

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Direktor: Professor Dr. med. Steffen Massberg
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



Der Einfluss des Retinoid-X-Rezeptors auf die Thrombozytenfunktion und die
Thrombopoese

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Verena Dorothee Warm

aus

Nürnberg

Jahr

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Erster Gutachter: PD Dr. med. Tobias Petzold

Mitberichterstatter: apl. Prof. Dr. Michael Spannagl
PD Dr. med. Claudia Nußbaum
Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Nieswandt
Prof. Dr. med. Uta Behrends

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 06.10.2022

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits im Journal of Thrombosis and Hemostasis veröffentlicht: Lüsebrink E*, Warm V*, Pircher J, et al. Role of RXR β in platelet function and arterial thrombosis. *JThromb Haemost.* 2019;17:1489-1499 (1), * contributed equally.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VII
Abstract	VIII
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Thrombozyten	1
1.1.1 Megakaryopoese und Thrombopoese	1
1.1.2 Thrombozytenadhäsion und -aktivierung.....	2
1.1.3 Kernrezeptoren in Thrombozyten	6
1.2 Der Retinoid-X-Rezeptor	7
1.2.1 Evolutionsbiologie des Retinoid-X-Rezeptors.....	8
1.2.2 Expression und Struktur	8
1.2.3 RXR-Liganden	9
1.2.4 Funktionen des RXR	12
1.3 Der RXR in Megakaryozyten und Thrombozyten	15
1.3.1 Einfluss von RXR-Liganden.....	16
2 Zielsetzung	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Versuchstiere	21
3.1.1 Knockoutmodelle	21
3.1.2 Blutentnahme	25
3.2 Experimentelle Versuche	26
3.2.1 Arbeiten mit 9-cis Retinsäure	26
3.2.2 Thrombozytenassays	26
3.2.3 Megakaryozytenassays	31
3.2.4 Kultivierung hämatopoetischer Vorläuferzellen	35
3.3 Eisenchlorid-induzierte arterielle Thrombose in vivo	36
3.4 Statistische Auswertung	37

4	Ergebnisse	39
4.1	Expression des Retinoid-X-Rezeptors in Thrombozyten und - megakaryozyten	39
4.1.1	Westernblot	39
4.1.2	Nachweis der RXR-Isoformen in Thrombozyten und Megakaryozyten mittels Immunofluoreszenzfärbung	40
4.2	Der Einfluss von RXR-Liganden auf die Thrombozytenfunktion .	43
4.2.1	Aggregometrie	43
4.2.2	Spreading	43
4.2.3	FACS.....	46
4.3	Der Einfluss von RXR-Liganden auf die Thrombozytenbildung ..	48
4.3.1	Quantifizierung der Proplättchenpartikelbildung mittels FACS Analyse	48
4.3.2	Quantifizierung der proplättchenbildenden Megakaryozyten mittels Immunofluoreszenz.....	49
4.4	Knockout-Tiere	50
4.4.1	Mx1-Cre/ RXR $\beta^{lox/lox}$	50
4.4.2	Pf4-Cre/ RXR $\beta^{lox/lox}$	53
5	Diskussion	71
5.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	71
5.2	Diskussion der Methoden	72
5.2.1	Das Pf4-Cre/ RXR $\beta^{lox/lox}$ Knockoutmodell.....	72
5.2.2	Spezifität der verwendeten RXR-Liganden.....	72
5.3	Diskussion der Ergebnisse	73
5.3.1	RXR-Isoformen in Thrombozyten und Megakaryozyten	73
5.3.2	Reduktion der Plättchenfunktion durch RXR-Liganden	73
5.3.3	Der Einfluss des RXRs auf die Thrombopoese	74
5.3.4	Keine Beeinträchtigung der Thrombozytenbildung durch RXR β -Knockout.....	75
5.3.5	Keine Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion durch RXR β -Knockout.....	76

5.3.6	Keine Beeinträchtigung der thrombozytenhemmenden Eigenschaften von RXR-Liganden bei RXR β -Knockout.....	76
5.3.7	DNA-unabhängige Funktionen des Retinoid-X-Rezeptors	77
5.4	Ausblick.....	78
6	Literatur.....	79
7	Danksagung.....	89
	Publikationsliste.....	91

Zusammenfassung

Der Retinoid-X-Rezeptor (RXR) ist ein Kernrezeptor, der durch die Bindung seines Liganden 9-cis Retinsäure als Transkriptionsfaktor wichtige Prozesse wie Zelldifferenzierung, Zellmetabolismus und Zelltod reguliert. Darüber hinaus führt die Behandlung von humanen Thrombozyten mit RXR-Liganden zu einer reduzierten Thrombozytenfunktion, diese Effekte wurden bisher DNA-unabhängigen Funktionen des RXRs zugeschrieben.

Ziel der Arbeit war es die inhibitorischen Effekte der RXR-Liganden auf murine Thrombozyten zu untersuchen und eine Mauslinie mit einem thrombozytenspezifischen RXR Knockout zu charakterisieren.

Es wurde mit Westernblotting gezeigt, dass murine Thrombozyten ausschließlich RXR β exprimieren. Mit Hilfe von Thrombozytenfunktionsassays, wie Licht-Transmissions-Aggregometrie, Spreading und FACS Analysen zur Quantifizierung von Thrombozytenaktivierungsmarkern wurde der Einfluss von RXR-Liganden auf die murine Thrombozytenfunktion weiter untersucht. Es konnte bestätigt werden, dass eine Vorbehandlung mit RXR-Liganden vor der Aktivierung mit Collagen und U46619 zu einer signifikant reduzierten Thrombozytenantwort führt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der synthetische RXR-Ligand Methoprensäure die Thrombopoese steigert.

Um zu bestätigen, dass die beobachteten Effekte auf den RXR zurückzuführen sind wurde die Mauslinie Pf4-Cre/ RXR β flox/flox generiert. Diese präsentiert einen Megakaryozyten- und Thrombozyten-spezifischen RXR β -Knockout. Die Knockout-Tiere zeigten keine veränderten Thrombozytenzahlen im Blut und Megkaryozytenzahlen in Knochenmark und Milz. Sie zeigten keine Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion. Ebenfalls konnte die gleiche Reduktion der Thrombozytenfunktion durch RXR-Liganden induziert werden wie in den Kontrolltieren.

Daraus resultiert, dass die Reduktion der Thrombozytenfunktion durch RXR-Liganden unabhängig von RXR β ist und über bisher unbekannte Mechanismen vermittelt wird. Diese Mechanismen gilt es in der Zukunft zu identifizieren und charakterisieren.

Abstract

The retinoid X receptor (RXR) is a nuclear receptor and transcription factor that regulates important processes such as cell differentiation, cell metabolism, and cell death by activation by its ligand 9-cis retinoic acid. Furthermore, treatment of human platelets with RXR ligands results in reduced platelet function; these effects have previously been attributed to non-genomic functions of RXR.

The aim of this work was to investigate the inhibitory effects of RXR ligands on murine platelets and to characterize a mouse model with a platelet-specific RXR knockout.

We demonstrated that murine platelets exclusively express RXR β . Platelet function assays, such as light transmission aggregometry, platelet spreading, and FACS analyses to quantify platelet activation markers, were used to further investigate the influence of RXR ligands on murine platelet function. It was confirmed that pretreatment with RXR ligands before activation with collagen and U46619 resulted in a significantly reduced platelet response. Furthermore, the synthetic RXR ligand methoprenoic acid was shown to increase thrombopoiesis.

To confirm that the observed effects were specifically mediated by the RXR, the mouse line Pf4-Cre/ RXR β flox/flox was generated, a mouse strain with a megakaryocyte- and platelet-specific RXR β knockout. The knockout animals showed no altered blood platelet counts and megakaryocyte counts in the bone marrow and the spleen. The knockout animals showed no altered platelet counts in blood and megakaryocyte counts in bone marrow and spleen. They showed no impairment of platelet function. Likewise, the same reduction in platelet function could be induced by RXR ligands as in control animals.

This suggests that the reduction in platelet function by RXR ligands is independent of RXR β and is mediated by currently unknown mechanisms. These mechanisms need to be identified and characterized in the future.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	3
Abbildung 2	4
Abbildung 3	6
Abbildung 4.	18
Abbildung 5	22
Abbildung 6	39
Abbildung 7	41
Abbildung 8	42
Abbildung 9	43
Abbildung 10	44
Abbildung 11	47
Abbildung 12	48
Abbildung 13	49
Abbildung 14	51
Abbildung 15	51
Abbildung 16	52
Abbildung 17	53
Abbildung 18	54
Abbildung 19	55
Abbildung 20	56
Abbildung 21	57
Abbildung 22	58
Abbildung 23	60
Abbildung 24	61
Abbildung 25	62
Abbildung 26	64
Abbildung 27	66
Abbildung 28.	68
Abbildung 29	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.....	9
Tabelle 2.....	24
Tabelle 3.....	24
Tabelle 4.....	25
Tabelle 5.....	28
Tabelle 6.....	29
Tabelle 7.....	38

Abkürzungsverzeichnis

9cRS	9- <i>cis</i> Retinsäure
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Allophycocyanin
atRS	All- <i>trans</i> Retinsäure
BCS	Bovine Calf Serum
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony forming Unit
CRP	Collagen-related Peptide
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Estradiol-Rezeptor
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FCS	Fetal Cow Serum
FITC	Fluoreszinoisothiozyanat
GCNF	Germ Cell nuclear Factor
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GPIb	Glykoproteinrezeptor Ib
GPVI	Glykoproteinrezeptor VI
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP3	Inositoltriphosphat
LXR	Liver-X-Rezeptor
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
MS	Methoprensäure
NF- κ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBS	Phosphat buffered Saline
PE	Phycoerythrin
Pf4	Plättchenfaktor 4
PKA	Proteinkinase A

PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
Poly (I:C)	Polyinosinic-polycytidylic acid
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor
RAR	Retinoic-Acid-Rezeptor
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
TBS	Tris-buffered saline
TBS	Tris-buffered saline
TPO	Thrombopoietin
TXA ₂	Thromboxan A ₂
vWF	Von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

1.1 Thrombozyten

Kommt es im kardiovaskulären System zu Läsionen der Gefäßwand wird über zahlreiche biochemische und zelluläre Prozesse die Blutstillung vermittelt, um die Integrität der Gefäßwände und damit den Blutfluss sicher zu stellen. Dabei können unterschiedliche pathologische Faktoren, wie beispielsweise das Vorliegen einer Arteriosklerose mit Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque, zu überschießenden Gerinnungsprozessen führen und in einer arteriellen Thrombose resultieren. Dies führt zu einem Gewebefarkt im Versorgungsgebiet der verschlossenen Arterie, sind die Koronararterien davon betroffen kann es zur Ausbildung eines Myokardinfarktes kommen. Eine zentrale Rolle in der Ausbildung der arteriellen Thrombose spielen dabei neben Endothelzellen und Gerinnungsfaktoren die Thrombozyten (2).

Thrombozyten sind kleine, kernlose Zellfragmente, die im Blut zirkulieren und essentiell für die Blutstillung sind. Im Knochenmark werden sie durch komplexe Prozesse von ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, abgeschnürt und in den Blutkreislauf entlassen. Kommt es im Gefäßsystem zu dessen Verletzung binden sie an die durch die Läsion freigelegten subendothelialen Komponenten. Diese Adhäsion an den Gefäßdefekt führt zu einer weiteren Thrombozytenaktivierung mit Rekrutierung weiterer Thrombozyten und anschließend zur Aggregation mit Quervernetzung durch Fibrinmoleküle und Ausbildung eines arteriellen Thrombus. Diese Vorgänge werden durch inhibitorische und aktivierende Proteinkaskaden fein reguliert. Gerät diese Regulierung jedoch außer Kontrolle, kann es zu lebensbedrohlichen Komplikationen kommen (3).

1.1.1 Megakaryopoese und Thrombopoese

Megakaryozyten sind die Vorläuferzellen der Thrombozyten, sie entstehen während der Megakaryopoese aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Die Thrombopoese bezeichnet die Bildung von Thrombozyten aus Megakaryozyten. Megakaryozyten sind sowohl die größten (50-100 µm im Durchmesser) als auch die seltensten (0,1 %) Zellen des Knochenmarks (4). Sowohl die Megakaryopoese als auch die Thrombopoese werden durch das

Zytokin Thrombopoietin stimuliert, welches an den Membranrezeptor c-Mpl bindet (5).

Um Thrombozyten bilden zu können vervielfältigen Megakaryozyten ihre DNA ohne sich dabei zu teilen, dieser Vorgang wird als Endomitose bezeichnet. Die polyploiden Zellen können dabei das bis zu 128-fache ihrer DNA enthalten. Im Verlauf reift der Megakaryozyt und bildet reichlich Proteine, Granula, Zellorganellen und Zellmembran aus. Anschließend formieren sich Ausstülpungen aus Zytoskelett und Zellmembran, die sich weiter verlängern und zu perlschnurartigen Proplättchen entwickeln. Entlang des Zytoskeletts werden Zellorganellen und Granula in die Zellausstülpungen transportiert (6). Die Proplättchen werden als Thrombozytenvorläufer abgeschnürt und reifen während ihrer Zirkulation im Blutstrom zu 1-3 µm großen Blutplättchen heran. Dort zirkulieren sie für 7-10 Tage. Kommt es währenddessen zu keiner Aktivierung der Thrombozyten werden diese anschließend in der Milz abgebaut (7).

1.1.2 Thrombozytenadhäsion und -aktivierung

Verletzungen der Gefäßwände aktivieren Proteinkaskaden im Blut und in Thrombozyten. Diese regulieren die Bildung eines Thrombus und die Blutstillung. Es kommt zur Adhäsion der Blutplättchen an beschädigte Gefäßabschnitte, diese resultiert in einer Aktivierung der Thrombozyten und zur anschließenden Aggregation mit Quervernetzung von Thrombozyten und Ausbildung eines Thrombus (8).

Bei Läsionen des Gefäßendothels kommt es zur Exposition subendothelialer extrazellulärer Matrixproteine (EZM). Die Bestandteile der EZM initiieren die Hämostase, welche sich in die primäre und die sekundäre Hämostase gliedert. Die primäre Hämostase ist gekennzeichnet durch die Bildung eines Thrombus durch Thrombozyten. Die sekundäre Hämostase beschreibt den Verschluss des Thrombus durch Fibrin, welche durch die Gerinnungsfaktoren reguliert wird (9).

Teil der EZM sind adhäsive Makromoleküle, wie Collagen, Laminin, Fibronectin und der von-Willebrand-Faktor (vWF). In Gefäßen mit hohen Scherraten, wie Arteriolen und kleinen Arterien, binden die Blutplättchen an die Endotheldefekte initial mit Hilfe des Glykoproteinrezeptors GPIb an den collagengebundenen vWF, der vom verletzten Gefäßendothel exprimiert wird (10). Diese Bindung ist für die Thrombozyten allerdings nicht ausreichend um eine suffiziente Adhäsion

zur EZM auszubilden. Sie rollen entlang der Gefäßoberfläche, während der Glykoproteinrezeptor VI (GPVI) niedrigaffin an Collagen bindet und innerhalb des Thrombozyten intrazelluläre Signalkaskaden auslöst. Diese Signalkaskaden führen zu einer Konformationsänderung in Integrinen (11). Integrine sind Matrixrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche, bei deren Aktivierung es zu einer Erhöhung ihrer Bindeaffinität an die EZM und der intrazellulären Calciumkonzentration kommt. Die für die Adhäsion wichtigsten Integrine sind das Integrin $\alpha 2\beta 1$, welches an Collagen bindet, und das Integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$, das den vWF bindet (Abbildung 1). Darüber hinaus kommt es zur Ausschüttung intrazellulär gelegener Granula und Thrombozytenmediatoren, wie Adenosindiphosphat (ADP), Thrombin und Thromboxan A_2 (TXA₂). Diese Mediatoren führen zu einer weiteren Eigenaktivität der Blutplättchen und rekrutieren und aktivieren wiederum weitere Thrombozyten und potenzieren so die Thrombozytenaktivierung. (11, 12).

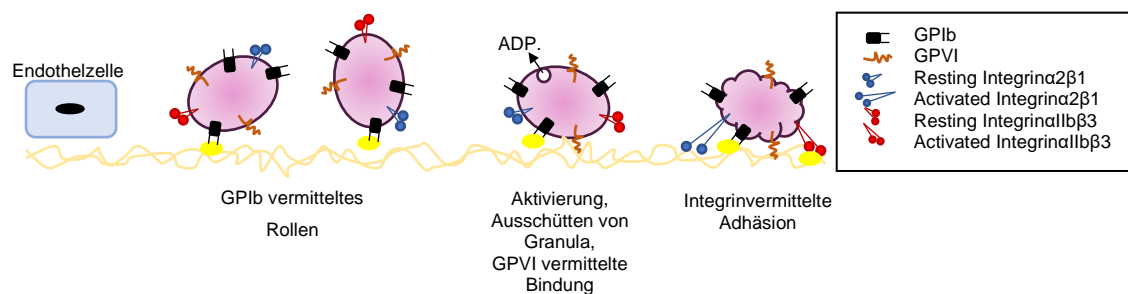


Abbildung 1 : Schematische Darstellung der Adhäsionsmechanismen von Thrombozyten. Die Bindung von GPIb an Collagen gebundenen vWF vermittelt das Rollen der Thrombozyten auf der Endothelläsion. Die GPVI-Bindung an Collagen vermittelt eine weitere Thrombozytenaktivierung, es kommt zu Konformationsänderungen in den Integrinen, die eine feste Adhäsion an die EZM vermitteln (modifiziert nach Varga-Szabo et al. 2008 (11)).

Die Amplifizierung der Thrombozytenantwort wird neben der Ausschüttung intrazellulär gelegener Thrombozytenagonisten zusätzlich durch Stimuli induziert, die bei Endothelverletzungen oder gegebenenfalls aus rupturierten atherosklerotischen Plaques freigesetzt werden. Diese Stimuli binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) auf der Thrombozytenoberfläche und führen zu einer weiteren Amplifikation der Zellantwort. Guanosin triphosphat bindende Proteine (G-Proteine) dienen als Schaltstellen in verschiedenen Signaltransduktionswegen (13). Thrombozyten exprimieren unterschiedliche

GPCRs, an die die G-Proteine Gs, Gq, G12/13 und Gi/Gz gekoppelt sind. Alle G-Proteine außer Gs vermitteln eine Stimuli-spezifische Thrombozytenaktivierung, wohingegen Gs an Rezeptoren für physiologische Thrombozyteninhibitoren wie Prostazyklin gekoppelt ist. Thrombin bindet und aktiviert die G-Protein gekoppelten Protease-aktivierten Rezeptoren PAR1 und PAR4 durch intramolekulare Spaltung. PAR-Rezeptoren sind an Gq und G12/13 gekoppelt. TXA₂ bindet an den TXA₂/Prostaglandin H₂-Rezeptor TP welcher mit Gq und G13 assoziiert ist. Serotonin bindet an den Gq-gekoppelten 5HT_{2A}-Rezeptor und ADP an den Gq- und Gi-gekoppelten P2Y-Rezeptor (Abbildung 2) (14).

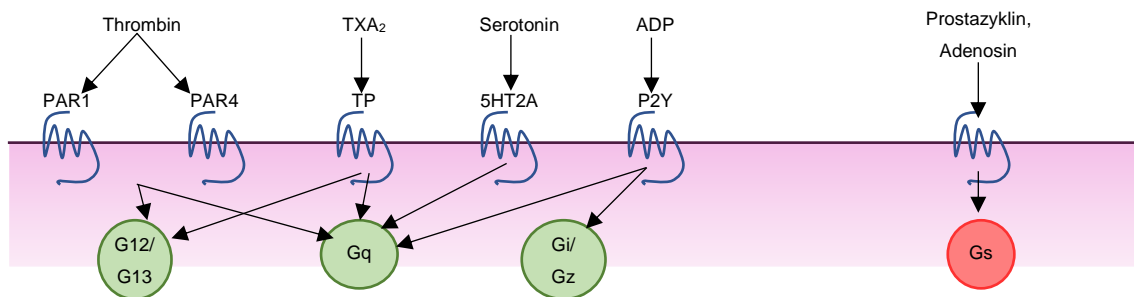


Abbildung 2 : Schematische Darstellung G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Die Aktivierung von Gs durch Prostazyklin führt zu einer Thrombozytenhemmung, die Aktivierung durch Thrombin, TXA₂, Serotonin und ADP führt zu einer Aktivierung der thrombozytenaktivierenden G-Proteinkaskaden (modifiziert nach Varga-Szabo et al. 2008 (11)).

Die Stimulation von Gq hat besonderen Stellenwert, da viele Stimuli über Gq ihre Aktivierung vermitteln. Sie trägt maßgeblich zur Thrombozytenaggregation, Granulasekretion und Integrinaktivierung bei.

Diese GPCR aktivieren wiederum im Verlauf weitere G-Proteine. Dabei spielen die G-Proteine RhoA, Cdc42 und Rac eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von Thrombozyten, der Dynamik des Zytoskelettes und der Sekretion von Granula (13).

Final konvergieren viele der Signalkaskaden, die durch unterschiedliche Stimuli ausgelöst werden, in derselben Endstrecke: der Aktivierung der Phosphoinositid-Phospholipase C. Diese bildet Inositoltriphosphat und Diacylglycerol aus, die zur Calciummobilisierung und der Aktivierung der Proteinkinase C führen. Die erhöhte Calciumkonzentration und die Proteinkinase C sind wiederum für viele

intrazelluläre Aktivierungsmechanismen wichtig, wie der Ausschüttung von Granula, der Synthese von TXA₂ und der Funktion der NO-Synthase (15).

Eine zentrale Rolle in der Thrombozytenaktivierung spielt die Sekretion von Granula. Blutplättchen enthalten drei Arten von Granula: Zur ersten Gruppe gehören α -Granula, die Adhäsionsmolekülen wie Fibrinogen, vWF und Gerinnungsfaktoren beinhalten. Die zweite Gruppe besteht aus den dense Granula, welche mit Serotonin, Histamin, divalente Kationen und Nukleotide beladen sind. Die dritte Gruppe sind lysosomale Granula, diese enthalten Lysozyme mit Proteasen. Die Ausschüttung endogener Stimuli amplifiziert die Thrombozytenantwort und hilft bei der Rekrutierung von zirkulierenden Thrombozyten (16).

Thrombozyten exprimieren unterschiedliche Integrine, das am zahlreichsten enthaltene ist das Integrin α IIb β 3, gefolgt von dem Integrin α 2 β 1, Integrin α 5 β 1 und Integrin α 6 β 13. Im nicht aktivierten Thrombozyten liegen sie in einem niedrigaffinen Zustand vor. Bei Plättchenaktivierung kommt es zu Konformationsänderungen, wobei sie in einen hochaffinen Zustand übergehen und an ihre Liganden binden. Die Signalkaskaden, die zu dem Affinitätsshift der Integrine führen, werden auch als „Inside-Out Signalling“ bezeichnet. Die Ligandenbindung an Integrine führt zu dem sogenannten „Outside-in Signalling“, es kommt erneut zu einer Konformationsänderung der Integrine, die dadurch intrazellulär neue Proteinkaskaden anstoßen. Diese führen zu einer stabilen Thrombozytenadhäsion, Thrombozytenaggregation und Thrombusformation (17, 18).

Der Thrombozyt verändert im Laufe seiner Aktivierung seine Form. Im Blut zirkuliert er als rund-ovale Scheibe. Bei Adhäsion an die EZM bildet er eine Kugel aus und breitet sich unter Ausbildung von Pseudopodien und Lamellopodien aus, dieser Vorgang wird auch als „Platelet Spreading“ bezeichnet (19). Danach kommt es zur „Clot Retraction“, der Thrombozyt adhäriert fest an der EZM, kontrahiert sein Zytoskelett und versiegelt so die Gefäßläsion. Diese strukturellen Veränderungen werden maßgeblich durch das Integrin α IIb β 3 vermittelt und sind Teil des Outside-in Signallings. Das Integrin besitzt einen zytoplasmatischen Schwanz, der an das Zytoskelett gebunden vorliegt und als Transduktor von biochemischen Signalen zu einer mechanischen Reaktion fungiert und damit zur Kontraktion führt (14).

Das Zytoskelett der Thrombozyten besteht zu großen Teilen aus Actin in seiner filamentösen Form, sogenanntes F-Actin, und einem Ring aus Mikrotubuli. Während der Thrombozytenaktivierung kommt es zum „Platelet Spreading“, das F-Actin bildet eine Zone mit parallel angeordneten Bündeln, die Filopodien ausbilden und eine Zone mit kürzeren orthogonal ausgehenden F-Actin Filamenten, die das Lamellopodium ausbilden. In der späteren Phase der „Clot Retraction“ kommt es zur Aktin-Myosin vermittelten Kontraktion des Zytoskeletts, was zu einer Stabilisierung des Blutgerinnsels führt (20, 21).

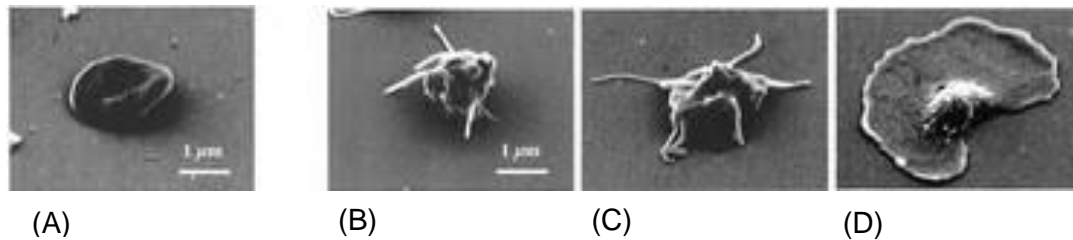


Abbildung 3: Aktivierung eines Thrombozyten unter Flussbedingungen bei einer Scherrate von 1500s^{-1} auf vWF. Der unaktivierte Thrombozyt als oval-runde Scheibe (A), Ausbildung von Pseudopodien und Rollen auf der mit vWF beschichteten Oberfläche, Adhäsion (B und C) und Ausbildung eines Lamellopodiums (D) (22).

1.1.3 Kernrezeptoren in Thrombozyten

Kernrezeptoren sind Transkriptionsfaktoren, die erst nach Bindung ihres spezifischen Ligandens die Transkription der DNA beeinflussen. Da Thrombozyten zellkernlose Zellen sind und damit keine nukleäre DNA besitzen, scheinen die Kernrezeptoren in Thrombozyten keine Funktion zu erfüllen. Entgegen dieser Erwartung sind die Kernrezeptoren nicht nur Überbleibsel, die im Zuge der Abschnürung von Megakaryozyten im Zytosol verbleiben. In den DNA-losen Zellfragmenten haben sie sogenannte nicht-genomische Funktionen und beeinflussen darüber die Thrombozytenfunktion (23).

Um DNA-unabhängige Funktionen von Kernrezeptoren zu untersuchen stellen Thrombozyten ein hervorragendes Modell dar. Während Kernrezeptoren als Transkriptionsfaktoren mehrere Stunden bis Tage brauchen bis man ihren Effekt untersuchen kann, modulieren die DNA-unabhängigen Wirkungen der Kernrezeptoren bereits nach kurzer Zeit die rasch induzierbare Thrombozytenantwort.

Zahlreiche Kernrezeptoren konnten in Blutplättchen nachgewiesen und ihr Einfluss auf die Thrombozytenfunktion herausgearbeitet werden. Sie stellen nicht

nur Überbleibsel dar, die im Rahmen der Thrombopoese im Zytosol verbleiben, sondern vermitteln kurzfristige Zellantwort und können dabei die Thrombozytenfunktion inhibierend oder aktivierend beeinflussen (23). Thrombozyten exprimieren verschiedene Kernrezeptoren die meist durch Bindung ihres spezifischen Liganden aktiviert werden. So zeigen beispielsweise Thrombozyten, die mit Prednisolon behandelt werden, eine durch den Glucocorticoidrezeptor (GR) vermittelte Reduktion des Aggregationsverhaltens (24). Durch die östrogenbedingte Aktivierung der Estradiolrezeptoren (ER) kommt es zu einer stärkeren Thrombozytenaktivierung (25). Die Aktivierung des Liver-X-Rezeptors (LXR) (26), des Retinoid-X-Rezeptors (RXR) (27), des Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptors (PPAR) (28) oder des Retinoic-Acid-Receptor (RAR) (29) führen zu einer Inhibition der Plättchenfunktion.

Da Thrombozyten eine maßgebliche Rolle in der Entstehung der arteriellen Thrombose spielen ist die Erforschung der Funktionsmechanismen in Blutplättchen von großer Bedeutung. Auf der Suche nach neuen Therapiekonzepten stellt die Modulation der Thrombozytenfunktion durch Kernrezeptoren eine interessante Option dar (30).

Ein wichtiger Kandidat zur weiteren Erforschung ist der Retinoid-X-Rezeptor. Viele der anderen Kernrezeptoren sind in ihrer Funktion obligat auf den RXR angewiesen, indem sie mit ihm Heterodimere bilden und nur in dieser Bindung als Transkriptionsfaktor agieren können. Aufgrund dieser enormen Bedeutung besteht ein großes Forschungsinteresse an möglichen Beeinflussungsfaktoren dieses Rezeptors.

1.2 Der Retinoid-X-Rezeptor

Der Retinoid-X-Rezeptor (RXR) ist ein Kernrezeptor und Transkriptionsfaktor, der in vielen Bereichen der Zelldifferenzierung, des Zellmetabolismus und des Zelltods eine wichtige Rolle spielt. Durch Aktivierung beeinflusst er die Transkription der DNA und moduliert darüber die Proteinexpression in Zellen. Er besitzt drei Subtypen, RXR α , RXR β und RXR γ , die wiederum durch alternatives Splicen mehrere Isoformen haben (31).

