

**Das thrombozytäre Chemokin C-X-C Motiv
Ligand 14 (CXCL14) bindet an den C-X-C Motiv
Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) und wirkt pro-
inflammatorisch**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Alexander Witte
aus Tübingen

Tübingen
2020

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

01.12.2020

Stellvertretender Dekan:

Prof. Dr. József Fortágh

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Meinrad Gawaz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Peter Ruth

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Thrombozyten	1
1.2 Megakaryopoese und Thrombopoese	3
1.3 Physiologische Funktion	4
1.4 Integrinaktivierung	5
1.5 Shape Change	6
1.6 Degranulation	7
1.7 Thrombo-Inflammation	12
1.8 Chemokine	15
1.9 CXCL14	15
1.10 CXCL14 vermittelte Chemotaxis	17
1.11 CXCL14 und Angiogenese	17
1.12 Antimikrobielle Eigenschaften von CXCL14	18
1.13 CXCL14 und der Insulinhaushalt	18
1.14 CXCL14 und sein Rezeptor	18
1.15 Induzierbare pluripotente Stammzellen (iPSCs)	20
1.16 CRISPR/Cas Technik	21
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Geräte	24
2.1.2 Chemikalien und Lösungen	26
2.1.3 Lösungen	28
2.1.4 Gebrauchsgüter	29
2.1.5 Zellkulturmedien	30
2.1.6 Antikörper und Plasmide	31
2.1.7 Software	32
2.2 Methoden	33
2.2.1 Zellbiologische Methoden	33
2.2.2 Isolation humaner Thrombozyten	33
2.2.3 Isolation von plättchenreichem Plasma (PRP)	33

2.2.4	Isolation muriner Thrombozyten	34
2.2.5	Herstellung von Thrombozytenüberständen	34
2.2.6	Isolation und Kultivierung humaner Monozyten	35
2.2.7	Isolation und Kultivierung muriner Monozyten	36
2.2.8	Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien	37
2.2.9	Kultivierung von induzierbaren pluripotenten Stammzellen	37
2.2.10	Transfektion von HEK293 und iPS-Zellen	38
2.2.11	Differenzierung von iPS-Zellen	39
2.2.12	Isolation von Thrombozyten-ähnlichen Partikeln	39
2.2.13	Cytospin	40
2.2.14	Lyse von Zellen	40
2.2.15	Bestimmung der Proteinkonzentration	41
2.2.16	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	41
2.2.17	Proteinnachweis durch Immunoblot-Analyse (Western Blot)	43
2.2.18	Ko-Immunopräzipitation	44
2.2.19	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	44
2.3	Molekularbiologische Methoden	45
2.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
2.3.2	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese	47
2.3.3	DNA-Konzentrationsbestimmung per NanoDrop	47
2.3.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	47
2.3.5	Chemische Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	47
2.3.6	CRISPR/Cas9 Knock-out von IPS-Zellen	48
2.3.7	Isolation von Plasmiden	49
2.3.8	Sequenzierung	49
2.4	Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie	50
2.4.1	Konfokale Mikroskopie von Thrombozyten	50
2.4.2	Konfokale Mikroskopie von Kulturzellen	50
2.4.3	Elektronenmikroskopie	51
2.5	Funktionelle Methoden	52
2.5.1	Bestimmung der Blutparameter	52
2.5.2	Durchflusszytometrie muriner Thrombozyten	52
2.5.3	Durchflusszytometrie humaner Thrombozyten	52

2.5.4	<i>In vitro</i> Thrombusbildung (Flusskammer)	53
2.5.5	Phagozytose Assay	54
2.5.6	Migration Monozyten	55
2.5.7	Migration Thrombozyten	56
2.5.8	Migration Thrombozyten ähnlicher Partikel (CDPs)	56
2.5.9	Aktives flächenhaftes Ausbreiten von Thrombozyten (<i>Spreading</i>)	57
2.5.10	Wundheilungsassay	58
2.5.11	Aggregometrie	59
2.5.12	ATP Freisetzung	59
2.6	Experimente an der Maus	60
2.6.1	Organentnahme	60
2.6.2	Phänotypisierung der <i>cxcl14^{-/-}</i> Knock-out Tiere	60
2.6.3	Phänotypisierung der <i>cxcr4^{fl/fl} Pf4-Cre⁺</i> Mäuse und <i>cxcr7^{fl/fl} Pf4-Cre⁺</i> Mäuse	61
2.6.4	<i>In vivo</i> Experimente (Peritonitis)	62
2.6.5	Verwendete Mäuse und ethische Vertretbarkeit	63
2.7	Statistische Auswertung	63
3	Ergebnisse	64
3.1	Thrombozyten exprimieren und sekretieren CXCL14	65
3.1.1	Thrombozyten exprimieren CXCL14	65
3.1.2	CXCL14 wird nach Thrombozytenstimulation freigesetzt	66
3.1.3	CXCL14 wird auf der Thrombozytenoberfläche detektiert	68
3.2	Thrombozytäres CXCL14 ist pro-inflammatorisch und thrombo-regulatorisch	72
3.2.1	CXCL14 erhöht die Monozyten vermittelte Phagozytose	72
3.2.2	Humane Monozyten migrieren zu thrombozytärem CXCL14	73
3.2.3	Thrombozytäres CXCL14 beeinflusst die murine Monozytenmigration	75
3.2.4	Thrombozytäres CXCL14 inhibiert Endothelzellproliferation	78
3.2.5	Thrombozyten werden nicht durch CXCL14 aktiviert	81
3.2.6	Die α -Degranulation von <i>cxcl14^{-/-}</i> Thrombozyten ist vermindert	83
3.2.7	CXCL14 zeigt keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation	85

3.2.8	cxcl14 ^{-/-} Thrombozyten zeigen eine verminderte flächenhafte Ausbreitung _____	86
3.2.9	Die <i>in-vitro</i> Thrombusbildung von cxcl14 ^{-/-} Mäusen ist vermindert _____	88
3.2.10	cxcl14 ^{-/-} Thrombozyten setzen geringere Mengen ATP frei _____	90
3.2.11	cxcl14 ^{-/-} Thrombozyten enthalten weniger δ -Granula _____	91
3.2.12	CXCL14 wirkt chemotaktisch auf Thrombozyten _____	93
3.3	CXCL14 wirkt über den thrombozytären Chemokinrezeptor CXCR4 _____	95
3.3.1	Die CXCL14 vermittelte Monozytenmigration erfolgt über CXCR4 _____	95
3.3.2	cxcr4 ^{-/-} Mäuse exprimieren keinen thrombozytären CXCR4 Rezeptor _____	96
3.3.3	Die CXCL14 vermittelte Thrombozyten Migration erfolgt über CXCR4 _____	98
3.3.4	Humane cxcr4 ^{-/-} Thrombozyten-ähnliche Partikel migrieren nicht zu CXCL14 _____	99
3.3.5	CXCL14 bindet an CXCR4 auf aktivierten Thrombozyten – Ko-Immunopräzipitation _____	107
3.3.6	CXCL14 bindet an CXCR4 auf aktivierten Thrombozyten - Konfokalaufnahmen _____	108
3.3.7	Im Peritonitis-Modell migrieren cxcr4 ^{-/-} Thrombozyten vermindert _____	110
4	Diskussion _____	112
4.1	Thrombozyten als Quelle für das Chemokin CXCL14 _____	112
4.2	Effekte von CXCL14 werden durch den Chemokinrezeptor CXCR4 vermittelt _____	116
4.3	Thrombozytäres CXCL14 interagiert mit dem Chemokinrezeptor CXCR4 _____	120
5	Zusammenfassung _____	122
6	Literaturverzeichnis _____	124
7	Plasmidkarten _____	134
8	Erklärung zum Eigenanteil _____	137
9	Veröffentlichungen _____	138
10	Danksagung _____	139
11	Lebenslauf _____	140

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung der Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten	5
Abbildung 2. Schematische Darstellung der Struktur eines Thrombozyten	9
Abbildung 3. Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen CXCL12 und CXCL14.....	20
Abbildung 4. Schematische Ansicht des angewendeten CRISPR/Cas9 Prinzips	23
Abbildung 5. Genotypisierung von <i>cxcl14^{-/-}</i> Mäusen	60
Abbildung 6. Generierung einer Thrombozyten-spezifischen CXC-Rezeptor Knock-out Maus	61
Abbildung 7. Schematische Abbildung der Fragestellung.....	64
Abbildung 8. Humane und murine Thrombozyten exprimieren CXCL14	65
Abbildung 9. Humane Thrombozyten enthalten CXCL14	66
Abbildung 10. CXCL14 ist im Überstand von aktivierten Thrombozyten nachweisbar	67
Abbildung 11. CXCL14 ist im Überstand von aktivierten Thrombozyten per ELISA nachweisbar.....	67
Abbildung 12. CXCL14 ist auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten zu detektieren	68
Abbildung 13. Die Oberflächenexpression von CXCL14 Thrombozyten ist CRP-XL-konzentrationsabhängig	70
Abbildung 14. CXCL14 erhöht die phagozytotische Aktivität von humanen Monozyten	72
Abbildung 15. Thrombozytäres CXCL14 wirkt chemotaktisch auf Monozyten..	74
Abbildung 16. <i>cxcl14^{-/-}</i> Mäuse exprimieren kein CXCL14	76
Abbildung 17. Thrombozytäres CXCL14 induziert die Migration von Monozyten	77
Abbildung 18. Rekombinantes CXCL14 inhibiert Wachstum von Endothelzellen	79
Abbildung 19. Thrombozytäres CXCL14 inhibiert Wachstum von Endothelzellen	80
Abbildung 20. Rekombinantes CXCL14 hat keinen Effekt auf die Aktivierung von Thrombozyten	82
Abbildung 21. <i>cxcl14^{-/-}</i> Thrombozyten zeigen Unterschiede in der Aktivierung verglichen zum Wildtyp	84
Abbildung 22. <i>cxcl14^{-/-}</i> Thrombozyten zeigen keine Veränderung in der Aggregation.....	85
Abbildung 23. Das Spreading von <i>cxcl14^{-/-}</i> Thrombozyten ist vermindert.....	86
Abbildung 24. Die Thrombusformation in vitro ist bei <i>cxcl14^{-/-}</i> Mäusen verringert	88
Abbildung 25. Inkubation mit CXCL14 reguliert die in vitro Thrombusformation	89
Abbildung 26. Die ATP Freisetzung in <i>cxcl14^{-/-}</i> Thrombozyten ist verringert	90
Abbildung 27. <i>cxcl14^{-/-}</i> Thrombozyten enthalten weniger δ -Granula verglichen zu Wildtyp Thrombozyten	92

Abbildung 28. Rekombinantes CXCL14 induziert die Migration von Thrombozyten	94
Abbildung 29. CXCL14 induziert die Migration von Monozyten über den CXCL14-Motiv Chemokin Rezeptor-4	95
Abbildung 30. CXCR4 und CXCR7 werden durch Pf4 abhängige Cre Expression ausgeknockt	97
Abbildung 31. CXCR4 ist für die Migration von Thrombozyten essentiell	98
Abbildung 32. Schematische Darstellung der iPSC Knock-out Charakterisierung	100
Abbildung 33. Schematische Darstellung der iPSC Differenzierung	102
Abbildung 34. iPSC Differenzierung – Thrombozyten ähnliche Partikel	104
Abbildung 35. CXCR4 ist in die Migration von humanen Thrombozyten ähnlichen Partikeln involviert	106
Abbildung 36. CXCR4 bindet CXCL14 in vitro	107
Abbildung 37. CXCL14 bindet an CXCR4 auf aktivierten Thrombozyten	109
Abbildung 38. In vivo Migration von Thrombozyten ist CXCR4 abhängig	111
Abbildung 39. Schematische Abbildung der Hypothese für thrombozytäres CXCL14	123
Abbildung 40. Addendum – Phänotypisierung von <i>cxcl14</i> ^{-/-} Mäusen	136
Tabelle 1. Inhalt thrombozytärer Granula	9
Tabelle 2. Zutaten Sammelgel – Endvolumen 5 ml	42
Tabelle 3. Zutaten Trenngel – Endvolumen 5 ml	42
Tabelle 4. Zutaten PCR Ansätze	45
Tabelle 5. Prozessbedingungen der PCR	46

Abkürzungsverzeichnis

ACD-Puffer	Acid-Citrate-Dextrose-Puffer
ADP	Adenosindiphosphat
APR	Akute-Phase-Reaktion
APS	Aktivierter Plättchenüberstand (<i>Activated platelet supernatant</i>)
ARP 2/3	<i>Actin-Related Proteins ARP2 and 3</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BMAC	<i>B-cell and monocyte activating protein</i>
C57Bl/6J	C57Bl/6J Maus Stamm
Ca ²⁺	Calcium Ionen
Cas9	CRISPR-assoziiertes Protein 9
CCL2 (MCP-1)	C-C Motiv Ligand 2 (<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>)
CCL3 (MIP-1α)	C-C Motiv Ligand 3 (<i>Macrophage Inflammatory Proteins- 1α</i>)

CCL5 (Rantes)	C-C Motiv Ligand 5 (<i>Regulated and Normal T cell Expressed and Secreted</i>)
CDPA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CRISPR	<i>Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRP-XL	<i>Crosslinked - Collagen-Related-Peptide</i>
crRNA	CRISPR-RNA
CXCL12 (SDF-1 α)	CXC-Motiv-Chemokin 12 (<i>Stromal cell-derived factor 1α</i>)
CXCL14 (BRAK)	C-X-C Motif Ligand 14 (<i>Breast- and kidney expressed chemokine</i>)
cxcl14 ^{-/-}	CXCL14 Knock-out
cxcl14 ^{+/+}	CXCL14 Wildtyp
CXCL4 (PF4)	CXC-Motiv-Chemokin 4 (<i>Platelet factor 4</i>)
CXCL7	CXC-Motiv-Chemokin 4 (<i>Platelet factor 7</i>)
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CXCR7	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7
DAG	1,2-Diacylglycerol
DCs	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GPCRs	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GPVI	Glykoprotein VI
GTP	Guanosintriphosphat
HDR	<i>Homology directed repair</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
iDCs	Unreife dendritische Zellen (<i>immature dendritic cells</i>)
IEP	isoelektrischen Wert
IL-1	Interleukin-1
ILK	<i>Integrine linked kinase</i>
IP ₃	Inositol-1, 4, 5-triphosphat
iPSCs	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
kDa	Kilo Dalton
KO	<i>Knock-out</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Mg ²⁺	Magnesium Ionen
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
Mip-2g	<i>Macrophage inflammatory protein-2g</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP-2, MMP-9	Matrix Metalloproteinase-2, Matrix Metalloproteinase-9
mRNA	<i>messenger RNA</i>

NaOH	Natriumhydroxid
NHEJ	Non-homologous end-joining
NKs	Natürliche Killerzellen
OCS	Offenes kanalikuläres System (<i>open canalicular system</i>)
oxLDL	Oxidiertes <i>low density</i> Lipoprotein
PAM	<i>Proto-spacer adjacent motif</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PGI ₂	Prostazyklin
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PRP	Plättchenreiches Plasma (<i>Platelet rich plasma</i>)
RCSB	<i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics</i>
RIAM	<i>Rap1-GTP-interacting adapter molecule</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPS	Unaktivierter Plättchenüberstand (<i>Resting platelet supernatant</i>)
RT	Raumtemperatur
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
SOCE	<i>Store operated calcium entry</i>
STIM1	<i>Stromal interaction molecule 1</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR-1	<i>Toll-like-Rezeptor 1</i>
TPO	Thrombopoetin
tracrRNA	<i>Trans-activating crRNA</i>
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vWF	von-Willbrandfaktor
WT	Wildtyp
δ-Granula	Delta/dichte Granula (<i>dense granules</i>)
μl	Microliter
μm	Micrometer

1 Einleitung

Herz-Kreislaufkrankungen wie Artherosklerose und daraus folgende Komplikationen, wie Herzinsuffizienz, Myokardinfarkte oder Schlaganfälle zählen nach wie vor zu den häufigsten Krankheits- und Todesursachen auf der Welt [1]. In den letzten Jahren konnte der Beitrag von Thrombozyten zu diesen Ereignissen immer deutlicher gezeigt werden. Neben ihrer klassischen Aufgabe, der Hämostase und der zentralen Bedeutung bei der arteriellen Thrombose, spielen Thrombozyten eine wichtige Rolle als Entzündungsmediatoren bei der Entstehung der Artherosklerose und anderen Entzündungsprozessen [2]. Thrombozyten setzen nach ihrer Aktivierung eine ganze Reihe von Signalstoffen, Zytokinen und Chemokinen frei, die autokrin selbst wieder Thrombozyten aktivieren können und parakrin Entzündungszellen chemotaktisch an den Entzündungsherd locken [3, 4]. Die Erforschung verschiedener thrombozytärer Chemokine, derer Rezeptoren sowie des Beitrags dieser Chemokin-Rezeptor-Achsen zu Entzündungsprozessen sind deshalb von immenser Bedeutung. Das Verständnis dieser Chemokin-Rezeptor-Achsen in Thrombozyten und anderen Zellen und daraus folgenden Wirkungen kann deshalb ein wichtiger Beitrag sein, neue Ansätze für Therapien für thrombozytär-bedingte Herz-Kreislaufkrankungen zu finden.

1.1 Thrombozyten

Thrombozyten sind 2 - 4 μm kleine kernlose Zellen im Blut, die 1865 von Max Schultze entdeckt, aber erst 1882 von Gulio Bizzozero funktionell genauer beschrieben wurden [5]. Ein gesunder Erwachsener hat 150.000 - 450.000 Thrombozyten pro μl im Blut, deren physiologische Hauptfunktion die Aufrechterhaltung der Blutstillung, der primären Hämostase ist.

Da sie keinen Zellkern haben, sind sie nur begrenzt zur Proteinbiosynthese fähig, zeichnen sich aber durch ein charakteristisches Membransystem aus. Dabei wird zwischen dem offenen kanalikulären Membransystem (*open canalicular system*, OCS) und dem dichten tubulären Membransystem (*dense tubular system*)

unterschieden. Die Kanäle des OCS durchziehen den Thrombozyten und bewirken dadurch eine Oberflächenvergrößerung der Zellmembran. Das dichte tubuläre Membransystem ist für die intrazelluläre Speicherung von Enzymen, wie Cyclooxygenasen und Thromboxan A₂ und Calcium Ionen (Ca²⁺) sowie bei Bedarf für deren Freisetzung verantwortlich [6]. Wie in anderen Zellen auch, erfüllt Ca²⁺ in Thrombozyten die Funktion eines *second messengers* und wird nach einer Aktivierung von Thrombozyten aus den intrazellulären Speichern freigesetzt und aus dem extrazellulären Raum aufgenommen [7, 8]. Dabei sorgt die durch Thrombozytenstimulation aktivierte Phospholipase C (PLC) für die Entstehung von Inositol-1, 4, 5-triphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). IP₃ bindet nun an seine spezifischen Rezeptoren und induziert dadurch einen Ca²⁺-Ausstrom aus intrazellulären Speichern, wohingegen DAG den Ca²⁺ Einstrom aus dem extrazellulären Raum vermittelt. Als Speicher-vermittelter Ca²⁺ Einstrom (*store operated calcium entry*; SOCE) wird ein Mechanismus bezeichnet, der intrazelluläre Ca²⁺ Speicherentleerung und extrazellulären Einstrom verbindet [8]. Nach der IP₃ vermittelten Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins STIM1 (*stromal interaction molecule 1*) an der Membran des dichten tubulären Systems und daraufhin zu dessen Bindung an die Untereinheiten des membranständigen ORAI-1-Rezeptors. Es kommt durch eine Oligomerisierung von ORAI-1 zur Porenbildung (*pore forming unit*) und dadurch zu einem Ca²⁺ Einstrom aus dem Extrazellularraum [8].

Thrombozyten besitzen neben ihrem charakteristischen Membransystem zudem Granula, die Signalstoffe, Zytokine und Chemokine enthalten und nach Aktivierung von Thrombozyten mit dessen Membransystem verschmelzen und so die Botenstoffe freisetzen können. Kommt es zu einer durch erhöhtes intrazelluläres Ca²⁺ zu einer Ca²⁺ vermittelten Aktivierung von Thrombozyten, ändern diese ihre Form (*shape change*). Dabei bilden die Thrombozyten durch Veränderung des Aktin-Zytoskellets Pseudopodien sowie Filopodien aus und degranulieren. Freigesetzte Substanzen können weitere Zellen rekrutieren und aktivieren und sind wichtiger Bestandteil der Hämostase aber auch Teil des Immunsystems. Denn neben der Hämostase spielen Thrombozyten mit ihren Botenstoffen auch im Rahmen der systemischen und vaskulären sowie in der

angeborenen aber auch der erworbenen Immunantwort eine wichtige Rolle [9].

1.2 Megakaryopoese und Thrombopoese

Der Thrombozytenbildung selbst geht die Reifung der Vorläuferzellen, der Megakaryozyten voran. Bei dieser Megakaryopoese reifen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark myeloide Vorläuferzellen heran, die über Zwischenstufen weiter zu Megakaryozyten differenzieren [10]. Anschließend erfolgt im Rahmen der Megakaryopoese eine Vervielfachung des Chromosomensatzes, sodass Megakaryozyten mit bis zu 64-fachem DNA Gehalt und einer Größe von 100 µm entstehen können [10, 11]. Außerdem beginnt die Zelle thrombozytenspezifische Proteine zu exprimieren, wie das Oberflächenprotein GPIIb (CD41) [12]. Über alle Differenzierungsschritte ist die Anwesenheit des Hormons Thrombopoetin (TPO) von entscheidender Wichtigkeit [13]. Der Prozess der Thrombozytenentstehung wird Thrombopoese genannt, wobei vom ausgereiften gefäßnahen Megakaryozyt sogenannte „Pro-Plättchen“ gebildet werden [14]. Dabei werden vermehrt Organellen, wie Granula und das tubuläre System gebildet, wobei dichte Granula (δ -Granula) und Lysosomen früh und alpha-Granula (α -Granula) dagegen spät gebildet werden [15]. Außerdem wird nun ein komplexes Membransystem aufgebaut und es kommt durch Zytoplasma-Abschnürung durch die Gefäßwand zur Bildung der einzelnen Thrombozyten und durch Scherkräfte im Blutgefäß zur Abgabe derer in den Blutkreislauf [16]. Aufgrund ihrer Entstehung durch Zytoplasma-Abschnürung von der Ursprungszelle haben Thrombozyten keine Zellkerne, nur eine begrenzte Lebensdauer von sieben bis zehn Tagen und sind nur eingeschränkt zur Proteinbiosynthese durch vom Megakaryozyt mitgegebene mRNA fähig [17, 18]. Kommt es nicht zur Aktivierung der Thrombozyten, werden diese nach dieser Lebensdauer durch eine Veränderung der Zusammensetzung ihrer Oberflächenproteine in Milz und Leber durch phagozytierende Zellen abgebaut [19].

1.3 Physiologische Funktion

Die physiologische Hauptaufgabe von Thrombozyten ist die Aufrechterhaltung der Blutstillung, der Hämostase [20]. Der Vorgang der Hämostase wird in die primäre und die sekundäre Hämostase eingeteilt, gefolgt von der Fibrinolyse [21]. Bei der primären Hämostase sind Thrombozyten die ersten Zellen, die bei einer Gefäßverletzung aktiviert werden, zunächst eine instabile Thrombusschicht bilden und so zur ersten Abdeckung der Gefäßverletzung führen. Dabei werden die Thrombozyten durch den Kontakt mit subendothelialen Kollagenschichten oder mit von-Willebrand Faktor (vWF) über ihre Rezeptoren wie GPVI beziehungsweise im Fall von vWF-Bindung über GPIb/V/IX aktiviert [22]. So kommt es zur Anhaftung (Adhäsion) von Thrombozyten und damit zu einem ersten instabilen Thrombus [23, 24]. Für dessen Formation ändert der aktivierte Thrombozyt seine Form, bildet Pseudopodien aus und deckt so den Verletzungsbereich ab. Durch die Bindung der Rezeptoren wie GPVI oder GPIb/V/IX kommt es zu einer Aktivierungskaskade des Thrombozyten, die unter anderem durch Integrinaktivierung und Sekretion der Granula gekennzeichnet ist [25]. Dadurch werden weitere Thrombozyten an den Ort der Gefäßverletzung rekrutiert und selbst aktiviert (Abbildung 1) [3]. Dies ist schon Teil der sekundären Hämostase. In deren Verlauf wird die Koagulationskaskade aktiviert, die durch Wechselwirkungen der Thrombozyten mit Plasmaproteinen und untereinander gekennzeichnet ist (Aggregation). Diese Koagulationskaskade lässt sich in zwei unterschiedlich ablaufende Kaskaden unterteilen, dem extrinsischen und dem intrinsischen System. Beide Gerinnungskaskaden führen schlussendlich zur Aktivierung des Faktors X und der Bildung des Pro-Thrombinasekomplex, bestehend aus Ca^{2+} , Faktor II, Xa und Va. Durch diesen Komplex kommt es im Blut zur proteolytischen Spaltung von Pro-Thrombin zu Thrombin. Thrombin seinerseits spaltet als Serinprotease Fibrinogen zu Fibrin durch dessen Wechselwirkungen mit Thrombozyten es schlussendlich zur Ausbildung eines stabilen Thrombus kommt [26]. Dieser stabile Thrombus schließt die Gefäßverletzung dicht ab und führt zur Blutstillung. Zum Schluss wird im Rahmen der Fibrinolyse ein Teil des stabilen Thrombus durch den Plasmin-vermittelten Fibrinabbau wieder aufgelöst, wodurch die Wundheilung beschleunigt wird [27].

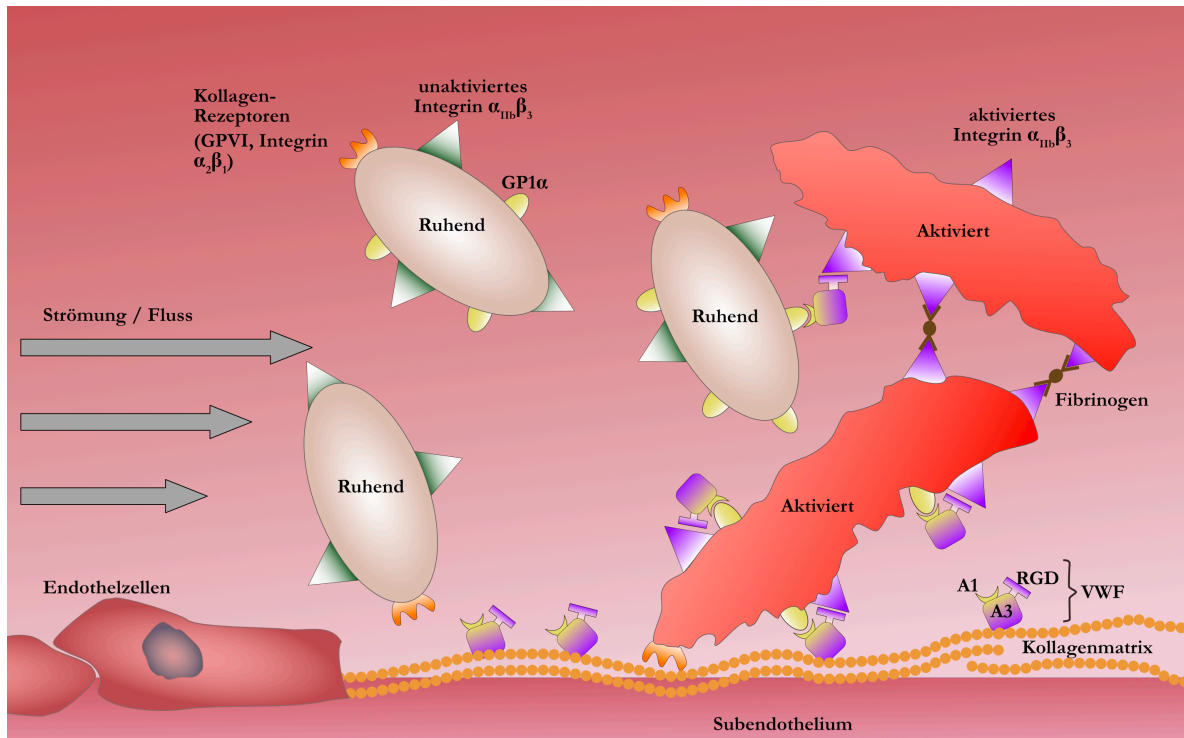


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten: Thrombozyten im Blutkreislauf adhären durch ihren von-Willebrand-Faktor Rezeptor GPIb α am subendothelial exprimierten von-Willebrand-Faktor Komplex (VWF) (bestehend aus A1-Domäne, der Arg-Gly-Asp-(RGD)-Bindungsdomäne und der A3-Domäne). Hierdurch und durch die Bindung an subendotheliales Kollagen durch ihre Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ werden Thrombozyten aktiviert. Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ wechselt dadurch in seine hochaffine Form und führt durch Fibrinogen Bindung zur Aggregation von Thrombozyten. Modifiziert nach Ruggeri *et al.* 2002 [3].

1.4 Integrinaktivierung

Integrine sind transmembranäre Rezeptoren auf Thrombozyten und setzen sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammen. Thrombozyten exprimieren insgesamt fünf Integrinformen der β_1 - und β_3 -Familie. Neben dem Kollagenrezeptor ($\alpha_2\beta_1$), dem Fibronectinrezeptor ($\alpha_5\beta_1$), dem Lamininrezeptor ($\alpha_6\beta_1$) ist der Fibrinogenrezeptor ($\alpha_{IIb}\beta_3$) das wichtigste Integrin für die Thrombozytenfunktion. Alle thrombozytären Integrinformen vermitteln Signale bidirektional zwischen Extrazellularraum und dem Zytosol und können einen inaktiven, niederaffinen und einen stimulierten, hochaffinen Zustand einnehmen.

So liegt das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, wie die anderen Integrine auch im unstimulierten Thrombozyt im niederaffinen Zustand vor [28]. Kommt es zu einer Aktivierung des Thrombozyten, steigt der intrazelluläre Ca^{2+} Spiegel durch Öffnung des dichten tubulären Systems und die Proteinkinase C (PKC) wird aktiviert. Daraufhin erfolgt ein GTPase vermittelter Zusammenschluss der zytosolischen Proteine Rap1b, Talin-1 und RIAM (*Rap1-GTP-interacting adapter molecule*) an der β -Untereinheit des Integrins [29]. Daraus ergibt sich eine Konformationsänderung des Integrins auf der extrazellulären Seite des Thrombozyten und damit ein Wechsel vom niederaffinen zum hochaffinen Zustand [28]. Der nun hochaffine Rezeptor bindet an unter anderem Fibrinogen, was als *inside-out signalling* bezeichnet wird. Zum nachfolgenden *outside in signalling* kommt es nun durch die Trennung der beiden Integrin Untereinheiten. Durch diese Trennung ist die Bindung des Proteins Kindlin-3 an die zytosolische β -Untereinheit des Integrins möglich. An Kindlin-3 wiederum können nun die Proteine Migfilin und ILK (*integrine linked kinase*) binden, die das Zytoskelett regulieren und verändern [30]. Diese Zytoskelettänderung ist sowohl für den *Shape Change* (siehe 1.5) und für die Degranulation von Thrombozyten (siehe 1.6) wichtig. Somit vermitteln Integrine die Adhäsion von Thrombozyten an extrazelluläre Matrix, die Aggregation durch Fibrinogen Bindung und tragen zu morphologischen Veränderungen (Degranulation und *Shape Change*) bei.

1.5 Shape Change

Im ruhenden Zustand zeigen Thrombozyten eine diskoide Form, welche sich nach Aktivierung sehr stark verändert. Zur Aktivierung von Thrombozyten kann es einerseits durch die Bindung an extrazelluläre Matrixproteine, wie Kollagen oder vWF kommen oder durch Bindung von Rezeptor-Agonisten wie Adenosindiphosphat (ADP), *Crosslinked Collagen-Related-Peptide* (CRP-XL), Thrombin oder Thromboxan A_2 [8]. Durch die Aktivierung von Thrombozyten kommt es zur genannten Formveränderung der Thrombozyten (*Shape Change*) sowie zur Degranulation [31]. Spezifische Aktinstrukturen wie ein Aktinfilamentring stabilisieren den Thrombozyten zunächst in seiner diskoiden Form, solange dieser unaktiviert bleibt [32].

Nach der Aktivierung des Thrombozyten kommt es zunächst zum sogenannten *rounding*. Durch eine Änderung am Aktinfilamentring ist nun eine Aktinanlagerung und damit eine Aktinpolymerisation möglich, die vorher durch das Protein CapZ verhindert wurde. Membranständige Proteine können sich nun an diesen Aktinfilamenten anlagern und stabilisieren die Pseudopodien- und Filopodienbildung. Außerdem wird durch den aktivierungsabhängigen erhöhten intrazellulären Ca^{2+} Spiegel das zytosolische Protein Gelsolin aktiviert, welches in seiner aktiven Form für den Abbau von Aktinstrukturen sorgt. Die so entstandenen kurzen Aktinfilamente und Aktinmonomere aktivieren den ARP 2/3 Peptidkomplex, welcher wiederum für den Aufbau von Aktinfilamenten zuständig ist und damit ebenfalls für die Pseudopodien und Filopodienausbildung sorgt. Am Ende der Zytoskelettveränderung steht das sogenannte *Spreading*, bei der sich der Thrombozyt flächig auf der extrazellulären Matrix ausbreiten kann [32, 33]. Durch den *Shape Change* haben Thrombozyten ihre Oberfläche stark vergrößert und feste Adhäsionspunkte ausgebildet, wodurch der entstehende Thrombus gefestigt wird.

1.6 Degranulation

Während der Aktivierung und der Formveränderung der Thrombozyten (*Shape Change*) kommt es zu einer Aktin-abhängigen Zentralisierung der Granula in der Mitte des Thrombozyten, wo die Granula mit dem OCS und mit der Plasmamembran verschmelzen [34, 35]. Hierfür wird ATP und Ca^{2+} benötigt, wobei intrazelluläres Ca^{2+} aus dem dichten tubulären Membransystem ausreicht. Nach einem GTPasen-vermittelten Transport der Granula Richtung Plasmamembran und OCS, fusionieren zuerst δ -Granula, um die Aggregation und Thrombusbildung aufrecht zu erhalten [36, 37]. Weil Thrombozyten dieselben Membranfusionsproteine exprimieren, entspricht die Fusion der Granula der von kernhaltigen Zellen [38, 39]. Nach der Fusion der Granula mit der Membran des OCS sind vermehrt spezifische Oberflächenproteine aus den Granula an der Thrombozytenoberfläche zu finden, beispielsweise P-Selektin (CD62P) nach α -Degranulation [15, 40].

δ -Granula, deren Inhalt im Rahmen der Thrombozytenaktivierung wie beschrieben zuerst freigesetzt wird, sind kleiner und sind in geringerer Anzahl im Thrombozyten zu finden als α -Granula [41]. δ -Granula enthalten hauptsächlich Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) sowie Ca^{2+} , Mg^{2+} und Serotonin [15]. Das ausgeschüttete Serotonin führt zu einer Vasokonstriktion des betroffenen Gefäßes und ADP zu einer parakrinen Aktivierung weiterer Thrombozyten über die purinergen Rezeptoren P_2Y_1 und P_2Y_{12} [42]. Das freigesetzte Ca^{2+} trägt als Teil des Prothrombinase Komplex ebenfalls weiter zur Aufrechterhaltung der Gerinnungskaskade bei.

α -Granula enthalten Signal-Proteine wie Plättchenfaktor-4 (PF4), *Stromal cell-derived factor 1 α* (SDF-1 α ; auch CXCL12 genannt) C-X-C Motiv Ligand 16 (CXCL16) oder Wachstumsfaktoren wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), den *platelet-derived growth factor* (PDGF) aber auch Adhäsionsproteine wie Fibrinogen oder Koagulationsfaktoren und Plasminogen. Zu den membranständigen Proteinen gehört unter anderen P-Selektin (CD62P) (Tabelle 1).

Die dritte Art von Granula in Thrombozyten sind Lysosomen. Lysosomen enthalten Proteasen, Hydrolasen und Kollagenasen, die nach Aktivierung freigesetzt werden. Nach ihrer Freisetzung können diese Enzyme zu pathologischen Umbauvorgängen der Gefäßwand zum Beispiel während der Atherogenese führen [15, 43, 44].

Die freigesetzten Botenstoffe durch die Degranulation wirken demnach auf autokrinem Weg, indem sie die Thrombozyten weiter aktivieren und durch Aufrechterhaltung der Gerinnungskaskade den Thrombus festigen. Zudem wirken sie parakrin, indem sie andere Thrombozyten aktivieren [45].

Neben der Schlüsselrolle während der Hämostase tragen Thrombozyten auch zu pathophysiologischen Vorgängen bei. So bilden Thrombozyten auch einen Thrombus nach einer Plaqueruptur bei Artherosklerose und können so zu Gefäßverschlüssen und zur Unterversorgung nachfolgender Gewebeabschnitte führen. In Herzkranzgefäßen führen solche Gefäß-verschließenden Thromben

zum Myokardinfarkt, in anderen Gefäßen zu Thrombosen und in hirnversorgenden Gefäßen zu Schlaganfällen [43].

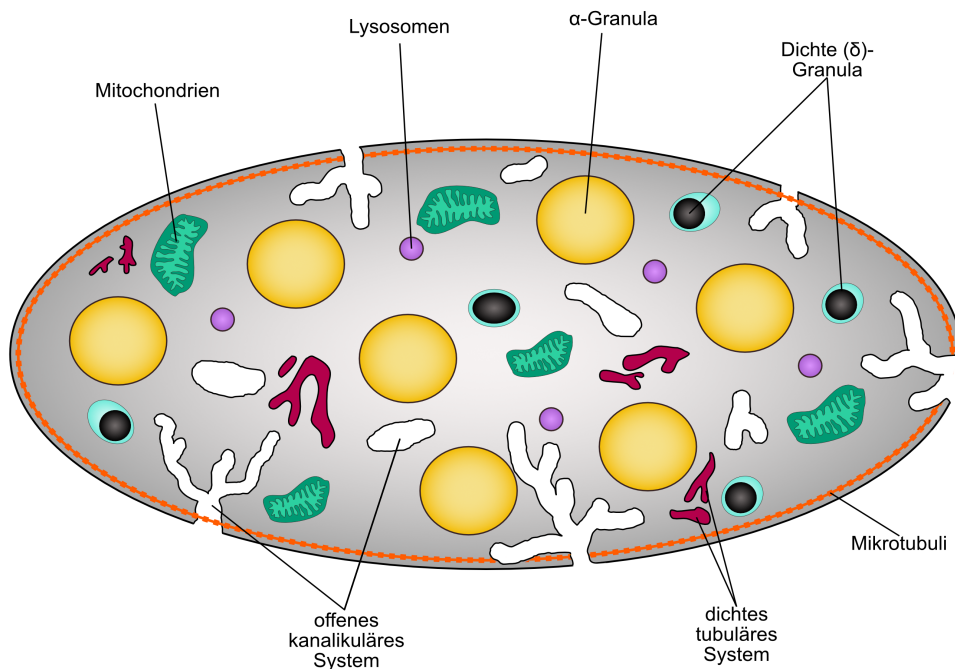


Abbildung 2. Schematische Darstellung eines Thrombozyten: Thrombozyten sind vom offenen kanalikulären System durchzogen, welches eine Oberflächenvergrößerung und Verbindung zum extrazellulären Raum darstellt. Das dichte tubuläre System durchzieht den Thrombozyten ebenfalls und dient der Speicherung von Ca^{2+} und metabolischer Enzyme. Thrombozyten enthalten Mitochondrien, Lysosomen und spezielle Granulatypen, wie alpha-Granula und dichte Granula, deren Inhalt diese bei Aktivierung des Thrombozyten in den extrazellulären Raum abgeben. Zum Inhalt der Granula siehe Tabelle 1.

Tabelle 1. Inhalt thrombozytärer Granula

alpha-Granula	Immunmodulatorische Funktion
CCL3 (MIP-1 α)	Zytokin: Aktivierung von Neutrophilen und Eosinophilen; beeinflusst die Immunglobulin Expression von B-Zellen [46, 47]
CCL5 (Rantes)	Chemokin: fördert Monozytenaktivierung, -adhäsion [48]

CXCL4 (PF4)	Chemokin: Anti-apoptotisch für Monozyten, fördert die Monozyten Differenzierung, Fördert oxLDL Aufnahme [49, 50]
CXCL7	Chemokin für Neutrophile und Endotheliale; Migration von Vorläuferzellen [51]
CXCL12	Chemokin: T-Zell-, Monozyten- und PMN-Migration [52]
Cyclophilin A	Wachstumsfaktor aus vaskulären glatten Muskelzellen und Thrombozyten [53]
MIF	Zytokin: fördert die Monozyten Migration [54, 55]
MMP-2, MMP-9	Proteasen: Abbau der extrazellulären Matrix, Thrombozyten-Leukozyten Aggregate [56, 57]
PDGF	Wachstumsfaktor: beeinflusst die Monozyten/Makrophagen Differenzierung [58, 59]
P-Selektin (CD62P)	Lektin: fördert Thrombozyten-Endothel Adhäsion
TGF- β	Zytokin: fördert Zellproliferation, B-Zell-, Makrophagen-, T-Zell Differenzierung [60, 61]
Thrombospondine	Glykoproteine: fördert Apoptose, Inflammation endothelialer Zellen sowie Makrophagen-Thrombozyten Aggregate [62, 63]
VEGF	Wachstumsfaktor: Fördert die Angiogenese
von-Willbrand-Faktor (vWF)	Führt zu Thrombozytenadhäsion und PMN Extravasion [64, 65]

Dichte-Granula

Serotonin	Neurotransmitter: fördert DC- und T-Zell Aktivierung [66, 67]
Glutamat	Aminosäure: T-Zell Migration [67]
ADP	Nucleotid: aktiviert Thrombozyten, Leukozyten, Endothelzellen [68, 69]

Histamin	Neurotransmitter: Gefäßaktivierung und Förderung der Degranulation [70]
----------	---

Produziert oder konstitutiv exprimiert	
---	--

IL-1	Zytokin: aktiviert Leukozyten und Endothelzellen [71, 72]
Thromboxan A2	Eicosanoid: fördert T-Zell Differenzierung, aktiviert Monozyten [73, 74]
Stickstoffmonoxid	Anti-Inflammatorische, anti-thrombotische reaktive Sauerstoffspezies [75]
GP1b α	Adhäsionsmolekül, bindet an Leukozyten [76]

1.7 Thrombo-Inflammation

Neben den bekannten physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von Thrombozyten rückt deren Beteiligung an Entzündungsprozessen, der sogenannten Thrombo-Inflammation, in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus von Forschungsarbeiten [77, 78]. Bei der Thrombo-Inflammation handelt es sich um einen neuen Patho-Mechanismus, bei dem thrombotische und entzündliche Prozesse eng miteinander zusammenhängen. Aus dieser thrombotisch-entzündlichen Kaskade können schwere Organschädigungen resultieren wie der ischämische Schlaganfall oder Myokardinfarkt [79]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind nicht vollständig geklärt, doch funktionell scheinen Thrombozyten nicht ihre klassische Rolle in der Hämostase zu spielen. Hierbei interagieren Thrombozyten mit Zellen des Immunsystems, wie Monozyten oder T-Zellen und beeinflussen das Entzündungsgeschehen [80].

Bei der ersten Phase einer Entzündung kommt es zur Akute-Phase-Reaktion (APR). Diese erste Entzündungsreaktion ist eine unspezifische Immunantwort als Reaktion auf eine lokale oder systemische Störung der Hämostase durch Infektionen, Gewebeschädigung, oder Neuwachstum von Gewebe [81]. Schon bei dieser ersten Immunreaktion des Körpers spielen Thrombozyten im Blutkreislauf eine Rolle [82]. So können Thrombozyten durch *Toll-like*-Rezeptoren (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-6, TLR-8 und TLR-9) auf ihrer Oberfläche durch den Kontakt mit Pathogen-assoziierten Molekülen, wie beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS) über TLR-4, aktiviert werden [83]. Außerdem sind Thrombozyten in der Lage Viren, wie das Influenza A Virus phagozytotisch aufzunehmen und in Lysosomen abzubauen [84]. Auch Bakterien können von Thrombozyten aufgenommen und durch Kontakt mit anderen Immunzellen abgebaut werden [85].

In den letzten Jahren wurde immer klarer, dass Thrombozyten nicht nur in der angeborenen, sondern auch in der erworbenen Immunabwehr eine wichtige Rolle spielen. Im Rahmen der Aktivierung von Thrombozyten kommt es zur Degranulation und damit zur Sekretion von Chemokinen, Cytokinen und

Adhäsionsmolekülen aus Granula in den extrazellulären Raum. Dabei wirken nicht nur freigesetzte Signalstoffe und –proteine als Entzündungsmediatoren, sondern auch die in Granula enthaltenen Oberflächenrezeptoren. Dazu gehört in α -Granula beispielsweise P-Selektin (CD62P). P-Selektin befindet sich nach der Thrombozyten Aktivierung vermehrt an der Membranoberfläche und interagiert mit Oberflächenrezeptoren auf Endothelzellen, Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten [86-88].

Obwohl freigesetzte Signalstoffe und –proteine zur Thrombozyten Aktivierung und Thrombusbildung beitragen, vermitteln diese auch eine ganze Reihe von Entzündungsvorgängen [89]. α -Granula sind dabei, wie beschrieben (siehe 1.6), die Hauptquelle für einen großen Umfang an entzündungsmediatorischen Chemokinen, die Zellen der erworbenen Immunabwehr rekrutieren und aktivieren.

Durch ihren Beitrag als Entzündungsmediatoren tragen Thrombozyten jedoch auch zu pathologischen Inflammationsprozessen bei. Die Artherosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, die durch die Einlagerung von Cholesterinestern und anderen Fetten in die innere Wandschicht arterieller Gefäße gekennzeichnet ist. Diese Einlagerungen können zu sogenannten arteriellen Plaques werden, die sich durch einen Lipidkern, die Einwanderung von glatten Muskelzellen und zu Schaumzellen differenzierte Makrophagen auszeichnen [90]. Eine Schicht aus glatten Muskelzellen, extrazellulärer Matrix und Endothelzellen stabilisiert den Plaque. Eine Destabilisierung kann zur Ruptur dieses Plaques führen, woraufhin sich ein gefäßverschließender Thrombus bilden kann und zur Unterversorgung des nachfolgenden Gewebes führt. Passiert dies in den Herzkranzgefäßen kommt es zu einem Myokardinfarkt. Auch in der Entstehung und in der Destabilisierung dieser Plaques sind Thrombozyten und ihre Chemokine involviert [91].

