

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie
der Kreislaufkrankheiten (IPEK)
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Christian Weber

Die Rolle des thrombozytären Chemokins CXCL12 in der arteriellen Thrombose und Atherosklerose

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



vorgelegt von

Julian Daniel Georg Leberzammer-Deuster

aus München

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Weber

Mitberichterstatter PD Dr. Tobias Petzold

Prof. Dr. Helmut P. Arbogast

Prof. Dr. Daniel Teupser

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Philipp von Hundelshausen

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Thrombozyten	1
1.1.1 Struktur und allgemeine Funktion	1
1.2 Die Schritte der Thrombusbildung	3
1.2.1 Adhäsion	3
1.2.2 Aktivierung, Formveränderung und Sekretion	4
1.2.3 Thrombozytenaggregation	6
1.2.4 Interaktion von Thrombozyten und Blutgerinnung in der Thrombusbildung	7
1.2.5 Aktuelle Erkenntnisse der Thrombusbildung	8
1.2.6 Entstehung der Atherosklerose/Atherothrombose mit Fokus auf die Rolle der Thrombozyten	9
1.3 Chemokine	11
1.3.1 Klassifizierung und Struktur	11
1.3.2 Chemokine aus Thrombozyten	12
1.3.3 CXCL12	12
1.3.4 CXCL12 und Thrombozyten	14
1.3.5 Chemokin-Chemokin Interaktion	15
1.4 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Tierursprung und Haltung:	23
2.2 Narkose und postoperative Analgesie:	24
2.3 FeCl₃-induzierte arterielle Thrombose in der A. carotis:	24
2.3.1 Herstellung der 10 %igen FeCl ₃ Lösung:	25
2.3.2 Operation	25
2.4 Neointimabildung/Plaquerbildung nach Gefäßverletzung	26
2.5 Histologie:	27
2.6 Ermittlung der Blutungszeit in der Maus	27

2.7	Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark der Maus	27
2.8	Durchflusszytometrische Bestimmung der murinen Thrombozytenaktivierung	27
2.9	CXCL12-ELISA	28
2.10	Multiparameter-Untersuchung der ex vivo Thrombusbildung von Mausblut	29
2.11	Blutentnahmen für in vitro und ex vivo Experimente mit humanem Blut	30
2.12	Herstellung von humanem atherosklerotischem Plauehomogenat	30
2.13	Messung der Thrombozytenaggregation mittels Impedanzaggregometrie	30
2.14	Analyse der Thrombusbildung von humanem Blut auf atherosklerotischem Plauematerial	31
2.14.1	Beschichtung der Deckgläschen mit atherosklerotischem Plauematerial:	31
2.14.2	Vorbereitung des Blutes:	32
2.14.3	Durchführung der Flussversuche	32
2.14.4	Aufnahme und Analyse der Flussversuche	32
2.15	Durchflusszytometrische Bestimmung der humanen Thrombozytenaktivierung	32
2.16	Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4 Internalisierung, CXCL12 Bindung/Expression und i[VREY]₄ Bindung	33
2.17	Western Blots	33
2.18	STED-Mikroskopie von isolierten humanen Thrombozyten	34
2.19	Herstellung der Chemokine	35
2.20	Herstellung des i[VREY]₄ Peptids	35
2.21	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	35
2.22	Kernspinresonanzspektroskopie	36
2.23	Statistische Analysen	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Wirkung der CXCL12-CXCR4 Achse auf die humane Thrombozytenaktivierung	37
3.1.1	Impedanzaggregometrie	37

3.1.2	Nachweis der CXCL12 Expression und Sekretion in ruhenden und aktivierten Thrombozyten.....	39
3.1.3	Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation unter arteriellen Flussbedingungen	40
3.2	In vivo Versuche in Versuchstieren mit CXCL12-defizienten Thrombozyten.....	41
3.2.1	Charakterisierung der Cxcl12 ^{Δplv/Δplv} Versuchstiere.....	41
3.2.2	FeCl ₃ induzierte Thrombose in der A. carotis	43
3.2.3	Neointimabildung nach arterieller Thrombose.....	44
3.2.4	Frühe Atherosklerose in der Aortenwurzel	45
3.2.5	Untersuchung der Blutungszeit	45
3.3	Untersuchung von CXCL12-defizienten Thrombozyten.....	45
3.3.1	Multiparameter-Untersuchung der ex vivo Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen	45
3.3.2	Durchflusszytometrische Untersuchung der murinen Thrombozytenaktivierung ..	48
3.4	Untersuchung der Signalwege, welche für eine CXCL12-abhängige Thrombozytenaggregation benötigt werden.....	49
3.5	Hemmung von CXCL12 durch i[VREY]₄, einem von CCL5 abgeleitetem Peptid 52	
3.5.1	Charakterisierung der CXCL12- i[VREY] ₄ Interaktion.....	53
3.5.2	Die Wirkung von CCL5 und i[VREY] ₄ auf die Thrombozytenaktivierung in vitro ...	55
3.5.3	Die Wirkung von i[VREY] ₄ auf die Plaque-induzierte Thrombusbildung unter arteriellem Fluss	58
3.5.4	Die Wirkung von i[VREY] ₄ in der arteriellen Thrombose in vivo	59
3.5.5	Untersuchung der Wirkung von i[VREY] ₄ auf die Thrombozytenaggregation mit und ohne CXCL12-Defizienz mittels Impedanzaggregometrie.....	60
3.5.6	Pharmakokinetik von i[VREY] ₄ und Effekte auf die Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten	61
3.5.7	Genauere Charakterisierung des i[VREY] ₄ Wirkmechanismus	62
3.5.8	Evaluation einer zusätzlichen Wirkung von i[VREY] ₄ auf konventionelle Thrombozytenaggregationshemmer.....	64
4	Diskussion	67
4.1	Wirkung der CXCL12-CXCR4 Achse auf die Thrombozytenaggregation	67
4.1.1	Impedanzaggregometrie.....	67
4.1.2	Darstellung der CXCL12 Expression und Sekretion in ruhenden und aktivierten Thrombozyten.....	69
4.1.3	Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation unter arteriellem Fluss	70

4.2	In vivo Versuche an Versuchstieren mit CXCL12-defizienten Thrombozyten	70
4.3	Untersuchung von CXCL12-defizienten Thrombozyten.....	73
4.4	Untersuchung der Signalwege, welche für eine CXCL12-abhängige Thrombozytenaggregation benötigt werden.....	74
4.5	Die Rolle der CXCL12 Rezeptoren CXCR4 und ACKR3 auf Thrombozyten 75	
4.6	Hemmung von CXCL12 durch i[VREY] ₄ , ein von CCL5 abgeleitetem Peptid und Charakterisierung der CXCL12- i[VREY] ₄ Interaktion.....	77
4.7	Die Wirkung von i[VREY] ₄ auf die Plaque-induzierte Thrombusbildung unter arteriellem Fluss	78
4.8	Die Wirkung von i[VREY] ₄ auf die arterielle Thrombose in vivo.....	78
4.9	Untersuchung der Wirkung von i[VREY] ₄ auf die Thrombozytenaggregation in Vollblut mit und ohne CXCL12-Defizienz mittels Impedanzaggregometrie	79
4.10	Pharmakokinetik von i[VREY] ₄ und Effekte auf die Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten.....	79
4.11	Genauere Charakterisierung des i[VREY] ₄ Wirkmechanismus	80
4.12	Evaluation einer zusätzlichen Wirkung von i[VREY] ₄ auf konventionelle Thrombozytenaggregationshemmer	80
4.13	Vergleich von i[VREY] ₄ mit anderen CXCL12 hemmenden Molekülen ..	81
5	Zusammenfassung	83
6	Summary	84
	Literaturverzeichnis	86
	Danksagung	95
	Affidavit	97
	Lebenslauf Fehler! Textmarke nicht definiert.	
	Publikationsliste Fehler! Textmarke nicht definiert.	

Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acid-Dextrose
ACKR3	Atypical chemokine receptor 3
ADP	Adenosindiphosphat
ApoE	Apolipoprotein E
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CRP	Collagen-Related Peptide
GP	Glykoprotein
GPCR	G-Protein Coupled Receptor
HSA	Humanes Serumalbumin
i.p.	intraperitoneal
IP3	Inositoltriphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MW±SD	Mittelwert ± Standartabweichung
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGI ₂	Prostazyklin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
STED	Stimulated emission depletion
TxA ₂	Thromboxan A2
VGEF	Vascular endothelial growth factor
vWF	von Willebrandfaktor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Die Schritte der Thrombusbildung (erstellt nach [3])	4
Abbildung 2. Die Signalkaskaden der Thrombozytenaktivierung (übersetzt mit freundlicher Genehmigung des Verlages und des Autors [27]).....	6
Abbildung 3. Aktuelles Modell der Thrombusbildung [36]	9
Abbildung 4. Die Rolle von Thrombozyten in der Entstehung der Atherosklerose [3].....	11
Abbildung 5. Die Entwicklung von Peptiden aus dem „Chemokin Interaktom“ (übersetzt mit freundlicher Genehmigung des Verlages und des Autors) [81]..	17
Abbildung 6. Darstellung der OP-Technik für das Thrombosemodell (eigenes Bildmaterial).....	26

Abbildung 7. CXCL12 verursacht eine Thrombozytenaggregation allein oder in Kombination mit Kollagen.....	37
Abbildung 8. Verminderung der Kollagen- und Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation durch den CXCR4-Antagonisten AMD3465	38
Abbildung 9. Nachweis von CXCL12 in ruhenden und aktivierten Thrombozyten	40
Abbildung 10. Verminderung der Thrombusbildung auf humanem atherosklerotischem Plaquematerial unter arteriellen Flussbedingungen durch den CXCR4-Antagonisten AMD3465	40
Abbildung 11. Verminderte CXCL12-Freisetzung von aktivierten PF4cre CXCL12 ^{flox/flox} Thrombozyten im Vergleich zu Kontrolltieren	42
Abbildung 12. Verminderte arterielle Thrombusbildung in vivo bei Versuchstieren mit CXCL12 defizienten Thrombozyten.....	43
Abbildung 13. Analyse der Plaquebildung und Blutungszeit bei Versuchstieren mit CXCL12 defizienten Thrombozyten.....	44
Abbildung 14. Verminderte Thrombusbildung CXCL12 defizienter Thrombozyten auf Kollagen.....	45
Abbildung 15. Repräsentative Abbildungen der Multiparameter-Untersuchung der Thrombusbildung auf Kollagen.....	46
Abbildung 16. Unveränderte Thrombusbildung CXCL-12 defizienter Thrombozyten auf VWF-BP, Laminin und Rhodocytin	47
Abbildung 17. Verminderte Thrombozytenaktivierung der CXCL-12 defizienter Thrombozyten.....	48
Abbildung 18. Die durch CXCL12 verursachte Thrombozytenaggregation ist abhängig von BTK.....	50
Abbildung 19. Die CXCL12-abhängige Thrombozytenaggregation kann durch Syk-, PI3-Kinase-, MAPK- und Calcium-Inhibitoren verhindert werden	51
Abbildung 20. Schematische Darstellung der verschiedenen VREY - Peptide .	52
Abbildung 21. Oberflächenplasmonresonanzspektrometrische Untersuchung der i[VREY] ₄ -CXCL12 Interaktion	53
Die Abbildung 22. Kernspinresonanzspektroskopische Untersuchungen der i[VREY] ₄ -CXCL12 Interaktion	54
Abbildung 23. Darstellung der Interaktion i[VREY] ₄ und CXCL12 auf Thrombozyten mittels <i>Proximity Ligation Assay</i>	55

Abbildung 24. Hemmung der CXCL12-induzierten Thrombozytenaggregation durch i[VREY] ₄	56
Abbildung 25. Verminderung der Kollagen- und Plaque induzierten Thrombozytenaggregation durch i[VREY] ₄	57
Abbildung 26. Verminderung der Thrombusbildung auf Plaque unter arteriellen Flussbedingungen durch i[VREY] ₄	58
Abbildung 27. Verminderte arterielle Thrombusbildung in vivo durch i.p. Injektion von i[VREY] ₄	59
Abbildung 28. Untersuchung der Wirkung von i[VREY] ₄ auf Thrombozyten mit und ohne CXCL12-Defizienz.....	60
Abbildung 29. Untersuchung der Pharmakokinetik von i[VREY] ₄ , sowie Effekte auf die Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten.....	61
Abbildung 30. i[VREY] ₄ zeigt eine erhöhte Bindungsaffinität an aktivierte Thrombozyten.....	62
Abbildung 31. i[VREY] ₄ inhibiert eine CXCL12-abhängige BTK-Phosphorylierung CXCR4-abhängig, ohne die CXCR4 Internalisierung zu beeinflussen.....	63
Abbildung 32. i[VREY] ₄ verstärkt die antithrombotische Wirkung von Cangrelor oder Aspirin, wirkt sich jedoch nicht negativ auf die primäre Hämostase aus...	65
Abbildung 33. Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von i[VREY] ₄ und der durch CXCL12 aktivierten Signalkaskade.....	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Inhalt der α -Granula, erstellt nach Flaumenhaft et al. [7].....	2
Tabelle 2. Verwendete Medikamente.....	19
Tabelle 3. Verwendete Pufferlösungen.....	19
Tabelle 4. Verwendete Reagenzien.....	21
Tabelle 5. Verwendete Antikörper.....	22
Tabelle 6. Verwendete Geräte.....	22
Tabelle 7. Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	23
Tabelle 8. Verwendete Software.....	23
Tabelle 9. Blutparameter der Versuchstiere mit CXCL12- defizienten Thrombozyten im Vergleich zu Kontrolltieren.....	41

Die in dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse wurden im Fachmagazin *Blood* veröffentlicht.

Leberzammer, J., Agten, S. M., Blanchet, X., Duan, R., Ippel, H., Megens, R. T., Schulz, C., Aslani M., Duchene, J., Döring, Y., Joss, N., Zhang, P., Brandl, R., Stark, K., Siess, W., Heemskerk, J. W , Hackeng, T. M, Jurk, K., Mayo, K. H., Weber, C.* , von Hundels-hausen, P*. (2022). Targeting platelet-derived CXCL12 impedes arterial thrombosis. *Blood*, 139(17), 2691-2705. doi:10.1182/blood.2020010140

1 Einleitung

Die ischämische Herzerkrankung ist die häufigste Todesursache weltweit. Außerdem beeinträchtigt dieses Krankheitsbild die Lebensqualität von vielen Patientinnen und Patienten und stellt somit zusätzlich eine hohe ökonomische Belastung für die Gesundheitssysteme dar [1, 2].

Die Grundlage der ischämischen Herzerkrankung ist eine Plaqueruptur oder -erosion in den Koronargefäßen. Dadurch wird eine Thrombozytenaktivierung und -aggregation eingeleitet. Der dadurch entstandene Thrombus verschließt das entsprechende Blutgefäß teilweise oder komplett, und das Herzmuskelgewebe nekrotisiert [3].

Aktuelle antithrombozytäre Therapien bergen ein erhöhtes Blutungsrisiko, welches wiederum eine häufige Ursache für Mortalität und Morbidität ist. Deshalb ist es weiterhin wichtig die pathophysiologischen Mechanismen der Thrombusbildung zu erforschen, um dabei relevante Mediatoren und Zielstrukturen für neuartige Wirkstoffe zu identifizieren [4].

In der folgenden Arbeit werden bekannte und neue Mechanismen der arteriellen Thrombose erörtert. Darüber hinaus wird ein neuartiger Wirkstoffkandidat in vitro und in vivo getestet.

1.1 Thrombozyten

1.1.1 Struktur und allgemeine Funktion

Thrombozyten sind 1 - 4 μm große zelluläre Partikel. Erwachsene Menschen besitzen 150×10^9 bis 400×10^9 Thrombozyten pro Liter Blut. Thrombozyten entstehen durch Abschnürung von Megakaryozyten im Knochenmark; ihre Verweildauer im Blut beträgt 5 - 11 Tage [5]. Thrombozyten besitzen keinen Zellkern, sie sind jedoch trotzdem, durch vorhandenen mRNA, eingeschränkt zur Proteinsynthese fähig [5, 6].

Die zum Teil thrombozytenspezifischen Proteine und Enzyme sind in den α -Granula, δ -Granula und Lysosomen gespeichert. In den α -Granula sind sowohl Proteine gespeichert, die an der Zellmembran exprimiert werden, als auch Proteine, die sezerniert werden. Proteomik-Studien deuten darauf hin, dass sich mehr als 300 verschiedene Proteine in den α -Granula befinden. Zu den

membranbindenden Proteinen gehören das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, GPIIb α -IX-V, GPVI, P-Selektin und Chemokinrezeptoren, wie CXCR4. Zu den sezernierten Proteinen gehören Gerinnungsfaktoren (Faktor V, IX, XIII, TF), Adhäsionsproteine (Fibrinogen, vWF,) Chemokine (CXCL4, CXCL12, CCL5), Wachstumsfaktoren, mikrobielle Proteine und Immunmediatoren [7].

Integrale Membranproteine	P-Selektin, $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Integrin, GPIIb α , GPVI
Gerinnungsfaktoren, Antikoagulanzen,	Faktor V, Faktor IX, Faktor XIII, Antithrombin, Protein S, Plasminogen
Adhäsionsproteine	vWF, Fibrinogen
Chemokine	CXCL1, CXCL4, CXCL5, CXCL7, CXCL8, CXCL12, CXCL14, CCL2, CCL3, CCL5
Wachstumsfaktoren	VEGF, PDGF
Antimikrobielle Substanzen	Thymosin- β4 , Thrombocidin 1 und 2
Immunmediatoren	Komplementfaktor C3 und C4, IgG, C1 Inhibitor

Tabelle 1. Inhalt der α -Granula, erstellt nach Flaumenhaft et al. [7]

Die wichtige Funktion der α -Granula zeigt sich im Krankheitsbild des Gray-Platelet Syndroms. Dabei kommt es zu einer Mutation des NBEAL2 Gens und zu einem Fehlen der sezernierten Proteine in den α -Granula. Der Phänotyp dieses Syndroms stellt sich mit Schleimhautblutungen und Menorrhagien, und sehr selten auch schwerwiegenden Blutungen dar. Dieser Phänotyp konnte im Mausmodell reproduziert werden: Nbeal2 $^{-/-}$ Tiere zeigen eine verlängerte Blutungszeit und einen Defekt in der Thrombusbildung [7-9].

In den δ -Granula (auch elektronendichte Granula) sind Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Phosphate, bioaktive Substanzen (Serotonin, Histamin) und Nukleotide (ADP, ATP etc.) gespeichert. Besonders hervorzuheben ist hierbei das Thrombozyten aktivierende Nukleotid ADP.

In den Lysosomen sind, so wie in anderen Zelltypen auch, Enzyme gespeichert, die an der Prozessierung von Proteinen beteiligt sind [7].

Die Hauptfunktion der Thrombozyten stellt die Instandhaltung der vaskulären Integrität dar, zudem spielen sie eine wichtige Rolle in anderen physiologischen Vorgängen wie z. B. der Wundheilung und der Abwehr von bakteriellen Erregern [10]. Jedoch tragen sie ebenso zu pathologischen Vorgängen, wie der arteriellen oder venösen Thrombose und der Atherogenese bei [11, 12].

1.2 Die Schritte der Thrombusbildung

1.2.1 Adhäsion

Durch eine Gefäßverletzung oder Plaqueruptur kommt Kollagen, welches sich in der Gefäßwand befindet und durch das Endothel abgeschirmt wird, in Kontakt mit Blut. An das freigelegte Kollagen bindet nun das von-Willebrand-Faktor (vWF) Multimer, welches aus dem Plasma oder den Endothelzellen stammt.

In Blutgefäßen mit hoher Scherrate, wie den Arterien, nimmt der GP Ib-V-IX Komplex die zentrale Rolle in der initialen Adhäsion der noch nicht aktivierten Thrombozyten mit dem, an Kollagen gebundenen, vWF ein.

Der GPIb α -IX-V Komplex ist auch auf ruhenden Thrombozyten stark exprimiert und bindet durch sein schnelle „On-Kinetik“ sehr schnell an den vWF. Durch Bindung an Kollagen ändert sich die Konformation des vWF Komplexes, und es werden verschiedene Bindungsplätze für GPIb α Rezeptoren frei.

Durch diese Bindung werden die fließenden Thrombozyten verlangsamt, und der GPVI Rezeptor, der zentrale Kollagenrezeptor der Thrombozyten, kann an Kollagen binden. Durch die ebenfalls schnelle „off-Kinetik“ des GPIb α -IX-V Komplexes kann allein durch diesen Mechanismus keine stabile Bindung mit der Gefäßwand eingegangen werden. Deshalb ermöglicht erst die Bindung von GPVI und Integrin $\alpha 2\beta 1$ an Kollagen und die dadurch ausgelöste Thrombozytenaktivierung eine stabile Bindung der Thrombozyten mit der verletzten Gefäßwand (Abbildung 1) [3, 13]. Die Relevanz von GPIb α für die Thrombusbildung zeigt sich sowohl im Menschen als auch im Mausmodell. Komplettes Fehlen oder eine Fehlfunktion von GPIb-V-IX führt beim Menschen zum Bernard–Soulier Syndrom. Dieses Syndrom geht mit einer Blutungsneigung, milder Thrombozytopenie und Riesenthrombozyten einher. Im Mausmodell führt eine GPIb α -Defizienz zum Verlust der Fähigkeit stabile Thromben zu bilden. Dies zeigt, dass der GPIb Rezeptor unabdingbar für die Entstehung von Thromben ist [14].

Die Relevanz des vWF zeigt sich ebenfalls in einem menschlichen Krankheitsbild. Die häufigste angeborene Störung der Blutstillung beim Menschen ist das von-Willebrand-Jürgens-Syndrom. Dabei liegt ein qualitativer oder quantitativer Mangel des vWF vor. Klinisch sind viele Patienten asymptomatisch, jedoch kann es auch zu Schleimhautblutungen, sowie gastrointestinalen und postoperativen Blutungen kommen [15].

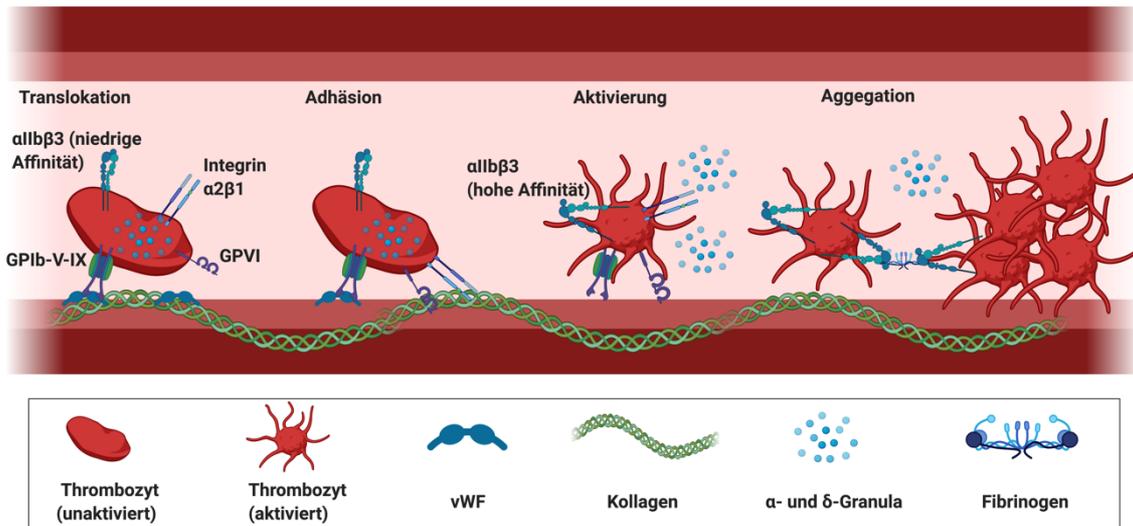


Abbildung 1. Die Schritte der Thrombusbildung (erstellt nach [3]) Initial werden die Thrombozyten durch eine transiente Bindung des GPIIb-V-IX Komplexes an immobilisierten vWF abgebremst. Eine stabile Adhäsion und eine Thrombozytenaktivierung erfolgt durch Bindung von GPIIb und Integrin $\alpha 2\beta 1$ an Kollagen. Durch die Thrombozytenaktivierung werden weitere Thrombozyten aktivierende Mediatoren aus den Granula freigesetzt. Die Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung wird durch eine Quervernetzung und weitere Aktivierung der Thrombozyten durch die Bindung von Integrin $\alpha 11\beta 3$ an Fibrinogen ermöglicht.

1.2.2 Aktivierung, Formveränderung und Sekretion

Die Thrombozytenaktivierung erfolgt über GPIIb und verschiedene G-Proteingekoppelte Rezeptoren (abgekürzt GPCR, G protein-coupled receptor). Durch die Bindung von GPIIb an Kollagen wird eine Signalkaskade über eine rezeptor-gekoppelte Tyrosinkinase „receptor-associated immunoreceptor tyrosine activation motif“ (ITAM) in Gang gesetzt. Nachgeordnet erfolgt die Signalweiterleitung über Syk-Kinasen, die Phospholipase Cy2, Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), die Bruton-Tyrosinkinase (BTK) und kleine G-Proteine (Abbildung 2). Dies führt zu Calciummobilisierung, Degranulation, Integrinaktivierung und Aggregation [14, 16, 17]. Die Bindung von GPIIb an Kollagen ist, wie experimentelle Studien zeigen, essenziell für die stabile Adhäsion und Thrombusbildung an der Gefäßwand und auf mit Kollagen und Plaque beschichteten Oberflächen [18-20]. Jedoch bewirkt GPIIb dies nicht allein, sondern verursacht eine Änderung der Affinitäten der Thrombozytenintegrine $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 11\beta 3$. Durch die Thrombozytenaktivierung ändert sich die Affinität von einer niedrigen hin zu einer hohen

Bindeaffinität [21, 22]. Die Bindung von GPVI an Kollagen ist jedoch nicht ausreichend für eine anhaltende und starke Thrombozytenaktivierung. Es bedarf der Kostimulation und Signalamplifizierung durch GPCR mittels ADP, Thromboxan (TxA₂), Thrombin und anderer Mediatoren. Durch die initiale Aktivierung setzen die Thrombozyten die bereits beschriebenen Inhalte der α - und δ -Granula frei. Dies führt wiederum zu einer reziproken Aktivierung der Thrombozyten mittels einer positiven Feedbackschleife, insbesondere durch ADP und das durch Arachidonsäure gebildete TxA₂. ADP bindet an die purinergen Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂. Thromboxan bindet an die Rezeptoren TP α und TP β . Thrombin bindet im Menschen an die PAR1 und PAR4 Rezeptoren. Die Relevanz der Aktivierung durch ADP und TxA₂ lässt sich nicht nur durch viele experimentelle Studien belegen, sondern auch durch den erfolgreichen klinischen Einsatz der P2Y₁₂ Inhibitoren und Aspirin, einem Hemmer der TxA₂ produzierenden Cyclooxygenase [3, 23].

Die beschriebenen Mechanismen der Koaktivierung sind die am besten beschriebenen und validierten. Jedoch exprimieren Thrombozyten eine Vielzahl an GPCR unter anderem Rezeptoren für Chemokine (CXCR4, CCR1/3/4), Adrenalin (α_{2A}), Serotonin (5-Hydroxytryptamine 2A) und Prostaglandin E2 (EP3) [24, 25]. Für einige dieser Mediatoren bzw. Rezeptoren konnte bereits eine Relevanz für die Thrombozytenaktivierung in vitro und für die Thrombusbildung oder Hämostase in vivo gezeigt werden. Für andere Mediatoren, wie z. B. der CXCL12-CXCR4 Achse steht diese Evaluierung noch aus.

Im Allgemeinen konnte gezeigt werden, dass die Untereinheiten der GPCR, insbesondere: G_{ai2}, G_{az}, G_q, G₁₃ essentiell für die Thrombozytenaktivierung und eine stabile Thrombusbildung sind [25].

Die nachgeordnete Signaltransduktion der GPCR-Aktivierung erfolgt bei G_q über die β -Isoform der Phospholipase C. Die Signaltransduktion des GPCR G₁₃, wird über Rho/Rho-Kinase Wege vermittelt.

G_{i2}, das am häufigsten in Thrombozyten exprimierte G-Protein (vermittelt u.a. die Transduktion von P2Y₁₂) inhibiert die Adenylcyclase, wodurch die Bildung von cAMP vermindert wird. cAMP wiederum verhindert die Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung [26].

Des Weiteren vermitteln G_i-Typ G-Proteine ihre Wirkung über den Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) Weg. Nachgeordnet wird dieser Signalweg über die Serin-/Threonin Kinase Akt vermittelt [25].

Die Aktivierung der Thrombozyten führt nicht nur zu einer Degranulation, sondern auch zu einer Formveränderung. Dabei ändern die Thrombozyten ihre Form von diskoid zu sphärisch. Dies geht durch eine Reorganisation des Zytoskeletts und einer Ausbildung von Filopodien vorstatten [5].

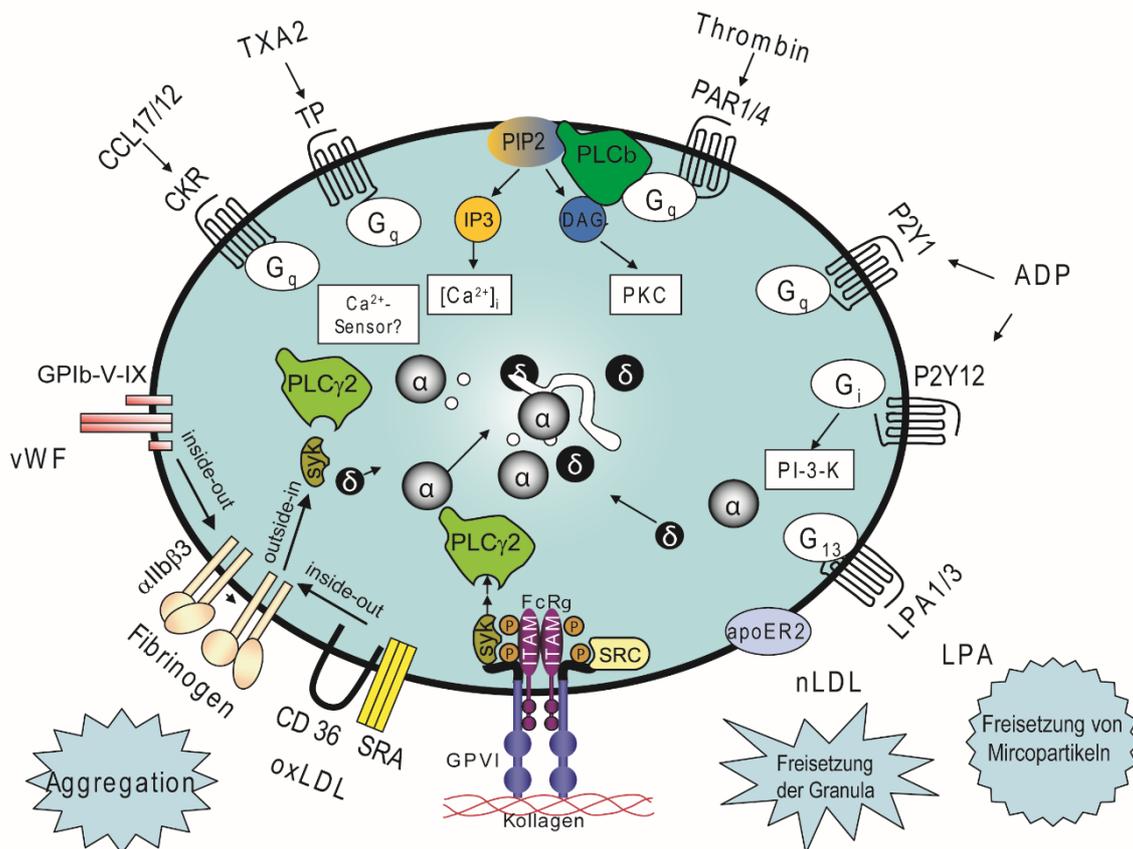


Abbildung 2. Die Signalkaskaden der Thrombozytenaktivierung (übersetzt mit freundlicher Genehmigung des Verlages und des Autors [27])

Darstellung der für die Thrombozytenaktivierung wichtigsten Agonisten, Rezeptoren und Signalkaskaden

1.2.3 Thrombozytenaggregation

Aus der Integration der durch GPVI und GPCR induzierten Signalkaskaden resultiert letztendlich eine Änderung der Bindungsaffiniät des Thrombozytenintegrins $\alpha IIb\beta 3$. Dies führt zur Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung (Abbildung 1) [14].

Sowohl die Aktivierung der PLC γ 2 als auch der PLC β durch GPCR führen zu einer Hydrolyse des Membranphospholipids Phosphatidylinositol- 4,5-bisphosphate (PIP2) in Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerin. Dadurch kommt es zum Ca²⁺-Einstrom durch das endoplasmatische Retikulum und indirekt durch sog. „store-operated calcium“ (SOC) Kanäle in der Zellmembran. Das erhöhte Ca²⁺ im Thrombozyten führt durch das Ca²⁺ sensitive Protein diacylglycerol-regulated guanine nucleotide exchange factor I (CaDAG-GEF1) zu einer Aktivierung des kleinen GTP-bindenden Proteins Rap1b. Rap1b wiederum führt über eine Interaktion mit Talin1 zu einer Talin-induzierten Aktivierung des α IIb β 3 Integrins. Dabei wechselt α IIb β 3 von einem Zustand der niedrigen Affinität zu einem Zustand der hohen Affinität zu seinen Bindungspartnern.

Das α IIb β 3 Integrin ist das am häufigsten auf Thrombozyten exprimierte Integrin (50,000– 80,000 Kopien/Thrombozyt.) Der wichtigste Bindungspartner von α IIb β 3 ist Fibrinogen. Durch die Bindung an Fibrinogen vermittelt aktiviertes α IIb β 3 die interthrombozytäre Bindung und ist damit essenziell für die Aggregation und die Thrombusstabilität. Außerdem bindet, an Kollagen gebundener, vWF ebenfalls an α IIb β 3 und unterstützt dadurch, bei hohen Scherraten, ebenfalls die Thrombusbildung. Die Aktivierung von α IIb β 3 stellt die gemeinsame Endstrecke der Thrombozytenaktivierung dar [14].

Die entscheidende Rolle von α IIb β 3 für die Hämostase zeigt sich in der seltenen Glanzmann-Thrombasthenie. Dabei kommt es zu einer stark erhöhten Blutungsneigung. Die zur Thrombozytenaggregationshemmung zugelassenen α IIb β 3 Inhibitoren (auch GPIIb/IIIa Blocker) sind sehr effektiv und werden in der perkutanen Koronarintervention angewendet. Jedoch führen sie zu einer stark erhöhten Blutungsneigung [13].

1.2.4 Interaktion von Thrombozyten und Blutgerinnung in der Thrombusbildung

Zusätzlich zur beschriebenen Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten wird die Blutgerinnung aktiviert. Gewebethromboplastin (englisch: tissue factor), welches aus dem verletzten Gefäß stammt, aktiviert die Gerinnungskaskade. Gewebethromboplastin aktiviert Faktor VII zu Faktor VIIa; in einem gemeinsamen Komplex spalten Gewebethromboplastin und Faktor VIIa Faktor X zu Faktor Xa. Faktor Xa wiederum spaltete zusammen mit Faktor V Prothrombin enzymatisch zu Thrombin. Thrombin verwandelt Fibrinogen zu Fibrin, welches den Thrombus

stabilisiert und über eine positive Feedbackschleife die Aktivierung von Faktor X weiter bestärkt. Die Thrombozytenaktivierung und die Blutgerinnung sind reziprok miteinander verknüpft. Der Gerinnungsfaktor Thrombin ist gleichzeitig über seine Rezeptoren PAR1 und PAR 4 ein starker Thrombozytenaktivator. Thrombozyten wiederum setzen bei Aktivierung Gerinnungsfaktoren und Fibrinogen frei. Außerdem exprimieren Thrombozyten bei Aktivierung Phosphatidylserine auf ihrer Oberfläche, was wiederum die Bildung von Thrombin fördert [12]. Neben Thrombozyten spielen auch andere Zelltypen, wie z.B. neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und die von Ihnen freigesetzten Mediatoren eine wichtige Rolle in der Thrombusbildung. Neutrophile Granulozyten setzen Serinproteasen und sog. *neutrophil extrazellulär traps* frei und tragen damit zu Thrombusbildung bei [12, 28-30].