1.2.1 Evolutionsbiologie des Retinoid-X-Rezeptors

Kernrezeptoren lassen sich abhängig von ihrem Bindeverhalten in fünf unterschiedliche Gruppen einteilen (32). Gruppe eins ist nur in der Lage ihre Funktion auszuführen, wenn sie in heterodimerer Form mit Gruppe zwei vorliegt. Der RXR gehört zur Gruppe zwei, diese Gruppe kann sowohl als Heterodimer als auch als Homodimer agieren. Gruppe drei sind Steroidhormonrezeptoren, die als Homodimere agieren. Gruppe vier kann ebenfalls mit dem RXR Heterodimere ausbilden. Gruppe fünf besteht aus dem Germ-cell-nuclear-factor-Rezeptor (GCNF), der nur wenig Gemeinsamkeiten mit anderen Rezeptoren aufweist (33).

Obwohl sich all diese Rezeptoren in ihrer Funktion unterscheiden, zeigen sie doch einige strukturelle Gemeinsamkeiten. Das legt nahe, dass sie sich alle aus einem gemeinsamen Rezeptorvorfahren entwickelt haben. Pflanzen, Hefen, Protozoen und Pilze zeigen keine codierenden DNA-Strukturen für Kernrezeptoren. Erst höher entwickelte Organismen wie Quallen und Seeanemonen besitzen Gene um Kernrezeptoren zu bilden. Sie exprimieren Rezeptoren der Gruppe fünf und der Gruppe zwei, unter anderem den RXR. Darüber hinaus zeigen sowohl der RXR in der Qualle als auch der im Säugetier die gleiche Ligandenspezifität für 9-*cis* Retinsäure. Es wird angenommen, dass der RXR der phylogenetisch älteste Kernrezeptor ist, aus dem sich die Kernrezeptorgruppen eins bis vier entwickelt haben (34),(33, 35).

1.2.2 Expression und Struktur

Die Subtypen RXR α , RXR β und RXR γ unterscheiden sich hinsichtlich der Länge ihrer Basenpaare und Masse (Tabelle 1). Sie sind in unterschiedlichen Geweben zu finden, RXR α findet sich in Leber, Milz, Epidermis und Intestinum, RXR β wird ubiquitär exprimiert und RXR γ wird vornehmlich in der Skelettmuskulatur, dem ZNS und dem Fettgewebe synthetisiert. Polymorphismen des RXR β -Gens können in Zusammenhang mit einem erhöhten BMI, Gallensteinen und cholangiozellulären Karzinome gebracht werden, Polymorphismen des RXR γ Gens mit familiärer Hyperlipidämie und Diabetes mellitus Typ 2.

Die RXR Subtypen haben sechs strukturelle Domänen, beginnend vom N-Terminus: eine Liganden-unabhängige Aktivierungsstelle, an die Co-Aktivatoren binden können; eine DNA-Bindedomäne mit zwei Zinkfingern; eine Ligandenbindedomäne; eine Verbindung zwischen der DNA-Bindedomäne und

der Ligandenbindedomäne; und eine Domäne, deren Funktion noch unbekannt ist (31).

	Human	Murin
RXR α	Basenpaare: 462 Masse: 50,8 kDa	Basenpaare: 467 Masse: 51,2 kDa
RXR β	Basenpaare: 533 Masse: 56,9 kDa	Basenpaare: 520 Masse: 55,9 kDa
RXR γ	Basenpaare: 463 Masse: 50,8 kDa	Basenpaare: 463 Masse: 50,8 kDa

Tabelle 1 : Basenpaarlänge und Masse der RXR-Subtypen (36)

1.2.3 RXR-Liganden

Bis heute ist es umstritten, welches Molekül der natürliche endogene Ligand für den RXR ist. Es ist ebenfalls unklar ob es überhaupt einen RXR-spezifischen Signalweg gibt oder ob der RXR nicht nur als Bindepartner in Rezeptorheterodimeren agiert. Organische Metabolite wie 9-*cis*-Retinsäure, Phytansäure und Docosahexaensäure binden *in vitro* spezifisch an den RXR, (35). Sowohl RXR-Dimere, als auch RXR-Tetramere und Heterodimere können RXR-Liganden binden und werden durch sie aktiviert (33).

Einen Nachweis, dass es zu einer endogenen RXR-Aktivierung und damit auch zu einer endogenen RXR-Ligandenbindung kommt, erbrachten Solomin et al. Sie züchteten eine Mauslinie, bei der ein Fusionsprotein an die RXR-Bindedomäne gekoppelt ist. Durch Bindung des Liganden wird ein transgenes Reporter-Konstrukt aktiviert und die Bildung von β -Galaktosidase induziert. Mit Hilfe von Whole-Monut Staining wurde diese Galaktosidase angefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass es während der Embryogenese zu einer RXR-spezifischen Galaktosidase-Bildung im Rückenmark kommt. Daraus resultiert die Vermutung, dass es zu diesem Zeitpunkt zu einer endogenen Ligandensynthese kommt (37).

1.2.3.1 Natürliche RXR-Liganden

1.2.3.1.1 9-*cis* Retinsäure

Vitamin-A und seine Derivate sind essentiell für viele Prozesse im Körper. Besonders während der Embryogenese spielen sie eine zentrale Rolle in der Entwicklung des Nervensystems, der Extremitäten und der kraniofazialen

Differenzierung. Auf der anderen Seite können zu hohe Retinoidkonzentrationen teratogen und toxisch für den Embryo sein. Im Organismus sind sie essentiell für das Sehen, die Fortpflanzung und das Immunsystem (38). Diese komplexen Prozesse werden durch unterschiedliche Vitamin-A Rezeptoren vermittelt.

1990 entdeckten Mangelsdorf et al. einen bisher unbekanntem Rezeptor, der Retinoid-abhängig aktiviert wird. Dieser zeigte jedoch eine andere Primärstruktur als der bereits bekannte Vitamin-A Rezeptor Retinoid-Acid-Receptor (RAR) und eine andere Ligandenspezifität. Da zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar war, welches Retinoid diesen Rezeptor aktiviert, wurde er „Retinoid-X-Rezeptor“ genannt. Erst später wurde 9-*cis* Retinsäure als das unbekannte „Retinoid X“ identifiziert und gezeigt, dass sie alle drei Subtypen RXR α , RXR β und RXR γ spezifisch bindet und aktiviert (39, 40).

Der endogen überwiegend vorkommende und metabolisch aktivste Vitamin-A Metabolit ist all-*trans* Retinsäure (atRS), der seine Funktion über den Retinoic-Acid-Receptor ausübt. Sein Isomer, 9-*cis* Retinsäure (9cRS), bindet sowohl hochaffin an den RXR als auch niedrigaffin an den RAR. Leider konnte lange Zeit 9-*cis* Retinsäure mit keiner validen analytischen Methode in Serum oder Gewebe nachgewiesen werden (38, 41). 2010 konnte jedoch mit Hilfe von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrikopplung 9cRS im murinen Pankreas detektiert werden und seine Funktion in der Regulation Glucose-induzierter Insulinsekretion gezeigt werden (42).

9cRS hat im Organismus unterschiedliche Funktionen, im Pankreas agiert 9-*cis* Retinsäure als Autakoid, das die glucoseabhängige Insulinproduktion mitreguliert (42). Darüber hinaus nimmt 9cRS Einfluss auf metabolische Stoffwechselwege, wie die Schilddrüsenhormonachse, Triglyceridsynthese, mitochondriale DNA-Transkription und die Steroidsynthese. Auch beeinflusst es das Immunsystem und moduliert Proliferation und Immunantwort von Lymphozyten (41).

Zur klinischen Anwendung kommt 9cRS, auch als Alitretinoin bezeichnet, bei dermatologischen Erkrankungen wie dem chronischen Handekzem und dem Kaposi-Sarkom. Es wirkt sowohl antiinflammatorisch und immunmodulierend, als auch antiproliferativ und proapoptotisch. Es kann topisch als Gel oder in Form von Kapseln oral eingenommen werden. So wie alle Retinoide zeigt auch 9cRS vielfältige Nebenwirkungen. Es wirkt teratogen und ist daher in der

Schwangerschaft kontraindiziert, führt zu einer Hypertriglyzeridämie, trockener Haut, Kopfschmerzen, Alopezie, Photosensitivität und anderen Komplikationen (43).

1.2.3.1.2 Fettsäuren

Fettsäuren stellen neben 9cRS ebenfalls RXR-Liganden dar. Insbesondere die gesättigte Fettsäure Phytansäure und die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure und Docosahexaensäure führen *in vitro* zu einer RXR-Aktivierung. Die Fettsäuren binden mit einer hohen Affinität an den RXR, sodass Lengqvist et al. nahelegen, dass der RXR auch *in vivo* als ein Fettsäurerezeptor agieren könnte (44, 45). Niu et al. identifizieren ungesättigte Fettsäuren als natürliche RXR-Liganden in murinen hämatopoetischen Stammzellen (46).

1.2.3.2 Synthetische Liganden: Rexinoide

Die sogenannten Rexinoide sind künstlich hergestellte Substanzen, die spezifisch den RXR aktivieren. Häufig verwendete Rexinoide sind beispielsweise Methoprensäure und Bexaroten (31).

Methopren und seine Derivate sind Wachstumshormone in Insekten und finden Anwendung als Insektizide. In Säugetieren bindet insbesondere Methoprensäure selektiv an den RXR und aktiviert ihn spezifisch, ohne dabei wie 9cRS ebenfalls den RAR zu aktivieren (47).

Bexaroten ist ein synthetisches Retinoidanalogon, das unter dem Arzneimittelnamen Targretin zur Therapie des kutanen T-Zelllymphoms eingesetzt wird. Phase 2 und 3 Studien konnten zeigen, dass bis zu 50 % der Patienten, die refraktär oder intolerant gegen bisherige Therapieschemata waren, von einer Bexarotentherapie profitieren. Allerdings kommt es auch zu starken unerwünschten Arzneimittelwirkungen. Die Patienten leiden vermehrt unter Hypothyreosen, Knochenmarksdepression und einer Serumerhöhung von Cholesterolemie und Triglyzeriden (48). Neben seiner Affinität für den RXR bindet Bexaroten auch an andere Rezeptoren, wie den PPAR γ und zeigt damit keine reine RXR-Spezifität (49).

Um Nutzen aus der Wechselwirkung mit dem RXR zu ziehen, aber gleichzeitig das Nebenwirkungsprofil von Bexaroten und 9cRS zu vermeiden, wird weiterhin an Rexinoiden geforscht. 9cUAB ist ein Retinoidanalogon mit einer inhibierenden

Wirkung auf die Karzinogenese, es wurde bereits sowohl *in vitro*, im Tierversuch, als auch in einer Phase 1 Studie untersucht. Es zeigt bisher ein günstiges Nebenwirkungsprofil und könnte nach weiterer Erprobung klinisch eingesetzt werden (50).

1.2.4 Funktionen des RXR

Der RXR hat viele unterschiedliche Funktionen. Zum einen agiert er als Transkriptionsfaktor, der durch Ligandenbindung aktiviert wird und die Proteinexpression beeinflusst. Auf der anderen Seite agiert er unabhängig von Liganden und ist ein obligater Bindepartner für andere Kernrezeptoren. (33)

1.2.4.1 RXR als Transkriptionsfaktor

Der RXR kann Homodimere oder Homotetramere mit sich selbst oder Heterodimere mit einer Vielzahl von anderen Kernrezeptoren ausbilden. Durch Ligandenaktivierung binden die Dimere an spezielle Basenpaarsequenzen an der DNA in der Nähe von Promotoren und beeinflussen deren Aktivität. Der Bindepartner des RXR bestimmt, an welche Basenpaarsequenz das Heterodimer bindet. Kein anderer Kernrezeptor kann mit so vielen unterschiedlichen Kernrezeptoren Heterodimere bilden. Bindepartner, wie der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR) α , PPAR β , PPAR γ , der Vitamin-D-Rezeptor (VDR), der Retinoid-Acid-Rezeptor (RAR), der Liver-X-Rezeptor (LXR) α , LXR β sind obligat auf den RXR angewiesen und können nur mit ihm ihre Funktion erfüllen (31, 35).

1.2.4.2 Knockout der RXR-Isoformen

Um die Funktion des RXR besser zu verstehen wurden unterschiedliche Knockout-Mäuse gezüchtet und untersucht.

1.2.4.2.1 RXR α Knockout

Kastner et al. generierten Knockout-Mäuse mit einem inkompletten, heterozygoten (RXR α +/-) und mit einem kompletten, homozygoten RXR α (RXR α -/-) Knockout. Die RXR α +/- Tiere zeigten im Gegensatz zu C57B/6 Mäusen (RXR α +/+) eine deutliche Wachstumsretardierung, die RXR α -/- Tiere verstarben in utero bis Embryonaltag 18,5. Die Embryonen zeigten okuläre und kardiale Malformationen, aber auch die Entwicklung von Lunge, Haut, Leber, Zähnen und Gaumen war beeinträchtigt (51).

Das Fehlen von RXR α im Organismus zeigt große Effekte auf die embryonale Entwicklung. Eine Aktivierung der Retinsäurerezeptoren RXR und RAR durch ihre Liganden kann während der Schwangerschaft jedoch auch teratogene Effekte hervorrufen, wie beispielsweise Skelettfehlbildungen und einen unvollständigen Verschluss des Gaumens. Um diese Effekte genauer zu untersuchen wurden weibliche heterozygote RXR α Knockout-Tiere mit männlichen heterozygoten verpaart und während der Schwangerschaft mit all-*trans* Retinsäure gefüttert. Per Kaiserschnitt wurden die Tiere am Embryonaltag 14,5 entbunden und auf ihre Fehlbildungen hin untersucht. RXR α $-/-$ Nachkommen zeigten im Gegensatz zu den RXR α $+/+$ Nachkommen keine durch all-*trans* Retinsäure bedingten Malformationen. Die RXR α $+/-$ Nachkommen zeigten milde Malformationen, jedoch nicht so ausgeprägte wie die Tiere ohne Knockout. Dies deutet daraufhin, dass die teratogenen Effekte von Retinsäuren über RXR α vermittelt werden (52, 53).

Um den Effekt des RXR α noch genauer zu untersuchen und die embryothalen Auswirkungen des Knockouts zu umgehen, wurden Mäuse mit konditionellem Knockout gezüchtet. Durch Verpaarung mit einer gewebespezifischen Cre-Rekombinase Maus, kann somit ein Gewebe selektiver knockout induziert werden. In einer Studie wurde mit Hilfe der K14-Cre-ER/ RXR α ^{flox/flox} Mauslinie ein isolierter RXR α Knockout in adulten Keratinozyten generiert, dabei zeigte sich eine starke Beeinträchtigung der Zelldifferenzierung. Die Knockout-Tiere litten unter Haarverlust, Zysten- und Ulcusbildungen bedingt durch eine Hyperproliferation und abnormalen terminalen Differenzierung der Keratinozyten. All diese Veränderungen traten in Weibchen stärker auf als in Männchen. Männchen exprimieren höhere Level an RXR β in Keratinozyten, ein Knockout von RXR α und RXR β führte bei Männchen und Weibchen zu ähnlichen Hautveränderungen. RXR β scheint den Mangel an RXR α in Keratinozyten von Männchen kompensieren zu können (54).

Mit Hilfe von Mx1-Cre/ RXR α ^{flox/flox} Mäusen, Knockout-Tieren mit einem induzierbaren Knockout in hämatopoetischen Stammzellen, wurde der Einfluss von RXR α auf die Blutbildung untersucht. Der Mangel an RXR α hatte keinen Einfluss auf die Hämatopoese *in vivo*. Zellkulturen von hämatopoetischen Stammzellen, die mit 9-*cis* Retinsäure behandelt wurden zeigten eine reduzierte Bildung an Colony Forming Units (CFU). Die Stammzellen der RXR α $-/-$ zeigten

hingegen *in vitro* keine vergleichbare Reaktion auf die Behandlung mit 9-*cis* Retinsäure, sondern eine leicht vermehrte Bildung von Stammzellkolonien (55).

1.2.4.2.2 RXR β -Knockout

Zur Untersuchung der RXR β -Isoform wurde eine Mauslinie mit einem vollständigen RXR β -Knockout generiert. Etwa die Hälfte der gezüchteten RXR β -/- Tiere starb vor oder nach der Geburt, die andere Hälfte zeigte außer einer nicht funktionierenden Spermatogenese keine Auffälligkeiten. Kastner et al. nehmen an, dass die einzelnen Isoformen des RXR redundant sind und den Ausfall einer Rezeptorisoform kompensieren können (56).

Sunaga et al. untersuchten den Einfluss von RXR β auf die myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks. Es wurden transgene Mäuse generiert, in denen die Funktion von RXR β Heterodimeren in myeloiden Vorläuferzellen unterdrückt wird. Diese Tiere zeigten eine Beeinträchtigung der Hämatopoese. Eines der zwölf untersuchten Tiere zeigte einen Arrest in der Differenzierung im promyelozytären Stadium, drei weitere zeigten eine leichte Inhibition der myeloiden Hämatopoese (57).

Um den Einfluss des RXR auf die Osteoklastendifferenzierung zu untersuchen generierten Menéndez-Gutiérrez et al. Mx1-Cre/ RXR α ^{flox/flox} / RXR β ^{flox/flox} Mäuse. Diese Tiere exprimieren in ihren hämatopoetischen Stammzellen, aus denen sich auch Osteoklasten differenzieren, keine RXR-Isoformen. Sie untersuchten die Knochendichte der Tiere und zeigten, dass 20 Wochen alte männliche Knockout-Tiere eine höhere Knochendichte besaßen als die Kontrolltiere. Im Gegensatz dazu zeigten weibliche Knockout-Tiere keine Abnormalitäten in ihrem Knochengestüt, jedoch konnte man bei ihnen im Gegensatz zu den Kontrolltieren keine Osteoporose induzieren durch Östrogenmangel nach Ovariectomie (58). Welchen Einfluss der RXR-Knockout für die anderen Zellen der hämatopoetischen Reihe hatte wurde nicht weiter untersucht, jedoch zeigte sich auch in dieser Studie ähnlich wie bereits bei einem RXR-Knockout in Keratinozyten ein unterschiedlicher Effekt des Knockouts auf beide Geschlechter.

1.2.4.2.3 RXR γ Knockout

Im Vergleich zu RXR γ +/+ Tieren zeigen RXR γ -/- keinerlei Unterschiede hinsichtlich Lebensfähigkeit, Fertilität, Wachstum und Verhalten. Auch der

vollständige Knockout von RXR β und RXR γ und ein heterozygoter Knockout von RXR α (RXR α +/-, RXR β /-, RXR γ /-) führte zu den vorher beschriebenen Fehlbildungen bei RXR α und RXR β -Knockouts, jedoch zu keinen RXR γ spezifischen. Krezel et al. ziehen daraus den Schluss, dass RXR γ sowohl für die embryonale Entwicklung, als auch für den erwachsenen Metabolismus entbehrlich ist. Darüber hinaus vermuten sie, dass ein einziges RXR α Allel den Funktionsverlust der anderen RXRs ausgleichen kann (59).

1.2.4.3 Einfluss des RXR auf mitochondriale DNA

Neben anderen Kernrezeptoren, wurde auch eine gekürzte Version des RXR α (mt-RXR) in der Mitochondrienmatrix entdeckt. Er übt dort einen Einfluss auf die mitochondriale Genexpression, die oxidative Phosphorylierung und die Energiebereitstellung aus. Seine Aktivierung führt zu einer Erhöhung mitochondrialer DNA und der Proteinexpression von Enzymen der Atmungskette (60–63).

Mitochondrien in Thrombozyten zeigen eine hohe metabolische Aktivität. Sie stellen den Blutplättchen nicht nur Energie in Form von ATP bereit, die Polarisation ihrer Membran ist auch assoziiert mit der Plättchenaktivität (64, 65).

1.2.4.4 DNA-unabhängige Funktionen des RXR

Neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor wurde gezeigt, dass der RXR auch zytoplasmatische, DNA-unabhängige Funktionen hat (31). Er fungiert sowohl als Transportprotein für andere Kernrezeptoren, ist aber auch in der Lage Apoptose und Immunreaktionen zu induzieren und inhibieren (66), (67).

Darüber hinaus findet man den RXR, wie auch viele andere Kernrezeptoren, in Thrombozyten. In diesen kernlosen Zellfragmenten kommt keine nukleäre DNA vor, daher können die Kernrezeptoren dort ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren nicht ausüben. Sie scheinen dort jedoch eine DNA-unabhängige Rolle zu spielen, denn die Behandlung mit RXR-Liganden führt zu einer Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion (27).

1.3 Der RXR in Megakaryozyten und Thrombozyten

Thrombozyten sind Zellfragmente, die mit dem Zytoplasma und den Zellorganellen ihrer Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, ausgestattet sind, jedoch ohne Zellkern und nukleäre DNA (7). In ihnen finden sich eine Vielzahl

von Kernrezeptoren. Diese stellen allerdings nicht nur Überbleibsel des Abschnürungsprozesses von den Megakaryozyten dar, sondern üben einen Einfluss auf die Plättchenfunktion aus (23). Neben dem PPAR (28, 68, 69), dem Androgenrezeptor (70) und Glukokortikoidrezeptor (24) wurde auch der Retinoid-X-Rezeptor in Thrombozyten gefunden.

Moraes et al. zeigen, dass sowohl im Zytosol als auch in der Membran von humanen Thrombozyten sowie in der Megakaryozytenlinie Meg-01 RXR α und RXR β vorkommen (27).

1.3.1 Einfluss von RXR-Liganden

1.3.1.1 Einfluss von 9-*cis* Retinsäure auf die Hämatopoese

Retinoide beeinflussen die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen. In Konzentrationen von 10^{-6} M wirkt 9cRS inhibitorisch auf die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen, 9cRS zeigt jedoch keinen Effekt auf die Differenzierung von Megakaryozyten (71). Auch zeigen sowohl CD34+- als auch HL-60 Zellen eine reduzierte Ausbildung von CFUs bei der Behandlung mit 9cRS (72, 73).

1.3.1.2 Einfluss von RXR-Liganden auf die Thrombozytenfunktion

Bereits 1990 zeigten Mukherjee et al., dass Thrombozyten nach einer Vorbehandlung mit 100nM Retinsäure für 20 min ein reduziertes Aggregationsverhalten auf Stimulation mit ADP zeigen (74).

Moraes et al. zeigen, dass sich durch die Aktivierung des RXR mit 9cRS und durch den synthetischen RXR-Liganden Methoprensäure die Plättchenfunktion beeinflussen lässt. Eine durch ADP oder TXA₂ induzierte Plättchenaggregation lässt sich durch die Vorbehandlung mit RXR-Liganden reduzieren. Weiterhin wird gezeigt, dass der RXR das G-Protein Gq bindet, die Gq-abhängige Rac-Aktivierung inhibiert und damit die Rac-abhängige intrazelluläre Calciumerhöhung hemmt. Dies führt zu einer Reduzierung der Thrombozytenantwort auf Stimuli (27).

Durch Unsworth et al. wurde der Einfluss von RXR-Liganden auf die Plättchenfunktion weitergehend untersucht. Eine Vorbehandlung mit RXR-Liganden führt zu einer Hemmung der Aggregation in der Licht-Transmissions-Aggregometrie, einer Hemmung der Integrin Inside-Out Aktivierung sowie die

Sekretion der α -Granula. Es kommt zu einer geringeren Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bei Aktivierung und zu einer Hemmung des Zellsreadings. Diese Hemmung konnte beobachtet werden bei einer Vorbehandlung mit RXR-Liganden in einer Konzentration von 10-20 μ M für drei min und einer anschließenden Stimulation durch die Thrombozytenaktivatoren Collagen, Thrombin und das collagen-related Peptide (CRP), einen spezifischen Agonisten für den Collagenrezeptor GPVI. Auch unter Durchflussbedingungen in der Durchflusskammer und in einem Thrombosemodell im Tierversuch konnte eine Reduktion der Thrombusbildung durch Vorbehandlung mit RXR-Liganden gezeigt werden.

Es wurde auf molekularer Ebene untersucht, wie RXR-Liganden eine Hemmung der Aktivierung durch GPVI-Agonisten und Thrombin vermitteln. Die am Anfang von GPVI-vermittelten Signalkaskaden stehende Phosphorylierung wird nicht quantitativ beeinflusst, sondern nur kurz verzögert. Erst in späteren Teilen der Signalwege kommt es zur RXR-vermittelten Inhibition der Thrombozytenfunktion. RXR-Liganden führen über eine Hochregulierung von NF κ B und cAMP zu einer erhöhten Aktivität der Proteinkinase K (PKA). Diese wiederum vermittelt eine Reduktion der intrazellulären Kalziumkonzentration und der Integrinaktivierung. Darüber wird die Granulasekretion, das Adhäsions- und Spreadingverhalten der Thrombozyten, die Thrombozytenaggregation und die Retraktion des Blutgerinnsels gehemmt. Dies resultiert in einer reduzierten Thrombusformation *in vitro* und einer Hemmung der Hämostase und der arteriellen Thrombose *in vivo*. Diese PKA-vermittelte Hemmung der Thrombozytenfunktion stellt einen neuen Ansatz dar für die Thrombozytenaggregationshemmung (75).

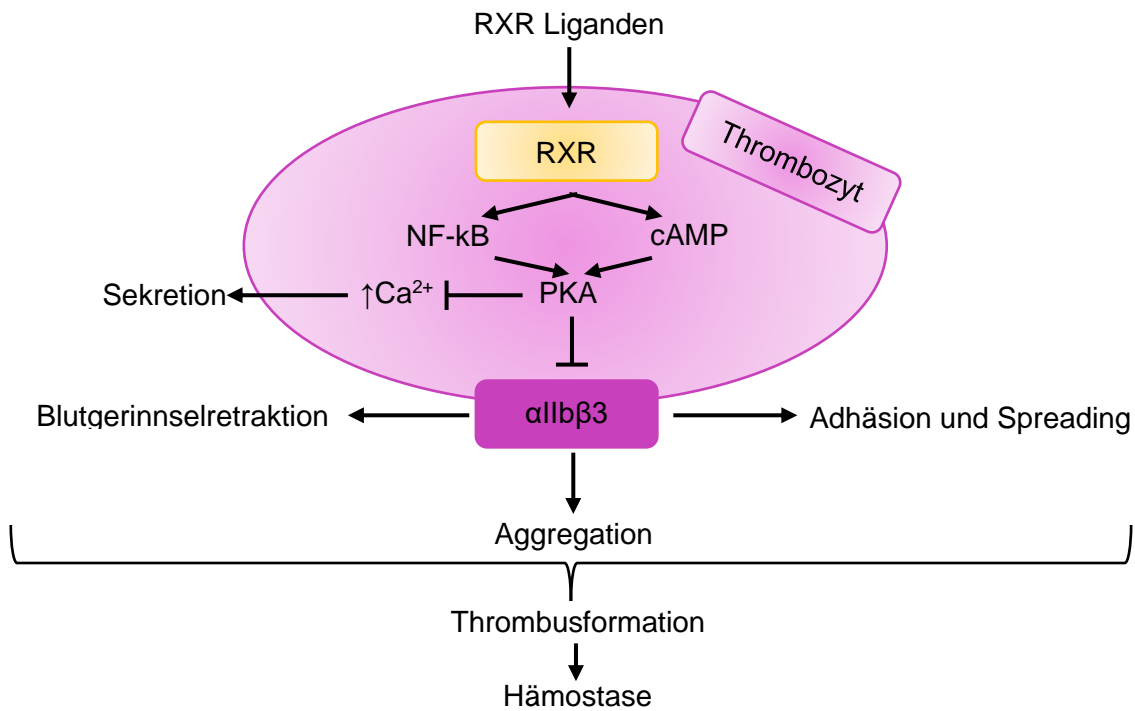


Abbildung 4: Schematische Darstellung RXR-abhängiger Signalwege in Thrombozyten. Die ligandenabhängige Aktivierung des RXR führt zu einer Aktivierung von NF-κB und cAMP, welche wiederum zu einer erhöhten Aktivität der PKA führen. Diese hemmt die intrazelluläre Erhöhung der Calciumkonzentration und der Integrin αIIbβ3 Aktivität. Daraus resultiert eine Inhibition der Granulasekretion, der Blutgerinnselretraktion, des Adhäsions- und Spreadingverhaltens sowie der Thrombozytenaggregation. Diese haben eine reduzierte Thrombusformation und Hämostase zur Folge. Modifiziert nach Unsworth et al. (75).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der RXR bei Plättchenaktivierung gemeinsam mit seinem Bindepartner, dem PPARγ, in Form von Platelet Microparticles freigesetzt wird (76) wobei deren physiologische Konsequenz nicht abschließend verstanden ist.

