, M., Bolstorff, J., Moore, K.J., Fisher, E.A., and Berger, J.S. (2019). Platelet regulation of myeloid suppressor of cytokine signaling 3 accelerates atherosclerosis. *Sci Transl Med* *11*, eaax0481.
- Bhusal, R.P., Foster, S.R., and Stone, M.J. (2020). Structural basis of chemokine and receptor interactions: Key regulators of leukocyte recruitment in inflammatory responses. *Protein Sci* *29*, 420-432.
- Blanchet, X., Cesarek, K., Brandt, J., Herwald, H., Teupser, D., Kuchenhoff, H., Karshovska, E., Mause, S.F., Siess, W., Wasmuth, H., *et al.* (2014). Inflammatory role and prognostic value of platelet chemokines in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost* *112*, 1277-1287.
- Blanchet, X., Langer, M., Weber, C., Koenen, R.R., and von Hundelshausen, P. (2012). Touch of chemokines. *Front Immunol* *3*, 175.
- Boisvert, W.A., Rose, D.M., Johnson, K.A., Fuentes, M.E., Lira, S.A., Curtiss, L.K., and Terkeltaub, R.A. (2006). Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO- $\alpha$  in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression. *Am J Pathol* *168*, 1385-1395.
- Boisvert, W.A., Santiago, R., Curtiss, L.K., and Terkeltaub, R.A. (1998). A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* *101*, 353-363.
- Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I.F. (1998). Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* *394*, 894-897.
- Brandt, E., Ernst, M., Loppnow, H., and Flad, H.D. (1989). Characterization of a platelet derived factor modulating phagocyte functions and cooperating with interleukin 1. *Lymphokine Res* *8*, 281-287.
- Burger, P.C., and Wagner, D.D. (2003). Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood* *101*, 2661-2666.
- Busygina, K., Jamasbi, J., Seiler, T., Deckmyn, H., Weber, C., Brandl, R., Lorenz, R., and Siess, W. (2018). Oral Bruton tyrosine kinase inhibitors selectively block atherosclerotic plaque-triggered thrombus formation in humans. *Blood* *131*, 2605-2616.
- Clore, G.M., and Gronenborn, A.M. (1995). Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines. *Faseb J* *9*, 57-62.
- Cochain, C., Vafadarnejad, E., Arampatzi, P., Pelisek, J., Winkels, H., Ley, K., Wolf, D., Saliba, A.E., and Zernecke, A. (2018). Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis. *Circ Res* *122*, 1661-1674.
- Combadiere, C., Potteaux, S., Gao, J.L., Esposito, B., Casanova, S., Lee, E.J., Debre, P., Tedgui, A., Murphy, P.M., and Mallat, Z. (2003). Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* *107*, 1009-1016.
- Combadiere, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2008). Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytoxis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* *117*, 1649-1657.

- Crown, S.E., Yu, Y., Sweeney, M.D., Leary, J.A., and Handel, T.M. (2006). Heterodimerization of CCR2 chemokines and regulation by glycosaminoglycan binding. *J Biol Chem* 281, 25438-25446.
- Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J., and Fogelman, A.M. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5134-5138.
- Czaplewski, L.G., McKeating, J., Craven, C.J., Higgins, L.D., Appay, V., Brown, A., Dudgeon, T., Howard, L.A., Meyers, T., Owen, J., *et al.* (1999). Identification of amino acid residues critical for aggregation of human CC chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha, MIP-1beta, and RANTES. Characterization of active disaggregated chemokine variants. *J Biol Chem* 274, 16077-16084.
- Damas, J.K., Waehre, T., Yndestad, A., Ueland, T., Muller, F., Eiken, H.G., Holm, A.M., Halvorsen, B., Froland, S.S., Gullestad, L., *et al.* (2002). Stromal cell-derived factor-1alpha in unstable angina: potential antiinflammatory and matrix-stabilizing effects. *Circulation* 106, 36-42.
- Deuel, T.F., Keim, P.S., Farmer, M., and Henrikson, R.L. (1977). Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 2256-2258.
- Doring, Y., van der Vorst, E.P.C., Duchene, J., Jansen, Y., Gencer, S., Bidzhekov, K., Atzler, D., Santovito, D., Rader, D.J., Saleheen, D., *et al.* (2019). CXCL12 Derived From Endothelial Cells Promotes Atherosclerosis to Drive Coronary Artery Disease. *Circulation* 139, 1338-1340.
- Dubrac, A., Quemener, C., Lacazette, E., Lopez, F., Zanibellato, C., Wu, W.G., Bikfalvi, A., and Prats, H. (2010). Functional divergence between 2 chemokines is conferred by single amino acid change. *Blood* 116, 4703-4711.
- Dudek, A.Z., Nesmelova, I., Mayo, K., Verfaillie, C.M., Pitchford, S., and Slungaard, A. (2003). Platelet factor 4 promotes adhesion of hematopoietic progenitor cells and binds IL-8: novel mechanisms for modulation of hematopoiesis. *Blood* 101, 4687-4694.
- Eckardt, V., Miller, M.C., Blanchet, X., Duan, R., Leberzammer, J., Duchene, J., Soehnlein, O., Megens, R.T., Ludwig, A.K., Dregni, A., *et al.* (2020). Chemokines and galectins form heterodimers to modulate inflammation. *EMBO Rep* 21, e47852.
- Eisman, R., Surrey, S., Ramachandran, B., Schwartz, E., and Poncz, M. (1990). Structural and functional comparison of the genes for human platelet factor 4 and PF4alt. *Blood* 76, 336-344.
- Farouk, S.S., Rader, D.J., Reilly, M.P., and Mehta, N.N. (2010). CXCL12: a new player in coronary disease identified through human genetics. *Trends Cardiovasc Med* 20, 204-209.
- Fernandez, D.M., Rahman, A.H., Fernandez, N.F., Chudnovskiy, A., Amir, E.D., Amadori, L., Khan, N.S., Wong, C.K., Shamailova, R., Hill, C.A., *et al.* (2019). Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques. *Nat Med* 25, 1576-+.
- Gawaz, M., Langer, H., and May, A.E. (2005). Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 115, 3378-3384.
- Gengrinovitch, S., Greenberg, S.M., Cohen, T., Gitay-Goren, H., Rockwell, P., Maione, T.E., Levi, B.Z., and Neufeld, G. (1995). Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem* 270, 15059-15065.
- Gerszten, R.E., Garcia-Zepeda, E.A., Lim, Y.C., Yoshida, M., Ding, H.A., Gimbrone, M.A., Jr., Luster, A.D., Luscinskas, F.W., and Rosenzweig, A. (1999). MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398, 718-723.
- Gleissner, C.A., Shaked, I., Erbel, C., Bockler, D., Katus, H.A., and Ley, K. (2010a). CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophages. *Circ Res* 106, 203-211.
- Gleissner, C.A., Shaked, I., Little, K.M., and Ley, K. (2010b). CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 184, 4810-4818.