1.2.5 Aktuelle Erkenntnisse der Thrombusbildung

Neuere Studien haben gezeigt, dass Thrombozyten innerhalb eines Thrombus nicht gleichmäßig aktiviert sind. Es gibt einen Kern mit stark aktivierten, P-Selektin positiven, eng gepackten und sphärischen Thrombozyten und eine Hülle mit weniger stark aktivierten, P-Selektin negativen diskoiden Thrombozyten. Im Kern ist eine initiale Thrombozytenaktivierung durch direkten Kontakt mit Kollagen aus der Gefäßwand und anschließend eine Aktivierung durch Thrombin entscheidend (Abbildung 3). Hingegen ist in der Hülle eine Aktivierung durch P2Y₁₂ und TxA₂ essenziell. Dieser Unterschied ist auf eine spatio-temporale Verteilung von Thrombozytenaktivatoren zurückzuführen [31-35].

Thrombin ist als großes Molekül vor allem im Kern des Thrombus vorhanden. ADP als kleines Molekül kann durch den Thrombus hindurchdiffundieren und somit die Hülle des Thrombus erreichen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich diskoidale, inaktivierte Thrombozyten durch rheologische Faktoren wie hohe Scherkräfte, wie sie in stenosierten Arterien vorhanden sind, aktiviert werden. Durch diese mechanosensitive Eigenschaft der Thrombozyten wird möglicherweise die Rekrutierung der Thrombozyten in den wachsenden Thrombus ermöglicht und dadurch die daraus folgende Akkumulation der löslichen Mediatoren gefördert. Durch diese Mediatoren wird die Thrombuskonsolidierung ermöglicht.

Allgemein wird davon ausgegangen, dass für die Thrombozytenaktivierung ein komplexes Netzwerk an Aktivatoren benötigt wird. Diese Aktivatoren binden an

unterschiedliche Thrombozytenrezeptoren und bedingen verschiedene ineinandergreifende positive Rückkopplungsschleifen [31-35].

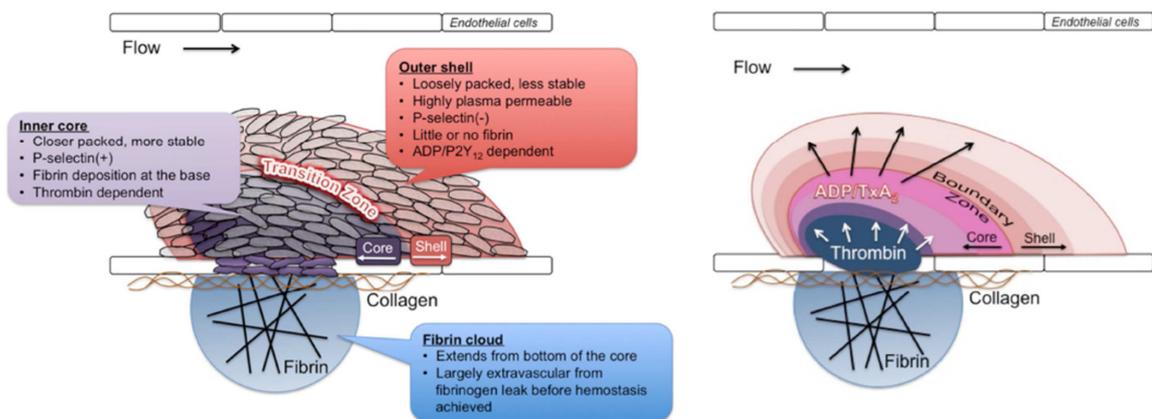


Abbildung 3. Aktuelles Modell der Thrombusbildung [36]

Aktuelle Forschungsergebnisse legen nahe, dass es innerhalb eines Thrombus ein heterogenes Verteilungsmuster gibt. Im stabilen Thrombusinneren überwiegen eng gepackte, stark aktivierte und P-Selektin positive Thrombozyten, welche insbesondere durch Thrombin aktiviert werden. In der äußeren Hülle hingegen, liegen lose gepackte, weniger stark aktivierte und P-Selektin negative Thrombozyten vor. Dieser Teil des Thrombus ist weniger stabil und die Thrombozytenaktivierung ist ADP abhängig.

1.2.6 Entstehung der Atherosklerose/Atherothrombose mit Fokus auf die Rolle der Thrombozyten

Die Atherosklerose ist die Ursache für zerebrovaskuläre Erkrankungen und die koronare Herzkrankheit. Die Ruptur atherosklerotischer Plaques und der daraus folgenden arteriellen Thrombose führt zum akuten Koronarsyndrom oder ischämischen Schlaganfall. Risikofaktoren für die Atherosklerose sind: ein hohes Lebensalter, genetische Disposition, Tabakkonsum, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas und chronische Entzündung.

Die Atherosklerose manifestiert sich insbesondere an Orten mit vorgeschädigtem Endothel und an Verzweigungsstellen mit gestörtem Flussprofil. Dadurch wird das Eindringen von LDL in die Intima der Gefäßwand begünstigt. Dort wird LDL durch reaktive Sauerstoffspezies zu oxLDL oxidiert. Oxidiertes LDL und weitere Lipide fördern die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Sezernierung von Chemokinen durch Endothelzellen. Dadurch und durch Deposition von durch Thrombozyten sezernierte Chemokine wird eine Infiltration von Immunzellen

initiiert. Initial entstehen sog. *fatty streaks*. Diese bestehen aus infiltrierten T-Zellen und aus dem Blut eingewanderten Monozyten, die LDL aufnehmen und zu Schaumzellen transformieren. Durch weitere Zellinfiltration, durch Apoptose der eingewanderten Zellen und durch Akkumulation von Cholesterolkristallen entsteht ein nekrotischer Kern. Dieser Kern wird durch eine bindegewebige Kappe vom Gefäßlumen abgegrenzt. Bei Fortschreiten der entzündlichen Vorgänge dünnt sich diese Kappe bis zur Ruptur des Plaques aus. Dies führt durch die bereits beschriebenen Mechanismen zu einer arteriellen Thrombose. Der Vorgang der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques mit anschließender arterieller Thrombose wird auch als Atherothrombose bezeichnet [37].

Thrombozyten sind nicht nur unabdingbar für die Entstehung der Thrombose, auch bei der Initiierung und Progression der Atherosklerose spielen sie eine wichtige Rolle (Abbildung 4) [38, 39]. Thrombozyten interagieren mit der Gefäßwand und deponieren u.a. die Chemokine CCL5 (auch RANTES) und CXCL4 (auch PF4), sowie Mikropartikel auf dem entzündeten Endothel [39-41]. Damit befördern sie die Immunzellinfiltration. Des Weiteren bilden Thrombozyten Komplexe mit Immunzellen und propagieren damit ebenfalls die Infiltration in die Gefäßwand [39]. Eine Blockade der Interaktion zwischen Gefäßwand und Thrombozyten kann die atherosklerotische Plaqueformation deutlich reduzieren [42]. Gesundes Endothel besitzt eine antiadhäsive Funktion, welche durch ADPasen, NO und PGI₂ vermittelt wird. Thrombozyten speichern in ihren α-Granula das, in gewissen Kontexten proinflammatorische, Chemokin CXCL12 und setzen es bei Aktivierung frei. Inwiefern durch Thrombozyten freigesetztes CXCL12 zur Pathogenese der Atherosklerose beiträgt, ist bisher nicht bekannt.

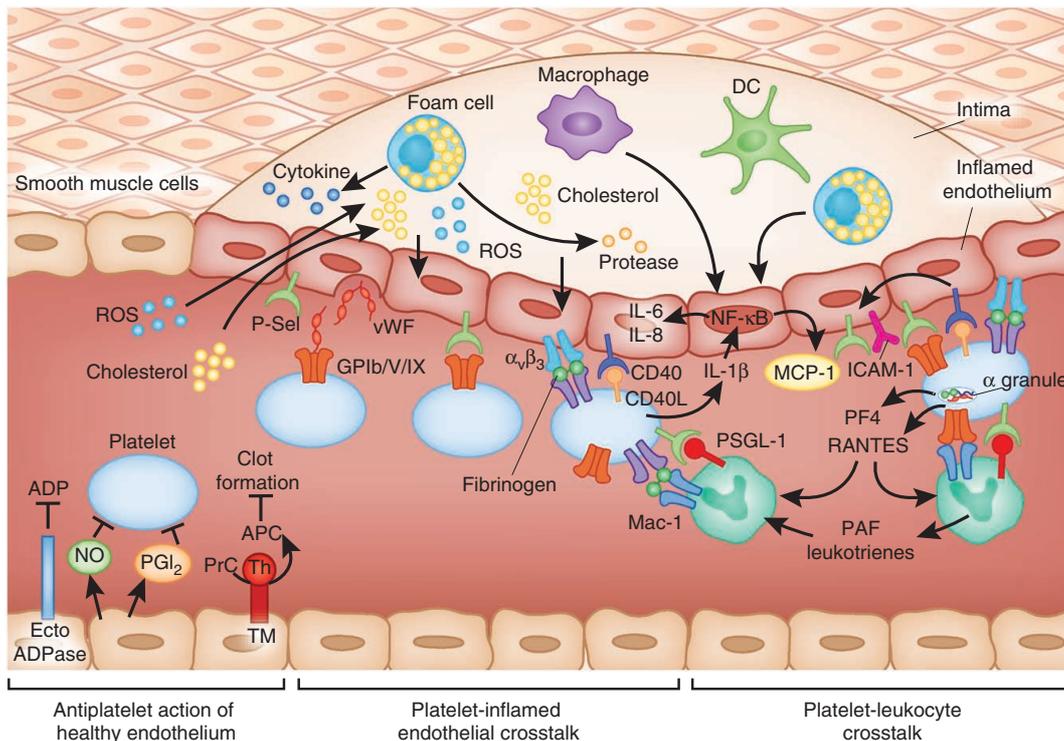


Abbildung 4. Die Rolle von Thrombozyten in der Entstehung der Atherosklerose [3]

Gesundes Endothel besitzt durch ADPasen, NO und PGI₂ einen antiadhäsiven Phänotyp. Hypercholesterinämie führt zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und damit eine Interaktion von Thrombozyten mit der Gefäßwand. Thrombozyten setzen daraufhin eine Vielzahl an inflammatorischen Mediatoren frei und bilden Komplexe mit Leukozyten. Beide Vorgänge verstärken die Immunzellinfiltration in die Gefäßintima und damit die Entstehung der Atherosklerose.

1.3 Chemokine

1.3.1 Klassifizierung und Struktur

Chemokine sind chemotaktische Zytokine. Bisher wurden ungefähr 50 verschiedene Chemokine im menschlichen Körper identifiziert. Sie werden strukturell nach Anordnung der Cysteinreste am N-Terminus in vier Gruppen eingeteilt: CXC, CC, CX3C und XC. Jedoch wird teilweise weiterhin der konventionelle Name benutzt (z.B. CXCL12 entspricht SDF-1α). Die tertiäre Struktur aller Chemokine besteht aus einem N-Terminus, einem zentralen β-Faltblatt (bestehend aus drei anti-parallelen β-Strängen) und einer C-terminalen α-Helix.

Funktionell können Chemokine als inflammatorisch, homöostatisch und gemischt klassifiziert werden. Inflammatorische Chemokine werden bei entzündlichen

Vorgängen freigesetzt und haben eine wichtige Funktion bei der Rekrutierung von Immunzellen. Homöostatische Chemokine sind oftmals dauerhaft exprimiert, und ihre Funktion liegt in der Migration von Zellen unter physiologischen Bedingungen, wie z. B. im Knochenmark. Gemischte Chemokine besitzen eine Funktion, die die beiden Eigenschaften vereint.

Die strukturelle Einteilung in 4 Gruppen ist ebenfalls für die Chemokinerezeptoren anwendbar. Diese werden je nachdem, welche Chemokinklasse sie binden, in CXCR, CCR, CX3R und XCR Rezeptoren eingeteilt. Die klassischen Chemokinrezeptoren, im Gegensatz zu den atypischen Chemokinrezeptoren, gehören zur Gruppe der 7-Transmembranhelix G-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Dabei ist der Rezeptor an eine $G_{\alpha i}$ Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine gekoppelt [43].

1.3.2 Chemokine aus Thrombozyten

Thrombozyten speichern diverse Chemokine in ihren α -Granula. Dazu gehören CXCL4 (auch PF4), CXCL7 (Platelet basic protein), CXCL4L1 (PF4alt), CCL5 (RANTES) und auch CXCL12 (SDF-1 α). Diese Chemokine haben eine Vielzahl an Funktionen bei kardiovaskulären Erkrankungen [44]. CXCL4 ist das am häufigsten in Thrombozyten vorkommende Chemokin und spielt eine wichtige Rolle bei Atherogenese und Thrombusbildung [45, 46]. Die Deposition von CCL5 durch Thrombozyten verursacht eine inflammatorische Zellrekrutierung in der Atherosklerose [40].

1.3.3 CXCL12

CXCL12 (auch SDF-1, abgekürzt von englisch stromal cell-derived factor 1) ist ein CXC-Chemokin. Sein zuerst beschriebener Rezeptor ist CXCR4, welcher auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert ist. CXCR4 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor und die Bindung von CXCL12 an CXCR4 löst eine intrazelluläre Signaltransduktion über die $G_{\alpha i}$ Untereinheit aus. Dies löst unter anderem Signalkaskaden über den Akt-, MAP (mitogen-activated protein)- und PI3 Signalwege, sowie über die PLC aus, was wiederum zu einem Ca^{2+} Einstrom in die Zelle führt [47]. Zudem konnte in Leukämiezellen gezeigt werden, dass CXCL12 die Bruton-Tyrosinkinase aktiviert [48, 49]. Letztendlich führt die Aktivierung dieser Signalwege durch CXCL12 je nach Zelltyp zu Zellaktivierung und/oder Chemotaxis [47, 50].

Außerdem wurde kürzlich ACKR3 (auch CXCR7) als weiterer Rezeptor für CXCL12 identifiziert. Dieser scheint jedoch keine klassische chemotaktische oder zellaktivierende Wirkung zu haben, sondern als antiapoptotischer oder als Decoy-Rezeptor zu funktionieren, der die Verfügbarkeit von CXCL12 bzw. CXCR4 reguliert [50-52].

Quellen von CXCL12 sind eine Vielzahl von Zellen, unter anderem CAR- Zellen im Knochenmark (englisch für CXCL12-abundant-reticular cells), Endothelzellen und Thrombozyten [50, 53, 54]. CXCL12 spielt eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung und in der Erhaltung der Knochenmarkhomöostase. Mäuse mit einer kompletten CXCL12-oder CXCR4-Defizienz sterben perinatal auf Grund von Störungen in der Hämatopoese, der Vaskulo-, Kardio- und Neurogenese [55]. Eine pharmakologische Unterbrechung der CXCL12-CXCR4 Achse resultiert in einer Freisetzung von Leukozyten und Progenitorzellen aus dem Knochenmark [56, 57]. Ferner scheint CXCL12 auch eine Rolle in der Thrombopoese zu spielen [58-62].

Darüber hinaus besitzt CXCL12 vielfältige reparative, aber auch proinflammatorische Funktionen, da es sowohl Immunzellen als auch Progenitorzellen rekrutiert.

Auch in kardiovaskulären Erkrankungen scheint die CXCL12-CXCR4-Achse eine vielschichtige Wirkung zu haben. In Myokardinfarktmodellen konnten sowohl reparative als auch herzmuskelschädigende Effekte der CXCL12-CXCR4 Achse beschrieben werden [50, 63, 64]. Genomweite Assoziationsstudien (abgekürzt GWAS nach genome-wide-association studies) konnten eine Verbindung zwischen dem CXCL12 Locus, CXCL12 Plasmaspiegeln und der koronaren Herzerkrankung beim Menschen herstellen [65-67]. Erhöhte CXCL12 Plasmalevel konnten als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse, Schlaganfall und das Auftreten von Herzinsuffizienz identifiziert werden [66, 68-70].

Im Mausmodell konnte bestätigt werden, dass CXCL12, welches aus Endothelzellen stammt, die Atheroprogression befördert [71]. Hingegen konnten andere Studien eine protektive Rolle der CXCL12-CXCR4 Achse, insbesondere von endothelialelem CXCR4 in der Atherosklerose zeigen [72]. Dies deutet auf eine komplexe kontext- und zellspezifische Rolle dieses Chemokins und seiner Rezeptoren hin [50, 63].

1.3.4 CXCL12 und Thrombozyten

Thrombozyten speichern CXCL12 in ihren α -Granula [54, 73]. Proteomische Untersuchungen legen nahe, dass pro Thrombozyt ca. 3900 CXCL12 Kopien vorhanden sind [74]. Bei Aktivierung durch Mediatoren, wie Kollagen, Thrombin oder oxLDL, exprimieren Thrombozyten CXCL12 in großem Maße auf der Zellmembran und setzen es frei. Diese Freisetzung geschieht innerhalb von Minuten [54, 73, 75, 76]. Außerdem exprimieren Thrombozyten CXCR4 auf ihrer Oberfläche [24, 77]. CXCL12 bindet CXCR4 auf der Thrombozytenoberfläche mit ca. 2000 Bindungsplätzen pro Thrombozyt und einer Affinität von 24 nmol/l [78].

Bisherige Untersuchungen konnten *in vitro* zeigen, dass CXCL12 Thrombozyten auto- und parakrin über CXCR4 aktivieren kann. Insbesondere bei suboptimaler Kostimulation durch Thrombozytenaktivatoren wie Kollagen, Thrombin oder ADP, kann CXCL12 die Thrombozytenaktivierung, -sekretion, -aggregation und die Thrombusbildung *in vitro* deutlich steigern [24, 75, 78-81]. Vor kurzem konnte außerdem gezeigt werden, dass CXCL12 zusammen mit CXCR4 die prothrombotischen Eigenschaften des oxLDL sowohl vermittelt als auch verstärkt [76]. Darüber hinaus stimuliert CXCL12 die Plättchenmigration, Adhäsion, Aktivierung und Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen auf thrombogenen Oberflächen [81-83]. Außerdem führt CXCL12 zur Ausbildung sog. *blebs* (englisch für Bläschen) auf der Thrombozytenoberfläche, einer Formveränderung, welche mit der prokoagulatorischen Funktion von Thrombozyten in Verbindung gebracht wird [79]. Mechanistisch wurde bisher dargelegt, dass CXCL12 einen Ca^{2+} Einstrom und eine Erniedrigung des intrazellulären cAMP vermittelt; beides vielfach beschriebene Mechanismen der Thrombozytenaktivierung. Diese Effekte werden durch CXCR4 vermittelte Signaltransduktionswege ausgelöst. Dabei sind die $G_{\alpha i}$ -Untereinheit von CXCR4, Tyrosinkinasen und Akt-Signaltransduktionswege involviert.

Bezüglich der Relevanz von ADP- und Prostaglandin-Signalwegen wird in der Literatur über unterschiedliche Befunde berichtet [75, 78-80, 84, 85]. Außerdem reguliert CXCL12, welches aus Thrombozyten stammt, die Funktion von Monozyten und ihre Differenzierung zu proatherogenen Schaumzellen [86].

Darüber hinaus wirkt sich CXCL12 über seinen zweiten Rezeptor ACKR3 positiv auf das Überleben von aktivierten Thrombozyten aus [87]. CXCL12 ist in arteriellen Thromben, vor allem auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten,

nachweisbar. In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass CXCL12 vaskuläre Progenitorzellen anlockt, damit den vaskulären Umbau nach Gefäßschädigung vermittelt und an der Neointimabildung beteiligt ist [54, 88, 89]. Außerdem induziert CXCL12 die Differenzierung von Progenitorzellen zu Endothelzellen und damit ebenfalls vaskuläre Heilungsprozesse [90]. Zusätzlich ist CXCL12 in atherosklerotischen Plaques vorhanden [80].

Patienten mit akutem Koronarsyndrom zeigen eine erhöhte thrombozytäre CXCL12 Expression, die mit dem Grad der Thrombozytenaktivierung und der Anzahl an CD34+ Progenitorzellen korreliert [91, 92]. In Ergänzung dazu gibt es eine Studie, die darauf hinweist, dass eine hohe thrombozytäre CXCL12 Expression bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit einen negativen Einfluss auf das Überleben hat [93]. Ferner konnte eine kleine Observationsstudie zeigen, dass Patienten mit disseminierter intravaskulärer Gerinnung und schlechtem klinischen Ergebnis hohe CXCL12 Plasmaspiegel aufweisen [94].

Die genannten experimentellen Untersuchungen und klinischen Studien konnten bereits Anhaltspunkte für eine wichtige Rolle von CXCL12 für kardiovaskuläre Erkrankungen feststellen. Inwiefern thrombozytäres CXCL12 eine relevante in vivo Funktion in der Thrombose und Atherosklerose besitzt, ist momentan unklar. Außerdem mangelt es an innovativen und translationalen Herangehensweisen, um die potenziell negativen Effekte von CXCL12 in kardiovaskulären Krankheitsbildern zu unterbinden.

1.3.5 Chemokin-Chemokin Interaktion

Eine feine Regulierung der Chemokinwirkung ist unabdingbar für die Funktion biologischer Systeme. Ein Mechanismus dieser Regulierung ist die Wechselwirkung von Chemokinen. Chemokine interagieren mit demselben Chemokin durch Homo- und Oligomerisierung. Die quartäre Struktur erfolgt bei CXC-Typ Dimeren über das zentrale β -Faltblatt, CC-Typ Homodimere bilden sich über Interaktion der beiden N-termini [43].

CXCL12 beispielsweise bildet CXC-Typ Dimere [95]. Es konnte gezeigt werden, dass der monomere oder dimere Zustand einen großen Einfluss auf die Aktivierung seines Rezeptors CXCR4 und die Signaltransduktion ausübt [96, 97].

Darüber hinaus binden Chemokine andere Chemokine durch Heterodimerisierung. Vor kurzer Zeit erfolgte eine umfassende Kartierung und Charakterisierung der Chemokin-Heterodimerbildung. Diese Studie zeigte, dass eine CC-Typ

Heterodimerisierung synergistisch wirkt, wohingegen eine CXC-Typ Heterodimerisierung einen antagonistischen Effekt hat [81].

Die synergistische CC-Typ Interaktion der beiden Thrombozytenchemokine CXCL4 und CCL5 ist ein wichtiger Mechanismus der inflammatorischen Zellrekutierung in der Atherogenese [41, 98]. Diese Interaktion und die daraus folgenden pathophysiologischen Mechanismen lassen sich durch ein Peptid, CKEY, welches diese Interaktion stört, verhindern [98]. Dieses Peptid zeigt auch Wirkung in anderen inflammatorischen Tiermodellen, wie der akuten Lungenschädigung, Myokardinfarkt, Aortenaneurysma und Schlaganfall [81, 99-102]. Darüber hinaus wurde ein weiteres Peptid, CAN, entwickelt, welches die CC-Typ Interaktion von CCL5 und CCL17 stört und damit ebenfalls die Atherogenese vermindert [40].

Dies deutet darauf hin, dass Chemokin-Chemokin Interaktionen vielversprechende Zielstrukturen für therapeutische Interventionen sind (Abbildung 5).

Zusätzlich wurde die inhibitorische CXC-Typ Interaktion der Chemokine CXCL12 und CCL5 analysiert. Kernspinresonanz Untersuchungen (abgekürzt NMR nach englisch nuclear magnetic resonance) geben Hinweise darauf, dass CCL5 an den β 1-Strang und an die C-terminale Helix von CXCL12 bindet. Daraus folgend wurde das Peptid [VREY]₄ entwickelt, das die inhibitorische Wirkung von CCL5 auf CXCL12 nachahmt. Zellmigrations-, Rezeptoraktivierungs-, Kompletions- und in vitro Thrombozytenaggregationsversuche konnten die spezifische und hemmende Wirkung von [VREY]₄ auf die CXCL12-Funktion bestätigen.

Weitere NMR Untersuchungen legten nahe, dass CCL5 sowie [VREY]₄ die Konformation von CXCL12 beeinflussen und auf diese Weise ihre Wirkung entfalten [81]. Bemerkenswerterweise wurde bereits 2005, bevor das Konzept der Chemokin-Chemokin Wechselwirkungen bekannt war, von Shenkman et al. publiziert, dass CCL5 die CXCL12-induzierte Thrombozytenaktivierung hemmt [103]. In weiteren Studien konnte außerdem eine inhibitorische CXC-Interaktion von CXCL4 auf die CXCL12-induzierte Zellmigration gezeigt werden [81, 104, 105]. Zudem wurde über eine synergistische Interaktion von CXCL9 auf CXCL12 berichtet [106].

Die bisherigen Versuche zur Inhibition der CXCL12-Funktion durch Chemokine oder Peptide wurden bisher ausschließlich in vitro durchgeführt.

Inwiefern von Chemokinen abgeleitete Peptide die Funktion von CXCL12 in Krankheitsmodellen beeinflussen können, ist bisher unklar und bedarf weiterer Evaluierung.

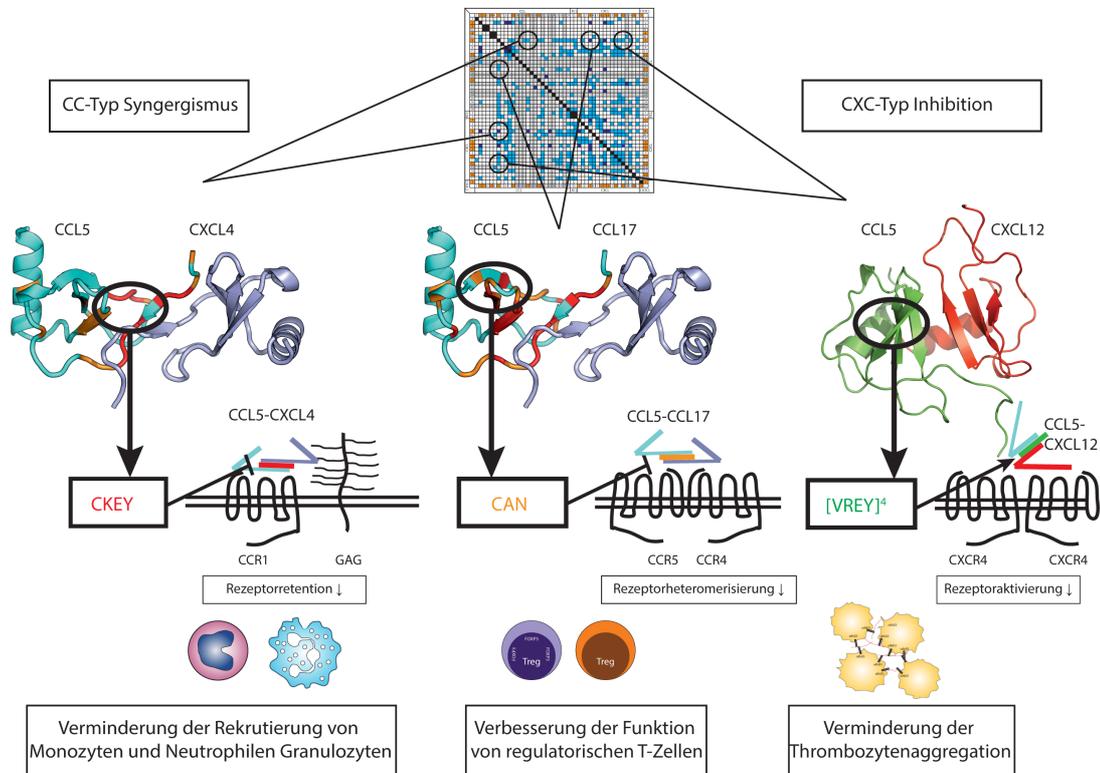


Abbildung 5. Die Entwicklung von Peptiden aus dem „Chemokin Interaktom“ (übersetzt mit freundlicher Genehmigung des Verlages und des Autors) [81]

Die systematische Kartierung der Chemokin-Chemokin Interaktionen in Form des „Chemokin Interaktoms“ ermöglichte die Entwicklung von Peptiden, welche Chemokin-Chemokin Interaktionen modulieren. Die Peptide CKEY und CAN verhindern die Heterodimerisierung von CCL5 mit CXCL4 bzw. mit CCL17. CKEY vermindert dadurch die Zellmigration von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten. CAN verstärkt die Wirkung von regulatorischen T-Zellen. [VREY]₄ initiiert die inhibierende Wirkung von CCL5 auf CXCL12. Dadurch kann [VREY]₄ die CXCL12 vermittelte Thrombozytenaggregation vermindern.

1.4 Zielsetzung

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl an experimentellen und klinischen Studien durchgeführt, um die komplexe Wirkung der CXCL12-CXCR4 Achse zu untersuchen. Dabei konnten wichtige Hinweise auf eine proatherogene und prothrombotische Wirkung von CXCL12 festgestellt werden [66, 71, 75, 81]. Diese Einsichten stehen in einem möglichen Gegensatz zu einer bisher angenommenen

homöostatischen und reparativen Funktion der CXCL12-CXCR4 Achse. Dies deutet auf eine komplexe kontext- und zellspezifische Rolle dieses Chemokins und seiner Rezeptoren in kardiovaskulären Krankheitsbildern hin [63].

Bisherige Untersuchungen bezüglich der Rolle von CXCL12 in der Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung haben sich auf statische in vitro Versuche und ex vivo Flusskammerversuche beschränkt [24, 75, 78-81]. Diese Versuche wurden zu einem Großteil mit gewaschenen Thrombozyten oder plättchenreichem Plasma und nicht mit physiologischem Vollblut durchgeführt. Da eine komplette genetische Deletion von CXCL12 in der Maus letal ist, ist bislang unklar, ob CXCL12 eine relevante in vivo Funktion in der arteriellen Thrombose ausübt [55]. Die Fähigkeit eine plättchenspezifische Gendelektionen im Tiermodell zu generieren, ermöglicht nun jedoch diese Evaluation [107]. Zudem ergeben sich aus der Kartierung des „Chemokin-Interaktoms“ innovative Ansätze zur Beeinflussung der Funktion von CXCL12 [81]. Inwiefern von Chemokinen abgeleitete Peptide jedoch die Funktion von CXCL12 in Krankheitsmodellen in vivo beeinflussen können, ist bisher unklar. Aufbauend auf den bisher gewonnen Erkenntnissen sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen genauer wissenschaftlich untersucht werden:

1. Welchen Einfluss hat thrombozytäres CXCL12 auf die Thrombozytenaktivierung im Vollblut, die arterielle Thrombose, die Hämostase und die Hämatopoese?
2. Spielt thrombozytäres CXCL12 eine Rolle in der frühen Atherosklerose und in der postthrombotischen Neointimabildung?
3. Lassen sich CXCL12-vermittelte Effekte durch ein von CCL5-abgeleitetes Peptid in translationalen in vivo bzw. ex vivo Modellen inhibieren?

2 Material und Methoden

Medikamente:

Medetomidin	cp pharma, Burgdorf
Midazolam	Ratiopharm, Ulm
Fentanyl	Janssen, Neuss
Atipamezol	cp pharma, Burgdorf
Flumazenil	Hexal, Holzkirchen
Naloxon	Ratiopharm, Ulm
Buprenorphin	Ratiopharm, Ulm
Xylaxin	WDT, Garbsen
Ketamin	Medistar, Ascheberg

Tabelle 2. Verwendete Medikamente

Puffer:

PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaCl-Lösung 0.9%	B.Braun, Melsungen
Homogenisierungspuffer	150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4
Citrat-Dextrose Puffer	80 mM Natriumcitrat, 52 mM Zitronensäure, 198 mM Glukose in destilliertem Wasser
Tyrode's Puffer ohne $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$	134 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1.80 mM. NaH_2PO_4 , 417 μM NaHCO_3 , Glukose 5,56 mM, pH 6.5
CGS Puffer	120 mM NaCl, 12.9 mM Natriumcitrat, 5 mM D-Glucose, pH 6.5
Laemmli Puffers	200 mM Tris/HCl, 15% (v/v) Glycerol, 6% (w/v) SDS, 0.06% (w/v) Bromphenoblau, 1:10 β -Mercaptoethanol

Tabelle 3. Verwendete Pufferlösungen

Reagenzien:

FeCl ₃ Pulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fett- und cholesterinreiches Tierfutter (21% Fett, 19.5 % Casein, 0,15% Cholesterin)	Ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest
Monovetten	Sarsted, Nümbrecht
Elastica-Van-Giesson Färbereagenzien	Baacklab, Schwerin
AMD3465	Tocris, Minneapolis, USA
SKF-Puffer	Takeda, Linz, Österreich
Horm Kollagen	Takeda, Linz, Österreich
1-Step Ultra TMB ELISA Substrat	Thermo Scientific, Waltham, USA
1 N Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rhodocytin	Erhalten von Prof. Dr. K. Clemetson, Universität Bern, Schweiz
VWF-BP	Erhalten von Prof. Dr. R. Farndale, Cambridge University
PPACK	Merck KGaA, Darmstadt
Heparin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DiOC6	Thermo Scientific, Waltham, USA
CXCL12	Eigene Herstellung
CCL5	Eigene Herstellung
CCL1	Peprtech, Rocky Hill, USA
i[VREY] ₄	Erhalten von Prof. Tilman Hackeng Universität Maastricht
humanes Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RBC Lysis/Fixation solution	Biolegend, San Diego, USA
PGE1	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Apyrase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Dako Fluoreszenz Medium	Agilent, Santa Clara, USA
Spectra M9 Medium	Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, USA
Streptavidin-FITC	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Remibrutinib	Medchemexpress, USA
TGX-221	Selleckchem, Houston, USA
SB2035080	BIOZOL, Eching, Germany
Aspirin	Bayer, Leverkusen, Germany
Cangrelor	Ferrer Deutschland GmbH, Herzogenrath, Germany
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA

Tabelle 4. Verwendete Reagenzien

Antikörper:

FITC anti murines P-Selektin, Wug.E9	emfret Analytics GmbH & Co.KG, Würzburg
PE anti murines aktiviertes α IIb β 3 Integrin, JON/A	emfret Analytics GmbH & Co.KG, Würzburg
APC anti murines CD41, MW Reg 30	Biologend, San Diego, USA
CXCL12 Duo-Set ELISA	R&D SYSTEMS, Minneapolis, USA
PE anti humanes CD 41, HIP8	BD Biosciences, San Jose, USA
FITC anti aktiviertes humanes α IIb β 3 Integrin, PAC-1	BD Biosciences, San Jose, USA
FITC anti humanes P-Selektin, AK-4	BD Biosciences, San Jose, USA
Anti humanes CXCL12	Acris/Origene, Rockville, USA
Anti humanes CXCL4, 170138	R&D Systems, Minneapolis, USA
Fluoreszenzkonjugierter Sekundäran- tikörper: Orgeon green goat anti- mouse	Thermo Scientific, Waltham, USA
Fluoreszenzkonjugierter Sekundäran- tikörper: anti-rabbit IgG STAR635p	Abberior, Germany
PE anti humanes CXCR4, 12G5	Biologend, San Diego, USA
PE anti humanes BTK, A16128B	Biologend, San Diego, USA
anti CXCL12, K15C	Merck KGaA, Darmstadt

FITC anti CXCL12, 79018	R&D SYSTEMS, Minneapolis, USA
Phospho-Btk Tyr551 E5Y6N	Cell Signaling, Cambridge, UK
Phospho-Btk Tyr223, 5082	Cell Signaling, Cambridge, UK
Total Btk, MAB5807	R&D Systems, Minneapolis, USA
Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper	R&D Systems, Minneapolis, USA

Tabelle 5. Verwendete Antikörper

Geräte:

Feinwaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Wasseraufbereitungssystem MilliQ	Merck KGaA, Darmstadt
Stereomikroskop	Carl Zeiss, Jena
High Resolution Kleintierultraschallgerät Vevo® 2100 mit 40-MHz Schallkopf	VisualSonics, Toronto, Canada)
Zellzählungsautomat	Scil Animal Care, Viernheim
FACSCanto II	BD Biosciences, San Jose, USA
Mikrotiterplatte Lesegerät	Tecan, Männedorf, Schweiz
Axio Observer Z1 Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Multiplate-Aggregometer	Roche, Mannheim
Konfokal-/STED-Mikroskop Leica SP8 3X	Leica, Wetzlar
Spritzsaugpumpe	Harvard Apparatus, Holliston USA
BiacoreX100	GE Healthcare Europe GmbH, New York, USA

Tabelle 6. Verwendete Geräte

Verbrauchsmaterialien:

Filterpapier	Macherey-Nagel, Düren
96-Well-Mikrotiterplatte	Merck, Darmstadt
Menzel-Deckglässchen	Thermoscientific, Waltham, USA
Flusskammer 0,1 Luer sticky slides	Ibidi, Gräfelfing
20-Gauge-Butterflykanüle	Intermedica GmbH, Mainz
Multiplate Testzellen	Roche, Mannheim
Plastikspitzen 25 ml	BD Bioscience, San Jose, USA

Silikonschlauch (Innendurchmesser: 1,5 mm, Außendurchmesser: 3,5 mm, Wanddicke: 1 mm)	Wagner & Munz GmbH, München
C1 Sensor Chips	GE Healthcare Europe GmbH, New York, USA

Tabelle 7. Verwendete Verbrauchsmaterialien

Software:

FlowJo v.10	BD Biosciences, San Jose, USA
Metamorph	Molecular Devices, San Jose, USA
Axiovisio	Carl Zeiss, Jena
LAS X	Leica, Wetzlar
3-D LAS	Leica, Wetzlar
BIAevaluation software	GE Healthcare Europe GmbH, New York, USA
Prism Version 8	GraphPad Software, San Diego, USA

Tabelle 8. Verwendete Software

2.1 Tierursprung und Haltung:

C57BL/6 und PF4cre Mäuse wurden bei The Jackson Laboratory gekauft. ApoE^{-/-} CXCL12^{flox/flox} Mäuse wurden von der Zentralen Versuchstierhaltung der LMU München bezogen. ApoE^{-/-} Cxcl12^{flox/flox} und PF4cre⁺ Mäuse wurden gekreuzt bis sich der gewünschte Genotyp ApoE^{-/-} PF4cre Cxcl12^{flox/flox} (als Cxcl12^{Δplt/Δplt} bezeichnet) eingestellt hatte. Der Tierstamm PF4cre CXCL12^{flox/flox} wurde bereits in der Literatur beschrieben [108]. Als Kontrollen wurden gleichaltrige und geschlechtsgleiche ApoE^{-/-} PF4cre CXCL12^{wt/wt} (als CXCL12^{wt/wt} bezeichnet) Tiere verwendet. CreErt^{wt/wt} Cxcr4^{flox/flox} (WT) und CreErt^{tg/wt} Cxcr4^{flox/flox} (CXCR4 KO) Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. Johan Duchene (LMU München) zur Verfügung gestellt. CreErt^{wt/wt} Cxcr4^{flox/flox} und CreErt^{tg/wt} Cxcr4^{flox/flox} Tiere wurden sieben konsekutive Tage mit Tamoxifen injiziert und nach 3 weiteren Wochen für Experimente verwendet. Die Genotypisierung erfolgte durch PCR nach laborinternem Standardprotokoll durch technische Assistenten der Arbeitsgruppe.