Liu et al. untersuchten Patienten mit koronarer Herzkrankheit über drei Jahre und bestimmten deren Retinsäurewerte im Blut. Das Patientenkollektiv mit niedrigeren Werten zeigte im Gegensatz zu dem Kollektiv mit höheren Retinsäurewerten in dem Beobachtungszeitraum eine erhöhte Mortalität. Sowohl der RAR als auch der RXR reduzieren in höheren Konzentrationen die Thrombozytenfunktion. Darüber hinaus steigern Retinsäuren die Reendothelialisierung bei Gefäßverletzungen, reduzieren das Remodelling nach Herzinfarkten und beeinflussen Makrophagen in ihrer Funktion (29, 77). Diese Effekte könnten zu der geringeren Mortalität bei höheren Retinsäurewert im Blut

beitragen haben. Daher stellen Retinsäuren und ihre Analoga einen möglichen neuen Therapieansatz dar um die Entstehung der arteriellen Thrombose zu hemmen.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Untersuchung der DNA-unabhängigen Funktionen des Retinoid-X-Rezeptors in Thrombozyten. Bislang wurden nur Untersuchungen zum Einfluss der RXR-Liganden auf die Thrombozytenfunktion durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Funktion des Retinoid-X-Rezeptors in Thrombozyten und Megakaryozyten mit Hilfe von neu generierten, Zelltyp-spezifischen, konditionellen Knockout-Tieren herausgearbeitet und verglichen werden. Mit Hilfe der neuen Mausmodelle, soll zudem die Spezifität der in früheren Studien beobachteten Effekt der RXR-Liganden evaluiert werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche sollen im Folgenden zusammengefasst und analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden am Mausmodell durchgeführt, da sich dieses besonders gut eignet Rückschlüsse auf die menschliche Biologie zu ziehen. Zum einen bestehen in der Genetik und der Physiologie von Menschen und Mäusen viele Gemeinsamkeiten, zum anderen lassen sich die Tiere darüber hinaus schnell züchten und ihre Physiologie ist bereits gut untersucht. Durch unterschiedliche Knockoutmodelle können Tiere generiert werden, denen zu untersuchende Proteine fehlen (78, 79).

Es wurden die Stämme C57BL/6J, Mx1-Cre/ $RXR\beta^{flox/flox}$ und Pf4-Cre/ $RXR\beta^{flox/flox}$ verwendet. Der C57BL/6 Stamm ist ein Wildtypstamm, der von den Charles Rivers Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) erworben wurde. Die beiden Knockout-Mauslinien Mx1-Cre/ $RXR\beta^{flox/flox}$ und Pf4-Cre/ $RXR\beta^{flox/flox}$ haben einen genetischen C57BL/6 Hintergrund. Es wurden 10-20 Wochen alte Tiere verwendet. Alle Tierversuche wurden mit der Genehmigung der Regierung Oberbayern durchgeführt (ROB-55.2-2532.Vet_02-17-228).

Die Tiere wurden in der spezifisch pathogenfreien Tierhaltung des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung oder der Tierhaltung der Medizinischen Klinik 1 des Klinikums Großhadern gehalten.

3.1.1 Knockoutmodelle

Um einen $RXR\beta$ -Knockout in Thrombozyten zu generieren wurden zwei unterschiedliche Knockoutstämme gezüchtet. Die Knockouts wurden mit dem cre-loxP System generiert. Dieses System besteht aus zwei Komponenten. Zum einen aus einer Rekombinase, die in der Lage ist DNA zu rekombinieren und zum anderen aus zwei loxP-Regionen, die eine DNA-Sequenz markieren, an der die Rekombinase ansetzen soll. Die Rekombinase steht unter dem Einfluss eines Promoters, der spezifisch für das Gewebe gewählt wird, in dem der Knockout stattfinden soll. Damit ein suffizienter Knockout stattfinden kann müssen beide Allele des auszuknockenden Proteins loxP-Regionen tragen und auf einem Allel die Rekombinase vorliegen. Ein Knockout kann konstitutiv oder konditionell vorliegen. Bei einem konstitutiven Knockout exprimiert die Maus bereits während

der Embryonalperiode nicht das Protein. Bei einem konditionellen Knockout, wird durch Verpaarung der konditionellen Knockout Maus mit einer spezifischen, promotergetriebenen Cre-Rekombinase Maus eine zellspezifische Expression der Cre-Rekombinase innerhalb der Zielzelle erreicht. Dadurch wird ein Ausschneiden der loxP-flankierte Region in der Zielzelle und somit ein Knockout erreicht. (80).

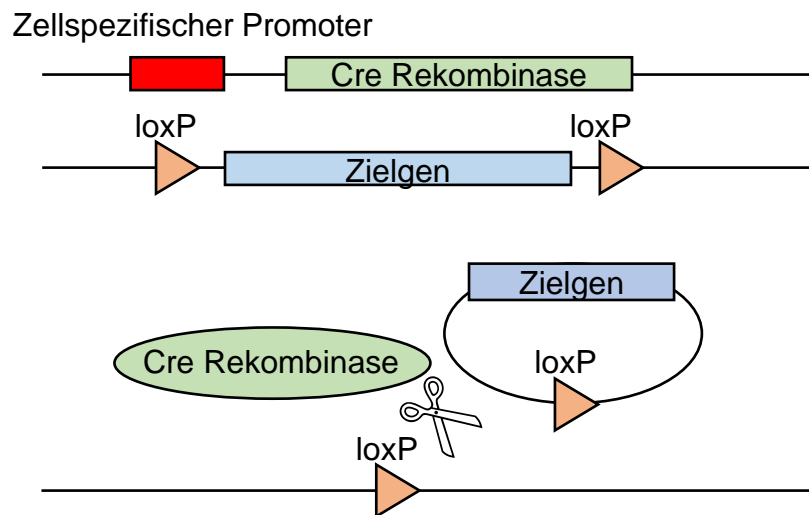


Abbildung 5 : Schematische Darstellung des Cre-loxP Systems. Die Cre Rekombinase steht unter dem Einfluss eines zellspezifischen Promoters. Bei seiner Aktivierung wird die Rekombinase gebildet, setzt an den loxP-Regionen um das Zielgen an und schneidet dieses aus.

3.1.1.1 Mx1-Cre/ RXR β ^{lox/lox}

Der Mx1 Promoter wird verwendet zur Untersuchung von hämatopoetischen Stammzellen. Er wird aktiviert bei viralen Infektionen und ist in gesunden Tieren inaktiv. Durch Interferon- α und - β , aber auch durch doppelsträngige RNA wie Polyinosin-polycytidin (pI-pC) wird er aktiviert. Auf seine Aktivierung hin wird in hämatopoetischen Stammzellen die Cre Rekombinase gebildet und schneidet dort das loxP-flankierte Gen aus (81).

Für Experimente wurden Mx1-Cre^{+/-} RXR β ^{lox/lox} Mäuse als Knockout-Tiere und Mx1-Cre^{-/-} RXR β ^{lox/lox} als Kontrolltiere gezüchtet. Sie wurden mit poly I:C (pI-pC) (invivogen) behandelt.

Es wurden unterschiedliche Therapieregime zur Induktion des Knockouts verwendet. Dabei wurden jeweils drei Kontroll- und drei Knockout-Tiere mit pI-pC behandelt. Die Tiere wurden einmal über drei Tage mit einer Dosis von 15 mg/kg

KG pl-pC an Tag 1 und mit einer zweiten Dosis an Tag 3 behandelt. Für einen zweiten Versuchsansatz wurden Mäuse über fünf Tage mit pl-pC behandelt, mit Injektion an Tag 1, Tag 3 und Tag 5.

Am Tag nach der letzten Injektion wurde den Tieren intrakardial Blut entnommen und auf den Knockout hin untersucht.

3.1.1.2 Pf4-Cre/ RXR β ^{flox/flox}

Um einen reinen Megakaryozyten-spezifischen Knockout zu generieren wurden Pf4-Cre/ RXR β ^{flox/flox} Mäuse gezüchtet. Der Plättchen Faktor 4 (Pf4) Promoter wird in Megakaryozyten aktiviert und führt in Megakaryozyten und Thrombozyten zum Knockout des geflochten Gens (82).

Dabei dienten Pf4-Cre^{+/-}/ RXR β ^{flox/flox} Tiere als Knockout-Tiere und Pf4-Cre^{-/-}/ RXR β ^{flox/flox} als Kontrolltiere.

3.1.1.3 Genotypisierung

Die gezüchteten Tiere wurden mittels PCR von labortechnischen Assistenten genotypisiert. Alle Proben wurden mit Wasser als Negativprobe zeitgleich gemessen, um Kontaminationen auszuschließen. Für die Genotypisierung wurden die Schwanzspitzen der zu untersuchenden Tiere mit dem DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen) lysiert.

Für die PCR des Pf4-Cre-Locus und des RXR β ^{flox}-Locus wurden 2,5 μ l 10x Standard Taq Reaction Buffer, 0,5 μ l 10 mM dNTPs, 0,5 μ l 10 μ M Forward Primer, 0,5 μ l 10 μ M Reverse Primer und 0,125 μ l Taq DNA-Polymerase (BioLabs) mit 2 μ l der DNA-Probe und mit nukleasefreiem Wasser auf 25 μ l pro Probe aufgefüllt.

Für die PCR der Mx1-Cre-Locus wurde das KAPA2G Fast Hot Start Genotyping Mix Kit von Peqlab verwendet. Dazu wurden 7,5 μ l nukleasefreies Wasser, 12,5 μ l KAPA2G Fast Hot Start Genotyping Mix, 0,5 μ l 25mM Magnesiumchlorid, 1,25 μ l 10 μ M Forward Primer und 1,25 μ l 10 μ M Reverse Primer mit 2 μ l DNA-Probe gemischt.

Es wurden Primer für die unterschiedlichen DNA-Abschnitte und die dazugehörigen PCR Protokolle aus den Tabellen 2-4 verwendet. Die RXR β ^{flox} Primer XO141 und WS55 detektieren das RXR β Wildtyp-Allel, WH137 und WS 54 das RXR β ^{flox}-Allel.

RXR β ^{flox}		
Primer	Basensequenz	Basenlänge
XO 141	5'-TCCTCCACTGCACACAGCCC-3'	20
WS 55	5'- CCGGGAGGGGCTGACTTTCATC-3'	21
WH 137	5'-CGTGCAAGGAAGGCCCTTTA-3'	20
WS 54	5'-TTAAAGCAGGAATTGGACCA-3'	20
PCR Protokoll		
Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 min
2	95°C	30 s
3	56°C	30 s
4	72°C	30 s
38 Zyklen Schritt 2-4		
5	72°C	7 min
6	4°C	

Tabelle 2: RXR β ^{flox} PCR Protokoll

Pf4-Cre		
Primer	Basensequenz	Basenlänge
Forward Primer	5'-CCCATACAGCACACCTTTTG-3'	20
Reverse Primer	5'-TGCACAGTCAGCAGGTT-3'	17
PCR Protokoll		
Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	3 min
2	95°C	30 s
3	55°C	45 s
4	72°C	1 min
35 Zyklen Schritt 2-4		
5	72°C	7 min
6	4°C	

Tabelle 3: Pf4-Cre PCR Protokoll

Mx1-Cre		
Primer	Basensequenz	Basenlänge
Forward Primer	5'-GTG AGT TTC GTT TCT GAG CTC C-3'	22
Reverse Primer	5'-CGG TTA TTC AAC TTG CAC CA-3'	20
PCR Protokoll		
Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	3 min
2	95°C	15 s
3	65°C	15 s
4	72°C	10 s
38 Zyklen Schritt 2-4		
5	72°C	7 min
6	4°C	

Tabelle 4: Mx1-Cre PCR Protokoll

Im Anschluss wurden die Proben auf ein Agarose-Gel (Biozym) pipettiert und bei 100V in einer PCR-Kammer (BioRad PowerPac HC) für 60 min nach ihrer Größe aufgeteilt. Als Marker wurde der 100bp DNA-Ladder Gene Ruler (Thermo Scientific) verwendet. Mit dem GelDoc 2000 (BioRad) wurden anschließend die Aufnahmen der Gele gemacht.

3.1.2 Blutentnahme

Zur Blutentnahme wurden die Mäuse in Narkose gelegt. Diese wurde mit einer Inhalationsnarkose aus Isofluran eingeleitet, welche über einen Isofluranverdampfer (Ohmeda Isotec 3 Vaporizer, Datex Ohmeda) mit Sauerstoff als Trägersubstanz verabreicht wurde. Danach wurde 0,05 mg/kg Körpergewicht Fentanyl (Fentadon, Albrecht GmbH), 0,5 mg/kg Körpergewicht Medetomidin (Dorbene, Pfizer GmbH) und 0,5 mg/kg Körpergewicht Midazolam (Midazolam, B. Braun) intraperitoneal injiziert.

Die Blutentnahme erfolgte mittels intrakardialer Punktion. Das gewonnene Blut wurde mit 150 µl Acid-Citrate-Dextrose antikoaguliert. Nach der Blutentnahme wurden die Tiere umgehend durch eine kraniozervikale Dislokation erlöst.

3.2 Experimentelle Versuche

3.2.1 Arbeiten mit 9-*cis* Retinsäure

9-*cis* Retinsäure ist sehr temperatur- und lichtempfindlich, sie oxidiert und isomerisiert schnell (83). Um dies möglichst zu vermeiden wurde mit 9cRS (ab141023, abcam) ausschließlich unter Gelblicht gearbeitet. 9cRS wurde in einer Glovebag (108D X-17-17, GlasCol) unter Stickstoffatmosphäre in Dimethylsulfoxid (DMSO; D2438, Sigma) gelöst und bei -20°C für maximal einen Monat aufbewahrt. Methoprensäure (ab141628, abcam) wurde ebenfalls in DMSO gelöst. DMSO hat thrombozytenhemmende Eigenschaften (84). Um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte auf 9cRS bzw. Methoprensäure zurückzuführen sind, wurden alle Versuche mit einem Äquivalent an DMSO zur Kontrolle durchgeführt. Im folgenden Text wird diese DMSO-Behandlung als Vehikel bezeichnet.

3.2.2 Thrombozytenassays

3.2.2.1 Thrombozytenisolation

Thrombozyten wurden aus dem Vollblut mittels Zentrifugation isoliert. Zur Isolation wurde Tyrodes-Puffer hergestellt (137 mM NaCl; 2,8 mM KCl; 12 mM NaHCO₃; 10 mM HEPES ([N-2 Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid], 5,5 mM Glucose) und auf den pH-Wert 6,5 eingestellt. Das Blut wurde mit Tyrodes im Verhältnis 1:1 verdünnt und bei Raumtemperatur, 160 g, Beschleunigung 1 und Bremse 0 für 5 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804R). Der Überstand bestehend aus plättchenreichem Plasma wurde abpipettiert und aufgehoben. Der Zentrifugationsschritt wurde mit dem obersten Drittel des Erythrozytenüberstandes und 2 ml Tyrodes pH 6,5 wiederholt. Das plättchenreiche Plasma der beiden Zentrifugationsschritte wurde gemischt und bei Raumtemperatur, 450 g, Bremse 1 und Beschleunigung 1 für 10 min zu einem Pellet zentrifugiert.

Dieses Pellet wurde entweder für weitere Funktionsassays in 1 ml Tyrodes pH 6,5 resuspendiert oder lysiert für Untersuchungen der Proteinexpression mittels Westernblotting. Dazu wurden die Proben 15 min in 98% Radioimmunopräzipitations-Assay-Buffer (RIPA-Buffer, #89900 Pierce, Thermo Scientific), 1% Proteaseinhibitor und 1% Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA,

Protease Inhibitor Cocktail Kit #78410, Thermo Scientific) lysiert, 10 min bei 450 g zentrifugiert und anschließend bei -20 °C eingefroren.

Die Zellzahl im Vollblut und in den Thrombozytenisolaten wurde mit einem Cellcounter (Horiba ABX) bestimmt.

3.2.2.2 Westernblotting

Der Nachweis der RXR-Isoformen erfolgte durch Westernblotting. Dabei wurden mittels Gelelektrophorese die Proteine der lysierten Thrombozyten ihrer Größe nach getrennt. Diese Proteine wurden durch Blotting auf eine Membran übertragen, auf der mit Hilfe von Antikörpern das gesuchte Protein detektiert wurde.

Um in jeder Probe die gleiche Menge an Proteinen zu untersuchen wurde die Proteinmenge der lysierten Thrombozyten mittels BCA-Tests (Pierce BCA Protein Assay Kit # 23227, Thermo Scientific) bestimmt. Dazu wurden Triplets jeder Probe für 30 min mit einem Gemisch der Stammlösungen A und B des Kits im Verhältnis 50:1 bei 37°C inkubiert. In Abwesenheit von Proteinen ist die Lösung grün, in Anwesenheit von Protein schlägt sie ins Blau-Violette um. Dieser Farbumschlag wurde mittels Photometrie (TECAN, Genios) bei 560nm gemessen. Die gemessenen Absorptionswerte wurden mit denen von BSA Standards mit bekannter Proteinkonzentration verglichen und daraus die Proteinkonzentrationen in den Proben errechnet. Alle Proben wurden auf eine Konzentration von 1 µg/ µl in 20 µl verdünnt. Zu jeder Probe wurden 5 µl einer Lösung aus 65 % Wasser, 25 % NUPAGE LDS Sample Buffer 4x (#NP0007, invitrogen) und 10 % NUPAGE Sample Reducing Agent 10x (#NP0009, invitrogen) gegeben. Die Proben wurden zur Proteindenaturierung 10 min auf 95°C erhitzt.

Die Proteine der Proben wurden mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach getrennt. In ein Gelelektrophoresesystem (XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System, Thermo Scientific) wurden Gele (NUPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel #NP0321, invitrogen) eingespannt. In die dadurch entstandene innere Kammer zwischen den Gelen wurden 200 ml einer Lösung aus 94,75 % Wasser, 5 % NUPAGE SDS MOPS Running Buffer 20x (#NP001, invitrogen) und 0,25 % NUPAGE Antioxidant (#NP005, invitrogen) gegeben. In die äußere Kammer wurden 600 ml einer Lösung aus 95 % Wasser und 5 % NUPAGE SDS MOPS

Running Buffer 20x (#NP001, invitrogen) gegeben. Die Proben wurden in die Taschen der Gele pipettiert. In die erste Tasche von links jedes Geles wurden 5 µl eines Westernblotmarkers (SeeBluePlus 2 Prestained Standard #LC5925, Thermo Scientific) gegeben. Die Gelelektrophorese wurde für eine Stunde bei 200V und maximaler Stromstärke durchgeführt.

Die Proteine wurden mittels Blotting auf eine Nitrocellulose Membran (LC2001, invitrogen) übertragen. Dafür wurden Filterpapier, eine Nitrocellulosemembran und Schwämme in 200 ml Wasser, 50 ml Methanol, 12,5 ml NUPAGE Transfer Buffer 20x (#NP0006-1, invitrogen) und 250 µl NUPAGE Antioxidant eingeweicht. Das Elektrophoreseigel wurde aus seiner Plastikhalterung entnommen und auf die Nitrocellulosemembran zwischen Filterpapier und Schwämmen in die Blotting Kammer (XCell II Blot Modul, Thermo Scientific) geschichtet. Darin wurde für eine Stunde mit einem zum Gel senkrecht liegenden elektrischen Feldes bei 40V und maximaler Stromstärke geblottet.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu vermeiden wurde diese für 30 min mit Hilfe von 5 % Milchpulver (T145.2, Roth) gelöst in TBS-Tween (TRIS-buffered saline, #1060.1, Roti-Stock; P2287, Sigma) geblockt.

Zur Proteindetektion wurden Primärantikörper gegen das zu untersuchende Protein in Milch TBS-Tween verdünnt (Tabelle 5). Die Blots wurden darin bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der Blot dreimal 5 min mit TBS-Tween gewaschen. Die mit einer Horseradish Peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper wurden ebenfalls in 5 % Milch TBS-T gelöst und die Membranen eine Stunde bei Raumtemperatur darin inkubiert (Tabelle 6). Anschließend erfolgten wieder 3 Waschschrte à 5 min mit TBS-T.

Protein	Spezies	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
Primärantikörper				
RXRα	Kaninchen	Abcam	Ab125001	1:2000
RXRβ	Maus	GeneTex	GTX22815	1:2000
RXRγ	Kaninchen	Abcam	Ab15518	1:500
β-Aktin	Kaninchen	Abcam	Ab8227	1:10 000

Tabelle 5 : Primärantikörper und dazugehörige Konzentrationen für Westernblotting

Sekundärantikörper, HRP-gelabelt				
Anti-mouse IgG	Ziege	Vector Laboratories	PI-2000	1:2000
Anti-rabbit IgG	Ziege	Enzo Lifescience	ADI-SAB- 300-J	1:2000-1:10 000

Tabelle 6: Sekundärantikörper und dazugehörige Konzentrationen für Westernblotting

An die zu untersuchenden Proteine binden die Primärantikörper, an welche wiederum die HRP-gekoppelten Sekundärantikörper binden. Die HRP ist ein Enzym, das beim Umsetzen seiner Substrate Licht emittiert. Diese Chemolumineszenz-Reaktion wird zur Detektion der Proteine verwendet.

Die Blots wurden dafür für 1 min mit 500 µl der Substrate (RPN2232SK, ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare Life Science) inkubiert. Röntgenfilme (#34090 CL-Xposure Film, Thermo Scientific) wurden zwischen 10 s und 3 min in einer Dunkelkammer den Blots exponiert und danach mit einem Westernblotentwickler (Curix 60 AGFA) entwickelt.

β-Aktin fungierte als Housekeeping Protein, es wird in Thrombozyten gleichmäßig gebildet. Das Housekeeping-Protein dient dazu zu zeigen, dass überall Proteine aufgetragen worden sind und es lässt sich durch die Stärke des Signals abschätzen, wie sich die Proteinmengen der aufgetragenen Proben zueinander verhalten.

3.2.2.3 Licht-Transmissions-Aggregometrie

Die Licht-Transmissions-Aggregometrie ist eine Methode zur Quantifizierung der Thrombozytenantwort auf einen definierten Stimulus.

Dazu wurde die Zellzahl in der Thrombozytensuspension bestimmt und mit Tyrodes pH 7,4 auf 100 000 / µl verdünnt. Calciumchlorid und Magnesiumchlorid wurden hinzugefügt um eine Endkonzentration von 1 mM zu erreichen, die in etwa der physiologischen Calcium- und Magnesiumkonzentration im Vollblut entspricht.

Thrombozyten wurden 3 min im Aggregometer (CHRONO-LOG® Model 700 Whole Blood/Optical Lumi-Aggregometer) je nach Assay ohne Zusatz, mit 20 µM 9cRS oder Vehikel inkubiert. Danach mit 0,1 U/ml Thrombin (P/N386, ChronoLog), 10 µg/ml Collagen (P/N385, ChronoLog) oder 10 µM U46619 (BML-

PG023, Enzo Life Science) aktiviert. Die Aggregation wurde mit AGGRO/LINK®8 für 6 min dokumentiert. Die Area Under the Curve (AUC) wurde zur Auswertung dokumentiert.

3.2.2.4 Thrombozytenspreeding und -färbungen

Um das Spreadingverhalten von Thrombozyten zu untersuchen wurden in 24 Well Dishes (CLS3524, 24 Well Plates, Sigma) Coverslips (#1051204, Heinz Herenz) mit 100 µg/ml Fibrinogen (F3879, Sigma) gelöst in PBS (#70013-016, gibco life technologies) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Diese wurden daraufhin mit 3 % BSA-PBS (#8076.4, Roth) für 15 min geblockt.

Thrombozyten wurden in Tyrodes pH 7,4 auf eine Zellzahl von 10 000/ µl verdünnt und Calciumchlorid und Magnesiumchlorid für mit einer Endkonzentration 1mM hinzugefügt. Thrombozyten wurden für 3 min mit dem Vehikel, 40 µM 9cRS oder 40 µM MA (ab141628, abcam) inkubiert, anschließend mit 10 µg/ml Collagen, 1 µM U46619 oder 0,1 U/ml Thrombin aktiviert und danach auf die mit Fibrinogen beschichteten Coverslips gegeben. Nach einer Inkubation (#9040-0038, Binder) bei 37 °C für 30 min wurden sie 10 min mit 4% Paraformaldehyd (#158127, Sigma) fixiert, mit 0,01% Triton 1 min permeabilisiert und mit 3% BSA-PBS 1 Stunde lang geblockt.

Zum Anfärben der RXR-Isoformen wurden Anti-RXRα-, Anti-RXRβ- oder Anti-RXRγ-Antikörper 1:500 in 3% BSA verdünnt. Die Thrombozyten wurden damit bei 4 °C über Nacht inkubiert und anschließend dreimal mit PBS-Tween gewaschen. Goat anti-mouse IgG (#A-11032, Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594, invitrogen, Thermo Scientific) oder goat anti-rabbit IgG (#A-11037, Goat anti-Rabbit IgG Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594, invitrogen, Thermofisher Scientific) Sekundärantikörper gekoppelt mit ALEXA 594 wurden in 3% BSA-PBS gelöst für 30 min mit den Thrombozyten inkubiert.

Zum Färben des Zytoskeletts wurde in der Verdünnung 1:1000 Phalloidin 488 (A12379, Alexa Fluor 488 Phalloidin, invitrogen, Thermofisher Scientific) in 3% BSA-PBS gelöst und die Thrombozyten damit eine halbe Stunde inkubiert. Phalloidin ist ein Gift des Knollenblätterpilzes und bindet hochaffin an filamentöses Aktin. Fluorochromgekoppeltes Phalloidin stellt eine gute Möglichkeit dar, das Aktinzytoskelett von Zellen darzustellen (85).

Danach wurden die Coverslips mit Hilfe von Mounting Medium (S3023 Fluorescent Mounting Medium, Dako) auf Objektträgern (#J1800AMN2, Menzel Gläser Superfrost, Thermofisher Scientific) fixiert. Die Thrombozyten wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (AxioImager. M2, Carl Zeiss Microscopy GmbH) mit dem 63x Objektiv mit dem Filterset GFP/mPlum gemacht. Für detailliertere Aufnahmen wurde ein Konfokalmikroskop (LSM-880 Airyscan and fast mode Zeiss) verwendet. Die Fläche von jeweils 40 gespreadeten Thrombozyten pro Setting und pro Maus wurden mittels ImageJ gemessen.

3.2.2.5 Fluorescence-activated Cell Sorting

Zur Quantifizierung der Thrombozytenaktivierung wurde die Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ - und die P-Selektin-Expression mittels Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) gemessen.

Die Thrombozytenkonzentrate wurden mit Tyrodes pH 7,4 auf 100 000/ μl verdünnt und Calciumchlorid und Magnesiumchlorid für eine Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. Thrombozyten wurden für 3 min mit dem Vehikel, 9cRS oder Methoprensäure inkubiert und anschließend mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Collagen, 10 μM U46619 oder 0,1 U/ml Thrombin aktiviert. Proben wurden mit CD42b-PE (#M040-1, emfret Analytics), CD62P-FITC (#M130-1, emfret Analytics) und JON/A-PE (#M023-2, emfret Analytics) Antikörpern inkubiert und anschließend mit dem BD LSRFortessa FACS-Gerät gemessen.

Die Versuche wurden mit FlowingSoftware analysiert.

3.2.3 Megakaryozytenassays

Der Anteil von Megakaryozyten an Knochenmarkszellen liegt bei etwa 0,1% (7). Um ausreichend Zellen für Versuche zu generieren wurden Megakaryozyten durch Kultivierung mit Thrombopoietin aus fetalen Leberzellen oder dem Knochenmark gewonnen.

3.2.3.1 Megakaryozytenkultur aus fetalen Leberzellen

Für die Gewinnung von Megakaryozyten aus fetalen Leberzellen wurden Mäuse verpaart. Am Embryonaltag 13,5 wurden die schwangeren Mäuse mit Isofluran narkotisiert und mittels kraniozervikaler Dislokation erlöst. Die Embryonen wurden entnommen, ihre Lebern freipräpariert und in PBS suspendiert. Das Gewebe wurde mit Hilfe einer 1 ml Pipette und einer 20G Nadel (BD Mikrolance

Becton Dickson GmbH) zu einer Einzelzellsuspension zerkleinert und durch einen 70 µm Zellfilter (CLS431751 Sigma, Corning Cell Strainer, Sigma) gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 300g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Medium bestehend aus 89 % Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, D5796, Sigma), 10 % Bovine Calf Serum (12133C Sigma, Sigma Aldrich) und 1 % Penicillin-Streptomycin (P4333 Sigma, Sigma) resuspendiert und mit einer Zählkammer gezählt. In 2 ml Medium wurden 1 000 000 Zellen mit 50ng/ml rekombinantem Thrombopoietin (12343615, Immunotools) in Sixwell Dishes (CLS3516, Corning Costar 6 Well Dish, Sigma) gegeben und für 5 Tage bei 37°C inkubiert.

3.2.3.2 Megakaryozytenkultur aus dem Knochenmark

Um Megakaryozyten aus dem Knochenmark zu gewinnen wurden Mäuse mit Isofluran narkotisiert und zervikal disloziert. Anschließend wurden beidseits Femora, Tibiae und Humeri freipräpariert und entnommen. Die Knochen wurden mit Hilfe eines Skalpells an beiden Enden eröffnet und das Knochenmark mit einer 26G (BD Mikrolance Becton Dickson GmbH) Nadel und 2 %BCS-PBS ausgespült. Unter Zuhilfenahme einer 20G Kanüle wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Diese wurde bei 300g 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Medium gelöst und die Zellzahl mittels Zählkammer gezählt. In 2 ml Medium wurden 1 000 000 Zellen mit 70ng/ml Thrombopoietin in Sixwell Dishes gegeben und für 5 Tage bei 37°C inkubiert.