- Gleissner, C.A., von Hundelshausen, P., and Ley, K. (2008). Platelet chemokines in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1920-1927.
- Goldmann, L., Duan, R., Kragh, T., Wittmann, G., Weber, C., Lorenz, R., von Hundelshausen, P., Spannagl, M., and Siess, W. (2019). Oral Bruton tyrosine kinase inhibitors block activation of the platelet Fc receptor CD32a (FcγRIIA): a new option in HIT? *Blood Adv* 3, 4021-4033.
- Gong, J.H., Uguccioni, M., Dewald, B., Baggiolini, M., and Clark-Lewis, I. (1996). RANTES and MCP-3 antagonists bind multiple chemokine receptors. *J Biol Chem* 271, 10521-10527.
- Gosling, J., Slaymaker, S., Gu, L., Tseng, S., Zlot, C.H., Young, S.G., Rollins, B.J., and Charo, I.F. (1999). MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 103, 773-778.
- Greaves, D.R., Hakkinen, T., Lucas, A.D., Liddiard, K., Jones, E., Quinn, C.M., Senaratne, J., Green, F.R., Tyson, K., Boyle, J., *et al.* (2001). Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 923-929.
- Green, C.J., Charles, R.S., Edwards, B.F., and Johnson, P.H. (1989). Identification and characterization of PF4var1, a human gene variant of platelet factor 4. *Mol Cell Biol* 9, 1445-1451.
- Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P., and Rollins, B.J. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2, 275-281.
- Han, Z.C., Lu, M., Li, J., Defard, M., Boval, B., Schlegel, N., and Caen, J.P. (1997). Platelet factor 4 and other CXC chemokines support the survival of normal hematopoietic cells and reduce the chemosensitivity of cells to cytotoxic agents. *Blood* 89, 2328-2335.
- Han, Z.C., Sensebe, L., Abgrall, J.F., and Briere, J. (1990). Platelet factor 4 inhibits human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 75, 1234-1239.
- Hansson, G.K. (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352, 1685-1695.
- Holm, E., Osooli, M., Steen Carlsson, K., and Berntorp, E. (2019). Cardiovascular disease-related hospitalization and mortality among persons with von Willebrand disease: A nationwide register study in Sweden. *Haemophilia* 25, 109-115.
- Huo, Y., Schober, A., Forlow, S.B., Smith, D.F., Hyman, M.C., Jung, S., Littman, D.R., Weber, C., and Ley, K. (2003). Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* 9, 61-67.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.
- Kameyoshi, Y., Dorschner, A., Mallet, A.I., Christophers, E., and Schroder, J.M. (1992). Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 176, 587-592.
- Karshovska, E., Weber, C., and von Hundelshausen, P. (2013). Platelet chemokines in health and disease. *Thromb Haemost* 110, 894-902.
- Katritch, V., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2013). Structure-Function of the G Protein-Coupled Receptor Superfamily. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol 53, 2013, P.A. Insel, ed. (Palo Alto: Annual Reviews), pp. 531-556.
- Kim, K.S., Rajarathnam, K., Clark-Lewis, I., and Sykes, B.D. (1996). Structural characterization of a monomeric chemokine: monocyte chemoattractant protein-3. *FEBS letters* 395, 277-282.
- Koenen, R.R., von Hundelshausen, P., Nesselova, I.V., Zernecke, A., Liehn, E.A., Sarabi, A., Kramp, B.K., Piccinini, A.M., Paludan, S.R., Kowalska, M.A., *et al.* (2009). Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Nat Med* 15, 97-103.

- Kuo, J.H., Chen, Y.P., Liu, J.S., Dubrac, A., Quemener, C., Prats, H., Bikfalvi, A., Wu, W.G., and Sue, S.C. (2013). Alternative C-terminal helix orientation alters chemokine function: structure of the anti-angiogenic chemokine, CXCL4L1. *J Biol Chem* *288*, 13522-13533.
- Langer, H.F., and Gawaz, M. (2008). Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thromb Haemost* *99*, 480-486.
- Lasagni, L., Grepin, R., Mazzinghi, B., Lazzeri, E., Meini, C., Sagrinati, C., Liotta, F., Frosali, F., Ronconi, E., Alain-Courtois, N., *et al.* (2007). PF-4/CXCL4 and CXCL4L1 exhibit distinct subcellular localization and a differentially regulated mechanism of secretion. *Blood* *109*, 4127-4134.
- Laudanna, C., and Alon, R. (2006). Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. *Thromb Haemost* *95*, 5-11.
- Lesnik, P., Haskell, C.A., and Charo, I.F. (2003). Decreased atherosclerosis in CX3CR1<sup>-/-</sup> mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest* *111*, 333-340.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* *7*, 678-689.
- Lievens, D., and von Hundelshausen, P. (2011). Platelets in atherosclerosis. *Thromb Haemost* *106*, 827-838.
- Looney, M.R., Nguyen, J.X., Hu, Y., Van Ziffle, J.A., Lowell, C.A., and Matthay, M.A. (2009). Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* *119*, 3450-3461.
- Maione, T.E., Gray, G.S., Petro, J., Hunt, A.J., Donner, A.L., Bauer, S.I., Carson, H.F., and Sharpe, R.J. (1990). Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* *247*, 77-79.
- Mann, J.M., and Davies, M.J. (1996). Vulnerable plaque. Relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries. *Circulation* *94*, 928-931.
- Massberg, S., Brand, K., Gruner, S., Page, S., Muller, E., Muller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., *et al.* (2002). A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* *196*, 887-896.
- Massberg, S., Konrad, I., Schurzinger, K., Lorenz, M., Schneider, S., Zohlnhoefer, D., Hoppe, K., Schiemann, M., Kennerknecht, E., Sauer, S., *et al.* (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.
- McDermott, D.H., Fong, A.M., Yang, Q., Sechler, J.M., Cupples, L.A., Merrell, M.N., Wilson, P.W., D'Agostino, R.B., O'Donnell, C.J., Patel, D.D., *et al.* (2003). Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest* *111*, 1241-1250.
- McGill, H.C., Jr., McMahan, C.A., Zieske, A.W., Tracy, R.E., Malcom, G.T., Herderick, E.E., and Strong, J.P. (2000). Association of Coronary Heart Disease Risk Factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth. *Circulation* *102*, 374-379.
- Middleton, J., Patterson, A.M., Gardner, L., Schmutz, C., and Ashton, B.A. (2002). Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* *100*, 3853-3860.
- Moatti, D., Faure, S., Fumeron, F., Amara Mel, W., Seknadji, P., McDermott, D.H., Debre, P., Aumont, M.C., Murphy, P.M., de Prost, D., *et al.* (2001). Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood* *97*, 1925-1928.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* *52*, 145-176.