Alle Tiere wurden in der Zentralen Versuchstierhaltung Innenstadt des Klinikums der LMU gehalten. Die Tiere wurden bei einem 12h Hell-/Dunkelrhythmus,

kontrollierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Tiere erhielten ad libitum Zugang zu Wasser und je nach Versuchsaufbau normaler oder fett- und cholesterinreicher Diät (21% Fett, 19,5 % Casein, 0,15% Cholesterin) Tiere, die für Versuche verwendet wurden, waren zwischen 10 und 20 Wochen alt und wogen 20-30 g. Die Tierversuche wurden gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt, und von der Regierung von Oberbayern genehmigt. (TVA 55.2-1-54-2532-133-2012 und 177-2016 - 230719). Alle Tierversuche wurden, wie in den Tierversuchsanträgen beschrieben mit einem Aufzeichnungsplan dokumentiert, und die Tiere wurden in den beschriebenen Abständen kontrolliert.

2.2 Narkose und postoperative Analgesie:

Für die arteriellen Thromboseversuche wurde eine antagonisierbare, intraperitoneale (i.p.) Dreifach-Narkose, bestehend aus Medetomidin 0,5 mg/kg, Midazolam 5 mg/kg und Fentanyl 0,05 mg/kg verwendet. Bei Versuchen der Neointimabildung wurde diese Narkose durch Atipamezol 2,5 mg/kg, Flumazenil 0,5 mg/kg, und Naloxon 1,2 mg/kg subkutan antagonisiert. Zur Analgesie wurde Buprenorphin 0,1 mg/kg direkt, 8 h und 24 h postoperativ i.p. injiziert. Für alle weiteren Versuche wurde eine Kombinationsnarkose aus Xylaxin und Ketamin verwendet. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde mit Hilfe des Zwischenzehenreflexes geprüft.

2.3 FeCl₃-induzierte arterielle Thrombose in der A. carotis:

Das FeCl₃-induzierte arterielle Thrombosemodell ist ein vielfach verwendetes Modell zur Untersuchung der arteriellen Thrombusbildung [109, 110]. Bei diesem Modell kommt es zur Bildung von okklusiven Thromben, die humanen arteriellen Thromben stark ähneln [111]. Die Thrombusbildung beruht auf oxidativer Schädigung des Gefäßendothels durch freie Sauerstoffradikale. Dadurch resultiert sowohl direkt als auch durch Exposition von Material aus der Gefäßwand eine Thrombozytenadhäsion und-aktivierung. Dadurch kommt es in Wildtypmäusen zu einer okklusiven Thrombusbildung. Eine Schädigung von Erythrozyten und daraus resultierende Oxidation von Hämoglobin scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen [112]. Die Konzentration der FeCl₃ Lösung, sowie die Dauer der Applikation hat einen Einfluss auf die Verschlusszeiten. Der Entschluss für eine 2-

minütige Applikation einer 10 %igen FeCl_3 Lösung fiel durch Konsultation der Literatur, sowie durch eigene Etablierungsexperimente [110].

2.3.1 Herstellung der 10 %igen FeCl_3 Lösung:

Eine 10 %ige FeCl_3 -Lösung wurde durch Mischen von, mit einer Feinwaage abgewogenem, FeCl_3 Pulver mit MilliQ gefiltertem reinem Wasser hergestellt. Die Lösung wurde für eine Minute gevortext und anschließend steril abfiltriert. Am Anfang jedes Versuchstages wurde eine frische Lösung hergestellt, um Oxidationsprozesse zu verhindern.

2.3.2 Operation

Bestimmte Versuchsgruppen wurden eine Stunde vor der Versuchsdurchführung mit $100 \mu\text{g}$ $[\text{VREY}]_4$ in $200 \mu\text{l}$ PBS (abgekürzt nach englisch phosphate-buffered saline), der äquimolaren Menge von VREY ($19,6502 \mu\text{g}$) in $200 \mu\text{l}$ PBS oder $200 \mu\text{l}$ PBS injiziert.

Nach Etablierung der Narkose wurden die Augen der Versuchstiere mit Augensalbe geschützt und die Zunge vorsichtig aus dem Mund herausgezogen, um das Atmen zu erleichtern. Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage auf eine Wärmeplatte positioniert, der Kopf wurde überstreckt und die Extremitäten und der Kopf wurden mit einem Klebestreifen fixiert. Das OP-Gebiet wurde mit einer Enthaarungscreme enthaart und anschließend mit 70 %igem Isopropanol desinfiziert. Die folgenden Schritte wurden mit Hilfe eines Stereomikroskops durchgeführt. Mit einer kleinen Operationsschere wurde eine mediane Hautinzision durchgeführt. Das subkutane Fett und der Restthymus wurden durchtrennt. Anschließend wurde die A. carotis communis stumpf präpariert und vom N. Vagus getrennt. Das umliegende Gewebe und der N. vagus wurden durch ein kleines grünes Plastikstück (eigene Herstellung) geschützt. Das Operationsgebiet wurde mit einem Tupfer vorsichtig getrocknet.

Anschließend wurde ein $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ großes Stück Filterpapier mit $2 \mu\text{l}$ 10%iger FeCl_3 -Lösung getränkt und für 2 Minuten auf die freigelegte Arterie platziert (Abbildung 6). Nach Ablauf der Zeit wurde das Filterpapier entfernt und das Gebiet mit 0.9% NaCl-Lösung gespült. Die Thrombusbildung wurde in Echtzeit mittels Doppler Sonographie dargestellt (Vevo[®] 2100 High Resolution Kleintierultraschallgerät mit 40-MHz Schallkopf).

Je nach Versuchstyp wurde die Beobachtung nach 20 bzw. 60 Minuten abgebrochen. Falls sich in dieser Zeit kein Thrombus gebildet hatte, wurde die Zeit als 20 bzw. 60 Minuten gewertet. Ein vollständiger Gefäßverschluss wurde als 2 Minuten ohne messbaren Blutfluss definiert. Dokumentiert wurde die Zeit bis zum vollständigen Verschluss der Arterie, die Dauer des Verschlusses, eine mögliche Wiedereröffnung und ein möglicher Reverschluss. Die Tiere wurden anschließend durch kardiale Punktion und Entbluten getötet. Anschließend wurde die A. carotis entnommen und in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Das gewonnene Blut wurde in EDTA Monovetten aufgefangen und es wurde mit einem automatisierten Zellzählungsautomaten ein Blutbild erstellt.



Abbildung 6. Darstellung der OP-Technik für das Thrombosemodell (eigenes Bildmaterial)
Freipräparierte A.carotis links mit aufliegendem in FeCl₃-getränktem Filterpapier (gelb) und einem Stück Kunststoff (grün) zum Schutz des umliegenden Gewebes

2.4 Neointimabildung/Plauebildung nach Gefäßverletzung

Für die Evaluierung der Neointimabildung und Plauebildung nach Gefäßverletzung wurde erst die FeCl₃-induzierte arterielle Thrombose in der A. carotis durchgeführt. Nach Ablauf des Messzeitraums wurde das OP-Gebiet mit 0.9% NaCl-Lösung gereinigt und die Wunde mit Metallclips verschlossen. Die Narkose wurde antagonisiert und eine Analgesie wurde verabreicht. Postoperativ erhielten die Versuchstiere eine fett- und cholesterinhaltige Diät für 4 Wochen, um eine Neointima/Plauebildung zu induzieren. (21 % Fett, 19,5 % Casein, 0,15 %

Cholesterin). Anschließend wurden die A. carotis und die Herzen mit der Aortenwurzel entnommen und in 4 % Paraformaldehyd fixiert.

2.5 Histologie:

Nach Entnahme wurden die Karotiden und Herzen mit Aortenwurzel in 4% Paraformaldehyd für einen Tag fixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurden sie in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden in 4 µM Schnitte geschnitten. Dabei wurde jeder vierte Schnitt aufgenommen. Die Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und mit einer Elastica-Van-Giesson Färbung gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden mikroskopisch analysiert, fotografiert und die Thrombus- bzw. Plaquegröße jedes vierten Schnittes wurde durch Planimetrie bestimmt.

2.6 Ermittlung der Blutungszeit in der Maus

Nach Etablierung einer ausreichend tiefen Narkose wurde ein 1 cm langes Stück der Schwanzspitze abgetrennt. Der Schwanz wurde anschließend in ein mit Kochsalzlösung gefülltes Reagenzgefäß eingetaucht, und die Zeit bis zur Beendigung der Blutung wurde gemessen.

2.7 Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark der Maus

C57BL/6 Versuchstiere bekamen 100 µg des CXCR4 Antagonisten AMD 3465, 100 µg i[VREY]₄ oder den Puffer PBS i.p. injiziert. Nach 4 Stunden wurden die Tiere unter Narkose entblutet. Das Blut wurde in EDTA Monovetten aufgefangen und es wurde mit einem automatisierten Zellzählungsautomaten ein Blutbild erstellt.

2.8 Durchflusszytometrische Bestimmung der murinen Thrombozytenaktivierung

Die Versuchstiere wurden mit Ketamin und Xylazin narkotisiert, mit einer Glaskapillare retrobulbär punktiert und entblutet. Das gewonnene Blut wurde mit Citrat Monovetten aufgefangen und antikoaguliert. Die Durchführung des Versuchs

wurde leicht modifiziert zum Protokoll im Datenblatt des Herstellers der Antikörper durchgeführt. Pro Bedingung wurden 20 µl des Blutes mit 1:200 mit Tyrodes Pufferlösung, supplementiert mit 1 mM CaCl₂, verdünnt. In die Reagenzgefäße wurde jeweils ein FITC (Fluorescein isothiocyanate) konjugierter Antikörper gegen P-Selektin und ein PE (Phycoerythrin) konjugierter Antikörper gegen die aktivierte Form von αIIbβ3 Integrin. Außerdem wurde zur besseren Identifizierung der Thrombozyten, ein gegen CD41 gerichteter APC (Allophycocyanin) konjugierter Antikörper hinzugefügt. Vor Zugabe des Blutes wurde außerdem, je nach Versuchsbedingung, equines Horm Kollagen in aufsteigenden Konzentrationen zugegeben.

Nach 15-minütiger Inkubationszeit wurde die Aktivierung durch Zugabe von PBS gestoppt und die Proben direkt im Anschluss mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Auswertung erfolgte durch die Software FlowJo v.10. Nach Einschluss der CD41 positiven Thrombozyten wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ausgewertet.

2.9 CXCL12-ELISA

Zur Bestimmung der CXCL12 Plasmalevel und der von Thrombozyten freigesetzten Menge an CXCL12 wurde ein CXCL12 Duo-Set ELISA nach Anleitung des Herstellers verwendet. In Kürze: Zuerst wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper beschichtet. Nach dreimaligem Waschen wurden unspezifische Bindungsstellen für eine Stunde mit PBS + 1% Bovinem Serum Albumin blockiert. Nach erneutem Waschen wurden die zu messende Probe und die Standardreihe zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der mit Biotin konjugierte Sekundärantikörper zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde eine mit Streptavidin konjugierte Meerrettichperoxidase zugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut gewaschen und das 1-Step Ultra TMB ELISA Substrat zugegeben, um eine Farbreaktion zu erzeugen. Nach ausreichendem Farbumschlag in der Standardreihe wurde die Reaktion mit 1 N Salzsäure gestoppt und die Farbintensität mit einem Mikrotiterplatte Lesegerät gemessen. Durch Erstellen einer Standardkurve mit Hilfe der Standardproben wurden die CXCL12 Konzentrationen in den restlichen Proben ermittelt.

2.10 Multiparameter-Untersuchung der ex vivo Thrombusbildung von Mausblut

Die Multiparameter-Untersuchung der ex vivo Thrombusbildung mit Mausblut unter Fluss wurden mit Hilfe von Prof. Heemskerk (Universität Maastricht) am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten durchgeführt. Diese Methode wurde angewendet, da eine geringe Blutmenge von 500 μl für diese Versuche ausreichend ist. Dies ist in Anbetracht des geringen Blutvolumens der Maus ein großer Vorteil. Die Durchführung erfolgte, wie bereits publiziert, in mit verschiedenen Oberflächen beschichteten Maastricht Flusskammern (Tiefe 50 μm , Breite: 3 mm, Länge 30 mm) [113-116]. Das Mausblut wurde, wie bereits beschrieben, retroorbital gewonnen und mit 50 μM PPACK, 50 U/ml Fragmin und 5 U/ml Heparin antikoaguliert. Die Flusskammern wurden je nach Versuchsbedingungen mit jeweils 3 *Microspots* beschichtet: a.) 100 $\mu\text{g/ml}$ Horm Kollagen oder b.) 12,5 $\mu\text{g/ml}$ VWF-BP + 250 $\mu\text{g/ml}$ Rhodocytin. Vor Perfusion wurden die Thrombozyten mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ DiOC6 angefärbt. Die Flusskammer wurde für 4 Minuten mit Mausblut und einer Scherrate von 1000 s^{-1} perfundiert. Danach wurde die Flusskammer mit Tyrode's Pufferlösung gespült, und es wurden Phasenkontrastaufnahmen von allen drei *Microspots* mit einem Axio Observer Z1 Mikroskop erstellt. Anschließend wurden die Thromben mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen P-Selektin, aktiviertes $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Integrin und Annexin V gefärbt. Davon wurden Fluoreszenzaufnahmen erstellt. Die aufgenommenen Bilder wurden von verschiedenen Personen verblindet, standardisiert und zum Teil automatisiert mit den Softwares Metamorph und Axiovision ausgewertet.

Es wurden die mit Thrombozyten bedeckte Fläche (P1, %SAC), das Thrombusvolumen (P2, %SAC), die Thrombus Morphologie (P3, Skala 0-5), ein *thrombus multilayer score* (P4, scale 0-3) und das Ausmaß der Thrombozytenkontraktion (P5, Skala 0-3), P-Selektin Expression (P6, %SAC), Annexin V Expression (P7, %SAC) und aktivierte $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Integrin Expression (P8, %SAC) ausgewertet. Der Mittelwert aus den drei Bildern wurde jeweils errechnet, sodass ein Wert pro Parameter und Experiment entstand.

Aus den Parametern P2-P5 und P8, die die Thrombozytenaggregation darstellen, wurde eine Thrombussignatur berechnet [116].

2.11 Blutentnahmen für in vitro und ex vivo Experimente mit humanem Blut

Das Blut wurde gesunden, freiwilligen Spendern abgenommen, die mindesten zwei Wochen zuvor keine thrombozytenhemmenden Medikamente zu sich genommen hatten. Die Probanden stimmten einer experimentellen Verwendung der Blutproben zu. Für die periphere Venenpunktion der V. cubitalis in der Armbeuge wurde eine 20-Gauge-Butterflykanüle verwendet. Das Blut wurde in, mit Hirudin beschichteten, Monovetten gesammelt, wobei das zuerst abgenommene Röhrchen verworfen wurde. Die Versuche wurden zwischen 30 Minuten bis maximal 4 Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt.

2.12 Herstellung von humanem atherosklerotischem Plaquehomogenat

Humanes Plaquehomogenat wurde, wie in der Disseration von Dr. med. Kristina Busygina beschrieben, hergestellt [117]. In Kürze: Das Plaquematerial wurde im Rahmen von Karotisendarterektomieoperationen gewonnen. Die Patienten und die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München stimmten der Verwendung zu (AZ 365-14) Die Plaques wurden vom umgebenden Gewebe getrennt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt [18, 118, 119]. Um Plaquehomogenat herzustellen, wurden die Proben abgewogen und in einem Homogenisierungspuffer homogenisiert (100 mg Feuchtwicht/ml). Es wurden Gemische aus Plaques von fünf verschiedenen Spendern hergestellt. Die Gemische wurden aliquotiert und unmittelbar bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt [120-122]. Für Impedanzaggregometrieversuche wurde das Plaquehomogenat 1:1 und für Flussversuche 1:20 mit PBS verdünnt.

2.13 Messung der Thrombozytenaggregation mittels Impedanzaggregometrie

Die Thrombozytenaggregation in vitro wurde, wie bereits beschrieben, durch Impedanzaggregometrie mit einem Multiplate-Aggregometer gemessen [121, 123, 124]. Für Teilversuche wurde das Blut mit 100 nM des CXCR4 Inhibitors AMD 3465 für 5 Minuten vorinkubiert. Zu Versuchsbeginn wurden 300 µl vorgewärmte

0,9 % NaCl Lösung und 300 µl Blut in die Messküvette pipettiert. Das verdünnte Blut wurde anschließend im System bei 37 °C für 3 Minuten angewärmt. Danach erfolgte die Zugabe der Stimuli: je nach Versuchsbedingung 0,1 µg/ml CXCL12, 0,1 bzw 0,2 µg/ml Horm Kollagen in SKF-Puffer, 833 µg/ml humanes Plaquehomogenat (eigene Herstellung), sowie des Rührers. Bei Teilversuchen wurden CXCL12 mit 5 µM i[VREY]₄, 0,1 µg/ml CCL5 oder 0,1 µg/ml CCL1 für 15 Minuten ohne Blut vorinkubiert, um eine Dimerisierung zu ermöglichen. Für Versuche mit kommerziell erhältlichen Inhibitoren wurde das Blut für 30 Minuten mit Remibrutinib (0,1 µM, Medchemexpress), TGX-221 (0,5 µM, Selleckchem), SB2035080 (30 µM, BIOZOL), Aspirin (300 µg/ml, Bayer) oder Cangrelor (0,34 µg/ml, Ferrer) vorbehandelt. Anschließend wurde für 15 Minuten die Thrombozytenaggregation gemessen und die kumulativen Aggregationswerte in willkürlichen Aggregations-einheiten (AU) über den Zeitraum von 15 Minuten (AU*min) ausgedrückt.

2.14 Analyse der Thrombusbildung von humanem Blut auf atherosklerotischem Plaquematerial

Die Versuche wurden wie bereits mehrfach beschrieben durchgeführt. Jedoch wurde die Durchführung dahingehend modifiziert, dass ein Konfokalmikroskop verwendet wurde, um die Thrombusbildung dreidimensional untersuchen zu können [118, 121, 122, 124].

2.14.1 Beschichtung der Deckgläschen mit atherosklerotischem Plaquematerial:

Plauehomogenat wurde 1:20 mit PBS verdünnt und gevortext. Anschließend wurde das Gemisch für 30 Minuten stehen gelassen. Nachdem sich größere Plauekomponenten abgesetzt hatten, wurde der Überstand abpipettiert.

Deckgläschen wurden mit 70 % Isopropanol gereinigt und 4 µl des Überstandes wurden auf einer Fläche von 5 x 7 mm gleichmäßig ausgestrichen. Die Deckgläschen wurden in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C aufbewahrt.

2.14.2 Vorbereitung des Blutes:

Humanes Vollblut wurde für 15 Minuten mit 1 μM DiOC6 inkubiert, um die Thrombozyten anzufärben. Je nach Versuchsbedingung wurden 1 μM AMD 3465 oder 5 μM i[VREY]₄ dazugegeben.

2.14.3 Durchführung der Flussversuche

Die Flusskammern (0,1 Luer sticky slides) wurden mit 4 % humanem Serumalbumin (HSA) in PBS zur Hemmung unspezifischer Thrombozytenbindung blockiert. Anschließend wurden die vorbereiteten Deckgläschen auf die Flusskammern geklebt und auf dem Mikroskopisch befestigt, welcher sich in einer auf 37 °C vorgeheizten Kammer befindet. Die Flusskammer wurde mit zwei Schläuchen und einer Spritzenpumpe verbunden. Die Flusskammer wurde erst mit PBS gespült und anschließend mit 4 % HSA in PBS blockiert. Anschließend wurde die Flusskammer mit dem vorbereiteten Blut bei einer Scherrate von 600 /s für 6 Minuten perfundiert.

2.14.4 Aufnahme und Analyse der Flussversuche

Die Thrombusbildung wurde in Echtzeit mit einem Konfokalmikroskop und der Software LAS X in 3-D aufgenommen. Nach sechs Minuten wurden eine 3-D Übersichtsaufnahme von 24 Gesichtsfeldern mit der dem LAS Navigator aufgenommen. Daraus wurde mit der Software 3-D LAS ein Thrombusvolumen ermittelt.

2.15 Durchflusszytometrische Bestimmung der humanen Thrombozytenaktivierung

Humanes Vollblut wurde 1:1 mit NaCl Lösung 0.9 % verdünnt und 30 Minuten bei 37 °C mit DMSO oder Remibrutinib (0,1 μM) vorbehandelt. Anschließend wurde das Blut mit 0,01 $\mu\text{g/ml}$ CRP und/oder mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ CXCL12 für 10 Minuten bei 37 °C aktiviert. Daraufhin wurde das Blut mit fluorochromkonjugierten Antikörpern gegen CD 41, gegen P-Selektin und gegen die aktive Form von $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Integrin inkubiert. Nach 15 Minuten wurde eine Erythrozytenlyse und Fixierung der Probe durchgeführt. Die Proben wurden direkt im Anschluss mit Durchflusszytometrie gemessen. Die Auswertung erfolgte durch die Software FlowJo. Nach Einschluss

der CD41 positiven Thrombozyten, wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ausgewertet.

2.16 Durchflusszytometrische Analyse der CXCR4 Internalisierung, CXCL12 Bindung/Expression und i[VREY]₄ Bindung

Um eine CXCR4 Internalisierung zu messen, wurde humanes Blut 1:1 mit PBS verdünnt und für 15 Minuten mit CXCL12 (1 µg/ml) behandelt. Je nach Versuchsbedingung wurde das Blut für 5 Minuten mit i[VREY]₄ (5 µM) vorbehandelt. Nach 15 Minuten wurde eine Erythrozytenlyse und Fixierung der Probe durchgeführt. Anschließend wurden die Probe mit einem Fluoreszenz-konjugierten anti-CXCR4 Antikörper inkubiert. Für die Messung der CXCL12 Bindung/Expression wurde verdünntes humanes Blut für 15 Minuten mit CXCL12 (0,1 µg/ml) oder Kollagen (1 µg/ml) ± i[VREY]₄ (5 µM) behandelt. Anschließend wurde CXCL12 mit zwei verschiedenen Fluorochrom-konjugierten anti-CXCL12 Antikörpern (R&D Systems, Klon: 79018 und Merck, Klon K15C) detektiert. Der K15C Antikörper wurde mit 20-fachem Überschuss Star Red-konjugiert (Abberior GmbH, Göttingen, Germany) und mit einer Zeba™ Entsalzungsröhre aufgereinigt (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). Die Bindung von i[VREY]₄-biot an humane oder murine Thrombozyten wurde in ruhendem oder mit Kollagen aktiviertem verdünntem Blut gemessen (1 µg/ml für humanes und 10 µg/ml für murines Blut). Blut von CreErt^{wt/wt} Cxcr4^{flox/flox} (WT) und CreErt^{tg/wt} Cxcr4^{flox/flox} (CXCR4 KO) Mäusen wurde 4 Wochen nach Tamoxifen Injektion genutzt. i[VREY]₄-biot Bindung an Thrombozyten wurde mittels Streptavidin-FITC Färbung (Vector Laboratories) gemessen. Thrombozyten wurden mittels CD41 Färbung detektiert. Alle Proben wurden mittels Durchflusszytometrie (FACSCanto II, BD Biosciences) analysiert und anschließend mit FlowJo v.10 (BD Biosciences) ausgewertet.

2.17 Western Blots

Humane Thrombozyten wurden aus frischem Vollblut isoliert und mit Natriumcitrat antikoaguliert. Plättchenreiches Plasma wurde mittels Zentrifugation für 10 Minuten bei 200g hergestellt. Das plättchenreiche Plasma wurde mit DMSO oder

Remibrutinib für 30 min bei 37°C präinkubiert; i[VREY]₄ wurde für 5 Minuten präinkubiert. Anschließend wurden die Thrombozyten durch CXCL12 oder CRP-XL stimuliert. Die Aggregation wurde mittels CGS Puffer, welchem Protease- und Phosphataseinhibitoren zugesetzt wurden, gestoppt. Dann wurden die Thrombozyten mittels Zentrifugation bei 14000g für 1 Minute pelletiert und mit Hilfe eines Laemmli Puffers für 10 Minuten bei 95°C lysiert. Die Proben wurden anschließend mittels Gelelektrophorese mit 8 und 10%igem SDS-Polyacrylamide Gelen getrennt und mit folgenden Antikörpern inkubiert: Phospho-Btk Tyr551 (E5Y6N), Tyr223 (#5082, Cell Signaling; 1:1000) und Gesamt Btk (R&D Systems; MAB5807). Die Western Blots wurden wie bereits zuvor beschrieben durchgeführt [125]. Die Membranen wurden mit Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörpern inkubiert (R&D Systems; 1:2000) und mit SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher) detektiert.

2.18 STED-Mikroskopie von isolierten humanen Thrombozyten

Die Blutabnahme erfolgte wie im Abschnitt 2.11 beschrieben, jedoch in ETDA Monovetten, in welche 1 µl PGE1 (50 µg/ml) zur Hemmung der Thrombozytenaktivierung vorgelegt wurde. Das Vollblut wurde 15 Minuten bei 300 g ohne Bremse zentrifugiert, um anschließend plättchenreiches Plasma zu erhalten. In neue Reaktionsgefäße wurde 3 µl PGE1 (5 µg/ml), 30 µl Apyrase (1 Unit/ml) und 3 ml Citrat-Dextrose Puffer (ACD) vorgelegt. Das plättchenreiche Plasma wurde zu der vorgelegten Lösung hinzugefügt und bei 1500 g für 10 Minuten zentrifugiert. Für Versuche mit aktivierten Thrombozyten wurden die Thrombozyten in Thyrode's Puffer Lösung resuspendiert und mit 1 µg/ml und 10 µg/ml des PAR4 Agonisten AY-NH₂ für 10 Minuten aktiviert und erneut bei 1500 g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipetiert und die pelletierten Thrombozyten in einer 1:1 Mischung aus ACD Puffer und einer Fixations-/Permeabilisations Lösung resuspendiert und für eine Stunde inkubiert. Die Lösung wurde anschließend erneut bei 1500 g für 10 Minuten zentrifugiert in mit einer Permeabilisierungs-/Waschlösung resuspendiert. Die unspezifischen Bindungsstellen der darin enthaltenen Thrombozyten wurden mit 1 % Ziegenserum für 15 Minuten blockiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit 5 µg/ml primären Antikörpern gegen CXCL12, CXCL4 und Tubulin über Nacht bei 4°C. Nach erneutem

Waschen und Zentrifugieren wurden die Thrombozyten mit fluorochromgefärbten Sekundärantikörpern für 1 Stunde bei Raumtemperatur gefärbt. Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren wurden die isolierten und gefärbten Thrombozyten mit Dako Fluoreszenz Medium resuspendiert, auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Deckgläschen eingedeckelt. Die Aufnahmen der Thrombozyten erfolgte mit einem STED (abgekürzt nach englisch stimulated emission depletion) Mikroskop.

2.19 Herstellung der Chemokine

Die Aufreinigung der rekombinanten Chemokine CXCL12 und CCL5 ist in unserer Arbeitsgruppe etabliert [126].

Zur Herstellung von ¹⁵N markiertem CXCL12 wurde Spectra M9 Medium genutzt. Die Biotinylierung erfolgte mit Heparinsäulen. Die Reinheit, korrekte Größe, Faltung und biologische Aktivität der produzierten Chemokine wurde durch Coomassie Gele, Massenspektrometrie, NMR und Chemotaxisversuchen kontrolliert.

2.20 Herstellung des i[VREY]₄ Peptids

Das i[VREY]₄ Peptid wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hackeng (Universität Maastricht) hergestellt und erfolgte analog zu Herstellung des [VREY]₄ Peptids [81]. Jedoch wurde zur Erhöhung der Stabilität und für eine verbesserte Präsentation der VREY Sequenz ein neues Gerüstpeptid verwendet (TASP-02).

2.21 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie wurde mit einem BiacoreX100 Gerät und Neutravidin modifizierten C1 Sensor Chips durchgeführt. Für Bindungsversuche wurde ein Chip mit biotinyliertem i[VREY]₄ konjugiert und mit CXCL12 oder CCL5 in Pufferlösung bei 90 µl/min für 180 s perfundiert. Die Darstellung und Analyse der Kurven erfolgte mit der BIAevaluation software. Für Inhibitionsversuche wurde ein mit biotinyliertem CXCL12 konjugierter Chip mit einer konstanten Menge an CCL5 und unterschiedlichen Mengen an i[VREY]₄ perfundiert. Daraus konnte eine prozentuale Inhibition errechnet werden.

2.22 Kernspinresonanzspektroskopie

Die Kernspinresonanzspektroskopie (abgekürzt NMR nach englisch nuclear magnetic resonance) wurde, wie bereits beschrieben, von Dr. Hans Ippel an der Universität Maastricht, durchgeführt [81].

2.23 Statistische Analysen

Alle Werte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung von n Experimenten angegeben. Zur Analyse und zur Erstellung der Graphen wurde die Software GraphPad Prism 8 verwendet. Die Daten wurden zuerst mit dem D'Agostino-Pearson Omnibus Test auf eine Gaußsche Normalverteilung hin getestet. Bei nur zwei Versuchsbedingungen und verbundenen Stichproben wurden bei Normalverteilung mit einem gepaarten t-Test auf Signifikanz getestet. Wenn keine Normalverteilung vorlag, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewendet. Nicht verbundene Stichproben wurden bei zwei Versuchsbedingungen und Normalverteilung mit einem ungepaarten t -Test und bei Fehlen einer Normalverteilung mit dem Mann-Whitney U-Test getestet.

Bei mehr als zwei Stichproben wurde eine Einweg-Varianzanalyse (auch ANOVA) bei vorhandener Normalverteilung und der Kruskal-Wallis Test bei Fehlen einer Normalverteilung angewandt. Nominalskalierte Daten wurden mit dem Exakten Test nach Fisher ausgewertet.

Die Signifikanzniveaus werden folgendermaßen dargestellt: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung der CXCL12-CXCR4 Achse auf die humane Thrombozytenaktivierung

3.1.1 Impedanzaggregometrie

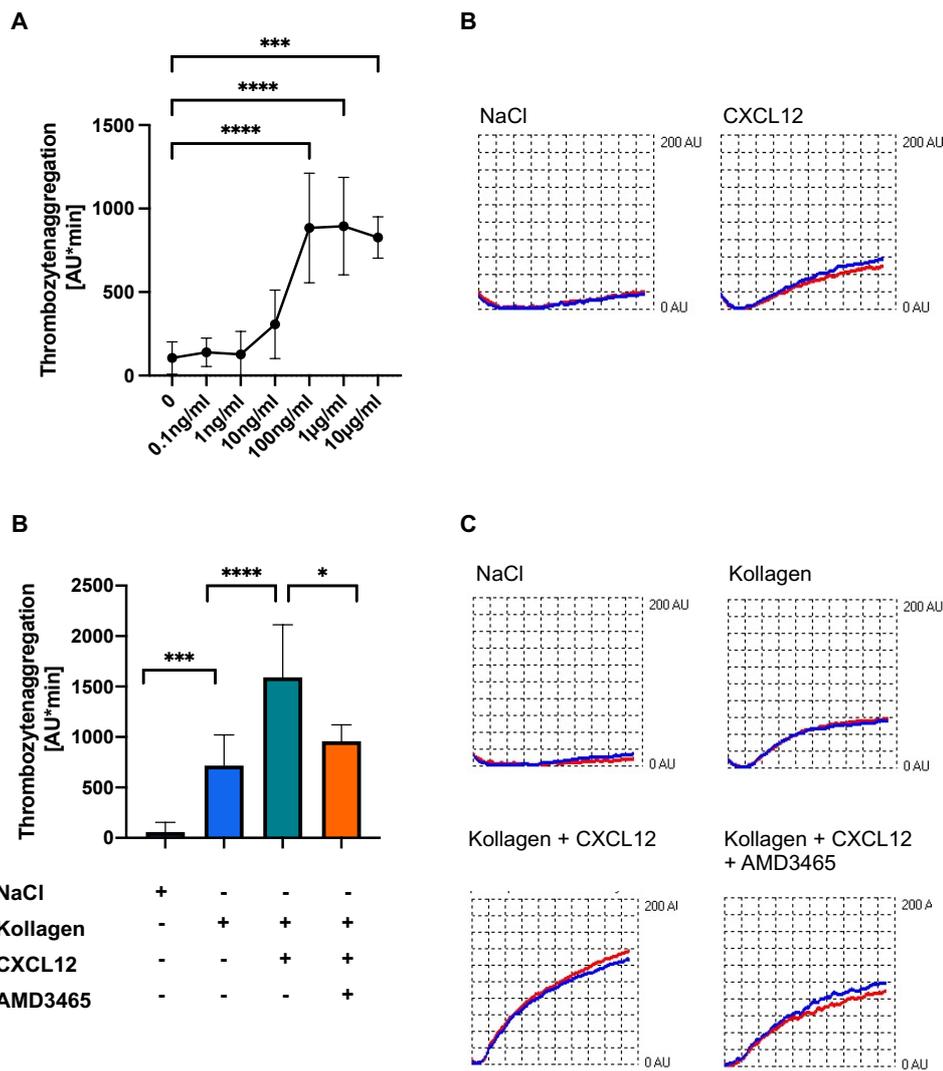


Abbildung 7. CXCL12 verursacht eine Thrombozytenaggregation allein oder in Kombination mit Kollagen

(A) Dosis-Wirkungskurve von CXCL12 auf die Thrombozytenaggregation in menschlichem Vollblut, gemessen für 15 Minuten mittels Impedanzaggregometrie. (B) Repräsentative Darstellung von Impedanzaggregometriekurven der Kontrolle und 0,1 µg/ml CXCL12. (C) Darstellung des Einflusses von unterschiedlichen Kombinationen aus Kollagen (0,1 µg/ml), CXCL12 (0,1 µg/ml) und AMD3465 (100 nM) auf die Thrombozytenaggregation gemessen für 15 Minuten mittels

Impedanzaggregometrie. Für Versuchsbedingungen mit AMD 3465 wurde das Blut für 5 Minuten mit AMD 3465 vorinkubiert. Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD), n = 6-10, *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001, ****: p < 0,0001 analysiert mit ANOVA (C) Repräsentative Darstellung von Impedanzaggregometriekurven der durchgeführten Versuche.