3.2.3.3 Megakaryozytenaufreinigung mittels BSA-Gradienten

Nach der 5-tägigen Inkubationszeit von Knochenmark und fetalen Leberzellen wurden diese bei 300g für 5 min abzentrifugiert und anschließend in 1 ml DMEM gelöst. Da sich in dieser Zellsuspension noch andere Zellen außer Megakaryozyten befanden wurden diese mit Hilfe des BSA-Gradienten isoliert. Der BSA-Gradient besteht aus drei unterschiedlichen Schichten an 3 %BSA-PBS, 1,5 %BSA-PBS und PBS, die vorsichtig aufeinander pipettiert werden. Die Zellsuspension wird auf den Gradienten pipettiert. Die schwereren Megakaryozyten sinken auf den Boden. Nach 30-40 min hat sich der Großteil an Megakaryozyten abgesetzt. Die restlichen Zellschichten werden vorsichtig abpipettiert. Die Megakaryozyten werden bei 300 g für 5 min zu einem Pellet zentrifugiert und in Medium resuspendiert.

Die Megakaryozyten wurden danach zur Immunofluoreszenzfärbung oder zur Quantifizierung der Proplättchenbildung mittels FACS weiterverwendet.

3.2.3.4 FACS zur Quantifizierung der Proplättchenpartikelbildung

Mit Hilfe von FACS Analysen wurde untersucht, wie sich RXR-Liganden auf die Proplättchenpartikelbildung aus Megakaryozyten auswirken. Dazu wurden die mit dem BSA-Gradienten isolierten Megakaryozyten auf eine mit Fibrinogen beschichtete Oberfläche gesetzt. Fibrinogen induziert in den Megakaryozyten die Proplättchenbildung. Dafür wurden 6 Well Dishes mit 100 µg/ml Fibrinogen gelöst in PBS bei 37°C für eine Stunde inkubiert und danach für 10 min mit 1,5 % BSA-PBS geblockt. 25 000 Megakaryozyten wurden in 2 ml Medium auf das Fibrinogen ausgesäht. In dem Medium waren 1 µM, 10 µM oder 100 µM 9cRS oder Methoprensäure oder ein Äquivalent des Vehikels gelöst. Von jeder Probe wurden Triplets erstellt. Die Zellen wurden für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand mit den darin enthaltenen Proplättchenpartikel mit 4 % PFA fixiert und bei 300g 5 min abzentrifugiert. Das daraus entstandene Pellet wurde in PBS resuspendiert und zur Analyse mit einem FACS Gerät (Gallios, Beckman Coulter) mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelten anti-mouse CD61 (#104305, Biolegend) und Allophycocyanin (APC) gekoppelten anti-mouse CD42b (#148505, Biolegend) Antikörper in der Verdünnung 1:400, und in der Verdünnung 1:200 ein Phycoerythrin (PE) gekoppelten anti-mouse Lymphozyten Antigen 6 Complex Locus G6D (Ly6G) (#127607, Biolegend) Antikörper gefärbt. Jeder Probe wurde die gleiche Menge an Rainbowbeads (#422907, BioLegend) hinzugegeben zum Standardisieren der Messungen. Es wurde quantifiziert, wie viele Proplättchen pro Probe in dem Zeitraum gemessen worden sind, in der eine definierte Anzahl von Beads gemessen wurde. Die Datenanalyse erfolgte mit FlowJo Software Version 9.6.2 (Tree Star).

3.2.3.5 Immunofluoreszenz von proplättchenbildenden

Megakaryozyten

Um proplättchenbildende Megakaryozyten für die weitere Untersuchung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie anzufärben wurden diese mit dem BSA-Gradienten isoliert und auf Fibrinogen beschichtete Coverslips gesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden wurden die Zellen für 10 min mit 4 % PFA

inkubiert, anschließend für 1 min mit 0,01 % Triton permeabilisiert und für 1 Stunde mit 3 % BSA-PBS geblockt.

Zum Anfärben der RXR-Isoformen wurden Anti-RXR α -, Anti-RXR β - oder Anti-RXR γ -Antikörper 1:500 in 3 % BSA-PBS verdünnt. Die Thrombozyten wurden damit bei 4°C über Nacht inkubiert und anschließend dreimal mit PBS-Tween gewaschen. Anti-mouse oder anti-rabbit Sekundärantikörper gekoppelt mit ALEXA 594 wurden in 3 % BSA-PBS gelöst für 30 min mit den Thrombozyten inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS-Tween gewaschen.

Zum Anfärben des Zellkerns wurde Hoechst 33342 (Hoechst 33342, Trihydrochloridetrihydrat, Invitrogen) 1:1000 in 3 %BSA-PBs gelöst und für 30 min auf die Megakaryozyten gegeben. Hoechst färbt hochspezifisch die DNA von Eukaryonten an und wurde in dieser Färbung zur Darstellung des Zellkerns verwendet. Anschließend wurde dreimal mit PBS-Tween gewaschen.

Zum Anfärben des Oberflächenproteins CD41 wurde der Primärantikörper rat anti-mouse CD41 (eBioMWRReg30, invitrogen, Thermofisher Scientific) in 3 % BSA-PBS gelöst und mit den Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden drei Waschschrte mit PBS-Tween durchgeführt. Goat anti-rat IgG Antikörper (Goat anti-Rat IgG Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488, invitrogen, Thermofisher Scientific) wurden in 3 % BSA-PBS gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde dreimal mit PBS-Tween gewaschen.

Danach wurden die Coverslips mit Hilfe von Mounting Medium auf Objektträgern fixiert. Die Megakaryozyten wurden mit Hilfe des Fluoreszenz- oder des Konfokalmikroskops mikroskopiert und fotografiert.

3.2.3.6 Immunofluoreszenz gegen CD41⁺ Megakaryozyten in Milz, Leber und Knochenmark

Um die Anzahl von Megakaryozyten im Gewebe zu quantifizieren wurde CD41, ein Oberflächenprotein von Megakaryozyten, in Milz, Leber und Knochenmark angefärbt. Murine Milz, Leber und Femur wurden in Tissue Tek (OCT Compound, Sakura) eingebettet und bei -20°C tiefgefroren. Mit Hilfe des Kryotoms (KryoStar NX70) wurde das Gewebe in 8 μ m feine Schnitte geschnitten und auf Objektträger gegeben. Die Schnitte wurden auf einem Schüttler für 15 min mit 4

% PFA fixiert und anschließend 5 min mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden sie mit 0,1 % Triton 5 min permeabilisiert und danach wieder 5 min mit PBS gewaschen. Zum Blocken wurde 3 % BSA-PBS für eine Stunde verwendet und danach wieder 5 min mit PBS gewaschen. Mit einem PAP-Pen (Liquid Blocker, Science Services) wurden die Schnitte umkreist, auf die Schnitte wurde ein 1:100 verdünnter CD41-PE Antikörper pipettiert und unter Lichtausschluss für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden danach zweimal 5 min mit PBS-Tween gewaschen und zum Anfärben der Zellkerne für 3 min mit DAPI in der Verdünnung 1:10 000 in 3 % BSA-PBS inkubiert. Nach einem letzten 5-minütigen Waschschrift mit PBS wurden auf die Schnitte Deckgläser mit Hilfe von Mounting Medium fixiert. Die Megakaryozyten wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (AxioImager. M2, Carl Zeiss Microscopy GmbH) mit dem 40x Objektiv mit dem Filterset DAPI/mPlum mikroskopiert und fotografiert. Mit ImageJ wurden Megakaryozyten ausgezählt.

3.2.4 Kultivierung hämatopoetischer Vorläuferzellen

3.2.4.1 Quantifizierung myeloider Vorläuferzellen

Um durch Knockouts induzierte Veränderung in der Zelldifferenzierung im Knochenmark zu quantifizieren wurden Knochenmarkskulturen mit MethoCult (STEMCELL Technologies, GF M3434) angelegt. MethoCult ist ein Medium, in dem hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem murinen Knochenmark, der Milz, der fetalen Leber oder dem Blut kultiviert werden. Darin wachsen alle myeloiden Vorläuferzellen außer Megakaryozyten.

Murine Knochen wurden isoliert und mit einem Skalpell von Muskeln und Sehnen befreit. Die Epiphysen wurden abgetrennt und die Knochen wurden mit einer 26G Kanüle und PBS ausgespült. Mit einer 20G Kanüle wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und die Zellen wurden durch einen 40 µm Filter gegeben.

Die Zellen wurden in dem MethoCult Medium mit einer Zellkonzentration von 20 000/ml gelöst und für 8 Tage bei 37°C inkubiert.

Dabei bilden Vorläuferzellen sogenannte CFUs aus. Sie unterscheiden sich in ihrer Morphologie und Größe. Es entstehen aus erythroiden Vorläufern Colony Forming Units-erythroid (CFU-E) und Burst-Forming Units-erythroid (BFU-E). Granulozyten- und Makrophagenvorläufer bilden charakteristische CFU-GM aus.

Multipotente Stammzellen bilden CFU-GEMM aus, in denen Granulozyten-, Erythrozyten-, Makrophagen- und Megakaryozytenvorläufer zu finden sind. Ein kleiner Teil lymphoider Vorläufer kann als Pre-B-CFU gefunden werden. Es entstehen auch aus einigen Megakaryozytenvorläufern CFU-Mks, die aufgrund ihrer Morphologie jedoch schwer zu identifizieren sind.

Die Kulturen wurden mit einem Mikroskop in 20-facher Vergrößerung abfotografiert und die Zellkolonien anhand ihrer Morphologie den unterschiedlichen CFUs zugeordnet und ausgezählt

3.2.4.2 Quantifizierung von Megakaryozytenvorläufern

Für die Quantifizierung von Megakaryozytenvorläufern wurde das MegaCult Kit (STEMCELL Technologies, #04971) verwendet.

Knochenmarkszellen wurden wie oben beschrieben isoliert. 10 000 Zellen/ml wurden in MegaCult Medium und IMDM mit 50ng/ml TPO und 10ng/ml Il-3 gelöst und für 6 Tage bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Das MegaCult Medium wurde dafür für 5 min mit eiskaltem Aceton fixiert. Anschließend wurde das Medium für 5 Stunden mit einer Lösung aus 0,5 mg/ml Acetylthiocholinoidid, 0,1 M Natriumchlorid, 0,05 M Natriumcitrat, 1,5 mM Kupfersulfat und 0,25 mM Kaliumferrocyanid gefärbt. Danach wurde das Medium mit 95 % Ethanol für 10 min fixiert und für 30 s mit Harris' Hämatoxylin gefärbt.

Die Zellkulturen wurden mit einem Mikroskop in 20-facher Vergrößerung abfotografiert und die Zellkulturen gezählt. Eine Zellkultur wurde als mehr als drei Megakaryozyten in unmittelbarer Nähe definiert.

3.3 Eisenchlorid-induzierte arterielle Thrombose *in*

vivo

In vivo Versuche wurden durch den Veterinärmediziner Dr. Andreas Ehrlich durchgeführt. Es wurde eine arterielle Thrombose in der A. carotis communis durch topische Applikation von 10%-iger Eisen-III-Chlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) induziert. FeCl₃ induziert eine oxidative Schädigung des Endothels und dient als Modell zur Untersuchung der arteriellen Thrombose (86).

Die Versuche wurden unter einer Isofluran-Inhalationsnarkose (Isofluran CP, cp-pharma, Burgdorf) und einer Injektionsnarkose mit Medetomidin (Dorbene vet., zoetis Deutschland GmbH, Berlin), Midazolam (Midazolam, B. Braun, Melsungen) und Fentanyl (Fentadon, Albrecht GmbH, Aulendorf) durchgeführt. Die Versuchstiere erhielten über einen Schwanzvenenkatheter Fluoreszenzmarkierte Antikörper (X488, CYLight488-labeled; Emfret Analytics, Eibelstadt, Germany), welche an die GPIIb/IIIa Untereinheit des GPIIb-V-IIIa Komplex auf murinen Thrombozyten und Megakaryozyten binden. Die Versuche wurden mit den Pf4-Cre^(+/-)/RXR β ^{flox/flox} und Pf4-Cre^(-/-)/RXR β ^{flox/flox} Tieren mit und ohne Vorbehandlung mit 9cRA durchgeführt. Zur Vorbehandlung wurde 15 min vor Induktion der arteriellen Thrombose gewichtsadaptiert 9cRA intravenös injiziert um eine Plasmakonzentration von 20 μ mol/l zu erzielen.

Unter Narkose wurde nach Rasur und Desinfektion mittels Hautschnitt vom Kieferwinkel Richtung Sternum und stumpfer Präparation die Arteria communis freigelegt. Filterpapiere (Whatman Filter, GE Healthcare, Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) wurden mit der 10%-igen Eisen-III-Chlorid Lösung getränkt und von außen für 3 min auf der Arterie platziert. Anschließend wurden über 60 min im Abstand von 0,5 S unter einem Intravitalmikroskop (Mikroskop: Leica DM 6 FS, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) Bilder von dem geschädigten Areal angefertigt. Es wurde analysiert, zu welchem Zeitpunkt es zu einer Okklusion des Gefäßes und wann zu einer Reperfusion gekommen ist.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Graphen wurde mit GraphPad Prism 7 gemacht. Auf Normalverteilung wurde mit dem D'Agostino-Pearson Omnibus Test für Fallzahlen ≥ 8 oder mit dem Kolmogorov-Smirnov Test für Fallzahlen ≥ 5 überprüft.

Für Stichproben, bei denen keine Normalverteilung vorlag, wurde der Kruskal-Wallis Test verwendet. Bei Normalverteilung wurden die Daten mit dem ungepaarten T-Test, Two-way ANOVA, one-way ANOVA, oder dem Multiple T-Test ausgewertet.

P-Werte wurden in der Statistik wie folgt dargestellt (Tabelle 7):

Darstellung	P-Wert
ns	$P > 0.05$
*	$P \leq 0.05$
**	$P \leq 0.01$
***	$P \leq 0.001$
****	$P \leq 0.0001$

Tabelle 7 : Darstellung von P-Werten

4 Ergebnisse

4.1 Expression des Retinoid-X-Rezeptors in Thrombozyten und -megakaryozyten

Mittels Westernblotting und Immunhistochemie gegen die RXR-Isoformen wurde charakterisiert welche Isoformen in Thrombozyten und -megakaryozyten exprimiert werden.

4.1.1 Westernblot

Zuerst wurden murine Thrombozyten dahingehend untersucht, welche RXR Isoformen sie exprimieren. Dazu wurden Westernblots von isolierten Thrombozyten von C57B/6 Mäusen durchgeführt (3.2.2.2).

Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu humanen Thrombozyten, die RXR α und RXR β exprimieren, murine Thrombozyten nur RXR β enthalten (Abbildung 6).

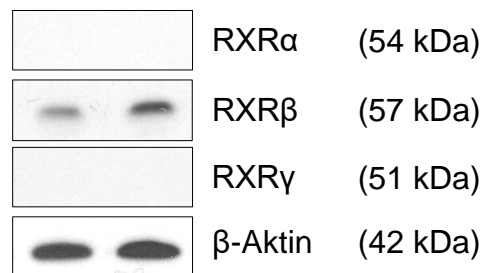


Abbildung 6 : Repräsentativer Westernblot muriner Thrombozyten nach RXR α , RXR β , RXR γ und β -Aktin. Den Versuchstieren wurde Blut entnommen und aus diesem Thrombozyten isoliert. Diese wurden lysiert und mittels Westernblotting auf die Expression der RXR-Isoformen hin untersucht. Murine Thrombozyten exprimieren RXR β , jedoch kein RXR α und RXR γ .

Megakaryozyten konnten durch Westernblotting nicht auf ihre RXR-Isoformen hin untersucht werden, da es nicht möglich war Zellisolate mit ausreichender Reinheit herzustellen.

4.1.2 Nachweis der RXR-Isoformen in Thrombozyten und Megakaryozyten mittels Immunfluoreszenzfärbung

4.1.2.1 Thrombozyten

Zum Nachweis der RXR-Isoformen mittels Immunfluoreszenz in Thrombozyten wurden diese mit Thrombin aktiviert und anschließend nach den RXR-Isoformen gefärbt. Es konnte nur RXR β in murinen Blutplättchen nachgewiesen werden (

Abbildung 7).

4.1.2.2 Megakaryozyten

Um zu zeigen, welche RXR-Isoformen Megakaryozyten exprimieren wurden Megakaryozyten wie beschrieben aus fetalen Leberzellen gewonnen und gefärbt (3.2.3.1).

Abbildung 8 zeigt repräsentative Bilder dieser Färbungen. Es zeigte sich, dass Megakaryozyten, die durch Kultivierung von fetalen Leberzellen gewonnen worden sind, RXR β und RXR γ exprimieren.

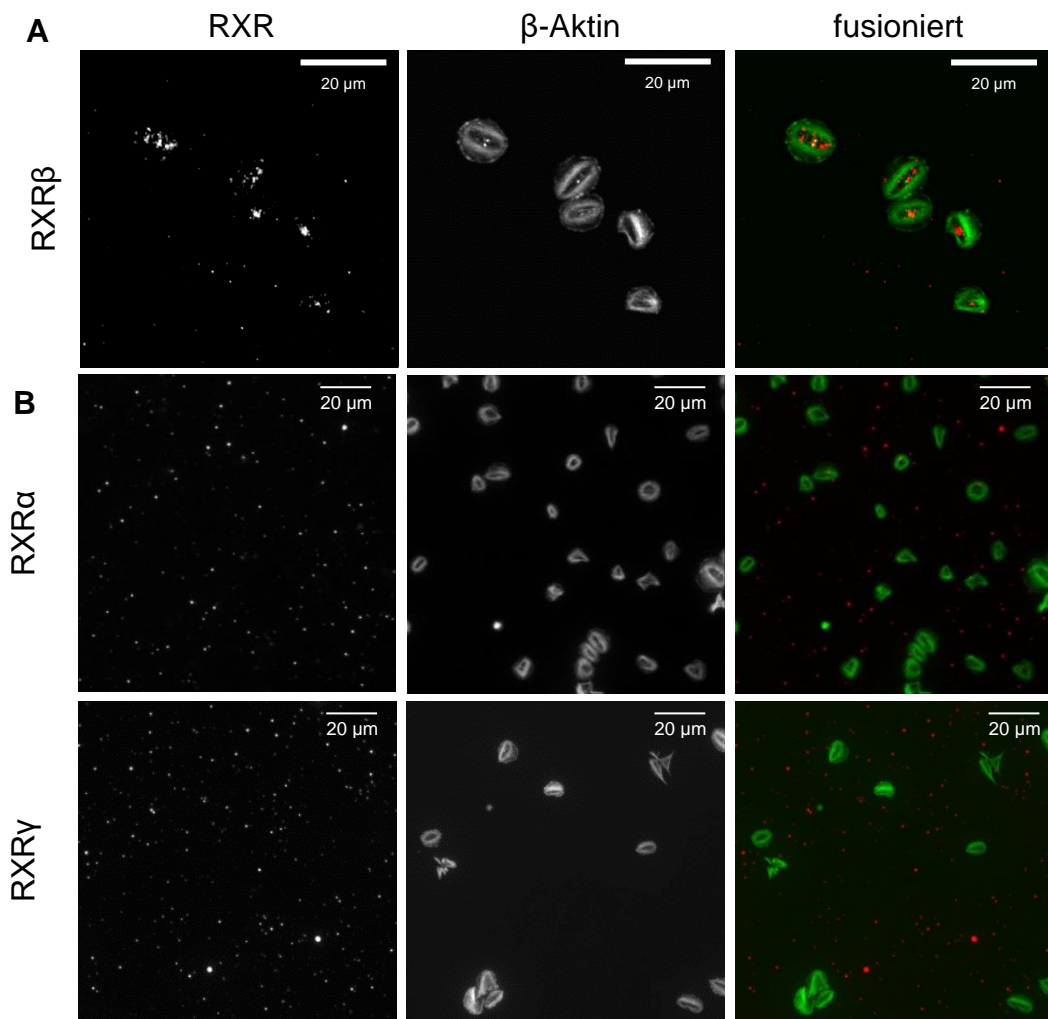


Abbildung 7 : Repräsentative Aufnahmen von Thrombozyten. Thrombozyten aus C57B/6 Mäusen wurden mit Thrombin (0,01/ml) aktiviert, auf Fibrinogen (100μg/ml) ausgesät, nach 30 min fixiert und nach F-Aktin (grün) und RXR-Isoformen (rot) gefärbt. Aufnahmen eines konfokalen Mikroskops (A), Aufnahmen eines Fluoreszenzmikroskops (B). Es zeigt sich RXRβ in murinen Thrombozyten, RXRα und RXRγ konnten nicht nachgewiesen werden.

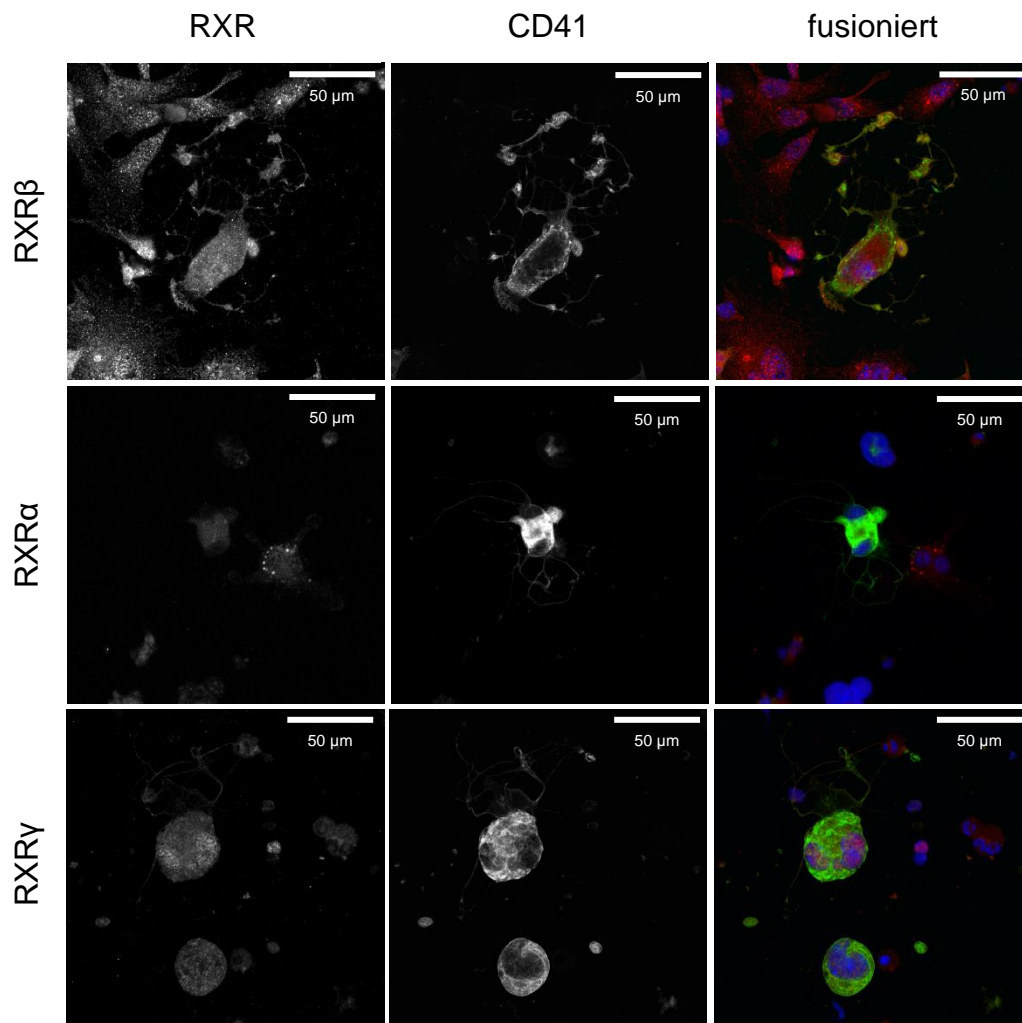


Abbildung 8 : Repräsentative Aufnahmen von Megakaryozyten, welche aus fetalen Leberzellen kultiviert worden sind. Fetale Lebern wurden an Embryonaltag 13,5 entnommen und für 6 Tage mit Thrombopoietin (70 ng/ml) kultiviert. Mittels BSA-Gradienten wurden Megakaryozyten isoliert und anschließend für 6 Stunden auf Fibrinogen (100 μ g/ml) ausgesät. Nach anschließender Fixierung wurden diese nach CD41 (grün), Zellkern (blau) und RXR-Isoformen (rot) gefärbt. Es konnten intrazellulär RXR β und RXR γ nachgewiesen werden, jedoch kein RXR α . Mit freundlicher Genehmigung von Lüsebrink et al (1).

4.2 Der Einfluss von RXR-Liganden auf die Thrombozytenfunktion

4.2.1 Aggregometrie

Um den Einfluss von RXR-Liganden auf die Aktivierung von murinen Thrombozyten zu untersuchen wurden Aggregometrien mit isolierten murinen Thrombozyten durchgeführt. Es wurde die Area Under the Curve (AUC) quantifiziert. Die Vorbehandlung mit 20 μ M 9cRS zeigte signifikante inhibitorische Effekte auf die Aktivierung mit dem Thromboxan A₂ Mimetikum U46619. Bei der Aktivierung mit Collagen zeigten die mit 9cRS vorbehandelten Thrombozyten eine statistisch nicht signifikante schwächere Aggregation. Bei der Aktivierung mit Thrombin konnte kein Unterschied zwischen den mit Vehikel und 9cRS behandelten Thrombozyten festgestellt werden (siehe Abbildung 9).

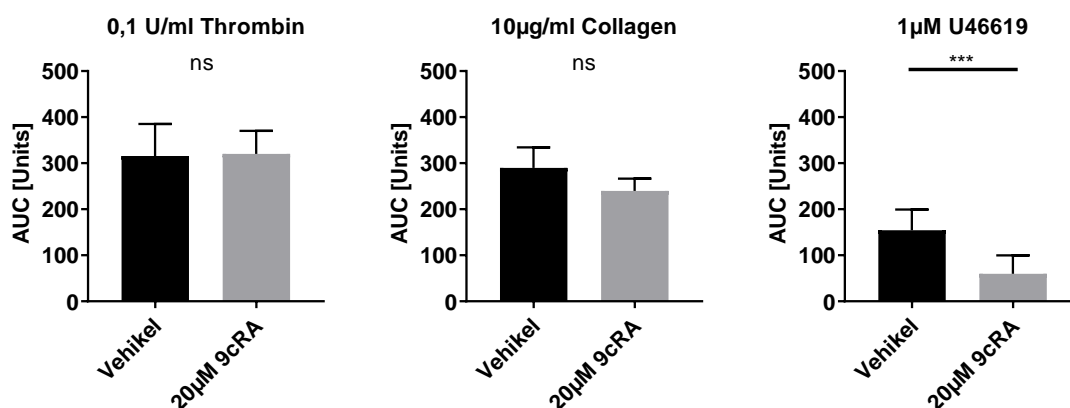
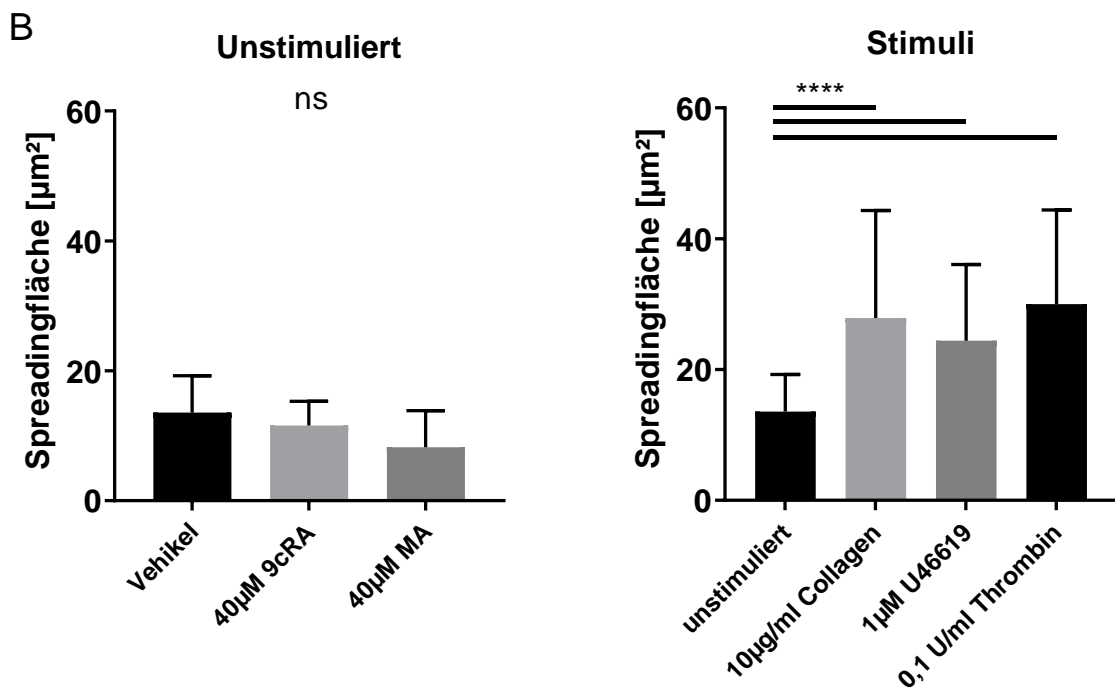
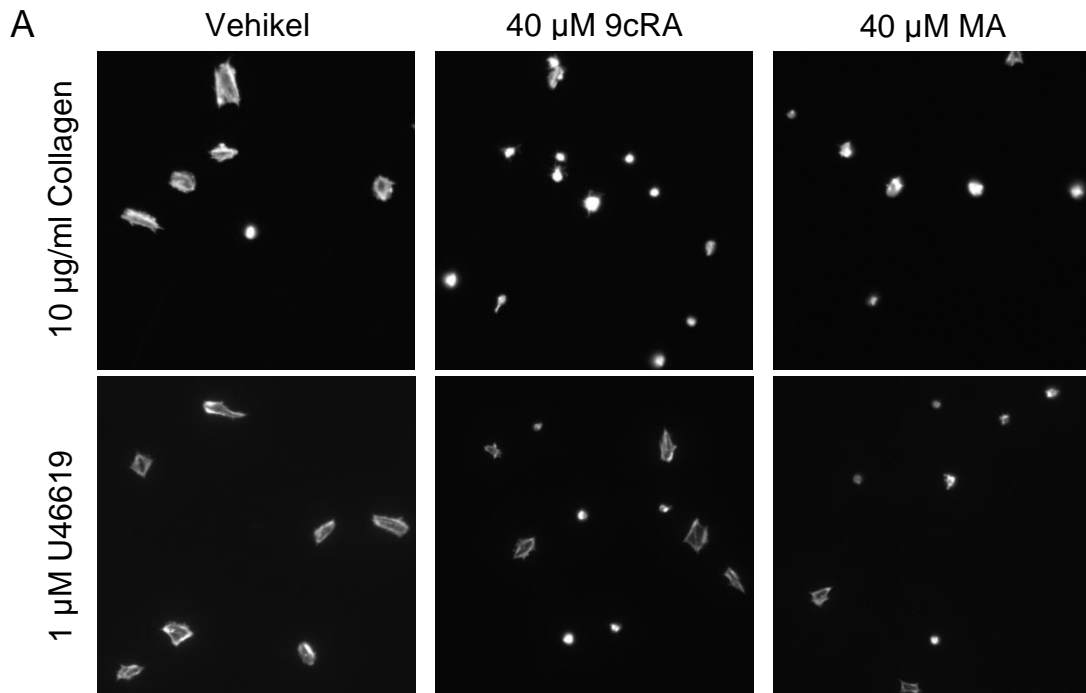


Abbildung 9 : Thrombozyten wurden mittels Licht-Transmissions-Aggregometrie (n=3) untersucht. Eine Vorbehandlung mit 20 μ M 9cRA zeigte keinen statistisch signifikanten, hemmenden Effekt auf die Aktivierung mit Thrombin (0,1 U/ml) und Collagen (10 μ g/ml). Eine Vorbehandlung mit 9cRA konnte signifikant eine durch das Thromboxan A₂ Mimetikum U46619 (1 μ M) induzierte Aggregation reduzieren. Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.2.2 Spreading

Um den Einfluss der RXR-Aktivierung auf die Aktivierung und das Spreadingverhalten von murinen Thrombozyten zu untersuchen wurden Spreadingversuche durchgeführt. Es wurden Thrombozyten von vier C57B/6 Mäusen mit den RXR-Liganden 9cRS und MA oder dem Vehikel DMSO vorbehandelt und mit U46619, Thrombin oder Collagen aktiviert. In Abbildung 10

zeigt sich, dass die Vorbehandlung mit RXR-Liganden einen hemmenden Einfluss auf das Spreadingverhalten nach Collagen- und U46619-Aktivierung hat. Die RXR-Liganden zeigten keinen Einfluss auf die Aktivierung mit 0,1 U/ml Thrombin.



