

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. S. Massberg

**Interaktion von neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten im  
murinen Knochenmark**



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

vorgelegt von  
Christian Weber  
aus Kronach

München 2023

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:

PD Dr. med. Tobias Petzold

Mitberichterstatter:

PD Dr. Johanna Tischer

Prof. Dr. Michael Spannagl

Prof. Dr. Ralf Huss

Dekan der Medizinischen Fakultät der LMU:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:

06.07.2023

---

<b>1. Einführung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Megakaryopoiese.....	5
1.2 Thrombopoiese.....	12
1.3 Neutrophile Granulozyten.....	16
1.4 Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion.....	21
1.5 Leukozyten-Megakaryozyten-Interaktion.....	23
1.6 Zusammenfassung und Zielsetzung.....	27
<b>2. Materialien</b> .....	<b>29</b>
2.1 Mauslinien.....	29
2.2 Durchflusszytometrie-Antikörper.....	29
2.3 Depletions-Antikörper.....	29
2.4 Histologie-Reagenzien.....	30
2.5 Reagenzien.....	30
2.6 Verbrauchsmaterialien.....	31
2.7 Geräte.....	31
2.8 Software.....	31
<b>3. Methoden</b> .....	<b>32</b>
3.1 Megakaryozytenisolation aus fetalen Leberzellen und murinem Knochenmark.....	32
3.2 Isolation von neutrophilen Granulozyten aus murinem Knochenmark.....	33
3.3 Isolation von Lymphozyten aus der murinen Milz.....	33
3.4 Vorbereitung der Zellkulturplatten.....	34
3.5 Vorbereitung Megakaryozyten Mono-/Ko-Kultur Modell.....	34
3.5.1 Megakaryozyten Mono-Kultur.....	34
3.5.2 Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur.....	35
3.5.3 Neutrophilen-Megakaryozyten-Transwell Ko-Kultur.....	36
3.5.4 Neutrophilen-Überstand-Megakaryozyten Ko-Kultur.....	36
3.5.5 Lymphozyten-Megakaryozyten Ko-Kultur.....	37
3.5.6 Zytoskeletthinhibitoren in der Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur.....	37
3.5.7 Knock-Out-/mutierte-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur.....	38
3.5.8 Apocynin-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur.....	38
3.6 Zellernte.....	39
3.7 Auswertung der Zellpartikel mittels Durchflusszytometrie.....	39
3.8 Neutrophilen-Depletions-Versuch in C57/BL6-Mäusen.....	40
3.9 Thrombozyten-Depletions-Versuch in ITGB2-KO-Mäusen.....	41

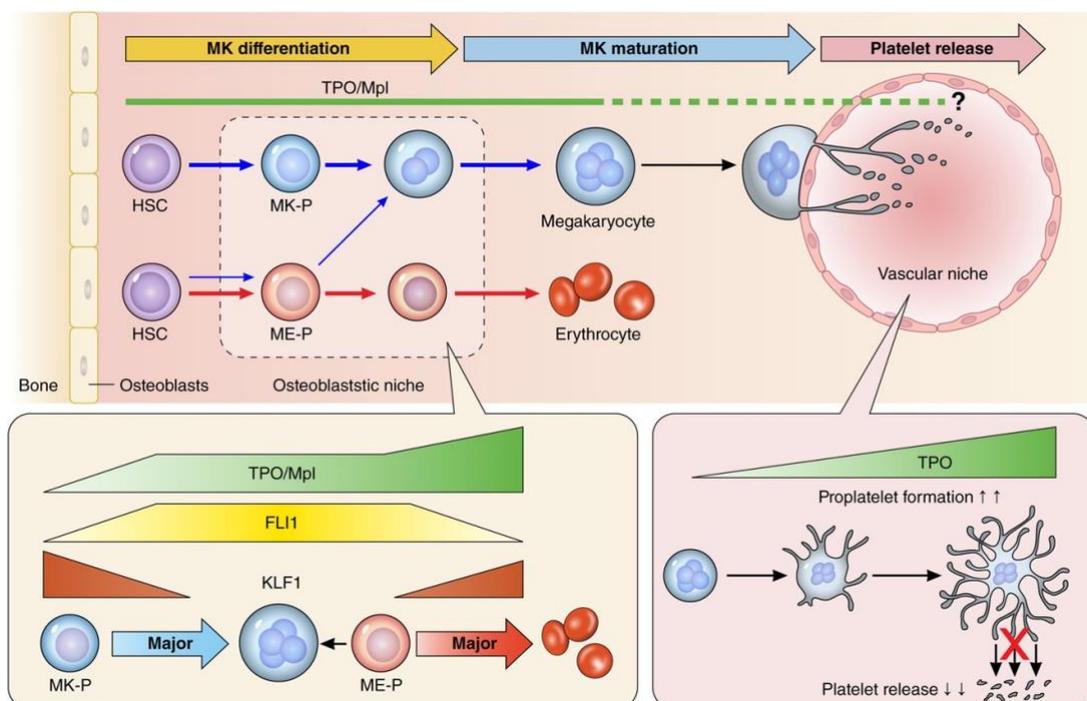
---

3.10 Doppel-Depletions-Versuch in C57/BL6-Mäusen .....	41
3.11 Messung der retikulären Thrombozyten .....	42
3.12 Whole-mount-Staining von murinen Röhrenknochen .....	42
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
4.1 Charakterisierung der Megakaryozyten Mono-Kultur .....	43
4.2 Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur .....	45
4.3 Neutrophilen-Megakaryozyten-Transwell Ko-Kultur .....	46
4.4 Neutrophilen-Überstand-Megakaryozyten Ko-Kultur .....	47
4.5 Lymphozyten-Megakaryozyten Ko-Kultur .....	47
4.6 Zytoskelettinhibitoren in der Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur .....	48
4.7 Charakterisierung der Neutrophilen-Megakaryozyten Interaktion .....	49
4.8 Neutrophilen-Depletion in C57/BL6-Mäusen .....	54
4.9 Thrombozyten-Depletion in ITGB2-KO-Mäusen.....	55
4.10 Doppel-Depletion in C57/BL6-Mäusen .....	56
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>57</b>
5.1 Steigerung der <i>in vitro</i> Thrombopoiese durch neutrophile Granulozyten .....	57
5.2 Steigerung der <i>in vitro</i> Thrombopoiese durch enge Interaktion .....	59
5.3 Steigerung der <i>in vitro</i> Thrombopoiese ist Neutrophilen-spezifisch.....	59
5.4 Einfluss von Zytoskelettinhibitoren auf die <i>in vitro</i> Thrombopoiese .....	60
5.5 Steigerung der <i>in vitro</i> Thrombopoiese durch CXCL12/CXCR4-Achse.....	60
5.6 Steigerung der <i>in vitro</i> Thrombopoiese durch ROS .....	63
5.7 Steigerung der <i>in vivo</i> Thrombopoiese durch neutrophile Granulozyten.....	65
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick Immunothrombopoiese .....</b>	<b>66</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>67</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>10. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>11. Danksagung .....</b>	<b>84</b>
<b>12. Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>85</b>

# 1. Einführung

## 1.1 Megakaryopoiese

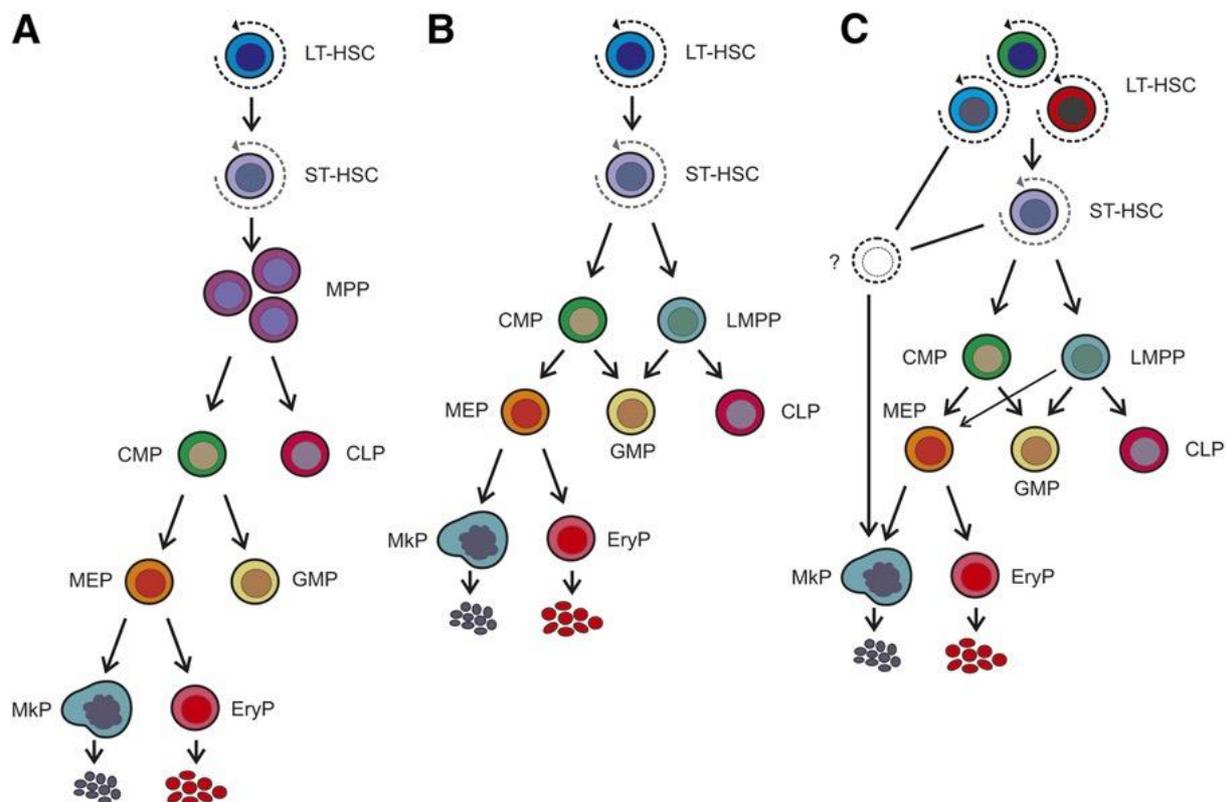
Als Megakaryopoiese bezeichnet man den Prozess der Differenzierung und Reifung hämatopoetischer Stammzellen zu Megakaryozyten (Abbildung 1). Megakaryozyten sind Zellen, die sich vorrangig im Knochenmark befinden. Mit einer Größe von ungefähr 50-100 µm handelt es sich zwar um eine der größten Zellarten im Knochenmark, mit einer Häufigkeit von nur 0,1% stellen sie jedoch gleichzeitig eine der seltensten Zellenreihen des Knochenmarks dar (Crane, Jeffery, & Morrison, 2017). Darüber hinaus findet man Megakaryozyten aber auch im Dottersack, der Milz, der Lunge sowie in frühen Entwicklungsstadien in fetalen Lebern von Säugetieren (Lefrancais et al., 2017; Long, Williams, & Ebbe, 1982; Ogawa, 1993; Slayton et al., 2002). Ihre primäre Aufgabe besteht in der Produktion von Thrombozyten. Die Thrombozytenbildung findet dabei hauptsächlich im Knochenmark statt. Lefrancais E, et al. konnten 2017 zeigen, dass Megakaryozyten ebenfalls im Gefäßsystem der Lunge vorhanden sind und zur Thrombozytenproduktion entscheidend beitragen. Außerdem bilden sie hier einen Pool für die Regeneration von Megakaryozyten im Knochenmark (Lefrancais et al., 2017).



**Abbildung 1: Differenzierung und Reifung von Megakaryozyten (Eto & Kunishima, 2016)**

Gezeigt wird die Differenzierung und Reifung von Megakaryozyten aus hämatopoetischen Stammzellen sowie die anschließende Thrombozytenproduktion im Knochenmark. Weiterhin wird der Einfluss von Thrombopoetin auf die Differenzierung und Thrombopoese dargestellt. Der Abscherprozess von Thrombozyten ins Gefäßlumen ist dagegen TPO-unabhängig (A. P. Ng et al., 2014).

Im Knochenmark werden alle blutbildenden Vorläuferzellen aus hämatopoetische Stammzellen mit den Eigenschaften der Selbsterneuerung und möglichen Differenzierung gebildet (Abbildung 2). Diese Merkmale sind dabei variabel ausgeprägt. Dabei wird die nachfolgende Hierarchie in der Stammzellentwicklung eingehalten. Man unterscheidet in Stammzellen (LT-HSC, engl. *long-term hematopoietic stem cells*), die sich in einem weiteren zeitlichen Rahmen selbst erneuern und in nachfolgende Vorläuferzellen differenzieren können. Die ihnen nachfolgenden Stammzellen werden wiederum als short-term hematopoietic stem cells (ST-HSC) bezeichnet. ST-HSC sind gekennzeichnet durch eine eher kurzfristige Fähigkeit zur Erneuerung und Differenzierung. Entwickeln sich ST-HSC weiter, können prinzipiell mehrere Wege der Entwicklung mit verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten einschlagen sowie Stadien übersprungen werden. Weiterhin werden Stammzellen anhand ihrer Fähigkeit eingeteilt unterschiedliche Zellarten und Gewebe bilden zu können. Man unterscheidet in toti-, pluri-, multi-, oligo- und unipotente Stammzellen (Seita & Weissman, 2010).



**Abbildung 2: Verschiedene Modelle der Stammzellhierarchie (Woolthuis & Park, 2016)**

(A) Das klassische Modell zeigt die Aufteilung in myeloische (CMP) und lymphatische Vorläuferzellen (CLP). (B) Alternatives Modell nach Adolfsson et al. (Adolfsson et al., 2005). (C) Neues Modell mit Definition nach immunphänotypischen Gesichtspunkten und möglicher direkter Entwicklung von Megakaryozytenvorläuferzellen aus LT-HSC.

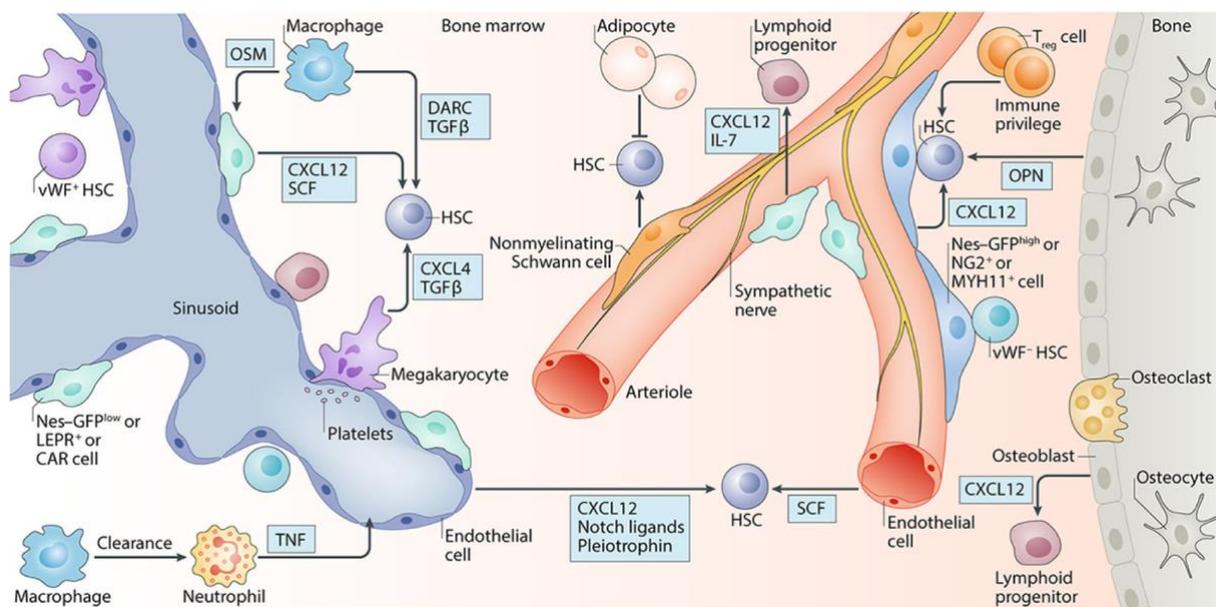
---

Neben den lymphatischen Stammzellen (CLP, engl. *common lymphatic progenitor*) können sich ST-HSC im klassischen Modell auch zu myeloischen Stammzellen (CMP, engl. *common myeloid progenitor*) entwickeln. CMP können sich im Anschluss weiter differenzieren und andere Vor- und Zwischenstufen wie zum Beispiel Granulozyten- oder Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzellen bilden (Haas et al., 2015; Woolthuis & Park, 2016). Über die Megakaryozytenvorläuferzelle (MK-P, engl. *megakaryocyte progenitor*) differenzieren sich die Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläufer zu Megakaryozyten weiter. Weiterhin besteht die Möglichkeit der direkten Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen in Megakaryozyten, wobei die verschiedenen Zwischenstufen übersprungen werden können (Woolthuis & Park, 2016). Dieser Prozess der schnelleren Differenzierung ist Gegenstand aktueller Forschung und nicht abschließend aufgeklärt.

Die unterschiedlichen Differenzierungsmöglichkeiten werden durch verschiedene Mediatoren moduliert und maßgeblich beeinflusst. Eine zentrale Rolle in der Differenzierung von Megakaryozyten kommt Thrombopoetin (TPO) zu (Kaushansky, 1995; Kaushansky & Drachman, 2002). Andere Chemokine und Zytokine von untergeordneter Rolle sind verschiedene Interleukine (IL), zum Beispiel IL-1, IL-3, IL-6 und IL-11 sowie Erythropoetin, G-CSF (engl. *granulocyte colony-stimulating factor*) und CXCL12 (engl. C-X-C motif chemokine ligand 12 = SDF-1, engl. stromal derived factor 1) (Broudy, Lin, & Kaushansky, 1995; S. Chen, Su, & Wang, 2013; Kaser et al., 2001). Chemokine sind dabei eine große Familie strukturell ähnlicher chemoaktiver Moleküle, welche auf G-Protein gekoppelte Rezeptoren wirken und Zellen mit entsprechenden Rezeptoren zum Ort der höchsten Konzentration anziehen. Als Zytokine bezeichnet man Proteine, die Einfluss auf Wachstums- und Differenzierungsvorgänge von Zellen nehmen. Daneben können Zytokine pathophysiologische Prozesse wie Entzündungen regulieren und maßgeblich beeinflussen.

Früher wurde vermutet, dass während der fortschreitenden Differenzierung in der Entwicklungslinie von Megakaryozyten eine gleichzeitige Durchwanderung des Knochenmarks vom Knochen zur gefäßnahen Mikroumgebung stattfindet (Niswander, McGrath, Kennedy, & Palis, 2014). Man ging davon aus, dass unreifen Megakaryozytenvorläuferzellen noch Osteoblasten anheften. Im weiteren Verlauf wird diese Verbindung gelöst und es erfolgt eine Migration hin zum Gefäßsystem. Nachdem die reifen Megakaryozyten Anschluss ans Gefäßsystem gewonnen haben, kann die Thrombopoese erfolgen. Dieses Konzept wurde

2017 von Stegner et al. in Frage gestellt. In ihrer Arbeit zur Verteilung und Migration von Megakaryozyten konnten sie feststellen, dass Megakaryozyten zufällig, aber gefäßnah, im Knochen verteilt sind und nur eine äußerst geringe Migration im Knochenmark vollziehen. Nach Megakaryozyten-Depletion konnte eine Wiederherstellung der Thrombozyten-produzierenden Megakaryozyten aus gefäßnahen hämatopoetischen Stammzellen festgestellt werden. So wird zwischen einem Thrombozyten-produzierenden und einem ruhenden Megakaryozyten-Reservoir unterschieden (Stegner et al., 2017).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Knochenmarks und der Stammzellnische (Pinho & Frenette, 2019)**

Es werden verschiedene Zellarten und Faktoren gezeigt, die direkt oder indirekt die Aktivität von hämatopoetischen Stammzellen regulieren. Hierbei spielen unterschiedlichste Zellen eine Rolle. Weiterhin sind einige wichtige Faktoren wie CXCL12 (engl. *C-X-C motif chemokine ligand 12*) und SCF dargestellt.

Aktuell wird das Knochenmark anhand von Modellen in unterschiedliche Nischen eingeteilt. Als Nische werden hierbei spezielle Mikroumgebungen im Knochenmark bezeichnet. Diese sind gekennzeichnet durch unterschiedliche extrazelluläre Matrixproteine, verschiedene Chemokin- und Zytokinzusammensetzungen sowie Zell-Zell-Kontakten und physikalischen Gegebenheiten (Abbildung 3 und 4). Man unterscheidet in eine sinusoidale, arterielle, nicht-vaskularisierte, osteoblastische und subosteoblastischen Nische. Die sinusoidale Gefäßnische, der Sitz der Thrombozyten-bildenden Megakaryozyten, beeinflusst die Megakaryopoese und Thrombopoese ebenso wie Megakaryozyten die ebenfalls in der sinusoidalen Gefäßnische gelegenen hämatopoetischen Stammzellen (Bruns et al., 2014; Pinho et al., 2018). In der gefäßnahen Umgebung werden hämatopoetische Stammzellen wie Megakaryozyten durch

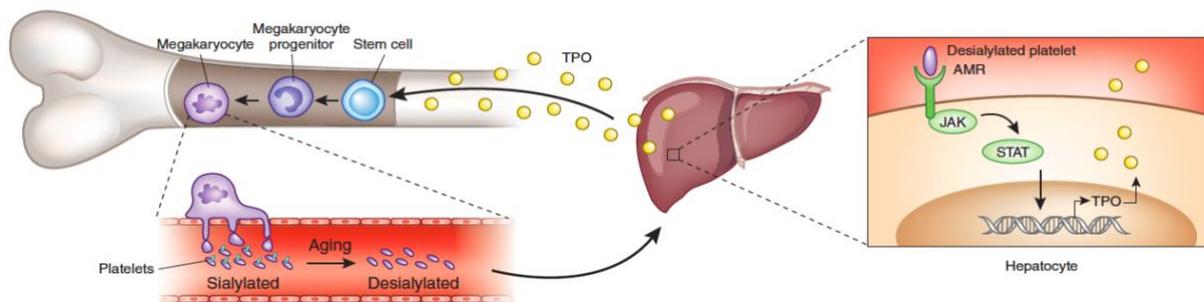


---

Arbeit von Chen und Kollegen werden die Beeinflussungen der Megakaryozytenproliferation, -differenzierung und -reifung durch die Sauerstoffkonzentration und reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*) zusammengefasst (S. Chen et al., 2013). Die osteoblastische Nische weist mit 0,1% den geringsten Sauerstoffpartialdruck auf und begünstigt somit die Erhaltung von CD34+-Stammzellen in der G<sub>0</sub>-Phase (Hermitte, Brunet de la Grange, Belloc, Praloran, & Ivanovic, 2006; Parmar, Mauch, Vergilio, Sackstein, & Down, 2007). Im Gegenzug wird die Differenzierung von Megakaryozyten und Megakaryozyten-CFUs (engl. *colony forming units*) aus CD34+-Stammzellen bei 5% Sauerstoff begünstigt (Mostafa, Miller, & Papoutsakis, 2000). Hohe Konzentrationen von ROS und niedrige Antioxidantienkonzentrationen führen hingegen zur Ausbildung von typischen Zellmarkern und weiteren Differenzierung von Megakaryozyten (Sardina et al., 2010). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Sauerstoffsättigung und ROS-Konzentration vielfältige Effekte hervorrufen und nur zwei von vielen Einflussfaktoren der Megakaryopoese darstellen.

Nachdem sich aus hämatopoetischen Stammzellen unreife Megakaryozyten entwickelt haben, beginnt die Megakaryozytenreifung. TPO spielt in diesem Prozess ebenfalls eine entscheidende Rolle. Als Bindungspartner des Mpl-Rezeptors (engl. *myeloproliferative leukemia protein*) auf der Zelloberfläche von Megakaryozyten beeinflusst und reguliert TPO entscheidend eine konstante Thrombozytenanzahl im Blut (Broudy et al., 1995). TPO wird dabei hauptsächlich in der Leber und zu einem gewissen Anteil auch in der Niere und im Knochenmark produziert (Qian, Fu, Li, Chen, & de Sauvage, 1998; Sungaran, Markovic, & Chong, 1997). Im Blut beeinflussen sich TPO-Plasmaspiegel und Thrombozytenzahl gegenseitig und halten so die Anzahl an Thrombozyten konstant (Choi, Nichol, Hokom, Hornkohl, & Hunt, 1995; Engel, Loeffler, Franke, & Schmitz, 1999). Unter normalen Bedingungen wird das von Hepatozyten sezernierte TPO durch Hormonaufnahme und -abbau reguliert und weitestgehend konstant gehalten (Kaushansky, 2005). Dieses Gleichgewicht kann im Rahmen von Entzündungen oder in anderen Stresssituationen dysreguliert sein und aktiv verändert werden. So können beispielsweise Makrophagen IL-6 sezernieren und dadurch die TPO-Freisetzung stimulieren. Konsekutiv wird die Thrombozytenproduktion erhöht und angepasst (Kaser et al., 2001). 2015 konnte gezeigt werden, dass die TPO-Produktion durch Veränderungen des Sialyierungsmusters der Thrombozytenoberfläche reguliert wird (Abbildung 5). Insbesondere bei reifen und alternden Thrombozyten kommt dieser

Mechanismus durch die fortschreitende Desialierung zum Tragen. Normalerweise haben Thrombozyten eine Lebensdauer von ungefähr sieben Tagen. Nach Desialierung und Bindung von Thrombozyten an den Ashwell-Morell-Rezeptor von Hepatozyten führt dies über eine Hochregulierung von JAK2 (Janus Kinase 2) und STAT3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) zu einer gesteigerten Synthese von TPO (Grozovsky et al., 2015). Ein hoher Anteil reifer Thrombozyten führt so zu einer gesteigerten Produktion neuer Thrombozyten durch die Megakaryozyten des Knochenmarks und regelt auf diese Weise das Gleichgewicht aus Bereitstellung und Abbau von Thrombozyten mittels TPO im Blutkreislauf (Kile, 2015).



**Abbildung 5: Regulationsmechanismen der TPO-/Thrombozytenproduktion (Kile, 2015)**

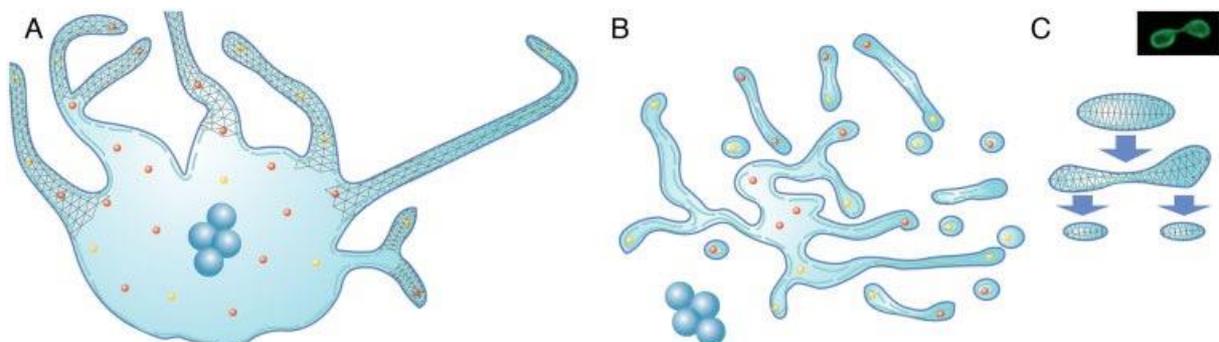
Die Abbildung zeigt das TPO-vermittelte Gleichgewicht aus Thrombozytenproduktion im Knochenmark mit Desialierung der Thrombozyten im Blutstrom und der TPO-Freisetzung durch Hepatozyten in der Leber. TPO wiederum beeinflusst die Bereitstellung von Thrombozyten durch Megakaryozyten im Knochenmark.

Während der Megakaryopoese treibt TPO die Reifung voran und Megakaryozyten durchlaufen mehrere Prozesse der Endomitose. Hierdurch vermehrt sich die Menge an DNA zunehmend und es wird ein polyploider Zustand erreicht. Dies dient vermutlich der effizienten Synthese der enormen Mengen an Proteinen und RNAs, die in den später gebildeten, zellkernlosen Thrombozyten verpackt werden (Machlus & Italiano, 2013; Zimmet & Ravid, 2000). Dabei wird die Megakaryopoese durch diverse Transkriptionsfaktoren, wie GATA-1 (Erythroid transcription factor), FOG-1 (Friend of GATA-1) und NF-E2 (Nuclear factor-Erythroid 2), reguliert (Avanzi, Izak, Oluwadara, & Mitchell, 2015; Crispino, 2005; Italiano & Shivdasani, 2003). Unter diesen Molekülen hat GATA-1 eine herausragende Rolle inne, da die Rekrutierung von verschiedenen Chromatinaktivierungs- und -repressionselementen sowie der anderen Faktoren, wie zum Beispiel FOG-1, durch GATA-1 erleichtert wird (Crispino, 2005). Mäuse mit GATA-1-KO (Knock-Out) weisen einen thrombozytopenen Phänotyp auf (Vyas, Ault, Jackson, Orkin, & Shivdasani, 1999). Dies unterstreicht die zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors GATA-1 im Prozess der Megakaryopoese.

---

## **1.2 Thrombopoiese**

Unter Thrombopoiese versteht man die Bildung von Thrombozyten durch reife Megakaryozyten in den Gefäßnischen des Knochenmarks. Während dieses Prozesses bilden Megakaryozyten zelluläre Ausstülpungen, sogenannte Proplättchen, aus (Abbildung 6). Diese ragen in die Sinusoide und den Blutfluss hinein. Von diesen länglichen Zellaussackungen scheren sich unter Einfluss der Blutströmung einzelne Thrombozytenvorstufen ab, die Präplättchen genannt werden. Jede Megakaryozyte erzeugt auf diese Weise eine Vielzahl von Präplättchen, die sich wiederum teilen und zu reifen Thrombozyten entwickeln (Italiano, 2013; Kaushansky, 2008; Thon et al., 2010). Neue unreife Thrombozyten werden auf Grund Ihrer Größe und dem hohen RNA-Gehalt in den ersten beiden Tagen als retikuläre Thrombozyten (retPlts) bezeichnet. Insgesamt sind Megakaryozyten auf diese Weise fähig, mehrere Hundert bis Tausend Thrombozyten pro Vorläuferzelle zu produzieren und so den täglichen Bedarf von ungefähr  $100 \times 10^9$  Thrombozyten zu decken. Nachdem sie vollständig zu Proplättchen und Thrombozyten zerfallen sind sowie den Kern ins Interstitium abgegeben haben, endet die Rolle der Megakaryozyten im Prozess der Thrombopoiese (Italiano, 2013).