So haben Untersuchungen gezeigt, dass IL-1 β , welches von Thrombozyten nach Aktivierung synthetisiert wird, ein starker Aktivator von Endothelzellen ist. Dies fördert weitere Entzündungsprozesse an den Endothelzellen [72]. Aktivierte Thrombozyten vermitteln eine Freisetzung von CCL2 (*monocyte chemoattractant protein-1*; MCP-1) aus Endothelzellen, welches Monozyten chemotaktisch

anlockt und so zur Progression der Atherosklerose beiträgt [92]. Auch andere thrombozytäre Signalstoffe und Chemokine konnten als wichtige Entzündungsmediatoren identifiziert werden. Das thrombozytäre Chemokin CXCL4 beispielsweise lässt nicht nur Monozyten an einen Entzündungsherd migrieren und fördert deren Differenzierung zu Makrophagen [49]. Es fördert auch die Aufnahme von oxidiertem Lipoprotein mit geringer Dichte (oxLDL) durch Makrophagen, welche daraufhin zu Schaumzellen werden und die Atherosklerose vorantreiben [50]. Viele andere thrombozytäre Chemokine tragen ebenfalls zu Entzündungsprozessen bei, wie CCL5 (RANTES) im Rahmen des Monozyten Arrest auf entzündetem Endothel [48] (Tabelle 1). Ein weiteres pro-inflammatorisches Chemokin, welches bisher nicht mit Thrombozyten in Bezug gebracht wurde, ist CXCL14.

1.8 Chemokine

Chemokine sind 8-12 kDa kleine Signalproteine, die als chemotaktische Zytokine in der Lage sind, die Migration von Zellen auszulösen [93]. Dabei migrieren die Zellen entlang eines Chemokin Konzentrationsgradienten. Die Chemokine werden dabei über spezifische Chemokinrezeptoren detektiert. Funktionell wirken die bisher 50 identifizierten Chemokine sowohl während Inflammationsprozessen (induzierbare Chemokine) und in der Homöostase (konstitutive Chemokine) [94]. Inflammatorische Chemokine werden durch Entzündungsherde, Tumore und Infektionen freigesetzt und locken Leukozyten an den Ort der Freisetzung. Homöostatische Chemokine sind dagegen an der Organogenese und der Überwachung von gesundem Gewebe beteiligt. Sie lassen Leukozyten im Rahmen der Blutbildung in das Knochenmark migrieren und im Zuge einer adaptiven Immunantwort in die Milz und Lymphknoten [95]. Zwar sind sich Chemokine strukturell sehr ähnlich, da sie in der Regel einen freien N-Terminus, ein dreifaches β -Faltblatt und eine C-terminale α -Helix und damit eine hoch konservierte Tertiärstruktur aufweisen [96]. Dennoch lassen sich Chemokine in vier Gruppen einteilen. Am N-Terminus der Chemokine befinden sich in der Aminosäuresequenz unterschiedliche Cystein-Motive. Anhand der Anzahl und des Abstandes zweier Cysteine durch andere Aminosäuren werden Chemokine in C-, CC-, CXC-, CX3C-Motiv Liganden eingeteilt. Hierbei steht C für das Cystein und X für eine andere Aminosäure. Bei CX3C-Chemokinen befinden sich 3 Aminosäuren zwischen den Cysteinen am N-Terminus.

1.9 CXCL14

Das C-X-C Motiv Ligand 14 Chemokin (CXCL14) gehört zur Gruppe der CXC-Chemokine, die sich weiter in zwei Untergruppen unterteilen lassen. Dabei wird zwischen ELR-positiven und ELR-negativen CXC-Chemokinen unterschieden. Das ELR-Motiv ist eine Glutaminsäure-Leucin-Argingin Abfolge (ELR) direkt vor dem ersten N-terminalen Cystein. ELR-positive Chemokine enthalten diese Abfolge, ELR-negative hingegen nicht. ELR-positive CXC-Chemokine gelten in der Regel als Promotoren der Angiogenese und locken Neutrophile an,

wohingegen ELR-negative CXC-Chemokine inhibitorisch auf die Angiogenese wirken [97]. CXCL14 gehört zu den ELR-negativen Chemokinen. CXCL14 wurde erstmals 1999 als *breast- and kidney expressed chemokine* (BRAK) von Hromas *et al.* beschrieben [98]. Andere frühere Synonyme für CXCL14 sind BMAC (*B-cell and monocyte activating protein*) [99] oder Mip-2 γ (*Macrophage inflammatory protein-2 γ*) [100]. Das CXCL14-codierende Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 5q31 und wird zunächst als 111 Aminosäuren langes Protein und 13 kDa großes Protein exprimiert, welches zu Protein mit 77 Aminosäuren prozessiert wird und dann 9,4 kDa groß ist.

CXCL14 wird vor allem in Epithel- und Schleimhautgewebe und damit im Gastro-Intestinaltrakt, der Haut, Geschmacksknospen, in der Plazenta und in Brustgewebe exprimiert. Sind diese Gewebe von Karzinomen betroffen, ist CXCL14 drastisch herunterreguliert oder gar nicht vorhanden [98, 101, 102]. In anderen Karzinomen, wie dem Prostatakarzinom, dem Pankreaskarzinom, oder dem Glioblastom wurde hingegen eine Hochregulation von CXCL14 im betroffenen Gewebe beschrieben [103-105]. Die unterschiedliche Expression von CXCL14 hängt demnach von der Art der Tumoren ab und ist aktueller Gegenstand anderer Forschungsarbeiten.

Als konstitutive oder aktivierungsabhängige zelluläre Quellen für CXCL14 wurden B-Zellen, Monozyten, unreife dendritische Zellen (iDCs) sowie dendritische Zellen (DCs) identifiziert [100, 102, 106]. Auf diese Zellen wirkt CXCL14 chemotaktisch anziehend, was eine Rolle in Immunreaktionen vermuten lässt [99, 100]. Außerdem sind Zellen der Dermis, wie Keratinozyten, dermale Fibroblasten, dermale Endothelzellen und Zellen der *Lamina Propria* Quellen für CXCL14 [107, 108].

1.10 CXCL14 vermittelte Chemotaxis

Die biologische Wirkung von CXCL14 auf Zellen ist aufgrund des noch unbekanntes Rezeptors nur teilweise geklärt. So ist bekannt, dass CXCL14 chemotaktisch auf iDCs wirkt, welche in die Epidermis einwandern und zu Langerhans Zellen differenzieren [108]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CXCL14 bei CESS (einer humanen B-Zelllinie), THP-1 Zellen (einer humanen leukämischen-Monozyten Zelllinie), humanen Neutrophilen, humanen und murinen unreifen dendritischen Zellen (iDCs), humanen Monozyten und bei aktivierten natürlichen Killerzellen (NKs) Zellmigration vermittelt [100, 107, 109, 110]. T-Zellen und dendritische Zellen (DCs) hingegen zeigen keinen migratorischen Effekt hin zu CXCL14 [100, 107]. Obwohl DCs und Monozyten *in vitro* von CXCL14 chemotaktisch angezogen werden, sind in CXCL14 defizienten Tieren keine Unterschiede in der Anzahl an Monozyten oder dendritischen Zellen im Blut, im Knochenmark oder in den Lymphgefäßen zu beobachten [111]. All diese Beobachtungen zeigen, dass CXCL14 gerade bei inflammatorischen Zellen eine wichtige Rolle als Chemoattraktant zu spielen scheint.

1.11 CXCL14 und Angiogenese

Wie andere ELR-negative Chemokine, zeigt auch CXCL14 eine inhibitorische Wirkung auf die Gefäßneubildung, die Angiogenese. So konnte in *in vivo* Experimenten gezeigt werden, dass CXCL14 die VEGF-vermittelte Angiogenese schon in geringen Konzentrationen inhibieren kann. Zusätzlich verhindert CXCL14 die Migration von Endothelzellen. Diese anti-angiogenetischen Eigenschaften könnten der Grund für eine verstärkte Neovaskularisierung von Tumoren sein, in denen die Expression von CXCL14 vermindert ist [112].

1.12 Antimikrobielle Eigenschaften von CXCL14

In unterschiedlichen Forschungsarbeiten konnte durch *in vitro* aber auch durch *in vivo* Experimente gezeigt werden, dass CXCL14 antimikrobiell auf unterschiedliche Pathogene wirkt. Gram-negative wie Gram-positive Keime aber auch *Candida albicans* sind CXCL14 sensibel [113]. Bei Gram-negativen Bakterien scheint der N-terminale Teil von CXCL14 für den antimikrobiellen Effekt verantwortlich zu sein, der über Membran Depolarisation, DNA-Bindung des Bakteriums und Porenbildung in der Bakterien-Membran vermittelt wird [114].

1.13 CXCL14 und der Insulinhaushalt

CXCL14 hat neben seinen beschriebenen Wirkungen auch einen Einfluss auf Fettleibigkeit und Insulin Resistenz. Es steigert die Insulinvermittelte Glukose-Aufnahme in Adipozyten [115]. Außerdem konnte bei CXCL14 defizienten Mäusen gezeigt werden, dass Mäuse mit CXCL14 *Knock-out* vor einer *high-fat-diet*-induzierten Hyperglykämie und Hyperinsulinämie geschützt waren [116].

1.14 CXCL14 und sein Rezeptor

Chemokine binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), wobei verschiedene Chemokine an denselben Rezeptor binden können und ein Chemokin an verschiedene Rezeptoren binden kann [117, 118]. Der Chemokin Rezeptor für CXCL14 ist bisher nicht eindeutig identifiziert und wird kontrovers diskutiert.

Neben allen anderen bekannten 50 Chemokinen zeigt nur CXCL12 ein ähnlich hohes Maß an Konservierung seiner Sequenz in verschiedenen Wirbeltier-Spezies wie CXCL14 [119]. Daher wurde angenommen, dass CXCL14 eine ähnliche Funktion in der Homöostase und Organogenese einnimmt und eine regulatorische oder kompensatorische Rolle in der CXCL12-CXCR4

Signalvermittlung spielt [120-124]. Ein *Knock-down* mit CXCL14-shRNA in Huhn-Fibroblasten führt beispielsweise zu einer Hochregulierung von CXCL12 und seinen Rezeptoren CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) und CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7 (CXCR7) [125].

Frühere Forschungsarbeiten haben außerdem zeigen können, dass CXCL14 mit einer hohen Affinität an CXCR4 bindet und dass die Bindung von CXCL14 an CXCR4 zu einer Inhibierung von CXCL12-CXCR4 vermittelten Signalen führt [121]. Sowohl eine verminderte Migration von monozytären THP-1 Zellen, als auch ein vermindertes CXCL12-CXCR4 vermitteltes Neuronenwachstum konnte nach Zugabe von CXCL14 beobachtet werden [125]. Bei CXCL12 konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Part vor dem C-X-C Motiv die initiale Bindungsdomäne von CXCL12 für CXCR4 ist. Bei der CXCL14-CXCR4 Bindung hingegen wurde gezeigt, dass hierfür der C-terminale Part von CXCL14 verantwortlich ist [126, 127]. Mithilfe von diesem Unterschied in Bindungsdomäne und damit auch in Bindungsort der Chemokine am Rezeptor wird bei Tanageshima *et al.* erklärend postuliert, warum es nicht zu einer Verdrängung von ¹²⁵I-CXCL12 vom bindenden Rezeptor nach Zugabe von CXCL14 kommt [127].

Diese nicht vorhandene Verdrängungsreaktion am CXCR4 Rezeptor ist aber auch eine von mehreren Beobachtungen, die keine Bindung von CXCL14 und CXCR4 und keine inhibitorische Auswirkung von CXCL14 auf CXCL12-CXCR4 vermittelten Reaktionen zeigt. So konnte die Gruppe um Otte *et al.* unter anderem keine Inhibierung der CXCL12 induzierten CXCR4 Phosphorylierung, keine G-Protein vermittelte Ca²⁺ Mobilisierung und keine CXCL14 vermittelte CXCR4-Internalisierung zeigen [128]. Die Internalisierung von CXCR4 ist eine direkte Auswirkung auf die Chemokin Bindung von CXCL12 [129]. Andere Forschungsarbeiten zeigen eine Bindung von CXCL14 an CXCR4 einhergehend mit einer allosterischen Modulation von CXCR4. So soll es nach der CXCL14 Bindung zu einer Konformationsänderung von CXCR4 hin zu einer Form kommen, die daraufhin sensitiver für CXCL12 ist [130].

Ob CXCR4 der alleinige Rezeptor für CXCL14 ist, ob für die Bindung ein Co-Rezeptor nötig ist, oder ob CXCL14 im Zusammenspiel mit CXCL12 über CXCR4 wirkt, ist demnach noch Bestandteil weiterer, zukünftiger Forschung.

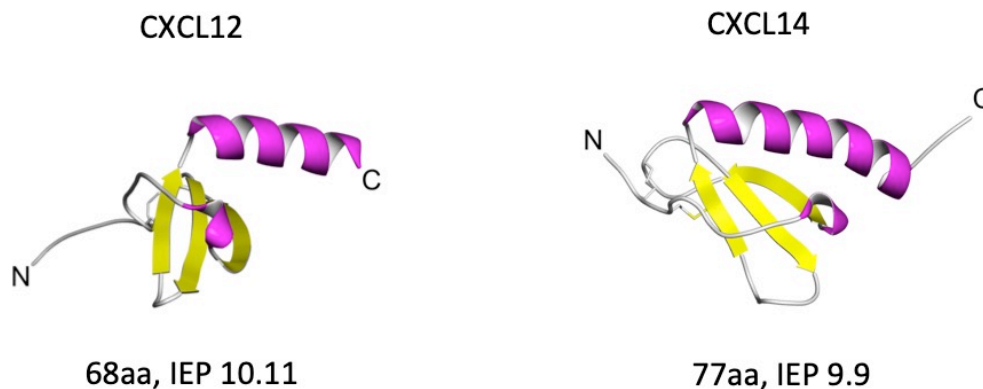


Abbildung 3. Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen CXCL12 und CXCL14: CXCL12 und CXCL14 sind kleine Chemokine mit einer Länge von 68 Aminosäuren (68aa) für CXCL12 und 77 Aminosäuren (77aa) für CXCL14 im prozessierten/aktivierten Zustand. Beide zeigen eine C-terminale alpha-Helix Struktur und haben einen hohen isoelektrischen Wert (IEP). Die Strukturen ergeben sich aus der RCSB protein data bank und wurden mit Jmol, einem open-source Java Programm in 3D dargestellt (<http://www.jmol.org/>).

1.15 Induzierbare pluripotente Stammzellen (iPSCs)

Induzierbare pluripotente Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*; iPSCs) sind pluripotente Stammzellen, die durch Reprogrammierung aus nicht-pluripotenten somatischen Zellen generiert werden können. Im Jahr 2006 wurden diese erstmals durch Shinya Yamanaka in Kyoto durch die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren generiert [131]. Humane iPSCs wurden 2007 das erste Mal von mehreren Gruppen generiert [132-134]. Ein Vorteil dieser Zellen ist die Vermeidung von ethischen Bedenken, da keine embryonalen Zellen für diese Art von Stammzellforschung nötig ist, iPSCs dennoch den natürlichen Stammzellen sehr stark ähneln [135]. Herausforderungen für die klinische Anwendung von iPSCs sind, dass zur Reprogrammierung Retroviren nötig sind sowie die Aktivierung eines Pro-Onkogens [136, 137], was zu Teratom- oder anderer Tumorbildung führen kann. Trotz dieser Bedenken ist es möglich, Krankheiten im Labor noch besser nachzubilden, zu untersuchen und zu verstehen. So ist es bereits gelungen, mit iPSCs die Sichelzellanämie in Mäusen zu therapieren [137].

Durch unterschiedliche Faktoren, wie Cytokine, Hormone oder Wachstumsfaktoren können iPSCs zu jedem anderen Zelltyp differenziert werden. Die Differenzierung von iPSCs zu Thrombozyten bildenden Megakaryozyten konnte bereits von mehreren Gruppen gezeigt werden [138, 139]. Außerdem konnten mithilfe der CRIPRS/Cas9 Technik iPSCs von Patienten mit Glykoprotein IIb/IIIa Polymorphismus genetisch verändert werden. Die aus diesen genetisch veränderten Megakaryozyten entstandenen Thrombozyten zeigen keinen Polymorphismus der Alloantigene mehr und wurden nicht mehr von Autoimmunantikörpern erkannt [140]. Dieser Ansatz zeigt, dass die Generierung von genetisch veränderten humanen Thrombozyten möglich ist und eine neue interessante Methode darstellt, Gendefekte aber auch Rezeptor-Liganden Bindungen in einem humanen System näher zu untersuchen.

1.16 CRISPR/Cas Technik

Die CRISPR/Cas Technik ist eine molekularbiologische Methode, zur Generierung von spezifischen Genabschaltungen (*Knock-outs*), Gen-Insertionen (*Knock-ins*) oder basenspezifischer Reparaturen von veränderten Genen. CRISPR steht für gruppierte kurze palindromische Wiederholungen von Gensequenzen mit regelmäßigen Abständen (***Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats***). Cas9 steht für **CRISPR-assoziertes** Protein und ist eine Endonuklease aus *Streptococcus pyogenes*. Das CRISPR/Cas System wurde nach einigen Vorarbeiten in den 1980er Jahren erstmals 2005 als möglicher Teil eines adaptiven Immunsystems von Bakterien beschrieben [141, 142]. Von 2011 bis 2015 wurde die CRISPR/Cas Methode von mehreren Forschergruppen von unter anderen Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna sowie von Feng Zhang bis hin zur Genom-Editierung an humanen Zellen vorangebracht [143-145].

Mechanistisch bindet das Ribonukleoprotein Cas9 eine bestimmte CRISPR-RNA-Sequenz (crRNA). Die crRNA wird vor dieser Bindung noch prozessiert, sodass sie eine Abschrift der CRISPR-Sequenz und der Erkennungssequenz enthält. Die Erkennungssequenz ist komplementär zur durch die Cas9 zu schneidende DNA. Die crRNA bindet an die sogenannte tracrRNA und im

Komplex mit der Cas9 kann diese nach Anlagerung an die komplementäre Schnittstelle auf der DNA die selbige schneiden [146]. Ein künstliches crRNA/tracrRNA Molekül bestehend aus einer zusammenhängenden RNA-Sequenz wird sgRNA (*single guide RNA*) genannt und oft in Experimenten benutzt. Voraussetzung für das Schneiden der DNA ist neben der Erkennungssequenz auf der crRNA aber auch das sogenannte PAM (*proto-spacer adjacent motif*) [147]. Dieses Motiv besteht aus drei Basen direkt neben der Erkennungssequenz und setzt sich aus einer beliebigen und zwei Guanin-Basen zusammen und ist wichtig für die Aktivierung der Cas9. Ist dies gegeben, bindet die Cas9 an den DNA-Doppelstrang und löst die Helix Struktur dieser auf. Das crRNA/tracrRNA Molekül lagert sich durch die komplementäre Erkennungssequenz an den DNA-Strang an und es kommt durch die Cas9 zu einem Schnitt der beiden DNA-Stränge an derselben Stelle. Nach dieser Trennung kann es im Rahmen von Reparaturmechanismen der Zelle zu zwei unterschiedlichen Vorgängen kommen. Zur homologen Rekombination (*homology directed repair*; HDR) kommt es indem die defekte unterbrochene Stelle mit einer ähnlichen Nukleotidsequenz ausgetauscht wird, wobei die unbeschädigte Gensequenz auf dem anderen Chromosom als Vorlage dient. Liegt kein unbeschädigtes Chromosom in unmittelbarer Nähe vor, kommt es zum nicht homologen Reparaturmechanismus (*Non-homologous end-joining*; NHEJ) [148]. Der NHEJ-Mechanismus ist fehleranfälliger und führt häufiger zu Insertionen oder Deletionen von Basenpaaren und kann somit zu Verschiebungen des Leserasters (*Frameshift*) der DNA Sequenz führen und damit zum Abbruch der Aminosäuresequenz oder zur Expression nicht funktioneller Proteine. Diese Fehleranfälligkeit macht man sich durch das CRISPR/Cas-System zunutze und kann so gewünschte, sehr spezifische Genveränderungen erreichen.

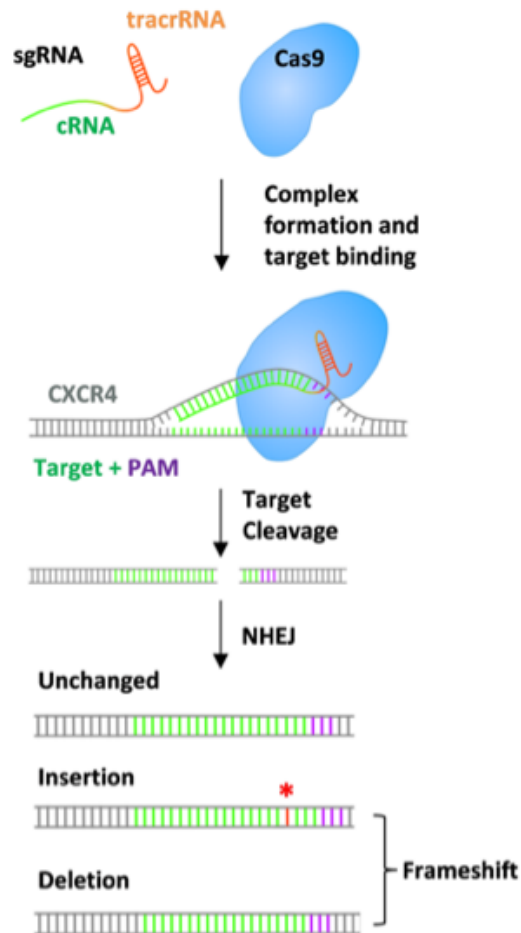


Abbildung 4. Schematische Ansicht des angewendeten CRISPR/Cas9 Prinzips:

Die sgRNA, bestehend aus der cRNA und der tracrRNA bildet zusammen mit dem Enzym Cas9 einen Komplex und lagert sich an das Ziel-Gen (Target) an. Daraufhin wird das Ziel-Gen durch den sgRNA/Cas9 Komplex geschnitten. Nachfolgende zelluläre Reparatur-mechanismen können zur Insertion oder Deletion von Basenpaaren führen, was zu einer Verschiebung des DNA-Leseraserts und damit zu einem *Knock-out* des Ziel-Gens führt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Boyden Chamber	48-Well Chemotaxis Chamber	Neuro Probe, Gaithersburg, MD, USA
Brutschrank	Sanyo - CO ₂ Incubator	Sanyo Chemical Laboratory, Kyoto, Japan
Durchflusszytometer - FACS Assays	BD FACS CALIBUR	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Durchflusszytometer - Sorting	BD FACS ARIA	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Elektronenmikroskop	LIBRA 120	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Flusskammer	Flusskammer 5 µm tief	Maastricht Instruments BV, Maastricht, Niederlande
Hämatologiegerät	KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland
Infusionspumpe	KDS-100-CE	KDS Scientific Inc., Holliston, MA, USA
Kleinschüttler	IKA®MS3	IKA Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
Konfokalmikroskop	LSM EXCITER 5	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskope	Zeiss Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
	Nikon ECLIPSE TS100	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
	Nikon OPTIOHOT-2	Nikon Corporation, Tokio, Japan
Magnetrührer	IKAMAG®RH	IKA Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikroplatten <i>Reader</i> - ELISA	Glomax Multi Detection System	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
Mikroplatten <i>Reader</i> - Proteinbestimmung	Bio-RAD Model 550 Microplate Reader	Bio-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Odyssey® Infrarot Scanner	Li-Cor® Biosciences	Li-Cor® Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
PCR- Cycler	Flex Cycler Block T48	analytik Jena, Jena, Deutschland

Sterilbank	Herasafe™, Type HS18	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Stromversorgung - <i>SemiDry-Blot</i>	Electrophoresis Power Supply	General Electric Company, Boston, MA, USA
Stromversorgung - Western-Blot Apparatur	Bio-RAD PowerPac Basic	Bio-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Stromversorgung - <i>Wet-Blot</i>	Bio-RAD PowerPac 300	Bio-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vollblutlumino- aggregometer	Chrono-Log Modell 700	Chrono-Log Corporation, Haverton, PA, USA
Western-Blot Apparatur	XcellSure™ Lock	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, USA
Western-Blot Apparatur - <i>SemiDry- Blot</i>	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Western-Blot Apparatur <i>Wet-Blot</i>	Bio-RAD MiniPROTEAN® Tetra Cell	Bio-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Zentrifugen	Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Multifuge 1S	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ADP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agarose	Bioenzym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Apyrase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ATP- Standardlösung	Chrono-Log Corporation, Havertown, PA, USA
BD FACS <i>Lysing Solution</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent	Bio-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
<i>Bone morphogenetic Protein</i> (BMP-4)	bioLegend, San Diego, CA, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Collagen-related Peptide</i> (CRP-XL)	Richard Farndale, University of Cambridge, UK
D (+) Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Escherichia coli BioParticles® Alexa 488	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Ethanol reinst, p.A.	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
bFGF	Preprotech, Rocky Hill, NJ, USA
Fibrinogen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ficoll-Paque Plus®	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Fluoreszenz Eindeckelmedium	Dako, Glostrup, Dänemark
Formaldehyd 4%	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Interleukin-11	bioLegend, San Diego, CA, USA
Isopropanol	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kollagen HORM	Takeda Austria GmbH, Linz Österreich
Luciferase-Lösung ChronoLume®	Chrono-Log corporation, Havertown, PA, USA
Methanol	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Mono-Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NP-40	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Prostaglandin I ₂	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Protease Inhibitor	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
Protease/Phosphatase Inhibitor	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
<i>Protein Block Serum Free</i>	Dako, Glostrup, Dänemark
Proteinmarker - Precision Plus Dual Color	Bio-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
rhCXCL14 (rekombinantes humanes CXCL14)	R&D Sciences, Minneapolis, MN, USA
rmCXCL14 (rekombinantes murines CXCL14)	BioLegend, San Diego, CA, USA
rmhCXCL12 (rekombinantes murines/humanes CXCL12)	R&D Sciences, Minneapolis, MN, USA
Roti®-Block	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Histokit	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Stem-Cell Facor (SCF)</i>	Preprotech, Rocky Hill, NJ, USA
StemFlex Medium TBS Tabletten	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thrombin	Roche AG, Mannheim, Deutschland
ToPro-3 Iodine	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
Thrombopoetin (TPO)	Preprotech, Rocky Hill, NJ, USA
Tris (Trizma (base))	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypanblau	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Tween®20	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
U-46619	Enzo lifescience GmbH, Lörrach, Deutschland
VEGF-A	R&D Sciences, Minneapolis, MN, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
ACD-Puffer	116 mM mono- Natriumcitrat 70 mM Zitronensäure 110 mM Glukose auf pH 4,6 (NaOH) einstellen
10x Blotpuffer	25 mM Tris 150 mM Glycin <i>ad</i> 1000 ml Aqua dest.
1x Blotpuffer	100 ml 10x Blotpuffer 200 ml Methanol <i>ad</i> 1000 ml Aqua dest.
Karnovsky Lösung	11,25 mM Natriumhydroxid 158,4 mM Natriumdihydrogenphosphat 4 % Paraformaldehyd Aqua dest. <i>ad</i> 100 ml 25 %iges Glutaraldehyd mit HCl auf pH 7,2 einstellen
Ladepuffer (5x Lämmli)	6,5 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8 2 ml 10 %iges SDS 1 ml Glycerin 1 Spatelspitze Bromphenolblau vor Gebrauch + 25 µl β-Mercaptoethanol
10x Laufpuffer	25 mM Tris 193 mM Glycin 1 % SDS <i>ad</i> 1 l Aqua dest.
1x Laufpuffer	100 ml 10x Laufpuffer <i>ad</i> 1000 ml Aqua dest.
Lysepuffer	Cell Lysis Buffer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
PBS-Heparin	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</i> 20 U/ml Heparin
PBS-T	1000 ml PBS Gibco 0,5 ml Tween-20

TBS-T	2 TBS Tabletten 0,05 % Tween®20 (v/v) ad 1000 ml Aqua dest.
10x Tyrodes Puffer	1,34 M NaCl 119 mM NaHCO ₃ 2,68 mM KCl ad 1000 ml Aqua dest., steril filtrieren, bei 4°C aufbewahren
1x Tyrodes	10 ml 10x Tyrodespuffer (v/v) ad 100 ml Aqua dest 0,1 g BSA (Albumin Fraction V) 0,1 g D-(+)-Glucose; pH-Wert einstellen mit HEPES
1x Tyrodes + 2 mM Calcium	+ 2 mM Calcium, 1ml Calciumchlorid [0,1M] ad 50 ml Tyrodes (1 x)
1x Tyrodes + 1 mM Calcium	+ 1 mM Calcium, 0,5 ml Calciumchlorid [0,1M] ad 50 ml Tyrodes (1 x)

2.1.4 Gebrauchsgüter

Bezeichnung	Herkunft
1 ml Spritzen	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
10 ml Spritzen	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
12-Kammerobjektträger	ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland
15 ml Reaktionsgefäße (BD Falcon™)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
20 ml Spritzen	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
50 ml Reaktionsgefäße (BD Falcon™)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
C Chip Neubauer <i>improved</i>	Peqlab GmbH, Erlangen, Deutschland
CPDA Monovetten 8,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA Mikro-Probengefäß	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Einmalkapillaren	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg Deutschland
FACS Röhrchen	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Falcon Röhrchen	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Fettstift	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, USA
Gewebekulturschalen	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Glasküvette 450µl	Chrono-Log Corporation, Haverton, PA, USA
Kanüle i.p. Injektion (Peritonitis) 20G	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

Kanüle Peritoneallavage (Peritonitis) 26G	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Kanülen	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Membranadapter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Membraneinsatz 3µm	Neuro Probe, Gaithersburg, MD, USA
Membraneinsatz 5µm	Corning B.V Life Science, Amsterdam, Niederlande
Novex-Gelkassetten	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, USA
Petrischalen	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
PVDF Membran	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
<i>Safety-Multifly</i>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	Corning Incorporated, Corning, USA
Whatman™ <i>Blotting Paper</i>	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Zellkulturflaschen	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschaber	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Zellsiebe	Corning Incorporated, Corning, NY, USA

2.1.5 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Humane Monozyten Zellmedium	RPMI-Medium 1640 1 % Penicillin-Streptomycin 10 % fetales Kälberserum 0,5 % L-Glutamin
Murine Monozyten Zellmedium	RPMI-Medium 1640 1 % Penicillin-Streptomycin 10 % fetales Kälberserum 0,5 % L-Glutamin
HUVEC Zellmedium	VascuLife® VEGF Endothelial Medium
HEK293 Zellmedium	DMEM-Medium 1 % Penicillin-Streptomycin 10 % fetales Kälberserum
iPSC Zell Medium	StemFlex Medium

2.1.6 Antikörper und Plasmide

Primäre Antikörper

Bezeichnung	Verwendung	Herkunft
Alexa Fluor™ 488 Phalloidin	Immunfluoreszenz	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
anti- GP1b α -APC (Xia.G5-)	Durchflusszytometrie	EMFRET Analytics GmbH & Co KG., Eibelstadt, Deutschland
anti- GP1b α -PE	Durchflusszytometrie	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
anti- α IIb β 3-PE (JON/A)	Durchflusszytometrie	EMFRET Analytics GmbH & Co KG., Eibelstadt, Deutschland
anti-CXCL12-FITC	Durchflusszytometrie	Bereitgestellt von Lydia Laptev
anti-CXCL14	Western Blot	Abcam, Cambridge, UK
anti-CXCL14	Western Blot / Co-Immunpräzipitation	R&D Sciences, Minneapolis, MN, USA
anti-CXCL14-FITC	Durchflusszytometrie / Immunfluoreszenz	Biorbyt Ltd., Cambridge, UK
anti-CXCR4	Western Blot / Co-Immunpräzipitation / Immunfluoreszenz	Novus Biologicals, Centennial, CO, USA
anti-CXCR7	Western Blot / Co-Immunpräzipitation / Immunfluoreszenz	Novus Biologicals, Centennial, CO, USA
anti-GPIX-FITC (Xia.B4)	Durchflusszytometrie	EMFRET Analytics GmbH & Co KG., Eibelstadt, Deutschland
anti-GPV-FITC (Gon.C2)	Durchflusszytometrie	EMFRET Analytics GmbH & Co KG., Eibelstadt, Deutschland
anti-GPVI-FITC (JAQ.1)	Durchflusszytometrie	EMFRET Analytics GmbH & Co KG., Eibelstadt, Deutschland
anti-Integrin- α 5-FITC (Tap.A12)	Durchflusszytometrie	EMFRET Analytics GmbH & Co KG., Eibelstadt, Deutschland
anti-Integrin- β 3-FITC (Luc.A5)	Durchflusszytometrie	EMFRET Analytics GmbH & Co KG., Eibelstadt, Deutschland
anti-P-Selektin-FITC	Durchflusszytometrie	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
anti-P-Selektin-FITC (Wu.E9)	Durchflusszytometrie	EMFRET Analytics GmbH & Co KG., Eibelstadt, Deutschland
anti-phospho-PI3K	Western Blot	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
anti-PI3K	Western Blot	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
anti- α -Tubulin	Western Blot	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
anti- β -Actin	Western Blot	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA

PAC-1-FITC	Durchflusszytometrie	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
------------	----------------------	---

Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor 568 Donkey anti-Rabbit	Immunfluoreszenz	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
Donkey anti-Mouse IRDye®680RD	Western Blot	Li-Cor® Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
Donkey anti-Mouse IRDye®800RD	Western Blot	Li-Cor® Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
Donkey anti-Rabbit IRDye®680RD	Western Blot	Li-Cor® Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
Donkey anti-Rabbit IRDye®800RD	Western Blot	Li-Cor® Biosciences, Bad Homburg, Deutschland

Plasmide

pCMV3-C-GFPspark® CXCR4/CD184 cDNA	CXCR4 Immunopräzipitation	Sino Biological, Wayne, PA, USA
pCMV3-N-His CXCL14 cDNA	CXCL14 Immunopräzipitation	Sino Biological, Wayne, PA, USA
pSpCas9(BB)-2a-GFP (px458)	CRISPR/Cas9 <i>Knock-out</i>	Addgene, Watertown, MA, USA

2.1.7 Software

Name	Hersteller
AggroLink8	Chrono-Log corporation, Havertown, PA, USA
Axiovision Rel 4.8	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
EndNote X8	Clarivate Analytics, Jersey, UK
FlowJo	FlowJo, LLC Data Analysis Software, Ashland, OR, USA
GraphPad Prism 8	Graphpad Prism Software, La Jolla, CA, USA
ImageJ 1.47v	public domain
SPSS Version 21	SPSS Inc., Chicago, IL, USA
Zen	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.2 Isolation humaner Thrombozyten

Zur Isolation von humanen Thrombozyten wurde von freiwilligen Spendern 16 ml venöses Blut über einen Safety-Multifly 21G in Spritzen entnommen, in denen 4 ml ACD Puffer vorgelegt waren. Nach der Überführung von je 10 ml Blut-ACD Mischung in 15 ml Falcon™-Röhrchen wurden diese bei 204 x g für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Das gewonnene plättchenreiche Plasma (PRP, obere Phase) wurde mit einer Transferpipette an den unteren Teil eines 50 ml Falcon™ - Röhrchens überführt, in denen 35 ml Tyrodes Puffer pH 6,5 vorgelegt waren. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 836 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur wird der Überstand verworfen und das Thrombozytenpellet in Tyrodes Puffer pH 7,4 aufgenommen. Nach Resuspension wurde die Thrombozytenzahl mithilfe des Sysmex-Hämatologiegerätes bestimmt und auf die gewünschte Anzahl mit Tyrodes Puffer pH 7,4 eingestellt. Sollten isolierte Thrombozyten im Rahmen anschließender Experimente aktiviert werden, wurde das Thrombozytenpellet in Tyrodes Puffer pH 7,4 aufgenommen, dem zuvor Ca^{2+} in einer Konzentration von 1 mM zugefügt. Sollte eine Aktivierung von Thrombozyten durch die Isolation vermindert werden, wurde das PRP mit Prostaglandin I₂ (PGI₂ (0,5 µM)) und Apyrase (0,02 U/ml) versetzt.

2.2.3 Isolation von plättchenreichem Plasma (PRP)

Für Experimente, bei denen humanes plättchenreiches Plasma (PRP) verwendet wurde, wurde freiwilligen Spendern venöses Blut in CDPA (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin) Monovetten entnommen. Nach einer Zentrifugation bei 204 x g bei Raumtemperatur für 20 Minuten wurde die obere Phase (PRP) entnommen.

2.2.4 Isolation muriner Thrombozyten

Zur Isolation muriner Thrombozyten wurde 8 - 12 Wochen alten *cxcl14^{+/+}* und *cxcl14^{-/-}* Mäusen Blut entnommen. Dafür wurde mithilfe einer Heparin-beschichteten Kapillare das retrobulbäre Venengeflecht punktiert und 0,9 - 1,2 ml Blut in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 300 µl ACD gegeben. Das versetzte Blut wurde anschließend für 5 Minuten bei 260 x g und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Plättchenreiches Plasma (PRP) setzt sich als obere Phase ab und wurde mit einem kleinen Teil der unteren Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Tyrodes Puffer pH 7,4 wurde das plättchenreiche Plasma erneut bei 52 x g ohne Bremse für 6 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Phase wurde sauber abgenommen und wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die übrige untere Phase wurde mit 200 µl Tyrodes pH 7,4 versetzt und erneut bei 52 x g ohne Bremse für 6 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die klaren Überstände werden vereint und bei 640 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Thrombozytenpellet wurde anschließend mit Tyrodes Puffer pH 7,4 gewaschen. Das PRP wurde mit Apyrase (0,02 U/ml) und PGI₂ versetzt für den Fall, dass eine vorzeitige Aktivierung durch Isolationsschritte vermieden werden sollte. Anschließend wurden die Thrombozyten zweimal mit Tyrodes Puffer pH 7,4 gewaschen.

Mithilfe des Symex-Hämatologiegerätes wurde die Anzahl an Thrombozyten in der Thrombozytensuspension bestimmt und mit Tyrodes Puffer pH 7,4 auf die gewünschte Zahl eingestellt.

2.2.5 Herstellung von Thrombozytenüberständen

Isolierte humane (siehe 2.2.2) oder murine Thrombozyten (siehe 2.2.4) wurden nach Resuspension in Tyrodes pH 7,4 mit 1 mM Ca²⁺ bei einer Zellzahl von 1 x 10⁹ Thrombozyten /ml für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für den Überstand von ruhenden Thrombozyten (*Resting platelet supernatant*; RPS) wurde, wie in 2.2.2 den Thrombozyten PGI₂ und Apyrase zugesetzt und PBS statt einem aktivierenden Agonisten. Um den Überstand von aktivierten

Thrombozyten (*Activated platelet supernatant*; APS) zu gewinnen wurden die Thrombozyten mit 5 µg/ml CRP-XL versetzt. Nach der Inkubation wurden sowohl ruhende als auch aktivierte Thrombozyten bei 640 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde daraufhin vorsichtig abgenommen und je nach Experiment weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.2.6 Isolation und Kultivierung humaner Monozyten

Zur Isolation von humanen Monozyten wurde eine etablierte Methode verwendet [149]. Hierbei standen „Leukozyten-Kegel“ aus der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung, die als Nebenprodukt bei der Plasmaspende entstehen. Nach dem Aufschneiden der beiden Schläuche an Kegel Ein- und Ausgang wurde der Kegel auf ein 50 ml Reaktionsgefäß gestellt, sodass das Blut hineinlaufen kann. Anschließend wurde das Volumen mit PBS auf eine Gesamtmenge von 70 ml ergänzt. Je 15 ml Ficoll® Paque wurden in zwei 50 ml Reaktionsgefäße vorgelegt und mit je 35 ml Blut-PBS Gemisch vorsichtig überschichtet und anschließend wurde das Zweiphasengemische bei 850 x g für 15 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Die weiße Intermediär Schicht wird mit einer sterilen Transferpipette in ein frisches 50 ml Reaktionsgefäß überführt, in 50 ml PBS resuspendiert und daraufhin bei 475 x g für 5 Minuten pelletiert, um vorhandene Thrombozyten mit dem Überstand zu entfernen. Nach Resuspension des Pellets mit 30 ml PBS wurde dieser Schritt wiederholt, woraufhin das Pellet in 40 ml Medium resuspendiert wurde und per Symex-Hämatologiegerätes die Zellzahl bestimmt wurde. Je $2,3 \times 10^8$ Zellen wurden pro T175-Flasche ausgesät. Nicht adhärente Zellen wurden am nächsten Tag durch Entfernung des Mediums und durch Waschen der Kulturflasche mit PBS entfernt. Adhärente Monozyten wurden danach mit 4 ml Trypsin für 5 Minuten bei 37°C vom Flaschenboden abgelöst und daraufhin nach Zugabe von 10 ml Medium bei Raumtemperatur pelletiert und für weitere Versuche im entsprechenden Medium resuspendiert. Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

2.2.7 Isolation und Kultivierung muriner Monozyten

Murine Monozyten wurden aus der Milz von C57Bl/6J Wildtyp Mäusen isoliert. Dazu wurde den Tieren *post mortem* die Milz entnommen und anschließend unter sterilen Bedingungen weitergearbeitet. Das Organ wurde auf einen 40 µm Zellfilter (Corning Incorporated) gelegt, der auf einem 50 ml Falcon befestigt wurde. Anschließend wurde die Milz durch den Zellfilter gedrückt, der daraufhin mit 15 ml PBS gespült wurde. Die Gewebe-Suspension wurde in einem frischen 50 ml Reaktionsgefäß auf 25 ml Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (Ficoll-Paque Plus®, GE Healthcare Bio Sciences) geschichtet, sodass zwei Phasen bestehen bleiben. Das Zwei-Phasengemisch wurde anschließend bei 922 x g für 18 min bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Die entstandene weißliche Intermediärschicht wurde in ein frisches 50 ml Falcon überführt und mit PBS auf ein Volumen von 50 ml ergänzt. Bei 535 x g für 10 min bei Raumtemperatur mit Bremse wurden die Zellen pelletiert. Durch die Resuspension des Pellets in 2 ml sterilem destilliertem Wasser für 30 Sekunden wurden im Zellpellet enthaltene Erythrozyten lysiert. Danach wurde die Zellsuspension mit PBS auf 50 ml Volumen ergänzt, um die Lyse der Zellen zu stoppen. Nach erneuter Pelletierung bei 535 x g für 10 min bei Raumtemperatur mit Bremse wurden die Zellen in entsprechendem 10 ml RPMI-Medium mit 10 % FCS resuspendiert (siehe 2.1.5) und in einer Gewebekulturschale (20 x 100 mm, Cell Culture Dishes, Greiner Bio-One GmbH) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach 24 Stunden Inkubation wurden nicht adhärente Zellen durch die Entnahme vom Zellkulturmedium und durch Spülung mit PBS entfernt. Die adhärenen Monozyten wurden mit einem Spatel gelöst und in ein neues 50 ml Falcon überführt. Nach Zugabe von 50 ml PBS wurden die Zellen erneut pelletiert. Bei Resuspension des Zellpellets in 1 ml PBS 1 % FCS wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 4 x 10⁵ Zellen pro ml eingestellt.

2.2.8 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

HEK293, HeLa, HUVEC, THP-1 und Meg-01 Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in den entsprechenden Medien kultiviert (siehe 2.1.5). Um Zellen zu passagieren, zu transfizieren oder in Experimenten zu verwenden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die adhärennten Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, mit entsprechendem Medium versetzt und bei 330 x g pelletiert. Der Trypsin-haltige Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert. 10 µl einer 1:10 Verdünnung der Zellsuspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Damit HUVECs gut in Zellkulturflaschen aus Polystyrene anwachsen, ist es nötig, diese vorher mit 0,2 %iger Gelatine zu beschichten. Hierbei wird 2 %-ige Gelatine (Sigma-Aldrich) erwärmt, 1:10 in PBS verdünnt, und in die Zellkulturflaschen gegeben, sodass deren Boden bedeckt ist. Nach 10 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Gelatine abgenommen und verworfen. Das Medium für die Kultivierung von HUVECs (siehe 2.1.5) wurde nun vorgelegt und die Zellen wurden daraufhin ausgesät.

2.2.9 Kultivierung von induzierbaren pluripotenten Stammzellen

Humane induzierbare pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen; iPSCs) wurden auf mit Geltrex (Thermo Fisher) beschichteten 6-Well Platten in StemFlex Medium (Thermo Fisher) kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 mit PBS/EDTA (0.02 %) gesplittet. Durch einen Zusatz von RevitaCell (Thermo Fisher) zum StemFlex Medium wurde der Apoptose von Zellen vorgebeugt. Nach dem aufteilen der Zellen wurden diese wieder auf mit Geltrex beschichteten 6-Well Platten in StemFlex Medium ausgesät und bei 37°C unter sterilen Bedingungen kultiviert.

2.2.10 Transfektion von HEK293 und iPS-Zellen

HEK293 und iPS-Zellen wurden gleichermaßen mit Plasmiden transfiziert. Dazu wurden 2×10^5 Zellen pro Well in 2 ml Zellmedium in einer 6-Well Platte ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. 2,5 µg Plasmid DNA wurden zu 250 µl serumfreiem Zellmedium (Opti-MEM, Thermo-Fisher) gegeben. In dieses Reaktionsgefäß wurden 7,5 µl TransIT-LT1 Transfektionsreagenz gegeben, vorsichtig gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Reagenz-Komplexe tropfenweise über ein Well verteilt und die Zellen wurden weiter bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen auf erfolgreiche Transfektion und erfolgreiche Transkription des Plasmides untersucht. Hierfür wurde, um die Effizienz der CRISPR/Cas Methode zu untersuchen, die genomische DNA der Zellkultur oder von isolierten Zelllinien aufgereinigt und eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die zahlreichen DNA Abschnitte wurden sequenziert und per TIDE Analyse auf (<https://tide.deskgen.com>) auf Insertionen oder Deletion von Basenpaaren und daraus folgende Leserasterverschiebungen untersucht im Vergleich zu unveränderten Zellen. In Zusammenarbeit mit Valerie Dicenta (Labor Gawaz, Universitätsklinik Tübingen) wurden HEK293 Zellen mit Plasmiden zur Überexpression von CXCR4 mit GFP-Tag oder CXCL14 mit 6xHIS-Tag transfiziert (s. Plasmidkarten). Mithilfe eines Hygromycin B Resistenz-Gens auf den Plasmiden wurden durch Zusatz von Hygromycin B (0,25 mg/ml) zum Kulturmedium für 10 Tage nicht transfizierte Zellen abgetötet und nur transfizierte Zellen befinden sich danach weiter in Kultur. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.11 Differenzierung von iPS-Zellen

Zur Differenzierung von iPS-Zellen wurden zunächst 4×10^5 SNL Feeder Zellen (Public Health England) in Zellkulturschalen mit 3,5 cm Durchmesser ausgesät. 24 Stunden später wurden 50 – 70 %-ig konfluente iPS-Zellen aus einem 6-Well auf das 3,5 cm Well in StemFlex Medium gesät. Nach weiteren 24 Stunden wurden die iPS-Zellen wieder mit PBS/EDTA (0.02 %) für 5 min behandelt und so von den SNL Feeder-Zellen getrennt. Zur Generierung der *Embryoid Bodies* (EBs), die später Megakaryozyten generieren, wurden 20,000 Zellen zu einem EB in 96-Well Platten in APEL2 Serum-freien Medium mit hbFGF (20 ng/ μ l) (Peprotech) und 10 μ M ROCK Inhibitor Y-27632 (Tocris) zentrifugiert. Die Differenzierung wurde am folgenden Tag gestartet. An Tag vier der iPS-Zell Differenzierung wurden 10 EBs in ein Geltrex beschichtetes Well in 6-Well Platten gesät. Zur anfänglichen Differenzierung der iPS-Zellen wurde APEL2 Medium mit hVEGF (20 ng/ml), hSCF (50 ng/ml) und hTPO (100 ng/ml) genutzt, um CD34⁺/CD41a⁺ Megakaryozyten-Vorläufer Zellen zu generieren. Das Differenzierungsmedium wurde alle 3 - 4 Tage gewechselt. An Tag 14 der Differenzierung wurde das Medium zu RPMI-Medium mit hSCF (25 ng/ml), hTPO (50 ng/ml) und hIL-11 (10 ng/ml) gewechselt, um die finale Produktion der thrombozytenartigen Partikel (*Culture-derived platelets*, CDPs) zu starten. Das Medium wurde alle 3 - 4 Tage bis Tag 28 der Differenzierung gewechselt.