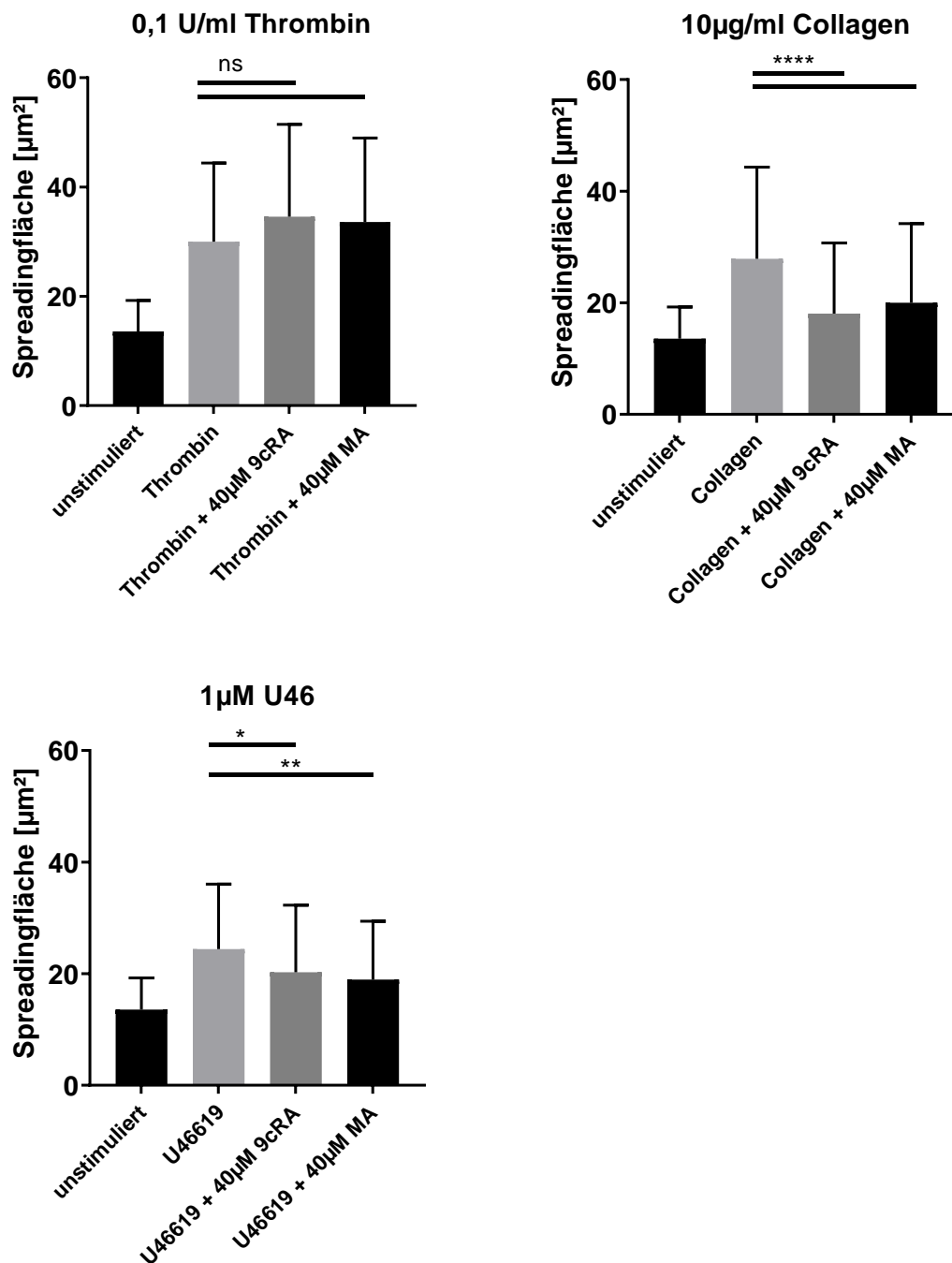


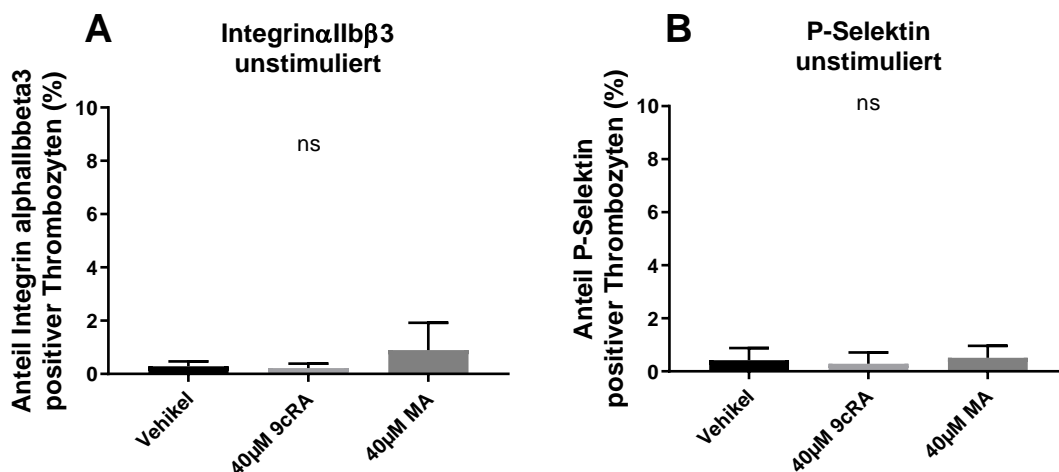
Abbildung 10 : (A) Repräsentative Darstellung von Thrombozyten nach Spreadingversuchen. 10 000 Zellen/ μl wurden mit den RXR-Liganden 9cRA (40 μM) oder MA (40 μM) vorbehandelt und anschließend mit entweder Collagen (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Thrombin (0,1U/ml) oder U46619 (1 μM) aktiviert. Die Thrombozyten wurden anschließend auf Fibrinogen (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausgesät, nach 30 min Inkubation bei 37,0°C fixiert und anschließend nach F-Aktin gefärbt. (B) Die Fläche der Thrombozyten wurde mittels ImageJ quantifiziert. Nach Stimulation mit allen drei Thrombozytenaktivatoren zeigt sich eine signifikant vergrößerte Spreadingfläche. Durch Vorbehandlung mit dem Vehikel, 9cRA (40 μM) und MA (40 μM) kam es zu keiner Aktivierung der unstimulierten

Thrombozyten. Die Vorbehandlung mit beiden RXR-Liganden konnte das Spreadingverhalten auf die Aktivierung mit Collagen und U46619 signifikant reduzieren, auf eine Aktivierung mit Thrombin zeigte sich kein Einfluss. Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.2.3 FACS

FACS-Versuche mit murinen Thrombozyten wurden wie beschrieben durchgeführt, um zu quantifizieren, welchen Einfluss RXR-Liganden auf die Expression von Thrombozytenaktivierungsmarkern von Mäusen haben. Es wurde untersucht wie groß der Anteil an CD42b positiven Zellen ist, die nach RXR-Ligandenbehandlung und Stimulation mit 0,1 U/ml Thrombin, 100 μ g/ml Collagen und 10 μ M U46619 Aktivierungsmarker exprimieren.

In Abbildung 11 zeigt sich eine signifikante Reduktion der P-Selektin Expression auf Thrombozyten nach Behandlung mit RXR-Liganden und der Aktivierung mit 100 μ g/ml Collagen. Die gleiche Tendenz ist bei der Integrin α IIb β 3 Expression zu erkennen, jedoch liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Auf die Aktivierung mit 0,1 U/ml Thrombin haben die RXR-Liganden keinen signifikanten Einfluss.



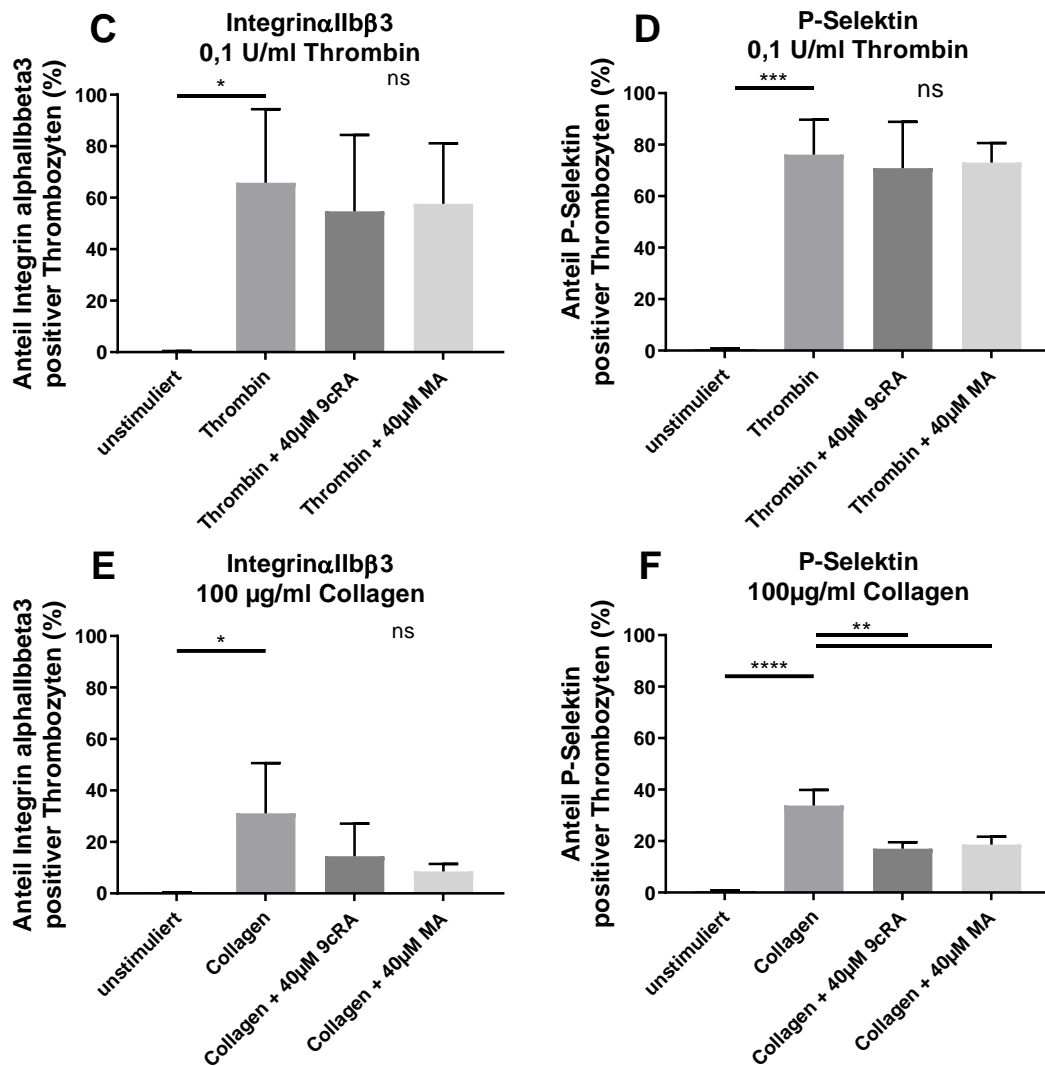


Abbildung 11 : Thrombozyten (n = 3) wurden isoliert und mit dem Vehikel oder den RXR-Liganden 9cRA (40 μ M) und MA (40 μ M) für 3 min inkubiert und anschließend mit Collagen (100 μ g/ml) oder Thrombin (0,1 U/ml) aktiviert. Die aktivierten Thrombozyten wurden mittels fluoreszenzmarkierter Antikörpern gegen die Thrombozytenaktivierungsmarker Integrin α IIb β 3 und P-Selektin markiert. Anschließend wurde Expression der Aktivierungsmarker mittels FACS-Analyse quantifiziert. Es zeigte sich keine Aktivierung der Thrombozyten durch die RXR-Liganden. Es kam zu keiner Thrombozytenaktivierung und Expression von Integrin α IIb β 3 (A) und P-Selektin (B) nach Vorbehandlung mit 9cRA und MA. Die Vorbehandlung mit RXR-Liganden hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Expression von aktiviertem Integrin α IIb β 3 nach Stimulation mit Thrombin (C) und Collagen (E) und auf die Expression von P-Selektin nach Stimulation mit Thrombin (D). Es zeigte sich eine signifikant reduzierte Expression von P-Selektin nach Vorbehandlung mit den RXR-Liganden und Stimulation mit Collagen (F). Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.3 Der Einfluss von RXR-Liganden auf die Thrombozytenbildung

4.3.1 Quantifizierung der Proplättchenpartikelbildung mittels FACS Analyse

Neben dem Einfluss von RXR-Liganden auf die Thrombozytenfunktion wurde weitergehend der Einfluss der RXR-Liganden auf die Thrombozytenbildung untersucht. Mittels FACS-Analyse wurde die Proplättchenpartikelbildung von Megakaryozyten quantitativ bestimmt.

Megakaryozyten wurden wie beschrieben aus fetalen Leberzellen kultiviert und mit den RXR-Liganden 9-*cis* Retinsäure, Bexaroten und Methoprensäure für 6 Stunden auf Fibrinogen beschichteten Oberflächen inkubiert. Die gebildeten Proplättchen wurden mit Hilfe von FACS Analysen quantifiziert.

Es zeigte sich kein Effekt durch die Behandlung mit 9cRS, jedoch durch die Behandlung mit Bexaroten und Methoprensäure. In der Konzentration 10 μM zeigten beide RXR-Liganden eine signifikant erhöhte Proplättchenpartikelzahl, in der Konzentration 100 μM zeigte nur Methoprensäure eine signifikant erhöhte Proplättchenpartikelzahl (siehe Abbildung 12).

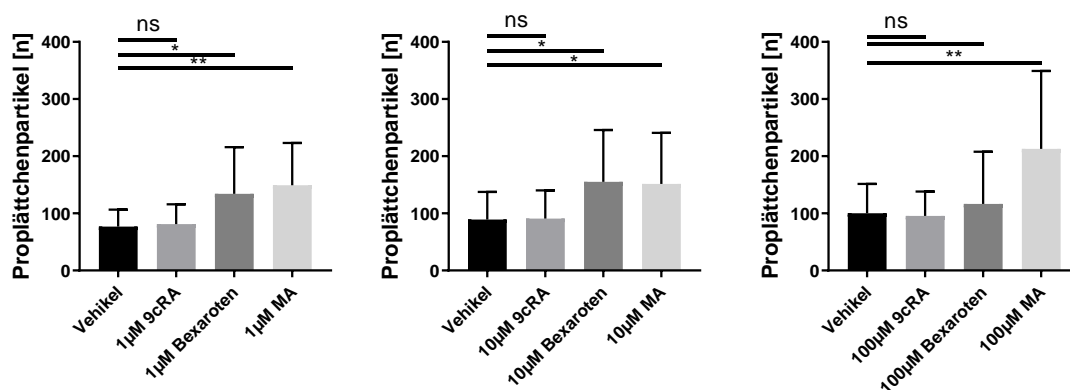


Abbildung 12 : Megakaryozyten wurden aus fetalen Lebern kultiviert und mittels FACS-Analyse auf die Bildung von Proplättchenpartikeln hin untersucht (n = 5). Dafür wurden fetale Lebern an Embryonaltag 13,5 entnommen und für 6 Tage mit Thrombopoietin (70 ng/ml) kultiviert. Mittels BSA-Gradienten wurden Megakaryozyten isoliert und anschließend auf Fibrinogen (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausgesät und mit dem Vehikel oder den RXR-Liganden 9cRA, Bexaroten und MA in den Konzentrationen 1 μM , 10 μM und 100 μM für

6 Stunden inkubiert. Die gebildeten Proplättchenpartikel wurden mit 4%-iger PFA Lösung fixiert und anschließend nach den Thrombozytenoberflächenmarkern CD61 und CD42b gefärbt. Mittels FACS-Analyse wurde die Anzahl gebildeter Proplättchenpartikel quantifiziert. Eine niedrig dosierte Behandlung mit Bexaroten (1 und 10 μM) führte zu einer signifikanten Erhöhung der Proplättchenpartikelbildung, sowie eine Behandlung mit Methoprensäure in allen drei verwendeten Konzentrationen. Eine Behandlung mit 9cRA hatte keinen Einfluss auf die Proplättchenpartikelbildung. Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.3.2 Quantifizierung der proplättchenbildenden

Megakaryozyten mittels Immunfluoreszenz

Mittels CD41 Färbung von Megakaryozyten, die für 6 Stunden auf Fibrinogen beschichteten Coverslips mit RXR-Liganden behandelt wurden, wurde der Anteil an proplättchenformenden Megakaryozyten an der Gesamtzahl von Megakaryozyten bestimmt. Es wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung gemacht und 40 Zellen pro Setting ausgezählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 zusammengefasst. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungen festgestellt werden.

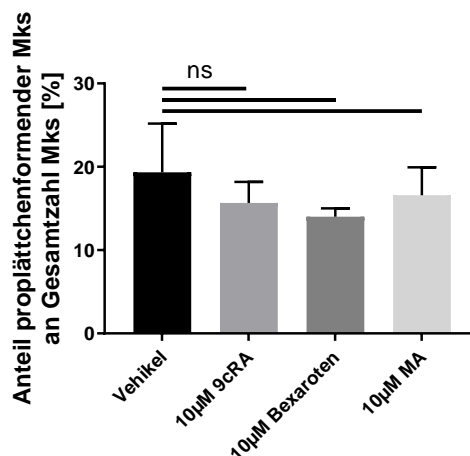


Abbildung 13 : Anteil der proplättchenbildenden Megakaryozyten an der Gesamtzahl aller Megakaryozyten nach 6-stündiger Inkubation mit RXR-Liganden (n=3). Dafür wurden fetale Lebern an Tag 13,5 post conceptionem entnommen und für 6 Tage mit Thrombopoietin (70 ng/ml) kultiviert. Mittels BSA-Gradienten wurden Megakaryozyten isoliert und anschließend auf Fibrinogen (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausgesät und mit dem Vehikel oder den RXR-Liganden 9cRA, Bexaroten und MA in den Konzentrationen 1 μM , 10 μM und

100 μ M für 6 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und nach CD41 gefärbt. Es wurde der Anteil an proplättchenbildenden Megakaryozyten im Verhältnis zur Gesamtzahl an Megakaryozyten erhoben. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen hinsichtlich des Anteils proplättchenbildender Megakaryozyten. Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.4 Knockout-Tiere

Um zu untersuchen, wie sich der Knockout des Rezeptors auf die Thrombozytenbildung und -funktion auswirkt wurden zwei Knockout-Mauslinien gezüchtet und auf die Vollständigkeit und den Einfluss des Knockouts hin untersucht.

4.4.1 Mx1-Cre/ RXR β ^{flox/flox}

Zur Induktion eines konditionellen RXR β -Knockouts in Thrombozyten wurden die Mx1-Cre/ RXR β ^{flox/flox} Mäuse mit unterschiedlichen Therapieregimen mit polyI:C behandelt, Blut wurde abgenommen, Thrombozyten isoliert und auf den Knockout hin überprüft.

4.4.1.1 Westernblot

Die Effektivität des Knockouts wurde mit Hilfe von Westernblots kontrolliert. Lysierte Thrombozyten von Kontrolltieren (Mx1-Cre^{-/-} RXR β ^{flox/flox}) und Knockout-Tieren (Mx1-Cre^{+/-} RXR β ^{flox/flox}) wurden auf ihren RXR β Gehalt überprüft.

Mit den unterschiedlichen getesteten poly I:C Injektionsschemata konnte kein kompletter RXR β -Knockout generiert werden. Mittels Westernblot Charakterisierung fand sich in den Thrombozyten aus behandelten Tieren immer noch 30-60 % des RXR β Proteins. Jedoch kam es zu keiner kompensatorischen vermehrten Expression von RXR α oder RXR γ .

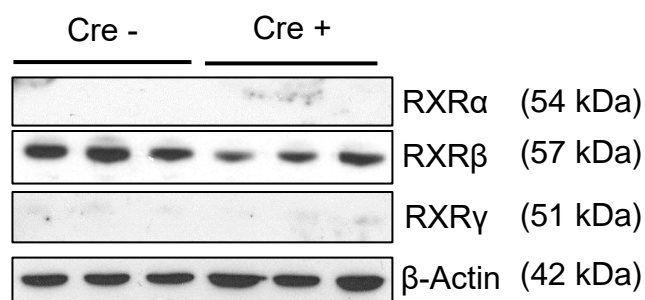


Abbildung 14 : Repräsentativer Westernblot der RXR-Proteinexpression in Thrombozyten von Mx1-Cre/ RXR $\beta^{flox/flox}$ Mäusen. Den Versuchstieren wurde Blut entnommen und aus diesem Thrombozyten isoliert. Diese wurden lysiert und mittels Westernblotting auf die Expression der RXR-Isoformen hin untersucht. Es konnte kein suffizienter RXR β -Knockout mit dem Mx1-Cre/ RXR $\beta^{flox/flox}$ Modell generiert werden.

4.4.1.2 Blutbild Analyse

Um den Einfluss des partiellen Knockouts auf das Blutbild zu untersuchen, erfolgten Blutanalyse mittels Cellcounter. Es zeigte sich kein Unterschied in der Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl und in der Höhe des Hämoglobinwertes zwischen den Knockout und den Kontrolltieren.

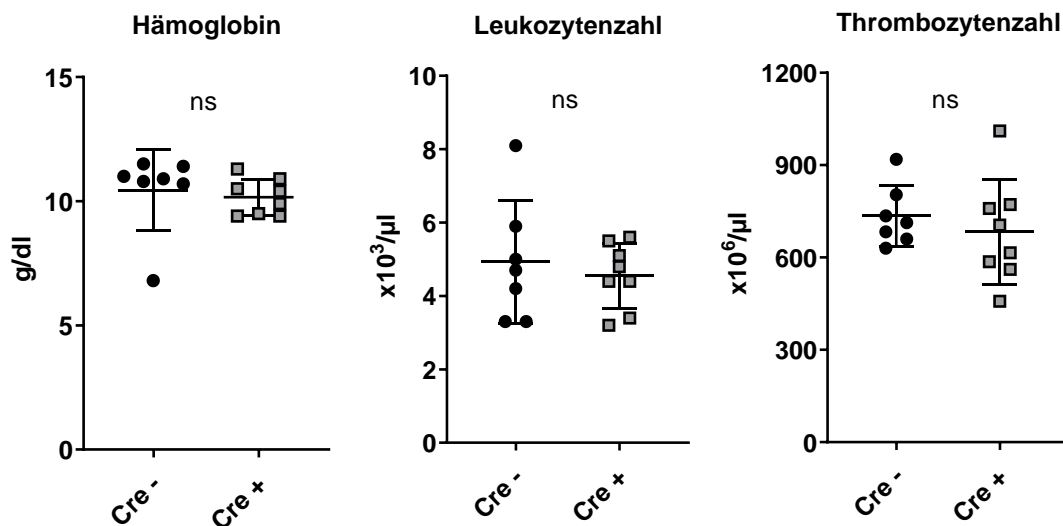


Abbildung 15 : Hämoglobingehalt, Leukozyten- und Thrombozytenzahlen der Mx1-Cre/ RXR $\beta^{flox/flox}$ Tiere (n=7-8). Mittels Cellcounter wurden Blutbilder von den Versuchstieren angefertigt. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Knockout- und Kontrollgruppe hinsichtlich des Hämoglobingehalts und der Leukozyten- und Thrombozytenzahl. Die Graphen zeigen einzelne Individuen sowie den Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.4.1.3 CD41 Färbungen des Knochenmarks

Zur Quantifizierung der Megakaryozytenzahl im Knochenmark der Mx1-Cre/ RXR $\beta^{flox/flox}$ Tiere wurden CD41-Färbungen von Knochenschnitten wie beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde die Anzahl der Megakaryozyten pro Sichtfeld ausgezählt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe.

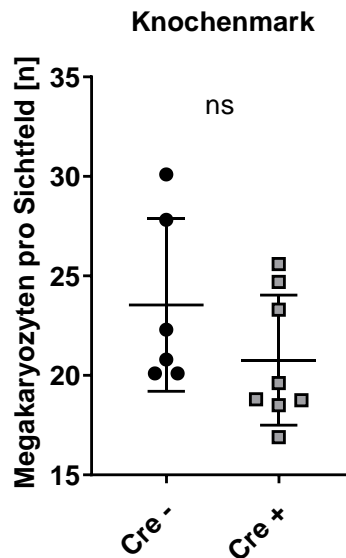


Abbildung 16: Megakaryozytenzahlen im Knochenmark. Aus Humeri der Versuchstiere wurden bei -20°C 8 µm feine Schnitte angefertigt und nach dem Megakaryozytenmarker CD41 gefärbt. Es wurden CD41 positive Zellen im Knochenmark der Mx1-Cre/ RXRβ^{flox/flox} Mäuse ausgezählt (n=5-7), es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen. Die Graphen zeigen einzelne Individuen sowie den Mittelwert ± Standardabweichung.

4.4.1.4 Quantifizierung hämatopoetischer Vorläuferkolonien *in vitro*

Zur Untersuchung der hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark der Mx1-Cre/ RXRβ^{flox/flox} Tiere wurden MegaCult und MethoCult Kulturen angelegt.

4.4.1.4.1 MegaCult

Zur Untersuchung der Megakaryozytenvorläufer im Knochenmark der Knockout- und Kontrolltiere wurden MegaCult Kulturen angelegt. Knochenmark wurde wie beschrieben isoliert und präpariert für das MegaCult Assay. Megakaryozytenkulturen wurden nach 8 Tagen ausgezählt. Es ergab sich kein Unterschied in der Ausbildung von Megakaryozytenkolonien zwischen Knockout und Kontrolltieren (Abbildung 17 A).

4.4.1.4.2 MethoCult

MethoCult Kulturen wurden zur Untersuchung der hämatopoetischen Vorläuferzellen der myeloischen Reihe angelegt. Im MethoCult Assay konnten weder bei den multipotenten CFU, wie den CFU-GEMM, aus denen sich Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten differenzieren, noch in den CFU-GM, aus denen Granulozyten und Monozyten entstehen,

Unterschiede zwischen Knockout- und Kontrollzellen gezeigt werden. Unipotente Vorläuferkolonien wie CFU-Monozyten, CFU-Granulozyten und BFU-Erythrozyten zeigten auch keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abbildung 17). Es zeigte sich kein Unterschied in der Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zwischen der Kontrollgruppe und der Knockoutgruppe.