**Abbildung 6: Thrombopoiese-Modell (Italiano, 2013)**

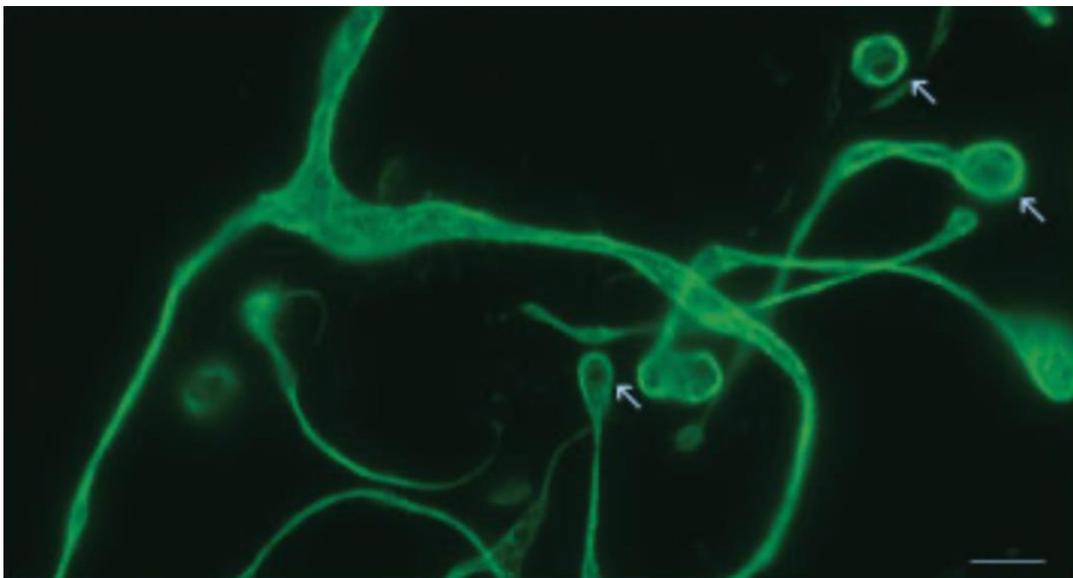
(A) Die Megakaryozyte beginnt unter Umgestaltung des Zytoskeletts Proplättchen auszubilden. (B) Es folgt der Zerfall in mehrere Präplättchen und Thrombozyten. Der Kern wird dabei ins Interstitium abgegeben. (C) Die weitere Entwicklung findet im Blutstrom statt. Dabei verändern sich die zuerst diskoiden Partikel über eine hantelförmige Zwischenstufe nach erneuter Teilung in einzelne Thrombozyten.

Um die kernlosen Thrombozyten für ihre späteren Funktionen auszustatten und den weiteren Prozess der Thrombopoiese zu initiieren, müssen Megakaryozyten enorme Mengen an Proteinen und RNA produzieren (Machlus & Italiano, 2013). Zu Beginn der Reifung starten Megakaryozyten, wie alle hämatopoetischen Stammzellen, mit einem diploiden Genom von  $2n$ . Das heißt in jeder Zelle liegen jeweils zwei einander entsprechender homologe Gene von Vater und Mutter vor. Im weiteren Verlauf werden durch Endomitose Kopien der DNA

---

prozessiert und Genome mit einem Vielfachen Chromosomensatz erreicht. Diese können von 4n, 8n, 16n, 32, 64n bis 128n reichen (Zimmet & Ravid, 2000). Wie bereits oben erwähnt, werden diese Endomitose-Zyklen maßgeblich durch TPO gesteuert (Gurney, Carver-Moore, de Sauvage, & Moore, 1994). Auf diese Weise wird der nötige polyploide Kernzustand erreicht, um eine effiziente Synthese der Proteine und RNA zu ermöglichen. Im weiteren Verlauf können die später kernlosen Thrombozyten mit den nötigen Proteinen und RNAs beladen werden.

Darüber hinaus werden Veränderungen der Zellstruktur und Umlagerungen des Zytoskeletts vorgenommen (Abbildung 7) (Hartwig & Italiano, 2006; Italiano, Lecine, Shivdasani, & Hartwig, 1999; Machlus & Italiano, 2013; Machlus et al., 2016; Patel et al., 2005; Thon et al., 2010). So ist beispielsweise  $\beta$ 1-Tubulin, ein Strukturprotein in Megakaryozyten, an diesen Umgestaltungen des Zytoskeletts direkt beteiligt. Aus  $\beta$ 1-Tubulin-KO-Mäusen gewonnene Thrombozyten weisen verschiedene funktionelle und strukturelle Defekte auf und die Mäuse leiden an einer Thrombozytopenie (Freson et al., 2005; Italiano et al., 1999; Lecine, Italiano, Kim, Villeval, & Shivdasani, 2000).



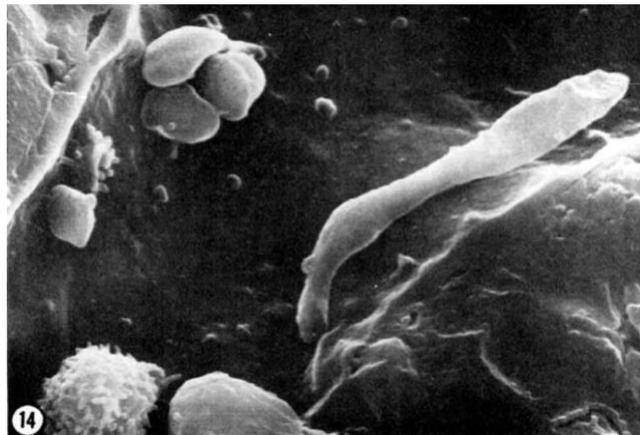
**Abbildung 7: Struktur von Mikrotubuli in Proplättchen (Italiano, 2013)**

Die Abbildung zeigt die Organisationsstruktur von  $\beta$ -1-Tubulin markierten Mikrotubuli in murinen Proplättchen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Die Megakaryozyten bilden Aussackungen, welche mit der Zeit immer länger werden. An den Enden (Pfeile) der Proplättchen und bereits losgelösten Partikel entstehen Köpfe. Diese ähneln der Struktur reifer Thrombozyten. Maßeinheit 5  $\mu$ m.

Zudem ist filamentöses Aktin an der folgenden Bildung von Proplättchen beteiligt, welches innerhalb der Thrombozytenvorstufen zu einer Bifurkation in den noch großen und diskoiden

---

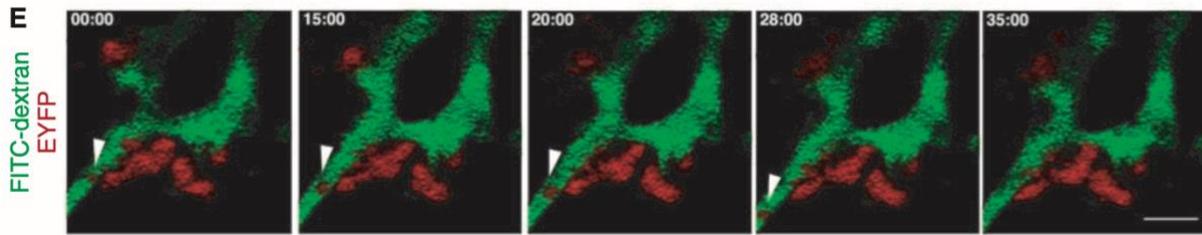
Thrombozyten führt und die spätere Teilung initiiert (Italiano et al., 1999; Italiano & Shivdasani, 2003; Patel et al., 2005). Zusätzlich zu diesen Strukturproteinen tragen kontraktile Elemente zur Bildung der Thrombozyten bei. Hier ist insbesondere Myosin, codiert auf dem MYH9-Gen (engl. *Myosin heavy chain 9*), zu nennen. Es bindet an Aktin und ist zur aktiven Verkürzung fähig. Bei Patienten, die eine Mutation innerhalb des MYH9-Gens tragen, tritt aufgrund der verminderten Kontraktilität eine Makrothrombozytopenie auf (Althaus & Greinacher, 2009; Italiano & Shivdasani, 2003). Ein MYH9-Gendefekt erschwert die anfängliche Bildung von Thrombozyten im Knochenmark aufgrund des funktionsuntüchtigen Rho-Rock-Kinase-Myosin-IIA-Signalwegs. Dies führt durch die fehlende Teilung zu einer verringerten Anzahl und Größenzunahme der zirkulierenden Thrombozyten (Chang et al., 2007; Z. Chen et al., 2007). Heutzutage erleichtert der Fortschritt in der *in vivo* Live-Bildgebung durch Multiphotonmikroskopie die Veranschaulichung der Proplättchenbildung und den Prozess der Thrombozytenbiogenese (Abbildung 8). Dabei ist es Junt et al. erstmals gelungen den dynamischen Prozess der Thrombopoese *in vivo* mittels Multiphotonmikroskopie zu analysieren (Abbildung 9) (Junt et al., 2007).



**Abbildung 8: Elektronenmikroskopie eines Knochenmarkssinusoids (Becker & De Bruyn, 1976)**

Die Abbildung zeigt die luminalen Ansicht eines Sinusoids des Knochenmarks mit dem intravasalen Anteil des Proplättchens (rechts), mehreren Thrombozyten (oben links) sowie andere Blutzellen (unten links) in 6000-facher Vergrößerung.

Viele Einflussfaktoren der Thrombopoese sind bisher noch unbekannt und die letzten Schritte vor der Abscherung in den Blutstrom sind kaum verstanden. Zhang et al. konnten jedoch zeigen, dass das Lipid Sphingosin-1-phosphat (S1p), welches an den S1p-Rezeptor-1 bindet, eine entscheidende Rolle in der zielgerichteten Freisetzung von Proplättchen in das vaskuläre Department sowie in der Abscherung der Präplättchen in den Blutstrom spielt (L. Zhang et al., 2012). S1p-Rezeptor-1-KO-Mäuse weisen deshalb eine Thrombozytopenie bei fehlgeleiteten extravaskulären Proplättchen und defekter intravaskulärer Thrombozytenabscherung auf.



**Abbildung 9: *In vivo* Multiphotonen-Mikroskopie des intravaskulären Abscherprozesses (Junt et al., 2007)**

Die Abbildungsserie zeigt *in vivo* das Abscheren von Thrombozytenvorstufen von einer Megakaryozyte (EYFP+, engl. *enhanced yellow fluorescent protein*, rot) nach FITC-dextran (Fluoreszeinisothiocyanat-dextran, grün) Injektion in ein nahes Gefäß. Die Zahlen in der oberen Ecke geben den zeitlichen Verlauf in Minuten und Sekunden wieder. Maßeinheit 50  $\mu\text{m}$ .

2015 wurde gezeigt, dass atypisch gebildete Thrombozyten bei akutem Bedarf oder entzündlichen Erkrankungen von Megakaryozyten in den Blutstrom entlassen werden können. Die Daten und Bilder von Nishimura et al. zeigen, dass Megakaryozyten eine Art raschen Zerfallsschritt durchlaufen können, um eine große Anzahl von Thrombozyten in kurzer Zeit freizusetzen. Dieser Prozess wird als „*Rupture*“, also Zerfall, bezeichnet. Als Interaktionsmolekül wurde von Neutrophilen stammendes IL-1 $\alpha$  im Blut benannt. Die Arbeit konnte außerdem zeigen, dass IL-1 $\alpha$  über den zugehörigen Rezeptor Caspase-3 aktiviert und so zu einer Verringerung der Membranstabilität führt. Dies hat den Zellzerfall zu Folge (Nishimura et al., 2015). Insgesamt bleibt der Prozess und die Beteiligung von intrazellulärer Caspasen an der Thrombopoese jedoch umstritten.

Obwohl TPO die Differenzierung der Megakaryozytenreifung maßgeblich beeinflusst und TPO- und Mpl-KO-Mäuse eine schwere Thrombozytopenie aufweisen, sind diese Mäuse weiterhin in der Lage, Proplättchen in die Sinusoide des Knochenmarks abzugeben. Dies zeigt, dass TPO und Mpl bei der Megakaryopoese zwar eine entscheidende Rolle spielen, jedoch nicht maßgeblich an den letzten Schritten der Thrombopoese beteiligt sind (Eto & Kunishima, 2016; A. P. Ng et al., 2014). Hierfür sind, wie bereits oben erwähnt, andere Faktoren teilweise bekannt, wie zum Beispiel die Scherkräfte im Blutstrom und S1p (L. Zhang et al., 2012). Die genauen molekularen Mechanismen und intrazellulären Umlagerungen, die zur Bildung von Thrombozyten beitragen, sind noch nicht völlig verstanden und insbesondere der Prozess der Abscherung und weitere Einflussfaktoren wie die umgebenden Zellen auf die Thrombozytenbiogenese noch nicht ausreichend erforscht.

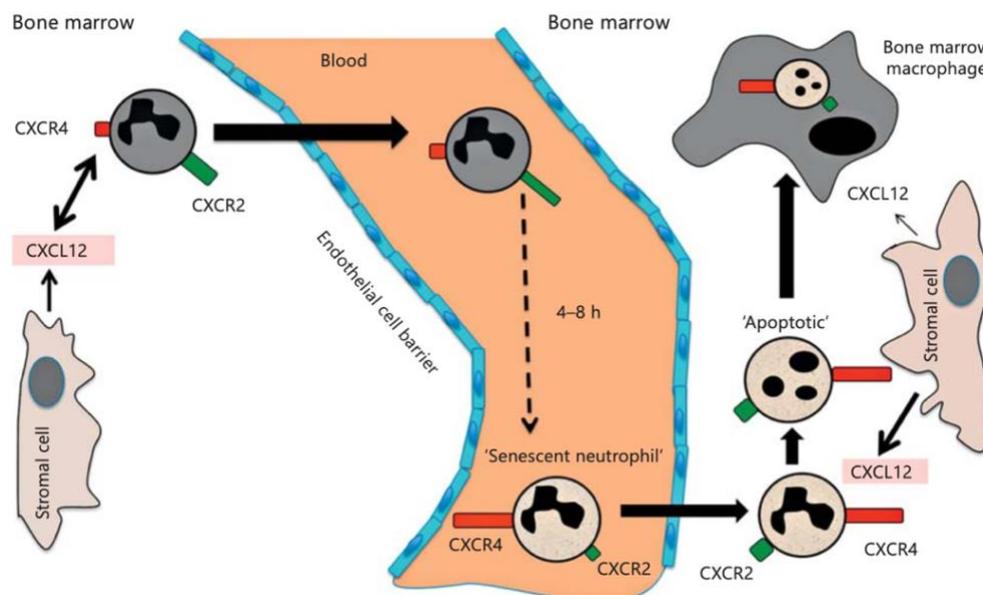
---

### **1.3 Neutrophile Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten sind die häufigsten Leukozyten (engl. *white blood cells* = WBC) im Blut und Knochenmark, Teil des angeborenen Immunsystems und haben vielfältige Aufgaben vor allem im Rahmen von Entzündungen und Infektionen (de Oliveira, Rosowski, & Huttenlocher, 2016). Sie stammen von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab und differenzieren sich aus CMPs und Myeloblasten. Der gesamte Prozess der Neutrophilenbildung wird als Neutropoese bezeichnet. Als wichtigster Stimulus ist das Zytokin G-CSF bekannt (Lieschke et al., 1994; Semerad, Liu, Gregory, Stumpf, & Link, 2002). Das Zytokin bindet an den G-CSF-Rezeptor und G-CSF-Rezeptor-KO-Mäuse weisen folglich eine Neutropenie bei fehlerhafter Produktion und übermäßiger Apoptose auf (Liu, Wu, Wesselschmidt, Kornaga, & Link, 1996). Darüber hinaus spielen auch andere lösliche Faktoren wie IL17 und CXCL12 wichtige Rollen im Prozess der Neutropoese (Forlow et al., 2001; Petit et al., 2002).

Das murine Knochenmark stellt mit 120 Millionen Zellen das größte Reservoir an neutrophilen Granulozyten dar. Täglich werden Millionen von unreifen CXCR4<sup>low</sup>CXCR1/2<sup>high</sup> neutrophilen Granulozyten zur weiteren Reifung in das Blut abgegeben (Abbildung 10)(Metzemaekers, Gouwy, & Proost, 2020). Die wichtigsten Schlüssel-moleküle im Zusammenhang mit dem Auswandern von neutrophilen Granulozyten in die Blutbahn sind G-CSF, sowie f-MLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), TNF $\alpha/\beta$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha/\beta$ ) und CXCL12 (Jagels & Hugli, 1994). Die Aufenthaltsdauer im intravasalen Kompartiment beträgt nur wenige Stunden (Furze & Rankin, 2008). Hierbei findet eine Externalisierung des zuvor in Granula gespeichertem CXCR4 statt. CD62L<sup>high</sup>CXCR4<sup>low</sup>CXCR1/2<sup>high</sup> neutrophile Granulozyten werden in kurzer Zeit zu CD62L<sup>low</sup>CXCR4<sup>high</sup>CXCR1/2<sup>low</sup> neutrophilen Granulozyten. Die im Blutstrom gereiften CD62L<sup>low</sup>CXCR4<sup>high</sup>CXCR1/2<sup>low</sup> neutrophilen Granulozyten werden im Anschluss wieder zurück ins Knochenmark aufgenommen (Casanova-Acebes et al., 2013; De Filippo & Rankin, 2018; Martin et al., 2003). Die Sinusoide des Knochenmarks stellen dabei den Ort des Austritts und des Wiedereintritts ins Interstitium dar (Itkin et al., 2016). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CXCL12/CXCR4-Chemokin-Achse sowie CXCR1/2 entscheidende Rollen in der Retention, Mobilisation und beim Wiedereintritt von neutrophilen Granulozyten spielen.

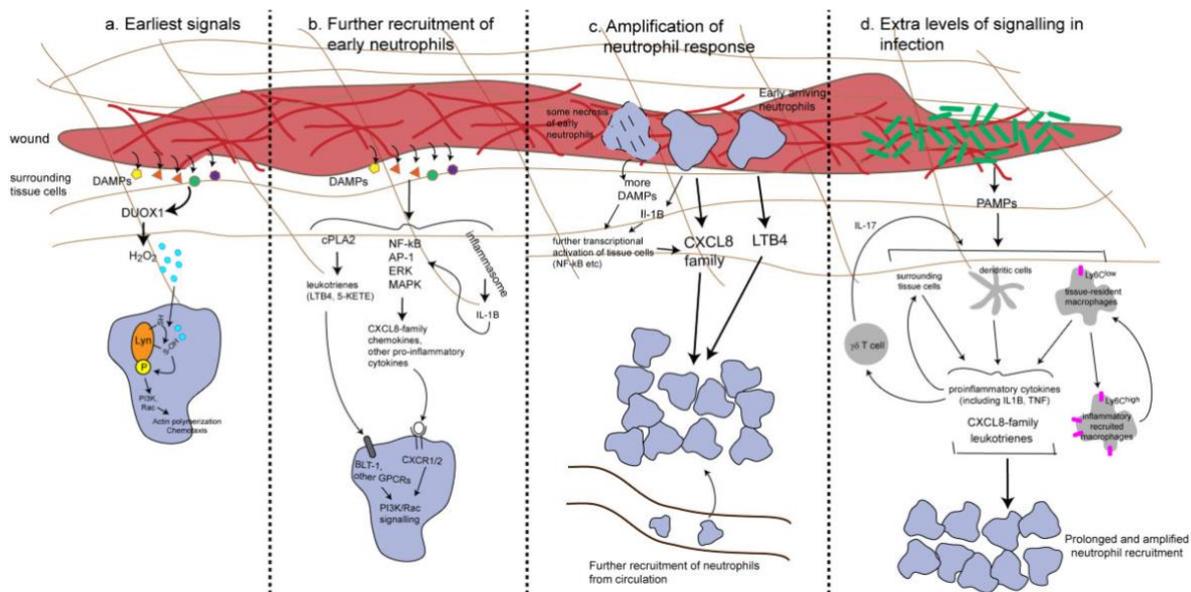
Gereifte neutrophile Granulozyten kehren entweder ins Knochenmark zurück oder wandern in verschiedene andere Organe, zum Ort der Infektion oder Entzündung aus. Der Abbau der CXCR4<sup>high</sup>CXCR1/2<sup>low</sup> neutrophilen Granulozyten findet sowohl im Knochenmark als auch in der Niere und Milz statt (Rankin, 2010). Der Abbau von gealterten CXCR4<sup>high</sup>CXCR1/2<sup>low</sup> neutrophilen Granulozyten durch Makrophagen im Knochenmark beeinflusst wiederum die Zusammensetzung der hämatopoetischen Stammzellnische, die Auswanderung hämatopoetischer Stammzellen und stellt eine Verbindung im Rahmen des zirkadianen Rhythmus von Immunabwehr und Blutbildung dar (Casanova-Acebes et al., 2013). Auf diese Weise wird ein konstantes Gleichgewicht aus alten, reifen und jungen, unreifen neutrophilen Granulozyten gewährleistet.



**Abbildung 10: Schematisches Modell der Mobilisation von neutrophilen Granulozyten (Strydom & Rankin, 2013)**

Neutrophile Granulozyten wandern aus dem Knochenmark aus. Nach kurzer Zeit beginnt die Hochregulierung von CXCR4 (rot) und Herabregulierung von CXCR1/2. Dem Gradienten von CXCL12 folgend treten die reifen Immunzellen wieder ins Knochenmark ein. CXCL12 wird unter anderem durch Stromazellen im Knochenmarkinterstitium produziert. Hier findet die Apoptose und der Abbau durch Phagozytose durch Makrophagen statt.

Als häufigste Leukozyten im humanen Blut stellen neutrophile Granulozyten die ersten Immunzellen im infizierten Gewebe oder der Blutbahn dar. Dabei sind sie sowohl an der Bekämpfung bakterieller Erreger als auch viraler Pathogene beteiligt. Die Anlockung und Migration von neutrophilen Granulozyten ins infizierte Gewebe laufen dabei in mehreren Phasen ab (Abbildung 11).

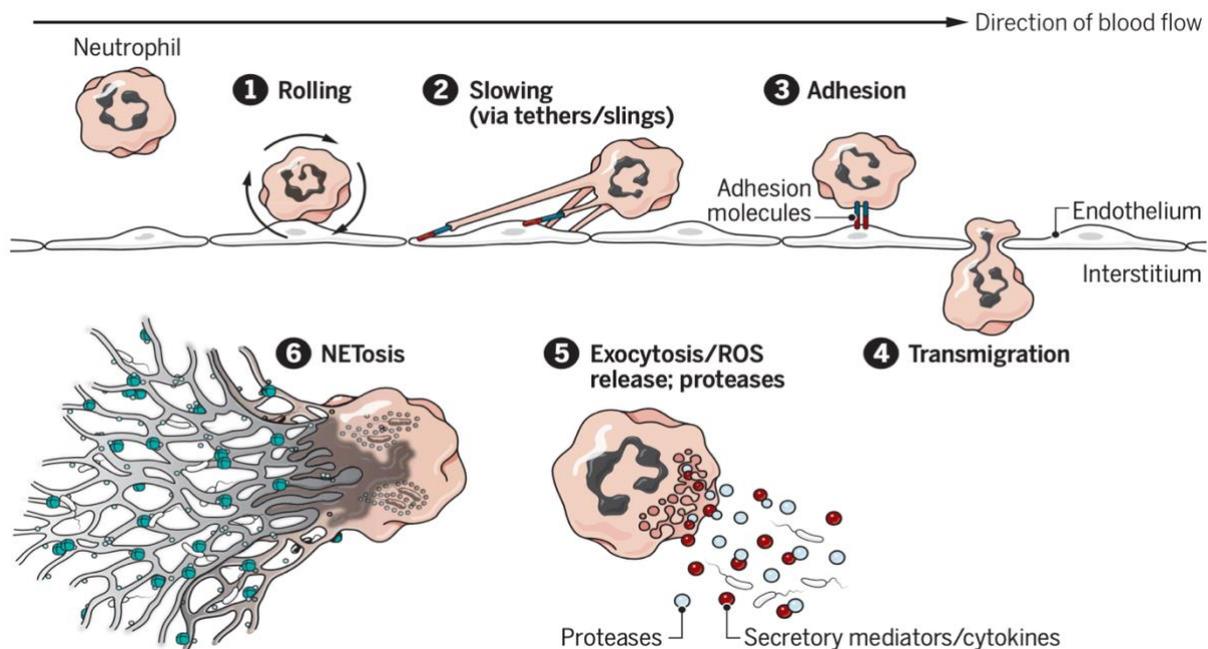


**Abbildung 11: Modell der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (de Oliveira et al., 2016)**

(a) DAMPs initiieren die Sekretion von  $H_2O_2$ . (b) Chemokine und Leukotriene locken massenhaft Immunzellen an. (c) Die initial eingewanderten neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ziehen weitere Leukozyten aus dem Blut an. (d) Bei Infektionen werden zudem proinflammatorische Zytokine gebildet und weitere Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen) sind involviert, um die Neutrophilen-Infiltration aufrecht zu erhalten und zu erhöhen.

Die ersten Signale der lokalen Infektion stellen DAMPs (Schaden-assoziierte-molekulare-Muster, engl. *damage associated patterns*) und der als Folge produzierte Wasserstoffperoxidgradient ( $H_2O_2$ -Gradient) dar (Niethammer, Grabher, Look, & Mitchison, 2009; Pittman & Kubes, 2013). DAMPs repräsentieren dabei ein weites Feld aus verschiedenen Molekülen wie DNA, Proteinen, N-Formyl-Peptiden (wie f-MLP), extrazelluläre Matrixbestandteilen, Adenosintriphosphat und Harnsäure (Venereau, Ceriotti, & Bianchi, 2015). Diese frühen Signale werden von neutrophilen Granulozyten durch spezifische PRRs (Mustererkennungsrezeptoren, engl. *pattern recognition receptors*) erkannt und führen zum Andocken und Rollen von neutrophilen Granulozyten auf der Oberfläche von entzündetem Endothel (Abbildung 12) (Sreeramkumar et al., 2014).  $H_2O_2$  löst weiterhin eine chemotaktische Migration zum Ort der höchsten Konzentration in humanen wie murinen neutrophilen Granulozyten aus (Klyubin, Kirpichnikova, & Gamaley, 1996; Yoo, Starnes, Deng, & Huttenlocher, 2011). Als nächster Schritt werden massenhaft Immunzellen durch die bereits eingewanderten neutrophilen Granulozyten und Makrophagen angezogen. Hierfür wird teils auf Mediatoren in der frühen Rekrutierungsphase wie die Chemokine der CXCL8-Familie und Leukotrien B4 (LTB4) als Vertreter der Lipidmediatoren zurückgegriffen (Lammermann et al., 2013; L. G. Ng et al., 2011; Sadik & Luster, 2012). CXCL1-8 (engl. *C-X-C motif chemokine ligand*

1-8) als Vertreter der CXCL8-Familie werden durch die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 gebunden (Kobayashi, 2008; Russo, Garcia, Teixeira, & Amaral, 2014). Durch verschiedene Signalwege, die in die gerichtete Migration von neutrophilen Granulozyten münden, wird die Rekrutierung weiter vorangetrieben (Kobayashi, 2008; Russo et al., 2014). Die Lipidmediatoren und die CXCL8-Familie sind dabei für die Aufrechterhaltung des Rekrutierungsreizes verantwortlich. Im Gegensatz dazu erreicht der  $H_2O_2$ -Gradient sein Maximum bereits nach 30 Minuten und ist nach 1 Stunde komplett zusammengebrochen (Pase et al., 2012).



**Abbildung 12: Neutrophilen Extravasation und Abwehrmechanismen (Ley et al., 2018)**

Als Antwort auf eine Infektion und Entzündung im Gewebe wandern zirkulierende neutrophile Granulozyten ins Gewebe aus. (1) Die ersten Schritte des Andockens und Rollens sind L-Selektin und PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand 1) vermittelt. (2) Durch  $\beta$ -2-Integrin (ITGB2) wird die Rollbewegung abgebremst. (3) ITGB2 und andere Adhäsionsmoleküle sorgen für eine feste Bindung ans entzündete Endothel. (4) Im Anschluss findet die dem chemotaktischen Gradienten aus Entzündungsmediatoren folgende Migration durch das Endothel und die Basalmembran statt. (5+6) Im Gewebe angekommen bedienen sich Neutrophile ihrer verschiedenen Abwehrmöglichkeiten wie Internalisierung von Pathogenen, Ausschütten von Proteasen, Abgabe von weiteren Entzündungsmediatoren, ROS-Produktion sowie NETs.

Im Blut oder infizierten Gewebe angekommen stehen neutrophilen Granulozyten ein ganzes Arsenal an Abwehrmechanismen zur Verfügung. Über verschiedene Wirkmechanismen, wie ROS-Sekretion, Ausschütten ihrer Granula, Phagozytose und NETs (engl. *neutrophile extracellular traps*), können die Immunzellen Pathogene eindämmen und unschädlich machen (Branzk et al., 2014; Brinkmann et al., 2004; Winterbourn, Kettle, & Hampton, 2016). Dabei sind einige Abwehrmechanismen eng mit der Extravasation verknüpft. Unter

---

Entzündungsbedingungen löst beispielsweise die Aktivierung von Integrinen oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren die Produktion von ROS aus (Nguyen, Green, & Meccas, 2017). ROS wird dabei von verschiedenen Enzymfamilien bereitgestellt. Die NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat)-Oxidase-Familie (NOX) besteht aus mehreren einzelnen Oxidasen wie NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 und NOX5 und stellt den größten Produzenten von ROS dar (Bedard & Krause, 2007). Die Enzyme befinden sich in der Zellmembran und bestehen jeweils aus mehreren Untereinheiten und weiteren assoziierten Proteinen. So sind Untereinheiten, wie zum Beispiel p22, essenziell für die Funktion und Stabilität von NOX1, NOX2 und NOX3 in der Membran von Neutrophilen.

Im Gegensatz zu unreifen sind reife neutrophile Granulozyten rein morphologisch kleiner und weniger körnig. Darüber hinaus zeigten Analysen des Transkriptom, dass gealterte neutrophile Granulozyten entzündungsfördernde Gene wie zum Beispiel für TNF $\alpha$  vermehrt exprimieren. Im Laufe der Reifung werden diese durch Reize aktiviert und ein entzündungsfördernder Phänotyp begünstigt (Adrover et al., 2019). Aus diesem Grund haben neutrophile Granulozyten eine tragende Rolle in inflammatorischen Prozessen wie intravasalen Entzündungen inne und beeinflussen die Pathogenese und Wundheilung von Erkrankungen wie zum Beispiel dem Myokardinfarkt entscheidend (Horckmans et al., 2017). In diesem Zusammenhang wurde weiterhin festgestellt, dass gealterte Neutrophile mehr ROS produzieren als junge neutrophile Granulozyten (Adrover et al., 2019).

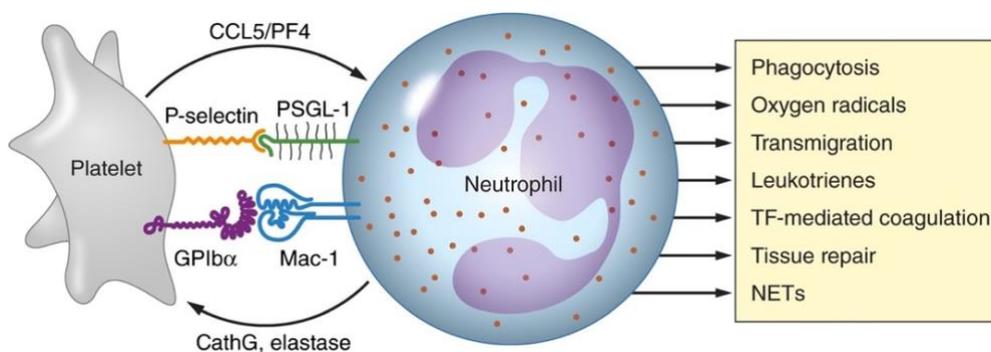
Weiterhin beeinflussen neutrophilen Granulozyten durch die Ausschüttung von Proteasen, Zytokinen und anderen Faktoren in ihren Granula aber auch die Geweberegeneration und sind entscheidend an der Modulation des erworbenen Immunsystems einschließlich der Aktivierung von B- und T-Zellen beteiligt.