- Nabel, E.G., and Braunwald, E. (2012). A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med* 366, 54-63.
- Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S.W., Litovsky, S., Rumberger, J., Badimon, J.J., Stefanadis, C., Moreno, P., Pasterkamp, G., *et al.* (2003a). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* 108, 1772-1778.
- Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S.W., Litovsky, S., Rumberger, J., Badimon, J.J., Stefanadis, C., Moreno, P., Pasterkamp, G., *et al.* (2003b). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 108, 1664-1672.
- Nesmelova, I.V., Sham, Y., Dudek, A.Z., van Eijk, L.I., Wu, G., Slungaard, A., Mortari, F., Griffioen, A.W., and Mayo, K.H. (2005). Platelet factor 4 and interleukin-8 CXC chemokine heterodimer formation modulates function at the quaternary structural level. *J Biol Chem* 280, 4948-4958.
- Patzelt, J., Verschoor, A., and Langer, H.F. (2015). Platelets and the complement cascade in atherosclerosis. *Front Physiol* 6, 49.
- Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben-Hur, H., Many, A., Shultz, L., *et al.* (1999). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283, 845-848.
- Pervushina, O., Scheuerer, B., Reiling, N., Behnke, L., Schroder, J.M., Kasper, B., Brandt, E., Bulfone-Paus, S., and Petersen, F. (2004). Platelet factor 4/CXCL4 induces phagocytosis and the generation of reactive oxygen metabolites in mononuclear phagocytes independently of Gi protein activation or intracellular calcium transients. *J Immunol* 173, 2060-2067.
- Petersen, F., Bock, L., Flad, H.D., and Brandt, E. (1998). A chondroitin sulfate proteoglycan on human neutrophils specifically binds platelet factor 4 and is involved in cell activation. *J Immunol* 161, 4347-4355.
- Pitsilos, S., Hunt, J., Mohler, E.R., Prabhakar, A.M., Poncz, M., Dawicki, J., Khalapyan, T.Z., Wolfe, M.L., Fairman, R., Mitchell, M., *et al.* (2003). Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thromb Haemost* 90, 1112-1120.
- Potteaux, S., Combadiere, C., Esposito, B., Casanova, S., Merval, R., Ardouin, P., Gao, J.L., Murphy, P.M., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2005). Chemokine receptor CCR1 disruption in bone marrow cells enhances atherosclerotic lesion development and inflammation in mice. *Mol Med* 11, 16-20.
- Proudfoot, A.E., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J.P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P.R., and Wells, T.N. (2001). The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J Biol Chem* 276, 10620-10626.
- Proudfoot, A.E., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N., and Kosco-Vilbois, M.H. (2003). Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1885-1890.
- Proudfoot, A.E., Power, C.A., Hoogewerf, A.J., Montjovent, M.O., Borlat, F., Offord, R.E., and Wells, T.N. (1996). Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem* 271, 2599-2603.
- Proudfoot, A.E.I., Johnson, Z., Bonvin, P., and Handel, T.M. (2017). Glycosaminoglycan Interactions with Chemokines Add Complexity to a Complex System. *Pharmaceuticals (Basel)* 10, 70.
- Qin, L., Kufareva, I., Holden, L.G., Wang, C., Zheng, Y., Zhao, C., Fenalti, G., Wu, H., Han, G.W., Cherezov, V., *et al.* (2015). Structural biology. Crystal structure of the chemokine receptor CXCR4 in complex with a viral chemokine. *Science* 347, 1117-1122.
- Quinones, M.P., Martinez, H.G., Jimenez, F., Estrada, C.A., Dudley, M., Willmon, O., Kulkarni, H., Reddick, R.L., Fernandes, G., Kuziel, W.A., *et al.* (2007). CC chemokine receptor 5 influences late-stage atherosclerosis. *Atherosclerosis* 195, e92-103.
- Rader, D.J., and Daugherty, A. (2008). Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 451, 904-913.