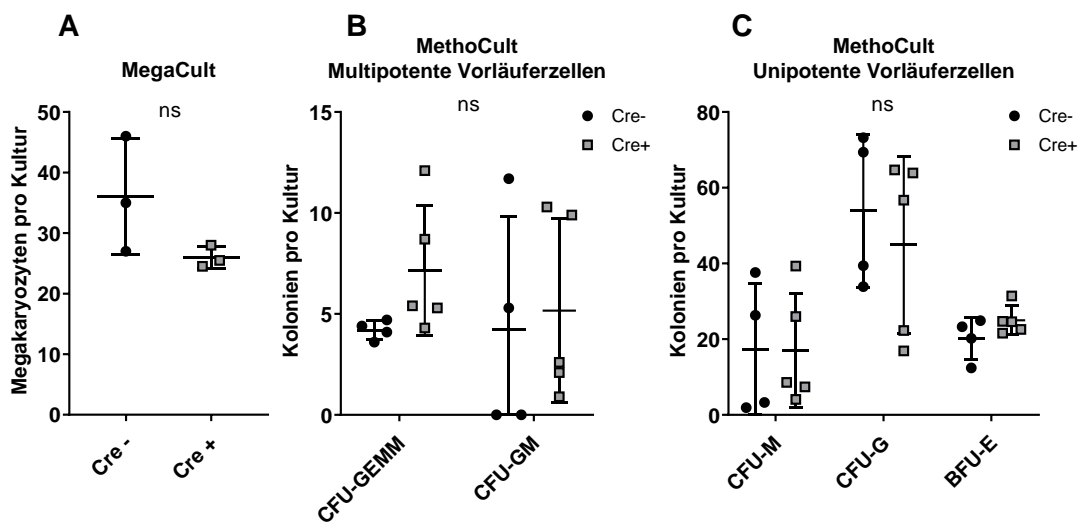


Abbildung 17 : CFU-Assays von hämatopoetischen Vorläuferzellen der Mx1-Cre/RXR β ^{flox/flox} Mäuse. Aus Humeri und Femora der Versuchstiere wurde Knochenmark isoliert, aufgereinigt und anschließend in MegaCult oder MethoCult Medien (STEMCELL Technologies, GF M3434, #04971) kultiviert, fixiert und anschließend ausgezählt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Die Graphen zeigen einzelne Kulturen und den Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.4.2 Pf4-Cre/ RXR β ^{flox/flox}

Es wurde eine weitere Mauslinie, die Pf4-Cre/ RXR β ^{flox/flox} Linie, zur Untersuchung eines RXR β -Knockouts in Thrombozyten gezüchtet. Während in der Mauslinie Mx1-Cre/ RXR β ^{flox/flox} ein konditioneller Knockout vorliegt, der erst durch Behandlung mittels poly I:C Therapie induziert wird, liegt in der Pf4-Cre/ RXR β ^{flox/flox} Linie ein konstitutiver Knockout vor. Dabei wird die Cre-Rekombinase in allen Zellen gebildet, in denen der PF4-Promoter aktiv ist. Dieser findet sich in Megakaryozyten und Thrombozyten und ermöglicht einen bereits kongenital bestehenden thrombozyten- und megakaryozytenspezifischen Knockout des RXR β -Proteins.

4.4.2.1 Charakterisierung der Pf4-Cre/ RXR $\beta^{\text{flox/flox}}$ Mäuse

4.4.2.1.1 Westernblot

Zur Überprüfung der Effektivität des Knockouts wurden Westernblots der lysierten Thrombozyten der Pf4-Cre/ RXR $\beta^{\text{flox/flox}}$ Mäuse angefertigt. Es konnte ein effektiverer RXR β -Knockout generiert werden als durch den konditionellen Mx1-Cre/ RXR $\beta^{\text{flox/flox}}$ Knockout. Allerdings zeigten einige der durch Genotypisierung bestimmten Knockout-Tiere das RXR β Protein in geringen Mengen im Westernblot, was für eine nicht vollständige Deletionseffizienz spricht.

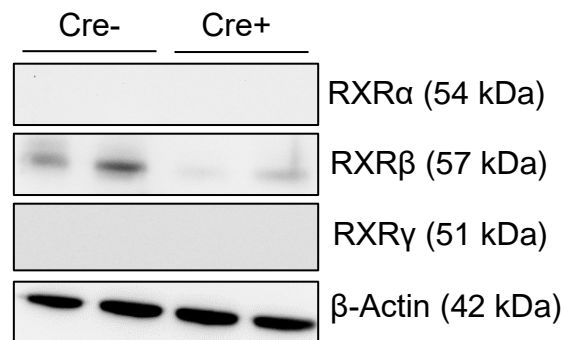


Abbildung 18 : Westernblot der RXR-Proteinexpression in Thrombozyten von Pf4-Cre/ RXR $\beta^{\text{flox/flox}}$ Tieren. Den Versuchstieren wurde Blut entnommen und aus diesem Thrombozyten isoliert. Diese wurden lysiert und mittels Westernblotting auf die Expression der RXR-Isoformen hin untersucht. Es zeigte sich ein RXR β -Knockout und keine kompensatorische Erhöhung der Proteinlevel an RXR α und RXR γ .

4.4.2.1.2 RXR β Färbung in Thrombozyten

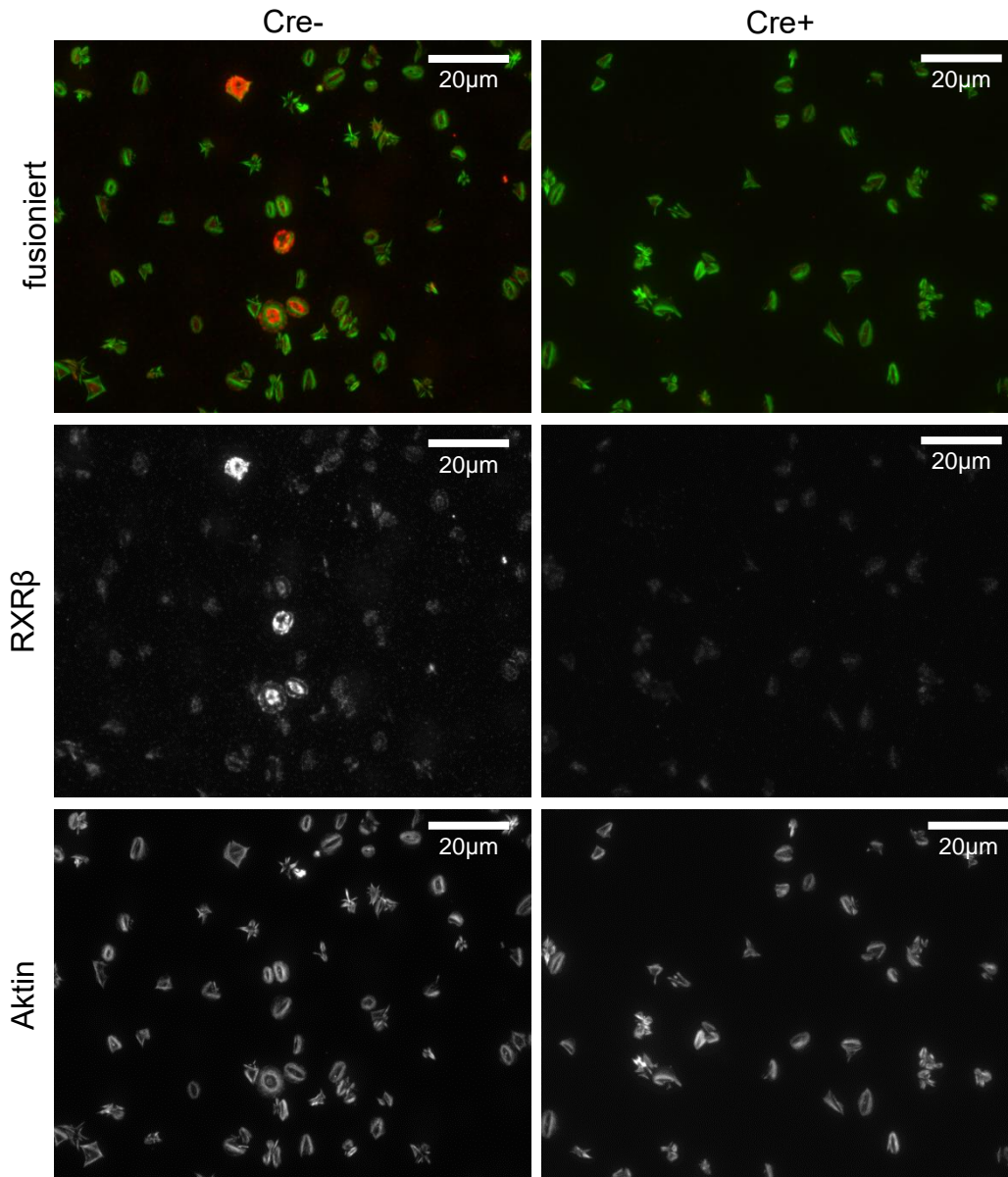


Abbildung 19: Repräsentative Aufnahmen von Thrombozyten der Pf4-Cre^{+/-} RXR β ^{flox/flox} und Pf4-Cre^{-/-} RXR β ^{flox/flox} Tiere. Diese wurden mit Thrombin (0,01 U/ml) aktiviert, auf Fibrinogen (100 µg/ml) ausgesät, nach 30 min fixiert und nach F-Aktin (grün) und RXR β (rot) gefärbt. In den Knockout-Thrombozyten zeigte sich keine Expression von RXR β . Zum Nachweis von RXR β wurden Thrombozyten wie beschrieben mit 0,01 U/ml Thrombin aktiviert, gespreadet und nach RXR β angefärbt. Es zeigte sich wie bereits im Westernblot, dass die Pf4-Cre^{+/-} RXR β ^{flox/flox} Mäuse kein RXR β exprimieren.

4.4.2.1.3 Blutbild

Um den Einfluss des Pf4-Cre/ RXR β ^{flox/flox} Knock-outs auf das Blutbild zu untersuchen, erfolgten Blutanalyse mittels Cellcounter. Hämoglobingehalt und

Leukozyten- und Thrombozytenzahlen im Blut der Pf4-Cre/ RXR β ^{flox/flox} Knockout-Tiere zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren.

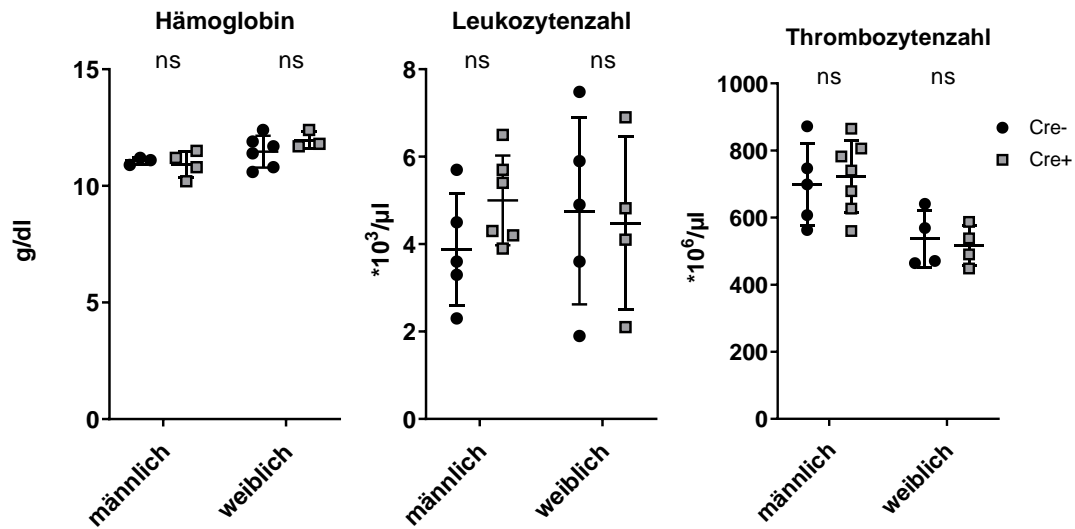


Abbildung 20 : Hämoglobingehalt, Leukozyten- und Thrombozytenzahlen von Pf4-Cre/ RXR β ^{flox/flox} Tieren (n=10). Mittels Cellcounter wurden Blutbilder von den Versuchstieren angefertigt. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Knockout- und Kontrollgruppe hinsichtlich des Hämoglobingehalts und der Leukozyten- und Thrombozytenzahl. Die Graphen zeigen einzelne Individuen sowie den Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.4.2.1.4 CD41 Färbungen von Knochenmark und Milzen

Zur Quantifizierung der Megakaryozytenzahl in Milz und Knochenmark der Pf4-Cre/ RXR β ^{flox/flox} Tiere wurden CD41-Färbungen von Knochenschnitten wie beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde die Anzahl der Megakaryozyten pro Sichtfeld ausgezählt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Knockout- und Kontrolltieren.

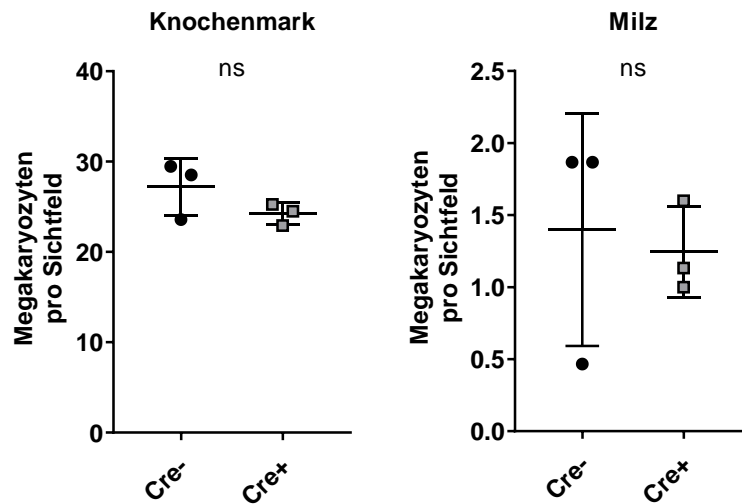


Abbildung 21 : Megakaryozytenzahlen in Knochenmark und Milz. Aus den Humeri und Milzen der Versuchstiere wurden bei -20°C $8\ \mu\text{m}$ dünne Gewebeschnitte angefertigt und mit dem Megakaryozytenmarker CD41 gefärbt. Es wurden CD41 positive Zellen im Knochenmark der Pf4-Cre/ RXR β flox/flox Mäuse ausgezählt (n=6), es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen. Die Graphen zeigen einzelne Individuen sowie den Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.4.2.2 Thrombozytenfunktionsassays mit RXR β -Knockout

Thrombozyten *in vitro*

Es wurden unterschiedliche Thrombozytenfunktionsassays mit den Knockoutthrombozyten durchgeführt, um den Einfluss des Knockouts auf die Thrombozytenfunktion zu untersuchen.

4.4.2.2.1 Aggregometrie

Mittels Licht-Transmissions-Aggregometrie wurde die Auswirkung des RXR β -Knockouts auf die Thrombozytenaktivierung untersucht.

Mit isolierten Thrombozyten der Knockout- und Kontrolltiere wurden Aggregationsversuche durchgeführt. Für die Stimuli $0,1\ \text{U/ml}$ Thrombin, $10\ \mu\text{g/ml}$ Collagen und $1\ \mu\text{M}$ U46619 zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

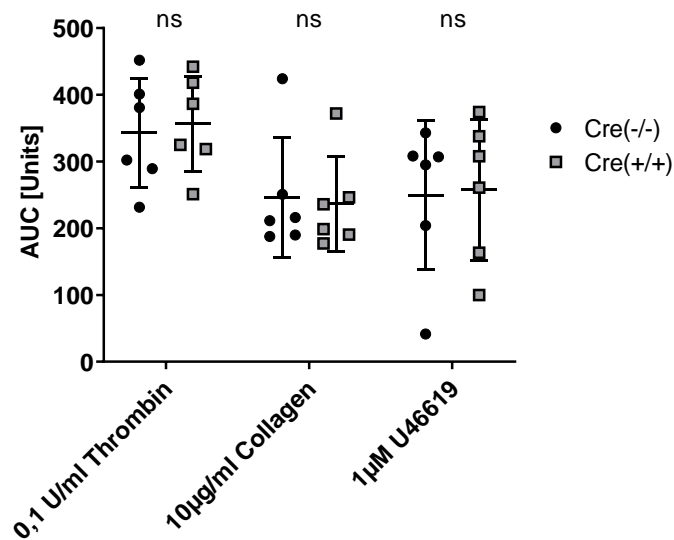


Abbildung 22 : Licht-Transmissions-Aggregometrie mit Thrombozyten der Pf4-Cre/RXR $\beta^{flox/flox}$ Linie. Es wurden Thrombozyten aus Vollblut isoliert und im Aggregometer mit 0,1 U/ml Thrombin, 10 μ g/ml Collagen oder 1 μ M U46619 stimuliert. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Knockout- und Kontrollgruppe. Die Graphen zeigen einzelne Individuen sowie den Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.4.2.2.2 Spreading

Der Einfluss der RXR-Liganden wurde auf das Spreadingverhalten von Knockout- und Kontrollthrombozyten nach Aktivierung mit Thrombin, Collagen und U46619 untersucht. Darüber hinaus wurde analysiert, ob die RXR-Liganden in den Knockout-Tieren einen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion haben. In den Pf4-Cre^{-/-}/RXR β ^{flox/flox} Kontrolltieren zeigten sich ähnliche Auswirkungen wie in den C57B/6 Mäusen (Abbildung 23), es kam zu einer Reduktion des Spreadingverhaltens durch eine Vorbehandlung mit 40 μ M 9cRS und 40 μ M MA bei Stimulation mit 10 μ g/ml Collagen oder 1 μ M U46619. Die Vorbehandlung mit 40 μ M 9cRS und 40 μ M MA reduzierte das Spreadingverhalten auf die Stimulation mit 10 μ g/ml Collagen und 1 μ M U46619. Auch die Pf4-Cre^{+/-}/RXR β ^{flox/flox} Mäuse zeigten eine ähnliche Inhibition der Thrombozytenaktivierung durch die RXR-Liganden (Abbildung 24). Im Vergleich von Knockout- und Kontrolltieren zeigte sich ein signifikanter, wenn auch nur marginaler, Größenunterschied in der Spreadingfläche von unstimulierten Thrombozyten zwischen Knockout- und Kontrolltieren. Außerdem führte die Stimulation mit 1 μ M U46619 in den Knockoutthrombozyten zu einem signifikant stärkeren Spreadingverhalten als in den Kontrollthrombozyten (Abbildung 25).

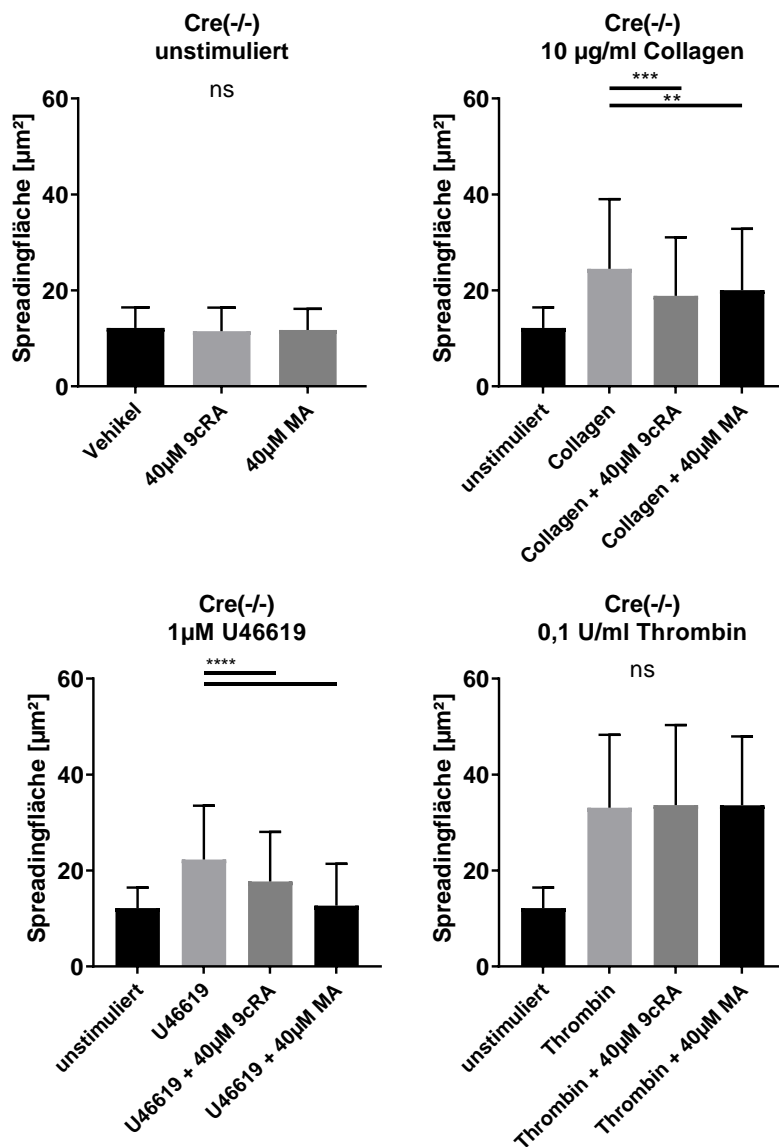


Abbildung 23 : Spreading der Pf4-Cre^{-/-}/ RXR β ^{fl^{ox}/fl^{ox}} Kontrolltiere (n=6) nach Stimulation mit Collagen (10µg/ml), U46619 (1µM) und Thrombin (0,1U/ml). Isolierte Thrombozyten mit der Konzentration von 10 000 Zellen/ µl wurden mit den RXR-Liganden 9cRA (20µM) oder MA (40µM) vorbehandelt und mit Collagen (10µg/ml), Thrombin (0,1U/ml) oder U46619 (1 µM) aktiviert. Die Thrombozyten wurden anschließend auf Fibrinogen (100µ/ml) ausgesät, nach 30 min Inkubation bei 37,0°C fixiert und nach F-Aktin gefärbt. Die Fläche der Thrombozyten wurde mittels ImageJ quantifiziert. Durch Vorbehandlung mit dem Vehikel, 9cRA (20 µM) und MA (40 µM) kam es zu keiner Aktivierung der unstimulierten Thrombozyten. Die Vorbehandlung mit beiden RXR-Liganden konnte das Spreadingverhalten der Kontrollgruppe auf die Aktivierung mit Collagen und U46619 signifikant reduzieren, auf eine Aktivierung mit Thrombin zeigte sich kein Einfluss. Graphen zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung

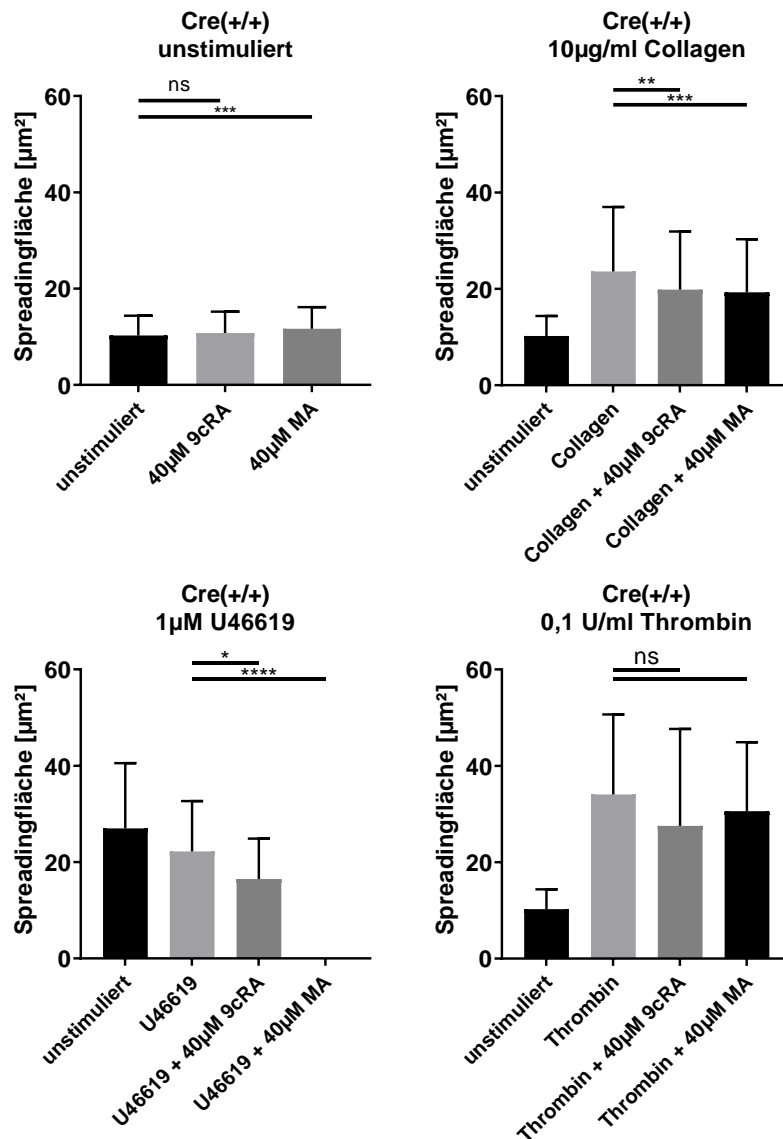


Abbildung 24 : Spreading der Pf4-Cre^{+/-} RXR β ^{flox/flox} Knockout-Tiere (n=6) unter Zusatz der Stimuli Collagen (10µg/ml), U46619 (1µM) und Thrombin (0,1U/ml). Die Zellen wurden wie oben beschrieben aufbereitet und hinsichtlich ihres Spreadingverhaltens untersucht. Die Vorbehandlung mit beiden RXR-Liganden konnte das Spreadingverhalten der Knockoutgruppe auf die Aktivierung mit Collagen und U46619 signifikant reduzieren, auf eine Aktivierung mit Thrombin zeigte sich kein Einfluss. Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

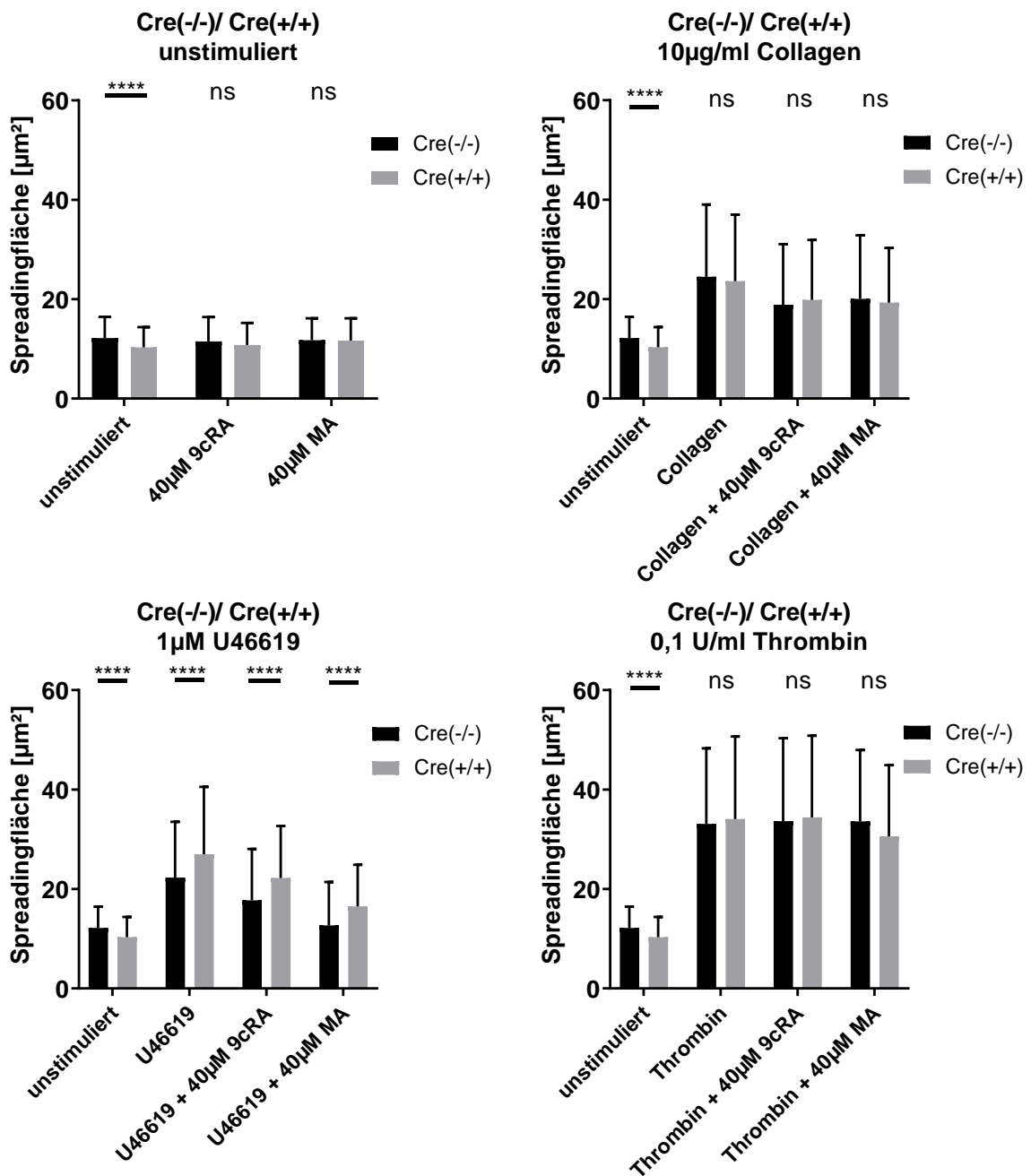


Abbildung 25 : Zusammenfassende Darstellung und Vergleich des Spreadingverhaltens von Knockout- und Kontrolltiere (n=6). Die Zellen wurden wie oben beschrieben aufbereitet und hinsichtlich ihres Spreadingverhaltens untersucht, das Spreadingverhalten der Knockoutgruppe wurde dem der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Spreadingfläche in den unstimulierten Thrombozyten ohne RXR-Vorbehandlung zwischen Knockout- und Kontrolltieren. Ebenso zeigte sich nach Aktivierung der Thrombozyten mit dem Thromboxan A2 Mimetikum U46619 mit und ohne Vorbehandlung mit RXR-Liganden ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.4.2.2.3 FACS

Zur weiteren Untersuchung der Auswirkungen eines RXR β -Knockouts auf die Thrombozytenfunktion wurden mittels FACS-Analyse die Expression von Thrombozytenaktivierungsmarkern untersucht.