Der Verlust von neutrophilen Granulozyten durch verschiedene Erkrankungen und therapiebedingte medikamentöse Nebenwirkungen hat fatale Konsequenzen wie beispielsweise unkontrollierte Infektionen. Dagegen hat eine übermäßige Infiltration durch Neutrophile ebenfalls weit reichende Folgen wie chronische Entzündungen, Funktionsverlust der betroffenen Organe und verzögerte Gewebeheilung (de Oliveira et al., 2016). Ein gut ausbalanciertes System ist somit unabdingbar und wird durch verschiedene Stellschrauben immer wieder reevaluiert und erneut angepasst.

## 1.4 Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion

Thrombozyten spielen die zentrale Rolle in der primären Blutstillung und Aufrechterhaltung der Hämostase. Unter normalen Bedingungen zirkulieren Thrombozyten im Ruhezustand im Blut. Bei Aktivierung, zum Beispiel im Rahmen von Gefäßverletzung, vollziehen die Thrombozyten Formveränderungen, entleeren ihre Granula und exprimieren und aktivieren verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel Integrine, auf ihrer Oberfläche. Die Formänderung und Aktivierung von Thrombozyten sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen, die auch im Rahmen von Thrombozyten-Leukozyten- und Thrombozyten-Endothel-Wechselwirkungen bekannt sind, sind essenziell für die Aufrechterhaltung der Integrität der Gefäßwand. Durch Bildung eines Thrombus werden Gefäßleckagen abgedichtet und ein weiterer Blutverlust gestoppt. Weiterhin haben Thrombozyten vielfältige andere Aufgaben. Diese gehen weit über die Wahrung der Gefäßintegrität hinaus.

So haben Thrombozyten weitreichende Funktionen in Prozessen wie Entzündungen, der Angiogenese und Tumorerkrankungen (Kim, Davis, & Jenne, 2018; Leblanc & Peyruchaud, 2016; Patzelt & Langer, 2012). Thrombozyten interagieren mit einer Vielzahl von Leukozyten, indem sie Proteine und andere Moleküle, wie zum Beispiel Adenosindiphosphat, aus Granula entleeren. Auf der anderen Seite können Leukozyten weitere Faktoren wie Proteasen und Stickoxid freisetzen, um die Funktion von Thrombozyten zu modulieren. Thrombozyten-Neutrophilen-Wechselwirkungen werden dabei über verschiedene molekulare Mechanismen vermittelt (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Neutrophilen-Thrombozyten-Wechselwirkungen und deren Auswirkungen (Lisman, 2018)**

Eine der wichtigsten Interaktionsmöglichkeiten beinhaltet von Thrombozyten exprimiertes p-Selektin (CD62P), welches von Neutrophilen durch PSGL-1 gebunden wird (Hamburger & McEver, 1990; Moore et al., 1995). Weiterhin spielt von Thrombozyten exprimiertes Glykoprotein Iba, welches wiederum von neutrophilen Granulozyten durch Makrophagen-1-Antigen (MAC-1), bestehend aus CD11b und ITGB2, gebunden wird eine zentrale Rolle in der Neutrophilen-Thrombozyten-Interaktion (Simon et al., 2000).

---

Das Zusammenspiel von Thrombozyten und Neutrophilen ist auf Grundlage der vorhandenen Interaktionsmoleküle vielfältig. Im Falle von Entzündungen ermöglichen Thrombozyten beispielsweise die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten aus dem Blutstrom an das Endothel und somit die Transmigration durch aktivierte oder geschädigte Endothelzellen (Zuchtriegel et al., 2016). Diese rekrutierten neutrophilen Granulozyten scannen nach aktivierten Thrombozyten und verarbeiten sowohl Signale aus dem Blutstrom als auch Informationen durch das Endothel (Sreeramkumar et al., 2014). Die zeitliche und räumliche Wechselwirkung beruht dabei auf der initialen CD40/CD40L- (CD40, engl. *TNF receptor superfamily ligand*, CD40L, engl. *TNF receptor superfamily member 5*) und der p-Selektin/PSGL-1-Bindung. Anschließend kommt es via ERK/MAPK-abhängiger (ERK, engl. *Extracellular signal-regulated kinases*, MAPK, engl. *Mitogen-activated protein kinase*) Umgestaltung der Expression von Integrinen zur definitiven Extravasation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Diese Prozesse sind essenziell für die Migration von Neutrophilen zum Ort der Inflammation. Die Hemmung der einzelnen Teilschritte resultiert folglich in einer gestörten Auswanderung von Immunzellen ins infizierte perivaskuläre Gewebe (Zuchtriegel et al., 2016).

Die bereits erwähnten NETs sind ein weiteres Beispiel der Neutrophilen-Thrombozyten-Interaktion. NETs bestehen dabei aus von neutrophilen Granulozyten sezernierter DNA, welche Pathogene im Blutstrom einfängt. Der Prozess setzt dabei auf verschiedene Bindungspartner wie p-Selektin/PSGL-1, Integrin- $\beta$ -2 und Glykoprotein IIb/IIIa voraus (Carestia et al., 2016; Caudrillier et al., 2012; Etulain et al., 2015). Dabei verursachen die intravaskulären NETs zusammen mit den Thrombozyten einen Mikrothrombus, um Krankheitserreger einzufangen, Entzündungsherde abzudichten und so die Verbreitung von Pathogenen und Entzündungsmediatoren zu begrenzen. Dieser Mechanismus hat weitreichende klinische Relevanz in vielfältigen Erkrankungen wie Thrombosen, Sepsis, Ischämien, Reperfusionzuständen, Abstoßungsreaktionen und Gewebsschäden (Czaikoski et al., 2016; Gould, Lysov, & Liaw, 2015; Huang et al., 2015; Martinod & Wagner, 2014; Nakazawa et al., 2017; Sayah et al., 2015).

Die Thrombozyten-Neutrophilen-Wechselwirkung hat weiterhin Bedeutung in anderen Erkrankungen. Hier sind neben den bereits aufgeführten Entitäten bakteriellen Infektionen,

---

die Sichelzellanämie, chronisch entzündliche Darmerkrankungen sowie das Asthma zu nennen (Caudrillier et al., 2012; Gawaz, Fateh-Moghadam, Pilz, Gurland, & Werdan, 1995; Gresele et al., 1993; Pamuk et al., 2006; Polanowska-Grabowska et al., 2010). Die Wechselwirkung von Thrombozyten und Leukozyten, insbesondere Neutrophilen, sind somit vielfältig und Gegenstand aktueller Forschung. Viele Interaktionen in anderen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen sind noch nicht hinreichend erforscht und die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sowie die daraus resultierenden Verbindungen von Immunsystem und Gerinnung zum Teil unklar.

### **1.5 Leukozyten-Megakaryozyten-Interaktion**

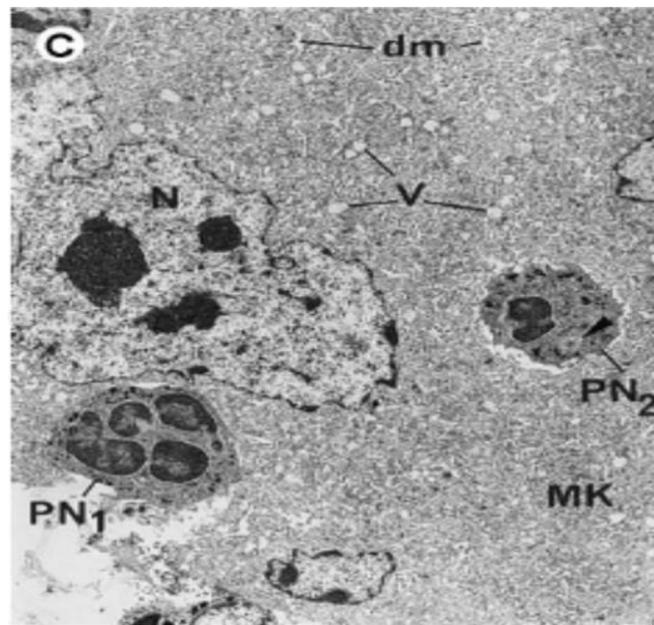
1956 beschrieben Humble et al. erstmals das Phänomen einer Zelle im Zytoplasma einer anderen Zelle als Emperipolesis. Der Begriff leitet sich dabei aus dem Griechischen von den Silben „em“ für „innen“ und „peripolesis“ für „umhergehen“ ab und beinhaltet das aktive Eindringen einer Zelle in das Zytoplasma einer anderen Zelle (Humble, Jayne, & Pulvertaft, 1956). Bei der Emperipolesis bleiben die aufgenommenen Zellen im Gegensatz zur Phagozytose intakt und weiterhin vital.

Die erste Beschreibung im Zusammenhang mit der bei Megakaryozyten stattfindenden Emperipolesis wurde von Larsen et al. veröffentlicht (Larsen, 1970). Dabei umschließen Megakaryozyten andere kleinere Zellen wie neutrophile Granulozyten, Monozyten oder Lymphozyten. Die Emperipolesis bei Megakaryozyten ist physiologisch äußerst selten und tritt gehäuft unter verschiedenen pathophysiologischen Umständen auf. Zum Beispiel konnte eine gehäufte Emperipolesis-Rate bei Krankheitsbildern wie Thrombozytopenien (Avci et al., 2002), Hodgkin-Lymphomen (Knight & Savasan, 2018), Leukämien (Shamoto, 1981), Myelofibrosen (Schmitt et al., 2000; Spangrude et al., 2016) und Blutverlusten (Cashell & Buss, 1992) beobachtet werden. Der Prozess der Emperipolesis konnte in verschiedenen *in vivo* Tiermodellen bei Megakaryozyten festgestellt werden. Hierbei handelt es sich um Tierversuche mit subletaler Bestrahlung des Knochenmarks bei Mäusen und einem Leishmaniose-Hunde-Modell (Bobik & Dabrowski, 1995; Momo et al., 2014). Auch konnte Emperipolesis bei Megakaryozyten in fetalen Lebern von Menschen gefunden werden (Lee, Erm, Kim, & Becker, 1999). Zusammengenommen lässt sich sagen, dass Emperipolesis eine

---

seltene, aber bei vielen Lebewesen physiologisch sowie pathologisch gehäuft vorkommende Interaktion von beispielsweise Megakaryozyten und Leukozyten ist.

Da die physiologische Relevanz der Emperipolesis noch nicht abschließend geklärt ist, wird der zugrunde liegende molekulare Mechanismus weiter erforscht. 2000 konnten Schmitt et al. zeigen, dass TPO-überexprimierte Megakaryozyten im Mausmodell eine Myelofibrose induzieren können (Abbildung 14). Darüber hinaus erhöht die Überstimulation die Häufigkeit der Emperipolesis im Knochenmark. Weitere Untersuchungen ergaben, dass diese Überexpression zu vermehrter Bildung von  $\alpha$ -Granula führt, p-Selektin auf der Zellmembran der Megakaryozyten verstärkt exprimiert und ein intensiver Umbau des Zytoskeletts der Megakaryozyten angeregt wird (Schmitt A, et al., 2000).



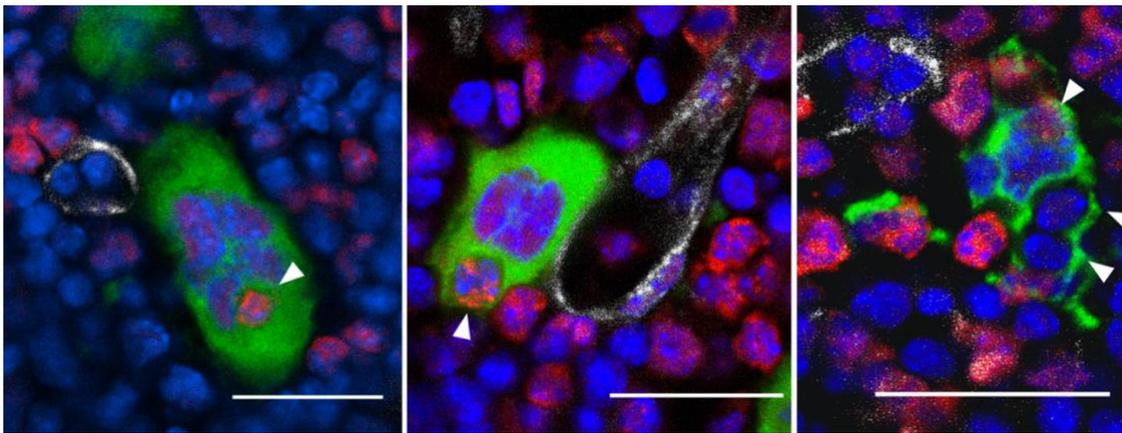
**Abbildung 14: Elektronenmikroskopieaufnahme mit Emperipolesis einer Megakaryozyte (Schmitt et al., 2000)**

(C) Gezeigt wird eine polymorphkernige Zelle (PN1) beim Eindringen sowie eine weitere (PN2) in der Megakaryozyte (MK).

Cunin et al. konnte 2019 neue Einblicke in den Ablauf liefern und die beteiligten Interaktionsmoleküle der Emperipolesis identifizieren. Mittels anschaulicher Multiphoton- und Konfokalmikroskopie konnte der Aktin-vermittelte dynamische Prozess der Emperipolesis genauer charakterisiert werden. Als Interaktionsmoleküle zwischen Neutrophilen und Megakaryozyten wurden ITGB2 und die ICAM-1/Erzin-Achse benannt. Nachdem eine direkte Interaktion zwischen ITGB2 auf Seiten der neutrophilen Granulozyten und ICAM-1 auf Seiten der Megakaryozyte etabliert ist, wird der neutrophile Granulozyt mittels Aktin-Umgestaltung internalisiert.

---

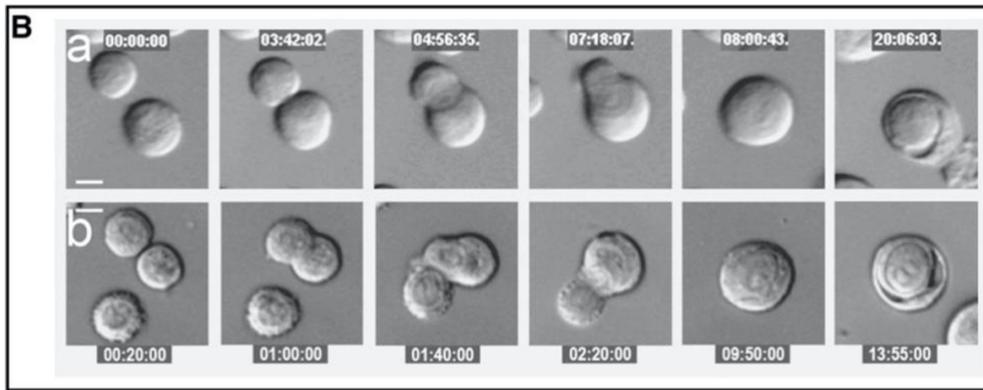
Um die aufgenommene Zelle bildet sich eine Zellmembran, welche Emperisom genannt wird. Diese löst sich im Verlauf wieder auf und entlässt den Neutrophilen ins Zytoplasma der Megakaryozyte. Hier kann in Interaktion mit dem Abgrenzungsmembransystem ein Austausch von Membranstücken vom Neutrophilen auf die Megakaryozyte und umgekehrt erfolgen. Insgesamt bietet die Arbeit spannende Einblicke in die Interaktion beider Zellen und liefert eine neue Sichtweise auf die molekulare Oberfläche von Megakaryozyten und den produzierten Thrombozyten, die somit teilweise aus Neutrophilen-Zellmembran bestehen kann (Cunin et al., 2019).



**Abbildung 15: Konfokalmikroskopie der Emperipolesis (Cunin et al., 2019)**

Konfokalmikroskopie von murinem Knochenmark mit anti-CD41 (grün), anti-Ly6G (rot) und anti-CD31/CD144 (weiß) Färbung. DNA wurde mittels Hoechst (blau) gefärbt. Die Pfeilspitzen zeigen internalisierte neutrophile Granulozyten oder andere Ly6G<sup>low</sup> Knochenmarkszellen (rot) in Megakaryozyten (grün). Die Maßeinheit entspricht 20µm.

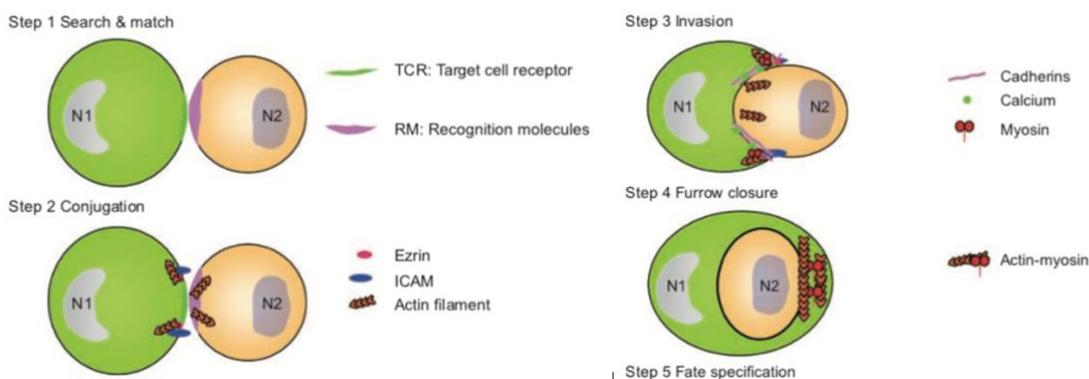
Overholtzer et al. publizierten 2007 eine weitere "Zelle-in-Zelle"-Interaktion, welche als "Entose" bezeichnet wird (Abbildung 15). Diese weist viele Ähnlichkeiten zur Emperipolesis auf. Unter normalen Umständen führt der Kontaktverlust von Endothelzellen zur extrazellulären Matrix zum programmierten Zelltod. Dieser Prozess wird Anoikis genannt. Entose tritt bei Epithelien und deren Tumoren auf und verhindert die Apoptose der extrazellulär losgelösten Zellen. Nach Internalisierung der Zelle ins Zytoplasma einer anderen Zelle wird die aufgenommene Zelle entweder durch Enzyme zerstört oder vital aus dem Inneren entlassen (Overholtzer et al., 2007).



**Abbildung 16: Entose in einer Zellsuspension (Overholtzer et al., 2007)**

(B) Differenzialinterferenzkontrastbilder einer Zellsuspension im zeitlichen Verlauf. XX:YY:ZZ für Stunden:Minuten:Sekunden. Die Maßeinheit entspricht 10 µm. (a) Eine Zelle internalisiert eine andere Zelle. (b) Zwei Zellen internalisieren in eine dritte Zelle.

Die Veröffentlichung von Overholtzer et al. legt nahe, dass die Bildung einer physischen Bindung zwischen den beiden Zellen Voraussetzung für den weiteren Entose-Prozess ist. Darüber hinaus erfordert die Aufnahme die vom Rho-ROCK-Signalweg (Rho, Ras homologue, ROCK, Rho-Kinase) abhängigen und die auf Aktin und Myosin basierenden kontraktile Kräfte der Empfängerzelle. Die Rho-Familie stellt dabei eine Untergruppe der GTPase-Enzymfamilie (Guanosintriphosphatase) dar. ROCK ist im Anschluss eines der wichtigsten Effektorproteine der Rho-Familie mit wichtigen Funktionen in der Regulierung des Zytoskeletts und wird in Zusammenhang mit der Entstehung sowie der Invasion und Metastasierung maligner Tumore gebracht (Kroemer & Perfettini, 2014). Die Aktivierung des Signalwegs führt dabei zu einer Umgestaltung des Zytoskeletts der aufnehmenden Zelle (Abbildung 16). In einem *in vitro* Wachstumsassay waren E- und P-Cadherine exprimierende Tumorzellen in der Lage, Epithelübergänge umzugestalten und andere Zellen ins eigene Zytoplasma aufzunehmen (Overholtzer et al., 2007).



**Abbildung 17: Entose Modell (Xia, Wang, Guo, & Yao, 2008)**

Hypothetisches Modell zur Illustration der schrittweisen Vorgänge bei Zell-in-Zell-Phänomenen wie Emperipolesis und Entose.

---

Obwohl verschiedene Forschungsgruppen unterschiedliche molekulare Mechanismen, die die Emperipolesis von Megakaryozyten antreiben, aufgedeckt haben, gibt es noch viele offene Fragen. Allen voran ist die physiologische und pathophysiologische Bedeutung des Prozesses weiter unklar. Im Vergleich zur Phagozytose, bei der die Eliminierung der aufgenommenen Zelle eintritt, wird bei der Emperipolesis die zelluläre Integrität und Funktion bewahrt. Es handelt sich dabei meist nur um ein vorübergehendes Ereignis. Denkbar ist, dass es sich bei dem Vorgang um einen Schutzmechanismus der aufgenommenen Zelle handelt, um sich vor schwierigen Mikroumgebungen zu schützen. Darüber hinaus ist weiter unbekannt welche Faktoren über die Rollen von aufnehmender und aufgenommener Zelle sowie des weiteren Schicksals nach Aufnahme bei der Entose entschieden.

### **1.6 Zusammenfassung und Zielsetzung**

Thrombozyten sind kleine, kernlose Zellen mit einer Lebensdauer von durchschnittlich sieben Tagen. Sie zirkulieren im Blut mit der Hauptaufgabe die Gefäßintegrität zu wahren und im Falle von Blutungen und nach Verletzungen die Leckagen in den Gefäßen zu schließen. Darüber hinaus sind Thrombozyten an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wie Entzündungen und der Immunantwort beteiligt. Täglich werden ungefähr  $100 \times 10^9$  Thrombozyten durch Megakaryozyten kontinuierlich aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf abgegeben. Megakaryozyten machen dabei nur 0,01% der Zellen des Knochenmarks aus. Durch Fragmentierung im Rahmen der Thrombopoese sind sie in der Lage, mehrere hundert Thrombozyten in den Blutkreislauf freisetzen. Über verschiedene Zwischenschritte wie Proplättchen und Präplättchen werden letztendlich einzelne Thrombozyten durch weitere Teilung im Blutstrom bereitgestellt. Die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch insbesondere für die Prozesse der intrazellulären Strukturumwandlungen und der Abscherung noch weitgehend unbekannt und es wurden nur wenige Faktoren wie Scherkräfte oder S1p identifiziert, die diese beeinflussen. Insbesondere bleibt die Rolle anderer Zellarten in dieser Entwicklung unklar. Die engen räumlichen Beziehungen im Knochenmark durch andere Zellen und die unter anderen Umständen häufige Wechselwirkung von Thrombozyten und Leukozyten legt eine Interaktion auch auf Knochenmarksebene dabei durchaus nahe. In dieser Arbeit sollen nach der Etablierung eines *in vitro* Zellmodells zur Quantifizierung der Thrombozytenproduktion das interzelluläre Zusammenspiel und die zugrundeliegenden intra- und extrazellulären molekularen

---

Mechanismen, die an der Thrombopoese beteiligt sind, dargestellt werden. Nach einer grundlegenden Charakterisierung des *in vitro* Modells wird hier der Einfluss neutrophiler Granulozyten, die auf Grund der Anzahl häufigsten Interaktionspartner im Knochenmark, auf die Thrombopoese nachgewiesen und näher charakterisiert. Durch verschiedene andere Zellarten und KO-Mauslinien konnten die Mechanismen genauer aufgeschlüsselt und CXCR4/CXCL12 sowie ROS als entscheidende Einflussgrößen identifiziert werden. In mehreren Depletions-Experimenten wird im Anschluss die *in vivo* Relevanz der untersuchten Wechselwirkung dargestellt. Dabei kann die Thrombopoese durch eine erhöhte Anzahl an intravasalen Neutrophilen gesteigert sowie durch induzierte Neutropenie gehemmt werden. Der Mechanismus stellt eine weitere Verbindung zwischen Immunsystem und Hämostase dar und liefert neue Einblicke in die murine Pathophysiologie der Thrombopoese sowie dem Zusammenspiel von neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten.

---

## **2. Materialien**

### **2.1 Mauslinien**

Wildtyp C57BL/6-Mäuse wurden von Charles River Company bezogen. Mrp8<sup>Cre</sup>(B6.Cg-Tg(S100A8-cre,-EGFP)1Ilw)- und CXCR4<sup>fl/fl</sup>(B6.129P2-Cxcr4<sup>tm2Yzo</sup>/J)-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Andrés Hidalgo (Spanish National Center for Cardiovascular Research) zur Verfügung gestellt und gekreuzt, um Mrp8<sup>Cre</sup>-CXCR4<sup>fl/fl</sup>-Mäuse zu generieren. Mx1<sup>Cre</sup>-β-1-Integrin(ITGB1)<sup>fl/fl</sup>(B6;129-Itgb1<sup>tm1Efu</sup>/J)-, β-2-Integrin-KO- (Walzog, Scharffetter-Kochanek, & Gaehtgens, 1999) und Kindlin-3(Kin3)-KO-Mäuse (Moser, Nieswandt, Ussar, Pozgajova, & Fassler, 2008) wurden von PD Dr. rer. nat. Markus Moser (Technische Universität München), p22<sup>mt/mt</sup>(A.B6 Tyr+-Cyba<sup>nmf333</sup>/J)-Mäuse wurden von Prof. Dr. Agnes Görlach (Deutsches Herzzentrum München) und PSGL-1-KO-Mäuse (Borges et al., 1997) wurden von Prof. Dr. Dietmar Vestweber (Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin München) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle Tierversuche wurden von der bayerischen Regierung genehmigt und entsprachen der bayerischen Tierschutzgesetzgebung (TVA 55.2-1-54-2532-148-2016). Der Titel der Genehmigung lautet „Funktionelle Analyse der Leukozyten-Megakaryozyten Interaktion im Knochenmark und deren Bedeutung für die Thrombopoese.“

### **2.2 Durchflusszytometrie-Antikörper**

Name:	Klon:	Firma:	Bestellnummer:
APC rat anti-mouse CD42d AB	1C2	Biolegend	148506
APC armenian hamster IgG isotype ctrl AB	HTK888	Biolegend	400912
FITC hamster anti-mouse CD61 AB	HMβ3-1	BD Pharmigen	553346
FITC hamster IgG1 isotype ctrl AB	A19-3	BD Pharmigen	553971
PE rat anti-mouse Ly6G AB	1A8	BD Pharmigen	551461
PE rat IgG2α κ isotype ctrl AB	R35-95	BD Pharmigen	553930

**Tabelle 1: Durchflusszytometrie-Antikörper**

### **2.3 Depletions-Antikörper**

Name:	Klon:	Firma:	Bestellnummer:
Ultra-LEAF purified rat anti-mouse Ly6G/Ly6C AB	RB6-8C5	Biolegend	108453
Ultra-LEAF purified rat IgG2α, κ isotype ctrl AB	RTK2758	Biolegend	400544
Purified rat anti-mouse CD42b AB	R300	Emfret Analytics	R300
Purified rat IgG isotype ctrl AB	R301	Emfret Analytics	R301

**Tabelle 2: Depletions-Antikörper**

## **2.4 Histologie-Reagenzien**

Name:	Klon:	Firma:	Bestellnummer:
Streptavidin eFluor 450 Conjugate	-	ebioscience	48-4317-82
Biotin anti-mouse CD41a AB	MWReg30	ebioscience	13-0411-82
FITC anti-mouse CD41a AB	MWReg30	ebioscience	11-0411-85
PE anti-mouse Ly6G AB	1A8	Biolegend	127608

**Tabelle 3: Histologie-Reagenzien**

## **2.5 Reagenzien**

Name:	Firma:	Bestellnummer:
Lantrunculin A	Abcam	421.55
Dulbecco's phosphate buffered saline	Biochrom	L1825
Fetal bovine serum	Biochrom	S0615
L-15 Leibovitz Medium	Biochrom	F1315
Fibrinogen	Fisher Scientific	11496922
Recombinant mouse thrombopoietin	Immunotools	12343615
P-URFP-3.0	Kisker Biotech	GKAG03
Blebbistatin	Merck	203390
Nocodazol	Merck	487929
Sphingosin-1-Phosphat	Merck Millipore	567727
Neutrophil Isolation Kit mouse	Miltenyi Biotec	130-097-658
Pan T Cell Isolation Kit 2 mouse	Miltenyi Biotec	130-095-130
Bovine serum albumin	Sigma-Aldrich	A9647
Fibrinogen from human plasma	Sigma-Aldrich	F3879
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich	P4333
Dulbecco's modified eagle's medium	Sigma-Aldrich	D5796
Ethylendiaminetetraacetic acid	Sigma-Aldrich	E7889
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich	C8273
Apocynin	Sigma-Aldrich	A10809
Phorbol-12-Myristate-13-Acetat	Sigma-Aldrich	P8139
Thiazol orange	Sigma-Aldrich	390062
Triton X-100	Sigma-Aldrich	93443
EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin	Thermo Scientific	21217

**Tabelle 4: Reagenzien**

## **2.6 Verbrauchsmaterialien**

Name:	Firma:	Bestellnummer:
Microlence 3 20G Kanülen	BD Pharmigen	301300
Microlence 3 26G Kanülen	BD Pharmigen	303800
Microlence 3 30G Kanülen	BD Pharmigen	305771
Falcon Cell Strainer 70 µm	Corning	352350
Falcon Cell Strainer 100 µm	Corning	352360
Corning Costar Transwell 0,4 µm	Fisher Scientific	10301031
LD columnes	Miltenyi Biotec	130-042-901
LS columnes	Miltenyi Biotec	130-042-401
Zellkulturtestplatte	TPP	92006

**Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien**

## **2.7 Geräte**

Name:	Firma:	Version:
Durchflusszytometer	Beckman Coulter	Gallios
Wärmeschrank	Binder	FED 115.APT line
Zentrifuge	Eppendorf	5804V
Kryostat	Fisher Scientific	Epredia Cryostar NX 70
Mikrozentrifuge	Hettich	Micro 22R
Blutanalysegerät	IDEXX	ProCyte Dx
Vortex	IKA Works	MS2 Minishaker
Leukozyten-Zählkammer	Laboroptik	Neubauer 0,1mm/0,0025mm <sup>2</sup>
Megakaryozyten-Zählkammer	Laboroptik	Fuchs Rosenthal 0,2mm/0,0625mm <sup>2</sup>
Wasserbad/-thermostat	Lauda	E100/012T
Zweiphotonenmikroskop	LaVision Biotec	TriM Scope II Series
Analysewaage	Sartorius	Talent TE214S
Mikroskop	Zeiss	Axiovert 200

**Tabelle 6: Geräte**

## **2.8 Software**

Name:	Firma:	Version:
FlowJo Software	Treestar	8.7
IMARIS Software	IMARIS	7.2.1, 8.2.1
Prism GraphPad	Prism	8

**Tabelle 7: Software**

---

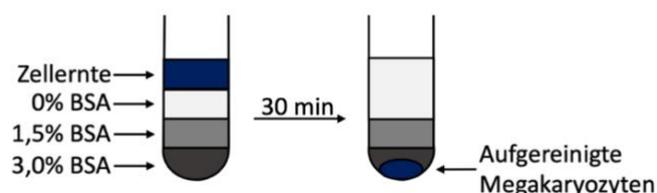
### **3. Methoden**

#### **3.1 Megakaryozytenisolation aus fetalen Leberzellen und murinem Knochenmark**

Megakaryozyten aus fetalen Leberzellen wurden aus Mäuseembryonen 13,5-14,5 Tage nach Verpaarung gewonnen. Nach Präparation der fetalen Lebern wurden diese anschließend mit Hilfe von Falcon Cell Strainern 70 µm und 30G Kanülen zerkleinert und eine Einzelzellsuspension in einer Mischung aus 69% Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM), 10% fetalem Rinderserum (FBS) und 1% Penicillin und Streptomycin hergestellt. Die Zelllösung wurde mit 70 ng/ml TPO versetzt und für 5 Tage bei 37 °C sowie 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert (Thon et al., 2010).