Die Wirkung der CXCL12-CXCR4 Achse auf die Thrombozytenaggregation in humanem Vollblut wurde mit Hilfe von Impedanzaggregometrie untersucht. Die Zugabe von CXCL12 (0,1 μ g/ml) zu Vollblut führte zu einer mäßig starken, aber mit verschiedenen Spendern reproduzierbaren, signifikanten Thrombozytenaggregation. Bei Kostimulation durch suboptimale Dosen mit Kollagen (0,1 μ g/ml) konnten 0,1 μ g/ml CXCL12 die Thrombozytenaggregation in vitro deutlich und signifikant verstärken. Die dabei erreichten Werte entsprechen in etwa denen einer optimalen Stimulation mit Kollagen.

Dieser CXCL12-vermittelte Effekt ließ sich durch Zugabe des CXCR4-Inhibitors AMD3465 hemmen (Abbildung 7).

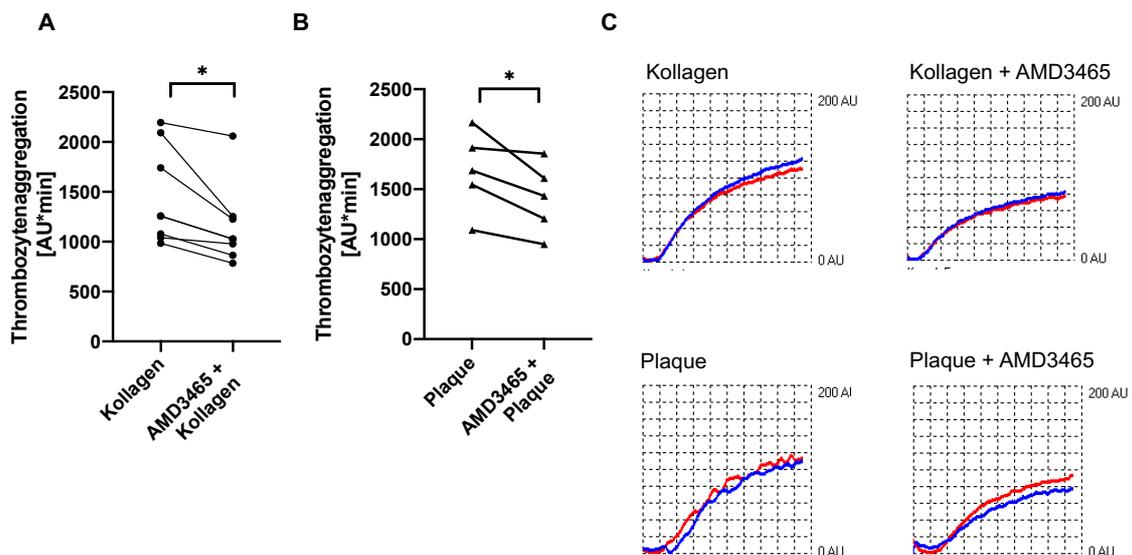


Abbildung 8. Verminderung der Kollagen- und Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation durch den CXCR4-Antagonisten AMD3465

Darstellung des Einflusses von AMD3465 (100 nM) auf (A) die Kollagen- (0,2 μ g/ml) und (B) Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation (833 μ g/ml), gemessen mittels Impedanzaggregometrie. Es erfolgte eine Vorinkubation des Blutes mit AMD 3465 für 5 Minuten. (C) Repräsentative Darstellung von Impedanzaggregometriekurven der durchgeführten Versuche. n = 7 (A), n = 6 (B), MW \pm SD, *: p < 0,05 analysiert mit gepaartem t-Test.

Um eine Thrombozytenaggregation zu induzieren, die die Mechanismen einer arteriellen Thrombose besser widerspiegelt, wurde der Versuch ebenfalls mit optimalen Dosen an Kollagen (0,2 µg/ml) oder humanem atherosklerotischen Plauehomogenat (833 µg/ml) durchgeführt. Dies führte zu einer starken Thrombozytenaktivierung. Die Zugabe von 100 nM AMD3465 konnte sowohl die Kollagen- als auch die Plaue-induzierte Thrombozytenaggregation signifikant vermindern (Abbildung 8).

Zur Untersuchung der, durch CXCL12-vermittelten, Mechanismen der Thrombozytenaktivierung, wurden Thrombozyten in Vollblut mit Kollagen allein oder mit Kollagen und CXCL12 aktiviert und anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD41, P-Selektin und aktiviertes $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Integrin gefärbt. Die mittlere Fluoreszenzintensität wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Die Kombination aus Kollagen und CXCL12 führte zu einer signifikant stärkeren Expression von aktiviertem $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Integrin, jedoch nicht von P-Selektin. Eine Aktivierung mit humanem atherosklerotischem Plauematerial, dem Pathomechanismus in der Atherothrombose, führte bei einer Vorinkubation des Blutes mit AMD3465 zu einer verminderten Expression an aktiviertem $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Integrin (Abbildung 9).

3.1.2 Nachweis der CXCL12 Expression und Sekretion in ruhenden und aktivierten Thrombozyten

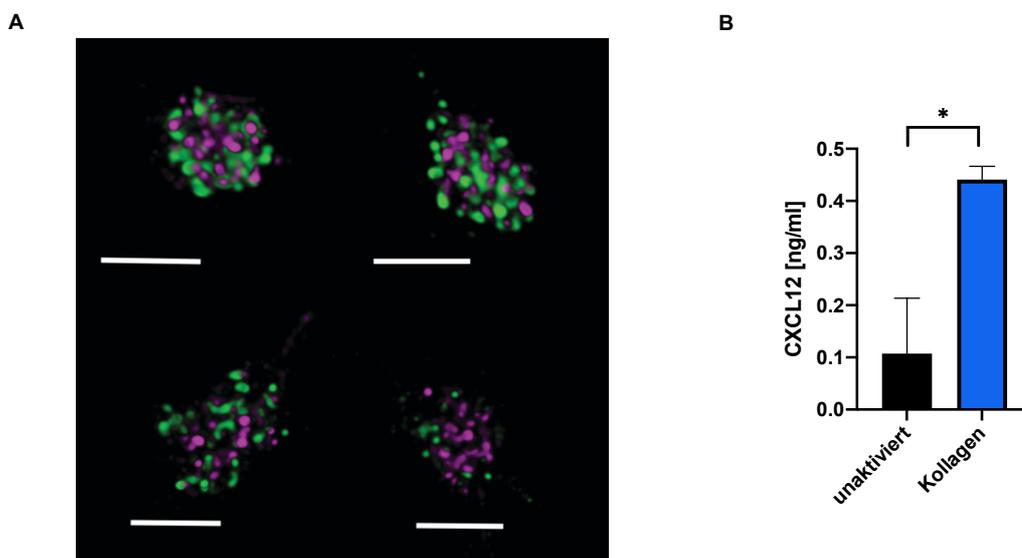


Abbildung 9. Nachweis von CXCL12 in ruhenden und aktivierten Thrombozyten

(A) Hochauflösende STED-mikroskopische Immunfluoreszenzaufnahmen von isolierten, permeabilisierten ruhenden Thrombozyten mit indirekter Antikörperfärbung gegen CXCL12 (lila) und CXCL4 (grün), Maßstabbalken = 2 μm (B) Messung des von Thrombozyten unter Kollagenstimulation (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) freigesetzten CXCL12 mittels ELISA. $n = 2-3$, $\text{MW} \pm \text{SD}$, *: $p < 0,05$ analysiert mit ungepaartem t-Test (B)

Zur Visualisierung der CXCL12 Expression wurden isolierte Thrombozyten fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen CXCL12 angefärbt. Mittels hochauflösender STED Mikroskopie konnte ein granuläres Verteilungsmuster der CXCL12 Signale in ruhenden Thrombozyten gezeigt werden. Bei Aktivierung zeigte sich eine Verlagerung des CXCL12. Dies lässt auf eine Freisetzung der beiden Chemokine bei Thrombozytenaktivierung schließen.

Die durchgeführten CXCL12-ELISA Versuche konnte bestätigen, dass Thrombozyten nach Stimulation CXCL12 ausschütten (Abbildung 9).

3.1.3 Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation unter arteriellen Flussbedingungen

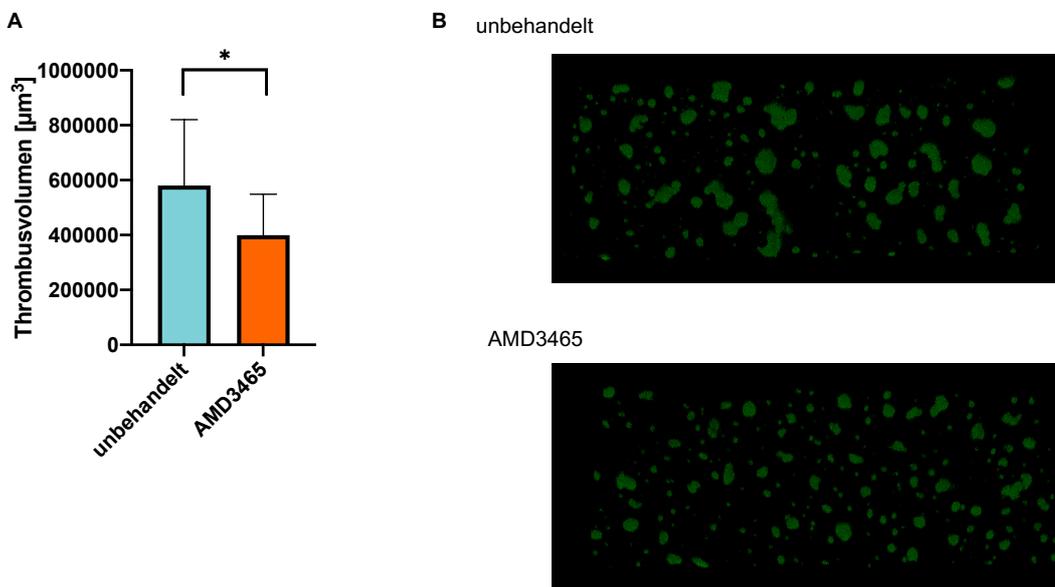


Abbildung 10. Verminderung der Thrombusbildung auf humanem atherosklerotischem Plaquematerial unter arteriellen Flussbedingungen durch den CXCR4-Antagonisten AMD3465

(A+B) Humanes Vollblut wurde unter arteriellen (600 s^{-1}) Flussbedingungen über humanes atherosklerotisches Plaquematerial perfundiert. Die Thrombozyten wurden im Vorhinein für 15 Minuten mit 1 μM DiOC6 angefärbt. Ein Teil der Proben wurde vor Versuchsbeginn für 15 Minuten mit 1 μM AMD3465 behandelt. Nach 6 Minuten Perfusion wurde das 3-D Thrombusvolumen

mittels Konfokalmikroskopie ausgewertet. n = 12, MW \pm SD , *: p < 0,05 analysiert mit ungepaartem t-Test. (B) Repräsentative Darstellung des ausgewerteten 3-D Thrombusvolumens der beiden Versuchsgruppen

Um die pathophysiologischen Vorgänge einer Atherothrombose ex vivo zu simulieren, wurden Flusskammern mit humanem atherosklerotischem Plaquematerial beschichtet und unter arteriellen Flussbedingungen (600/s) mit Vollblut perfundiert. Dies führte mit unbehandeltem Vollblut zum Aufbau stabiler Thromben auf dem Plaquematerial. Eine Vorinkubation des Blutes mit dem CXCR4 Inhibitor AMD3465 (1 μ M) führte zu einer signifikanten Verminderung des, mittels Konfokalmikroskopie ermittelten, Thrombusvolumens (Abbildung 10).

3.2 In vivo Versuche in Versuchstieren mit CXCL12-defizienten Thrombozyten

3.2.1 Charakterisierung der Cxcl12 ^{Δ plt/ Δ plt} Versuchstiere

	Cxcl12 ^{wt/wt}	Cxcl12 ^{Δplt/Δplt}	Signifikanz
Plasma CXCL12 level, pg/ml	561,8 \pm 345,5	515,4 \pm 221,2	ns
Gewicht, g	29,4 \pm 4,5	28,6 \pm 4,6	ns
Thrombozyten, 10 ⁹ /l	1260 \pm 274,7	1257 \pm 280,7	ns
MPV, fl	5,1 \pm 0,5	5 \pm 0,5	ns
Leukozyten, 10 ⁹ /l	3,3 \pm 1,1	2,8 \pm 0,8	ns
Lymphozyten, %	68,1 \pm 21	76,6 \pm 8,7	ns
Monozyten, %	5 \pm 2,4	4,4 \pm 1,5	ns
Neutrophile Granulozyten, %	26,9 \pm 18,7	19,1 \pm 7,6	ns
Erythrozyten, 10 ¹² /l	8,4 \pm 0,38	8,4 \pm 0,7	ns
Hämoglobin, mmol/l	8 \pm 0,3	7,9 \pm 0,6	ns

Tabelle 9. Blutparameter der Versuchstiere mit CXCL12- defizienten Thrombozyten im Vergleich zu Kontrolltieren

Die Blutparameter wurden mit einem automatisierten Zellzählungsautomaten und einem CXCL12 ELISA bestimmt. n = 10, MW \pm SD, analysiert mit ungepaartem t-Test.

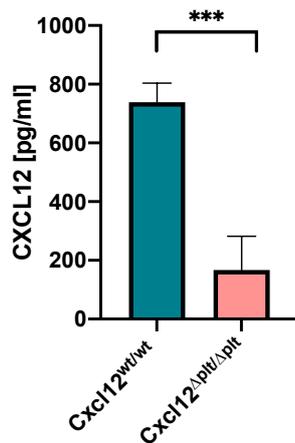


Abbildung 11. Verminderte CXCL12-Freisetzung von aktivierten PF4cre CXCL12^{flox/flox} Thrombozyten im Vergleich zu Kontrolltieren

Die CXCL12 Freisetzung aus mit Kollagen aktiviertem Blut (10 µg/ml) aus dargestellten Versuchstieren wurde mittels ELISA bestimmt. n = 3, MW ± SD , ***: p < 0,001 analysiert mit ungepaartem t-Test

Eine ubiquitäre CXCL12-Defizienz ist bei der Maus letal. Deshalb, und um zell-spezifische Effekte zu untersuchen wurden, Versuchstiere mit einer thrombozytenspezifischen CXCL12-Defizienz gezüchtet. Zur Generierung von Versuchstieren mit einer Veranlagung zur Hypercholesterinämie und einer thrombozytenspezifischen CXCL12-Defizienz wurden ApoE^{-/-} Cxcl12^{flox/flox} und PF4cre Mäuse gekreuzt, bis sich der gewünschte Genotyp ApoE^{-/-} PF4cre Cxcl12^{flox/flox} (Cxcl12^{Δplt/Δplt}) eingestellt hatte. Die Genotypisierung wurde mittels PCR durchgeführt. Der Tierstamm PF4cre CXCL12^{flox/flox} wurde bereits in der Literatur beschrieben [108]. ELISA-Versuche konnten die thrombozytäre CXCL12-Defizienz bestätigen: Aktivierte Thrombozyten von Cxcl12^{Δplt/Δplt} Tieren setzten kaum CXCL12 frei (Abbildung 11). Jedoch besaßen die Tiere unveränderte CXCL12 Plasmaspiegel. Bei Untersuchung des Blutes und des Knochenmarks konnten keine signifikanten Veränderungen der Hämatopoese in Bezug auf Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozytensubtypen wie T Zellen, Monozyten und Granulozyten, festgestellt werden (Tabelle 9). Als Kontrolle wurden jeweils ApoE^{-/-} PF4cre Cxcl12^{wt/wt} Tiere (Cxcl12^{wt/wt}) verwendet.

3.2.2 FeCl₃ induzierte Thrombose in der A. carotis

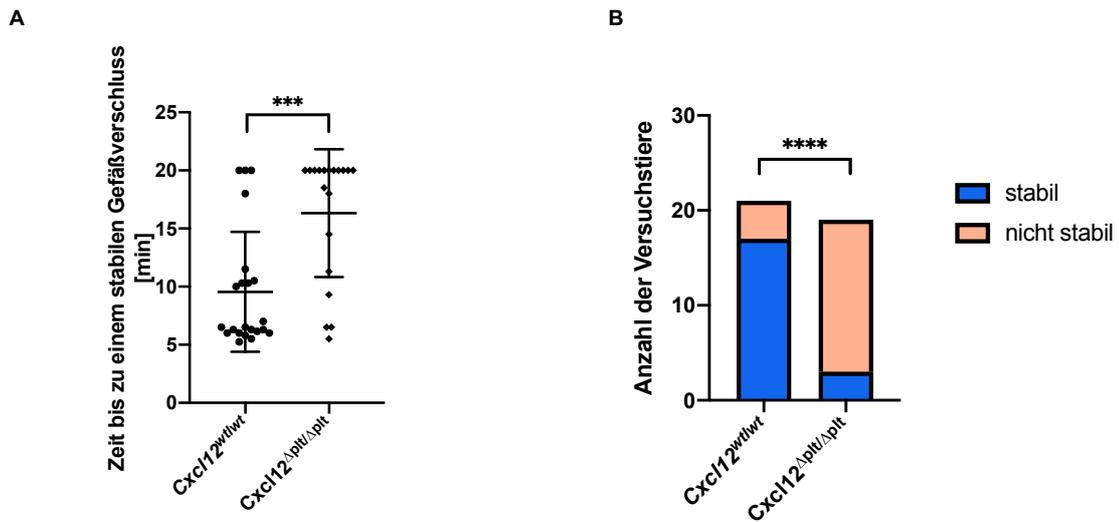


Abbildung 12. Verminderte arterielle Thrombusbildung in vivo bei Versuchstieren mit CXCL12 defizienten Thrombozyten

(A) Die Zeit bis zu einem stabilen Verschluss der A. carotis (2 Minuten kein Blutfluss) wurde nach FeCl₃-induzierter Thrombose für maximal 20 Minuten mittels Doppler Sonographie gemessen. (B) Die Versuchstiere wurden eingeteilt in Tiere mit stabilen und nicht stabilen Verschlüssen der A. carotis n = 22, MW ± SD, ***: p < 0,001 analysiert mit Mann-Whitney U Test.

Zur experimentellen Untersuchung der arteriellen Thrombose wurde das FeCl₃ induzierte Thrombosemodell in der A. carotis gewählt. Dabei entstehen Thromben, die humanen arteriellen Thromben im Aussehen und in Zusammensetzung ähneln [111]. Cxcl12^{Δplt/Δplt} Versuchstiere zeigten eine signifikant verlängerte Zeit bis zu einem stabilen Verschluss der A. carotis. Zudem bildete ein signifikant größerer Anteil der Tiere keine stabilen Verschlüsse (Abbildung 12). Dies zeigt, dass thrombozytäres CXCL12 einen relevanten in vivo Mediator in der arteriellen Thrombusbildung und -konsolidierung darstellt.

3.2.3 Neointimabildung nach arterieller Thrombose

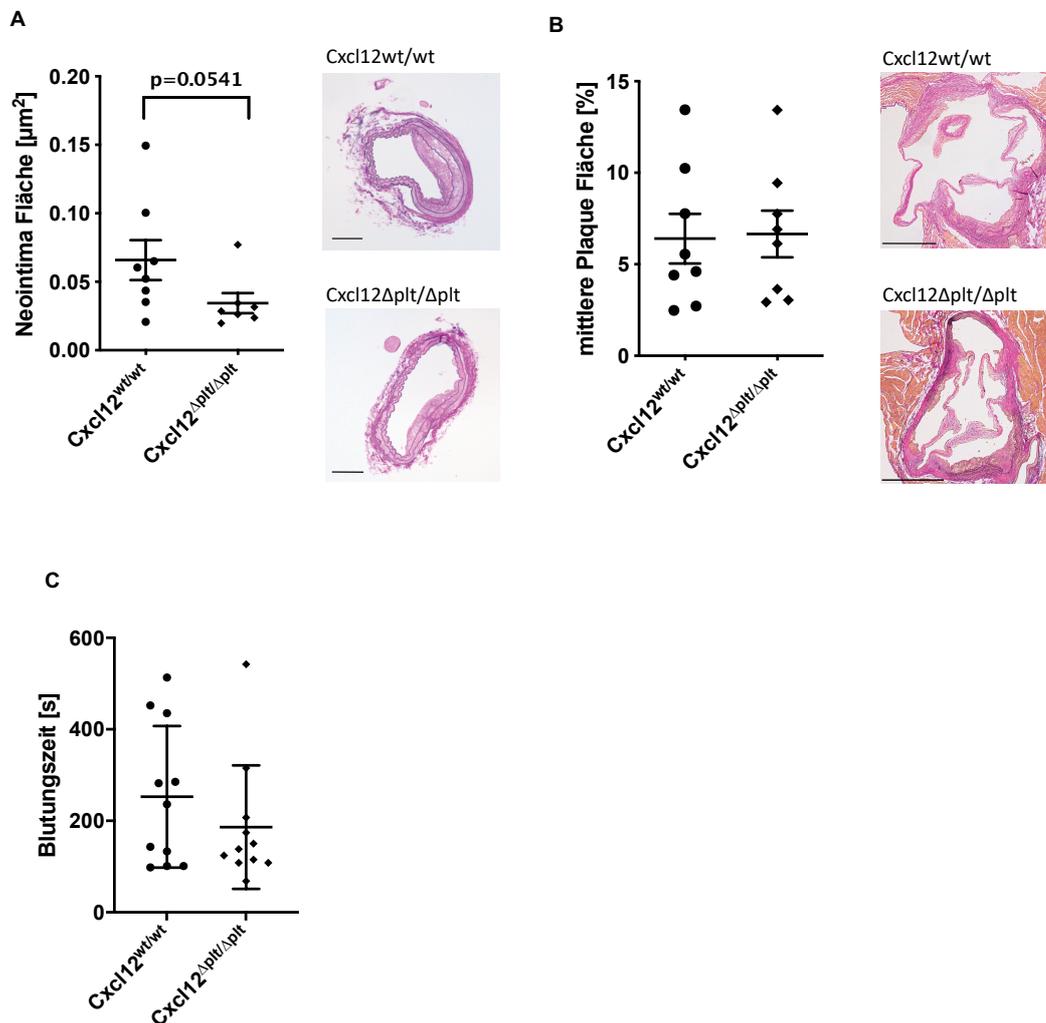


Abbildung 13. Analyse der Plaquebildung und Blutungszeit bei Versuchstieren mit CXCL12 defizienten Thrombozyten

Histologische Auswertung (EVG) der Neointimafläche nach arterieller Thrombose und anschließender 4-wöchiger cholesterinreicher Diät in der geschädigten A. carotis (**A**, Maßstab Balken = 100 μm) und der atherosklerotischen Plaquefläche in der Aortenwurzel (**B**, Maßstab Balken = 500 μm). $n = 8$, (**C**) Messung der murinen Blutungszeit, $n = 10$, $\text{MW} \pm \text{SD}$, alle analysiert mit ungepaartem t-Test

Zur Untersuchung der Neointimabildung nach arterieller Thrombose und de-novo Plaquebildung wurden die Versuchstiere nach FeCl_3 induzierter Thrombose für 4 Wochen mit einer fett- und cholesterinreichen Diät gefüttert. Die histologische Auswertung der Neointimafläche in der vorgeschädigten A. carotis von $\text{Cxcl12}^{\Delta\text{plt}/\Delta\text{plt}}$ Tieren erbrachte keinen signifikanten Unterschied. Jedoch zeigte sich ein Trend zu einer kleineren Neointimafläche (Abbildung 13A).

3.2.4 Frühe Atherosklerose in der Aortenwurzel

Um den Einfluss von thrombozytärem CXCL12 auf die de-novo Atherogenese, ohne vorangegangene Schädigung, zu untersuchen wurden ApoE^{-/-} PF4cre CXCL12^{flox/flox} Tiere und passende Kontrolltiere für 4 Wochen mit einer fett- und cholesterinreichen Diät gefüttert. Die Auswertung der Plaquesgröße in der Aortenwurzel zeigte keine Unterschiede. Damit scheint thrombozytäres CXCL12 keine Rolle in der frühen de-novo Atherogenese zu spielen (Abbildung 13B).

3.2.5 Untersuchung der Blutungszeit

Um eine etwaige Konsequenz einer thrombozytären CXCL12 Deletion auf die primäre Hämostase nach einer Verletzung zu untersuchen, wurde ein murines Blutungsmodell angewandt. Bei den beiden Vergleichsgruppen zeigte sich kein Unterschied in der Blutungszeit. Thrombozytäres CXCL12 scheint damit keine Auswirkung auf die Blutstillung zu haben (Abbildung 13C).

3.3 Untersuchung von CXCL12-defizienten Thrombozyten

3.3.1 Multiparameter-Untersuchung der ex vivo Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen

Kollagen

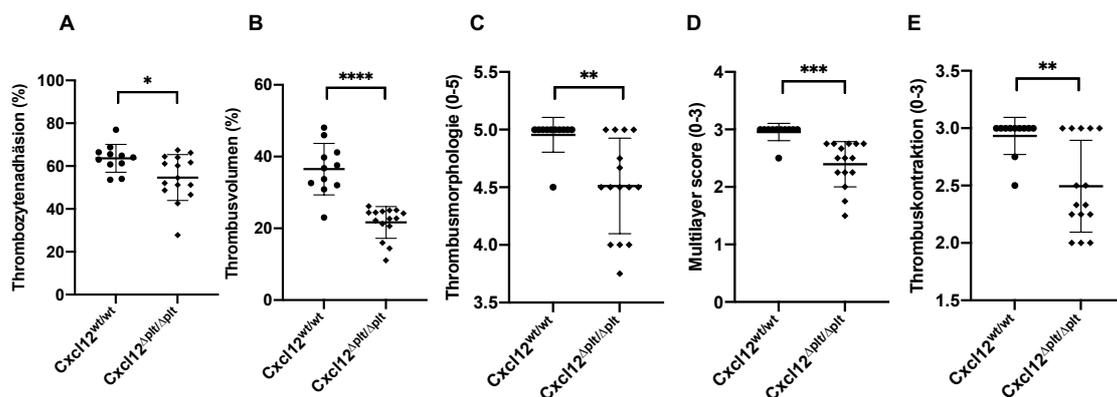


Abbildung 14. Verminderte Thrombusbildung CXCL12 defizienter Thrombozyten auf Kollagen

Murines Blut wurde unter arteriellen Flussbedingungen (1000 s⁻¹) für 4 Minuten über 3 eine mit Kollagen beschichtete Flusskammer perfundiert. Anschließend erfolgte eine mikroskopische

Multiparameter-Auswertung der Thromben. n=11-15, MW \pm SD, *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001, ****: p < 0,0001, analysiert mit ungepaartem t-Test.

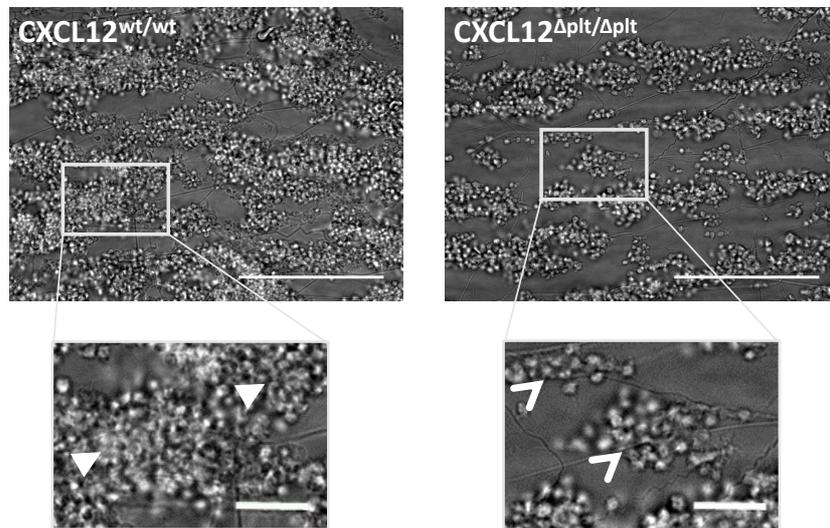


Abbildung 15. Repräsentative Abbildungen der Multiparameter-Untersuchung der Thrombusbildung auf Kollagen

Repräsentative mikroskopische Darstellung der unterschiedlichen Thrombusmorphologie mit Zoom, der verdeutlicht, dass Cxcl12wt/wt Versuchstiere große, kontrahierte Thromben erzeugen, wobei die einzelnen Thrombozyten kaum zu unterscheiden sind. Cxcl12 Δ plt/ Δ plt Versuchstiere hingegen erzeugen kleinere, weniger kontrahierte Thromben mit klar erkennbaren Thrombozyten. Maßstabballen Übersichtsbild = 50 μ m, Maßstabballen Zoom = 10 μ m.

VWF-BP, Laminin und Rhodocytin

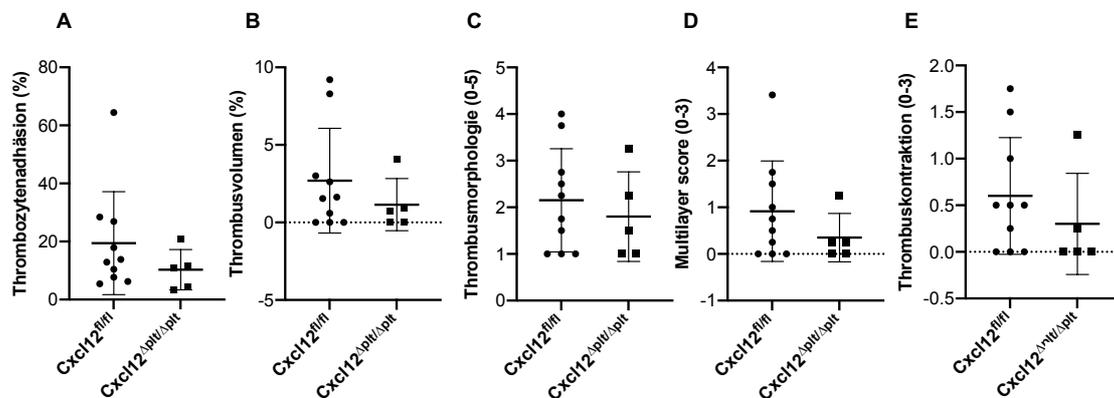


Abbildung 16. Unveränderte Thrombusbildung CXCL-12 defizienter Thrombozyten auf VWF-BP, Laminin und Rhodocytin

Analog zu Abbildung 15 erfolgte dieselbe Untersuchung in einer Flusskammer, die mit VWF-PB, Laminin und Rhodocytin beschichtet wurde. MW \pm SD, n = 5 – 10, analysiert mit ungepaartem t-Test

Zur Validierung und genaueren Charakterisierung der prothrombotischen Eigenschaften von thrombozytärem CXCL12 wurden Multiparameter-Untersuchungen der Thrombusbildung in Flusskammern unter arteriellen Flussbedingungen (1000/s) und verschiedenen Beschichtungen durchgeführt. In einer Versuchsreihe wurden mit fibrillärem Kollagen beschichtete Kammern verwendet; damit wird eine über GPIIb/IIIa, GPIIb/IIIa und Integrin $\alpha_2\beta_1$ vermittelte Thrombozytenaktivierung eingeleitet. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Flusskammern mit VWF-BP, Laminin und Rhodocytin beschichtet. Dies wiederum bewirkt eine CLEC-2 vermittelte Thrombozytenaktivierung.

Die Auswertung der Versuche, die mit Kollagen beschichteten Flusskammern durchgeführt wurden, zeigte bei Verwendung von ApoE^{-/-} PF4cre CXCL12^{flox/flox} Blut im Gegensatz zu Kontrollblut folgende Ergebnisse: Es zeigte sich ein geringgradiger, jedoch signifikanter Unterschied der mit Thrombozyten bedeckten Fläche (P1, %SAC). Das Thrombusvolumen (P2, %SAC), die Thrombusmorphologie (P3, Skala 0-5) und das Ausmaß der Thrombozytenkontraktion (P5, Skala 0-3) zeigten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 14 und 15).

In den Versuchen mit den mit VWF-BP, Laminin und Rhodocytin beschichteten Flusskammern zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Jedoch zeigte sich in Vergleich mit der Kollagenbeschichtung insgesamt deutlich kleinere Thromben (Abbildung 16). Damit scheint thrombozytäres CXCL12 insbesondere bei Kollagen-vermittelter Thrombozytenaktivierung relevant zu sein. Thrombozytäres CXCL12 wirkt sich dabei vor Allem auf Mechanismen der Thrombozytenaggregation aus.