An den Thrombozyten der Pf4-Cre/ RXR $\beta^{\text{flox/flox}}$ Tiere wurden wie zuvor beschrieben FACS-Versuche durchgeführt. Hierbei wurden die Kontroll- und die Knockout-Tiere mit RXR-Liganden vorbehandelt und anschließend mit Collagen und Thrombin stimuliert. Der Einfluss der RXR-Liganden auf die Funktion der Cre- und Cre+ Tiere wurde untersucht und die Expression der Aktivierungsmarker Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ und P-Selektin zwischen den beiden Gruppen verglichen.

In der Kontrollgruppe der Cre- Tiere zeigte sich kein statistisch signifikanter Effekt der RXR-Liganden auf die Thrombozytenfunktion (siehe Abbildung 26). Weder die Expression von Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ noch die von P-Selektin ließ sich durch die Vorbehandlung mit RXR-Liganden signifikant beeinflussen.

Die Knockoutgruppe wurde ebenfalls dahingehend untersucht, ob RXR-Liganden einen Einfluss auf die Expression der beiden Aktivierungsmarker nehmen. Es zeigte sich auch in der Knockoutgruppe kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe durch eine Vorbehandlung mit RXR-Liganden (siehe Abbildung 27).

Anschließend wurde die Expression der Aktivierungsmarker zwischen Kontroll- und Knockout-Tieren verglichen. Auch hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 28).

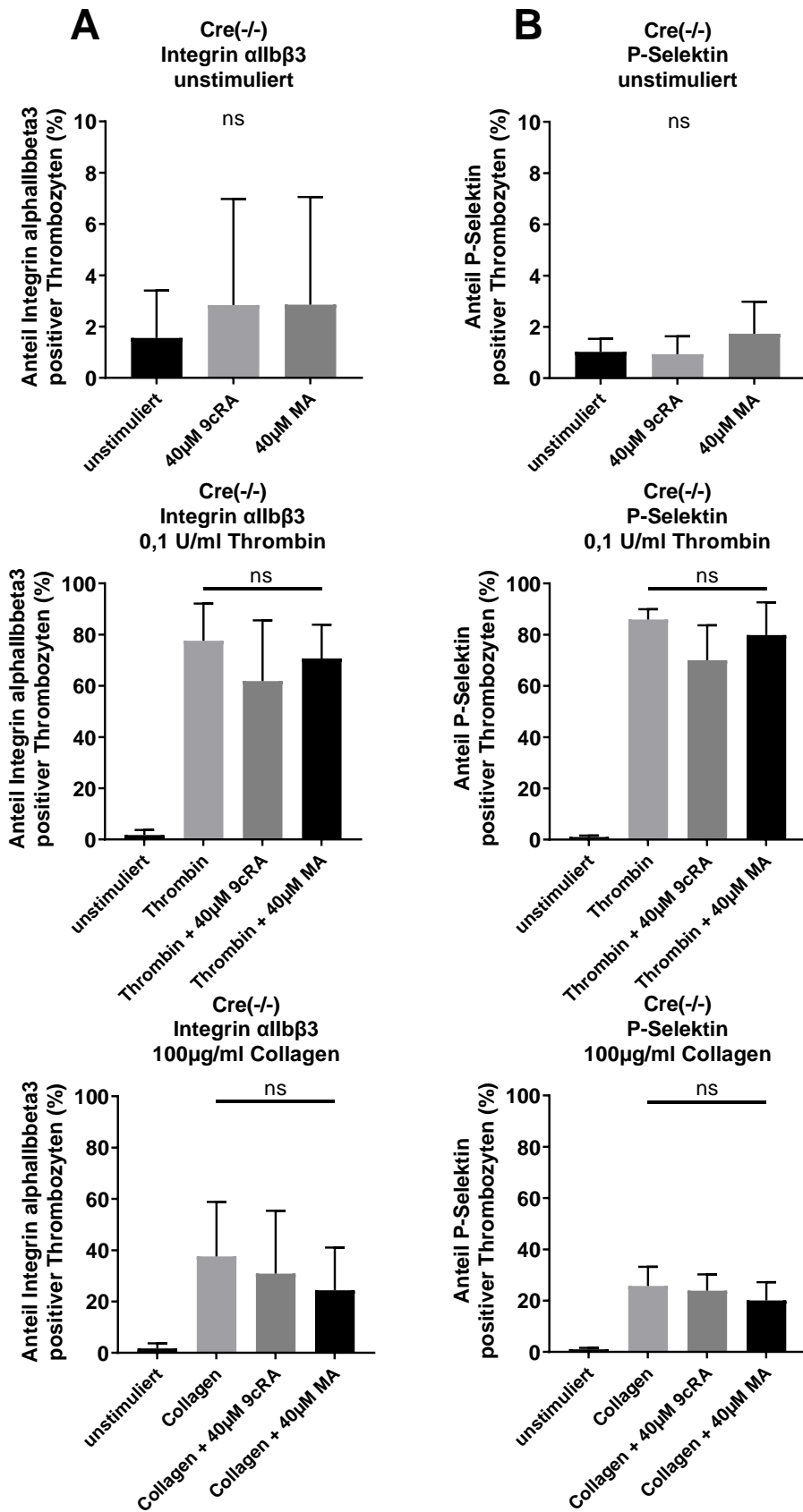


Abbildung 26: Thrombozyten von Pf4-Cre^{-/-}/ RXR $\beta^{\text{flox/flox}}$ Mäusen (n=7) wurden isoliert und mit dem Vehikel oder den RXR-Liganden 9cRA (20 μM) und MA (40 μM) für 3 min

inkubiert und anschließend mit Collagen (100 µg/ml) oder Thrombin (0,1 U/ml) aktiviert. Es wurde untersucht, inwieweit die Vorbehandlung der RXR-Liganden die Expression von Integrin $\alpha 2\beta 3$ (A) und P-Selektin (B) beeinflusst. Die Graphen stellen den Anteil der CD42 positiven Zellen dar, die das Integrin $\alpha 2\beta 3$ (A) oder den P-Selektin (B) exprimieren. Es zeigte sich keine Aktivierung der Thrombozyten durch die RXR-Liganden. Die Vorbehandlung mit RXR-Liganden hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Expression von Integrins $\alpha 1\text{Ib}\beta 3$ nach Stimulation mit Thrombin und Collagen und auf die Expression von P-Selektin nach Stimulation mit Thrombin in der Kontrollgruppe. Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

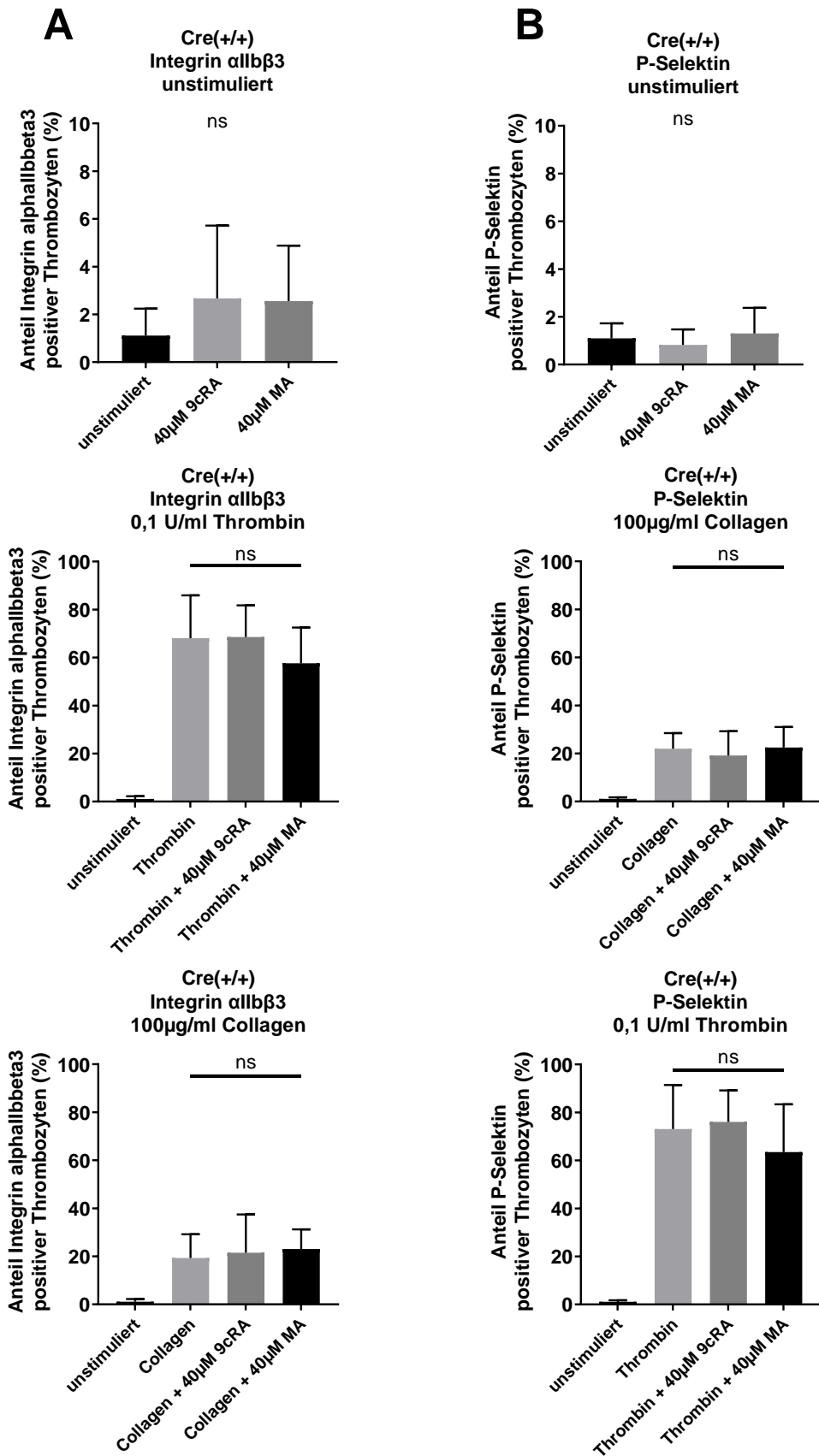


Abbildung 27: Thrombozyten von Pf4-Cre^{+/-}/RXR β ^{flox/flox} Mäusen (n=7) wurden mit RXR-Liganden 3 min inkubiert und daraufhin mit 100 μ g/ml Collagen oder 0,1 U/ml Thrombin

aktiviert. Es wurde untersucht, inwieweit die Vorbehandlung der RXR-Liganden die Expression von Integrin $\alpha 2\beta 3$ (A) und GPVI (B) in den Knockoutthrombozyten beeinflusst. Die Graphen stellen den Anteil der Thrombozyten dar, die das Integrin $\alpha 2\beta 3$ (A) oder den GPVI (B) exprimieren. Die Vorbehandlung mit RXR-Liganden hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Expression von Integrins $\alpha 1\beta 3$ nach Stimulation mit Thrombin und Collagen und auf die Expression von P-Selektin nach Stimulation mit Thrombin in der Knockoutgruppe. Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung.

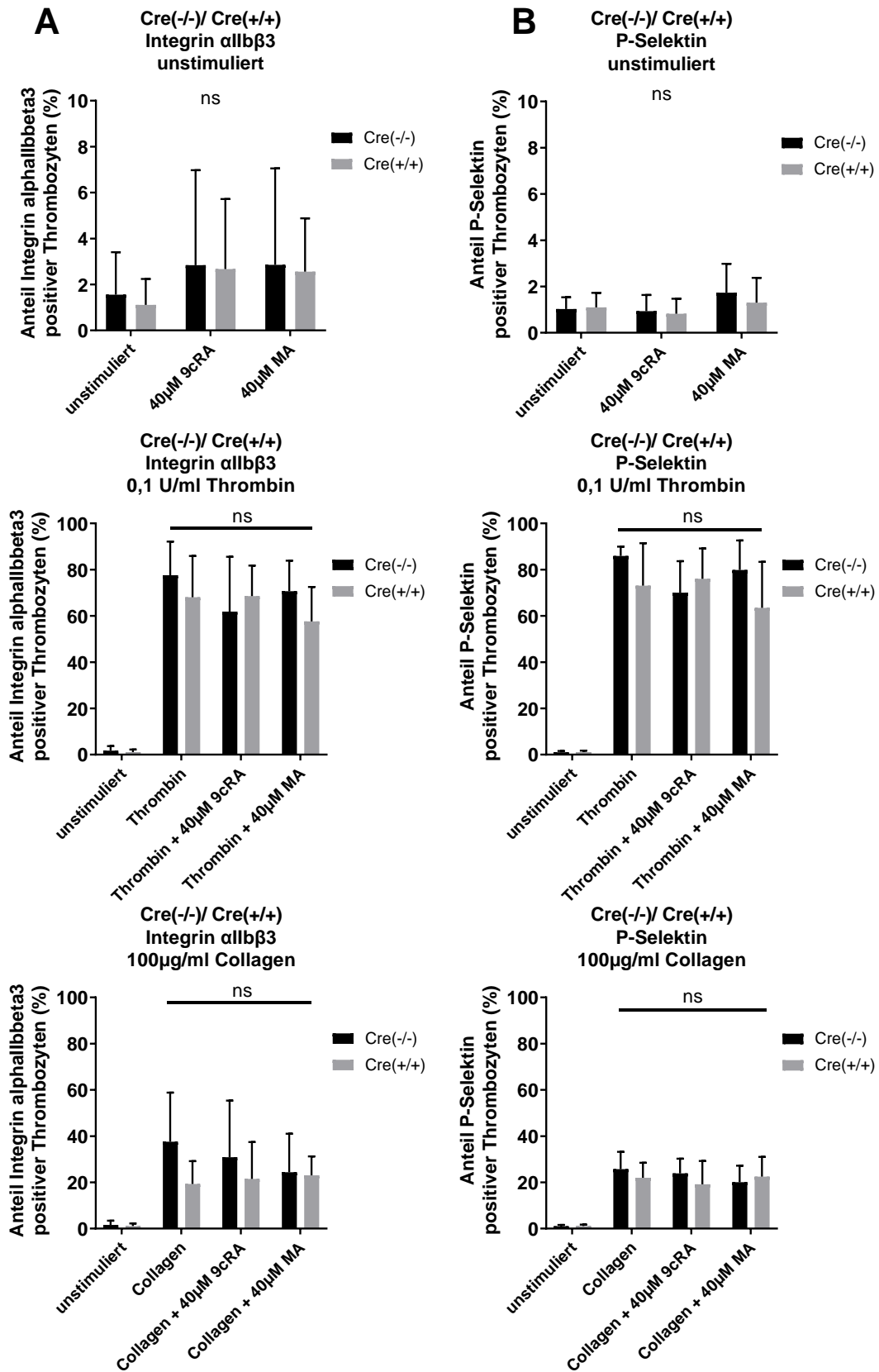
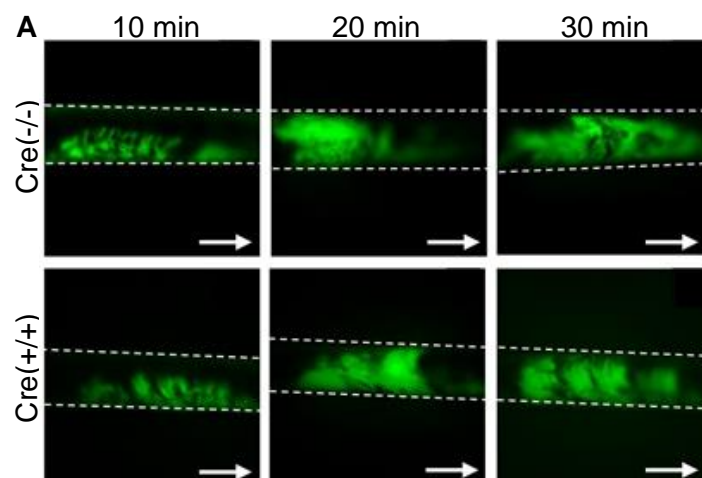


Abbildung 28: Zusammenfassende Darstellung und Vergleich der Ergebnisse von Knockout- und Kontrolltieren. Es wurde untersucht, ob es in der Expression der Thrombozytenaktivierungsmarker Integrin alphaIIb beta3 und P-Selektin Unterschiede zwischen

der Kontrollgruppe der Pf4-Cre^{-/-}/ RXRβ^{fllox/fllox} Tiere und der Knockoutgruppe der Pf4-Cre^{+/-}/ RXRβ^{fllox/fllox} Tiere gibt (n=7). Thrombozyten von Knockout- und Kontrollmäusen (n=7) wurden mit RXR-Liganden 3 min inkubiert und daraufhin mit 100 µg/ml Collagen oder 0,1 U/ml Thrombin aktiviert. Es wurde untersucht, inwieweit die Vorbehandlung der RXR-Liganden die Expression von Integrin α2bβ3 (A) und GPVI (B) beeinflusst. Die Graphen stellen den Anteil der Thrombozyten dar, die das Integrin α2bβ3 (A) oder den GPVI (B) exprimieren. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen hinsichtlich der Expression der beiden untersuchten Thrombozytenaktivierungsmarkern. Graphen zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung.

4.4.2.3 Arterielle Thrombose *in vivo*

Um die Auswirkungen von RXRβ auf die arterielle Thrombose *in vivo* eruieren wurde diese im Eisen-III-Chlorid Modell untersucht. Die Durchführung erfolgte mit der Unterstützung von Dr. Joachim Pircher und Dr. Andreas Ehrlich. Mittels topischer Applikation von Eisen-III-Chlorid wurde in den Pf4-Cre^(+/-)/ RXRβ^{fllox/fllox} und den Pf4-Cre^(-/-)/ RXRβ^{fllox/fllox} eine arterielle Thrombose in der Arteria carotis communis induziert. Mittels intravitraler Fluoreszenzmikroskopie wurde untersucht, ob sich ein Unterschied zwischen den Knockouttieren und den Kontrolltieren hinsichtlich der Bildung eines arteriellen Thrombus zeigt. Sowohl in der Zeit bis zur Okklusion des geschädigten Gefäßes, als auch in der Dauer und der Anzahl auftretender Okklusionen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen gezeigt werden. Auch nach 15-minütiger Vorbehandlung mit 9cRA zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen.



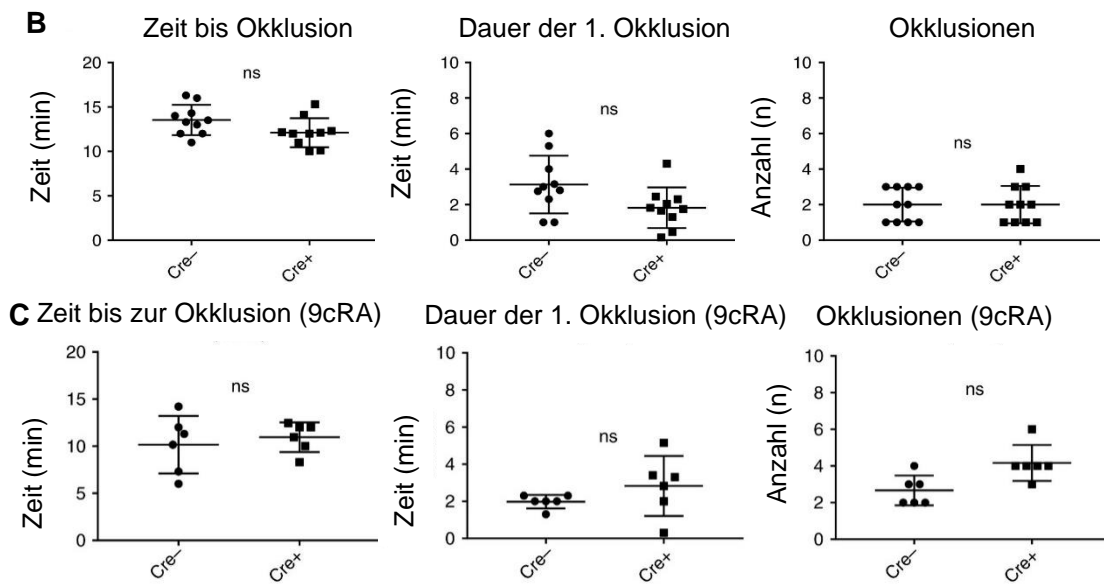


Abbildung 29: Induktion einer arteriellen Thrombose im Eisen-III-Chlorid Modell *in vivo*. (A) Thrombozyten wurden *in vivo* mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern gelabelt, die Bildung des Thrombus wurde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. (B) Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Pf4-Cre^(+/-)/RXRβ^{flox/flox} und Pf4-Cre^(-/-)/RXRβ^{flox/flox} Tieren (n=10) hinsichtlich der Zeit bis zur ersten Okklusion, Dauer der ersten Okklusion und Anzahl der Okklusionen. (C) Die Kontroll- und Knockouttiere wurden für 15 min vor der Gefäßschädigung mit einer gewichtsadaptierten Dosis von 9cRA in einer geschätzten Plasmakonzentration von 20µmol/l vorthera- piert (n=7). Es zeigte sich zwischen den beiden Versuchsgruppen hinsichtlich der Zeit bis zur ersten Okklusion, Dauer der ersten Okklusion und Anzahl der Okklusionen kein signifikanter Unterschied. Die Graphen zeigen einzelne Individuen sowie den Mittelwert ± Standardabweichung. Mit freundlicher Genehmigung von Lüsebrink et al. (1).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Ziel der Arbeit war es die DNA-unabhängigen Funktionen des RXR in Thrombozyten herauszuarbeiten.

Es konnte gezeigt werden, dass murine Thrombozyten ausschließlich RXR β und murine Megakaryozyten RXR β und RXR γ exprimieren. Wie bereits für humane Thrombozyten gezeigt worden ist (27, 75), konnte auch für murine Blutplättchen demonstriert werden, dass RXR-Liganden einen inhibierenden Einfluss auf die Thrombozytenfunktion haben. Darüber hinaus konnte eine gesteigerte Proplättchenproduktion nach Behandlung von Megakaryozyten mit RXR-Liganden gezeigt werden.

Mit dem für die Untersuchung eines RXR β -Knockouts verwendete Mausmodell der Linie Mx1-CreRXR $\beta^{\text{flox/flox}}$ konnte kein suffizienter RXR β -Knockout in Thrombozyten erreicht werden. In der verwendeten Mauslinie konnte keine Beeinträchtigung der Thrombopoese oder der Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen im Knochenmark beobachtet werden.

Der Pf4-Cre/ RXR $\beta^{\text{flox/flox}}$ Mausstamm wurde stattdessen verwendet, da in dieser Mauslinie ein suffizienterer Knockout des RXR β Proteins generiert werden konnte. Der Mangel an RXR β in Megakaryozyten und Thrombozyten zeigte keinen Einfluss auf die Thrombozytenzahlen im Blut und die Megakaryozytenzahlen im Knochenmark. Blutplättchen ohne RXR β zeigten keine Beeinträchtigung ihrer Thrombozytenfunktion, nur im Spreadingversuch zeigte sich nach Stimulation mit dem Thromboxan A2 Mimetikums U46619 eine signifikant größere Spreadingfläche als in der Kontrollgruppe. Auch im *in vivo* Modell zur Untersuchung der arteriellen Thrombose zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Okklusion eines durch Eisen-III-Chloid geschädigten Gefäßes zwischen den beiden Versuchsgruppen. Die RXR-Liganden 9cRS und MA zeigten auch in Thrombozyten mit einem Knockout des RXR β -Proteins die gleiche Wirkung wie in den Kontrolltieren.

5.2 Diskussion der Methoden

5.2.1 Das Pf4-Cre/ RXR β ^{flox/flox} Knockoutmodell

Das Cre/flox-System mit PF4 als Promoter für die Cre-Rekombinase stellt ein etabliertes und gängiges Modell zur Deletion von Proteinen in Megakaryozyten und Thrombozyten dar (82). Allerdings ist der PF4-Promoter auch in weiteren hämatopoetischen Stammzellen aktiv, dadurch kommt es auch zu einem RXR Knockout in anderen blutbildenden Zellen. Die daraus resultierenden Interaktionen können das Knockoutmodell auf unvorhergesehene Weise beeinflussen. (87, 88)

5.2.2 Spezifität der verwendeten RXR-Liganden

In den Versuchen wurden 9-*cis* Retinsäure, Methoprensäure und Bexaroten als RXR-Liganden verwendet. Da Bexaroten dosisabhängig thrombozytenaktivierende und -inhibierende Wirkungen zeigte und es als Apoptoseinduktor in Thrombozyten und PPAR Antagonist beschrieben worden ist (49, 89), wurde davon Abstand genommen weitere Versuche mit Bexaroten durchzuführen.

9-*cis* Retinsäure ist einer der viel diskutierten natürlichen Liganden für den RXR. Allerdings weist er keine reine Spezifität für den RXR auf, sondern bindet ebenfalls an den RAR. Für die Aktivierung des RAR mit seinem Liganden all-*trans* Retinsäure wurde bereits ebenfalls eine thrombozyteninhibierende Funktion beschrieben (29). 9cRS und atRS sind Isomere, die sich leicht ineinander umwandeln. Obwohl wie oben beschrieben mit 9cRS nur unter Gelblicht gearbeitet wurde und Aliquote unter Stickstoffatmosphäre aufbewahrt worden sind, kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte durch atRS vermittelt worden sind, welches sich durch Isomerisierung aus 9cRA bildet. Auch besteht die Möglichkeit, dass die Effekte, die in dieser Arbeit auf eine vermeintliche Aktivierung des RXR zurückgeführt werden, letztlich durch eine 9cRS-vermittelte RAR-Aktivierung bedingt sind (29, 83, 90).

Methoprensäure wird in der Literatur als reiner RXR-Ligand beschrieben (31) und zeichnet sich durch eine bessere Stabilität als 9cRS aus. Daher sind die

Ergebnisse, die mit Methoprensäure generiert wurden, als spezifische Effekte zu interpretieren.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 RXR-Isoformen in Thrombozyten und Megakaryozyten

Humane Thrombozyten exprimieren RXR α und RXR β (27), murine Thrombozyten hingegen nur RXR β . Obwohl sich Maus und Mensch in vielen Bereichen ihrer Physiologie sehr ähneln, weisen sie doch Unterschiede in ihrer Proteinexpression auf.

Für die humane Meg-01 Megakaryozytenlinie wurde bereits bestätigt, dass der RXR enthalten ist (27). In den von uns durchgeführten RXR-Färbungen von fetalen Megakaryozyten *in vitro* wurde sowohl RXR β als auch RXR γ nachgewiesen. Dies ist bemerkenswert, da Thrombozyten nur RXR β exprimieren. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die verwendeten Megakaryozyten aus fetalen Leberzellen gewonnen worden sind. Daher ist es möglich, dass Megakaryozyten aus dem Knochenmark adulter Mäuse eine andere Proteinexpression aufweisen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass RXR β von den Megakaryozyten beispielsweise in Form von Granula in Thrombozyten transportiert wird und RXR γ im Megakaryozyten zurückbleibt. Geplante Studien sollen dahingehend Klarheit bringen.

5.3.2 Reduktion der Plättchenfunktion durch RXR-Liganden

Zahlreiche Studien haben in den letzten Jahren den DNA-unabhängigen Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Plättchenfunktion untersucht (23, 30). Der hemmende Einfluss von RXR-Liganden auf die Funktion von humanen Thrombozyten wurde eingehend beschrieben. Unsworth et al. beobachten eine RXR-Liganden vermittelte Reduktion der Thrombozytenaktivierung durch Thrombin, Collagen, Collagen-related Peptide, ADP und Thromboxan A2 (27, 75).

In den von uns durchgeführten Versuchen mit murinen Thrombozyten konnten diese Ergebnisse für das Mausmodell weitgehend bestätigt werden, RXR-Liganden führten in murinen Thrombozyten zu einer Reduktion der Thrombozytenantwort bei Aktivierung mit Collagen und dem Thromboxan A2 Mimetikum U46619.

Mittels Licht-Transmissions-Aggregometrie konnte gezeigt werden, dass 9-*cis* Retinsäure einen statistisch signifikant hemmenden Einfluss auf die Aktivierung mit U46619 hat und die Aktivierung durch Collagen tendenziell auch reduziert.

