

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

Die Rolle der Interaktion von Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten in Bezug auf die Thrombopoese

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



vorgelegt von
Boj Friedrich Wolfgang Maria Hoppe
aus Hamburg
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Tobias Petzold

Mitberichterstatter: PD Dr. Lisa Gross
Prof. Dr. Bernhard Heindl

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	4
Zusammenfassung	5
1. Einleitung	6
1.1 Hämatopoese	6
1.1.1 Pluripotente Stammzellen	6
1.1.2 Stammzellnischen	8
1.1.3 Megakaryozyten	9
1.1.4 Thrombopoese	10
1.1.5 Thrombozyten.....	13
1.1.6 Neutrophile Granulozyten	15
1.2 Zell-Zell-Interaktion.....	17
1.2.1 Neutrophile Granulozyten und Thrombozyten.....	17
1.2.2 Neutrophile Granulozyten und Megakaryozyten	19
1.3 Fragestellung.....	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Materialien	22
2.1.1 Vorbemerkung und Genehmigung.....	22
2.1.2 Versuchstiere.....	22
2.1.3 Antikörper	22
2.1.4 Puffer und Reagenzien.....	23
2.1.5 Geräte und Software	23
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Präparation muriner Knochen	24
2.2.2 Isolation muriner Knochenmarkszellen.....	24
2.2.3 Herstellung von Knochenmarksausstrichen	24
2.2.4 Herstellung von Zytospins.....	25
2.2.5 Plättchen Depletion	25
2.2.6 Isolation von Neutrophilen Granulozyten.....	25
2.2.7 Isolation von Megakaryozyten mittels positiver Selektion	26
2.2.8 Isolation von Megakaryozyten mittels negativer Selektion	26
2.2.9 Isolation von Megakaryozyten aus fetalen Leberzellen	27
2.2.10 Anreicherung von Megakaryozyten mittels BSA-Gradienten.....	27
2.2.11 Präparation der Oberflächen zur Zelladhäsion.....	27
2.2.12 Präparation der Co-Kultur	27

2.2.13	Immunhistochemische Färbungen.....	28
2.2.14	Fluoreszenzmikroskopie	28
2.2.15	Zeitaufgelöste Videoaufnahmen	28
2.2.16	Durchflusszytometrie.....	29
3.	Ergebnisse	30
3.1	Emperipolesis als Form der Interaktion	30
3.1.1	Darstellung im isolierten Knochen	30
3.1.2	Darstellung im Knochenmarkausstrich	32
3.1.3	Quantifikation in Zytospins.....	33
3.2	Charakterisierung der Zellen zur Bildung einer Co-Kultur	35
3.2.1	Isolierte Neutrophile Granulozyten	35
3.2.2	Megakaryozyten aus positiver Selektion	36
3.2.3	Megakaryozyten aus negativer Selektion.....	37
3.2.4	Megakaryozyten aus fetalen Leberzellen	38
3.3	Beobachtungen der etablierten Co-Kultur	41
3.3.1	Megakaryozyten zeigen Pro-Plättchen-Formation	41
3.3.2	Neutrophile Granulozyten zeigen zelltypische Aktivität	41
3.3.3	Physische Zell-Zell-Interaktion in der Co-Kultur.....	42
3.4	Einfluss der Co-Kultur auf die Thrombopoese	44
3.4.1	Vermehrte Pro-Plättchen-Formation von Megakaryozyten.....	44
3.4.2	Vermehrte Bildung Plättchen-assoziiierter Fragmente	46
4.	Diskussion.....	50
4.1	Gesteigerte Emperipolesis nach Plättchen-Depletion.....	50
4.2	Etablierung einer Co-Kultur aus Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten	52
4.3	Physische Interaktion von Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten	53
4.4	Steigerung der Thrombopoese durch Neutrophile Granulozyten.....	53
4.5	Fazit und Ausblick	55
	Literaturverzeichnis.....	56
	Anhang	66
	Danksagung	66
	Affidavit.....	67

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation (= <i>Gruppe von Oberflächenantigenen</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIC	Differential Interference Contrast (= <i>Differential-Interferenz-Kontrast</i>)
engl.	englisch
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting (= <i>Durchflusszytometrie</i>)
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fetal Calf Serum (= <i>Fetales Kälberserum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
griech.	griechisch
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSC	Hematopoietic Stem Cell (= <i>Hämatopoetische Stammzelle</i>)
IgG	Immunoglobulin G
lat.	lateinisch
LPS	Lipopolysaccharid
MK	Megakaryozyt
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid (= <i>Boten-Ribonukleinsäure</i>)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMN	Polymorphonuclear Leukocyte (= <i>Neutrophiler Granulozyt</i>)
RNA	Ribonucleic Acid (= <i>Ribonukleinsäure</i>)
SEM	Standard Error of the Mean (= <i>Standardfehler des Mittelwerts</i>)
TPO	Thrombopoetin
vWF	von-Willebrand-Faktor
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Hierarchie der hämatopoetischen Differenzierung.	7
Abbildung 1.2: Differenzierung von Megakaryozyten zu Plättchen.	11
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Hämostase.....	14
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Immunothrombose.	18
Abbildung 1.5: Beispiele von Emperipolesis in Megakaryozyten.	20
Abbildung 3.1: Darstellung von Emperipolesis im isolierten Knochen.	31
Abbildung 3.2: Beispiele von Emperipolesis im Knochenmarkausstrich.	32
Abbildung 3.3: Beispiel eines Zytospins zur Quantifikation der Emperipolesis.....	33
Abbildung 3.4: Megakaryozyten zeigen gesteigerte Emperipolesis durch Neutrophile Granulozyten nach Plättchen-Depletion.	34
Abbildung 3.5: Isolierte Neutrophile Granulozyten zeigen zelltypische Granula und Migrationsfähigkeit.	35
Abbildung 3.6: Messung der Aktivierbarkeit der isolierten Neutrophilen Granulozyten.	36
Abbildung 3.7: Megakaryozyten aus positiver Selektion bilden vereinzelt Pseudopodien.....	37
Abbildung 3.8: Megakaryozyten aus negativer Selektion sind vital und bilden Pseudopodien.....	38
Abbildung 3.9: Megakaryozyten aus fetalen Leberzellen bilden Pro-Plättchen.	39
Abbildung 3.10: Zytoskelett der Pro-Plättchen-Formation von Megakaryozyten aus fetalen Leberzellen.	40
Abbildung 3.11: Zusammenfassung der erprobten Methoden zur Isolation von Megakaryozyten.	40
Abbildung 3.12: Zelltypische Differenzierung der Megakaryozyten mit Pro-Plättchen- Formation in der Co-Kultur.....	41
Abbildung 3.13: Zelltypischen Migration von Neutrophilen Granulozyten in der Co- Kultur mit Megakaryozyten.....	42
Abbildung 3.14: Physische Interaktion von Neutrophilen Granulozyten mit Megakaryozyten <i>in vitro</i>	43
Abbildung 3.15: Kriterien und Beispiele für die Klassifikation von Megakaryozyten in Thrombopoese-Stadien.....	44
Abbildung 3.16: Beispiele der Klassifikation von Megakaryozyten in Stadien der Thrombopoese.	45
Abbildung 3.17: Gesteigerte Pro-Plättchen Formation der Megakaryozyten in Anwesenheit von Neutrophilen Granulozyten.	46
Abbildung 3.18: Gating-Strategie zur Quantifizierung von Plättchen-assoziierten Fragmenten mittels Durchflusszytometrie.	48
Abbildung 3.19: Megakaryozyten bilden vermehrt Plättchen-assoziierte Fragmente in Anwesenheit von Neutrophilen Granulozyten.	49

Zusammenfassung

Das Zusammenspiel von Neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten wurde in den letzten Jahren ausgiebig erforscht und hat unter anderem zu dem Konzept der Immuno-thrombose geführt.

Auf Ebene der thrombozytären Vorläuferzellen, der Megakaryozyten, wurde die Emperipolesis beschrieben: eine Sonderform der Zell-Zell-Interaktion, bei der Neutrophile Granulozyten in die Megakaryozyten eindringen und sie durchwandern, wobei beide Zellen intakt und vital bleiben. Dieses Phänomen ist noch unvollständig verstanden, findet sich jedoch bei verschiedenen Pathologien gesteigert, so auch bei einem vermehrten Bedarf an Thrombozyten.

Dies führte uns zu der Hypothese, dass die Interaktion von Neutrophilen Granulozyten mit Megakaryozyten möglicherweise die Thrombopoese beeinflusst.

In dieser Arbeit konnten wir die Emperipolesis im murinen Modell beobachten und verifizieren, dass eine Antikörper-induzierte Thrombopenie ihr Auftreten steigert. Zur weiteren Analyse konnten wir erfolgreich eine Co-Kultur aus primären Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten *in vitro* etablieren. Im Vergleich mehrerer Protokolle zeigte die Isolation aus fetalen Leberzellen (anders als positive bzw. negative Selektion) als einzige eine funktionsfähige Thrombopoese.

Mittels Videomikroskopie konnten wir eine physische Interaktion der Neutrophilen Granulozyten mit den Megakaryozyten beobachten, die vorwiegend an den langen Pro-Plättchen bildenden Ausläufern stattfand. Histomorphologische Auswertungen zeigten einen signifikanten Anstieg der Pro-Plättchen-formenden Megakaryozyten in Anwesenheit von Neutrophilen. Zur weiteren Analyse etablierten wir eine durchflusszytometrische Methode, um die entstehenden Pro-Plättchen und Plättchen anhand ihres doppelt-positiven Signals für CD41 / CD42d trotz ihrer heterogenen Größe zu quantifizieren. Unsere Methode validierten wir mit Sphingosin-1-phosphat (S1P), welches vorbeschrieben die Bildung und Abschnürung von (Pro-)Plättchen steigert, und fanden ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Thrombopoese in Anwesenheit von Neutrophilen Granulozyten.

Zusammenfassend konnten wir erfolgreich eine Co-Kultur aus primären Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten *in vitro* etablieren und an diesem Modell die physische Interaktion von Neutrophilen mit Megakaryozyten beobachten, sowie eine Steigerung der Thrombopoese nachweisen.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Neutrophile Granulozyten in bisher unbekannter Funktion zur Thrombopoese beitragen. Die etablierten Modelle und Methoden bilden eine Grundlage für weitere Studien zu diesem Phänomen.

1. Einleitung

1.1 Hämatopoese

Die Hämatopoese (griech. *haimatos* „Blut“, *poiesis* „Schöpfung“) bezeichnet sowohl die Blutbildung im Allgemeinen als auch die spezielle Ausreifung in die verschiedenen Zelllinien des Blutes.

Das Blut gewährleistet die Versorgung aller Organe mit Nährstoffen, verbindet diese untereinander über Botenstoffe und bildet einen essenziellen Teil des Immunsystems. Über die Hälfte des Blutes besteht aus dem flüssigen Blutplasma (ca. 55 %) und darin gelösten Proteinen, den kleineren Anteil bilden die Blutzellen (ca. 45 %), die auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind. Im menschlichen Körper werden bis zu einer halben Billion ($4\text{-}5 \times 10^{11}$) Blutzellen pro Tag gebildet, wobei die Lebensspanne von wenigen Stunden bei Granulozyten, bis zu mehreren Monaten für Erythrozyten und sogar mehreren Jahren für lymphatische Gedächtniszellen betragen kann.¹

Vorgeburtlich beginnt die Blutbildung im Dottersack und in der Plazenta, findet im Verlauf überwiegend in der fetalen Leber und Milz statt und nach der Geburt nur noch im Knochenmark.² Dieses besteht beim Neugeborenen vollständig aus dem roten (= blutbildenden) Knochenmark, welches mit fortschreitendem Alter durch das gelbe (= nicht-blutbildende, fetthaltige) Knochenmark ersetzt wird.³ Beim Erwachsenen findet die Hämatopoese nur noch in den Epiphysen der langen Röhrenknochen und im Achsenskelett statt.

1.1.1 Pluripotente Stammzellen

Die Pluripotenz (lat. *plus* „mehr“, *potentia* „Kraft“) bezeichnet die Fähigkeit von Stammzellen, sich zu einer Vielzahl verschiedener Zellen zu entwickeln.

Grundlage der Blutbildung sind die pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSCs, engl. *hematopoietic stem cells*), welche über ihre besondere Fähigkeit zur fortwährenden Selbsterneuerung und die Möglichkeit zur weiteren Differenzierung in verschiedene Blutzellen definiert sind.⁴

Mit unter 0,01 % der kernhaltigen Zellen des Knochenmarks sind die HSCs ausgesprochen selten, stellen jedoch lebenslang die alleinige Herkunft für alle zirkulierenden Blutzellen dar.¹ Durch das Potenzial der Selbsterneuerung mit unbegrenzt häufiger identischer Zellteilung sind sie in der Lage, das gesamte Knochenmark langfristig zu repopulieren, z.B. im Rahmen einer Stammzelltransplantation.^{5,6}

Das klassische Modell der Hämatopoese postuliert eine hierarchisch absteigende Differenzierung mit HSCs an der Spitze.¹ Bereits auf Ebene der Progenitorzellen geschieht eine Aufteilung in die myeloische oder lymphatische Zellreihe.⁷ Diese differenzieren weiter zu Precursorzellen und beginnen definierte Granula und Oberflächenmarker zu bilden, um letztlich als ausgereifte Effektorzellen in den Blutpool zu wandern.

Im Gegensatz hierzu werden die HSCs selbst durch das Fehlen spezieller Linienmarker (lin⁻) charakterisiert. Zwar wird u.a. CD34 stark auf HSCs exprimiert, findet sich jedoch auch auf differenzierten Zellen und wird nur langsam im Verlauf herunterreguliert.⁸ Als weitere Marker sind Sca-1 (engl. *stem cells antigen 1*) bzw. c-Kit (auch: SCFR, engl. *stem cell growth factor receptor*, CD117) beschrieben, die jedoch ebenfalls weiterhin auf Progenitorzellen enthalten sind.⁹

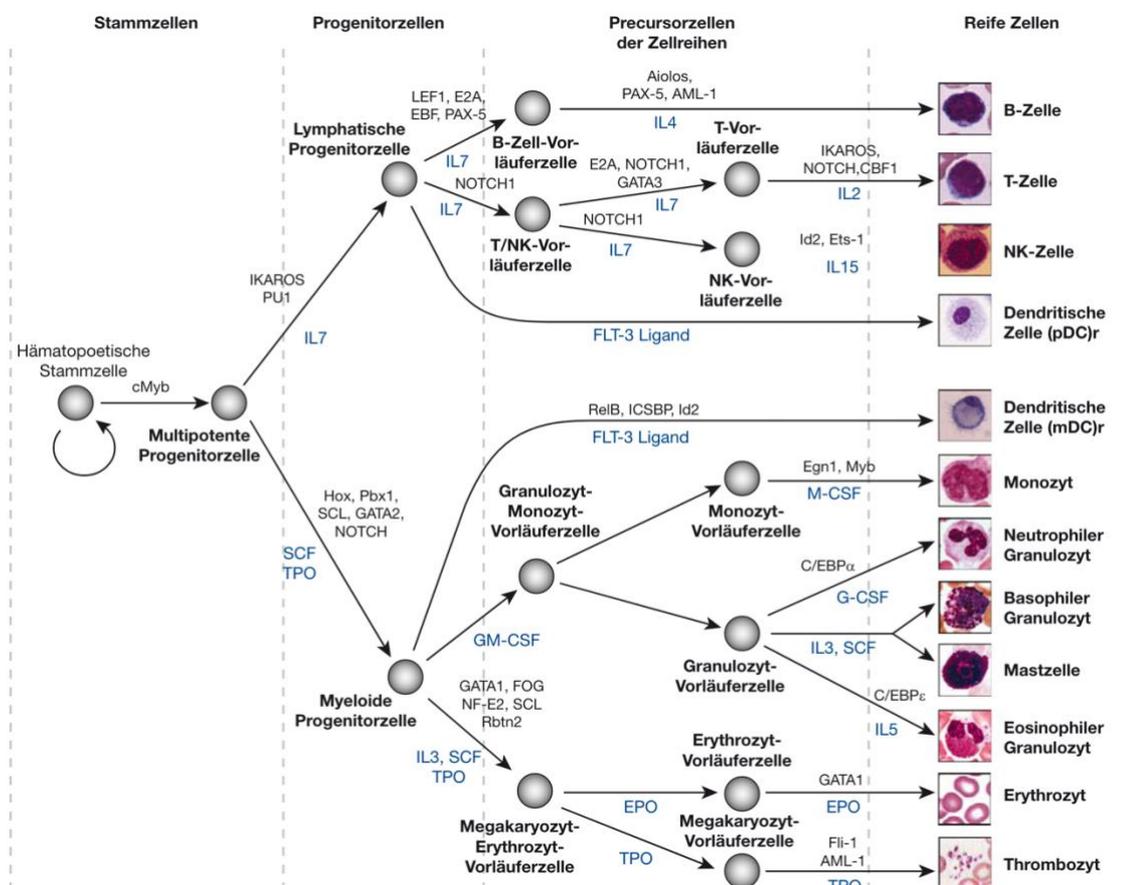


Abbildung 1.1: Hierarchie der hämatopoetischen Differenzierung. Stammzellen differenzieren stufenweise über Progenitorzellen und Precursorzellen weiter zu reifen Zellen, welche als Effektorzellen unterschiedliche Funktionen im Blut übernehmen. Übersicht der wichtigsten Transkriptionsfaktoren (schwarz, oberhalb der Pfeile) und löslichen Faktoren (blau, unterhalb der Pfeile). (Aus: Suttrop et al.¹⁰, mit freundlicher Genehmigung des ABW Wissenschaftsverlages)

Zusätzlich zu dem hierarchischen Modell konnten neuere Untersuchungen auch teilweise eine Konversion zwischen den differenzierten Precursorzellen in jeweils

andere Zellreihen oder die direkte Bildung reifer Zellen aus HSCs mit dem Überspringen mehrerer Zwischenstufen zeigen.^{11,12}

Das Gleichgewicht der Hämatopoese ist essenziell, da eine Fehlregulation zu myeloproliferativen Erkrankungen oder Leukämien führen kann.¹³ Die Differenzierung wird reguliert durch ein komplexes Zusammenspiel (Abbildung 1.1, im Folgenden näher erläutert) aus einerseits zell-intrinsischen Regulatoren (wie Transkriptionsfaktoren, epigenetischen Modulatoren und molekularen Signalwegen), andererseits durch zell-extrinsische Faktoren (wie weit entfernt freigesetzte Hormone oder neurale Signale), sowie durch Interaktion mit der lokalen Mikroumgebung der Knochenmarkstruktur selbst, der sogenannten Stammzellnische.

1.1.2 Stammzellnischen

Das Konzept einer „Stammzellnische“ wurde bereits 1978 von Schofield¹⁴ postuliert und ist seit mehreren Jahren Gegenstand intensiver Forschung.

Die spezielle Architektur der Knochen bildet ein von Stromazellen und Osteoblasten gestütztes trabekuläres Netzwerk, das mit nervalen und vaskulären Leitungsbahnen durchzogen ist, über welche die ausgereifte Blutzellen in den Körperkreislauf gelangen; den Knochen selbst umgibt als Knochenhaut das Periost, welches noch stärker von Gefäßen und Nerven durchzogen ist.¹³

HSCs finden sich vorwiegend im Randbereich der Knochen in der „endostalen Nische“.¹⁵ Für den Erhalt der HSCs haben sich vornehmlich die Zytokine CXCL12^{16,17} (auch: SDF1, engl. *stromal cell-derived factor 1*) als Ligand für CXCR4, sowie SCF^{18,19} (engl. *stem cell factor*) für SCFR bzw. c-Kit etabliert.

Je nach weiterer Differenzierung wandern die Zellen in weiter zentral gelegene „perivaskuläre Nischen“, so finden sich z.B. lymphoide Progenitorzellen vorwiegend um die schmalen Arteriolen^{20,21} und Megakaryozyten um die breiteren venösen Sinusoide,^{21,22} um dort ihre Effektorzellen in die Blutbahn abzugeben. Mesenchymale Vorläuferzellen (MSC, engl. *mesenchymal stem cells*) umhüllen die Gefäße und bilden wichtige Faktoren wie CXCL12 und SCF, aber auch das Interleukin 7 (IL-7) und VCAM-1 (engl. *vascular adhesion molecule 1*).^{23,24}

Zusätzlich reichen sympathische Nervenfasern entlang der Arteriolen bis tief in das Knochenmark und sind ebenfalls an der Regulation der HSCs beteiligt, z.B. über CXCL12 oder direkte β_2 -Adrenoreptoren.^{25,26}

Die multifaktoriellen Einflüsse der Hämatopoese sind weiterhin nur unvollständig verstanden. Die vorliegende Arbeit soll hierbei die Rolle der Interaktion zwischen

zwei speziellen Blutzellen untersuchen: den Megakaryozyten und den Neutrophilen Granulozyten.

1.1.3 Megakaryozyten

Mit Durchmessern von 50-100 μm und $\sim 0,01\%$ der Population gehören Megakaryozyten zu den seltensten und größten kernhaltigen Zellen im Knochenmark,²⁷ woher auch ihr Name stammt (griech. *megas* „groß“, *karyon* „Kern“, *kytos* „Höhle“ bzw. „Zelle“). Als hochspezialisierte Vorläuferzelle kann jede einzelne davon tausende Blutplättchen hervorbringen,^{28,29} was vorwiegend im Knochenmark geschieht, jedoch auch im peripheren Blutstrom³⁰ oder in der Lunge³¹ beschrieben wurde. Megakaryozyten entstehen aus HSCs über die myeloiden Progenitorzellen (MPC, engl. *myeloid progenitor cell*) und weiter über die gemeinsamen Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzellen (MEP, engl. *megakaryocyte-erythrocyte progenitors*) aus den Megakaryozyten-Vorläuferzellen (Abbildung 1.1).¹¹

Wichtigster Treiber ist das Hormon Thrombopoetin (TPO) über den Megakaryozyten-spezifischen Rezeptor c-Mpl (engl. *myeloproliferative leukemia protein*, CD110).³²⁻³⁵ TPO wird vorwiegend in der Leber^{36,37} synthetisiert, zu kleineren Anteilen auch direkt im Knochenmark³⁸ oder in den Nieren³⁹. Die Regulation geschieht unter physiologischen Bedingungen über die irreversible Bindung von TPO an c-Mpl auf Thrombozyten, so dass bei reduzierter Thrombozytenzahl der TPO-Spiegel im Blut entsprechend ansteigt.⁴⁰ Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass alternde und somit desialylierte Blutplättchen über den Ashwell-Morell Rezeptor (AMR) in der Leber geklärt werden und über den JAK2/STAT3-Weg die mRNA-Expression für TPO steigern.⁴¹ Auch unter inflammatorischen Bedingungen zeigt sich ein durch IL-6 ausgelöster TPO-Anstieg mit entsprechend gesteigerter Plättchenproduktion.^{42,43}

Obwohl TPO^{-/-} bzw. c-Mpl^{-/-} Knock-out Mäuse eine ausgeprägte Thrombopenie mit nur noch 10 % der Thrombozyten zeigen, können die verbleibenden Megakaryozyten weiter funktionsfähige Blutplättchen produzieren.⁴⁴⁻⁴⁶ Die Thrombopoese kann temporär durch die Megakaryozyten-aktiven Zytokine CXCL12 / SDF1 und FGF-4 wiederhergestellt werden, wobei IL-6 und IL-11 keinen Effekt zeigen, da diese lediglich die TPO-Sekretion anregen.⁴⁷

Dies bestärkt, dass TPO und c-Mpl eine essenzielle Funktion in der Megakaryopoese besitzen, jedoch weitere Faktoren für die finale Thrombopoese verantwortlich sein müssen.

Die Transkriptionsfaktoren GATA-1 und FOG (engl. *friend of GATA-1*) spielen eine wichtige Rolle in der Ausreifung der Megakaryozyten, ihre Abwesenheit resultiert in unausgereiften Megakaryozyten, sowie einer deutlichen Thrombopenie und insuffizienten Thrombozyten mit unzureichender Granula.^{48–50} Der Knock-out von NF-E2 (engl. *nuclear factor, erythroid 2*) führt im Mausmodell zu tödlicher Thrombopenie, obwohl die Megakaryozyten selbst scheinbar normal ausreifen.⁵¹ Auffällig ist jedoch das Fehlen des zytoskelettalen β_1 -Tubulin⁵² in Megakaryozyten und Blutplättchen, sowie der Verlust von Thromboxan⁵³ in der Granula.