3.3.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der murinen Thrombozytenaktivierung

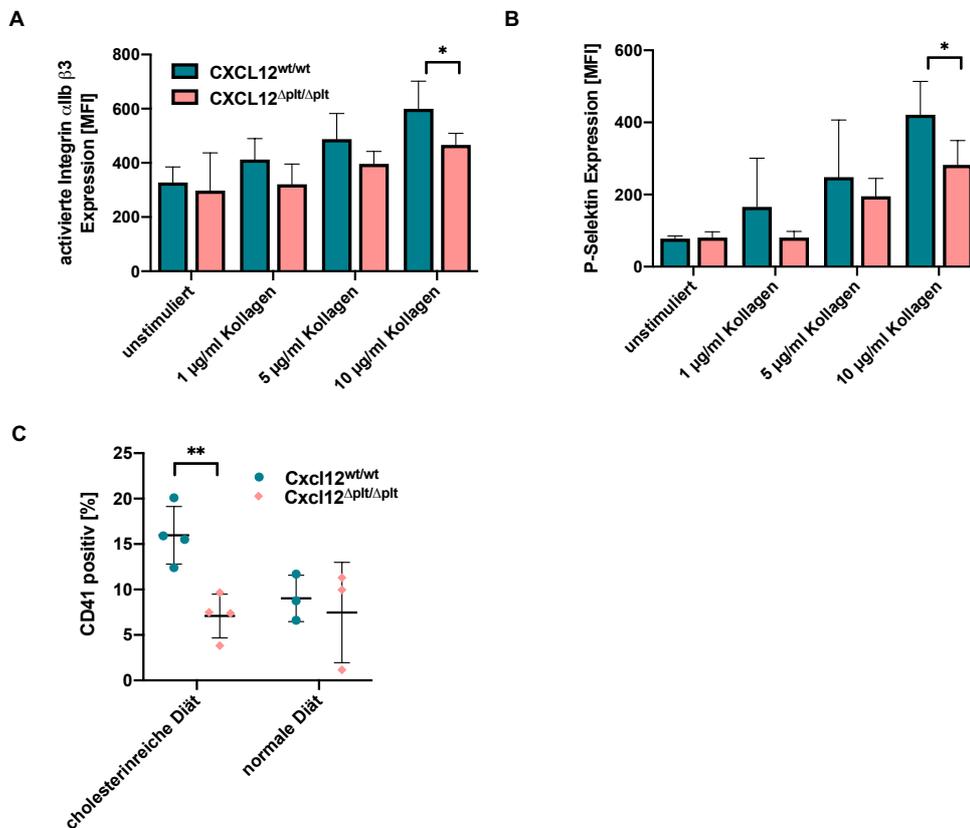


Abbildung 17. Verminderte Thrombozytenaktivierung der CXCL-12 defizienten Thrombozyten

(A+B) Murines Blut wurde mit Kollagen (1, 5 und 10 µg/ml) stimuliert und die Expression von P-Selektin und aktiviertem αIIbβ3 Integrin wurde auf der Thrombozytenoberfläche mittels direkter Antikörperfärbung durchflusszytometrisch bestimmt, n = 6. **(C)** Neutrophile Granulozyten-Thrombozyten-Komplexe im Blut von Versuchstieren unter cholesterinreicher und normaler Diät wurden durchflusszytometrisch untersucht n=3-4 (C) MW ± SD, *: p < 0,05, **: p < 0,01 analysiert mit ungepaartem t-Test.

Um die Mechanismen der Thrombozytenaktivierung besser auf der Einzelzellebene zu untersuchen, wurden murine Thrombozyten mit steigenden Konzentrationen an Kollagen aktiviert, mit Antikörpern gegen P-Selektin und aktiviertes αIIbβ3 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass bei Stimulation mit 10 µg/ml Kollagen, CXCL12 defiziente Thrombozyten eine geringere aktivierte αIIbβ3 Integrin und P-Selektin Expression aufweisen. Außerdem zeigten CXCL12-defiziente Versuchstiere unter cholesterinreicher, aber nicht unter normaler Diät, eine verminderte Komplexbildung von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten (Abbildung 17).

3.4 Untersuchung der Signalwege, welche für eine CXCL12-abhängige Thrombozytenaggregation benötigt werden

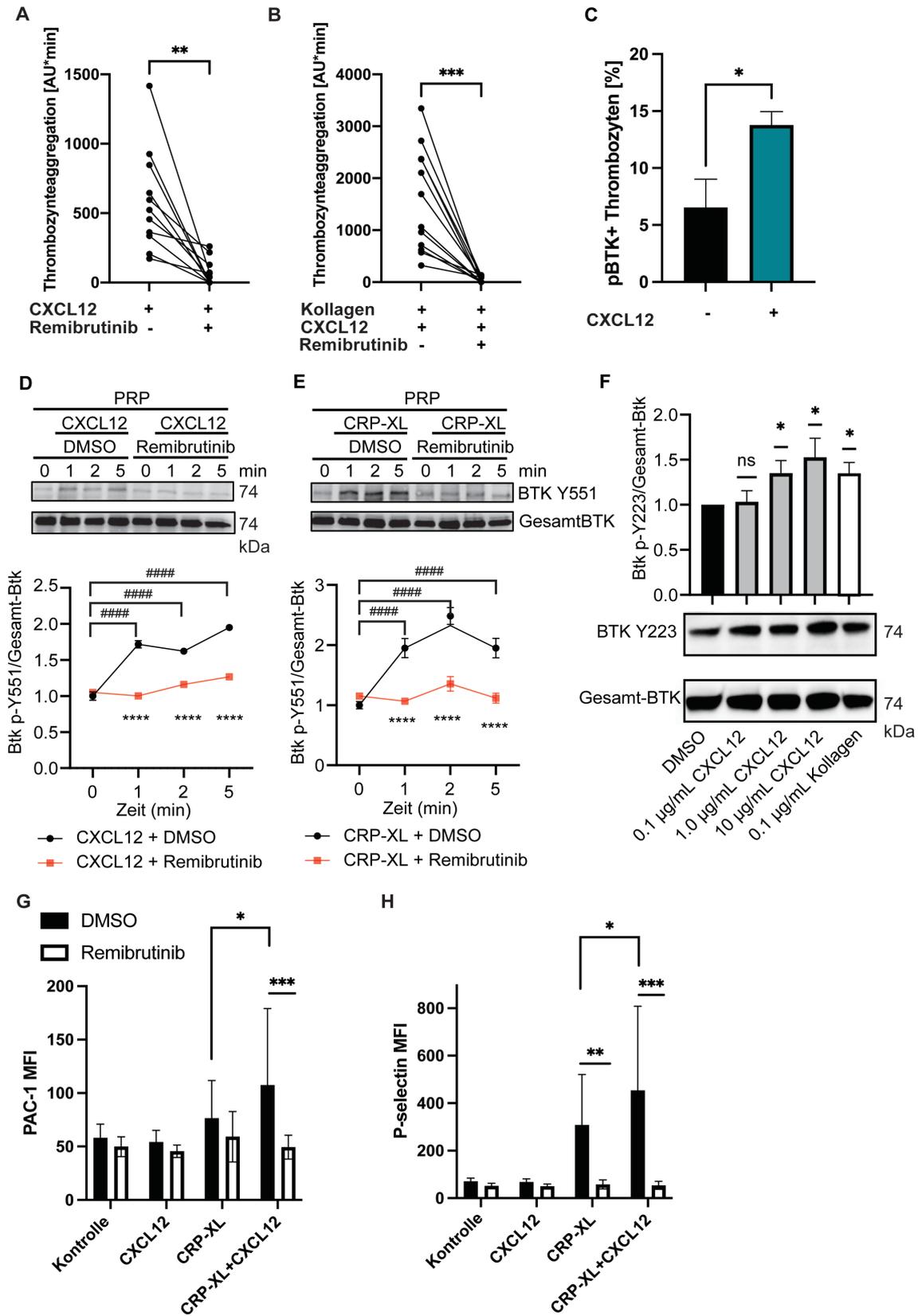


Abbildung 18. Die durch CXCL12 verursachte Thrombozytenaggregation ist abhängig von BTK

(A,B) Blut wurde für 1h bei 37 °C mit DMSO (0,1 %, als Lösungsmittelkontrolle) oder Remibrutinib (0,1 µM) zur BTK-Inhibition inkubiert. Die Thrombozytenaggregation wurde mittels Impedanzaggregometrie nach Aktivierung mit rekombinantem CXCL12 allein (1 µg/ml) oder in Kombination mit Kollagen (0,1 µg/ml) gemessen. **(C)** Der Effekt von CXCL12 auf die BTK-Phosphorylierung in humanen Thrombozyten wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (n=3).

(D-F) Humanes plättchenreiches Plasma wurde mit DMSO (0.1 %) oder Remibrutinib (1 µM) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Aktivierung mit **(D)** 1 µg/ml CXCL12, **(E)** 2.5 µg/mL CRP-XL und **(F)** CXCL12 oder Kollagen (n=3). **(D-E)** Die Thrombozytenaggregation wurde nach 1, 2, oder 5 Minuten mit CGS Puffer gestoppt. Dargestellt werden repräsentative Western Blots **(D,E)** und die Quantifizierung der Btk Y551 Phosphorylierung im Vergleich zu Gesamt-BTK. **(F)** Die Phosphorylierung von Y223 im Vergleich zu Gesamt-BTK nach Stimulation mit CXCL12 (0.1-10 µg/mL) ist ebenfalls mit einem repräsentativen Immunoblot und densitometrischer Quantifizierung dargestellt (n=3). **(G,H)** Messung der Thrombozytenaktivierung mittels durchflusszytometrischer Analyse der Oberflächenproteine: aktiviertes αIIbβ3 Integrin (PAC-1) und P-Selektin. Blut wurde vor Aktivierung mit DMSO oder Remibrutinib vorbehandelt und mit CXCL12 (0,1 µg/ml und/oder CRP (0,01 µg/ml) aktiviert.

MW ± SD. *P ≤ 0.05, ***P ≤ 0.001, ****/#####P ≤ 0.0001, analysiert mit gepaartem (A-B) oder ungepaartem (C) T-Test und zweifacher Varianzanalyse (ANOVA) mit Dunnetts Posttest (D,E,G,H).

Fibrilläres Kollagen bewirkt über den Rezeptor GPVI eine BTK-abhängige Signalkaskade, die zur Thrombozytenaggregation führt. Dies kann mittels BTK-Inhibitoren blockiert werden [17]. In Leukämiezellen aktiviert CXCL12 über seinen Rezeptor CXCR4 ebenfalls BTK-abhängige Signalkaskaden [48, 49]. Ob jedoch in Thrombozyten eine CXCR4-Aktivierung zu einer BTK-abhängigen Signalkaskade führt, wurde bisher nicht untersucht. Die Zugabe des selektiven BTK-Inhibitors Remibrutinib konnte die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit CXCL12 allein oder in Kombination mit Kollagen komplett verhindern (Abbildung 18A,B). Zudem führte CXCL12 zu einer Phosphorylierung von BTK an den beiden Phosphorylierungsstellen Y551 und Y223 (Abbildung 18C-F). Die Kombination von CXCL12 mit dem GPVI Agonisten CRP (collagen-related peptide) führte zu einer signifikanten Steigerung der Aktivierungsmarker P-Selektin und aktiviertem αIIbβ3 Integrin. Remibrutinib konnte diesen Effekt komplett verhindern (Abbildung 18G,H). Dies zeigt, dass sowohl GPVI als auch CXCR4-abhängige Signalkaskaden BTK benötigen. BTK wird durch Syk und PI3K aktiviert. Der Inhibitoren gegen Syk und PI3K konnte ebenfalls eine

Thrombozytenaggregation durch CXCL12 allein oder in Kombination mit Kollagen verhindern (Abbildung 19A-C). Zudem konnten wir bestätigen, dass eine Hemmung der MAPKinase, sowie von intrazellulärem Calcium, welche den bisher betrachteten Signalwegen nachgeschaltet sind, eine CXCL12-abhängige Aggregation komplett und eine Kollagen- und CXCL12-abhängige Aggregation teilweise inhibierten (Abbildung 19D-F) [127].

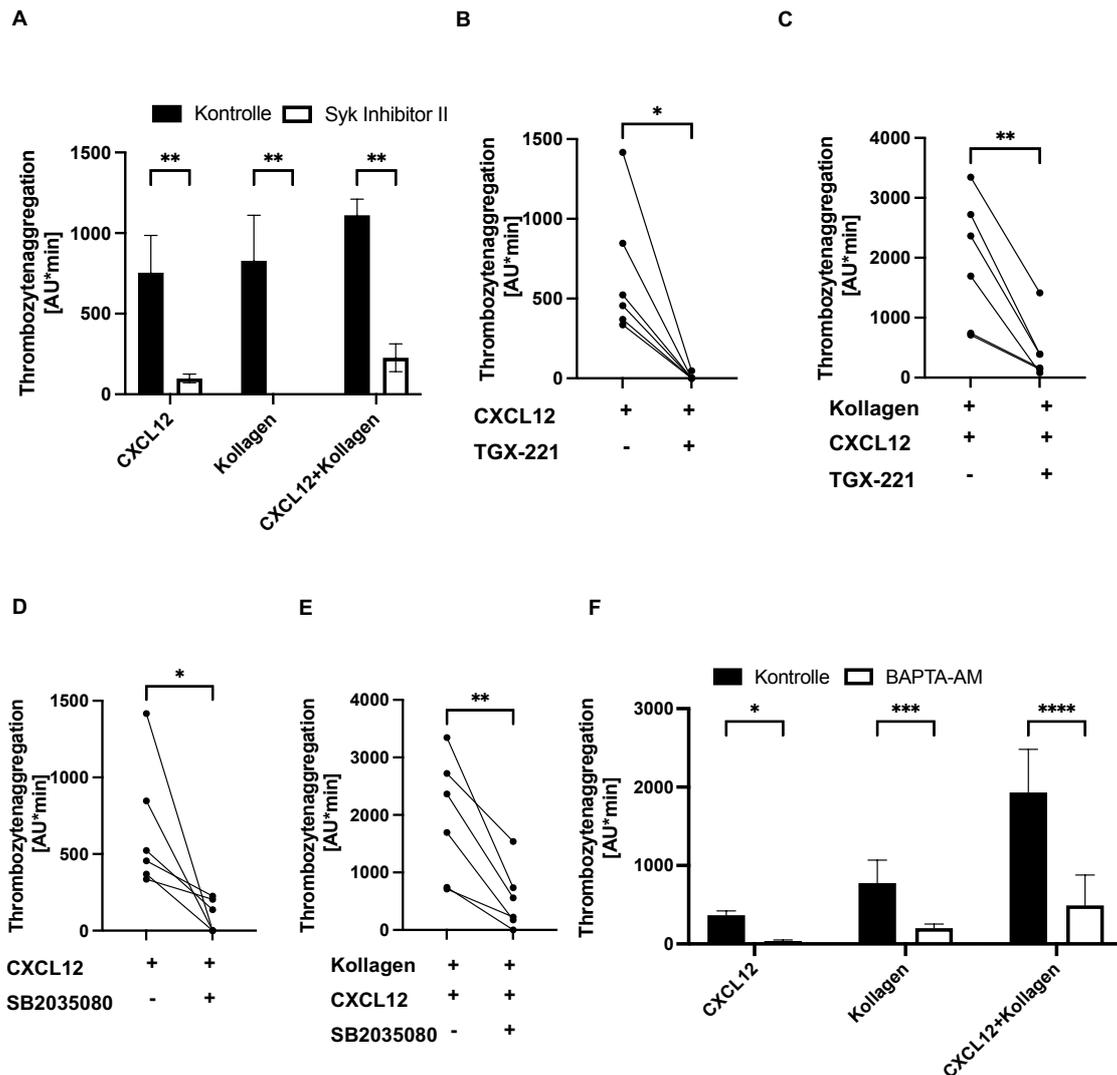


Abbildung 19. Die CXCL12-abhängige Thrombozytenaggregation kann durch Syk-, PI3-Kinase-, MAPK- und Calcium-Inhibitoren verhindert werden

Die Thrombozytenaggregation wurde mittels Impedanzaggregometrie nach Aktivierung mit rekombinantem CXCL12 (1 µg/ml) oder in Kombination mit Kollagen (0,1 µg/ml) gemessen. Das Blut wurde mit (A) dem Syk-Inhibitor II (5 µM), (B,C) einem Inhibitor der PI3K Untereinheit p85/p100, TGX-221 (0,5 µM) oder (D,E) dem MAPK-Inhibitor SB-203580 (30 µM) behandelt (n=6). In (F) wurde plättchenreiches Plasma mit einem Inhibitor gegen intrazelluläres Calcium

(BAPTA-AM, 5 Minuten, 100 μ M) behandelt, bevor eine Thrombozytenaggregation mit CXCL12 (5 μ g/ml), Kollagen (1 μ g/ml) oder in Kombination ausgelöst wurde.

MW \pm SD. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0.001 analysiert zweifacher Varianzanalyse (ANOVA) mit Dunnetts Posttest (A,F) und mit gepaartem t-Test (B-E).

3.5 Hemmung von CXCL12 durch i[VREY]₄, einem von CCL5 abgeleitetem Peptid

In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass ein von CCL5 abgeleitetes Peptid [VREY]₄ (Abbildung 20A), wie CCL5, mit CXCL12 interagiert und die chemotaktischen und Thrombozyten aktivierenden Effekte von CXCL12 in vitro hemmen kann [81]. Das Peptid [VREY]₄ wurde zu i[VREY]₄ (Abbildung 20A,B), optimiert. i[VREY]₄ ist ein Peptid, welches das Bindungsmotiv von CCL5 an CXCL12 (VREY) in vierfacher Ausführung auf einem TASP-Gerüst (nach englisch: template-assembled synthetic protein) trägt. i[VREY]₄ ermöglicht, durch ein verändertes Gerüst, im Vergleich zum Vorgängerpeptid, eine optimierte Anordnung der Helices. Außerdem wurde ein biotinylierte Version des Peptids, i[VREY]₄-biotin (Abbildung 20C) zur vereinfachten Detektion synthetisiert. Zudem wurde VREY ctrl hergestellt, welches nur aus dem Bindungsmotiv ohne TASP-Gerüst, besteht. Dieses Peptid weist nicht dieselbe konformationelle Stabilität wie i[VREY]₄ auf und dient als Kontrollpeptid (Abbildung 20D).

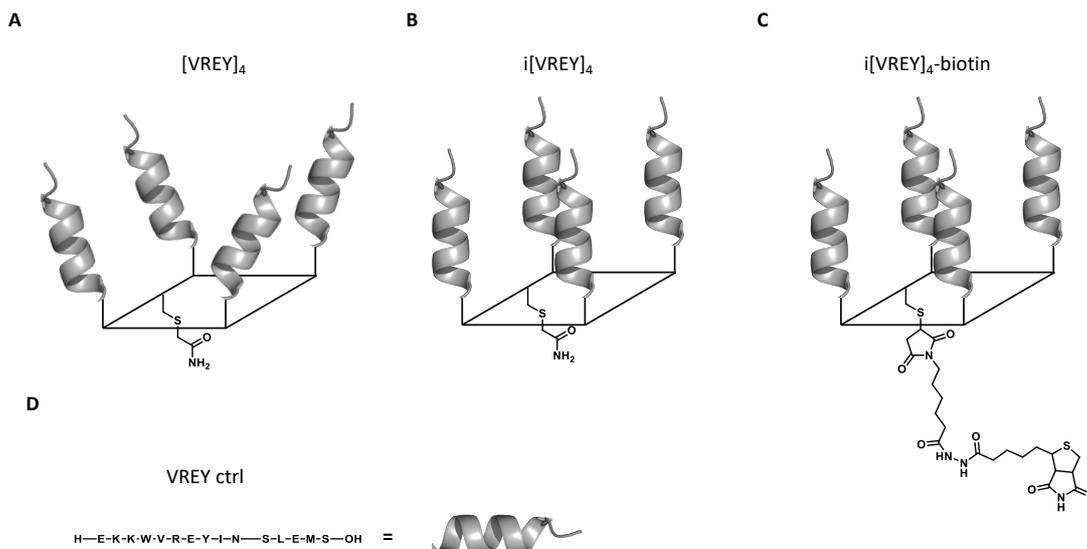


Abbildung 20. Schematische Darstellung der verschiedenen VREY - Peptide

Schematische Darstellung des **(A)** Vorläuferpeptids [VREY]₄, **(B)** der optimierten Version i[VREY]₄, **(C)** eines biotinylierten Peptids i[VREY]₄-biotin, sowie **(D)** der linearen Sequenz VREY ctrl.

3.5.1 Charakterisierung der CXCL12- i[VREY]₄ Interaktion

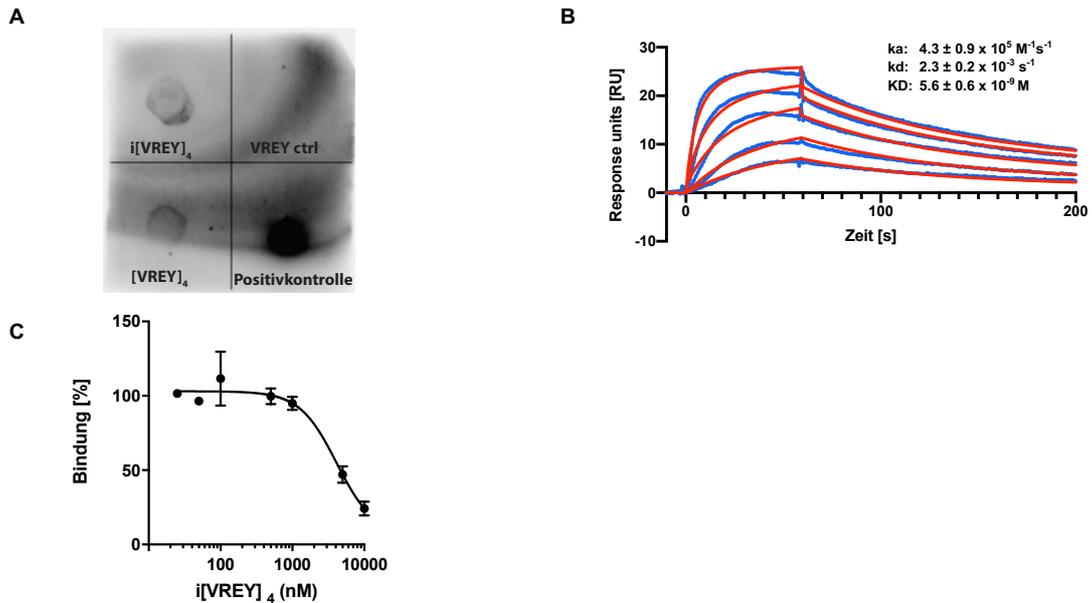
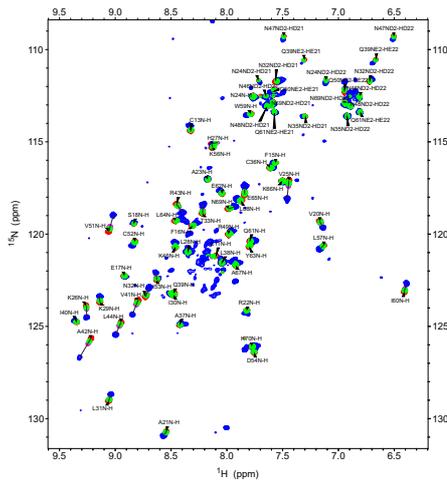
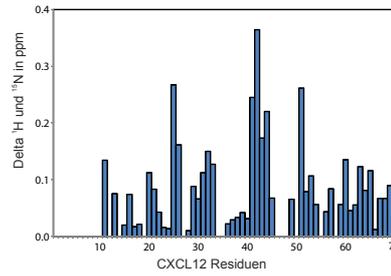


Abbildung 21. Oberflächenplasmonresonanzspektrometrische Untersuchung der i[VREY]₄-CXCL12 Interaktion

(A) Qualitative Untersuchung der Bindung der Peptide i[VREY]₄, VREY ctrl und [VREY]₄ mittels Ligandenblot. **(B)** Untersuchung der Bindung von unterschiedlichen CXCL12 Konzentrationen (1000, 500, 250, 125, 62,5 ng/ml) an einen i[VREY]₄-Chip mittels Oberflächenplasmonresonanzspektrometrie (BIAcore X100) gemessen in Response Units (RU). **(C)** Verdrängung der Bindung von CCL5 an einen CXCL12-Chip durch i[VREY]₄

A**B**

Die Abbildung 22. Kernspinresonanzspektroskopische Untersuchungen der i[VREY]₄ - CXCL12 Interaktion

(A) Darstellung der ¹⁵N-CXCL12 Spektren ohne (rot) und mit Zugabe von i[VREY]₄ (20 μM grün, 40 μM lila und 200 μM blau). (B) Darstellung der Verschiebung der ¹⁵N-CXCL12 Spektren durch Zugabe von 20 μM i[VREY]₄ anhand der unterschiedlichen CXCL12 Residuen.

Mittels Ligandenblot konnte qualitativ gezeigt werden, dass i[VREY]₄ und [VREY]₄, aber nicht VREY ctrl an CXCL12 bindet. Die Fähigkeit der Interaktion von i[VREY]₄ mit CXCL12 wurde mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass CXCL12 mit hoher Affinität mit einem i[VREY]₄-Chip interagiert. Außerdem konkurrierte i[VREY]₄ mit CCL5 um die Bindung an einen CXCL12-Chip (Abbildung 21). Die Ergebnisse konnten durch Kernspinresonanzspektroskopie in Kooperation mit Prof. Mayo und Dr. Ippel (Universität Minnesota, Universität Maastricht) bestätigt werden. Wie die i[VREY]₄-induzierten Änderungen in den ¹⁵N-CXCL12 Spektren zeigen, bindet i[VREY]₄ CXCL12 (Abbildung 22). Außerdem konnte mittels *Proximity Ligation* gezeigt werden, dass i[VREY]₄ und CXCL12 eine Interaktion auf Thrombozyten eingehen (Abbildung 23).

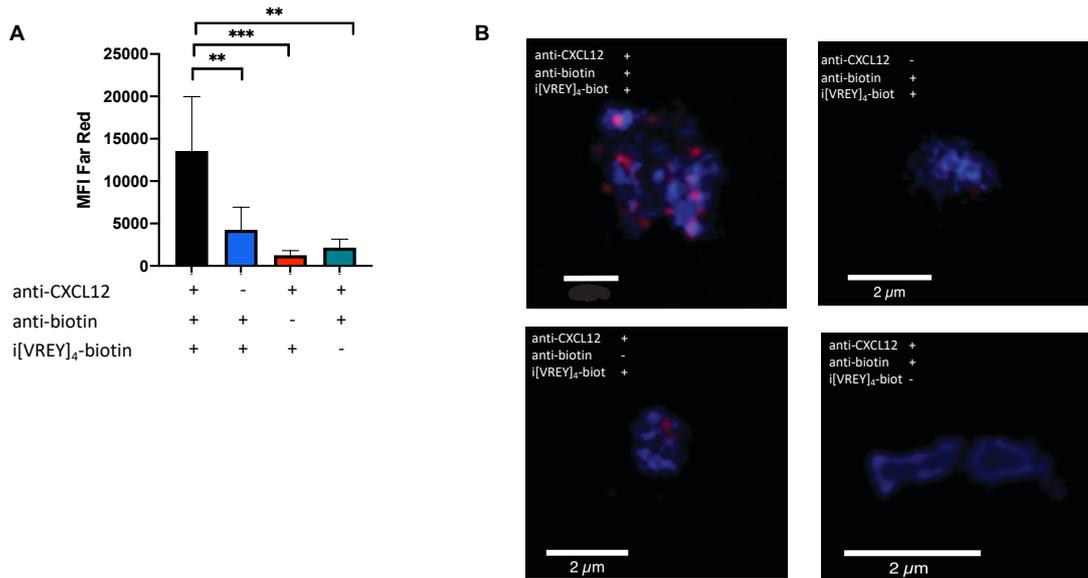
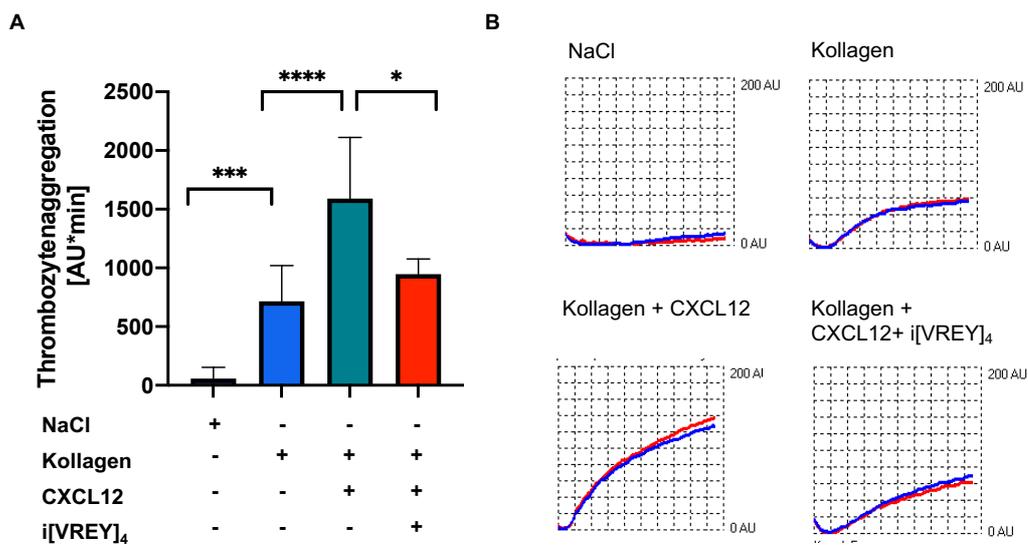


Abbildung 23. Darstellung der Interaktion i[VREY]₄ und CXCL12 auf Thrombozyten mittels Proximity Ligation Assay.

(A) Durchflusszytometrischer Nachweis einer Interaktion von CXCL12 und i[VREY]₄ auf ruhenden Thrombozyten durch Proximity Ligation. (B) Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen des Proximity Ligation Signals (rot) auf ruhenden Thrombozyten (blau).

3.5.2 Die Wirkung von CCL5 und i[VREY]₄ auf die Thrombozytenaktivierung in vitro



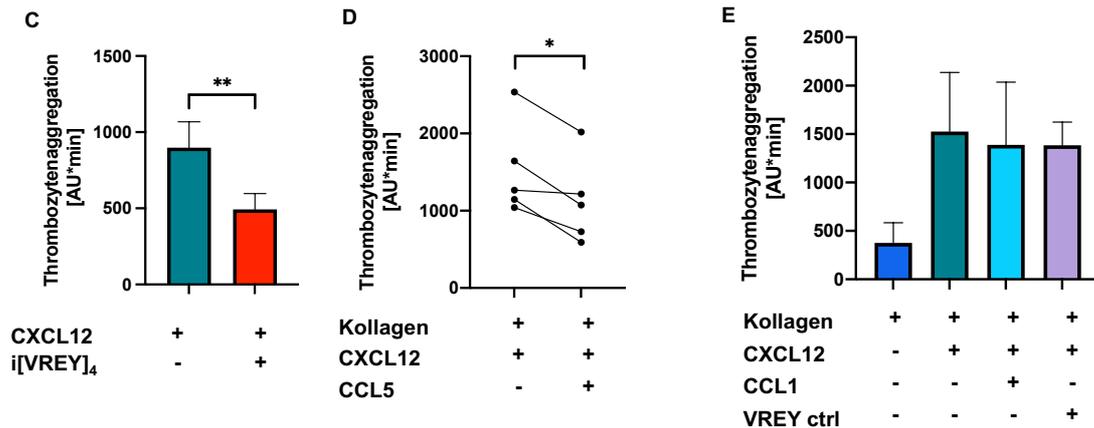


Abbildung 24. Hemmung der CXCL12-induzierten Thrombozytenaggregation durch i[VREY]₄

(A) Darstellung des Einflusses von i[VREY]₄ (5 µM) auf die Thrombozytenaggregation induziert durch CXCL12 und Kollagen, gemessen für 15 Minuten mittels Impedanzaggregometrie, CXCL12: 100 ng/ml, Kollagen: 100 ng/ml. Für Versuchsbedingungen mit i[VREY]₄ wurde das Blut für 5 Minuten mit i[VREY]₄ vorinkubiert. (B) Repräsentative Darstellung von Impedanzaggregometriekurven der unter (A) durchgeführten Versuche. Reduktion der CXCL12-induzierten Thrombozytenaggregation (1 µg/ml) durch (C) i[VREY]₄ (5 µM) oder (D) CCL5 (E) Kein Einfluss von CCL1 oder VREY ctrl auf die CXCL12- induzierte Thrombozytenaggregation. MW ± SD, n = 5-10, *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001, ****: p < 0,0001 analysiert mit ANOVA

Die Konsequenzen einer Interaktion von i[VREY]₄, sowie CCL5 auf die CXCL12-vermittelte Thrombozytenaktivierung wurde durch Impedanzaggregometrie untersucht. Die Zugabe von 5 µM i[VREY]₄ auf die Kombination aus 0,1 µg/ml Kollagen und 0,1 µg/ml CXCL12 oder CXCL12 alleine konnte die CXCL12-bedingte Thrombozytenaggregation signifikant vermindern (Abbildung 24A,C).

Zur Überprüfung des vorgeschlagenen Mechanismus wurde dieses Experiment auch mit der Zugabe von 0,1 µg/ml CCL5, anstatt i[VREY]₄ durchgeführt. Die Zugabe von CCL5 führte ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung der Thrombozytenaggregation (Abbildung 24D). Weder die Zugabe von VREY ctrl noch die Zugabe von CCL1, einem Chemokin, welches nicht mit CXCL12 interagiert, führten zu einer Veränderung der Thrombozytenaggregation (Abbildung 24 E).

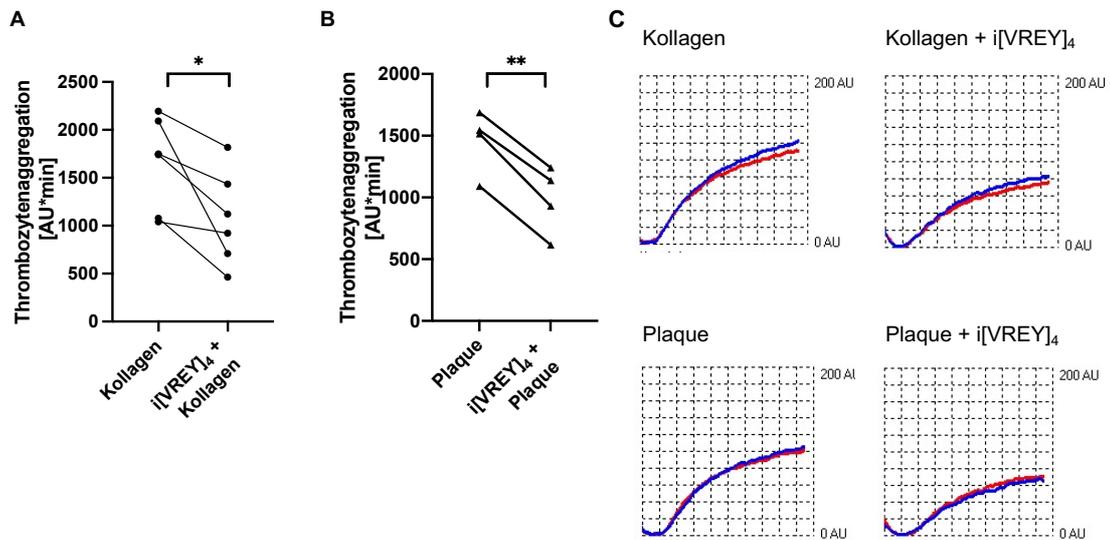


Abbildung 25. Verminderung der Kollagen- und Plaque induzierten Thrombozytenaggregation durch i[VREY]₄

Darstellung des Einflusses von i[VREY]₄ (5 μ M) auf **(A)** die Kollagen- (0.2 μ g/ml) und **(B)** Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation (833 μ g/ml), gemessen mittels Impedanzaggregometrie. Es erfolgte eine Vorinkubation des Blutes mit i[VREY]₄ (5 μ M) für 5 Minuten. n = 7 (A), n = 6 (B), *: p < 0,05, **: p < 0,01, analysiert mit gepaartem t-Test. **(C)** Repräsentative Darstellung von Impedanzaggregometriekurven der durchgeführten Versuche.

Analog zu Abbildung 8 wurde ein weiterer Versuch mit Kollagen (0,2 μ g/ml) und humanem atherosklerotischen Plaquehomogenat (833 μ g/ml) durchgeführt. Durch Zugabe von 5 μ M i[VREY]₄ konnte sowohl die Kollagen- als auch die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation signifikant vermindert werden (Abbildung 25).