Durch FACS-Analysen wurde quantifiziert, wie die Expression der Thrombozytenaktivierungsmarker CD62P und Integrin α IIb β 3 auf der Thrombozytenoberfläche durch RXR-Liganden beeinträchtigt wird. CD62P, auch P-Selektin genannt, befindet sich im ruhenden Thrombozyten in intrazellulär gelegenen α -Granula. Bei Plättchenaktivierung werden diese Granula sekretiert und P-Selektin an der äußeren Thrombozytenmembran exprimiert. Die gemessene Reduktion von P-Selektin auf der Zellmembran durch eine Vorbehandlung mit RXR-Liganden zeigt, dass diese zu einer reduzierten Ausschüttung von α -Granula führen. Weitere Marker für die Thrombozytenaktivierung stellen Konformationsänderungen in den auf der Thrombozytenmembran lokalisierten Integrine dar. Die darin resultierenden Proteinkaskaden werden als Inside-Out Signalling bezeichnet. Insbesondere das Integrin α IIb β 3 hat dabei einen maßgeblichen Stellenwert. Bei Plättchenaktivierung vermittelten Strukturänderungen im Integrin α IIb β 3 eine feste Adhäsion an Gefäßläsionen. Es konnte gezeigt werden, dass RXR-Liganden die Aktivierung des Integrins α IIb β 3 und damit das Inside-Out Signalling von Thrombozyten reduzieren.

5.3.3 Der Einfluss des RXRs auf die Thrombopoese

Während der Einfluss von *all-trans* Retinsäure und dem Retinoic-Acid-Receptor auf die Hämatopoese schon eingehend untersucht worden sind (91), wurden bisher nur wenig Studien zum Einfluss des RXRs und seiner Liganden auf die Hämatopoese durchgeführt.

Um den Einfluss von RXR-Liganden auf die Thrombopoese zu untersuchen, behandelten wir aus fetalen Leberzellen kultivierte Megakaryozyten mit unterschiedlichen RXR-Liganden. Insbesondere für den RXR-selektiven, wärme- und lichtstabilen Liganden Methoprensäure konnte eine signifikant erhöhte Proplättchenproduktion gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass RXR-Liganden die Bildung von Thrombozyten steigern. Mikroskopisch konnte kein erhöhter Anteil von proplättchenproduzierenden Megakaryozyten an der Gesamtzahl von Megakaryozyten in den mit RXR-Liganden behandelten

Kulturen nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, dass die Mehrproduktion auf eine erhöhte Effektivität der Thrombopoese zurückzuführen ist und nicht auf eine vermehrte Induktion der Thrombopoese in Megakaryozyten.

Allerdings ist zu beachten, dass unter statischen Bedingungen *in vitro* nicht zwingend auf Effekte *in vivo* zu schließen sind. Darüber hinaus entstammen die verwendeten Megakaryozyten fetalen Lebern, die *in vitro* kultiviert wurden. Es ist nicht auszuschließen, dass diese eine andere Proteinexpression als reife Megakaryozyten aus dem Knochenmark adulter Mäuse aufweisen und deshalb auf Stimuli anders reagieren.

Megakaryozyten enthalten im Gegensatz zu Thrombozyten DNA, daher ist es auch möglich, dass die beobachteten Effekte auf eine Aktivierung des RXR als Transkriptionsfaktor zurückzuführen sind und nicht auf die kurzfristigen, DNA-unabhängigen Effekte, wie sie Thrombozyten beobachtet werden können. Allerdings stellt das Zeitfenster von 6 Stunden, in dem die Megakaryozyten mit den RXR-Liganden kultiviert worden sind, einen relativ kurzen Zeitraum dar, um die beobachteten Effekte auf eine RXR-induzierte Veränderung der Genexpression zurückzuführen. Daher gehen wir davon aus, dass die vermehrte Plättchenproduktion auf eine Beeinträchtigung des Zytoskeletts durch akute Proteininteraktionen entstanden ist, ähnlich wie das reduzierte Spreadingverhalten der Thrombozyten.

5.3.4 Keine Beeinträchtigung der Thrombozytenbildung durch RXR β -Knockout

Der RXR ist für andere Transkriptionsfaktoren ein obligater Bindepartner, auf den sie angewiesen sind um ihre Funktion ausführen zu können (31). Daraus resultierte unsere Hypothese, dass durch den Knockout von RXR β nicht nur dessen Funktionen in Megakaryozyten beeinträchtigt werden, sondern auch die Funktionen vieler anderer Transkriptionsfaktoren. Entgegen unserer Erwartungen konnten keine Veränderungen der Thrombozytenzahlen im Blut und der Megakaryozytenzahlen in Milz und Knochenmark beobachtet werden und keine Beeinträchtigung der Hämatopoese festgestellt werden.

Es konnte in den Knockout-Tieren auch keine andere RXR-Isoform detektiert werden, welche durch eine kompensatorische Bildung bei Mangel des RXR β -Proteins in Megakaryozyten zu erklären wäre.

Dennoch ist nicht auszuschließen, dass der Mangel von RXR β durch die biologischen Leistungen anderer Proteine kompensiert wird. Ein bereits kongenital bestehender Knockout, der zu keinen offensichtlichen Fehlfunktionen des Organismus in Fetal- und Embryonalperiode sowie postpartal führt setzt ein weitgehend intaktes biologisches System voraus. Dies kann durch die Entbehrlichkeit von RXR β erklärt werden, aber auch durch eine ausreichende Kompensation durch andere Proteine.

5.3.5 Keine Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion durch RXR β -Knockout

Um zu untersuchen, ob der RXR β -Knockout zu einer Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion führt, wurden unterschiedliche Thrombozytenfunktionsassays durchgeführt. Zur Untersuchung wurden die Stimuli Thrombin, U46619 und Collagen verwendet. Für diese drei Stimuli hatten Unsworth et al. gezeigt, dass sie durch RXR-Liganden beeinflusst werden. Wir konnten dies mit unseren Versuchen nur für Collagen und U46619 belegen. Weder in der Aggregometrie, noch im FACS oder dem Spreading konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten ohne RXR β eine andere Funktionalität aufweisen als Thrombozyten mit RXR β . Ebenso zeigte sich *in vivo* hinsichtlich der Bildung einer arteriellen Thrombose kein Unterschied zwischen der Kontroll- und der Knockoutgruppe.

5.3.6 Keine Beeinträchtigung der thrombozytenhemmenden Eigenschaften von RXR-Liganden bei RXR β -Knockout

In unserer Studie wurden darüber hinaus die RXR β -Knockoutthrombozyten mit RXR-Liganden behandelt. Entgegen unserer Erwartungen führten auch hier die RXR-Liganden zu einer Reduktion der Thrombozytenfunktion. Es ließen sich *in vitro* die gleichen thrombozytenhemmenden Effekte in Thrombozyten ohne RXR β generieren wie in Thrombozyten mit RXR β . Granulasekretion und Integrinaktivierung, sowie Outside-In Signalling konnten mit RXR-Liganden reduziert werden. Im *in vivo* Modell zur Bildung einer arteriellen Thrombose zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Okklusion des geschädigten Gefäßes.

Daher stellt sich die Frage, worauf diese Effekte zurück zu führen sind. Das verwendete Mausmodell bietet die Möglichkeit, spezifisch zu untersuchen, ob die verwendeten RXR-Liganden ihre Effekte über den RXR β vermitteln. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass ein anderer als bisher angenommener Mechanismus der Reduktion der Plättchenfunktion zugrunde liegt, welcher unabhängig von einer RXR-Aktivierung ist. Um diese Problemstellung abschließend zu klären bedarf es noch weiterer Untersuchungen.

5.3.7 DNA-unabhängige Funktionen des Retinoid-X-Rezeptors

Die in den letzten Jahren viel beschriebenen DNA-unabhängigen Funktionen von Kernrezeptoren sind bis heute noch nicht abschließend aufgeklärt. Thrombozyten stellen ein hervorragendes System dar, um DNA-unabhängige, schnelle Effekte von Kernrezeptoren zu untersuchen. Als Zellfragmente enthalten sie keinen Nukleus und keine nukleäre DNA. Darüber hinaus lässt sich die Beeinflussung ihrer Funktionalität mit etablierten Thrombozytenfunktionsassays untersuchen. (30)

Entdeckt wurden diese DNA-unabhängigen Effekte durch die Beeinflussung von kernlosen Zellen, wie Erythrozyten und Thrombozyten, durch Steroide. Schnelle Zellantworten auf Konjugate aus Kernrezeptorliganden, die nicht membrangängig waren, wiesen darauf hin, dass Kernrezeptoren nicht nur im Kern und Zytoplasma, sondern auch in der Membran zu finden sind. Für Steroide, Vitamin D und Schilddrüsenhormone konnten G-Protein gekoppelte Signalwege identifiziert werden (92). Allerdings konnte für viele andere Kernrezeptoren keine spezifischen, DNA-unabhängigen Signalwege nachgewiesen werden oder es wurden andere Rezeptoren identifiziert, die die vermeintlich DNA-unabhängigen Funktionen der Kernrezeptoren vermitteln (93).

Die durch unsere Versuche produzierten Ergebnisse zeigen, dass es trotz eines RXR β -Knockouts zu einer 9cRS- und MA- vermittelten Reduktion der Thrombozytenfunktion kommt.

Unter der Bedingung, dass ein suffizienter RXR β -Knockout stattgefunden hat und damit keine RXR-Isoform in den Thrombozyten mehr enthalten war, lässt sich ableiten, dass die inhibitorischen Effekte der RXR-Liganden auf Thrombozyten

durch andere Mechanismen als die DNA-unabhängigen Funktionen des RXR vermittelt werden.

5.4 Ausblick

Um zu klären, wodurch die durch die RXR-Liganden induzierte Reduktion der Thrombozytenfunktion generiert wird, müssen weitere Studien durchgeführt werden. Es bedarf der Identifikation des vermittelnden Rezeptors.

Retinoide werden bereits in der Therapie von Ekzemen, Akne und der promyelozytären Leukämie eingesetzt. Allerdings weisen sie viele Nebenwirkungen auf. Daher wären Retinoide zur Thrombozytenaggregationshemmung nur bedingt geeignet. Vorausgesetzt die thrombozytenhemmenden Funktionen werden durch eine andere Rezeptorklasse vermittelt, stellt diese möglicherweise einen vielversprechenden Ansatzpunkt für neuartige Therapiemöglichkeiten zur Thrombozytenaggregationshemmung dar.

Mit dem Pf4-Cre/ RXR β ^{flox/flox} Modell lässt sich darüber hinaus weiterführend untersuchen, ob andere Kernrezeptoren, die eine DNA-unabhängige Funktion besitzen und obligat für die Ausübung ihrer Funktion als Transkriptionsfaktor auf den RXR angewiesen sind, diesen auch zur Vermittlung ihrer nicht genomischen Effekte obligat benötigen.

Teilergebnisse wurden bereits im April 2019 im Journal of Thrombosis und Haemostasis unter dem Titel „Role of RXR β in platelet function and arterial thrombosis“ veröffentlicht (1).

6 Literatur

1. Lüsebrink E, Warm V, Pircher J, Ehrlich A, Zhang Z, Strecker J et al. Role of RXR β in platelet function and arterial thrombosis. *J Thromb Haemost* 2019; 17(9):1489–99. doi: 10.1111/jth.14531.
2. Koupenova M, Kehrel BE, Corkrey HA, Freedman JE. Thrombosis and platelets: an update. *Eur Heart J* 2017; 38(11):785–91. doi: 10.1093/eurheartj/ehw550.
3. Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost* 2011; 9 Suppl 1:92–104. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04361.x.
4. Nakeff A, Maat B. Separation of megakaryocytes from mouse bone marrow by velocity sedimentation. *Blood* 1974; 43(4):591–5.
5. Sauvage FJ de, Carver-Moore K, Luoh SM, Ryan A, Dowd M, Eaton DL et al. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med* 1996; 183(2):651–6. doi: 10.1084/jem.183.2.651.
6. Italiano JE, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999; 147(6):1299–312. doi: 10.1083/jcb.147.6.1299.
7. Machlus KR, Italiano JE, JR. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol* 2013; 201(6):785–96. doi: 10.1083/jcb.201304054.
8. Tomaiuolo M, Brass LF, Stalker TJ. Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. *Interv Cardiol Clin* 2017; 6(1):1–12. doi: 10.1016/j.iccl.2016.08.001.
9. Gale AJ. Continuing education course #2: Current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol* 2011; 39(1):273–80. doi: 10.1177/0192623310389474.
10. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998; 94(5):657–66.

11. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2008; 28(3):403–12. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.150474.
12. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: The platelet paradigm. *Blood* 1998; 91(8):2645–57.
13. Aslan JE, McCarty OJT. Rho GTPases in platelet function. *J Thromb Haemost* 2013; 11(1):35–46. doi: 10.1111/jth.12051.
14. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006; 99(12):1293–304. doi: 10.1161/01.RES.0000251742.71301.16.
15. Crittenden JR, Bergmeier W, Zhang Y, Piffath CL, Liang Y, Wagner DD et al. CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat Med* 2004; 10(9):982–6. doi: 10.1038/nm1098.
16. Ren Q, Ye S, Whiteheart SW. The platelet release reaction: Just when you thought platelet secretion was simple. *Curr Opin Hematol* 2008; 15(5):537–41. doi: 10.1097/MOH.0b013e328309ec74.
17. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2010; 30(12):2341–9. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.207522.
18. Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: The end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(4):288–300. doi: 10.1038/nrm2871.
19. Sandmann R, Köster S. Topographic Cues Reveal Two Distinct Spreading Mechanisms in Blood Platelets. *Sci Rep* 2016; 6:22357 EP -. doi: 10.1038/srep22357.
20. Sorrentino S, Studt J-D, Medalia O, Tanuj Sapra K. Roll, adhere, spread and contract: structural mechanics of platelet function. *Eur J Cell Biol* 2015; 94(3-4):129–38. doi: 10.1016/j.ejcb.2015.01.001.
21. Bye AP, Unsworth AJ, GIBBINS JM. Platelet signaling: A complex interplay between inhibitory and activatory networks. *J Thromb Haemost* 2016; 14(5):918–30. doi: 10.1111/jth.13302.

22. Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Matsui H, Mizuno T, Miyata S et al. Platelet shape changes and adhesion under high shear flow. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002; 22(2):329–34.
23. Bishop-Bailey D. The platelet as a model system for the acute actions of nuclear receptors. *Steroids* 2010; 75(8-9):570–5. doi: 10.1016/j.steroids.2009.09.005.
24. Moraes LA, Paul-Clark MJ, Rickman A, Flower RJ, Goulding NJ, Perretti M. Ligand-specific glucocorticoid receptor activation in human platelets. *Blood* 2005; 106(13):4167–75. doi: 10.1182/blood-2005-04-1723.
25. Bar J, Lahav J, Hod M, Ben-Rafael Z, Weinberger I, Brosens J. Regulation of platelet aggregation and adenosine triphosphate release in vitro by 17beta-estradiol and medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women. *Thromb Haemost* 2000; 84(4):695–700.
26. Spyridon M, Moraes LA, Jones CI, Sage T, Sasikumar P, Bucci G et al. LXR as a novel antithrombotic target. *Blood* 2011; 117(21):5751–61. doi: 10.1182/blood-2010-09-306142.
27. Moraes LA, Swales KE, Wray JA, Damazo A, Gibbins JM, Warner TD et al. Nongenomic signaling of the retinoid X receptor through binding and inhibiting Gq in human platelets. *Blood* 2007; 109(9):3741–4. doi: 10.1182/blood-2006-05-022566.
28. Ali FY, Armstrong PCJ, Dhanji A-RA, Tucker AT, Paul-Clark MJ, Mitchell JA et al. Antiplatelet actions of statins and fibrates are mediated by PPARs. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2009; 29(5):706–11. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.183160.
29. Rondina MT, Freitag M, Pluthero FG, Kahr WHA, Rowley JW, Kraiss LW et al. Non-genomic activities of retinoic acid receptor alpha control actin cytoskeletal events in human platelets. *J Thromb Haemost* 2016; 14(5):1082–94. doi: 10.1111/jth.13281.
30. Unsworth AJ, Flora GD, GIBBINS JM. Non-genomic effects of nuclear receptors: Insights from the anucleate platelet. *Cardiovasc Res* 2018. doi: 10.1093/cvr/cvy044.

31. Dawson MI, Xia Z. The retinoid X receptors and their ligands. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821(1):21–56. doi: 10.1016/j.bbaliip.2011.09.014.
32. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 1999; 97(2):161–3.
33. Ahuja HS, Szanto A, Nagy L, Davies PJA. The retinoid X receptor and its ligands: Versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003; 17(1):29–45.
34. Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* 2014; 157(1):255–66. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.012.
35. Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJA, Nagy L. Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* 2004; 11 Suppl 2:S126-43. doi: 10.1038/sj.cdd.4401533.
36. Uniprot Knowledgebase [Stand: 02.10.2016]. Verfügbar unter: www.uniprot.org.
37. Solomin L, Johansson CB, Zetterström RH, Bissonnette RP, Heyman RA, Olson L et al. Retinoid-X receptor signalling in the developing spinal cord. *Nature* 1998; 395(6700):398–402. doi: 10.1038/26515.
38. Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J Lipid Res* 2013; 54(7):1761–75. doi: 10.1194/jlr.R030833.
39. Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE et al. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 1992; 6(3):329–44. doi: 10.1101/gad.6.3.329.
40. Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM et al. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 1992; 68(2):397–406.
41. Kane MA. Analysis, occurrence, and function of 9-cis-retinoic acid. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821(1):10–20. doi: 10.1016/j.bbaliip.2011.09.012.
42. Kane MA, Folias AE, Pingitore A, Perri M, Obrochta KM, Krois CR et al. Identification of 9-cis-retinoic acid as a pancreas-specific autacoid that attenuates glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(50):21884–9. doi: 10.1073/pnas.1008859107.

43. Bubna AK. Alitretinoin in Dermatology-An Update. *Indian J Dermatol* 2015; 60(5):520. doi: 10.4103/0019-5154.164426.
44. Lemotte PK, Keidel S, Apfel CM. Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand. *Eur J Biochem* 1996; 236(1):328–33.
45. Lengqvist J, Mata De Urquiza A, Bergman A-C, Willson TM, Sjövall J, Perlmann T et al. Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3(7):692–703. doi: 10.1074/mcp.M400003-MCP200.
46. Niu H, Fujiwara H, Di Martino O, Hadwiger G, Frederick TE, Menéndez-Gutiérrez MP et al. Endogenous retinoid X receptor ligands in mouse hematopoietic cells. *Sci Signal* 2017; 10(503). doi: 10.1126/scisignal.aan1011.
47. Harmon MA, Boehm MF, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(13):6157–60.
48. Farol LT, Hymes KB. Bexarotene: A clinical review. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004; 4(2):180–8. doi: 10.1586/14737140.4.2.180.
49. Marciano DP, Kuruvilla DS, Pascal BD, Griffin PR. Identification of Bexarotene as a PPAR γ Antagonist with HDX. *PPAR Res* 2015; 2015:254560. doi: 10.1155/2015/254560.
50. Kolesar JM, Hoel R, Pomplun M, Havighurst T, Stublaski J, Wollmer B et al. A pilot, first-in-human, pharmacokinetic study of 9cUAB30 in healthy volunteers. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3(12):1565–70. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0149.
51. Kastner P, Grondona JM, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Decimo D et al. Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* 1994; 78(6):987–1003.
52. Sucov HM, Izpisúa-Belmonte JC, Gañan Y, Evans RM. Mouse embryos lacking RXR alpha are resistant to retinoic-acid-induced limb defects. *Development* 1995; 121(12):3997–4003.

53. Nugent P, Sucov HM, Pisano MM, Greene RM. The role of RXR-alpha in retinoic acid-induced cleft palate as assessed with the RXR-alpha knockout mouse. *Int J Dev Biol* 1999; 43(6):567–70.
54. Li M, Indra AK, Warot X, Brocard J, Messaddeq N, Kato S et al. Skin abnormalities generated by temporally controlled RXRalpha mutations in mouse epidermis. *Nature* 2000; 407(6804):633–6. doi: 10.1038/35036595.
55. Ricote M, Snyder CS, Leung H-Y, Chen J, Chien KR, Glass CK. Normal hematopoiesis after conditional targeting of RXRalpha in murine hematopoietic stem/progenitor cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2006; 80(4):850–61. doi: 10.1189/jlb.0206097.
56. Kastner P, Mark M, Leid M, Gansmuller A, Chin W, Grondona JM et al. Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev* 1996; 10(1):80–92.
57. Sunaga S, Maki K, Lagasse E, Blanco JC, Ozato K, Miyazaki J et al. Myeloid differentiation is impaired in transgenic mice with targeted expression of a dominant negative form of retinoid X receptor beta. *Br J Haematol* 1997; 96(1):19–30.
58. Menéndez-Gutiérrez MP, Rószter T, Fuentes L, Núñez V, Escolano A, Redondo JM et al. Retinoid X receptors orchestrate osteoclast differentiation and postnatal bone remodeling. *J Clin Invest* 2015; 125(2):809–23. doi: 10.1172/JCI77186.
59. Krezel W, Dupé V, Mark M, Dierich A, Kastner P, Chambon P. RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-RXR beta -/-/RXR gamma -/- mutant mice are viable. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(17):9010–4.
60. Casas F, Daury L, Grandemange S, Busson M, Seyer P, Hatier R et al. Endocrine regulation of mitochondrial activity: involvement of truncated RXRalpha and c-Erb Aalpha1 proteins. *FASEB J* 2003; 17(3):426–36. doi: 10.1096/fj.02-0732com.
61. Lin Y-W, Lien L-M, Yeh T-S, Wu H-M, Liu Y-L, Hsieh R-H. 9-cis retinoic acid induces retinoid X receptor localized to the mitochondria for mediation of

- mitochondrial transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377(2):351–4. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.09.122.
62. Psarra A-MG, Sekeris CE. Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783(1):1–11. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.10.021.
63. Silvagno F, Vivo E de, Attanasio A, Gallo V, Mazzucco G, Pescarmona G. Mitochondrial localization of vitamin D receptor in human platelets and differentiated megakaryocytes. *PLoS One* 2010; 5(1):e8670. doi: 10.1371/journal.pone.0008670.
64. Zharikov S, Shiva S. Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease. *Biochem Soc Trans* 2013; 41(1):118–23. doi: 10.1042/BST20120327.
65. Garcia-Souza LF, Oliveira MF. Mitochondria: biological roles in platelet physiology and pathology. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 50:156–60. doi: 10.1016/j.biocel.2014.02.015.
66. Lin X-F, Zhao B-X, Chen H-Z, Ye X-F, Yang C-Y, Zhou H-Y et al. RXRalpha acts as a carrier for TR3 nuclear export in a 9-cis retinoic acid-dependent manner in gastric cancer cells. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 23):5609–21. doi: 10.1242/jcs.01474.
67. Zhang X-k, Su Y, Chen L, Chen F, Liu J, Zhou H. Regulation of the nongenomic actions of retinoid X receptor-alpha by targeting the coregulator-binding sites. *Acta Pharmacol Sin* 2015; 36(1):102–12. doi: 10.1038/aps.2014.109.
68. Ali FY, Davidson SJ, Moraes LA, Traves SL, Paul-Clark M, Bishop-Bailey D et al. Role of nuclear receptor signaling in platelets: antithrombotic effects of PPARbeta. *FASEB J* 2006; 20(2):326–8. doi: 10.1096/fj.05-4395fje.
69. MORAES LA, SPYRIDON M, KAISER WJ, JONES CI, SAGE T, ATHERTON REL et al. Non-genomic effects of PPARgamma ligands: inhibition of GPVI-stimulated platelet activation. *J Thromb Haemost* 2010; 8(3):577–87. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03732.x.
70. Khetawat G, Faraday N, Nealen ML, Vijayan KV, Bolton E, Noga SJ et al. Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor beta and

- androgen receptor (AR): Testosterone regulates AR expression. *Blood* 2000; 95(7):2289–96.
71. Visani G, Ottaviani E, Zauli G, Tosi P, Pellacani A, Isidori A et al. All-trans retinoic acid at low concentration directly stimulates normal adult megakaryocytopoiesis in the presence of thrombopoietin or combined cytokines. *Eur J Haematol* 1999; 63(3):149–53.
72. Sakashita A, Kizaki M, Pakkala S, Schiller G, Tsuruoka N, Tomosaki R et al. 9-cis-retinoic acid: effects on normal and leukemic hematopoiesis in vitro. *Blood* 1993; 81(4):1009–16.
73. Rusten LS, Dybedal I, Blomhoff HK, Blomhoff R, Smeland EB, Jacobsen SE. The RAR-RXR as well as the RXR-RXR pathway is involved in signaling growth inhibition of human CD34+ erythroid progenitor cells. *Blood* 1996; 87(5):1728–36.
74. Mukherjee G, Chatterjee GC, Banerjee D, Bhattacharya DK. Differential effect of retinoic acid on ADP and collagen induced platelet aggregation. *Indian J Exp Biol* 1990; 28(10):949–52.
75. Unsworth AJ, Flora GD, Sasikumar P, Bye AP, Sage T, Kriek N et al. RXR Ligands Negatively Regulate Thrombosis and Hemostasis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2017. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309207.
76. Ray DM, Spinelli SL, Pollock SJ, Murant TI, O'Brien JJ, Blumberg N et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor transcription factors are released from activated human platelets and shed in microparticles. *Thromb Haemost* 2008; 99(1):86–95. doi: 10.1160/TH07-05-0328.
77. Liu Y, Chen H, Mu D, Di Li, Zhong Y, Jiang N et al. Association of Serum Retinoic Acid with Risk of Mortality in Patients with Coronary Artery Disease. *Circ Res* 2016. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308781.
78. Urquiza AM de, Liu S, Sjöberg M, Zetterström RH, Griffiths W, Sjövall J et al. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 2000; 290(5499):2140–4.

79. Perlman RL. Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. *Evol Med Public Health* 2016; 2016(1):170–6. doi: 10.1093/emph/eow014.
80. McLellan MA, Rosenthal NA, Pinto AR. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr Protoc Mouse Biol* 2017; 7(1):1–12. doi: 10.1002/cpmo.22.
81. Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science* 1995; 269(5229):1427–9. doi: 10.1126/science.7660125.
82. Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC. Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood* 2007; 109(4):1503–6. doi: 10.1182/blood-2006-04-020362.
83. Barua AB, Furr HC. Properties of retinoids. Structure, handling, and preparation. *Mol Biotechnol* 1998; 10(2):167–82. doi: 10.1007/BF02760863.
84. Asmis L, Tanner FC, Sudano I, Lüscher TF, Camici GG. DMSO inhibits human platelet activation through cyclooxygenase-1 inhibition. A novel agent for drug eluting stents? *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391(4):1629–33. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.102.
85. Chazotte B. Labeling cytoskeletal F-actin with rhodamine phalloidin or fluorescein phalloidin for imaging. *Cold Spring Harb Protoc* 2010; 2010(5):pdb.prot4947. doi: 10.1101/pdb.prot4947.
86. Pircher J, Czermak T, Ehrlich A, Eberle C, Gaitzsch E, Margraf A et al. Cathelicidins prime platelets to mediate arterial thrombosis and tissue inflammation. *Nat Commun* 2018; 9(1):1523. doi: 10.1038/s41467-018-03925-2.
87. Calaminus SDJ, Guitart AV, Guitart A, Sinclair A, Schachtner H, Watson SP et al. Lineage tracing of Pf4-Cre marks hematopoietic stem cells and their progeny. *PLoS One* 2012; 7(12):e51361. doi: 10.1371/journal.pone.0051361.
88. Pertuy F, Aguilar A, Strassel C, Eckly A, Freund J-N, Duluc I et al. Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond the megakaryocyte lineage. *J Thromb Haemost* 2015; 13(1):115–25. doi: 10.1111/jth.12784.

89. Cao H, Bissinger R, Umbach AT, Gawaz M, Lang F. Effect of Bexarotene on Platelet Activation and Apoptosis. *Cell Physiol Biochem* 2017; 42(2):838–47. doi: 10.1159/000478627.
90. Sharow KA, Temkin B, Asson-Batres MA. Retinoic acid stability in stem cell cultures. *Int J Dev Biol* 2012; 56(4):273–8. doi: 10.1387/ijdb.113378ks.
91. Purton LE. Roles of retinoids and retinoic Acid receptors in the regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *PPAR Res* 2007; 2007:87934. doi: 10.1155/2007/87934.
92. Kramer IM. Signal transduction. Third edition. Amsterdam, Boston, Heidelberg: AP Academic Press an imprint of Elsevier; 2016.
93. Ordóñez-Morán P, Muñoz A. Nuclear receptors: Genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle* 2009; 8(11):1675–80. doi: 10.4161/cc.8.11.8579.

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg und Herrn Prof. Dr. med. Christian Schulz möchte ich dafür danken, dass ich unter ihrer Aufsicht an diesem interessanten Thema arbeiten durfte.

Herrn Dr. med. Tobias Petzold danke ich für die ausgezeichnete Betreuung, die stetigen Ideen und Anregungen, die geholfen haben das Projekt weiterzuentwickeln und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der AG Massberg/Schulz, insbesondere meinen Mitdoktoranden Zhang Zhe und Christian Weber und den labortechnischen Assistenten Elisabeth Raatz und Cuong Tien Kieu für die umfangreiche Unterstützung.

Meiner Familie und meinem Freund möchte ich für ihre Ermutigungen danken.



Eidesstaatliche Versicherung

Warm, Verena Dorothee

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Der Einfluss des Retinoid-X-Rezeptors auf die Thrombozytenfunktion und die Thrombopoese

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Tübingen, 14.02.2023

Verena Dorothee Warm

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Publikationsliste

Lüsebrink E*, Warm V*, Pircher J, et al.

Role of RXR β in platelet function and arterial thrombosis

Journal of Thrombosis and Haemostasis 2019;17:1489–1499

<https://doi.org/10.1111/jth.14531>

* Geteilte Erstautorenschaft