2.2.12 Isolation von Thrombozyten-ähnlichen Partikeln

Zur Untersuchung der Thrombozyten ähnlichen Partikel (*Culture-derived platelets*; CDPs) aus der iPS Kultur wurden die Überstände der differenzierten Kultur (siehe 2.2.11) an Tag 7, 14, 21, und 28 entnommen. Die Überstände wurden bei Raumtemperatur für 5 Minuten für 300 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt, um große Suspensionszellen im Pellet abzutrennen. Der gewonnene Überstand wurde erneut bei 836 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet wurde in 500 μ l Reaktionspuffer aufgenommen. Um die Menge an freigesetzten CDPs zu quantifizieren wurden CD42b positive Zellen

nach CDP-Isolation mittels Durchflusszytometrie gezählt und in Relation zu den initial eingesetzten iPS-Zellen gesetzt.

2.2.13 Cytospin

Für die Konfokal-mikroskopischen Aufnahmen von semi-adhärenenten IPS-Zellen im Laufe des Differenzierungsprotokolls wurden diese folgendermaßen präpariert. Bei Entnahme des Mediums aus der Zellkultur zur Isolation der CDPs (siehe 2.2.12) werden semi-adhärenente Zellen mit abgenommen. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt bei 2.2.12 wird das Pellet, welches die semi-adhärenenten Zellen enthält in PBS Puffer aufgenommen und via Cytospin™ (Thermo Fisher) auf einen Objektträger gebracht, und getrocknet. Anschließend wurde Rabbit-anti-CD42b Antikörper auf die Präparate gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Mit PBS-T wurde dann 3 Mal gewaschen. Daraufhin wurde ein Alexa 568 anti-rabbit zusammen mit AlexaFluor 488 Phalloidin zur Aktin Färbung und TO-PRO-3 (1 µM) zur Kernfärbung auf die Präparate gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit PBS-T 3 Mal gewaschen und mit Eindeckelmedium versiegelt.

2.2.14 Lyse von Zellen

Das Medium von in 10 cm Zellkulturplatten kultivierten adhärenenten Zellen (HEK293) wurde entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 400 µl Lysepuffer und Inkubation für 10 Minuten bei 4°C, wurden die Zellen abgeschabt und bei 4°C in Eppendorf-Reaktionsgefäßen für 10 Minuten inkubiert.

Isolierte Thrombozyten wurden mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 gewaschen und pelletiert. Das Thrombozytenpellet wurde in Lysepuffer resuspendiert und auf Eis für 15 Minuten inkubiert.

Nach einer Ultraschall-Behandlung (40 W, 0,5 s Puls, 15 s) wurden die Lysate bei 19000 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, um Zelltrümmer vom Lysat zu trennen. Anschließend wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt

und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Der Abbau der Proteine und deren De-Phosphorylierung wurde mithilfe des Zusatzes von Protease-Inhibitoren und gegebenenfalls Phosphatase-inhibitoren zum verwendeten Lysepuffer verhindert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.2.15) und danach die Auftrennung (siehe 2.2.16) und Nachweis der Proteine (siehe 2.2.17) im Lysat.

2.2.15 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Lysaten wurde mithilfe von Bradford-Assays bestimmt [150]. Dabei werden 10 µl einer 1:30 Verdünnung der Lysate mit dem Bradford-Reagenz gemischt. Eine Verschiebung des Absorptionsspektrums von 470 nm zu 595 nm durch die Reaktion der im Lysat enthaltenen Proteine mit dem Bradford-Reagenz kann mithilfe einer Standardkurve photometrisch quantitativ ausgewertet werden.

2.2.16 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Mithilfe der Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden Proteine ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Dabei wurden die zu analysierenden Proteine mit reduzierendem SDS-haltigem Puffer (Laemmli-Puffer mit β -Mercaptoethanol) versetzt und durch eine Inkubation bei 95°C für 10 Minuten denaturiert. So wurde eine Entfaltung der Proteinstruktur erreicht. Die Eigenladung der vorliegenden linearen Proteinketten wurde durch die Anlagerung von negativ geladenem Natriumdodecylsulfat überlagert. So können die Proteine ihrer Größe nach in einem Polyacrylamidgel, an das elektrische Spannung angelegt wurde, aufgetrennt werden. Im Laufe dieser Arbeit wurden Polyacrylamidgele mit 15 %, 12,5 %, 8 % und 7 % Acrylamid Anteil im Trenngel und 5 % Acrylamid Anteil im Sammelgel. Zur Auftrennung wurden die eingestellten Proteinproben nach der Inkubation mit reduzierendem Puffer in die Taschen des Sammelgels pipettiert und Spannung wurde angelegt. Nach der

Wanderung der Proteine durch das Sammelgel befinden sich diese auf der gleichen Höhe am Gel Übergang, bevor eine Auftrennung im Trenngel erfolgt.

Das Sammelgel setze sich immer wie folgt zusammen:

Tabelle 2. Zutaten Sammelgel – Endvolumen 5 ml

Substanzen	Volumina für ein Sammelgel
dH ₂ O	3, 4 ml
Acylamid/Bis-Lösung (30 %)	830 µl
1.5 M TRIS pH 8.8	-
1 M TRIS pH 6.8	630 µl
10 % (w/v) SDS	50 µl
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	50 µl
TEMED	5 µl

Unter dem angefertigten Sammelgel befindet sich das Trenngel, in dem sich die Proteine auftrennen. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde ein Proteingrößenmarker aufgetragen.

Tabelle 3. Zutaten Trenngel – Endvolumen 5 ml

Substanzen	Volumina für ein 10%-iges Trenngel
dH ₂ O	4 ml
Acylamid/Bis-Lösung (30%)	3,3 ml
1.5M TRIS pH 8.8	2,5 ml
1 M TRIS pH 6.8	-
10% (w/v) SDS	100 µl
10% (w/v) Ammoniumpersulfat	100 µl
TEMED	4 µl

Nach dem Auftragen der Proben in das Sammelgel wurde eine Spannung von 80 V für 30 Minuten angelegt. Danach wurde die Spannung auf 120 V erhöht und die Lauffront der Proben lief bis zur unteren Gelkante.

2.2.17 Proteinnachweis durch Immunoblot-Analyse (Western Blot)

Durch die Western-Blot Methode wurden die im Gel aufgetrennten Proteine zur weiteren Detektion mithilfe einer angelegter Spannung auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierbei wird zwischen Semi-Dry und Wet-Blot unterschieden. Im Laufe dieser Arbeit wurden beide Methoden durchgeführt, wobei die Semi-Dry Methode für Zielproteine mit einer Größe von unter 25 kDa und die Wet-Blot Methode für Zielproteine über 25 kDa verwendet wurde.

Für beide Methoden wird die hydrophobe PVDF-Membran für 5 Minuten in Methanol aktiviert. Danach wurden das Gel, die aktivierte Membran und auf beiden Seiten eine Lage Whatman-Paper in der Wet-Blot- oder Semi-Dry-Kammer so zusammengebaut, dass durch die angelegte Spannung die Proteine aus dem Gel auf die Membran Richtung Anode wandern. Eine Spannung von 115 V wurde dabei für 75 Minuten beim Wet-Blot angelegt und eine Spannung von 10 V für 70 Minuten beim Semi-Dry Blot. Danach wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Blockierlösung (Roti®-Block) auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper, verdünnt in Blockierlösung zur Immundetektion bei 4°C über Nacht inkubiert, bevor die Membran drei Mal für 10 Minuten mit je 20 ml TBS + 0,1 % Tween-20 (TBS-T) gewaschen wurde. Darauf folgte die Inkubation der Membran mit dem entsprechenden Fluorophor-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:15000) für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Um unspezifische Hintergrundsignale zu vermeiden wurde erneut drei Mal für je 10 Minuten mit 20 ml TBS-T gewaschen, bevor die Membran zwischen trockenem Whatman-Paper für 1 Stunde getrocknet wurde. Das Fluoreszenz Signal des gebundenen Sekundärantikörpers wurde mithilfe des LI-COR Infrarot Bild Systems detektiert.

2.2.18 Ko-Immunopräzipitation

Mithilfe der Ko-Immunopräzipitation wurde im Rahmen dieser Arbeit die CXCR4-CXCL14 Bindung untersucht. Hierfür wurden humane isolierte Thrombozyten nach dem finalen Pelletieren des Isolationsprozesses in Tyrodes Puffer pH 7,4 mit 1 mM Ca^{2+} aufgenommen und auf eine Konzentration von 1×10^9 /ml eingestellt. Nach Zugabe von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CRP-XL und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten wurde ein Teil dreifach konzentrierter Lysepuffer zu zwei Teilen Zellsuspension gegeben. Nach 15 Minuten erfolgter Lyse auf Eis wurden unlösliche Zelltrümmer bei 4°C für fünf Minuten und 19000 x g pelletiert und verworfen. Die Proteinkonzentration des Überstands wurde bestimmt (siehe 2.2.15) und zu 2,0 mg Gesamtprotein wurden 6 μg Immunpräzipitationsantikörper hinzugefügt und über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde zu jeder Probe 40 μl Agarose Beads Suspension (Cell Signaling) hinzugefügt und für zwei Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Agarose Beads bei 14000 x g für 30 Sekunden Bei Raumtemperatur pelletiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 500 μl neuem Lysepuffer aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde fünfmal wiederholt. Nach dem fünften Waschschrift wurde das Pellet in reduzierendem Ladepuffer (Cell Signaling) aufgenommen und bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben per SDS-Page (siehe 2.2.16) und Immunoblot-Analyse (siehe 2.2.17) analysiert.

2.2.19 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Gehalt an CXCL14 in Thrombozyten sowie freigesetztes CXCL14 wurde mit dem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) DuoSet CXCL14/BRAK ELISA von R&D Systems ermittelt. Für die Gehaltsbestimmung in Thrombozyten wurden 1×10^9 isolierte Thrombozyten (siehe 2.2.2) in 200 μl Lysepuffer mit Protease-Inhibitor lysiert und als Probe bis zum Versuch bei -20°C aufbewahrt. Die Menge an sekretiertem CXCL14 aus Thrombozyten wurde mit aktiviertem Thrombozyten Überstand gemessen. Hierfür wurden isolierte Thrombozyten ($1 \times 10^9/\text{ml}$) in Tyrodes-Puffer pH 7,4 1 mM Ca^{2+} auf eine mit 1 mg/ml

kollagenbeschichtete Oberfläche gegeben (20 x 100 mm, *Cell Culture Dishes*, Greiner Bio-One GmbH). Nach 30 Minuten wird der Puffer abgenommen und in ein 15 ml Falcon überführt. Nachdem Zelltrümmer bei per Zentrifugation abgetrennt wurden, wurde der aktivierte Thrombozytenüberstand bei -20°C als Probe aufbewahrt. Als unaktivierte Kontrolle diente Überstand von Thrombozyten, die auf einer mit 1 mg/ml Bovinem Serum Albumin (BSA) beschichteten Oberfläche für 30 Minuten inkubiert wurden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden gewünschte DNA Abschnitte *in vitro* vervielfältigt und für weitere Experimente oder Analysen verwendet. Hierfür wurde DNA aus murinen Gewebeproben mithilfe des MyTaq™-Kits (bioline International) isoliert und DNA aus Kulturzellen mithilfe des Qiagen *DNA easy blood and tissue Kits* (nach dessen Herstellerangaben). 2 µl dieser isolierten DNA wurden zu 23 µl eines Polymerase-Puffer Gemisches (GoTaq® G2 Flexi - Promega) hinzugefügt, welches sich wie folgt zusammensetzt (Tabelle 4. Zutaten PCR Ansätze). Anschließend wurden die Proben mit entsprechenden Prozessbedingungen vervielfältigt (Tabelle 5).

Tabelle 4. Zutaten PCR Ansätze

Substanzen	Volumina für 23µl Polymerase-Puffer
Nuklease freies Wasser	12,75
5x Puffer (GoTaq®Flexi)	5
MgCl ₂ (25mM)	2,5
dNTPs (10 mM je dNTP)	0,5
Forward Primer (10µM)	0,5
Reverse Primer (10µM)	0,5
GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase	0,25

Tabelle 5. Prozessbedingungen der PCR

Temperatur	Zeit
95°C	5 Minuten
95°C	30 Sekunden
Y* °C	30 Sekunden
72°C	Z** Sekunden
72°C	5 Minuten
4°C	∞

Y* = Die *Annealing* Temperatur (T_m) wurde anhand der Schmelzpunkte der eingesetzten Primer und der eingesetzten DNA-Polymerase über das Webtool von New England Biolabs (<https://tmcalculator.neb.com>) berechnet.

Z** = die Zeit für die DNA Polymerisierung ist abhängig von der Größe des zu polymerisierenden DNA Abschnittes und der eingesetzten Polymerase und wurde nach Herstellerangaben berechnet

Folgende Primer wurden in dieser Arbeit verwendet:

hCXCR4-Forward: 5'-AATTCTCTTGTGCCCTTAGCC-3'
hCXCR4-Reverse: 5'-CAGACTGATGAAGGCCAGGA-3'
mCXCR4-Forward: 5'-GATGGGATTTCTGTATGAGGATTAGC-3'
mCXCR4-Reverse: 5'-CCACCCAGGACAGTGTGACTCTAA-3'
Pf4-Cre-Forward_1: 5'-CCCATACAGCACACCTTTTG-3'
Pf4-Cre-Reverse_1: 5'-TGCACAGTCAGCAGGTT-3'
Pf4-Cre-Forward_2: 5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG-3'
Pf4-Cre-Reverse_2: 5'-GTCAGTCGAGTGCACAGTTT-3'
mCXCL14-Forward_1: 5'-TGGCCCAGGAATCAAACACAG-3'
mCXCL14-Reverser_1: 5'-GGGGCCCTCCTACTTCTACCATC-3'
mCXCL14-Forward_2: 5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3'
mCXCL14-Reverser_2: 5'-CAAGGTGAGATCACAGAAGATC-3'

Folgende sgRNAs wurden in dieser Arbeit verwendet:

sgRNA - CXCR4: 5'- CACTTCAGATAACTACACCG-3'
sgRNA - CXCR7: 5'- CAACAGCAGCGACTGCATCG-3'

2.3.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Mithilfe der Gelelektrophorese können DNA Fragmente nach der PCR oder einem Restriktionsverdau in einem Agarose Gel ihrer Größe nach aufgetrennt werden und detektiert werden. In dieser Arbeit wurden 1.5 % (w/V) Agarose TAE-Puffer Gele verwendet. Die DNA Proben durch eine angelegte Spannung von 135 V für 35 Minuten aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA im Gel durch das Inkubieren in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Das entstandene Bandenmuster wurde unter UV-Licht detektiert und konnte durch einen vorher ebenfalls pipettierten DNA-Größenmarker größenspezifisch eingeordnet werden.

2.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung per NanoDrop

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde das NanoDrop ND-1000 Gerät genutzt. Dabei wurden 2 µl der zu vermessenden DNA-Lösung auf die Messeinheit pipettiert und die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Differenz aus dem gemessenen Absorptionswert und aus dem Nullwert (Messwert der Absorption von Lösungsmittel ohne DNA) ergibt mithilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes die DNA-Konzentration der Probe.

2.3.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte erfolgreich sequenzieren lassen zu können, bedurfte es nach der PCR einer Aufreinigung des Produktes. Hierfür wurde das ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher) Reagenz nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.5 Chemische Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Für die chemische Transformation von Plasmiden in *E. coli* wurden kompetente Bakterien aus dem One shot™ TOP10 Kit (Thermo Fisher) verwendet. Zu 50 µl kompetenten Zellen wurden 1 µg Plasmid-DNA gegeben und nach Herstellerangaben weiter vorgegangen. Die transformierten Bakterien wurden

auf Agar Platten ausgesät, welche mit einem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt waren. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C konnten Bakterienkolonien, die durch erfolgreiche Plasmid Aufnahme resistent gegenüber dem Selektionsantibiotikum waren für weitere Kulturen ausgewählt werden.

2.3.6 CRISPR/Cas9 Knock-out von IPS-Zellen

Um den Einfluss von Chemokinrezeptoren auf die Migration von iPSC-CDPs zu untersuchen, wurden iPSC-Zellen mithilfe der CRISPR/Cas9 Methode ausgeknockt. Mithilfe dieser Methode ist es möglich, einfach und gezielt genomische Veränderungen herbeizuführen wie Deletionen oder Insertionen von Basenpaaren. So können Gene durch Punktmutationen ausgeknockt oder „repariert“ werden. Durch die genetischen Veränderungen von humanen iPSCs und deren nachfolgende Differenzierung in verschiedene humane Zellen können genetische Modifikationen an humanen Zellen leicht nachgestellt werden und in einem humanen System untersucht werden. Tierversuche im Mausmodell können so eingespart werden und zusätzlich ist es möglich gewonnene Ergebnisse aus dem murinen Modell in einem humanen Modell zu untersuchen.

Für die Anwendung der CRISPR/Cas Technik wurde nach der in *Nature Protocols* von F. Ann Ran *et al.* beschriebenen Methode vorgegangen [151]. In Kürze wurden dabei auf www.benchling.com webbasiert *single guide RNAs* (sgRNA) für ein bestimmtes Ziel-Gen generiert. Anschließend wurden die sgRNAs bestellt und nach beschriebenem Protokoll ligiert [151]. Um später iPSC-Zellen zu transfizieren, wurde die ligierte sgRNA in einen für Cas9 codierenden Vektor (pSpCas9(BB)-2A-GFP (px458)) von Addgene nach Protokoll eingebracht. HEK293 Zellen wurden mit den erhaltenen Plasmiden transfiziert (siehe 0), um die Effizienz der verschiedenen sgRNAs zu untersuchen. Die *on-target* Effizienz der einzelnen sgRNA Kandidaten wurde per TIDE Assay untersucht. Hierfür wurde die genomische DNA der transfizierten Zellpopulationen gewonnen (siehe 2.3.1), mit der anschließend eine PCR durchgeführt wurde. Die PCR Produkte von untransfizierten wie transfizierten

Populationen wurden mithilfe der webbasierten Methode TIDE (<https://tide.deskgen.com>) verglichen. So kann eine prozentuale Aussage über die *on-target* Effizienz der einzelnen sgRNA Kandidaten getroffen werden. Die sgRNA mit der höchsten *in vitro on-target* Effizienz wurde ausgewählt, um iPS-Zellen zu transfizieren. Anschließend wurden die iPS Zellen durch das exprimierte GFP-Signal mithilfe der Durchflusszytometrie in 96-Well Platten zu Einzelklonen sortiert, oder 8×10^3 Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät, so dass nach 7 Tagen in Kultur Einzelzellklone ausgewählt und kultiviert werden konnten. Die genomische DNA der Einzelzellklone wurde gewonnen (über *QuickExtract DNA Extraction Solution*[™] in Kollaboration mit Masoud Nasri, AG Julia Skokowa, Universitätsklinikum Tübingen), und die generierten PCR-Produkte wie zuvor per TIDE Assay verglichen. Ein erfolgreicher *Knock-out* wurde über eine Insertion oder Deletion einer einzelnen Base an berechneter Stelle im Ziel-Gen definiert, da daraus eine Verschiebung des Leserasters während der Translation (*Frameshift*) erfolgte.

2.3.7 Isolation von Plasmiden

Plasmide, die zur Transfektion von humanen Zelllinien benötigt wurden, wurden aus vorher transformierten *E. coli* (siehe 2.3.5) isoliert und gereinigt. Hierfür wurde je nach benötigter Menge das Qiagen Plasmid Midi Kit, beziehungsweise das Qiagen Maxi Kit nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.8 Sequenzierung

Gewonnene, aufgereinigte PCR-Proben oder Plasmide wurden von der Firma LGC Genomics GmbH (Berlin, Deutschland) sequenziert.

2.4 Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie

2.4.1 Konfokale Mikroskopie von Thrombozyten

Konfokale Aufnahmen aktivierter Thrombozyten wurden mithilfe von Dr. Andreas Mack am Zeiss LSM 5 EXCITER *confocal laser scanning* Mikroskop aufgenommen. Hierfür wurden Deckgläser mit 100 µg/ml Fibrinogen in dH₂O über Nacht bei 4°C beschichtet und anschließend mit 1 % (w/V) BSA in PBS blockiert. Isolierte Thrombozyten (3×10^4 /µl) in Tyrodes Puffer pH 7,4 mit 1 mM Ca²⁺ wurden mit CRP-XL (5 µg/ml) versetzt und direkt auf die Deckgläser gegeben. Nach 30 Minuten wurde die Flüssigkeit auf den Deckgläsern abgekippt und die Deckgläser wurden drei Mal mit 100 µl PBS gewaschen. Die anschließende Fixierung erfolgte mit 100 µl 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA 4 %), welches für 10 Minuten auf den adhärenierten Zellen verblieb. Nach einer Blockierung mit 1 % igem BSA (w/V) für 30 Minuten wurden die Thrombozyten mit einem anti-CXCR4, anti-CXCR7, bzw. entsprechenden IgG Kontrollen über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T am nächsten Tag wurden anschließend die entsprechenden Sekundärantikörper (s. 2.1.6) hinzugefügt und für zwei Stunden auf den Zellen belassen. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde der bereits gelabelte anti-CXCL14-FITC bzw. IgG-FITC auf die Zellen gegeben und ebenfalls für 2 Stunden inkubiert. Nach einem finalen dreimaligen Waschen wurden die Deckgläser mit Eindeckelmedium auf Objektträgern fixiert.

2.4.2 Konfokale Mikroskopie von Kulturzellen

Abgelöste und in Medium resuspendierte Zellen wurden in einer Zahl von 5×10^4 /Well in ein 12-Kammersystem von ibidi GmbH ausgesät. Nach 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ wurde das Medium abgenommen und 4 %-iges PFA für 10 Minuten hinzugefügt. Nach dieser Fixierung wurden die Zellen mit 1 %-igem BSA in PBS für 30 Minuten blockiert, ehe die Primärantikörper zu den Zellen hinzugefügt wurden. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C

wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und danach mit den entsprechend markierten Sekundärantikörpern zusammen mit To-PRO3 (1 μ M) für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen ehe das Silikon-Trennsystem der Kammern entfernt wurde und die Zellen auf den Objektträgern mit Eindeckelmedium und Deckgläsern eingedeckelt wurden. Die Aufnahmen wurden mithilfe des Zeiss LSM 5 EXCITER *confocal laser scanning* Mikroskops aufgenommen.

2.4.3 Elektronenmikroskopie

Isolierte murine Thrombozyten (siehe 2.2.4) wurden nach der finalen Pelletierung des Isolationsprozesses in 37°C vorgewärmter Karnovsky-Lösung resuspendiert und so für 10 Minuten bei 37°C fixiert. Danach wurde die Suspension bei 4°C gelagert bis zur Einbettung in 3,5 %-iger Agarose bei 37°C. Anschließend wurde die Mischung bei Raumtemperatur getrocknet und mit einer 1 %-igen Osmiumlösung (0.1 M Cacodylatpuffer mit 1.5 % K-Ferrocyanid) nochmals für 2 Stunden postfixiert. Die fixierten Thrombozytenblöcke wurden in Glycinether eingebettet und mit einem Ultra-Microtom in 30 nm dünne Präparate geschnitten und auf ein Kupfergitter aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Transmission Elektronenmikroskop (Zeiss LIBRA 120), welches bei 120 kV arbeitet [152].

2.5 Funktionelle Methoden

2.5.1 Bestimmung der Blutparameter

Die Blutparameter der einzelnen Mauslinien wurden mit dem Hämatologiegerät KX21N (Sysmex) analysiert. Dabei wurden 90 µl murines Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen und in EDTA enthaltene Probengefäße gegeben. Das Gemisch wurde anschließend mit dem Hämatologiegerät gemessen und analysiert.

2.5.2 Durchflusszytometrie muriner Thrombozyten

Für die Untersuchung von Oberflächenproteinen im Durchflusszytometer wurden 50 µl murinen Blutes in 300 µl PBS-Heparin (20 U/ml) gegeben und mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 auf 1 ml Gesamtvolumen ergänzt. Anschließend wurde dreimal für je 5 Minuten bei Raumtemperatur und 260 x g zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde und das restliche Blut in 500 µl Tyrodes-Puffer pH 7,4 wieder aufgenommen wurde. Zuletzt wurde das Blut mit 500 µl Tyrodes-Puffer pH 7,4 mit 1 mM Ca²⁺ wieder aufgenommen. Davon wurden je 25 µl in FACS-Röhrchen gegeben und je 5 µl anti-P-Selektin-FITC, anti-Integrin α_{IIb}β₃-PE und anti-CD42b-APC oder anti-CXCL14-FITC gegeben. Anschließend wurden die verschiedenen Thrombozytenagonisten CRP-XL, Thrombin, ADP und U-46619 in entsprechenden Konzentrationen hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Reaktion mit 300 µl PBS gestoppt und die Proben wurden mit dem FACS Calibur analysiert.

2.5.3 Durchflusszytometrie humaner Thrombozyten

Für die Durchführung der Durchflusszytometrie humaner Thrombozyten wurde plättchenreiches Plasma (PRP) (siehe 2.2.3) gewonnen. Nach Zellzahlanalyse mit dem Hämatologiegerät KX21N wurden 0,5 x 10⁶ Thrombozyten in 5 µl zu 35 µl PBS + Ca²⁺ zusammen mit je 5 µl anti-CD62P-PE, PAC-1-FITC oder anti-

CXCL12-FITC oder anti-CXCL14-FITC gegeben. Anschließend wurden die Thrombozytenagonisten CRP-XL, Thrombin, oder ADP in angegebenen Konzentrationen dazugegeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 300 µl 0,5 %-igem Paraformaldehyd in PBS gestoppt und die Proben wurden mithilfe des FACS Caliburs analysiert.

Für die Ko-Inkubationsexperimente von rekombinantem CXCL14 mit Thrombozytenagonisten wurden die Zellen wie oben beschrieben pipettiert. Der Zugabe der Thrombozytenagonisten und der Antikörper stand jedoch eine 30-minütige Inkubation der Zellen mit rekombinantem CXCL14 bei Raumtemperatur vor.

2.5.4 *In vitro* Thrombusbildung (Flusskammer)

Das Blut von 8 bis 12 Woche alten Mäusen, versetzt mit PBS-Heparin (20 U/ml), wurde mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 und 1 mM Ca²⁺ in einem Verhältnis von 5:1 gemischt und zu je 800 µl auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach einer Zugabe von rekombinantem CXCL14 in einer finalen Konzentration von 1 µg/ml beziehungsweise PBS (Negativkontrolle) und einer Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Blut in einer 1ml Spritze aufgenommen und in eine Infusionspumpe eingespannt.

Bei Experimenten mit humanem Blut wurden 800 µl von-CPDA antikoaguliertem Blut mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 und 1 mM Ca²⁺ versetzt und rekombinantes CXCL14 oder PBS zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Blut in einer 1 ml Spritze aufgenommen.

Mit einer Flussgeschwindigkeit von 7,52 ml/h, was einer Scherrate von 1000 /sec entspricht, wurde das Blut durch eine Flusskammer perfundiert. Die Oberfläche war zuvor über Nacht bei 4°C mit 200 µg/ml Kollagen beschichtet worden. Nachdem 1 ml Volumen perfundiert waren, wurde die Flusskammer mit einer 1 ml Spritze mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 gespült, woraufhin 5 - 6 mikroskopische Aufnahmen (Zeiss Axiovert 200) von der Thromben-bedeckten Oberfläche gemacht wurden. Die Auswertung erfolgte digital mit Hilfe der AxioVision

Software durch Relation der Fläche, die durch Thromben bedeckt waren zur Gesamtfläche der Aufnahme.

2.5.5 Phagozytose Assay

Das phagozytotische Verhalten von Monozyten wurde mithilfe von markierten *E. coli* Partikeln untersucht. Dafür wurden isolierte humane Monozyten in RPMI-1640 mit 1 %-igem FCS (siehe 2.2.6) mit PBS oder rekombinatem CXCL14 für 2 Stunden bei 37°C in FACS-Röhrchen vorinkubiert. Anschließend wurden FITC markierte *E. coli* Partikel in einem Verhältnis 10:1 pro eingesetzten Monozyt hinzugefügt. Eine Probe wurde bei 4°C (Negativkontrolle) für 4 Stunden inkubiert, die restlichen Proben bei 37°C für dieselbe Zeit. Anschließend wurden die Zellen mit 1 %-igem PFA fixiert. Um an der Oberfläche angelagerte *E. coli* Partikel von phagozytierten zu unterscheiden wurde das Fluoreszenzsignal der angelagerten Partikel durch den Zusatz von 10% Trypanblau überdeckt. Die Fluoreszenz der aufgenommenen Partikel wurde mithilfe des FACS Calibur gemessen.

2.5.6 Migration Monozyten

Die Migration von Monozyten hin zu rekombinanten Chemokinen oder Thrombozytenüberstand (siehe 2.2.5) wurde in einer 48-Well *Boyden* Kammer untersucht. In die untere Kammer wird ein Volumen von 33 μl mit chemotaktischen Substanzen, wie CXCL12 (1 $\mu\text{g/ml}$; verdünnt in PBS mit 1 % FCS) oder Kontrollen in angegebener Konzentration pipettiert. Der untere Teil wird durch einen Filter mit einer Porengröße von 5 μm für humane Monozyten und von 3 μm für murine Monozyten blasenfrei bedeckt. Über den Filter wird eine Gummimatte gelegt und diese drei Teile werden durch die obere Kammer abgeschlossen. In die obere Kammer werden 50 μl mit 2×10^4 Monozyten pipettiert, ebenfalls in PBS mit 1 % FCS. Über 4 Stunden wurden Monozyten bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Migrieren die Monozyten dabei durch die Filtermembran in Richtung der Chemokine, bleiben diese zum Teil darin hängen, migrieren aber auch zum Teil durch die Membran in die untere Kammer. Nach der Inkubation wurden die Zellen in der oberen Kammer verworfen und die Filtermembran wurde in 100 %-igem Methanol für 10 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellen auf der Membran durch eine May-Grünwald/Giemsa Färbung und anschließende mehrfache Spülung in destilliertem Wasser angefärbt. Der Filter wurde für die Auswertung in Roti®-Histokit Eindeckelmedium zwischen einen Objektträger und ein Deckglas eingedeckelt, getrocknet und die anschließenden Mikroskopie Aufnahmen (Nikon ECLIPSE TS100) wurden quantitativ ausgewertet. Hierfür wurden in 10-facher Vergrößerung 5 Bilder pro Ansatz gemacht und mithilfe einer Bildverarbeitungssoftware (Image J) ausgewertet. Zusätzlich wurden nach erfolgter Inkubation für 37°C das Volumen in den Wells der unteren Kammer in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 250 μl PFA 0,5 % verdünnt. Anschließend wurde mithilfe des FACS Calibur die Zellzahl in den FACS-Röhrchen über 120 Sekunden gemessen.

2.5.7 Migration Thrombozyten

Die Migration von Thrombozyten in Trans-Well-Experimenten hin zu rekombinanten Chemokinen wurde bereits bei Krämer *et al.* beschrieben [153]. Die Migrationsexperimente in dieser Arbeit wurden vergleichbar durchgeführt. Hierfür wurden Trans-Well-Systeme der Firma Corning Incorporated verwendet. Dabei handelt es sich um ein Zwei-Platten System mit einem unteren Teil, in den Puffer und Chemokine vorgelegt werden und einen oberen Teil, in den die Zellen pipettiert wurden. Getrennt sind beide Teile durch eine Membran, die wie in Krämer *et al.* eine Porengröße von 0,4 μm aufweist. In die untere Platte werden 235 μl der, in PBS mit 1 % FCS verdünnten Chemokine in die entsprechenden Reservoirs pipettiert zusammen mit 5 μl eines anti-CD42b-PE Antikörpers. Isolierte murine Thrombozyten wurden von C57Bl/6J Wildtypmäusen, *cxcr4*^{-/-} oder *cxcr7*^{-/-} Mäusen nach der finalen Pelletierung des Isolationsprozesses in Tyrodes Puffer pH 7,4 mit 1 mM Ca^{2+} und 1 % FCS aufgenommen und auf eine Konzentration von $1,33 \times 10^7$ /ml eingestellt. In die oberen Wells wurden nun 75 μl der Thrombozytensuspension gegeben. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde der obere Teil entfernt, vorsichtig resuspendiert und 210 μl aus dem unteren Reservoir in FACS-Röhrchen überführt. In diesen FACS-Röhrchen waren 30 μl 4 %-iges PFA vorgelegt worden, was zu einer Gesamtkonzentration von 0,5 % PFA in einer Zellsuspension von 250 μl führte. Diese Probe wurde anschließend für 120 Sekunden mithilfe der Durchflusszytometrie vermessen und die CD42b positive Zellen quantitativ erfasst. Eine PBS Kontrolle ohne Chemokine im unteren Reservoir diente als Negativkontrolle, auf deren gemessene Zellzahl die anderen Werte relativiert werden.

2.5.8 Migration Thrombozyten ähnlicher Partikel (CDPs)

Das Migrationsausmaß iPSC-generierter Thrombozyten-ähnlicher Partikel (*Culture-derived platelets*; CDPs) wurde im selben experimentellen Ansatz untersucht wie das von murinen Thrombozyten. Nach der Isolation von CDPs (siehe 2.2.12) und der Resuspension derselben in 500 μl PBS mit 1 % FCS

wurden jeweils 75 µl in die oberen Wells des Zweikammer Migrationssystems gegeben. Wie unter 2.5.7 beschrieben, befanden sich auch hierbei 235 µl PBS mit 1 % FCS und rekombinanten Chemokinen oder PBS (Negativkontrolle) in den unteren Wells Die Anzahl CD42b positiver Zellen in den Wells mit Chemokin-versetztem Puffer wurde auch hier in Relation zur Anzahl der CD42b positiven Zellen in der Negativkontrolle gebracht.

2.5.9 Aktives flächenhaftes Ausbreiten von Thrombozyten (Spreading)

Die Ausbreitung von murinen Thrombozyten wurde auf einer Fibrinogen-beschichteten Oberfläche nach Aktivierung untersucht. Hierfür wurden Deckgläser mit Fibrinogen (100 µg/ml) bei 4°C über Nacht beschichtet. Nach der Beschichtung wurden die Deckgläser mit einer Blockier-Lösung (PBS mit 1 % BSA) bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Währenddessen wurden murine Thrombozyten isoliert (siehe 2.2.4) und nach dem finalen Pelletieren des Isolationsprozesses in Tyrodes Puffer mit 1 mM Ca²⁺ resuspendiert und auf 30 x 10⁴ Thrombozyten /µl eingestellt. Nachdem die Blockier-Lösung abgenommen wurde, wurde die Thrombozytensuspension auf die Deckgläser pipettiert. Unmittelbar bevor die Thrombozytensuspension auf die Fibrinogen Beschichtung pipettiert wurde, wurde der Suspension ein aktivierender Agonist (CRP, Thrombin) zugesetzt. Anschließend werden die Deckgläser bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension abgenommen und durch den Zusatz von 4 %-igem Formaldehyd auf die Deckgläser wurden adhärenzte und flächig ausgebreitete Thrombozyten für 10 Minuten fixiert. Um alle restlichen nicht adhärenzten Thrombozyten zu entfernen wurde das Formaldehyd entfernt und die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden anschließend entweder für die Immunfluoreszenz weiterverwendet oder auf einen Objektträger gelegt und sofort mikroskopisch aufgenommen. Dabei wurden an einem Zeiss Axiovert 200 mittels Differentialinterferenzkontrast (DIC) mindestens fünf repräsentative Aufnahmen bei einer 100-fachen Vergrößerung gemacht. Die adhärenzten Thrombozyten wurden in vier verschiedene Stadien ihrer Ausbreitung eingeteilt [154]. Phase 1 entsprach dabei adhärenzten Thrombozyten ohne Filopodien oder Lamellopodien, Phase 2 adhärenzten

Thrombozyten nur mit Filopodien, Phase 3 partiell ausgebreiteten Thrombozyten mit Filopodien und Lamellopodien und Phase 4 vollständig ausgebreiteten Thrombozyten. Die Anzahl an Thrombozyten von Wildtypmäusen in ihrem jeweiligen Stadium wurde mit der Anzahl an cxcl14^{-/-} Thrombozyten des entsprechenden Stadiums verglichen.

2.5.10 Wundheilungsassay

Der Einfluss von rekombinantem sowie thrombozytärem CXCL14 auf endotheliale Zellen wurde mithilfe eines Wundheilungs-Experimentes (*Scratch-Assay*) untersucht. Durchgeführt wurde das Experiment in 24-Well Platten, deren Wells auf der Unterseite mit einem Stift markiert wurden, sodass eine Hilfslinie seitwärts quer durch das Well verlief. Nach der Beschichtung mit 0,2 %-iger Gelatine wurden 2×10^5 HUVECs pro Well in 300 μ l Medium auf der 24-Well Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Tags darauf wurde das Medium gewechselt, sodass das neue Medium 10 ng/ml VEGF-A und PBS bzw. die Chemokine CXCL14 (50 ng/ml) oder CXCL12 (50 ng/ml) oder 1:1 mit APS oder RPS (s. 2.2.5) versetzt wurde. Anschließend wurde eine gelbe 200 μ l Pipetten Spitze senkrecht auf die Oberfläche angesetzt und es wurden pro Well orthogonal zur Hilfslinie zwei „Striche“ auf der Endothelzellschicht gezogen. Hierdurch wurde ein definierter Spalt in den HUVEC Zellrasen eingefügt, der sich mikroskopisch darstellen und mithilfe der Bildverarbeitungssoftware AxioVision Software vermessen lässt. Es wurden nach 0, 4, 8, 10 und 24 Stunden vier Aufnahmen pro Well mit einer 2,5-fachen Vergrößerung aufgenommen, je zwei unter und zwei oberhalb der Markierungslinie. So waren einzelne Bilder des gleichen Abschnitts über die Zeit miteinander vergleichbar.

2.5.11 Aggregometrie

Das Maß und die Geschwindigkeit der Aggregation von isolierten murinen oder humanen Thrombozyten lässt sich mithilfe des Vollblutluminoaggregometers Modell 700 (Chrono-Log Corporation) darstellen und bestimmen. Hierfür wurden 250 µl Thrombozytensuspension ($2,5 \times 10^8$ Thrombozyten /µl) in Tyrodes Puffer pH 7,4 in einer Glasküvette mit einem Rührfisch bei 1000 RPM und 37°C inkubiert. Nach Kalibrierung konnte die Aggregation aufgezeichnet werden, die nach Zugabe von diversen Agonisten in verschiedenen Konzentrationen erfolgte. Die Messung wurde über 10 Minuten aufgezeichnet. Das Maß an Aggregation wurde durch Relation der ursprünglich durchgelassenen Lichtmenge zu der Lichtmenge, die nach 10 Minuten durch die Thrombozytensuspension gelassen wurde, in Prozent berechnet. Die Auswertung erfolgte dabei durch die AggroLink Software [155].

2.5.12 ATP Freisetzung

Die Menge an ATP, die von aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird, wurde ebenfalls mit dem Vollblutluminoaggregometer Modell 700 (Chrono-Log Corporation) bestimmt. 240 µl isolierte murine Thrombozyten in Tyrodes-Puffer pH 7,4 wurden dafür bei einer Konzentration von $2,5 \times 10^8$ Thrombozyten /µl in eine Glasküvette überführt und mit 10 µl Luciferase-Lösung versetzt. Nach 2 Minuten Inkubation bei 37°C wurden 5 µl einer ATP Standard-Lösung (Chrono-Log) zugegeben. Durch Anpassen der Sensitivität konnte das System so auf 2 nM ATP kalibriert werden. Nach dieser Kalibrierung konnte die ATP-Sekretion von aktivierten Thrombozyten in Proben gemessen werden, welchen aktivierende Agonisten in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wurden. Auch hier erfolgte die Messung über 10 Minuten und die Auswertung über die AggroLink Software [155].

2.6 Experimente an der Maus

2.6.1 Organentnahme

Für die Gewinnung von Lysaten aus murinem Gewebe, wurden Tiere in Narkose durch Entbluten getötet. Anschließend wurden die Gefäße und Organe mit PBS und Heparin (20 U/ml) gespült. Die Organe wurden entnommen, mechanisch zerkleinert und in Lysepuffer aufgenommen. Nach einstündiger Lyse auf Eis wurden Zelltrümmer bei 14000 x g für 10 Minuten bei 4°C pelletiert und verworfen. Die gelösten Proteine wurden auf ihren Anteil am Überstand bestimmt (siehe 2.2.15).

2.6.2 Phänotypisierung der *cxcl14*^{-/-} Knock-out Tiere

Der Einfluss von CXCL14 in verschiedenen Experimenten wurde mithilfe von *cxcl14*^{-/-} Mäusen untersucht. Heterozygote *cxcl14*^{+/-} Männchen wurden hierfür mit heterozygoten *cxcl14*^{+/-} Weibchen verpaart. Die geborenen Jungtiere wurden nach 21 Tagen abgesetzt, wobei diese nach einem Ohrlohschema eindeutig identifizierbar markiert wurden. Die gewonnene Gewebeprobe konnte zur DNA-Extraktion und damit zur Genotypisierung der Jungtiere verwendet werden (Abbildung 5). Gewicht und Körperlänge wurden im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyptieren im Alter von 10 Wochen dokumentiert (Addendum Abbildung 40).

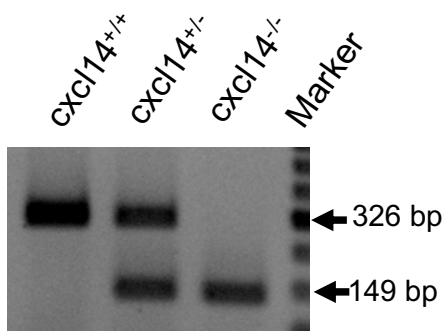


Abbildung 5. Genotypisierung von *cxcl14*^{-/-} Mäusen: Nach DNA Extraktion aus Gewebeproben und durchgeführter PCR sind die Bandenmuster von Wildtyp Mäusen (*cxcl14*^{+/+}; 326 bp) klar von heterozygoten Mäusen (*cxcl14*^{+/-}) und CXCL14 *Knock-out* Mäusen (*cxcl14*^{-/-}; 149 bp) zu unterscheiden.

2.6.3 Phänotypisierung der *cxcr4fl/fl Pf4-Cre+* Mäuse und *cxcr7fl/fl Pf4-Cre+* Mäuse

Für die Untersuchung des Einflusses von Chemokinrezeptoren in verschiedenen Experimenten ist ein Thrombozyten-spezifischer *Knock-out* dieser Rezeptoren sehr wichtig, um den Einfluss von Thrombozyten näher zu charakterisieren. Hierfür werden Pf4-Cre positive Männchen mit Pf4-Cre negativen, homozygot geflochten Weibchen verpaart. Durch das Cre-loxP System wird ein konditioneller *Knock-out* des entsprechenden Gens erreicht (Abbildung 6). Nach dem Absetzen 21 Tage alter Jungtiere wurden diese nach einem Ohrlochschemata eindeutig identifizierbar markiert und die dabei gewonnene Gewebeprobe konnte zur DNA-Extraktion und Genotypisierung verwendet werden. Das Gewicht und die Körperlänge wurden mit gleichaltrigen Wildtyptieren im Alter von 10 Wochen verglichen.

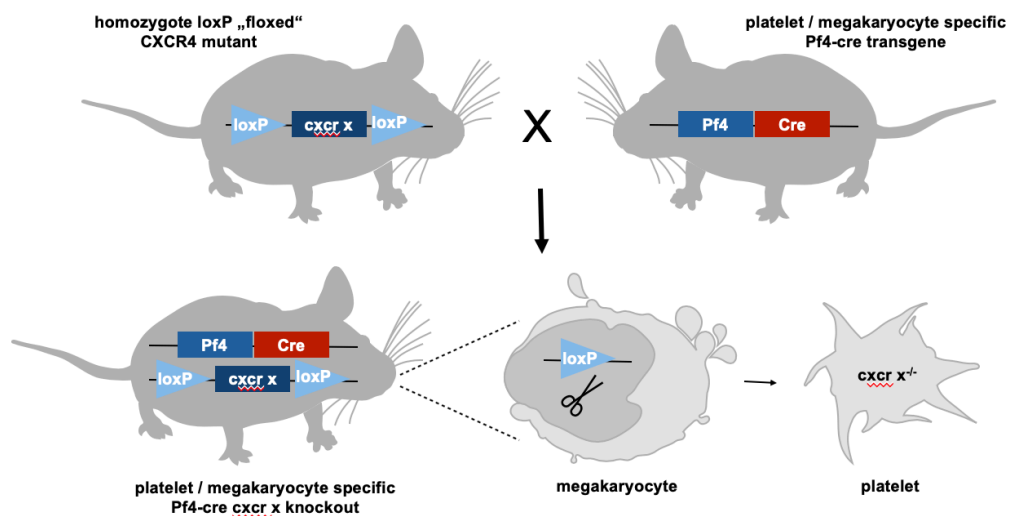


Abbildung 6. Generierung einer Thrombozyten-spezifischen CXCR-Rezeptor *Knock-out* Maus: Zuchtschema eines Pf4-Cre Männchens (linke obere Maus) und eines *cxcr* $X^{lox/flox}$ Weibchens (rechte obere Maus). Hierbei steht der "cxc X" für den entsprechenden Rezeptor (CXCR4 oder CXCR7). Die Kreuzung resultiert in Cre Expression, der Deletion des loxP-flankierten Gens und damit zum *cxcr* $x^{-/-}$ Nachwuchs (untere Maus).