3.5.3 Die Wirkung von i[VREY]₄ auf die Plaque-induzierte Thrombusbildung unter arteriellem Fluss

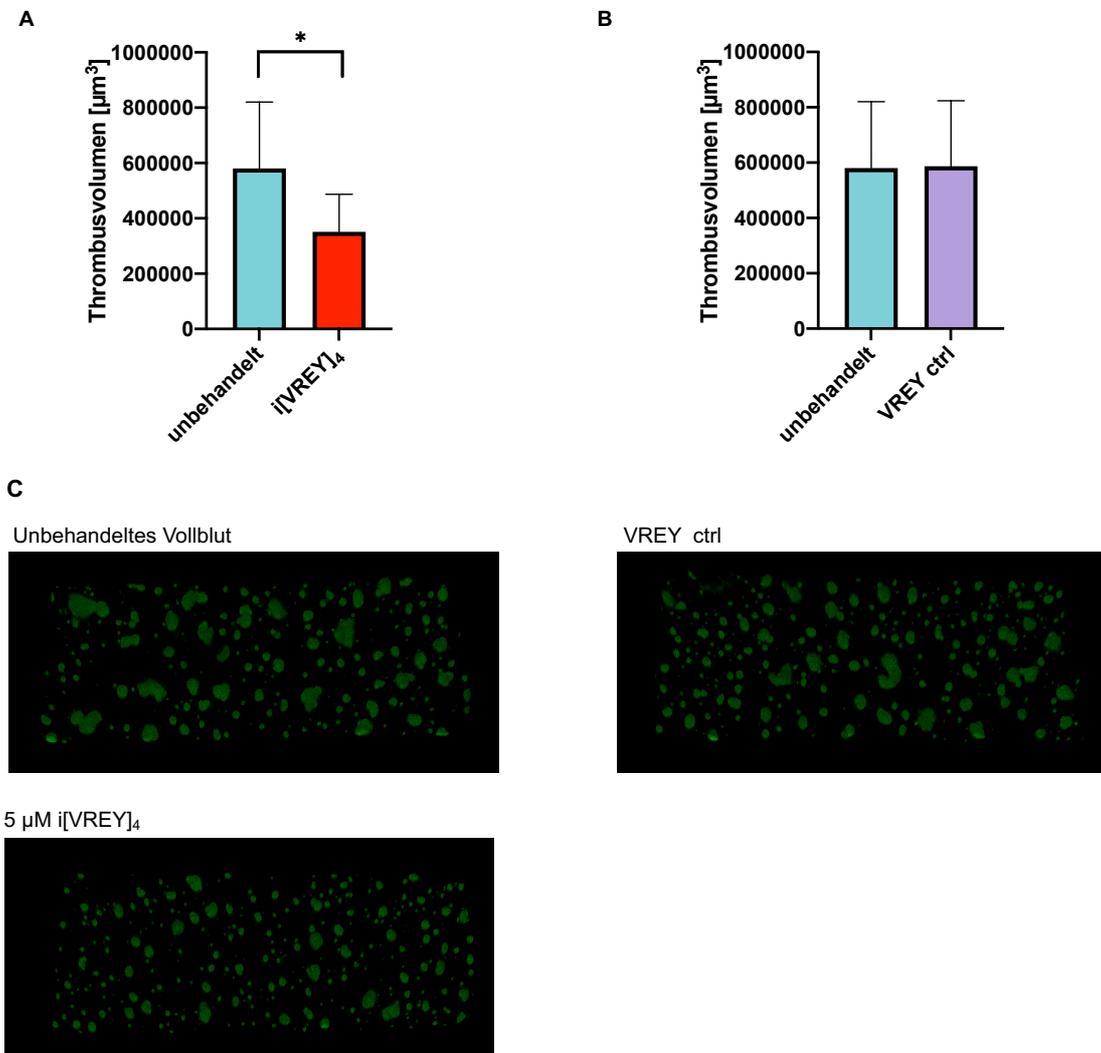


Abbildung 26. Verminderung der Thrombusbildung auf Plaque unter arteriellen Flussbedingungen durch i[VREY]₄

(A,B) Humanes Vollblut wurde unter arteriellen (600 s^{-1}) Flussbedingungen über humanes atherosklerotisches Plaquematerial perfundiert. Die Thrombozyten wurden im Vorhinein für 15 Minuten mit $1 \mu\text{M}$ DiOC6 angefärbt. Ein Teil der Proben wurde vor Versuchsbeginn für 15 Minuten mit $5 \mu\text{M}$ i[VREY]₄ oder VREY ctrl behandelt. Nach 6 Minuten Perfusion wurde das 3-D Thrombusvolumen mittels Konfokalmikroskopie ausgewertet. $n = 6-12$, *: $p < 0,05$ analysiert mit ungepaartem t-Test. (C) Repräsentative Darstellung des ausgewerteten 3-D Thrombusvolumens der beiden Versuchsgruppen

Um die Wirkung von i[VREY]₄ in einem Versuchsaufbau zu untersuchen, der die pathophysiologischen Mechanismen der Atherothrombose ex vivo simuliert, wurde analog zu 3.1.3 ein Flusskammerversuch auf Plaque beschichteter

Oberfläche unter arteriellen Flussbedingungen durchgeführt. Die Zugabe von 5 μM i[VREY]₄ zu humanem Vollblut konnte das gebildete Thrombusvolumen auf atherosklerotischem Plauehomogenat signifikant reduzieren. Im Gegensatz dazu hatte VREY ctrl keinen Einfluss (Abbildung 26).

3.5.4 Die Wirkung von i[VREY]₄ in der arteriellen Thrombose in vivo

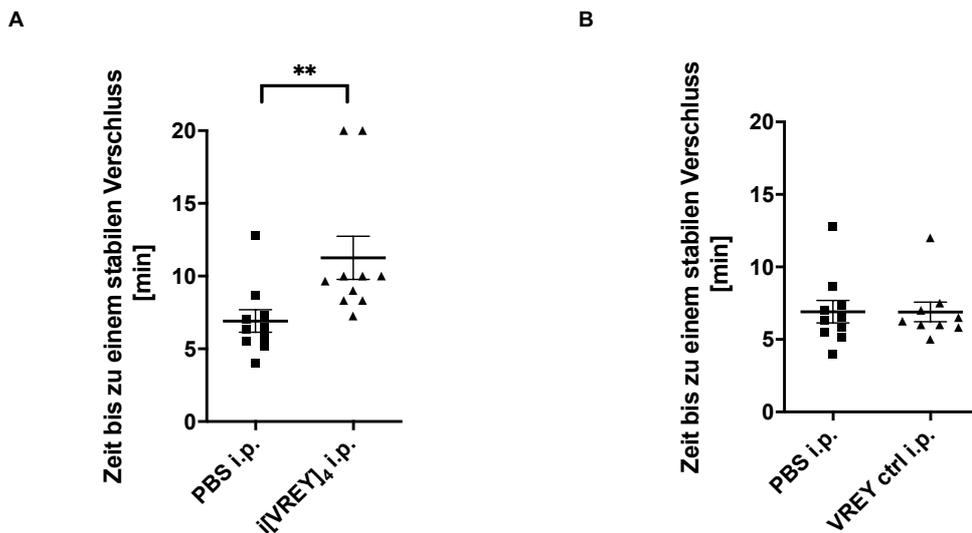


Abbildung 27. Verminderte arterielle Thrombusbildung in vivo durch i.p. Injektion von i[VREY]₄

Den Versuchstieren wurden 1 Stunde vor Versuchsbeginn i[VREY]₄ (100 μg) (**A**), VREY control (**B**) (19,6 μg) oder PBS i.p. injiziert. Die Zeit bis zu einem stabilen Verschluss der A. carotis (2 Minuten kein Blutfluss) wurde nach FeCl₃-induzierter Thrombose für maximal 20 Minuten mittels Doppler Sonographie gemessen. n = 9-10, **: p < 0,01 analysiert mit Mann-Whitney U Test.

Um die Wirkung von i[VREY]₄ in einem in vivo Versuchsaufbau zu untersuchen, wurde das in 3.2.2 verwendete FeCl₃ induzierte Thrombosemodell der A. carotis erneut verwendet. Den C57BL/6 Versuchstieren wurde 1 Stunde vor Versuchsbeginn 100 μg i[VREY]₄, die equimolare Menge an VREY oder der verwendete Puffer, PBS, i.p. injiziert. Die Thromboseversuche zeigten eine signifikante Reduzierung der Zeit bis zu einem stabilen Verschluss der A. carotis, in der i[VREY]₄ Gruppe im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe (Abbildung 27A). Die Injektion von VREY ctrl zeigte keinen Unterschied zu PBS (Abbildung 27B).

3.5.5 Untersuchung der Wirkung von i[VREY]₄ auf die Thrombozytenaggregation mit und ohne CXCL12-Defizienz mittels Impedanzaggregometrie

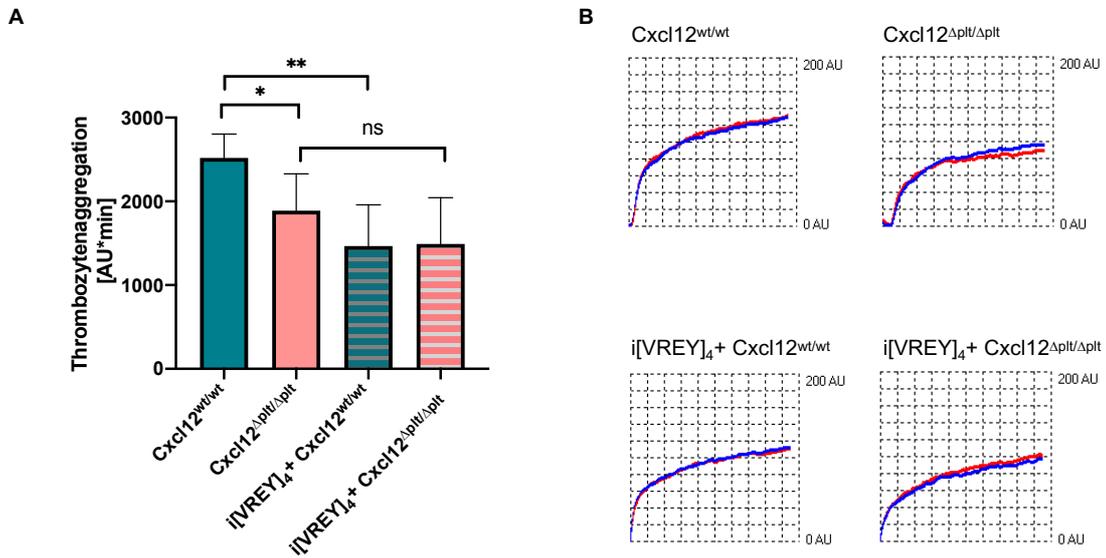


Abbildung 28. Untersuchung der Wirkung von i[VREY]₄ auf Thrombozyten mit und ohne CXCL12-Defizienz

(A) Murines Blut wurde mit Kollagen (10 µg/ml) stimuliert und die Thrombozytenaggregation wurde mittels Impedanzaggregometrie gemessen. Für Versuchsgruppen der i[VREY]₄ Behandlung, wurde das Blut vor Versuchsbeginn mit 5 µM i[VREY]₄ vorinkubiert. n = 6-8, *: p < 0,05, **: p < 0,01, analysiert mit ANOVA. (B) Repräsentative Darstellung von Impedanzaggregometriekurven der durchgeführten Versuche.

Vollblut mit CXCL12-defizienten Thrombozyten zeigte eine verminderte Thrombozytenaggregation im Vergleich zu Kontrollblut. Die Zugabe von 5 µM i[VREY]₄ führte zu einer signifikanten Verminderung der Thrombozytenaggregation in Kontrollblut, jedoch nicht in Vollblut mit CXCL12-defizienten Thrombozyten (Abbildung 28).

3.5.6 Pharmakokinetik von i[VREY]₄ und Effekte auf die Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten

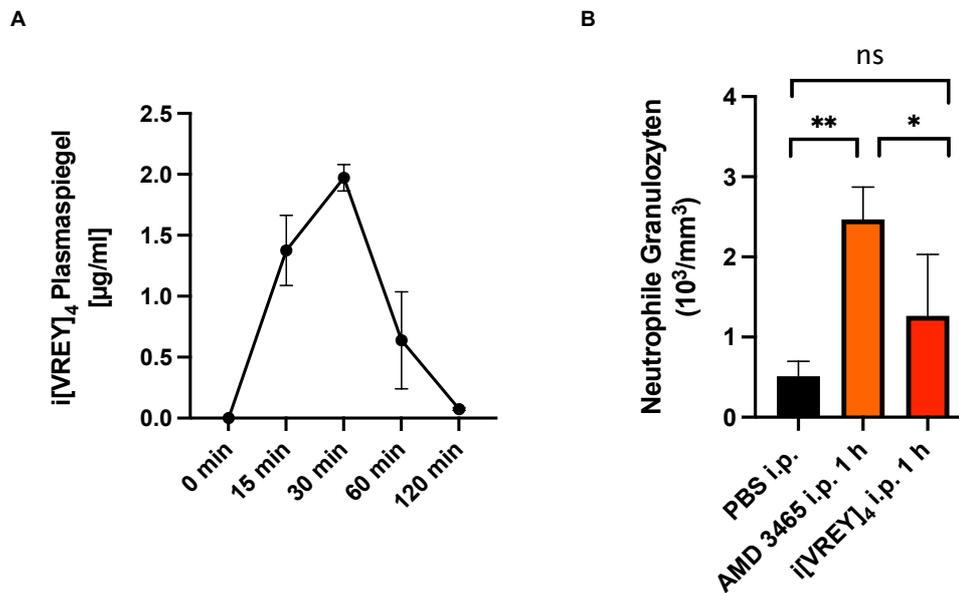


Abbildung 29. Untersuchung der Pharmakokinetik von i[VREY]₄, sowie Effekte auf die Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten

(A) Die Plasmaspiegel von i[VREY]₄ wurde zu verschiedene Zeitpunkt nach i.p. Injektion (75 µg i[VREY]₄-biotin) mittels ELISA gemessen. (B) Den Versuchstieren wurden PBS, AMD 3465 (100 µg) oder i[VREY]₄ (100 µg) i.p. injiziert. Nach einer Stunde wurde mit einem Zellzählungsautomaten ein Blutbild erstellt. n = 3-6, ***: p < 0,001, analysiert mit ANOVA

Die CXCR4 Antagonisten AMD 3100 und AMD 3465 führen zu einer Leukozyten- und Progenitorzellmobilisierung aus dem Knochenmark in die Blutzirkulation [57, 128, 129]. Diese Leukozytenrekrutierung geschieht in der Maus innerhalb von 1 Stunde nach Injektion [129]. Um die Wirkung von i[VREY]₄ auf die Leukozytenmobilisierung zu untersuchen, wurde Versuchstieren PBS, 100 µg AMD3465 oder 100 µg i[VREY]₄ i.p. injiziert. Nach einer Stunde wurde den Tieren Blut entnommen und durch einen automatisiertem Zellzählungsautomaten ein Blutbild erstellt. Die Injektion von 100 µg AMD3465 führte, im Vergleich zur PBS Injektion, zu einer starken und signifikanten Leukozytenmobilisierung. Die Injektion von 100 µg i[VREY]₄ führte zu einer signifikant geringeren Leukozytenmobilisierung als AMD3465 (Abbildung 29).

3.5.7 Genauere Charakterisierung des i[VREY]₄ Wirkmechanismus

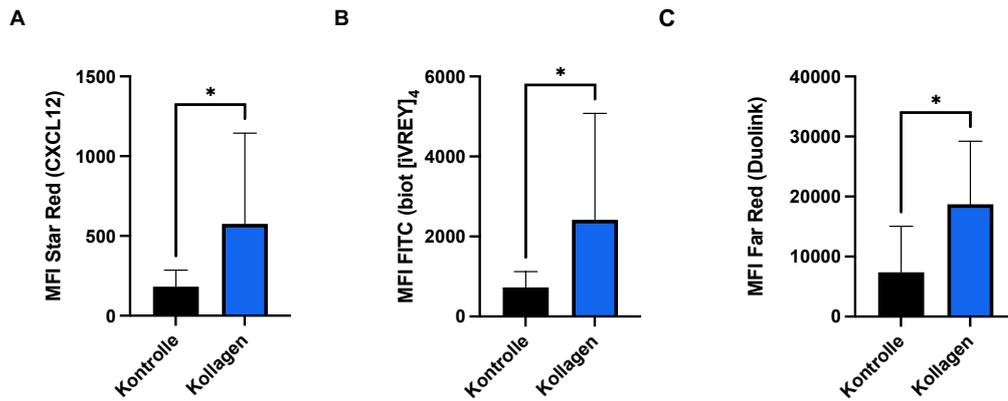
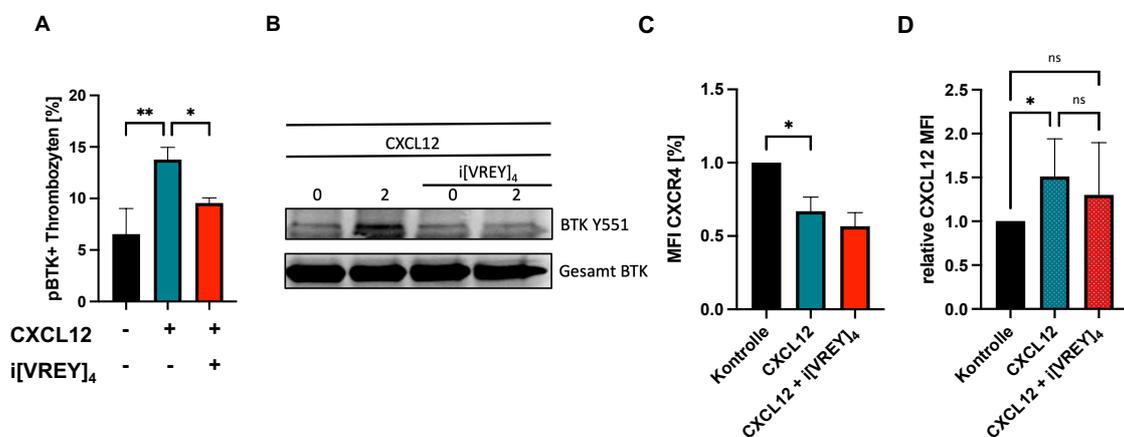


Abbildung 30. i[VREY]₄ zeigt eine erhöhte Bindungsaffinität an aktivierte Thrombozyten

Die endogene CXCL12 Expression (A) und i[VREY]₄ Bindung (B) wurde auf ruhenden und Kollagen-aktivierten Thrombozyten (10 µg/ml) mittels Durchflusszytometrie gemessen. (n=6). (C) Durchflusszytometrischer Nachweis einer Interaktion von CXCL12 und i[VREY]₄ auf ruhenden und aktivierten Thrombozyten durch Proximity Ligation (n=7). *P < 0,05, analysiert mit ungepaartem t-Test.

Um die Interaktion von CXCL12 und i[VREY]₄ genauer zu untersuchen, wurde zuerst das Bindungsverhalten von i[VREY]₄ an ruhende und aktivierte Thrombozyten verglichen. Eine Thrombozytenaktivierung durch Kollagen führte zu einer vermehrten Präsentation von CXCL12 auf der Thrombozytenoberfläche und zu einer verstärkten Bindung von i[VREY]₄. Zudem konnte mittels *Proximity Ligation* gezeigt werden, dass CXCL12 und i[VREY]₄ nach Thrombozytenaktivierung auch vermehrt auf der Thrombozytenoberfläche interagieren (Abbildung 30 A-C).



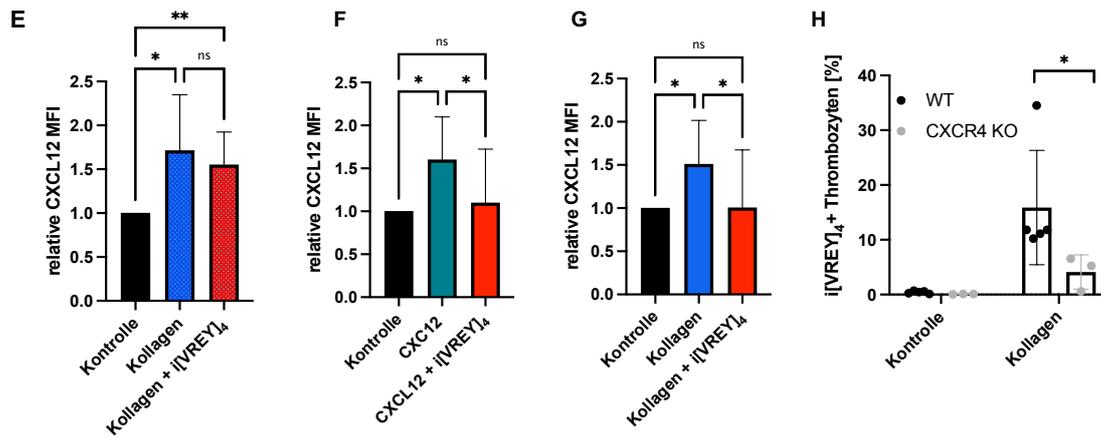


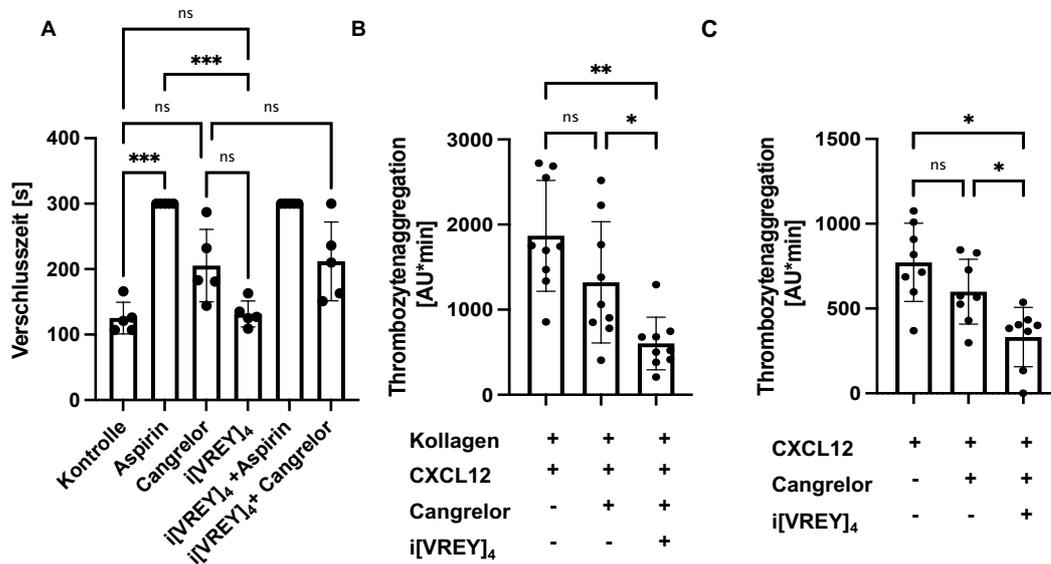
Abbildung 31. i[VREY]₄ inhibiert eine CXCL12-abhängige BTK-Phosphorylierung CXCR4-abhängig, ohne die CXCR4 Internalisierung zu beeinflussen.

(A) Die Phosphorylierung von BTK in humanen Thrombozyten wurde mittels Durchflusszytometrie (A, n=3) und Western Blot (B, n=2) analysiert. Thrombozyten wurden mit CXCL12 (1 µg/ml) und je nach Bedingung mit i[VREY]₄ (5 µM) für 2 min behandelt. (C) Die Expression von CXCR4 auf humanen Thrombozyten wurde nach Zugabe von CXCL12 (1 µg/ml) und i[VREY]₄ (5 µM) mittels Durchflusszytometrie gemessen (n=4). Humanes Blut wurde mit CXCL12 (0,1 µg/ml) oder Kollagen (1 µg/ml) behandelt und CXCL12 wurde mittels Fluorochrom-konjugierter monoklonaler Antikörper (D,E; Klon K15C, n=10) oder (F,G; Klon 79018, n=8) auf der Thrombozytenoberfläche detektiert. (H) Die Bindung von i[VREY]₄-biot an ruhenden oder aktivierte (10 µg/ml Kollagen) Thrombozyten von Tamoxifen injizierten CreErtwt/wt Cxcr4flox/flox (WT) oder CreErt^{tg/wt} Cxcr4^{flox/flox} (CXCR4 KO) Mäuse wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. *P < 0,05, **P < 0,01, analysiert mit ANOVA mit Tukeys Posttest (A, C-G) oder ungepaartem t-Test (H).

Zudem führte eine Präinkubation mit i[VREY]₄ zu einer verminderten CXCL12-induzierten BTK-Phosphorylierung. Diese Befunde sprechen für einen CXCL12-abhängigen Mechanismus von i[VREY]₄ (Abbildung 31A, B). Jedoch konnte eine CXCL12-induzierte CXCR4 Internalisierung nicht durch i[VREY]₄ verhindert werden (Abbildung 31C). Dies weist daraufhin, dass i[VREY]₄ eine CXCL12-induzierte Signaltransduktion von CXCR4 zu verändern scheint, nicht jedoch eine Internalisierung des Rezeptors. Sowohl endogenes wie auch exogen hinzugefügtes CXCL12 konnten auf der Thrombozytenoberfläche durch einen blockierenden Antikörper (K15C), welcher gegen den N-Terminus von CXCL12 gerichtet ist, detektiert werden. Dieser Antikörper bindet an Glykosaminoglykan-gebundenes CXCL12, nicht jedoch an CXCR4-gebundenes CXCL12. Die Zugabe von i[VREY]₄ konnte die Bindung von K15C nicht verändern (Abbildung 31D,E). Dies weist daraufhin, dass i[VREY]₄ die Bindung von CXCL12 an

Glykosaminoglykane auf der Thrombozytenoberfläche nicht verändert. Im Gegensatz dazu, konnte die Bindung eines CXCL12 Antikörpers (Klon 79018), welcher auch CXCR4-gebundenes CXCL12 erkennt, durch i[VREY]₄ signifikant verringert werden (Abbildung 31F,G). Das bedeutet, dass die Bindung von i[VREY]₄ keine Motive von CXCL12 benötigt, welche für die Interaktion mit CXCR4 relevant sind. Um zu untersuchen, ob die Bindung von i[VREY]₄ durch CXCR4 beeinflusst wird, verglichen wir die Bindung von i[VREY]₄ auf murinen ruhenden und aktivierten CXCR4-defizienten Thrombozyten. Konsistent mit den Versuchen mit humanen Thrombozyten (Abbildung 30) band i[VREY]₄ lediglich an aktivierte Thrombozyten (Abbildung 31H). Dies macht eine direkte Interaktion von i[VREY]₄ und CXCR4 unwahrscheinlich. Zudem war für die Bindung von i[VREY]₄ das Vorhandensein von CXCR4 erforderlich. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf die Bildung eines ternären Komplexes von i[VREY]₄, CXCL12 und CXCR4 auf der Thrombozytenoberfläche hin.

3.5.8 Evaluation einer zusätzlichen Wirkung von i[VREY]₄ auf konventionelle Thrombozytenaggregationshemmer



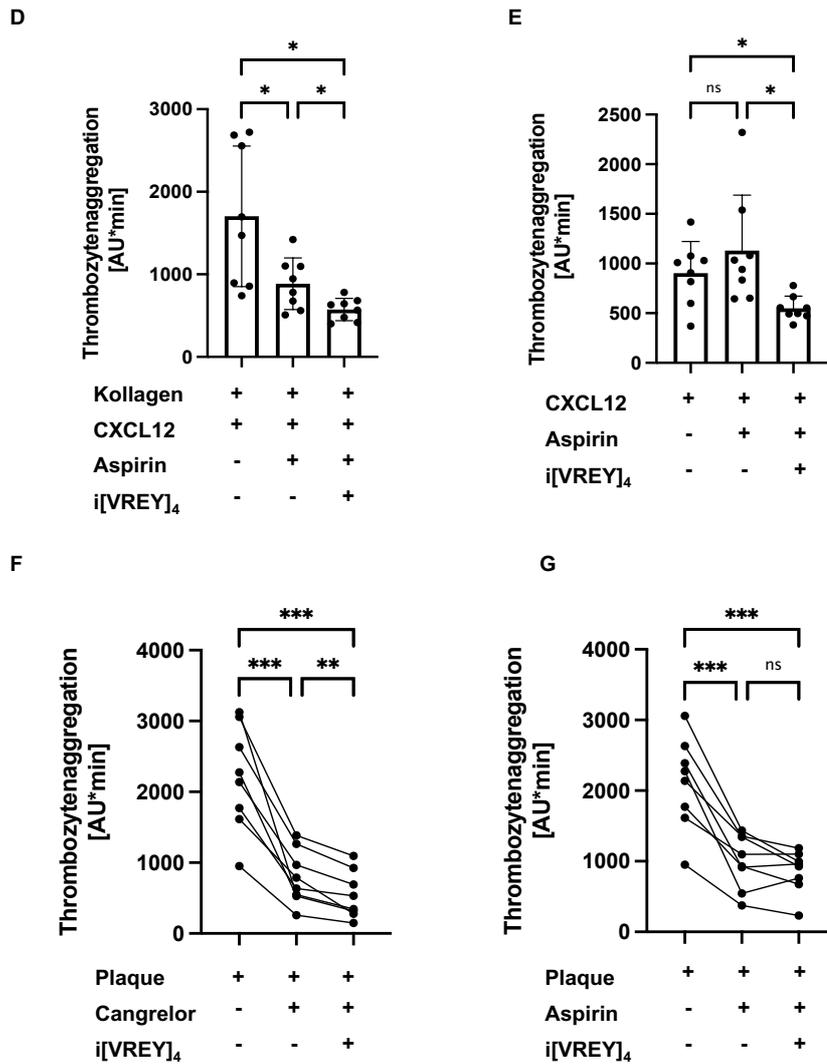


Abbildung 32. i[VREY]₄ verstärkt die antithrombotische Wirkung von Cangrelor oder Aspirin, wirkt sich jedoch nicht negativ auf die primäre Hämostase aus.

(A) Die Wirkung von Aspirin (300 µg/ml), Cangrelor (0,34 µg/ml) und i[VREY]₄ (5 µM) allein oder in unterschiedlichen Kombinationen auf die Kollagen/Epinephrin-induzierte Verschlusszeit wurde mit einem PFA-200 Gerät untersucht, welches die primäre Hämostase simuliert. (B-G) Die zusätzliche Wirkung von i[VREY]₄ (5 µM) auf eine konventionelle antithrombotische Therapie mit Aspirin (300 µg/ml) oder Cangrelor (0,34 µg/ml) wurde mittels Impedanzaggregometrie für 15 Minuten in menschlichem Blut gemessen. Eine Thrombozytenaggregation wurde durch CXCL12 allein (0,1 µg/ml) und in Kombination mit Kollagen (0,1 µg/ml), (1 µg/ml) oder durch Plauehomogenat (833 µg/ml) ausgelöst. Das Blut wurde mit den entsprechenden Wirkstoffen für 15 Minuten vorbehandelt (n=8). *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001, analysiert mit ANOVA.

Aspirin und P2Y₁₂ Inhibitoren sind die klinisch am meistens verwendeten Thrombozytenaggregationshemmer [23, 130]. Die Wirkung von i[VREY]₄ wurde in Kombination mit diesen Standard-Thrombozytenaggregationshemmern untersucht. (Abbildung 32A) Um die Effekte auf die primäre Hämostase zu simulieren, wurde

eine in-vitro Verschlusszeit mit einem platelet function analyzer PFA-200 untersucht. Aspirin, führte zu einer Verlängerung der in vitro Blutungszeit bis zum oberen Messlimit von 300 ms. Auch Cangrelor führte, in geringerem Ausmaß, zu einer signifikanten Verlängerung der in vitro Verschlusszeit. i[VREY]₄ verlängerte weder die in vitro Blutungszeit, noch verstärkte es die Wirkung von Cangrelor (Abbildung 32A).

Zudem wurde die Wirkung von Aspirin und Cangrelor auf die Thrombozytenaggregation durch CXCL12 allein (Abbildung 32B) oder in Kombination mit Kollagen (Abbildung 32C) untersucht. Dabei zeigte sich, dass Cangrelor eine CXCL12-induzierte Thrombozytenaggregation nur geringfügig verringern konnte. Die Thrombozytenaggregationshemmung konnte durch die Zugabe von i[VREY]₄ signifikant verstärkt werden. Aspirin führte zu einer signifikanten Thrombozytenaggregationshemmung bei Stimulation mit Kollagen (Abbildung 32D) und CXCL12, nicht jedoch bei CXCL12 allein (Abbildung 32E). Die Zugabe von i[VREY]₄ zu Aspirin konnte die Thrombozytenaggregation signifikant verringern. Zudem konnte i[VREY]₄ eine hemmende Wirkung von Clopidogrel auf eine Plaque-induzierte Thrombozytenaggregationshemmung verstärken (Abbildung 32F), hatte jedoch keinen zusätzlichen Effekt auf Aspirin (Abbildung 32G).

Eine CXCL12-induzierte Thrombozytenaggregation scheint somit unabhängig von ADP oder Thromboxan zu sein. Zudem kann i[VREY]₄ die Wirkung von konventionellen Thrombozytenaggregationshemmern verstärken, ohne die primäre Hämostase zu beeinflussen.

4 Diskussion

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war, die Relevanz von thrombozytärem CXCL12 für die Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* zu evaluieren. Darüber hinaus sollte das Peptid i[VREY]₄ auf seine CXCL12-inhibierende Wirkung getestet werden.

Als Methoden wurden unter anderem ein transgenes Tiermodell, Impedanzaggregometrie, Durchflusszytometrie, Flusskammerversuche mit Kollagen und atherosklerotischem Plaquematerial und ein *in vivo* Thrombosemodell verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass thrombozytäres CXCL12 ein entscheidender Mediator für die Kollagen- und Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation *in vitro* und *ex vivo* ist. Außerdem ist thrombozytäres CXCL12 relevant für eine effektive und stabile Thrombusbildung *in vivo*. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass i[VREY]₄ mit CXCL12 interagiert und die proaggregatorische Wirkung von CXCL12 in den genannten Modellen hemmen kann.

4.1 Wirkung der CXCL12-CXCR4 Achse auf die Thrombozytenaggregation

4.1.1 Impedanzaggregometrie

In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von CXCL12 die Thrombozytenaggregation in Vollblut, bei suboptimaler Vorstimulation mit Kollagen, deutlich steigern konnte. CXCL12 konnte in höheren Konzentrationen auch ohne Kostimulation in Vollblut ebenfalls eine schwach proaggregatorische Wirkung ausüben. Des Weiteren führte die Hemmung des CXCR4 Rezeptors durch AMD 3465 zu einer Verminderung der durch Kollagen- und Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation.

Dieses Ergebnis bestätigt bereits veröffentlichte Untersuchungen. Bisher konnte dargelegt werden, dass CXCL12 über CXCR4 die aggregatorische Wirkung von Kollagen, Thrombin, ADP oder Serotonin in gewaschenen Thrombozyten erhöhen kann [75, 78-80]. Außerdem konnten Chatterjee et al. kürzlich darlegen, dass CXCL12 die prothrombotische Funktion von oxLDL vermittelt [76]. Die vorgelegten Ergebnisse zeigen nun erstmalig, dass die Zugabe von CXCL12 die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation auch im physiologischen Medium

Vollblut über den Rezeptor CXCR4 verstärkt. Dabei konnte CXCL12 die aggregatorische Wirkung von suboptimalen Konzentrationen auf die Wirkung von optimalen Konzentrationen erhöhen. Dies ist vergleichbar mit Ergebnissen von Gear et al., die jedoch nur in plättchenreichem Plasma durchgeführt wurden [79]. In niedrigen Konzentrationen induziert CXCL12 nur die reversible erste Phase der Aggregation, in höheren Konzentrationen die erste und zweite Phase. Diese Fähigkeit, die Thrombozytenaktivierung zu amplifizieren, jedoch als Mediator allein nur schwach oder in hoher Konzentration aktivierend zu wirken, ist vergleichbar mit anderen Mediatoren, welche ebenfalls über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wirken, wie z. B. Epinephrin oder Serotonin. Allein nur schwach wirksame Mediatoren können synergistisch wirken und damit eine starke Thrombozytenaggregation hervorrufen [25, 78]. Untersuchungen zeigen, dass Thrombozyten für einen physiologischen Aggregationsvorgang sowohl eine Stimulation über G_i - als auch G_q -Proteine benötigen. Ausschaltung oder Antagonisierung einer der beiden Signalwege führt zu einer insuffizienten Aggregation. Dies wurde beispielsweise für die beiden ADP Rezeptoren $P2Y_1$ und $P2Y_{12}$ gezeigt, die jeweils an G_q oder G_i -Proteine gekoppelt sind. Antagonisierung einer der beiden Rezeptoren verhinderte eine ADP-induzierte Aggregation. Jedoch konnte die Aggregationsfähigkeit durch Zugabe eines anderen G_q oder G_i aktivierenden Mediators wiederhergestellt werden [25, 78, 131]. Zusammenfassend deutet dies auf die Notwendigkeit der Aktivierung verschiedener Signalwege für eine vollständige Thrombozytenaktivierung hin.