Im Verlauf der Differenzierung bilden die Megakaryozyten unter dem Einfluss von TPO und Transkriptionsfaktoren wichtige Oberflächenproteine aus, insbesondere sogenannte Integrine, welche Zell-Adhäsionen vermitteln können.⁵⁴ So bildet z.B. Integrin β_3 (CD61) gemeinsam mit Integrin α_{IIb} (CD41) das Glykoprotein GPIIb/IIIa, welches Fibrinogen binden und in die Zelle aufnehmen kann.⁵⁵ Weitere Glykoproteine sind z.B. GPIb (CD42) als Teil GPIb-IX-V-Komplexes, welcher auch als von-Willebrand-Faktor-Rezeptor (vWF-R) bezeichnet wird, da er bei der Blutstillung als Bindestelle für den von-Willebrand-Faktor (vWF) dient – sein Verlust bewirkt jedoch zusätzlich eine unzureichende Pro-Plättchen-Formation, wie z.B. im Bernard-Soulier Syndrom sichtbar wird.^{56,57}

1.1.4 Thrombopoese

Äquivalent zur Hämatopoese beschreibt die Thrombopoese die Bildung von Thrombozyten aus Megakaryozyten. Eine der wichtigsten Fähigkeiten der Megakaryozyten ist die Endomitose: die mehrfache Verdopplung des haploiden Chromosomensatzes ohne Zellteilung.⁵⁸ Somit entsteht ein multilobulär gelappter Kern (Polyploidie), der bis zum 128n-Stadium reichen kann, wobei 16n das häufigste Stadium ist.⁵⁹ Dies gewährleistet die metabolische Leistungsfähigkeit für die enorme Anzahl benötigter Zellorganellen, Proteine und Granula für die zu produzierenden Plättchen.⁶⁰

Die Polyploidie begünstigt die Bildung des Demarkations-Membransystems (DMS, engl. *demarcation membrane system*), eines labyrinthartig verschlungenen Netzes aus Membranen und Zisternen, das durch Einstülpung der äußeren Zellmembran entsteht und die benötigten Oberflächenmembranen für die Vielzahl der entstehenden Pro-Plättchen und Plättchen bildet.^{61–64}

Durch eine ausgedehnte Reorganisation des Zytoskeletts transformieren Megakaryozyten über mehrere Stadien zu Plättchen, wobei die wichtigsten Proteinbausteine Tubulin und Aktin bilden.²⁸ Mikrotubuli sind hohle Röhren aus α - und β -

Tubulin (negativ bzw. positiv geladen), die sich durch kontinuierlichen Auf- und Abbau verformen können und so die Ausdehnung und Polarisation der Zellen mit der Bildung von Pseudopodien ermöglichen (Abbildung 1.2, A-C).⁵² Unter dem Einsatz von zytoplasmatischem Motorprotein Dynein gleiten die Mikrotubuli aneinander und bilden lange Pro-Plättchen aus.⁶⁵ F-Aktin und sein Motorprotein Myosin bewirken die Biegung und Verzweigung der Pro-Plättchen (Abbildung 1.2, D) und sind insbesondere in den anschwellenden Enden der Zellausläufer zu finden (vgl. auch Konfokalmikroskopie, Abbildung 3.10).^{66–68} Ebenfalls über Mikrotubuli-basierten Transport gelangen die benötigten Zellorganelle und Granula in die Pro-Plättchen.⁶⁹ Final kommt es zu der Abschnürung der kernlosen Pro-Plättchen und dem Ausscheiden der Zellkerne (Abbildung 1.2, E).

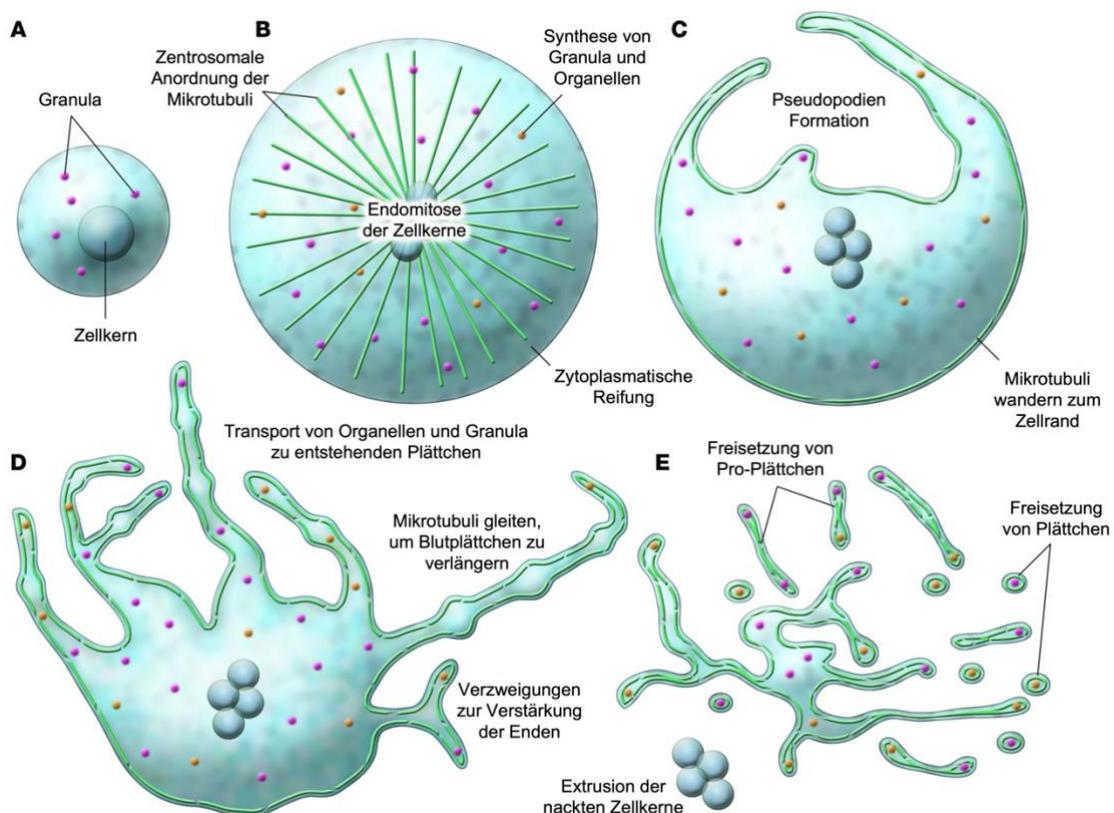


Abbildung 1.2: Differenzierung von Megakaryozyten zu Plättchen. Schematische Übersicht der stufenweisen Differenzierung von unreifen Megakaryozyten (A) zu freigesetzten Plättchen (E): (B) Während der Endomitose geschieht die zytosomatische Reifung und Ausdehnung, mit der massiven Bildung von Zellorganellen. Die Anordnung der Mikrotubuli beginnt ausgehend von den Zentrosomen. (C) Vor dem Beginn der Pro-Plättchen-Formation bauen sich die Zentrosome ab und die Mikrotubuli wandern zum Zellkortex. Die Ausbildung von Pseudopodien beginnt. (D) Das Gleiten von überlappenden Mikrotubuli treibt die Ausdehnung der Pro-Plättchen voran. Zellorganellen werden in die sich verzweigenden Ausläufer geschleust. (E) Das gesamte Zytoplasma der Megakaryozyten wird in Pro-Plättchen umgewandelt, die aus der Zelle freigesetzt werden und im weiteren Verlauf finale Plättchen bilden. Die verbliebenen Zellkerne werden ausgeschieden. (Übersetzt aus: Patel et al.,²⁸ mit freundlicher Genehmigung, erteilt durch Copyright Clearance Center, Inc.)

Diese Abschnürungen (engl. *shedding*) konnten *in vitro*^{65,66,70} und *in vivo*^{29,71,72} beobachtet werden, letzteres erstmals 2007 durch Junt et al. mittels intravitraler Multiphotonenmikroskopie in der Schädelkalotte von Mäusen. Hierbei entstehen

diskoidale und hantelförmige Fragmente, die mit 3-10 µm noch doppelt- bis sechsfach so groß wie Plättchen sind und auch als Plättchen-assoziierte Fragmente oder Prä-Plättchen bezeichnet werden.⁷⁰ Die weitere Ausreifung und Teilung in einzelne Plättchen geschieht mutmaßlich im Blutstrom³⁰ unter Scherkräften,^{71,73,74} wurde aber auch vereinzelt z.B. in der Lunge³¹ beschrieben.

Während die Plättchen-Formation *in vitro* in alle Richtungen geschieht,^{66,70} findet der Prozess *in vivo* gerichtet zu den Sinusoiden hin statt. Diese gezielte Ausrichtung wird unter anderem durch S1P (Sphingosin-1-phosphat) über den Rezeptor S1PR1 auf Megakaryozyten zytotaktisch vermittelt, welcher auch das Abschnüren der Vorläufer-Plättchen in die Blutbahn verstärkt.⁷¹

Es konnte gezeigt werden, dass die bloße Translokation von Megakaryozyten-Vorläuferzellen in die Nähe der Sinusoide die Ausreifung beschleunigt.⁴⁷ Dies legt die Vermutung nahe, dass eine direkte Zell-Zell-Interaktion Einfluss auf die Ausreifung hat: außerhalb der komplexen dreidimensionalen Struktur des Knochenmarks ist die Thrombopoese *in vitro* zwar genauso möglich, jedoch deutlich verlangsamt.⁷⁵ Die Thrombopoese wird gefördert durch CXCL12 und FGF-4 (engl. *fibroblast growth factor 4*), welche die Expression der Adhäsionsmoleküle VLA-4 (engl. *very late antigen-4*) auf Megakaryozyten und der entsprechenden Bindestelle VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion protein 1*, CD106) auf perivaskulären Endothelzellen steigern.^{76,77} Die Unterbrechung dieser direkten VE-Cadherin (engl. *vascular endothelial cadherin*, CD144) medierten Zell-Zell-Kontakte führt dazu, dass die vaskuläre Nische nicht mehr in der Lage ist, die Megakaryozyten-Reifung zu unterstützen und den Weg in den Blutstrom zu leiten.⁴⁷

Unter inflammatorischen Bedingungen kann es akut zum hohen Verbrauch von Thrombozyten und konsekutiv kurzfristiger Thrombopenie kommen.^{78,79} Hier konnte einerseits gezeigt werden, dass die notfallmäßig beschleunigte Bildung von Megakaryozyten direkt aus entsprechend vorgeprägten HSCs über posttranskriptionelle Modifikation ohne Zwischenstufen möglich ist, aus sogenannten Stammzell-ähnliche Megakaryozyten-Progenitorzellen (engl. *stem-like megakaryocyte committed progenitors*, *SL-MkPs*).⁸⁰ Nishimura *et al.* beschreiben ebenfalls einen alternativen Weg, der über inflammatorisches IL-1 α zur schnellen „Ruptur“ der Megakaryozyten mit sofortiger Freisetzung von Plättchen in die Sinusoide führt und kurzfristig eine zwanzigfache Steigerung der Thrombozyten-Produktion ermöglicht.⁷²

1.1.5 Thrombozyten

Die Thrombozyten (griech. *thrombos* „Klumpen“, *kytos*, „Zelle“) gehören mit 1-3 μm zu den kleinsten Zellen im Körper und dienen primär der Blutstillung (Hämostase).⁸¹ Im Ruhezustand haben sie eine bikonvexe Form und werden deshalb auch als Blutplättchen bezeichnet. Bei Aktivierung verformen sie sich und bilden zahlreiche fingerförmige Pseudopodien aus und verkleben sich unter dem Einfluss von Gerinnungsfaktoren zu Thromben, um geschädigte Gefäße zu verschließen.^{81,82}

Im menschlichen Blut zirkulieren etwa eine Billion (10^{12}) Thrombozyten, was bei ca. 5 Liter Blutvolumen einer durchschnittlichen Thrombozytenzahl von 150.000-450.000/ μl entspricht. Wenn man die durchschnittliche Lebensdauer der Blutplättchen von nur 8-10 Tagen betrachtet und das ungefähr ein Drittel als Reservoir in der Milz gespeichert werden, so muss ein erwachsener Mensch täglich 100 Milliarden (10^{11}) neue Thrombozyten bilden.^{83,84}

Bei Säugetieren verfügen die Thrombozyten über keinen Zellkern mehr.⁸⁵ Dies bedeutet, dass sie selbst keine Transkription betreiben können und somit fast vollständig auf den von Megakaryozyten vorab gebildeten Vorrat an Proteinen und Granula angewiesen sind. In geringem Umfang können sie über mitgegebene mRNA noch eine begrenzte Proteinbiosynthese betreiben.^{86,87}

Zu ihren wichtigsten Oberflächenmarkern gehört der bereits angesprochene vWF-Rezeptor (auch: GPIb-IX-V-Komplex, CD42).⁸⁸ Bei Schädigungen der Gefäßwand wird vWF aus Weibel-Palade-Körperchen frei, über den die Thrombozyten mit ihrem vWF-Rezeptor an subendotheliales Kollagen binden können und aus ihrer α -Granula weiteren vWF ausstoßen. Dies führt zur Konformationsänderung der Plättchen und der Sekretion von ADP (Adenosindiphosphat), welches über ihren P2Y₁₂-Rezeptor weitere Thrombozyten rekrutiert und aktiviert. Parallel aktiviert der subendotheliale Gewebefaktor (engl. *tissue factor*, Gerinnungsfaktor III) den Gerinnungsfaktor VII zu VIIa, welcher als Serinprotease weitere Gerinnungsfaktoren aktiviert. Der auf den Plättchen aktivierte GPIIb/IIIa-Rezeptor ermöglicht zusammen mit den weiteren Gerinnungsfaktoren (I-XIII) über deren Endprodukt Fibrin die Quervernetzung der Thrombozyten und die Stabilisierung des Thrombus (Abbildung 1.3).^{81,89}

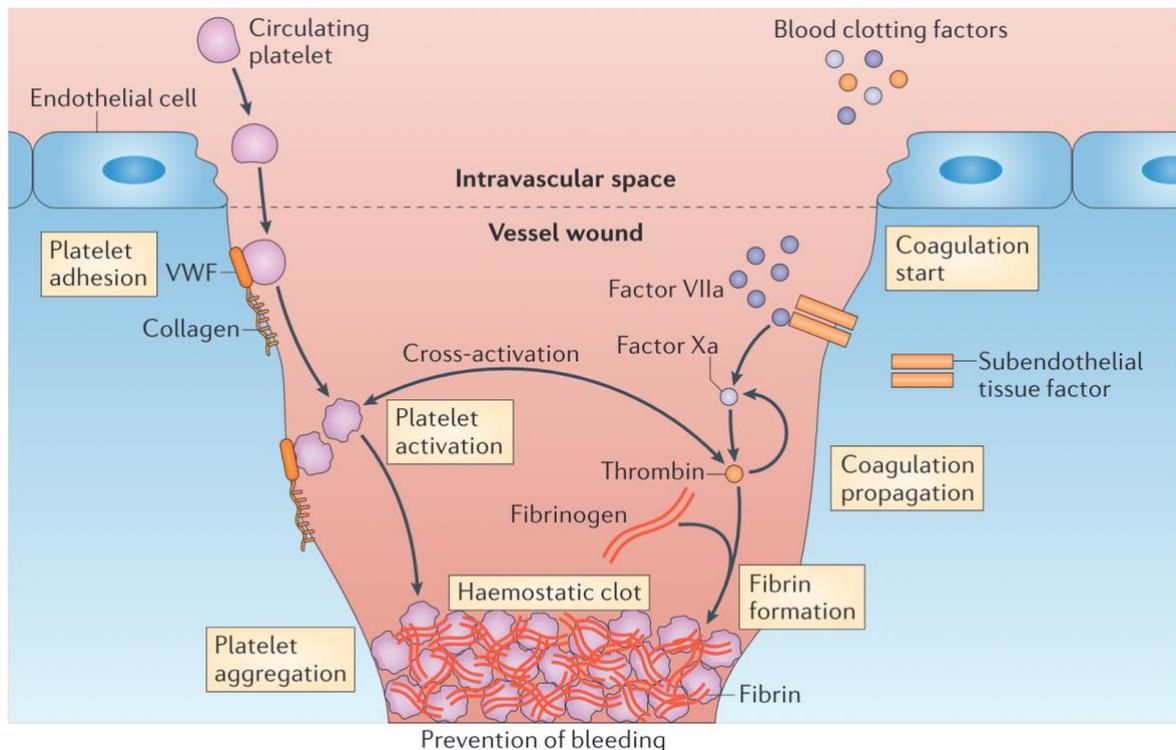


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Hämostase. Zelluläre Blutplättchen und lösliche Gerinnungsfaktoren agieren hierbei in engem Zusammenspiel, um Blutgerinnsel zum Wundverschluss zu bilden. Bei einer Gefäßverletzung wird u.a. subendothelialer von-Willebrand Faktor (vWF) frei, der Thrombozyten aktiviert und anheften lässt. Ebenfalls wird Gewebefaktor (Gerinnungsfaktor III) frei, der den im Blut befindlichen Gerinnungsfaktor VII zu VIIa aktiviert, welcher als Serinprotease die Kaskade der weiteren Gerinnungsfaktoren anstößt. Über mehrere Zwischenschritte erfolgt in der gemeinsamen Endstrecke die Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin, welches das entstanden Netz aus aktivierten Thrombozyten zum finalen Thrombus verfestigt. (Aus: Engelmann et al.,⁹⁰ mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

Niedere Wirbeltiere (z.B. Vögel, Reptilien und Fische) besitzen keine eigenen kernlosen Thrombozyten, sondern kernhaltige Hämozyten. Diese ähneln den Makrophagen der Säugetiere und erfüllen Aufgaben des Immunsystems über Toll-like Rezeptoren (TLR), Phagozytose und antimikrobielle Peptide, gewährleisten jedoch ebenfalls die Gerinnung und Wundverschluss.^{91,92} Dies zeigt evolutionsbiologisch eine Verbindung zwischen Gerinnungs- und Immunsystem, welche in den letzten Jahren auch bei höheren Wirbeltieren immer weiter erforscht wurde.⁹²

So konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten ebenfalls zur angeborenen Immunabwehr beitragen und z.B. über den vWF-Rezeptor und GPIIb/IIIa Bakterien binden können.^{93,94} Zusätzlich exprimieren sie eine ganze Reihe von Toll-like Rezeptoren,⁹⁵ von denen insbesondere TLR4 bei der Erkennung von Bakterien anhand von Lipopolysacchariden (LPS) beteiligt ist.^{96,97}

Blutplättchen werden generell als erste Zellen bei Gewebeschäden aktiviert und rekrutieren ihrerseits Immunzellen, wie z.B. Dendritische Zellen und insbesondere Neutrophile Granulozyten.⁹⁴

1.1.6 Neutrophile Granulozyten

Die Neutrophilen Granulozyten gehören zum unspezifischen angeborenen Immunsystem und stellen beim Menschen mit ca. 50-70 % den größten Teil der zirkulierenden Leukozyten. Ihr Namen leitet sich von dem Vorhandensein zahlreicher Granula ab, sowie ihrem Aussehen in der Pappenheim-Färbung: bei gleichen Anteilen positiv und negativ geladener Granula färben sie eher „neutral“, im Unterschied zu den anderen „eosinophilen“ oder „basophilen“ Granulozyten.⁹⁸ Mit Durchmessern von 7-10 μm liegen sie im Normbereich der Größe von Blutzellen und lassen sich vor allem an ihrem segmentierten Kern erkennen.⁹⁸ Ein kritisches Absinken der Neutrophilen Granulozyten wird als Neutropenie bezeichnet und kann schwere Infektionen bis zur tödlichen Sepsis verursachen.⁹⁹

Neutrophile Granulozyten entwickeln sich über 7-10 Tage im Knochenmark, ihre folgende Lebensdauer in der peripheren Blutbahn wird kontrovers diskutiert, ist jedoch eher kurz und liegt mutmaßlich im Bereich von mehreren Stunden.¹⁰⁰⁻¹⁰²

Bei Aktivierung in entzündetem Gewebe kann sich ihre Lebensdauer jedoch um ein vielfaches steigern^{103,104} und wurde bis zu 48 h beobachtet¹⁰⁵.

Sie entstehen aus HSCs über dieselben Myeloiden Progenitorzellen wie die Megakaryozyten (Abbildung 1.1), vorwiegend unter dem Einfluss des Hormons G-CSF (engl. *granulocyte colony stimulating factor*).¹⁰⁶ Dieses wird maßgeblich durch die Apoptose von alten Granulozyten reguliert, welche im Gewebe durch Makrophagen und Dendritische Zellen abgebaut werden. Diese drosseln daraufhin ihre Produktion von IL-23, welches über IL-17A sonst G-CSF stimuliert.^{107,108} Eine vermehrte Bildung von Granulozyten mit vermehrtem Abbau reduziert somit das Wachstumssignal und hält darüber die Zellzahl in Balance.

Die granulozytäre Reifung wird durch Transkriptionsfaktoren wie PU.1 und die Familie der C/EBP $_{\alpha-\zeta}$ (engl. *CCAAT/enhancer-binding protein*) reguliert^{109,110} und geschieht über mehrere Stadien von Myeloblast, Promyelozyt, Myelozyt, Metamyelozyt zum (unreifen) stabkernigen und schließlich zum (reifen) segmentkernigen Granulozyt.⁹⁸

Im Fall einer Entzündung müssen die Leukozyten den Blutstrom verlassen um in das umliegende Gewebe einzuwandern (Transmigration), was durch den mehrstufigen Prozess der Adhäsionskaskade beschrieben wird.¹¹¹

Diese wurden in den letzten Jahren immer weiter genauer unterteilt, besteht jedoch klassischerweise aus den folgenden drei Phasen:

Phase 1 beginnt mit dem „Rollen“ an der Gefäßwand um abzubremsen und ist vorwiegend durch Selektine vermittelt, auf den Leukozyten z.B. L-Selektin

(CD62L) und PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand-1, CD162), am Endothel entsprechend P-Selektin (CD62P) und GlyCAM-1 für L-Selektin.¹¹²

Phase 2 beschreibt die „Aktivierung“, welche vorwiegend durch Chemokine geschieht, z.B. TNF α (Tumor-Nekrose Faktor α), CCL2 oder IL-1 β .¹⁰⁴

In Phase 3 geschieht die festere „Adhäsion“ mit langsamem „Kriechen“ sowie der „Transmigration“, durch spezielle Integrine.⁵⁴ Hierzu zählen auf Leukozyten z.B. LFA-1 (aus Integrin β -1/CD18 und Integrin α -L/CD11a), Mac-1 (aus CD18 und Integrin α -M/CD11b) und VLA-4, welche an endotheliales ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*, CD54) oder VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule 1*, CD106) binden können.¹¹²

Die Pathogenabwehr durch Neutrophile Granulozyten basiert auf drei Prinzipien: der Phagozytose, der Bildung von Bakteriziden und der NETose.⁹⁸

Wenn Leukozyten Krankheitserreger detektieren, können sie entweder Bakterizide nach extrazellulär sezernieren oder die Erreger direkt phagozytieren (griech. *phagein* „fressen“, *kytos* „Zelle“), um sie innerhalb der einverleibten abgekapselten Phagosome gezielt zu eliminieren. Dies geschieht über zytotoxische Sauerstoffradikale (Peroxide) durch die NADPH-abhängige Oxidase (ROS, engl. *reactive oxygen species*).¹¹³ Als weitere Bakterizide kommen die Myeloperoxidase (MPO) zum Einsatz, welche Chlorid zum stark anti-mikrobakteriellen Hypochlorit katalysiert oder auch z.B. Cathepsin, Defensin, Lactoferrin und Lysozym.¹¹⁴ Bereits nach wenigen Phagozytosen sind die Glykogenspeicher der Leukozyten aufgebraucht, so dass sie im programmierten Zelltod der Apoptose (griech. *apoptōsis* „Abfallen“, bezogen auf Blätter im Herbst) untergehen und Eiter bilden. Hierbei schütten sie verbliebene Granula und Chemokine aus, was wiederum weitere Immunzellen anlockt.¹⁰⁴

Eine Sonderform des Zelltods stellt die NETose dar: besonders stark aktivierte Neutrophile Granulozyten können extrazelluläre Pathogene durch den Ausstoß von NETs (engl. *neutrophil extracellular traps*) „einfangen“.^{115,116} Diese NETs bestehen aus DNA-Strängen, an welche Histone und Bakterizide (z.B. Myeloperoxidase, Cathepsin und Lactoferrin) gebunden sind, welche sich um die Pathogene legen um diese zu immobilisieren und anzugreifen.^{112,117} Die komplexen NETs binden unter anderem vWF und Gerinnungsfaktor XII, was die Interaktion mit Blutplättchen und der Gerinnungskaskade aktiviert und auch als „Immunothrombose“⁹⁰ bezeichnet wird und im Folgenden genauer erläutert werden soll.

1.2 Zell-Zell-Interaktion

Höhere Lebewesen sind Mehrzeller, die einerseits einen gemeinsamen Stoffwechsel und andererseits eine Aufgabenteilung besitzen, welche über spezialisierte Zellen geschieht, die Gewebe und Organe bilden.¹¹⁸ Grundlage für das Funktionieren mehrzelliger Organismen ist die Kommunikation der Zellen untereinander um gemeinsam übergeordnete Aufgaben erfüllen zu können.

Diese kann entweder über direkten Zell-Zell-Kontakt erfolgen durch Oberflächenmoleküle (wie z.B. Rezeptoren und Liganden, Integrine und Adhäsionsmoleküle) oder durch lösliche Botenstoffe (wie z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren, Chemokine oder Zytokine).¹¹⁹

Im Folgenden soll es insbesondere um die bisher bekannten Wege der Interaktion zwischen Neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten, bzw. ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, gehen.