2.6.4 *In vivo Experimente (Peritonitis)*

Die Tierversuchsanträge wurden vor Versuchsbeginn vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (M10/16, M5/17). Mithilfe des Peritonitis Modells in der Maus kann die *in vivo* Infiltration verschiedener pro-inflammatorischer Zellen untersucht werden.

Bei dem Thioglycollat-abhängigen Peritonitismodell werden die Mäuse zunächst durch Inhalation von 5,0 rel. Vol. % Isofluran in der Anästhesiekammer bei einer Sauerstoff-Flussrate von 1 l/min betäubt. Anschließend erfolgt die intraperitoneale Thioglycollatapplikation (4 %, 20 ml/kg Körpergewicht). Tieren mit Thioglycollat-induzierter Peritonitis wird eine Analgesie bis zur Tötung mit Buprenorphin 0,05 - 0,1 mg/kg 3 x tägl. subkutan verabreicht.

Um die Injektion der Narkotika oder Kochsalzlösung oder Thioglycollat in die Bauchhöhle zu erleichtern und die Belastung der Tiere möglichst gering zu halten, werden die Tiere vor der i.p.-Injektion durch Inhalation von 5,0 rel. Vol. % Isofluran in der Anästhesiekammer bei einem Sauerstoff- Flussrate von 1 l/min narkotisiert. Als Beobachtungszeitpunkt werden 24 Stunden nach Thioglycollatapplikation gewählt. Die Tötung findet zum definierten Zeitpunkt durch Entbluten und anschließenden Genickbruch in Isoflurannarkose statt. Dann werden die migrierten Zellen durch Peritoneallavage aus den geopfertem Mäusen gewonnen und durch FACS-Analyse entsprechend ihrer Oberflächen-Antigene charakterisiert, was hier einem CD42b Antikörper zur Thrombozyten Detektion entspricht. Die Mäuse werden dafür im abdominalen Bereich mit Hilfe von Haarentfernungsmittel von Haaren befreit und steril vorbereitet.

Durch einen kleinen Schnitt in der Bauchwand wurde die Peritonealflüssigkeit nun mit einer Transferpipette entnommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Infiltrierte Zellen, die eventuell noch in der Peritonealhöhle verblieben sind, wurden durch das Spülen der Peritonealhöhle mit insgesamt 6 ml PBS rausgewaschen und ebenfalls in das 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen in der gewonnenen Lavage wurde bei 301 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert und mit 1 ml BD™ FACS™ Lyse Lösung fixiert. Nach einer Zellzahlbestimmung mit der Neubauerkammer wurden je $0,5 \times 10^6$ Zellen in FACS-Röhrchen pipettiert, zusammen mit Antikörpern (anti-CD42b-PE, anti-

CD11b-APC) und für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde der Gehalt an den Zellen, die positiv für einen bestimmten Oberflächenmarker waren per Durchflusszytometrie quantitativ bestimmt.

2.6.5 Verwendete Mäuse und ethische Vertretbarkeit

Alle Mäuse, die sich in Zucht befanden oder für Experimente gebraucht wurden, wurden von Fachpersonal gepflegt und betreut. Gehalten wurden die Mäuse in einer spezifisch pathogen freien Tierhaltung. Für Experimente wurden die Linien C57Bl/6J (Wildtyp, WT), $Cxcl14^{tm1Bmsr}/Cxcl14^{tm1Bmsr}$ ($cxcl14^{-/-}$), $cxcr4^{fl/fl}$ Pf4-Cre⁺ Mäuse ($cxcr4^{-/-}$), $cxcr4^{fl/fl}$ Pf4-Cre⁻ Mäuse ($cxcr4^{+/+}$) und $cxcr7^{fl/fl}$ Pf4-Cre⁺ Mäuse ($cxcr7^{-/-}$), $cxcr7^{fl/fl}$ Pf4-Cre⁻ Mäuse ($cxcr7^{+/+}$) verwendet. Alle durchgeführten Tierversuche wurden entsprechend tierschutzrechtlicher Bestimmungen durchgeführt. Die Tierversuchsanträge wurden zuvor vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (M10/16, M5/17).

2.7 Statistische Auswertung

Die Daten und Werte in dieser Arbeit wurden mithilfe der GraphPad PRISM Software (Version 8) auf statistische Unterschiede getestet. Dabei wurde zuerst auf Normalverteilung untersucht. Der Vergleich von zwei Gruppen wurde anschließend mit einem zweiseitigem gepaarten beziehungsweise ungepaartem t-Test und die Unterschiede in einer Gruppe mithilfe des ANOVA Dunett's-Test beziehungsweise bei keiner Normalverteilung mit einem Mann-Whitney-U-Test untersucht. Die Ergebnisse mit *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) und ***($p < 0,001$) wurden als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

Ziele dieser Arbeit waren es, zu untersuchen:

- I) ob Thrombozyten das Chemokin CXCL14 exprimieren und nach Aktivierung freisetzen
- II) ob CXCL14 zu inflammatorischen Prozessen beiträgt
- III) über welchen Rezeptor CXCL14 ausgelöste Wirkungen vermittelt werden
- IV) welche Auswirkung das Chemokin auf die Funktionalität von Thrombozyten hat und ob es die Thrombusbildung beeinflusst

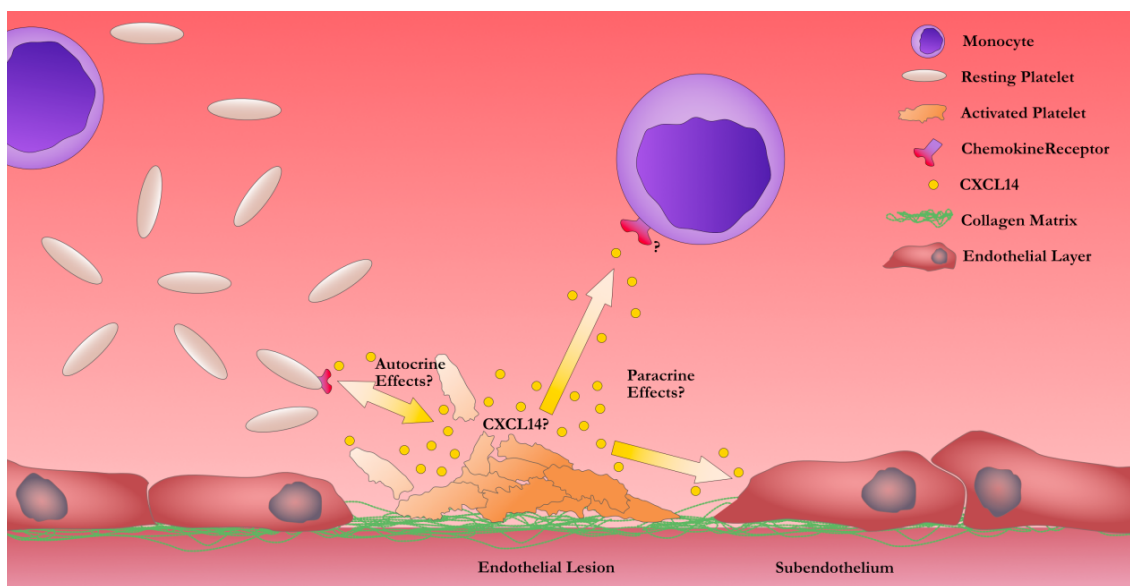


Abbildung 7. Schematische Abbildung der Fragestellung: Experimentell geprüft werden soll, ob das Chemokin CXCL14 in Thrombozyten vorhanden ist, nach Aktivierung freigesetzt wird und einen parakrinen Effekt auf andere Zellen ausübt. Im Fokus hierbei stehen mögliche chemotaktische Effekte auf inflammatorische Zellen wie Monozyten sowie Effekte auf das Zellwachstum von Endothelzellen, die durch ihre Lokalisation auf der Gefäßoberfläche thrombozytären Chemokinen ausgesetzt sind. Auch autokrine Effekte auf Thrombozyten selbst im Hinblick auf Thrombozytenaktivierung, -degranulation, *Shape Change* und *in vitro* Thrombusbildung sollen untersucht werden. Ebenfalls soll experimentell untersucht werden, ob CXCL14 eine Migration von Thrombozyten beeinflussen kann. So soll die Frage geklärt werden, ob möglicherweise in Thrombozyten vorhandenes CXCL14 einen pro-inflammatorischen Effekt aufzeigt und damit aktiv zur Thrombo-Inflammation beiträgt. Außerdem soll der verantwortliche Rezeptor für CXCL14 vermittelte Wirkungen untersucht werden.

3.1 Thrombozyten exprimieren und sekretieren CXCL14

3.1.1 Thrombozyten exprimieren CXCL14

Um die Frage zu beantworten, ob Thrombozyten das Chemokin CXCL14 exprimieren, wurden Western Blots von humanen Thrombozyten Lysaten angefertigt. Hierbei konnte eine spezifische Antikörperbindung bei ungefähr 18 kDa und 13 kDa detektiert werden, was spezifischen CXCL14 Banden entspricht.

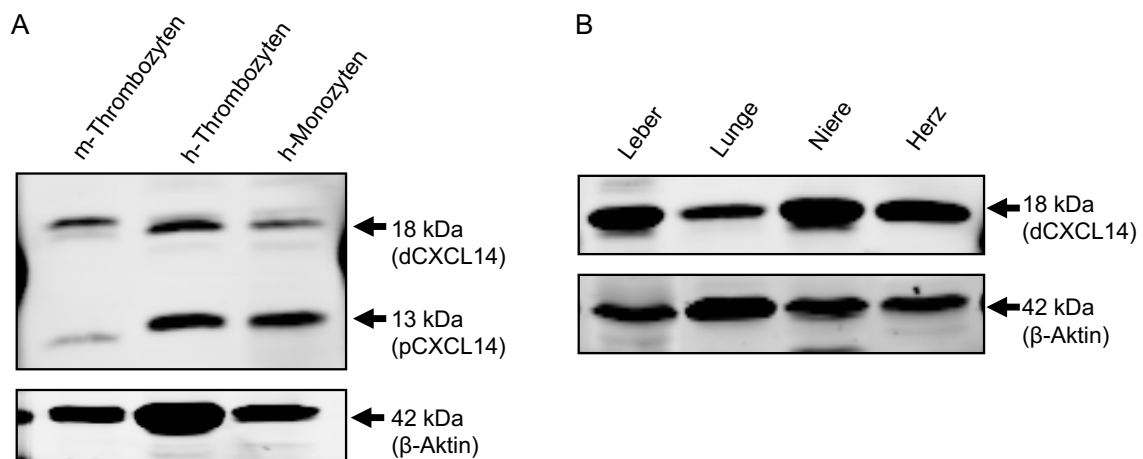


Abbildung 8. Humane und murine Thrombozyten exprimieren CXCL14: (A) Western Blot Analysen zeigen ein signifikantes Signal für CXCL14 bei etwa 18 kDa (dCXCL14; *dimeric* CXCL14) und 13 kDa (pCXCL14; unreifes, *premature* CXCL14) in humanen und murinen Thrombozyten (h-/m-Thrombozyten) sowie in humanen Monozyten (h-Monozyten). Das Signal von β-Aktin (42 kDa) diene als Ladekontrolle. (B) Als Positivkontrolle für das CXCL14 Signal dienten die Lysate von murinem Nieren-, Lungen-, Leber-, und Herzgewebe. Abbildungen sind repräsentativ für n = 3 Western-Blot Analysen.

So konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass isolierte humane und murine Thrombozyten das Chemokin CXCL14 enthalten. Als Kontrolle diente das Lysat von humanen Monozyten, die CXCL14 exprimieren [107] (Abbildung 8). Eine weitere Kontrolle für das detektierte CXCL14 Signal waren Lysate von verschiedenen murinen Organen. Auch hier konnte eine spezifische Bande für CXCL14 detektiert werden. Zur Kontrolle der geladenen Proteinmenge wurde β-Aktin detektiert. In dieser Arbeit sind in Western-Blots spezifische CXCL14 Signale bei etwa 13 kDa (*premature* CXCL14; pCXCL14) aber auch bei etwa

18 kDa (*dimeric CXCL14*; dCXCL14) gezeigt (Abbildung 8). Dies ist damit zu erklären, da CXCL14 zunächst als 111 Aminosäuren langes Protein mit einer Größe von 13 kDa exprimiert wird. Anschließend wird es zum reifen Protein mit 77 Aminosäuren prozessiert, welches dann 9,4 kDa groß ist. Da jedoch nicht nur ein spezifisches Signal bei 13 kDa detektiert wurden, sondern auch bei etwa 18 kDa, könnte es sich hierbei um eine Homodimerisierung von 2 prozessierten CXCL14 Proteinen mit 9,4 kDa oder um eine Heterodimerisierung mit einem anderen ähnlich großen Protein handeln. Eine Homodimerisierung von CXCL14 wird bereits in der Literatur diskutiert [121, 127].

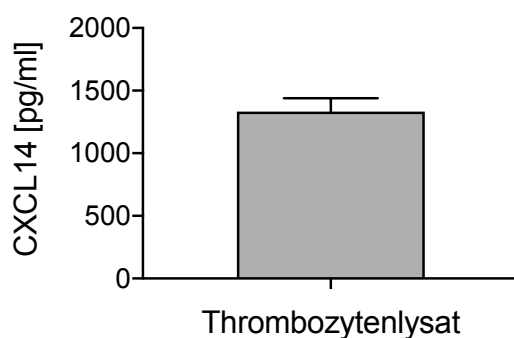


Abbildung 9. Humane Thrombozyten enthalten CXCL14: CXCL14 ist in humanen Thrombozyten per ELISA nachweisbar. Bei einer Anzahl von 1×10^9 Thrombozyten /ml wurde dabei ein CXCL14 Signal von 1332,1 pg/ml \pm 150,6 pg /ml vermessen. Als Kontrolle diente eine Standardkonzentrationsreihe in Lysepuffer. Es handelt sich um n = 3 unabhängige Versuchsansätze.

Lysierte isolierte humane Thrombozyten wurden ebenfalls mithilfe des *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) auf ihren CXCL14 Gehalt untersucht. Lysate von 1×10^9 Thrombozyten ergaben dabei ein Signal von 1332,1 pg/ml \pm 150,6 pg/ml. Dieses Ergebnis bestätigt das Vorkommen von CXCL14 in humanen Thrombozyten.

3.1.2 CXCL14 wird nach Thrombozytenstimulation freigesetzt

Thrombozyten exprimieren und sekretieren eine Vielzahl an Chemokinen, Zytokinen und anderen Signalstoffen nach Stimulation. Daher stellte sich nach dem Nachweis des Vorkommen von CXCL14 in Thrombozyten die Frage, ob CXCL14 auch von aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird.

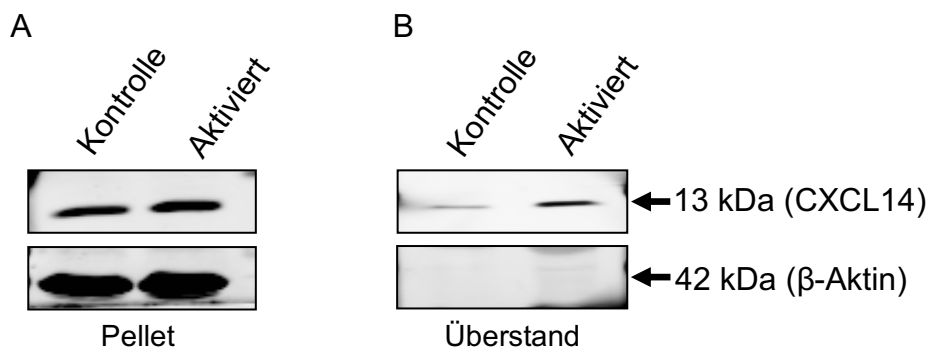


Abbildung 10. CXCL14 ist im Überstand von aktivierten Thrombozyten nachweisbar: Thrombozyten wurden mit CRP-XL (5 µg/ml) für 60 Minuten in PBS+Ca²⁺ aktiviert. Überstände (**B**) und Thrombozytenlysate (**A**) zeigten per Western-Blot CXCL14 Signale (13 kDa), wobei in Überständen, die von aktivierten Thrombozyten (Aktiviert) stammen deutlich stärkere CXCL14 Signale zu sehen sind als von unaktivierten (Kontrolle). Als Ladekontrolle dienten das Signal für β-Aktin. Abbildungen sind repräsentativ für n = 3 Western-Blot Analysen.

Nach einer Stimulation von isolierten humanen Thrombozyten mit Kollagen-ähnlichem Peptid (*Collagen-related peptide*; CRP-XL) konnte ein CXCL14 Signal in Western-Blots im Überstand dieser Thrombozyten (Aktiviert) detektiert werden, kaum jedoch in dem Überstand von unaktivierten Thrombozyten (Kontrolle) (Abbildung 10).

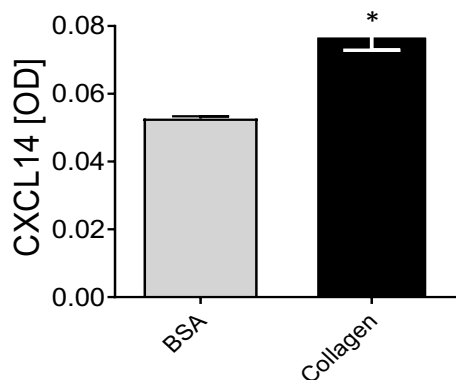


Abbildung 11. CXCL14 ist im Überstand von aktivierten Thrombozyten per ELISA nachweisbar: Thrombozyten wurden auf immobilisiertem Kollagen (*Collagen*; 1 mg/ml) oder BSA (1 mg/ml) aktiviert. Die Freisetzung von CXCL14 in den Überständen wurde per ELISA als Signalstärke (*optical density*; OD) analysiert. Statistik: ungepaarter t-Test; n = 3; p < 0,01

In den Überständen von, mit Kollagen aktivierten, Thrombozyten konnte auch per ELISA ein signifikant stärkeres Signal für CXCL14 gemessen werden im Vergleich zu den Überständen von ruhenden Thrombozyten (BSA) (Abbildung 11). Beide Ergebnisse, der Western Blot und das ELISA Experiment indizieren eine Freisetzung von CXCL14 aus aktivierten Thrombozyten.

3.1.3 CXCL14 wird auf der Thrombozytenoberfläche detektiert

Um die Freisetzung von CXCL14 aus Thrombozyten weitergehend zu untersuchen und darzustellen, wurden zusätzliche Experimente mit ruhenden und aktivierten Thrombozyten durchgeführt. Nach Inkubation mit aktivierenden Agonisten oder einer nicht aktivierenden Kontrolle wurden die Thrombozyten mit Antikörpern für Aktivierungsmarker gefärbt und deren Oberflächenexpression auf Thrombozyten im Durchflusszytometer analysiert.

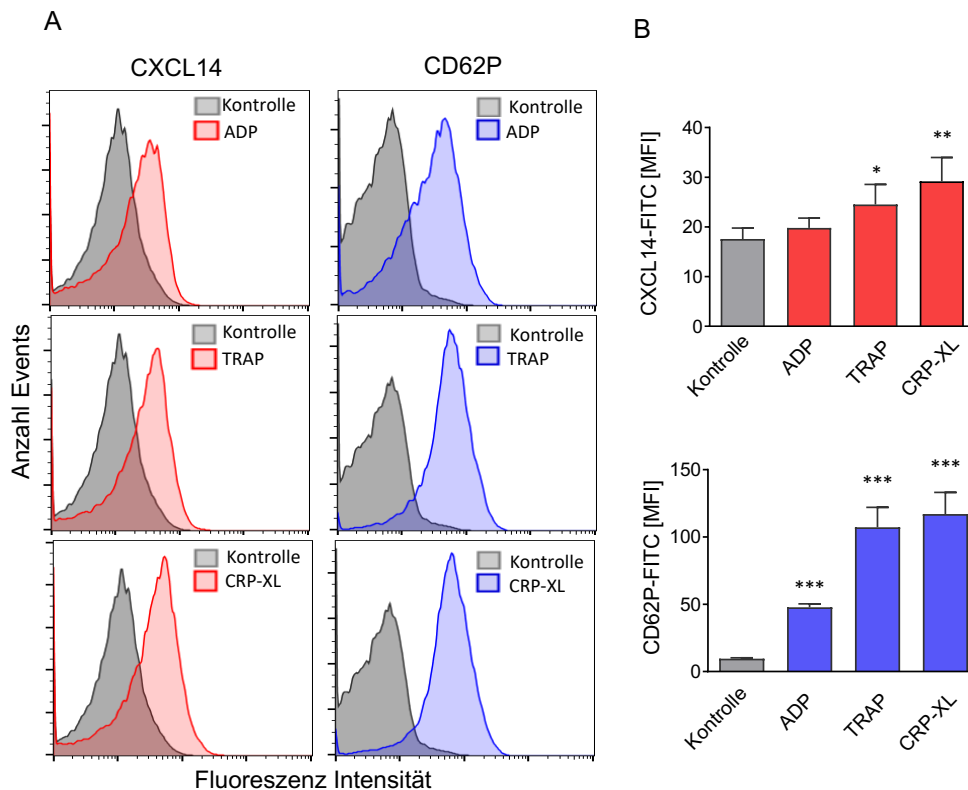
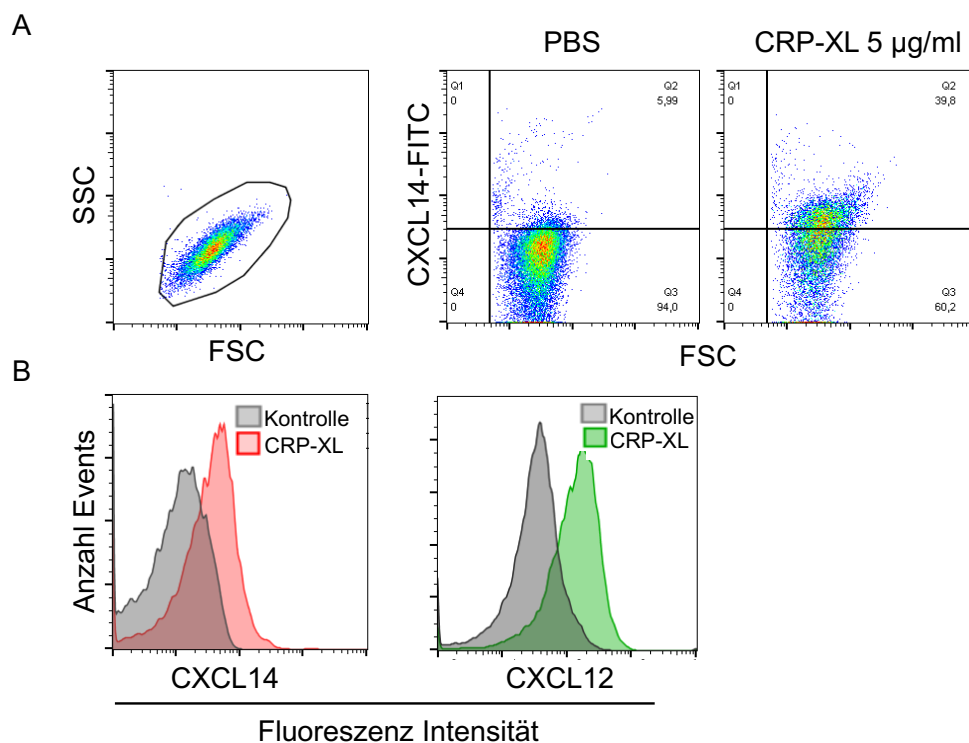


Abbildung 12. CXCL14 ist auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten zu detektieren: (A) Histogramme von durchflusszytometrischen Experimenten zeigen eine Verschiebung des CXCL14 Signals (rot) auf der Thrombozyten Oberfläche nach Aktivierung mit verschiedenen Agonisten im Vergleich zu unaktivierten Thrombozyten (grau). (B) Quantitative Auswertung – Durchflusszytometrische Experimente zeigen, dass das Oberflächen Signal von CXCL14 auf Thrombozyten nach CRP-XL- (5 µg/ml) beziehungsweise TRAP-Gabe (*Thrombin Receptor activating Peptide*; 25 µM) signifikant erhöht ist im Vergleich zu unaktivierten Thrombozyten (Kontrolle). Die Oberflächenexpression von CD62P (blau) dient als Kontrolle der Thrombozyten Degranulation. Statistik: einfache Varianzanalyse; n = 5; CXCL14-FITC: Kontrolle vs. ADP p = ns; Kontrolle vs. TRAP p < 0,05; Kontrolle vs. CRP-XL p < 0,01; CD62P-FITC: Kontrolle vs. ADP p < 0,001; Kontrolle vs. TRAP p < 0,001; Kontrolle vs. CRP-XL p < 0,001.

Bei durchflusszytometrischen Untersuchungen der Bindung von anti-CXCL14 Antikörpern an der Thrombozyten Oberfläche konnte ein signifikant höheres Bindungssignal an aktivierte Thrombozyten festgestellt werden (Abbildung 12). Hierbei wurden Thrombozyten mit verschiedenen Agonisten aktiviert. Zur Kontrolle der Aktivierung wurde hierbei die Oberflächenexpression des thrombozytären Aktivierungsmarkers P-Selektin (CD62P) gemessen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass CXCL14 in Thrombozyten vorhanden ist und durch deren Aktivierung freigesetzt wird. Außerdem ist ein erhöhtes Signal an CXCL14 auf der Thrombozyten Oberfläche nach Aktivierung zu detektieren, was auf eine autokrine Bindung von freigesetztem thrombozytärem CXCL14 hinweisen könnte.

In weiteren durchflusszytometrischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Maß an Oberflächenexpression von CXCL14 auf isolierten Thrombozyten abhängig ist von der eingesetzten Dosis an CRP-XL.



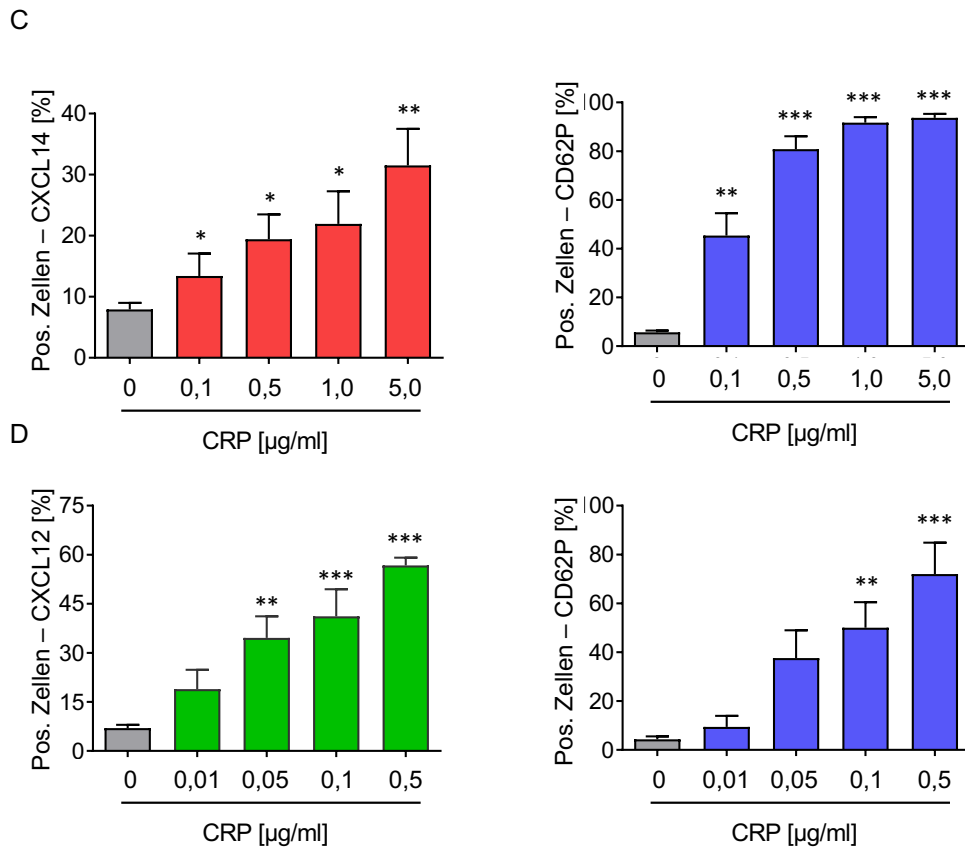


Abbildung 13. Die Oberflächenexpression von CXCL14 Thrombozyten ist CRP-XL-konzentrationsabhängig: Die quantitative Auswertung von Dot-Blots (A) und entsprechenden Histogrammen (B) von durchflusszytometrischen Experimenten zeigen, dass die Oberflächenexpression von CXCL14 auf aktivierten Thrombozyten abhängig von der eingesetzten Menge CRP-XL (0,1 µg/ml – 5 µg/ml) ist (C). Niedrigere Konzentrationen an CRP-XL (0,01 – 0,5 µg/ml) sind nötig für eine vergleichbare CXCL12-Oberflächenexpression (D). Die Oberflächenexpression von CD62P dient als Kontrolle der Thrombozyten Degranulation. Statistik: einfache Varianzanalyse; n = 4; Pos. Zellen CXCL14: 0 vs 0,1 p < 0,05; 0 vs 0,5 p < 0,05; 0 vs 1,0 p < 0,05; 0 vs 5,0 p < 0,01; Pos. Zellen CD62P: 0 vs 0,1 p < 0,01; 0 vs 0,5 p < 0,001; 0 vs 1,0 p < 0,001; 0 vs 5,0 p < 0,001; Pos. Zellen CXCL12: 0 vs 0,01 p = ns; 0 vs 0,05 p < 0,01; 0 vs 0,1 p < 0,001; 0 vs 0,5 p < 0,001; Pos. Zellen CD62P: 0 vs 0,01 p = ns; 0 vs 0,05 p = ns; 0 vs 0,1 p < 0,01; 0 vs 0,5 p < 0,001

Mit steigender CRP-XL Konzentration stieg die gemessene Bindung von anti-CXCL14-FITC Antikörper an der Thrombozyten-Oberfläche signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Um den Aktivierungsgrad der Thrombozyten unter den eingesetzten CRP-XL Konzentrationen zu kontrollieren, wurde der Marker für die Degranulation von α -Granula P-Selektin (CD62P) gemessen. Deutlich geringere Konzentrationen an CRP-XL waren ausreichend, um eine signifikant erhöhte Oberflächenbindung eines anti-CXCL12-FITC Antikörpers zu erreichen. Auch

diese Ergebnisse sprechen dafür, dass CXCL14 nicht nur in Thrombozyten vorhanden ist, sondern auch nach deren Aktivierung freigesetzt wird.

3.2 Thrombozytäres CXCL14 ist pro-inflammatorisch und thrombo-regulatorisch

3.2.1 CXCL14 erhöht die Monozyten vermittelte Phagozytose

Um die möglichen Auswirkungen von CXCL14 auf inflammatorische Prozesse und damit dessen Beitrag zur Thrombo-Inflammation zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zur unspezifischen Immunantwort gehören phagozytierende Zellen. Die Phagozytose ist ein rezeptorvermittelter energie- und zytoskelettabhängiger „Fressvorgang“ bei dem Partikel, wie Bakterien von der phagozytierenden Zelle umschlossen, internalisiert und abgebaut werden. Phagozytotische Prozesse durch Monozyten können deren Differenzierung und das Voranschreiten von Arteriosklerose begünstigen und sind deshalb von besonderem Interesse bei der Untersuchung der biologischen Aktivität von CXCL14 [156]. Die monozytäre Phagozytose ist ein wichtiger Teil der primären Immunantwort [157].

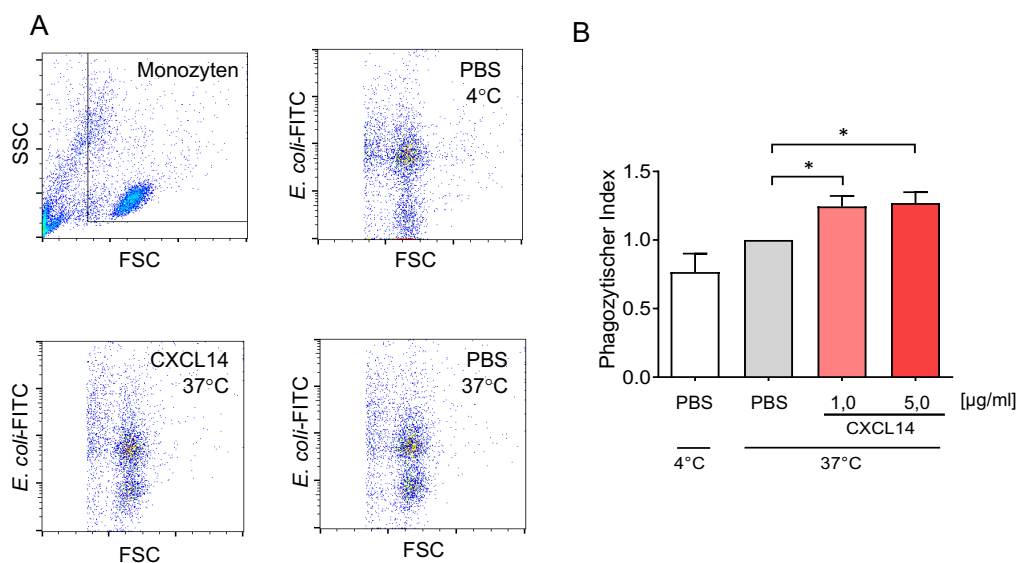


Abbildung 14. CXCL14 erhöht die phagozytotische Aktivität von humanen Monozyten: Die relativierte Auswertung von Dot-Blots aus Durchflusszytometrischen Experimenten (A) zeigt, dass CXCL14 (1 µg/ml; 5 µg/ml) die mittlere Fluoreszenz-Intensität (*Mean Fluorescence Intensity; MFI*) von isolierten Monozyten, welche Alexa Flour® 488 markierte *E. coli* BioParticles® aufgenommen haben, signifikant erhöht (B). Aufgetragen ist der relative Vergleich zum Wert bei 37°C von PBS behandelten Monozyten. Die Inkubation bei 4°C diente als Negativ-Kontrolle für das Phagozytose Experiment. Statistik: Mann Whitney U-Test; n = 4; PBS-37°C vs 1,0 p < 0,05; PBS-37°C vs 5,0 p < 0,05

Um den Einfluss von CXCL14 auf diesen pro-inflammatorischen Prozess zu untersuchen, wurden isolierte humane Monozyten mit rekombinantem CXCL14 vorinkubiert und anschließend mit Fluoreszenz-markierten *E. coli* Partikeln inkubiert. Im Vergleich zur Kontrolle bei 37°C konnte eine signifikant erhöhte Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Partikeln in Monozyten nach der Inkubation mit rekombinantem CXCL14 (1 µg/ml) detektiert werden (Abbildung 14). Mit einer höheren Dosis an CXCL14 (5 µg/ml) ließ sich dieser Effekt weiter verstärken. Als Negativkontrolle diente eine Inkubation der Monozyten mit den markierten Partikeln bei 4°C.

3.2.2 Humane Monozyten migrieren zu thrombozytärem CXCL14

Für eine optimale Immunantwort müssen Immunzellen zur gerichteten Migration in der Lage sein, um an den Entzündungsort zu gelangen. Dies wird über einen Konzentrationsgradienten chemotaktisch aktiver Moleküle gesteuert. Die chemotaktischen Eigenschaften von CXCL14 konnten teilweise bereits aufgezeigt werden [107, 108, 112, 158]. Um diese Wirkung von CXCL14 zu bestätigen und um die Methode im Rahmen dieser Arbeit zu nutzen, wurden isolierte humane Monozyten einem rekombinanten CXCL14 Gradienten ausgesetzt. Zwischen Zellen und Chemokin befand sich dabei eine Membran mit definierter Porengröße (hier 5 µm), durch die Monozyten im Laufe des Experiments (4 Stunden bei 37°C) migrieren können.

Die migrierten Monozyten wurden per Durchflusszytometrie quantitativ analysiert und ein signifikanter Unterschied konnte bei CXCL14 (5 µg/ml) im Vergleich zur Negativkontrolle detektiert werden. Das Chemokin CXCL12 (1 µg/ml) diente hierbei als Positivkontrolle (Abbildung 15).

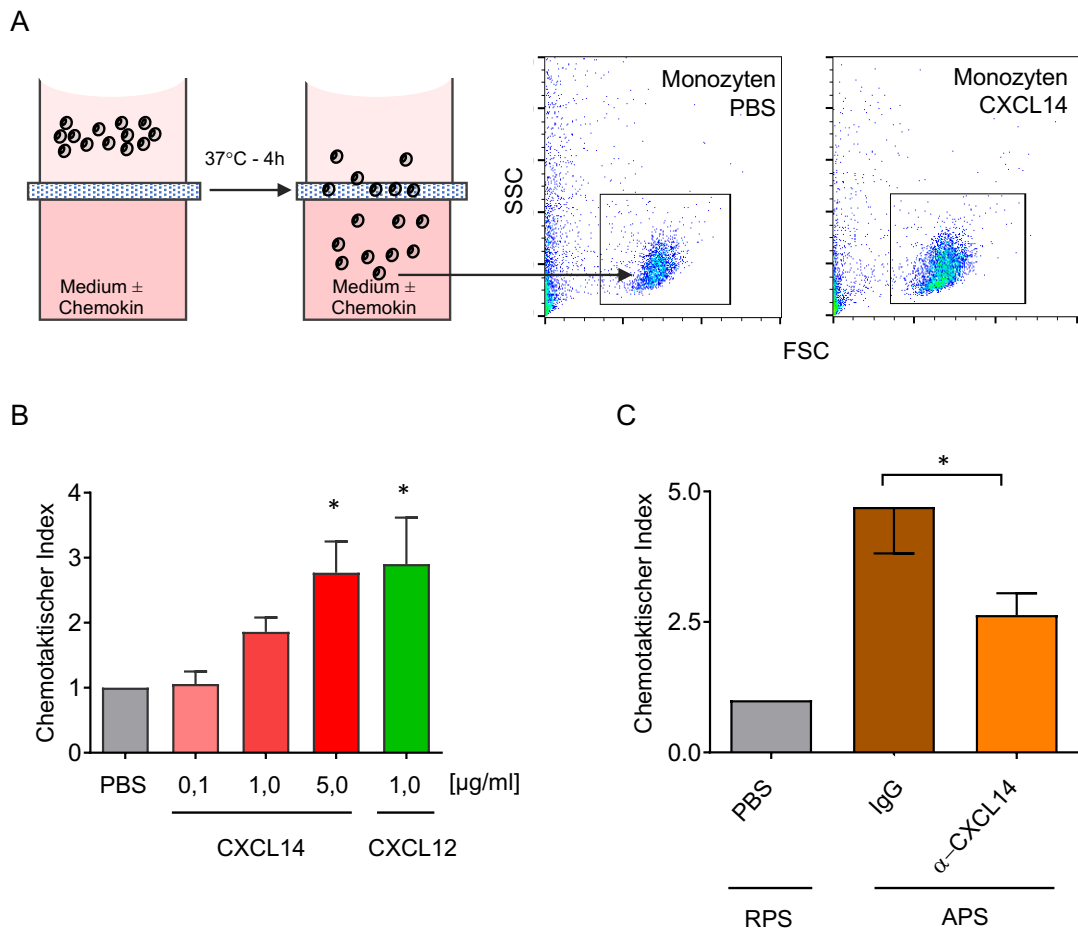


Abbildung 15. Thrombozytäres CXCL14 wirkt chemotaktisch auf Monozyten: (A) Schematischer Versuchsaufbau einer modifizierten Boyden-Kammer. Nach 4 Stunden bei 37°C sind humane Monozyten in Medium vom oberen Well durch die Membran (5 µm Porengröße) in das untere Well mit Medium und Chemokin migriert. Die Zahl der migrierten Monozyten im unteren Well wird durchflusszytometrisch quantifiziert. (B) CXCL14 zeigt einen konzentrations-abhängigen chemotaktischen Effekt auf humane Monozyten. CXCL12 dient als Positivkontrolle. Statistik: Mann Whitney U-Test; n = 5; CXCL14: PBS vs 0,1 p = ns; PBS vs 1,0 p = ns; PBS vs 5,0 p < 0,05; CXCL12 PBS vs 1,0 p < 0,05 (C) Die Inkubation von Überstand von aktivierten Thrombozyten mit neutralisierendem CXCL14 Antikörper erniedrigt die Anzahl an migrierten Monozyten signifikant im Vergleich zur IgG Kontrolle. Hier wurden Monozyten in der Membran mit May-Grünwald-Lösung gefärbt. Statistik: Mann Whitney U-Test; n = 5; APS: IgG vs α-CXCL14 p < 0,05

Um die Frage nach den chemotaktischen Eigenschaften von CXCL14 zu beantworten, welches aus Thrombozyten freigesetzt wird, wurde derselbe Versuchsaufbau gewählt. Statt rekombinantem Chemokin wurde der Überstand von ruhenden (RPS) oder von aktivierten Thrombozyten (APS) als

chemotaktisches Signal verwendet. Dabei wurde der Überstand von aktivierten Thrombozyten für 30 Minuten mit neutralisierendem Antikörper vor-inkubiert. Als Kontrolle diente IgG-behandelter Überstand sowie Überstand von ruhenden Thrombozyten als Negativkontrolle. Bei den Proben von Monozyten, die hin zu APS mit zu neutralisierendem Antikörper wanderten, konnte eine signifikante Verringerung der migrierten Monozyten detektiert werden im Vergleich zur IgG-behandelten Kontrolle. Neben einer erneuten Bestätigung dafür, dass CXCL14 nach Aktivierung freigesetzt wird, indiziert dieses Ergebnis, dass die freigesetzte Menge aus Thrombozyten CXCL14 eine funktionelle Aufgabe hat und chemotaktisch auf Monozyten wirkt und damit aktiv zu deren Migration beiträgt.

3.2.3 Thrombozytäres CXCL14 beeinflusst die murine Monozytenmigration

Zur Bestätigung der Beobachtung des chemotaktischen Effekts von thrombozytärem CXCL14 wurde ein ähnliches Experiment mit isolierten murinen Monozyten durchgeführt. Statt einer antikörperbasierten Neutralisation von thrombozytärem CXCL14 wurde hierbei der aktivierte Überstand von *cxcl14^{-/-}* Mäusen mit dem von C57Bl6/J Wildtypmäusen verglichen und auf sein migratorisches Potenzial untersucht.

Zunächst wurden die gezüchteten *cxcl14^{-/-}* Tiere phänotypisiert. Zuvor wurde von Meuter *et al.* in 2007 der Phänotyp von *cxcl14^{-/-}* Mäusen mit Wildtypmäusen verglichen ohne dabei Auffälligkeiten in der Anzahl von Leukozyten im Blut, jedoch eines Aufzucht Verlustes zu zeigen [111]. Zusätzlich dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich Gewicht, Größe und Thrombozytenzahl im Vollblut von *cxcl14^{-/-}* und WT Mäusen nicht unterschieden (Addendum - Abbildung 40).

Zur Bestätigung des CXCL14-*Knock-outs* wurde das Lysat von Thrombozyten von *cxcl14*^{-/-} Mäusen in Westernblots mit dem Lysat von Thrombozyten Wildtyp Mäusen verglichen.

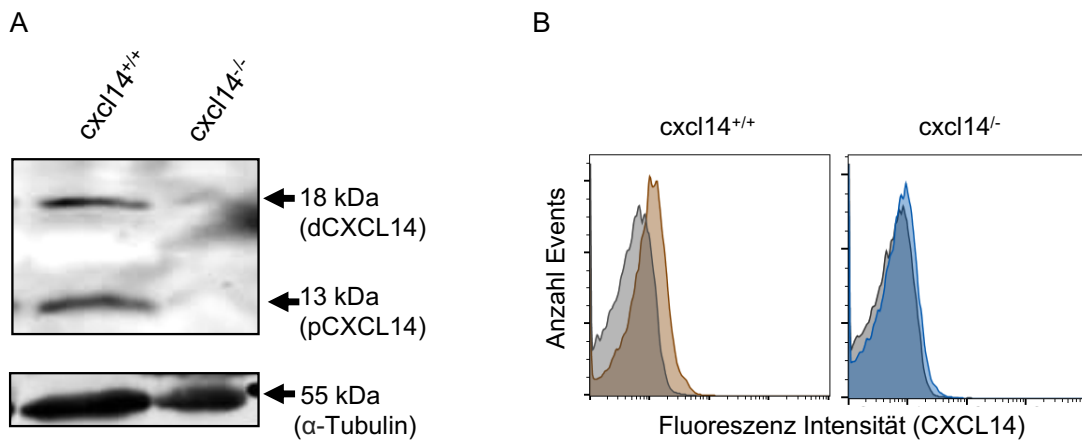


Abbildung 16. *cxcl14*^{-/-} Mäuse exprimieren kein CXCL14: (A) Western Blot Experimente mit lysierten isolierten humanen Thrombozyten zeigen kein murines thrombozytäres CXCL14 Signal bei *cxcl14*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (*cxcl14*^{+/+}) bei etwa 18 kDa (dCXCL14; *dimeric* CXCL14) und 13 kDa (pCXCL14; unreifes, *premature* CXCL14). α -Tubulin (55 kDa) dient als Ladekontrolle. Abbildungen entsprechen n = 3 unabhängigen Western Blot Experimenten. (B) Nach Aktivierung von isolierten murinen Thrombozyten mit CRP-XL (5 μ g/ml) für 30 Minuten zeigen diese keine erhöhte Oberflächenexpression von CXCL14 bei *cxcl14*^{-/-} Thrombozyten im Vergleich zu Wildtyp-Thrombozyten (*cxcl14*^{+/+}). Daten entsprechen n = 3 unabhängigen Experimenten.

Dabei konnte gezeigt werden, dass ein spezifisches CXCL14 Signal bei etwa 18 kDa (*dimeric* CXCL14; dCXCL14) und bei etwa 13 kDa (*premature* CXCL14; pCXCL14) zwar bei dem Thrombozyten-Lysat von Wildtyp Mäusen, nicht aber bei *cxcl14*^{-/-} Mäusen zu detektieren war. Als Ladekontrolle diente hier das Signal von α -Tubulin (Abbildung 16).