Analog wurden Megakaryozyten aus murinem Knochenmark erwachsener Tiere gewonnen, indem die präparierten Knochen mit 2% FBS in 4°C kaltem PBS (engl. *Phosphate buffered saline*) gespült wurden. Die Knochenmarksanteile wurde wiederum mittels Cell Strainer und Spülkanüle zerkleinert und in eine Einzelzellsuspension verarbeitet. Anschließend erfolgte die Kultur in gleicher Weise in dem gleichen Medium und mit den gleichen Reagenzien wie bei den aus fetalen Leberzellen isolierten Megakaryozyten. Zur besseren Differenzierung wurden 15 U/ml Heparin hinzugefügt.

Nach 5 Tagen wurden die nun differenzierten Zellen eingesammelt und mit Hilfe eines Albumingradienten angereichert. Der Gradient bestand hierbei aus drei Schichten (0%/1,5%/3%) BSA (engl. *Bovine serum albumin*) in PBS (Abbildung 18). Die Zellen wurden für 30 Minuten auf dem Gradienten belassen, die oberen Schichten anschließend verworfen und die Zellen in der untersten Schicht vorsichtig eingesammelt. Dadurch erhielt man aufgereinigte Zellen, welche mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer quantifiziert wurden.



**Abbildung 18: Schematische Darstellung des BSA-Gradienten zur Megakaryozytenisolation**

Die Schichten nehmen in der Konzentration des BSA von oben nach unten zu. Die Einzelzellsuspension der Knochenmarkszellen wird für 30 min auf dem Gradienten belassen. Durch Sedimentation sinken die großen und schweren Megakaryozyten nach unten. Anschließend werden die oberen Schichten verworfen und die angereicherten Megakaryozyten weiterverarbeitet.

---

### **3.2 Isolation von neutrophilen Granulozyten aus murinem Knochenmark**

Für die Isolation wurden Röhrenknochen von C57BL/6-Mäusen oder anderen Mauslinien gewonnen. Die Knochen wurden an beiden Enden aufgeschnitten und mit 2% FBS in PBS gespült, um die Knochenmarkanteile herauszulösen. Es wurde wie bereits oben beschrieben eine Einzelzellsuspension hergestellt und die neutrophilen Granulozyten durch Verwendung des Neutrophilen-Isolations-Kits aufgereinigt. Hierfür wurde nach Durchführung einer Erythrozyten-Lyse mit Erythrozyten-Lyse-Puffer die im Kit befindlichen Antikörper und magnetischen Beads zugefügt. So wurden mittels magnetischer Zellsortierung (MACS, engl. *magnetic cell sorting*) alle nicht gewünschten Zellen markiert. Durch die Wirkung des Magnets auf die markierten Zellen verblieben diese im Sinne einer negativen Selektion in der LD-Trennsäule (Abbildung 18). Nach Durchfluss der Zellsuspension wurden die angereicherten Zellen gewaschen, mittels Neubauer-Zählkammer quantifiziert und für weitere Experimente verwendet.



**Abbildung 19: LD Columnes der Firma Miltenyi Biotec ([mediray.co.nz](http://mediray.co.nz))**

### **3.3 Isolation von Lymphozyten aus der murinen Milz**

Lymphozyten (L) wurden aus der Milz erwachsener C57BL/6-Mäusen gewonnen. Nach Präparation der Milz wurde diese mit einem Cell Strainer 70 µm und einer 26G Kanüle zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Anschließend erfolgte die Isolation und Aufreinigung nach Angaben des Herstellers des Pan T Cell Isolation Kit. Durch Markierung mit Antikörpern (AB) und magnetischen Beads wurde die Zelllösung in LS-Trennsäulen aufgereinigt. Dabei wurden die ungewünschten Zellen markiert und verblieben nach Negativselektion in der Säule. Die unmarkierten Lymphozyten wurden zuletzt gewaschen, quantifiziert und für weiter Versuche verwendet.

---

### **3.4 Vorbereitung der Zellkulturplatten**

Sterile 6-Well-Platten (Abbildung 20) wurden mit 100 µg/ml Fibrinogen beschichtet und für eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator belassen. Anschließend wurde die Fibrinogenlösung verworfen und die Oberfläche mit 1,5% BSA für mindestens weitere 30 Minuten geblockt. Nach Entfernung des BSAs wurden die Testplatten mit PBS gewaschen und für die weiteren Versuche verwendet.



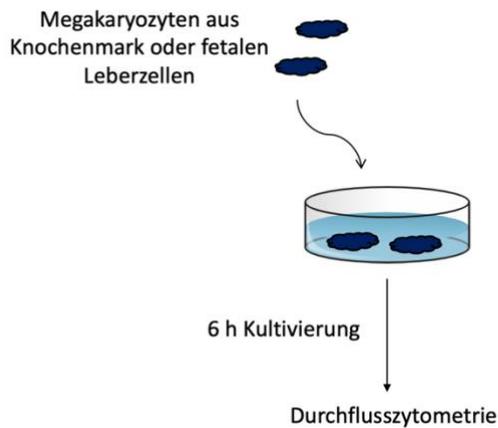
**Abbildung 20: 6-Well Zellkulturplatte der Firma TPP (www.buch-holm.com)**

### **3.5 Vorbereitung Megakaryozyten Mono-/Ko-Kultur Modell**

Megakaryozyten, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten wurden unter Verwendung des BSA-Gradienten oder des jeweiligen Isolierungskits wie oben aufgeführt isoliert. Die Zellen wurden im Anschluss auf den vorbereiteten Zellkulturplatten ausgesät und in einem speziellen Medium (40% (69% DMEM-Medium + 10% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin) + 60% L-15 Leibovitz Medium) für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Für die verschiedenen Experimente wurden jeweils unterschiedliche Ansätze gewählt und entsprechend unterschiedliche Zellarten und Anzahl von Zellen ausgesät. Weiterhin wurden bestimmte Stimulanzen, Inhibitoren oder Antikörper zu den jeweiligen Ansätzen hinzugefügt. Die genaue Beschreibung der einzelnen Experimente wird im jeweiligen Absatz aufgeführt.

#### **3.5.1 Megakaryozyten Mono-Kultur**

Es wurden verschiedene Zellkultur-Ansätze mit jeweils 10.000, 25.000 und 50.000 Megakaryozyten pro Well ausgesät. Es wurden keine anderen Zellen, Stimulanzen, Inhibitoren oder Antikörper verwendet. Zur Implementierung erfolgt die Zellernte zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Alle nachfolgenden Kulturen erfolgten für 6 Stunden (Abbildung 21).

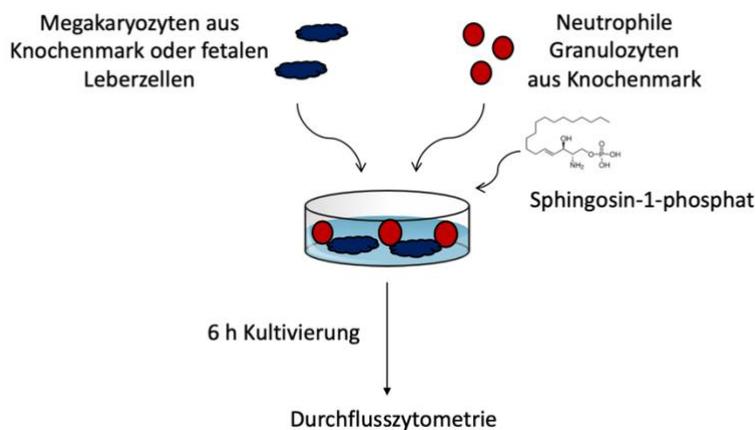


**Abbildung 21: Schematische Darstellung Megakaryozyten Mono-Kultur**

### **3.5.2 Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

Es wurden verschiedene Zellkultur-Ansätze mit jeweils 10.000, 25.000 oder 50.000 Megakaryozyten pro Well ausgesät. Es wurden weiterhin 250.000 neutrophile Granulozyten pro Well hinzugefügt. Darüber hinaus wurde der Stimulus S1p in der Konzentration 10  $\mu\text{M}$  verwendet (Abbildung 22).

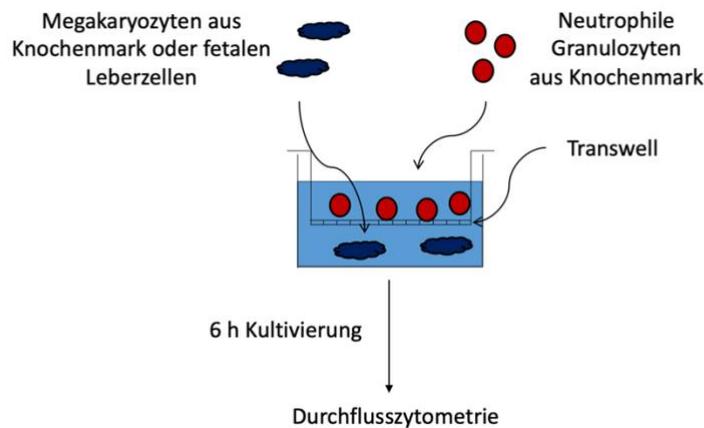
Um eine bessere Veranschaulichung zu erreichen und die unterschiedliche Megakaryozyten-Qualität zwischen den einzelnen Experimenten zu berücksichtigen, wurden relative Änderungen im Vergleich zur Megakaryozyten Mono-Kultur berechnet und veranschaulicht. Hierdurch konnten die Unterschiede innerhalb der verschiedenen Aussaat-Gruppen besser verglichen werden. Die reine Megakaryozyten Mono-Kultur bildet mit einem Mittelwert von 1 die Bezugsgröße.



**Abbildung 22: Schematische Darstellung Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

### 3.5.3 Neutrophilen-Megakaryozyten-Transwell Ko-Kultur

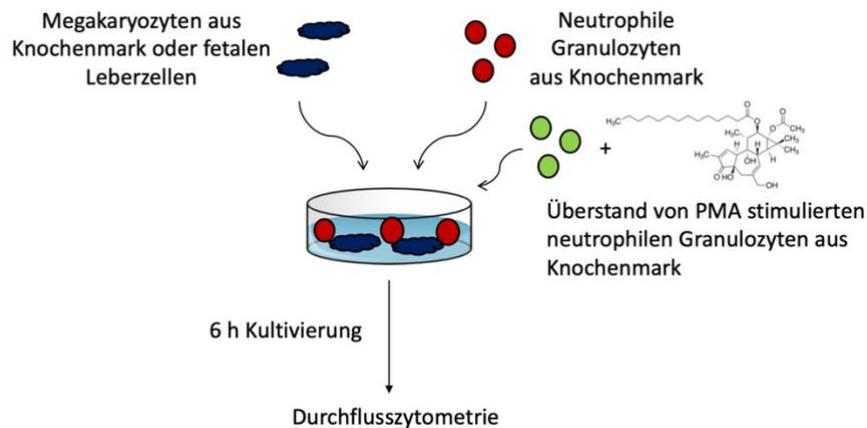
Es wurden verschiedene Zellkultur-Ansätze mit jeweils 10.000, 25.000 oder 50.000 Megakaryozyten pro Well ausgesät. Es wurden weiterhin 250.000 Neutrophile pro Well hinzugefügt. Die beiden Zellarten wurden in einer Gruppe durch Transwells getrennt, wobei Megakaryozyten auf den mit Fibrinogen beschichteten Boden und neutrophile Granulozyten im ebenfalls beschichteten Transwell eine Ebene über den Megakaryozyten im Medium ausgesät wurden. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht eine räumliche Trennung beider Zellarten, wobei lösliche Stoffe sich frei durch das Transwell bewegen können (Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Schematische Darstellung Neutrophilen-Megakaryozyten-Transwell Ko-Kultur

### 3.5.4 Neutrophilen-Überstand-Megakaryozyten Ko-Kultur

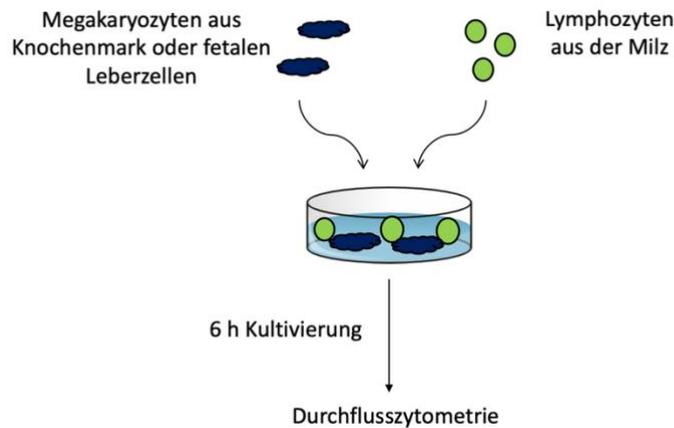
Es wurden verschiedene Zellkultur-Ansätze mit jeweils 10.000, 25.000 oder 50.000 Megakaryozyten pro Well ausgesät. Weiterhin wurden entweder 250.000 Neutrophile oder der Überstand von mit 50 nM Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA) stimulierten Neutrophilen hinzugefügt (Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Schematische Darstellung Neutrophilen-Überstand-Megakaryozyten Ko-Kultur

### 3.5.5 Lymphozyten-Megakaryozyten Ko-Kultur

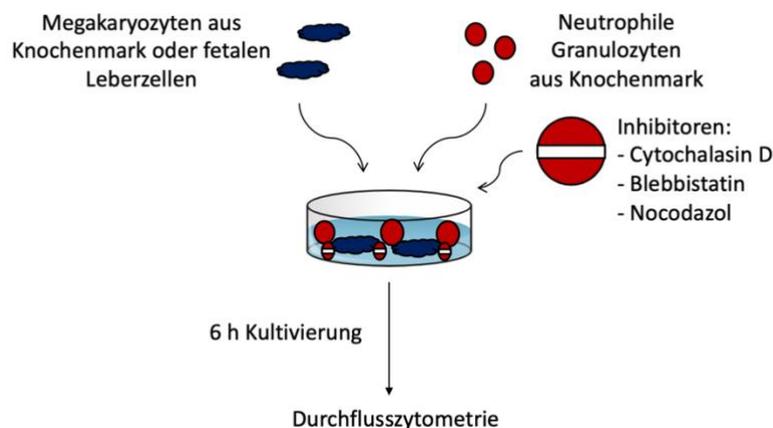
Es wurden verschiedene Zellkultur-Ansätze mit jeweils 10.000, 25.000 oder 50.000 Megakaryozyten pro Well ausgesät. In diesem Versuch wurden 250.000 neutrophile Granulozyten oder 250.000 Lymphozyten hinzugefügt (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Schematische Darstellung Lymphozyten-Megakaryozyten Ko-Kultur**

### 3.5.6 Zytoskeletthinhibitoren in der Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur

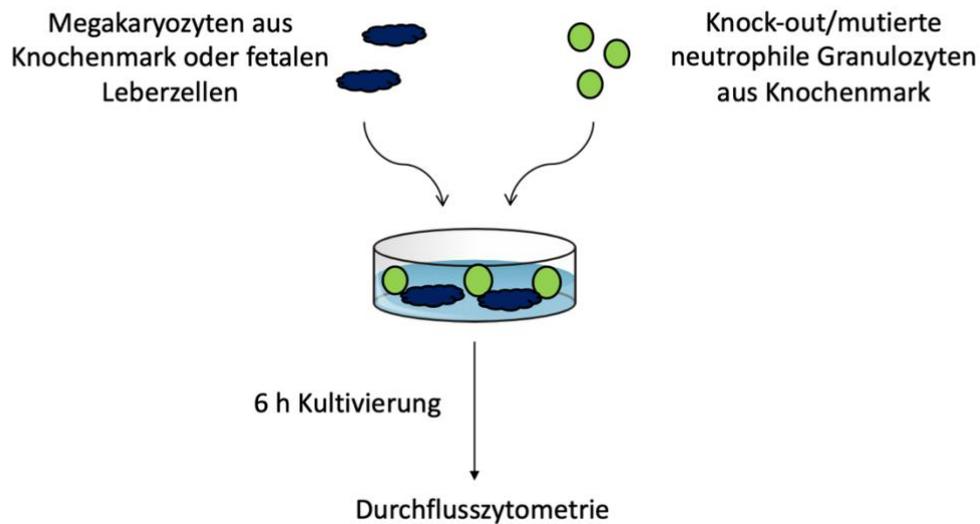
Es wurden verschiedene Zellkultur-Ansätze mit jeweils 10.000, 25.000 oder 50.000 Megakaryozyten pro Well ausgesät. Es wurden weiterhin 250.000 neutrophile Granulozyten vor der Aussaat mit je einem der Inhibitoren Blebbistatin (50 nM), Cytochalasin D (100 nM) und Nocodazol (50 nM) für 30 Minuten inkubiert (Abbildung 26). Dabei hat das Pilzgift Cytochalasin D eine spezifische Hemmung der Aktin-Polymerisation zur Folge (Brenner & Korn, 1980). Nocodazol hingegen stört die Mikrotubuli-Polymerisation (Samson, Donoso, Heller-Bettinger, Watson, & Himes, 1979). Blebbistatin hemmt die Myosin-II-ATPase und damit die Zellmotilität (Kovacs, Toth, Hetenyi, Malnasi-Csizmadia, & Sellers, 2004).



**Abbildung 26: Schematische Darstellung Zytoskeletthinhibitoren in der Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

### **3.5.7 Knock-Out-/mutierte-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

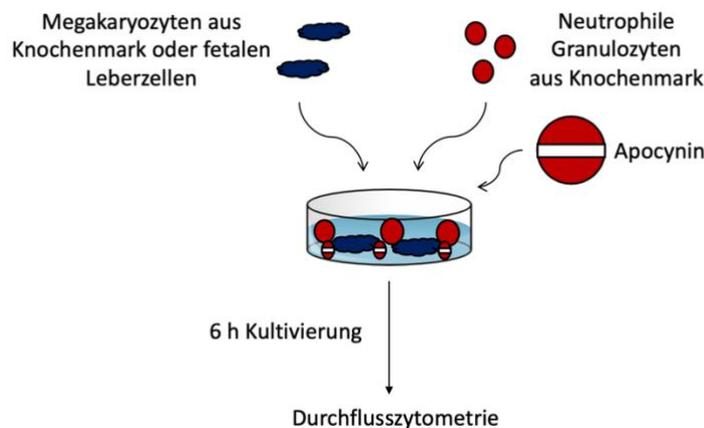
Es wurden verschiedene Zellkultur-Ansätze mit jeweils 10.000, 25.000 oder 50.000 Megakaryozyten pro Well ausgesät. Weiterhin wurden entweder 250.000 neutrophile Granulozyten oder 250.000 KO/mutierte neutrophile Granulozyten hinzugefügt. Bei den KO/mutierten Zellen handelte es sich um PSGL-1-KO, Kindlin-3-KO (Kin3), Integrin- $\beta$ -1-KO (ITGB1), Integrin- $\beta$ -2-KO (ITGB2), CXCR4-KO und p22<sup>mt/mt</sup> Neutrophile (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Schematische Darstellung KO-/mutierte Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

### **3.5.8 Apocynin-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

Es wurden verschiedene Zellkultur-Ansätze mit jeweils 10.000, 25.000 oder 50.000 Megakaryozyten pro Well ausgesät. Es wurden weiterhin 250.000 neutrophile Granulozyten hinzugefügt. Darüber hinaus wurde der NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin in der Konzentration 50 nM in der Ko-Kultur verwendet (Abbildung 28).

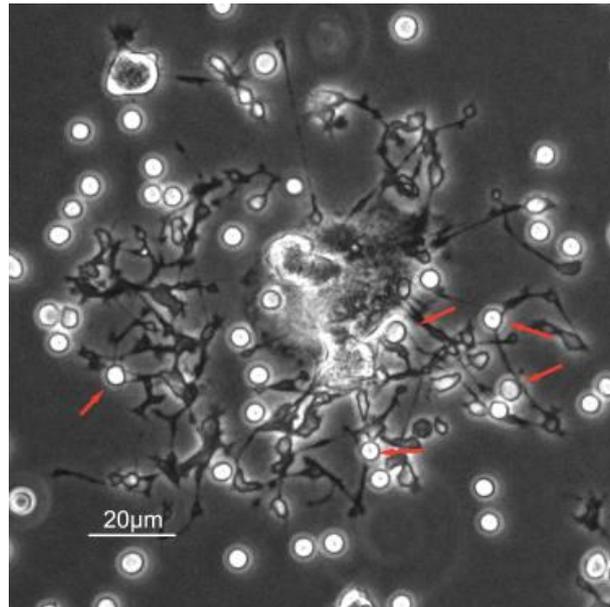


**Abbildung 28: Schematische Darstellung Apocynin-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

---

### **3.6 Zellernte**

Nach 6 Stunden wurde der Überstand jedes Wells vorsichtig eingesammelt, mit PBS gewaschen, zentrifugiert und für 10 Minuten mit 1% PFA fixiert (Abbildung 29). Nach erneutem Waschen wurde das Zellpellet in PBS gelöst und mit den Antikörpern in einer Konzentration von 1:400 für CD42d-APC und CD61-FITC sowie einer Konzentration von 1:200 für Ly6G-PE gefärbt. Zuletzt wurde 1µl Ultra-Rainbow-Beads zur späteren Normierung zugefügt.



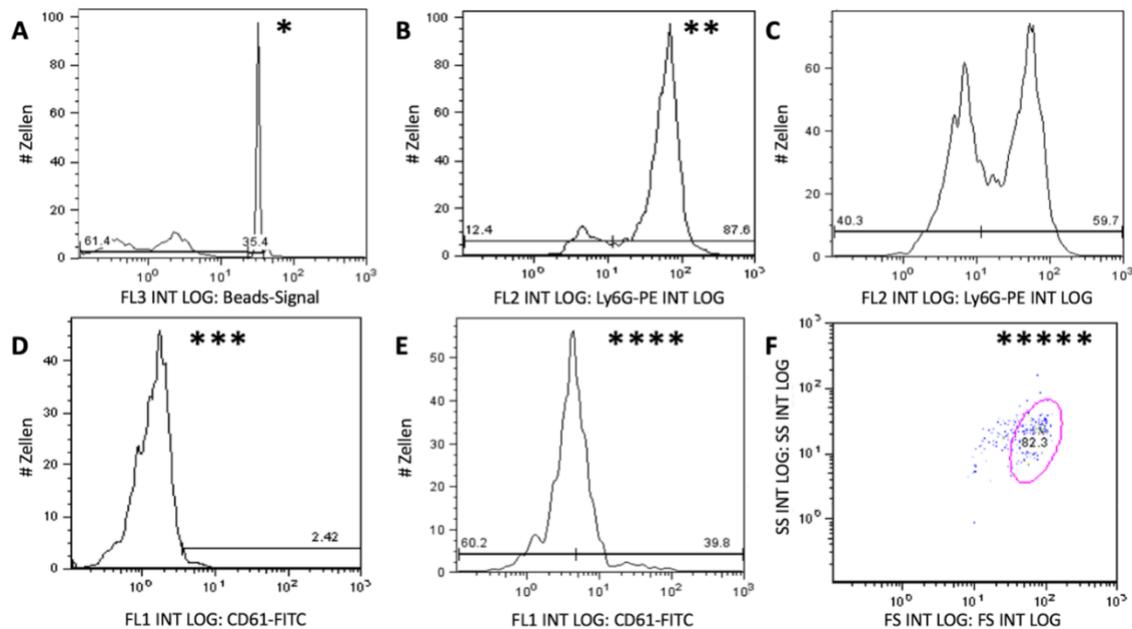
**Abbildung 29: Lichtmikroskopie der Zellkultur**

Die Aufnahme zeigt die aus dem Knochenmark isolierten Megakaryozyten sowie deren Interaktion mit Neutrophilen in einer *in vitro* Ko-Kultur. Die Roten Pfeile zeigen die Orte der Interaktion. Der Balken entspricht 20 µm.

### **3.7 Auswertung der Zellpartikel mittels Durchflusszytometrie**

Um die genaue Anzahl an Plättchen-assoziierten-Fragmente (PAF) in jedem Well zu bestimmen, wurden zuerst die Beads (Abbildung 30, \*) im Kanal FL3 als Normierungsgröße bestimmt. Die Beads dienen während der Datenerhebung als Stop-Condition und nun bei der Auswertung als Vergleichswert, da in jeder Probe die gleiche Anzahl und damit gleiche Konzentration an Beads vorzufinden ist. Anschließend werden nun die FL3 negativen Zellen (alle Zellen mit niedrigerem FL3-Signal im Vergleich zu den Beads) weiter aufgeschlüsselt (Abbildung 30, A). Danach werden die Neutrophilen (Abbildung 30, \*\*) mit Hilfe des Ly6G-PE-Signals identifiziert. Hierfür wird für jeden Versuch neu die Schwelle in einer Probe mit einer reinen neutrophilen-Granulozyten-Probe bestimmt (Abbildung 30, B). Dieser Schwellenwert wird auf die restlichen Proben übertragen. Mit der Ly6G-PE negativen Population (Abbildung

30, C) wird weitergearbeitet. In der Probe, in der der CD61-FITC-AB durch eine entsprechende Isotyp-Kontrolle ersetzt wurde, wird nun die Grenze gesetzt, ab welcher die Zellen als CD61-FITC positiv (Abbildung 30, \*\*\*) angesehen werden (Abbildung 30, D). Diese wird mit weniger als 3% unspezifischer Bindung festgelegt. Nachdem die Grenze (Abbildung 30, \*\*\*\*) auf alle anderen Proben übertragen wurde (Abbildung 30, E), wurde abschließend eine Population (Abbildung 30, \*\*\*\*\*) nach Forward-scatter-/Sideward-scatter (FS, SS) Eigenschaften identifiziert, als PAF definiert und quantifiziert (Abbildung 30, F).

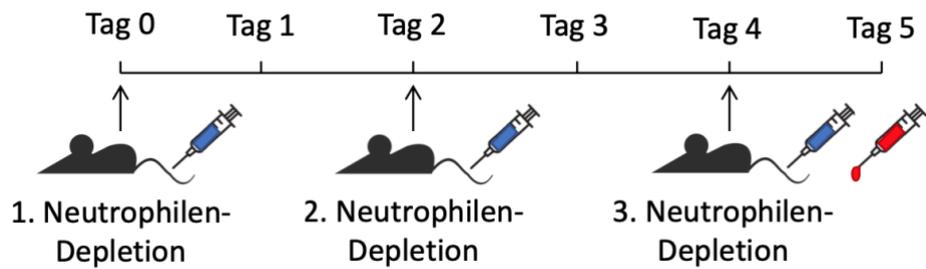


**Abbildung 30: Gatingstrategie in der Durchflusszytometrie**

(A) Identifikation der Beads (\*). (B) Identifikation der Neutrophilen (\*\*) mittels Ly6G-PE. (C) Übertragung auf die Ko-Kultur-Proben. (D) Festlegen der CD61-FITC-Grenze (\*\*\*) in der Isotyp-Kontrolle. (E) Übertragung der Grenze auf die Ko-Kultur-Proben (\*\*\*\*). (F) Festlegung der PAF-Population anhand von FS und SS (\*\*\*\*\*).

### **3.8 Neutrophilen-Depletions-Versuch in C57/BL6-Mäusen**

Für den Neutrophilen-Depletion-Versuch wurden 10-12 Wochen alte C57/BL6 Mäuse verwendet. Die Depletion erfolgte mit 50 µg purified Ly6G Antikörper (Klone: RB6-8C5) oder Isotyp-Kontroll-Antikörper (Klone: RTK2758), welche vorher mittels PBS verdünnt wurden. Die Injektion erfolgte in die Schwanzvene. Jede Maus erhielt nach dem unten aufgeführten Versuchsprotokoll drei Dosen des jeweiligen Antikörpers alle zwei Tage. Die Blutentnahme nach Ablauf des Versuchsprotokolls erfolgt durch intrakardiale Punktion an Tag 5 (Abbildung 31). Die Blutprobe wurde in einem ACD (engl. *acid citrate dextrose* = Zitronensäure-Dextrose) Puffer-Röhrchen (Verhältnis ACD zu Blut = 1/7) gesammelt und mittels Blutanalysegerät (IDEXX ProCyte DX) untersucht.

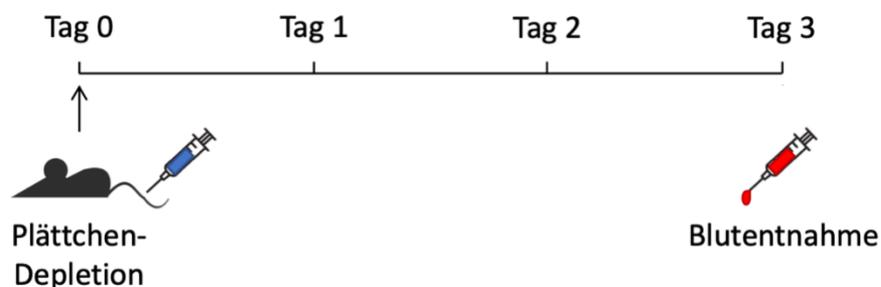


**Abbildung 31: Versuchsprotokoll Neutrophilen-Depletion**

Jede Maus erhielt drei Dosen des Depletions- oder Kontrollantikörper. Im Anschluss erfolgte die Blutentnahme an Tag 5.

### **3.9 Thrombozyten-Depletions-Versuch in ITGB2-KO-Mäusen**

Für den Thrombozyten-Depletions-Versuch wurden 10-12 Wochen alte ITGB2<sup>+/+</sup> oder ITGB2<sup>-/-</sup> Mäuse verwendet. Die Depletion erfolgte mit 2 µl/g Körpergewicht anti-CD42b-Antikörper (Klone: R300) oder Isotyp-Kontroll-Antikörper (Klone: R301), welche vorher mittels PBS verdünnt wurden. Die Injektion erfolgte in die Schwanzvene. Jede Maus erhielt nach dem unten aufgeführten Versuchsprotokoll eine Dosis des Antikörpers. Die Blutentnahme nach Ablauf des Versuchsprotokolls erfolgt durch intrakardiale Punktion an Tag 3 (Abbildung 32). Die Blutprobe wurde in einem ACD-Puffer-Röhrchen (Verhältnis ACD zu Blut = 1/7) gesammelt und mittels Blutanalysegerät (IDEXX ProCyte DX) untersucht.



**Abbildung 32: Versuchsprotokoll Thrombozyten-Depletion**

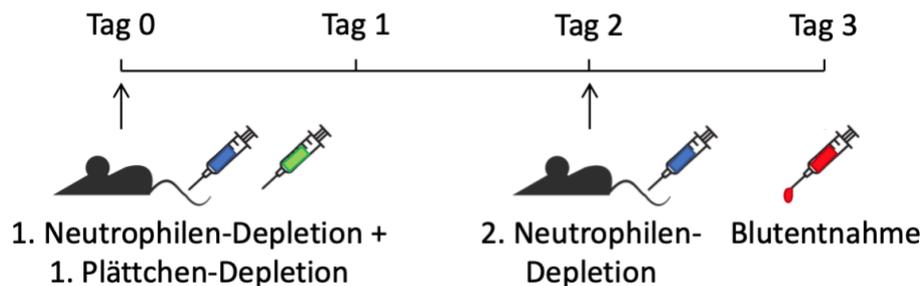
Jede Maus erhielt eine Dosis des Depletionsantikörper. Im Anschluss erfolgte die Blutentnahme an Tag 3.