1.2.1 Neutrophile Granulozyten und Thrombozyten

Eine Gefäßverletzung birgt sowohl die Gefahr des Blutverlustes als auch des Eindringens von Krankheitserregern. Wie bereits erläutert gibt es in niederen Wirbeltieren noch die gemeinsamen Hämozyten, die Funktionen der Thrombozyten und der Leukozyten übernehmen^{91,92} und auch bei höheren Wirbeltieren entstehen beiden Zellen aus denselben myeloiden Vorläuferzellen.¹

Aufgrund ihrer kleinen Größe befinden sich die Thrombozyten durch die Strömungskräfte vorwiegend am Rand des Blutstroms nahe der Gefäßwände¹²⁰ und überwiegen mit ihrer Anzahl die Leukozyten um ca. 40:1.⁹⁴ Somit scheint es nur folgerichtig, dass die Thrombozyten als „Ersthelfer“ bei einer Gefäßverletzung auch das Immunsystem aktivieren, z.B. über die Expression von P-Selektin, welches über PSGL-1 die leukozytäre Adhäsionskaskade anstößt.¹²¹

Weitere direkte Interaktion geschieht über die Bindung von CD40 auf Leukozyten an CD40-Ligand (CD40L, auch: CD154) auf Plättchen,^{122,123} wobei dieser ebenfalls an CD40 auf Endothelzellen binden kann und dort über die Hochregulation von ICAM-1 und VCAM-1 sowie die Sekretion von CCL2 weitere Leukozyten rekrutiert.¹²⁴ Zusätzlich können Plättchen auch löslichen CD40L sezernieren, was mit vaskulären Zellen interagiert und dort P-Selektin, E-Selektin, IL-6 und Gewebefaktor (engl. *tissue factor*) freisetzt, welche die Leukozyten-Rekrutierung und die Gerinnung verstärken.¹²⁴ Weiter sezernieren Thrombozyten selbst multiple inflammatorische Mediatoren, wie diverse CXC-Chemokin Liganden, z.B. CXCL1, CXCL4, CXCL5, CXCL7, CCL3 und CCL7.^{90,92,125} Einen ebenfalls wichtigen Kommunikationsweg stellen die leukozytären Integrin-Komplex Mac-1 dar,

welcher mit thrombozytärem CD42b (auch: GPIb, Teil des vWF) feste Bindungen eingehen können und somit Thromben stabilisieren.^{126,127}

Der auf Plättchen vorkommende TLR4 dient nicht nur der Erkennung und Bindung von bakteriellem LPS und Bakterien selbst, hierüber kann auch eine direkte Interaktion mit Neutrophilen Granulozyten erfolgen, was deren Degranulation bis zur NETose zur Folge hat.¹²⁸ Die gebildeten NETs sind selbst stark gerinnungsfördernd, aktivieren Faktor XII (vermutlich über ihre negative Oberfläche), binden löslichen vWF und Gewebefaktor und inaktivieren seinen Gegenspieler TFPI (engl. *tissue factor pathway inhibitor*).^{129,130}

Weitere Immunzellen wie z.B. Monozyten werden durch DAMPs oder PAMPs (engl. *danger / pathogen associated molecular patterns*) aktiviert und aktivieren ihrerseits über Gewebefaktor die Gerinnungskaskade. Der myeloide Rezeptor TREM-1 (engl. *triggering receptor expressed on myeloid cells 1*) kommt vorwiegend auf Monozyten und Neutrophilen vor, wurde aber ebenfalls auf Thrombozyten beschrieben und ist bei verschiedenen Pathologien wie Sepsis oder Ischämien erhöht.¹³¹ In Kombination mit aktivierten TLRs stimuliert TREM-1 verschiedene granulozytäre Effektoren, wie die reaktiven Oxygen-Spezies (ROS), Phagozytose oder IL-8.¹³¹

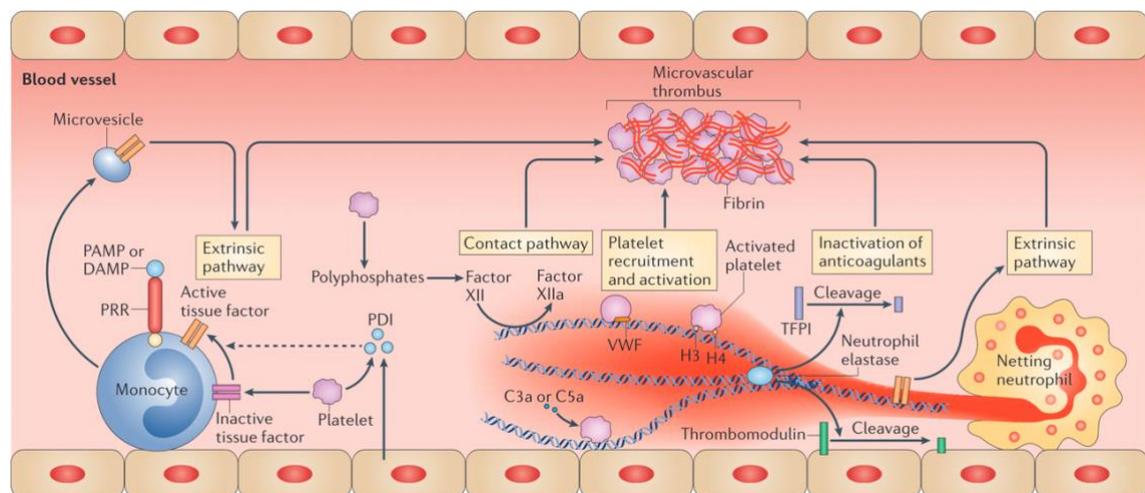


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Immunothrombose. Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten erkennen Pathogene über DAMPs oder PAMPs (engl. *danger / pathogen associated molecular patterns*) und können über Gewebefaktor und Mikrovesikel die Gerinnungskaskade anstoßen. Bei Aktivierung können Neutrophile Granulozyten Bakterizide und NETs ausstoßen, welche wiederum durch Gewebefaktor, Gerinnungsfaktor XII und vWF die Gerinnungskaskade und die Thrombozyten aktivieren. Auch Thrombozyten können Pathogene erkennen (z.B. über TLR4 oder vWFR) und durch Chemokine weitere Thrombozyten und Leukozyten rekrutieren. In engem Zusammenspiel von Immunsystem und Gerinnungssystem entsteht so eine (Mikro-)Thrombose zur Pathogenabwehr: die Immunothrombose. (Aus: Engelman et al.,⁹⁰ mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

Für diese synergistisch gebildeten Thromben zur Pathogenabwehr prägten Engelman und Massberg den Begriff der „Immunothrombose“ (Abbildung 1.4).⁹⁰

Dieses Zusammenspiel zeigt großes Potenzial in der Pathogenabwehr, kann jedoch auch zu unkontrollierbaren Komplikationen wie Thrombosen oder Verbrauchskoagulopathie bei Sepsis führen.⁹⁰

1.2.2 Neutrophile Granulozyten und Megakaryozyten

In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass sich Neutrophile Granulozyten im Knochenmark überproportional häufig in direkter Nähe zu Megakaryozyten befinden, verglichen mit der rein zufälligen Verteilung einer Computersimulation.¹³² Auch konnte gezeigt werden, dass der Übertritt von Neutrophilen aus dem Knochenmark in den Blutstrom mittels G-CSF indirekt über Megakaryozyten reguliert wird: G-CSF steigert die Sekretion von TPO (mutmaßlich aus Stromazellen), welches bei der Aktivierung von Megakaryozyten auch die Sekretion von CXCL-1 und CXCL-2 auslöst, die den Ausstrom der Neutrophilen erleichtern.¹³³

Die Emperipolesis (griech. *em-* „innen“, *peripoleomai* „umherwandern“) wurde erstmals 1965 von Humble *et al.* als besondere Form der Zell-Zell-Interaktion beschrieben, bei der eine Zelle in eine andere eindringt, in ihr „umherwandert“ und sie anschließend wieder intakt verlassen kann.¹³⁴ Dies unterscheidet die Emperipolesis wesentlich von der Phagozytose oder der Entose, bei denen die aufgenommenen Zellen jeweils abgetötet werden bzw. nach der Interaktion versterben.^{135,136}

Vorwiegend wurde die Emperipolesis in (ca. 5- bis 10-größeren) Megakaryozyten beobachtet und dort vor allem durch Neutrophile Granulozyten, aber auch in Tumorzellen durch Lymphozyten.¹³⁴ Ihr Vorkommen ist unter anderem bei der seltenen Rosai-Dorfman-Erkrankung (auch: Sinus-Histiozytose mit massiver Lymphadenopathie) erhöht und dient hier als Prognosekriterium.¹³⁷

Emperipolesis wurde bei allen bisher untersuchten Säugetieren nachgewiesen und findet sich im gesunden Knochenmark je nach Spezies und Quelle bei ungefähr 1-15 % der Megakaryozyten.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Eine gesteigerte Emperipolesis tritt bei Pathologien mit vermehrter Bildung von Thrombozyten auf, u.a. nach Blutung¹⁴¹, bei Thrombopenie¹⁴² oder myelodysplastischen Erkrankungen, wie der Polycythaemia Vera¹⁴³, der essentiellen Thrombozythämie¹⁴² oder dem makrothrombozytopenen Grey-Platelet-Syndrome¹⁴⁴ (vgl. Abbildung 1.5, A). Ebenfalls wurde Emperipolesis vermehrt beobachtet bei übermäßiger Bildung oder gesteigertem Bedarf an Neutrophilen Granulozyten, z.B. bei Inflammation¹³⁹ oder myelodysplastischen Erkrankungen wie der Chronisch Granulozytären Leukämie¹⁴³, aber auch bei sublethaler Bestrahlung¹⁴⁰ und bei schwerer Myelofibrose¹⁴⁵.

Mittels zeitaufgelöster Mikroskopie konnte die Emperipolesis genauer beobachtet werden und dauert durchschnittlich ca. 10-40 min.^{147,148} Vermittelt wird dies mutmaßlich über dieselben Rezeptor/Liganden-Paare wie bereits oben zur Megakaryozyten-Neutrophilen Interaktion beschrieben, u.a. ICAM-1/CD18^{147,149}, P-Selektin/PSGL-1¹⁵⁰ oder CD42b/CD18¹²⁶.

Eine neuere Studie legt hierbei nahe, dass Neutrophile während dem „Durchwandern“ der Megakaryozyten Kontakt zum Demarkations-Membransystem (DMS) haben und darüber letztlich Membranbestandteile an die zukünftigen Blutplättchen abgeben¹⁴⁷ (vgl. Abbildung 1.5, C), was ein weiteres Indiz für das immuno-thrombotische Zusammenspiel sein könnte.

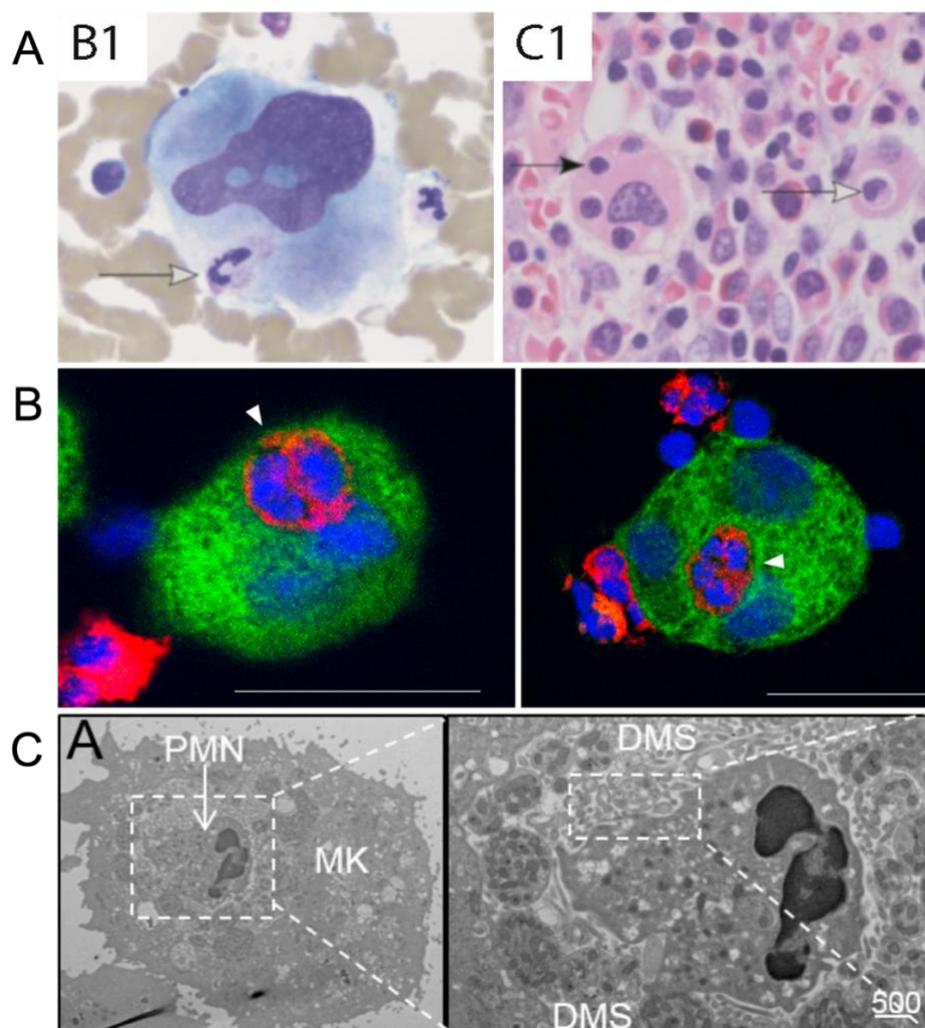


Abbildung 1.5: Beispiele von Emperipolesis in Megakaryozyten. Pfeile markieren beispielhaft Neutrophile Granulozyten im Inneren von Megakaryozyten. (A) Emperipolesis im Knochenmarksausstrich einer 11-jährigen Patientin mit Grey-Platelet-Syndrom (links: Wright-Giemsa-Färbung; rechts: HE-Färbung). (B) Konfokalmikroskopie von Emperipolesis bei isolierten humanen Knochenmarkszellen (grün: CD41; rot: CD15; blau: Hoechst; Skalierungsbalken: 20 μ m) (C) Elektronenmikroskopie bei Emperipolesis von murinen Zellen zeigt den engen Kontakt der Neutrophilen Granulozyten zum megakaryozytären demarcation membrane system (DMS). (MK: Megakaryozyt; PMN: Neutrophiler Granulozyt; Skalierungsbalken: 500 nm). ((A) Aus: McGinnis et al.¹⁴⁶, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier; (B-C) Aus: Cunin et al.¹⁴⁷, mit freundlicher Genehmigung durch die CC-Lizenz BY 4.0)

1.3 Fragestellung

Neutrophile Granulozyten und Thrombozyten bilden jeweils essenzielle Funktionen für das Immunsystem bzw. für das Gerinnungssystem. Evolutionsbiologisch und in niederen Wirbeltieren werden ihre Aufgaben noch durch eine gemeinsame Zellart abgebildet – auch in höheren Wirbeltieren entstehen beide aus der myeloiden Reihe und reifen in engem Kontakt zueinander im Knochenmark aus.

Das Zusammenspiel von Neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht und hat unter anderem zum Konzept der Immunthrombose geführt. Es wurden bereits wichtige Mechanismen und molekulare Signalwege gefunden, über die beide Zellarten interagieren, insbesondere zur immunologischen Funktion.

Auf Ebene der Vorläuferzellen zwischen Neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten wurde vorwiegend die Emperipolesis als Phänomen der Zell-Zell-Interaktion beschrieben, welches insbesondere bei vermehrtem Bedarf an Thrombozyten bzw. Granulozyten gesteigert ist.

Daher vermuten wir, dass die Emperipolesis und somit die Interaktion von Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten auch direkten oder indirekten Einfluss auf die Thrombopoese hat.

Das Anliegen der vorliegenden Arbeit ist es, mögliche Formen der Interaktion zwischen Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten zu identifizieren und Auswirkungen auf die Thrombopoese zu untersuchen. Als bekanntes Beispiel soll in einem ersten Schritt die Emperipolesis untersucht werden.

Wichtigstes Ziel ist die Etablierung einer Co-Kultur aus primären Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten, um an dieser unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* mögliche Interaktionen und die Auswirkung auf die Thrombopoese untersuchen zu können. Letztere soll anhand bildmorphologischer und durchflusszytometrischer Methoden quantifiziert und analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Vorbemerkung und Genehmigung

Die folgenden Versuche sind im Zeitraum von Oktober 2014 bis Dezember 2016 mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern und unter Wahrung des deutschen Tierschutzgesetzes am Klinikum der Universität München und am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt worden.

2.1.2 Versuchstiere

Alle Versuche wurden mit Wildtyp Mäuse C57BL/6 (Charles River Germany, Sulzfeld) durchgeführt. Die Tiere wurden im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin unter standardisierten Laborbedingungen und mit freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Zur Organentnahme wurden die Tiere im Beisein von Veterinären mit Isofluran (Abbott, Wiesbaden) narkotisiert und mittels zervikaler Dislokation euthanasiert.

2.1.3 Antikörper

Spezifität (anti-Maus)	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CD11b *	FITC	M1/70	BioLegend
CD41 **	FITC	MWReg30	BioLegend
CD42b	PE	Xia.G5	emfret
CD42d ***	APC	1C2	BioLegend
CD62L ****	PE	MEL-14	BD Biosciences
GPVI	PE	784808	R&D Systems
Ly6G ****	PE	1A8	BD Pharmigen
MPO	FITC	2D4	LifeSpan BioSciences
Isotyp Ratte IgG2bκ *	FITC	eB149/10H5	eBioscience
Isotyp Ratte IgG1κ **	FITC	RTK2071	BioLegend
Isotyp Hamster IgG ***	APC	HTK888	BioLegend
Isotyp Ratte IgG2aκ ****	PE	eBM2a	eBioscience
β-Tubulin	Alexa Fluor 647	22833	Invitrogen
F-Aktin (Phalloidin)	Alexa Fluor 488	(kein AK)	Invitrogen

Die Anzahl Sternchen (*) markiert jeweils die korrespondierende Isotyp-Kontrolle.

2.1.4 Puffer und Reagenzien

Name	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich
L-15 Medium (Leibovitz)	Biochrom
Recombinant Mouse Thrombopoetin (rmTPO)	Immunotools
EasySep PE Positive Selection Kit	STEMCELL Technologies
MACS Neutrophil Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec
MACS Lineage Cell Depletion Kit, mouse	Miltenyi Biotec
MACS LD Columns	Miltenyi Biotec
TO-PRO-3	Invitrogen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle weiteren Puffer und Reagenzien mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt und von den Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.5 Geräte und Software

Name	Hersteller
Tischzentrifuge 5804R	Eppendorf
Durchflusszytometer Gallios	Beckman Coulter
Kryostat-Mikrotom	Leica
Mikroskop Axiovert 200 mit HRc-Axiocam Kamera	Carl Zeiss Microscopy
Mikroskop Axio Imager 2 mit AxioCamICc5 Kamera	Carl Zeiss Microscopy
Konfokalmikroskop Leica TCS SP5	Leica Microsystems
FlowJo (Version 10.7.2)	FlowJo LLC
GraphPad Prism (Version 8.4.3)	GraphPad Software
ImageJ / Fiji ¹⁵¹ (Version 2.3.0)	NIH

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation muriner Knochen

Die langen Röhrenknochen von euthanasierten Mäusen wurden entnommen, in 70 % Ethanol gereinigt und in 4 °C PBS auf Eis gelagert. Für immunhistochemische Färbungen wurden die Knochen anschließend in 0.25 M EDTA + 4 % PFA bei 4 °C für 2 Wochen entkalkt. Danach wurden die weichen Knochen in PBS gespült, gefroren, im Kryostat-Mikrotom geschnitten (6 µm), auf Objektträger aufgetragen und mit 4 % PFA für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Schnitte wurden anschließend permeabilisiert und gefärbt, wie weiter unten beschrieben (vgl. Methoden 2.2.13).

2.2.2 Isolation muriner Knochenmarkszellen

Entnommene und gereinigten Röhrenknochen wurden an den Enden eröffnet und mit 4° C gekühltem Buffer aus PBS + 2 % FCS mit einer 26 G Nadel und einer 20 ml Spritze gespült. Die gewonnene Suspension wurde durch einen vorgewässerten Zellfilter mit 70 µm Poren (BD Biosciences) gesiebt, um größere Partikel und Knochenreste zu entfernen. Die Zellen wurden bei 300 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbliebene Zellpellet anschließend vorsichtig wieder in Suspension gebracht.

Je nach Protokoll wurden 3 ml Erylyse-Buffer hinzugegeben, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann die Reaktion mit 30 ml PBS + 2 mM EDTA gestoppt, abermals zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C), der Überstand verworfen und resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt, an die gewünschte Konzentration angepasst und je nach Protokoll weiter verfahren.

2.2.3 Herstellung von Knochenmarksausstrichen

Knochenmarkszellen wurden isoliert wie beschrieben (vgl. Methoden 2.2.2, ohne Erylyse), 3 x in PBS gewaschen, jeweils zentrifugiert (300 g, 5 min, Raumtemperatur) und anschließend in hoher Konzentration tröpfchenweise auf Objektträger verteilt. Die entstandenen Tropfen wurden mit sanftem Druck seitwärts mit der Kante eines weiteren Objektträgers ausgestrichen, luftgetrocknet und mit Methanol für 5 min fixiert. Anschließend erfolgte eine Wright-Giemsa-Färbung, die Objektträger wurden über Nacht luftgetrocknet und mit Eindeckmedium fixiert.

2.2.4 Herstellung von Zytospins

Knochenmarkszellen wurden isoliert wie beschrieben (vgl. Methoden 2.2.2, ohne Erylyse) und jeweils $2-4 \times 10^6$ Zellen in 100 μl PBS resuspendiert. Diese konnten mittels Shandon-Zentrifuge gezielt auf Objektträger aufgebracht werden, um somit eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Anschließend erfolgte eine May-Grünwald-Giemsa-Färbung, die Objektträger wurden über Nacht luftgetrocknet und mit Eindeckmedium fixiert.

2.2.5 Plättchen Depletion

Zur Immunthrombozytopenie mittels Antikörper-induzierter Plättchen-Depletion wurde 10-12 Wochen alten C57BL/6 Mäusen (unter Narkose mit Isofluran) 50 μg CD41-Antikörper (Klon: MWRReg30) oder die entsprechend korrespondierende Isotyp-Kontrolle (Ratte IgG1 κ , Klon: RTK2071) in die Schwanzvene injiziert, wie vorbeschrieben.¹⁵²

2.2.6 Isolation von Neutrophilen Granulozyten

Knochenmarkszellen wurden isoliert wie beschrieben (vgl. Methoden 2.2.2, mit Erylyse) und nach Herstellerangaben mit dem „Neutrophil Isolation Kit“ (Miltenyi Biotec) behandelt. Die Zellzahl wurde auf ein Vielfaches von 10^7 Zellen / 40 μl gebracht und alle folgenden Volumina daran angepasst. Dann wurden 10 μl Antikörper-Cocktail hinzugegeben und für 10 min bei 4 °C inkubiert.

Zwischenzeitlich wurden die Durchlauf-Filter („LD Columns“) präpariert, aufrecht in den Magneten montiert, ein 15 ml Falcon darunter positioniert und mit 2 ml Buffer [PBS + 2mM EDTA + 0,5 % BSA] gespült, welcher vorab im Ultraschallbad von Luftbläschen geklärt worden war.

Zu den Zellen wurden nun 30 μl Buffer und 20 μl magnetische Microbeads hinzugefügt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden weitere 2 ml Buffer hinzugegeben, zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C), der Überstand verworfen und in 2 ml frischem Buffer vorsichtig resuspendiert. Ein frisches 15 ml Falcon wurde unter dem Magneten positioniert und die Zellsuspension durch die Filtersäule laufen gelassen, wobei zweimal jeweils nach 1-2 min 1 ml Buffer nachgeträufelt wurde.

Im Falcon sammeln sich sodann die gewünschten Zellen, während die unerwünschten Zellen mit Antikörpern markiert und durch die magnetischen Microbeads in der Filtersäule im Magneten verbleiben. Die Zellen wurden nochmals in 30 ml Buffer resuspendiert, zentrifugiert und konnten dann weiterverwendet werden.

2.2.7 Isolation von Megakaryozyten mittels positiver Selektion

Knochenmarkszellen wurden isoliert wie beschrieben (vgl. Methoden 2.2.2, mit Erylyse) und nach Herstellerangaben mit dem „PE Positive Selection Kit“ (STEMCELL Technologies) behandelt. Die Zellen wurden gezählt und in Buffer [PBS + 2 % FCS + 2mM EDTA] auf 10^8 Zellen / ml resuspendiert, alle weiteren Angaben gelten pro 1 ml. Nun wurden 10 μ l FcR blockierende Antikörper hinzugegeben, resuspendiert, dann der PE-konjugierte Antikörper 1:100 für die gewünschten Zellen hinzugegeben (CD42b-PE oder GPVI-PE), 2-3 x resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Waschung mit 5 ml PBS und Zentrifugation (300 g, 5 min, Raumtemperatur). Resuspension, Hinzufügen von 100 μ l / ml „PE-Selection Cocktail“ und Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Dann Hinzufügen von 50 μ l / ml magnetischer Nanopartikel, welche vorher gründlich resuspendiert wurden und Inkubation für 10 min. Auffüllen des Volumens auf 2,5 ml mit oben genanntem Buffer und vorsichtiges Resuspendieren in sterilem FACS-Röhrchen, welches in den zugehörigen Magneten gestellt wird, hier Inkubation für 5 min. Anschließend wurde das Röhrchen im Magneten in einer zügigen kontinuierlichen Bewegung kopfüber gedreht und die heraustropfende Flüssigkeit verworfen; dieser Vorgang wurde 3 x zu je 5 min wiederholt. Zuletzt verblieben in dem Röhrchen die mit PE-Antikörpern und magnetischen Nanopartikeln gebundenen Zellen, welche resuspendiert und verwendet werden konnten.

2.2.8 Isolation von Megakaryozyten mittels negativer Selektion

Der Vorgang der negativen Isolation von adulten Stammzellen aus dem Knochenmark funktioniert nahezu identisch wie die oben beschriebene negative Isolation von Neutrophilen Granulozyten (vgl. Methoden 2.2.6), nur unter Verwendung des „Lineage Cell Depletion Kit“ (Miltenyi Biotec).

Die Antikörper-Auswahl enthält multiple Oberflächenmarker reifer hämatopoetischer Zellreihen (CD5, CD45R (B220), CD11b, Anti-Gr-1 (Ly6G/C), Anti-Gr-7-4 und Ter-119), die magnetisch markiert sind, so dass nach der negativen Selektion nur undifferenzierte (lin^-) Stammzellen verbleiben.

Die so gewonnenen Stammzellen können unter Beigabe von 100 ng / ml Thrombopoetin über 4-5 Tage in unbeschichteten 6-Well-Platten zu je 10^6 Zellen / Well im in 2,5 ml Medium [DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin / Streptomycin] bei 37 °C und 5 % CO₂ zu Megakaryozyten ausgereift werden. Vor der Verwendung wurden die ausgereiften Megakaryozyten mittels BSA-Gradienten angereichert, wie unten beschrieben (vgl. Methoden 2.2.10).