- Rahman, K., Vengrenyuk, Y., Ramsey, S.A., Vila, N.R., Girgis, N.M., Liu, J.H., Gusarova, V., Gromada, J., Weinstock, A., Moore, K.J., *et al.* (2017). Inflammatory Ly6C(hi) monocytes and their conversion to M2 macrophages drive atherosclerosis regression. *Journal of Clinical Investigation* 127, 2904-2915.
- Rajaratnam, K., Sykes, B.D., Kay, C.M., Dewald, B., Geiser, T., Baggiolini, M., and Clark-Lewis, I. (1994). Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science* 264, 90-92.
- Rath, D., Chatterjee, M., Borst, O., Muller, K., Stellos, K., Mack, A.F., Bongartz, A., Bigalke, B., Langer, H., Schwab, M., *et al.* (2014). Expression of stromal cell-derived factor-1 receptors CXCR4 and CXCR7 on circulating platelets of patients with acute coronary syndrome and association with left ventricular functional recovery. *Eur Heart J* 35, 386-394.
- Reitsma, S., Slaaf, D.W., Vink, H., van Zandvoort, M.A., and oude Egbrink, M.G. (2007). The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* 454, 345-359.
- Ruggeri, Z.M. (2002). Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 8, 1227-1234.
- Sachais, B.S., Turrentine, T., Dawicki McKenna, J.M., Rux, A.H., Rader, D., and Kowalska, M.A. (2007). Elimination of platelet factor 4 (PF4) from platelets reduces atherosclerosis in C57Bl/6 and apoE<sup>-/-</sup> mice. *Thromb Haemost* 98, 1108-1113.
- Saederup, N., Chan, L., Lira, S.A., and Charo, I.F. (2008). Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice - Evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation* 117, 1642-1648.
- Sarabi, A., Kramp, B.K., Drechsler, M., Hackeng, T.M., Soehnlein, O., Weber, C., Koenen, R.R., and Von Hundelshausen, P. (2011). CXCL4L1 inhibits angiogenesis and induces undirected endothelial cell migration without affecting endothelial cell proliferation and monocyte recruitment. *J Thromb Haemost* 9, 209-219.
- Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata, Y., and Nagai, R. (2002). Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 8, 403-409.
- Schall, T.J., Jongstra, J., Dyer, B.J., Jorgensen, J., Clayberger, C., Davis, M.M., and Krensky, A.M. (1988). A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol* 141, 1018-1025.
- Scheuerer, B., Ernst, M., Durrbaum-Landmann, I., Fleischer, J., Grage-Griebenow, E., Brandt, E., Flad, H.D., and Petersen, F. (2000). The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood* 95, 1158-1166.
- Schober, A., Knarren, S., Lietz, M., Lin, E.A., and Weber, C. (2003). Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 108, 2491-2497.
- Shaw, J.P., Kryger, G., Cleasby, A., Wonacott, A., Power, C.A., Proudfoot, A.E., and Wells, T.N. (1994). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human RANTES. *Journal of molecular biology* 242, 589-590.
- Sjaarda, J., Gerstein, H., Chong, M., Yusuf, S., Meyre, D., Anand, S.S., Hess, S., and Pare, G. (2018). Blood CSF1 and CXCL12 as Causal Mediators of Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol* 72, 300-310.
- Skalen, K., Gustafsson, M., Rydberg, E.K., Hulten, L.M., Wiklund, O., Innerarity, T.L., and Boren, J. (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 417, 750-754.
- Skelton, N.J., Aspiras, F., Ogez, J., and Schall, T.J. (1995). Proton NMR assignments and solution conformation of RANTES, a chemokine of the C-C type. *Biochemistry* 34, 5329-5342.
- Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.

- Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* *92*, 1355-1374.
- Stellos, K., Bigalke, B., Langer, H., Geisler, T., Schad, A., Kogel, A., Pfaff, F., Stakos, D., Seizer, P., Muller, I., *et al.* (2009). Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34+ progenitor cells. *Eur Heart J* *30*, 584-593.
- Strong, J.P., Malcom, G.T., McMahan, C.A., Tracy, R.E., Newman, W.P., 3rd, Herderick, E.E., and Cornhill, J.F. (1999). Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study. *Jama* *281*, 727-735.
- Struyf, S., Burdick, M.D., Proost, P., Van Damme, J., and Strieter, R.M. (2004). Platelets release CXCL4L1, a nonallelic variant of the chemokine platelet factor-4/CXCL4 and potent inhibitor of angiogenesis. *Circ Res* *95*, 855-857.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* *25*, 977-988.
- Tacke, F., Alvarez, D., Kaplan, T.J., Jakubzick, C., Spanbroek, R., Llodra, J., Garin, A., Liu, J., Mack, M., van Rooijen, N., *et al.* (2007). Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* *117*, 185-194.
- Tanaka, T., Manome, Y., Wen, P., Kufe, D.W., and Fine, H.A. (1997). Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nat Med* *3*, 437-442.
- Teupser, D., Pavlides, S., Tan, M., Gutierrez-Ramos, J.C., Kolbeck, R., and Breslow, J.L. (2004). Major reduction of atherosclerosis in fractalkine (CX3CL1)-deficient mice is at the brachiocephalic artery, not the aortic root. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 17795-17800.
- Thelen, M., Munoz, L.M., Rodriguez-Frade, J.M., and Mellado, M. (2010). Chemokine receptor oligomerization: functional considerations. *Current opinion in pharmacology* *10*, 38-43.
- van der Meijden, P.E.J., and Heemskerk, J.W.M. (2019). Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nature reviews Cardiology* *16*, 166-179.
- Veillard, N.R., Kwak, B., Pelli, G., Mulhaupt, F., James, R.W., Proudfoot, A.E., and Mach, F. (2004). Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res* *94*, 253-261.
- von Hundelshausen, P., Agten, S.M., Eckardt, V., Blanchet, X., Schmitt, M.M., Ippel, H., Neideck, C., Bidzhekov, K., Leberzammer, J., Wichapong, K., *et al.* (2017). Chemokine interactome mapping enables tailored intervention in acute and chronic inflammation. *Sci Transl Med* *9*, eaah6650.
- von Hundelshausen, P., Koenen, R.R., Sack, M., Mause, S.F., Adriaens, W., Proudfoot, A.E., Hackeng, T.M., and Weber, C. (2005). Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* *105*, 924-930.
- von Hundelshausen, P., Koenen, R.R., and Weber, C. (2009). Platelet-mediated enhancement of leukocyte adhesion. *Microcirculation* *16*, 84-96.
- von Hundelshausen, P., Petersen, F., and Brandt, E. (2007). Platelet-derived chemokines in vascular biology. *Thromb Haemost* *97*, 704-713.
- von Hundelshausen, P., and Weber, C. (2007). Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* *100*, 27-40.