Auch in Durchflusszytometrie Experimenten zeigte sich die Auswirkung eines CXCL14 *Knock-outs*. Hier wurden isolierte murine Thrombozyten von Wildtyp- und *cxcl14*^{-/-} Mäusen mit CRP-XL 5 μ g/ml und anti-CXCL14 Antikörper für 30 Minuten behandelt. Im überlagerten Histogramm der CXCL14-Fluoreszenzintensität ist eine klare Verschiebung auf der X-Achse zu erkennen von nicht aktivierten hin zu aktivierten Thrombozyten der Wildtypmäuse. Diese aktivierungsabhängige Verschiebung ist beim Vergleich von nicht aktivierten und aktivierten Thrombozyten der *cxcl14*^{-/-} Maus nicht zu erkennen (Abbildung 16).

Dieses Ergebnis zeigt, dass kein CXCL14 auf der Oberfläche von isolierten *cxcl14*^{-/-} Thrombozyten bindet, was auf den CXCL14 *Knock-out* zurückzuführen ist.

Die Überstände von aktivierten und nicht aktivierten Thrombozyten von Wildtyp- und *cxcl14*^{-/-} Mäusen wurden nun auf ihr chemotaktisches Potenzial untersucht. In einem ähnlichen Versuchsaufbau wie in 3.2.2 wurden murine Monozyten in einer *Boyden*-Kammer Thrombozytenüberstand ausgesetzt.

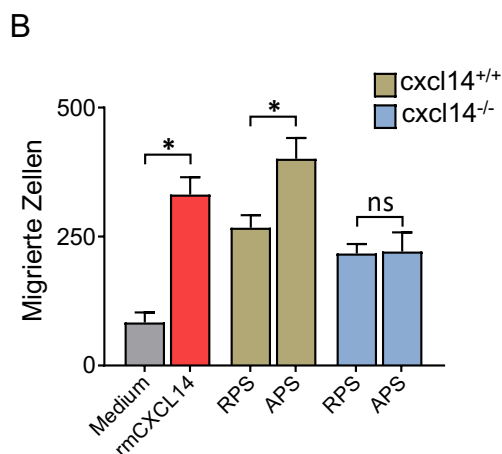
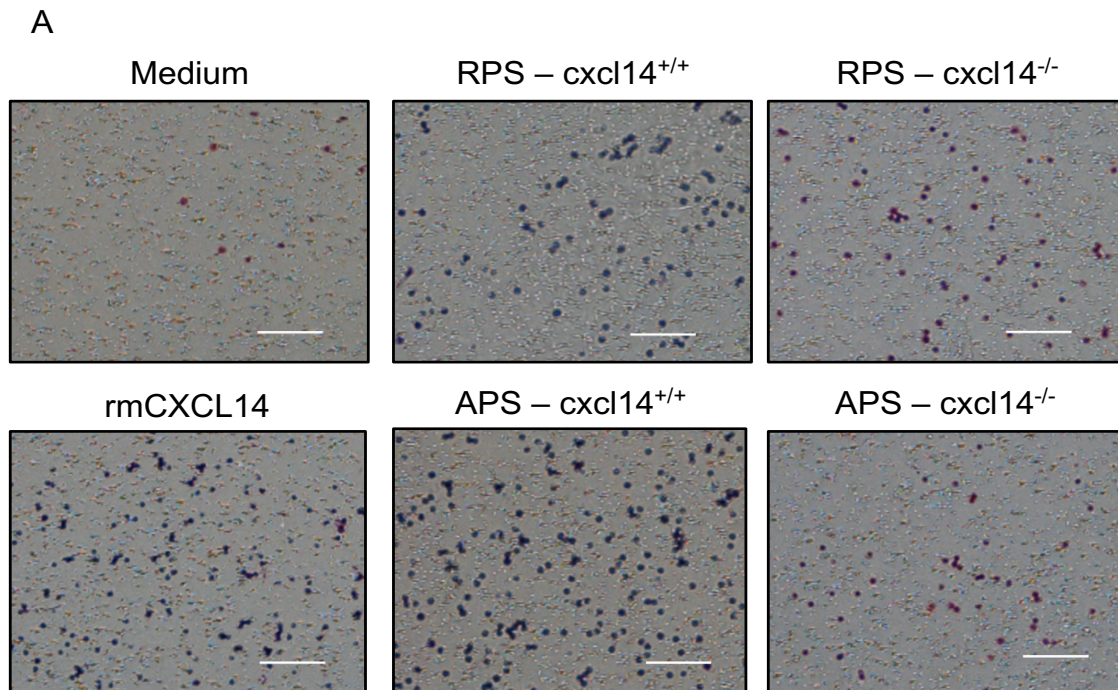


Abbildung 17. Thrombozytäres CXCL14 induziert die Migration von Monozyten: (A) Repräsentative Aufnahmen der Monozyten auf der Membran der *Boyden*-Kammer. Nach 4 Stunden bei 37°C wurde die Membran (3 µm Porengröße) mit May-Grünwaldlösung gefärbt und Monozyten wurden gezählt. Skalierungen entsprechen 10 µm (B) Quantitative Auswertung - Zum aktivierten Überstand (APS) von Wildtyp-Thrombozyten (*cxcl14*^{+/+})

migrieren signifikant mehr Monozyten als zum nicht aktivierten (RPS). Im Vergleich dazu ist kein signifikanter Unterschied zwischen RPS und APS auf die Migration von Monozyten bei *cxcl14*^{-/-}-Thrombozyten zu erkennen. Statistik: ungepaarter t-Test, n = 5: Medium vs rmCXCL14 p < 0,05; *cxcl14*^{+/+}: RPS vs. APS p < 0,05; *cxcl14*^{-/-}: p = ns

Hier konnte gezeigt werden, dass signifikant mehr Monozyten zu aktiviertem Überstand von cxcl14^{+/+} Thrombozyten wanderten im Vergleich zu nicht aktivierten cxcl14^{+/+} Thrombozyten Überstand. In Kontrast dazu wurde kein signifikanter Unterschied in der Migration von Monozyten hin zu den aktivierten und nicht aktivierten Überständen von cxcl14^{-/-} Thrombozyten beobachtet. Als Negativkontrolle diente eine Pufferprobe und als Positivkontrolle diente rekombinantes murines CXCL14 (1 µg/ml) (Abbildung 17). Diese Ergebnisse bestätigen den zuvor beobachteten chemotaktischen Effekt von thrombozytärem CXCL14 und indizieren damit einen pro-inflammatorischen Effekt von thrombozytärem CXCL14.

3.2.4 Thrombozytäres CXCL14 inhibiert Endothelzellproliferation

Ein wichtiger Aspekt für Entzündungsprozesse ist die Integrität der Endothelzellschicht. Hierbei muss die Zellschicht durchlässig für Immunzellen sein, um deren Auswanderung aus Gefäßen hin zu einem Entzündungsort im umliegenden Gewebe zu garantieren. Gleichzeitig stellt eine beschädigte Endothelschicht innerhalb eines Gefäßes selbst einen Startpunkt einer Thrombusbildung und von Inflammationsprozessen dar. Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von CXCL14 auf inflammatorische Prozesse wurden daher Wundheilungs-Experimente (*Scratch-Assays*) durchgeführt. Auch hier wurde zunächst ein bekannter inhibitorischer Effekt von CXCL14 auf das Zusammenwachsen einer Endothelzellschicht bestätigt [112]. Dafür wurde eine konfluente Zellschicht von humanen Endothelzellen (HUVECs) mit einer Pipetten Spitze beschädigt. Nach angegebenen Zeitpunkten wurden mikroskopische Aufnahmen angefertigt und der unbewachsene Bereich wurde quantifiziert und zur Anfangsgröße relativiert. Dabei konnte ein signifikant verschlechtertes Zusammenwachsen der Endothelschicht nach Gabe von rekombinantem CXCL14 im Vergleich zu Kontrolle oder zu CXCL12 Gabe detektiert werden (Abbildung 18).

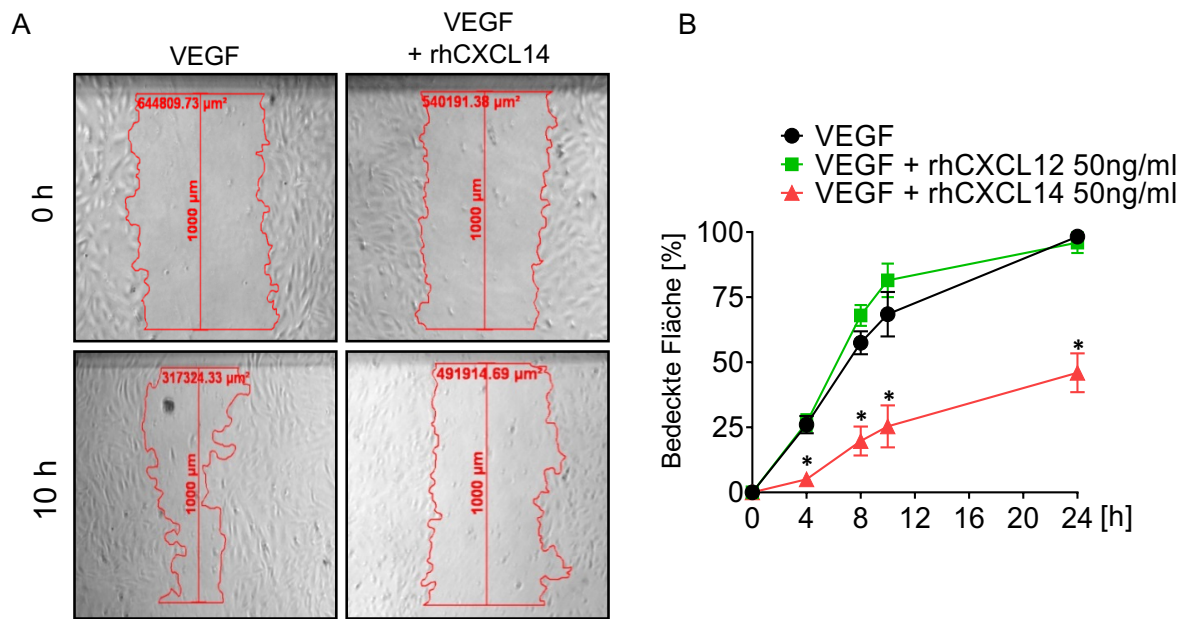


Abbildung 18. Rekombinantes CXCL14 inhibiert Wachstum von Endothelzellen: (A) Mikroskopische Aufnahmen der Endothelzellen, inkubiert bei 37°C mit VEGF- (10 ng/ml) und mit VEGF/rekombinatem humanem CXCL14- (rhCXCL14 50 ng/ml) versetzten Medium zeigen einen Unterschied im Schließen einer definierten unbewachsenen Oberfläche (Wunde) nach 10 Stunden. (B) Quantitative Auswertung des Wundverschlusses - Der Vergleich der unbewachsenen Flächen ergibt bereits nach 4 Stunden einen signifikanten Unterschied für CXCL14 behandelte HUVECs. Als Positivkontrolle dient Medium mit rekombinatem CXCL12 (50 ng/ml) und VEGF. Statistik: einfache Varianzanalyse; n = 3; VEGF + rhCXCL14 vs VEGF + rhCXCL12: 4 h: $p < 0,05$; 8 h: $p < 0,05$; 10 h: $p < 0,05$; 24 h: $p < 0,05$

Um diesen Effekt auch für thrombozytäres CXCL14 zu untersuchen, wurden die Endothelzellschicht nach Beschädigung mit Überstand von humanen Thrombozyten inkubiert. Wurden die Überstände von aktivierten Thrombozyten zuvor mit einem neutralisierenden CXCL14 Antikörper versetzt, war ein signifikant verbessertes Zusammenwachsen zu beobachten im Vergleich zu IgG versetztem aktivierten Überstand. Der Überstand von nicht aktivierten Thrombozyten diente als Kontrolle (Abbildung 19).

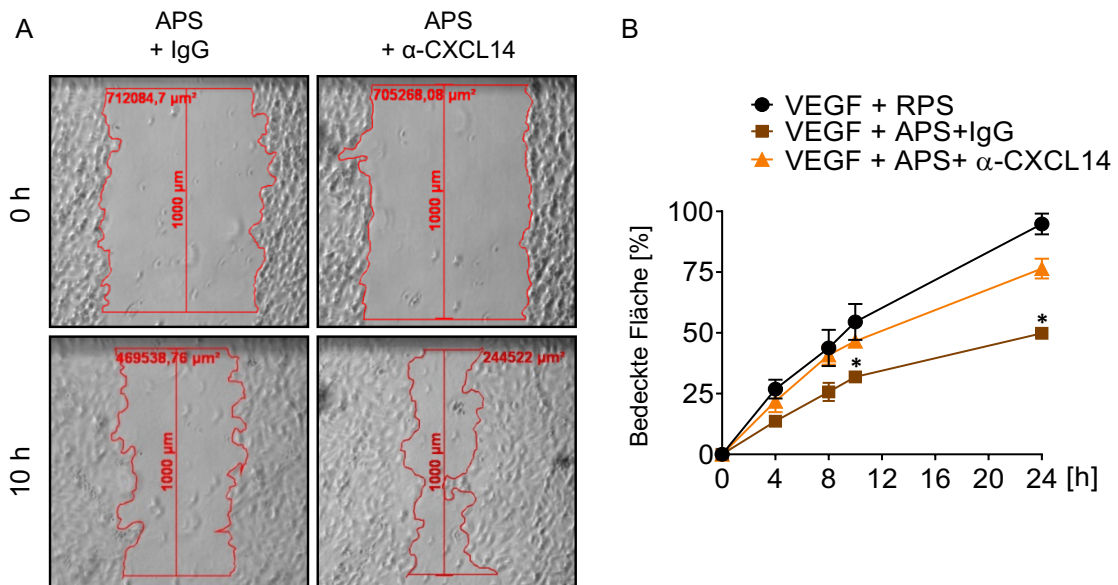


Abbildung 19. Thrombozytäres CXCL14 inhibiert Wachstum von Endothelzellen:

(A) Mikroskopische Aufnahmen der Endothelzellen, inkubiert bei 37°C mit mit aktivierten Thrombozytenüberstand (APS) versetztem Medium zeigen nach 10 Stunden einen Unterschied im Schließen einer definierten unbewachsenen Oberfläche (Wunde). Hierbei sind die Überstände mit neutralisierendem CXCL14 Antikörper oder entsprechender IgG Kontrolle vorinkubiert worden. (B) Quantitative Auswertung – Nach 10 Stunden und 24 Stunden ist ein signifikant verlangsamtes Bewachsen der zellfreien Oberfläche bei aktiviertem Thrombozytenüberstand zu erkennen im Vergleich zur IgG Kontrolle oder ruhendem Thrombozytenüberstand (RPS). Dieser Effekt wird durch die Inkubation mit neutralisierendem CXCL14 Antikörper aufgehoben. Statistik: einfache Varianzanalyse; n = 3; VEGF + APS + IgG vs VEGF + APS + $\alpha\text{-CXCL14}$: 4 h: p = ns; 8 h: p = ns; 10 h: p < 0,05; 24 h: p < 0,05

Dieses Ergebnis legt eine inhibitorische Funktion auf die Migration oder die Proliferation von Endothelzellen durch thrombozytäres CXCL14 nahe und bestätigt damit einen weiteren Beitrag von CXCL14 zur Inflammation im Rahmen von Gefäßverletzungen.

3.2.5 Thrombozyten werden nicht durch CXCL14 aktiviert

Chemokine können neben ihren klassischen Eigenschaften wie Vermittlung der Zellmigration auch im Rahmen einer autokrinen Schleife zur Aktivierung von Thrombozyten beitragen [45]. Um zu untersuchen, ob CXCL14 direkt in die Aktivierung Thrombozyten eingreift, wurden durchflusszytometrische Experimente durchgeführt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass es nach Inkubation von isolierten humanen Thrombozyten mit rekombinantem CXCL14 zu keiner erhöhten CD62P-Expression oder PAC-1 Bindung (aktiviertes Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) auf der Thrombozyten Oberfläche kommt.

Sowohl nach verschiedenen Inkubationszeiten (10, 30, 60 Minuten), als auch bei unterschiedlichen Konzentrationen von CXCL14 (0,1; 1,0; 5,0 $\mu\text{g/ml}$) wurde kein Anstieg der Aktivierungsmarker für Thrombozyten beobachtet (Abbildung 20 A). Als Positivkontrolle diente die Inkubation der Thrombozyten mit CRP-XL (1 $\mu\text{g/ml}$).

Auch eine synergistische Aktivierung, wie sie für CXCL12 und aktivierende Agonisten beschrieben ist, wurde untersucht. Nach einer Ko-Inkubation von Thrombozyten mit rekombinantem CXCL14 (1 $\mu\text{g/ml}$) und einem aktivierenden Agonisten für 30 Minuten war kein Unterschied in der Expression der Aktivierungsmarker CD62P und aktiviertem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (PAC-1 Bindung) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle zu detektieren (Abbildung 20 B).

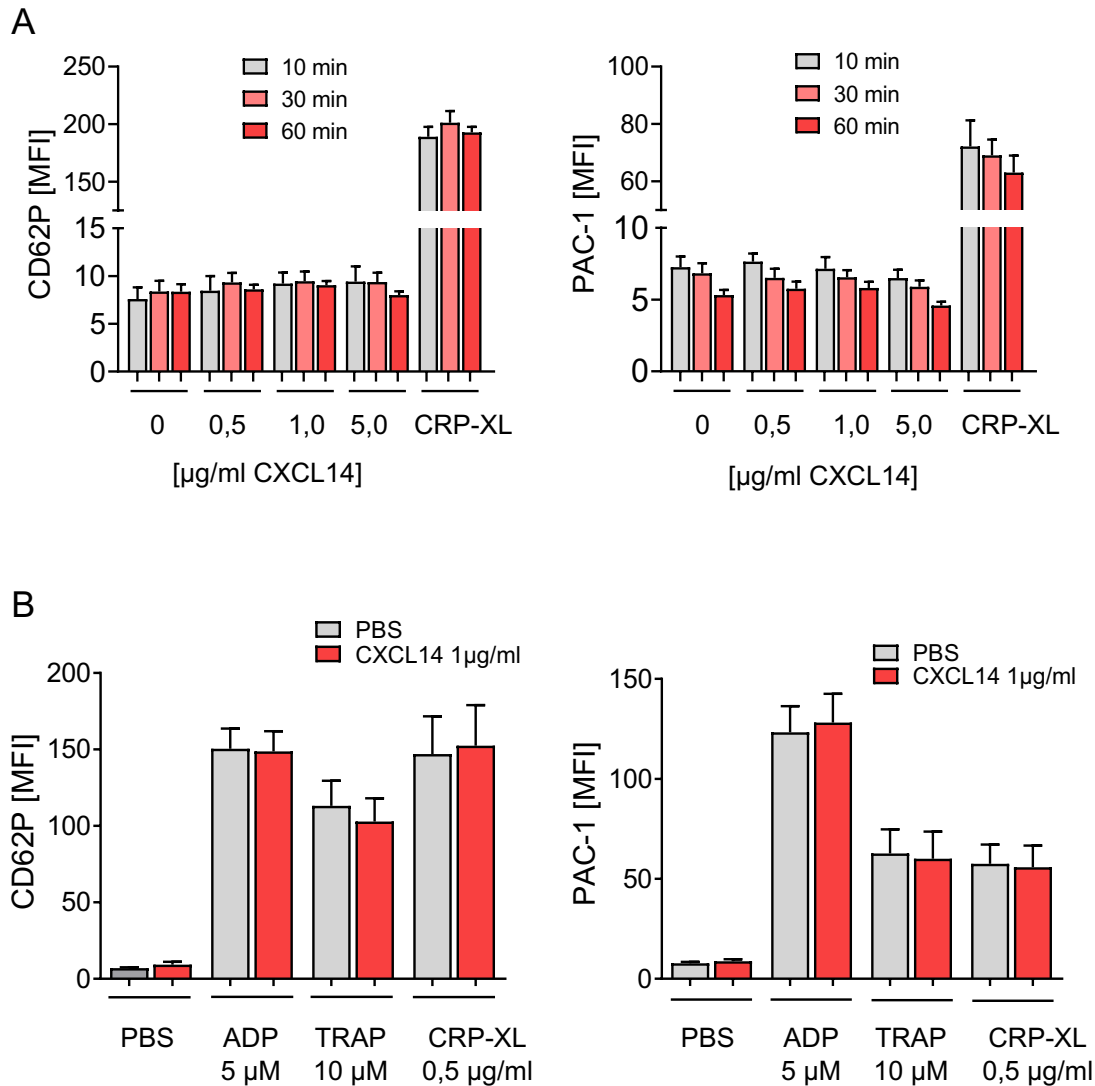


Abbildung 20. Rekombinantes CXCL14 hat keinen Effekt auf die Aktivierung von Thrombozyten: (A) Durchflusszytometrische Experimente mit isolierten humanen Thrombozyten zeigen keine Veränderung des Fluoreszenz Signals (*Mean fluorescence intensity*; MFI) der Aktivierungsmarker CD62P oder Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (PAC-1 Bindung) durch die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen über unterschiedliche Zeitpunkte im Vergleich zu ruhenden Thrombozyten. Die Inkubation mit CRP-XL (1 $\mu\text{g/ml}$) diente als Positivkontrolle der Thrombozyten Aktivierung. Daten entsprechen $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ von ≥ 3 unabhängigen Experimenten. (B) Die Ko-Inkubation von rekombinantes CXCL14 zusammen mit aktivierenden Agonisten (ADP 5 μM , TRAP 10 μM , CRP-XL 0,5 $\mu\text{g/ml}$) zeigt keinen signifikanten Effekt auf das Fluoreszenz Signal der Aktivierungsmarker CD62P oder Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (PAC-1 Bindung) im Vergleich zur PBS-Puffer Kontrolle. Statistik: (A) einfache Varianzanalyse; (B) ungepaarter t-Test; für alle $n \geq 3$: für alle $p = \text{ns}$.

3.2.6 Die α -Degranulation von *cxcl14*^{-/-} Thrombozyten ist vermindert

Um autokrine Auswirkungen von CXCL14 auf Thrombozyten zu untersuchen, wurden murine Thrombozyten von *cxcl14*^{-/-} Mäusen in ihrer Aktivierbarkeit mit Thrombozyten von *cxcl14*^{+/+} Mäusen verglichen.

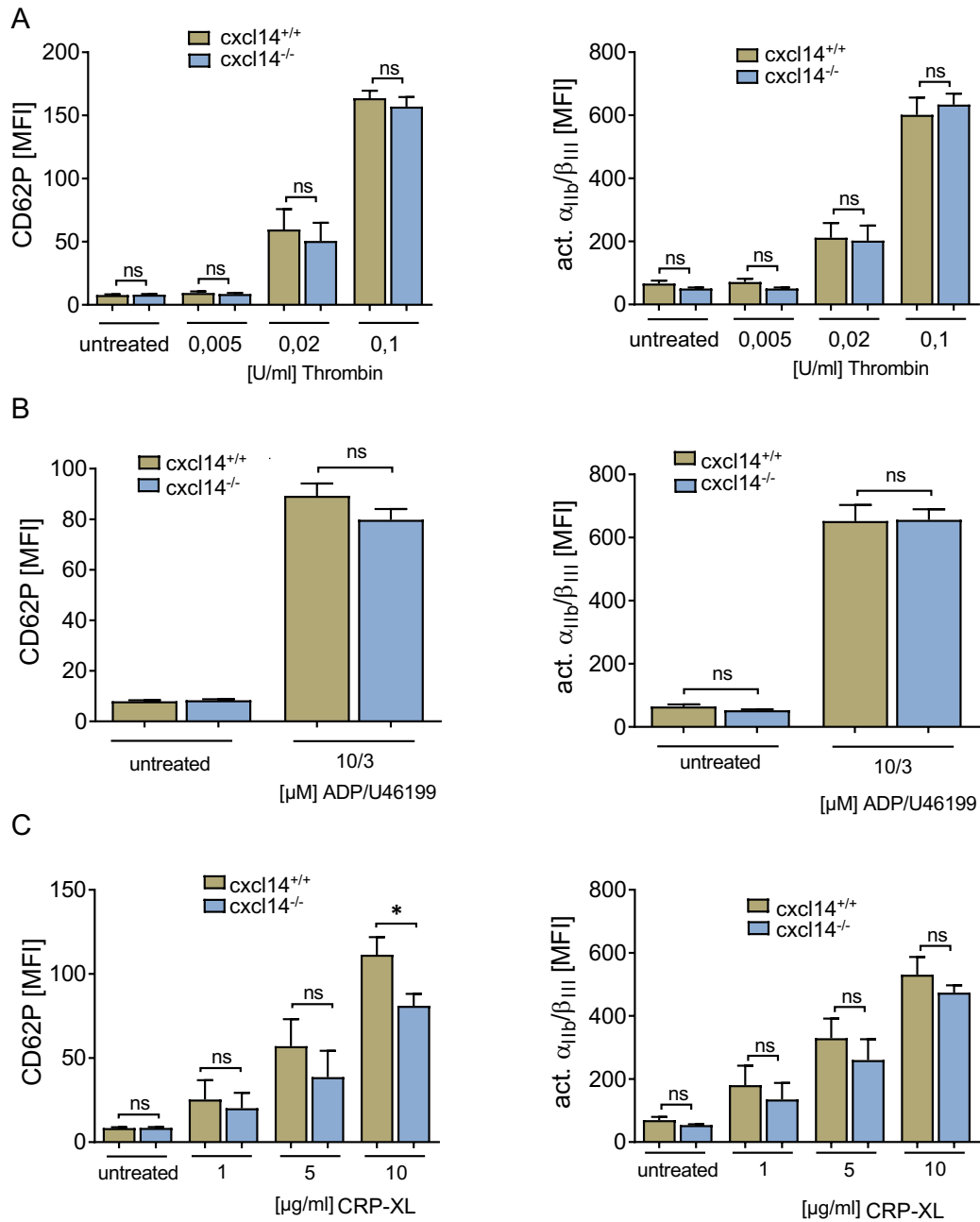


Abbildung 21. cxcl14^{-/-} Thrombozyten zeigen Unterschiede in der Aktivierung verglichen zum Wildtyp: Quantitative Analyse von durchflusszytometrischen Experimenten mit isolierten cxcl14^{-/-} Thrombozyten zeigen keinen Unterschied in der Expression von CD62P oder Integrin α_{IIb}/β_3 (PAC-1 Bindung) im Vergleich zu Wildtyp Thrombozyten nach Aktivierung mit verschiedenen Konzentrationen von Thrombin (0,005; 0,02; 0,1 U/ml) (**A**) oder ADP/U46199 (10/3 μ M) (**B**) für je 30 Minuten. (**C**) Quantitative Analyse von durchflusszytometrischen Experimenten mit isolierten cxcl14^{-/-} Thrombozyten zeigen eine signifikant verminderte Expression von CD62P im Vergleich zu Wildtyp Thrombozyten nach Aktivierung mit CRP-XL (10 μ g/ml) für 30 Minuten. Statistik: (A, B) ungepaarter t-Test - cxcl14^{+/+} vs. cxcl14^{-/-}; für alle $n \geq 5$: für alle $p = ns$. (C) ungepaarter t-Test; $n \geq 5$: cxcl14^{+/+} vs. cxcl14^{-/-} CRP-XL 10 μ g/ml: $p < 0,05$.

Die Bestimmung der Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern auf Thrombozyten war auch für die Phänotypisierung der cxcl14^{-/-} Mäuse ein wichtiger Parameter. Die Expression von aktiviertem Integrin α_{IIb}/β_3 (JONA-Bindung) auf cxcl14^{-/-} Thrombozyten unterschied sich bei unterschiedlichen Konzentrationen von CRP-XL nicht zu der von cxcl14^{+/+} Thrombozyten.

Auch die CD62P-Expression und damit die Degranulation von α -Granula nach Thrombin Gabe (0,005; 0,02; 0,1 U/ml) sowie nach ADP (10 μ M) zusammen mit dem Thromboxan-Analogon U46119 (3 μ M) unterschied sich bei cxcl14^{-/-} Thrombozyten nicht von der von cxcl14^{+/+} Thrombozyten. Ebenfalls kein signifikanter Unterschied wurde bei der aktiviertem Integrin α_{IIb}/β_3 (JONA-Bindung) Expression auf Thrombozyten unter Stimulation mit den jeweiligen Agonisten detektiert (Abbildung 21).

Nach Inkubation mit CRP-XL (10 μ g/ml) war hingegen eine signifikant niedrigere CD62P-Expression und damit der Degranulation von α -Granula in cxcl14^{-/-} Thrombozyten zu detektieren.

3.2.7 CXCL14 zeigt keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation

Um zu untersuchen, ob sich der beobachtete Unterschied in der Oberflächenexpression von thrombozytären Aktivierungsmarkern eines CXCL14 *Knock-outs* auch funktionell auf die Thrombozyten Funktion auswirkt, wurde der Einfluss des CXCL14 *Knock-outs* bei verschiedenen *in vitro* Thrombozyten-Funktionsanalysen gemessen.

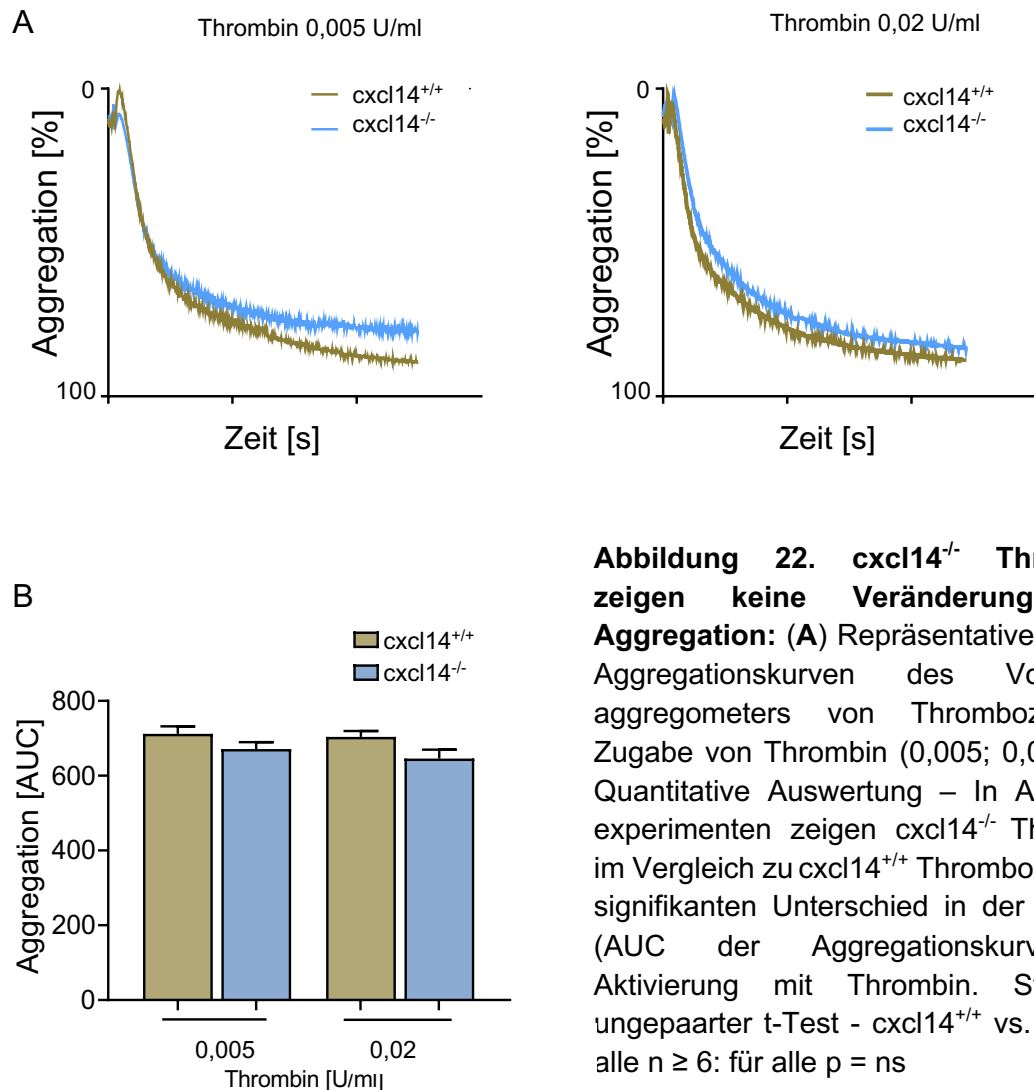


Abbildung 22. cxcl14^{-/-} Thrombozyten zeigen keine Veränderung in der Aggregation: (A) Repräsentative 10-minütige Aggregationskurven des Vollblutluminaggregometers von Thrombozyten nach Zugabe von Thrombin (0,005; 0,02 U/ml). (B) Quantitative Auswertung – In Aggregationsexperimenten zeigen cxcl14^{-/-} Thrombozyten im Vergleich zu cxcl14^{+/+} Thrombozyten keinen signifikanten Unterschied in der Aggregation (AUC der Aggregationskurven) nach Aktivierung mit Thrombin. Statistik: (B) ungepaarter t-Test - cxcl14^{+/+} vs. cxcl14^{-/-}; für alle n ≥ 6: für alle p = ns

Hier konnte bei aggregometrischen Messungen kein signifikanter Unterschied in der der Aggregation von Thrombozyten von cxcl14^{-/-} und cxcl14^{+/+} Mäusen nach Stimulation mit Thrombin (0,005; 0,02 U/ml) detektiert werden.

3.2.8 *cxcl14*^{-/-} Thrombozyten zeigen eine verminderte flächenhafte Ausbreitung

Eine wichtige Funktion von Thrombozyten nach Aktivierung ist die flächenhafte Ausbreitung, um eine Gefäßverletzung abzudecken oder eine blutende Wunde zu verschließen. Bei Oberflächenmarkern, die im Rahmen des *Spreading*-Vorgangs wichtig sind, wie aktiviertem Integrin α_{IIb}/β_3 (JONA-Bindung) und bei der Aggregation von Thrombozyten war im Rahmen dieser Arbeit kein Unterschied zwischen *cxcl14*^{-/-}- und *cxcl14*^{+/+} Thrombozyten zu messen. Jedoch unterschieden diese sich in der funktionellen Analyse der flächenhaften Ausbreitung in *Spreading*-Experimenten.

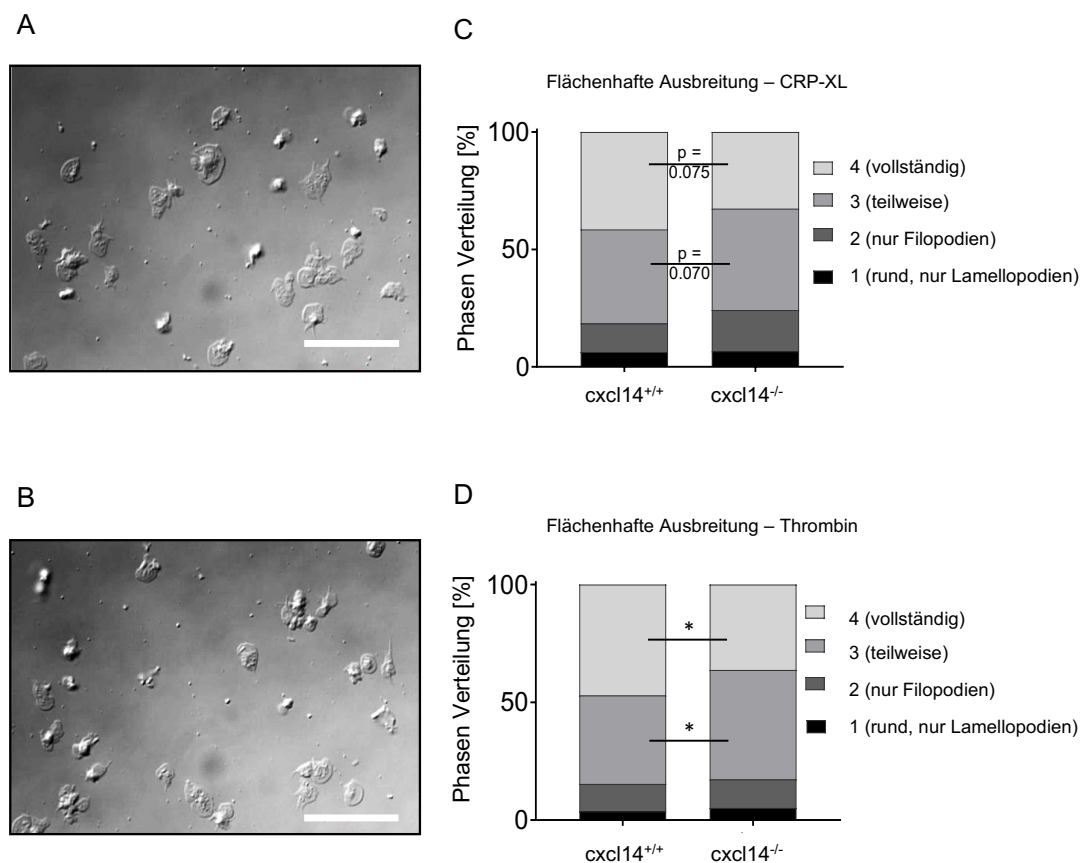


Abbildung 23. Das *Spreading* von *cxcl14*^{-/-} Thrombozyten ist vermindert: Isolierte Thrombozyten von *cxcl14*^{-/-} und *cxcl14*^{+/+} Mäusen adhären und breiten sich flächenhaft auf einer Fibrinogen-beschichteten (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Oberfläche aus. Repräsentative Differentialinterferenzkontrast-Aufnahmen (DIC) nach 30 Minuten sind von $n \geq 4$ unabhängigen Experimenten gezeigt von *cxcl14*^{+/+} (A) und *cxcl14*^{-/-} Thrombozyten (B) nach Aktivierung mit Thrombin. Die Skalierung entspricht 20 μm .

Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen vier Aktivierungseinteilungen (1 – rund, nur Lamellopodien; 2 – nur Filopodien; 3 – partielles flächenhaftes Ausbreiten; 4 – vollständiges flächenhaftes Ausbreiten) nach Aktivierung mit CRP-XL zu beobachten. Die statistische Auswertung der vier Aktivierungseinteilungen von $cxcl14^{-/-}$ und $cxcl14^{+/+}$ Thrombozyten zeigt eine signifikante Verminderung in der flächenhaften Ausbreitung nach Aktivierung mit Thrombin (**D**) nicht so bei Aktivierung mit (**C**). Statistik: ungepaarter t-Test; $n \geq 4$; $cxcl14^{+/+}$ vs. $cxcl14^{-/-}$ CRP-XL – Phase 1-4 $p = ns$; Thrombin – Phase 1 $p > ,05$; Phase 2 $p = ns$; Phase 3 $p < 0,05$; Phase 4 $p < 0,01$

Nach Stimulation mit Thrombin (0,01 U/ml) für 30 Minuten kam es zum *Spreading* von Thrombozyten, wobei diese Pseudopodien und Filopodien ausbilden und so an der Fibrinogen-beschichteten Oberfläche haften und sich ausbreiten.

Bei Thrombozyten von $cxcl14^{-/-}$ Mäusen war eine signifikant verringerte Zahl an komplett ausgebreiteten Thrombozyten (vollständiges flächenhaftes Ausbreiten, Phase 4) im Vergleich zu Thrombozyten von $cxcl14^{+/+}$ Mäusen zu beobachten. Auch die Zahl an noch nicht komplett ausgebreiteten Thrombozyten (partielles flächenhaftes Ausbreiten, Phase 3) war bei $cxcl14^{-/-}$ Thrombozyten nach Thrombin Stimulation signifikant verringert im Vergleich zu $cxcl14^{+/+}$ Thrombozyten. Dieses Ergebnis zeigt, dass CXCL14 eine Wirkung auf eine der wichtigsten Thrombozyten Funktionen ausübt und macht eine weitere Untersuchung auf funktioneller Ebene nötig.

3.2.9 Die *in-vitro* Thrombusbildung von *cxcl14*^{-/-} Mäusen ist vermindert

Um eben diese Beteiligung von CXCL14 an den essentiellen Funktionen wie der Thrombusbildung zu untersuchen, wurden in Perfusionsexperimenten das Blut von Wildtyp- mit dem von *cxcl14*^{-/-} Mäusen verglichen.

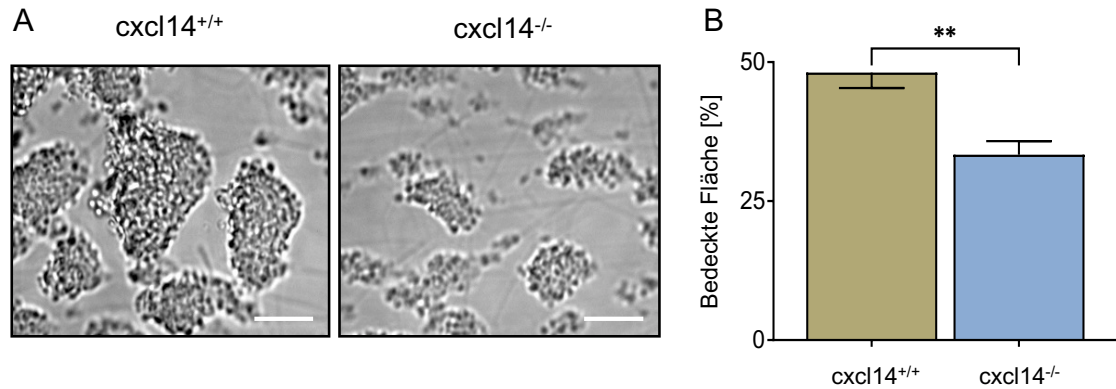


Abbildung 24. Die Thrombusformation *in vitro* ist bei *cxcl14*^{-/-} Mäusen verringert: (A) Vollblut von *cxcl14*^{+/+} und *cxcl14*^{-/-} Mäusen wurde für 15 Minuten über eine Kollagenbeschichtete Oberfläche (100 µg/ml) bei einer Scherrate von 1000 /s perfundiert. Repräsentative Phase Kontrast Aufnahmen von n = 6 unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Die Skalierung entspricht 20 µm. (B) Quantitative Auswertung – Der Anteil der mit Thromben bedeckte Fläche an Gesamtfläche ist bei *cxcl14*^{-/-} Vollblut signifikant geringer als bei Vollblut von Wildtyp-Mäusen. Statistik: ungepaarter t-Test; n = 6; *cxcl14*^{+/+} vs. *cxcl14*^{-/-} p < 0,01

Bei einer Scherrate von 1000 /s wurde 1 ml Blut über eine mit immobilisiertem Kollagen beschichtete Oberfläche perfundiert, die Fläche der gebildeten Thromben wurde analysiert und zur Gesamtfläche in Relation gesetzt. Hierbei wurde eine signifikant verringerte Thromben Fläche mit dem Blut von *cxcl14*^{-/-} Mäusen gemessen im Vergleich zum Blut von *cxcl14*^{+/+} Mäusen (Abbildung 24).

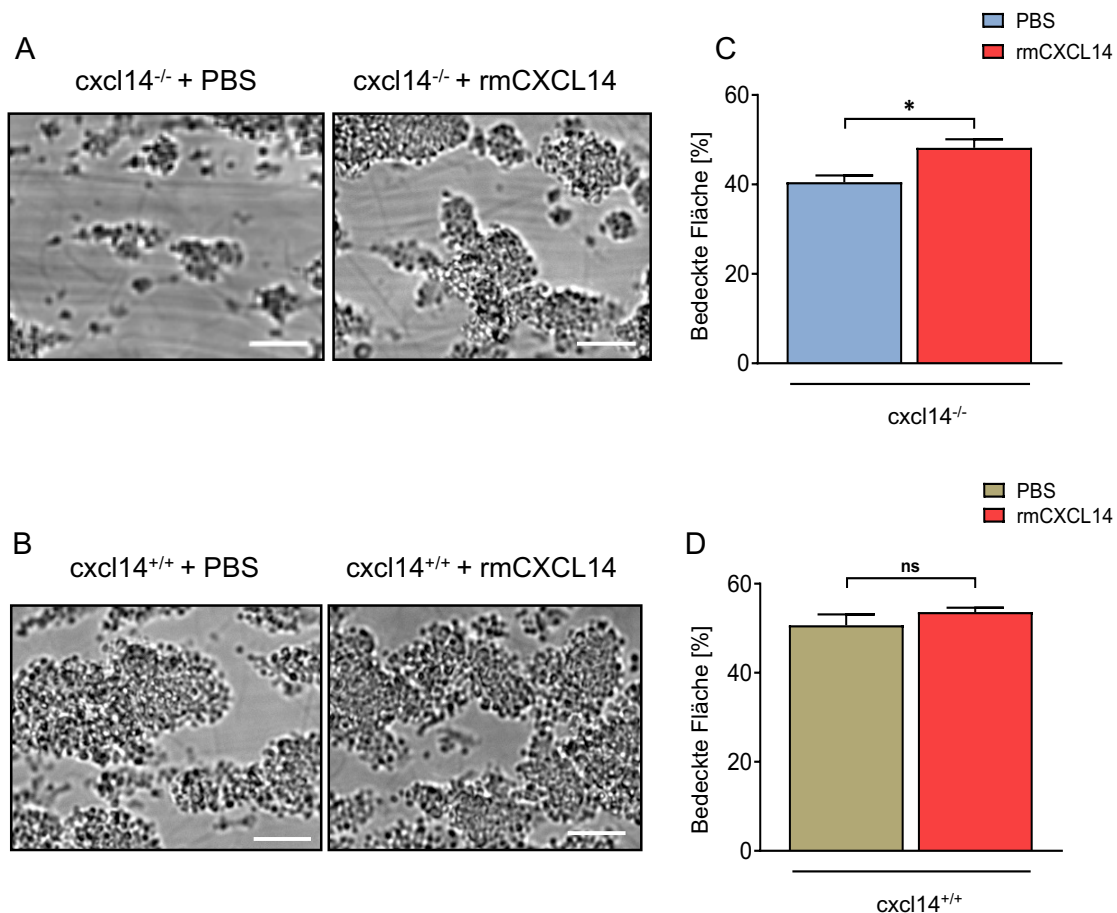


Abbildung 25. Inkubation mit CXCL14 reguliert die *in vitro* Thrombusformation: Vollblut von cxcl14^{+/+} (A) und cxcl14^{-/-} Mäusen (B) wurde nach Vorinkubation mit PBS oder rekombinatem murinem CXCL14 (rmCXCL14; 1 µg/ml) für 15 Minuten über eine Kollagen-beschichtete Oberfläche (100 µg/ml) bei einer Scherrate von 1000 /s perfundiert. Repräsentative Phase Kontrast Aufnahmen von n = 6 unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Die Skalierung entspricht 20 µm. (C) Quantitative Auswertung – Der Anteil der mit Thromben bedeckte Fläche an Gesamtfläche ist bei cxcl14^{-/-} Vollblut signifikant erhöht nach Inkubation mit rmCXCL14 im Vergleich zur PBS Inkubation Statistik: ungepaarter t-Test; n ≥ 3; cxcl14^{-/-} vs. cxcl14^{-/-} + rmCXCL14 p < 0,05 (D). Quantitative Auswertung – Der Anteil der mit Thromben bedeckte Fläche an Gesamtfläche ist bei cxcl14^{+/+} Vollblut nicht verändert nach Inkubation mit rmCXCL14 im Vergleich zur PBS Inkubation. Statistik: ungepaarter t-Test; n ≥ 3; cxcl14^{+/+} vs. cxcl14^{+/+} + rmCXCL14 p = ns

Durch die Prä-Inkubation des Blutes von cxcl14^{-/-} Tieren mit rekombinatem murinem CXCL14 (1 µg/ml) für 30 min konnte dieser Effekt aufgehoben werden, was indiziert, dass CXCL14 direkt an der Thrombusbildung unter Flussbedingungen involviert ist. Im Gegensatz dazu hat die Inkubation von CXCL14 exprimierenden Tieren mit rekombinatem CXCL14 keinen Effekt auf die Thrombusbildung (Abbildung 25).