2.2.9 Isolation von Megakaryozyten aus fetalen Leberzellen

Wie in der Literatur beschrieben,¹⁵³ wurden fetale Leberzellen an Tag 13,5-14,5 isoliert, gefiltert, in Suspension gebracht und äquivalent zu den Stammzellen aus negativer Selektion (vgl. Methoden 2.2.8) in Medium [DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin / Streptomycin] unter Beigabe von 70 ng / ml Thrombopoetin in unbeschichteten 6-Well-Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ für 4-5 Tage kultiviert. Vor der Verwendung wurden die ausgereiften Megakaryozyten mittels BSA-Gradienten angereichert, wie unten beschrieben (vgl. Methoden 2.2.10).

2.2.10 Anreicherung von Megakaryozyten mittels BSA-Gradienten

Wie in der Literatur beschrieben,¹⁵³ können die ausgereiften Megakaryozyten über einen BSA-Gradienten mit aufsteigender Dichte angereichert werden: Hierzu wird in einem 25 ml Falcon vorsichtig in sinkender Konzentration von unten nach oben je 3 ml 3 %, 1,5 % und 0 % BSA / PBS geschichtet. Die resuspendierten Zellen werden behutsam in die oberste Schicht des Gradienten pipettiert. Nach 25 min bei Raumtemperatur können die oberen beiden Schichten (6 ml) abgetragen und verworfen werden, während sich im untersten Layer (3 ml) aufgrund ihrer Größe die angereicherten Megakaryozyten finden, welche nun weiterverwendet werden können.

2.2.11 Präparation der Oberflächen zur Zelladhäsion

Um saubere, homogene und haftungsfähige Oberfläche für histologische Untersuchungen oder Videoaufnahmen zu erhalten, wurden Glasplättchen bzw. 6-Well-Platten beschichtet. Die Glasplättchen wurden zuerst in 20 % Salpetersäure (HNO₃) 1 h gereinigt, 5 x mit destilliertem Wasser gewaschen und auf einem Rotationsbeschichter getrocknet (90 Umdrehungen / s für 10 s). Die Oberflächen wurden dann mit 100 µg / ml Fibrinogen (Sigma-Aldrich) in PBS gelöst beträufelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Vor der Verwendung erfolgte eine 3 x Wäsche mit PBS.

2.2.12 Präparation der Co-Kultur

Isolierte Megakaryozyten wurden in Fibrinogen-beschichtete 6-Well-Platten in etabliertem Medium⁷⁰ [40 % (DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin / Streptomycin) + 60 % Leibovitz L15] ausplattiert zu $2,5 \times 10^4$ Zellen und konnten für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ adhärent werden. Sodann wurden $2,5 \times 10^5$ isolierte Neutrophile Granulozyten hinzugegeben und je nach Protokoll weiterverfahren.

2.2.13 Immunhistochemische Färbungen

Knochen wurden entkalkt und präpariert wie vorbeschrieben (vgl. Methoden 2.2.1), bzw. Glasplättchen wurden beschichtet wie vorbeschrieben (vgl. Methoden 2.2.11) und isolierte Zellen wurden darauf ausplattiert in Medium [DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin / Streptomycin] und über 3-6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % PFA für 10 min fixiert, alle weiteren Schritte folgten bei Raumtemperatur.

Fixierte Zellen bzw. Knochen-Schnitte wurde mit PBS gewaschen, mit 2 % Glycin in PBS für 5 min inkubiert, mit PBS gewaschen, mit 0,2 % Triton X-100 für 5 min permeabilisiert und erneut gewaschen. Unspezifische Antigene wurden mit 3 % BSA / PBS für 1 h blockiert. Antikörper (1:100) wurden schrittweise für je 1 h im Dunkeln inkubiert und jeweils anschließend gewaschen. Zellkerne wurden mit DAPI bzw. TO-PRO-3 für je 2 min angefärbt. Fertige Objektträger wurden mit Eindeckmedium fixiert und lichtgeschützt gelagert.

2.2.14 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenz ist definiert als die Emission von Licht kürzerer Wellenlänge nach Exzitation mit Licht höherer Wellenlänge, wobei der Wechsel der Wellenlängen als Stokes-Shift bezeichnet wird.¹⁵⁴ Durch den Einsatz dichroitischer Filter kann nur Licht der emittierten Wellenlänge aufgezeichnet werden und Licht der Exzitation herausgefiltert werden, was eine Quantifikation des vorhandenen Fluorochroms ermöglicht.¹⁵⁵ Verschiedene Fluorochrome haben jeweils ein charakteristisches Exzitations- und Emissions-Spektrum, was durch den gezielten Einsatz von Filtern eine sichere Abgrenzbarkeit voneinander und somit einen hohen Kontrast ermöglicht.

Die Aufnahmen erfolgten vorwiegend auf einem Mikroskop vom Typ Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy, Jena) mit den Objektiven 20x, 40x oder 63x Vergrößerung (20x/0,8 Plan-APOCHROMAT; 40x/0,75 EC Plan-NEOFLUAR; 63x/1,4 Öl, Plan-APOCHROMAT; Carl Zeiss Microscopy). Die Bildakquisition erfolgte für jeden Kanal einzeln monochromatisch (AxioCamICc5 Kamera, Carl Zeiss Microscopy), welche in der digitalen Bildnachverarbeitung (ImageJ / Fiji¹⁵¹, NIH, USA) coloriert und zusammengesetzt wurden. Vereinzelt wurden Aufnahmen am Konfokalmikroskop (Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar) akquiriert, um eine höhere Auflösung zu gewährleisten.

2.2.15 Zeitaufgelöste Videoaufnahmen

Zelltypen wurden einzeln oder in Co-Kultur angesetzt, wie oben beschrieben, und auf einem auf 37 °C beheizten Mikroskop-Tisch positioniert. Einzelbilder wurden

auf einem Durchlichtmikroskop vom Typ Axiovert 200 (Carl Zeiss Microscopy) mit 10x Vergrößerung (10x/0,25 Achroplan, Carl Zeiss Microscopy) und einer Kamera vom Typ HRc-Axiocam (Carl Zeiss Microscopy) nach definierten Zeitabständen (meist 60 s) aufgenommen und in digitaler Bildnachverarbeitung (ImageJ / Fiji¹⁵¹) zu zeitaufgelösten Videos zusammengesetzt. Die Mikroskopleuchte wurde ebenfalls so programmiert, dass sie nur zur Bildakquisition eingeschaltet wurde und die Zellen dazwischen lichtgeschützt waren.

2.2.16 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie ermöglicht die simultane Messung verschiedener physikalischer Eigenschaften (Größe, Granularität) und multipler molekularer Marker (über fluoreszierende Antikörper) bei einzelnen Zellen in großer Anzahl.¹⁵⁶ Hierzu werden die Zellen in Suspension hydrodynamisch fokussiert und einzeln durch einen Laserstrahl geleitet. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. *forward scatter*) ist dabei proportional zur Größe und das Seitwärtsstreulicht (SSC, engl. *side scatter*) proportional zur Granularität.¹⁵⁷ Über multiple Filter können unterschiedliche fluoreszierende Antikörper gleichzeitig gemessen werden, wobei das Signal jeweils proportional zur vorhandenen Antikörper-Menge bzw. dem gebundenen Protein ist. Die Auswertung in Histogrammen und Punktdiagrammen („Dot-Plots“) erlaubt über sogenanntes „Gating“ die Analyse einzelner Zellpopulationen und die Quantifikation spezifischer Marker.

Zur Färbung wurden die gewünschten Zellen mit 1 % PFA für 10 min fixiert, mit PBS gewaschen und zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C). In FACS-Röhrchen wurden die Zellen in PBS mit Antikörpern (1:100) für 20 min bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, USA) wie jeweils im entsprechenden Abschnitt spezifiziert.

3. Ergebnisse

3.1 Emperipolesis als Form der Interaktion

Die Emperipolesis ist ein seltenes Phänomen der Zell-Zell-Interaktion (vgl. Einleitung 1.2.2), das jedoch fast ausschließlich in Megakaryozyten beobachtet wird: Je nach Quelle können in ca. 1-15 % der Megakaryozyten andere Zellen beobachtet werden, wobei es sich größtenteils um Neutrophile Granulozyten handelt.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Daher nahmen wir die Emperipolesis als Ausgangspunkt, unsere Untersuchungen zur Interaktion von Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten zu beginnen.

3.1.1 Darstellung im isolierten Knochen

Der überwiegende Anteil der Hämatopoese findet im blutbildenden Knochenmark statt, vorwiegend in den langen Röhrenknochen.⁸⁵ Daher isolierten wir murine Femora- und Tibiae-Knochen und präparierten diese zur histologischen Aufbereitung, wie beschrieben (vgl. Methoden 2.2.1). Zusammenfassend müssen die Knochen zuerst über einen längeren Zeitraum entkalkt werden, damit sie dann geschnitten, fixiert und gefärbt werden können.

Im Längsschnitt der Knochen zeigt sich das Knochenmark dicht gepackt mit Stammzellen und von Vaskulatur durchzogen, letztere ist in unseren Schnitten nur indirekt als zellfreie geschlängelte Region abgrenzbar (Abbildung 3.1, A-B). In der Vergrößerung wird sichtbar, wie Neutrophile Granulozyten direkt adhärent an Megakaryozyten sind (*Pfeilspitzen*). Vereinzelt lässt sich auch Emperipolesis von Neutrophilen Granulozyten in Megakaryozyten abgrenzen (*Pfeile*) (Abbildung 3.1, C).

Aufgrund der dichten Zellhäufung und Überlagerung ist einerseits eine eindeutige Zuordnung von Zellen innerhalb der Megakaryozyten schwierig. Andererseits werden beim Erstellen der feinen Schnitte (6 µm) die sehr großen Megakaryozyten (50-100 µm) mutmaßlich häufig zerteilt, sodass möglicherweise Fälle von Emperipolesis übersehen werden. Daher suchten wir nach weiteren Methoden, die Knochenmarkzellen intakt zu lassen und diese weiter analysieren zu können.

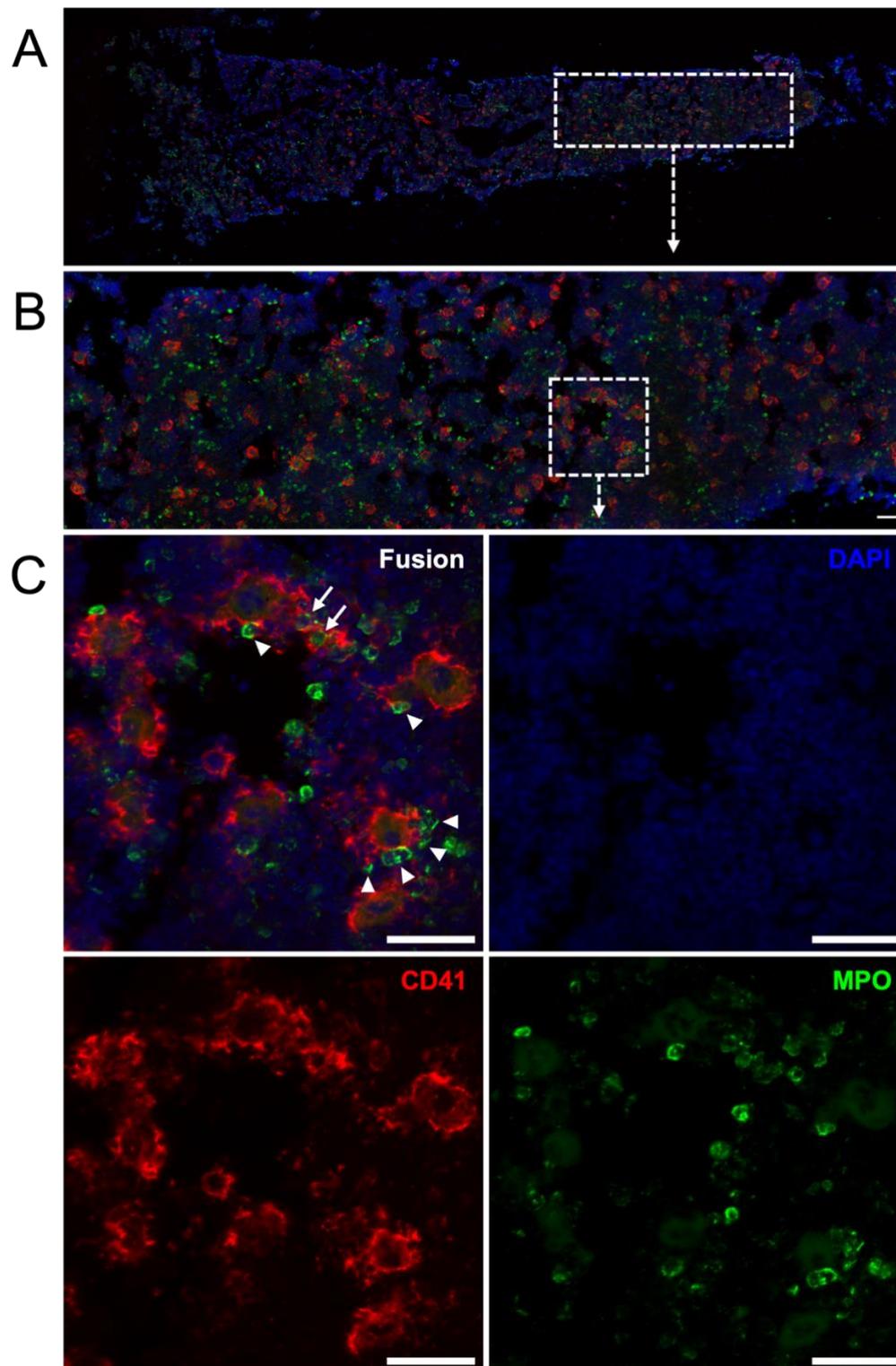


Abbildung 3.1: Darstellung von Emperipolesis im isolierten Knochen. (A) Zusammengesetzte Aufnahme des Längsschnitts durch einen murinen Tibia-Knochen (ca. 7 x 1 mm). Gestrichelte Ausschnitte jeweils im folgenden Bild dargestellt: (B) Die Vergrößerung demonstriert die Dichte, in welcher Megakaryozyten (rot) und Neutrophile Granulozyten (grün) im Knochenmark vorkommen. (C) Im Detail wird eine Emperipolesis sichtbar (Pfeile), mit zwei Neutrophilen Granulozyten innerhalb eines Megakaryozyten. Im Gegensatz dazu zeigen sich multiple Neutrophile Granulozyten direkt adhären an Megakaryozyten (exemplarische Pfeilspitzen). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). (Vergrößerung: 20x; Skalierungsbalken: 50 µm)

3.1.2 Darstellung im Knochenmarksausstrich

Um einzelne, jedoch ganze Zellen aus dem Knochenmark zu analysieren, können klassischerweise Knochenmarksausstriche hergestellt werden, wie vorher beschrieben (vgl. Methoden 2.2.3).

Im Mikroskop durchsuchten wir diese nach den gewünschten Zellen: Megakaryozyten, erkenntlich an ihrer ausgeprägten Größe ($\sim 50\text{-}100\ \mu\text{m}$)¹⁵⁸ und Neutrophile Granulozyten, erkenntlich an ihrer Größe ($\sim 7\text{-}10\ \mu\text{m}$), ihren segmentförmigen Kernen¹⁵⁹ und ihrer nur schwachen („neutrophilen“) Anfärbung.

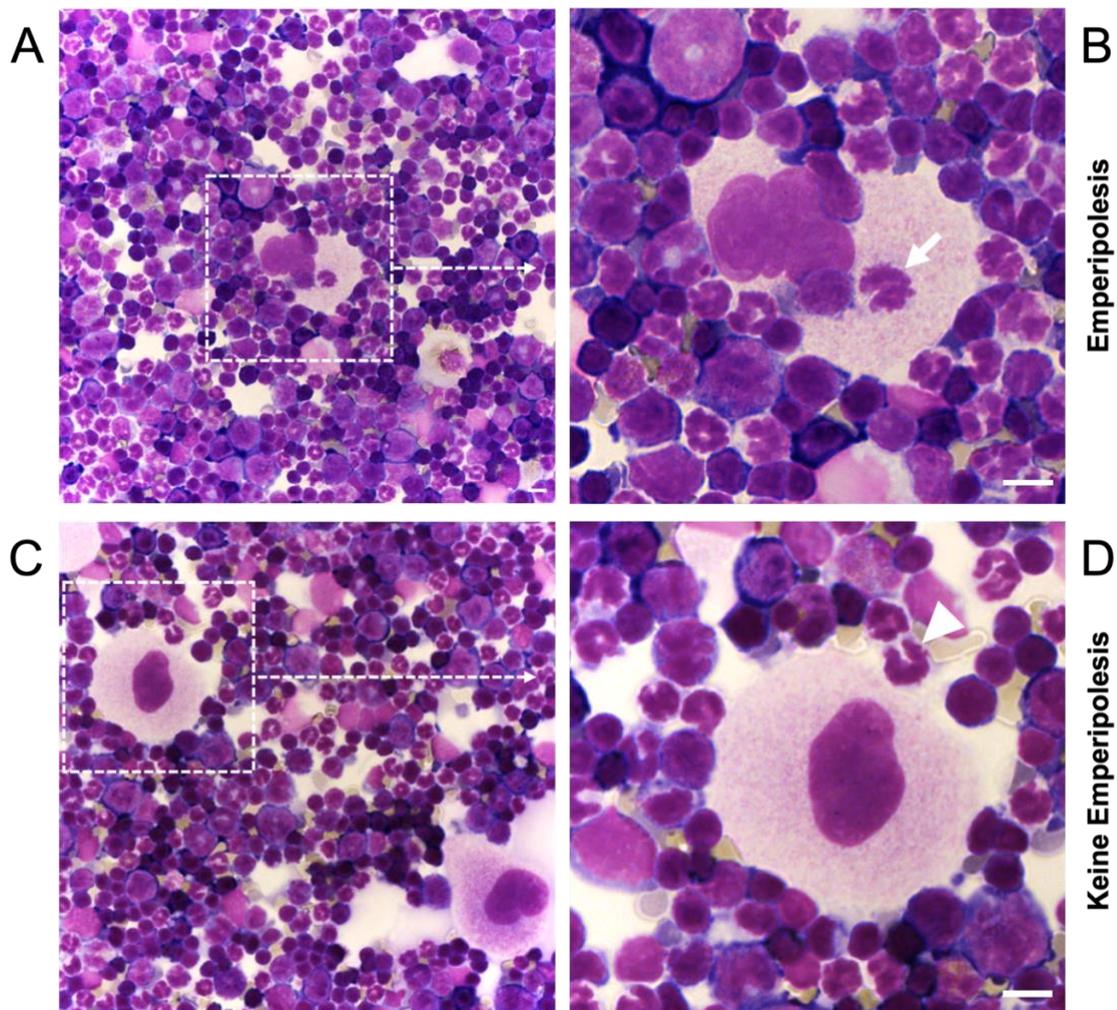


Abbildung 3.2: Beispiele von Emperipolesis im Knochenmarksausstrich. (A-B) Exemplarische Emperipolesis eines Neutrophilen Granulozyten (*Pfeil*) innerhalb des Zytoplasmas eines Megakaryozyten, die jeweiligen Zellmembranen sind intakt abgrenzbar. (C-D) Zum Vergleich: Ein Neutrophiler Granulozyt (*Pfeilspitze*) in direktem Kontakt zu einem Megakaryozyten, jedoch nicht innerhalb des Zytoplasmas, die jeweiligen Zellmembranen sind gut außerhalb voneinander abgrenzbar: keine Emperipolesis. (Färbung: HE; Vergrößerung: 63x mit Immersionsöl; Skalierungsbalken: 10 μm)

Entscheidend für die Definition der Emperipolesis ist die intakte Zellmembran der aufgenommenen Zelle.¹³⁸ Da Megakaryozyten insgesamt nur $\sim 0,01\ \%$ ¹⁵⁸ der kernhaltigen Knochenmarkszellen ausmachen und die Emperipolesis mit 1-15 %^{139,140} ein eher seltenes Phänomen ist, gilt es sicher zu unterscheiden zwischen Zellen,

die aneinander und Zellen die ineinander liegen. Dies wird durch unsere Beobachtungen beispielhaft illustriert (Abbildung 3.2).

Knochenmarkausstriche sind einfach und schnell herzustellen, nachteilig ist jedoch die starke Variabilität in Zellzahl und Dichte, welche eine valide Quantifizierbarkeit einschränkt.

3.1.3 Quantifikation in Zytospins

Um die im Knochenmarkausstrich beobachtete Emperipolesis bei Megakaryozyten quantifizieren zu können, führten wir Zytospins durch, wie oben beschrieben (vgl. Methoden 2.2.4). Zusammenfassend wird hierbei eine definierte Zellzahl über einen kleinen Trichter gezielt auf einen Objektträger zentrifugiert, getrocknet, fixiert und gefärbt, um eine möglichst homogene und reproduzierbare Zelldichte zu gewährleisten.

In Vorversuchen konnten wir eine optimale Zellzahl von $2-4 \times 10^6$ Zellen pro Zytospin etablieren und so ein Assay zur Quantifikation der Emperipolesis schaffen. Hierfür wurde jeweils der gesamte Zytospin automatisiert in Einzelbildern mikroskopisch erfasst, zusammengesetzt (engl. *stitching*) und dann Software-gestützt manuell ausgewertet (Abbildung 3.3).

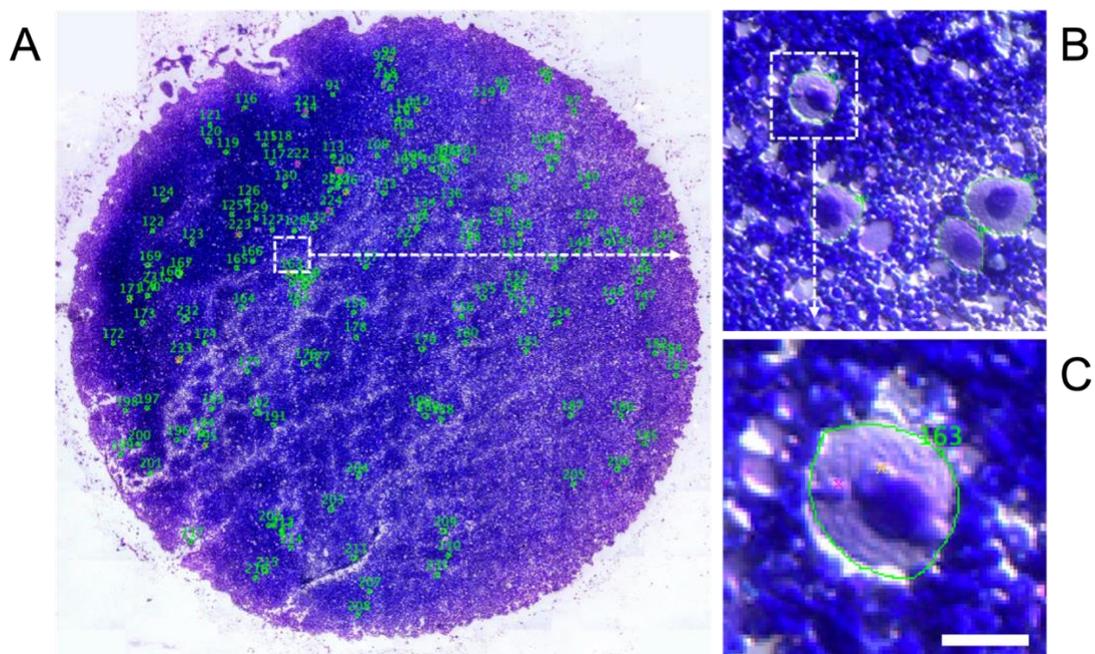


Abbildung 3.3: Beispiel eines Zytospins zur Quantifikation der Emperipolesis. (A) Übersicht der aus Einzelbildern zusammengesetzten Aufnahme eines gesamten Zytospins. Manuell annotierte Megakaryozyten in Grün umrandet. Gestrichelte Ausschnitte jeweils im Folgenden vergrößert. (B) Detail von mehreren Megakaryozyten, nur Zellen mit intaktem Kern wurden quantifiziert. (C) Einzelner Megakaryozyt, mit Emperipolesis: im Zytoplasma enthaltene Zellen mit Gelb bzw. Pink markiert. (Färbung: May-Grünwald-Giemsa; Vergrößerung: 20x DIC; Skalierungsbalken: 25 µm)

Zum Vorkommen der Emperipolesis bei Mäusen finden sich Angaben von 1-4 %.^{139,149,160} Im gespülten Knochenmark sind sogar Häufigkeiten von 12-15 %^{140,161} beschrieben, davon der Großteil mit ca. 70-80 % durch Neutrophile Granulozyten, was ca. 8-12 % Emperipolesis durch Neutrophile ergibt.

Eine erhöhte Emperipolesis ist bei verschiedenen (Patho-) Mechanismen beschrieben, u.a. bei sublethaler Bestrahlung¹⁴⁰, inflammatorischen Prozessen^{139,149}, Blutung¹⁴¹, Thrombozytopenie¹⁴², Leukämien^{142,162} und Myelodysplastischen Syndromen^{144,163} bis hin zur Myelofibrose¹⁶⁰.

Wir entschieden uns, eine Thrombopenie durch Antikörper-basierte Plättchen-Depletion hervorzurufen (vgl. Methoden 2.2.5). Bei unbehandelten Kontrollen konnten wir eine Emperipolesis durch Neutrophile Granulozyten in 7,8 % der Megakaryozyten beobachten (Abbildung 3.4). An Tag 3 nach Plättchen-Depletion blieb diese weitestgehend unverändert mit 8,2 %, an Tag 5 zeigte sich knapp eine Verdoppelung auf 15,1 %. Die Zellzahl war zwischen den Gruppen weitestgehend konstant mit ca. 150 ± 15 Megakaryozyten / Zytospin. Da diese Beobachtungen in der Literatur bereits ausgiebig validiert wurden^{141,142}, verzichteten wir auf mehrfache Wiederholungen.