CXCL12 scheint in diesem Zusammenhang ein relevanter Thrombozytenaktivator zu sein, welcher seine Wirkung über den G_i -Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR4 ausübt [75, 78]. In der Literatur wird beschrieben, dass CXCL12 allein eine Aggregation in plättchenreichem Plasma, jedoch nicht in isolierten Thrombozyten hervorruft. Dies ähnelt anderen Mediatoren, welche über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wirken und deutet darauf hin, dass sekundäre Mechanismen involviert sind [75]. Bezüglich dieser sekundären Mechanismen werden in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse beschrieben: Einerseits wird berichtet, dass ADP Rezeptorantagonisten oder Apyrase, ein ADP-hydrolysierendes Enzym, CXCL12-vermittelte Effekte inhibieren [79, 85]. Andererseits wird in neueren Publikationen beschrieben, dass eine Blockierung der TxA_2 Signalkaskaden mit Aspirin oder Indometacin inhibierend wirken, ADP-Antagonisten jedoch nur einen geringen Effekt aufweisen [75, 78]. Darüber hinaus konnte mechanistisch gezeigt

werden, dass CXCL12 in Thrombozyten seine Wirkung über den CXCR4 Rezeptor und über Signalkaskaden die G_i, PI3 Kinasen, Tyrosinkinase, die Adenylatcyclase und Akt Signalwege involvieren, vermittelt. Diese Signalkaskaden führen sowohl zu einem Calciumstrom, sowie zur Erniedrigung von cAMP, beides Vorgänge der Thrombozytenaktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [25, 75, 78-80, 84, 85]. Die Ergebnisse dieser Arbeit, die darlegen, dass eine CXCR4 Antagonisierung zu einer Verminderung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation führt, werden durch Daten von Walsh et al. bestätigt [75]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch erstmals auch eine Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation dargelegt werden. Dies deutet auf eine Relevanz der CXCL12-CXCR4 Achse als para- und autokrinen Mediator der Thrombozytenaggregation durch atherosklerotisches Plaquematerial hin.

4.1.2 Darstellung der CXCL12 Expression und Sekretion in ruhenden und aktivierten Thrombozyten

Bei Aktivierung exprimieren Thrombozyten CXCL12 auf ihrer Oberfläche und setzen es frei [54, 73, 75, 76, 83]. Dies konnte durch hochauflösende STED Mikroskopie und ELISA bestätigt werden. Dies stärkt die Hypothese, dass CXCL12 ein autokriner, von Thrombozyten selbst freigesetzter, Aktivator ist.

Experimente von Chatterjee et al. zeigen, dass CXCL12 im Vergleich zum ebenfalls in den α -Granula gespeicherten Chemokin CXCL4 bei Aktivierung in geringerem Ausmaß freigesetzt wird. Bemerkenswerterweise ist CXCL12 jedoch zu einem deutlich höheren Anteil auf der Thrombozytenoberfläche vorhanden. Dies ist insbesondere beachtlich, da CXCL4 in größeren Mengen in den α -Granula vorhanden ist [44] Welche mechanistische Rolle dieses Oberflächen-gebundene CXCL12 in der CXCL12-abhängigen Thrombozytenaktivierung hat, ist unklar und bedarf weiterer Abklärung.

Klinische Untersuchungen zeigen, dass Patienten mit akutem Koronarsyndrom eine erhöhte thrombozytäre CXCL12-Expression zeigen, welche mit dem Grad der Thrombozytenaktivierung korreliert [91, 92]. In Ergänzung dazu, wurde vor kurzem postuliert, dass eine hohe thrombozytäre CXCL12-Expression bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit einen negativen Einfluss auf das Überleben hat [93].

Im Folgenden soll nun die Relevanz der CXCL12-CXCR4 Achse unter pathophysiologischen Bedingungen diskutiert werden.

4.1.3 Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation unter arteriellem Fluss

Um die pathophysiologischen Bedingungen einer atherosklerotischen Plaque-ruptur besser nachzubilden, wurden Flusskammern mit humanem atherosklerotischem Plaquematerial beschichtet und unter arteriellen Scherraten mit humanem Vollblut perfundiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung der CXCL12-CXCR4 Achse zu einem reduzierten Thrombusvolumen führte. Dies wird durch Ergebnisse bestätigt, die in einem ähnlichen Versuchsaufbau mit Kollagenbeschichtung durchgeführt wurden [75]. Außerdem wird in der Literatur berichtet, dass unter Flussbedingungen die Zugabe von CXCL12 zu Vollblut unter Fluss zu einer verstärkten Thrombusbildung führte. Dies konnte durch Kostimulation mit oxLDL oder ADP weiter verstärkt werden [76, 79].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CXCL12 die Thrombozytenmigration induziert, und dass Thrombozyten unter arteriellen Flussbedingungen auf CXCL12-beschichteten Oberflächen adhären [82, 83]. Dies ist besonders unter dem Gesichtspunkt relevant, da atherosklerotisches Plaquematerial CXCL12 enthält [80, 132]. Inwieweit eine CXCL12-induzierte Thrombozytenmigration zur Thrombusbildung durch atherosklerotisches Plaquematerial beiträgt, stellt eine weiterführende Fragestellung dar. Zusammenfassend konnte mit diesem Versuch erstmalig gezeigt werden, dass die Blockierung von CXCR4 die Plaque-induzierte Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen vermindern konnte. Im Folgenden wird die in vivo Relevanz von thrombozytärem CXCL12 diskutiert.

4.2 In vivo Versuche an Versuchstieren mit CXCL12-defizienten Thrombozyten

Die Ergebnisse der in vivo Versuche zeigten, dass eine thrombozytäre CXCL12-Defizienz dazu führte, dass sich die Zeit bis zur Ausbildung einer stabilen arteriellen Thrombose verlängerte und mehr Versuchstiere keine stabilen Thromben ausbildeten. Dazu zeigte sich in der histologischen Auswertung eine verkleinerte

Thrombusfläche. Außerdem fand sich nach 4 Wochen einer fett- und cholesterinreichen Diät ein Trend zu einer geringeren postthrombotischen Plaquebildung. Die thrombozytäre CXCL12-Defizienz hatte keine Auswirkungen auf die Hämatopoese, die CXCL12 Plasmaspiegel, die Blutungszeit und die de-novo Atherogenese in der Aortenwurzel nach 4 Wochen fett- und cholesterinreicher Diät. Diese Arbeit ist die erste ihrer Art, welche den Effekt einer CXCL12-Defizienz auf die Thrombusbildung in vivo untersucht. Eine Studie von Chatterjee et al. kann die erhobenen Ergebnisse dahingehend ergänzen, dass eine Injektion von 10 µg CXCL12 zu einem signifikant schnelleren Verschluss im FeCl₃-Thrombosemodell führte. Jedoch wurde diese Studie nur mit einer geringen Gruppengröße (n=5) durchgeführt und die exogene Zugabe von CXCL12 ermöglicht es nicht, Aussagen über eine Relevanz von endogenem CXCL12 in der Atherothrombose zu treffen [76].

Die Verschlusszeiten in den vorgelegten Thromboseversuchen ähneln den Ergebnissen anderer Untersuchungen mit ähnlichem Versuchsaufbau [76, 110, 133, 134]. Im Vergleich mit anderen autokrin wirkenden Thrombozytenaktivatoren, wie z. B. ADP, Serotonin, Epinephrin oder CXCL4 zeigt sich bei Deletion oder Antagonisierung ebenfalls eine Instabilität der Thromben, wobei oftmals zusätzlich eine verlängerte Blutungszeit auftritt [25, 45, 134]. Eine Instabilität der Thromben wurde ebenfalls bei in vivo Thromboseversuchen in Versuchstieren mit Ausschaltung der G-Proteine, über die sowohl CXCL12 als auch die anderen genannten Mediatoren wirken, beobachtet [25, 133]. Da CXCL12, unter anderem, über eine Erniedrigung des intrathrombozytären cAMPs proaggregatorisch wirkt [75], ist ebenfalls nennenswert, dass eine Erhöhung des intrathrombozytären cAMPs die Thrombozytenakkumulation nach Gefäßverletzung verhindert [25, 45, 75, 78, 81, 133-135].

Die Ergebnisse bezüglich der Neointima/Plaquebildung nach Gefäßschädigung werden durch Veröffentlichungen von Schober und Zerneck et al. untermauert. Darin wird dargelegt, dass nach Gefäßschädigung CXCL12 gemeinsam mit Thrombozyten an der Neointimabildung beteiligt ist und dass eine Blockierung der CXCL12-CXCR4 Achse die Neointimabildung hemmt [88, 89]. Thrombozytäres CXCL12 scheint zumindest anteilig an diesem Prozess beteiligt zu sein.

Der Befund, dass thrombozytäres CXCL12 keine Auswirkung auf die CXCL12 Plasmaspiegel sowie auf eine frühe de-novo Atherogenese in der Aortenwurzel

hat, wird durch eine Studie von Döring et al., in welcher Versuchstiere mit CXCL12-defizientem Knochenmark verwendet wurden, bestätigt [71].

Da CXCL12 eine wichtige Rolle für die Hämatopoese spielt, ist es bemerkenswert, dass eine thrombozytäre und megakaryozytäre CXCL12-Defizienz keine Auswirkung auf die Hämatopoese in Bezug auf Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozytensubtypen wie T Zellen, Monozyten und Granulozyten hat.

Dies ist aber plausibel, da im Knochenmark hauptsächlich sog. CAR- Zellen CXCL12 freisetzen. (siehe Einleitung)

Eine mögliche Erklärung, warum thrombozytäres CXCL12 eine relevante Rolle in der arteriellen Thrombose innehat, obwohl CXCL12 im Plasma unter physiologischen Bedingungen bereits vorhanden ist (Maus ca. 500 pg/ml [71], Mensch: ca. 2000 pg/ml [70]) ist, dass es Hinweise darauf gibt, dass CXCL12 im Serum durch Modifikation eine verminderte Aktivität aufweist [70, 136]. Dies erklärt, warum akut von Thrombozyten freigesetztes CXCL12 eine Rolle in der arteriellen Thrombose spielen könnte. Des Weiteren gibt es Anhaltspunkte dafür, dass es während der Thrombusbildung im interthrombozytären Spalt zu einer lokalen Erhöhung der Konzentration der freigesetzten Mediatoren kommt. Außerdem können, durch die enge räumliche Nähe, auf der Oberfläche exprimierte Moleküle mit den nächstgelegenen Thrombozyten interagieren. Dies könnte auch auf thrombozytäres CXCL12 zutreffen [137]. Fasst man die Rolle von thrombozytärem CXCL12 in der Thrombose zusammen, so scheint CXCL12 als para- und autokriner Thrombozytenaktivator zu fungieren, der nach Stimulation verschiedener Agonisten, wie Kollagen oder Thrombin freigesetzt wird. CXCL12 könnte dabei zusammen mit anderen Mediatoren ein Faktor der reziproken Rückkopplungsschleife sein, die für eine stabile Thrombusbildung nötig ist. Betrachtet man das aktuelle Modell der Thrombusbildung (siehe Einleitung), so könnte CXCL12 zu den Effekten der ebenfalls über G-Proteine wirkenden Mediatoren ADP und TxA₂ bei der Aktivierung und Rekrutierung der Thrombozyten in der äußeren, instabilen Thrombushülle beitragen. Dies wird durch die erhobenen in vivo Ergebnisse gestützt, die zeigten, dass Versuchstiere mit einer thrombozytären CXCL12-Defizienz oftmals keine okklusiven Thromben ausbildeten, und dass sich in der histologischen Auswertung kleinere Thromben als in der Vergleichsgruppe zeigten [33, 35, 36].

4.3 Untersuchung von CXCL12-defizienten Thrombozyten

Um zu untersuchen, über welchen Mechanismus thrombozytäres CXCL12 prothrombotisch wirkt, wurden Experimente mit CXCL12-defizienten Thrombozyten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass CXCL12-defiziente Thrombozyten in Multiparameter-Flusskammerversuchen auf Kollagen-beschichteten Oberflächen einen stark ausgeprägten Phänotyp bezüglich der Aggregationsfähigkeit und des Thrombusaufbaus besaßen. Die Thrombozytenadhäsion hingegen war weniger stark eingeschränkt. Außerdem zeigten CXCL12-defiziente Thrombozyten eine Reduktion der Expression von aktiviertem $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Integrin und P-Selektin nach Kollagenstimulation. Die Ergebnisse hinsichtlich der verminderten Aggregation sind vergleichbar mit denen einer allgemeinen CXCR4 Inhibition wie in 3.1.3 beschrieben und von Walsh et al. veröffentlicht [75]. Dieser Phänotyp ähnelt den Ergebnissen von Flusskammerversuchen unter Aspirin oder P2Y₁₂ Behandlung [138]. Bemerkenswert an den erhobenen Versuchen ist, dass Unterschiede in der Thrombozytenaggregation nur auf Kollagen-beschichteten Oberflächen, nicht jedoch auf der Kombinationsbeschichtung VWF-BP/ Laminin/Rhodocytin sichtbar waren. Dies hebt die Relevanz von thrombozytärem CXCL12 für die Pathomechanismen der Atherothrombose hervor, in denen die Thrombozytenaktivierung vor allem über die Interaktion von GPVI und Kollagen erfolgt [18].

Kollagen aktiviert Thrombozyten über GPIb, GPVI und Integrin $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ und anschließend über die Ausschüttung sekundärer Mediatoren wie ADP, TxA₂ und auch CXCL12. Die Beschichtung VWF-BP/ Laminin/Rhodocytin aktiviert Thrombozyten über $\alpha\text{6}\beta\text{1}$ und CLEC2 [115]. Ob diese Aktivierung zu einer Freisetzung von CXCL12 führt, ist auf Grund der erhobenen Daten fraglich, aber bisher nicht untersucht worden. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Experimente können womöglich den, in den Flusskammerexperimenten beobachteten, Phänotyp erklären. Die Thrombozytenaggregation wird hauptsächlich über aktiviertes $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ vermittelt. Die erniedrigte aktivierte $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Integrin und P-Selektin Expression durch CXCL12-defiziente Thrombozyten bestätigt diese Hypothese. Auch die verminderte Komplexbildung von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten unter cholesterinreicher Diät im Blut von Versuchstieren mit CXCL12-defizienten Thrombozyten lässt sich durch die verminderte Expression dieser Oberflächenmoleküle, insbesondere P-Selektin, erklären. Da eine cholesterinreiche Diät zur Thrombozyten Aktivierung führt, ließ sich die verminderte Komplexbildung

nur unter cholesterinreicher Diät feststellen, nicht unter normaler Diät [139]. Es ließ sich analog nur nach Thrombozytenaktivierung eine verminderte Expression von P-Selektin auf Thrombozyten feststellen.

4.4 Untersuchung der Signalwege, welche für eine CXCL12-abhängige Thrombozytenaggregation benötigt werden

BTK ist eine Tyrosinkinase, welche ein wichtiges Enzym für die B-Zell Funktion darstellt und BTK-Inhibitoren werden klinisch erfolgreich gegen maligne B-Zell-Erkrankungen eingesetzt wird. Für Thrombozyten konnte gezeigt werden, dass BTK die Kollagen-GPVI Signalkaskade vermittelt [17]. Zudem war bereits bekannt, dass CXCL12 über CXCR4 zu einer BTK-Aktivierung in Leukämiezellen führt [48, 49]. Inwiefern dieser CXCL12-abhängige Mechanismus jedoch auf Thrombozyten übertragbar ist, war bislang unklar. In den durchgeführten Experimenten konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass eine Thrombozytenaggregation hervorgerufen durch CXCL12 allein oder in Kombination mit Kollagen BTK-abhängig ist und dass CXCL12 zu einer BTK-Phosphorylierung in Thrombozyten führt. BTK wird durch PIP3 aktiviert, welches in Thrombozyten durch die PI3Kinase Untereinheit p85/p100 generiert wird [17]. In Einklang damit, konnte eine Hemmung der PI3Kinase durch TGX-221 ebenfalls eine Thrombozytenaggregation durch CXCL12 allein oder in Kombination mit Kollagen verhindern. Zudem beschrieben Nakashima et al., dass CXCL12 zu einer, für die Thrombozytenaggregation wichtigen, Aktivierung der MAPK führt [127]. Diese Ergebnisse konnten in den durchgeführten Experimenten durch Verwendung eines MAPK-Inhibitors bestätigt werden. Jedoch war die Effektgröße im Vergleich zur Inhibition von BTK oder PI3K geringer, was möglicherweise für zusätzliche MAPK-unabhängige Signalwege spricht. Außerdem konnte mit Hilfe eines Calcium-Inhibitors gezeigt werden, dass die CXCL-12 abhängige Thrombozytenaktivierung Calcium abhängig ist. Zusammenfassend scheint in Thrombozyten eine Bindung von CXCL12 an CXCR4 über die PI3K zu einer Aktivierung von BTK und letztendlich zu einer Calciumfreisetzung und Thrombozytenaggregation zu führen (siehe zusammenfassende Abbildung 33).

4.5 Die Rolle der CXCL12 Rezeptoren CXCR4 und ACKR3 auf Thrombozyten

Neben CXCR4, dessen Rolle hauptsächlich in dieser Arbeit beschrieben und diskutiert wurde, bindet CXCL12 auf Thrombozyten ebenfalls an seinen zweiten Rezeptor ACKR3 (abgekürzt nach englisch *atypical chemokine receptor 3*). Im Ruhezustand befindet sich CXCR4 ausschließlich auf der Thrombozytenoberfläche. ACKR3 hingegen ist sowohl im Zytoplasma als auch auf der Zellmembran, wenngleich in geringerem Maße als CXCR4, exprimiert. Bei Bindung von CXCL12 an CXCR4 findet eine Internalisierung von CXCR4 und eine Hochregulierung von ACKR3 auf die Oberfläche statt. Es wurde beschrieben, dass *in vitro* CXCL12 über ACKR3 der aktivierungsinduzierten Apoptose von Thrombozyten entgegenwirkt. Welche *in vivo* Relevanz dieser Prozess hat, wurde bisher nicht untersucht [140, 141]. Klinische Studien, konnten zeigen, dass Patienten mit akutem Koronarsyndrom eine erhöhte Expression an CXCL12 und ACKR3 aufweisen. Die CXCL12-Expression korreliert dabei stark mit dem Grad der Thrombozytenaktivierung (P-Selektin, GPVI und aktiviertes $\alpha\text{IIb}\beta_3$) und leicht mit den Plasma CXCL12-Spiegeln. Die ACKR3-Expression hingegen korreliert stark mit der CXCL12-Expression. Darüber hinaus konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass eine niedrige CXCR4-Expression auf Thrombozyten einen negativen Einfluss auf das kumulative Überleben von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) hat. Umgekehrt übt eine hohe CXCL12-Expression auf Thrombozyten eine schlechte Prognose auf das kumulative Überleben für Patienten mit KHK aus.

Diese Studien geben Hinweise darauf, dass die experimentell beschriebenen Wechselwirkungen von CXCL12 und seinen Rezeptoren, sowie die prothrombotischen Effekte von CXCL12 klinische Relevanz haben. Jedoch gibt es auch klinische Hinweise auf eine reparative Rolle der CXCL12-CXCR4-ACKR3 Achse (siehe Einleitung). Die ACKR3-Expression korrelierte in Patienten mit akutem Koronarsyndrom positiv mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion der Patienten. Außerdem korreliert die CXCL12 Expression positiv mit der Menge an zirkulierenden CD31+ Progenitorzellen und der linksventrikulären Ejektionsfraktion. Zusammenfassend scheint eine hohe CXCL12-Expression in Patienten mit KHK und damit hohem Risiko für ein akutes Koronarsyndrom, eine CXCR4-Aktivierung und Internalisierung zu bedingen und damit eine Thrombozytenaktivierung

zu verursachen. Diese Aktivierung führt dann zu einem höheren Risiko für ein thrombotisches Ereignis. Die Studien geben jedoch auch Hinweise darauf, dass nach einem thrombotischen Ereignis CXCL12 ebenfalls seine reparativen Funktionen ausübt.

Um die komplexe Rolle von CXCL12 besser zu verstehen, ist ein Vergleich mit anderen Mediatoren, die an CXCR4 oder ACKR3 binden, unerlässlich. MIF ist ein chemokinähnlicher Mediator, der auch in Thrombozyten detektierbar ist und an die Rezeptoren CXCR4, ACKR3, CXCR2 und CD72 bindet. Seine Wirkung auf Thrombozyten unterscheidet sich, trotz der teilweise gemeinsamen Rezeptoren, deutlich von CXCL12 [141, 142].

MIF und CXCL12 zeigen Unterschiede in der Ausschüttungskinetik, wobei MIF erst zwei Stunden nach Kollagen- oder Thrombinstimulation nachweisbar ist und den Höhepunkt der Ausschüttung nach acht Stunden erreicht. CXCL12 hingegen wird innerhalb von wenigen Minuten nach Stimulation mit verschiedenen Aktivatoren, wie Thrombin, ADP oder oxLDL ausgeschüttet; die Ausschüttung erschöpft sich jedoch zügig [143]. MIF hat im Gegensatz zu CXCL12 keine Wirkung auf die Thrombozytenaktivierung oder -aggregation [51, 143]. MIF bindet zwar an CXCR4 kann aber auf Grund der Abwesenheit seiner Korezeptoren CD72 und CXCL2 keine Signaltransduktion auslösen. Dahingegen übt MIF über ACKR3 eine antiapoptotische Wirkung auf aktivierte Thrombozyten aus. Bei Injektion hemmt MIF über diesen antikoagulatorischen Mechanismus die Thrombusbildung. Inwiefern endogenes MIF, aufgrund der beschriebenen langsamen Ausschüttungskinetik, denselben Effekt in vivo ausübt wurde bisher nicht beschrieben [87].

CXCL14 ist ein Chemokin welches ebenfalls an CXCR4 bindet und mit CXCL12 interagiert [81, 144, 145]. CXCL14 wurde vor kurzem von Witte et al. als neues Thrombozytenchemokin mit Relevanz für die Thrombuskonsolidierung identifiziert.

Witte et al. beschreiben, dass CXCL14-defizientes Blut eine verminderte Thrombusbildung unter Fluss zeigte, jedoch konnte eine Zugabe von CXCL14 im selben Modell keine vermehrte Adhäsion verursachen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CXCL14 eine Thrombozytenmigration über CXCR4 auslöste [145]. Welche Auswirkung eine CXCL12-CXCL14 Interaktion, für die es bereits Hinweise gibt [81], auf die Funktion der Thrombozyten hat, wäre eine interessante Fragestellung, ist jedoch bisher unklar.

4.6 Hemmung von CXCL12 durch i[VREY]₄, ein von CCL5 abgeleitetem Peptid und Charakterisierung der CXCL12-i[VREY]₄ Interaktion

i[VREY]₄ ist ein Peptid, das die inhibierende Bindung von CCL5 an CXCL12 imitiert. Außerdem wurde ein Kontrollpeptid, VREY, synthetisiert, welches nicht die konformationelle Stabilität wie i[VREY]₄ aufweist.

Die strukturellen Versuche mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und Kernspinresonanzspektroskopie bestätigten, dass i[VREY]₄ CXCL12 bindet. Bereits in einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass CCL5 mit CXCL12 interagiert. Das Vorläuferpeptid [VREY]₄ wurde auf Grund dieser Erkenntnisse synthetisiert [81]. i[VREY]₄ ist eine optimierte Version von [VREY]₄. Im Vergleich zu den von Hundelshausen et al. für [VREY]₄ veröffentlichten Daten zeigt i[VREY]₄ ein ähnliches Bindungsverhalten an CXCL12 [81]. Die in der Kernspinresonanzspektroskopie erhobenen Daten zeigen teilweise ähnliche strukturelle Änderungen bei der Bindung von i[VREY]₄ an CXCL12, wie bei der Homodimerbildung von CXCL12. Homodimeres CXCL12 zeigt eine veränderte Funktion im Gegensatz zu monomeren CXCL12. Veldkamp et al. zeigen, dass dimeres CXCL12 wie monomeres CXCL12 eine Ca²⁺-Influx bewirkt, jedoch keine chemotaktischen Wirkung ausübt [96]. Auch Dury et al. berichten über unterschiedliche funktionelle Wirkung, Signaltransduktion und Bindung an CXCR4 und ACKR3 von dimeren CXCL12 im Gegensatz zu monomeren CXCL12 [97].

Ray et al. berichten ebenfalls über eine unterschiedliche Funktion und Signaltransduktion von dimeren und monomeren CXCL12. Rays et al. Ergebnisse weisen darauf hin, dass dimeres CXCL12 im Gegensatz zu monomeren CXCL12 keine Aktivierung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Akt ausübt. Dies würde die beobachteten Befunde der i[VREY]₄-CXCL12 Interaktion widerspiegeln, die zeigen, dass [VREY]₄ die CXCL12-induzierte Erniedrigung des intrazellulären cAMPs inhibiert [81]. Die divergierende Wirkung von monomerem und dimerem CXCL12 lässt sich durch unterschiedliche Bindung an CXCR4 erklären und konnte durch Kernspinresonanzspektroskopie bestätigt werden [146].

Die Unterschiede der veröffentlichten Ergebnisse könnte an der Verwendung unterschiedlicher CXCL12-Homodimere liegen [95]. Zusammenfassend, lässt sich

sagen, dass dimeres CXCL12 unterschiedliche funktionelle Eigenschaften im Gegensatz zu monomerem CXCL12 besitzt.

Die Wirkung von CCL5 bzw. i[VREY]₄ auf die Thrombozytenaktivierung in vitro zeigt, dass i[VREY]₄, ebenso wie CCL5, die CXCL12-induzierte Thrombozytenaggregation hemmt. Darüber hinaus zeigen die erhobenen Befunde, dass i[VREY]₄ die Kollagen- oder Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen vermindert. Weder das Chemokin CCL1 noch das Kontrollpeptid VREY ctrl konnten eine CXCL12-induzierte Thrombozytenaggregation beeinflussen.

Der Grad der Inhibierung der CXCL12-induzierten Thrombozytenaggregation ähnelt den Ergebnissen für den CXCR4-Antagonisten AMD 3465 (siehe 3.1.1). Die erhobenen Ergebnisse werden durch die veröffentlichten Versuche von Hundelshausen et al., in denen das Vorgängermolekül [VREY]₄ verwendet wurde, bestätigt. In der genannten Studie wurde die hemmende Wirkung von CCL5 und [VREY]₄ jedoch nur auf eine allein durch CXCL12-induzierte Thrombozytenaggregation untersucht [81].

4.7 Die Wirkung von i[VREY]₄ auf die Plaque-induzierte Thrombusbildung unter arteriellem Fluss

Um das translationale Potential von i[VREY]₄ zu evaluieren wurden analog zu 3.1.3 Flusskammerversuche unter arteriellen Flussbedingungen auf Plaque-beschichteten Oberflächen durchgeführt. Die Vorinkubation von humanem Vollblut mit i[VREY]₄ führte zu einer Reduktion des ermittelten Thrombusvolumens. Dieses Ergebnis wird durch die Daten der Vorgängerstudie von Hundelshausen et al. bestätigt. Dort konnte dargelegt werden, dass das Blut von Versuchstieren, die eine einmalige [VREY]₄ Injektion erhalten hatten, ein vermindertes Thrombusvolumen in einem Kollagen-beschichteten Flusskammermodell aufwies [81].

4.8 Die Wirkung von i[VREY]₄ auf die arterielle Thrombose in vivo

Um die in vivo Wirkung von i[VREY]₄ auf die arterielle Thrombose zu untersuchen, wurden wie in 3.2.2. ein FeCl₃ - induziertes arterielles Thrombosemodell

verwendet. In den durchgeführten Thromboseversuchen verminderte eine i.p. Applikation von i[VREY]₄ die durchschnittliche Zeit bis zu einem stabilen Verschluss der A. carotis. Die Injektion des Kontrollpeptids VREY ctrl hatte keine Wirkung. Damit zeigt sich im Vergleich zu den Versuchen 3.2.2., dass i[VREY]₄ das Potential besitzt, zumindest einen Teil der prothrombotischen in vivo-Wirkung von CXCL12 zu inhibieren.

4.9 Untersuchung der Wirkung von i[VREY]₄ auf die Thrombozytenaggregation in Vollblut mit und ohne CXCL12-Defizienz mittels Impedanzaggregometrie

Um die Spezifität der Wirkung von i[VREY]₄ auf die Thrombozytenaggregation zu untersuchen, erfolgte eine impedanzaggregometrische Messung der Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten mit und ohne CXCL12-Defizienz. CXCL12-defiziente Thrombozyten zeigten eine verminderte Aggregationsfähigkeit, was die zuvor beschriebenen Untersuchungen bestätigt. Die Zugabe von 5 µM i[VREY]₄ führte bei Kontrollblut zu einer signifikanten verminderten Thrombozytenaggregation, jedoch nicht in Blut mit CXCL12-defizienten Thrombozyten. Dies weist auf eine spezifische Hemmung von thrombozytärem CXCL12 durch i[VREY]₄ hin.

4.10 Pharmakokinetik von i[VREY]₄ und Effekte auf die Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten

Die Wirkung des CXCR4-Antagonisten AMD3465 führt durch Störung der CXCL12-CXCR4 Achse im Knochenmark zu einer Freisetzung von Progenitorzellen und Leukozyten [129]. Die leukozytenmobilisierende Wirkung von AMD3465 konnte in den durchgeführten Versuchen bestätigt werden. Die Injektion von i[VREY]₄ führte zu keiner signifikanten Leukozytenmobilisierung. Die geringere Leukozytenmobilisierung stellt möglicherweise einen Vorteil gegenüber direkten CXCR4-Antagonisten dar. Um die Pharmakokinetik von i[VREY]₄ zu analysieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuartiger Sandwich ELISA gegen i[VREY]₄ entwickelt. Die Injektion von 75 µg i[VREY]₄ führte nach 30 Minuten zu einem maximalen Plasmaspiegel von 1.97 µg/ml. Dieser fiel nach 2 Stunden auf ein Plasmaspiegel von 0.07 µg/ml ab. Diese Pharmakokinetik nach i.p. Injektion ist vergleichbar mit anderen klinisch zugelassenen Medikamenten [147].

4.11 Genauere Charakterisierung des i[VREY]₄ Wirkmechanismus

Mittels verschiedener durchflusszytometrischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass i[VREY]₄ an CXCL12 bindet, das mit seinem Rezeptor CXCR4 interagiert. Eine Thrombozytenaktivierung führte zu einer vermehrten Präsentation von CXCL12 auf der Thrombozytenoberfläche und zu einer erhöhten Bindung von i[VREY]₄. i[VREY]₄ verminderte eine CXCL12-induzierte Signaltransduktion via BTK, hatte jedoch keinen Einfluss auf die CXCR4 Internalisierung. Zudem benötigte i[VREY]₄ das Vorhandensein von CXCR4 auf der Oberfläche von Mausthrombozyten um binden zu können. In der Gesamtschau der Befunde spricht das für die Bildung eines ternären Komplexes zwischen i[VREY]₄, CXCL12 und CXCR4. In einer solchen Komplexbildung scheint i[VREY]₄ nur einen Teil der durch CXCR4 vermittelten Signaltransduktion zu verändern. Ein selber Mechanismus konnte für ein Peptid gezeigt werden, dass eine G-protein-vermittelte Signaltransduktion von CXCR4 verhinderte, nicht jedoch eine Arrestin-vermittelte Rezeptorinternalisierung [146].

Diese Form einer ternären Heterokomplexbildung konnte zudem für die Interaktion von CXCL12 mit anderen Botenstoffen, wie Galektin-3 oder HMGB1 gezeigt werden und ist damit auch für die Interaktion von CXCL12 mit i[VREY]₄ plausibel [148, 149]. Interessanterweise ist die Wirkung von Galektin-3 und HMGB1 auf die Funktion von CXCL12 gegensätzlich. Galectin-3 vermindert die Aktivität von CXCL12 wohingegen HMGB1 sie verstärkt. Darüber hinaus führt auch die Homodimerisierung von CXCL12 zu einer veränderten Signaltransduktion von CXCR4 (siehe Abschnitt 4.5) Die komplexen und unterschiedliche Auswirkungen dieser Heterokomplexe auf die Funktion von CXCR4 bedürfen weiterer Untersuchungen.

4.12 Evaluation einer zusätzlichen Wirkung von i[VREY]₄ auf konventionelle Thrombozytenaggregationshemmer

In der klinischen Praxis werden aktuell vor allem zwei Arten von Thrombozytenaggregationshemmern benutzt: Aspirin und P2Y₁₂ Inhibitoren [23]. Die Therapie mit diesen Thrombozytenaggregationshemmern birgt jedoch ein erhebliches Blutungspotential, sowie ein residuales thrombogenes Risiko [23, 130]. In der

vorliegenden Arbeit wurde daher evaluiert inwiefern die Kombination von i[VREY]₄ mit Aspirin oder dem P2Y₁₂ Inhibitor Cangrelor sich auf die Blutungszeit in einem in-vitro Blutungsmodell (PFA-200) sowie auf die Thrombozytenaggregation auswirkt. i[VREY]₄ führte weder allein noch in Kombination mit Aspirin oder Cangrelor zu einer Verlängerung der Blutungszeit.

Die durchgeführten Versuche zeigten, dass Aspirin und Cangrelor die CXCL12-abhängige Thrombozytenaggregation nur unzureichend hemmen.

Die Zugabe von i[VREY]₄ führte jedoch zu einer signifikant verbesserten Hemmung einer CXCL12-abhängigen Thrombozytenaggregation in Kombination mit Aspirin oder Cangrelor. Daher wurde zudem untersucht, ob i[VREY]₄ in Kombination mit Standardthrombozytenaggregationshemmern eine Plaque-induzierte Thrombozytenaggregationshemmung verbessern kann. i[VREY]₄ in Kombination mit Cangrelor konnte die thrombozytenaggregationshemmende Wirkung signifikant verstärken. Zusammenfassend scheint i[VREY]₄ die Wirkung von Aspirin oder Cangrelor zu verstärken ohne die in-vitro Blutungszeit zu verlängern.

4.13 Vergleich von i[VREY]₄ mit anderen CXCL12 hemmenden Molekülen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Funktion von CXCL12 zu inhibieren.

Das Molekül AMD3100, ein CXCR4-Antagonist, wird klinisch zur Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen eingesetzt (Plerixaform). AMD3100 wurde aber in diesen Versuchen nicht verwendet, da gezeigt werden konnte, dass AMD3100, im Gegensatz zu AMD3465, eine agonistische Wirkung auf ACKR3 besitzt [57, 128, 129, 150]. Neben der direkten CXCR4 Antagonisierung durch AMD 3100/AMD 3465 und dem in dieser Arbeit beschriebenen Peptid i[VREY]₄ gibt es noch weitere Ansätze, um CXCL12 zu inhibieren. Mehrfach beschrieben wurde die erfolgreiche in vitro und in vivo Anwendung des RNA Oligonukleotids NOX-A12 (Spiegelmer) als CXCL12 bindendes und inhibierendes Molekül [151-153]. Mit diesem Molekül wurden bereits erfolgreiche klinische Phase I und II Studien durchgeführt, mit dem Ziel einer Leukämie- und Stammzellmobilisierung [153-155]. Außerdem wurde aus der bereits beschriebenen Interaktion von CXCL4 und CXCL12 (siehe Einleitung) ein Peptid konstruiert, das die chemotaktische Wirkung von CXCL12 in vitro inhibierte [105].