- von Hundelshausen, P., Weber, K.S., Huo, Y., Proudfoot, A.E., Nelson, P.J., Ley, K., and Weber, C. (2001). RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* *103*, 1772-1777.
- Walz, A., and Baggiolini, M. (1989). A novel cleavage product of beta-thromboglobulin formed in cultures of stimulated mononuclear cells activates human neutrophils. *Biochemical and biophysical research communications* *159*, 969-975.
- Wang, X., Watson, C., Sharp, J.S., Handel, T.M., and Prestegard, J.H. (2011). Oligomeric structure of the chemokine CCL5/RANTES from NMR, MS, and SAXS data. *Structure* *19*, 1138-1148.
- Wasilko, D.J., Johnson, Z.L., Ammirati, M., Che, Y., Griffor, M.C., Han, S., and Wu, H. (2020). Structural basis for chemokine receptor CCR6 activation by the endogenous protein ligand CCL20. *Nat Commun* *11*, 3031.
- Watson, J.B., Getzler, S.B., and Mosher, D.F. (1994). Platelet factor 4 modulates the mitogenic activity of basic fibroblast growth factor. *J Clin Invest* *94*, 261-268.
- Weber, C., Meiler, S., Doring, Y., Koch, M., Drechsler, M., Megens, R.T., Rowinska, Z., Bidzhekov, K., Fecher, C., Ribechini, E., *et al.* (2011). CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis by restraining regulatory T cell homeostasis in mice. *J Clin Invest* *121*, 2898-2910.
- Weber, C., and Noels, H. (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* *17*, 1410-1422.
- Weber, C., Schober, A., and Zernecke, A. (2004). Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *24*, 1997-2008.
- Weber, K.S., von Hundelshausen, P., Clark-Lewis, I., Weber, P.C., and **Weber, C.** (1999). Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur J Immunol* *29*, 700-712.
- Zarbock, A., Singbartl, K., and Ley, K. (2006). Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J Clin Invest* *116*, 3211-3219.
- Zavodszky, G., van Rooij, B., Czaja, B., Azizi, V., de Kanter, D., and Hoekstra, A.G. (2019). Red blood cell and platelet diffusivity and margination in the presence of cross-stream gradients in blood flows. *Phys Fluids* *31*, 11.
- Zernecke, A., Shagdarsuren, E., and Weber, C. (2008). Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *28*, 1897-1908.
- Zheng, Y., Han, G.W., Abagyan, R., Wu, B., Stevens, R.C., Cherezov, V., Kufareva, I., and Handel, T.M. (2017). Structure of CC Chemokine Receptor 5 with a Potent Chemokine Antagonist Reveals Mechanisms of Chemokine Recognition and Molecular Mimicry by HIV. *Immunity* *46*, 1005-1017 e1005.
- Zheng, Y., Qin, L., Zacarias, N.V., de Vries, H., Han, G.W., Gustavsson, M., Dabros, M., Zhao, C., Cherney, R.J., Carter, P., *et al.* (2016). Structure of CC chemokine receptor 2 with orthosteric and allosteric antagonists. *Nature* *540*, 458-461.
- Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* *12*, 121-127.

## Verzeichnis eigener wissenschaftlicher Veröffentlichungen

### Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor

1. **von Hundelshausen P**, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K and Weber C. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation*. 2001;103:1772-7.
2. Baltus T, **von Hundelshausen P\***, Mause SF, Buhre W, Rossaint R and Weber C. Differential and additive effects of platelet-derived chemokines on monocyte arrest on inflamed endothelium under flow conditions. *J Leukoc Biol*. 2005;78:435-41. \*geteilte Erstautorenschaft
3. **von Hundelshausen P**, Koenen RR, Sack M, Mause SF, Adriaens W, Proudfoot AE, Hackeng TM and Weber C. Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood*. 2005;105:924-30.
4. Sarabi A, Kramp BK, Drechsler M, Hackeng TM, Soehnlein O, Weber C, Koenen RR and **von Hundelshausen P**. CXCL4L1 inhibits angiogenesis and induces undirected endothelial cell migration without affecting endothelial cell proliferation and monocyte recruitment. *J Thromb Haemost*. 2011;9:209-19.
5. Blanchet X, Cesarek K, Brandt J, Herwald H, Teupser D, Kuchenhoff H, Karshovska E, Mause SF, Siess W, Wasmuth H, Soehnlein O, Koenen RR, Weber C and **von Hundelshausen P**. Inflammatory role and prognostic value of platelet chemokines in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost*. 2014;112:1277-87.
6. **von Hundelshausen P**, Oexle K, Bidzhekov K, Schmitt MM, Hristov M, Blanchet X, Kaemmerer H, Matyas G, Meitinger T and Weber C. Recurrent spontaneous coronary dissections in a patient with a de novo fibrillin-1 mutation without Marfan syndrome. *Thromb Haemost*. 2015;113:668-70.
7. **von Hundelshausen P**, Agten SM, Eckardt V, Blanchet X, Schmitt MM, Ippel H, Neideck C, Bidzhekov K, Leberzammer J, Wichapong K, Faussner A, Drechsler M, Grommes J, van Geffen JP, Li H, Ortega-Gomez A, Megens RT, Naumann R, Dijkgraaf I, Nicolaes GA, Doring Y, Soehnlein O, Lutgens E, Heemskerk JW, Koenen RR, Mayo KH, Hackeng TM and Weber C. Chemokine interactome mapping enables tailored intervention in acute and chronic inflammation. *Sci Transl Med*. 2017;9:eaah6650.
8. Eckardt V, Miller MC, Blanchet X, Duan R, Leberzammer J, Duchene J, Soehnlein O, Megens RT, Ludwig AK, Dregni A, Faussner A, Wichapong K, Ippel H, Dijkgraaf I, Kaltner H, Doring Y, Bidzhekov K, Hackeng TM, Weber C, Gabius HJ, **von Hundelshausen P\*** and Mayo KH. Chemokines and galectins form heterodimers to modulate inflammation. *EMBO Rep*. 2020;21:e47852. \*geteilte Letzt- und alleinige korrespondierende Autorschaft

### Originalarbeiten als Koautor

1. Draude G, **von Hundelshausen P**, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HW and Weber C. Distinct scavenger receptor expression and function in the human CD14(+)/CD16(+) monocyte subset. *Am J Physiol*. 1999;276:H1144-9.
2. Weber KS, **von Hundelshausen P**, Clark-Lewis I, Weber PC and Weber C. Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur J Immunol*. 1999;29:700-12.
3. Weber C, Belge KU, **von Hundelshausen P**, Draude G, Steppich B, Mack M, Frankenberger M, Weber KS and Ziegler-Heitbrock HW. Differential chemokine receptor

- expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol.* 2000;67:699-704.
4. Neuzil J, Schroder A, **von Hundelshausen P**, Zerneck A, Weber T, Gellert N and Weber C. Inhibition of inflammatory endothelial responses by a pathway involving caspase activation and p65 cleavage. *Biochemistry.* 2001;40:4686-92.
  5. Neuzil J, Schröder A, **von Hundelshausen P**, Zerneck A, Weber T, Gellert N and Weber C. Inhibition of Inflammatory Endothelial Responses by a Pathway Involving Caspase Activation and p65 Cleavage. *Biochemistry.* 2001;40:4686-4692.
  6. Schober A, Manka D, **von Hundelshausen P**, Huo Y, Hanrath P, Sarembock IJ, Ley K and Weber C. Deposition of Platelet RANTES Triggering Monocyte Recruitment Requires P-Selectin and Is Involved in Neointima Formation After Arterial Injury. *Circulation.* 2002;106:1523-1529.
  7. Schober A, Zerneck A, Liehn EA, **von Hundelshausen P**, Knarren S, Kuziel WA and Weber C. Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets. *Circ Res.* 2004;95:1125-33.
  8. Mause SF, **von Hundelshausen P**, Zerneck A, Koenen RR and Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1512-8.
  9. Zerneck A, Schober A, Bot I, **von Hundelshausen P**, Liehn EA, Mopps B, Mericskay M, Gierschik P, Biessen EA and Weber C. SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res.* 2005;96:784-91.
  10. von Hundelshausen P, Zerneck A, Liehn EA, Fraemohs L, **von Hundelshausen P**, Koenen RR, Corada M, Dejana E and Weber C. Importance of junctional adhesion molecule-A for neointimal lesion formation and infiltration in atherosclerosis-prone mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:e10-3.
  11. Hundhausen C, Schulte A, Schulz B, Andrzejewski MG, Schwarz N, **von Hundelshausen P**, Winter U, Paliga K, Reiss K, Saftig P, Weber C and Ludwig A. Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *J Immunol.* 2007;178:8064-72.
  12. Koenen RR, **von Hundelshausen P** and Weber C. Inflammatory blues turns velvet skin into rawhide: monocyte rolling on modified endothelial PSGL-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:990-2.
  13. Nowak B, Weber C, Schober A, Zeiffer U, Liehn EA, **von Hundelshausen P**, Reinartz P, Schaefer WM and Buell U. Indium-111 oxine labelling affects the cellular integrity of haematopoietic progenitor cells. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging.* 2007;34:715-21.
  14. Hristov M, Schmitz S, Schuhmann C, Leyendecker T, **von Hundelshausen P**, Krotz F, Sohn HY, Nauwelaers FA and Weber C. An optimized flow cytometry protocol for analysis of angiogenic monocytes and endothelial progenitor cells in peripheral blood. *Cytometry A.* 2009;75:848-53.
  15. Koenen RR, **von Hundelshausen P**, Nesselova IV, Zerneck A, Liehn EA, Sarabi A, Kramp BK, Piccinini AM, Paludan SR, Kowalska MA, Kungl AJ, Hackeng TM, Mayo KH and Weber C. Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Nat Med.* 2009;15:97-103.

16. Segerer S, Johnson Z, Rek A, Baltus T, **von Hundelshausen P**, Kungl AJ, Proudfoot AE, Weber C and Nelson PJ. The basic residue cluster (55)KKWVR(59) in CCL5 is required for in vivo biologic function. *Mol Immunol*. 2009;46:2533-8.
17. Zaldivar MM, Pauels K, **von Hundelshausen P**, Berres ML, Schmitz P, Bornemann J, Kowalska MA, Gassler N, Streetz KL, Weiskirchen R, Trautwein C, Weber C and Wasmuth HE. CXC chemokine ligand 4 (Cxcl4) is a platelet-derived mediator of experimental liver fibrosis. *Hepatology*. 2010;51:1345-53.
18. Grommes J, Alard JE, Drechsler M, Wantha S, Morgelin M, Kuebler WM, Jacobs M, **von Hundelshausen P**, Markart P, Wygrecka M, Preissner KT, Hackeng TM, Koenen RR, Weber C and Soehnlein O. Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:628-36.
19. Karshovska E, Weber C and **von Hundelshausen P**. Platelet chemokines in health and disease. *Thromb Haemost*. 2013;110:894-902.
20. Koenen R, Karshovska E, Zhao Z, **von Hundelshausen P** and Weber C. Role of platelet-specific junctional adhesion molecule. A (JAM-A) in atherosclerosis progression. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2013;11:155.
21. Kramp BK, Megens RT, Sarabi A, Winkler S, Projahn D, Weber C, Koenen RR and **von Hundelshausen P**. Exchange of extracellular domains of CCR1 and CCR5 reveals confined functions in CCL5-mediated cell recruitment. *Thromb Haemost*. 2013;110:795-806.
22. Strussmann T, Tillmann S, Wirtz T, Bucala R, **von Hundelshausen P** and Bernhagen J. Platelets are a previously unrecognised source of MIF. *Thromb Haemost*. 2013;110:1004-13.
23. Wantha S, Alard JE, Megens RT, van der Does AM, Doring Y, Drechsler M, Pham CT, Wang MW, Wang JM, Gallo RL, **von Hundelshausen P**, Lindbom L, Hackeng T, Weber C and Soehnlein O. Neutrophil-derived cathelicidin promotes adhesion of classical monocytes. *Circ Res*. 2013;112:792-801.
24. Hartwig H, Drechsler M, Lievens D, Kramp B, **von Hundelshausen P**, Lutgens E, Weber C, Doring Y and Soehnlein O. Platelet-derived PF4 reduces neutrophil apoptosis following arterial occlusion. *Thromb Haemost*. 2014;111:562-4.
25. Richter R, Jochheim-Richter A, Ciuculescu F, Kollar K, Seifried E, Forssmann U, Verzijl D, Smit MJ, Blanchet X, **von Hundelshausen P**, Weber C, Forssmann WG and Henschler R. Identification and characterization of circulating variants of CXCL12 from human plasma: effects on chemotaxis and mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem cells and development*. 2014;23:1959-74.
26. Ahmadsei M, Lievens D, Weber C, **von Hundelshausen P** and Gerdes N. Immune-mediated and lipid-mediated platelet function in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2015;26:438-48.
27. Alard JE, Ortega-Gomez A, Wichapong K, Bongiovanni D, Horckmans M, Megens RT, Leoni G, Ferraro B, Rossaint J, Paulin N, Ng J, Ippel H, Suylen D, Hinkel R, Blanchet X, Gaillard F, D'Amico M, **von Hundelshausen P**, Zarbock A, Scheiermann C, Hackeng TM, Steffens S, Kupatt C, Nicolaes GA, Weber C and Soehnlein O. Recruitment of classical monocytes can be inhibited by disturbing heteromers of neutrophil HNP1 and platelet CCL5. *Sci Transl Med*. 2015;7:317ra196.
28. Karshovska E, Zhao Z, Blanchet X, Schmitt MM, Bidzhekov K, Soehnlein O, **von Hundelshausen P**, Mattheij NJ, Cosemans JM, Megens RT, Koeppl TA, Schober A, Hackeng TM, Weber C and Koenen RR. Hyperreactivity of junctional adhesion molecule