3.2.10 *cxcl14*^{-/-} Thrombozyten setzen geringere Mengen ATP frei

Ein autokriner Aktivator von Thrombozyten, der einen Einfluss auf die Thrombusbildung haben kann, ist ADP. Da ADP wie auch ATP in Thrombozyten in δ -Granula gespeichert wird, kann die messbare Freisetzung von ATP indirekt Hinweise auf die Degranulation von δ -Granula und damit auf die Freisetzung von ADP geben. Daher wurde die Freisetzung von ATP aus isolierten murinen Thrombozyten per *Luciferase Assay* gemessen, um einen möglichen Grund der verminderten Thrombusbildung in *cxcl14*^{-/-} Blut zu untersuchen.

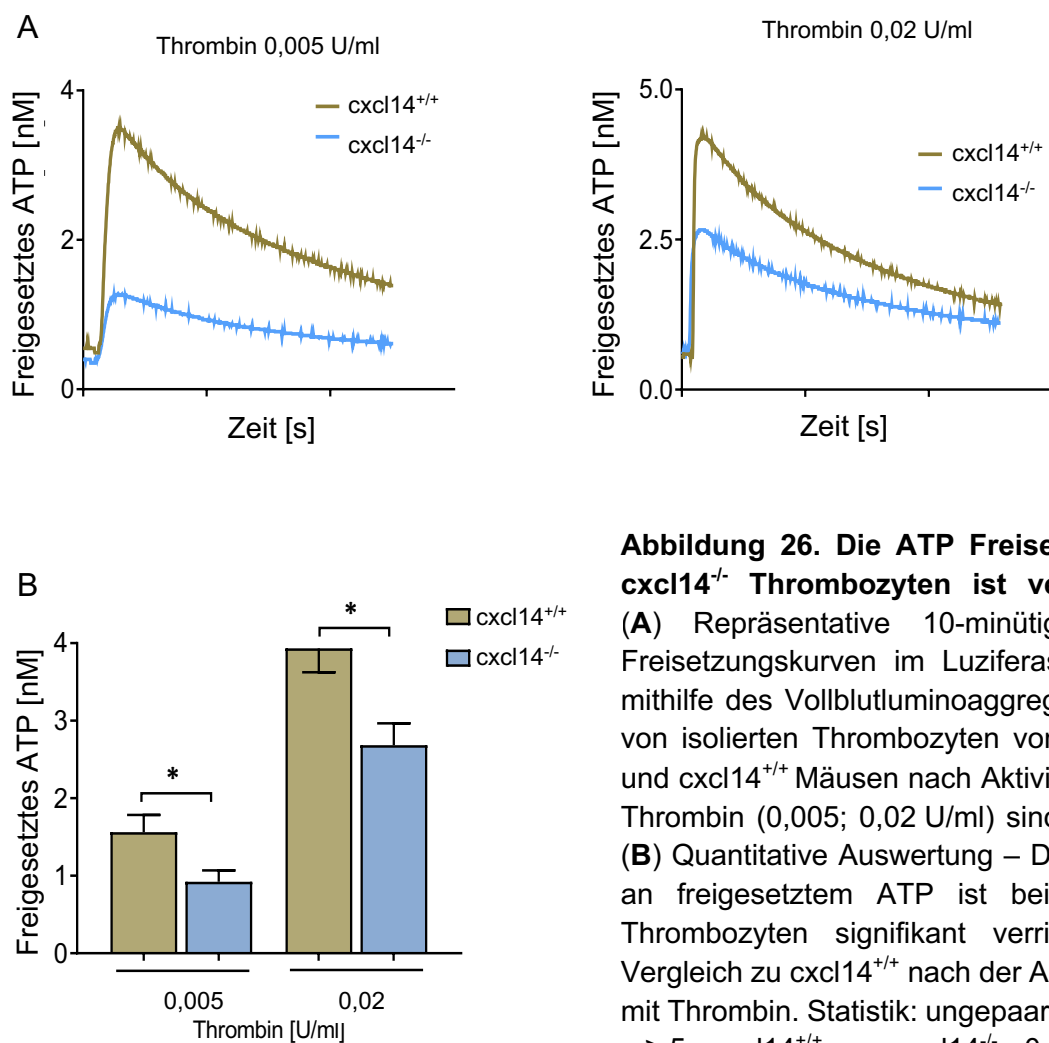


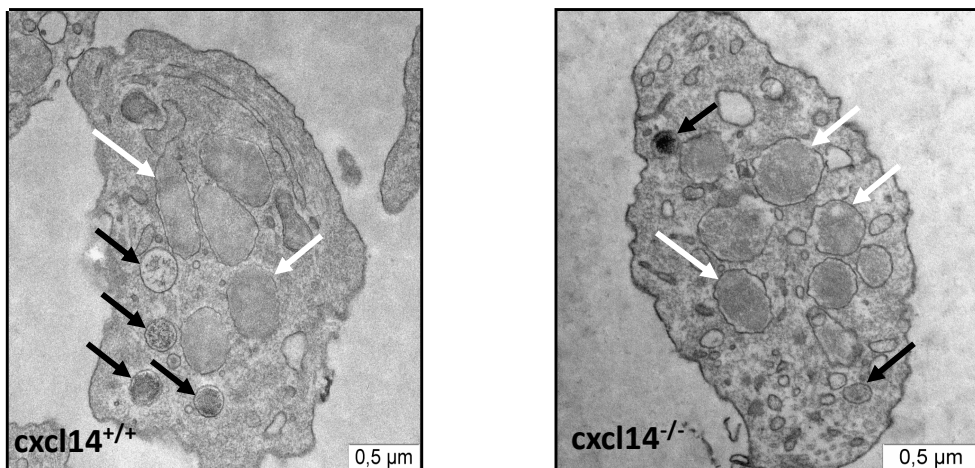
Abbildung 26. Die ATP Freisetzung in *cxcl14*^{-/-} Thrombozyten ist verringert: (A) Repräsentative 10-minütige ATP-Freisetzungskurven im Luciferase Assay mithilfe des Vollblutluminoaggregometers von isolierten Thrombozyten von *cxcl14*^{-/-} und *cxcl14*^{+/+} Mäusen nach Aktivierung mit Thrombin (0,005; 0,02 U/ml) sind gezeigt. (B) Quantitative Auswertung – Die Menge an freigesetztem ATP ist bei *cxcl14*^{-/-} Thrombozyten signifikant verringert im Vergleich zu *cxcl14*^{+/+} nach der Aktivierung mit Thrombin. Statistik: ungepaarter t-Test; n ≥ 5; *cxcl14*^{+/+} vs. *cxcl14*^{-/-}; 0,005 U/ml: p < 0,05; 0,02 U/ml: p < 0,05

Nach Stimulation von *cxcl14^{-/-}* Thrombozyten mit Thrombin (0,005; 0,02 U/ml) wurde über 10 Minuten eine signifikant geringere Menge an freigesetztem ATP im Vergleich zu *cxcl14^{+/+}* Thrombozyten gemessen (Abbildung 26). Eine geringere Freisetzung von ATP spricht für einer geringere Freisetzung von Thrombozyten aktivierendem ADP auf Thrombozyten und kann ein Grund für die verringerte Thrombusbildung in *cxcl14^{-/-}* Blut sein. Ob die verringerte Freisetzung an einer verringerten Anzahl an δ -Granula in den *cxcl14^{-/-}* Thrombozyten oder an einer verminderten Funktionalität liegt, sollte im Folgenden mithilfe der Transmission-Elektronenmikroskopie untersucht werden.

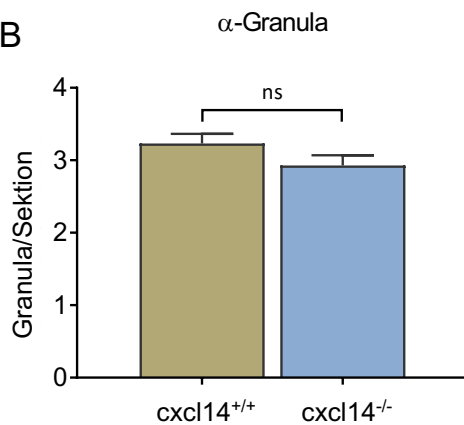
3.2.11 *cxcl14^{-/-}* Thrombozyten enthalten weniger δ -Granula

Um einen möglichen Grund für eine geringere ATP Freisetzung zu untersuchen, wurden Transmission-Elektronenmikroskopie Aufnahmen von Thrombozyten von *cxcl14^{-/-}* und von *cxcl14^{+/+}* Mäusen mithilfe von Birgit Fehrenbacher unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Schaller an der Universitäts-Hautklinik Tübingen angefertigt. Ziel war es, die die α -Granula und die ATP speichernden δ -Granula zu quantifizieren. Insgesamt 126 Thrombozyten von je fünf Mäusen pro Gruppe wurden auf ihre Anzahl an α -Granula und δ -Granula untersucht [159].

A



B



C

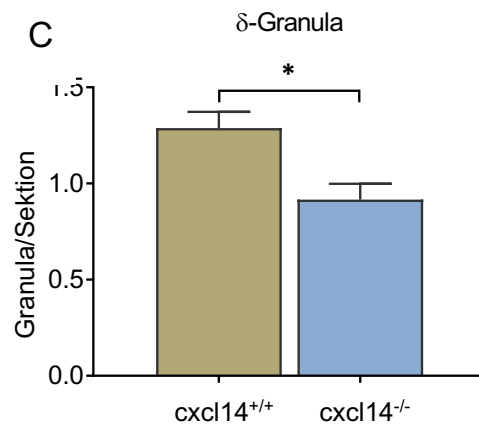


Abbildung 27. *cxcl14*^{-/-} Thrombozyten enthalten weniger δ -Granula verglichen zu Wildtyp Thrombozyten: (A) Transmissionselektronenmikroskopie Aufnahmen von murinen *cxcl14*^{+/+} und *cxcl14*^{-/-} Thrombozyten sind gezeigt. Schwarze Pfeile indizieren Dichte-Granula (δ -Granula), weiße Pfeile α -Granula. Die Skalierung entspricht 500 nm. Die quantitative Auswertung von Granula per Thrombozytenaufnahme (*Granula/Sektion*) – Thrombozyten von 5 *cxcl14*^{+/+} und 5 *cxcl14*^{-/-} Mäusen zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl ihrer α -Granula (B) und δ -Granula (C). Statistik: ungepaarter t-Test; n = 126; *cxcl14*^{+/+} vs. *cxcl14*^{-/-}; α -Granula: p > 0,05; δ -Granula: p < 0,01

Beim Vergleich beider Gruppen konnte eine signifikant erniedrigte Zahl an δ -Granula bei Thrombozyten von *cxcl14*^{-/-} Mäusen festgestellt werden (Abbildung 27), was der Grund für eine verringerte ATP/ADP-Freisetzung und damit für die verringerte Thrombusbildung sein könnte.

3.2.12 CXCL14 wirkt chemotaktisch auf Thrombozyten

In neueren Untersuchungen wird deutlich, dass Chemokine wie CXCL12 nicht nur die Migration von kernhaltigen Zellen, sondern auch von Thrombozyten beeinflussen und damit zu inflammatorischen Vorgängen beitragen [153]. Um zu untersuchen, ob CXCL14 einen ähnlichen chemotaktischen Effekt auf Thrombozyten hat, wurde dies in 96-Trans-Well-Migrationsexperimenten untersucht. Hierbei wurden Thrombozyten, die innerhalb von 2 Stunden durch eine porenhaltige Membran (0,4 µm) in ein unteres Well migriert waren, mit einem anti-CD42b-APC Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch für 2 Minuten quantifiziert.

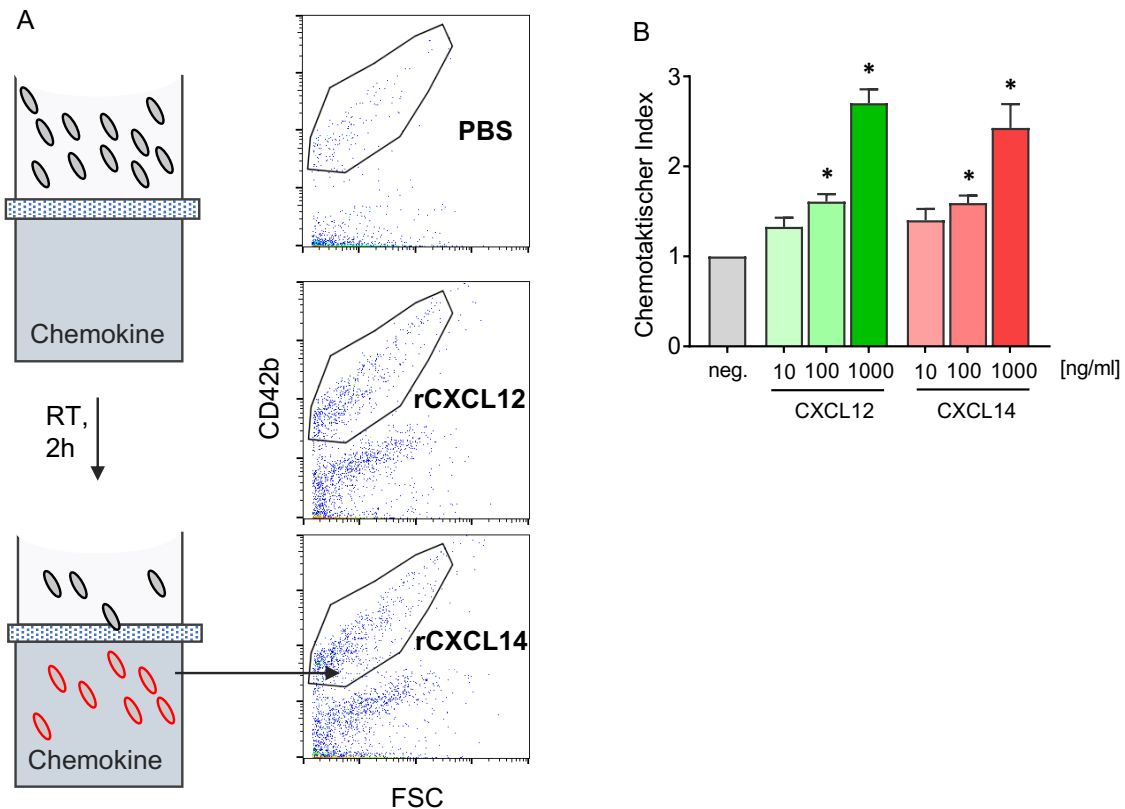


Abbildung 28. Rekombinantes CXCL14 induziert die Migration von Thrombozyten: (A) Schematischer Versuchsaufbau einer 96-Trans-Well Migrationskammer. Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur sind murine Thrombozyten in Medium vom oberen Well durch die Membran (0.4 μm Porengröße) in das untere Well mit Medium und Chemokin migriert. Die Zahl der migrierten Thrombozyten im unteren Well wird durchflusszytometrisch quantifiziert. Dot-Blots zeigen CD42b positive Zellen aus unteren Wells bei mit PBS oder rekombinatem Chemokin (rmCXCL12; 1 μg/ml, rmCXCL14; 1 μg/ml) versetzten Medium nach erfolgter Migration. (B) Quantitative Auswertung – Rekombinantes murines CXCL14 (100, 1000 ng/ml) hat einen signifikanten chemotaktischen Effekt auf murine Thrombozyten, der vergleichbar ist mit dem chemotaktischen Effekt von rekombinatem murinem CXCL12 (100, 1000 ng/ml). Statistik: Mann Whitney U-Test; n = 8; CXCL12: 10 vs 100 ng/ml: p < 0,05; 10 vs 1000 ng/ml: p < 0,001; CXCL14: 10 vs 100 ng/ml: p < 0,05; 10 vs 1000 ng/ml: p < 0,01

In Relation zur Negativkontrolle (PBS) wurde, ähnlich wie für rekombinantes CXCL12 (100, 1000 ng/ml), eine signifikant erhöhte Anzahl an CD42b-positiven Zellen für rekombinantes CXCL14 (100, 1000 ng/ml) gemessen. Eine dosisabhängige, chemotaktische Wirkung von CXCL14 auf Thrombozyten konnte so erstmals gezeigt werden.

3.3 CXCL14 wirkt über den thrombozytären Chemokinrezeptor CXCR4

3.3.1 Die CXCL14 vermittelte Monozytenmigration erfolgt über CXCR4

Um die Frage zu klären, über welchen Rezeptor CXCL14 beschriebene Effekte vermittelt werden und welcher Rezeptor damit für die pro-inflammatorischen Effekte von CXCL14 verantwortlich ist, wurden erneut Trans-Well-Migrationsexperimente durchgeführt. Wie bei 3.2.2 migrierten dabei isolierte humane Monozyten innerhalb von vier Stunden bei 37°C durch eine poröse Membran (5 µm) und wurden anschließend für zwei Minuten durchflusszytometrisch gezählt.

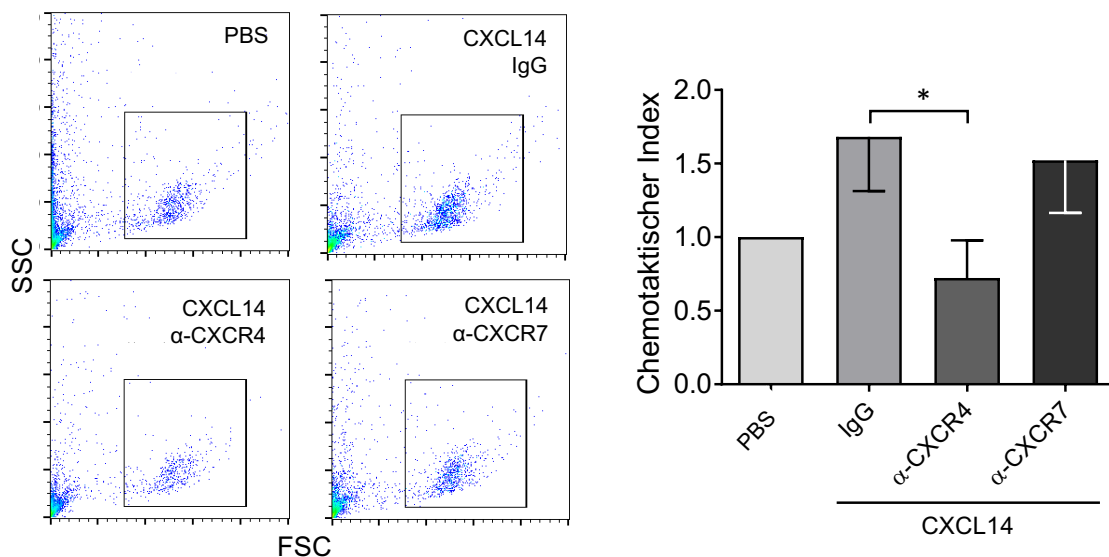


Abbildung 29. CXCL14 induziert die Migration von Monozyten über den CXCR-Motiv Chemokin Rezeptor-4: (A) Nach 4 Stunden bei 37°C sind humane Monozyten in Medium vom oberen Well durch die Membran (5 µm Porengröße) in das untere Well mit Medium und Chemokin migriert. Dot-Blots von Migrationsexperimenten zeigen eine geringere Anzahl an migrierten humanen Monozyten nach Vorinkubation mit blockierendem CXCR4 Antikörper im Vergleich zur IgG Kontrolle oder blockierendem CXCR7 Antikörper. (B) Quantitative Auswertung – Der chemotaktische Effekt auf humane Monozyten von CXCL14 ist durch die Inkubation mit blockierenden CXCR4 Antikörpern signifikant erniedrigt. Statistik: ungepaarter t-Test; n = 3; IgG vs. α-CXCR4: p < 0,05

Der unter 3.2.2 beschriebene chemotaktische Effekt (hier IgG-Kontrolle) konnte dabei signifikant vermindert werden, wurden die Zellen vorher für 30 Minuten mit einem blockierenden anti-CXCR4-Antikörper inkubiert. Eine Blockade des

CXCR7 Rezeptors dagegen führte nicht zu einer Inhibition der Migration (Abbildung 29). Dieses Ergebnis deutet auf eine CXCL14-CXCR4 vermittelte Migration von Monozyten hin.

3.3.2 *cxcr4*^{-/-} Mäuse exprimieren keinen thrombozytären CXCR4 Rezeptor

Die Frage nach dem verantwortlichen Rezeptor für CXCL14 vermittelte Effekte wurde mithilfe von Thrombozyten spezifischen CXCR4-*Knock-out* Mäusen (*cxcr4*^{fl/fl} Pf4-Cre⁺ Mäuse (*cxcr4*^{-/-}), *cxcr4*^{fl/fl} Pf4-Cre⁻ Mäuse (*cxcr4*^{+/+})) und CXCR7- *Knock-out* Mäusen (*cxcr7*^{fl/fl} Pf4-Cre⁺ Mäuse (*cxcr7*^{-/-}), *cxcr7*^{fl/fl} Pf4-Cre⁻ Mäuse (*cxcr7*^{+/+})) weiter untersucht. Diese Tiere wurden im Labor von Prof. Gawaz an der Uniklinik Tübingen generiert und gezüchtet (Jessica Sudmann). Die Kreuzung von Pf4-Cre positiven (Pf4-Cre⁺) Mäusen mit *cxcr4*^{fl/fl} Pf4-Cre negativen Mäusen führt zu Nachwuchs, der die Cre-Rekombinase in Zellen exprimiert, die den Pf4 Promotor exprimieren. Die exprimierte Cre-Rekombinase führt anschließend zur Entfernung des Genabschnitts (hier CXCR4 oder CXCR7), der von zwei loxP Motiven (fl/fl) umgeben ist. Damit kommt es zu einem spezifischen *Knock-out* des Zielgens ausschließlich in Zellen, die den Pf4-Promotor exprimieren. Dieser kommt hauptsächlich in Megakaryozyten vor, weshalb es in Cre positiven Mäusen, die ebenfalls das *cxcr4*^{fl/fl} Motiv haben, zu einem Megakaryozyten- und damit Thrombozyten-spezifischen CXCR4 *Knock-out* kommt.

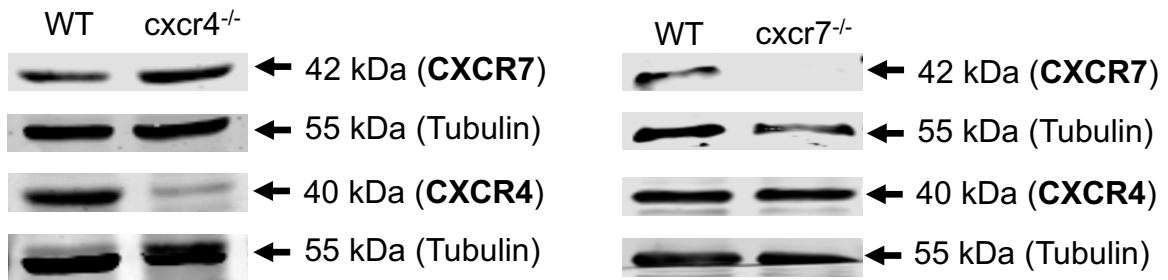


Abbildung 30. CXCR4 und CXCR7 werden durch Pf4 abhängige Cre Expression ausgeknockt: (A) Repräsentative Western Blots von Thrombozyten Lysaten von *cxcr4*^{fl/fl} Pf4-Cre⁺ Mäuse (*cxcr4*^{-/-}) zeigen ein CXCR7 (42 kDa) aber kaum ein CXCR4 (40 kDa) Signal im Vergleich zu *cxcr4*^{fl/fl} Pf4-Cre⁻ Mäuse (WT). Als Ladekontrolle dient α -Tubulin (50 kDa). Daten entsprechen n = 3 unabhängigen Experimenten. (B) Entsprechend wird in Western Blots von Lysaten von *cxcr7*^{fl/fl} Pf4-Cre⁺ Mäusen (*cxcr7*^{-/-}) kein Signal für CXCR7, jedoch für CXCR4 detektiert. *cxcr7*^{fl/fl} Pf4-Cre⁻ Mäuse (WT) dienten als Wildtypkontrolle. Außerdem diente α -Tubulin als Ladekontrolle. Daten entsprechen n = 3 unabhängigen Experimenten.

In Immunoblot Analysen (Western Blots) ist kaum ein Signal für den CXCR4-Rezeptor in Lysat von Thrombozyten von *cxcr4*^{fl/fl} Pf4-Cre⁺ Mäusen (*cxcr4*^{-/-}) und bei *cxcr7*^{fl/fl} Pf4-Cre⁺ Mäuse (*cxcr7*^{-/-}) ist kein spezifisches Signal für den CXCR7-Rezeptor in Lysat von Thrombozyten zu detektieren. Ein *Knock-out* dieser Rezeptoren in Pf4-Cre positiven Tieren auf deren Thrombozyten war demnach gewährleistet. Zu einem minimal vorhandenen Signal kann es, wie bei CXCR4 in der *cxcr4*^{-/-} Probe kommen, sollten sich einzelne andere Zellen noch unter den aufgereinigten Thrombozyten befinden. Da der *Knock-out* nur in Thrombozyten exprimiert wird, nicht jedoch in anderen Blutzellen, ist eine Kontamination weniger anderer Zellen nie völlig ausgeschlossen.

3.3.3 Die CXCL14 vermittelte Thrombozyten Migration erfolgt über CXCR4

Da ein Effekt von CXCL14 auf die Migration von Thrombozyten gezeigt werden konnte (3.2.12), wurden mit isolierten murinen *cxcr4*^{-/-} und *cxcr7*^{-/-} Thrombozyten Trans-Well-Migrationsexperimente durchgeführt, um den verantwortlichen Rezeptor zu identifizieren und eine mögliche Beteiligung von CXCR4 genauer zu untersuchen.

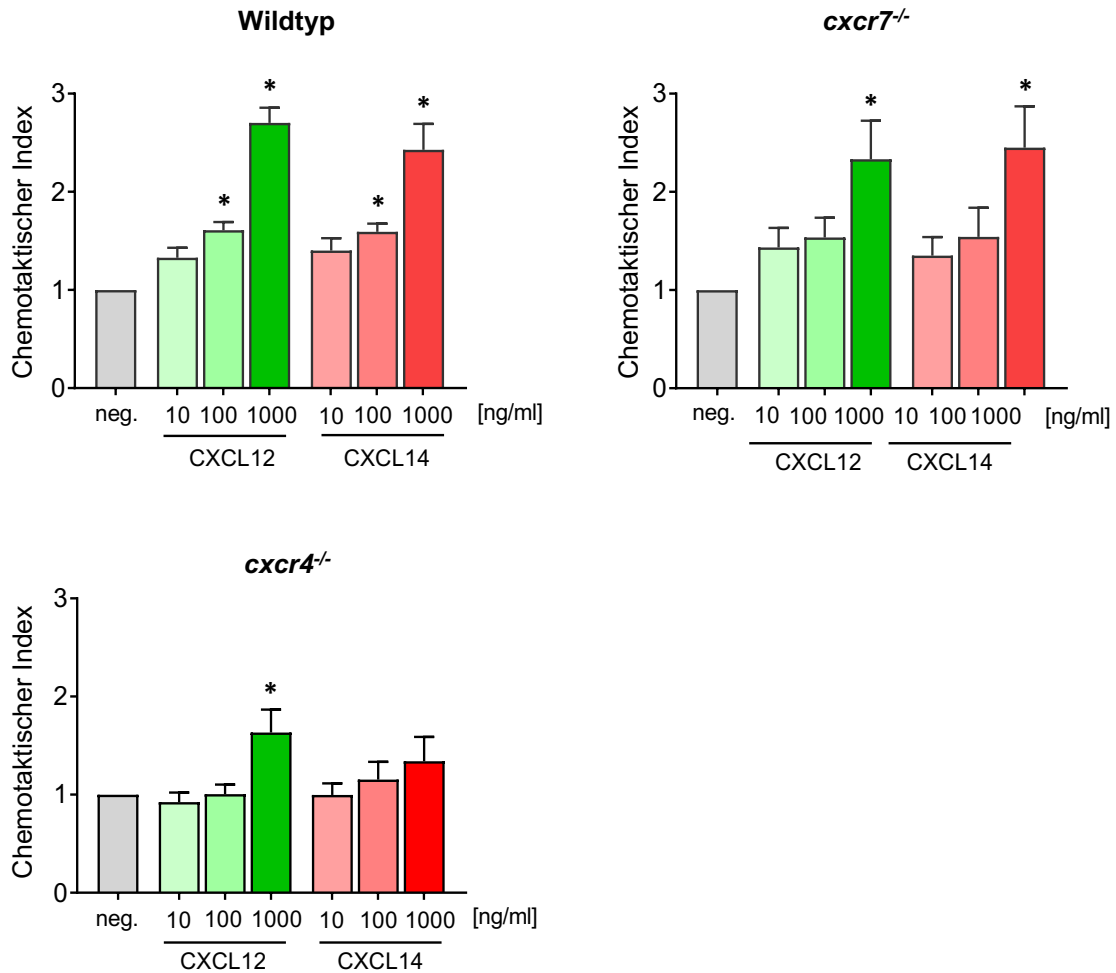


Abbildung 31. CXCR4 ist für die Migration von Thrombozyten essentiell: Isolierte murine *cxcr4*^{-/-} und *cxcr7*^{-/-} Thrombozyten wurden, wie in 3.2.12 beschrieben, in 96-Trans-Well Migrationsexperimenten verwendet. Quantitative Auswertung – Migrierte Thrombozyten werden in Relation zu Anzahl migrierter Zellen ihrer Negativkontrolle (neg.) aufgetragen. Im Vergleich zu Wildtyp und *cxcr7*^{-/-} Thrombozyten migrieren *cxcr4*^{-/-} Thrombozyten in einem signifikant geringeren Maß hin zu rekombinantem CXCL12 und rekombinantem CXCL14. Statistik: Mann Whitney U-Test; n ≥ 3; WT - CXCL12: 10 vs 100 ng/ml: p < 0,05; 10 vs 1000 ng/ml: p < 0,001; CXCL14: 10 vs 100 ng/ml: p < 0,05; 10 vs 1000 ng/ml: p < 0,01; *cxcr7*^{-/-} - CXCL12: 10 vs 1000 ng/ml: p < 0,05; CXCL14: 10 vs 1000 ng/ml: p < 0,05; *cxcr4*^{-/-} - CXCL12: 10 vs 1000 ng/ml: p < 0,05; CXCL14: 10 vs 1000 ng/ml: p = ns

Im Vergleich zu Thrombozyten von Wildtyp Mäusen konnte eine signifikante Abnahme von migrierten Thrombozyten von *cxcr4*^{-/-} hin zu rekombinantem CXCL12 und CXCL14 beobachtet werden (Abbildung 31). Thrombozyten mit einem CXCR7 *Knock-out* zeigten ein ähnliches Migrationsausmaß wie Thrombozyten von Wildtyp-Mäusen. Dies spricht dafür, dass CXCL14 über den Rezeptor CXCR4 die Migration von Thrombozyten beeinflusst.

3.3.4 Humane *cxcr4*^{-/-} Thrombozyten-ähnliche Partikel migrieren nicht zu CXCL14

Eine neue Möglichkeit, genetisch veränderte humane Thrombozyten zu generieren und funktionell zu untersuchen, ist aktuell im Fokus der Wissenschaft. Hierbei macht man sich die Möglichkeit zunutze, humane induzierbare pluripotente Stammzellen (iPSCs) mithilfe der CRISPR/Cas Technik zu verändern und aus den veränderten Zellen Thrombozyten zu gewinnen. Um die beobachteten Effekte von CXCL14 im murinen Rezeptor *Knock-out* Modell in ein humanes *Knock-out* Modell zu transferieren, wurden iPSCs mithilfe des CRISPR/Cas9 Systems genetisch modifiziert und anschließend zu Megakaryozyten differenziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 auf iPS-Zellen von gesunden Spendern mithilfe des CRISPR/Cas9 Systems ausgeknockt (Abbildung 4). Nach der Transfektion der iPS-Zellen wurden Kolonien aus Einzelklonen herangezogen. Zellen aus diesen Kolonien entsprechen einer Zelllinie, die aus einer einzelnen Zelle nach Transfektion hervorgegangen ist. Die genomische DNA dieser Zellen wurde extrahiert und sequenziert. Bei den Klon-Zelllinien B2 und H3 für CXCR4 und den Klon-Zelllinien A8 und B6 für CXCR7 konnten durch die TIDE-Analyse jeweils eindeutig eine Insertion von einem Basenpaar detektiert werden (Abbildung 32). Diese Insertion von einem Basenpaar führt zu einer Verschiebung des Leserasters (*Frameshift*) des Exons des Zielgens in der Zelllinie, welche dadurch als *Knock-out* des entsprechenden Gens angesehen werden konnte (Abbildung 32).

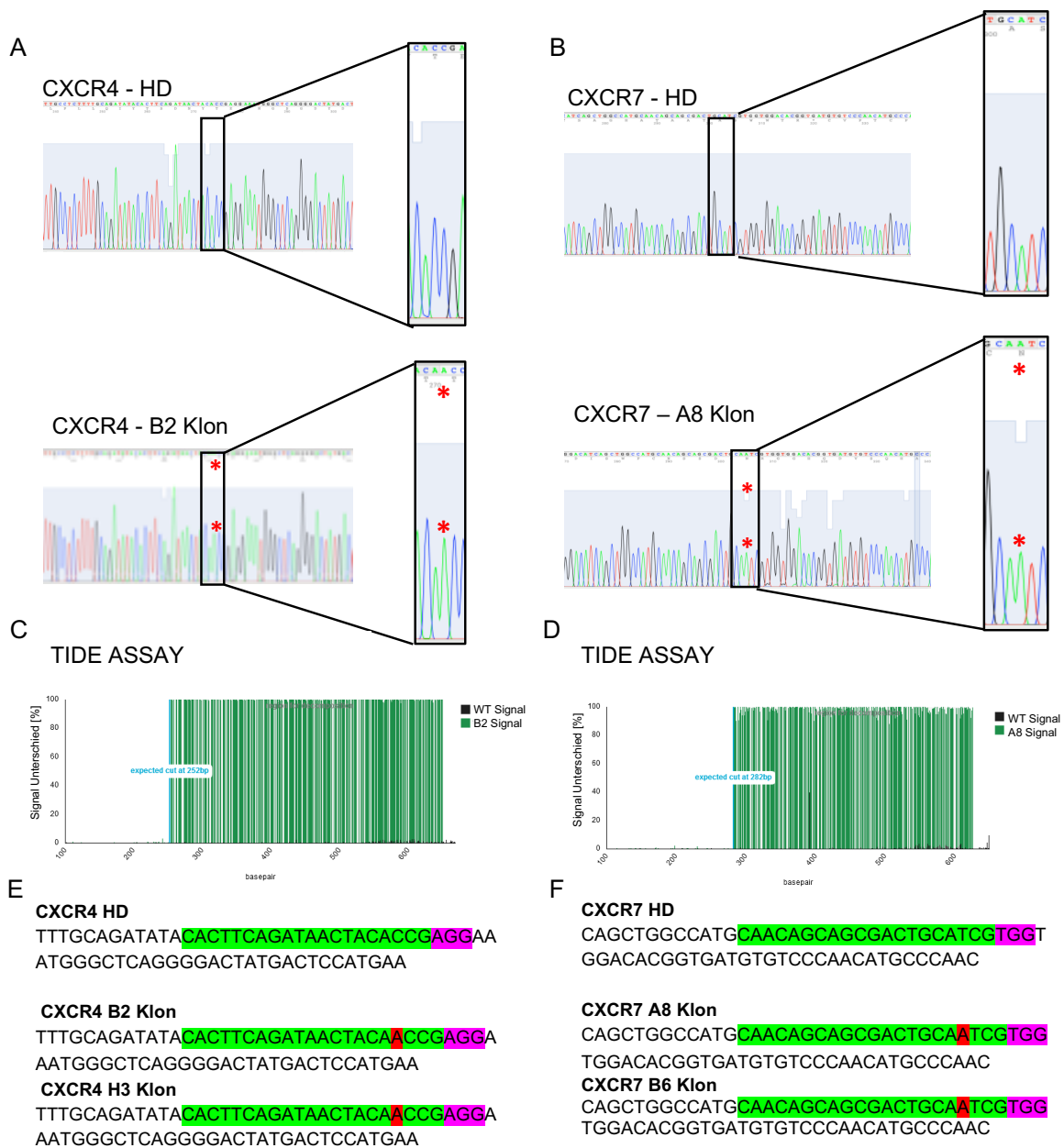


Abbildung 32. Schematische Darstellung der iPSC Knock-out Charakterisierung: DNA Chromatogramm des unveränderten iPSC Klons (CXCR4-Healthy Donor; HD (A) beziehungsweise CXCR7-Healthy Donor; HD (B)) und eines entsprechenden mittels CRISPR/Cas9 veränderten Klons (CXCR4 B2 / CXCR7 A8). Nach durchgeführter Sanger-Sequenzierung isolierter genomischer DNA sind eindeutige Nukleotid Peaks in beiden Sequenzen und eine Insertion eines zusätzlichen Adenins in der CXCR4 B2 beziehungsweise in der CXCR7 A8 Klon Sequenz (roter Stern) zu erkennen im Vergleich zur unveränderten Sequenz. Ein Vergleich der Sequenzen des unveränderten und des CRISPR/Cas9 veränderten Genabschnitts mittels TIDE Assay macht eine Quantifizierung und Charakterisierung der induzierten Mutation möglich und zeigt für den B2 Klon für CXCR4 (C) beziehungsweise für den A8 Klon für CXCR7 (D) eine eindeutige Insertion von einem Basenpaar an. Ein Fehler im Leseraster ist damit ab der erwarteten Cas9-Schnittstelle zu erkennen (grüner Bereich). Die Nukleotid Sequenz der beiden

CXCR4 Klone B2 und H3 ergeben je eine Insertion eines Adenins an derselben Stelle im Vergleich zur unveränderten Sequenz (**E**). Dieselben Insertionen sind beim CXCR7 Gen zu erkennen bei den beiden Klonen (A8 und B6) (**F**). Grün markiert ist dabei die sgRNA Zielsequenz, violett das PAM (*proto-spacer adjacent motif*) und rot die Mutationen.

Zu Beginn der Differenzierung der IPS-Zellen wurden etwa 3×10^4 Zellen zu einem „embryonalen Körperchen“ (*Embryoid Body*, EB) pelletiert und ausgesät. Ähnlich wie bei Lu *et al.* beschrieben, wurde zu diesen EBs ein Cocktail aus Wachstumshormonen und Zytokinen gegeben und alle sieben Tage wurde Medium entnommen und so zentrifugiert, dass Thrombozyten ähnliche Partikel (*Culture-derived platelets*, CDPs) entnommen werden konnten [138].

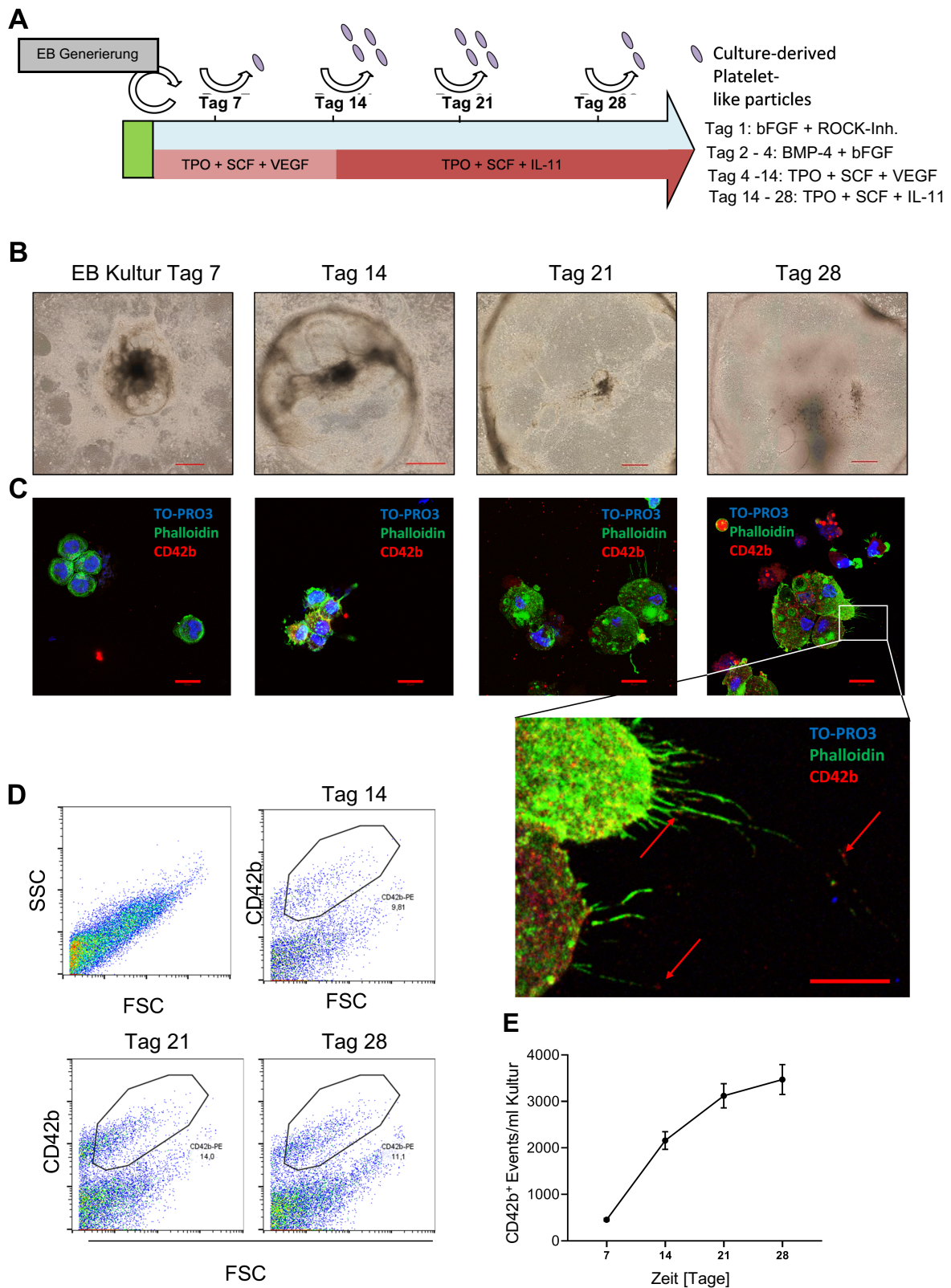
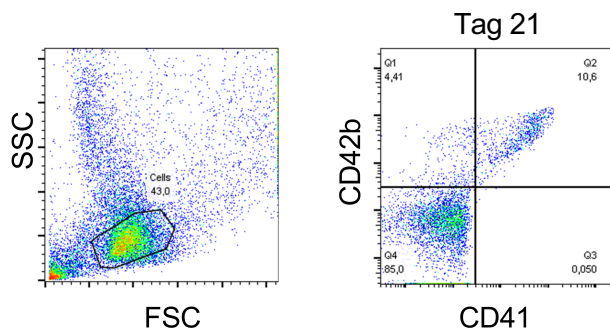


Abbildung 33. Schematische Darstellung der iPS Differenzierung: (A) Nach EB (*Embryoid Body*) Generierung von 2×10^4 iPS Zellen werden diese für insgesamt 28 Tage mit verschiedenen Wachstumshormonen und Zytokinen behandelt. Alle 7 Tage ab Tag 7 werden Thrombozyten-ähnliche Partikel (*culture derived platelet like particles*; CDP) aus dem Überstand der Kultur isoliert. (B) Repräsentative Hell-Feld Mikroskopie

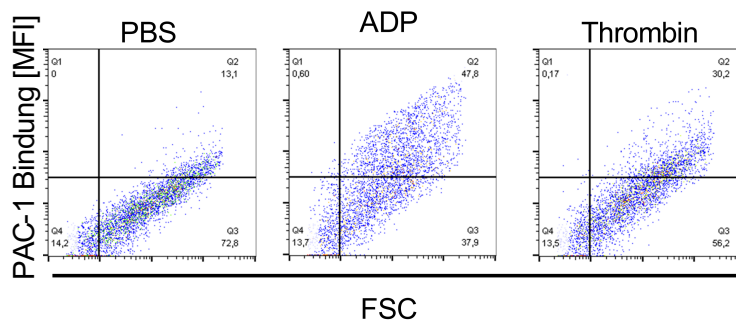
Aufnahmen der EBs über 28-Tage ist gezeigt. Die Skalierung entspricht 500 μm . **(C)** Repräsentative Konfokal-Mikroskopie Aufnahmen wurden zu angegebenen Zeitpunkten von Kulturzellen aufgenommen, nachdem diese mittels Cytospin auf Objektträger fixiert und mit Antikörpern oder Farbstoffen gefärbt wurden. F-Aktin wurde mit Alexa-Fluor-488-Phalloidin sichtbar gemacht und wird grün dargestellt. Die Bindung von CD42b Antikörpern wird in rot und die Kernfärbung mittels TO-PRO-3 wird in blau dargestellt. Über einen Zeitraum von 28 Tagen werden die Zellen größer und Protrusionen-ähnliche, CD42b positive (rote Pfeile) Membranausstülpungen werden beobachtet. Die Skalierung entspricht 20 μm . **(D)** Repräsentative durchflusszytometrische Dot-Blots der Überstände der Kultur zeigen das Vorkommen von CD42b positive Zellen nach angegebenen Zeitpunkten. **(E)** Die Quantifizierung von CD42b positiven Zellen zeigen ein Maximum an freigesetzten Thrombozyten ähnlichen Partikeln an Tag 28. Daten entsprechen $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ von $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten.

Abbildung 33 zeigt Übersichtsaufnahmen der Entwicklung der EBs über die Zeitspanne von 28 Tagen. Repräsentative konfokale Aufnahmen von semiadhärenten Zellen zeigen eine Zunahme an CD42b-Signal, eine Zellvergrößerung sowie Ausläufer, die an Protrusionen von Megakaryozyten erinnern. (Abbildung 33 C). Ein weiteres Indiz für die Entstehung von Megakaryozyten ist das Vorkommen von CD41/CD42-positiven Zellen in der iPSC-Kultur, welche durch repräsentative Dot-Blots gezeigt werden konnten (Abbildung 34 A). Das Vorkommen von CDPs nahm über die Zeit zu und erreichte an Tag 28 seinen Höhepunkt (Abbildung 33 E).