### **3.10 Doppel-Depletions-Versuch in C57/BL6-Mäusen**

Für den Doppel-Depletions-Versuch wurden 10-12 Wochen alte C57/BL6 Mäuse verwendet. Es erfolgte in beiden Gruppen eine Thrombozyten-Depletion mittels 2 µl/g Körpergewicht anti-CD42b-Antikörper (Klone: R300) oder Isotyp-Kontroll-Antikörper (Klone: R301), welche vorher mittels PBS verdünnt wurden. Die Doppel-Depletions(DD)-Gruppe erhielt zusätzlich eine Neutrophilen-Depletion (Klone: RB6-8C5), die Kontrollgruppe den entsprechenden Isotyp-Kontroll-Antikörper (Klone: RTK2758). Die Neutrophilen-Depletion und Thrombozyten-

---

Depletion erfolgte entsprechend den Protokollen in Abschnitt 3.8 und 3.9. Jede Maus erhielt nach dem unten aufgeführten Versuchsprotokoll eine Dosis mit dem Thrombozyten-Depletionsantikörper und je zwei Dosen des Neutrophilen-Depletionsantikörper beziehungsweise des entsprechenden Isotyp-Kontroll-Antikörpers. Die Blutentnahme nach Ablauf des Versuchsprotokolls erfolgte durch intrakardiale Punktion an Tag 3 (Abbildung 33). Die Blutprobe wurde in einem ACD-Puffer-Röhrchen (Verhältnis ACD zu Blut = 1/7) gesammelt und mittels Blutanalysegerät (IDEXX ProCyte DX) untersucht.



**Abbildung 33: Versuchsprotokoll Doppel-Depletion**

Jede Maus erhielt eine Dosis des Thrombozyten-Depletionsantikörper. Die Gruppen wurden durch die unterschiedliche Injektion mit Neutrophilen-Depletionsantikörper oder entsprechendem Isotyp-Kontroll-Antikörper in Doppel-Depletions-Gruppe und Kontrollgruppe definiert. Die Neutrophilen-Depletion erfolgte in zwei Dosen an jedem zweiten Tag. Im Anschluss erfolgte die Blutentnahme an Tag 3.

### **3.11 Messung der retikulären Thrombozyten**

Zur Messung der retikulären Thrombozyten erfolgte die intrakardiale Blutentnahme in ein ACD-Puffer-Röhrchen. 20 µl Blut wurden dann mit 1% PFA unter Raumtemperatur für zehn Minuten fixiert. Im Anschluss erfolgte ein Waschschriff mit PBS. Die Thrombozyten wurden dann in 100 µl PBS mit 1 µg/ml Thiazol-orange (TO) und 1 µl CD42d-APC-Antikörper gefärbt. Die retikulären Thrombozyten wurden nach doppelt positivem CD42d-APC- und dem Thiazol-orange-Signal im Durchflusszytometer (Beckman Coulter Gallios) ausgewählt. Für die Auswertung wurde der geometrische (geo.) Mittelwert der Expressionskurve herangezogen.

### **3.12 Whole-mount-Staining von murinen Röhrenknochen**

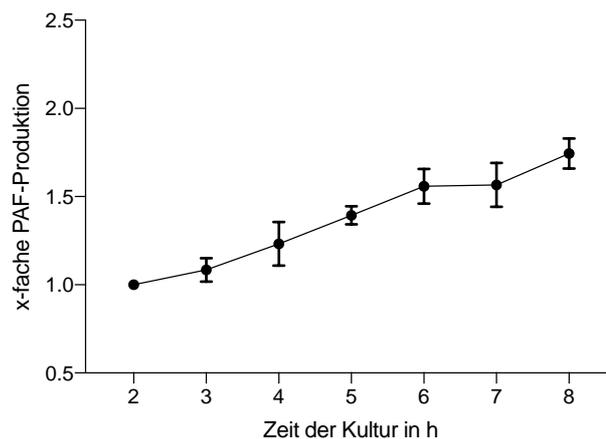
Es wurden gefrorene Röhrenknochen von 10-12 Wochen alten C57/BL6-Mäusen isoliert und horizontal geschnitten. Im Anschluss wurden die Knochen mit 10% Ziegen Serum und 0,1% Triton X-100 für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Hiernach wurden die Proben mit PBS und den Histologie-Reagenzien (siehe Tabelle 3: Histologie-Reagenzien) über Nacht inkubiert, gewaschen und mittels Zweiphotonen-Mikroskopie aufgenommen.

---

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Megakaryozyten Mono-Kultur

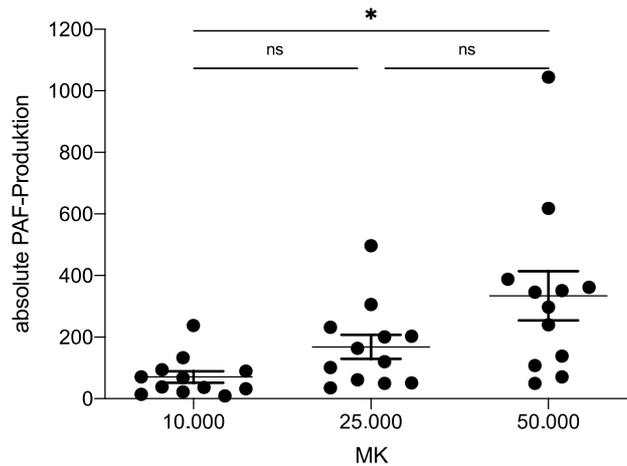
Um die komplexen *in vivo* Zusammenhänge zu vereinfachen und genauer untersuchen zu können, wurde ein *in vitro* Modell zur Quantifizierung der Thrombopoese unter Einfluss verschiedener Stimulanzen, Inhibitoren und Antikörperzugabe etabliert. Auch die Interaktion mit anderen Zellarten sollte zu einem späteren Zeitpunkt Gegenstand der Untersuchungen sein. Zuerst wurde ein Versuchsaufbau mit verschiedener Anzahl an Megakaryozyten *in vitro* implementiert. Untersucht wurden hierfür zuerst der zeitliche Verlauf der *in vitro* Thrombopoese anhand der Anzahl der Plättchen assoziierten Fragmente (PAF) zu verschiedenen Zeitpunkten. Mit fortschreitender Kulturdauer konnte eine Zunahme der PAF im Überstand sowie ein Plateau nach 6 Stunden festgestellt werden (Abbildung 34). Für alle weiteren Experimenten wurde zukünftig auf Grund des Plateaus und aus organisatorischen Gründen eine Kulturdauer von 6 Stunden bis zur Zellernte festgelegt.



**Abbildung 34: Quantifizierung der PAF im zeitlichen Verlauf**

Auf den 2 h Wert normierte Zunahme der gemessenen PAF; 50.000 Megakaryozyten; N = 4; Mittelwert  $\pm$  SEM; Daten zeigen 4 unabhängige Experimente.

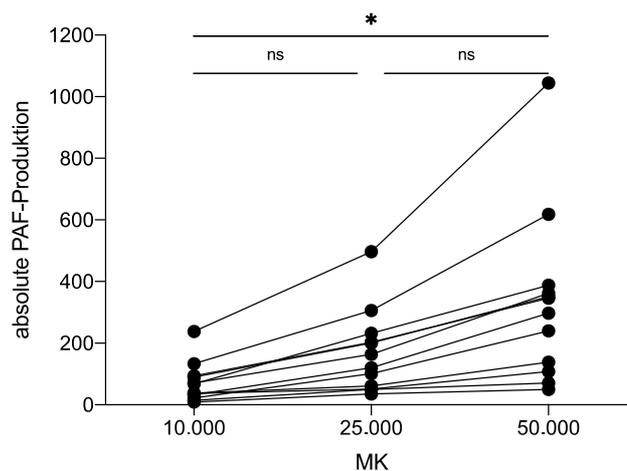
Im nächsten Schritt der Etablierungsarbeiten wurde die Thrombopoese in Abhängigkeit der zuvor ausgesäten Megakaryozytenanzahl untersucht. Hierzu wurden die PAF nach 6 Stunden geerntet. Erwartungsgemäß produzierten mehr ausgesäte Megakaryozyten mehr PAF *in vitro*. Dabei bestand eine direkte Proportionalität zwischen der Anzahl der ausgesäten Megakaryozyten und der gemessenen PAF-Anzahl. Die PAF-Mittelwerte der Gruppen mit 25.000 und 50.000 Megakaryozyten betragen entsprechend dem 2,5- beziehungsweise 5-fachen Wert der Gruppe mit 10.000 Megakaryozyten (Abbildung 35).



**Abbildung 35: Quantifizierung der PAF in Abhängigkeit der zuvor ausgesäten Megakaryozyten**

Mittelwerte der einzelnen Experimente der jeweiligen Gruppe; 10.000, 25.000 und 50.000 MK; N = 12; Mittelwert ± SEM; \* = P<0,05; ns = nicht signifikant; Daten umfassen 12 unabhängige Experimente mit One-way ANOVA (Varianzanalyse) Testung und Tukey's multiple comparison test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.

Weiterhin konnte bei genauer Analyse der einzelnen Datensets festgestellt werden, dass die absolute Anzahl der gemessenen PAF stark zwischen den einzelnen Experimenten variierte. Dies ist am ehesten auf die unterschiedliche Qualität der Megakaryozytenisolation zurückzuführen. Für alle zukünftigen Experimente wurden deshalb relative Werte mit Bezug auf eine Vergleichsgruppe am jeweiligen Versuchstag herangezogen. In der nachfolgenden Abbildung 36 werden die gleichen Daten wie in Abbildung 35 jeweils mit Verbindungslinie der einzelnen Datenpunkte pro Experimente gezeigt (Abbildung 36).



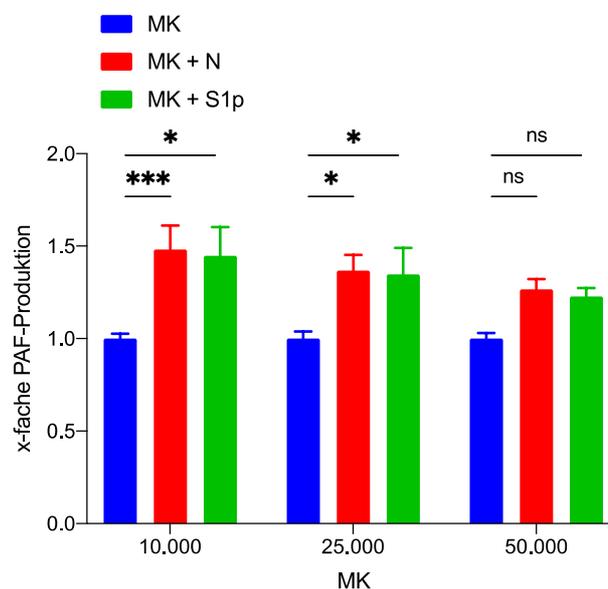
**Abbildung 36: Quantifizierung der PAF in Abhängigkeit der zuvor ausgesäten Megakaryozyten mit Verbindungslinie der einzelnen Versuche**

Gleiches Datenset wie Abbildung 35; Die einzelnen Experimente sind mit einer Linie verbunden; 10.000, 25.000 und 50.000 MK; N = 12; Mittelwert ± SEM; \* = P<0,05; ns = nicht signifikant; Daten umfassen 12 unabhängige Experimente mit One-way ANOVA (Varianzanalyse) Testung und Tukey's multiple comparison test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.

Man erkennt deutlich, dass sich die Linien kaum schneiden und somit die Abhängigkeit bezüglich der Anzahl der ausgesäten Megakaryozyten in jedem Experiment erhalten bleibt. Gleichzeitig unterscheiden sich die absoluten PAF-Werten von vergleichbaren Experimenten.

#### **4.2 Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

Im nächsten Schritt erfolgten Experimente zur Neutrophilen-Megakaryozyten-Wechselwirkung. Um die komplexen *in vivo* Interaktion zu untersuchen, wurde eine *in vitro* Kultur von Megakaryozyten in Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten durchgeführt. S1p ist als Stimulus der Thrombopoese *in vitro* und *in vivo* bekannt und fungiert als Positivkontrolle (L. Zhang et al., 2012). Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der MK+N- und MK+S1p-Gruppen gegenüber der reinen MK-Gruppe für 10.000 und 25.000 Megakaryozyten. Darüber hinaus kommt eine Dosis-Wirkung-Beziehung in dem Verhältnis aus Megakaryozyten und neutrophilen Granulozyten zur Darstellung. Mehr neutrophile Granulozyten im Verhältnis zu Megakaryozyten führten zu einer gesteigerten Thrombopoese *in vitro*. Die Steigerung betrug in den untersuchten Verhältnissen maximal 50%. In der Gruppe mit 50.000 Megakaryozyten ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse bei erhaltenem Trend der gesteigerten Thrombopoese in Anwesenheit von Neutrophilen und S1p (Abbildung 37).

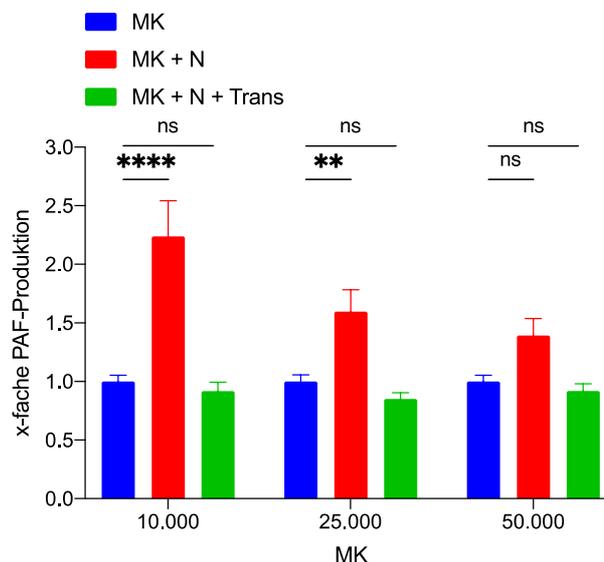


**Abbildung 37: Relative Quantifizierung der PAF in der Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

Relative PAF Anzahl der Gruppen MK (blau), MK+N (rot) und MK+S1p (grün) nach Normierung auf die Vergleichsgruppe mit entsprechender Anzahl an MK (blau); N = 12; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \* = P<0,05; \*\*\* = P<0,0003; ns = nicht signifikant; Daten umfassen 12 unabhängige Experimente mit Two-way ANOVA (Varianzanalyse) Testung und Tukey's multiple comparison test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.

### 4.3 Neutrophilen-Megakaryozyten-Transwell Ko-Kultur

Nachdem eine Wechselwirkung von Megakaryozyten und neutrophilen Granulozyten im Rahmen einer effizienteren Thrombopoese nachgewiesen werden konnte, sollte die Art der Wechselwirkung beider Zellarten miteinander weiter charakterisiert und genauer beschrieben werden. Dabei beruhen Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen entweder auf direkter Interaktion mittels Rezeptoren oder auf parakrinem Weg mittels beispielsweise Chemokinen oder Zytokinen. Zur Überprüfung der Frage, ob eine direkte Interaktion für die gesteigerte Thrombopoese nötig ist, wurden Neutrophilen-Megakaryozyten-Transwell-Versuche im Sinne von Boyden Chamber Assays durchgeführt. Dabei wurde in der Megakaryozyten-Neutrophilen-Gruppe eine direkte Interaktion ermöglicht und in der Transwell-Gruppe (Trans) die beiden Zellarten räumlich voneinander getrennt. Nach Auswertung der Daten konnte keine gesteigerte Thrombopoese in der Transwell-Gruppe festgestellt werden. Die Transwell-Gruppe zeigte eine nicht signifikant veränderte Thrombopoese im Vergleich zu den Proben mit ausschließlich Megakaryozyten (Abbildung 38). Die erhobenen Daten lassen den Schluss zu, dass eine direkte physikalische Interaktion von Neutrophilen und Megakaryozyten Voraussetzung für eine effizientere Art der Thrombozytenproduktion ist. Ist die unmittelbare Nähe nicht gegeben, ist keine gesteigerte Thrombopoese durch Wechselwirkung mit neutrophilen Granulozyten nachweisbar.

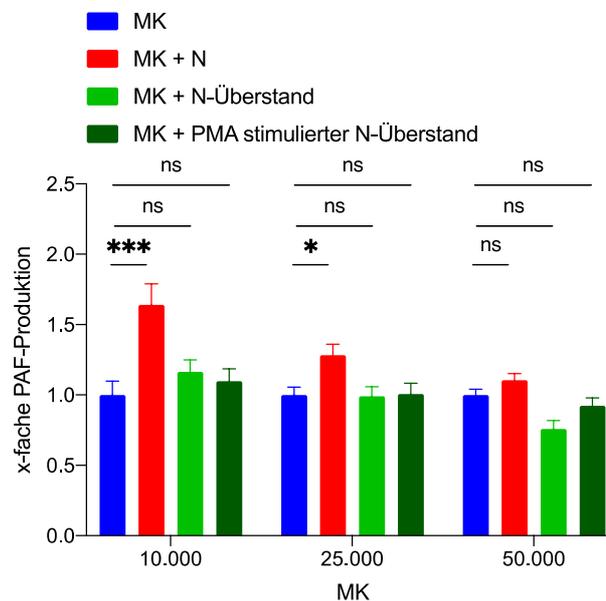


**Abbildung 38: Quantifizierung der PAF in der Neutrophilen-Megakaryozyten-Transwell Ko-Kultur**

Relative PAF Anzahl der Gruppen MK (blau), MK+N (rot) und MK+N+Trans (grün) nach Normierung auf die Vergleichsgruppe mit entsprechender Anzahl an MK (blau); N = 3; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*\* =  $P < 0,0015$ ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant; Daten umfassen 3 unabhängige Experimente mit Two-way ANOVA Testung und Tukey's multiple comparison test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.

#### 4.4 Neutrophilen-Überstand-Megakaryozyten Ko-Kultur

Um die Frage der möglichen Interaktion und Beeinflussung der Megakaryozyten durch von neutrophilen Granulozyten sezernierte Moleküle zu beantworten, wurden Megakaryozyten zusammen mit dem Überstand von stimulierten und unstimulierten neutrophilen Granulozyten kultiviert. Als Stimulus wurde PMA verwendet. PMA ist als Aktivator von neutrophilen Granulozyten bekannt (Brinkmann et al., 2004; Takei, Araki, Watanabe, Ichinose, & Sendo, 1996). Der isolierte Überstand von aktivierten und unstimulierten neutrophilen Granulozyten zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die *in vitro* Thrombopoiese in der Megakaryozytenkultur (Abbildung 39). Diese Ergebnisse stützen zusammen mit den Ergebnissen aus den Transwell-Versuchen die dringende Notwendigkeit einer engen Interaktion.



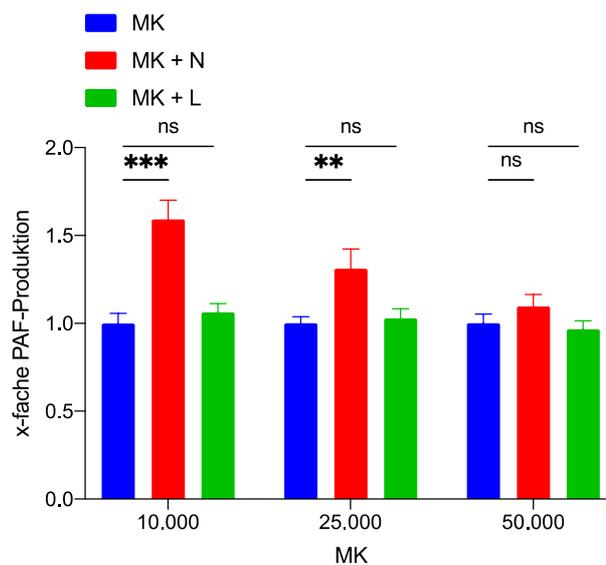
**Abbildung 39: Quantifizierung der PAF in der Neutrophilen-Überstand-Megakaryozyten Ko-Kultur**

Relative PAF Anzahl der Gruppen MK (blau), MK+N (rot), MK+N-Überstand (hellgrün) und MK+PMA-stimulierter N-Überstand (dunkelgrün) nach Normierung auf die Vergleichsgruppe mit entsprechender Anzahl an MK (blau); N = 3; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \* =  $P < 0,05$ ; \*\*\* =  $P < 0,0003$ ; ns = nicht signifikant, Daten umfassen 3 unabhängige Experimente mit Two-way ANOVA Testung und Tukey's multiple comparison test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.

#### 4.5 Lymphozyten-Megakaryozyten Ko-Kultur

Der Tatsache geschuldet, dass auch andere Leukozyten sowohl im Blut als auch im Knochenmark als mögliche Interaktionspartner für Megakaryozyten in Frage kommen, wurde der Einfluss anderer Immunzellen auf die Thrombopoiese untersucht. So wurde die *in vitro* Thrombopoiese in Anwesenheit von Lymphozyten gemessen. Es wurde die gleiche Anzahl (250.000) an Interaktionspartner wie in der Neutrophilen-Megakaryozyten-Ko-Kultur

verwendet, um die Effektivität verschiedener Zellen auf die Thrombozytenproduktion vergleichen zu können. Dabei ist allerdings der Tatsache Rechnung zu tragen, dass Lymphozyten sehr viel seltener als neutrophile Granulozyten im Knochenmark vorkommen und deshalb der Einfluss durch das Modell überschätzt werden könnte. Nach Auswertung der Versuche konnten über verschiedene Verhältnisse aus Lymphozyten und Megakaryozyten keine Steigerung der Thrombopoese gemessen werden. Es zeigte sich lediglich die Thrombozytenproduktion der reinen Megakaryozytenkultur (Abbildung 40). Die Ergebnisse lassen den Schluss eines Neutrophilen-spezifischen Interaktion mit Megakaryozyten zu.

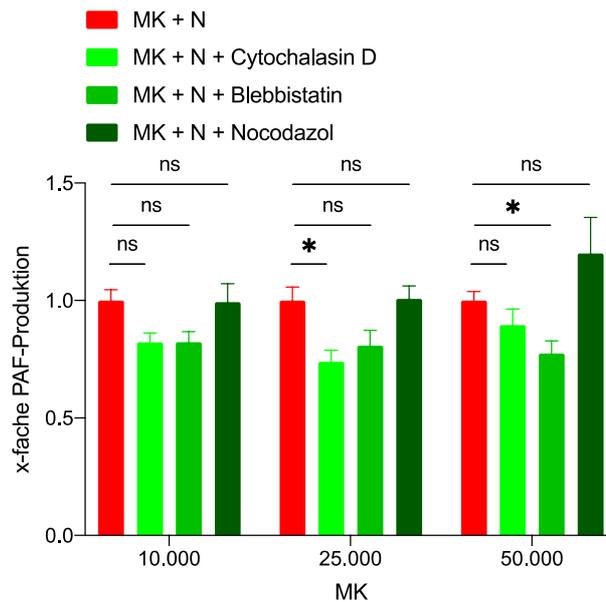


**Abbildung 40: Quantifizierung der PAF in der Lymphozyten-Megakaryozyten Ko-Kultur**

Relative PAF Anzahl der Gruppen MK (blau), MK+N (rot) und MK+L (grün) nach Normierung auf die Vergleichsgruppe mit entsprechender Anzahl an MK (blau); N = 4; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*\* =  $P < 0,0015$ ; \*\*\* =  $P < 0,0003$ ; ns = nicht signifikant; Daten umfassen 4 unabhängige Experimente mit Two-way ANOVA Testung und Tukey's multiple comparison test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.

#### **4.6 Zytoskeletthinhibitoren in der Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

Um die Rolle kontraktile Elemente im Prozess der Wechselwirkung von neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten in der Ko-Kultur zu untersuchen, wurden verschiedene Zytoskelett- und Motilitäts-Inhibitoren verwendet. Es kamen Cytochalasin D, Blebbistatin und Nocodazol zur Anwendung. Neutrophile wurden vor Verwendung in der Ko-Kultur mit den Wirkstoffen wie oben beschrieben vorinkubiert. Dabei zeigte sich, dass die Thrombopoese unter dem Einfluss von Cytochalasin D und Blebbistatin tendenziell leicht eingeschränkt war. Die Fähigkeit von Megakaryozyten zur Thrombozytenproduktion war in Anwesenheit von Nocodazol-vorinkubierten neutrophilen Granulozyten nicht verändert (Abbildung 41).

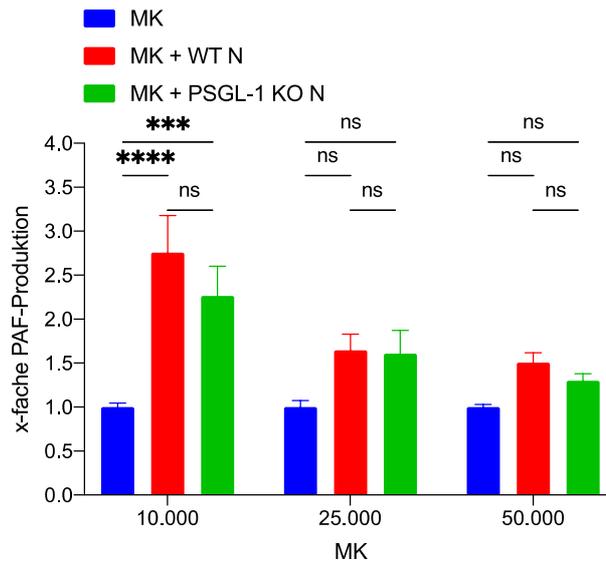


**Abbildung 41: Quantifizierung der PAF in der Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur in Anwesenheit verschiedener Zytoskeletthinhibitoren**

Relative PAF Anzahl der Gruppen MK+N (rot), MK+N+Cytochalasin D (hellgrün), MK+N+Blebbistatin (grün) und MK+N+Nocodazol (dunkelgrün) nach Normierung auf die Vergleichsgruppe mit entsprechender Anzahl an MK+N (rot); N = 3; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \* = P<0,05; ns = nicht signifikant; Daten umfassen 3 unabhängige Experimente mit Two-way ANOVA Testung und Tukey's multiple comparison test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.

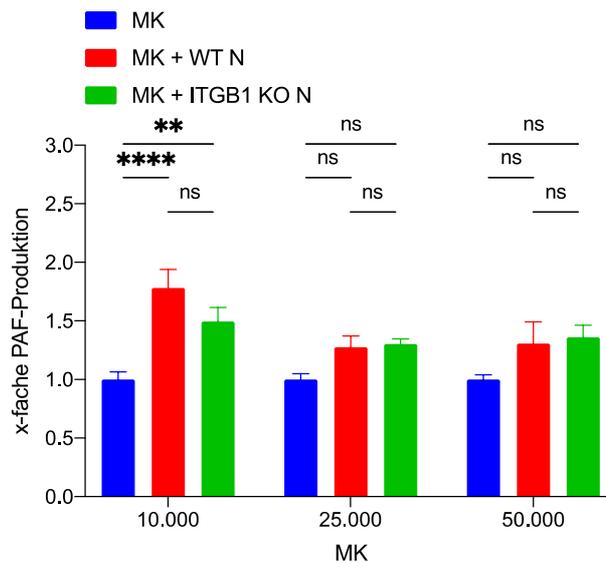
#### **4.7 Charakterisierung der Neutrophilen-Megakaryozyten Interaktion**

Um die Art der Interaktion und die beteiligten Interaktionsmoleküle zu identifizieren, wurden Experimente mit Knock-out-Zellen der gängigsten Wechselwirkungspartner durchgeführt (Lisman, 2018). Hierfür wurden wie oben bereits erwähnt PSGL-1-KO-, Integrin- $\beta$ -1-KO-, Integrin- $\beta$ -2-KO- sowie Kindlin-3-KO-Neutrophile Granulozyten verwendet. Die zuvor verwendete Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten wurden zur besseren Vergleichbarkeit beibehalten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für PSGL-1-KO- (Abbildung 42), Integrin- $\beta$ -1-KO- (Abbildung 43), Integrin- $\beta$ -2-KO- (Abbildung 44) und Kindlin-3-KO-neutrophile Granulozyten (Abbildung 45) keine signifikante Änderung der PAF-Werte gemessen werden konnte. Die untersuchten Moleküle spielen somit keine Rolle in der Neutrophilen-vermittelten Thrombopoiese.



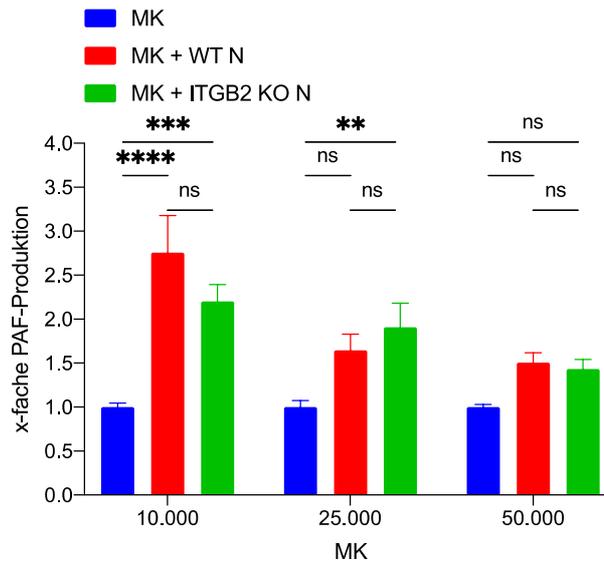
**Abbildung 42: Quantifizierung der PAF in der PSGL-1-KO-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

PAF Anzahl der Gruppen MK (blau), MK+N (rot), MK+PSGL-1 KO N (grün) nach Normierung auf die Vergleichsgruppe mit entsprechender Anzahl an MK (blau); N = 4; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*\*\* =  $P < 0,0003$ ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant; Daten umfassen 4 unabhängige Experimente mit Two-way ANOVA Testung und Tukey's multiple comparison test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.



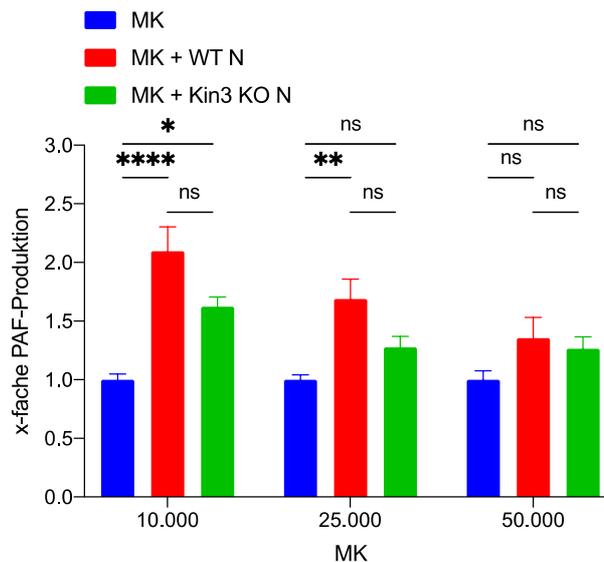
**Abbildung 43: Quantifizierung der PAF in der Integrin- $\beta$ -1-KO-Neutrophilen-Megakaryozyten-Ko-Kultur**

PAF Anzahl der Gruppen MK (blau), MK+N (rot), MK+ITGB-1 KO N (grün) nach Normierung auf die Vergleichsgruppe mit entsprechender Anzahl an MK (blau); N = 5; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*\* =  $P < 0,015$ ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant; Daten zeigen 5 unabhängige Experimente mit Two-way ANOVA Testung und Tukey's multiple comparison test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.



**Abbildung 44: Quantifizierung der PAF in der Integrin- $\beta$ -2-KO-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

PAF Anzahl der Gruppen MK (blau), MK+N (rot), MK+ITGB-2 KO N (grün) nach Normierung auf die Vergleichsgruppe mit entsprechender Anzahl an MK (blau); N = 4; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*\* =  $P < 0,015$ ; \*\*\* =  $P < 0,0003$ ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant; Daten umfassen 4 unabhängige Experimente mit Two-way ANOVA Testung und Tukey's multiple comparison test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.