- A-deficient platelets accelerates atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Circ Res.* 2015;116:587-99.
29. Koenen RR, Werner I, Vajen T, Projahn D, Staudt M, Curaj A, Soenmez TT, Simseyilmaz S, Hackeng TM, **von Hundelshausen P**, Weber C and Liehn EA. Blocking heteromerization of platelet chemokines CCL5 and CXCL4 reduces inflammation and preserves heart function after myocardial infarction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2015;13:786.
  30. Wirtz TH, Tillmann S, Strussmann T, Kraemer S, Heemskerk JW, Grottko O, Gawaz M, **von Hundelshausen P** and Bernhagen J. Platelet-derived MIF: a novel platelet chemokine with distinct recruitment properties. *Atherosclerosis.* 2015;239:1-10.
  31. Agten SM, Koenen RR, Ippel H, Eckardt V, **von Hundelshausen P**, Mayo KH, Weber C and Hackeng TM. Probing Functional Heteromeric Chemokine Protein-Protein Interactions through Conformation-Assisted Oxime Ligation. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016;55:14963-14966.
  32. Vajen T, Werner I, Projahn D, Staudt M, Curaj A, Soenmez TT, Simseyilmaz S, Hackeng TM, **von Hundelshausen P**, Koenen RR, Weber C and Liehn EA. Blocking heteromerization of platelet chemokines ccl5 and cxcl4 reduces inflammation and preserves heart function after myocardial infarction. *Cardiovascular research.* 2016;111:S96.
  33. Paulin N, Doring Y, Kooijman S, Blanchet X, Viola JR, de Jong R, Mandl M, Hendrikse J, Schiener M, **von Hundelshausen P**, Vogt A, Weber C, Bdeir K, Hofmann SM, Rensen PCN, Drechsler M and Soehnlein O. Human Neutrophil Peptide 1 Limits Hypercholesterolemia-induced Atherosclerosis by Increasing Hepatic LDL Clearance. *EBioMedicine.* 2017;16:204-211.
  34. Zhao Z, Vajen T, Karshovska E, Dickhout A, Schmitt MM, Megens RTA, **von Hundelshausen P**, Koeppel TA, Hackeng TM, Weber C and Koenen RR. Deletion of junctional adhesion molecule A from platelets increases early-stage neointima formation after wire injury in hyperlipidemic mice. *J Cell Mol Med.* 2017;21:1523-1531.
  35. Vajen T, Koenen RR, Werner I, Staudt M, Projahn D, Curaj A, Sonmez TT, Simseyilmaz S, Schumacher D, Mollmann J, Hackeng TM, **von Hundelshausen P**, Weber C and Liehn EA. Blocking CCL5-CXCL4 heteromerization preserves heart function after myocardial infarction by attenuating leukocyte recruitment and NETosis. *Sci Rep-Uk.* 2018;8:11.
  36. Bianchini M, Duchene J, Santovito D, Schloss MJ, Evrard M, Winkels H, Aslani M, Mohanta SK, Horckmans M, Blanchet X, Lacy M, **von Hundelshausen P**, Atzler D, Habenicht A, Gerdes N, Pelisek J, Ng LG, Steffens S, Weber C and Megens RTA. PD-L1 expression on nonclassical monocytes reveals their origin and immunoregulatory function. *Sci Immunol.* 2019;4.
  37. Goldmann L, Duan R, Kragh T, Wittmann G, Weber C, Lorenz R, **von Hundelshausen P**, Spannagl M and Siess W. Oral Bruton tyrosine kinase inhibitors block activation of the platelet Fc receptor CD32a (FcγRIIA): a new option in HIT? *Blood Adv.* 2019;3:4021-4033.
  38. Kornhuber KTI, Seidel H, Pujol C, Meierhofer C, Rösenthaller F, Pressler A, Stöckl A, Nagdyman N, Neidenbach RC, **von Hundelshausen P**, Halle M, Holdenrieder S, Ewert P, Kaemmerer H and Hauser M. Hemostatic abnormalities in adult patients with Marfan syndrome. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy.* 2019.
  39. Santovito D, Egea V, Bidzhekov K, Natarelli L, Mourao A, Blanchet X, Wichapong K, Aslani M, Brunssen C, Horckmans M, Hristov M, Geerlof A, Lutgens E, Daemen M, Hackeng T, Ries C, Chavakis T, Morawietz H, Naumann R, **von Hundelshausen P**, Steffens S, Duchene J, Megens RTA, Sattler M and Weber C. Noncanonical inhibition of caspase-3

by a nuclear microRNA confers endothelial protection by autophagy in atherosclerosis. *Sci Transl Med.* 2020;12.