A



B



C

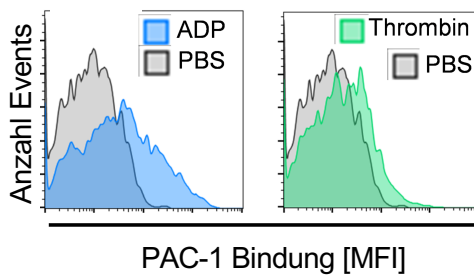


Abbildung 34. iPSC Differenzierung – Thrombozyten ähnliche Partikel: (A) Repräsentative durchflusszytometrische Dot Blots von iPSCs an Tag 21 der Differenzierung zeigen CD41/CD42b positive Zellen in der Kultur. Abbildungen entsprechen $n = 3$ unabhängigen Experimenten. (B) Isolierte CD42b positive Thrombozyten ähnliche Partikel wurden mit ADP (20 μM) und Thrombin (0,1 U/ml) für 30 Minuten in Tyrodes Puffer (pH 7.4 mit 1 mM Ca^{2+}) inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Repräsentative Histogramme (C) zeigen einen Anstieg der PAC-1 Oberflächen Bindung, was ein Vorhandensein und eine Aktivierung von Integrin $\alpha_{\text{IIb}}/\beta_3$ indiziert.

Die generierten CD42-positiven CDPs zeigten nach Stimulation mit den bekannten Thrombozyten Stimulantien ADP (20 μ M) und Thrombin (0,1 U/ml) eine erhöhte Bindung des Aktivierungsmarkers PAC-1 (erhöhtes aktiviertes Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) in der Durchflusszytometrie (Abbildung 34). Somit konnte gezeigt werden, dass humane, aktivierbare, Thrombozyten-ähnliche Partikel *in vitro* im Rahmen dieser Arbeit generiert werden konnten.

Um zu untersuchen, ob CXCR4 auch auf humanen Thrombozyten der verantwortliche Rezeptor für die CXCL14 vermittelte Thrombozyten Migration ist, wurden CXCR4- und CXCR7-*Knock-out* iPS Zelllinien mithilfe des CRISPR/Cas Systems generiert (siehe 2.2.12). Nach deren Differenzierung wurden CDPs isoliert und Migrationsexperimente mit denselben Versuchsbedingungen wie bei murinen Thrombozyten durchgeführt.

In diesen 96 Trans-Well-Migrationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass *cxcr4*^{-/-} CDPs nicht mehr hin zu rekombinantem CXCL14 migrieren (Abbildung 35). *cxcr7*^{-/-} und unveränderte CDPs hingegen migrierten, ähnlich wie murine Thrombozyten, hin zu den rekombinanten Chemokinen. So konnte der durch CXCL14-CXCR4 vermittelte chemotaktische Effekt aus einem murinen *Knock-out* Modell erstmals in einem humanen *Knock-out* Ansatz bestätigt werden.

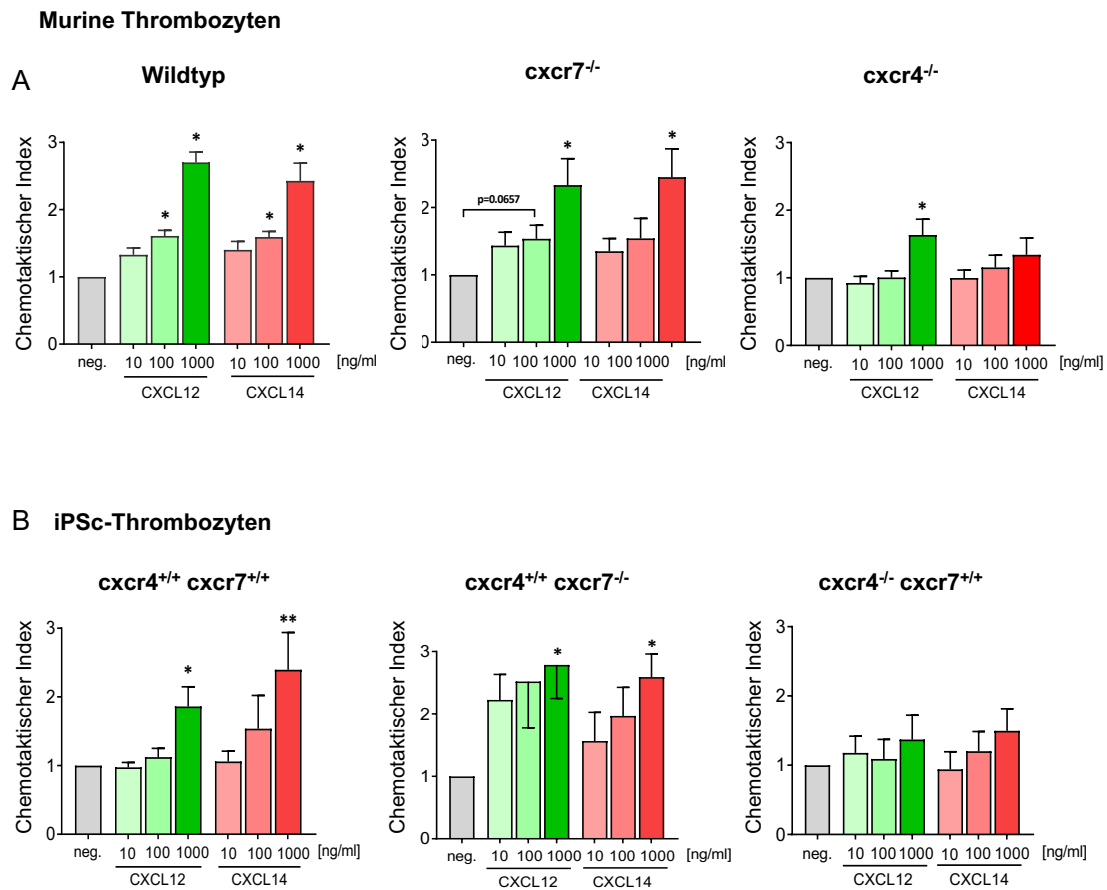


Abbildung 35. CXCR4 ist in die Migration von humanen Thrombozyten ähnlichen Partikeln involviert: (B) Trans-Well-Migrationsexperimente mit CDPs aus den Überständen der iPSC-Kultur wurden ab Tag 14 an jedem siebten Tag durchgeführt. Zellen migrieren durch eine Membran (Porengröße = 0,4 μm), werden durch einen Fluoreszenz-markierten CD42b Antikörper gefärbt und quantitativ durchflusszytometrisch analysiert. Aufgetragen sind migrierte CDPs in Relation zur PBS Puffer Kontrolle. Im Vergleich zur geringsten Konzentration an Chemokinen migrieren CDPs signifikant verstärkt hin zu höher konzentrierten rekombinanten Chemokinen CXCL12 (1000 ng/ml) und CXCL14 (1000 ng/ml). Wie bei murinen Wildtyp Thrombozyten (A) migrieren genetisch unveränderte CDPs (B) hin zu CXCL14 (1000 ng/ml) nicht aber wenn ein *Knock-out* von CXCR4 besteht. Statistik: (A) siehe Abbildung 30. (B) Mann Whitney U-Test; $n \geq 7$; *cxcr4^{+/+}-cxcr7^{+/+}* - CXCL12: 10 vs 1000 ng/ml: $p < 0,05$; CXCL14: 10 vs 1000 ng/ml: $p < 0,01$; *cxcr4^{+/+} - cxcr7^{-/-}* - CXCL12: 10 vs 1000 ng/ml: $p < 0,05$; CXCL14: 10 vs 1000 ng/ml: $p < 0,05$; *cxcr4^{-/-} - cxcr7^{+/+}* - CXCL12: 10 vs 1000 ng/ml: $p = \text{ns}$ CXCL14: 10 vs 1000 ng/ml: $p = \text{ns}$

3.3.5 CXCL14 bindet an CXCR4 auf aktivierten Thrombozyten – Ko-Immunopräzipitation

Um die vorherigen Experimente zu stützen und um zu zeigen, dass die CXCL14 vermittelte Wirkung durch eine Rezeptorbindung an CXCR4 erfolgt, wurden Bindungsstudien durchgeführt. Diese Bindung wurde zum einen durch Ko-Immunopräzipitationen untersucht.

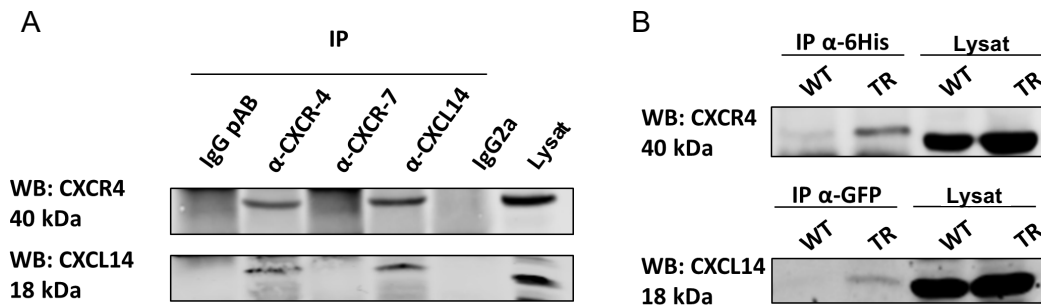


Abbildung 36. CXCR4 bindet CXCL14 *in vitro*: (A) Thrombozyten wurden mit CRP-XL aktiviert (5 µg/ml; 30 min), lysiert und mit Präzipitations-Antikörpern gegen CXCR4, CXCR7, CXCL14 und entsprechenden IgG Kontrollen inkubiert. Western Blot Analysen der behandelten Lysate zeigen spezifische Signale für CXCR4 in Proben, die mit CXCL14 Präzipitations-Antikörpern behandelt wurden und *vice versa*. Als Positiv-Kontrolle dient das Thrombozyten-Lysat ohne Präzipitationsschritt (Lysat). Daten entsprechen n = 3 unabhängigen Experimenten. (B) Lysate von HEK293 Zellen, die zuvor mit CXCL14-6xHis-tag/CXCR4-GFPspark-tag Plasmiden transfiziert wurden (TR) und das Lysat von Wildtyp HEK293 Zellen (WT) wurden mit anti-6xHis-tag beziehungsweise anti-GFP-tag Präzipitationsantikörpern behandelt. Western Blot Analysen zeigen spezifische Signale für CXCR4 in Proben, die mit anti-6xHis-tag Präzipitations-Antikörpern behandelt wurden und für CXCL14 in Proben, die mit anti-GFP-tag Präzipitations-Antikörpern behandelt wurden Als Positiv-Kontrolle dient das Zell-Lysat ohne Präzipitationsschritt (Lysat). Daten entsprechen n = 3 unabhängigen Experimenten.

Wurde das Lysat von aktivierten Thrombozyten mit CXCR4-Präzipitation Antikörpern inkubiert, konnte im darauffolgenden Western Blot ein deutliches spezifisches CXCL14 Signal detektiert werden. Entsprechend wurde bei einer Inkubation des aktivierten Thrombozyten Lysats mit CXCL14-Präzipitation Antikörper ein spezifisches Signal für CXCR4 im Western Blot detektiert. Mit IgG behandelte Proben dienten als Negativkontrolle, als Positiv Kontrolle diente die Inkubation von Präzipitations-Antikörper gegen das Antigen, gegen das auch der Detektions-Antikörper im Immunoblot gerichtet war. Eine weitere Kontrolle stellt

das Lysat aktivierter Thrombozyten dar, welches nicht mit Präzipitations-Antikörper behandelt wurde (Lysat). Hierdurch konnte eine direkte Bindung zwischen CXCL14 und CXCR4 gezeigt werden, nach Aktivierung von Thrombozyten.

Zusätzlich wurden HEK293 Zellen mit einem CXCL14-6xHis-tag- und einem CXCR4-GFPspark-tag-Plasmid transfiziert, sodass beide Proteine überexprimiert wurden. Nach Lyse dieser Zellen (TR) und von untransfizierten Zellen (WT) wurden ebenfalls Ko-Immunpräzipitationen angesetzt. Einer Präzipitation gegen ein 6xHis-tag-Motiv folgte bei transfizierten Zellen eine Detektion von CXCR4 und einer Präzipitation gegen ein GFP-Motiv eine Detektion von CXCL14 im Western Blot. Beide Immunpräzipitationsansätze zeigen eine direkte Interaktion zwischen CXCL14 und CXCR4 auf und stützen die These, dass CXCL14 seine biologischen Wirkungen über eine Bindung an den Rezeptor CXCR4 vermittelt.

3.3.6 CXCL14 bindet an CXCR4 auf aktivierten Thrombozyten - Konfokalaufnahmen

Ein weiteres Experiment, mit dem die Bindung zwischen CXCR4 und CXCL14 dargestellt wurde, waren konfokale Mikroskopie Aufnahmen von aktivierten Thrombozyten nach deren Inkubation mit anti-CXCR4- und anti-CXCL14-Antikörpern. Hier konnte ebenfalls eine Ko-Lokalisation zwischen CXCR4- und CXCL14 Signal detektiert werden.

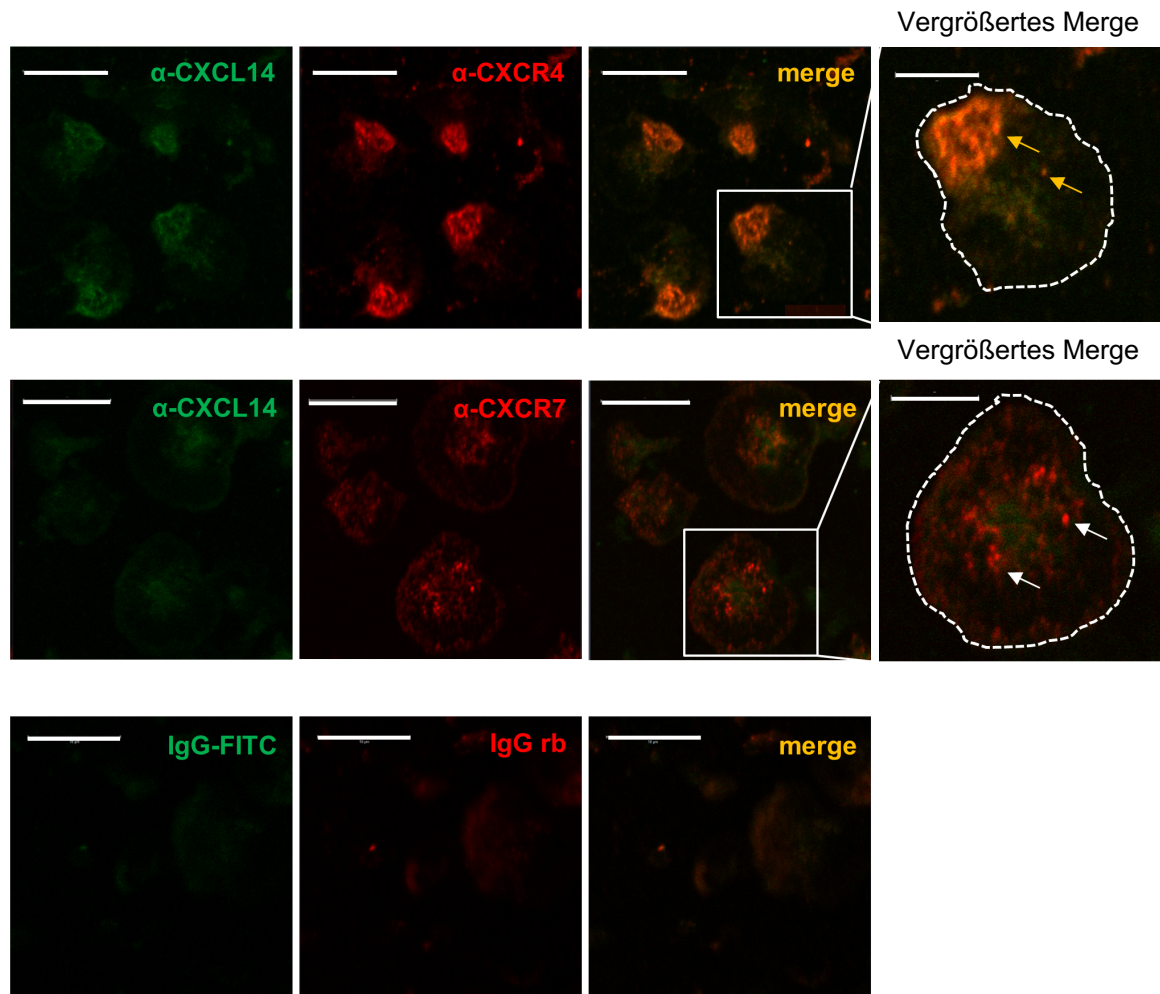


Abbildung 37. CXCL14 bindet an CXCR4 auf aktivierten Thrombozyten: Repräsentative Konfokal mikroskopische Aufnahmen von aktivierten Thrombozyten (CRP-XL 5 μ g/ml; 30 min) die auf Fibrinogen beschichteter Oberfläche (100 μ g/ml) adhäreren, wurden mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen CXCL14 (grün), CXCR4 und CXCR7 (beide rot) beziehungsweise entsprechenden IgG Kontrollen inkubiert. Die Überlagerung von grünem und rotem Signal (*merge*) und damit die Ko-Lokalisation ist als gelbes Signal bei CXCR4 und CXCL14 Färbung zu sehen (gelbe Pfeile zeigen die Ko-Lokalisation), nicht aber bei CXCL14 und CXCR7 Färbung (weiße Pfeile zeigen Einzelfärbung von CXCR7). Die gestrichelte Linie beschreibt den Umriss des ausgebreiteten Thrombozyten. Die Skalierung entspricht 10 μ m in Einzelaufnahmen und 5 μ m in den vergrößerten Aufnahmen (*Vergrößertes Merge*). Die Aufnahmen entsprechen n = 3 unabhängigen Experimenten.

Die Überlagerung von rotem und grünem Signal führt zu einem gelben und kann als Ko-Lokalisation der beiden Signale angesehen werden [160]. Dies ist der Fall bei CXCR4 und CXCL14 Färbungen. Im Vergleich zur Signalüberlagerung für CXCR4 und CXCL14 kommt es bei einer Färbung von CXCR7 und CXCL14 nicht

zu einer Überlagerung. Als Negativkontrolle dienten mit entsprechenden IgG gefärbte Thrombozyten. So konnte auf aktivierten Thrombozyten eine CXCL14-CXCR4 Bindung gezeigt werden.

3.3.7 Im Peritonitis-Modell migrieren *cxcr4*^{-/-} Thrombozyten vermindert

Um die Relevanz des CXCR4 Rezeptors für die Entzündungs-vermittelte Migration von Thrombozyten *ex-vivo* zu untersuchen, wurde ein murines Peritonitis Modell herangezogen. Hierbei wurden Wildtyp- und *cxcr4*^{fl/fl} Pf4-Cre⁺ Mäusen (*cxcr4*^{-/-}) entweder Kochsalzlösung als Negativkontrolle oder 4%-ige Thioglykolat-Lösung intraperitoneal injiziert und nach 24 Stunden die Intraperitonealflüssigkeit auf eingewanderte Thrombozyten durchflusszytometrisch untersucht.

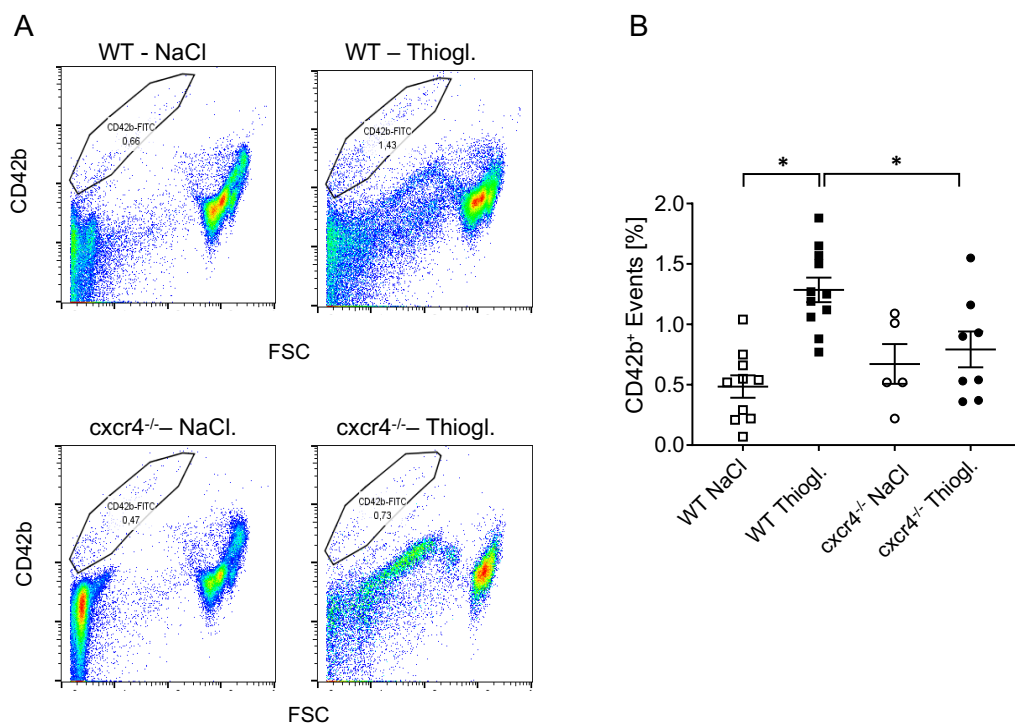


Abbildung 38. *In vivo* Migration von Thrombozyten ist CXCR4 abhängig: (A) Wildtyp und *cxcr4*^{-/-} Mäusen wurde intraperitoneal isotonische Kochsalzlösung (NaCl) beziehungsweise 4-%ige Thioglykolat-Lösung (Thiogl.) injiziert. Dot Blots von durchflusszytometrischen Analysen der Peritonealflüssigkeit nach 24 Stunden zeigen eine Zunahme von CD42b positiven Zellen im Thrombozyten Gate bei Thioglykolat Gabe (WT – Thiogl.) im Vergleich zur entsprechenden Kochsalz Kontrolle (WT – NaCl). Bei *cxcr4*^{-/-} Mäusen ist diese Zunahme nicht zu sehen. (B) Quantitative Auswertung – Die Thioglykolat Gabe bei Wildtyp Mäusen führt zu signifikant mehr Thrombozyten in der Peritonealflüssigkeit. Im Vergleich hierzu sind signifikant weniger Thrombozyten in der Peritonealflüssigkeit der *cxcr4*^{-/-} Maus nach Thioglykolat Gabe zu beobachten. Statistik: ungepaarter t-Test; n ≥ 5; WT NaCl vs. WT Thiogl.: p < 0,001; WT Thiogl. vs. *cxcr4*^{-/-} Thiogl.: p < 0,05

Bei Wildtyp-Mäusen wurden signifikant mehr eingewanderte Thrombozyten in der Intraperitonealflüssigkeit nach Thioglykolat Gabe gemessen als bei der mit Kochsalzlösung behandelten Gruppe. Signifikant weniger Thrombozyten wurden hingegen in der mit Thioglykolat behandelten Gruppe der *cxcr4*^{fl/fl} Pf4-Cre⁺ Mäusen im Vergleich zur entsprechenden Wildtyp Gruppe gemessen (Abbildung 38). Dieses Ergebnis indiziert ebenfalls, dass der Chemokin Rezeptor CXCR4 in die Entzündungs-vermittelte Migration von Thrombozyten involviert ist.

4 Diskussion

4.1 Thrombozyten als Quelle für das Chemokin CXCL14

Thrombozyten sind neben ihrer klassischen Rolle als Schlüsselspieler während der Thrombose und Hämostase auch in der Regulation von Gefäß- und Gewebereparatur nach Organschäden beteiligt [161]. Dabei dienen Thrombozyten als eine Hauptquelle für Chemokine und andere Signalstoffe und können innerhalb von kurzer Zeit erhebliche Mengen davon an der Stelle eines Thrombus in die direkte Umgebung abgeben. Von Thrombozyten freigesetzte Signalstoffe regulieren Immunabwehr-, Reparatur- und Entzündungsprozesse, wie die chemotaktische Migration von Entzündungszellen, deren spezifische Differenzierung, deren phagozytotische Aktivität oder auch die Migration und Proliferation von Endothelzellen [89, 162, 163]. Entzündungsreaktionen, die thrombotischen Ereignissen, wie dem Myokardinfarkt, oder dem ischämischen Schlaganfall nachfolgen und durch Thrombozyten vermittelt werden, gehören zur Thrombo-Inflammation [163-165].

Zu den freigesetzten thrombozytären Signalstoffen gehören CXC-Chemokine wie CXCL4 (PF4), CXCL11, CXCL12 (SDF-1), CXCL16, CCL-Chemokine wie CCL5/RANTES, Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) oder auch chemokinähnliche Zytokine wie MIF (*Macrophage migration inhibitory factor*). Einige dieser thrombozytären Signalstoffe wie CXCL4, oder CXCL12 sind sowohl in ihrer Wirkungsweise, als auch in ihrer spezifischen Rezeptorbindung bereits ausführlich beschrieben [91] (Tabelle 1. Inhalt thrombozytärer Granula).

CXCL12 oder CXCL4 rekrutieren entzündliche und regenerative Endothelzellen, modulieren eine pro- und anti-angiogene Reaktion und üben antimikrobielle Aktivitäten aus und tragen so zur Thrombo-Inflammation bei [166-168].

Die Expression und Freisetzung von CXCL14 aus Thrombozyten konnte bisher auch in großen Proteom-Studien noch nicht beschrieben werden [169]. In dieser Arbeit konnte jedoch nicht nur gezeigt werden, dass CXCL14 in Thrombozyten vorhanden ist und nach Aktivierung an deren Oberfläche bindet, sondern auch, dass CXCL14 aus aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird und biologische

Funktionen erfüllt. Mithilfe von verschiedenen Methoden konnte CXCL14 in humanen und in murinen Thrombozyten nachgewiesen werden (Abbildung 8) sowie auch im Überstand von aktivierten Thrombozyten.

Das Signal von freigesetztem CXCL14 war per ELISA nicht quantifizierbar, da die Menge an freigesetztem CXCL14 aus 1×10^9 /ml unter der Nachweisgrenze des ELISAs von 125 pg/ml lag. Damit ist die freigesetzte Menge von CXCL14 deutlich geringer als die, in der Literatur beschriebene Menge an freigesetztem CXCL12 von etwa 500 pg/ml von 1×10^9 Thrombozyten [54].

Anzumerken ist hier, dass im Rahmen dieser Arbeit lediglich CXCL14 gemessen wurde und es sich bei CXCL12 um Ergebnisse anderer Experimentatoren handelt. Dieser quantitative Unterschied zwischen CXCL12 und CXCL14 könnte jedoch eine Erklärung dafür sein, dass nach geringeren CRP-XL Konzentrationen bereits Bindungssignale an der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten für CXCL12 zu beobachten ist und erst bei höheren Konzentrationen für CXCL14 (Abbildung 13). Die Detektion von CXCL14 nach Aktivierung auf der Thrombozyten Oberfläche kann auch ein Hinweis auf eine autokrine Wirkung sein. Da freigesetztes CXCL14 auch im Überstand von aktivierten Thrombozyten zu detektieren war, liegt auch eine biologische parakrine Wirkung auf andere Zellen nah.

So konnte im Verlauf dieser Arbeit das bekannte pro-inflammatorische Potenzial und der Beitrag von CXCL14 zur Immunabwehr weiter beschrieben werden. Durch eine Inkubation von CXCL14 mit humanen Monozyten wurde deren Phagozytose von *E. coli* Partikeln verstärkt. Außerdem migrierten isolierte humane Monozyten hin zu rekombinantem CXCL14 aber auch hin zu aktiviertem Thrombozytenüberstand. Die Rekrutierung von Monozyten in die direkte Umgebung von aktivierten Thrombozyten scheint durch CXCL14 vermittelt zu werden. Denn durch eine Antikörper-basierte Neutralisation von CXCL14 im Thrombozytenüberstand konnte die Monozyten Migration signifikant vermindert werden (Abbildung 15).

Außerdem konnten diese humanen Daten durch die Untersuchung der CXCL14 *Knock-out* (*cxcl14^{-/-}*) Maus bestätigt werden. Auch hier führte das Fehlen von CXCL14 zu einer verringerten Monozyten Migration zu aktivierten

Thrombozytenüberstand im Kontrast zu dem von Wildtyp Mäusen (Abbildung 11). Dieses Ergebnis ist nicht nur ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein von CXCL14 in Thrombozyten, sondern auch auf die biologische Relevanz von thrombozytärem CXCL14. All diese Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung des pro-inflammatorischen CXCL14 an der Aufrechterhaltung einer Entzündung schließen. Da CXCL14 nach Aktivierung von Thrombozyten freigesetzt wird, kann CXCL14 unmittelbar zur Thrombo-Inflammation beitragen.

Von Thrombozyten ist bereits bekannt, dass diese sowohl die Endothelaktivierung als auch die Heilung von Gefäßläsionen durch CXCL12-abhängige Endothelmigration und Neo-Endothelialisierung induzieren [26]. Shellenberger *et al.* konnten 2004 zeigen, dass CXCL14 das Wachstum und Gefäßen inhibiert [112]. Im Jahr 2017 wurde von Ojeda *et al.* ein inhibitorischer Effekt von CXCL14 auf Neuronen und Gefäße beschrieben, wobei CXCL14 eine CXCL12 vermittelte Gefäßneubildung beeinflusste [125]. Übertragen auf das thrombozytäre System konnte in Rahmen dieser vorliegenden Arbeit ebenfalls gezeigt werden, dass CXCL14 aus aktivierten Thrombozyten das Zusammenwachsen einer Endothelzellschicht inhibiert (Abbildung 19). Die parakrine Wirkung von thrombozytärem CXCL14 kann demnach zur Regulation von Entzündungsprozessen im direkten Umfeld einer Gefäßverletzung beitragen indem Monozyten angelockt werden und der Verschluss der Endothelzellschicht verzögert wird.

Rekombinantes CXCL14 selbst hat keinen Effekt auf die Aktivierung von Thrombozyten (Abbildung 20). Dennoch ist eine signifikante Reduktion in der Thrombusbildung im Perfusionsmodell bei *cxcl14^{-/-}* Mäusen im Vergleich zu deren Wildtyp Geschwistern zu beobachten (Abbildung 24). Da dieser Effekt durch die Zugabe von rekombinantem CXCL14 aufgehoben aber nicht verstärkt wurde (Abbildung 25), weist dies darauf hin, dass CXCL14 zwar keinen aktivierenden Effekt auf Thrombozyten an sich hat, wohl aber für eine normale Thrombusbildung und deren Regulation wichtig ist.

Die Rezeptor-Chemokin Bindung und deren damit vermittelte Effekte können auch durch Wechselwirkungen mit anderen Zytokinen oder Chemokinen

beeinflusst werden [170]. So könnte der nicht vorhandene Effekt von rekombinantem CXCL14 in murinem Vollblut und die verringerte Thrombusbildung in *cxcl14^{-/-}* Vollblut das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels mit einem anderen Chemokin sein. Im Jahr 2017 konnten Collins *et al.* eine starke Interaktion zwischen CXCL14 und CXCL12 bei der Bindung an den Chemokin Rezeptor CXCR4 beobachten. Sie zeigten auch eine hohe Bindungsaffinität von CXCL14 zu CXCR4 (KD $3,5 \times 10^{-8}$ M) und beschrieben CXCL14 als positiven allosterischen Modulator von CXCR4. Ein Effekt auf die Zellmigration über CXCR4, der allein durch CXCL14 vermittelt wird, konnte von dieser Gruppe aber nicht gezeigt werden. Zusammen mit CXCL12 übertraf die Zellmigration jedoch den alleinigen CXCL12-vermittelten Effekt [130]. Demnach könnte durch CXCL14 die Wirkung von CXCL12 nach der Bindung an CXCR4 verstärkt werden. Da sowohl isolierte Thrombozyten als auch Thrombozyten im Vollblut in Experimenten immer eine Quelle für CXCL12 darstellen, kann dieser Synergismus von CXCL14 und CXCL12 als zusätzlicher Faktor in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden. CXCL12 und die aus der Bindung an CXCR4 resultierende Aktivierung von Thrombozyten konnte bereits 2015 von Walsh *et al.* bei isolierten Thrombozyten und im Perfusionsmodell gezeigt werden [45]. Demnach könnte der positive allosterische Mechanismus zwischen CXCL14, CXCR4 und CXCL12 ein Grund für die verminderte Thrombusbildung im Blut von *cxcl14^{-/-}* Mäusen sein.

Ein anderer Ansatz zur Erklärung der erniedrigten *in vitro* Thrombusbildung in *cxcl14^{-/-}* Mäusen könnte eine veränderte Thrombozytenfunktionalität sein. Die Anzahl der α -Granula, die durch ihren Inhalt zur Aktivierung von Thrombozyten beitragen, die primäre Aggregation oder die Oberflächenexpression von P-Selektin, GPVI, GPV, GPIX, Integrin α -5 und Integrin β -3 waren in *cxcl14^{-/-}* Thrombozyten im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Abbildung 27 und Addendum Abbildung 40). Im Gegensatz zur unveränderten Anzahl von α -Granula konnte mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) jedoch eine signifikant geringere Anzahl von δ -Granula und eine signifikante Reduktion der ATP-Freisetzung aus *cxcl14^{-/-}* Thrombozyten beobachtet werden (Abbildung 26 und Abbildung 27). Dies könnte neben dem direkten autokrinen Einfluss ein

anderer möglicher Grund für die beeinträchtigte Thrombusbildung bei *cxcl14*^{-/-} Mäusen sein. Die Vorgänge der Biogenese von δ -Granula sind noch nicht eindeutig geklärt. Die Proteine BLOC-1 (*biogenesis of lysosome-related organelles complex 1*) und -2 sowie Adapter-Protein-Komplex-3 (AP-3) könnten hierbei eine Rolle spielen [171]. Ob CXCL14 jedoch an der Regulation dieser Proteine beteiligt ist, ist nicht bekannt und sollte das Ziel weiterer Forschungsarbeiten sein.

4.2 Effekte von CXCL14 werden durch den Chemokinrezeptor CXCR4 vermittelt

Obwohl CXCL14 in mehreren Aspekten von klinischer Bedeutung ist, ist der Rezeptor, über den CXCL14 seine beschriebenen Wirkungen entfaltet immer noch nicht eindeutig identifiziert. Da die Chemokine CXCL12 und CXCL14 sowie die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 in Wirbeltieren sehr stark konserviert sind, könnte dies auf eine evolutionär konservierte Wechselwirkung dieser Rezeptoren und Liganden hinweisen [120].

Zwar gibt es in der Literatur bereits beschriebene Hinweise auf die Interaktion von CXCL14 und CXCR4, diese werden jedoch kontrovers diskutiert. Bevor Collins *et al.* in 2017 die Bindung von CXCL14 an CXCR4 zeigten [130], wurde diese zuerst 2013 von Tanegashima *et al.* beschrieben [121]. Hier wurde jedoch eine hemmende Wirkung von CXCL14 auf die CXCL12-CXCR4 vermittelte Zellmigration beschrieben. Diese These stellten Otte *et al.* im Jahr 2014 in Frage, da sie keinen verminderten biologischen Effekt von CXCL14 auf die CXCL12-CXCR4 Achse beobachten konnten. Eine direkte Bindung von CXCL14 an CXCR4 wurde hier jedoch nicht untersucht [128].

CXCL14 wurde bereits als starkes chemotaktisches Signal auf iDCs oder humane Monozyten beschrieben [107, 112]. Da auch durch Experimente in dieser vorliegenden Arbeit bereits gezeigt wurde, dass humane Monozyten hin zu CXCL14 migrieren, wurde der Einfluss von CXCR4 auf die Migration mithilfe eines CXCR4-blockierenden Antikörpers untersucht. Eine Beteiligung von CXCR4 an der CXCL14 vermittelten Migration, nicht aber von CXCR7 konnte

hier gezeigt werden und bestätigt die These einer funktionellen CXCL14-CXCR4 Interaktion und biologischen Wirkung (Abbildung 29).

Da auch Thrombozyten CXCR4 exprimieren [172] und die aktive Migration von Thrombozyten hin zu Chemokinen wie CXCL12 beobachtet werden kann [153] wurden Trans-Well-Migrationsstudien mit murinen Thrombozyten durchgeführt. Hier konnte ein deutlicher Effekt von murinem rekombinantem CXCL14 auf die Migration von murinen Wildtypmäusen beobachtet werden (Abbildung 31). Um die Beteiligung von CXCR4 und CXCR7 auf die Chemokin-vermittelte Thrombozytenmigration zu untersuchen, wurden thrombozytenspezifische CXCR4 *Knock-out*- (*cxcr4^{-/-}*) beziehungsweise CXCR7 *Knock-out*- (*cxcr7^{-/-}*) Mäuse gezüchtet. Generiert wurden diese mithilfe des Cre-loxP Systems. Hierbei werden Mäuse mit zwei loxP-Flankierungen vor und nach dem zu entfernenden Genabschnitt mit Mäusen gekreuzt, die die Cre-Rekombinase durch einen megakaryozytären/Thrombozyten spezifischen Promotor (Pf4) exprimieren. Die Cre-Rekombinase sorgt für ein Überlagern der beiden loxP Seiten und ein Entfernen des flankierten Genabschnitts. Durch die Expression der Cre-Rekombinase in ausschließlich Thrombozyten generierenden Zellen kommt es nur in diesen zur Deletion des zu entfernenden Genabschnittes und damit zum Thrombozyten spezifischen *Knock-out* (Abbildung 6).

In den darauffolgenden Migrationsexperimenten kam es im Gegensatz zur dosisabhängigen CXCL14-vermittelten Migration von Wildtyp Thrombozyten zu einer signifikant verringerten Anzahl an migrierten *cxcr4^{-/-}* Thrombozyten nicht jedoch von *cxcr7^{-/-}* Thrombozyten (Abbildung 31). Neben der verminderten Monozyten Migration nach antikörperbasierter CXCR4 Blockade legt dies auch nach genetischer CXCR4 Deletion eine direkte Beteiligung von CXCR4 an CXCL14 vermittelten Funktionen nahe.

Da sich funktionelle Studien mit murinen *Knock-out* Zellen oftmals nicht genau auf humane Systeme übertragen lassen [173], wurden im Rahmen dieser Arbeit humane „*Knock-out* Thrombozyten“ generiert. Schon zuvor konnte gezeigt werden, dass funktionelle Aspekte gentechnisch veränderter Thrombozyten mithilfe von differenzierten CD34⁺ -Vorläuferzellen untersucht werden können

[174, 175]. Die Erzeugung stabiler genetisch veränderter Zelllinien, die Thrombozyten produzieren, ist jedoch immer noch schwierig und eine stabile Produktion von synthetischen Thrombozyten wären gerade in der Transfusionsmedizin von großem Interesse [176]. Die CRISPR/Cas9 Technologie (**C**lustered **R**egulatory **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats / **CRISPR**-assoziiertes Protein 9) stellt eine neue mögliche Methode dar, nicht nur *in vitro* generierte Thrombozyten für diagnostische oder eventuell therapeutische, sondern auch für investigative Zwecke zu nutzen. Dies konnten unter anderen Zhang *et al.* im Jahr 2016 durch Modifizierung von Allo-Antigenen auf humanen Thrombozyten zeigen [140]. Mithilfe der CRISPR/Cas9 Technik wurden in dieser vorliegenden Arbeit CXCR4 beziehungsweise CXCR7 in induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) genetisch ausgeknockt. Aus diesen iPSCs können nach einem etablierten Protokoll durch den Zusatz von verschiedenen Zytokinen und Wachstumshormonen über 28 Tage zuerst hämatopoetische Vorläufer Zellen (CD34⁺) in Suspension und schließlich Megakaryozyten (CD41⁺/CD42b⁺) generiert werden (Abbildung 34). Im Laufe der Differenzierung kann man mithilfe von Konfokal-Mikroskopie ein Größenwachstum der Suspensionszellen, ein Polyploidie und das Ausformen von CD42b-positiven Protrusionen erkennen, was auf Thrombozyten-produzierende Megakaryozyten hinweist (Abbildung 33).

Im Überstand der Zellkulturen befinden sich abgeschnürte CD42b-positive Partikel, die in ihrer Größe und Granularität (FSC/SSC) in der Durchflusszytometrie den natürlich vorkommenden Thrombozyten entsprechen. Auch sind diese *in vitro* Thrombozyten durch ADP aktivierbar, was an der Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers PAC-1 (aktiviertes Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) zu detektieren war (Abbildung 34). Durch den Einsatz dieser *in vitro* generierten humanen Thrombozyten in Migrationsexperimenten konnte zum einen gezeigt werden, dass auch diese humanen Thrombozyten in Richtung der rekombinanten Chemokine CXCL12 und CXCL14 migrierten. In Kontrast hierzu wurden Thrombozyten, die aus *cxcr4*^{-/-} iPSCs generiert wurden, chemotaktisch nicht von CXCL12 und CXCL14 angezogen (Abbildung 35). Aus *cxcr7*^{-/-} iPSCs gingen im Rahmen der Differenzierung zu Megakaryozyten hingegen Thrombozyten hervor, die ebenfalls zu Chemokinen migrierten.

Diese Experimente bestätigen den Befund aus dem Thrombozyten Migrationsmodell mit murinen Zellen auf einer Ebene mit humanen Zellen. Sie zeigen, dass CXCR4 ein wichtiger Rezeptor für die CXCL12- beziehungsweise für die CXCL14-vermittelte Thrombozyten Migration ist. Außerdem zeigen sie die praktische Anwendung eines Technologietransfers von einem murinen Thrombozyten-*Knock-out* Modell auf ein humanes Thrombozyten-*Knock-out* Modell.

Neben den *in vitro* Migrationsexperimenten von murinen Thrombozyten hin zu rekombinanten Proteinen wurde im Peritonitis Modell untersucht, ob Thrombozyten zu einem Inflammationsherd migrieren. Hierbei wird Wildtyp- und CXCR4 *Knock-out* Mäusen 4 %-iges Thioglykolat intraperitoneal injiziert und so eine standardisierte Entzündung hervorgerufen. Nach 24 Stunden sind signifikant mehr Thrombozyten in der intraperitonealen Flüssigkeit mithilfe der Durchflusszytometrie zu detektieren (Abbildung 38). Dies war bereits in der Literatur beschrieben und damit die Positivkontrolle des gleichen Versuch Ansatzes mit *cxcr4^{-/-}* Thrombozyten [166]. Diese CXCR4 *Knock-out* Thrombozyten migrierten bei gleichem Versuchsansatz in signifikant geringerem Ausmaß im Vergleich zu Wildtyp Thrombozyten. Das Ergebnis untermauert die CXCR4 abhängige Thrombozyten Migration. Zwar ist in dem Peritonitis Modell kein direkter Bezug zu CXCL14 und CXCR4 gegeben, aber es konnte erstmals die CXCR4 abhängige Thrombozyten Migration *in vivo* im Kontext einer Entzündung gezeigt werden.

4.3 Thrombozytäres CXCL14 interagiert mit dem Chemokinrezeptor CXCR4

Um die These der CXCL14-CXCR4 Interaktion weiter zu untersuchen, wurden Ko-Immunopräzipitationen durchgeführt.

Bereits im Jahr 2013 wurde von Tanegeshima *et al.* die Bindung von *Flag-Tag* markiertem CXCR4 und radioaktiv markiertem CXCL14 mithilfe der Ko-Immunopräzipitation in HEK293-Zelllysate dargestellt [121]. Ähnlich wie in der veröffentlichten Arbeit von Tanegeshima *et al.* konnte eine Bindung von CXCL14 und CXCR4 in HEK293-Zelllysate im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Im Gegensatz zu radioaktivem rekombinantem CXCL14 wie in der Veröffentlichung von Tanegeshima *et al.*, wurde hier jedoch 6-His-tag markiertes CXCL14 nachgewiesen, welches nach Plasmid-Transfektion von HEK293 Zellen endogen exprimiert wurde. Nach CXCR4-GFP-tag Plasmid Transfektion derselben Zellen konnte in Ko-Immunopräzipitationen die Bindung zwischen CXCL14 und GFP-tag markierten und zwischen CXCR4 und 6xHis-tag markierten Proteinen in Western-Blots gezeigt werden (Abbildung 36). Dies ist eine weitere Bestätigung der Bindung zwischen CXCL14 und CXCR4, wenn auch in einem sehr artifiziellen System, indem eine Zelle zur Überexpression von zwei Proteinen gebracht wird. In einem physiologischeren Ansatz wurde das Kernthema dieser Arbeit, Freisetzung von thrombozytärem CXCL14 und dessen Wechselwirkung mit Oberflächenproteinen auf Thrombozyten mithilfe von Ko-Immunopräzipitationen untersucht.

Wie in Abbildung 12 gezeigt, ist nach der Aktivierung von Thrombozyten mit verschiedenen Agonisten auf der Zelloberfläche in durchflusszytometrischen Experimenten ein erhöhtes CXCL14-Signal nachzuweisen. Daher wurde für weitere Ko-Immunopräzipitationen das Lysat aktivierter Thrombozyten verwendet, um die Chemokin-Rezeptor Interaktion zu untersuchen. Hier konnte ein spezifisches Signal im Immunoblot für CXCL14 bei Proben gezeigt werden, die mit anti-CXCR4 Antikörper inkubiert wurden. Entsprechend konnte ein CXCR4 Signal in Proben detektiert werden, die mit anti-CXCL14 Antikörper behandelt wurden. Eine Interaktion zwischen CXCL14 und CXCR4 konnte hier demnach auch bei aktivierten Thrombozyten gezeigt werden (Abbildung 36).

Um die vorangegangenen Experimente, die eine Bindung zwischen CXCL14 und CXCR4 zeigen, weiter zu bestätigen, wurden Konfokal-Aufnahmen von aktivierten Thrombozyten angefertigt. Hier konnte eine Überlagerung der CXCL14- und CXCR4 Signalen beobachtet werden nicht jedoch zwischen CXCL14- und CXCR7 Signalen (Abbildung 37). Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine Interaktion zwischen CXCL14 und dem Rezeptor CXCR4 in aktivierten Thrombozyten.

Wie beschrieben, haben Collins *et al.* bei der Bindung an den CXCR4 bereits eine Interaktion zwischen CXCL14 und CXCL12 beobachten können [130]. Auch andere Signalstoffe können durch die Hetero-Dimerisierung mit Chemokinen, wie CXCL4 und CXCL12 oder CXCL7 und CXCL12 zu einer funktionellen Rezeptor-vermittelten Wirkung führen [177].