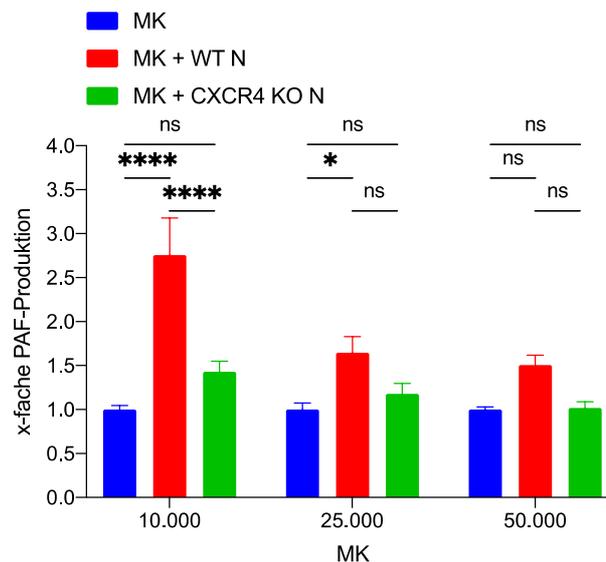


**Abbildung 45: Quantifizierung der PAF in der Kindlin-3-KO-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

PAF Anzahl der Gruppen MK (blau), MK+N (rot) und MK+Kin3 KO N (grün) nach Normierung auf die Vergleichsgruppe mit entsprechender Anzahl an MK (blau); N = 4; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,015$ ; \*\*\*\* =  $P < 0,001$ ; ns = nicht signifikant; Daten umfassen 4 unabhängige Experimente mit Two-way ANOVA Testung und Tukey's multiple comparison test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.

In der Literatur ist der Einfluss der CXCL12/CXCR4-Achse auf neutrophile Granulozyten und Megakaryozyten hinreichend bekannt. Neben grundlegenden Funktionen wie die Rückkehr von Neutrophilen ins murine Knochenmark und die Beteiligung an der Auswanderung von

Stammzellen in Thrombosen wirkt CXCL12 via CXCR4 als Chemokin mit starker Anziehungskraft auf neutrophile Granulozyten wie Megakaryozyten (Casanova-Acebes et al., 2013; Lane et al., 2000; Massberg et al., 2006; Niswander, Fegan, Kingsley, McGrath, & Palis, 2014). Bezüglich der Interaktion der genannten Zellarten ist keine Wechselwirkung via CXCL12/CXCR4 vorbeschrieben. Um den Einfluss der CXCL12/CXCR4-Achse in dem Ko-Kultur-Modell zu bestimmen, wurden Versuche mit CXCR4-KO-Neutrophilen durchgeführt. Nach der Auswertung konnte in der CXCR4-KO-Neutrophilen-Megakaryozyten-Gruppe für 10.000 Megakaryozyten keine signifikant gesteigerte Thrombopoiese mittels Durchflusszytometrie gemessen werden. Die Anzahl der PAF im Überstand bewegte sich auf dem Niveau der reinen Megakaryozyten Mono-Kultur. Der Trend einer ausgelöschten Interaktion ließ sich in den Gruppen mit 25.000 und 50.000 Megakaryozyten reproduzieren, war allerdings nicht signifikant (Abbildung 46).

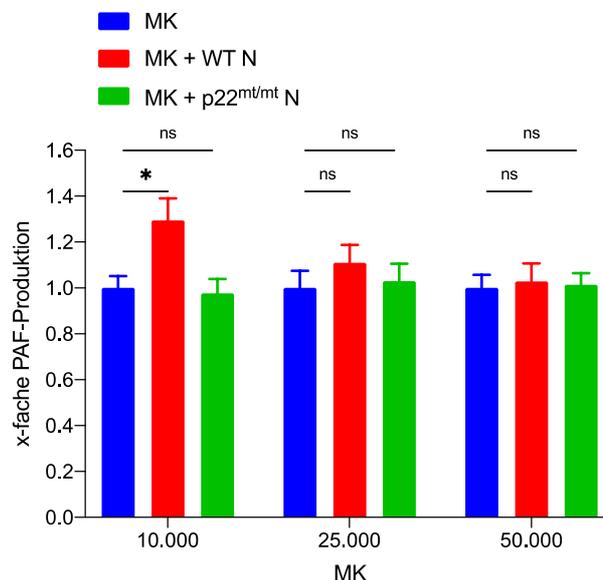


**Abbildung 46: Quantifizierung der PAF in der CXCR4-KO-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

PAF Anzahl der Gruppen MK (blau), MK+N (rot) und MK+CXCR4 KO N (grün) nach Normierung auf die Vergleichsgruppe mit entsprechender Anzahl an MK (blau); N = 3; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \* =  $P < 0,05$ ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant; Daten umfassen 3 unabhängige Experimente mit Two-way ANOVA Testung und Tukey's multiple comparison test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.

Reife Neutrophile weisen nicht nur eine höhere Expression von CXCR4 auf, sondern durchlaufen weitere Veränderungen des Phänotyps im Vergleich zu unreifen Neutrophilen. Weiterhin stellen neutrophile Granulozyten eine bedeutende Quelle für ROS dar und die Publikation von Adrover et al. konnte kürzlich zeigen, dass reife Neutrophile die Fähigkeit besitzen, verstärkt ROS zu produzieren und so ein erhöhtes Level an ROS aufweisen (Adrover et al., 2019). Weitere veröffentlichte Arbeiten belegen die Rolle von ROS in den Prozessen der

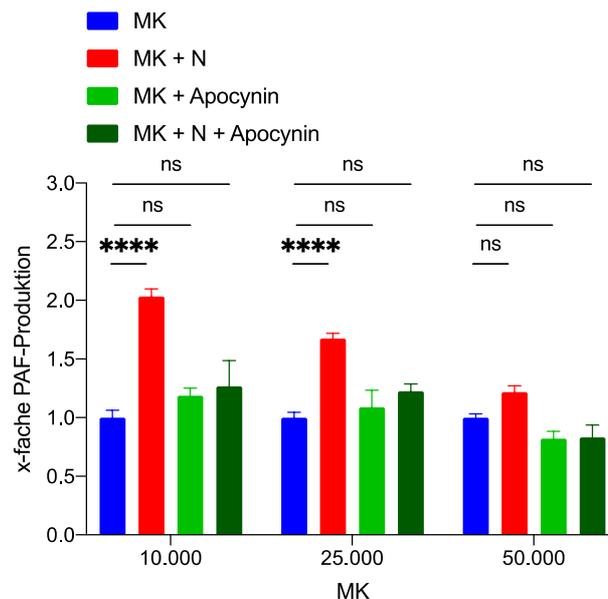
Differenzierung und der Reifung von Megakaryozyten sowie der Thrombozytenabscherung (S. Chen et al., 2013; Motohashi et al., 2010; Owusu-Ansah & Banerjee, 2009; Sardina et al., 2010; Wu et al., 2016). Zusammengefasst hat ROS einen großen Einfluss auf die Megakaryopoese und Thrombopoese. In weiteren Versuchen sollte der Einfluss von ROS im Ko-Kultur-Modell untersucht werden. Die zentrale Frage lautete, inwieweit von Neutrophilen produzierte ROS für die effizientere Thrombopoese im Rahmen der untersuchten Wechselwirkung verantwortlich ist. Um weitere Einblicke in den Mechanismus zu erhalten, wurden  $p22^{mt/mt}$  neutrophile Granulozyten in der Ko-Kultur verwendet. Die Neutrophilen dieser Mauslinie weisen einen intrinsischen Defekt in der NADPH-Oxidase-Untereinheit p22 auf. Die NADPH-Oxidase ist der größte Produzent von ROS und p22 essentiell für die Funktion von NOX1, NOX2, NOX3 und NOX4 (Bedard & Krause, 2007). Nach Auswertung der Daten konnten festgestellt werden, dass bei erhaltener möglicher Interaktion aber ohne die Fähigkeit des ROS-Produktion keine gesteigerte Thrombopoese messbar war. Der zuvor additive Effekt zeigte sich komplett erloschen. Die gesteigerte Thrombopoese war ausschließlich durch Wildtyp-Neutrophile auslösbar. Auch hier zeigten sich lediglich signifikante Ergebnisse für die Gruppe mit 10.000 Megakaryozyten. Dieselbe Tendenz zeigte sich allerdings auch in den anderen Gruppen (Abbildung 47).



**Abbildung 47: Quantifizierung der PAF in der  $p22^{mt/mt}$ -Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

PAF Anzahl der Gruppen MK (blau), MK+N (rot) und MK+ $p22^{mt/mt}$  N (grün) nach Normierung auf die Vergleichsgruppe mit entsprechender Anzahl an MK (blau); N = 3; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \* =  $P < 0,05$ ; ns = nicht signifikant; Daten umfassen 3 unabhängige Experimente mit Two-way ANOVA Testung und Tukey's multiple comparison test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.

Um die Relevanz des von neutrophilen Granulozyten stammendem ROS im Rahmen der Thrombopoese erneut zu untersuchen, wurde der NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin verwendet, um die ROS-Produktion in Neutrophilen von extern zu unterbinden (Bedard & Krause, 2007). Apocynin zeigte auf Megakaryozyten für sich genommen keinen signifikanten Einfluss im Sinne einer veränderten Thrombopoese. Im Vergleich der Gruppen MK+N und MK+N+Apocynin war eine deutliche Abnahme der Thrombopoese festzustellen (Abbildung 48). Dies unterstreicht erneut den positiven Einfluss von ROS auf die *in vitro* Thrombopoese.



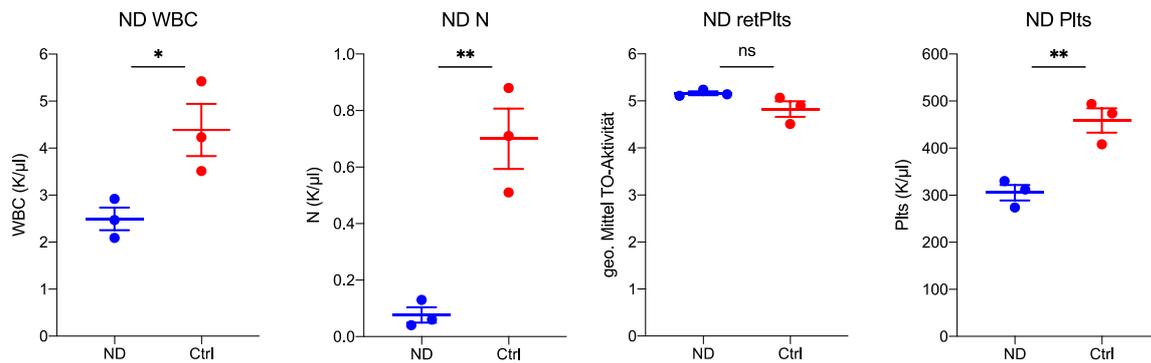
**Abbildung 48: Quantifizierung der PAF in der Apocynin-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur**

PAF Anzahl der Gruppen MK (blau), MK+N (rot), MK+Apocynin (grün) und MK+N+Apocynin (dunkelgrün) nach Normierung auf die Vergleichsgruppe mit entsprechender Anzahl an MK (blau); N = 3; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant; Daten umfassen 3 unabhängige Experimente mit Two-way ANOVA Testung und Tukey's multiple comparison test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.

#### **4.8 Neutrophilen-Depletion in C57/BL6-Mäusen**

Um die *in vivo* Relevanz der bereits *in vitro* analysierten Wechselwirkung von Neutrophilen und Megakaryozyten auf die Thrombozytenbildung zu untersuchen, wurde eine Neutrophilen-Depletion in C57/BL6-Mäusen durchgeführt. Ziel war es den Einfluss von neutrophilen Granulozyten auf die Megakaryopoese unter Standardbedingungen zu untersuchen. An Tag 5 des Versuchs wiesen die Tiere in der Gruppe mit Neutrophilen-Depletion erwartungsgemäß deutlich weniger Leukozyten und insbesondere neutrophile Granulozyten auf. Interessanterweise waren die unreifen Thrombozyten in beiden Gruppen auf ähnlichem Niveau. Es konnte allerdings nach fünf Tagen ein deutlicher Unterschied in der Anzahl der reifen Thrombozyten gemessen werden. Nicht-depletierte Tiere wiesen im

Unterschied zur Interventionsgruppe eine ungefähr 50% höher Anzahl an Thrombozyten im Blut auf (Abbildung 49).

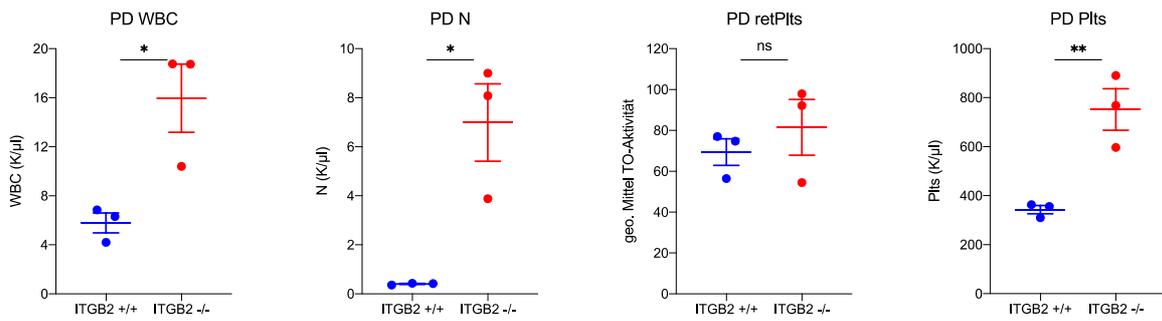


**Abbildung 49: Analyse der Blutwerte nach Neutrophilen-Depletion**

Gezeigt werden die Blutwerte am Tag 5 nach dreimaliger Depletion oder Isotyp-Kontroll-Antikörpergabe; n = 3; Mittelwerte ± SEM; \* = P < 0,05; \*\* = P < 0,015; ns = nicht signifikant; Daten umfassen ein Experiment mit unpaired T-Test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.

#### **4.9 Thrombozyten-Depletion in ITGB2-KO-Mäusen**

Im Abschnitt 4.8 wurde der Einfluss von fehlenden Neutrophilen auf die tägliche Produktion von Thrombozyten unter Standardbedingungen untersucht. In diesem Abschnitt soll nun das vermehrte Vorkommen von neutrophilen Granulozyten und deren Auswirkung auf die *in vivo* Thrombopoese beleuchtet werden. Nachdem ausgeschlossen werden konnte, dass ITGB2 direkt am Mechanismus der Neutrophilen-vermittelten Thrombopoese beteiligt ist, wurden ITGB2<sup>+/+</sup> und ITGB2<sup>-/-</sup>-Mäuse verwendet. ITGB2<sup>-/-</sup>-Tiere weisen auf Grund des gestörten Übertritts von Neutrophilen aus dem Blut ins Knochenmark nach abgeschlossener Reifung eine deutlich erhöhte Anzahl an intravaskulären Leukozyten auf. Beide Gruppen erhielten eine Thrombozyten-Depletion. Im Anschluss wurde die Nachbildung von Thrombozyten beider Gruppen untersucht. Nach Auswertung konnte erwartungsgemäß eine deutlich erhöhte Anzahl an Leukozyten und neutrophilen Granulozyten im Blut von ITGB2<sup>-/-</sup>-Mäusen gemessen werden. Die retikuläre Thrombozytenanzahl war in beiden Gruppen jeweils auf ähnlichem Niveau. Im Unterschied zu den ITGB2<sup>+/+</sup>-Tieren konnten die ITGB2<sup>-/-</sup>-Tiere deutlich schneller die Anzahl der Thrombozyten erhöhen. Am Tag 3 konnten in ITGB2<sup>-/-</sup>-Tieren mehr als 100% mehr Thrombozyten gemessen werden (Abbildung 50).

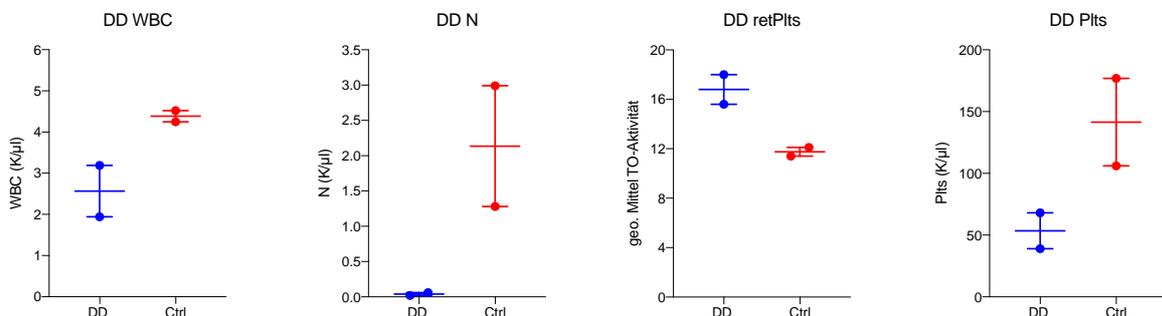


**Abbildung 50: Analyse der Blutwerte nach Thrombozyten-Depletion**

Gezeigt werden die Blutwerte am Tag 3 nach einmaliger Thrombozyten-Depletion in ITGB2<sup>+/+</sup> oder ITGB2<sup>-/-</sup>-Mäusen, n = 3; Mittelwerte ± SEM; \* = P<0,05; \*\* = P<0,015; ns = nicht signifikant; Daten umfassen ein Experiment mit unpaired T-Test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz.

#### **4.10 Doppel-Depletion in C57/BL6-Mäusen**

Um den Einfluss von Neutrophilen auf die *in vivo* Thrombopoiese von C57/BL6-Mäusen bei stark erhöhtem Bedarf an Thrombozyten zu untersuchen, wurde ein Doppel-Depletions-Experiment durchgeführt. Dabei sollte der Einfluss von Neutrophilen auf eine massiv gesteigerte Thrombopoiese untersucht werden. Hierfür mussten beide Gruppen nach Thrombozyten-Depletion die erworbene Thrombopenie überwinden und die Anzahl an Thrombozyten in An- und Abwesenheit (ausgelöst durch Depletion) von neutrophilen Granulozyten wiederherstellen. Nach Auswertung an Tag 3 wiesen Tiere der Doppel-Depletions-Gruppe nach Neutrophilen-Depletion erwartungsgemäß eine niedrigere Anzahl an Leukozyten und vor allem Neutrophilen auf. Die retikuläre Thrombozytenanzahl war in der Doppel-Depletions-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe. In Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten konnte die Doppel-Depletions-Gruppe unter starkem Bedarf deutlich weniger Thrombozyten im Zeitraum von 3 Tagen produzieren als die Vergleichsgruppe (Abbildung 51).



**Abbildung 51: Analyse der Blutwerte nach Doppel-Depletion**

Gezeigt werden die Blutwerte am Tag 3 nach einmaliger Thrombozyten-Depletion in WT-Tieren sowie zweimaliger Dosis einer Neutrophilen-Depletion; n = 2; Mittelwerte ± SEM; Daten umfassen ein Experiment; Auf eine statistische Auswertung wurde bei einer Anzahl von n = 2 verzichtet.

---

## **5. Diskussion**

### **5.1 Steigerung der *in vitro* Thrombopoese durch neutrophile Granulozyten**

In den letzten Jahrzehnten wurden mehrere Mechanismen identifiziert, die die Thrombopoese unter Steady-State- oder Entzündungsbedingungen regulieren. S1p und IL-1 $\alpha$  sind hierbei nur einige beispielhafte Faktoren (Nishimura et al., 2015; L. Zhang et al., 2012). Dabei wurde die Rolle der zellulären Mikroumgebung für die Bildung und Freisetzung von Thrombozyten bisher noch wenig untersucht. In meiner Arbeit wird ein neues Zellkulturmodell etabliert und der Einfluss der *in vitro* Interaktion via CXCR4/CXCL12 und ROS im Rahmen der Thrombopoese aufgeschlüsselt. Ich konnte zeigen, dass eine spezifische Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten die Thrombopoese via CXCR4/CXCL12-Chemokin-Achse und ROS steigert.

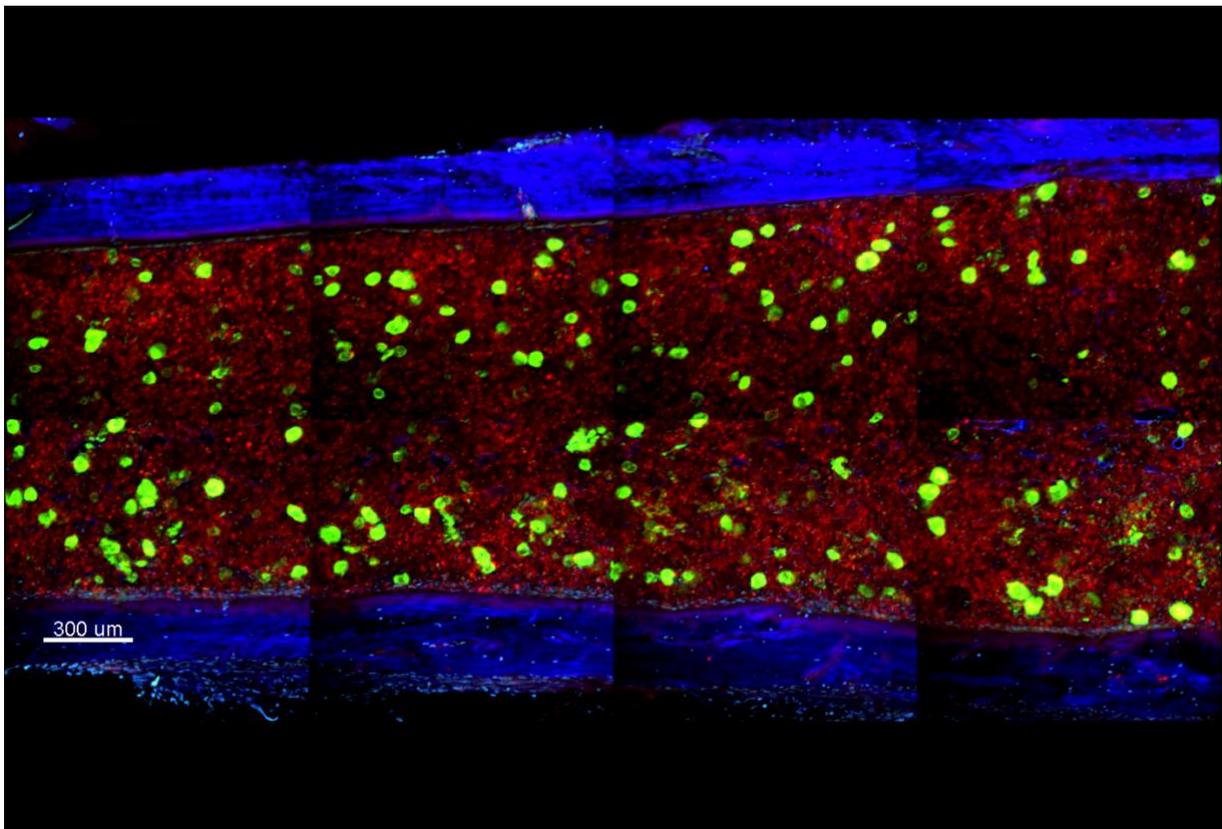
In dieser Arbeit wurde mittels Durchflusszytometrie die *in vitro* Thrombopoese von Megakaryozyten quantitativ gemessen. Diese sehr genaue Untersuchungsmethode erlaubt bereits geringe Unterschiede in Form von einzelnen Proplättchen zu detektieren. Die Vorgehensweise inklusive Zellisolation und Zellkultur orientierte sich hierbei an bereits veröffentlichten Versuchsaufbauten (Thon & Italiano, 2012).

In den grundlegenden Versuchen zeigte sich, dass die Anzahl der gemessenen PAFs mit zunehmender Kulturdauer und bei gesteigerter Aussaat von Megakaryozyten anstieg. Nachdem ein geeigneter Versuchsablauf mit unterschiedlicher Anzahl von Megakaryozyten sowie die Kulturdauer von 6 Stunden festgelegt war, wurden verschiedenen Zellkulturen mit unterschiedlichen Manipulationsmöglichkeiten und Erweiterungen untersucht.

Die bekannten Interaktionen von Immunzellen und Thrombozyten sowie die unmittelbare Nähe von neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten legten eine Interaktion beider Zelltypen in der Knochenmarksnische bereits im Vorfeld nahe. Um den Einfluss von neutrophilen Granulozyten auf die Thrombopoese zu untersuchen, wurden die Zellen zur Megakaryozyten-Aussaat *in vitro* hinzugefügt. S1p wurde als Positivkontrolle verwendet, welches dafür bekannt ist die *in vivo* Thrombopoese zu steigern, (L. Zhang et al., 2012). Neutrophile Granulozyten zeigten einen ähnlich starken Einfluss auf die Thrombopoese wie S1p. Die Ergebnisse beweisen den stimulierenden Einfluss von neutrophilen Granulozyten auf

---

die *in vitro* Thrombopoese. Aus den verschiedenen Verhältnissen von Neutrophilen und Megakaryozyten war weiterhin eine Dosis-Wirkung-Beziehung ersichtlich. Bei einem Verhältnis von Megakaryozyten zu neutrophilen Granulozyten von 1/25 war der Einfluss von Neutrophilen auf die Thrombopoese am größten. Neben der bekannten Hilfe bei der Extravasation und den NETs ist die Thrombose als Effektor der angeborenen Immunantwort bereits bekannt (Brinkmann et al., 2004; Engelmann & Massberg, 2013; Zuchtriegel et al., 2016). Da Thrombozyten als kleine Zellpartikel den größeren Progenitorzellen entspringen und somit die gleichen oder zumindest eine ähnlichen Zelloberfläche aufweisen, wurde die Hypothese einer Interaktion auf Vorläuferzellebene im Knochenmark aufgestellt. Die untersuchte Interaktion im Rahmen der Thrombopoese stellt neben den bereits aufgeführten Wechselwirkungen eine neue Querverbindung aus angeborener Immunität und Blutbildung im murinen Knochenmark dar.



**Abbildung 52: Whole mount Staining eines murinen Femurs**

Die Abbildung zeigt das Whole-mount-Staining eines murinen Femurs in horizontaler Achse. Die Megakaryozyten sind dabei mittels CD41a-FITC grün, die neutrophilen Granulozyten mittels Ly6G-PE rot und die extrazelluläre Matrix blau gefärbt. Die Abbildung zeigt das von Knochenmatrix umgebene Knochenmark mit einzelnen Megakaryozyten in unmittelbarer Nähe zu vielen Neutrophilen eines kompletten Femurs. Die Maßeinheit entspricht 300μm.

---

## **5.2 Steigerung der *in vitro* Thrombopoese durch enge Interaktion**

Um die Art der Interaktion weiter zu spezifizieren, wurde das Transwell-Ko-Kultur-Modell im Sinne einer Boyden Chamber verwendet. Neben dem parakrinen Weg besteht die Möglichkeit der direkten Interaktion (Lisman, 2018). In der Transwell-Gruppe konnte keine gesteigerte Thrombozytenproduktion gemessen werden. Die erhobenen Daten lassen den Schluss zu, dass eine enge Interaktion von Neutrophilen und Megakaryozyten für eine effizientere Art der Thrombozytenproduktion nötig ist. Ist die unmittelbare Nähe nicht gegeben, ist keine gesteigerte Thrombopoese durch Wechselwirkung mit neutrophilen Granulozyten möglich. Die Ergebnisse der Ko-Kultur bei Zugabe von Überstand aktivierter neutrophiler Granulozyten unterstützen diese These. Durch sezernierte Moleküle nach Aktivierung war keine Steigerung der Thrombopoese bei Megakaryozyten und in der Ko-Kultur möglich. Lediglich die physische Anwesenheit der neutrophilen Granulozyten selbst erhöhte die Thrombozytenproduktion. Es bleibt somit festzuhalten, dass eine enge räumliche Beziehung und Interaktion Grundlage der *in vitro* Wechselwirkung zwischen Megakaryozyten und neutrophilen Granulozyten ist. Es ist bekannt, dass sich sowohl Megakaryozyten im Rahmen der Thrombopoese als auch neutrophile Granulozyten bei der Extravasation und Wiedereintritt in Knochenmark in der sinusiodalen Knochenmarksnische aufhalten (Itkin et al., 2016; Stegner et al., 2017). Eine enge räumliche Beziehung ist somit auch *in vivo* jederzeit gegeben.

## **5.3 Steigerung der *in vitro* Thrombopoese ist Neutrophilen-spezifisch**

Um den Einfluss von neutrophilen Granulozyten auf die Thrombopoese im Vergleich zu anderen Leukozyten zu beurteilen, wurden Lymphozyten, welche die zweithäufigsten Leukozyten im Knochenmark darstellen, isoliert und in gleicher Weise wie neutrophilen Granulozyten für die Ko-Kultur verwendet. Lymphozyten zeigten keinen Einfluss auf die Anzahl der geernteten PAF. Somit konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten, nicht aber Lymphozyten, zur spezifischen Interaktion mit Megakaryozyten fähig sind. Als Ursache kann angesehen werden, dass Lymphozyten sich erheblich von neutrophilen Granulozyten hinsichtlich der Expression von Oberflächenmolekülen und im Inhalt der Granula unterscheiden. Im Rahmen der Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten mittels CXCR4/CXCL12 wurde in dieser Arbeit auch ROS als Interaktionsmolekül identifiziert. Auch die Regulation und Funktion von Lymphozyten wird maßgeblich von oder durch ROS bestimmt oder beeinflusst (Belikov, Schraven, & Simeoni,

---

2015; Nakvasina, Popova, Lidokhova, & Artyukhov, 2019; Villamor, Montserrat, & Colomer, 2004). Die Menge an ROS und die damit verbundene Möglichkeit Megakaryozyten zu beeinflussen ist in neutrophilen Granulozyten ist aber weit größer als in Lymphozyten.

#### **5.4 Einfluss von Zytoskeletthinhibitoren auf die *in vitro* Thrombopoese**

Mittels *in vitro* Messung der Thrombopoese oben genannter Ko-Kultur wurde weiterhin die Rolle der verschiedenen Zytoskelettbestandteile evaluiert. Nach Auswertung der Daten zeigte sich, dass die Inhibition durch Cytochalasin D und Blebbistatin zu einer tendenziell leichten Reduktion der *in vitro* Thrombopoese im Rahmen der Wechselwirkung führte. Nocodazol zeigte hingegen keinen hemmenden Effekt. Dies ist am ehesten in der Wirkweise der einzelnen Inhibitoren zu erklären. So führt Cytochalasin D zur spezifischen Hemmung der Aktin-Polymerisation (Brenner & Korn, 1980). Blebbistatin hingegen hemmt die Aktivität der Myosin-II-ATPase und somit die Zellmotilität (Kovacs et al., 2004). Die Daten legen nahe, dass eine Aktin- und Myosin-basierte Kontraktilität von Neutrophilen zumindest Teil einer effizienteren Thrombozytenbiogenese ist. Nocodazol hingegen beeinflusst die Polymerisation von Mikrotubuli (Samson et al., 1979). Ein Einfluss der Hemmung von Mikrotubuli konnte im Ko-Kultur-Modell nicht nachgewiesen werden.