Inwiefern sich i[VREY]₄ in seiner Funktion im Vergleich mit diesen Ansätzen unterscheidet oder gleicht, müssen weitere Studien zeigen. Ein Vorteil von i[VREY]₄ könnte die verminderte Zellmobilisierung aus dem Knochenmark darstellen. Dies macht i[VREY]₄ attraktiv für therapeutische Ansätze der CXCL12-Inhibition, in denen keine Zellmobilisierung erwünscht ist.

5 Zusammenfassung

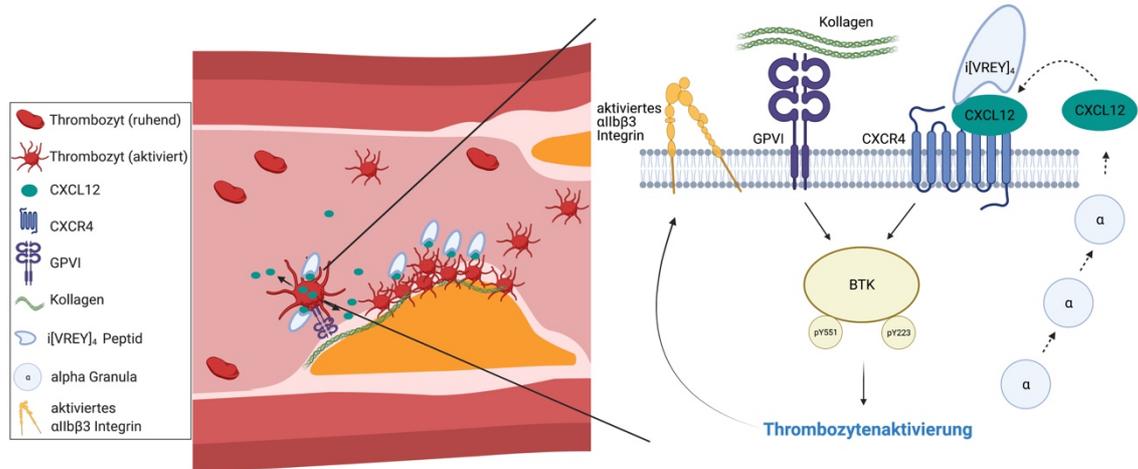


Abbildung 33. Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von i[VREY]₄ und der durch CXCL12 aktivierten Signalkaskade

Arterielle thrombotische Ereignisse sind die häufigste Todesursache weltweit und aktuelle Thrombozytenaggregationshemmer verursachen Blutungskomplikationen. Deshalb besteht weiterhin Bedarf an der Erforschung der Pathomechanismen der arteriellen Thrombose und an der Translation dieser Befunde.

CXCL12 ist ein Chemokin mit vielfältigen Funktionen, dem eine thrombozytenaktivierende Wirkung *in vitro* zugesprochen wird. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die aggregationsfördernden Eigenschaften der CXCL12-CXCR4 Achse zu bestätigen, eine *in vivo* Relevanz zu untersuchen und zu testen, ob thrombozytäres CXCL12 für diese Effekte verantwortlich ist. Darüber hinaus war ein weiteres Ziel, das Potential eines mit CXCL12 interagierenden Peptids in der Thrombozytenaggregationshemmung zu evaluieren.

Für die Beurteilung der Thrombozytenaggregation wurden Impedanzaggregometrie, Flusskammerversuche auf Kollagen- und Plaque-beschichteten Oberflächen und *in vivo* Modelle der arteriellen Thrombose und der Blutungsneigung verwendet. Außerdem wurden STED Mikroskopie, Durchflusszytometrie und Western-Blot-Experimente zur Untersuchung und Darstellung der molekularen Prozesse verwendet. Zur Erforschung von strukturellen Interaktionen wurden Oberflächenplasmonenresonanz- und Kernspinresonanzspektroskopie verwendet.

Mit Hilfe diesen Methoden konnte belegt werden, dass CXCL12 über CXCR4 eine BTK-Signaltransduktion und darüber eine Thrombozytenaggregation verursacht, insbesondere in Kostimulation mit Kollagen. Zudem verminderte die Blockade von CXCR4 die Kollagen- und Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen. Unter arteriellen Flussbedingungen konnte außerdem gezeigt werden, dass eine CXCR4 Antagonisierung zu einer verminderten Thrombusbildung auf humanem atherosklerotischem Plaquematerial führte. Diese Befunde deuten darauf hin, dass thrombozytäres CXCL12 als para- und autokriner Mediator wirkt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Versuchstiere mit thrombozytärer CXCL12-Defizienz verwendet. Blut mit CXCL12-defizienten Thrombozyten zeigte eine verminderte Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen. In einem in vivo Thrombosemodell bildeten die Versuchstiere mit CXCL12-defizienten Thrombozyten instabilere und kleinere Thromben. Auf molekularer Ebene exprimierten die defizienten Thrombozyten unter Kollagenstimulation weniger aktiviertes $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Integrin. Um die prothrombotischen Eigenschaften von CXCL12 zu hemmen, wurde i[VREY]_4 , ein von CCL5 abgeleitetes Peptid, synthetisiert. Mittels struktureller Untersuchungen konnte die Interaktion von CXCL12 und i[VREY]_4 genauer charakterisiert werden. Die Inhibierung von CXCL12 durch i[VREY]_4 führte zu einer Hemmung der CXCL12-, Kollagen- und Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation. Unter Flussbedingungen verminderte i[VREY]_4 die Thrombusbildung auf humanem atherosklerotischem Plaquematerial. Darüber hinaus verlängerte i[VREY]_4 die Zeit bis zu einem stabilen Verschluss in einem in vivo Thrombosemodell und verstärkte die Wirkung von zugelassenen Thrombozytenaggregationshemmern ohne negative Effekte auf die primäre Hämostase in-vitro. Somit stellt i[VREY]_4 einen vielversprechenden Ansatz zur Hemmung der prothrombotischen Wirkung des Chemokins CXCL12 dar.

6 Summary

Thromboembolic events remain the leading cause of death and current antiplatelet medications harbor the risk of bleeding. Therefore, novel therapeutics are needed. CXCL12 is a multifunctional chemokine expressed by thrombocytes that has been described to activate platelets in-vitro. However, the in vivo relevance

of platelet-derived CXCL12 in arterial thrombosis was unknown. This thesis aimed to evaluate the importance of platelet-derived CXCL12 in arterial thrombosis and elucidate the molecular mechanisms of how CXCL12 activates platelets and targets CXCL12 with a novel peptide antagonist. Multiple electrode aggregometry, flow-chamber assays, flow cytometry, and mouse models of arterial thrombosis and bleeding were used to investigate platelet aggregation and thrombosis. To elucidate the molecular mechanisms of the CXCL12-CXCR4 axis, western blot experiments, flow-cytometry and STED microscopy were used. Furthermore, surface- and nuclear plasmon resonance were used to characterize the interactions between CXCL12 and the peptide antagonist i[VREY]₄. Using these techniques, we could prove that CXCL12 activates platelets via its receptor CXCR4 and could show for the first time a significant relevance of the tyrosine kinase BTK in the signaling cascade of CXCR4 in platelets. Antagonism of CXCR4 reduced thrombus formation under arterial flow conditions in a human plaque-coated flow chamber model, indicating that CXCL12 acts as an auto- and paracrine platelet activator. To prove the relevance of platelet-derived CXCL12, we used a platelet-specific mouse model of CXCL12 deficiency. Blood from deficient mice showed a reduced thrombus formation on collagen under arterial flow, and platelet-specific CXCL12 deficiency led to a prolonged time to occlusion and less stable thrombi in an in vivo arterial thrombosis model. CXCL12-deficient thrombocytes showed a reduced expression of p-selectin and activated αIIbβ₃ integrin on a molecular level. To target CXCL12 in atherothrombotic disease, i[VREY]₄ a CCL5 derived peptide was designed. The interaction of CXCL12 and i[VREY]₄ was characterized using biophysical methods and flow-cytometry. i[VREY]₄ reduced CXCL12-, collagen- and plaque-induced platelet aggregation under static and flow conditions. Furthermore, i[VREY]₄ curbed arterial thrombosis in vivo without causing leukocytosis and improved the efficacy of approved antiplatelet drugs without causing increased bleeding in-vitro. In summary, i[VREY]₄ is a novel promising candidate to inhibit the prothrombotic effects of platelet-derived CXCL12.

Literaturverzeichnis

1. Nowbar, A.N., et al., *Mortality From Ischemic Heart Disease*. Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes, 2019. **12**(6): p. e005375.
2. Association, A.H., *Cardiovascular disease: A costly burden for America projections through 2035*. 2017.
3. Jackson, S.P., *Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1423-36.
4. Mackman, N., et al., *Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches*. Nat Rev Drug Discov, 2020.
5. Thomas, S.G., 3 - *The Structure of Resting and Activated Platelets*, in *Platelets (Fourth Edition)*, A.D. Michelson, Editor. 2019, Academic Press. p. 47-77.
6. Provost, P., 6 - *Platelet MicroRNAs*, in *Platelets (Fourth Edition)*, A.D. Michelson, Editor. 2019, Academic Press. p. 127-138.
7. Flaumenhaft, R. and A. Sharda, 19 - *Platelet Secretion*, in *Platelets (Fourth Edition)*, A.D. Michelson, Editor. 2019, Academic Press. p. 349-370.
8. Deppermann, C., et al., *Gray platelet syndrome and defective thrombo-inflammation in Nbeal2-deficient mice*. J Clin Invest, 2013. **123**(8): p. 3331-42.
9. Cattaneo, M., 48 - *Inherited Disorders of Platelet Function*, in *Platelets (Fourth Edition)*, A.D. Michelson, Editor. 2019, Academic Press. p. 877-904.
10. Gaertner, F., et al., *Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria*. Cell, 2017. **171**(6): p. 1368-1382.e23.
11. von Hundelshausen, P. and C. Weber, *Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease*. Circ Res, 2007. **100**(1): p. 27-40.
12. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 34-45.
13. Nieswandt, B., I. Pleines, and M. Bender, *Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke*. J Thromb Haemost, 2011. **9 Suppl 1**: p. 92-104.
14. Stegner, D. and B. Nieswandt, *Platelet receptor signaling in thrombus formation*. J Mol Med (Berl), 2011. **89**(2): p. 109-21.
15. Kasper, D., et al., *Harrison's principles of internal medicine*, 19e. 2015.
16. Hagedorn, I., T. Vögtle, and B. Nieswandt, *Arterial thrombus formation. Novel mechanisms and targets*. Hamostaseologie, 2010. **30**(3): p. 127-35.
17. Busygina, K., et al., *Btk Inhibitors as First Oral Atherothrombosis-Selective Antiplatelet Drugs?* Thromb Haemost, 2019. **119**(8): p. 1212-1221.
18. Penz, S., et al., *Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI*. Faseb j, 2005. **19**(8): p. 898-909.
19. Massberg, S., et al., *A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo*. J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 41-9.
20. Schulz, C., et al., *Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(4): p. 356-67.
21. Nieswandt, B. and S.P. Watson, *Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?* Blood, 2003. **102**(2): p. 449-61.

22. Stegner, D., et al., *Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 127.
23. Jamasbi, J., et al., *Platelet receptors as therapeutic targets: Past, present and future*. Thromb Haemost, 2017. **117**(7): p. 1249-1257.
24. Clemetson, K.J., et al., *Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4046-4054.
25. Offermanns, S., *Activation of platelet function through G protein-coupled receptors*. Circ Res, 2006. **99**(12): p. 1293-304.
26. Sim, D.S., et al., *Initial accumulation of platelets during arterial thrombus formation in vivo is inhibited by elevation of basal cAMP levels*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2127-34.
27. von Hundelshausen, P., R.R. Koenen, and C. Weber, *Platelet-mediated enhancement of leukocyte adhesion*. Microcirculation, 2009. **16**(1): p. 84-96.
28. Massberg, S., et al., *Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases*. Nat Med, 2010. **16**(8): p. 887-96.
29. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(36): p. 15880-15885.
30. Marx, C., et al., *Eosinophil-platelet interactions promote atherosclerosis and stabilize thrombosis by eosinophil extracellular traps*. Blood, 2019: p. blood.2019000518.
31. Nesbitt, W.S., et al., *A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation*. Nat Med, 2009. **15**(6): p. 665-73.
32. Stalker, T.J., et al., *Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network*. Blood, 2013. **121**(10): p. 1875-85.
33. Stalker, T.J., J.D. Welsh, and L.F. Brass, *Shaping the platelet response to vascular injury*. Curr Opin Hematol, 2014. **21**(5): p. 410-7.
34. McFadyen, J.D. and S.P. Jackson, *Differentiating haemostasis from thrombosis for therapeutic benefit*. Thromb Haemost, 2013. **110**(5): p. 859-67.
35. Brass, L.F., S.L. Diamond, and T.J. Stalker, *Platelets and hemostasis: a new perspective on an old subject*. Blood Adv, 2016. **1**(1): p. 5-9.
36. Tomaiuolo, M., L.F. Brass, and T.J. Stalker, *Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis*. Interv Cardiol Clin, 2017. **6**(1): p. 1-12.
37. Weber, C. and H. Noels, *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1410-22.
38. Huo, Y., et al., *Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E*. Nat Med, 2003. **9**(1): p. 61-7.
39. von Hundelshausen, P. and M.M. Schmitt, *Platelets and their chemokines in atherosclerosis-clinical applications*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 294.
40. von Hundelshausen, P., et al., *RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium*. Circulation, 2001. **103**(13): p. 1772-7.
41. von Hundelshausen, P., et al., *Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium*. Blood, 2005. **105**(3): p. 924-30.

42. Massberg, S., et al., *A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation*. J Exp Med, 2002. **196**(7): p. 887-96.
43. Blanchet, X., et al., *Touch of chemokines*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 175.
44. Karshovska, E., C. Weber, and P. von Hundelshausen, *Platelet chemokines in health and disease*. Thromb Haemost, 2013. **110**(5): p. 894-902.
45. Eslin, D.E., et al., *Transgenic mice studies demonstrate a role for platelet factor 4 in thrombosis: dissociation between anticoagulant and antithrombotic effect of heparin*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3173-80.
46. Sachais, B.S., et al., *Elimination of platelet factor 4 (PF4) from platelets reduces atherosclerosis in C57Bl/6 and apoE^{-/-} mice*. Thromb Haemost, 2007. **98**(5): p. 1108-13.
47. Mousavi, A., *CXCL12/CXCR4 signal transduction in diseases and its molecular approaches in targeted-therapy*. Immunology Letters, 2020. **217**: p. 91-115.
48. Chen, S.S., et al., *BTK inhibition results in impaired CXCR4 chemokine receptor surface expression, signaling and function in chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2016. **30**(4): p. 833-843.
49. de Gorter, D.J., et al., *Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing*. Immunity, 2007. **26**(1): p. 93-104.
50. van der Vorst, E.P., Y. Doring, and C. Weber, *MIF and CXCL12 in Cardiovascular Diseases: Functional Differences and Similarities*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 373.
51. Chatterjee, M., et al., *Macrophage migration inhibitory factor limits activation-induced apoptosis of platelets via CXCR7-dependent Akt signaling*. Circ Res, 2014. **115**(11): p. 939-49.
52. Lau, S., et al., *A negative-feedback loop maintains optimal chemokine concentrations for directional cell migration*. Nature Cell Biology, 2020. **22**(3): p. 266-273.
53. Baccin, C., et al., *Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization*. Nat Cell Biol, 2020. **22**(1): p. 38-48.
54. Massberg, S., et al., *Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1221-33.
55. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(16): p. 9448-9453.
56. Martin, C., et al., *Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence*. Immunity, 2003. **19**(4): p. 583-93.
57. Broxmeyer, H.E., et al., *Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist*. Journal of Experimental Medicine, 2005. **201**(8): p. 1307-1318.
58. Hamada, T., et al., *Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation*. J Exp Med, 1998. **188**(3): p. 539-48.
59. Lane, W.J., et al., *Stromal-derived factor 1-induced megakaryocyte migration and platelet production is dependent on matrix metalloproteinases*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4152-9.

60. Majka, M., et al., *Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4142-51.
61. Perez, L.E., et al., *Increased plasma levels of stromal-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) enhance human thrombopoiesis and mobilize human colony-forming cells (CFC) in NOD/SCID mice*. Exp Hematol, 2004. **32**(3): p. 300-7.
62. Niswander, L.M., et al., *SDF-1 dynamically mediates megakaryocyte niche occupancy and thrombopoiesis at steady state and following radiation injury*. Blood, 2014. **124**(2): p. 277-86.
63. Döring, Y., et al., *The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 212.
64. Liehn, E.A., et al., *Double-Edged Role of the CXCL12/CXCR4 Axis in Experimental Myocardial Infarction*. Journal of the American College of Cardiology, 2011. **58**(23): p. 2415-2423.
65. Mehta, N.N., et al., *The novel atherosclerosis locus at 10q11 regulates plasma CXCL12 levels*. European Heart Journal, 2011. **32**(8): p. 963-971.
66. Sjaarda, J., et al., *Blood CSF1 and CXCL12 as Causal Mediators of Coronary Artery Disease*. Journal of the American College of Cardiology, 2018. **72**(3): p. 300-310.
67. Schunkert, H., et al., *Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease*. Nature Genetics, 2011. **43**(4): p. 333-338.
68. Subramanian, S., et al., *Stromal cell-derived factor 1 as a biomarker of heart failure and mortality risk*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(9): p. 2100-5.
69. Schutt, R.C., et al., *Plasma CXCL12 levels as a predictor of future stroke*. Stroke, 2012. **43**(12): p. 3382-6.
70. Ghasemzadeh, N., et al., *Plasma stromal cell-derived factor 1 α /CXCL12 level predicts long-term adverse cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease*. Atherosclerosis, 2015. **238**(1): p. 113-118.
71. Döring, Y., et al., *CXCL12 Derived From Endothelial Cells Promotes Atherosclerosis to Drive Coronary Artery Disease*. Circulation, 2019. **139**(10): p. 1338-1340.
72. Doring, Y., et al., *Vascular CXCR4 Limits Atherosclerosis by Maintaining Arterial Integrity: Evidence From Mouse and Human Studies*. Circulation, 2017. **136**(4): p. 388-403.
73. Chatterjee, M., et al., *Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli*. Blood, 2011. **117**(14): p. 3907-11.
74. Burkhart, J.M., et al., *The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways*. Blood, 2012. **120**(15): p. e73-82.
75. Walsh, T.G., M.T. Harper, and A.W. Poole, *SDF-1 α is a novel autocrine activator of platelets operating through its receptor CXCR4*. Cell Signal, 2015. **27**(1): p. 37-46.
76. Chatterjee, M., et al., *Regulation of oxidized platelet lipidome: implications for coronary artery disease*. Eur Heart J, 2017.
77. Wang, J.F., Z.Y. Liu, and J.E. Groopman, *The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion*. Blood, 1998. **92**(3): p. 756-64.

78. Kowalska, M.A., et al., *Stromal cell-derived factor-1 and macrophage-derived chemokine: 2 chemokines that activate platelets*. *Blood*, 2000. **96**(1): p. 50-7.
79. Gear, A.R., et al., *Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC, and SDF-1 to stimulate platelet function*. *Blood*, 2001. **97**(4): p. 937-45.
80. Abi-Younes, S., et al., *The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques*. *Circ Res*, 2000. **86**(2): p. 131-8.
81. von Hundelshausen, P., et al., *Chemokine interactome mapping enables tailored intervention in acute and chronic inflammation*. *Sci Transl Med*, 2017. **9**(384).
82. Kraemer, B.F., et al., *PI3 kinase-dependent stimulation of platelet migration by stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*. *J Mol Med (Berl)*, 2010. **88**(12): p. 1277-88.
83. Kraemer, B.F., et al., *High shear flow induces migration of adherent human platelets*. *Platelets*, 2011. **22**(6): p. 415-21.
84. Ohtsuka, H., et al., *SDF-1alpha/CXCR4 Signaling in Lipid Rafts Induces Platelet Aggregation via PI3 Kinase-Dependent Akt Phosphorylation*. *PLoS One*, 2017. **12**(1): p. e0169609.
85. Suttitanamongkol, S. and A.R. Gear, *ADP receptor antagonists inhibit platelet aggregation induced by the chemokines SDF-1, MDC and TARC*. *FEBS Lett*, 2001. **490**(1-2): p. 84-7.
86. Chatterjee, M., et al., *Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4–CXCR7*. *Cell Death & Disease*, 2015. **6**: p. e1989.
87. Chatterjee, M., et al., *Macrophage migration inhibitory factor limits activation-induced apoptosis of platelets via CXCR7-dependent Akt signaling*. *Circulation research*, 2014. **115**(11): p. 939-949.
88. Schober, A., et al., *Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice*. *Circulation*, 2003. **108**(20): p. 2491-2497.
89. Zerneck, A., et al., *SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells*. *Circ Res*, 2005. **96**(7): p. 784-91.
90. Stellos, K., et al., *Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells*. *Circulation*, 2008. **117**(2): p. 206-15.
91. Stellos, K., et al., *Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34+ progenitor cells*. *Eur Heart J*, 2009. **30**(5): p. 584-93.
92. Wurster, T., et al., *Platelet expression of stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1): an indicator for ACS?* *Int J Cardiol*, 2013. **164**(1): p. 111-5.
93. Rath, D., et al., *Platelet surface expression of SDF-1 is associated with clinical outcomes in the patients with cardiovascular disease*. *Platelets*, 2017. **28**(1): p. 34-39.
94. Kim, H.K., et al., *Plasma level of stromal derived factor-1 (SDF-1) is increased in disseminated intravascular coagulation patients who have poor outcomes: in vitro effect of SDF-1 on coagulopathy*. *Thromb Res*, 2007. **120**(4): p. 559-66.

95. Ray, P., et al., *Secreted CXCL12 (SDF-1) forms dimers under physiological conditions*. *Biochem J*, 2012. **442**(2): p. 433-42.
96. Veldkamp, C.T., et al., *Structural basis of CXCR4 sulfotyrosine recognition by the chemokine SDF-1/CXCL12*. *Sci Signal*, 2008. **1**(37): p. ra4.
97. Drury, L.J., et al., *Monomeric and dimeric CXCL12 inhibit metastasis through distinct CXCR4 interactions and signaling pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(43): p. 17655-60.
98. Koenen, R.R., et al., *Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice*. *Nat Med*, 2009. **15**(1): p. 97-103.
99. Grommes, J., et al., *Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012. **185**(6): p. 628-36.
100. Iida, Y., et al., *Peptide Inhibitor of CXCL4–CCL5 Heterodimer Formation, MKEY, Inhibits Experimental Aortic Aneurysm Initiation and Progression*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2013. **33**(4): p. 718-726.
101. Fan, Y., et al., *MKEY, a Peptide Inhibitor of CXCL4–CCL5 Heterodimer Formation, Protects Against Stroke in Mice*. *Journal of the American Heart Association*, 2016. **5**(9): p. e003615.
102. Vajen, T., et al., *Blocking CCL5-CXCL4 heteromerization preserves heart function after myocardial infarction by attenuating leukocyte recruitment and NETosis*. *Scientific reports*, 2018. **8**(1): p. 10647-10647.
103. Shenkman, B., et al., *Differential response of platelets to chemokines: RANTES non-competitively inhibits stimulatory effect of SDF-1 alpha*. *J Thromb Haemost*, 2004. **2**(1): p. 154-60.
104. Carlson, J., et al., *The heterodimerization of platelet-derived chemokines*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1834**(1): p. 158-68.
105. Nguyen, K.T.P., et al., *CXCL12-CXCL4 heterodimerization prevents CXCL12-driven breast cancer cell migration*. *Cell Signal*, 2019. **66**: p. 109488.
106. Venetz, D., et al., *Perivascular expression of CXCL9 and CXCL12 in primary central nervous system lymphoma: T-cell infiltration and positioning of malignant B cells*. *Int J Cancer*, 2010. **127**(10): p. 2300-12.
107. Tiedt, R., et al., *Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo*. *Blood*, 2007. **109**(4): p. 1503-6.
108. Rafii, S., et al., *Platelet-derived SDF-1 primes the pulmonary capillary vascular niche to drive lung alveolar regeneration*. *Nat Cell Biol*, 2015. **17**(2): p. 123-136.
109. Sachs, U.J. and B. Nieswandt, *In vivo thrombus formation in murine models*. *Circ Res*, 2007. **100**(7): p. 979-91.
110. Li, W., T.M. McIntyre, and R.L. Silverstein, *Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: A model of redox pathology*. *Redox Biol*, 2013. **1**: p. 50-5.
111. Novotny, J., et al., *Histological comparison of arterial thrombi in mice and men and the influence of Cl-amidine on thrombus formation*. *PLoS One*, 2018. **13**(1): p. e0190728.
112. Schoenwaelder, S.M. and S.P. Jackson, *Ferric chloride thrombosis model: unraveling the vascular effects of a highly corrosive oxidant*. *Blood*, 2015. **126**(24): p. 2652-3.

113. de Witt, S.M., et al., *Identification of platelet function defects by multi-parameter assessment of thrombus formation*. Nature Communications, 2014. **5**(1): p. 4257.
114. de Witt, S.M., et al., *Multi-parameter assessment of thrombus formation on microspotted arrays of thrombogenic surfaces*. Nature Protocol Exchange, 2014: p. 33.
115. Nagy, M., et al., *Comparative Analysis of Microfluidics Thrombus Formation in Multiple Genetically Modified Mice: Link to Thrombosis and Hemostasis*. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 2019. **6**(99).
116. van Geffen, J.P., et al., *High-throughput elucidation of thrombus formation reveals sources of platelet function variability*. Haematologica, 2019. **104**(6): p. 1256-1267.
117. Busygina, K., *Prävention der atherosklerotischen Plaque-induzierten Thrombozytenaktivierung durch Tyrosinkinaseinhibitoren*, in *Medizinische Fakultät*. 2020, LMU München: Munich.
118. Reininger, A.J., et al., *A 2-step mechanism of arterial thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(11): p. 1147-58.
119. Brandl, R., et al., *Topographic analysis of proliferative activity in carotid endarterectomy specimens by immunocytochemical detection of the cell cycle-related antigen Ki-67*. Circulation, 1997. **96**(10): p. 3360-8.
120. Dwivedi, S., et al., *Rac1-mediated signaling plays a central role in secretion-dependent platelet aggregation in human blood stimulated by atherosclerotic plaque*. J Transl Med, 2010. **8**: p. 128.
121. Jamasbi, J., et al., *Differential Inhibition of Human Atherosclerotic Plaque-Induced Platelet Activation by Dimeric GPVI-Fc and Anti-GPVI Antibodies: Functional and Imaging Studies*. J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(22): p. 2404-15.
122. Jamasbi, J., et al., *Cross-Linking GPVI-Fc by Anti-Fc Antibodies Potentiates Its Inhibition of Atherosclerotic Plaque- and Collagen-Induced Platelet Activation*. JACC Basic Transl Sci, 2016. **1**(3): p. 131-142.
123. Tóth, O., et al., *Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood*. Thromb Haemost, 2006. **96**(6): p. 781-8.
124. Busygina, K., et al., *Oral Bruton tyrosine kinase inhibitors selectively block atherosclerotic plaque-triggered thrombus formation in humans*. Blood, 2018. **131**(24): p. 2605-2616.
125. Makhoul, S., et al., *cAMP- and cGMP-elevating agents inhibit GPIIb/IIIa-mediated aggregation but not GPIIb/IIIa-stimulated Syk activation in human platelets*. Cell Commun Signal, 2019. **17**(1): p. 122.
126. Proudfoot, A.E. and F. Borlat, *Purification of recombinant chemokines from E. coli*. Methods Mol Biol, 2000. **138**: p. 75-87.
127. Nakashima, D., et al., *Synergistic effect of collagen and CXCL12 in the low doses on human platelet activation*. PLOS ONE, 2020. **15**(10): p. e0241139.
128. Devine, S.M., et al., *Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction*. Blood, 2008. **112**(4): p. 990-998.
129. Bodart, V., et al., *Pharmacology of AMD3465: a small molecule antagonist of the chemokine receptor CXCR4*. Biochem Pharmacol, 2009. **78**(8): p. 993-1000.

130. Majithia, A. and D.L. Bhatt, *Novel Antiplatelet Therapies for Atherothrombotic Diseases*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019. **39**(4): p. 546-557.
131. Jin, J. and S.P. Kunapuli, *Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(14): p. 8070-4.
132. Merckelbach, S., et al., *Expression and Cellular Localization of CXCR4 and CXCL12 in Human Carotid Atherosclerotic Plaques*. *Thromb Haemost*, 2018. **118**(1): p. 195-206.
133. Devanathan, V., et al., *Platelet Gi protein Gai2 is an essential mediator of thrombo-inflammatory organ damage in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(20): p. 6491-6.
134. Wolf, K., et al., *Partially Defective Store Operated Calcium Entry and Hem(ITAM) Signaling in Platelets of Serotonin Transporter Deficient Mice*. *PLoS One*, 2016. **11**(1): p. e0147664.
135. Przyklenk, K., et al., *Targeted inhibition of the serotonin 5HT2A receptor improves coronary patency in an in vivo model of recurrent thrombosis*. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(2): p. 331-40.
136. Villalba, S., et al., *Serum inactivation contributes to the failure of stromal-derived factor-1 to block HIV-1 infection in vivo*. *J Leukoc Biol*, 2003. **74**(5): p. 880-8.
137. Brass, L.F., L. Zhu, and T.J. Stalker, *Minding the gaps to promote thrombus growth and stability*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(12): p. 3385-92.
138. Mendolicchio, G.L., et al., *Variable effect of P2Y12 inhibition on platelet thrombus volume in flowing blood*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(2): p. 373-82.
139. Barrett, T.J., et al., *Platelet regulation of myeloid suppressor of cytokine signaling 3 accelerates atherosclerosis*. *Science Translational Medicine*, 2019. **11**(517): p. eaax0481.
140. Chatterjee, M., et al., *SDF-1 α induces differential trafficking of CXCR4-CXCR7 involving cyclophilin A, CXCR7 ubiquitination and promotes platelet survival*. *Faseb j*, 2014. **28**(7): p. 2864-78.
141. Chatterjee, M., D. Rath, and M. Gawaz, *Role of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 for platelet function*. *Biochem Soc Trans*, 2015. **43**(4): p. 720-6.
142. Strüßmann, T., et al., *Platelets are a previously unrecognised source of MIF*. *Thrombosis and haemostasis*, 2013. **110**(5): p. 1004-1013.
143. Wirtz, T.H., et al., *Platelet-derived MIF: a novel platelet chemokine with distinct recruitment properties*. *Atherosclerosis*, 2015. **239**(1): p. 1-10.
144. Collins, P.J., et al., *Epithelial chemokine CXCL14 synergizes with CXCL12 via allosteric modulation of CXCR4*. *Faseb j*, 2017. **31**(7): p. 3084-3097.
145. Witte, A., et al., *The chemokine CXCL14 mediates platelet function and migration via direct interaction with CXCR4*. *Cardiovasc Res*, 2020.
146. Ziarek, J.J., et al., *Structural basis for chemokine recognition by a G protein-coupled receptor and implications for receptor activation*. *Science Signaling*, 2017. **10**(471): p. eaah5756.
147. Al Shoyaib, A., S.R. Archie, and V.T. Karamyan, *Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies?* *Pharmaceutical Research*, 2019. **37**(1): p. 12.
148. Eckardt, V., et al., *Chemokines and galectins form heterodimers to modulate inflammation*. *EMBO Rep*, 2020: p. e47852.

149. Cecchinato, V., et al., *Chemokine interaction with synergy-inducing molecules: fine tuning modulation of cell trafficking*. J Leukoc Biol, 2016. **99**(6): p. 851-5.
150. Kalatskaya, I., et al., *AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties*. Mol Pharmacol, 2009. **75**(5): p. 1240-7.
151. Darisipudi, M.N., et al., *Dual blockade of the homeostatic chemokine CXCL12 and the proinflammatory chemokine CCL2 has additive protective effects on diabetic kidney disease*. Am J Pathol, 2011. **179**(1): p. 116-24.
152. Hoellenriegel, J., et al., *The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization*. Blood, 2014. **123**(7): p. 1032-9.
153. Vater, A. and S. Klussmann, *Turning mirror-image oligonucleotides into drugs: the evolution of Spiegelmer(®) therapeutics*. Drug Discov Today, 2015. **20**(1): p. 147-55.
154. Vater, A., et al., *Hematopoietic stem and progenitor cell mobilization in mice and humans by a first-in-class mirror-image oligonucleotide inhibitor of CXCL12*. Clin Pharmacol Ther, 2013. **94**(1): p. 150-7.
155. Steurer, M., et al., *Olaptesed pegol (NOX-A12) with bendamustine and rituximab: a phase IIa study in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica, 2019. **104**(10): p. 2053-2060.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christian Weber für die Aufnahme in das Institut für Prävention und Epidemiologie der Kreislauferkrankungen (IPEK), die Anstellung, und die kontinuierliche Förderung bedanken.

Dank gebührt ebenfalls dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislaufforschung e.V. (DZHK) für die Förderung durch ein Promotionsstipendium.

Besonders danken möchte ich PD Dr. Philipp von Hundelshausen für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Vergabe des Themas und seine exzellente Betreuung. Seine kontinuierliche Unterstützung trug maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe von Hundelshausen möchte ich mich ebenfalls herzlich bedanken. Durch die gute Atmosphäre im Labor hat die Arbeit Spaß gemacht. Ein spezieller Dank gebührt Dr. Xavier Blanchet für die Einarbeitung, die herausragende Unterstützung in allen Belangen und für die Durchführung der Plasmonresonanzspektrometrieversuche. Ebenfalls danken möchte ich: Veit Eckhardt für die Einarbeitung und die Möglichkeit an seinem Projekt mitzuarbeiten, Rundan Duan für die Unterstützung bei der Durchführung der in vivo Versuche, Martin Schmitt für die STED und Konfokalmikroskopie, sowie Lusine Sayoran, Sabine Streicher und Kathrin von Oheimb für die vielfältige technische Unterstützung.

Dank gebührt ebenfalls den Kollegen aus Maastricht. Insbesondere möchte ich danken: Stijn Agten für die Synthese des Peptids, Hans Ippel für die Durchführung der Kernspinresonanzspektrometrieversuche, Prof. Johan Heemskerk für die Durchführung der murinen Flusskammerversuche und Prof. Tilman Hackeng.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Remco Megens für die Unterstützung bei der Konfokalmikroskopie und an PD. Dr. Kerstin Jurks aus Mainz für die Unterstützung bei den Western Blot-Versuchen. Bei Prof. Kevin Mayo bedanke ich mich für Unterstützung bei der Analyse der Kernspinresonanzspektrometrie.

Dank gebührt ebenfalls den Mitarbeitern der ZVH für die Versorgung der Versuchstiere.

Weiterhin möchte ich mich beim gesamten IPEK, insbesondere den Mitgliedern des Gartenpavillions für die vielfältige Unterstützung und die gute Zeit am IPEK bedanken.

Dank gebührt auch Heidi und Andrea für ihre Unterstützung. Ich möchte mich bei meinen Eltern von ganzem Herzen für alles was sie für mich getan haben bedanken. Danke euch für eure liebevolle Erziehung, den Rückhalt und die immerwährende Unterstützung. Zuletzt möchte mich bei meiner Partnerin Eileen bedanken. Danke für deine Liebe, dass du an mich glaubst, mich unterstützt und immer an meiner Seite bist.

Affidavit

Leberzammer-Deuster, Julian

—

Name, Vorname

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

Die Rolle des thrombozytären Chemokins CXCL12 in der arteriellen Thrombose und Atherosklerose

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.

Frankfurt am Main, 21.02.2023

Ort, Datum

Julian Leberzammer-Deuster

Unterschrift Doktorand