### Übersichtsartikel und Editorials

1. **von Hundelshausen P**, Petersen F and Brandt E. Platelet-derived chemokines in vascular biology. *Thromb Haemost.* 2007;97:704-13.
2. **von Hundelshausen P** and Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2007;100:27-40.
3. Gleissner CA, **von Hundelshausen P** and Ley K. Platelet chemokines in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1920-7.
4. Koenen RR and **von Hundelshausen P**. The chemokine system as therapeutic target in cardiovascular disease. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.* 2008;5:e285-e292.
5. **von Hundelshausen P**, Koenen RR and Weber C. Platelet-mediated enhancement of leukocyte adhesion. *Microcirculation.* 2009;16:84-96.
6. Hristov M, Leyendecker T, Schuhmann C, **von Hundelshausen P**, Heussen N, Kehmeier E, Krotz F, Sohn HY, Klauss V and Weber C. Circulating monocyte subsets and cardiovascular risk factors in coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2010;104:412-4.
7. Lievens D and **von Hundelshausen P**. Platelets in atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2011;106:827-38.
8. Blanchet X, Langer M, Weber C, Koenen RR and **von Hundelshausen P**. Touch of chemokines. *Frontiers in immunology.* 2012;3:175.
9. **von Hundelshausen P** and Weber C. [Chronic inflammation and atherosclerosis]. *Deutsche medizinische Wochenschrift.* 2013;138:1839-44.
10. **von Hundelshausen P** and Schmitt MM. Platelets and their chemokines in atherosclerosis-clinical applications. *Front Physiol.* 2014;5:294.
11. Duchene J and **von Hundelshausen P**. Platelet-derived chemokines in atherosclerosis. *Hamostaseologie.* 2015;35:137-41.
12. Weber C and **von Hundelshausen P**. CANTOS trial validates the inflammatory pathogenesis of atherosclerosis: setting the stage for a new chapter in therapeutic targeting. *Circ Res.* 2017;121:1119-1121.
13. Eckardt V, Weber C and **von Hundelshausen P**. Glycans and Glycan-Binding Proteins in Atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2019;119:1265-1273.
14. Kessler T, Schunkert H and **von Hundelshausen P**. Novel Approaches to Fine-Tune Therapeutic Targeting of Platelets in Atherosclerosis: A Critical Appraisal. *Thromb Haemost.* 2020. In press.

## Danksagung

An vorderster Stelle gilt mein Dank meinem Mentor und Freund Prof. Dr. Christian Weber. Ihm verdanke ich, dass grundlagenwissenschaftliches Arbeiten und eine klinische Ausbildung überhaupt vereinbar waren. Dazu waren immer wieder organisatorische Anpassungen anfangs im Lehr- und Forschungsgebiet molekulare Kardiologie, dann im neugegründeten Institut für molekulare Kardiologie (IMCAR) und Absprachen mit der Leitung der jeweiligen internistischen Klinik notwendig. An dieser Stelle danke ich daher den Direktoren der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums der RWTH Aachen Prof. Dr. Peter Hanrath, Prof. Dr. Malte Kelm und Prof. Dr. Nikolaus Marx, mich neben der klinischen Ausbildung organisatorisch unterstützt zu haben. Neben der Organisation waren es aber vor allem das wissenschaftliche Anstoßen, Begleiten und Unterstützen sowohl im experimentellen Detail als auch in der längerfristigen Ausrichtung, die eine erfolgreiche Planung, Ausführung und vor allem den Abschluss der Projekte erst ermöglichten.

Ich danke Prof. Dr. Rory Koenen, der mich eine lange Strecke auf dem Weg von Aachen nach München begleitet hat, für seine Freundschaft und die fruchtbaren Ideen, die sich weiter fortpflanzen. Ihm sind wichtige Kooperationen zu verdanken und auch sein breites Interesse an nicht nur medizinischer Forschung haben dazu geführt gelegentlich „über den Tellerrand“ zu schauen.

Ich danke Prof. Tilman Hackeng und Prof. Kevin Mayo für die langjährige vertrauensvolle Zusammenarbeit, das zu Verfügung stellen ihrer Expertise und Ressourcen sowie den unschätzbaren Rat, der über wissenschaftliche Themen hinaus die gemeinsamen Projekte begleitete.

Besonderer Dank gilt Dr. Xavier Blanchet, der mit unermüdlichem Einsatz im Labor nicht nur half neue Methoden aufzubauen, sondern der auch als Ansprechpartner für Doktoranden und technische Assistenten das Rückgrat der Arbeitsgruppe bildete und selbstlos den Doktoranden so manchen experimentellen Weg ebnete.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an die Mediziner und Naturwissenschaftler Dr. Sebastian Mause, Katja Cesarek, Dr. Alisina Sarabi, Dr. Birgit Kramp, Veit Eckardt, Julian Leberzammer und Tomasz Lakomic, ohne deren Engagement und treibende Kraft die Projekte nicht hätten umgesetzt werden können und die mit den Projekten promovierten oder gerade dabei sind.

Ich danke für die technische Unterstützung und Umsetzung der Experimente, Organisation des Laboralltages und der personellen und finanziellen Administration, für ein immer freundliches Miteinander und den reibungslosen Ablauf der finanziellen und organisatorischen Verpflichtungen Annie Mayer, Jolanta Tupiec, Eva Bretzke, Lusine Saroyan, Sabine Streicher, Brigitte Stöger, Emanuel Putz, Damaris Bindl, Iliriana Vatovci.

Mein Dank gilt auch meinen Kollegen vom Institut, vom SFB1123, vom CARIM aus Maastricht für die gemeinsamen Diskussionen nach Vorträgen, Projektbesprechungen und vielfältigen Kooperationen. Hier möchte ich mich insbesondere ganz herzlich bei Dr. Remco Megens bedanken, dessen unerschöpfliche Physis und seine Liebe zur Mikroskopie mich immer beeindruckt, mitgezogen und angespornt haben.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. P.C. Weber bedanken, der mich aus der Ferne begleitete und wiederholt auf Notwendigkeiten hinwies.

Zuletzt gilt mein innigster Gruß und Dank meiner Familie, besonders meiner Ehefrau Pia, meinen Eltern und meinen Kindern, die die Aufs und Abs in dieser Zeit manches Mal vielleicht etwas verwundert, stets jedoch liebevoll mitgetragen haben.