#### **5.5 Steigerung der *in vitro* Thrombopoese durch CXCL12/CXCR4-Achse**

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sind verschiedenste Interaktionen zwischen neutrophilen Granulozyten und den von Megakaryozyten gebildeten Thrombozyten bekannt (Caudrillier et al., 2012; Etulain et al., 2015; von Bruhl et al., 2012; Zuchtriegel et al., 2016). Die bekannten Interaktionspartner auf molekularer Ebene wurden deshalb mittels verschiedener KO-Mauslinien untersucht. Eine komplette Auslöschung der Thrombopoese Steigerung konnte unter Verwendung von PSGL-1-, Kin3-, ITGB1- und ITGB2-KO-neutrophilen Granulozyten nicht festgestellt werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen KO- und WT-Leukozyten. Somit bleibt festzuhalten, dass die zuletzt genannten Moleküle nicht entscheidend an der Interaktion von Megakaryozyten und neutrophilen Granulozyten beteiligt sind.

Aus früheren Studien ist bekannt, dass CXCL12 im Mechanismus der Leukozyten-Rekrutierung zusammen mit dessen Rezeptor CXCR4 eine wichtige Rolle spielt (Strydom & Rankin, 2013).

---

Insbesondere bei gereiften neutrophilen Granulozyten mit hoher CXCR4 Expression spielt diese Chemokin-Achse beim Rückübertritt ins Knochenmark, dem sogenannten Homing, eine entscheidende Rolle (Casanova-Acebes et al., 2013). Dabei stellen die Sinusoide den Ort des erneuten Übertritts von reifen neutrophilen Granulozyten ins Knochenmark dar (Itkin et al., 2016). CXCR4-KO-Mäuse weisen auf Grund des gestörten Rückübertritts in das Knochenmark eine deutlich erhöhte Zahl von neutrophilen Granulozyten und interessanterweise eine geringere Anzahl an Thrombozyten im Blut auf (Daten werden nicht gezeigt). Die intravenöse Gabe von Pentacor, einem CXCL12-Inhibitor, resultiert dabei *in vivo* ebenfalls in einer reduzierten Thrombozytenzahl im Blut von Mäusen. Umgekehrt führt die intravenöse Gabe von CXCL12 zu einer Umverteilung der Megakaryozyten in die Gefäßnahe sinusiodale Nische mit konsekutiver Thrombozytensteigerung im Blut (Niswander, Fegan, et al., 2014).

Auch auf Megakaryozytenvorläuferzellen bis hin zum Thrombozyten wurde CXCR4 bereits nachgewiesen. Die Expression nimmt dabei mit fortschreitender Reifung zu (Wang 1998). Bezüglich des Einflusses von CXCL12 auf Megakaryozyten und deren Vorläuferzellen herrschen unterschiedliche Meinungen. Wahrscheinlich wirkt CXCL12 lediglich als chemotaktisch aktives Molekül und kann nicht zu erhöhter Anzahl von CFU-MKs (engl. *colony forming units* = Kolonieformende Einheit) führen (Hodohara et al., 2000; Majka et al., 2000). Megakaryozytenvorläuferzellen und CD34+ Stammzellen werden in jedem Fall durch das chemotaktisch aktive CXCL12 angezogen (Aiuti, Webb, Bleul, Springer, & Gutierrez-Ramos, 1997; Hamada et al., 1998; Wang et al., 1998). Weiterhin ist bekannt, dass auch die Migration von Megakaryozyten selbst durch CXCL12 maßgeblich beeinflusst wird und deren Wanderung von der össären in die vaskuläre Nische des Knochenmarks begünstigt. Hierfür wird vor allem die MMP-9-Sekretion (Matrix-Metalloproteinase-9) durch CXCL12 stimuliert (Lane et al., 2000; Majka et al., 2000). MMP-9 ist dabei entscheidend bei der Umgestaltung von extrazellulärem Material und der Durchwanderung des Knochenmarks. Blockierung von MMP-9 führt weiterhin *in vitro* und *in vivo* zu einer reduzierten Thrombozytenproduktion (Lane et al., 2000). Es scheint wahrscheinlich, dass CXCL12 als chemoaktives Molekül mit hoher Konzentration im Blut die Migration im Modell der Megakaryozytenbewegung von der össären in die sinusiodale Nische maßgeblich beeinflusst. Weiterhin ist erneut die neuere Publikation von Stegner und Kollegen zu nennen, welche keine relevante Megakaryozytenmobilität im Knochenmark beschreibt und das Konzept der Knochenmarksdurchwanderung hinterfragt

---

(Stegner et al., 2017). Weiterhin erfüllt CXCL12 auf Megakaryozyten und Thrombozyten wichtige Funktionen wie die Hilfe bei der Extravasation von hämatopoetischen Stammzellen in arteriellen Thromben *in vivo* (Massberg et al., 2006).

Bisher wurden Endothel- und Mesenchymzellen, später CAR-Zellen (CXCL12-abundant reticulare cells) für die hauptsächliche CXCL12-Produktion im Knochenmark angesehen (Dar et al., 2005; Jung et al., 2006; Sugiyama, Kohara, Noda, & Nagasawa, 2006). Aktuelle Studien geben mittels mRNA-Einzelzellsequenzierung (engl. *messenger ribonucleic acid* = Botenribonukleinsäure) neue Aufschlüsse über die räumliche, zelluläre und molekulare Organisation des Knochenmarks. Baccin und Kollegen konnten eine bisher unbekannt Subpopulation der Adipo-CAR- und Osteo-CAR-Zellen als vorrangige Zytokinproduzenten im Knochenmark ausmachen. Die Produktion von CXCL12 auf mRNA-Ebene konnte in Endothel und mesenchymalen Zellen ebenfalls, aber in deutlich geringerem Maße, nachgewiesen werden. Dabei war CXCL12 mRNA vor allem in der arteriolen und sinusiodalen Nische aufzufinden (Baccin et al., 2020). Es ist dabei bereits bekannt, dass lösliche Faktoren wie CXCL12 und SCF hämatopoetische Stammzellen entscheidend beeinflussen (Ding, Saunders, Enikolopov, & Morrison, 2012; Omatsu et al., 2010; Sugiyama et al., 2006; Sugiyama & Nagasawa, 2012). So erzeugen verschiedene Zellen spezifische Mikroumgebungen mit unterschiedlichen Zytokin- und Chemokinzusammensetzungen und nehmen somit an nahezu allen Vorgängen des Knochenmarks teil. Welchen Einfluss die neu entdeckten Subpopulationen der Adipo-CAR und Osteo-CAR-Zellen im sensiblen Zusammenspiel von Zellen, extrazelluläre Matrix und löslichen Molekülen einnehmen, bleibt abzuwarten.

Um den Einfluss der CXCL12/CXCR4-Achse im Ko-Kulturmodell zu untersuchen, wurden CXCR4-KO neutrophile Granulozyten verwendet. Interessanterweise konnte in Anwesenheit von CXCR4-KO neutrophilen Granulozyten keine gesteigerte Thrombopoiese *in vitro* gemessen werden. Im Vergleich zu den anderen KO-Modellen zeigte nur die Verwendung von CXCR4-KO neutrophilen Granulozyten eine komplette Aufhebung der gesteigerten Thrombopoiese. Diese Ergebnisse beweisen die direkte Beteiligung der CXCL12/CXCR4-Achse und unterstreichen die Schlüsselrolle von CXCL12 und CXCR4 im Zusammenspiel von neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten *in vitro*. Die Ergebnisse müssen dabei kritisch eingeordnet werden. In der untersuchten Ko-Kultur spielten andere Zellen der

---

Knochenmarksnische einschließlich aller CXCL12 produzierenden Zellen, keine Rolle. Es verbleibt lediglich das von Megakaryozyten produzierte CXCL12. Die Auswertung legt eine ausreichende Rekrutierung durch das von Megakaryozyten gebildete CXCL12 nahe.

Aktuell bestehen zumindest Hinweise, dass sowohl Megakaryozyten als auch neutrophile Granulozyten in die unmittelbare Gefäßmikroumgebung durch CXCL12-Sekretion der Adipo-CAR- und Osteo-CAR-Zellen gelockt werden. Als chemoaktives Protein und mit der bekannten zunehmenden CXCR4 Hochregulierung im Rahmen der Differenzierungsprozesse und Reifung von Megakaryozyten ist eine Beeinflussung der Thrombozytenvorläuferzellen wahrscheinlich. Adipo-CAR- und Osteo-CAR-Zellen könnten so durch CXCL12-Produktion in der spezifischen Mikroumgebung der sinusiodalen Nische neutrophile Granulozyten und Megakaryozyten am Ort der endgültigen Thrombozytenbildung zusammenbringen. Ob *in vivo* das von Adipo-CAR- und Osteo-CAR-Zellen sezernierte CXCL12 eine größere Rolle spielt, kann aktuell nicht beantwortet werden. Die Ergebnisse von Baccin und Kollegen legen bei der eindeutigen Ausprägung der mRNA-Verteilung für CXCL12 in Adipo-CAR- und Osteo-CAR-Zellen im Gegensatz zu Megakaryozyten die Beteiligung ersterer Zellen an der vorrangigen Bildung der Mikroumgebung zur Thrombopoese nahe. Da das chemoaktive Molekül CXCL12 sowohl auf Megakaryozyten als auch neutrophile Granulozyten wirkt, könnten Adipo-CAR- und Osteo-CAR-Zellen für das Aufeinandertreffen beider Zellarten in den sinusiodalen Nischen verantwortlich sein.

### **5.6 Steigerung der *in vitro* Thrombopoese durch ROS**

Megakaryozyten sind vor allem an Orten mit hoher Sauerstoff- und ROS-Konzentration anzutreffen (Junt et al., 2007). Darüber hinaus ist bekannt, dass sowohl eine hohe Sauerstoff- als auch eine hohe ROS-Konzentration zur Reifung von Megakaryozyten beiträgt (O'Brien et al., 2008). Dabei wird der Reifungsprozess über spezifisches Transkriptionselement wie GATA-1 und NF-E2 aktiviert (Mostafa, Papoutsakis, & Miller, 2001). ROS stimuliert ERK-abhängige Regulatoren wie zum Beispiel MAPK/ERK. Diese steigern die Thrombopoese während der letzten Phase der Megakaryozytenentwicklung (P. Zhang, Wang, Kagan, & Bonner, 2000). Darüber hinaus generieren CD34+ Stammzellen vermehrt CD41+ Megakaryozyten unter 20% pO<sub>2</sub> im Vergleich zur Kultur mit 5% pO<sub>2</sub> (Mostafa et al., 2000). Im Review von 2013 sehen

---

Chen und Kollegen ROS als einen zentralen Signalgeber im Rahmen von Megakaryopoese und Thrombopoese (S. Chen et al., 2013).

Da insbesondere reife neutrophile Granulozyten eine große Quelle von ROS darstellen, wurde der direkte Einfluss von ROS auf die *in vitro* Thrombopoese von Megakaryozyten mit Hilfe von p22<sup>mt/mt</sup> neutrophilen Granulozyten untersucht (Bedard & Krause, 2007; Casanova-Acebes et al., 2013). Die verwendeten Leukozyten sind durch eine Mutation in der p22-Untereinheit mit einer funktionsuntüchtigen NADPH-Oxidase 2 (NOX2) ausgestattet und in der Produktion von ROS deutlich eingeschränkt. In der Ko-Kultur erzeugten p22<sup>mt/mt</sup> Neutrophile keine gesteigerte Thrombopoese im Vergleich zur reinen Megakaryozytenkultur. Im Vergleich zu Wildtyp neutrophilen Granulozyten bleibt somit festzuhalten, dass ROS als Mediator die Interaktion von neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten zur Steigerung der *in vitro* Thrombopoese vermittelt. *In vitro* spielen Störeinflüsse wie anderweitige ROS keine Rolle. *In vivo* muss allerdings das Gefälle der ROS- sowie der Sauerstoffkonzentration von den Gefäßen zum Knochenmarksinterstitium mit in Betracht gezogen werden (S. Chen et al., 2013).

Zur weiteren Bestätigung der bereits diskutierten Ergebnisse wurde eine Ko-Kultur mit dem Inhibitor der NADPH-Oxidase Apocynin durchgeführt (Bedard & Krause, 2007). Die Apocynin-Neutrophilen-Megakaryozyten-Ko-Kultur sollte die Frage nach der chemischen Beeinflussung der ROS-Produktion in Wildtyp Neutrophilen beantworten und deren Rolle in der untersuchten Wechselwirkung weiter untermauern. Dabei spielt sicher auch die Reifung von neutrophilen Granulozyten eine Rolle, denn reife Zellen besitzen mehr ROS als unreife (Adrover et al., 2019). Auf die Produktion von PAF durch Megakaryozyten allein hatte Apocynin keinen Einfluss. Unter Verwendung von Apocynin im Rahmen der Neutrophilen-Megakaryozyten-Ko-Kultur konnte lediglich die Werte der Mono-Kultur gemessen werden.

In diesem Zusammenhang ist die NOX-vermittelte ROS-Produktion von neutrophilen Granulozyten sowohl im Versuchsaufbau durch externe Inhibition mittels Apocynin als auch bei intrinsischem NADPH-Oxidase-Defekt entscheidend für die Thrombozytenbiogenese im Rahmen der Wechselwirkung von neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten. Neben den im Review von Chen und Kollegen aufgeführtem Einfluss von ROS auf wesentliche Funktionen von Megakaryozyten wie Proliferation und Differenzierung wird hier nun erstmals der positive Einfluss von ROS auf die Thrombopoese bewiesen (S. Chen et al., 2013).

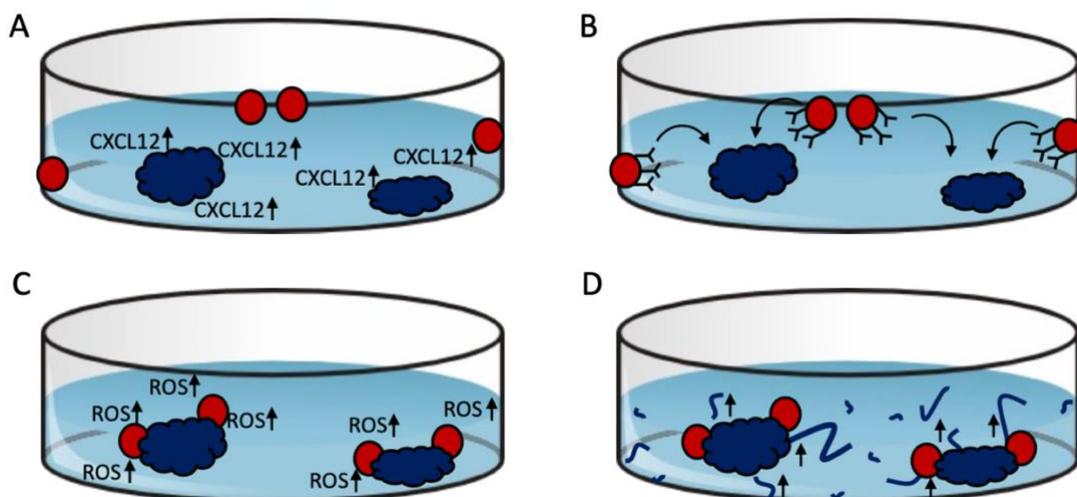
---

### **5.7 Steigerung der *in vivo* Thrombopoese durch neutrophile Granulozyten**

Um die Relevanz des oben aufgeschlüsselten Mechanismus *in vivo* zu korrelieren, wurden mehrere Depletions-Experimente durchgeführt. In Abschnitt 4.11 wird der Einfluss von neutrophilen Granulozyten auf die Baseline-Thrombozytenproduktion im Knochenmark gezeigt. Im neutropenen Zustand war die Thrombopoese weniger effizient und die Thrombozytenanzahl sank bereits nach 5 Tage um 50% ab. In Abschnitt 4.12 wurde im Gegensatz zum vorherigen Absatz der Einfluss einer Neutrophilie auf die *in vivo* Thrombopoese untersucht. Nach Auswertung der Ergebnisse bleibt festzuhalten, dass die Anzahl der neutrophilen Granulozyten intravasal die Thrombopoese nach Depletion beeinflusst und eine gesteigerte Thrombozytenproduktion ermöglicht. Zuletzt wurde mittels Doppel-Depletion der Einfluss von neutrophilen Granulozyten auf die *in vivo* Thrombopoese in C57/BL6-Mäusen unter Stressbedingungen untersucht. Nach Auswertung der Ergebnisse bleibt auch hier der positive Einfluss von Neutrophilen auf die Thrombozytenproduktion mit dem Resultat einer deutlich gesteigerten Thrombozytenanzahl festzuhalten. Zusammengefasst beeinflussen die Anzahl an neutrophilen Granulozyten die Thrombopoese *in vivo* unter Standardbedingungen wie unter extremem Thrombozytenbedarf. Dabei ist die Antwort des Knochenmarks unter Stress inkomplett verstanden und Gegenstand aktueller Forschung. Tikhonova und Kollegen veröffentlichten 2019 einen weiteren Einblick in die Komplexität der verschiedenen Knochenmarksnischen unter Standardbedingungen und Stress. Weiterhin konnte die plastische Umgestaltung auf Einzelzellebene gezeigt werden. Dadurch konnte ein neues Verständnis der Antwort des Knochenmarks und dessen Umgestaltungsmöglichkeiten auf Stress gewonnen werden (Tikhonova et al., 2019).

## 6. Zusammenfassung und Ausblick Immunothrombopoese

Diese Arbeit identifiziert neutrophile Granulozyten als einen zentralen Treiber der murinen Thrombopoese *in vitro* und *in vivo*. Das Zusammenspiel von Megakaryozyten und neutrophilen Granulozyten durch die CXCL12/CXCR4-Achse, die direkte Interaktion, sowie die Freisetzung von ROS sind dabei unerlässlich (Abbildung 53). Der positive Einfluss ist dabei Neutrophilen-spezifisch. Dabei spielt der Mechanismus nicht nur unter Standardbedingungen, sondern auch bei hohem Thrombozytenbedarf eine wichtige Rolle und stellt eine direkte Verbindung zwischen dem angeborenen Immunsystem und der primären Hämostase unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen her. Die Ergebnisse geben eine andere Sichtweise und neuartiges Konzept der Thrombozytenbiogenese, welche die Wechselwirkung zwischen Megakaryozyten und anderen Immunzellen einbindet. Weiterhin stellt die untersuchte Wechselwirkung einen weiteren Teilschritt zur *ex vivo* Produktion von Thrombozyten dar. Unter Berücksichtigung anderer publizierter Arbeiten ist ein enges Zusammenspiel von Adipo-CAR-Zellen als CXCL12-Produzenten, neutrophilen Granulozyten als ROS-Lieferanten und Megakaryozyten zur Thrombopoese in der sinusiodalen Nische möglich. Erstere könnten mittels CXCL12 Megakaryozyten und neutrophile Granulozyten in die Sinusoide des Knochenmarks locken. Hier steigern Neutrophile via CXCR4-Interaktion die ROS-Produktion und regen Megakaryozyten zur effizienteren Thrombopoese an (Abbildung 53).



**Abbildung 53: Modell der *in vitro* Immunothrombopoese**

(A) Gezeigt wird die Sekretion von CXCL12 durch Megakaryozyten (blau). (B) Dies führt zur Anlockung von CXCR4-exprimierenden neutrophilen Granulozyten (rot). (C) Im Rahmen der Interaktion produzieren neutrophile Granulozyten große Mengen ROS. (D) Die hohe ROS-Konzentration führt zu einer gesteigerten Thrombopoese *in vitro* mit vermehrter Proplättchenbildung durch die Megakaryozyten.

---

## **7. Abkürzungsverzeichnis**

AB	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovine serum albumin
CAR	CXCL12-abundant reticular
CD	Cluster of differentiation
CD34	Hematopoietic progenitor cell antigen
CD40	TNF receptor superfamily member 5
CD40L	TNF receptor superfamily ligand
CD41	Integrin $\alpha$ IIb
CD42b	Glykoprotein Iba $\alpha$
CD61	Integrin $\beta$ III
CD62p	p-Selektin
CFU	Colony forming unit
CLP	Common lymphoid progenitor
CMP	Common myeloid progenitor
Ctrl	Control
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1
CXCL4	C-X-C motif chemokine ligand 4
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12
CXCR1	C-X-C motif chemokine receptor 1
CXCR2	C-X-C motif chemokine receptor 2
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4
DAMPs	Damage associated patterns
DARC	Duffy antigen receptor for chemokines
DD	Doppel-Depletion
DMEM	Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
FGF-1	Fibroblast growth factor 1
f-MLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FBS	Fetal bovine serum

FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FOG-1	Friend of GATA-1
geo	geometrisch
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GATA-1	Erythroid transcription factor
GP130	Glykoprotein 130
GTPase	Guanosintriphosphatase
IL	Interleukin
IL1	Interleukin 1
IL1 $\alpha$	Interleukin 1 $\alpha$
IL3	Interleukin 3
IL6	Interleukin 6
IL10	Interleukin 10
IL17	Interleukin 17
KO	Knock-out
L	Lymphozyten
LTB4	Leukotrien B4
LT-HSC	Long-term hematopoetic stem cells
MAC-1	Makrophagen-1-Antigen
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MK-P	Megakaryocyte progenitor
Mpl	Myeloproliferative leukemia protein
mRNA	Messenger ribonucleic acid
Mrp8	Myeloid related protein 8
Mx1	Myxovirus resistance protein 1
MYH9	Myosin heavy chain 9
N	Neutrophile Granulozyten
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ND	Neutrophilen-Depletion
NET	Neutrophile extracellular trap
NF-E2	Nuclear factor-Erythroid 2
NOX	NADPH-Oxidase
PAF	Plättchen assoziierte Fragmente
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetat

PN	Polymorphnukläre Zelle
PRRs	pattern recognition receptors
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
retPlts	Retikuläre Thrombozyten
Rho	Ras homologue
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-Kinase
ROS	Reactive oxygen species
S1p	Sphingosin-1-Phosphat
SCF	Stem cell factor
SDF-1	Stromal derived factor 1
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
ST-HSC	Short-term hematopoetic stem cells
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TD	Thrombozyten-Depletion
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TO	Thiazol-orange
Trans	Transwell
TNF $\alpha/\beta$	Tumornekrosefaktor $\alpha/\beta$
TPO	Thrombopoetin
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
WBC	Leukozyten
WT	Wildtyp

**Tabelle 8: Abkürzungsverzeichnis**

---

## **8. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung:	Titel:	Seite:
1	Differenzierung und Reifung von Megakaryozyten	5
2	Verschiedene Modelle der Stammzellhierarchie	6
3	Schematische Darstellung des Knochenmarks und der Stammzellnische	8
4	Molekulare Zusammensetzung der hämatopoetischen Stammzellnische	9
5	Regulationsmechanismen der TPO-/Thrombozytenproduktion	11
6	Thrombopoese-Modell	12
7	Struktur von Mikrotubuli in Proplättchen	13
8	Elektronenmikroskopie eines Knochenmarkssinusoids	14
9	In vivo Multiphotonen-Mikroskopie des intravaskulären Abscherprozesses	15
10	Schematisches Modell der Mobilisation von neutrophilen Granulozyten	17
11	Modell der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten	18
12	Neutrophilen Extravasation und Abwehrmechanismen	19
13	Neutrophilen-Thrombozyten-Wechselwirkungen und deren Auswirkungen	21
14	Elektronenmikroskopieaufnahme mit Emperipoiesis einer Megakaryozyte	24
15	Konfokalmikroskopie der Emperipoiesis	25
16	Entose in einer Zellsuspension	26
17	Entose Modell	26
18	Schematische Darstellung des BSA-Gradienten zur Megakaryozytenisolation	32
19	LD Columnes der Firma Miltenyi Biotec	33
20	6-Well Zellkulturplatte der Firma TPP	34
21	Schematische Darstellung Megakaryozyten Mono-Kultur	35
22	Schematische Darstellung Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur	35
23	Schematische Darstellung Neutrophilen-Megakaryozyten-Transwell Ko-Kultur	36
24	Schematische Darstellung Neutrophilen-Überstand-Megakaryozyten-Kultur	36
25	Schematische Darstellung Lymphozyten-Megakaryozyten Ko-Kultur	37
26	Schematische Darstellung Zytoskeletthinhibitoren in der Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur	37
27	Schematische Darstellung KO-/mutierte-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur	38
28	Schematische Darstellung Apocynin-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur	38
29	Lichtmikroskopie der Zellkultur	39
30	Gatingstrategie in der Durchflusszytometrie	40
31	Versuchsprotokoll Neutrophilen-Depletion	41
32	Versuchsprotokoll Thrombozyten-Depletion	41

33	Versuchsprotokoll Doppel-Depletion	42
34	Quantifizierung der PAF-Produktion im zeitlichen Verlauf	43
35	Quantifizierung der PAF in Abhängigkeit der zuvor ausgesäten Megakaryozyten	44
36	Quantifizierung der PAF in Abhängigkeit der zuvor ausgesäten Megakaryozyten mit Verbindungslinie der einzelnen Versuche	44
37	Relative Quantifizierung der PAF in der Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur	45
38	Quantifizierung der PAF in der Neutrophilen-Megakaryozyten-Transwell Ko-Kultur	46
39	Quantifizierung der PAF in der Neutrophilen-Überstand-Megakaryozyten Ko-Kultur	47
40	Quantifizierung der PAF in der Lymphozyten-Megakaryozyten Ko-Kultur	48
41	Quantifizierung der PAF in der Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur in Anwesenheit verschiedener Zytoskelettinhibitoren	49
42	Quantifizierung der PAF in der PSGL-1-KO-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur	50
43	Quantifizierung der PAF in der Integrin- $\beta$ -1-KO-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur	50
44	Quantifizierung der PAF in der Integrin- $\beta$ -2-KO-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur	51
45	Quantifizierung der PAF in der Kindlin-3-KO-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur	51
46	Quantifizierung der PAF in der CXCR4-KO-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur	52
47	Quantifizierung der PAF in der p22 <sup>mt/mt</sup> -Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur	53
48	Quantifizierung der PAF in der Apocynin-Neutrophilen-Megakaryozyten Ko-Kultur	54
49	Analyse der Blutwerte nach Neutrophilen-Depletion	55
50	Analyse der Blutwerte nach Thrombozyten-Depletion	56
51	Analyse der Blutwerte nach Doppel-Depletion	56
52	Whole-mount-Staining muriner Femur	58
53	Modell der in vivo Immunothrombopoiese	66

**Tabelle 9: Abbildungsverzeichnis**

---

## **9. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Durchflusszytometrie-Antikörper	29
Tabelle 2	Depletions-Antikörper	29
Tabelle 3	Histologie-Reagenzien	30
Tabelle 4	Reagenzien	30
Tabelle 5	Verbrauchsmaterialien	31
Tabelle 6	Geräte	31
Tabelle 7	Software	31
Tabelle 8	Abkürzungsverzeichnis	67-69
Tabelle 9	Abbildungsverzeichnis	70-71
Tabelle 10	Tabellenverzeichnis	72

**Tabelle 10: Tabellenverzeichnis**

---

## 10. Literaturverzeichnis

- Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C. T., . . . Jacobsen, S. E. (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*, 121(2), 295-306. doi:10.1016/j.cell.2005.02.013
- Adrover, J. M., Del Fresno, C., Crainiciuc, G., Cuartero, M. I., Casanova-Acebes, M., Weiss, L. A., . . . Hidalgo, A. (2019). A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection. *Immunity*, 50(2), 390-402 e310. doi:10.1016/j.immuni.2019.01.002
- Aiuti, A., Webb, I. J., Bleul, C., Springer, T., & Gutierrez-Ramos, J. C. (1997). The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*, 185(1), 111-120. doi:10.1084/jem.185.1.111
- Althaus, K., & Greinacher, A. (2009). MYH9-related platelet disorders. *Semin Thromb Hemost*, 35(2), 189-203. doi:10.1055/s-0029-1220327
- Avanzi, M. P., Izak, M., Oluwadara, O. E., & Mitchell, W. B. (2015). Actin inhibition increases megakaryocyte proplatelet formation through an apoptosis-dependent mechanism. *PLoS One*, 10(4), e0125057. doi:10.1371/journal.pone.0125057
- Avci, Z., Turul, T., Catal, F., Olgar, S., Baykan, A., Tekfam, O., & Gurgey, A. (2002). Thrombocytopenia and emperipolesis in a patient with hepatitis a infection. *Pediatr Hematol Oncol*, 19(1), 67-70. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11787869>
- Baccin, C., Al-Sabah, J., Velten, L., Helbling, P. M., Grunschlager, F., Hernandez-Malmierca, P., . . . Haas, S. (2020). Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nat Cell Biol*, 22(1), 38-48. doi:10.1038/s41556-019-0439-6
- Becker, R. P., & De Bruyn, P. P. (1976). The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat*, 145(2), 183-205. doi:10.1002/aja.1001450204
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87(1), 245-313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
- Belikov, A. V., Schraven, B., & Simeoni, L. (2015). T cells and reactive oxygen species. *J Biomed Sci*, 22, 85. doi:10.1186/s12929-015-0194-3
- Bobik, R., & Dabrowski, Z. (1995). Emperipolesis of marrow cells within megakaryocytes in the bone marrow of sublethally irradiated mice. *Ann Hematol*, 70(2), 91-95. doi:10.1007/bf01834387
- Borges, E., Eytner, R., Moll, T., Steegmaier, M., Campbell, M. A., Ley, K., . . . Vestweber, D. (1997). The P-selectin glycoprotein ligand-1 is important for recruitment of neutrophils into inflamed mouse peritoneum. *Blood*, 90(5), 1934-1942. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9292527>
- Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S. E., Wang, Q., Gutierrez, M. G., Brown, G. D., & Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol*, 15(11), 1017-1025. doi:10.1038/ni.2987
- Brenner, S. L., & Korn, E. D. (1980). The effects of cytochalasins on actin polymerization and actin ATPase provide insights into the mechanism of polymerization. *J Biol Chem*, 255(3), 841-844. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6444302>

- 
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., . . . Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, *303*(5663), 1532-1535. doi:10.1126/science.1092385
- Broudy, V. C., Lin, N. L., & Kaushansky, K. (1995). Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood*, *85*(7), 1719-1726. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535585>
- Bruns, I., Lucas, D., Pinho, S., Ahmed, J., Lambert, M. P., Kunisaki, Y., . . . Frenette, P. S. (2014). Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med*, *20*(11), 1315-1320. doi:10.1038/nm.3707
- Carestia, A., Kaufman, T., Rivadeneyra, L., Landoni, V. I., Pozner, R. G., Negrotto, S., . . . Schattner, M. (2016). Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *J Leukoc Biol*, *99*(1), 153-162. doi:10.1189/jlb.3A0415-161R
- Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L. A., Nombela-Arrieta, C., Chevre, R., N, A. G., . . . Hidalgo, A. (2013). Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*, *153*(5), 1025-1035. doi:10.1016/j.cell.2013.04.040
- Cashell, A. W., & Buss, D. H. (1992). The frequency and significance of megakaryocytic emperipoiesis in myeloproliferative and reactive states. *Ann Hematol*, *64*(6), 273-276. doi:10.1007/bf01695470
- Caudrillier, A., Kessenbrock, K., Gilliss, B. M., Nguyen, J. X., Marques, M. B., Monestier, M., . . . Looney, M. R. (2012). Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest*, *122*(7), 2661-2671. doi:10.1172/JCI61303
- Chang, Y., Aurade, F., Larbret, F., Zhang, Y., Le Couedic, J. P., Momeux, L., . . . Debili, N. (2007). Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood*, *109*(10), 4229-4236. doi:10.1182/blood-2006-04-020024
- Chen, S., Su, Y., & Wang, J. (2013). ROS-mediated platelet generation: a microenvironment-dependent manner for megakaryocyte proliferation, differentiation, and maturation. *Cell Death Dis*, *4*, e722. doi:10.1038/cddis.2013.253
- Chen, Z., Naveiras, O., Balduini, A., Mammoto, A., Conti, M. A., Adelstein, R. S., . . . Shivdasani, R. A. (2007). The May-Hegglin anomaly gene MYH9 is a negative regulator of platelet biogenesis modulated by the Rho-ROCK pathway. *Blood*, *110*(1), 171-179. doi:10.1182/blood-2007-02-071589
- Choi, E. S., Nichol, J. L., Hokom, M. M., Hornkohl, A. C., & Hunt, P. (1995). Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood*, *85*(2), 402-413. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7529062>
- Crane, G. M., Jeffery, E., & Morrison, S. J. (2017). Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*, *17*(9), 573-590. doi:10.1038/nri.2017.53
- Crispino, J. D. (2005). GATA1 in normal and malignant hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol*, *16*(1), 137-147. doi:10.1016/j.semcdb.2004.11.002
- Cunin, P., Bouslama, R., Machlus, K. R., Martinez-Bonet, M., Lee, P. Y., Wactor, A., . . . Nigrovic, P. A. (2019). Megakaryocyte emperipoiesis mediates membrane transfer from intracytoplasmic neutrophils to platelets. *Elife*, *8*. doi:10.7554/eLife.44031
- Czaikoski, P. G., Mota, J. M., Nascimento, D. C., Sonogo, F., Castanheira, F. V., Melo, P. H., . . . Cunha, F. Q. (2016). Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PLoS One*, *11*(2), e0148142. doi:10.1371/journal.pone.0148142