Dies bekräftigte jedoch unsere Hypothese, dass es ein tieferes Zusammenspiel von Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten in Bezug auf die Thrombopoese gibt. Daraufhin planten wir ein *in vitro* Modell, um dieses Zusammenspiel weiter untersuchen zu können.

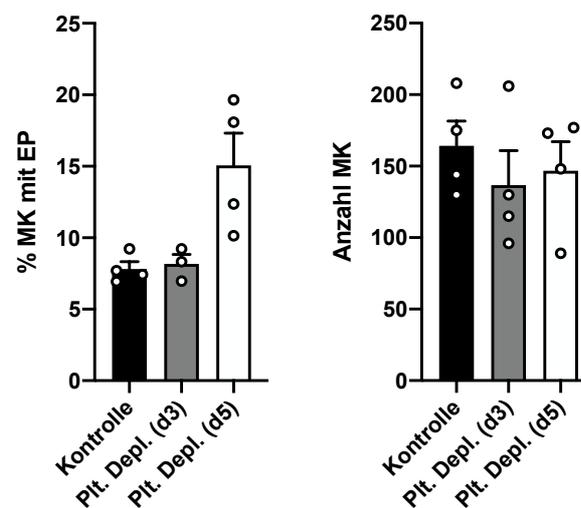


Abbildung 3.4: Megakaryozyten zeigen gesteigerte Emperipolesis durch Neutrophile Granulozyten nach Plättchen-Depletion. Nach Antikörper-gestützter Plättchen Depletion („Plt. Depl.“) zeigt sich nach 3 Tagen („d3“) die beobachtete Emperipolesis von Neutrophilen Granulozyten in Megakaryozyten unverändert bei ca. 8,2 % (Kontrolle: 7,8 %), nach 5 Tagen („d5“) nahezu verdoppelt auf 15,1 %. Die Anzahl der Megakaryozyten pro Zytospin war mit ca. 150 ± 15 konstant. (MK: Megakaryozyten; EP: Emperipolesis; Durchführung in Quadruplikaten, Angabe der Mittelwerte +SEM, hier als methodischer Fehler. Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht).

3.2 Charakterisierung der Zellen zur Bildung einer Co-Kultur

Zur genaueren Analyse der Interaktion zwischen Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten entschieden wir uns für die Isolation von primären Zellen, um diese unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* gemeinsam kultivieren zu können. Im folgenden Abschnitt werden die hierfür verwendeten Protokolle verglichen und die isolierten Zellen charakterisiert.

3.2.1 Isolierte Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten isolierten wir aus murinem Knochenmark, wie beschrieben (vgl. Methoden 2.2.6). In der Charakterisierung zeigen die Zellen ihre typische segmentkernige Morphologie und Myeloperoxidase-(MPO)-positive Granula (Abbildung 3.5, A). Videoaufnahmen dokumentieren nach Aktivierung durch das chemotaktische Peptid fMLP zelltypisches Migrationsverhalten^{164,165} unter aktiver Formänderung (Abbildung 3.5, B).

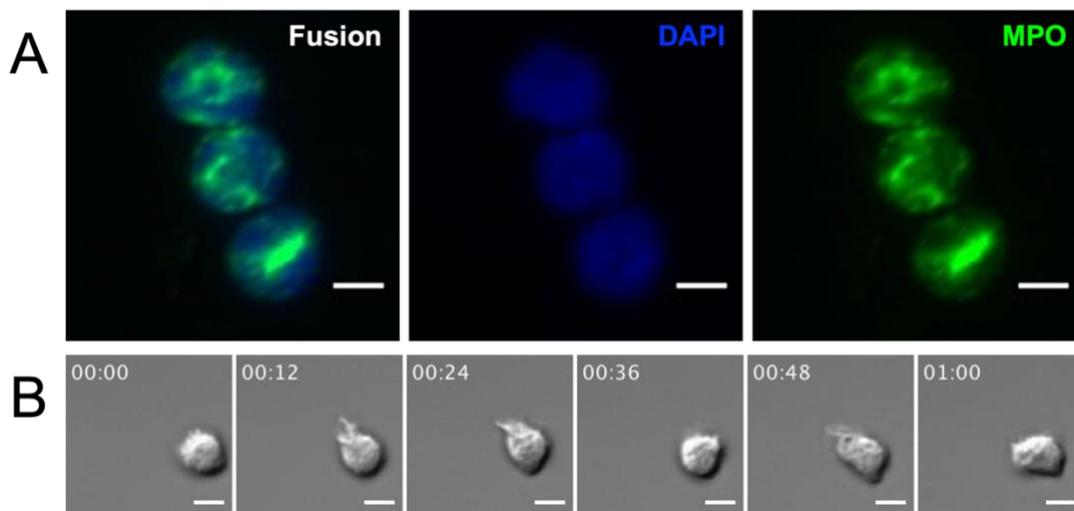


Abbildung 3.5: Isolierte Neutrophile Granulozyten zeigen zelltypische Granula und Migrationsfähigkeit. (A) Fluoreszenzmikroskopie: Aufreihung von drei Neutrophilen Granulozyten, mit charakteristischer segmentförmiger Konfiguration der Kerne und stark positivem Signal für Myeloperoxidase (MPO). Färbung der Zellkerne mit DAPI. (B) Zeitaufgelöste mikroskopische Aufnahmen zeigen die zelltypische schnelle Migration, exemplarisch ausgelöst durch Aktivierung mit dem chemotaktischen Peptid fMLP. (MPO: Myeloperoxidase; Zeitangaben: mm:ss; Vergrößerung: 63x + Immersionsöl (A); 10x DIC (B); Skalierungsbalken: 5 µm)

In dem uns vorliegenden Protokoll ist eine Aufbewahrung und Kultivierung der isolierten Neutrophilen Granulozyten über Nacht beschrieben. Um die Aktivierbarkeit quantifizieren zu können, nutzten wir durchflusszytometrische Verfahren zur Bestimmung der Rezeptordichte auf den einzelnen Zellen (vgl. Methoden 2.2.16). Wie vorbeschrieben, steigt unter Stimulation mit fMLP die Expression

des Adhäsionsmoleküls Integrin α -M (CD11b), während L-Selektin (CD62L) herunter reguliert wird.¹⁶⁵ Diese dosisabhängigen Effekte konnten wir ebenfalls nachweisen, mit jedoch sinkender Effektstärke im Zeitverlauf (Abbildung 3.6).

Um die bestmögliche Aktivierbarkeit zu gewährleisten, entschieden wir uns somit die Neutrophilen Granulozyten nicht über Nacht zu kultivieren, sondern jeweils erst kurz vor den geplanten Experimenten zu isolieren.

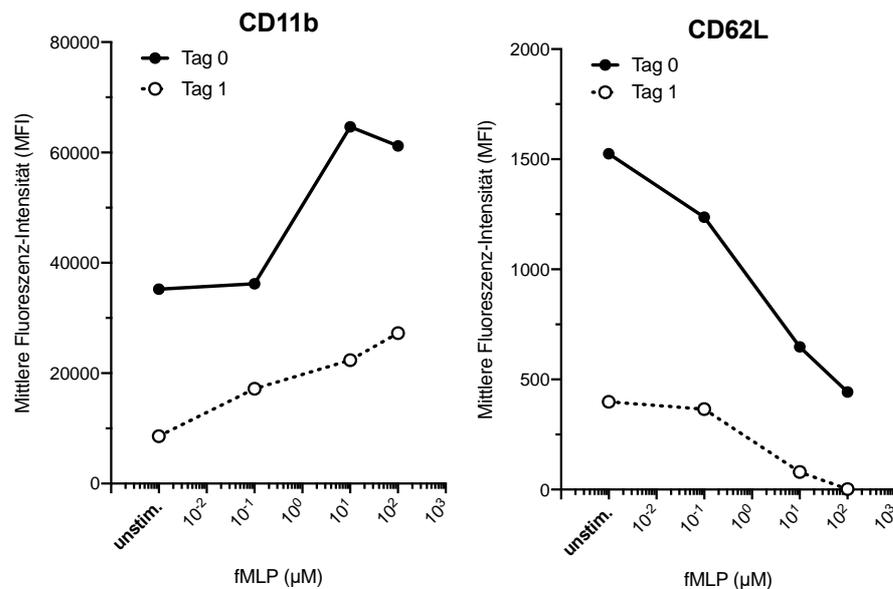


Abbildung 3.6: Messung der Aktivierbarkeit der isolierten Neutrophilen Granulozyten. Durchflusszytometrische Messungen zeigen, dass mit steigender Konzentration des Stimulanz fMLP die Expression der Adhäsionsmoleküle proportional ansteigt (CD11b, links), bzw. antiproportional abfällt (CD62L, rechts). Diese Aktivierbarkeit ist direkt am Tag der Isolation am stärksten (Tag 0) und sinkt danach ab (Tag 1). (Eine Signifikanzanalyse wurde bei $n=1$ nicht durchgeführt.)

3.2.2 Megakaryozyten aus positiver Selektion

Eine Möglichkeit, spezielle Zellen zu isolieren, ist die „positive Selektion“ (vgl. Methoden 2.2.7). Zusammenfassend werden die gewünschten Zellen anhand ausgewählter Oberflächenantigene über Antikörper markiert, welche wiederum an magnetischen Nanopartikel gebunden werden. Über einen starken Magneten können somit die Antikörper-markierten Zellen separiert werden.

Hieraus gewonnen Megakaryozyten zeigen die charakteristische Größe und positives Signal für die ausgewählten Oberflächenmarker (im Beispiel GPVI bzw. CD42b), in der Selektion enthalten sind teilweise auch Marker-positive, jedoch avitale Zellfragmente (Abbildung 3.7, A).

Nach Ausplattieren auf Fibrinogen und Inkubation über 6 h lässt sich vereinzelt die Bildung von Pseudopodien abgrenzen, jedoch keine Pro-Plättchen-Formation

(Abbildung 3.7, B). Somit stellt die positive Selektion auch nach mehreren Versuchsreihen leider keine geeignete Methode für unsere geplante Analyse der Thrombopoese dar.

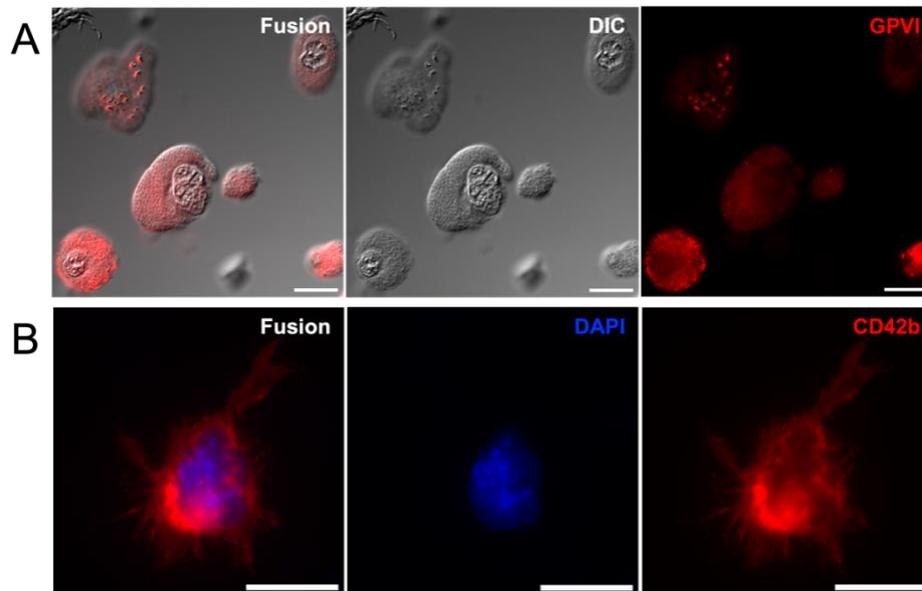


Abbildung 3.7: Megakaryozyten aus positiver Selektion bilden vereinzelt Pseudopodien. (A) Nach Isolation und Aufreinigung zeigen sich viele Zellen mit charakteristischer Größe und positivem Signal für GPVI, jedoch teilweise auch nur avitale Zellfragmente. (B) Nach Ausplattieren auf Fibrinogen über 6 h lässt sich vereinzelt die Bildung von Pseudopodien abgrenzen. (Vergrößerung: 10x DIC (A); 63x + Immersionsöl (B); Skalierungsbalken: 25 µm)

3.2.3 Megakaryozyten aus negativer Selektion

Als nächstes versuchten wir Megakaryozyten aus Stammzellen aus dem Knochenmark anzuzüchten. Zusammenfassend werden bei der „negativen Selektion“ (vgl. Methoden 2.2.8) aus dem adulten murinen Knochenmark nur diejenigen Stammzellen (HSCs) zu behalten, die noch keine Oberflächenmarker der reifen hämatopoetischen Zellreihen enthalten (lin^{-}). Der Vorteil ist, dass die so verbliebenen Stammzellen selbst keine Antikörper gebunden haben und über entsprechende Stimuli ausdifferenziert werden können, in unserem Fall bilden sich unter Thrombopoetin innerhalb von 5-6 Tage Megakaryozyten.

Die gewonnenen Zellen zeigen eine gute Ausbeute in Zellzahl und Viabilität (Video-Aufnahmen über 6 h möglich), teilweise konnte ebenfalls die Bildung von Pseudopodien beobachtet werden, sowie die charakteristischen Oberflächenantigene (Abbildung 3.8). Da in mehreren Versuchsreihen keine Pro-Plättchen gebildet wurden, musste auch diese Methode verworfen werden.

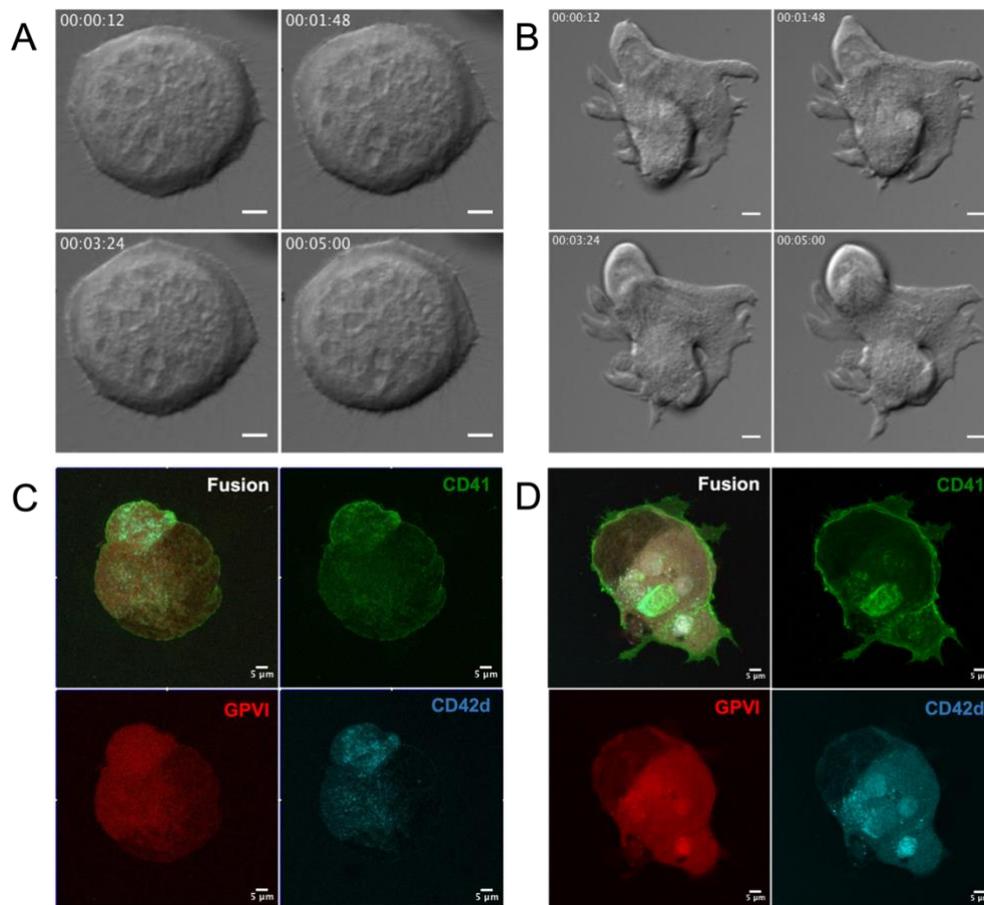


Abbildung 3.8: Megakaryozyten aus negativer Selektion sind vital und bilden Pseudopodien. (A-B) Zeitaufgelöste mikroskopische Aufnahmen, Ausschnitte über je 5:00 h. (C-D) Konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigen die charakteristischen Oberflächenmarker und insbesondere die Bildung von CD41-positiven Pseudopodien (D). (Zeitangaben: dd:hh:mm; Vergrößerung: 10x DIC (A-B); 63x + Immersionsöl (C-D); Skalierungsbalken: 5 µm)

3.2.4 Megakaryozyten aus fetalen Leberzellen

Eine weitere Methode, um primäre murine Megakaryozyten zu erhalten, ist die Isolation von fetalen Leberzellen (vgl. Methoden 2.2.9). Als pluripotente fetale Stammzellen können diese (ähnlich den vorher eingesetzten adulten Stammzellen) unter dem Einfluss von Thrombopoetin zu Megakaryozyten ausgereift werden. Dieser Prozess ist deutlich zeitaufwendiger und benötigt mindestens 3 Wochen bis zur möglichen Verwendung der so gewonnenen Megakaryozyten.

Nach Ausplattieren auf Fibrinogen und Inkubation bei 37 °C zeigen die gewonnenen Megakaryozyten eine gute Viabilität, mit im Verlauf sichtbar zunehmender Bildung von Pseudopodien. Erstmals lassen sich auch dutzende Ausläufer mit Pro-Plättchen abgrenzen (Abbildung 3.9, A). Ebenfalls zeigt sich ein kräftiges Signal für den charakteristischen Oberflächenmarker CD41 (Abbildung 3.9, B).

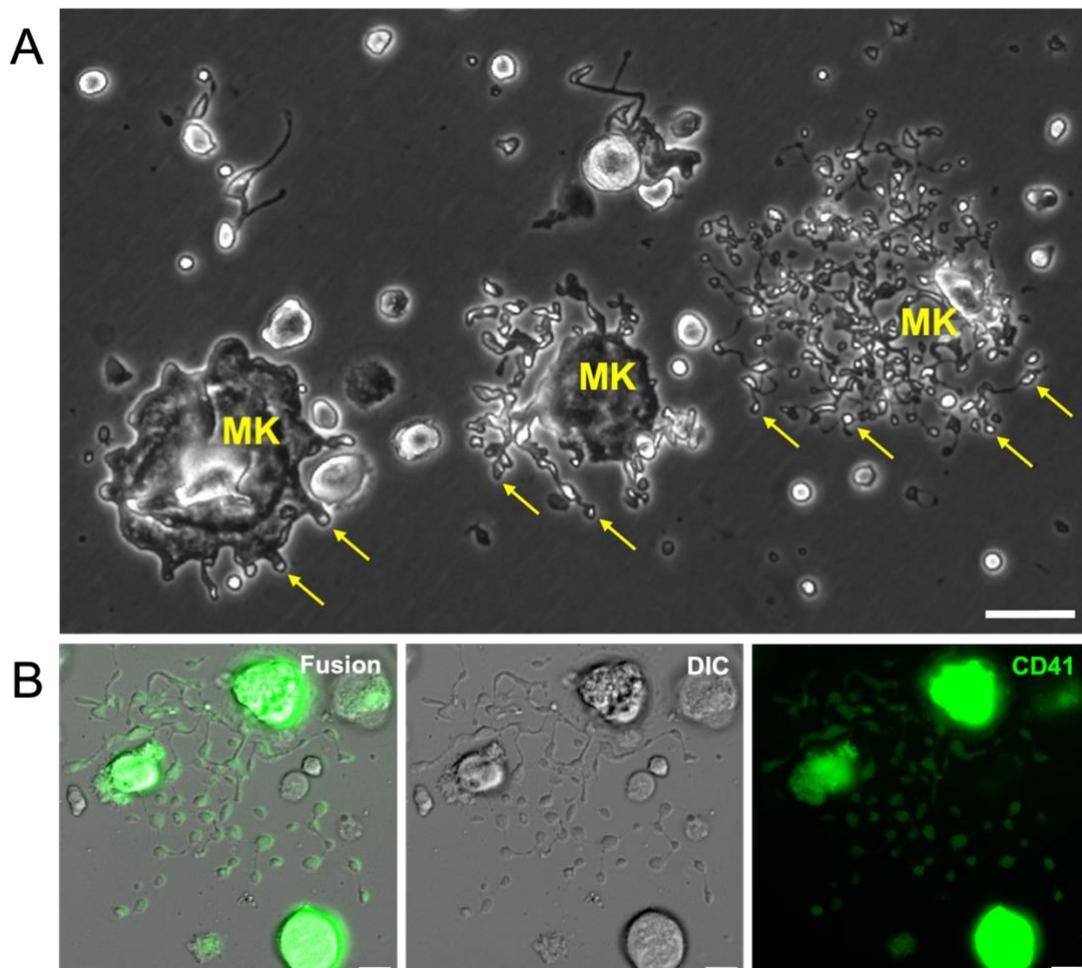


Abbildung 3.9: Megakaryozyten aus fetalen Leberzellen bilden Pro-Plättchen. (A) Megakaryozyten in verschiedenen Stadien der Thrombopoese, exemplarisch mit Pfeilspitzen markiert ist die beginnende Bildung von Pseudopodien (*links*) und die fortschreitende Formation von Pro-Plättchen (*mittig und rechts*). Aufnahme 6 h nach Ausplattieren auf Fibrinogen. (B) Megakaryozyten und Pro-Plättchen an den Ausläufern sind kräftig positiv für CD41. (*MK: Megakaryozyt; Vergrößerung: 10x DIC; Skalierungsbalken: 50 μ m*)

In der Konfokalmikroskopie können die Pro-Plättchen weiter charakterisiert werden: es zeigt sich die vorherbeschriebene Reorganisation des Zytoskeletts, mit der Bildung von langen Ausläufern aus β -Tubulin mit der Anreicherungen von F-Aktin an den Spitzen (Abbildung 3.10).^{70,166}

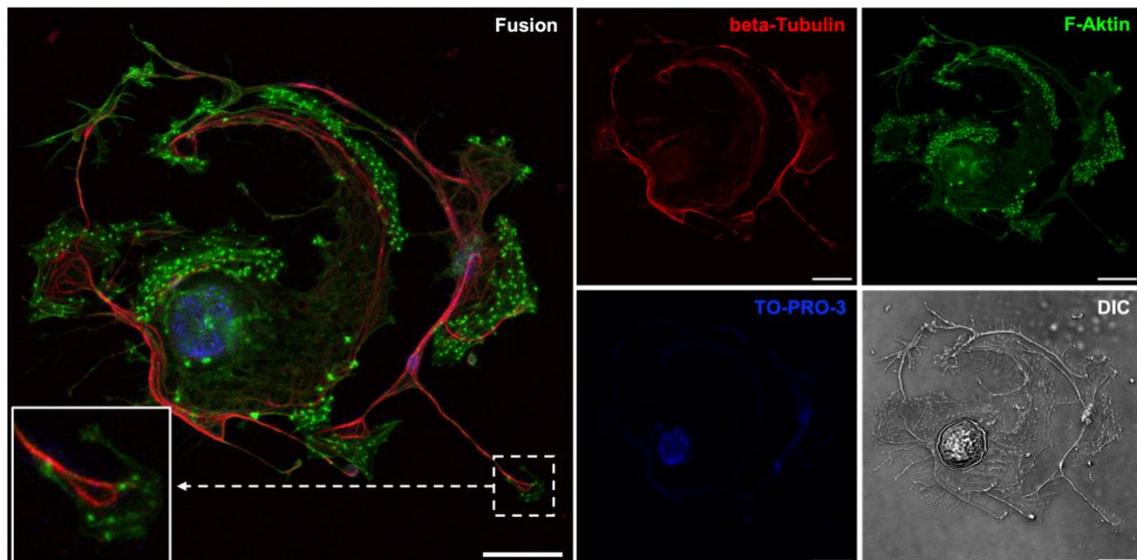


Abbildung 3.10: Zytoskelett der Pro-Plättchen-Formation von Megakaryozyten aus fetalen Leberzellen. Konfokalmikroskopische Aufnahmen demonstrieren die charakteristischen Zellausläufer und ihre zytoskelettale Zusammensetzung, mit langen Ausläufern aus β -Tubulin und Anreicherung von F-Aktin an den Spitzen bei der Bildung von Pro-Plättchen, besonders gut abgrenzbar in dem vergrößerten Detail links unten. Anfärbung der Zellkerne mit TO-PRO3. (Vergrößerung: 63x + Immersionsöl; Skalierungsbalken: 20 μ m)

Zusammenfassend ist die Ausreifung von Megakaryozyten aus fetalen Leberzellen zwar die aufwändigste der getesteten Methoden, ermöglicht jedoch als einzige die Kultivierung von genügend viablen Zellen, welche über eine funktionsfähige Thrombopoese mit der Bildung von Pro-Plättchen verfügen (

Abbildung 3.11). Somit haben wir die Isolation aus fetalen Leberzellen für alle nachfolgenden Experimente gewählt.

Methoden	Viabilität	Anzahl	Proliferation	Dauer
Positive Selektion	(+)	+	Pseudopodien	0 Tage
Negative Selektion	+++	++	Pseudopodien	5-6 Tage
Fetale Leberzellen	+++	+++	Pro-Plättchen-Formation	20-21 Tage

Abbildung 3.11: Zusammenfassung der erprobten Methoden zur Isolation von Megakaryozyten. Semi-quantitative Angaben, basierend auf den gezeigten Ergebnissen (+: wenig, ++: mäßig, +++: viel).