Da Thrombozyten eine Vielzahl von Chemokinen, Cytokinen oder anderen Signalpeptiden enthalten, freisetzen und binden, muss die genaue Art des Zusammenspiels von CXCL14 und CXCR4 deshalb noch weiter untersucht werden. Diese Arbeit trägt jedoch einen ersten Teil zum ersten Grundverständnis der CXCL14/CXCR4 Achse in Thrombozyten bei.

5 Zusammenfassung

Die physiologische Hauptfunktion von Thrombozyten ist die Aufrechterhaltung der Hämostase. Neben den gut erforschten physiologischen Prozessen drängt das Zusammenspiel zwischen Thrombozyten und Entzündungsvorgängen immer mehr in den Fokus von Forschungsarbeiten. Bei der sogenannten Thrombo-Inflammation hängen thrombotische und entzündliche Prozesse eng miteinander zusammen [77, 78].

Die vorgelegte Arbeit beschreibt die Expression und Freisetzung des Chemokins CXCL14 aus aktivierten Thrombozyten sowie dessen parakrine Wirkung auf Entzündungszellen, Endothelzellen und auf Thrombozyten selbst. Ziel war es, den Beitrag von thrombozytärem CXCL14 zu inflammatorischen Prozessen näher zu beleuchten und den Rezeptor für thrombozytäres CXCL14 zu identifizieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass humane sowie murine Thrombozyten CXCL14 exprimieren und dass nach Aktivierung mit verschiedenen Agonisten auf der Thrombozyten Oberfläche vermehrt CXCL14 präsentiert wird. Freigesetztes thrombozytäres CXCL14 wirkt chemotaktisch auf humane und murine Monozyten und vermittelt diesen Effekt über den Chemokinrezeptor CXCR4. Weitere pro-inflammatorische Eigenschaften von CXCL14, wie die Stimulation der monozytären Phagozytose von *E.coli* Partikeln konnten gezeigt werden. Außerdem hemmt rekombinantes aber auch thrombozytäres CXCL14 die Proliferation von humanen Endothelzellen. Obwohl rekombinantes CXCL14 weder alleine, noch in Ko-Inkubation mit aktivierenden Agonisten die Thrombozyten Aktivierung beeinflusst, ist die *in vitro* Thrombusbildung im Blut von *cxcl14^{-/-}* Mäusen im Vergleich zum Wildtyp signifikant vermindert. Als eine Ursache hierfür konnte eine geringere Anzahl an δ -Granula in *cxcl14^{-/-}* Thrombozyten und eine damit verbundene reduzierte ATP-Freisetzung identifiziert werden. Neben der Monozyten Migration beeinflusst CXCL14 chemotaktisch auch die Migration von Thrombozyten. Durch die Verwendung von Thrombozyten spezifischen CXCR4- und CXCR7-*Knock-out* Mäusen konnte in weiteren Migrationsexperimenten dargestellt werden, dass CXCR4 der verantwortliche Rezeptor für die CXCL14 vermittelte Migration der Thrombozyten ist. Zusätzlich zum murinen Modell konnte im Rahmen dieser

Arbeit die CXCR4 abhängige CXCL14 vermittelte Thrombozyten Migration weiter mit *in vitro* generierten humanen CXCR4- und CXCR7-Knock-out Thrombozyten bestätigt werden. Weiterhin konnte eine direkte Interaktion von CXCL14 mit CXCR4 auf aktivierten Thrombozyten mithilfe der Konfokal Mikroskopie identifiziert werden sowie durch die Durchführung von Ko-Immünpräzipitationsstudien mit aktivierten Thrombozyten. Ko-Immünpräzipitationsstudien mit CXCL14 und CXCR4 überexprimierenden Zellen führten ebenfalls zum Ergebnis der Interaktion der beiden Proteine. So konnte neben der Erstbeschreibung von CXCL14 aus Thrombozyten die Interaktion zwischen CXCL14 und CXCR4 in Thrombozyten und die biologische, pro-inflammatorische Wirkung dieser Bindung gezeigt werden.

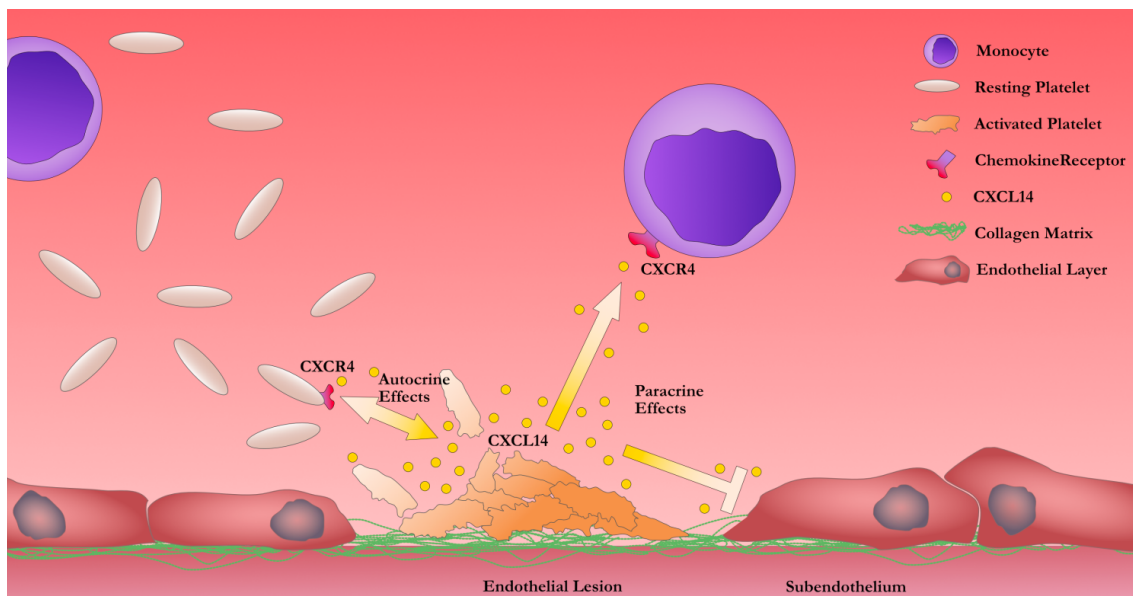


Abbildung 39. Schematische Abbildung der Hypothese für thrombozytäres CXCL14: Das thrombozytäre Chemokin CXCL14 wird nach Aktivierung freigesetzt und wirkt chemotaktisch parakrin auf Monozyten und Thrombozyten über den Rezeptor CXCR4. Außerdem hemmt CXCL14 das Wachstum von humanen Endothelzellen und kann so zur Regulation von Entzündungsprozessen beitragen. CXCL14 scheint außerdem eine Rolle in der Regulation im Thrombus Aufbau zu spielen.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit tragen unmittelbar zum besseren Verständnis von Thrombozyten beeinflussten Entzündungsprozessen bei. So können die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit möglicherweise bei der Entwicklung neuer Medikamente oder Therapieformen thrombozytär bedingter Erkrankungen in der Zukunft eine wichtige Rolle spielen.

6 Literaturverzeichnis

1. Roth, G.A., et al., *Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015*. J Am Coll Cardiol, 2017. **70**(1): p. 1-25.
2. Koenen, R.R., et al., *Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice*. Nat Med, 2009. **15**(1): p. 97-103.
3. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
4. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3378-84.
5. Brewer, D.B., *Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet*. Br J Haematol, 2006. **133**(3): p. 251-8.
6. Gerrard, J.M., J.G. White, and D.A. Peterson, *The platelet dense tubular system: its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux*. Thromb Haemost, 1978. **40**(2): p. 224-31.
7. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 517-29.
8. Braun, A., et al., *STIM and Orai in hemostasis and thrombosis*. Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 2144-60.
9. Gaertner, F. and S. Massberg, *Patrolling the vascular borders: platelets in immunity to infection and cancer*. Nat Rev Immunol, 2019.
10. Szalai, G., A.C. LaRue, and D.K. Watson, *Molecular mechanisms of megakaryopoiesis*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(21): p. 2460-76.
11. Machlus, K.R. and J.E. Italiano, Jr., *The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation*. J Cell Biol, 2013. **201**(6): p. 785-96.
12. Romano, C.M., et al., *Inter- and intra-host viral diversity in a large seasonal DENV2 outbreak*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70318.
13. Kaushansky, K., et al., *Thrombopoietin, the Mp1 ligand, is essential for full megakaryocyte development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3234-8.
14. WRIGHT, J.H., *The Origin and Nature of the Blood Plates*. The Boston Medical and Surgical Journal, 1906. **154**(23): p. 643-645.
15. Rendu, F. and B. Brohard-Bohn, *The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions*. Platelets, 2001. **12**(5): p. 261-73.
16. Tablin, F., M. Castro, and R.M. Leven, *Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation*. J Cell Sci, 1990. **97 (Pt 1)**: p. 59-70.
17. Mason, K.D., et al., *Programmed anuclear cell death delimits platelet life span*. Cell, 2007. **128**(6): p. 1173-86.
18. Lindemann, S. and M. Gawaz, *The active platelet: translation and protein synthesis in an anucleate cell*. Semin Thromb Hemost, 2007. **33**(2): p. 144-50.
19. Grozovsky, R., K.M. Hoffmeister, and H. Falet, *Novel clearance mechanisms of platelets*. Curr Opin Hematol, 2010. **17**(6): p. 585-9.

20. Hou, Y., et al., *Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis*. J Biomed Res, 2015. **29**.
21. Cesarman-Maus, G. and K.A. Hajjar, *Molecular mechanisms of fibrinolysis*. Br J Haematol, 2005. **129**(3): p. 307-21.
22. Falati, S., C.E. Edmead, and A.W. Poole, *Glycoprotein Ib-V-IX, a receptor for von Willebrand factor, couples physically and functionally to the Fc receptor gamma-chain, Fyn, and Lyn to activate human platelets*. Blood, 1999. **94**(5): p. 1648-56.
23. Clemetson, K.J., *Platelets and primary haemostasis*. Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 220-4.
24. Broos, K., et al., *Platelets at work in primary hemostasis*. Blood Rev, 2011. **25**(4): p. 155-67.
25. Nieswandt, B. and S.P. Watson, *Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?* Blood, 2003. **102**(2): p. 449-61.
26. Gawaz, M., *Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 498-511.
27. Zhou, G., M.W. Fan, and J.Y. Liu, *[Effects of glucocorticoids on T helper cells balance in oral lichen planus]*. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2005. **40**(2): p. 98-101.
28. Nieswandt, B., D. Varga-Szabo, and M. Elvers, *Integrins in platelet activation*. J Thromb Haemost, 2009. **7 Suppl 1**: p. 206-9.
29. Lee, H.S., et al., *RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences*. J Biol Chem, 2009. **284**(8): p. 5119-27.
30. Tao, L., et al., *Recent advances in the understanding of the molecular mechanisms regulating platelet integrin alphaIIb beta3 activation*. Protein Cell, 2010. **1**(7): p. 627-37.
31. Lee, D., et al., *Differential dynamics of platelet contact and spreading*. Biophys J, 2012. **102**(3): p. 472-82.
32. Bearer, E.L., J.M. Prakash, and Z. Li, *Actin dynamics in platelets*. Int Rev Cytol, 2002. **217**: p. 137-82.
33. Li, Z., E.S. Kim, and E.L. Bearer, *Arp2/3 complex is required for actin polymerization during platelet shape change*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4466-74.
34. Stenberg, P.E., et al., *Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets*. J Cell Biol, 1984. **98**(2): p. 748-60.
35. Ginsberg, M.H., L. Taylor, and R.G. Painter, *The mechanism of thrombin-induced platelet factor 4 secretion*. Blood, 1980. **55**(4): p. 661-8.
36. Koseoglu, S. and R. Flaumenhaft, *Advances in platelet granule biology*. Curr Opin Hematol, 2013. **20**(5): p. 464-71.
37. Berry, S., et al., *The role of microtubules in platelet secretory release*. Biochim Biophys Acta, 1989. **1012**(1): p. 46-56.
38. Chen, D., et al., *Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense core granule release*. Blood, 2000. **95**(3): p. 921-9.
39. Lemons, P.P., et al., *Regulated secretion in platelets: identification of elements of the platelet exocytosis machinery*. Blood, 1997. **90**(4): p. 1490-500.

40. Gremmel, T., A.L. Frelinger, 3rd, and A.D. Michelson, *Platelet Physiology*. Semin Thromb Hemost, 2016. **42**(3): p. 191-204.
41. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates*. Blood Rev, 2009. **23**(4): p. 177-89.
42. Kahner, B.N., et al., *Nucleotide receptor signaling in platelets*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(11): p. 2317-26.
43. Lievens, D. and P. von Hundelshausen, *Platelets in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2011. **106**(5): p. 827-38.
44. Ciferri, S., et al., *Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation*. Thromb Haemost, 2000. **83**(1): p. 157-64.
45. Walsh, T.G., M.T. Harper, and A.W. Poole, *SDF-1alpha is a novel autocrine activator of platelets operating through its receptor CXCR4*. Cell Signal, 2015. **27**(1): p. 37-46.
46. Kimata, H., et al., *RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha selectively enhance immunoglobulin (IgE) and IgG4 production by human B cells*. J Exp Med, 1996. **183**(5): p. 2397-402.
47. Reichel, C.A., et al., *Ccl2 and Ccl3 mediate neutrophil recruitment via induction of protein synthesis and generation of lipid mediators*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(11): p. 1787-93.
48. von Hundelshausen, P., et al., *RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium*. Circulation, 2001. **103**(13): p. 1772-7.
49. Scheuerer, B., et al., *The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages*. Blood, 2000. **95**(4): p. 1158-66.
50. Nassar, T., et al., *Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 6187-93.
51. Gleissner, C.A., *Platelet-derived chemokines in atherogenesis: what's new?* Curr Vasc Pharmacol, 2012. **10**(5): p. 563-9.
52. Stellos, K., et al., *Expression of platelet-bound stromal cell-derived factor-1 in patients with non-valvular atrial fibrillation and ischemic heart disease*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(1): p. 49-55.
53. Elvers, M., et al., *Intracellular cyclophilin A is an important Ca(2+) regulator in platelets and critically involved in arterial thrombus formation*. Blood, 2012. **120**(6): p. 1317-26.
54. Strussmann, T., et al., *Platelets are a previously unrecognized source of MIF*. Thromb Haemost, 2013. **110**(5): p. 1004-13.
55. Wirtz, T.H., et al., *Platelet-derived MIF: a novel platelet chemokine with distinct recruitment properties*. Atherosclerosis, 2015. **239**(1): p. 1-10.
56. Santos-Martinez, M.J., et al., *Role of metalloproteinases in platelet function*. Thromb Res, 2008. **121**(4): p. 535-42.
57. Chung, A.W., et al., *Platelet-leukocyte aggregation induced by PAR agonists: regulation by nitric oxide and matrix metalloproteinases*. Br J Pharmacol, 2004. **143**(7): p. 845-55.
58. Bezuidenhout, L., et al., *Ang-2 and PDGF-BB cooperatively stimulate human peripheral blood monocyte fibrinolysis*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(6): p. 1496-503.
59. Krettek, A., et al., *Expression of PDGF receptors and ligand-induced migration of partially differentiated human monocyte-derived*

- macrophages. *Influence of IFN-gamma and TGF-beta*. *Atherosclerosis*, 2001. **156**(2): p. 267-75.
60. Takimoto, T., et al., *Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development*. *J Immunol*, 2010. **185**(2): p. 842-55.
 61. Warner, G.L., D.O. Nelson, and D.W. Scott, *Synergy between TGF-beta and anti-IgM in growth inhibition of CD5+ B-cell lymphomas*. *Ann N Y Acad Sci*, 1992. **651**: p. 274-6.
 62. Silverstein, R.L. and R.L. Nachman, *Thrombospondin binds to monocytes-macrophages and mediates platelet-monocyte adhesion*. *J Clin Invest*, 1987. **79**(3): p. 867-74.
 63. Lopez-Dee, Z., K. Pidcock, and L.S. Gutierrez, *Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation*. *Mediators Inflamm*, 2011. **2011**: p. 296069.
 64. Chauhan, A.K., et al., *ADAMTS13: a new link between thrombosis and inflammation*. *J Exp Med*, 2008. **205**(9): p. 2065-74.
 65. Zhao, B.Q., et al., *von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke*. *Blood*, 2009. **114**(15): p. 3329-34.
 66. O'Connell, P.J., et al., *A novel form of immune signaling revealed by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic cells and T cells*. *Blood*, 2006. **107**(3): p. 1010-7.
 67. Leon-Ponte, M., G.P. Ahern, and P.J. O'Connell, *Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor*. *Blood*, 2007. **109**(8): p. 3139-46.
 68. Evangelista, V., et al., *Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte adhesion and platelet-dependent leukocyte activation*. *Thromb Haemost*, 2005. **94**(3): p. 568-77.
 69. Riegel, A.K., et al., *Selective induction of endothelial P2Y6 nucleotide receptor promotes vascular inflammation*. *Blood*, 2011. **117**(8): p. 2548-55.
 70. Mannaioni, P.F., M.G. Di Bello, and E. Masini, *Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine*. *Inflamm Res*, 1997. **46**(1): p. 4-18.
 71. Lindemann, S., et al., *Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis*. *J Cell Biol*, 2001. **154**(3): p. 485-90.
 72. Hawrylowicz, C.M., G.L. Howells, and M. Feldmann, *Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production*. *J Exp Med*, 1991. **174**(4): p. 785-90.
 73. Yao, C., et al., *Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion*. *Nat Med*, 2009. **15**(6): p. 633-40.
 74. Sakata, D., C. Yao, and S. Narumiya, *Emerging roles of prostanoids in T cell-mediated immunity*. *IUBMB Life*, 2010. **62**(8): p. 591-6.
 75. Morrell, C.N., et al., *Regulation of platelet granule exocytosis by S-nitrosylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(10): p. 3782-7.
 76. Simon, D.I., et al., *Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. *J Exp Med*, 2000. **192**(2): p. 193-204.

77. Palacios-Acedo, A.L., et al., *Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating With the Enemy*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1805.
78. May, A.E., P. Seizer, and M. Gawaz, *Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. s5-10.
79. Nieswandt, B., C. Kleinschnitz, and G. Stoll, *Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease?* J Physiol, 2011. **589**(17): p. 4115-23.
80. Stoll, G. and B. Nieswandt, *Thrombo-inflammation in acute ischaemic stroke - implications for treatment*. Nat Rev Neurol, 2019. **15**(8): p. 473-481.
81. Gruys, E., et al., *Acute phase reaction and acute phase proteins*. J Zhejiang Univ Sci B, 2005. **6**(11): p. 1045-56.
82. Aggrey, A.A., et al., *Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria*. J Immunol, 2013. **190**(9): p. 4685-91.
83. Aslam, R., et al., *Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo*. Blood, 2006. **107**(2): p. 637-41.
84. Koupenova, M., et al., *The role of platelets in mediating a response to human influenza infection*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1780.
85. Gaertner, F., et al., *Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria*. Cell, 2017. **171**(6): p. 1368-1382 e23.
86. Larsen, E., et al., *PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes*. Cell, 1989. **59**(2): p. 305-12.
87. Diacovo, T.G., et al., *Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules*. Science, 1996. **273**(5272): p. 252-5.
88. Frenette, P.S., et al., *Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7450-4.
89. Gleissner, C.A., P. von Hundelshausen, and K. Ley, *Platelet chemokines in vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(11): p. 1920-7.
90. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
91. von Hundelshausen, P. and M.M. Schmitt, *Platelets and their chemokines in atherosclerosis-clinical applications*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 294.
92. Boring, L., et al., *Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 894-7.
93. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 565-8.
94. Campos, R.G., *Securing information on funding sources for nursing research*. J Nurs Adm, 1976. **6**(8): p. 16-8, 54.
95. Moser, B., et al., *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. Trends Immunol, 2004. **25**(2): p. 75-84.
96. Beck-Sickinger, A.G. and N. Panitz, *Semi-synthesis of chemokines*. Curr Opin Chem Biol, 2014. **22**: p. 100-7.

97. Strieter, R.M., et al., *The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 27348-57.
98. Hromas, R., et al., *Cloning of BRAK, a novel divergent CXC chemokine preferentially expressed in normal versus malignant cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **255**(3): p. 703-6.
99. Sleeman, M.A., et al., *B cell- and monocyte-activating chemokine (BMAC), a novel non-ELR alpha-chemokine*. Int Immunol, 2000. **12**(5): p. 677-89.
100. Cao, X., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel CXC chemokine macrophage inflammatory protein-2 gamma chemoattractant for human neutrophils and dendritic cells*. J Immunol, 2000. **165**(5): p. 2588-95.
101. Meuter, S. and B. Moser, *Constitutive expression of CXCL14 in healthy human and murine epithelial tissues*. Cytokine, 2008. **44**(2): p. 248-55.
102. Frederick, M.J., et al., *In vivo expression of the novel CXC chemokine BRAK in normal and cancerous human tissue*. Am J Pathol, 2000. **156**(6): p. 1937-50.
103. Schwarze, S.R., et al., *Modulation of CXCL14 (BRAK) expression in prostate cancer*. Prostate, 2005. **64**(1): p. 67-74.
104. Wenthe, M.N., et al., *CXCL14 expression and potential function in pancreatic cancer*. Cancer Lett, 2008. **259**(2): p. 209-17.
105. Fazi, B., et al., *The Expression of the Chemokine CXCL14 Correlates with Several Aggressive Aspects of Glioblastoma and Promotes Key Properties of Glioblastoma Cells*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(10).
106. Salogni, L., et al., *Activin A induces dendritic cell migration through the polarized release of CXC chemokine ligands 12 and 14*. Blood, 2009. **113**(23): p. 5848-56.
107. Kurth, I., et al., *Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAK) in macrophage development*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 855-61.
108. Schaerli, P., et al., *Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation*. Immunity, 2005. **23**(3): p. 331-42.
109. Mokhtar, N.M., et al., *Progestin regulates chemokine (C-X-C motif) ligand 14 transcript level in human endometrium*. Mol Hum Reprod, 2010. **16**(3): p. 170-7.
110. Starnes, T., et al., *The chemokine CXCL14 (BRAK) stimulates activated NK cell migration: implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy*. Exp Hematol, 2006. **34**(8): p. 1101-5.
111. Meuter, S., et al., *Murine CXCL14 is dispensable for dendritic cell function and localization within peripheral tissues*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(3): p. 983-92.
112. Shellenberger, T.D., et al., *BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells*. Cancer Res, 2004. **64**(22): p. 8262-70.
113. Maerki, C., et al., *Potent and broad-spectrum antimicrobial activity of CXCL14 suggests an immediate role in skin infections*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 507-14.

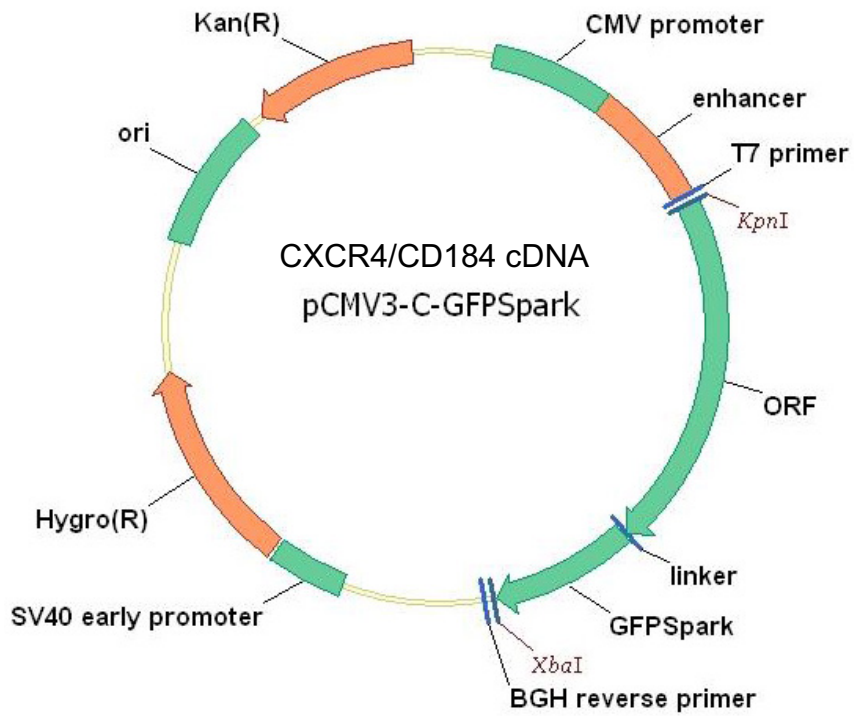
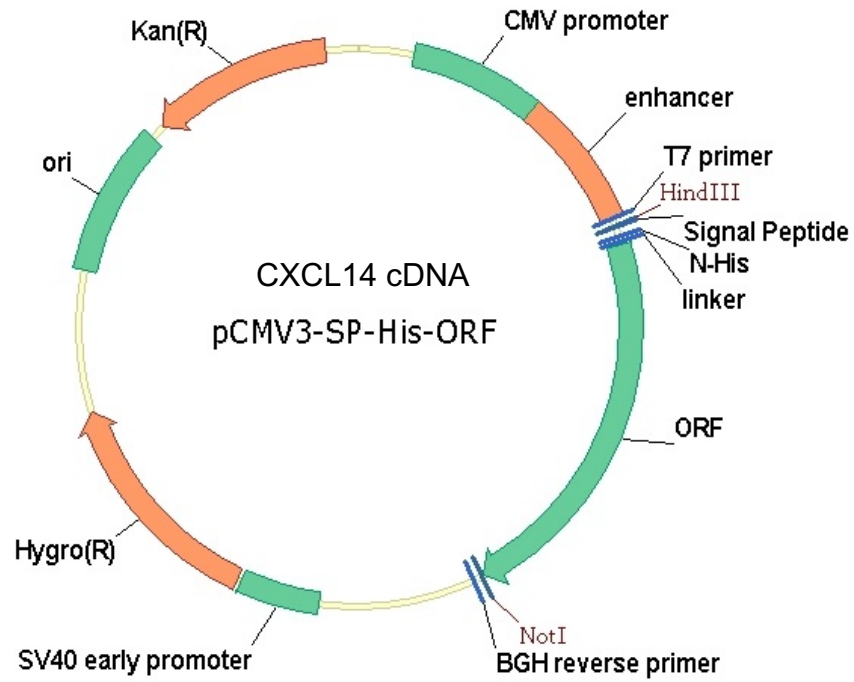
114. Dai, C., et al., *CXCL14 displays antimicrobial activity against respiratory tract bacteria and contributes to clearance of Streptococcus pneumoniae pulmonary infection*. J Immunol, 2015. **194**(12): p. 5980-9.
115. Tanegashima, K., et al., *CXCL14 deficiency in mice attenuates obesity and inhibits feeding behavior in a novel environment*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10321.
116. Nara, N., et al., *Disruption of CXC motif chemokine ligand-14 in mice ameliorates obesity-induced insulin resistance*. J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 30794-803.
117. Bacon, K.B. and J.K. Harrison, *Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis*. J Neuroimmunol, 2000. **104**(1): p. 92-7.
118. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *The chemokine superfamily revisited*. Immunity, 2012. **36**(5): p. 705-16.
119. DeVries, M.E., et al., *Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 401-15.
120. Huising, M.O., et al., *Three novel carp CXC chemokines are expressed early in ontogeny and at nonimmune sites*. Eur J Biochem, 2004. **271**(20): p. 4094-106.
121. Tanegashima, K., et al., *CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis*. FEBS Lett, 2013. **587**(12): p. 1731-5.
122. Hayashi, Y., et al., *CXCL14 and MCP1 are potent trophic factors associated with cell migration and angiogenesis leading to higher regenerative potential of dental pulp side population cells*. Stem Cell Res Ther, 2015. **6**: p. 111.
123. Huising, M.O., et al., *Molecular evolution of CXC chemokines: extant CXC chemokines originate from the CNS*. Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 307-13.
124. Garcia-Andres, C. and M. Torres, *Comparative expression pattern analysis of the highly conserved chemokines SDF1 and CXCL14 during amniote embryonic development*. Dev Dyn, 2010. **239**(10): p. 2769-77.
125. Ojeda, A.F., R.P. Munjaal, and P.Y. Lwigale, *Knockdown of CXCL14 disrupts neurovascular patterning during ocular development*. Dev Biol, 2017. **423**(1): p. 77-91.
126. Kofuku, Y., et al., *Structural basis of the interaction between chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 and its G-protein-coupled receptor CXCR4*. J Biol Chem, 2009. **284**(50): p. 35240-50.
127. Tanegashima, K., et al., *Dimeric peptides of the C-terminal region of CXCL14 function as CXCL12 inhibitors*. FEBS Lett, 2013. **587**(23): p. 3770-5.
128. Otte, M., et al., *CXCL14 is no direct modulator of CXCR4*. FEBS Lett, 2014. **588**(24): p. 4769-75.
129. Haribabu, B., et al., *Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28726-31.
130. Collins, P.J., et al., *Epithelial chemokine CXCL14 synergizes with CXCL12 via allosteric modulation of CXCR4*. FASEB J, 2017. **31**(7): p. 3084-3097.

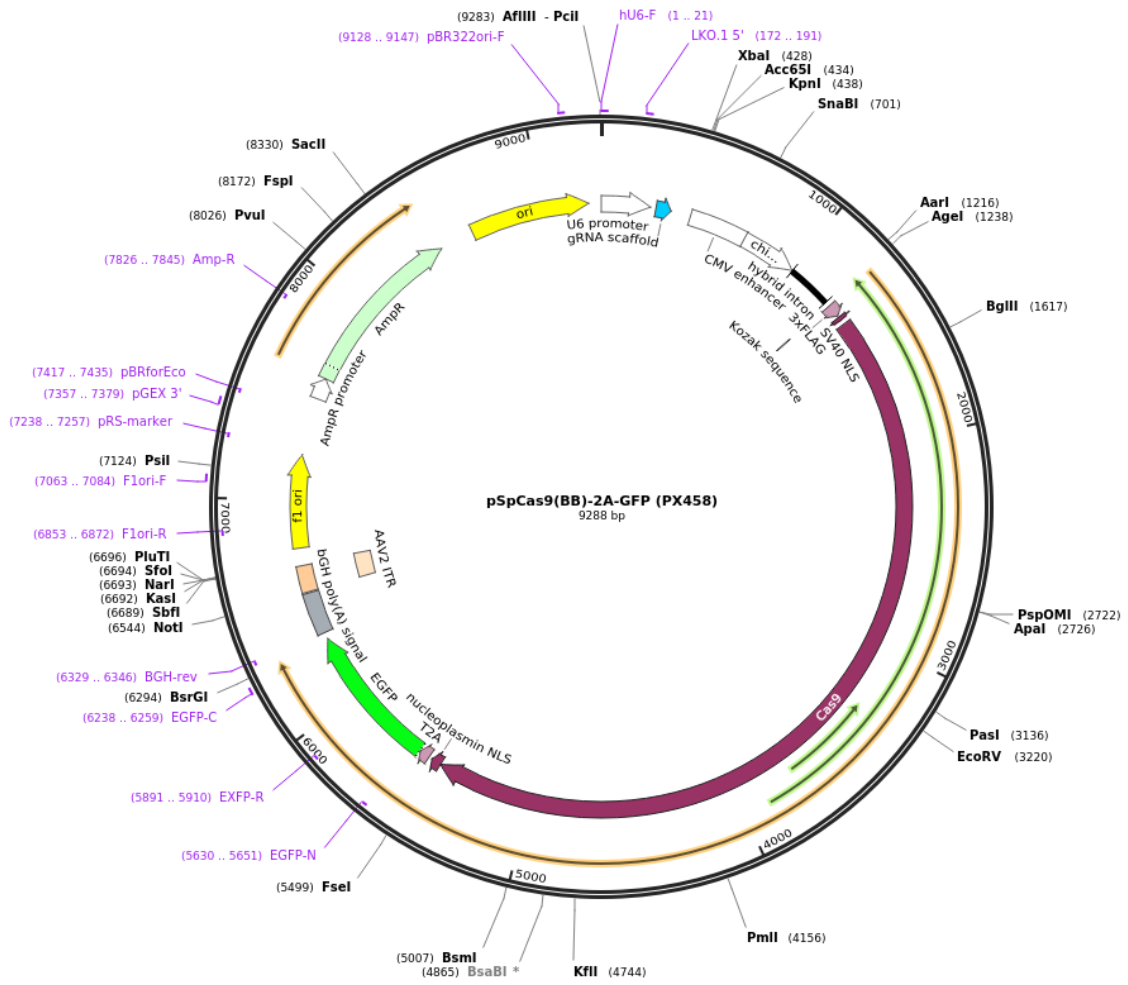
131. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
132. Park, I.H., et al., *Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors*. Nature, 2008. **451**(7175): p. 141-6.
133. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
134. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
135. Tonge, P.D., et al., *Divergent reprogramming routes lead to alternative stem-cell states*. Nature, 2014. **516**(7530): p. 192-7.
136. Marion, R.M., et al., *A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1149-53.
137. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(1): p. 101-6.
138. Lu, S.J., et al., *Platelets generated from human embryonic stem cells are functional in vitro and in the microcirculation of living mice*. Cell Res, 2011. **21**(3): p. 530-45.
139. Feng, Q., et al., *Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells*. Stem Cell Reports, 2014. **3**(5): p. 817-31.
140. Zhang, N., et al., *CRISPR/Cas9-mediated conversion of human platelet alloantigen allotypes*. Blood, 2016. **127**(6): p. 675-80.
141. Ishino, Y., et al., *Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product*. J Bacteriol, 1987. **169**(12): p. 5429-33.
142. Barrangou, R., *The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond*. Curr Opin Immunol, 2015. **32**: p. 36-41.
143. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
144. Barrangou, R., et al., *CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes*. Science, 2007. **315**(5819): p. 1709-12.
145. Hsu, P.D., E.S. Lander, and F. Zhang, *Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering*. Cell, 2014. **157**(6): p. 1262-78.
146. Deltcheva, E., et al., *CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III*. Nature, 2011. **471**(7340): p. 602-7.
147. Mojica, F.J., et al., *Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 3): p. 733-40.
148. Moore, J.K. and J.E. Haber, *Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 2164-73.
149. Chatterjee, M., et al., *SDF-1alpha induces differential trafficking of CXCR4-CXCR7 involving cyclophilin A, CXCR7 ubiquitination and promotes platelet survival*. FASEB J, 2014. **28**(7): p. 2864-78.
150. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.

151. Ran, F.A., et al., *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. Nat Protoc, 2013. **8**(11): p. 2281-2308.
152. Walker, B., et al., *Impact of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 on platelet dense granule biogenesis and secretion*. J Thromb Haemost, 2015. **13**(7): p. 1325-34.
153. Kraemer, B.F., et al., *PI3 kinase-dependent stimulation of platelet migration by stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*. J Mol Med (Berl), 2010. **88**(12): p. 1277-88.
154. Pleines, I., et al., *Multiple alterations of platelet functions dominated by increased secretion in mice lacking Cdc42 in platelets*. Blood, 2010. **115**(16): p. 3364-73.
155. Borst, O., et al., *The serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) influences platelet calcium signaling and function by regulation of Orai1 expression in megakaryocytes*. Blood, 2012. **119**(1): p. 251-61.
156. Flynn, M.C., et al., *Monocytes, Macrophages, and Metabolic Disease in Atherosclerosis*. Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 666.
157. Kantari, C., M. Pederzoli-Ribeil, and V. Witko-Sarsat, *The role of neutrophils and monocytes in innate immunity*. Contrib Microbiol, 2008. **15**: p. 118-146.
158. Shurin, G.V., et al., *Loss of new chemokine CXCL14 in tumor tissue is associated with low infiltration by dendritic cells (DC), while restoration of human CXCL14 expression in tumor cells causes attraction of DC both in vitro and in vivo*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5490-8.
159. Harper, M.T., et al., *Absence of platelet phenotype in mice lacking the motor protein myosin Va*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53239.
160. Dunn, K.W., M.M. Kamocka, and J.H. McDonald, *A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **300**(4): p. C723-42.
161. Langer, H.F. and M. Gawaz, *Platelets in regenerative medicine*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(4): p. 299-307.
162. Gawaz, M. and S. Vogel, *Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells*. Blood, 2013. **122**(15): p. 2550-4.
163. Deppermann, C., et al., *Platelet secretion is crucial to prevent bleeding in the ischemic brain but not in the inflamed skin or lung in mice*. Blood, 2017. **129**(12): p. 1702-1706.
164. Mezger, M., et al., *Platelets and Immune Responses During Thromboinflammation*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1731.
165. De Meyer, S.F., et al., *Thromboinflammation in Stroke Brain Damage*. Stroke, 2016. **47**(4): p. 1165-72.
166. Chatterjee, M., et al., *Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4-CXCR7*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1989.
167. Salcedo, R., et al., *Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha*. Am J Pathol, 1999. **154**(4): p. 1125-35.
168. Tang, Y.Q., M.R. Yeaman, and M.E. Selsted, *Antimicrobial peptides from human platelets*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6524-33.

169. Coppinger, J.A., et al., *Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions*. *Blood*, 2004. **103**(6): p. 2096-104.
170. Rath, D., et al., *Evidence of an interaction between TGF-beta1 and the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis in human platelets*. *Thromb Res*, 2016. **144**: p. 79-84.
171. Sharda, A. and R. Flaumenhaft, *The life cycle of platelet granules*. *F1000Res*, 2018. **7**: p. 236.
172. Kowalska, M.A., et al., *Megakaryocyte precursors, megakaryocytes and platelets express the HIV co-receptor CXCR4 on their surface: determination of response to stromal-derived factor-1 by megakaryocytes and platelets*. *Br J Haematol*, 1999. **104**(2): p. 220-9.
173. Perlman, R.L., *Mouse models of human disease: An evolutionary perspective*. *Evol Med Public Health*, 2016. **2016**(1): p. 170-6.
174. Ungerer, M., et al., *Generation of functional culture-derived platelets from CD34+ progenitor cells to study transgenes in the platelet environment*. *Circ Res*, 2004. **95**(5): p. e36-44.
175. Gillitzer, A., et al., *Retroviral infection and selection of culture-derived platelets allows study of the effect of transgenes on platelet physiology ex vivo and on thrombus formation in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(8): p. 1750-5.
176. Sugimoto, N. and K. Eto, *Platelet production from induced pluripotent stem cells*. *J Thromb Haemost*, 2017. **15**(9): p. 1717-1727.
177. Carlson, J., et al., *The heterodimerization of platelet-derived chemokines*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1834**(1): p. 158-68.

7 Plasmidkarten





Addendum

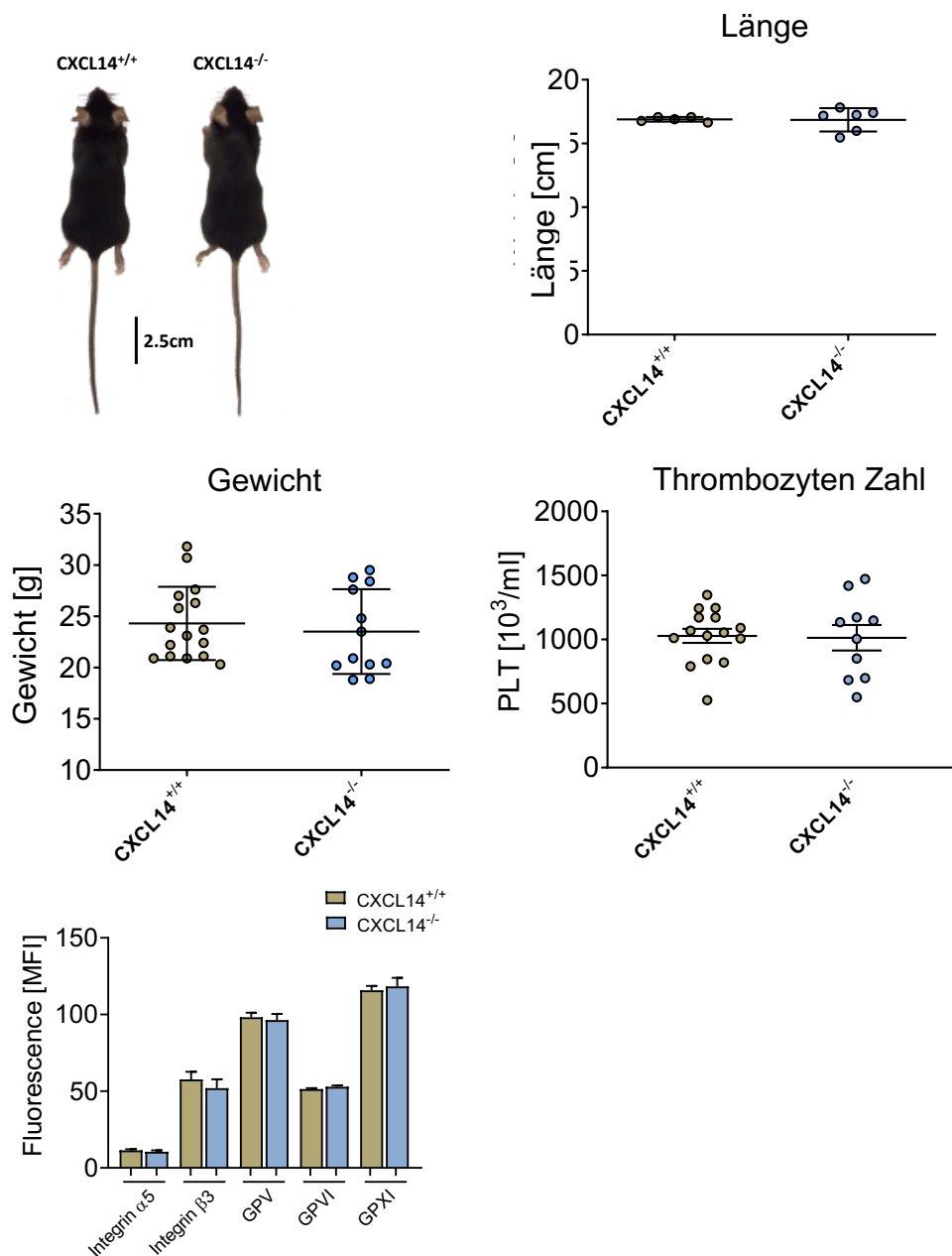


Abbildung 40. Addendum – Phänotypisierung von $cxcl14^{-/-}$ Mäusen: (A) Makroskopische Aufnahmen von Wildtyp- ($CXCL14^{+/+}$) und $CXCL14$ *Knock-out* Mäusen ($CXCL14^{-/-}$) im Alter von 10 Wochen. (B) Die Länge der Mäuse ist nicht unterschiedlich zwischen Wildtyp- und $CXCL14$ *Knock-out* Mäusen im Alter von 10 Wochen. (C) Auch in der Gewichtsverteilung von 10 Wochen alten Wildtyp und $CXCL14$ *Knock-out* Mäusen gibt es keinen signifikanten Unterschied. (D) Die Thrombozyten Anzahl im Blut von Wildtyp und $CXCL14$ *Knock-out* Mäusen unterscheidet sich nicht signifikant. (E) Durchflusszotometrische Experimente von isolierten Thrombozyten von Wildtyp und $CXCL14$ *Knock-out* Mäusen zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Oberflächenexpression der Integrine α -5 und β -3 und nicht in den Glykoproteinen GPV, GPVI und GPXI.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät unter Betreuung von Prof. Dr. Peter Ruth durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Meinrad Gawaz, Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung Kardiologie und Kreislauferkrankungen.

Die Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt. Die Methode der Koimmunopräzipitation wurde mit Unterstützung von Valerie Dizenta (Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung Kardiologie und Kreislauferkrankungen AG Prof. Gawaz) durchgeführt. Die Methode der IPSC-Differenzierung wurde mit Unterstützung von Benjamin Dannenmann und Masoud Nasri (Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und Rheumatologie, AG Prof. Skokowa) durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

[Unterschrift]

9 Veröffentlichungen

Diplomarbeit:

Panagiotis Papatheodorou, Shuo Song, Diana López-Ureña, **Alexander Witte**,
Felícia Marques, Gerhard Stefan Ost, Björn Schorch Esteban Chaves-Olarte,
Klaus Aktories
*Cytotoxicity of Clostridium difficile toxins A and B requires an active and
functional SREBP-2 pathway*
FASEB J., 2018

Dissertation:

Alexander Witte, Madhumita Chatterje, Florian Lang, Meinrad Gawaz
Platelets as a Novel Source of Pro-Inflammatory Chemokine CXCL14
Chem. Phys. Biochem., 2017

Alexander Witte, Anne Katrin Rohlfing, Benjamin Dannenmann, Valerie
Dicenta, Masoud Nasri, Kyra Kolb, Jessica Sudmann, Tatsiana Castor, Dominik
Rath, Oliver Borst, Julia Skokowa, Meinrad Gawaz
*The chemokine CXCL14 mediates platelet function and migration via direct
interaction with CXCR4*
Cardiovasc Res., 2020

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz bedanken, der mir die Möglichkeit gab, in der Abteilung für Kardiologie und Kreislauferkrankungen des Universitätsklinikums Tübingen meine Arbeit anzufertigen. Außerdem möchte ich mich für die wertvolle Unterstützung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und den guten Rat zur und neben der Promotion bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Peter Ruth für die wissenschaftlichen Ratschläge und die Übernahme der Betreuung an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen zu promovieren.

Ein großes Danke geht an Dr. med. Tatsiana Castor, Dr. rer. nat. Madhuita Chatterjee und Dr. rer. nat. Anne-Katrin Rohlfing, die durch ihre hilfsbereite Art in alltäglichen Herausforderungen im Labor und durch ihre wissenschaftliche Expertise einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben.

Danken möchte ich auch allen Kollegen und Mitarbeitern der AG Gawaz Patrick Münzer, Sascha Geue, Britta Walker, Mailin Manke und Daniela Eissler sowie Saskia Ungern-Sternberg, Jessica Sudmann, Kyra Kolb, Valerie Dicenta, Sabrina Felouf, Sahra Gekerle, Lydia Laptev, Klaudia Posavec, Frederik Emschermann, Markus Olbrich, die alle durch die guten wissenschaftlichen Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben sowie durch die ständige Unterstützung in theoretischen und methodischen Herausforderungen oder Fragestellungen.

Danken möchte ich auch den Kollegen Benjamin Dannenmann und Masoud Nasri aus der Abteilung Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums Tübingen und Prof. Dr. Julia Skokowa für Ihre Hilfe bei der Differenzierung und Kultivierung der iPS Zellen.

Von ganzem Herzen möchte ich mich auch bei meiner Frau, meinem Sohn und meiner ganzen Familie bedanken für ihre tägliche Motivation, die nötige Ablenkung und die immense Unterstützung, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.