- 
- Dar, A., Goichberg, P., Shinder, V., Kalinkovich, A., Kollet, O., Netzer, N., . . . Lapidot, T. (2005). Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat Immunol*, 6(10), 1038-1046. doi:10.1038/ni1251
- De Filippo, K., & Rankin, S. M. (2018). CXCR4, the master regulator of neutrophil trafficking in homeostasis and disease. *Eur J Clin Invest*, 48 Suppl 2, e12949. doi:10.1111/eci.12949
- de Oliveira, S., Rosowski, E. E., & Huttenlocher, A. (2016). Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol*, 16(6), 378-391. doi:10.1038/nri.2016.49
- Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G., & Morrison, S. J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 481(7382), 457-462. doi:10.1038/nature10783
- Engel, C., Loeffler, M., Franke, H., & Schmitz, S. (1999). Endogenous thrombopoietin serum levels during multicycle chemotherapy. *Br J Haematol*, 105(3), 832-838. doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01459.x
- Engelmann, B., & Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 13(1), 34-45. doi:10.1038/nri3345
- Eto, K., & Kunishima, S. (2016). Linkage between the mechanisms of thrombocytopenia and thrombopoiesis. *Blood*, 127(10), 1234-1241. doi:10.1182/blood-2015-07-607903
- Etulain, J., Martinod, K., Wong, S. L., Cifuni, S. M., Schattner, M., & Wagner, D. D. (2015). P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood*, 126(2), 242-246. doi:10.1182/blood-2015-01-624023
- Forlow, S. B., Schurr, J. R., Kolls, J. K., Bagby, G. J., Schwarzenberger, P. O., & Ley, K. (2001). Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice. *Blood*, 98(12), 3309-3314. doi:10.1182/blood.v98.12.3309
- Freson, K., De Vos, R., Wittevrongel, C., Thys, C., Defoor, J., Vanhees, L., . . . Van Geet, C. (2005). The TUBB1 Q43P functional polymorphism reduces the risk of cardiovascular disease in men by modulating platelet function and structure. *Blood*, 106(7), 2356-2362. doi:10.1182/blood-2005-02-0723
- Furze, R. C., & Rankin, S. M. (2008). Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*, 125(3), 281-288. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x
- Gawaz, M., Fateh-Moghadam, S., Pilz, G., Gurland, H. J., & Werdan, K. (1995). Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest*, 25(11), 843-851. doi:10.1111/j.1365-2362.1995.tb01694.x
- Gould, T. J., Lysov, Z., & Liaw, P. C. (2015). Extracellular DNA and histones: double-edged swords in immunothrombosis. *J Thromb Haemost*, 13 Suppl 1, S82-91. doi:10.1111/jth.12977
- Gresele, P., Dottorini, M., Selli, M. L., Iannacci, L., Canino, S., Todisco, T., . . . Nenci, G. G. (1993). Altered platelet function associated with the bronchial hyperresponsiveness accompanying nocturnal asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 91(4), 894-902. doi:10.1016/0091-6749(93)90347-i
- Grozovsky, R., Begonja, A. J., Liu, K., Visner, G., Hartwig, J. H., Falet, H., & Hoffmeister, K. M. (2015). The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat Med*, 21(1), 47-54. doi:10.1038/nm.3770
- Gurney, A., Carver-Moore, K., de Sauvage, F., & Moore, M. (1994). Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science*, 265(5177), 1445-1447. doi:10.1126/science.8073287

- 
- Haas, S., Hansson, J., Klimmeck, D., Loeffler, D., Velten, L., Uckelmann, H., . . . Essers, M. A. (2015). Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors. *Cell Stem Cell*, 17(4), 422-434. doi:10.1016/j.stem.2015.07.007
- Hamada, T., Mohle, R., Hesselgesser, J., Hoxie, J., Nachman, R. L., Moore, M. A., & Rafii, S. (1998). Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation. *J Exp Med*, 188(3), 539-548. doi:10.1084/jem.188.3.539
- Hamburger, S. A., & McEver, R. P. (1990). GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood*, 75(3), 550-554. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1688717>
- Hartwig, J. H., & Italiano, J. E., Jr. (2006). Cytoskeletal mechanisms for platelet production. *Blood Cells Mol Dis*, 36(2), 99-103. doi:10.1016/j.bcmd.2005.12.007
- Hermitte, F., Brunet de la Grange, P., Belloc, F., Praloran, V., & Ivanovic, Z. (2006). Very low O<sub>2</sub> concentration (0.1%) favors G<sub>0</sub> return of dividing CD34+ cells. *Stem Cells*, 24(1), 65-73. doi:10.1634/stemcells.2004-0351
- Hodohara, K., Fujii, N., Yamamoto, N., & Kaushansky, K. (2000). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells (CFU-MK). *Blood*, 95(3), 769-775. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648384>
- Horckmans, M., Ring, L., Duchene, J., Santovito, D., Schloss, M. J., Drechsler, M., . . . Steffens, S. (2017). Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur Heart J*, 38(3), 187-197. doi:10.1093/eurheartj/ehw002
- Huang, Z., Han, Z., Ye, B., Dai, Z., Shan, P., Lu, Z., . . . Huang, W. (2015). Berberine alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy in cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol*, 762, 1-10. doi:10.1016/j.ejphar.2015.05.028
- Humble, J. G., Jayne, W. H., & Pulvertaft, R. J. (1956). Biological interaction between lymphocytes and other cells. *Br J Haematol*, 2(3), 283-294. doi:10.1111/j.1365-2141.1956.tb06700.x
- Italiano, J. E., Jr. (2013). Unraveling mechanisms that control platelet production. *Semin Thromb Hemost*, 39(1), 15-24. doi:10.1055/s-0032-1331157
- Italiano, J. E., Jr., Lecine, P., Shivdasani, R. A., & Hartwig, J. H. (1999). Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol*, 147(6), 1299-1312. doi:10.1083/jcb.147.6.1299
- Italiano, J. E., Jr., & Shivdasani, R. A. (2003). Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost*, 1(6), 1174-1182. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871316>
- Itkin, T., Gur-Cohen, S., Spencer, J. A., Schajnovitz, A., Ramasamy, S. K., Kusumbe, A. P., . . . Lapidot, T. (2016). Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature*, 532(7599), 323-328. doi:10.1038/nature17624
- Jagels, M. A., & Hugli, T. E. (1994). Mechanisms and mediators of neutrophilic leukocytosis. *Immunopharmacology*, 28(1), 1-18. doi:10.1016/0162-3109(94)90034-5
- Jung, Y., Wang, J., Schneider, A., Sun, Y. X., Koh-Paige, A. J., Osman, N. I., . . . Taichman, R. S. (2006). Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone*, 38(4), 497-508. doi:10.1016/j.bone.2005.10.003
- Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., . . . von Andrian, U. H. (2007). Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*, 317(5845), 1767-1770. doi:10.1126/science.1146304

- 
- Kaser, A., Brandacher, G., Steurer, W., Kaser, S., Offner, F. A., Zoller, H., . . . Tilg, H. (2001). Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*, *98*(9), 2720-2725. doi:10.1182/blood.v98.9.2720
- Kaushansky, K. (1995). Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*, *86*(2), 419-431. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7605981>
- Kaushansky, K. (2005). The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest*, *115*(12), 3339-3347. doi:10.1172/JCI26674
- Kaushansky, K. (2008). Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood*, *111*(3), 981-986. doi:10.1182/blood-2007-05-088500
- Kaushansky, K., & Drachman, J. G. (2002). The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Oncogene*, *21*(21), 3359-3367. doi:10.1038/sj.onc.1205323
- Kile, B. T. (2015). Aging platelets stimulate TPO production. *Nat Med*, *21*(1), 11-12. doi:10.1038/nm.3780
- Kim, S. J., Davis, R. P., & Jenne, C. N. (2018). Platelets as Modulators of Inflammation. *Semin Thromb Hemost*, *44*(2), 91-101. doi:10.1055/s-0037-1607432
- Klyubin, I. V., Kirpichnikova, K. M., & Gamaley, I. A. (1996). Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. *Eur J Cell Biol*, *70*(4), 347-351. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8864663>
- Knight, T., & Savasan, S. (2018). Megakaryocytic Emperipoiesis in an Adolescent With Hodgkin Lymphoma. *J Pediatr Hematol Oncol*, *40*(4), 306. doi:10.1097/MPH.0000000000001116
- Kobayashi, Y. (2008). The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci*, *13*, 2400-2407. doi:10.2741/2853
- Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C., Malnasi-Csizmadia, A., & Sellers, J. R. (2004). Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem*, *279*(34), 35557-35563. doi:10.1074/jbc.M405319200
- Kroemer, G., & Perfettini, J. L. (2014). Entosis, a key player in cancer cell competition. *Cell Res*, *24*(11), 1280-1281. doi:10.1038/cr.2014.133
- Lammermann, T., Afonso, P. V., Angermann, B. R., Wang, J. M., Kastenmuller, W., Parent, C. A., & Germain, R. N. (2013). Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature*, *498*(7454), 371-375. doi:10.1038/nature12175
- Lane, W. J., Dias, S., Hattori, K., Heissig, B., Choy, M., Rabbany, S. Y., . . . Rafii, S. (2000). Stromal-derived factor 1-induced megakaryocyte migration and platelet production is dependent on matrix metalloproteinases. *Blood*, *96*(13), 4152-4159. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11110686>
- Larsen, T. E. (1970). Emperipoiesis of granular leukocytes within megakaryocytes in human hemopoietic bone marrow. *Am J Clin Pathol*, *53*(4), 485-489. doi:10.1093/ajcp/53.4.485
- Leblanc, R., & Peyruchaud, O. (2016). The role of platelets and megakaryocytes in bone metastasis. *J Bone Oncol*, *5*(3), 109-111. doi:10.1016/j.jbo.2016.02.007
- Lecine, P., Italiano, J. E., Jr., Kim, S. W., Villeval, J. L., & Shivdasani, R. A. (2000). Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood*, *96*(4), 1366-1373. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10942379>

- 
- Lee, W. B., Erm, S. K., Kim, K. Y., & Becker, R. P. (1999). Emperipolesis of erythroblasts within Kupffer cells during hepatic hemopoiesis in human fetus. *Anat Rec*, 256(2), 158-164. doi:10.1002/(SICI)1097-0185(19991001)256:2<158::AID-AR6>3.0.CO;2-0
- Lefrancais, E., Ortiz-Munoz, G., Caudrillier, A., Mallavia, B., Liu, F., Sayah, D. M., . . . Looney, M. R. (2017). The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*, 544(7648), 105-109. doi:10.1038/nature21706
- Ley, K., Hoffman, H. M., Kubes, P., Cassatella, M. A., Zychlinsky, A., Hedrick, C. C., & Catz, S. D. (2018). Neutrophils: New insights and open questions. *Sci Immunol*, 3(30). doi:10.1126/sciimmunol.aat4579
- Lieschke, G. J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., . . . Dunn, A. R. (1994). Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*, 84(6), 1737-1746. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7521686>
- Lisman, T. (2018). Platelet-neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease. *Cell Tissue Res*, 371(3), 567-576. doi:10.1007/s00441-017-2727-4
- Liu, F., Wu, H. Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T., & Link, D. C. (1996). Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity*, 5(5), 491-501. doi:10.1016/s1074-7613(00)80504-x
- Long, M. W., Williams, N., & Ebbe, S. (1982). Immature megakaryocytes in the mouse: physical characteristics, cell cycle status, and in vitro responsiveness to thrombopoietic stimulatory factor. *Blood*, 59(3), 569-575. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7059669>
- Machlus, K. R., & Italiano, J. E., Jr. (2013). The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol*, 201(6), 785-796. doi:10.1083/jcb.201304054
- Machlus, K. R., Johnson, K. E., Kulenthirarajan, R., Forward, J. A., Tippy, M. D., Soussou, T. S., . . . Battinelli, E. M. (2016). CCL5 derived from platelets increases megakaryocyte proplatelet formation. *Blood*, 127(7), 921-926. doi:10.1182/blood-2015-05-644583
- Majka, M., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, J., Kowalska, M. A., Vilaire, G., Pan, Z. K., . . . Ratajczak, M. Z. (2000). Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood*, 96(13), 4142-4151. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11110685>
- Martin, C., Burdon, P. C., Bridger, G., Gutierrez-Ramos, J. C., Williams, T. J., & Rankin, S. M. (2003). Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*, 19(4), 583-593. doi:10.1016/s1074-7613(03)00263-2
- Martinod, K., & Wagner, D. D. (2014). Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*, 123(18), 2768-2776. doi:10.1182/blood-2013-10-463646
- Massberg, S., Konrad, I., Schurzinger, K., Lorenz, M., Schneider, S., Zohlnhofer, D., . . . Gawaz, M. (2006). Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*, 203(5), 1221-1233. doi:10.1084/jem.20051772
- Metzemaekers, M., Gouwy, M., & Proost, P. (2020). Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell Mol Immunol*, 17(5), 433-450. doi:10.1038/s41423-020-0412-0
- Momo, C., Jacintho, A. P., Moreira, P. R., Munari, D. P., Machado, G. F., & Vasconcelos Rde, O. (2014). Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Med Int*, 2014, 150582. doi:10.1155/2014/150582

- 
- Moore, K. L., Patel, K. D., Bruehl, R. E., Li, F., Johnson, D. A., Lichenstein, H. S., . . . McEver, R. P. (1995). P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol*, *128*(4), 661-671. doi:10.1083/jcb.128.4.661
- Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M., & Fassler, R. (2008). Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med*, *14*(3), 325-330. doi:10.1038/nm1722
- Mostafa, S. S., Miller, W. M., & Papoutsakis, E. T. (2000). Oxygen tension influences the differentiation, maturation and apoptosis of human megakaryocytes. *Br J Haematol*, *111*(3), 879-889. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11122151>
- Mostafa, S. S., Papoutsakis, E. T., & Miller, W. M. (2001). Oxygen tension modulates the expression of cytokine receptors, transcription factors, and lineage-specific markers in cultured human megakaryocytes. *Exp Hematol*, *29*(7), 873-883. doi:10.1016/s0301-472x(01)00658-0
- Motohashi, H., Kimura, M., Fujita, R., Inoue, A., Pan, X., Takayama, M., . . . Yamamoto, M. (2010). NF-E2 domination over Nrf2 promotes ROS accumulation and megakaryocytic maturation. *Blood*, *115*(3), 677-686. doi:10.1182/blood-2009-05-223107
- Nakazawa, D., Kumar, S. V., Marschner, J., Desai, J., Holderied, A., Rath, L., . . . Anders, H. J. (2017). Histones and Neutrophil Extracellular Traps Enhance Tubular Necrosis and Remote Organ Injury in Ischemic AKI. *J Am Soc Nephrol*, *28*(6), 1753-1768. doi:10.1681/ASN.2016080925
- Nakvasina, M. A., Popova, L. I., Lidokhova, O. V., & Artyukhov, V. G. (2019). Modulation of Structural and Functional Properties of Human Lymphocytes by Reactive Oxygen Species. *Bull Exp Biol Med*, *166*(4), 481-486. doi:10.1007/s10517-019-04377-4
- Ng, A. P., Kauppi, M., Metcalf, D., Hyland, C. D., Josefsson, E. C., Lebois, M., . . . Alexander, W. S. (2014). Mpl expression on megakaryocytes and platelets is dispensable for thrombopoiesis but essential to prevent myeloproliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(16), 5884-5889. doi:10.1073/pnas.1404354111
- Ng, L. G., Qin, J. S., Roediger, B., Wang, Y., Jain, R., Cavanagh, L. L., . . . Weninger, W. (2011). Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events. *J Invest Dermatol*, *131*(10), 2058-2068. doi:10.1038/jid.2011.179
- Nguyen, G. T., Green, E. R., & Mecsas, J. (2017). Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*, *7*, 373. doi:10.3389/fcimb.2017.00373
- Niethammer, P., Grabher, C., Look, A. T., & Mitchison, T. J. (2009). A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*, *459*(7249), 996-999. doi:10.1038/nature08119
- Nishimura, S., Nagasaki, M., Kunishima, S., Sawaguchi, A., Sakata, A., Sakaguchi, H., . . . Nagai, R. (2015). IL-1alpha induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *J Cell Biol*, *209*(3), 453-466. doi:10.1083/jcb.201410052
- Niswander, L. M., Fegan, K. H., Kingsley, P. D., McGrath, K. E., & Palis, J. (2014). SDF-1 dynamically mediates megakaryocyte niche occupancy and thrombopoiesis at steady state and following radiation injury. *Blood*, *124*(2), 277-286. doi:10.1182/blood-2014-01-547638
- Niswander, L. M., McGrath, K. E., Kennedy, J. C., & Palis, J. (2014). Improved quantitative analysis of primary bone marrow megakaryocytes utilizing imaging flow cytometry. *Cytometry A*, *85*(4), 302-312. doi:10.1002/cyto.a.22438
- O'Brien, J. J., Spinelli, S. L., Tober, J., Blumberg, N., Francis, C. W., Taubman, M. B., . . . Phipps, R. P. (2008). 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 enhances platelet production from megakaryocytes. *Blood*, *112*(10), 4051-4060. doi:10.1182/blood-2008-05-158535

- 
- Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, 81(11), 2844-2853. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8499622>
- Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., & Nagasawa, T. (2010). The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*, 33(3), 387-399. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.017
- Overholtzer, M., Mailloux, A. A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S. J., King, R. W., . . . Brugge, J. S. (2007). A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*, 131(5), 966-979. doi:10.1016/j.cell.2007.10.040
- Owusu-Ansah, E., & Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*, 461(7263), 537-541. doi:10.1038/nature08313
- Pamuk, G. E., Vural, O., Turgut, B., Demir, M., Umit, H., & Tezel, A. (2006). Increased circulating platelet-neutrophil, platelet-monocyte complexes, and platelet activation in patients with ulcerative colitis: a comparative study. *Am J Hematol*, 81(10), 753-759. doi:10.1002/ajh.20655
- Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J. A., Sackstein, R., & Down, J. D. (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(13), 5431-5436. doi:10.1073/pnas.0701152104
- Pase, L., Layton, J. E., Wittmann, C., Ellett, F., Nowell, C. J., Reyes-Aldasoro, C. C., . . . Lieschke, G. J. (2012). Neutrophil-delivered myeloperoxidase dampens the hydrogen peroxide burst after tissue wounding in zebrafish. *Curr Biol*, 22(19), 1818-1824. doi:10.1016/j.cub.2012.07.060
- Patel, S. R., Richardson, J. L., Schulze, H., Kahle, E., Galjart, N., Drabek, K., . . . Italiano, J. E., Jr. (2005). Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood*, 106(13), 4076-4085. doi:10.1182/blood-2005-06-2204
- Patzelt, J., & Langer, H. F. (2012). Platelets in angiogenesis. *Curr Vasc Pharmacol*, 10(5), 570-577. doi:10.2174/157016112801784648
- Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., . . . Lapidot, T. (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*, 3(7), 687-694. doi:10.1038/ni813
- Pinho, S., & Frenette, P. S. (2019). Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(5), 303-320. doi:10.1038/s41580-019-0103-9
- Pinho, S., Marchand, T., Yang, E., Wei, Q., Nerlov, C., & Frenette, P. S. (2018). Lineage-Biased Hematopoietic Stem Cells Are Regulated by Distinct Niches. *Dev Cell*, 44(5), 634-641 e634. doi:10.1016/j.devcel.2018.01.016
- Pittman, K., & Kubes, P. (2013). Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *J Innate Immun*, 5(4), 315-323. doi:10.1159/000347132
- Polanowska-Grabowska, R., Wallace, K., Field, J. J., Chen, L., Marshall, M. A., Figler, R., . . . Linden, J. (2010). P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(12), 2392-2399. doi:10.1161/ATVBAHA.110.211615
- Qian, S., Fu, F., Li, W., Chen, Q., & de Sauvage, F. J. (1998). Primary role of the liver in thrombopoietin production shown by tissue-specific knockout. *Blood*, 92(6), 2189-2191. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9731084>
- Rankin, S. M. (2010). The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J Leukoc Biol*, 88(2), 241-251. doi:10.1189/jlb.0210112

- 
- Russo, R. C., Garcia, C. C., Teixeira, M. M., & Amaral, F. A. (2014). The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol*, *10*(5), 593-619. doi:10.1586/1744666X.2014.894886
- Sadik, C. D., & Luster, A. D. (2012). Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation. *J Leukoc Biol*, *91*(2), 207-215. doi:10.1189/jlb.0811402
- Samson, F., Donoso, J. A., Heller-Bettinger, I., Watson, D., & Himes, R. H. (1979). Nocodazole action on tubulin assembly, axonal ultrastructure and fast axoplasmic transport. *J Pharmacol Exp Ther*, *208*(3), 411-417. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/85702>
- Sardina, J. L., Lopez-Ruano, G., Sanchez-Abarca, L. I., Perez-Simon, J. A., Gaztelumendi, A., Trigueros, C., . . . Hernandez-Hernandez, A. (2010). p22phox-dependent NADPH oxidase activity is required for megakaryocytic differentiation. *Cell Death Differ*, *17*(12), 1842-1854. doi:10.1038/cdd.2010.67
- Sayah, D. M., Mallavia, B., Liu, F., Ortiz-Munoz, G., Caudrillier, A., DerHovanessian, A., . . . Looney, M. R. (2015). Neutrophil extracellular traps are pathogenic in primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*, *191*(4), 455-463. doi:10.1164/rccm.201406-1086OC
- Schmitt, A., Jouault, H., Guichard, J., Wendling, F., Drouin, A., & Cramer, E. M. (2000). Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood*, *96*(4), 1342-1347. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10942376>
- Seita, J., & Weissman, I. L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, *2*(6), 640-653. doi:10.1002/wsbm.86
- Semerad, C. L., Liu, F., Gregory, A. D., Stumpf, K., & Link, D. C. (2002). G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity*, *17*(4), 413-423. doi:10.1016/s1074-7613(02)00424-7
- Shamoto, M. (1981). Emperipolesis of hematopoietic cells in myelocytic leukemia. Electron microscopic and phase contrast microscopic studies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, *35*(3), 283-290. doi:10.1007/bf02889168
- Simon, D. I., Chen, Z., Xu, H., Li, C. Q., Dong, J., McIntire, L. V., . . . Lopez, J. A. (2000). Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med*, *192*(2), 193-204. doi:10.1084/jem.192.2.193
- Slayton, W. B., Georgelas, A., Pierce, L. J., Elenitoba-Johnson, K. S., Perry, S. S., Marx, M., & Spangrude, G. J. (2002). The spleen is a major site of megakaryopoiesis following transplantation of murine hematopoietic stem cells. *Blood*, *100*(12), 3975-3982. doi:10.1182/blood-2002-02-0490
- Spangrude, G. J., Lewandowski, D., Martelli, F., Marra, M., Zingariello, M., Sancillo, L., . . . Migliaccio, A. R. (2016). P-Selectin Sustains Extramedullary Hematopoiesis in the Gata1 low Model of Myelofibrosis. *Stem Cells*, *34*(1), 67-82. doi:10.1002/stem.2229
- Sreeramkumar, V., Adrover, J. M., Ballesteros, I., Cuartero, M. I., Rossaint, J., Bilbao, I., . . . Hidalgo, A. (2014). Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science*, *346*(6214), 1234-1238. doi:10.1126/science.1256478
- Stegner, D., vanEeuwijk, J. M. M., Angay, O., Gorelashvili, M. G., Semeniak, D., Pinnecker, J., . . . Heinze, K. G. (2017). Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature. *Nat Commun*, *8*(1), 127. doi:10.1038/s41467-017-00201-7
- Strydom, N., & Rankin, S. M. (2013). Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease. *J Innate Immun*, *5*(4), 304-314. doi:10.1159/000350282

- 
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., & Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25(6), 977-988. doi:10.1016/j.immuni.2006.10.016
- Sugiyama, T., & Nagasawa, T. (2012). Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 11(3), 201-206. doi:10.2174/187152812800392689
- Sungaran, R., Markovic, B., & Chong, B. H. (1997). Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. *Blood*, 89(1), 101-107. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8978282>
- Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A., & Sendo, F. (1996). Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol*, 59(2), 229-240. doi:10.1002/jlb.59.2.229
- Thon, J. N., & Italiano, J. E. (2012). Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol*(210), 3-22. doi:10.1007/978-3-642-29423-5\_1
- Thon, J. N., Montalvo, A., Patel-Hett, S., Devine, M. T., Richardson, J. L., Ehrlicher, A., . . . Italiano, J. E., Jr. (2010). Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol*, 191(4), 861-874. doi:10.1083/jcb.201006102
- Tikhonova, A. N., Dolgalev, I., Hu, H., Sivaraj, K. K., Hoxha, E., Cuesta-Dominguez, A., . . . Aifantis, I. (2019). The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature*, 569(7755), 222-228. doi:10.1038/s41586-019-1104-8
- Venereau, E., Ceriotti, C., & Bianchi, M. E. (2015). DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol*, 6, 422. doi:10.3389/fimmu.2015.00422
- Villamor, N., Montserrat, E., & Colomer, D. (2004). Cytotoxic effects of B lymphocytes mediated by reactive oxygen species. *Curr Pharm Des*, 10(8), 841-853. doi:10.2174/1381612043452848
- von Bruhl, M. L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., . . . Massberg, S. (2012). Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*, 209(4), 819-835. doi:10.1084/jem.20112322
- Vyas, P., Ault, K., Jackson, C. W., Orkin, S. H., & Shivdasani, R. A. (1999). Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood*, 93(9), 2867-2875. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10216081>
- Walzog, B., Scharffetter-Kochanek, K., & Gaetgens, P. (1999). Impairment of neutrophil emigration in CD18-null mice. *Am J Physiol*, 276(5), G1125-1130. doi:10.1152/ajpgi.1999.276.5.G1125
- Wang, J. F., Liu, Z. Y., & Groopman, J. E. (1998). The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood*, 92(3), 756-764. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9680341>
- Winterbourn, C. C., Kettle, A. J., & Hampton, M. B. (2016). Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem*, 85, 765-792. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014442
- Woolthuis, C. M., & Park, C. Y. (2016). Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood*, 127(10), 1242-1248. doi:10.1182/blood-2015-07-607945
- Wu, S., Li, Z., Gnatenko, D. V., Zhang, B., Zhao, L., Malone, L. E., . . . Bahou, W. F. (2016). BLVRB redox mutation defines heme degradation in a metabolic pathway of enhanced thrombopoiesis in humans. *Blood*, 128(5), 699-709. doi:10.1182/blood-2016-02-696997
- Xia, P., Wang, S., Guo, Z., & Yao, X. (2008). Emperipolesis, entosis and beyond: dance with fate. *Cell Res*, 18(7), 705-707. doi:10.1038/cr.2008.64

- 
- Yoo, S. K., Starnes, T. W., Deng, Q., & Huttenlocher, A. (2011). Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature*, *480*(7375), 109-112. doi:10.1038/nature10632
- Zhang, L., Orban, M., Lorenz, M., Barocke, V., Braun, D., Urtz, N., . . . Massberg, S. (2012). A novel role of sphingosine 1-phosphate receptor S1pr1 in mouse thrombopoiesis. *J Exp Med*, *209*(12), 2165-2181. doi:10.1084/jem.20121090
- Zhang, P., Wang, Y. Z., Kagan, E., & Bonner, J. C. (2000). Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK. *J Biol Chem*, *275*(29), 22479-22486. doi:10.1074/jbc.M910425199
- Zimmet, J., & Ravid, K. (2000). Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp Hematol*, *28*(1), 3-16. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10658672>
- Zuchtriegel, G., Uhl, B., Pühr-Westerheide, D., Pornbacher, M., Lauber, K., Krombach, F., & Reichel, C. A. (2016). Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation. *PLoS Biol*, *14*(5), e1002459. doi:10.1371/journal.pbio.1002459

---

## **11. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg, Chefarzt der medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universität München, danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Ich bin besonders dankbar für das exzellente wissenschaftliche Umfeld und die professionelle Zusammenarbeit. Die Expertise und finanzielle Unterstützung waren stets beispiellos.

Insbesondere gilt mein Dank auch meinem Doktorvater und Betreuer sowie wissenschaftlichen Mentor PD Dr. med. Tobias Petzold aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universität München für seine großartige und intensive Betreuung, sein großes Engagement und seine uneingeschränkte Förderung.

Weiterhin danke ich Zhang Zhe, Inas Saleh, Verena Warm, Boj Hoppe und Manuela Thienel für die exzellente methodische und technische Unterstützung und die hervorragende Zusammenarbeit bei der Durchführung der Experimente. Darüber hinaus gilt mein Dank dem wissenschaftlichen Team der AG Massberg. Ohne Susanne Sauer, Michael Lorenz, Elisabeth Raatz, Tien Cuong Kieu, Meike Miller, Bastian Helmer, Ronja Schuchert und Vanessa Philippi wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Während meiner Zeit im Labor wurden aus Kollegen Freunde.

Ein besonderer Dank gilt auch der AG Sperandio und allen voran Angela Kurz, die bei der Etablierung der Durchflusszytometrieprotokolle entscheidende Ideen beisteuerten. Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Andres Hidalgo, Prof. Dietmar Vestweber, Prof. Agnes Görlach und Dr. Markus Moser für die freundliche Bereitstellung der verschiedenen Mauslinien bedanken.

Außerdem möchte ich mich von Herzen bei meiner ganzen Familie bedanken für ihre stetige und liebevolle Unterstützung sowie die motivierenden Worte bedanken. Ohne euren Halt und Erziehung wäre ich nicht zu dem Menschen geworden, der ich heute bin. Weiterhin gilt besonderer Dank meiner Freundin Carola, die mich stetig ermutigt, die Zuversicht nicht zu verlieren und meinen Weg fortzusetzen, auch wenn dieser manchmal steil und schwierig erschien.

---

## **12. Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Christian Weber, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*„Interaktion von neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten im murinen Knochenmark“*

selbstständig 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. Zitiert oder abgebildet Arbeiten oder Erkenntnisse anderer wurden stets als solche gekennzeichnet.

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

Freiburg, den 22.07.2023

Christian Weber