3.3 Beobachtungen der etablierten Co-Kultur

Nach der erfolgreichen Isolation und Kultivierung von jeweils primären funktionsfähigen Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten, galt es nun diese in der gemeinsamen Co-Kultur funktionsfähig zu halten, um sie weiter analysieren zu können. In mehreren Versuchen konnten wir das benötigte Medium und die Kulturbedingungen optimieren (vgl. Methoden 2.2.12), so dass die jeweiligen Zellen in der Co-Kultur ihr vorbeschriebenes charakteristisches Verhalten beibehielten.

3.3.1 Megakaryozyten zeigen Pro-Plättchen-Formation

Die aus fetalen Leberzellen gewonnenen Megakaryozyten zeigen auch in der etablierten Co-Kultur mit den isolierten Neutrophilen Granulozyten ihre zelltypische Differenzierung⁸⁵ und die Bildung von Pro-Plättchen²⁸ an ihren Ausläufern.

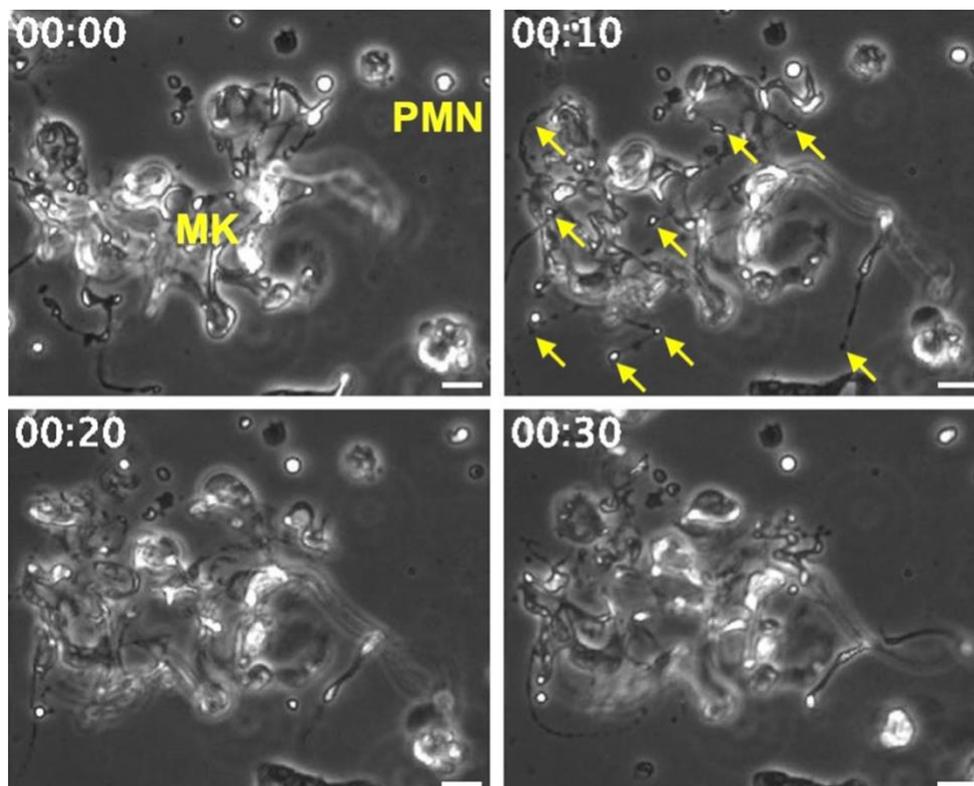


Abbildung 3.12: Zelltypische Differenzierung der Megakaryozyten mit Pro-Plättchen-Formation in der Co-Kultur. Zeitaufgelöste mikroskopische Aufnahmen, Ausschnitt über 0:30 h. Pfeilspitzen zeigen exemplarisch die Bildung von Pro-Plättchen an langen Ausläufern der Megakaryozyten. (MK: Megakaryozyt; PMN: Neutrophiler Granulozyt; Pfeilspitzen: Pro-Plättchen-Formation; Zeitangabe: hh:mm; Vergrößerung: 10x DIC; Skalierungsbalken: 20 µm)

3.3.2 Neutrophile Granulozyten zeigen zelltypische Aktivität

Die isolierten Neutrophilen Granulozyten können unter den etablierten Bedingungen ebenfalls lange vital bleiben (in unseren Versuchen > 9 h) und zeigen zell-

typische Migration^{164,167} mit Formänderung auf der mit Fibrinogen beschichteten Oberfläche.

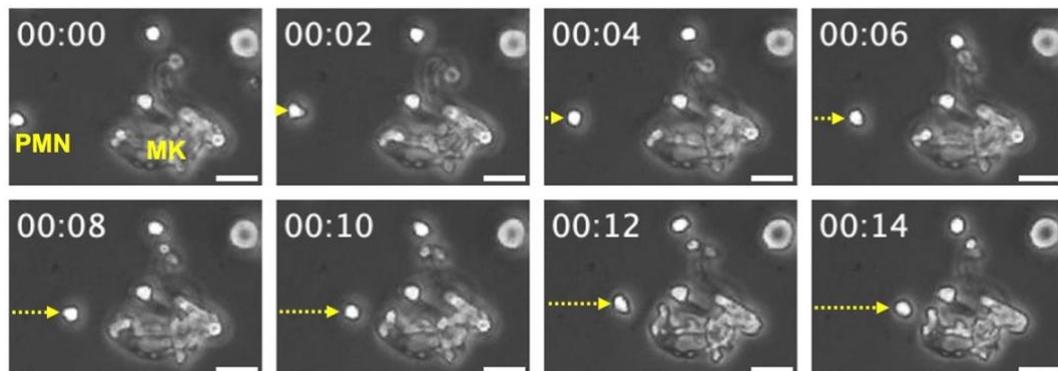


Abbildung 3.13: Zelltypischen Migration von Neutrophilen Granulozyten in der Co-Kultur mit Megakaryozyten. Zeitaufgelöste mikroskopische Bilder mit der exemplarischen Annotation eines Neutrophilen Granulozyten und der zurückgelegten Strecke (*gestrichelte Pfeile*) unter migrationstypischer Verformung der Zelle. Gesamte Videoaufnahme über 3:00 h. (MK: Megakaryozyt; PMN: Neutrophiler Granulozyt; Zeitangabe: hh:mm; Vergrößerung: 10x DIC; Skalierungsbalcken: 20 μ m)

3.3.3 Physische Zell-Zell-Interaktion in der Co-Kultur

Nach der erfolgreichen Etablierung einer Co-Kultur aus primären Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten begannen wir diese unter kontrollierten Bedingungen zu beobachten. Hierzu setzen wir die Co-Kultur wie vorbeschrieben an (vgl. Methoden 2.2.12), wobei die Megakaryozyten nach Ausplattierung für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden und nach Zugabe von Neutrophilen Granulozyten bei 37 °C für weitere 3-6 h im Zeitraffer automatisiert gefilmt wurden (vgl. Methoden 2.2.15).

In den entstandenen Videos konnten wir mehrfach eine physische Interaktion zwischen Neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten beobachten. Diese spielte sich insbesondere an den länglichen Ausläufern der Megakaryozyten im Bereich der Pro-Plättchen Formation ab und es schien, als würden die Neutrophile Granulozyten regelrecht an den Pro-Plättchen „ziehen“. Aufgrund des komplexen Versuchsaufbaus und der nur begrenzten Anzahl gleichzeitig zu beobachtender Megakaryozyten (ca. 1-3 pro Sichtfeld) konnte keine aussagefähige Quantifizierung der Interaktion vorgenommen werden, die Abbildung 3.14 dokumentiert jedoch beispielhaft unsere Beobachtungen.

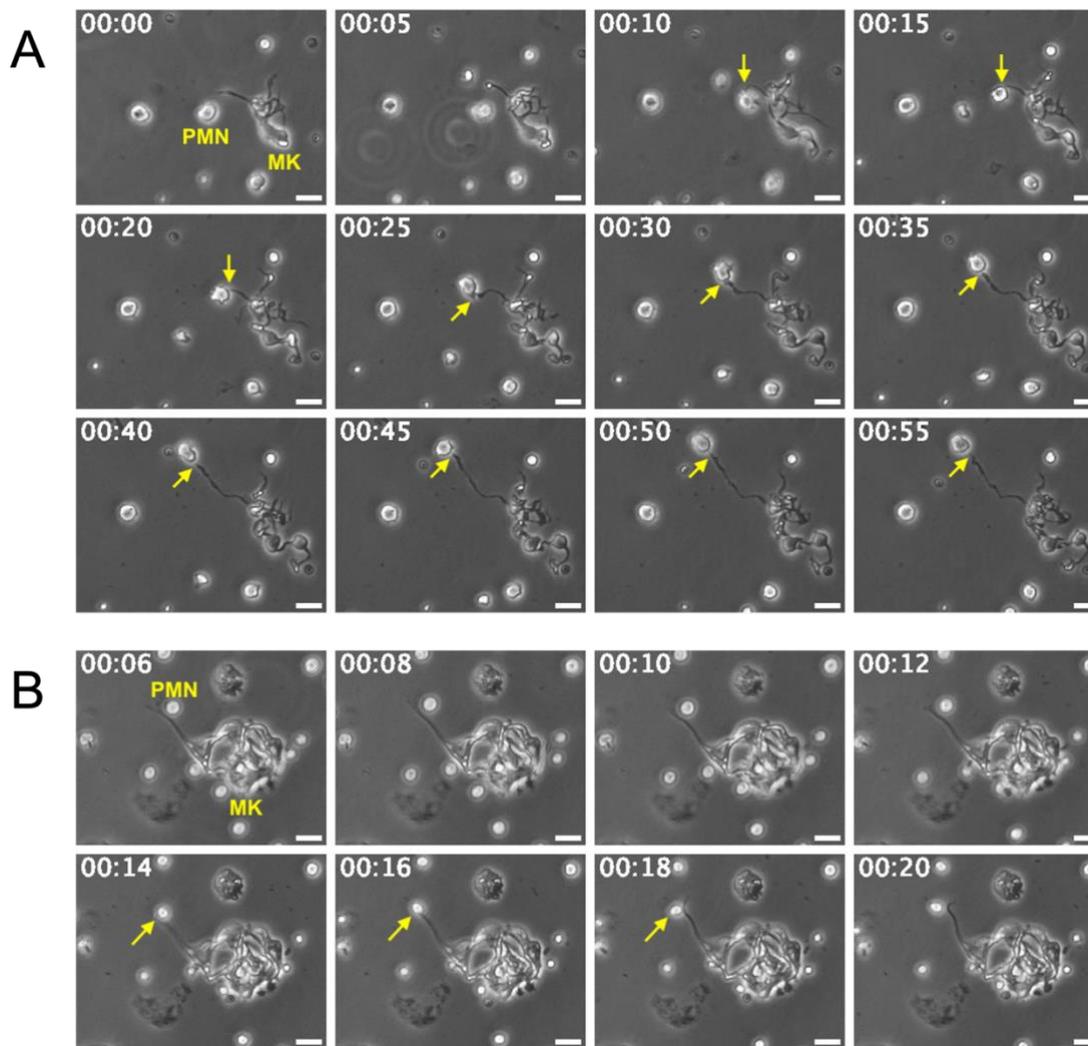


Abbildung 3.14: Physische Interaktion von Neutrophilen Granulozyten mit Megakaryozyten *in vitro*. Zwei Beispiele (A) und (B) demonstrieren die Interaktion (*Pfeilspitzen*), die insbesondere im Bereich der Pro-Plättchen-formierenden Ausläufer der Megakaryozyten beobachtet wurden. Gesamte Videoaufnahme je über 3:00 h. (MK: Megakaryozyt; PMN: Neutrophiler Granulozyt; Zeitangabe: hh:mm; Vergrößerung: 10x DIC; Skalierungsbalken: 20 µm)

3.4 Einfluss der Co-Kultur auf die Thrombopoese

Nach den qualitativen Beobachtungen der physischen Interaktion zwischen Neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten suchten wir nach Methoden, die möglichen Auswirkungen der Interaktion quantitativ zu erfassen. Hierzu konzentrierten wir uns auf die Hauptaufgabe der Megakaryozyten, die Thrombopoese, und untersuchten diese im Vergleich von Megakaryozyten allein („MK“) mit Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten („MK + PMN“) in der Co-Kultur.

3.4.1 Vermehrte Pro-Plättchen-Formation von Megakaryozyten

Während der Thrombopoese durchlaufen Megakaryozyten verschiedene Stadien, die sich morphologisch abgrenzen lassen.^{28,70,166} Um eine mögliche Beeinflussung der Megakaryozyten durch die Anwesenheit von Neutrophilen Granulozyten quantifizieren zu können, entwickelten wir basierend auf den vorherbeschriebenen Stadien und unseren Beobachtungen die folgende Klassifikation:

Beispiele

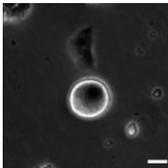
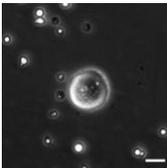
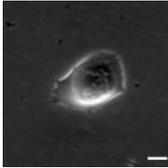
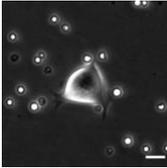
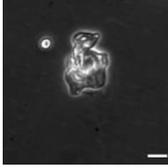
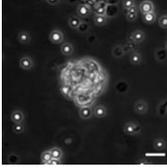
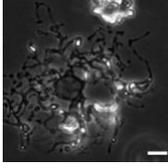
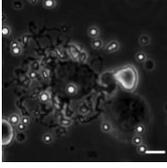
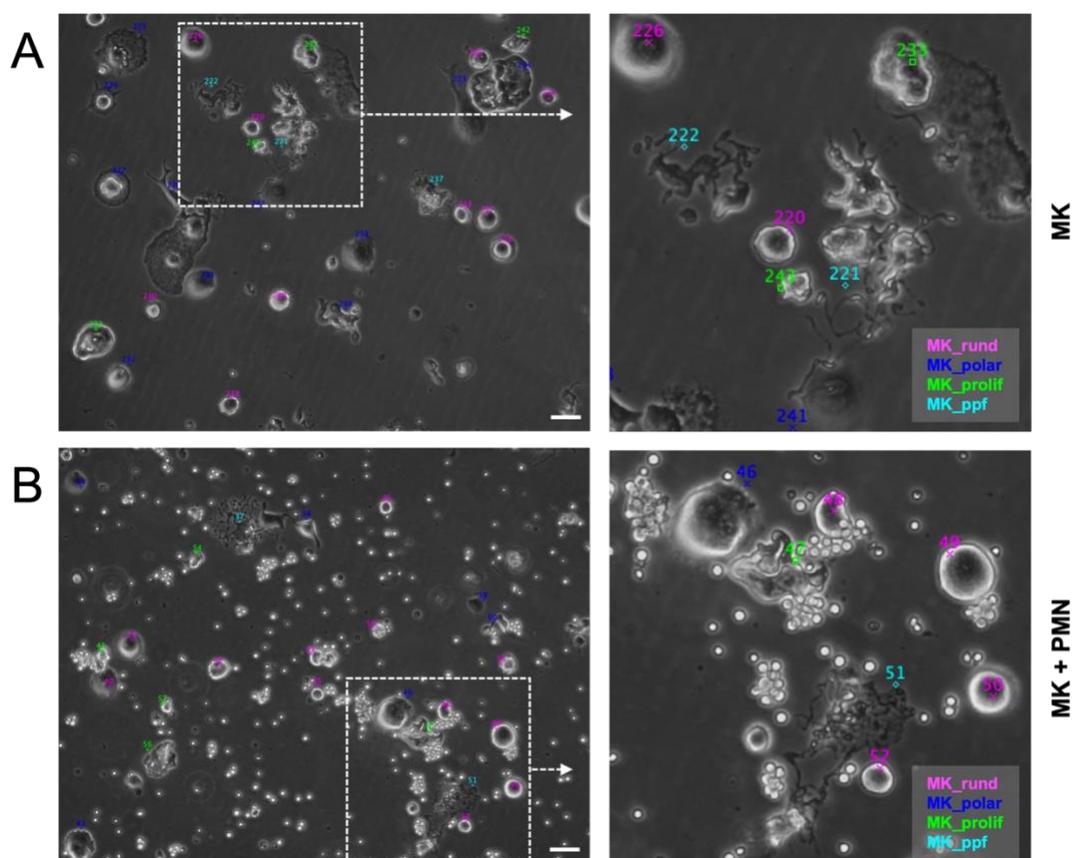
Kriterien	MK	MK + PMN
<p>MK_{rund} Ruhende Megakaryozyten</p> <ul style="list-style-type: none"> - Durchmesser > 20 µm - rund - keine Ausläufer 		
<p>MK_{polar} Polarisation der Megakaryozyten</p> <ul style="list-style-type: none"> - Durchmesser > 20 µm - beginnend entrundet - min. 1 breiter Ausläufer 		
<p>MK_{prolif} Proliferation der Megakaryozyten</p> <ul style="list-style-type: none"> - Durchmesser > 20 µm - vollständig entrundet - multiple Ausstülpungen 		
<p>MK_{ppf} Pro-Plättchen-Formation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Durchmesser > 20 µm - min. 1 schmaler Ausläufer: < 1 µm breit, > 10 µm lang 		

Abbildung 3.15: Kriterien und Beispiele für die Klassifikation von Megakaryozyten in Thrombopoese-Stadien.
(MK: Megakaryozyten in Kultur; MK + PMN: Megakaryozyten und Neutrophile Granulozyten in Co-Kultur; Vergrößerung: 10x DIC; Skalierungsbalken: 20 µm)

MK_{rund} beschreibt ruhende Megakaryozyten, die noch unreif sind und neben ihrer außergewöhnlichen Größe¹⁶⁸ (Durchmesser > 20 µm) an ihrer komplett runden

Form identifiziert werden können; als nächster Schritt folgt die Reorganisation des Zytoskeletts⁷⁰ mit konsekutiver Polarisation der Megakaryozyten und der Bildung von Pseudopodien²⁸, hier als MK_{polar} bezeichnet. Die zunehmende Proliferation, MK_{prolif} , zeigt sich durch die Bildung multipler Ausstülpungen und einer vollständigen Entrundung der Zellen.²⁸ Im letzten Schritt zeigen die Megakaryozyten eine deutliche Pro-Plättchen-Formation⁶⁶, hier abgekürzt als MK_{ppf} und definiert durch die Abgrenzbarkeit multipler, schmaler ($< 1 \mu\text{m}$ Breite) und langer ($> 10 \mu\text{m}$ Länge) Ausläufer (Abbildung 3.15).

Zur Quantifikation wurden Megakaryozyten allein („MK“) oder in der etablierten Co-Kultur gemeinsam mit Neutrophilen Granulozyten („MK + PMN“) jeweils für 3 h bzw. 6 h bei 37 °C inkubiert, wie vorbeschrieben (vgl. Methoden 2.2.12). Anschließend wurden die Zellen fixiert, im Phasenkontrastmikroskop strukturiert je 25 Bilder pro Well akquiriert und diese anschließend Software-gestützt entsprechend klassifiziert (Abbildung 3.16).



Für die Auswertung wurden in 3 unabhängigen Experimenten insgesamt 9.969 Zellen manuell klassifiziert, die Zählungen je Experiment auf den 3h-Zeitpunkt normiert und als relative Veränderung zum 6h-Zeitpunkt notiert (Abbildung 3.17). Über den Zeitverlauf konnten wir die tendenzielle Zunahme der Proliferation in beiden Gruppen beobachten (MK_{prolif} , Anstieg beider Gruppen: 1,19; $p=0.999$), bei geringem Rückgang der früheren Entwicklungsstufen MK_{rund} und MK_{polar} . In Anwesenheit von Neutrophilen Granulozyten („MK + PMN“) zeigt sich eine signifikante Steigerung der Megakaryozyten mit Pro-Plättchen-Formation (MK_{ppf}) verglichen mit den Megakaryozyten („MK“) allein (Anstieg: 2,77 vs. 1,50; $p<0,001$).

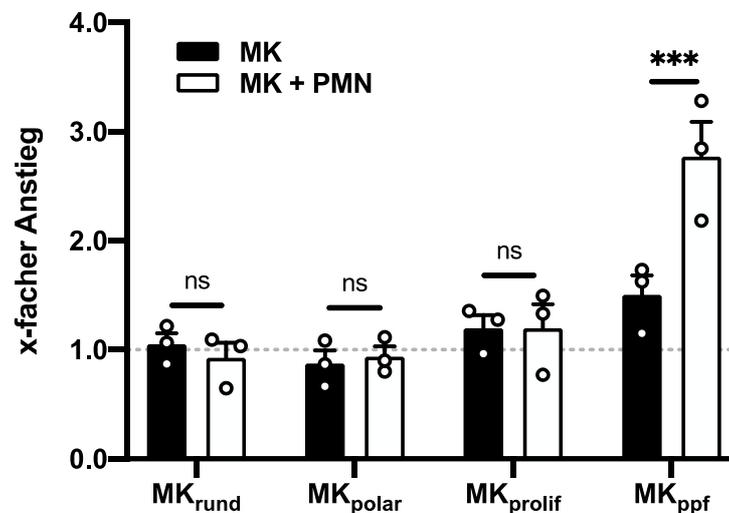


Abbildung 3.17: Gesteigerte Pro-Plättchen Formation der Megakaryozyten in Anwesenheit von Neutrophilen Granulozyten. Relativer Anstieg vom 3h- zum 6h-Zeitpunkt; Darstellung als Mittelwerte +SEM; $n=3$ unabhängige Experimente in Duplikaten; Ergebnisse von insgesamt 9.969 manuell klassifizierten Zellen, Mittelwert pro Well: 831 ± 88 SEM. Signifikanzanalyse mittels Zwei-Faktor-ANOVA (Thrombopoese-Stadien und MK/MK+PMN) mit post-hoc Sidak-Korrektion. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; ns: nicht signifikant)

3.4.2 Vermehrte Bildung Plättchen-assoziiertes Fragmente

Im Rahmen der Thrombopoese findet nach den morphologischen Veränderungen der Megakaryozyten eine fortschreitende Absonderung von Pro-Plättchen statt, die in der Auflösung der Megakaryozyten selbst endet (vgl. auch Einleitung Abbildung 1.2).²⁸ Diese abgesonderten, unreifen und verschiedenen großen Zellteile werden auch als Plättchen-assoziierte Fragmente^{28,70,73} bezeichnet, deren weitere Ausreifung zu funktionstüchtigen Blutplättchen nicht nur im Knochenmark^{22,47}, sondern auch in der Blutbahn³⁰ oder in der Lunge³¹ beschrieben wurde.

Um unsere Beobachtungen der Beeinflussung der Thrombopoese zu bestätigen, planten wir eine Quantifizierung der Plättchen-assoziierten Fragmente mittels Durchflusszytometrie (vgl. Methoden 2.2.16). Wie beschrieben wurden die Zellen hierfür 6 h kultiviert, anschließend fixiert und mit fluoreszierenden Antikörpern

gefärbt. Anhand von FFS und SSC wurden nur lebende Zellen eingeschlossen. Jeder Probe fügten wir eine definierte Zahl fluoreszierender Beads hinzu, um auch bei unterschiedlichen Zellzahlen zwischen den Proben (Megakaryozyten mit / ohne Neutrophile Granulozyten) einen verlässlichen Maßstab zur Normierung unserer Messungen zu erhalten.

Eine weitere Besonderheit stellte die große Heterogenität in der Größe der Plättchen-assoziierten Fragmente dar, die anhand ihres doppelt positiven Signals für CD41 (GPIIb) und CD42d (GPV) zugeordnet werden konnten.¹⁵⁸ Neutrophile Granulozyten (PMN) wurden anhand ihres positiven Signals für Lys6G identifiziert. Um eine Eichung der jeweiligen Signalstärken vorzunehmen und eine Verfälschung durch unspezifische Autofluoreszenz zu vermeiden, wurden für jeden Antikörper die entsprechenden Isotyp-Kontrollen genutzt (Zusammenfassung der Gating-Strategie in Abbildung 3.18).

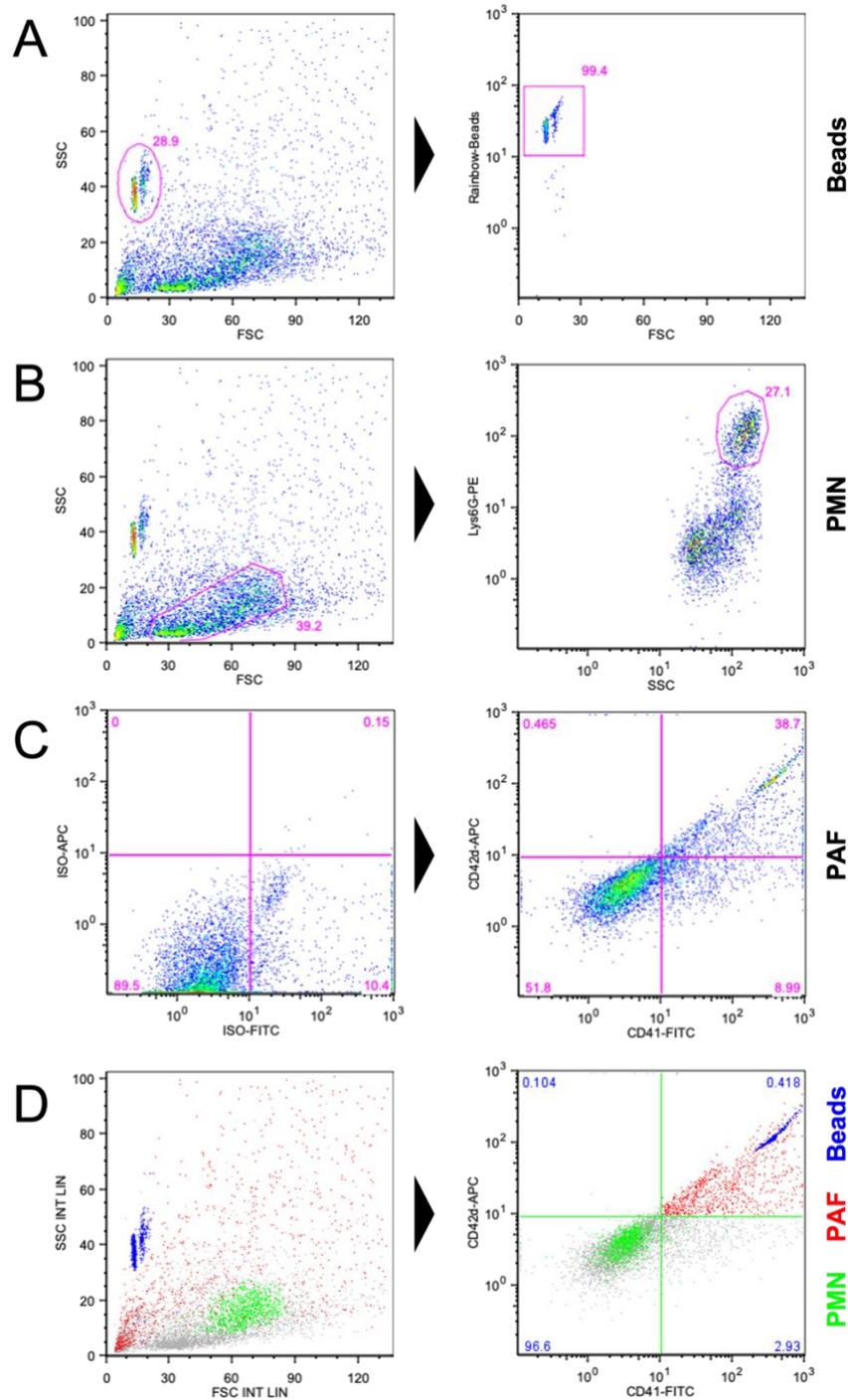


Abbildung 3.18: Gating-Strategie zur Quantifizierung von Plättchen-assoziierten Fragmenten mittels Durchflusszytometrie. Repräsentative Plots einer Probe. Anhand von FFS und SSC wurden nur lebende Zellen eingeschlossen. (A) Beads wurden anhand ihrer charakteristischen Größe und Granularität (*links*), sowie ihrem ausgeprägtem Fluoreszenzsignal (*rechts*) identifiziert. (B) Neutrophile Granulozyten wurden anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) vorselektiert (*links*) und an ihrer hohen Expression von Lys6G identifiziert (*rechts*). (C) Als Plättchen-assoziierte Fragmente (PAF) wurden Zellfragmente unterschiedlicher Größe mit doppelt positivem Signal für CD41 und CD42d klassifiziert (*rechts*, oberer rechter Quadrant). Von dieser Gruppe wurden die bereits identifizierten Beads und PMN subtrahiert. Isotyp-Kontrollen dienten bei allen Antikörpern zur Etablierung der Grenzwerte (*links*). (D) Pseudo-Color-Plots der Gruppen. (*MK*: Megakaryozyten; *PMN*: Neutrophile Granulozyten; *PAF*: Plättchen-assoziierte Fragmente)

Um unsere Messmethode zu validieren, gaben wir als positive Kontrolle Sphingosin-1-phosphat (S1P) zur Kultur, welches vorbeschrieben sowohl die Pro-Plättchen-Formation, als auch das Abscheren (engl. *shedding*) von Plättchen-assoziierten Fragmenten (PAF) verstärkt.⁷¹ Zur Analyse wurden die Messwerte in jedem Experiment auf die Messungen der Megakaryozyten in Kultur („MK“) normiert und als relative Veränderungen dazu angegeben (Abbildung 3.19).

Unser Model verifiziert den bekannten Anstieg der Plättchen-assoziierten Fragmente unter dem Einfluss von S1P (Anstieg: 1,17; $p=0,388$). In Anwesenheit von Neutrophilen Granulozyten zeigt sich eine signifikante Zunahme der Plättchen-assoziierten Fragmente (Anstieg: 1,54; $p=0,002$), welche sich in Kombination von S1P und Neutrophilen Granulozyten weiter steigert und ebenfalls signifikant zeigt (Anstieg: 1,62; $p<0,001$).

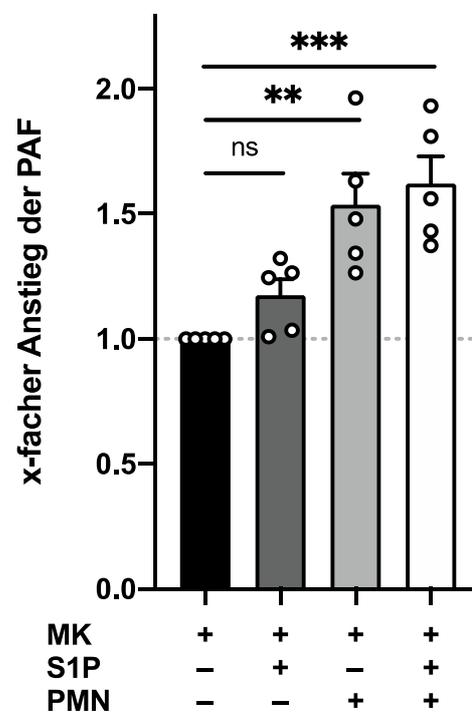


Abbildung 3.19: Megakaryozyten bilden vermehrt Plättchen-assoziierte Fragmente in Anwesenheit von Neutrophilen Granulozyten. Darstellung als Mittelwerte +SEM; $n=5$ unabhängige Experimente in Duplikaten. Signifikanzanalyse mittels ANOVA und post-hoc Tukey-Test (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; ns: nicht signifikant; MK: Megakaryozyten; PMN: Neutrophile Granulozyten; PAF: Plättchen-assoziierte Fragmente; S1P: Sphingosin-1-phosphat)

4. Diskussion

Ausgiebige Untersuchungen der letzten Jahre zur Interaktion von Neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten haben unter anderem zum Konzept der Immunothrombose⁹⁰ geführt und konnten auf Ebene der thrombozytären Vorläuferzellen, der Megakaryozyten, die Emperipolesis¹³⁸ entdecken. Letztere ist in ihrer Funktion noch nicht verstanden, findet sich jedoch als Sonderform der Zell-Zell-Interaktion bei verschiedenen Pathologien gesteigert, so auch bei einem vermehrten Bedarf an Thrombozyten.^{141,142} Dies führte uns zu der Hypothese, dass die Interaktion von Neutrophilen Granulozyten mit Megakaryozyten möglicherweise die Thrombopoese beeinflusst.

In dieser Arbeit konnten wir im murinen Modell verifizieren, dass die Depletion von Plättchen das Auftreten der Emperipolesis steigert. Zur weiteren Analyse konnten wir in mehreren Schritten erfolgreich eine Co-Kultur aus primären und funktionsfähigen Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten etablieren. Anhand dieser konnten wir zeigen, dass Megakaryozyten in Anwesenheit von Neutrophilen Granulozyten morphologisch eine signifikante Steigerung der Thrombopoese aufweisen. Ebenfalls konnten wir in der Co-Kultur einen signifikanten Anstieg von Plättchen-assoziierten Fragmenten nachweisen.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Neutrophile Granulozyten in bisher unbekannter Funktion zur Thrombopoese beitragen und sollen im Folgenden kritisch diskutiert werden.

4.1 Gesteigerte Emperipolesis nach Plättchen-Depletion

Bei der Erforschung des immuno-thrombotischen Zusammenspiels konnten in den letzten Jahren multiple gemeinsame Signalwege (z.B. über Oberflächenproteine oder Chemokine) zwischen Neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten identifiziert werden.^{92,90} Da Blutplättchen selbst kernlos sind und über (fast) keine eigene Proteinbiosynthese mehr verfügen, sind die entsprechenden Marker und Chemokine bei den Megakaryozyten bereits nahezu identisch vorhanden.⁸⁵ Auf Ebene dieser Stammzellen wurde als besondere Interaktion die Emperipolesis¹³⁸ beschrieben, weshalb wir sie als Startpunkt unserer Untersuchungen wählten.

In mehreren Schritten konnten wir Zytospins als verlässliche Methode identifizieren, um eine definierte Anzahl von Knochenmarkszellen auf Objektträger zu transferieren und das Vorkommen der Emperipolesis histologisch zu analysieren (vgl. Ergebnisse 3.1.1-3.1.3). Da eine gesteigerte Emperipolesis bei Blutung¹⁴¹

und Thrombozytopenie¹⁴² vorbeschrieben ist, induzierten wir mittels Antikörper-Injektion eine Immunthrombozytopenie¹⁵² (vgl. Methoden 2.2.5).

In den unbehandelten Kontrollen konnten wir bei 7,8 % der Megakaryozyten eine Emperipolesis durch Neutrophile beobachten, was gut mit publizierten Werten von 8-12 % im murinen Modell korreliert.^{140,161} Interessanterweise blieb die Rate an Tag 3 nach Plättchen-Depletion mit 8,2 % noch relativ unverändert und zeigte sich erst an Tag 5 knapp verdoppelte auf 15,1 % (vgl. Abbildung 3.4).

Dieser späte Anstieg lässt sich möglicherweise durch die verzögerte Kinetik nach Plättchen-Depletion erklären: kurz nach der Injektion sinken die Thrombozytenzahlen rapide ab und beginnen erst nach ca. 48 h (Tag 2) langsam wieder zu steigen, während erst nach ca. 120 h (Tag 5) eine relevante Thrombozytenzahl von ca. 80 % der normalen Population erreicht wird.^{152,169}

Unsere Daten zeigen, dass sich Emperipolesis z.B. im Zytospin quantifizieren lässt und durch eine Immunthrombozytopenie bzw. die darauffolgend reaktiv gesteigerte Thrombopoese induziert werden kann. Dies diente uns als unterstützender Ausgangspunkt für unsere Hypothese, dass es eine Verbindung zwischen Neutrophilen Granulozyten, Megakaryozyten und der Thrombopoese gibt.

Als Limitation bleibt zu erwähnen, dass wir die aufwendigen Versuche nicht bis zur statistischen Belastbarkeit wiederholten, da diese gut mit bereits publizierten Beobachtungen übereinstimmten. Zur weiteren Erforschung des Auftretens und der Kinetik der Emperipolesis unter verschiedenen Stimuli könnte dieses Modell gut mit mehreren Messreihen erweitert werden.

Erst kürzlich konnte die Arbeitsgruppe um Cunin *et al.* mittels zeitaufgelöster Konfokalmikroskopie zeigen, dass die Emperipolesis ein transients Prozess ist, der meist unter 10 min andauert („schnellen“ Form) und von einer „langsamen“ Form mit über 60 min Dauer unterscheidbar ist.¹⁷⁰ Dies legt nahe, dass die Emperipolesis deutlich häufiger als angenommen ist und bisherige histologische Untersuchungen immer nur eine (falsch niedrige) Momentaufnahme ermöglichten. In einer anderen Publikation zeigte dieselbe Gruppe, dass es bei der Emperipolesis zum Membrantransfer von Neutrophilen Granulozyten auf das DMS der Megakaryozyten kommt und somit die entstehenden Plättchen leukozytäre Oberflächenmarker erhalten, was als weiterer Beleg für die immuno-thrombotische Verbindung gesehen werden kann.¹⁴⁷

4.2 Etablierung einer Co-Kultur aus Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten

Als Kernstück dieser Arbeit galt es, eine funktionsfähige Co-Kultur zu etablieren, um die Interaktion von Neutrophilen Granulozyten und Megakaryozyten *in vitro* in Bezug auf die Thrombopoese unter kontrollierten Bedingungen untersuchen zu können.

Um murine Megakaryozyten zu untersuchen, sind in der Literatur verschiedene Modelle beschrieben – von immortalisierten Zelllinien, über Knochenmark-Isolation bis zur Ausreifung aus fetalen Leberzellen. So isolierte z.B. auch die genannte Gruppe um Cunin *et al.* hämatopoetische Stammzellen (HSCs) mittels negativer Selektion aus murinem Knochenmark und reifte diese unter TPO zu Megakaryozyten aus.^{147,170} Unsere Analysen zeigten jedoch, dass die so gewonnenen Zellen zwar viabel ausreifen, jedoch keine vollwertige Thrombopoese betreiben können und allenfalls Pseudopodien ausbilden (vgl. Ergebnisse 3.2.3).

Nach dem Vergleich von drei Protokollen (positive Selektion, negative Selektion und fetale Leberzellen; vgl.

Abbildung 3.11) setzten wir somit auf die letzte und aufwendigste Methode, da diese Zellen dank ihres hohen Differenzierungspotenzials *in vitro* zahlreiche (Pro-)Plättchen bilden und bereits von Italiano *et al.* 1999 bei der ersten erfolgreichen Beobachtung der Thrombopoese genutzt wurden.⁶⁶

Die Neutrophilen Granulozyten isolierten wird mittels negativer Selektion (vgl. Methoden 2.2.6) jeweils direkt vor den geplanten Experimenten. Obwohl in dem uns vorliegenden Protokoll eine mögliche Aufbewahrung über Nacht beschrieben ist, sahen wir eine deutliche Abnahme der leukozytären Aktivierbarkeit mit der Zeit (vgl. Abbildung 3.6). Auch wenn die Lebensdauer von Neutrophilen Granulozyten nach Verlassen des Knochenmarks kontrovers diskutiert wird, liegt sie mutmaßlich eher im Bereich mehrerer Stunden.¹⁰⁴ Sowohl allein als auch in Co-Kultur zeigten beide Zellarten eine gute Viabilität (Videoaufnahmen > 9 h) und jeweils zelltypisches Verhalten mit der Bildung von Pro-Plättchen (Megakaryozyten) und aktiver Migration (Neutrophile Granulozyten) (vgl. Ergebnisse 3.3).

Nach unserem Wissen ist dies die erste Arbeit, die erfolgreich eine Co-Kultur aus primären Megakaryozyten und primären Neutrophilen Granulozyten mit funktionsfähiger Thrombopoese etabliert hat. Diese ermöglichte uns im Folgenden die weitere Analyse der Interaktion beider Zellen, jedoch unter Berücksichtigung der gegebenen Limitationen einer jeden isolierten Kultur *in vitro*: es handelt sich um ein artifizielles Modell mit dem Vorteil der Untersuchbarkeit unter kontrollierten

Bedingungen, es kann jedoch niemals die volle Komplexität des Organismus *in vivo* abbilden, wie z.B. die komplexe dreidimensionale Knochenmarkstruktur¹³.

4.3 Physische Interaktion von Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten

Die erfolgreich etablierte Co-Kultur *in vitro* aus primären Megakaryozyten und Neutrophilen Granulozyten begannen wir nun in zeitaufgelösten Videoaufnahmen über 3-6 h zu beobachten (vgl. Ergebnisse 3.3.3). Hierbei zeigte sich vielfach eine physische Interaktion der Neutrophilen mit Megakaryozyten, die sich insbesondere auf die reifen Megakaryozyten und ihre lang auslaufenden Pro-Plättchen konzentrierte und den Anschein hatte, als würden die Leukozyten regelrecht an den Pro-Plättchen „ziehen“ (vgl. Abbildung 3.14). Leider reichten die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten aufgrund des komplexen Versuchsaufbaus und der nur begrenzten Anzahl der zu beobachtenden Megakaryozyten nicht für eine aussagekräftige Quantifizierung.

Unsere Arbeitsgruppe um Petzold *et al.* nahm diese Beobachtungen jedoch zum Anlass, weitere Versuche *in vivo* durchzuführen: mittels intravitale Multiphotonen-Mikroskopie konnte das Knochenmark in der Schädelkalotte von Mäusen mit konditionalem Knock-in für zellspezifische Fluoreszenzproteine gefilmt werden (Pf4-cre(+)/Confetti^{-/-}/Lyz2-eGFP).¹⁷¹ Dies bestätigte unsere Ergebnisse und zeigte das noch stärkere Ausmaß der Interaktionen *in vivo*, wo jeder Megakaryozyt im Durchschnitt mit vier Neutrophilen gleichzeitig physischen Kontakt hatte. Im Mittel wurden acht Interaktionen pro Stunde gezählt, mit einer mittleren Dauer von 13 min.¹⁷¹ Insgesamt zeigten fortgeschritten differenzierte und somit entrundete Megakaryozyten signifikant häufiger physische Interaktion, was auch mit unseren Beobachtungen *in vitro* übereinstimmt.

Dies ist die erste Publikation, die eine physische Interaktion speziell der Pro-Plättchen von Megakaryozyten mit Neutrophilen Granulozyten beschreibt – im Gegensatz zu weiteren aktuellen Arbeiten, die sich vermehrt mit der Emperipolesis beschäftigen,^{147,170} wie bereits oben diskutiert (vgl. Diskussion 4.1).

4.4 Steigerung der Thrombopoese durch Neutrophile Granulozyten

Um den Einfluss von Neutrophilen Granulozyten auf die Thrombopoese zu untersuchen, nutzten wir die etablierte Co-Kultur zuerst für histomorphologische Analysen (vgl. Abbildung 3.15). Hierbei konnten wir zeigen, dass in Anwesenheit

von Neutrophilen Granulozyten der Anteil Pro-Plättchen-formierender Megakaryozyten signifikant steigt (vgl. Abbildung 3.17). Da wir ausschließen wollten, dass es sich um eine reine Steigerung der megakaryozytären Ausreifung ohne weitere funktionelle Beeinflussung der effektiven Plättchenbildung handelte, entwickelten wir eine durchflusszytometrische Methode, um Plättchen und Plättchen-assoziierte Fragmente (PAF) anhand ihres doppel-positiven Signals für CD41 / CD42d zu quantifizieren (vgl. Abbildung 3.18).

Diese Methode konnten wir anhand des vorbeschriebenen Thrombopoese-fördernden Faktors S1P⁷¹ validieren und somit nachweisen, dass Megakaryozyten in Anwesenheit von Neutrophilen Granulozyten signifikant mehr Plättchen bzw. PAF freisetzen (vgl. Abbildung 3.19).

Nach unserem Wissen ist dies die erste Arbeit, welche die physische Interaktion und den positiven Einfluss von Neutrophilen Granulozyten auf die megakaryozytäre Thrombopoese zeigen konnte. Allerdings werfen die verwendeten Methoden weitere Fragen auf, u.a. ob es sich als Ursache hierbei wirklich um die beobachtete physische Zell-Zell-Interaktion handelt, oder um eine Beeinflussung durch lösliche Faktoren und welche molekulare Signalwege daran beteiligt sind.

Aufbauend auf diesen Vorarbeiten und etablierten Methoden konnte unsere Arbeitsgruppe um Petzold *et al.* diesen Fragen in weiteren Projekten nachgehen: so konnte mit der etablierten durchflusszytometrischen Methode gezeigt werden, dass nur Neutrophile Granulozyten einen Effekt auf die Thrombopoese haben und nicht B-Zellen, T-Zellen oder Monozyten.¹⁷¹ Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass eine Neutropenie bei Mäusen (Antikörper-induziert oder mittels konditionalem Knock-out) eine Thrombopenie nach sich zieht.¹⁷¹

Weitere Versuche mit unserem etablierten Assay bewiesen, dass nur die tatsächliche physische Interaktion eine Steigerung der PAF bewirkt, während eine Co-Kultur mit Trennung beider Zelltypen durch eine semi-permeable Membran (*transwell*) oder nur die Inkubation mit dem Überstand der Neutrophilen Granulozyten ohne Effekt blieben.¹⁷¹

Auch die mechanistischen Fragen konnten im Rahmen weiterer Arbeiten geklärt werden: so konnte gezeigt werden, dass der beobachtete Effekt vorwiegend von CXCR4, geringer auch von Integrin β 1 und Kindlin-3 auf Neutrophilen Granulozyten abhängt, während vermutete Rezeptoren wie PSGL-1, CD41, CD40L und CD18 (Integrin β 2) keinen Einfluss zeigten.¹⁷¹

Neutrophile Granulozyten ohne CXCR4 können weniger gut in das Knochenmark zurückfinden (engl. *homing*), wie vorbeschrieben¹⁷² und zeigen eine zufällige Verteilung im Knochenmark, ohne die bekannte Nähe¹³² zu Megakaryozyten.¹⁷¹

Als Ligand zu CXCR4 wird CXCL12 (auch: SDF1) kräftig auf Megakaryozyten exprimiert^{16,17} und unsere Gruppe konnte nachweisen, dass dieser Signalweg zur NOX2 (engl. *NADPH oxidase 2*) vermittelten Produktion von reaktiven Oxygen-Spezies (ROS) in Neutrophilen Granulozyten führt. In Megakaryozyten bewirkt diese Interaktion die aktivierende Phosphorylierung von ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinases*) und MLC (engl. *myosin light chain*), welche als essenziell zur megakaryozytären Ausreifung, sowie zur Formation und Freisetzung von Pro-Plättchen vorbeschrieben sind.^{173,174}

Die Erkenntnisse zur Neutrophilen-getriebenen Thrombopoese konnten auch auf Menschen übertragen werden: die Analyse der großen GWAS Datenbank (engl. *genome wide association study*) mit 408.112 Individuen¹⁷⁵ zeigte, dass genetische Veränderungen der Neutrophilen-Funktion mit einer reduzierten Plättchenzahl korrelieren.¹⁷¹ Auch zeigen Patienten mit Herzinfarkt eine höhere Rate retikulierter „junger“ Plättchen, welche als besonders prothrombotisch vorbeschrieben sind,^{176,177} sowie ebenfalls kurzfristig eine erhöhte Expression von CXCR4 auf Neutrophilen Granulozyten.¹⁷¹

Im daraufhin erweiterten Tiermodell zu arterieller und venöser Thrombose sowie zur LPS-induzierten Neutrophilen-Aktivierung konnte ebenfalls der prothrombotische Effekt der CXCR4-CXCL12-Achse nachgewiesen werden, welcher sich durch die Blockade von CXCR4 normalisieren ließ.¹⁷¹

4.5 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Neutrophile Granulozyten mit Megakaryozyten physisch interagieren und eine Steigerung der Plättchen-Produktion *in vitro* bewirken.

Die generierten Ergebnisse und etablierten Methoden führten zu weiteren Arbeiten, die letztlich zeigen konnten, dass durch Neutrophile Granulozyten vermittelte Mechano-signale an Megakaryozyten über CXCR4-CXCL12 und NOX2 die granulozytäre ROS aktivieren und megakaryozytäre ERK / MLC phosphorylieren, was zu einer Steigerung der Thrombopoese führt.¹⁷¹

Erste Daten weisen ebenfalls auf eine Relevanz dieses Effekts im Menschen hin, welcher u.a. beim Myokardinfarkt prothrombotisch wirkt. Somit eröffnet die Entdeckung der Neutrophilen-induzierten Thrombopoese neue therapeutische Ansätze bei ischämischen Ereignissen, welche in weiteren Studien untersucht werden sollten.

Literaturverzeichnis

1. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993;81(11):2844-2853.
2. Galloway JL, Zon LI. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol*. 2003;53:139-158. doi:10.1016/s0070-2153(03)53004-6
3. Kricun ME. Red-yellow marrow conversion: Its effect on the location of some solitary bone lesions. *Skeletal Radiol*. 1985;14(1):10-19. doi:10.1007/BF00361188
4. Laurenti E, Göttgens B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*. 2018;553(7689):418-426. doi:10.1038/nature25022
5. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poepl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*. 2011;333(6039):218-221. doi:10.1126/science.1201219
6. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996;273(5272):242-245. doi:10.1126/science.273.5272.242
7. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000;404(6774):193-197. doi:10.1038/35004599
8. Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood*. 1991;77(6):1218-1227.
9. Holmes C, Stanford WL. Concise Review: Stem Cell Antigen-1: Expression, Function, and Enigma. *STEM CELLS*. 2007;25(6):1339-1347. doi:10.1634/stemcells.2006-0644
10. Suttrop N, Möckel M, Siegmund B. *Harrisons Innere Medizin. Register: Innere Medizin*. 19. Auflage, in Zusammenarbeit mit der Charité. ABW Wissenschaftsverlag; 2016.
11. Woolthuis CM, Park CY. Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood*. 2016;127(10):1242-1248. doi:10.1182/blood-2015-07-607945
12. Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, et al. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*. 2005;121(2):295-306. doi:10.1016/j.cell.2005.02.013
13. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(5):303-320. doi:10.1038/s41580-019-0103-9
14. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
15. Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Winkel B, et al. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol*. 2013;15(5):533-543. doi:10.1038/ncb2730
16. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*. 2002;3(7):687-694. doi:10.1038/ni813
17. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25(6):977-988. doi:10.1016/j.immuni.2006.10.016
18. Ikuta K, Weissman IL. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(4):1502-1506.

19. Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, et al. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med*. 1991;174(1):63-71. doi:10.1084/jem.174.1.63
20. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*. 2013;495(7440):231-235. doi:10.1038/nature11885
21. Pinho S, Marchand T, Yang E, Wei Q, Nerlov C, Frenette PS. Lineage-Biased Hematopoietic Stem Cells Are Regulated by Distinct Niches. *Dev Cell*. 2018;44(5):634-641.e4. doi:10.1016/j.devcel.2018.01.016
22. Day RB, Link DC. Megakaryocytes in the hematopoietic stem cell niche. *Nat Med*. 2014;20(11):1233-1234. doi:10.1038/nm.3745
23. Cordeiro Gomes A, Hara T, Lim VY, et al. Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation. *Immunity*. 2016;45(6):1219-1231. doi:10.1016/j.immuni.2016.11.004
24. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-834. doi:10.1038/nature09262
25. Katayama Y, Battista M, Kao WM, et al. Signals from the Sympathetic Nervous System Regulate Hematopoietic Stem Cell Egress from Bone Marrow. *Cell*. 2006;124(2):407-421. doi:10.1016/j.cell.2005.10.041
26. Maryanovich M, Zahalka AH, Pierce H, et al. Adrenergic nerve degeneration in bone marrow drives aging of the hematopoietic stem cell niche. *Nat Med*. 2018;24(6):782-791. doi:10.1038/s41591-018-0030-x
27. Nakeff A, Maat B. Separation of megakaryocytes from mouse bone marrow by velocity sedimentation. *Blood*. 1974;43(4):591-595.
28. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3348-3354. doi:10.1172/JCI26891
29. Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*. 2007;317(5845):1767-1770. doi:10.1126/science.1146304
30. Behnke O, Forer A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol Suppl*. 1998;61:3-23. doi:10.1111/j.1600-0609.1998.tb01052.x
31. Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*. 2017;544(7648):105-109. doi:10.1038/nature21706
32. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell*. 1994;77(7):1117-1124. doi:10.1016/0092-8674(94)90450-2
33. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature*. 1994;369(6481):533-538. doi:10.1038/369533a0
34. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature*. 1994;369(6481):568-571. doi:10.1038/369568a0
35. Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*. 1995;86(2):419-431.
36. Qian S, Fu F, Li W, Chen Q, de Sauvage FJ. Primary Role of the Liver in Thrombopoietin Production Shown by Tissue-Specific Knockout. *Blood*. 1998;92(6):2189-2191. doi:10.1182/blood.V92.6.2189
37. M D, J L, Q L, L D. Hepatic thrombopoietin is required for bone marrow hematopoietic stem cell maintenance. *Science*. 2018;360(6384). doi:10.1126/science.aap8861

38. Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, et al. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):671-684. doi:10.1016/j.stem.2007.10.008
39. Sungaran R, Markovic B, Chong BH. Localization and Regulation of Thrombopoietin mRNA Expression in Human Kidney, Liver, Bone Marrow, and Spleen Using In Situ Hybridization. *Blood*. 1997;89(1):101-107. doi:10.1182/blood.V89.1.101
40. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3339-3347. doi:10.1172/JCI26674
41. Grozovsky R, Begonja AJ, Liu K, et al. The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat Med*. 2015;21(1):47-54. doi:10.1038/nm.3770
42. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*. 2001;98(9):2720-2725. doi:10.1182/blood.V98.9.2720
43. Wolber EM, Fandrey J, Frackowski U, Jelkmann W. Hepatic thrombopoietin mRNA is increased in acute inflammation. *Thromb Haemost*. 2001;86(6):1421-1424.
44. Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science*. 1994;265(5177):1445-1447. doi:10.1126/science.8073287
45. Murone M, Carpenter DA, de Sauvage FJ. Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice. *Stem Cells Dayt Ohio*. 1998;16(1):1-6. doi:10.1002/stem.160001
46. Ng AP, Kauppi M, Metcalf D, et al. Mpl expression on megakaryocytes and platelets is dispensable for thrombopoiesis but essential to prevent myeloproliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(16):5884-5889. doi:10.1073/pnas.1404354111
47. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*. 2004;10(1):64-71. doi:10.1038/nm973
48. Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J*. 1997;16(13):3965-3973. doi:10.1093/emboj/16.13.3965
49. Vyas P, Ault K, Jackson CW, Orkin SH, Shivdasani RA. Consequences of GATA-1 Deficiency in Megakaryocytes and Platelets. *Blood*. 1999;93(9):2867-2875. doi:10.1182/blood.V93.9.2867
50. Crispino JD. GATA1 in normal and malignant hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16(1):137-147. doi:10.1016/j.semcdb.2004.11.002
51. Shivdasani RA, Rosenblatt MF, Zucker-Franklin D, et al. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell*. 1995;81(5):695-704. doi:10.1016/0092-8674(95)90531-6
52. Lecine P, Italiano JE, Kim SW, Villeval JL, Shivdasani RA. Hematopoietic-specific β 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood*. 2000;96(4):1366-1373. doi:10.1182/blood.V96.4.1366
53. Deveaux S, Cohen-Kaminsky S, Shivdasani RA, et al. p45 NF-E2 regulates expression of thromboxane synthase in megakaryocytes. *EMBO J*. 1997;16(18):5654-5661. doi:10.1093/emboj/16.18.5654
54. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):269-280. doi:10.1007/s00441-009-0834-6
55. Handagama P, Scarborough RM, Shuman MA, Bainton DF. Endocytosis of Fibrinogen Into Megakaryocyte and Platelet α -Granules Is Mediated by α IIb β 3 (Glycoprotein IIb-IIIa). *Blood*. 1993;82(1):135-138. doi:10.1182/blood.V82.1.135.bloodjournal821135

56. Ware J, Russell SR, Marchese P, et al. Point mutation in a leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ib alpha resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Clin Invest.* 1993;92(3):1213-1220.
57. Balduini A, Malara A, Pecci A, et al. Proplatelet formation in heterozygous Bernard-Soulier syndrome type Bolzano. *J Thromb Haemost JTH.* 2009;7(3):478-484. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03255.x
58. Zimmet J, Ravid K. Polyploidy: Occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp Hematol.* 2000;28(1):3-16. doi:10.1016/S0301-472X(99)00124-1
59. Odell TT, Jackson CW, Friday TJ. Megakaryocytopoiesis in rats with special reference to polyploidy. *Blood.* 1970;35(6):775-782.
60. Raslova H, Roy L, Vourc'h C, et al. Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood.* 2003;101(2):541-544. doi:10.1182/blood-2002-05-1553
61. Behnke O. An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow: I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J Ultrastruct Res.* 1968;24(5):412-433. doi:10.1016/S0022-5320(68)80046-2
62. Radley JM, Haller CJ. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood.* 1982;60(1):213-219.
63. Schulze H, Korpál M, Hurov J, et al. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood.* 2006;107(10):3868-3875. doi:10.1182/blood-2005-07-2755
64. Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood.* 2014;123(6):921-930. doi:10.1182/blood-2013-03-492330
65. Patel SR, Richardson JL, Schulze H, et al. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood.* 2005;106(13):4076-4085. doi:10.1182/blood-2005-06-2204
66. Italiano JE, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood Platelets Are Assembled Principally at the Ends of Proplatelet Processes Produced by Differentiated Megakaryocytes. *J Cell Biol.* 1999;147(6):1299-1312. doi:10.1083/jcb.147.6.1299
67. Tablin F, Castro M, Leven RM. Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J Cell Sci.* 1990;97(1):59-70. doi:10.1242/jcs.97.1.59
68. Rojnuckarin P, Kaushansky K. Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase C α . *Blood.* 2001;97(1):154-161. doi:10.1182/blood.V97.1.154
69. Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood.* 2005;106(13):4066-4075. doi:10.1182/blood-2005-06-2206
70. Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, et al. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol.* 2010;191(4):861-874. doi:10.1083/jcb.201006102
71. Zhang L, Orban M, Lorenz M, et al. A novel role of sphingosine 1-phosphate receptor S1pr1 in mouse thrombopoiesis. *J Exp Med.* 2012;209(12):2165-2181. doi:10.1084/jem.20121090
72. Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, et al. IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *J Cell Biol.* 2015;209(3):453-466. doi:10.1083/jcb.201410052

73. Al-Tamimi M, Grigoriadis G, Tran H, et al. Coagulation-induced shedding of platelet glycoprotein VI mediated by factor Xa. *Blood*. 2011;117(14):3912-3920. doi:10.1182/blood-2010-08-301523
74. Dunois-Lardé C, Capron C, Fichelson S, Bauer T, Cramer-Bordé E, Baruch D. Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood*. 2009;114(9):1875-1883. doi:10.1182/blood-2009-03-209205
75. Mohandas N, Prenant M. Three-dimensional Model of Bone Marrow. *Blood*. 1978;51(4):633-643. doi:10.1182/blood.V51.4.633.633
76. Avraham H, Cowley S, Chi SY, Jiang S, Groopman JE. Characterization of adhesive interactions between human endothelial cells and megakaryocytes. *J Clin Invest*. 1993;91(6):2378-2384. doi:10.1172/JCI116470
77. Avraham H, Banu N, Scadden DT, Abraham J, Groopman JE. Modulation of Megakaryocytopoiesis by Human Basic Fibroblast Growth Factor. *Blood*. 1994;83(8):2126-2132. doi:10.1182/blood.V83.8.2126.2126
78. Stohlawetz P, Stiegler G, Höcker P, Panzer S, Knöbl P. The rise of reticulated platelets after intensive chemotherapy for AML reduces the need for platelet transfusions. *Ann Hematol*. 1999;78(6):271-273. doi:10.1007/s002770050513
79. Tacchini-Cottier F, Vesin C, Redard M, Buurman W, Piguet PF. Role of TNFR1 and TNFR2 in TNF-induced platelet consumption in mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1998;160(12):6182-6186.
80. Haas S, Hansson J, Klimmeck D, et al. Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors. *Cell Stem Cell*. 2015;17(4):422-434. doi:10.1016/j.stem.2015.07.007
81. Furie B, Furie BC. Mechanisms of Thrombus Formation. *N Engl J Med*. 2008;359(9):938-949. doi:10.1056/NEJMra0801082
82. Hartwig JH. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol*. 1992;118(6):1421-1442. doi:10.1083/jcb.118.6.1421
83. Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, et al. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost JTH*. 2009;7(11):1759-1766. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03586.x
84. Kaushansky K. Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors. *N Engl J Med*. 2006;354(19):2034-2045. doi:10.1056/NEJMra052706
85. Machlus KR, Italiano JE. 2 - Megakaryocyte Development and Platelet Formation. In: Michelson AD, ed. *Platelets (Fourth Edition)*. Academic Press; 2019:25-46. doi:10.1016/B978-0-12-813456-6.00002-3
86. Rowley JW, Schwertz H, Weyrich AS. Platelet mRNA: the meaning behind the message. *Curr Opin Hematol*. 2012;19(5):385-391. doi:10.1097/MOH.0b013e328357010e
87. Kieffer N, Guichard J, Farcet JP, Vainchenker W, Breton-Gorius J. Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur J Biochem*. 1987;164(1):189-195. doi:10.1111/j.1432-1033.1987.tb11010.x
88. Bergmeier W, Chauhan AK, Wagner DD. Glycoprotein Ibalpha and von Willebrand factor in primary platelet adhesion and thrombus formation: lessons from mutant mice. *Thromb Haemost*. 2008;99(2):264-270. doi:10.1160/TH07-10-0638
89. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*. 2008;451(7181):914-918. doi:10.1038/nature06797
90. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(1):34-45. doi:10.1038/nri3345
91. Hose JE, Martin GG, Gerard AS. A Decapod Hemocyte Classification Scheme Integrating Morphology, Cytochemistry, and Function. *Biol Bull*. 1990;178(1):33-45. doi:10.2307/1541535

92. Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):264-274. doi:10.1038/nri2956
93. Gaertner F, Ahmad Z, Rosenberger G, et al. Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria. *Cell.* 2017;171(6):1368-1382.e23. doi:10.1016/j.cell.2017.11.001
94. Nicolai L, Massberg S. Platelets as key players in inflammation and infection. *Curr Opin Hematol.* 2020;27(1):34-40. doi:10.1097/MOH.0000000000000551
95. Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, et al. Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thromb Res.* 2004;113(6):379-385. doi:10.1016/j.thromres.2004.03.023
96. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KVJ, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood.* 2005;106(7):2417-2423. doi:10.1182/blood-2005-03-0916
97. Aslam R, Speck ER, Kim M, et al. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood.* 2006;107(2):637-641. doi:10.1182/blood-2005-06-2202
98. Borregaard N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity.* 2010;33(5):657-670. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011
99. Kochanek M, Schalk E, von Bergwelt-Baildon M, et al. Management of sepsis in neutropenic cancer patients: 2018 guidelines from the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) and Intensive Care Working Party (iCHOP) of the German Society of Hematology and Medical Oncology (DGHO). *Ann Hematol.* 2019;98(5):1051-1069. doi:10.1007/s00277-019-03622-0
100. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 2011;12(11):1035-1044. doi:10.1038/ni.2109
101. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, et al. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2010;116(4):625-627. doi:10.1182/blood-2010-01-259028
102. Tofts PS, Chevassut T, Cutajar M, Dowell NG, Peters AM. Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2011;117(22):6050-6052; author reply 6053-6054. doi:10.1182/blood-2010-10-310532
103. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 1992;80(8):2012-2020.
104. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010;31(8):318-324. doi:10.1016/j.it.2010.05.006
105. Wang J, Hossain M, Thanabalasuriar A, Gunzer M, Meininger C, Kubes P. Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science.* 2017;358(6359):111-116. doi:10.1126/science.aam9690
106. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood.* 1994;84(6):1737-1746.
107. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity.* 2005;22(3):285-294. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.011
108. Ley K, Smith E, Stark MA. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res.* 2006;34(3):229-242. doi:10.1385/IR:34:3:229
109. Nerlov C, Graf T. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* 1998;12(15):2403-2412. doi:10.1101/gad.12.15.2403

110. Dahl R, Walsh JC, Lancki D, et al. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBP α ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol.* 2003;4(10):1029-1036. doi:10.1038/ni973
111. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):678-689. doi:10.1038/nri2156
112. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med.* 2011;17(11):10. doi:10.1038/nm.2514
113. El-Benna J, Dang PMC, Gougerot-Pocidallo MA, Marie JC, Braut-Boucher F. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med.* 2009;41(4):217-225. doi:10.3858/emm.2009.41.4.058
114. Häger M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med.* 2010;268(1):25-34. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02237.x
115. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-1535. doi:10.1126/science.1092385
116. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 2014;15(11):1017-1025. doi:10.1038/ni.2987
117. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 2009;30(11):513-521. doi:10.1016/j.it.2009.07.011
118. Bowman JL, Sakakibara K, Furumizu C, Dierschke T. Evolution in the Cycles of Life. *Annu Rev Genet.* 2016;50:133-154. doi:10.1146/annurev-genet-120215-035227
119. Armingol E, Officer A, Harismendy O, Lewis NE. Deciphering cell–cell interactions and communication from gene expression. *Nat Rev Genet.* 2021;22(2):71-88. doi:10.1038/s41576-020-00292-x
120. Yeaman MR. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(6):426-437. doi:10.1038/nrmicro3269
121. Diacovo TG, Puri KD, Warnock RA, Springer TA, von Andrian UH. Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science.* 1996;273(5272):252-255. doi:10.1126/science.273.5272.252
122. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 1998;391(6667):591-594. doi:10.1038/35393
123. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:111-135. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.111
124. André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-Derived CD40L: The Switch-Hitting Player of Cardiovascular Disease. *Circulation.* 2002;106(8):896-899. doi:10.1161/01.CIR.0000028962.04520.01
125. von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med.* 2012;209(4):819-835. doi:10.1084/jem.20112322
126. Simon DI, Chen Z, Xu H, et al. Platelet glycoprotein Iba α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 2000;192(2):193-204. doi:10.1084/jem.192.2.193
127. Wang Y, Sakuma M, Chen Z, et al. Leukocyte Engagement of Platelet Glycoprotein Iba α via the Integrin Mac-1 Is Critical for the Biological Response to Vascular Injury. *Circulation.* 2005;112(19):2993-3000. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.571315

128. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007;13(4):463-469. doi:10.1038/nm1565
129. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(36):15880-15885. doi:10.1073/pnas.1005743107
130. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* 2010;16(8):887-896. doi:10.1038/nm.2184
131. Haselmayer P, Grosse-Hovest L, von Landenberg P, Schild H, Radsak MP. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood.* 2007;110(3):1029-1035. doi:10.1182/blood-2007-01-069195
132. Boisset JC, Vivié J, Grün D, Muraro MJ, Lyubimova A, van Oudenaarden A. Mapping the physical network of cellular interactions. *Nat Methods.* 2018;15(7):547-553. doi:10.1038/s41592-018-0009-z
133. Köhler A, De Filippo K, Hasenberg M, et al. G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood.* 2011;117(16):4349-4357. doi:10.1182/blood-2010-09-308387
134. Humble JG, Jayne WHW, Pulvertaft RJV. Biological Interaction Between Lymphocytes and Other Cells. *Br J Haematol.* 1956;2(3):283-294. doi:10.1111/j.1365-2141.1956.tb06700.x
135. Overholtzer M, Mailleux AA, Mouneimne G, et al. A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion. *Cell.* 2007;131(5):966-979. doi:10.1016/j.cell.2007.10.040
136. Overholtzer M, Brugge JS. The cell biology of cell-in-cell structures. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(10):796-809. doi:10.1038/nrm2504
137. Rosai J, Dorfman RF. Sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy. A newly recognized benign clinicopathological entity. *Arch Pathol.* 1969;87(1):63-70.
138. Cunin P, Nigrovic PA. Megakaryocyte emperipolesis: a new frontier in cell-in-cell interaction. *Platelets.* 2020;31(6):700-706. doi:10.1080/09537104.2019.1693035
139. Tanaka M, Aze Y, Fujita T. Megakaryocytic Emperipolesis in the Rat Bone Marrow Induced by Lipopolysaccharide. *J Vet Med Sci.* 1994;56(6):1173-1175. doi:10.1292/jvms.56.1173
140. Bobik R, Dabrowski Z. Emperipolesis of marrow cells within megakaryocytes in the bone marrow of sublethally irradiated mice. *Ann Hematol.* 1995;70(2):91-95. doi:10.1007/BF01834387
141. Sahebkhari HA, Tavassoli M. Marrow Cell Uptake by Megakaryocytes in Routine Bone Marrow Smears during Blood Loss. *Scand J Haematol.* 1976;16(1):13-17. doi:10.1111/j.1600-0609.1976.tb01110.x
142. Thiele J, Krech R, Choritz H, Georgii A. Emperipolesis — a peculiar feature of megakaryocytes as evaluated in chronic myeloproliferative diseases by morphometry and ultrastructure. *Virchows Arch B.* 1984;46(1):253. doi:10.1007/BF02890314
143. Cashell AW, Buss DH. The frequency and significance of megakaryocytic emperipolesis in myeloproliferative and reactive states. *Ann Hematol.* 1992;64(6):273-276. doi:10.1007/BF01695470
144. Larocca LM, Heller PG, Podda G, et al. Megakaryocytic emperipolesis and platelet function abnormalities in five patients with gray platelet syndrome. *Platelets.* 2015;26(8):751-757. doi:10.3109/09537104.2014.994093
145. Schmitt A, Jouault H, Guichard J, Wendling F, Drouin A, Cramer EM. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood.* 2000;96(4):1342-1347. doi:10.1182/blood.V96.4.1342

146. McGinnis E, Chipperfield KM. Striking emperipolesis in megakaryocytes of gray platelet syndrome. *Blood*. 2019;133(26):2809. doi:10.1182/blood.2019000494
147. Cunin P, Bouslama R, Machlus KR, et al. Megakaryocyte emperipolesis mediates membrane transfer from intracytoplasmic neutrophils to platelets. Fässler R, Akhmanova A, Fässler R, Sperandio M, eds. *eLife*. 2019;8:e44031. doi:10.7554/eLife.44031
148. Larsen Trygve E. Emperipolesis of Granular Leukocytes within Megakaryocytes in Human Hemopoietic Bone Marrow. *Am J Clin Pathol*. 1970;53(4):485-489. doi:10.1093/ajcp/53.4.485
149. Tanaka M, Aze Y, Fujita T. Adhesion Molecule LFA-1/ICAM-1 Influences on LPS-induced Megakaryocytic Emperipolesis in the Rat Bone Marrow. *Vet Pathol*. 1997;34(5):463-466. doi:10.1177/030098589703400511
150. Spangrude GJ, Lewandowski D, Martelli F, et al. P-Selectin Sustains Extramedullary Hematopoiesis in the Gata1low Model of Myelofibrosis. *Stem Cells*. 2016;34(1):67-82. doi:10.1002/stem.2229
151. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
152. Hitchcock IS, Fox NE, Prévost N, Sear K, Shattil SJ, Kaushansky K. Roles of focal adhesion kinase (FAK) in megakaryopoiesis and platelet function: studies using a megakaryocyte lineage-specific FAK knockout. *Blood*. 2008;111(2):596-604. doi:10.1182/blood-2007-05-089680
153. Lecine P, Villeval JL, Vyas P, Swencki B, Xu Y, Shivdasani RA. Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes. *Blood*. 1998;92(5):1608-1616.
154. Valeur B. Characteristics of Fluorescence Emission. In: *Molecular Fluorescence*. John Wiley & Sons, Ltd; 2001:34-71. doi:10.1002/3527600248.ch3
155. Lichtman JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nat Methods*. 2005;2(12):910-919. doi:10.1038/nmeth817
156. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(2):163-176. doi:10.3109/07388551.2015.1128876
157. Ibrahim SF, van den Engh G. Flow Cytometry and Cell Sorting. In: Kumar A, Galaev IY, Mattiasson B, eds. *Cell Separation: Fundamentals, Analytical and Preparative Methods*. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Springer; 2007:19-39. doi:10.1007/10_2007_073
158. Machlus KR, Italiano JE. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol*. 2013;201(6):785-796. doi:10.1083/jcb.201304054
159. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev*. 2019;99(2):1223-1248. doi:10.1152/physrev.00012.2018
160. Centurione L, Di Baldassarre A, Zingariello M, et al. Increased and pathologic emperipolesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1low mice. *Blood*. 2004;104(12):3573-3580. doi:10.1182/blood-2004-01-0193
161. McGarry MP, Reddington M, Jackson CW, Zhen L, Novak EK, Swank RT. Increased Incidence and Analysis of Emperipolesis in Megakaryocytes of the Mouse Mutant Gunmetal. *Exp Mol Pathol*. 1999;66(3):191-200. doi:10.1006/exmp.1999.2270
162. Cooper N, Bain BJ. Emperipolesis in a patient receiving romiplostim. *Am J Hematol*. 2016;91(1):166-166. doi:10.1002/ajh.24199

163. Mangi M, Mufti G. Primary myelodysplastic syndromes: diagnostic and prognostic significance of immunohistochemical assessment of bone marrow biopsies. *Blood*. 1992;79(1):198-205. doi:10.1182/blood.V79.1.198.198
164. Loike JD, el Khoury J, Cao L, et al. Fibrin regulates neutrophil migration in response to interleukin 8, leukotriene B4, tumor necrosis factor, and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Exp Med*. 1995;181(5):1763-1772. doi:10.1084/jem.181.5.1763
165. Videm V, Strand E. Changes in Neutrophil Surface-Receptor Expression After Stimulation with FMLP, Endotoxin, Interleukin-8 and Activated Complement Compared to Degranulation. *Scand J Immunol*. 2004;59(1):25-33. doi:10.1111/j.0300-9475.2004.01351.x
166. Machlus KR, Thon JN, Italiano JE. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *Br J Haematol*. 2014;165(2):227-236. doi:10.1111/bjh.12758
167. de Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(6):378-391. doi:10.1038/nri.2016.49
168. Long MW, Williams N, Ebbe S. Immature Megakaryocytes in the Mouse: Physical Characteristics, Cell Cycle Status, and In Vitro Responsiveness to Thrombopoietic Stimulatory Factor. *Blood*. 1982;59(3):569-575. doi:10.1182/blood.V59.3.569.569
169. Dhanjal TS, Pendaries C, Ross EA, et al. A novel role for PECAM-1 in megakaryocytopoiesis and recovery of platelet counts in thrombocytopenic mice. *Blood*. 2007;109(10):4237-4244. doi:10.1182/blood-2006-10-050740
170. Huang FY, Cunin P, Radtke FA, Darbousset R, Grieshaber-Bouyer R, Nigrovic PA. Neutrophil transit time and localization within the megakaryocyte define morphologically distinct forms of emperipoiesis. *Blood Adv*. 2022;6(7):2081-2091. doi:10.1182/bloodadvances.2021005097
171. Petzold T, Zhang Z, Ballesteros I, et al. Neutrophil “plucking” on megakaryocytes drives platelet production and boosts cardiovascular disease. *Immunity*. 2022;55(12):2285-2299.e7. doi:10.1016/j.immuni.2022.10.001
172. Adrover JM, Del Fresno C, Crainiciuc G, et al. A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection. *Immunity*. 2019;50(2):390-402.e10. doi:10.1016/j.immuni.2019.01.002
173. Mazharian A, Watson SP, Séverin S. Critical role for ERK1/2 in bone marrow and fetal liver-derived primary megakaryocyte differentiation, motility, and proplatelet formation. *Exp Hematol*. 2009;37(10):1238-1249.e5. doi:10.1016/j.exphem.2009.07.006
174. Chang Y, Auradé F, Larbret F, et al. Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood*. 2007;109(10):4229-4236. doi:10.1182/blood-2006-04-020024
175. Vuckovic D, Bao EL, Akbari P, et al. The Polygenic and Monogenic Basis of Blood Traits and Diseases. *Cell*. 2020;182(5):1214-1231.e11. doi:10.1016/j.cell.2020.08.008
176. Cesari F, Marcucci R, Gori AM, et al. Reticulated platelets predict cardiovascular death in acute coronary syndrome patients. Insights from the AMI-Florence 2 Study. *Thromb Haemost*. 2013;109(5):846-853. doi:10.1160/TH12-09-0709
177. Bongiovanni D, Santamaria G, Klug M, et al. Transcriptome Analysis of Reticulated Platelets Reveals a Prothrombotic Profile. *Thromb Haemost*. 2019;119(11):1795-1806. doi:10.1055/s-0039-1695009

Anhang

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Tobias Petzold für die freundliche Überlassung des Themas und die Aufnahme in seine Forschungsgruppe danken. Neben seiner fachlichen Betreuung und der Vermittlung wissenschaftlichen Denkens bin ich besonders dankbar für seine mitreißende Motivation und beeindruckende Ausdauer, sowie seine persönliche Unterstützung.

Zusätzlich möchte ich allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe danken, für die jederzeit große Hilfsbereitschaft sowie die kollegiale und fröhliche Arbeitsatmosphäre, die den Laboralltag sehr bereichert haben.

Abschließend möchte ich von Herzen meiner Familie und Franzi danken, eure stete Unterstützung hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Affidavit

Hoppe, Boj Friedrich Wolfgang Maria

Name, Vorname

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

**Die Rolle der Interaktion von Megakaryozyten und
Neutrophilen Granulozyten in Bezug auf die Thrombopoese**

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

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

München, den 16.10.2023

Ort, Datum

Boj Friedrich Hoppe

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand