

Entwicklung von ACKR3-spezifischen Agonisten und deren pharmakologische Wirksamkeit

Dissertation

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

vorgelegt von
Kyra Kolb
aus Mutlangen

Tübingen
2026

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

Tag der mündlichen Qualifikation: 23.04.2026

Dekan: Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Meinrad Gawaz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Robert Lukowski

Für Oma Erika

Es ist zwar kein Schloss aber ein Buch

Inhalt

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	10
1.1 Thrombozyten	12
1.1.1 Thrombopoese	12
1.1.2 Morphologie	13
1.1.2.1 Membransystem	13
1.1.2.2 Strukturelles System.....	13
1.1.2.3 Granula	14
1.2 Physiologische Funktion der Thrombozyten.....	17
1.2.1 Hämostase	17
1.2.1.1 Adhäsion.....	18
1.2.1.2 Aktivierung.....	18
1.2.1.3 Degranulation	19
1.2.1.4 Aggregation	20
1.2.2 Sekundäre Hämostase	21
1.2.3 Apoptose.....	21
1.3 Thrombose.....	23
1.3.1 Thrombozytäre Erkankungen	23
1.3.2 Thromboinflammation	24
1.3.3 Therapie.....	25
1.3.4 Blutungsrisiko in der Therapie von thrombotischen Erkrankungen	26
1.4 Thrombozytäre Chemokinrezeptoren und Chemokine	28
1.4.1 Der thrombozytäre Chemokinrezeptor ACKR3	29
1.4.2 Interaktion und Zusammenspiel von CXCR4 und ACKR3 auf Thrombozyten.....	31
2 Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Geräte	33
2.1.2 Gebrauchsgegenstände	34
2.1.3 Reagenzien und Chemikalien.....	36
2.1.4 Antikörper und Rekombinante Proteine:.....	38
2.1.5 Software	38
2.1.6 Lösungen und Puffer	39

2.1.7	Verwendete Verbindungen der Firma Enamine Ltd	40
2.2	Methoden.....	46
2.2.1	Versuche am Mausmodell (<i>ex vivo</i>)	46
2.2.1.1	Zucht.....	46
2.2.1.2	Phänotypisierung.....	47
2.2.1.3	DNA Extraktion.....	47
2.2.1.4	Gelelektrophorese.....	48
2.2.1.5	Verwendete Mäuse und ethische Vertretbarkeit	49
2.2.1.6	Bestimmung muriner Blutparameter	49
2.2.1.7	<i>Ex vivo</i> Thrombusformation mit murinem Vollblut	50
2.2.1.8	Durchflusszytometrie muriner Thrombozyten	51
2.2.1.9	Apoptose Assay muriner Thrombozyten	52
2.2.2	Versuche mit humanen Thrombozyten.....	53
2.2.2.1	Thrombozytenisolation aus humanem Vollblut.....	53
2.2.2.2	Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) aus humanem Vollblut	54
2.2.2.3	Durchflusszytometrie humaner Thrombozyten.....	54
2.2.2.4	<i>Ex vivo</i> Thrombusformation humaner Thrombozyten	55
2.2.2.5	Aggregometrie humaner Thrombozyten	55
2.2.2.6	Calcium-Spektrofluorometrie humaner Thrombozyten.....	56
2.2.3	Versuche in Zellkultur	57
2.2.3.1	Rekrutierung von β -Arrestin	57
2.2.3.2	Toxizitätsassay.....	57
2.2.4	Statistische Auswertung	58
2.2.5	Entwicklung eines ACKR3 Homologiemodells und <i>in silico screening</i>	58
2.2.6	Agonisten Optimierung	60
3	Ergebnisse	62
3.1	Einfluss des ACKR3-Knockouts auf murinen Thrombozyten.....	62
3.1.1	Einfluss des murinen ACKR3-Knockouts auf <i>ex vivo</i> Thrombusformation	63
3.1.2	Einfluss des ACKR3-Knockouts auf die Aktivierbarkeit der murinen Thrombozyten	64
3.1.3	Einfluss des ACKR3-Knockouts auf die Apoptose muriner Thrombozyten.....	65
3.2	Untersuchung des Effekts natürlicher ACKR3 Liganden sowie ACKR3-Agonist VUF11207 auf die Thrombozytenaktivierung	67
3.2.1	Einfluss auf <i>ex vivo</i> Thrombusbildung.....	68

3.2.2	Einfluss auf Aktivierbarkeit der Thrombozyten.....	69
3.3	Untersuchung von potenziellen ACKR3-Agonisten	70
3.3.1	Einfluss der potenziellen ACKR3-Agonisten auf die Aktivierbarkeit humaner Thrombozyten	71
3.3.2	Einfluss der potenziellen ACKR3-Agonisten auf die Rekrutierung von β -Arrestin	73
3.3.3	Kombinierte Analyse von β -Arrestin-Rekrutierung und P-Selektin-Expression zur Auswahl potenzieller Leitstrukturen	75
3.3.4	Wirkprofil der potenziellen ACKR3-Agonisten C10, C11 und C46 in verschiedenen Modellen der Thrombozytenfunktion	77
3.3.4.1	Einfluss der potenziellen ACKR3-Agonisten auf die Aktivierbarkeit von humanen Thrombozyten	78
3.3.4.2	Einfluss der potenziellen ACKR3-Agonisten auf die <i>ex vivo</i> Thrombusformation von humanen Thrombozyten.....	79
3.3.4.3	Einfluss der potenziellen ACKR3-Agonisten auf die Aggregation von humanen Thrombozyten	80
3.3.4.4	Einfluss der potenziellen ACKR3-Agonisten auf die Calciummobilisierung bei Aktivierung humaner Thrombozyten	82
3.4	Versuche mit chemisch modifizierten Strukturen von C10 und C11	82
3.4.1	Aktivierbarkeit der Thrombozyten.....	83
3.4.2	Untersuchung möglicher zelltoxische Effekte der Verbindungen	85
3.5	Einfluss des CXCR4 Rezeptors und CXCL12 auf die ACKR3-Agonist-Interaktion	86
3.5.1	Einfluss des CXCR4 Rezeptors und CXCL12 auf Aktivierbarkeit humaner Thrombozyten	87
3.6	Analyse der Rezeptorspezifität des ACKR3-Agonisten C10.....	88
3.6.1	Untersuchung der rezeptorabhängigen Wirkung des ACKR3-Agonisten C10 auf die Thrombusbildung unter Flussbedingungen.....	89
3.6.2	Untersuchung der rezeptorabhängigen Wirkung des ACKR3-Agonisten C10 auf die Thrombozytenaktivierung	90
3.7	Molekulare Mechanismen der ACKR3-abhängigen Signalübertragung.....	92
3.7.3	Bedeutung der pS350/pT352 ACKR3-ST/A Punktmutation in der Thrombusbildung	96
4	Diskussion	100
4.1	Einfluss einer genetischen ACKR3-Defizienz auf die Funktion muriner Thrombozyten....	100

4.2 Einfluss natürlicher ACKR3-Liganden und synthetischer Agonisten auf die Thrombozytenfunktion.....	103
4.3 Strukturbasierte Entwicklung und funktionelle Charakterisierung synthetischer ACKR3-Agonisten	105
4.4 Bestimmung des Einfluss des CXCR4-Rezeptors und CXCL12 auf die ACKR3-Agonist-Interaktion	107
4.5 Molekulare Mechanismen der ACKR3-abhängigen Signalübertragung.....	110
5 Zusammenfassung.....	114
5.1 Summary	116
6 Literaturverzeichnis.....	118
7 Addendum	132
8 Erklärung zum Eigenanteil.....	135
9 Veröffentlichungen	136
10 Danksagung.....	137

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der morphologischen Besonderheiten von ruhenden Thrombozyten..	16
Abbildung 2: Schematische Darstellung der morphologischen Besonderheiten aktivierter Thrombozyten:.	17
Abbildung 3: Funktion und Interaktion von CXCR4 und ACKR3 auf Thrombozyten:.	32
Abbildung 4: Grafische Darstellung der Generierung einer Thrombozyten-spezifischen Rezeptor Knock-out Maus.	46
Abbildung 5: Ergebnisse der Genotypisierung Repräsentative Abbildung der Gelektrophorese mit DNA Sequenzen der PCR auf <i>Ackr3</i> und PF4-cre.	49
Abbildung 6: Repräsentative Dot Blots zur beispielhaften Darstellung der Gatingstrategie bei Durchflusszytometrie mit murinem Vollblut.	52
Abbildung 7: Homologiemodell des ACKR3-Rezeptors und <i>in silico</i> Docking	59
Abbildung 8: Kreislauf der Agonisten-Optimierung:	61
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Fragestellung	62
Abbildung 10: Einfluss des ACKR3 Knockouts auf Thrombusformation	63
Abbildung 11.1: Einfluss des ACKR3-Knockouts auf Aktivierbarkeit muriner Thrombozyten	64
Abbildung 12: Einfluss des ACKR3-Knockouts auf die Apoptose muriner Thrombozyten ...	66
Abbildung 13: Ergebnisse der <i>ex vivo</i> Thrombusformation von humanem Vollblut über Kollagen-Beschichtung nach Behandlung mit natürlichen ACKR3 Liganden sowie VUF11207	69
Abbildung 14: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der P-Selektin Expression auf humanen Thrombozyten nach Behandlung mit natürlichen ACKR3 Liganden sowie VUF11207 und nach Aktivierung	70
Abbildung 15: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der CD62P-Expression nach Aktivierung	72
Abbildung 16: Ergebnisse des PathHunter β -Arrestin-Rekrutierungs-Assays zur Verfeinerung und Analyse der potenziellen ACKR3-Agonisten	74
Abbildung 17: Gemeinsame Darstellung der β -Arrestin-Rekrutierung und der P-Selektin-Expression für die 47 getesteten kommerziell erhältlichen Verbindungen	75
Abbildung 18: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der P-Selektin Expression auf humanen Thrombozyten nach Behandlung mit ausgewählten Verbindungen.	76
Abbildung 19: <i>Screening</i> -Prozess und Strukturformeln der ausgewählten Verbindungen.	77

Abbildung 20: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der P-Selektin Expression	79
Abbildung 21: Messung der <i>ex vivo</i> Perfusion nach Vorbehandlung mit verschiedenen (potenziellen) ACKR3-Agonisten	80
Abbildung 22: Messung der Thrombozytenaggregation nach Vorbehandlung mit verschiedenen (potenziellen) ACKR3-Agonisten	81
Abbildung 23: Calciummobilisierung- nach Aktivierung von isolierten humanen Thrombozyten	82
Abbildung 24: Repräsentative Ergebnisse für getestete Verbindungen aus Leitverbindung C10	84
Abbildung 25: Repräsentative Ergebnisse für getestete Verbindungen aus Leitverbindung C11	84
Abbildung 26: Konzentrationsabhängiger Promega RealTimeGlo™ Viability Assay	86
Abbildung 27: Untersuchung des Einflusses des CXCR4 Rezeptors und CXCL12 auf ACKR3-Agonist-Interaktion und der P-Selektin-Expression auf Thrombozyten	88
Abbildung 28: Vergleich der <i>ex vivo</i> Perfusion unter Einfluss des potenziellen Agonisten C10	90
Abbildung 29: Vergleich der P-Selektin Expression unter Einfluss des potenziellen ACKR3-Agonisten C10	92
Abbildung 30: Ergebnisse der Thrombusbildung nach Behandlung von humanem Blut mit dem β -Arrestin-Inhibitor Barbadin und dem GRK2-Inhibitor	94
Abbildung 31: Untersuchung der Thrombusbildung von murinem Vollblut von <i>Ackr3</i> ^{-/-} - sowie <i>Cxcr4</i> ^{-/-} -Tieren unter Einfluss von Barbadin oder GRK2 Inhibitor	96
Abbildung 32: Ergebnisse der Experimente mit murinem Vollblut und Behandlung mit Barbadin sowie repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Thrombusbildung	98
Abbildung 33: Ergebnisse der Experimente mit murinem Vollblut und dem GRK2 Inhibitor sowie repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Thrombusbildung	99
Abbildung 34: Schematische Darstellung der Hypothese	113
Abbildung 35: Strukturelle Modifikationen der Verbindungen aus den Ausgangstrukturen C10 und C11	134

Abkürzungsverzeichnis

ACD-Puffer	Acid-Citrate-Dextrose-Puffer
ACKR3	Atypischer Chemokin Rezeptor 3
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Bereich unter der Aggregationskurve (<i>area under curve</i>)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
bp	Basenpaare
C57Bl/6J	C57Bl/6J Maus Stamm
Ca ²⁺	Calcium Ionen
CCL17	C-C motif chemokine ligand 17
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
CHO	Chinese Hamster Ovary
COX	Cyclooxygenase
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CRP-XL	Crosslinked - Collagen-Related-Peptid
Cre	cyclization recombination
CXCL11	CXC-Motiv-Chemokin 11
CXCL12	(SDF-1 α) CXC-Motiv-Chemokin 12 (<i>Stromal cell-derived factor 1α</i>)
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CXCR7	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7
DAG	1,2-Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
GPCRs	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GPVI	Glykoprotein VI
GRK2	G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase 2
h	Stunden
H ₂ O	Wasser (Dihydrogenmonoxid)
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1 (<i>intercellular adhesion molecule 1</i>)
IL6	Interleukin-6

IP ₃	Inositol-1, 4, 5-triphosphat
KO	Knockout
MCP-1	monozytenchemotaktisches Protein-1 (<i>monocytechemotactic protein-1</i>)
MFI	Mean fluorescence intensity
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
OCS	offen kanikuläres System (<i>open canicular system</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PF4	Plättchenfaktor 4
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PRP	Plättchenreiches Plasma
RLU	Relative Lichteinheiten (<i>relative luminescent units</i>)
Rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
Sec	Sekunden
SDF-1 α	Stromal cell-derived factor 1 α
STEMI	akuten Myokardinfarkt (<i>ST-Elevation myocardial Infarction</i>)
TARC	thymusaktivitätsreguliertes Chemokin
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TxA ₂	Thromboxan A ₂
U/min	Umdrehungen pro Minute
vWF	von-Willebrandfaktor
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
μ l	Microliter
μ m	Micrometer
μ M	Micromol

1 Einleitung

Weltweit zählen Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den maßgeblichen Ursachen von Morbidität und Mortalität, wobei thrombotische Ereignisse wie Herzinfarkt und Schlaganfall besonders gravierende Auswirkungen auf die Gesundheit und Lebensqualität der Betroffenen haben (Lopez *et al.* 2006; Tsao *et al.* 2022). Aktuelle epidemiologische Daten verdeutlichen die globale Herausforderung, die von diesen Erkrankungen ausgeht. Im Jahr 2019 resultierten Herz-Kreislauf-Erkrankungen in geschätzten 17,9 Millionen Todesfällen weltweit, was einem Anteil von 32 % an der Gesamtmortalität entspricht. Diese alarmierende Statistik verdeutlicht die schwerwiegende globale, wirtschaftliche Belastung durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Von den genannten Todesfällen waren zudem 85 % auf Herzinfarkte oder Schlaganfälle zurückzuführen, was die gravierende Bedeutung dieser thrombotischen Ereignisse im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen unterstreicht (World Health Organisation 2021). Diese Zahlen offenbaren die Dringlichkeit einer intensiven wissenschaftlichen Forschung auf diesem Gebiet.

Die immense Prävalenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen hat nicht nur schwerwiegende gesundheitliche, sondern auch ökonomische Konsequenzen. Die Kosten für die Behandlung und Betreuung dieser Erkrankungen belaufen sich weltweit auf geschätzte 863 Milliarden US-Dollar jährlich, Tendenz steigend (Bloom, D.E., *et al.* 2011). Diese finanzielle Belastung stellt nicht nur eine Herausforderung für das Gesundheitssystem dar, sondern unterstreicht auch die dringende Notwendigkeit, effektive und kosteneffiziente Therapieansätze zu entwickeln.

Die Forschung im Bereich der Herz-Kreislauf-Erkrankungen hat sich weltweit zu einem entscheidenden Schwerpunkt in der medizinischen Grundlagenforschung entwickelt, wobei der Fokus auf der Entschlüsselung der zugrunde liegenden Mechanismen und der Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen liegt. Zahlreiche wissenschaftliche Studien haben dabei nicht nur klinische, sondern auch molekulare Aspekte dieser Erkrankungen beleuchtet (Dorobantu *et al.* 2021; Fræk *et al.* 2022). Das faszinierende Netzwerk und besonders das komplexe Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, Gerinnungsfaktoren und der Gefäßwand spielt eine zentrale Rolle und bildet die Grundlage für das Verständnis thromboinflammatorischer Prozesse und deren gezielter Beeinflussung (Ruggeri 2002; Davi und Patrono 2007).

Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf die Identifikation des thrombozytären ACKR3-Rezeptors als potenzielles therapeutisches Ziel zur Behandlung thrombozytenvermittelter Thrombosen. Ziel ist es, geeignete Agonisten zu identifizieren, die als vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung neuer Therapieansätze dienen können. Durch die

systematische Untersuchung der Mechanismen und des Einflusses dieses Rezeptors innerhalb des komplexen thrombotischen Netzwerks zielt die Arbeit darauf ab, fundierte Erkenntnisse zu gewinnen, die dazu beitragen, innovative Strategien für die Prävention und Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu entwickeln.

1.1 Thrombozyten

Die Entdeckung und umfassende Erforschung der Blutplättchen, auch als Thrombozyten bekannt, reicht bis ins 19. Jahrhundert zurück. Der britische Arzt William Addison erwähnte im Jahr 1842 erstmals die "*colourless corpuscles*" und die "*molecules and cytoblasts*" im Blut (Addison 1842). Die eigentliche Identifikation und Charakterisierung der Blutplättchen wurde jedoch später von anderen Forschern vorangetrieben, insbesondere durch die wegweisende Arbeit von Giulio Bizzozero. Dieser beschrieb 1881 erstmals einen "neuen Formbestandteil des Blutes" und prägte den Begriff der Thrombozyten. Ein Jahr später, 1882, veröffentlichte er eine umfassende Arbeit über diese Zellen, die einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis ihrer Rolle bei Thrombose und Blutgerinnung leistete (Bizzozero 1882; Collier 1984).

1.1.1 Thrombopoese

Thrombozyten sind kernlose, diskoidale Zellen und stellen mit 2–5 µm die kleinsten zellulären Bestandteile des Blutes dar (Frojmovic und Milton 1982). Aufgrund ihrer kernlosen Struktur besitzen sie nur eine begrenzte Fähigkeit zur Proteinbiosynthese (Gawaz 1999).

Diese anuklearen Zellen entstehen durch die sogenannte Thrombopoese, durch die Abschnürung aus Megakaryozyten, den größten Zellen im Knochenmark. Während des Reifungsprozesses der Megakaryozyten erfolgt eine Zellteilung, bei der der Zellkern intakt bleibt und das Zytoplasma sich in zahlreiche kleine Einheiten aufteilt. Durch die Abschnürung von Zellfragmenten entstehen zunächst sogenannte Proplättchen, lange Zellfortsätze, die bis in die Sinusoiden des Knochenmarks reichen. Diese Einheiten lösen sich schließlich ab und gelangen in den Blutkreislauf, wo sie als funktionelle Thrombozyten agieren (Behnke 1970; Thon und Italiano 2012). Die abschließende Reifung und Formgebung der Thrombozyten erfolgt somit erst im Blut selbst, durch unterschiedliche, vor allem mechanische Einflüsse des Blutstroms (Machlus und Italiano 2013). Ein einzelner Megakaryozyt kann so mehrere tausend Thrombozyten produzieren (Stenberg und Levin 1989). Da diese auch nur eine durchschnittliche Lebensdauer von circa 10 Tagen haben, bevor sie von Makrophagen in Milz und Leber wieder abgebaut werden, ist eine kontinuierliche Neubildung von Thrombozyten durch Megakaryozyten essenziell, um den Bedarf im Blutkreislauf aufrechtzuerhalten (Gawaz 1999; George 2000). Die physiologische Thrombozytenzahl im Blut eines gesunden Menschen liegt zwischen 150.000 und 450.000 pro µl (Gawaz 1999).

1.1.2 Morphologie

1.1.2.1 Membransystem

Die morphologische Struktur der Thrombozyten ist von großer Bedeutung für ihre Funktion. Die Zellen weisen ein charakteristisches Membransystem auf, das aus dem offenen kanalikulären Membransystem (OCS) und dem dichten tubulären Membransystem besteht (Gerrard *et al.* 1978). Das OCS durchzieht die Thrombozyten und sorgt für eine Vergrößerung der Zellmembran, während das dichte tubuläre Membransystem eine zentrale Rolle im Zusammenhang mit der Biosynthese von Prostaglandinen trägt. Prostaglandine wie Thromboxan A₂ (TxA₂) werden durch Cyclooxygenasen (COX), insbesondere COX-1, synthetisiert und sind entscheidend für die Hämostase und Vasokonstriktion (FitzGerald 2003). Darüber hinaus dient das dichte tubuläre Membransystem auch als intrazellulärer Speicher dieser Enzyme, ist aber auch für die Speicherung von Calciumionen (Ca²⁺) verantwortlich (White und Clawson 1980). Diese Enzyme und Ionen spielen eine entscheidende Rolle bei verschiedenen Prozessen innerhalb der Thrombozyten. Die intrazelluläre Speicherung von Calciumionen (Ca²⁺) im dichten tubulären Membransystem ist von zentraler Bedeutung für die Thrombozytenaktivierung. Nach einer Aktivierung durch bestimmte Stimuli, wie zum Beispiel Kollagen oder Thrombin, erfolgt die Freisetzung von gespeichertem Ca²⁺. Dieser Anstieg an intrazellulärem Calcium spielt eine Schlüsselrolle bei der Formänderung der Thrombozyten, der Granulaexozytose und der Aktivierung von Enzymen, die letztendlich zur Blutgerinnung beitragen (Versteeg *et al.* 2013; Golebiewska und Poole 2015).

1.1.2.2 Strukturelles System

Das Tubulinsystem innerhalb der Thrombozyten spielt eine maßgebliche Rolle bei der Erhaltung ihrer Form und Funktion. Es handelt sich um ein ausgeprägtes Netzwerk von Mikrotubuli, das mit dem OCS verbunden ist und sich durch die Zelle erstreckt. Diese Mikrotubuli sind entscheidend für die Stabilität der Thrombozytenform und tragen zur Bildung von Pseudopodien und Filopodien bei, die während der Thrombozytenaktivierung entstehen (White und Clawson 1980; White und Krumwiede 2007).

Neben den bereits erwähnten Mikrotubuli sind auch verschiedene Strukturproteine von Bedeutung, die die Integrität des strukturellen Systems aufrechterhalten.

Die Interaktion zwischen Mikrotubuli und Aktinfilamenten ist entscheidend für die dynamische Veränderung der Thrombozytenform. Aktinfilamente, ein weiteres zentrales Element des Zytoskeletts, interagieren mit den Mikrotubuli und sind so ebenfalls maßgeblich an der Ausbildung der Pseudopodien und Filopodien während der Thrombozytenaktivierung beteiligt (Italiano *et al.* 2003). Auch Strukturproteine wie Tubulin, Aktin und Myosin sind integraler Bestandteil des strukturellen Systems und gewährleisten nicht nur die Formstabilität, sondern auch die funktionelle Flexibilität der Thrombozyten. Darüber hinaus spielen Filamin-A und Septin eine Rolle bei der Verbindung des Zytoskeletts mit der Zellmembran und beeinflussen die mechanischen Eigenschaften der Thrombozyten (Li *et al.* 2002; Michelson 2011).

Die Verbindung zwischen dem Tubulinsystem und dem Membransystem gewährleistet nicht nur die Stabilität der Thrombozytenstruktur, sondern ermöglicht auch dynamische Veränderungen während ihrer Aktivierung. Die Kanäle des OCS sind in Kombination mit dem Tubulinsystem maßgeblich für die Oberflächenvergrößerung, Formveränderung und Granuladegranulation verantwortlich, die während des Hämostaseprozesses auftreten (Gawaz 1999; White und Krumwiede 2007). Zusätzlich zu diesen strukturellen Aspekten ist die räumliche Organisation des Tubulin- und Membransystems von entscheidender Bedeutung für die Regulation intrazellulärer Signale. Die enge Koordination dieser Systeme ermöglicht eine präzise Reaktion auf externe Stimuli und spielt somit eine Schlüsselrolle in der Hämostase und Immunantwort der Thrombozyten.

1.1.2.3 Granula

In den Thrombozyten sind neben den bereits diskutierten Strukturen wie dem Membransystem und dem Tubulinsystem auch organelle Strukturen vorhanden, darunter Mitochondrien, Glykogenspeicher und Granula. Diese spezialisierten Organellen befinden sich im Zytoplasma der Zellen. Thrombozyten besitzen verschiedene Arten von Granula, die für ihre physiologischen Funktionen von entscheidender Bedeutung sind. Diese Granula setzen sich aus Alpha-, *dense*-, Lambda- und Lyso-Granula zusammen (Heijnen und van der Sluijs 2015). Jedes Granulum hat eine spezifische Zusammensetzung von bioaktiven Molekülen, darunter Proteine, Zytokine und Chemokine, die bei der Regulierung von Hämostase und Immunantwort eine Schlüsselrolle spielen (George 2000).

Die Alpha-Granula der Thrombozyten sind mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und Gerinnungsfaktoren beladen. Diese umfassen, aber beschränken sich nicht auf, Fibrinogen, vWF, PDGF, TGF- β und Thrombospondin. Diese bioaktiven Moleküle

haben eine zentrale Rolle bei der Förderung der Hämostase durch die Regulation der Thrombozytenadhäsion, -aggregation und -aktivierung (Gawaz 1999; George 2000).

Dense Granula, auch als δ -Granula bekannt, tragen ihren Namen aufgrund ihres besonders hohen Gewichtsgehalts an verschiedenen Molekülen, der ihnen eine besonders hohe elektronenoptische Dichte verleiht (Zucker-Franklin 2003). Die *dense* Granula enthalten eine breite Palette biologisch aktiver Moleküle, darunter Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Serotonin, Calcium und verschiedene Wachstumsfaktoren (Gawaz 1999; Zucker-Franklin 2003). Die Aktivierung der Thrombozyten führt zur Fusion der *dense* Granula mit der Zellmembran, wodurch ihr Inhalt in den extrazellulären Raum freigesetzt wird (Italiano *et al.* 2003). Diese Freisetzung der Substanzen aus den *dense* Granula ist entscheidend für die Hämostase, da sie eine Verstärkung der Thrombozytenaktivierung und -aggregation bewirkt.

Lysosomale Granula enthalten eine Vielzahl von hydrolytischen Enzymen, die an der Verdauung und Zersetzung von Fremdpartikeln, beschädigten Zellkomponenten oder anderen Zellbestandteilen beteiligt sind (Heijnen und van der Sluijs 2015). Die Anwesenheit von Lysosomen in Thrombozyten unterstreicht deren Rolle in immunologischen und entzündlichen Prozessen. Während Thrombozyten in erster Linie für hämostatische Funktionen bekannt sind, tragen ihre lysosomalen Aktivitäten dazu bei, zelluläre Bestandteile zu eliminieren und die Homöostase im Blut aufrechtzuerhalten (Gawaz 1999; George 2000). Durch die Freisetzung von Enzymen aus den Lysosomen können Thrombozyten eine immunmodulatorische Funktion ausüben und an der Abwehr von Infektionen sowie anderen immunologischen Prozessen teilnehmen (George 2000).

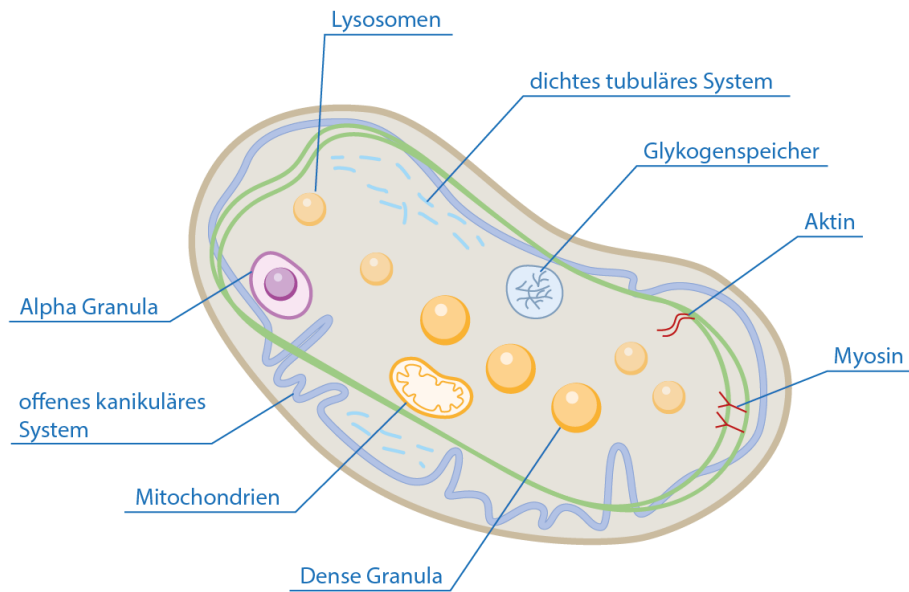


Abbildung 1: Schematische Darstellung der morphologischen Besonderheiten von ruhenden Thrombozyten. Der ruhende Thrombozyt ist scheibenförmig und glatt. Im Inneren befinden sich Mitochondrien, Glykogenspeicher und Granula (alpha-, dichte und lysosomale Granula), die Substanzen wie von-Willebrand-Faktor und ADP speichern. Das offene kanikuläre System (OCS) dient als Speicher und erleichtert später die Sekretion. In diesem Zustand bleiben die Thrombozyten inaktiv und zirkulieren frei im Blut (George 2000).

1.2 Physiologische Funktion der Thrombozyten

Die Thrombozyten als essenzielle Bestandteile des Blutes spielen eine zentrale Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen. Thrombozyten sind entscheidende Zellen im Prozess der Hämostase, der die Blutstillung nach Gefäßverletzungen gewährleistet. Diese kleinen Zellen spielen eine Schlüsselrolle in verschiedenen Phasen der Hämostase, darunter die Adhäsion, Aktivierung, Aggregation und die anschließende sekundäre Hämostase.

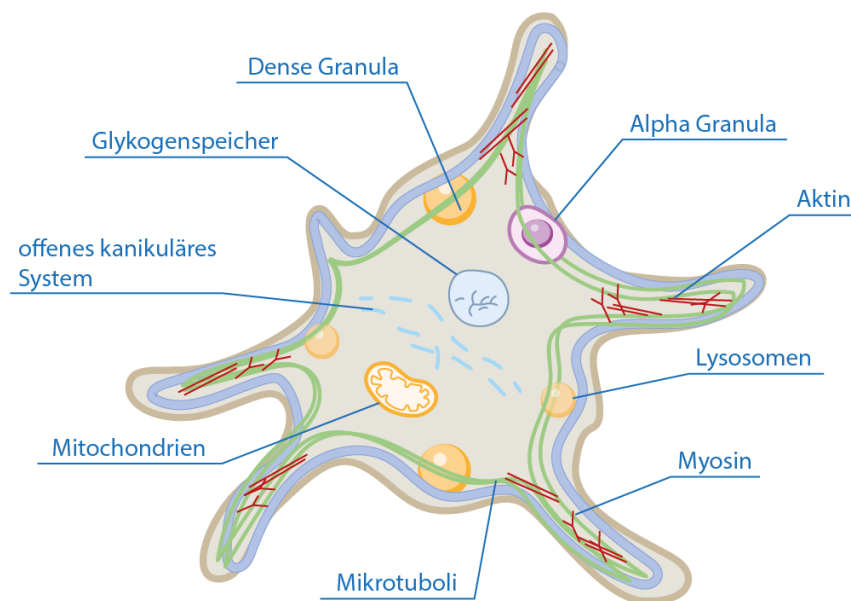


Abbildung 2: Schematische Darstellung der morphologischen Besonderheiten aktivierter Thrombozyten: Bei der Aktivierung, z. B. durch Gefäßverletzungen, ändert sich die Form. Der Thrombozyt bildet Pseudopodien und entleert die Granula. Zytoskelett-Proteine wie Aktin und Myosin ermöglichen Formveränderung und Sekretion. Das OCS erleichtert die Freisetzung gespeicherter Stoffe, und Mitochondrien liefern Energie für diese Prozesse. Aktivierte Thrombozyten sind essenziell für die Blutstillung (George 2000).

1.2.1 Hämostase

Die primäre Aufgabe der Thrombozyten im Rahmen der Hämostase besteht darin, schnell auf Gefäßverletzungen zu reagieren und die Bildung eines vorläufigen Blutgerinnsels zu initiieren (Ruggeri 2002). Dieser essenzielle Prozess beginnt mit der Adhäsion der Thrombozyten an die beschädigte Gefäßwand. Die Thrombozyten heften sich an das Subendothelium an und bilden eine instabile Thrombusschicht, um die Blutung zu stoppen (Broos *et al.* 2011).

1.2.1.1 Adhäsion

Die Adhäsion von Thrombozyten spielt eine zentrale Rolle als Reaktion auf vaskuläre Verletzungen und wird im Allgemeinen als der erste Schritt betrachtet. In diesem Prozess binden einzelne Thrombozyten durch spezifische Membranrezeptoren an zelluläre und extrazelluläre Matrixbestandteile der Gefäßwand und des umgebenden Gewebes (Ruggeri und Mendolicchio 2007).

Es wird grundsätzlich zwischen primärer und sekundärer Adhäsion unterschieden. Die primäre Adhäsion bezieht sich auf den ersten Kontakt und die Anhaftung von ruhenden Thrombozyten an die beschädigte Gefäßwand. Die sekundäre Adhäsion hingegen umfasst die Interaktion zwischen bereits aktivierten Thrombozyten und Subendothel (Gawaz 1999).

Die primäre Adhäsion wird durch die Wechselwirkung von Glykoproteinen mit der subendothelialen Matrix vermittelt. Insbesondere binden Thrombozyten an vaskuläres Kollagen und andere adhäsive Moleküle. Die Glykoproteine GPIb/V/IX und GPVI sind dabei maßgeblich beteiligt. In der Kontaktphase bindet GPIb/V/IX an von-Willebrand-Faktor (vWF), der von der geschädigten Gefäßwand freigesetzt wird (Turitto *et al.* 1985; Falati *et al.* 1999). Nach der initialen Adhäsion erfolgt in der Stabilisierungsphase eine verstärkte Bindung weiterer membranständiger Rezeptoren, insbesondere von Integrinen. Diese Integrine, wie beispielsweise Integrin- α IIb β 3, spielen eine entscheidende Rolle bei der Festigung der Thrombozytenbindung an die subendotheliale Matrix und fördern die Bildung eines stabilen Hämostasepfropfens (Gawaz *et al.* 2005; Ruggeri und Mendolicchio 2007).

Durch die Strömung des Blutes durch die Gefäße findet die Adhäsion unter starken Scherkräften statt. Dies erfordert, dass die erste Kontaktphase zwischen Thrombozyten und der subendothelialen Matrix schnell und stabil abläuft, um eine effiziente Hämostase zu gewährleisten. Die starken Scherkräfte tragen aber auch dazu bei, dass Thrombozyten rasch aktiviert werden. Die folgenden Interaktionen initiieren nicht nur den Adhäsionsprozess, sondern lösen auch komplexe biochemische Signalwege aus, die zu einer weiteren Aktivierung der Thrombozyten führen (Kroll *et al.* 1996; Sugimoto *et al.* 1999).

1.2.1.2 Aktivierung

Die Aktivierung der Thrombozyten ist ein zentraler Schritt im Prozess der Hämostase, der zu Veränderungen in ihrer Form und zur Freisetzung von Granula führt. Verschiedene Stimuli wie Kollagen, ADP und Thrombin lösen diesen Aktivierungsprozess aus. Thrombozyten setzen

dabei Thromboxan A₂ (TxA₂) und andere Signalmoleküle frei, die die weitere Aktivierung verstärken und den Beginn der Aggregation einleiten (Cheng *et al.* 2002; Ruggeri 2002). Ein Schlüsselaspekt der Thrombozytenaktivierung ist die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Das Calcium fungiert dabei als essenzieller sekundärer Botenstoff und spielt eine zentrale Rolle bei der Übertragung von Signalen, die die Thrombozytenaktivierung auslösen. Dieser regulatorische Vorgang wird durch die Bindung spezifischer Stimuli an Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche initiiert, was zu einem rapiden Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels führt. Dieser Anstieg wiederum aktiviert eine Vielzahl von calciumabhängigen Signalwegen, die den gesamten Aktivierungsprozess vorantreiben und die Formveränderung der Thrombozyten, den sogenannten „*shape change*“ bewirken (Gibbins 2004; Varga-Szabo *et al.* 2009).

Ein weiterer bedeutender Faktor in der Thrombozytenaktivierung sind Phospholipasen, spezifisch Phospholipase A₂ (PLA₂) und Phospholipase C (PLC). Diese Enzyme spielen eine entscheidende Rolle bei der Umwandlung von Phospholipiden in der Zellmembran in bioaktive Moleküle. Phospholipase A₂ hydrolysiert Phospholipide, um Arachidonsäure freizusetzen. Diese Arachidonsäure dient wiederum als Vorläufer für die Produktion von Thromboxan A₂ (TxA₂), einem starken Aggregationsmediator. Parallel dazu aktiviert Phospholipase C die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die sekundären Botenstoffe Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Diese Moleküle sind ebenfalls in der Signalweiterleitung während der Thrombozytenaktivierung involviert und verstärken den gesamten Aktivierungsprozess (Bever *et al.* 1983; Gibbins 2004).

1.2.1.3 Degranulation

Die Degranulation der Thrombozyten ist ein komplexer Prozess, bei dem verschiedene Granula-Inhalte freigesetzt werden, um die Thrombozytenaktivierung und die Bildung eines stabilen Blutgerinnsels zu unterstützen. Die Granula bestehen aus unterschiedlichen Bestandteilen, darunter α -Granula, δ -Granula und lysosomale Granula, und enthalten eine breite Palette von biologisch aktiven Molekülen. P-Selektin, ein Membranprotein auf den α -Granula, ist ein wichtiger Bestandteil, der bei der Thrombozytenaktivierung und der Wechselwirkung mit anderen Blutzellen und Gefäßwandzellen eine entscheidende Rolle spielt (Kaplan und Owen 1986; Rendu und Brohard-Bohn 2001).

Während der Degranulation werden P-Selektin, Plättchenfaktor 4, und andere Inhaltsstoffe freigesetzt und fördern die Wechselwirkung der Thrombozyten mit Leukozyten und

Endothelzellen. Diese Interaktionen sind entscheidend für die Regulation von Entzündungsprozessen, die an der Atherogenese beteiligt sind (Gawaz *et al.* 2005). Besonders P-Selektin spielt eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Immunzellen, insbesondere von Leukozyten, an Stellen von Gefäßverletzungen oder Entzündungen (André 2004). P-Selektin ist ein Zelladhäsionsmolekül, das auf aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert wird. Es bindet an P-Selektin-Glycoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) auf Leukozyten, was zur Adhäsion und Migration dieser Immunzellen in das entzündete Gewebe beiträgt. Dies verstärkt die entzündliche Komponente der Thrombozytenaktivierung und trägt zu Prozessen wie der Thrombusbildung und der Ausbreitung von Entzündungsreaktionen bei (Cerletti *et al.* 2012).

Die δ -Granula enthalten bioaktive Moleküle wie Serotonin, das die Gefäßkonstriktion und eine verstärkte Thrombozytenaktivierung fördert, sowie ADP, ATP und Ca^{2+} (Ambrosio und Di Pietro 2017). Die Freisetzung dieser Inhaltsstoffe trägt zur Verstärkung der Thrombozytenaktivierung und der Bildung eines stabilen Blutgerinnsels bei (Gremmel *et al.* 2016b).

1.2.1.4 Aggregation

Mit der Aktivierung folgt die Aggregation, bei der Thrombozyten miteinander interagieren und es zu einer sogenannten Koadhäsion kommt. Die primäre Thrombozytenaggregation, beginnt nach der initialen Adhäsion an der beschädigten Gefäßwand. Während der primären Thrombozytenaggregation spielt das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (auch GPIIb-IIIa), eine entscheidende Rolle indem es Fibrinogen bindet, was zu einer stabilen aber vorerst reversiblen Verbindung der Thrombozyten führt (Ruggeri *et al.* 1999). Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ist ein heterodimeres Transmembranprotein, das auf der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert wird. In Ruhe befindet sich Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ in einem inaktiven Zustand, und die Bindungsstellen für Fibrinogen sind verdeckt (Bennett 2005). Bei der Aktivierung der Thrombozyten durch verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel ADP oder Thrombin, kommt es zu einer Konformationsänderung, die die Bindungsstellen für Fibrinogen freilegt. Dies ermöglicht die spezifische Bindung von Fibrinogen an Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ und initiiert die Bildung von Fibrinogenbrücken zwischen benachbarten Thrombozyten (Marguerie *et al.* 1980; Shattil *et al.* 1985). Die resultierenden Aggregationsstrukturen sind vorläufig, aber stabil und legen den Grundstein für die nachfolgende sekundäre Thrombozytenaggregation.

Die sekundäre Thrombozytenaggregation ist irreversibel und setzt nach der Freisetzung spezifischer Substanzen aus den Granula, durch die sogenannte Degranulation, ein. Granula

enthalten bioaktive Substanzen wie ADP und Thromboxan A₂, die die Aktivierung der Thrombozyten weiter vorantreiben. Im Zuge dessen kommt es zu einer verstärkten und irreversiblen Bindung von Integrin- α IIb β 3, Fibrinogen und vWF. Diese stabilen Verbindungen sind von zentraler Bedeutung für die Bildung eines dichten und stabilen Thrombus (Turner *et al.* 2001; Jackson *et al.* 2003).

1.2.2 Sekundäre Hämostase

Die sekundäre Hämostase ist ein weiterer essenzieller Schritt im Prozess der Blutgerinnung, der nach der primären Hämostase erfolgt. In dieser Phase wird das Gerinnungssystem aktiviert, um ein stabiles Blutgerinnsel zu bilden. Schlüsselakteure in der sekundären Hämostase sind die Gerinnungsfaktoren, die in einem komplexen Kaskadensystem aktiviert werden. Die Gerinnungskaskade kann in den intrinsischen und extrinsischen Weg unterteilt werden (Dahlbäck 2005; Mackman 2008).

Der intrinsische Weg wird durch Kollagen und andere Oberflächenaktivatoren ausgelöst, während der extrinsische Weg durch äußere Gewebefaktoren wie das Gewebsthromboplastin in Gang gesetzt wird. Beide Wege führen zur Aktivierung von Gerinnungsfaktoren, darunter Faktor X, der eine zentrale Rolle in der Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin spielt (Hoffman und Monroe 2001; Mann *et al.* 2003). Thrombin wiederum spielt eine zentrale Rolle bei der Konvertierung von Fibrinogen zu Fibrin, indem es Fibrinopeptide abspaltet und die Polymerisation von Fibrinmolekülen initiiert (Blombäck *et al.* 1978; Standeven *et al.* 2005). Die Fibrinstränge verbinden sich miteinander und bilden ein stabiles dreidimensionales Netzwerk, das als Fibringerinnsel bezeichnet wird (Weisel 2005).

Das Fibringerinnsel trägt dazu bei, den vorläufigen Thrombozytenpfropfen, der während der primären Hämostase gebildet wurde, zu stabilisieren. Durch die Fibrinvernetzung werden die Thrombozyten fester miteinander verbunden, und der Hämostasepfropfen wird fester und widerstandsfähiger gegenüber Blutfluss und Scherkräften (Furie und Furie 2008).

1.2.3 Apoptose

Die Apoptose bei Thrombozyten spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation ihrer Lebensdauer und der Homöostase im Blutkreislauf. Diese Form des programmierten Zelltods ist ein natürlicher Mechanismus, der dazu beiträgt, überschüssige oder alternde Thrombozyten

zu eliminieren, um Platz für neuere und funktionsfähigere Zellen zu schaffen (Lebois und Josefsson 2016). Die Apoptose der Thrombozyten wird durch verschiedene Signale ausgelöst, darunter intrazelluläre Stressfaktoren, externe Signale wie Zytokine und die Bindung von Liganden an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche (McArthur *et al.* 2018). Dies führt zur Aktivierung von Signalwegen, die die Expression pro-apoptotischer Proteine erhöhen und die Aktivität anti-apoptotischer Proteine verringern, was letztendlich zum Zelltod führt (Leytin 2012). Eine Dysregulation der Thrombozytenapoptose kann zu verschiedenen Krankheitsbildern führen, darunter Thrombozytopenie, Thrombose und hämatologische Malignome (Josefsson 2023).

Ein entscheidender Aspekt bei der Apoptose ist die Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche, ein Marker für apoptotische Zellen, der die Wechselwirkung mit anderen Zellen und den Abbau ermöglicht (Gyulkhandanyan *et al.* 2012).

Ein wichtiger Mechanismus ist das mitochondriale Potential, das eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Apoptose spielt. Durch Stresssignale wie DNA-Schäden oder oxidativen Stress wird das mitochondriale Potential gestört, was zur Freisetzung von Cytochrom c führt und den intrinsischen Signalweg aktiviert. Dieser Prozess wird durch Regulatoren wie die Bcl-2-Familie von Proteinen kontrolliert, die das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen aufrechterhalten (Lebois und Josefsson 2016).

Des Weiteren spielen extrinsische Signalwege eine Rolle, bei denen externe Liganden wie TNF- α oder Fas-Ligand mit ihren entsprechenden Rezeptoren interagieren und die Initiierung der Apoptose durch die Aktivierung von Caspase-8 vermitteln (McArthur *et al.* 2018).

Insgesamt ist die Apoptose ein wesentlicher Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Thrombozytenhomöostase und spielt eine wichtige Rolle bei der Pathophysiologie verschiedener thrombozytärer Erkrankungen.

1.3 Thrombose

Herz-Kreislauf-Erkrankungen treten in vielfältigen Manifestationen auf und stellen weltweit die führende Todesursache dar, allen voran ischämische Herzkrankheiten und Schlaganfälle.

Eine besonders schwerwiegende Komplikation stellen somit thrombotische Erkrankungen dar. Thrombosen sind lebensbedrohliche Ereignisse, die durch die Bildung von Blutgerinnseln in den Blutgefäßen entstehen und zu schwerwiegenden Folgen wie Herzinfarkten, Schlaganfällen und Lungenembolien führen können (Roth *et al.* 2020).

Verschiedene Faktoren, darunter genetische Prädispositionen sowie erworbene Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Übergewicht, Ernährung, körperliche Inaktivität, Tabakkonsum, Alkoholmissbrauch aber auch psychosoziale Faktoren, können zur Entstehung solcher Gefäßverschlüsse beitragen (Yusuf *et al.* 2004; O'Donnell *et al.* 2016).

1.3.1 Thrombozytäre Erkrankungen

Herzinfarkt, Schlaganfall und Lungenembolie sind schwerwiegende vaskuläre Ereignisse, die erhebliche Morbidität und Mortalität weltweit verursachen. Der Herzinfarkt, auch bekannt als Myokardinfarkt, wird durch die plötzliche Blockade einer oder mehrerer Koronararterien verursacht, was zu einer unzureichenden Blutversorgung des Herzmuskels führt. Dieser Zustand kann durch die Ablagerung von Plaque in den Arterien ausgelöst werden, die schließlich zu einem akuten Verschluss führen kann. Die Ischämie des Herzmuskels führt zu typischen Symptomen wie Brustschmerzen, die in den Arm, den Nacken oder den Rücken ausstrahlen können, sowie zu Atemnot, Übelkeit und Schweißausbrüchen. Ein Herzinfarkt kann schwerwiegende Komplikationen wie Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz oder sogar den plötzlichen Herztod verursachen (Gawaz 2004; Yusuf *et al.* 2004).

Ein Schlaganfall tritt auf, wenn die Blutversorgung eines Teils des Gehirns unterbrochen wird, entweder durch ein blockiertes Blutgefäß (ischämischer Schlaganfall) oder durch eine Blutung im Gehirn (hämorrhagischer Schlaganfall). Die häufigsten Ursachen für einen ischämischen Schlaganfall sind Blutgerinnsel, die sich in den Arterien des Gehirns bilden und den Blutfluss blockieren. Ein hämorrhagischer Schlaganfall tritt auf, wenn ein Blutgefäß im Gehirn platzt und Blut in das umgebende Gewebe austritt (Grysiewicz *et al.* 2008). Die Symptome eines Schlaganfalls können plötzliche Lähmungen, Sehstörungen, Sprach- und Sprechstörungen sowie starke Kopfschmerzen sein. Ein Schlaganfall kann zu dauerhaften neurologischen

Schäden führen und in einigen Fällen sogar tödlich verlaufen (O'Donnell *et al.* 2016; Virani *et al.* 2021).

Die weltweit dritthäufigste kardiovaskuläre Todesursache nach Schlaganfall und Herzinfarkt stellt die Lungenembolie dar. Auch diese ist eine potenziell lebensbedrohliche Erkrankung, die auftritt, wenn sich ein Blutgerinnsel, normalerweise aus den tiefen Venen der Beine (Thrombose), löst und in die Lungenarterien gelangt, wo es einen Teil oder den gesamten Blutfluss blockieren kann (Essien *et al.* 2019). Auch eine Lungenembolie kann zu schwerwiegenden Komplikationen führen, einschließlich eines plötzlichen Herzstillstands oder Todes (Doherty 2017).

Die Prävention und Behandlung dieser vaskulären Ereignisse erfordert eine ganzheitliche Herangehensweise, die auf Risikoreduktion, Lebensstiländerungen und medizinischer Intervention basiert. Früherkennung von Risikofaktoren, Screening-Programme und die Entwicklung wirksamer Therapien sind entscheidend, um die Inzidenz und die negativen Auswirkungen von Herzinfarkt, Schlaganfall und Lungenembolie zu verringern.

1.3.2 Thromboinflammation

Thromboinflammation ist ein komplexer Prozess, der durch die Interaktion zwischen Thrombozyten, Entzündungszellen und der Gefäßwand gekennzeichnet ist (Engelmann und Massberg 2013). Eine der Hauptursachen für Thromboinflammation ist die endotheliale Dysfunktion, die zu einer gesteigerten Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten sowie zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine führt (Libby *et al.* 2002).

Ein zentraler Signalweg in der Thromboinflammation ist die Aktivierung des Gewebefaktor-Signalwegs, der zur Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und zur Bildung von Thromben führt (Gawaz *et al.* 2005). Darüber hinaus spielen inflammatorische Mediatoren wie Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) eine wichtige Rolle bei der Modulation der Thrombozytenfunktion und der Förderung der Thromboinflammation (Gremmel *et al.* 2016a).

Thromboinflammation ist eng mit verschiedenen Krankheitsbildern verbunden, darunter Atherosklerose, Myokardinfarkt, Schlaganfall und venöse Thromboembolien (Engelmann und Massberg 2013). In der Atherosklerose beispielsweise fördert die Anwesenheit von entzündlichen Zellen in atherosklerotischen Plaques die Thrombozytenaktivierung und die Bildung von Thromben (Libby 2002).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Thromboinflammation ist die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten. Durch die Expression von Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin und ICAM-1 können Thrombozyten aktiv an der Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten beteiligt sein, was die lokale Entzündungsreaktion verstärkt (Brühl *et al.* 2012).

Die Entwicklung neuer Therapien zur gezielten Unterdrückung der Thromboinflammation stellt daher ein vielversprechendes Ziel dar, um das Risiko thrombotischer Ereignisse bei entzündlichen Erkrankungen zu reduzieren und die klinischen Ergebnisse zu verbessern (Engelmann und Massberg 2013; Sharma *et al.* 2022).

1.3.3 Therapie

Die Therapie thrombotischer und thromboinflammatorischer Erkrankungen zielt darauf ab, die Bildung von Blutgerinnseln zu verhindern und Entzündungen im Gefäßsystem zu reduzieren. Eine zentrale Rolle spielen dabei Thrombozytenaggregationshemmer, die die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten hemmen und somit das Risiko von thrombotischen Ereignissen wie Herzinfarkt und Schlaganfall verringern (McNicol und Israels 2003).

Zu den wichtigsten Thrombozytenaggregationshemmern gehören Acetylsalicylsäure (Aspirin), Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor. Aspirin wirkt durch die Hemmung der Cyclooxygenase-1, einem Schlüsselenzym bei der Synthese von Thromboxan A₂, einem wichtigen Mediator der Thrombozytenaggregation, während Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor über die Hemmung des Adenosine-Diphosphate-Rezeptors (P₂Y₁₂-Rezeptor) auf Thrombozyten wirken und somit die Thrombozytenfunktion reduzieren (Patrono *et al.* 2005; Wiviott *et al.* 2007; Wallentin *et al.* 2009).

Diese Thrombozytenaggregationshemmer werden häufig in Kombination mit anderen antithrombotischen Medikamenten eingesetzt, insbesondere bei Patienten mit akuten koronaren Syndromen oder nach interventionellen Eingriffen wie Stentimplantationen (Yusuf *et al.* 2001; Steinhubl *et al.* 2002).

Patienten, die bereits ein thrombotisches Ereignis erlitten haben, weisen ein erhöhtes Risiko für Folgeereignisse auf und erfordern daher oft eine langfristige medikamentöse Therapie, um das Wiederauftreten solcher Ereignisse zu reduzieren (Savarese *et al.* 2016; Udell *et al.* 2016).

Für Patienten mit thromboinflammatorischen Ereignissen wie Atherosklerose und anderen entzündlichen Gefäßerkrankungen werden zunehmend Therapien entwickelt, die sowohl die Thrombose als auch die Entzündung adressieren. Dies umfasst die Verwendung von

Antiinflammatorika wie Steroiden und entzündungshemmenden Biologika sowie die Kombination von Thrombozytenaggregationshemmern mit antientzündlichen Medikamenten, um die zugrunde liegenden Mechanismen der Krankheit zu bekämpfen (Dinarello 2010; Liberale *et al.* 2021).

Die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur gezielten Hemmung von Thrombose und Entzündung bei thrombotischen und thromboinflammatorischen Erkrankungen hat das Potenzial, die klinischen Ergebnisse zu verbessern und das Risiko von Herz-Kreislauf-Ereignissen und anderen Komplikationen signifikant zu reduzieren.

1.3.4 Blutungsrisiko in der Therapie von thrombotischen Erkrankungen

Die Therapie mit antithrombotischen und entzündungshemmenden Medikamenten kann mit einer Reihe von Komplikationen und Nebenwirkungen verbunden sein. Zu einigen dieser Komplikationen gehören gastrointestinale Blutungen, intrakranielle Blutungen, allergische Reaktionen und Medikamentenwechselwirkungen (Steiner *et al.* 2006; Ruiz-Nodar *et al.* 2008; Gutermann *et al.* 2015). Insbesondere ältere Patienten oder solche mit vorbestehenden Erkrankungen sind einem erhöhten Risiko für gastrointestinale Blutungen ausgesetzt, während intrakranielle Blutungen schwerwiegende neurologische Folgen haben können (Fitzmaurice *et al.* 2002).

Besondere Aufmerksamkeit erfordern auch Patienten mit vorbestehenden Erkrankungen wie Magengeschwüren, Lebererkrankungen oder Niereninsuffizienz, da diese das Risiko für Blutungen weiter erhöhen können (Ageno und Donadini 2018). Eine individuelle Abwägung zwischen dem Nutzen der antithrombotischen Therapie zur Verhinderung thrombotischer Ereignisse und der Gefahr von Blutungen ist daher unerlässlich.

Auch bei invasiven Eingriffen oder Operationen besteht für Patienten, die bereits antithrombotische Medikamente einnehmen, ein erhöhtes Blutungsrisiko. Das Absetzen dieser Medikamente vor solchen Eingriffen birgt jedoch ebenfalls Gefahren, da es das Risiko eines thrombotischen Ereignisses erhöhen kann (Wagner *et al.* 2019).

Die Blutungsgefahr bei der antithrombotischen Therapie stellt ein erhebliches Problem dar. Es kann die Wirksamkeit der Behandlung beeinträchtigen und schwerwiegende Komplikationen verursachen, die die Lebensqualität der Patienten stark beeinträchtigen oder sogar lebensbedrohlich sein können (Scharf 2009). Trotz der lebensrettenden Wirkung von

Antithrombotika bei der Verhinderung thrombotischer Ereignisse wie Herzinfarkt und Schlaganfall bleiben deren Nebenwirkungen eine große Herausforderung in der klinischen Praxis. Die Forschung macht jedoch kontinuierliche Fortschritte bei der Entwicklung neuer Medikamente mit dem Potenzial, diese unerwünschten Effekte zu verringern, ohne die antithrombotische Wirksamkeit zu beeinträchtigen (Ruff *et al.* 2014).

1.4 Thrombozytäre Chemokinrezeptoren und Chemokine

Thrombozyten spielen eine immer stärker anerkannte Rolle bei systemischen Entzündungsreaktionen und der Regulation der angeborenen Immunabwehr. Sie exprimieren eine Vielzahl von Chemokinrezeptoren, die eine breite Palette von Chemokinen erkennen und darauf reagieren. Diese Rezeptoren können entweder die Freisetzung von Chemokinen stimulieren oder die Thrombozytenaktivierung induzieren, was zu einer Vielzahl von zellulären und immunologischen Reaktionen führt (Gear und Camerini 2003; Chatterjee und Geisler 2016). Thrombozytäre Chemokinrezeptoren und Chemokine spielen beispielsweise eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen und der Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der Verletzung oder Infektion (Hundelshausen und Weber 2007). So sind diese Rezeptoren und Moleküle nicht nur für die Hämostase und die Thrombusbildung von Bedeutung, sondern tragen auch zur Entstehung und Progression von thrombotischen Erkrankungen bei (Gleissner *et al.* 2008).

Chemokine sind kleine, lösliche Proteine, die aus etwa 70 bis 100 Aminosäuren bestehen und eine hohe strukturelle Vielfalt aufweisen. Sie können in vier verschiedene Klassen unterteilt werden: CXC, CC, CX3C und XC, basierend auf der Anordnung ihrer konservierten Cysteinreste (Rollins 1997). Diese Proteine bilden eine dreidimensionale Struktur, die durch die Anwesenheit von zwei bis vier Disulfidbrücken zwischen den konservierten Cysteinresten stabilisiert wird (Baggiolini *et al.* 1997; Blanchet *et al.* 2012). Die Struktur von Chemokinen bestimmt ihre Fähigkeit zur Bindung an spezifische Rezeptoren und zur Induktion zellulärer Reaktionen wie Chemotaxis und Aktivierung von Immunzellen. Die Wechselwirkung zwischen Chemokinen und ihren Rezeptoren ist äußerst selektiv und vermittelt unter anderem die gerichtete Migration von Zellen zu Entzündungsstellen oder anderen Zielgeweben (Griffith *et al.* 2014).

Diese Rezeptoren sind oft sieben-transmembrane G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die aus einer N-terminalen Domäne, sieben α -helikalen Transmembranbereichen, drei intrazellulären und drei extrazellulären Schleifen sowie einem C-terminalen Bereich bestehen (Blanchet *et al.* 2012; Bachelerie *et al.* 2014).

Thrombozytäre Chemokinrezeptoren sind in der Lage, Chemokine zu erkennen und vermitteln dadurch die Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten an entzündeten Gefäßwänden (Leberzammer und Hundelshausen 2023). Die drei wichtigsten Chemokine, die zur Aktivierung von Thrombozyten beitragen können, sind CXCL12 (SDF-1) das mit dem Chemokinrezeptor

CXCR4 interagiert, CCL17 (TARC) und CCR2 (MDC) die beide an CCR4 binden (Abi-Younes *et al.* 2000; Abi-Younes *et al.* 2001; Gear *et al.* 2001).

Darüber hinaus können Chemokine die Rekrutierung von Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen fördern, was zu einer weiteren Verschärfung von entzündlichen Reaktionen führt (Viola und Luster 2008).

Eine besonders relevante Rolle spielen Chemokine und ihre Rezeptoren auch bei der Pathogenese von Atherosklerose, einem Schlüsselereignis in der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Durch die Interaktion mit Chemokinen wie dem Monozyten chemotaktischen Protein-1 (MCP-1) und den entsprechenden Rezeptoren wie CCR2 können Monozyten in die Gefäßwand einwandern und sich dort zu Makrophagen differenzieren, was zur Bildung von atherosklerotischen Plaques beiträgt (Braunersreuther *et al.* 2007).

Insgesamt liefern diese Erkenntnisse wichtige Einblicke in die Mechanismen, die thrombozytäre Chemokinrezeptoren und Chemokine in der Pathophysiologie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und thromboinflammatorischen Zuständen spielen. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse könnte zur Identifizierung neuer therapeutischer Ziele führen und die Entwicklung von Medikamenten vorantreiben, die gezielt in die Entzündungsreaktionen und Thrombusbildung eingreifen.

1.4.1 Der thrombozytäre Chemokinrezeptor ACKR3

Thrombozytäre Chemokinrezeptoren spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Thrombozytenfunktion und der Hämostase. In diesem Zusammenhang rücken spezifische Rezeptoren wie ACKR3 (*Atypical Chemokine Receptor 3*), auch als CXCR7 bekannt, zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses (Viola und Luster 2008). ACKR3 ist ein nicht-klassischer (*atypical*) 7 transmembran G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der ursprünglich als Bindungsstelle für Chemokine identifiziert wurde, aber auch andere Liganden und Proteine der Gerinnungskaskade binden kann (Charo und Ransohoff 2006).

ACKR3 wird auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert und hat eine komplexe Rolle in der Regulation ihrer Funktionen, da er an der Modulation der Thrombozytenaktivierung, -aggregation und -adhäsion beteiligt ist (Chatterjee *et al.* 2015).

Darüber hinaus interagiert ACKR3 mit anderen Molekülen und Signalwegen, die für die Thrombozytenfunktion und die Pathophysiologie thrombotischer Erkrankungen relevant sind. Beispielsweise wurde festgestellt, dass eine Wechselwirkung zwischen ACKR3 und dem

Transformierenden Wachstumsfaktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) sowie dem CXC-Motiv-Chemokin 12 (CXCL12) und seinem Rezeptor CXCR4 in der Regulation von Thrombozytenfunktionen eine Rolle spielt (Rath *et al.* 2016). Außerdem wurde auch CXCL11 als weiterer Ligand von ACKR3 identifiziert. Im Vergleich zu CXCL12 weist CXCL11 eine höhere Bindungsaffinität an ACKR3 auf und kann ebenfalls regulatorisch in entzündlichen und vaskulären Prozessen wirken (Naumann *et al.* 2010). Die genaue Rolle von CXCL11 in der Thrombozytenbiologie ist bislang jedoch weniger umfassend untersucht.

Neben diesen klassischen Chemokinen wurde zudem der Makrophagen-Migrationsinhibitionsfaktor (MIF) als weiterer endogener Ligand von ACKR3 identifiziert (Alampour-Rajabi *et al.* 2015). MIF ist ein pleiotropes Zytokin mit proinflammatorischen Eigenschaften, das auf Thrombozyten jedoch keine aktivierende Wirkung entfaltet. Stattdessen wurde gezeigt, dass MIF über ACKR3 anti-apoptotische Signale in Thrombozyten vermittelt und deren Überleben fördert. (Chatterjee *et al.* 2014).

Weitere Studien haben gezeigt, dass die Expression von ACKR3 auf der Oberfläche von Thrombozyten mit ihrem Überlebenspotenzial und ihrer funktionellen Erholung nach einem akuten Myokardinfarkt (STEMI) assoziiert ist (Rath *et al.* 2018).

Die Bedeutung von ACKR3 in der Thrombozytenbiologie und der Pathophysiologie thrombotischer Erkrankungen wird durch eine Reihe von Erkenntnissen gestützt, die darauf hindeuten, dass dieser Rezeptor auch an der Regulation von Entzündungsreaktionen, Gewebeschäden und der Pathogenese von thromboinflammatorischen Erkrankungen beteiligt ist (Rohlfing *et al.* 2022). Der ACKR3-Rezeptor ist ein vielversprechendes Ziel für die Forschung und Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, da er beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Regulation der Thrombozytenfunktion und der Gewebeschädigung nach Ischämie/Reperfusion (I/R) spielt. Zudem reduziert die Verabreichung eines ACKR3-Agonisten vor einer Ischämie die Herzschädigung und Zellinfiltration im Infarktbereich. ACKR3 ist auch in Endothelzellen entscheidend für die vaskuläre Homöostase und das kardiale Remodeling nach einem Herzinfarkt. Diese Erkenntnisse unterstreichen das Potenzial von ACKR3 als therapeutisches Ziel zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Rohlfing *et al.* 2022; Rath *et al.* 2018). Die Entwicklung von Wirkstoffen, die gezielt auf diesen Rezeptor abzielen, könnte neue Behandlungsmöglichkeiten für diese lebensbedrohlichen Erkrankungen bieten (Wang *et al.* 2018).

1.4.2 Interaktion und Zusammenspiel von CXCR4 und ACKR3 auf Thrombozyten

Die Dynamik der Rezeptoren ACKR3 und CXCR4 auf Thrombozyten ist ein relativ junges Forschungsgebiet in der Immunologie und Hämatologie. Beide Rezeptoren gehören zur Familie der Chemokinrezeptoren und spielen eine bedeutende Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen, einschließlich Migration, Zellüberleben und Signaltransduktion.

CXCR4 ist ein gut etablierter Chemokinrezeptor, der auf Thrombozyten exprimiert wird. Sein Ligand, das Chemokin CXCL12 (auch bekannt als SDF-1), spielt eine entscheidende Rolle in der Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen und der Migration von Zellen des Immunsystems (Bleul *et al.* 1996). CXCR4 ist auch in der Hämostase und Thrombose involviert, indem es die Thrombozytenaktivierung und -aggregation reguliert (Leberzammer *et al.* 2022). Es konnte gezeigt werden, dass ACKR3 in der Lage ist, CXCL12 zu binden und somit die Verfügbarkeit dieses Chemokins für CXCR4 zu modulieren (Naumann *et al.* 2010). Auch wenn ACKR3 ursprünglich als nicht-signalisierender „scavenger“-Rezeptor für CXCL12 beschrieben wurde, zeigen neuere Studien jedoch, dass ACKR3 in der Lage ist, Signale zu vermitteln, wenn auch auf andere Weise als CXCR4 (Burns *et al.* 2006).

Das Zusammenspiel von CXCR4 und ACKR3 auf Thrombozyten ist komplex und noch nicht vollständig verstanden. Es gibt Hinweise darauf, dass CXCR7 als Regulator von CXCR4 fungiert, indem es den Abbau von CXCL12 fördert und somit die Signalübertragung durch CXCR4 beeinflusst (Balabanian *et al.* 2005). Darüber hinaus könnte ACKR3 durch Heterodimerisierung mit CXCR4 direkt auf die Signaltransduktion einwirken (Décaillot *et al.* 2011).

Weitere Studien zeigten, dass die Aktivierung von CXCR4 durch CXCL12 zur Thrombozytenaggregation und zur weiteren Freisetzung von Alpha-Granula führt, während die Präsenz von ACKR3 diese Effekte modulieren kann. Dies deutet darauf hin, dass CXCR7 eine fein abgestimmte Regulation der CXCR4-vermittelten Thrombozytenantwort ermöglicht (Chatterjee und Gawaz 2013; Chatterjee *et al.* 2015).

Das Verständnis des komplexen Zusammenspiels zwischen CXCR4 und ACKR3 auf Thrombozyten könnte wichtige therapeutische Implikationen haben, insbesondere in Bezug auf thromboembolische Erkrankungen und Entzündungsprozesse. Inhibitoren oder Modulatoren dieser Rezeptoren könnten potenziell als therapeutische Mittel zur Kontrolle der Thrombozytenfunktion und zur Prävention von Thrombosen eingesetzt werden.

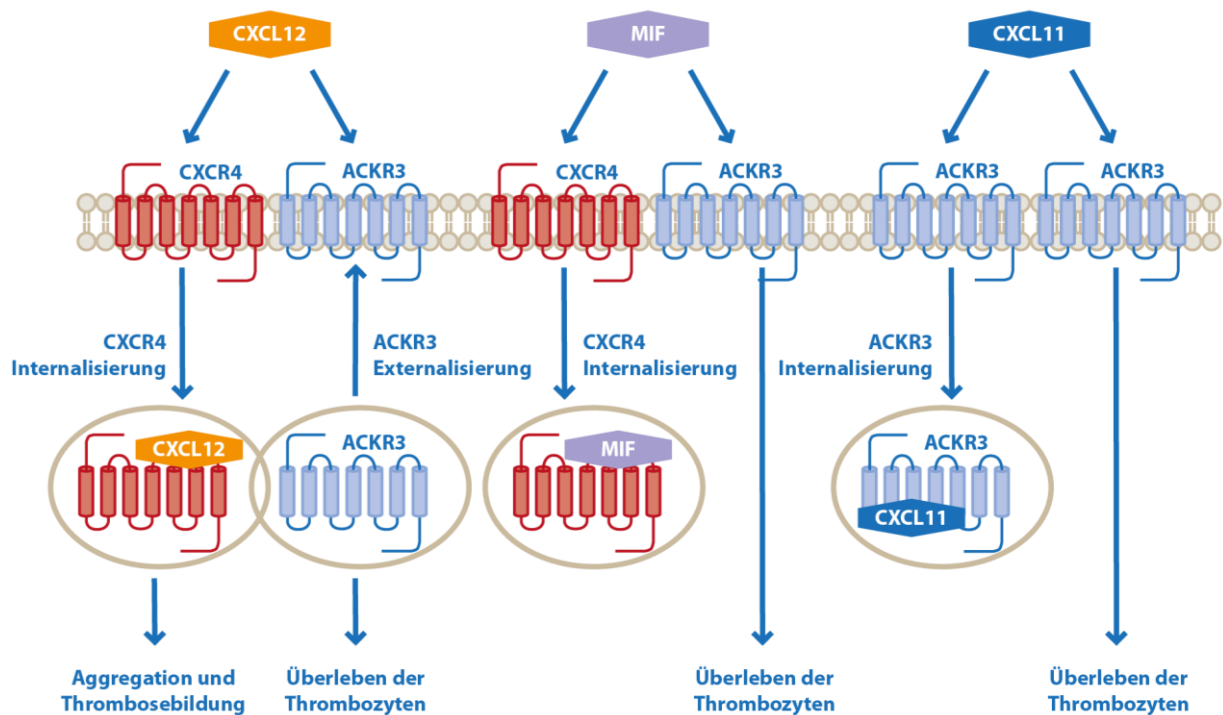


Abbildung 3: Funktion und Interaktion von CXCR4 und ACKR3 auf Thrombozyten: Die Darstellung zeigt, dass die Bindung von CXCL12 an CXCR4 auf der Thrombozytenoberfläche die Internalisierung des Rezeptors auslöst, während gleichzeitig ACKR3 dynamisch an die Zelloberfläche exponiert wird. Über CXCR4 vermittelt CXCL12 eine pro-thrombotische Reaktion, während die Bindung an ACKR3 potenziell eine Überlebensförderung der Thrombozyten bewirkt. MIF bindet ebenfalls an CXCR4 und führt zur Internalisierung. Zudem interagiert MIF direkt mit ACKR3, ähnlich wie der ACKR3-spezifische Ligand CXCL11, und unterstützt das Überleben der Thrombozyten, indem es sie vor Aktivierung und Apoptose schützt. Die Effekte von MIF und CXCL11 auf die Überlebensförderung werden durch spezifische Blockade von ACKR3 aufgehoben (modifiziert nach Chatterjee *et al.* 2015).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Durchflusszytometer	BD FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, California, USA
Flusskammer	Weite 5 mm, Tiefe 50 µm, Maastricht Instruments, Maastricht, Niederlande
Infusionspumpe	KDS-100-CE, KDS Scientific Inc., Holliston, MA, USA
Inkubator	CO ₂ Incubator MCO-18AIC, SANYO Electric Co. Ltd., Moriguchi, Japan
Lichtmikroskop	Nikon ECLIPSE TS100, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Mikroplatten Reader	Glomax Multi Detection System, Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
Mikrowelle	Bosch, Deutschland
Odyssey® Infrarot Scanner	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
pH Meter	HI 9025 microcomputer, Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, Deutschland
Schüttler	KS 260 basic, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Sysmex Hämatologieanalysator	KX-21N, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt
Thermomixer	Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Vollblutluminoaggregometer	Chrono-Log Modell 700 Chrono-Log Corporation, Haverton, PA, USA
Ultraschallgerät	VevoStrain 2100, VisualSonics, Toronto, Kanada
Waage	Kern CM 150-IN Pocket Balance, KERN & Sohn GmbH, Balingen,
Zentrifugen	Centrifuge 5417C Eppendorf, Hamburg, Deutschland Centrifuge 5417R Eppendorf, Hamburg, Deutschland Multifuge 1S Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, US

2.1.2 Gebrauchsgegenstände

CPDA Monovetten 8,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser (verschiedene Größen)	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
EDTA Mikro-Probengefäß	1,3 ml, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Einmalkapillaren	Einmal-Kapillarpipetten, Hirschmann® minicaps® end to end Natrium Heparin, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	Safe-Lock Tubes, Eppendorf Deutschland, Hamburg, Deutschland
Falcon Röhrchen	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Fettstift	Super PAP Pen Liquid Blocker, Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA
Glasküvette 450µl	Chrono-Log Corporation, Haverton, PA, USA
Kanülen	BD Microlance™ 3, verschiedene Größen: 27G 0,4 x 19 mm, Becton Dickinson and Company Limited, Drogheda, Irland B. Braun Sterican 30G 0,3 x 12 mm, B. Braun, Melsungen, Deutschland

Neubauer-Zählkammer	C-Chip, Neubauer Improved Einweg-Zählkammer, ehemals Biochrom GmbH nun Merck, Darmstadt, Deutschland
Objektträger	Super Frost®Plus, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Polystyrolröhrchen für die Durchflusszytometrie	5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol, Falcon® Corning Inc., Corning, New York, USA
Safety-Multifly	Sarstedt AG & Co., Nümrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (verschiedene Größen)	Corning Incorporated, Corning, USA
Spritzen (verschiedene Größen)	Firma B. Braun, Melsungen, Deutschland
Schaber (Zellkultur)	Corning® cell lifter Polyethylene, sterile, Corning Inc., Corning, New York, USA
96-Well Platten	96-Well Thermo Fast® Detection Plate, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zellkulturflaschen (verschiedene Größen)	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland

2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

ABT-737	Sigma-Aldrich AG, Taufkirchen, Deutschland
Albumin Fraction V (pH 7,0)	BSA (Bovines Serum Albumin); PanReac, AppliChem, MW = approx. 68000 g/mol
ADP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Albumin Fraction V (pH 7,0)	BSA (Bovines Serum Albumin); PanReac, AppliChem, MW = approx. 68000 g/mol
Agarose	Bioenzym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa	Steriles Wasser, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland
Apyrase	from potatoes, ATPase ≥ 200 units/mg protein, lyophilized powder, Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA
Calcium chloride (CaCl ₂)	Merck Group, Darmstadt, Germany
Collagen-related Peptide (CRP-XL)	Richard Farndale, University of Cambridge, UK
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
FACS Clean Solution	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS Rinse Solution	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FACSFlow Sheath Fluid	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Ficoll-Paque Plus®	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Formaldehyd 4 %	Otto Fischer GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
Fura-2 acetoxymethylester	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase	Promega, Madison, Wisconsin, USA
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Isofluran CP®	CP-pharma®, Burgdorf; Deutschland
Isopropanol	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Kollagen HORM	Takeda Austria GmbH, Linz Österreich
Luciferase-Lösung	ChronoLume® Chrono-Log corporation, Havertown, PA, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS mit und ohne Calcium	Dulbeccos Phosphate Buffered Saline modified without calcium chloride and magnesium chloride Dulbeccos Phosphate Buffered Saline with MgCl ₂ and CaCl ₂ , Sigma Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA
PBS Tabletten	Phosphate Buffered Saline Tablets, gibco®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thrombin	Roche AG, Mannheim, Deutschland
Trypanblau	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
3,3'-Dihexyloxycarbocyanine Iodid	Invitrogen, Carlsbad, California, USA

2.1.4 Antikörper und Rekombinante Proteine:

Annexin V FITC	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Germany
anti-P-Selektin-FITC	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
CXCL12	Recombinant CXCL12/SDF-1a, #350-NS-010/CF, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
CXCR4 Antikörper	NB100-74396, CXCR4 Antibody, Novus Biologicals USA, Littleton, CO, USA
Rat anti mouse GPIIb α /CD42b-Dylight 649	Emfret Analytics GmbH & Co. KG, Eibelstadt, Deutschland
Rat anti mouse CD62P-FITC	Emfret Analytics GmbH & Co. KG, Eibelstadt, Deutschland

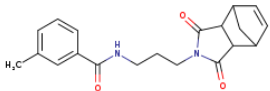
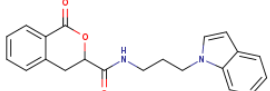
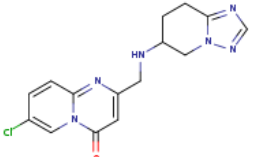
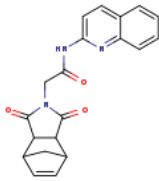
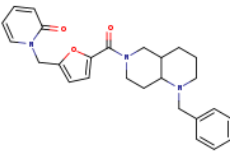
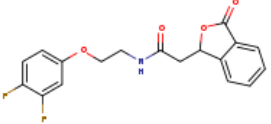
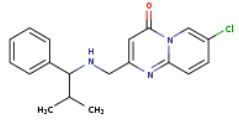
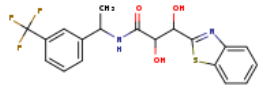
2.1.5 Software

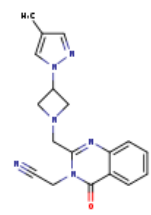
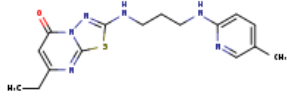
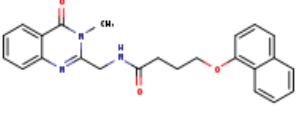
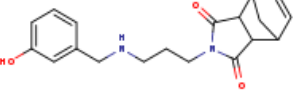
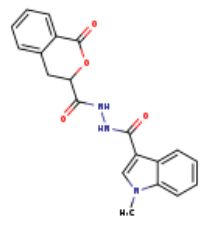
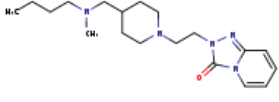
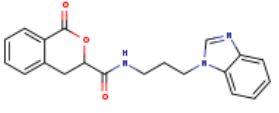
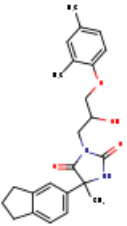
FACS-Auswertung	FlowJo, LLC LEGENDplex™ v 8.0
Literaturverwaltung	Citavi, Swiss Academic Software, Wädenswil, Switzerland
Mikroskopierprogramm	NIS-Elements, Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Statistikprogramm	PRISM, GraphPad Software 7.03, La Jolla, California, USA
Textverarbeitung	Word 2016, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

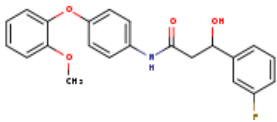
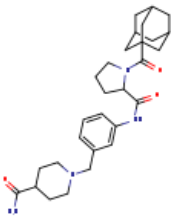
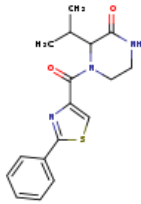
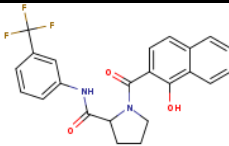
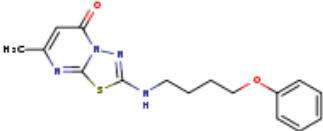
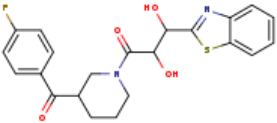
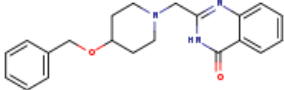
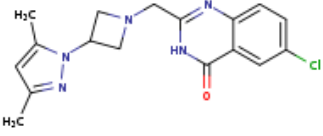
2.1.6 Lösungen und Puffer

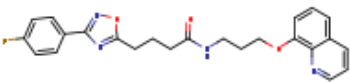
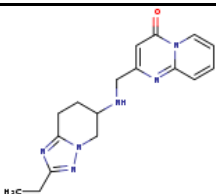
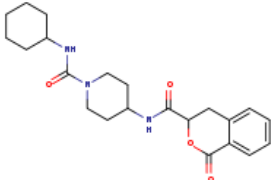
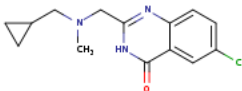
ACD Puffer	12,5 g Na ₃ -Citrat 294,1 g/mol 6,82 g Zitronensäure 10 g D-Glucose ad 500 ml Aqua dest., mit NaOH 1 N pH 4,69 einstellen
Annexin V binding buffer	10 mM Hepes 140 mM Natriumchlorid 2.5 mM Calciumchlorid ad 1000 ml Aqua dest, mit NaOH pH 7.4 einstellen
Tyrodespuffer 10-fach	80 g NaCl 10,15 g NaHCO ₃ 1,95 g KCl ad 1000 ml Aqua dest.,
1x Tyrodes	10 ml 10x Tyrodespuffer 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)

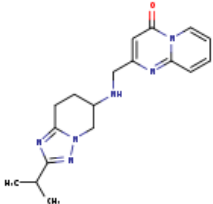
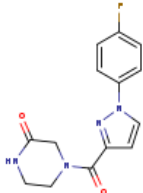
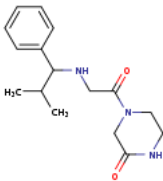
2.1.7 Verwendete Verbindungen der Firma Enamine Ltd

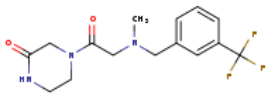
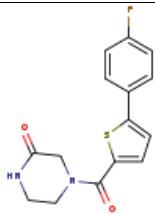
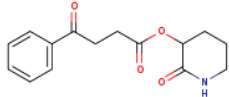
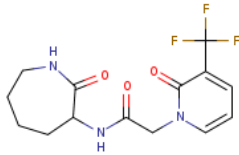
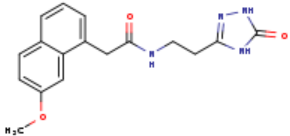
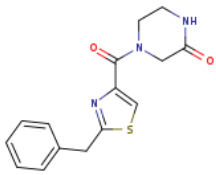
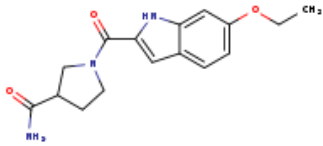
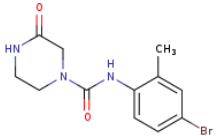
Nr.	Bezeichnung	Formel	MW g/mol	Strukturformel
C1	Z1391024726	$C_{20}H_{22}N_2O_3$	338.4	
C2	Z195063524	$C_{21}H_{20}N_2O_3$	348.4	
C3	Z1139408753	$C_{15}H_{15}ClN_6O$	330.8	
C4	Z85101211	$C_{20}H_{17}N_3O_3$	347.4	
C5	Z1439418053	$C_{26}H_{29}N_3O_3$	431.5	
C6	Z1144247956	$C_{18}H_{15}F_2NO_4$	347.3	
C7	Z106872310	$C_{19}H_{20}ClN_3O$	341.8	
C8	Z109428374	$C_{19}H_{17}F_3N_2O_3S$	410.4	

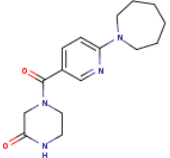
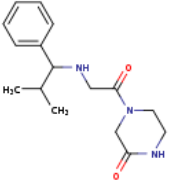
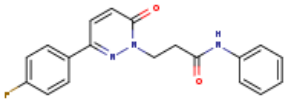
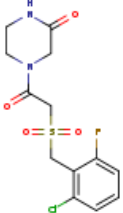
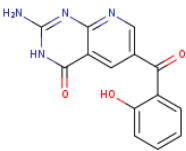
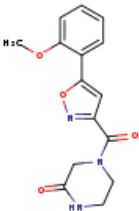
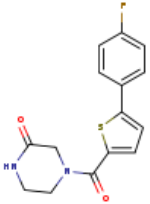
C9	Z1141259968	$C_{18}H_{18}N_6O$	334.4	
C10	Z645919236	$C_{16}H_{20}N_6OS$	344.4	
C11	Z1623225913	$C_{24}H_{23}N_3O_3$	401.5	
C12	Z1396720547	$C_{19}H_{22}N_2O_3$	326.4	
C13	Z195112378	$C_{20}H_{17}N_3O_4$	363.4	
C14	Z645144114	$C_{19}H_{31}N_5O$	345.5	
C15	Z195100594	$C_{20}H_{19}N_3O_3$	349.4	
C16	Z103254222	$C_{24}H_{28}N_2O_4$	408.5	

C17	Z1525008419	$C_{22}H_{20}FNO_4$	381.4	
C18	Z770395318	$C_{29}H_{40}N_4O_3$	492.7	
C19	Z1126883207	$C_{17}H_{19}N_3O_2S$	329.4	
C20	Z994763862	$C_{23}H_{19}F_3N_2O_3$	428.4	
C21	Z237654260	$C_{16}H_{18}N_4O_2S$	330.4	
C22	Z1625178979	$C_{22}H_{21}FN_2O_4S$	428.5	
C23	Z196036312	$C_{21}H_{23}N_3O_2$	349.4	
C24	Z1142780347	$C_{17}H_{18}ClN_5O$	343.8	

C25	Z1127254888	$C_{24}H_{23}FN_4O_3$	434.5	
C26	Z1139410635	$C_{17}H_{20}N_6O$	324.4	
C27	Z976566068	$C_{22}H_{29}N_3O_4$	399.5	
C28	Z650514800	$C_{14}H_{16}ClN_3O$	277.8	

C29	Z1139411706	$C_{18}H_{22}N_6O$	338.4	
C30	Z383003656	$C_{14}H_{13}FN_4O_2$	288.3	
C31	Z164154416	$C_{16}H_{23}N_3O_2$	289.4	

C32	Z644786206	$C_{15}H_{18}F_3N_3O_2$	329.3	
C33	Z85251374	$C_{15}H_{13}FN_2O_2S$	304.3	
C34	Z1446347527	$C_{15}H_{17}NO_4$	275.3	
C35	Z381569300	$C_{14}H_{16}F_3N_3O_3$	331.3	
C36	Z1510224603	$C_{17}H_{18}N_4O_3$	326.4	
C37	Z383003572	$C_{15}H_{15}N_3O_2S$	301.4	
C389	Z666976238	$C_{16}H_{19}N_3O_3$	301.3	
C39	Z410938296	$C_{12}H_{14}BrN_3O_2$	312.2	

C40	Z356468442	$C_{16}H_{22}N_4O_2$	302.4	
C41	Z164154416	$C_{16}H_{23}N_3O_2$	289.4	
C42	Z1003761100	$C_{19}H_{16}FN_3O_2$	337.4	
C43	Z416910564	$C_{13}H_{14}ClFN_2O_4S$	348.8	
C44	Z2237508760	$C_{14}H_{10}N_4O_3$	282.3	
C46	Z373658330	$C_{15}H_{15}N_3O_4$	301.3	
C47	Z85251374	$C_{15}H_{13}FN_2O_2S$	304.3	

2.2 Methoden

2.2.1 Versuche am Mausmodell (*ex vivo*)

2.2.1.1 Zucht

Um den Einfluss der ACKR3-Rezeptors auf Thrombozyten zu untersuchen werden für die vorliegenden Experimente Tiere aus Eigenzucht verwendet, die homozygot für ACKR3 gefloxt und mit einer Pf4-Cre-Rekombinase gezüchtet wurden (Linienbezeichnung: B6.Cg-Thy1a-(Acr)Cxcr7tm2Yzo -Tg(Pf4-cre)Q3Rsko/J). Die LoxP-Sequenzen sind um Exon 2 des *Acr3*-Gens lokalisiert, was bei Cre-positiven, homozygot gefloxten Tieren durch die Cre-Aktivität am plättchenspezifischen Promotor (Platelet Factor 4 = Pf4-Cre) zu einem *Knockout* des ACKR3-Rezeptors in Thrombozyten und Megakaryozyten führt (Abbildung 4). Hierfür werden Pf4-Cre positive Männchen mit Pf4-Cre negativen, homozygot gefloxten Weibchen verpaart. Die Verpaarung der Tiere erfolgte mit Pf4-Cre positiven männlichen und ausschließlich Pf4-Cre negativen weiblichen Tieren. Diese Tiere wurden dann für die nachfolgenden Experimente verwendet, wobei die Pf4-Cre-positiven Tiere als Knockouts (-/-) und ihre Pf4-Cre-negativen Geschwister als Wildtyp-Kontrollen (fl/fl) fungierten.

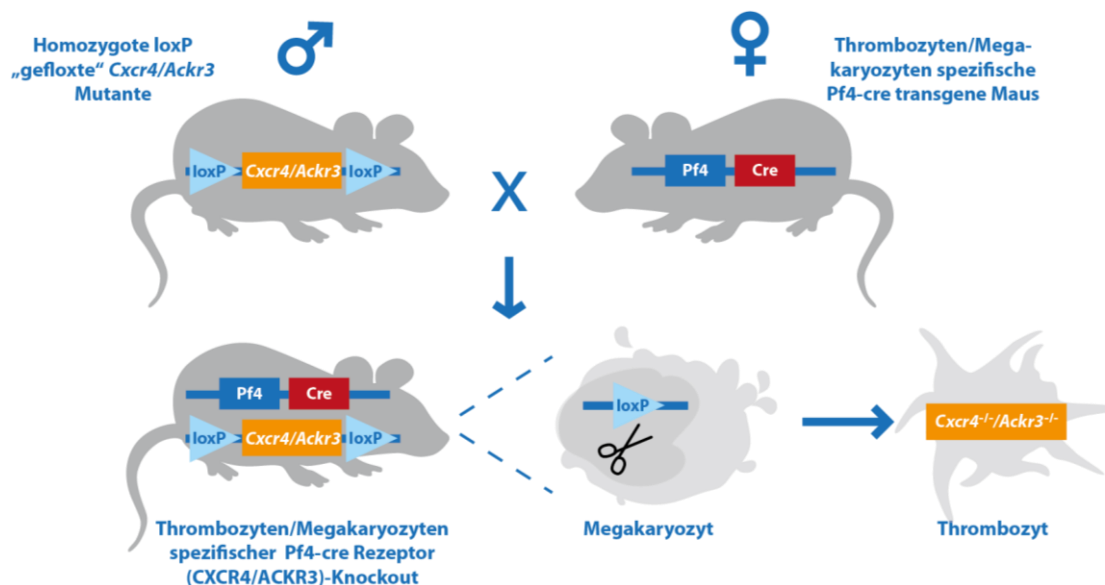


Abbildung 4: Grafische Darstellung der Generierung einer Thrombozyten-spezifischen Rezeptor Knock-out Maus: Zuchtschema eines Pf4-Cre Männchens (linke obere Maus) und eines *Cxcr4/Ackr3* flox/flox Weibchens (rechte obere Maus). Die Kreuzung resultiert in Cre Expression, der Deletion des loxP-flankierten Gens und damit zum *Cxcr4/Ackr3^{-/-}* Nachwuchs (untere Maus) (modifiziert nach Rohlfing *et al.* 2022).

2.2.1.2 Phänotypisierung

Der Einfluss des ACKR3 Rezeptors auf das Blutungsverhalten wurde in verschiedenen Experimenten mithilfe von *Ackr3^{-/-}* Mäusen untersucht. Heterozygote *Ackr3^{+/-}* Männchen wurden hierfür mit heterozygoten *Ackr3^{+/-}* Weibchen verpaart. Die geborenen Jungtiere wurden nach 21 Tagen abgesetzt und erhielten in diesem Zuge eine individuelle Ohrlochmarkierung (Rechts-Links Schema) durch welche diese eindeutig identifizierbar markiert wurden. Die gewonnene Gewebeprobe aus der Ohrlochstanzung konnte zur DNA-Extraktion und damit zur Genotypisierung der Jungtiere verwendet werden.

2.2.1.3 DNA Extraktion

Aus den gewonnenen murinen Gewebeproben wurde DNA mithilfe des MyTaq™-Kits (bioline International) nach dessen Herstellerangaben isoliert.

Für die Bestimmung des Genotyps der gezüchteten Tiere wurden die gewünschten DNA Sequenzen mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) vervielfältigt und anschließend analysiert.

Durch die PCR werden, durch die Verwendung bestimmter Primer, gezielt gewünschte DNA Sequenzen exponentiell vervielfältigt. Für die PCR in dieser Arbeit wurde das GoTaq® G2 Flexi Kit (Promega) wie folgt verwendet:

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

Der Ablauf gliedert sich in mehrere Prozessabschnitte auf. Die Denaturierung der DNA erfolgte zunächst einmalig für 5 min bei 95°C, anschließend für jeden folgenden Zyklus nur noch für

30 sec. Das *Annealing* der Primer erfolgte pro Zyklus für 30 sec und die Temperatur wurde anhand der Schmelzpunkte der eingesetzten Primer und der eingesetzten DNA-Polymerase festgelegt. Für die Elongation wurde für alle Zyklen eine Temperatur von 72°C verwendet und die Zeit abhängig von der Größe des zu polymerisierenden DNA Abschnittes und der verwendeten Polymerase nach befolgen der Herstellerangaben festgelegt. Abschließend erfolgte eine letzte Elongationsperiode von 5 min bevor die Proben auf eine Temperatur von 4°C gekühlt wurden um alle Prozesse abzustoppen.

Verwendete Primer:

mACKR3-Forward 5'-TCCAGGTTGGCAGATGGATATTG-3'

mACKR3-Reverse 5'-TGAAATCAGCATGATACAGGGTCC-3'

hCXCR4-Forward: 5'-AATTCTCTTGTGCCCTTAGCC-3'

hCXCR4-Reverse: 5'-CAGACTGATGAAGGCCAGGA-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'

2.2.1.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient zur Auftrennung und Visualisierung von DNA-Fragmenten nach einer PCR indem sie nach ihrer Größe in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Für diese Arbeit wurden 2 % (w/V) Agarose-Gele in TAE-Puffer eingesetzt. Von den mit Probenpuffer versetzten DNA-Proben wurden je 10 µl in die Gel-Taschen geladen und durch eine Spannung von 135 V der Größe nach auf dem Gel separiert. Um die DNA nach der Auftrennung auf dem Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel in Ethidiumbromid-Lösung inkubiert. Die resultierenden DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar und durch Vergleich mit einem zuvor aufgetragenen DNA Größenmarker spezifisch eingeordnet (Abbildung 5).

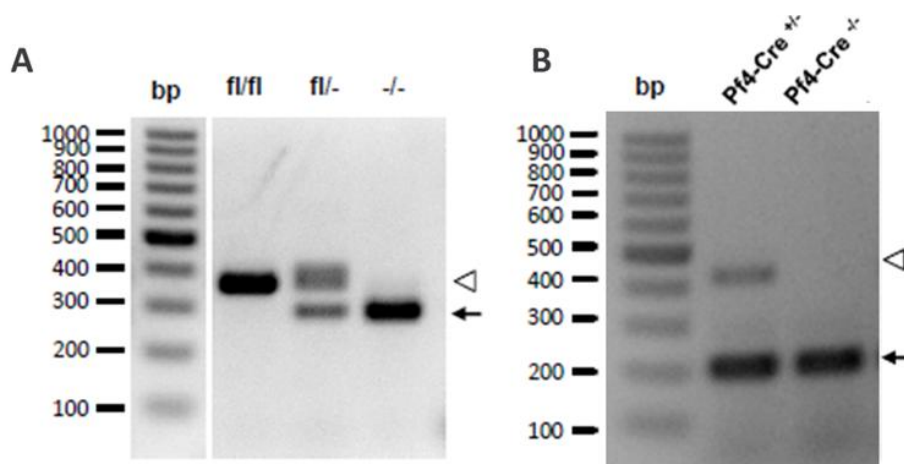


Abbildung 5: Ergebnisse der Genotypisierung Repräsentative Abbildung der Gelelektrophorese mit DNA Sequenzen der PCR auf *Ackr3* (A) und *Pf4-cre* (B).

2.2.1.5 Verwendete Mäuse und ethische Vertretbarkeit

Fachkundiges Personal kümmerte sich um die Pflege und Betreuung aller Mäuse, die entweder für Zuchtzwecke oder Experimente benötigt wurden. Die Mäuse wurden in einem spezifisch pathogenfreien Umfeld gehalten. Sie wurden in der Regel in geschlechterspezifischen Gruppen von bis zu 5 Tieren gehalten. Die Tierhaltung erfolgte in Makrolon Typ II Langkäfigen, bei einer konstant regulierten Temperatur von 20-23 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 bis maximal 60 %, wobei der Luftaustausch kontinuierlich überwacht, und die Tiere in einem stabilen Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten wurden. Die Mäuse wurden mit Standardfutter gefüttert, während die Zuchttiere eine energiereichere Zuchtfuttermischung erhielten. Allen Tieren stand jederzeit Wasser zur Verfügung.

Für die Experimente wurden verschiedene Mauslinien verwendet, darunter C57Bl/6J (Wildtyp, WT), *Cxcr4^{fl/fl}* Pf4-Cre⁺ Mäuse (*Cxcr4^{-/-}*), *Cxcr4^{fl/fl}* Pf4-Cre⁻ Mäuse (*Cxcr4^{+/+}*) und *Ackr3^{fl/fl}* Pf4-Cre⁺ Mäuse (*Ackr3^{-/-}*), sowie *Ackr3^{fl/fl}* Pf4-Cre⁻ Mäuse (*Ackr3^{+/+}*). Alle Tierversuche wurden gemäß den geltenden tierschutzrechtlichen Vorschriften durchgeführt und zuvor vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (M11/21M).

2.2.1.6 Bestimmung muriner Blutparameter

Unter Verwendung des Hämatologiegeräts KX-21N (Sysmex Deutschland GmbH) konnten die Blutparameter der Tiere gemessen werden. Hierfür wurde den Tieren unter tiefer Isoflurannarkose Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen. Die Entnahme von je

90 µl Vollblut erfolgte mit Natrium-Heparin Einmalkapillaren in ein EDTA Mikro-Probengefäß (Sarstedt AG & Co. KG). Anschließend wurde die Mischung mit dem Hämatologiegerät gemessen, analysiert und anschließend je nach Versuchsprotokoll eingestellt.

2.2.1.7 *Ex vivo* Thrombusformation mit murinem Vollblut

Deckgläser (24 x 60 mm) wurden mit 200 µl 100 µg/ml HORM Kollagen (HORM Suspension, Collagen Reagens HORM® Suspension (KRH), Takeda Austria GmbH) beschichtet und über Nacht bei 4 °C oder für zwei Stunden bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Unmittelbar vor dem Versuch wurde die verbliebene Flüssigkeit vorsichtig abgenommen und das Kollagen mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1 % BSA blockiert. Die zusammengebaute Flusskammer (Weite 5 mm, Tiefe 50 µm, Maastricht Instruments) auf der das mit Kollagen beschichtete Deckglas vorsichtig und möglichst Blasenfrei befestigt wurde, wurde zur Beseitigung von restlichen Luftblasen im System, ausreichend mit Tyrodespuffer pH 7.4, 2 mM Calcium durchspült.

Für die Probengewinnung werden die Tiere unter tiefe Isoflurannarkose gesetzt und Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen.

Für den Versuch wurden pro Tier jeweils 700 µl Vollblut in 300 µl PBS-Heparin 20 U/ml retrobulbär entnommen. Das Blut wurde im Verhältnis 5:1 mit Tyrodespuffer (pH 7.4, 2 mM Calcium) gemischt, mit 1 µM Fluorochrom 3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid (DiOC₆) für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und möglichst frei von Luftblasen mit einer 1 ml Spritze (Firma B. Braun) aufgenommen. Luftblasen wurden ggf. vorsichtig entfernt und die Spritze in eine Infusionspumpe eingespannt.

Die Perfusion der Kammer erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 7,5 ml/h, was einer Scherrate von 1000 /sek entspricht. Nach vollständigem Durchlauf des Blutes, wurde die Flusskammer mit einer 1 ml Spritze mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 gespült um nicht adhärente Rückstände zu entfernen.

Nach der Perfusion wurden unter Verwendung eines Nikon Eclipse Ti2-A (Nikon Instruments Inc.) fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von fünf unabhängig ausgewählten Bereichen der Flusskammer gemacht, um daraus die durchschnittliche Thromben bedeckte Fläche zu ermitteln. Die quantitative Analyse und Datentransformation wurden mithilfe von NIS-Elements AR durchgeführt.

2.2.1.8 Durchflusszytometrie muriner Thrombozyten

Um den Aktivierungsstatus von murinen Thrombozyten zu untersuchen wurden diese wie folgt durch Durchflusszytometrie analysiert.

Für die Probengewinnung wurde den Tieren mit Natrium-Heparin Einmalkapillaren retroorbital je 50 µl Blut entnommen. Die Tiere befanden sich dabei in tiefer Isoflurannarkose. Das Blut wurde in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen (Eppendorf Deutschland) aufgenommen, welche mit 100 µl PBS Heparin (20 U/ml) befüllt waren. Um die Probe für den Versuch zu entheparinisieren folgten mehrere Waschschrirte. Hierfür wurde das Blut zunächst mit 200 µl Tyrodespuffer (1-fach pH 7,4) versetzt und anschließend bei 640 x g für 5 min, bei Raumtemperatur und ohne Bremse zentrifugiert. Der klare Überstand der Probe wurde mit einer Pipette abgenommen und die Probe anschließend erneut mit 500 µl Tyrodespuffer (1-fach pH 7,4) versetzt. Auch hier wurde noch einmal bei 640 x g für 5 Minuten, bei Raumtemperatur und ohne Bremse zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Vor der Verwendung der Blutprobe wurde zu dieser noch 900 µl mit Tyrodespuffer (1-fach pH 7,4) mit 1mM Calcium hinzugefügt.

Von den Blutproben wurden je 5 µl in FACS kompatible Polystyrolröhrchen (5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol, Falcon® Corning Inc.) überführt und je 5 µl der für den Versuchsaufbau verwendeten Antikörper (anti-P-Selektin-FITC, anti-Integrin α IIb β 3-PE, anti-CD42b-APC) hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubationsphase im Dunkeln wurden 5 µl der gewählten Thrombozytenagonisten (CRP-XL (*Crosslinked-Collagen-Related-Peptide*), Thrombin) in entsprechenden Konzentrationen hinzugefügt und für weitere 30 min bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 300 µl PBS abgestoppt und die Proben mit dem FACS Calibur analysiert.

Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte anhand der in Abbildung 6 beispielhaft dargestellten Gatingstrategie. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI: *mean fluorescence intensity*) wurde als quantitative Messung der Oberflächenexpression von Thrombozytenproteinen verwendet.

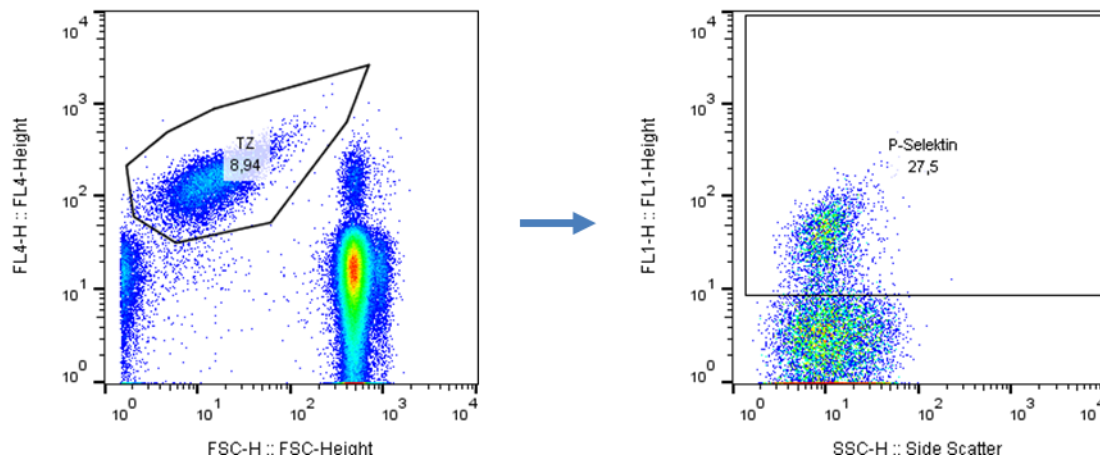


Abbildung 6: Repräsentative Dot Blots zur beispielhaften Darstellung der Gatingstrategie bei Durchflusszytometrie mit murinem Vollblut. Links: CD42b+ positive Thrombozytenpopulation mit gesetztem Gate; Rechts: Thrombozytenpopulation mit Gating für P-Selektin positive Thrombozyten nach vorheriger Aktivierung durch CRP.

2.2.1.9 Apoptose Assay muriner Thrombozyten

Um den Einfluss des thrombozytären ACKR3-Knockouts in Mäusen zu untersuchen wurde die Expression des Apoptosemarkers Annexin V durch eine Durchflusszytometrische Analyse ermittelt.

Zur Gewinnung von isolierten Thrombozyten wurde den Tieren unter Isoflurannarkose retroorbital Blut entnommen, in ACD-Puffer (1:4) befüllte 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße. Um die Thrombozyten von anderen Blutbestandteilen zu trennen wurden mehrere Zentrifugationsschritte durchgeführt. Zunächst wurde das Blut mit 100 µl Tyrodespuffer (1-fach pH 7,4) versetzt und anschließend bei 264 x g für 5 min bei Raumtemperatur und ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde inklusive der Leukozyten-reichen Intermediärschicht abgenommen und in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zugabe von 200 µl Tyrodespuffer (1-fach pH 7,4) folgte eine zweite Zentrifugation bei 52 x g für 6 min (RT, ohne Bremse). Nun wurde der Thrombozyten-reiche Überstand (PRP, platelet rich plasma) in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit dem restlichen Blut der vorhergegangene Schritt noch einmal durchgeführt. Der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt wurde anschließend mit dem aus dem vorherigen vereint. Um ein Zellpellet zu erhalten wurde das PRP bei 640 x g für 5 min erneut zentrifugiert und der Überstand danach vorsichtig abgenommen um das Zellpellet nicht zu beschädigen oder zu verlieren. Anschließend wurde das Zellpellet für eine Aufreinigung noch einmal in 200 µl Tyrodespuffer resuspendiert und abermals herunterzentrifugiert (640 x g, 5 min). Das nun

erhaltene Pellet wurde sehr vorsichtig in 110 µl PBS-Calcium resuspendiert und 10 µl für eine Bestimmung der Zellzahl in 90 µl PBS-Calcium aufgenommen. Nach einer Messung der Blutparameter am Hämatologiegerät wurden die verbliebenen 100 µl der Probe auf 200.000 Zellen pro µl eingestellt.

Je 5 µl der Thrombozyten wurden in ein Polystyrolröhrchen überführt und mit 5 ml des gewählten Agonisten (ABT-737, CRP) in entsprechender Konzentration für 30 min inkubiert. Anschließend wurde den Proben jeweils 5 µl Annexin V zugesetzt und weitere 30 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurden die Proben mit 300 µl Annexin V Puffer versetzt und die Proben anschließend Durch das Durchflusszytometer gemessen.

Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI: *Mean fluorescence intensity*) wurde als quantitative Messung der Oberflächenexpression von Thrombozytenproteinen verwendet. Da dieser Versuch mit isolierten Thrombozyten durchgeführt wurde, war kein Gating notwendig.

2.2.2 Versuche mit humanen Thrombozyten

2.2.2.1 Thrombozytenisolation aus humanem Vollblut

Um Thrombozyten aus humanem Blut zu isolieren, wurde von freiwilligen Spendern jeweils 16 ml venöses Blut in Spritzen entnommen, in denen zuvor 4 ml ACD-Puffer (RT) vorbereitet worden waren. Anschließend wurden jeweils 10 ml der Blut-ACD-Mischung in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und diese bei 1000 U/min für 20 min bei Raumtemperatur, ohne Bremse zentrifugiert. Das hier getrennte plättchenreiche Plasma (PRP) wurde vorsichtig mit einer Transferpipette entnommen und in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, wobei maximal 10 ml PRP pro Röhrchen verwendet wurden. Diese wurden dann mit Tyrodes-Puffer pH 6,5 auf ein Gesamtvolumen von 35 ml aufgefüllt und erneut bei 2100 U/min für 10 min bei Raumtemperatur, mit Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert und das Thrombozytenpellet in maximal 500 µl Tyrodes-Puffer pH 6,5 resuspendiert. Wenn die isolierten Thrombozyten für nachfolgende Experimente aktiviert werden sollten, wurde das Thrombozytenpellet in Tyrodes-Puffer pH 7,4 resuspendiert, dem zuvor Ca^{2+} in einer Konzentration von 1 mM hinzugefügt worden war.

Zur Bestimmung der Thrombozytenzahl wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 verdünnt (20 µl Zellsuspension + 180 µl Tyrodes-Puffer pH 7,4) und die Zellzahl mithilfe eines Sysmex-Hämatologiegerätes ermittelt.

2.2.2.2 Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) aus humanem Vollblut

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

Für die Verwendung von humanem plättchenreichen Plasma (PRP) in einigen Versuchen, wurde venöses Blut von freiwilligen gesunden Spendern in CPDA (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin) Monovetten gesammelt. Das Blut wurde anschließend bei Raumtemperatur für 20 Minuten bei 204 x g zentrifugiert, um die obere Phase, dass PRP, zu isolieren und anschließend für weitere Untersuchungen vorzubereiten.

2.2.2.3 Durchflusszytometrie humaner Thrombozyten

Um den Aktivierungsstatus von humanen Thrombozyten zu untersuchen wurden diese wie folgt durch Durchflusszytometrie analysiert.

Für die Durchflusszytometrie humaner Thrombozyten wurde plättchenreiches Plasma (PRP) wie zuvor beschrieben, vorbereitet. Nach der Zellzahlanalyse mit dem Hämatologiegerät wurde die Zellzahl des PRPs auf $0,5 \times 10^6$ Thrombozyten in 5 μ l eingestellt. Die gewünschten potenziellen ACKR3-Agonisten für die jeweiligen Proben werden in 10-facher Endkonzentration in PBS vorbereitet.

Pro Probe werden zu 35 μ l PBS + Ca^{2+} 5 μ l des eingestellten PRPs gegeben, zusammen mit 5 μ l anti-CD62P-FITC und 5 μ l des zu untersuchenden potenziellen ACKR3-Agonists und für 30 min bei Dunkelheit inkubiert. Daraufhin wurden die Thrombozytenagonisten CRP-XL, oder Thrombin in den spezifizierten Konzentrationen hinzugefügt und bei Raumtemperatur für abermals 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 300 μ l 0,5 % Paraformaldehyd in PBS abgestoppt.

Die Analyse und Auswertung der Durchflußzytometrie erfolgt mithilfe FACS Calibur.

2.2.2.4 *Ex vivo* Thrombusformation humaner Thrombozyten

Um die Thrombusbildung von humanem Blut unter Flussbedingungen zu untersuchen wurde ein artifizielles Perfusionssystem genutzt.

Freiwilligen gesunden Spendern wurde Blut in CPDA Monovetten abgenommen.

Deckgläser wurden mit Kollagen mit (200 µl 100 µg/ml HORM Kollagen) beschichtet und über Nacht bei 4°C oder für zwei Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Vor dem Versuch wurde das Kollagen für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1 % BSA blockiert. Die beschichteten Deckgläser wurden möglichst blasenfrei auf die Flusskammer aufgebracht und mit ausreichend Tyrodespuffer pH 7,4, 2 mM Calcium durchspült und ggfs. restlichen Luftblasen aus dem System zu entfernen.

Die potenziellen ACKR3-Agonisten werden in 10-facher Endkonzentration für den Versuch vorbereitet. Das Vollblut wurde im Verhältnis 5:1 mit PBS + Ca²⁺ versetzt und anschließend pro Probe 900 µl mit 100 µl der zu testenden Substanz gemischt. Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurden die Proben mit 1 µM DiOC₆ versetzt und ein letztes Mal für 10 min inkubiert.

Jede Probe wurde in einer 1 ml Spritze aufgenommen und Luftblasen ggf. vorsichtig entfernt. Die Spritze wurde in eine Infusionspumpe eingespannt und mit der vorbereiteten Flusskammer verbunden. Die Perfusion erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 7,5 ml/h, was einer Scherrate von 1000 /s entspricht. Nachdem der Inhalt der Spritze vollständig durch die Flusskammer perfundiert wurde, wurde die Kammer mit 1 ml Tyrodes-Puffer pH 7,4 gespült um nicht adhärenente Rückstände zu entfernen.

Für die Analyse der Thromben wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von fünf unabhängig ausgewählten Bereichen der Flusskammer gemacht und daraus die durchschnittliche Thromben bedeckte Fläche ermittelt. Die quantitative Analyse und Datentransformation wurden mithilfe von NIS-Elements AR durchgeführt.

2.2.2.5 Aggregometrie humaner Thrombozyten

Um die Einflüsse von potenziellen ACKR3-Agonisten auf die Aggregation humaner Thrombozyten zu untersuchen wurden Versuche mithilfe eines Aggregometers durchgeführt.

Für die Durchführung der Aggregometrie mit dem Chronolog-System (CHRONO-LOG Corporation) wurden Küvetten mit Rührfischen auf 37°C vorbereitet. Humanes Blut wurde in

Citratröhrchen gesammelt und anschließend bei 1000 U/min für 10 min zentrifugiert, um plättchenreiches Plasma (PRP) zu erhalten.

Zwei Drittel des PRP wurden entnommen und die Zellzahl mit bestimmt. Der verbleibende Inhalt der Röhrchen wurde bei 3500 U/min für 10 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde als plättchenarmes Plasma (PPP) abgenommen. Mit dem PPP wurde die Zellzahl des PRP auf 200.000 Plättchen pro μl eingestellt. Für die Versuche wurden jeweils 440 μl des eingestellten PRP, 50 μl der gewünschten Verbindung oder Agonisten in die Küvetten gegeben.

Um die Aggregation zu starten wurden 10 μl CRP in die Küvetten gegeben, sodass letztendlich ein Gesamtvolumen von 500 μl erreicht wurde. Unter ständiger Bewegung der Proben durch den Rührfisch wurde der Vorgang der Aggregation mit den ChronoLog über 5 min gemessen. Der Bereich unter der Aggregationskurve (AUC) wurde als Maß für die Thrombozytenaggregation verwendet.

2.2.2.6 Calcium-Spektrofluorometrie humaner Thrombozyten

Zur Messung des Effekts der potenziellen ACKR3-Agonisten auf die zytosolische Kalziumkonzentration wurde die Spektrofluorimetrie in gewaschenen humanen Thrombozyten durchgeführt. Die Thrombozyten wurden mit 5 μM fura-2 Acetoxymethylester (Invitrogen) und 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Pluronic F-127 (Biotium) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Thrombozyten ein Mal gewaschen und in - Tyrodespuffer pH 7.4 resuspendiert, der entweder 0,5 mM EGTA (Roth) oder 1 mM Ca^{2+} enthielt. Um die Calcium-Mobilisierung zu messen, wurden die Thrombozyten mit 100 μM des ACKR3-Agonisten C10 oder C46 behandelt und dann mit 5 $\mu\text{g/ml}$ CRP-XL aktiviert. Die Calciumkonzentrationen wurden unter Rührbedingungen mit einem Spektrofluorometer (LS 55, PerkinElmer) bei alternierenden Anregungswellenlängen von 340 und 380 nm bei 37°C gemessen. Die 340/380-nm-Verhältniswerte wurden in Calciumkonzentrationen umgerechnet.

2.2.3 Versuche in Zellkultur

2.2.3.1 Rekrutierung von β -Arrestin

Um die Aktivierung des ACKR3 Rezeptors durch erfolgreiche Bindung des potenziellen Agonisten zu untersuchen wurde der PathHunter® eXpress CXCR7 CHO-K1 β -Arrestin GPCR Assay nach Herstellerangaben verwendet.

Für den Assay wurden gemäß den Herstellerangaben zunächst CHO-K1 Zellen, die den ACKR3-Rezeptor und β -Arrestin exprimierten, vorbereitet. Die Zellen wurden in die vorgesehenen Wells einer 96-Well-Platte ausgesät und für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, um die Adhärenz zu gewährleisten.

Am nächsten Tag wurde das alte Zellkulturmedium entfernt und Konzentrationsreihen der zu testenden Verbindungen im frischen Zellmedium vorbereitet und in die jeweiligen Wells pipettiert. Es wurden auch Kontrollen ohne Agonisten und ohne Zellen zur Bestimmung des Hintergrundsignals berücksichtigt. Die Zellen wurden für 90 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, um die Bindung und Aktivierung des ACKR3-Rezeptors zu ermöglichen. Anschließend wurde das Detektionsreagenz gemäß den Herstelleranweisungen zu den Wells gegeben. Die Platten wurden bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert.

Um die Aktivierung des ACKR3-Rezeptors zu quantifizieren und die Wirkung der getesteten Verbindungen zu beurteilen wurde das chemolumineszente Signal aus der Reaktion mit einem Glomax Multi Detection Mikroplatten Reader gemessen.

2.2.3.2 Toxizitätsassay

Potenziell zelltoxische Effekte der Verbindungen wurden mithilfe des CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay untersucht. Die Reagenzien wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und verwendet.

Für die Untersuchung der Zellviabilität wurden HEK293-Zellen verwendet. Zunächst wurde das Medium der Zellkultur abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2,5 ml Trypsin für 5 min bei 37°C inkubiert, um sie zu lösen. Die abgelösten Zellen wurden dann mit 7,5 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) gemischt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1200 U/min für 5 Minuten wurden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert. Zur Zellzählung wurden 10 μ l der Zellsuspension mit 10 μ l Trypanblau gemischt und mithilfe einer Neubauer-

Zählkammer gezählt. Pro Well einer undurchsichtigen 96-Well-Platte wurden 8×10^3 Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C im Inkubator zur Adhäsion inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde das alte Zellkulturmedium entfernt und anschließend die Konzentrationsreihen der zu testenden Verbindungen im Zellmedium vorbereitet und in die entsprechenden Wells pipettiert (jeweils 100 µl). Dabei wurden sowohl eine DMSO-Kontrolle ohne Agonisten als auch eine Kontrolle ohne Zellen zur Bestimmung des Hintergrundsignals berücksichtigt. Die Zellen wurden nun wieder für 16 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert (beispielsweise von 16 Uhr bis 8 Uhr am nächsten Morgen). Danach wurde die gleiche Menge des CellTiter-Glo® Reagenz (100 µl) zu den Zellen gegeben. Die Platten wurden für 2min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert und anschließend für weitere 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Zelllyse zu gewährleisten. Schließlich wurde die Lumineszenz mit einem Glomax Multi Detection Mikroplatten Reader gemessen.

2.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung von GraphPad Prism (GraphPad Prism, Version 8, Fa. GraphPad Software Incorporated). Zunächst wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft. Der Vergleich von zwei Gruppen wurde mittels eines zweiseitigen gepaarten oder ungepaarten t-Tests durchgeführt, während die Unterschiede innerhalb einer Gruppe mittels ANOVA Dunnett's-Test oder, falls keine Normalverteilung vorlag, mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert wurden. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt, wobei der SEM die Streuung der Mittelwerte berechnete. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet und in den Darstellungen wie folgt markiert: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$). und ****($p < 0,0001$).

2.2.5 Entwicklung eines ACKR3 Homologiemodells und *in silico* screening

Das nachführend beschriebene *in silico* modelling wurde durch Ekaterina Shevchenko, Mark Kudolo und Tatu Pantsar in Betreuung durch Prof. Dr. Antti Poso (University of Eastern Finland, School of Pharmacy) entwickelt und durchgeführt.

Für das strukturelle Homologiemodell von ACKR3 standen zum Zeitpunkt der Erstellung nur zwei GPCR-Template-Strukturen zur Verfügung, die den aktiven Zustand repräsentierten und

eine Ähnlichkeit mit ACKR3 aufwiesen: der β 2-Adrenozeptor und der muskarinische M2-Rezeptor. Auf dieser Basis wurde das Modell erstellt. Für das nachfolgende *in silico screening* wurden ausschließlich Templates mit aktiver Konformation verwendet.

Zur Identifikation potenzieller ACKR3-Agonisten wurde ein klassisches molekulares Docking angewendet, das auf dem virtuellen Screening-Workflow im Maestro-Paket basierte (HTVS, SP und XP Docking). Hierfür wurde auf die MolPort-Bibliothek (Version 2014) mit knapp 50.000 kommerziell verfügbaren Verbindungen zurückgegriffen. Die erste Auswahl erfolgte anhand des GlideScore, einer empirischen Bewertungsfunktion, die die freie Bindungsenergie des Liganden unter Berücksichtigung der Kraftfeldbeiträge approximiert. Anschließend wurden repräsentative Verbindungen aus den vielversprechendsten *Clustern* visuell inspiziert (Bayrak *et al.* 2022).

Diese Methode ermöglichte es, potenzielle Verbindungen zu identifizieren, die als Grundlage für weitere experimentelle Untersuchungen dienen.

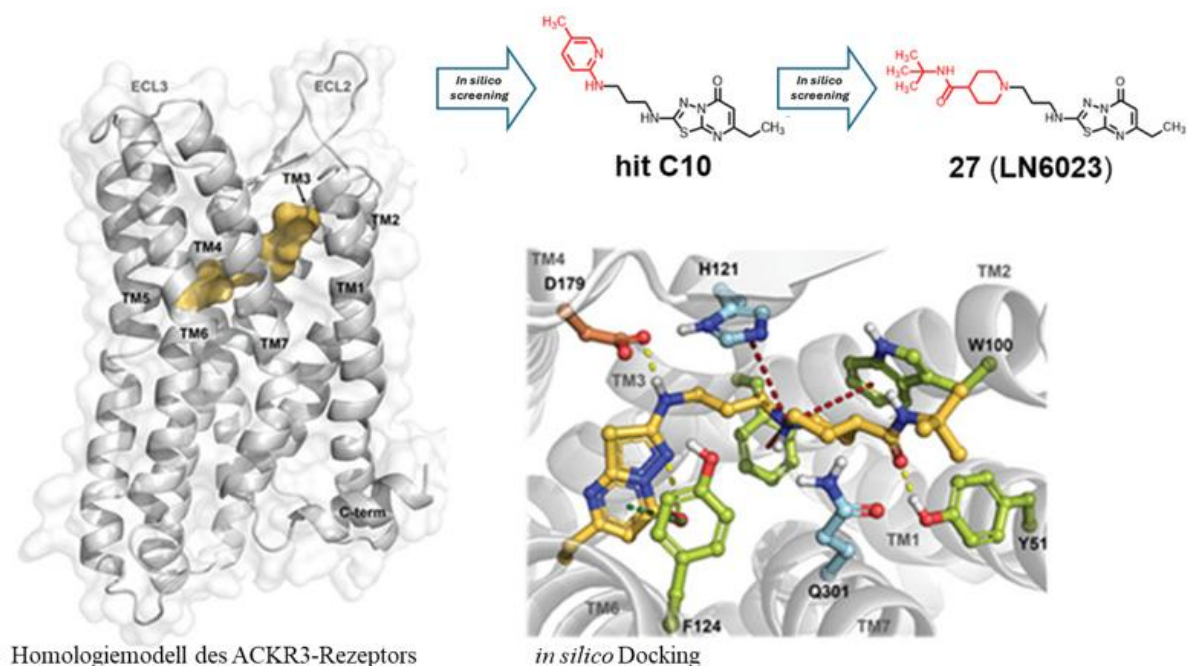


Abbildung 7: Homologiemodell des ACKR3-Rezeptors und *in silico* Docking: ACKR3 Homologiemodell nach Prof. Antii Poso und beispielhaftes Docking eines potenziellen Agonisten des Rezeptors zur Identifikation der Bindungsstellen (modifiziert nach Bayrak *et al.* 2022).

2.2.6 Agonisten Optimierung

Im Rahmen der Optimierung potenzieller Agonisten für den ACKR3-Rezeptor wurde ein iterativer Kreislauf zwischen experimentellen Laborversuchen und computergestütztem Modelling etabliert. Der Prozess beginnt mit der Auswahl vielversprechender Verbindungen durch *in silico screening*, bei dem virtuelle Bibliotheken von Molekülen durch computergestützte Methoden analysiert wurden, um potenzielle Agonisten zu identifizieren. Diese Verbindungen wurden basierend auf ihrer berechneten Bindungsaffinität und strukturellen Eignung ausgewählt.

Die im *in silico screening* identifizierten Verbindungen wurden anschließend im Labor experimentell getestet. Hierbei wurden ihre biochemischen und zellulären Wirkungen auf den ACKR3-Rezeptor untersucht. Diese Assays umfassten die Messung der Aktivierbarkeit, Degranulation und *ex vivo* Thrombusbildung. Diese Ergebnisse wurden genutzt, um das computergestützte Modell des Agonisten weiter zu verfeinern. Basierend auf den gewonnenen Daten wurde das Modell angepasst, um eine höhere Präzision in der Vorhersage der Agonistenaktivität zu erzielen. Dies beinhaltete strukturelle Anpassungen der Moleküle, Optimierungen der Bindungsstellen und die Berücksichtigung der biologischen Aktivitäten.

Die optimierten Verbindungen wurden dann im Labor synthetisiert und einem weiteren Zyklus experimenteller Tests unterzogen. Dieser iterative Prozess wurde so lange fortgesetzt, bis Verbindungen mit den gewünschten Eigenschaften in Bezug auf Wirksamkeit und Spezifität identifiziert sind. Durch die ständige Rückkopplung zwischen experimentellen Daten und computergestützter Modellierung wurde eine effiziente und zielgerichtete Optimierung der Agonisten ermöglicht.

Dieser methodische Ansatz erlaubte es, die Erkenntnisse aus den Laborversuchen direkt in die computergestützte Entwicklung einfließen zu lassen und umgekehrt. Dadurch könnten Agonisten kontinuierlich verbessert und letztlich Verbindungen mit hoher therapeutischer Potenz und geringen Nebenwirkungen entwickelt werden.

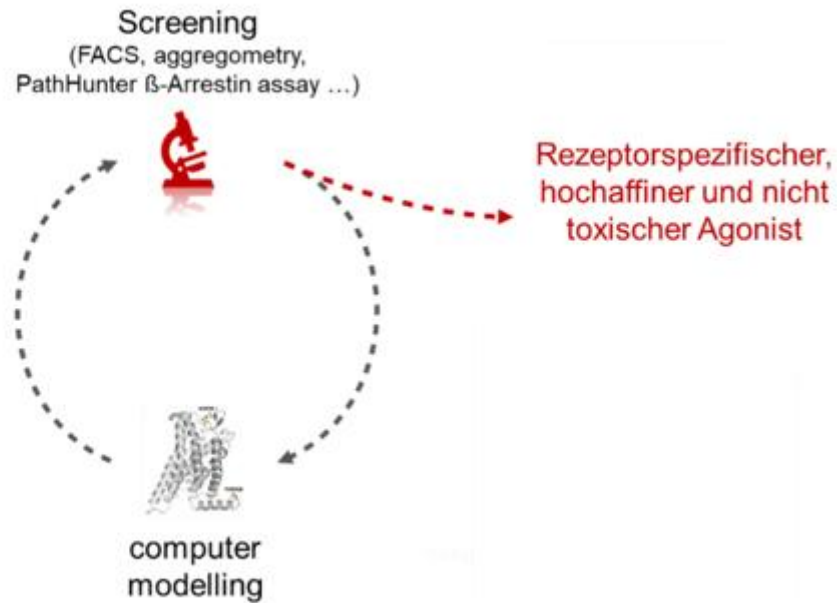


Abbildung 8: Kreislauf der Agonisten-Optimierung: Die im Labor erzielten Ergebnisse mit den durch *in silico screening* ausgewählten Verbindungen dienen als Grundlage für die computergestützte Optimierung des Agonisten-Modellings. Die daraus abgeleiteten Verbindungen werden erneut experimentell im Labor getestet. Die daraus gewonnenen experimentellen Daten werden wiederum genutzt, um die computergestützten Modellierungsinformationen weiter zu verfeinern und zu verbessern. Dieser iterative Prozess ermöglicht eine kontinuierliche Verbesserung der Agonisten hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Spezifität.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Rolle und Signalwege des ACKR3-Rezeptors bei kardiovaskulären, insbesondere thrombotischen Ereignissen, näher zu untersuchen. Das besondere Augenmerk lag dabei darauf, spezifische Agonisten dieses Rezeptors zu identifizieren, die zukünftig als potenzieller therapeutischer Ansatz dienen könnten.

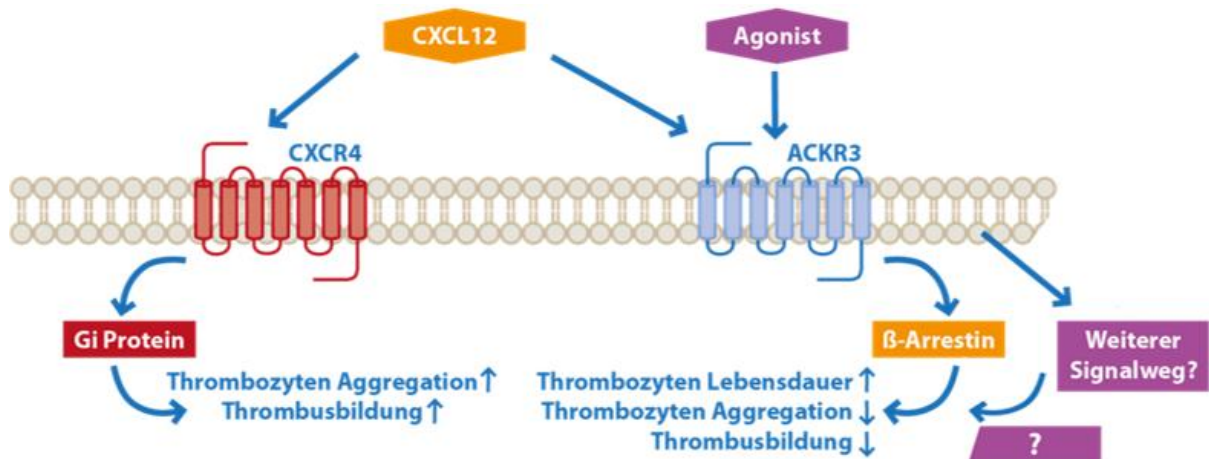


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Fragestellung: Die Signalübertragung über CXCR4 erfolgt hauptsächlich über die Kopplung an das Gi-Protein, während ACKR3 durch die Rekrutierung von β-Arrestin funktioniert, was diesem Rezeptor auch den Namen „Atypischer Chemokinrezeptor 3“ verleiht. Die Rekrutierung von β-Arrestin führt in Thrombozyten zu einer Hemmung der Aggregation, einer Unterdrückung der pro-thrombotischen Reaktion und einer Verlängerung der Lebensdauer der Thrombozyten. Im Gegensatz dazu bewirkt die Aktivierung von CXCR4 in Thrombozyten eine Aktivierung der Zellen, eine Förderung der Aggregation und die Bildung von Thromben (modifiziert nach Bayrak *et al.* 2022).

3.1 Einfluss des ACKR3-Knockouts auf murinen Thrombozyten

In diesem ersten Abschnitt der Arbeit lag der Fokus darauf, den Einfluss des ACKR3-Rezeptors auf Thrombozyten genauer zu untersuchen und zu validieren. Die ACKR3-Knockout-Maus, bei der der Rezeptor gezielt auf Thrombozyten ausgeschaltet ist, bietet eine Möglichkeit, die Rolle dieses Rezeptors genauer zu erforschen. Die Verwendung genetisch manipulierter Mäuse ermöglicht es, spezifische Veränderungen zu untersuchen und ist eine in der medizinischen Grundlagenforschung weit verbreitete und etablierte Methodik. Über die Platelet Factor 4-Cre-Rekombinase (Pf4-Cre) transgene Maus, das derzeit bevorzugte Modell zur Erzeugung von Megakaryozyt-/Thrombozyten-spezifischen Knock-out-Mäusen (Calaminus *et al.* 2012), ist es möglich, einen spezifischen Knockout des ACKR3-Rezeptors zu untersuchen. Diese Mauslinie ermöglicht es, die Unterschiede und den Einfluss des ACKR3-Rezeptors auf Thrombozyten in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen zu charakterisieren und zu verstehen.

3.1.1 Einfluss des murinen ACKR3-Knockouts auf *ex vivo* Thrombusformation

Um den Einfluss des ACKR3-Rezeptors auf die Thrombusbildung *ex vivo* aber dennoch unter physiologischen Flussbedingungen zu untersuchen, wurde ein etabliertes Perfusionsystem genutzt. Das System der Flußkammer wird zur Analyse der Hämostase herangezogen und kann funktionelle Veränderungen der Thrombozyten sichtbar machen (Roest *et al.* 2011).

Für diesen Versuch wurde murines Vollblut von Wildtyp-Mäusen (*Ackr3^{fl/fl}*) und Tieren mit megakaryozyten-/thrombozytenspezifischer Deletion von ACKR3 (*Ackr3^{-/-}*) genutzt und verglichen. Eine mittlere Flussgeschwindigkeit von 7,53 ml/h wurde verwendet, um Bedingungen ähnlich denen einer Arterie zu simulieren. Diese Flussrate entspricht einer Scherrate von etwa 1000 s⁻¹.

Der hierbei betrachtete Parameter für den Gruppenvergleich war die thrombusbedeckte Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche. Die thrombusbedeckte Fläche pro Bild wurde analysiert, um den Mittelwert für jedes Tier zu bestimmen und die Gruppen miteinander zu vergleichen. Die Auswertung der *ex vivo* Thrombusformation zeigt eine signifikant ($p < 0,001$) größere thrombusbedeckte Fläche bei Verwendung der Vollblutes der *Ackr3^{-/-}*-Tiere im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 10).

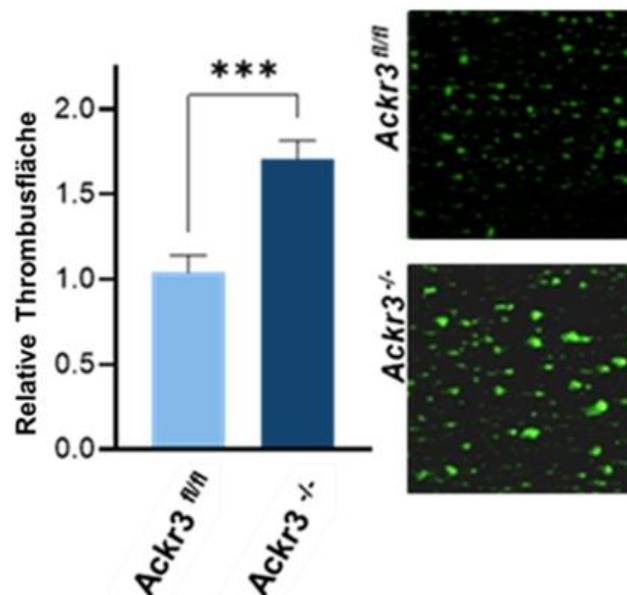


Abbildung 10: Einfluss des ACKR3 Knockouts auf Thrombusformation. *Ex vivo* Thrombusformation von murinem Vollblut von *Ackr3^{fl/fl}* und *Ackr3^{-/-}* Tieren über Kollagen-Beschichtung zeigt eine signifikant größere Thrombusfläche für die Versuche mit Blut von *Ackr3^{-/-}*-Tieren. Rechts: Repräsentative Bilder der Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung der durchschnittlichen relativen Thrombusfläche. Mittelwert ± S.D.; Student's t test, 95% Konfidenzintervall; $p < 0,001$; Ergebnisse von 10 unabhängigen Experimenten. (modifiziert nach Rohlfing *et al.* 2022).

3.1.2 Einfluss des ACKR3-Knockouts auf die Aktivierbarkeit der murinen Thrombozyten

Eine weitere relevante Methode zur funktionellen Untersuchung von Thrombozyten ist die Durchflusszytometrie, mit der verschiedene Parameter, zum Beispiel anhand von Fluoreszenzintensitäten, erfasst werden können (Linden *et al.* 2004).

In diesem Versuch wurde mithilfe dieser Methode die Aktivierbarkeit von murinen Thrombozyten untersucht, wobei P-Selektin als Indikator für die α -Degranulation diente und somit die Aktivierbarkeit repräsentiert. Unter Stimulation wird P-Selektin schnell von den α -Granula der Thrombozyten zur Zelloberfläche transloziert und kann über oberflächengebundenes CD62P auf den Thrombozyten detektiert werden (Stenberg *et al.* 1985; Merten und Thiagarajan 2000).

Ein direkter Vergleich zwischen Thrombozyten von Wildtyp- und *Ackr3*^{-/-}-Mäusen zeigte eine signifikant höhere Expression von P-Selektin auf der Oberfläche von ACKR3-defizienten Thrombozyten nach Stimulation mit CRP (1 μ g/ml, 5 μ g/ml: $p < 0.05$; 10 μ g/ml: $p < 0,01$) (Abbildung 11.1). Eine Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen (Abbildung 11.2).

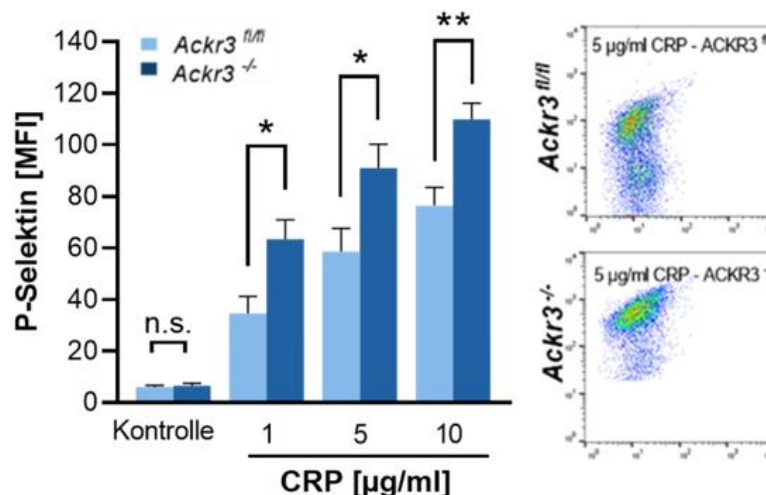


Abbildung 11.1: Einfluss des ACKR3-Knockouts auf Aktivierbarkeit muriner Thrombozyten. Durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenzintensität [MFI, mean fluorescence intensity] von P-Selektin bei murinem Vollblut von Wildtyp- (*Ackr3*^{fl/fl}) und *Ackr3*^{-/-}-Tieren. Vergleich des MFI nach Aktivierung durch CRP (collagen related peptide) in drei Konzentrationen (1, 5 und 10 μ g/ml). Repräsentative Dot Blots (bei 5 μ g/ml CRP). Mittelwert \pm S.E.M.; Student's t test, 95 % Konfidenzintervall; KO vs. WT: 1 μ g/ml und 5 μ g/ml: $p < 0,05$; 10 μ g/ml: $p < 0,01$; Ergebnisse von 10 unabhängigen Experimenten (modifiziert nach Rohlfing *et al.* 2022).

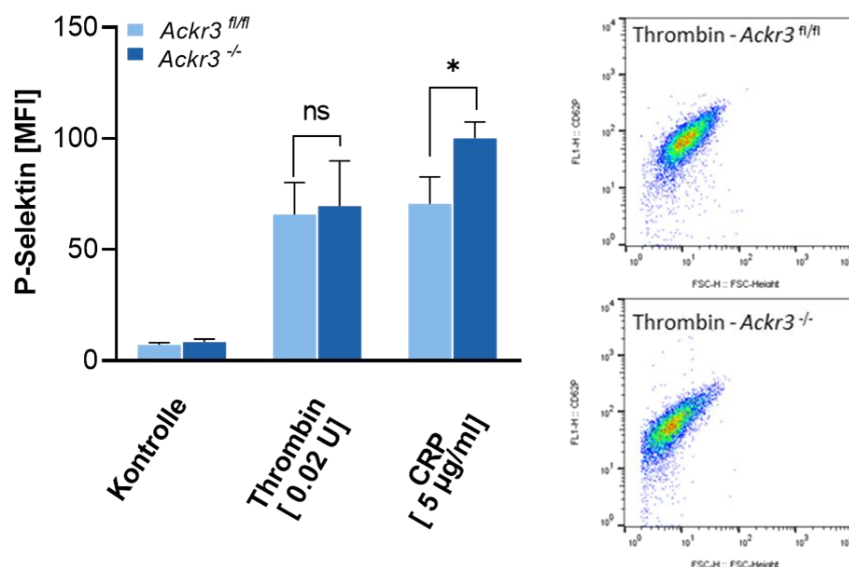


Abbildung 11.2: Einfluss des ACKR3-Knockouts auf Aktivierbarkeit muriner Thrombozyten. Durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenzintensität [MFI, mean fluorescence intensity] von P-Selektin bei murinem Vollblut von Wildtyp- (*Ackr3*^{fl/fl}) und *Ackr3*^{-/-}-Tieren. Vergleich des MFI nach Aktivierung durch 0.02 U/ml Thrombin und CRP 5 µg/ml. Die Aktivierung Thrombin zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen; Repräsentative Dot Plots der Versuche mit Thrombin. Mittelwert ± S.D.; Student's t test, 95 % Konfidenzintervall; KO vs WT: 5 µg/ml CRP: $p < 0,05$; Ergebnisse von 6 unabhängigen Experimenten. (modifiziert nach Rohlfig *et al.* 2022).

3.1.3 Einfluss des ACKR3-Knockouts auf die Apoptose muriner Thrombozyten

Um zu untersuchen ob die Abwesenheit des ACKR3-Rezeptors auf murinen Thrombozyten auch einen Einfluss auf den programmierten Zelltod hat, wurde ein Apoptose Assay auf Basis einer durchflusszytometrischen Messung der Oberflächenveränderung der murinen Thrombozyten durchgeführt. Als Marker für die Apoptose wurde das Phosphatidylserin auf der Thrombozytenoberfläche mittels Annexin V gemessen.

Phosphatidylserin ist ein Phospholipid, das normalerweise auf der inneren Seite der Lipiddoppelmembran lebender Zellen vorkommt. Während des Prozesses der Apoptose wird es jedoch auf die äußere Seite der Membran verlagert. Annexin V ist ein Protein, das spezifisch und mit hoher Affinität an Phosphatidylserin bindet (Vermes *et al.* 1995).

Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, zeigt sich sowohl bei der Aktivierung der Thrombozyten durch CRP als auch durch ABT737 eine signifikant höhere Fluoreszenzintensität und somit eine höhere Bindung von Annexin V an die Oberfläche der Thrombozyten von Tieren mit thrombozytenspezifischer Deletion des ACKR3-Rezeptors im Vergleich zu denen der Wildtyp Geschwister (CRP und ABT737: $p < 0,05$).

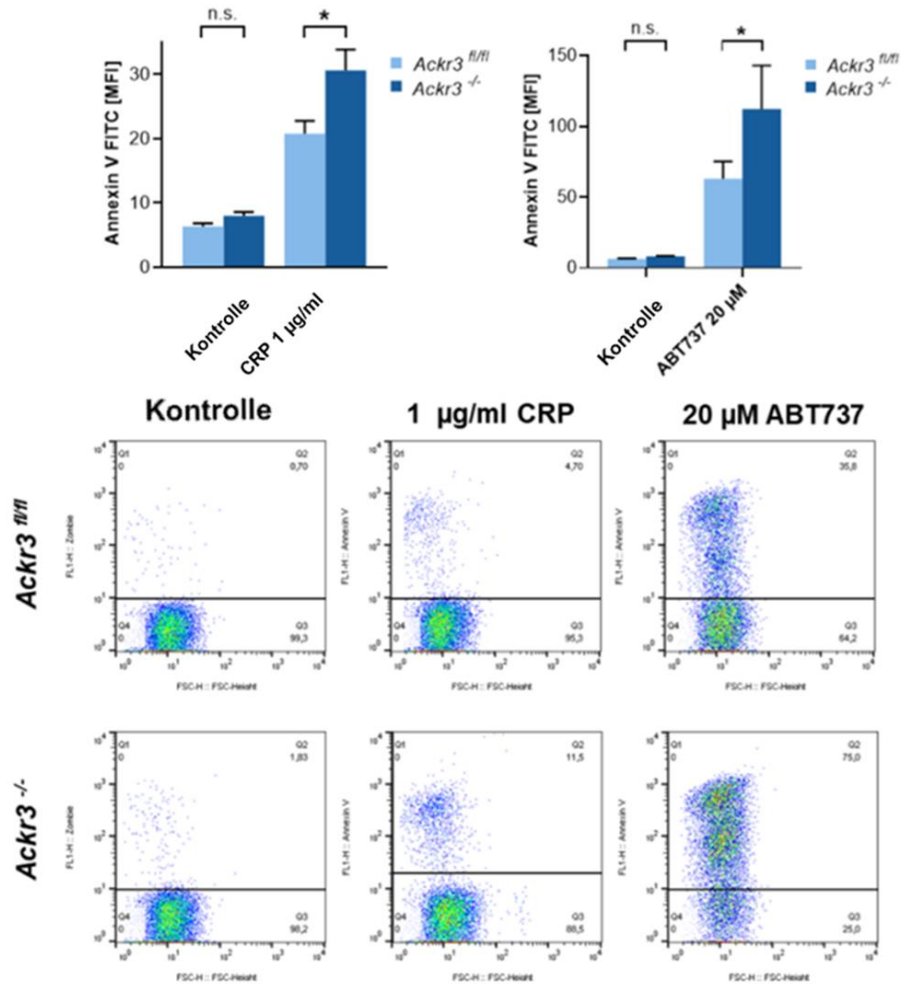


Abbildung 12: Einfluss des ACKR3-Knockouts auf die Apoptose muriner Thrombozyten: Annexin V Expression nach Stimulation mit 1 µg/ml CRP oder 20 µM ABT737, zeigt eine signifikant stärkere Expression für Thrombozyten von *Acker3*^{-/-}-Tieren, Repräsentative Dot Blots der unbehandelten und stimulierten Proben von Wildtyp- (*Acker3*^{fl/fl}) und *Acker3*^{-/-}-Tieren. Mittelwert ± S.E.M.; two-way ANOVA, 95 % Konfidenzintervall; KO vs WT 1 µg/ml CRP: p < 0,05, 20 µM ABT737: p < 0,05; *Acker3*^{fl/fl} Kontrolle: n=12; *Acker3*^{fl/fl} CRP: n=8; *Acker3*^{-/-} Kontrolle: n=8; *Acker3*^{-/-} CRP: n=4 (modifiziert nach Rohlfing *et al.* 2022).

3.2 Untersuchung des Effekts natürlicher ACKR3 Liganden sowie ACKR3-Agonist VUF11207 auf die Thrombozytenaktivierung

Dieser Teil der Arbeit zielt darauf ab, den Effekt der Aktivierung von ACKR3 durch seine natürlichen Liganden sowie durch den synthetischen Agonisten VUF11207 auf die Thrombozytenfunktionen zu untersuchen.

Die natürlichen Liganden des ACKR3-Rezeptors, die für diese Arbeit genutzt wurden, sind MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor), CXCL11 und CXCL12. MIF ist ein proinflammatorisches Zytokin, das in der Regulation der Immunantwort eine zentrale Rolle spielt und durch seine Interaktion mit ACKR3 die Migration und Aktivierung von Immunzellen beeinflusst (Alampour-Rajabi *et al.* 2015). CXCL11 und CXCL12 sind Chemokine, die ebenfalls als natürliche Liganden für ACKR3 dienen und an der Modulation von Zellmigration und Überlebenssignalen beteiligt sind (Burns *et al.* 2006; Naumann *et al.* 2010). Insbesondere CXCL12, auch bekannt als SDF-1, ist für seine Rolle in der hämatopoetischen Stammzellmobilisierung und der chemotaktischen Anlockung von Immunzellen bekannt (Bleul *et al.* 1996). Durch die Untersuchung dieser natürlichen Liganden soll ein Verständnis der Funktionen von ACKR3 in der Thrombozytenbiologie und -pathophysiologie gewonnen werden.

VUF11207 wurde als potenter und spezifischer Agonist für ACKR3 entwickelt und hat in präklinischen Studien gezeigt, dass es die Aktivität dieses Rezeptors in verschiedenen zellulären Kontexten moduliert (Wijtmans *et al.* 2012). VUF11207, ein substituiertes Styrenamid, wurde erstmals von Wijtmans *et al.* (2012) synthetisiert und charakterisiert. Diese Verbindung zeigte in Modellsystemen eine hohe Affinität und Spezifität für ACKR3 und bot damit eine Möglichkeit, die Rolle dieses Rezeptors gezielt zu untersuchen. Hier sollte der Einsatz von VUF11207 dazu beitragen, die Mechanismen der Thrombozytenmodulation durch ACKR3 besser zu verstehen und weitere potenzielle therapeutische Ansätze zur Behandlung von thromboinflammatorischen Erkrankungen zu entwickeln.

3.2.1 Einfluss auf *ex vivo* Thrombusbildung

Um den Einfluss von natürlichen ACKR3-Liganden auf die Thrombusbildung *ex vivo* unter möglichst physiologischen Flussbedingungen zu untersuchen, wurde ein künstliches Perfusionssystem mit humanem Vollblut verwendet. Diese Methode ermöglicht es, die Bedeutung der Liganden für die Plättchenaktivierung sichtbar zu machen und zu analysieren.

Für diesen Versuch wurde humanes Vollblut mit den natürlichen ACKR3-Liganden CXCL11, CXCL12 und MIF sowie dem synthetischen Agonisten VUF11207 vor inkubiert, um deren Effekt auf die Thrombusbildung zu untersuchen. Eine mittlere Flussgeschwindigkeit von 7,53 ml/h (Scherrate 1000 s^{-1}) wurde gewählt, um Bedingungen ähnlich denen in einer Arterie zu simulieren.

Der Hauptparameter für den Vergleich der verschiedenen Gruppen war die thrombusbedeckte Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche. Die thrombusbedeckte Fläche pro Bild wurde analysiert, um den Mittelwert für jede Bedingung zu bestimmen und die Ergebnisse zwischen den verschiedenen Liganden zu vergleichen. Durch diese Vorgehensweise konnte der spezifische Einfluss der einzelnen Liganden auf die Thrombozytenfunktion und Thrombusbildung unter nahezu physiologischen Bedingungen ermittelt werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 13 zusammen mit repräsentativen Aufnahmen des Experiments dargestellt. Nach der Inkubation mit CXCL11 (0,1 mg/ml) sowie MIF (0,2 $\mu\text{g/ml}$) zeigte sich eine signifikant ($p < 0,05$) reduzierte thrombusbedeckte Fläche im Vergleich zur Kontrolle. Auch der synthetische Agonist VUF11207 (100 μM) führte zu einer vergleichbaren Verringerung der thrombusbedeckten Fläche. Eine vorherige Inkubation mit CXCL12 (1 $\mu\text{g/ml}$) zeigte keine nachweisbaren Effekte.

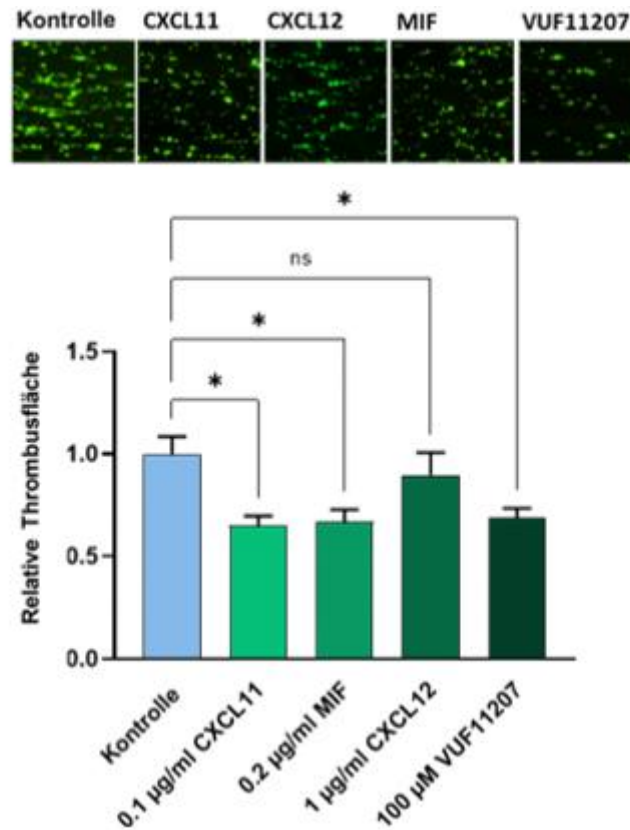


Abbildung 13: Ergebnisse der *ex vivo* Thrombusformation von humanem Vollblut über Kollagen-Beschichtung nach Behandlung mit natürlichen ACKR3 Liganden sowie VUF11207. Oben: repräsentative Fluoreszenzaufnahmen. Mittelwert \pm S.E.M.; Student's t test, 95 % Konfidenzintervall; Kontrolle (n=8) vs. CXCL11: $p < 0,05$ (n=6), MIF: $p < 0,05$ (n=6), VUF11207: $p < 0,05$ (n=7), CXCL12: $p > 0,05$ (n=4).

3.2.2 Einfluss auf Aktivierbarkeit der Thrombozyten

Zur Evaluierung der Wirkung der natürlichen ACKR3-Liganden auf die Aktivierbarkeit von humanen Thrombozyten wurde humanes PRP mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Proben wurden mit den Liganden CXCL11 (0,1 µg/ml), CXCL12 (1 µg/ml), MIF (0,2 µg/ml) und VUF11207 (100 µM) behandelt. Zur Aktivierung der Thrombozyten wurde ADP in einer Konzentration von 5 µM verwendet und die Effekte der Liganden auf die P-Selektin-Expression gemessen.

Die P-Selektin-Expression, ein Marker für die α -Degranulation, wurde durch Fluoreszenzmessung erfasst. Die Ergebnisse, die in Abbildung 14 dargestellt sind, zeigen, dass nur die Behandlung mit VUF11207 eine signifikante ($p < 0,0001$) Reduktion des P-Selektin-Signals im Vergleich zur Kontrolle bewirkte. Bei der Behandlung mit CXCL11, CXCL12 und MIF wurden keine signifikanten Unterschiede in der P-Selektin-Expression im Vergleich zur Kontrolle festgestellt.

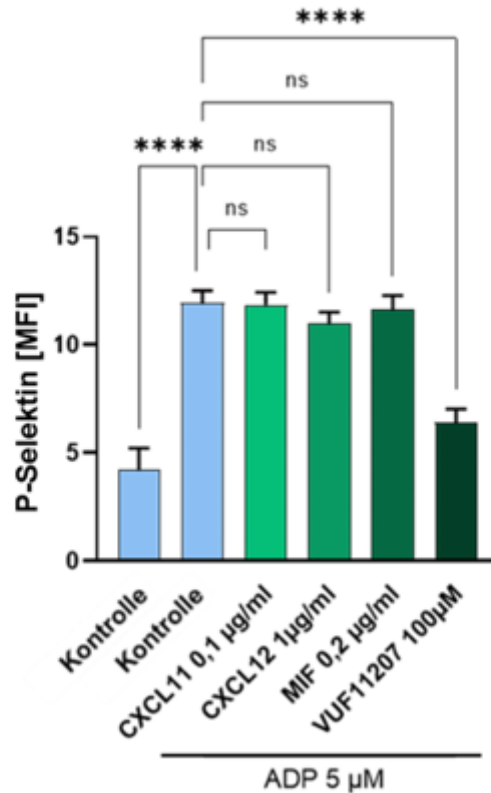


Abbildung 14: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der P-Selektin Expression auf humanen Thrombozyten nach Behandlung mit natürlichen ACKR3 Liganden sowie VUF11207 und nach Aktivierung mit 5 μM ADP. Mittelwert \pm S.E.M.; Student's t test, 95 % Konfidenzintervall; Kontrolle vs. aktivierte Kontrolle $p < 0,0001$, VUF11207 $p < 0,0001$; CXCL11, CXCL12, MIF: $p > 0,05$; Ergebnisse von 6 unabhängigen Experimenten.

3.3 Untersuchung von potenziellen ACKR3-Agonisten

Eine Reihe von Studien hat bereits aufgezeigt, dass der Chemokinrezeptor ACKR3 eine zentrale Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen spielt, was ihn zu einem Schwerpunkt der kardiovaskulären Forschung gemacht hat (Rath *et al.* 2018; Cebo *et al.* 2022; Rohlffing *et al.* 2022). Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung von ACKR3 als potenzielles Ziel für die Entwicklung neuer Therapeutika zur Behandlung und Prävention thrombotischer Erkrankungen. Insbesondere die Untersuchung der Wirkung natürlicher ACKR3-Liganden wie auch des synthetischen Agonisten VUF11207 hat gezeigt, dass ACKR3 eine vielversprechende therapeutische Zielstruktur darstellt.

Dieser Teil der Arbeit hat die Identifizierung, Validierung und Optimierung neuer spezifischer ACKR3-Agonisten zum Ziel.

Zu Beginn des Projekts wurde unter der Leitung von Prof. Antti Poso ein strukturelles Homologiemodell von ACKR3 erstellt, um ein strukturbasiertes virtuelles Screening

durchführen zu können, da zu diesem Zeitpunkt kein Röntgenkristallografiemodell des Rezeptors verfügbar war. Nach Validierung des Modells wurde ein klassisches molekulares „Docking“ genutzt, um potenzielle Agonisten zu identifizieren und klassifizieren. Dafür wurden bestehende Verbindungen aus einer Datenbibliothek genutzt (MolProt Library) und in verschiedene strukturbasierte Gruppen eingeteilt. Auf Grundlage dieser *in silico*-Analysen und der Struktur wurden schließlich 47 Verbindungen ausgewählt, die jeweils einzelne Gruppen repräsentieren und eine gezielte Untersuchung ermöglichen sollten, um herauszufinden, welche Strukturen potenziell am besten als ACKR3-Agonisten geeignet sind.

3.3.1 Einfluss der potenziellen ACKR3-Agonisten auf die Aktivierbarkeit humaner Thrombozyten

Die 47 Verbindungen, die aus dem *in silico screening* ausgewählt wurden, wurden auf ihren Einfluss auf die Aktivierbarkeit humaner Thrombozyten getestet. Dazu wurde PRP mit den Verbindungen in einer Konzentration von je 500 μ M vorinkubiert und anschließend mit CRP (1 μ g/mL) aktiviert. Die Expression von P-Selektin (CD62P) wurde durchflusszytometrisch gemessen. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 15 dargestellt und die Daten in Tabelle 1 festgehalten. Grüne Säulen in der Abbildung repräsentieren die daraufhin ausgewählten Leitstrukturen C10 und C11, die für weitere Untersuchungen und zur weiteren Optimierung der ACKR3-Agonisten herangezogen wurden. Die rote Säule zeigt die Verbindung C46, die im Vergleich zu den anderen Verbindungen keine Hemmwirkung aufwies. Diese wurde in nachfolgenden Versuchen auch als Negativkontrolle eingesetzt. Als Referenzsubstanz wurde der bekannte ACKR3-Agonist VUF11207 verwendet, um die Effektivität der getesteten Verbindungen zu bewerten.

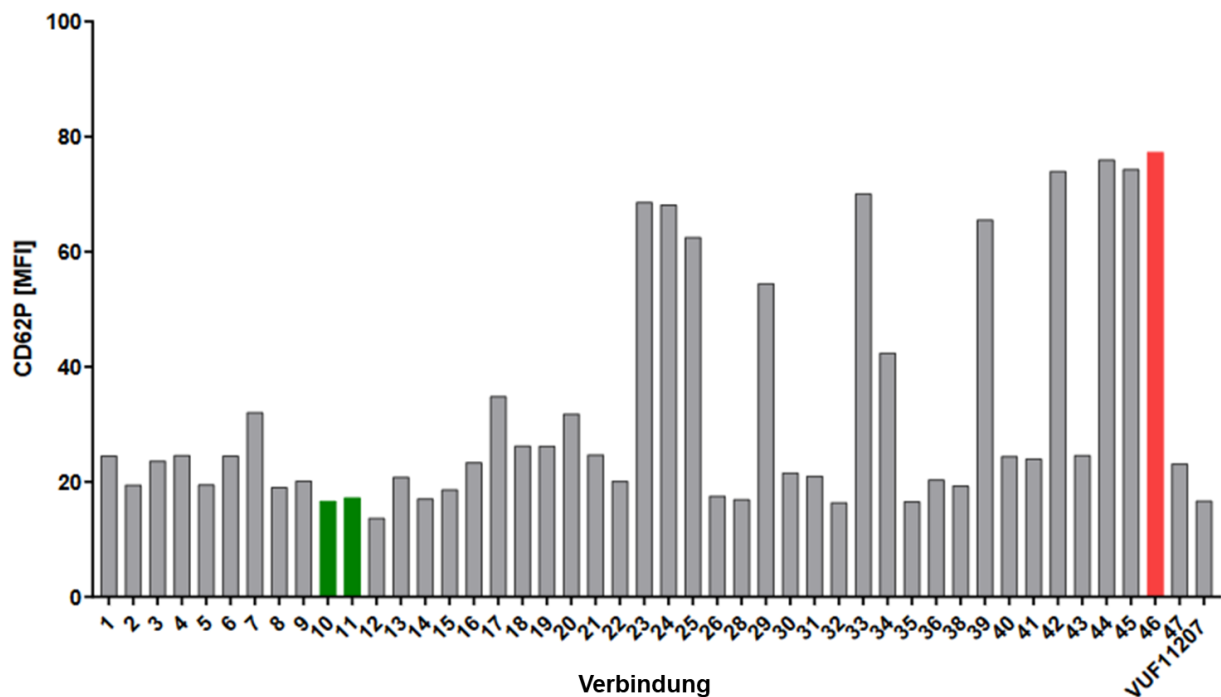


Abbildung 15: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der CD62P-Expression nach Aktivierung: Kommerziell hergestellte Verbindungen aus dem *in silico screening* wurden auf ihren Einfluss auf die Aktivierbarkeit humaner Thrombozyten getestet. Proben wurden mit den Verbindungen (500 μ M) vorinkubiert und anschließend mit CRP (1 μ g/mL) aktiviert. Die Daten werden als verbleibender Prozentsatz der CD62P-Expression eines Experiments in Duplikaten dargestellt. Die grünen Säulen zeigen die ausgewählten Hits C10 und C11 zur weiteren; die rote Säule zeigt die Verbindung C46. (modifiziert nach Bayrak *et al.* 2022).

Tabelle 1: CD62P Expression der 47 potenziellen ACKR3-Agonisten: Die CD62P-Expression der gemessenen Proben ist in Prozent angegeben. Die Werte wurden jeweils relativ zur negativen Kontrollprobe (0 %), die ohne vorherige CRP-Stimulation gemessen wurde, und zur positiven, vollständig aktivierten Kontrollprobe (100 %), die ausschließlich mit CRP aktiviert, jedoch nicht mit einem Agonisten vorinkubiert wurde, normalisiert.

Kontrolle	VUF11207	1	2	3	4	5	6	7	8
0	13,4	24,62	15,19	23,34	24,76	17,48	24,62	35,41	16,12
9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
18,41	13,33	14,19	6,973	19,33	13,98	16,19	22,98	39,41	27,12
19	20	21	22	23	24	25	26	28	29
27,05	35,05	24,84	18,33	87,64	86,92	78,92	14,62	13,76	67,42
30	31	32	33	34	35	36	38	39	40
17,55	19,62	13,12	89,71	50,13	13,26	18,69	17,19	83,28	24,48
41	42	43	44	45	46	47			
21,76	95,28	24,76	98,14	95,78	100	13,33			

3.3.2 Einfluss der potenziellen ACKR3-Agonisten auf die Rekrutierung von β -Arrestin

Um den Einfluss der 47 ausgewählten Verbindungen weiter zu charakterisieren, wurden alle Verbindungen mithilfe des PathHunter® eXpress CXCR7 CHO-K1 β -Arrestin GPCR Assays untersucht. Dieser Assay wurde verwendet, um die Rekrutierung von β -Arrestin als Indikator für die Aktivierung des Rezeptors zu quantifizieren. β -Arrestin spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), indem es sowohl die Desensibilisierung des Rezeptors als auch alternative Signalwege wie die MAP-Kinase-Signaltransduktion, vermittelt (Luttrell und Lefkowitz 2002; DeWire *et al.* 2007). Die Messung der β -Arrestin-Rekrutierung ist daher entscheidend, um die Funktionalität und Potenz der getesteten Verbindungen zu bewerten, die potenziell als Agonisten für die Modulation von Thrombozytenfunktionen dienen könnten. Die Ergebnisse des Assays sind in Abbildung 16 dargestellt. Der ACKR3-Agonist VUF11207 (500 μ M) und CXCL12 (1 ng/ml) wurden in diesem Versuch als Kontrollsubstanzen für eine positive Aktivierung des ACKR3 Rezeptors verwendet. Die Verbindungen C10 und C11 zeigen neben C23 eine besonders starke Lumineszenz, während C46 neben mehreren anderen Verbindungen eine geringe Aktivität aufweist. C23 wurde aufgrund der Ergebnisse in der Durchflusszytometrie nachfolgend nicht weiter verfolgt.

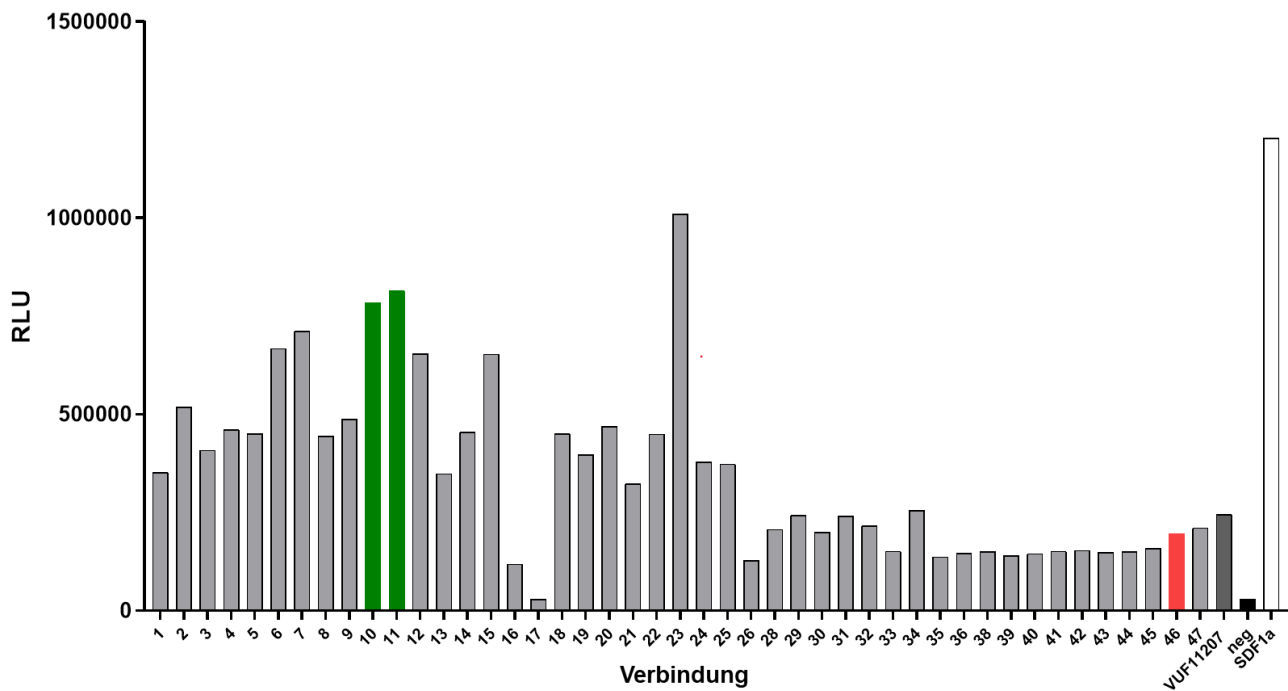


Abbildung 16: Ergebnisse des PathHunter β -Arrestin-Rekrutierungs-Assays zur Verfeinerung und Analyse der en ACKR3-Agonisten: Daten werden als relative lumineszente Einheiten (RLU) dargestellt. Die grünen Säulen repräsentieren die ausgewählten C10 und C11. Die rote Säule zeigt die Verbindung C46, die im Vergleich zu den anderen in den β -Arrestin-Rekrutierungs-Assays getesteten Verbindungen schlechtere Bindung aufwies. Als Referenzsubstanzen wurden VUF11207 (500 μ M) und CXCL12 verwendet (1 ng/ml). Die potenziellen Agonisten wurden in einer Konzentration von 500 μ M getestet. (modifiziert nach Bayrak *et al.* 2022).

Tabelle 2: Ergebnisse des PathHunter β -Arrestin-Rekrutierungs-Assays der potenziellen ACKR3-Agonisten. Als Referenzsubstanzen wurden VUF11207 (500 μ M) und CXCL12 verwendet (1 ng/ml). Die potenziellen Agonisten wurden in einer Konzentration von 500 μ M getestet. Die Ergebnisse wurden normalisiert auf die Kontrolle (0 %) und CXCL12 (100 %).

Kontrolle	CXCL12	1	2	3	4	5	6	7	8
0	100	27,51	41,67	32,29	36,77	35,94	54,39	58,11	35,36
9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
39,07	64,32	66,95	53,29	27,24	36,32	53,17	7,641	0	35,98
19	20	21	22	23	24	25	26	28	29
31,39	37,47	25,03	35,87	83,57	29,75	29,39	8,418	15,21	18,25
30	31	32	33	34	35	36	38	39	40
14,54	18,11	15,96	10,43	19,27	9,232	10,04	10,35	9,527	9,932
41	42	43	44	45	46	47	VUF11207		
10,44	10,59	10,23	10,33	11,07	14,23	15,5	18,47		

3.3.3 Kombinierte Analyse von β -Arrestin-Rekrutierung und P-Selektin-Expression zur Auswahl potenzieller Leitstrukturen

Zur umfassenden Bewertung der Effektivität der 47 getesteten Verbindungen wurden die Ergebnisse der beiden methodischen Ansätze in Abbildung 17 kombiniert dargestellt: die Durchflusszytometrie zur Messung der P-Selektin-Expression und der PathHunter® eXpress CXCR7 CHO-K1 β -Arrestin GPCR-Assay zur Quantifizierung der β -Arrestin-Rekrutierung.

Die Daten zeigen die β -Arrestin-Rekrutierung in grün und die P-Selektin-Expression in rot, in Prozent relativ zur Kontrolle. Die Abbildung veranschaulicht, dass die Verbindungen C10 und C11 sowohl eine hohe β -Arrestin-Rekrutierung als auch eine geringe P-Selektin-Expression aufwiesen. Die Verbindungen zeigten zwar nicht die jeweils besten Ergebnisse in beiden experimentellen Ansätzen aber in Zusammenfassung beider Versuche. C10 und C11 wurden daher für weitere Untersuchungen zur Charakterisierung ihrer Wirkung auf den ACKR3-Rezeptor ausgewählt. Die Verbindung C46 wurde hier als mögliche Negativkontrolle der Strukturen identifiziert.

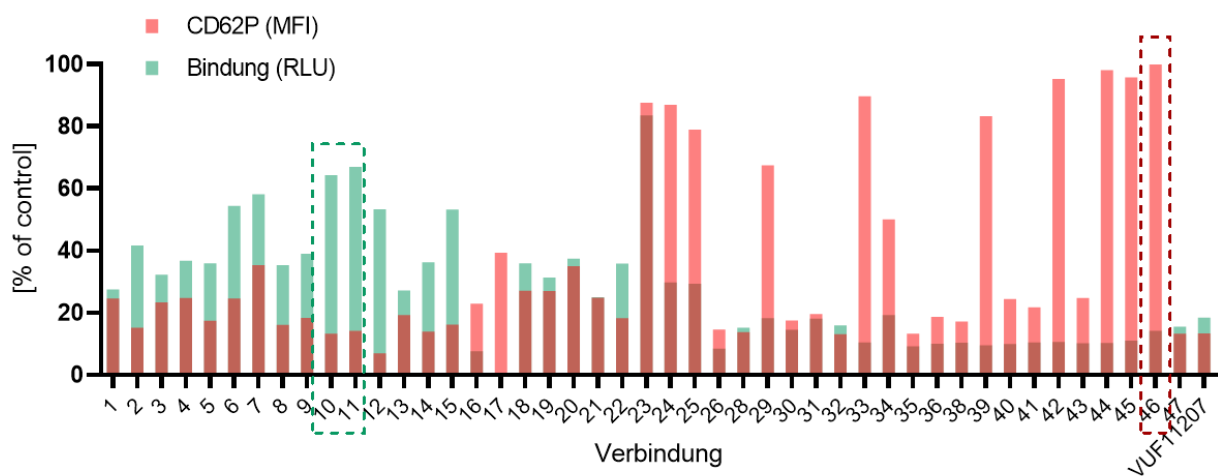


Abbildung 17: Gemeinsame Darstellung der β -Arrestin-Rekrutierung und der P-Selektin-Expression für die 47 getesteten kommerziell erhältlichen Verbindungen. Die Abbildung kombiniert die Ergebnisse aus zwei verschiedenen Tests: der Durchflusszytometrie zur Messung der P-Selektin-Expression (rot) und dem PathHunter® eXpress CXCR7 CHO-K1 β -Arrestin GPCR Assay (grün) zur Quantifizierung der β -Arrestin-Rekrutierung. Die Daten sind normalisiert in Prozent zur Kontrolle abgebildet. Die daraus identifizierten Leitstrukturen C10 und C11 sind grün umrandet markiert während die Negativkontrolle C46 rot umrandet ist (modifiziert nach Bayrak *et al.* 2022).

Auf Grundlage der kombinierten Ergebnisse aus Abbildung 17, der β -Arrestin-Rekrutierung und der P-Selektin-Expression, wurden die sechs vielversprechendsten Verbindungen (C10, C11, C6, C7, C12 und C15) in einer abschließenden Evaluierung getestet. In diesem Test wurden die Verbindungen in einer reduzierten Konzentration von 100 μ M eingesetzt, um deren Effektivität unter diesen veränderten Bedingungen weiter zu überprüfen. Die Untersuchung erfolgte erneut mittels Durchflusszytometrie, wobei die P-Selektin-Expression nach der Aktivierung der Thrombozyten mit CRP (1 μ g/ml) gemessen wurde.

Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten, dass C10 und C11 weiterhin vielversprechende Verbindungen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die P-Selektin-Expression bei der niedrigen Konzentration von 100 μ M waren. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden C10 und C11 für weitere detaillierte Untersuchungen und als Leitstrukturen für weitere Modifikationen ausgewählt.

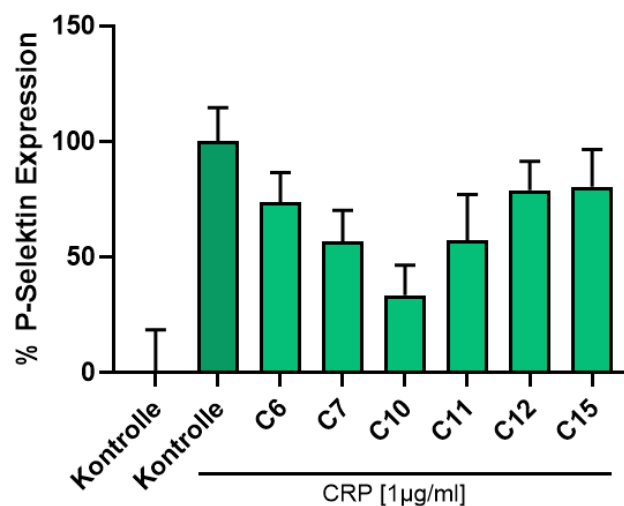


Abbildung 18: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der P-Selektin Expression auf humanen Thrombozyten nach Behandlung mit je einer der fünf ausgewählten Verbindungen C6, C7, C10, C11, C12 oder C15 (100 μ M), einer unbehandelten Kontrolle (dunkelgrün) und anschließender Aktivierung mit CRP (1 μ g/ml) sowie einer nicht aktivierten und unbehandelten Kontrolle (links). Mittelwert \pm S.E.M.; Ergebnisse von 4 unabhängigen Experimenten.

3.3.4 Wirkprofil der potenziellen ACKR3-Agonisten C10, C11 und C46 in verschiedenen Modellen der Thrombozytenfunktion

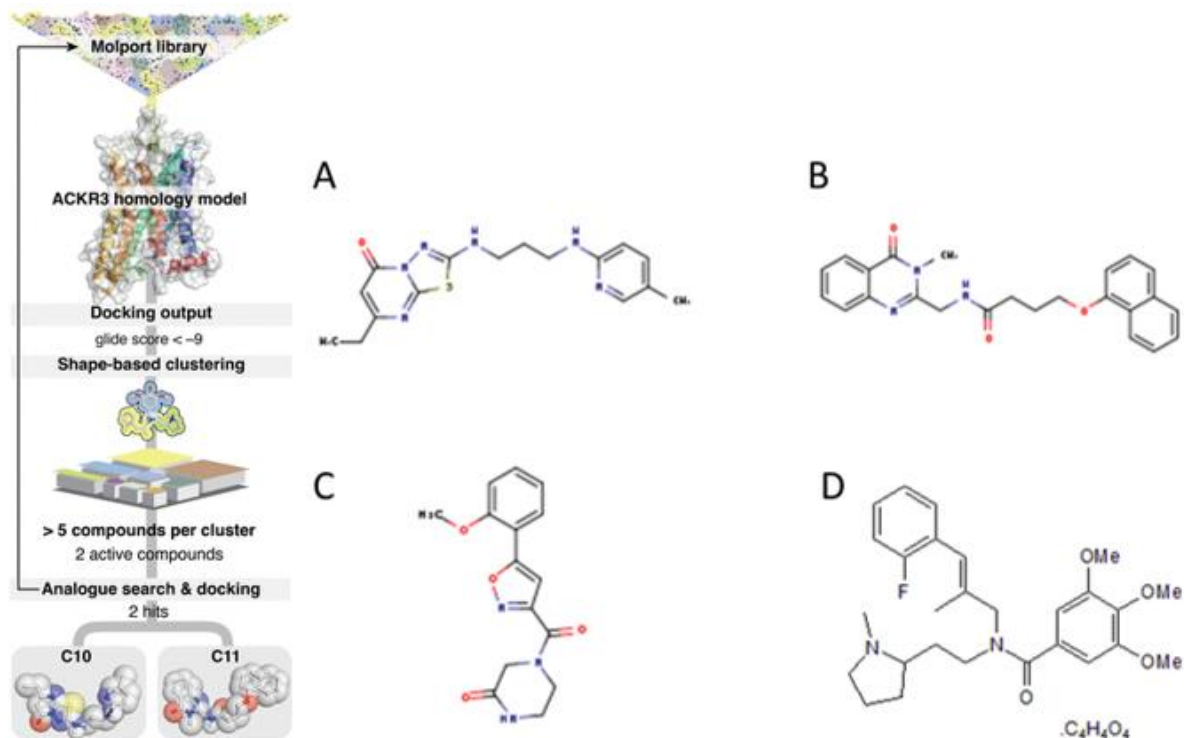


Abbildung 19: „Screening“-Prozess und Strukturformeln der ausgewählten Verbindungen: Links: Zusammenfassung der vorangegangenen Prozesses bis zur Identifikation der Leitverbindungen C10 und C11; Rechts Strukturformeln der vier Verbindungen die aufgrund ihrer Bindungs- und aktivierungshemmenden Eigenschaften für weitere Versuche als potenzielle ACKR3-Agonisten ausgewählt wurden. (A) Verbindung Z645919236 (im Weiteren bezeichnet als C10). (B) Verbindung Z623225913 (im Weiteren bezeichnet als C11). (C) Verbindung Z373658330 (im Weiteren bezeichnet als C46) in Versuchen als Negativkontrolle verwendet. (D) ACKR3-Agonist VUF11207 wird in Versuchen als Positivkontrolle verwendet. (aus Bayrak *et al.* 2022).

3.3.4.1 Einfluss der potenziellen ACKR3-Agonisten auf die Aktivierbarkeit von humanen Thrombozyten

Zur detaillierten Analyse der Verbindungen C10, C11, VUF11207 und C46 hinsichtlich der Thrombozytenaktivierung wurde die P-Selektin-Expression nach Aktivierung erneut mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Tests wurden mit humanem plättchenreichem Plasma (PRP) durchgeführt, wobei die Verbindungen in einer Konzentrationsreihe von 15,63 μM bis 1000 μM getestet wurden.

Die Experimente umfassten sieben Konzentrationen jeder Verbindung. Nach Inkubation mit den Agonisten und Aktivierung der Thrombozyten mit CRP (1 $\mu\text{g/ml}$) wurde die P-Selektin-Expression durchflusszytometrisch erfasst.

Abbildung 20 zeigt die P-Selektin-Expression für jede getestete Verbindung und Konzentration. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass C10, C11 und VUF11207 bei höheren Konzentrationen eine reduzierte P-Selektin-Expression aufwiesen im Vergleich zu C46, welches keine signifikante Aktivität zeigte.

Zusätzlich illustriert Abbildung 20 die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der P-Selektin-Expression für die getesteten Verbindungen und verdeutlicht die Variabilität der Thrombozytenaktivierung in Abhängigkeit von der Agonisten-Konzentration. Die getesteten Verbindungen C10, C11 und VUF11207 führten in höheren Konzentrationen zu einer abnehmenden P-Selektin-Expression und damit zu einer geringeren Thrombozytenaktivierung, während C46 wie zuvor keine Aktivität zeigte und daher als negative Kontrolle diente. VUF11207 wies erneut konsistente Ergebnisse auf und diente als Referenzsubstanz. Für die nachfolgenden Experimente wurde daraufhin die Konzentration auf 100 μM gesenkt, da diese im Vergleich zu den zuvor verwendeten 500 μM besser geeignet ist, potenzielle Verbindungen mit geringem Konzentrationsbedarf zu identifizieren. In der Dosis-Wirkungskurve liegen die 100 μM in einem Bereich, der noch ausreichend wirksam ist, aber vor dem Plateau der Konzentrationen, bei denen nur eine geringe oder keine Wirkung mehr zu beobachten ist.

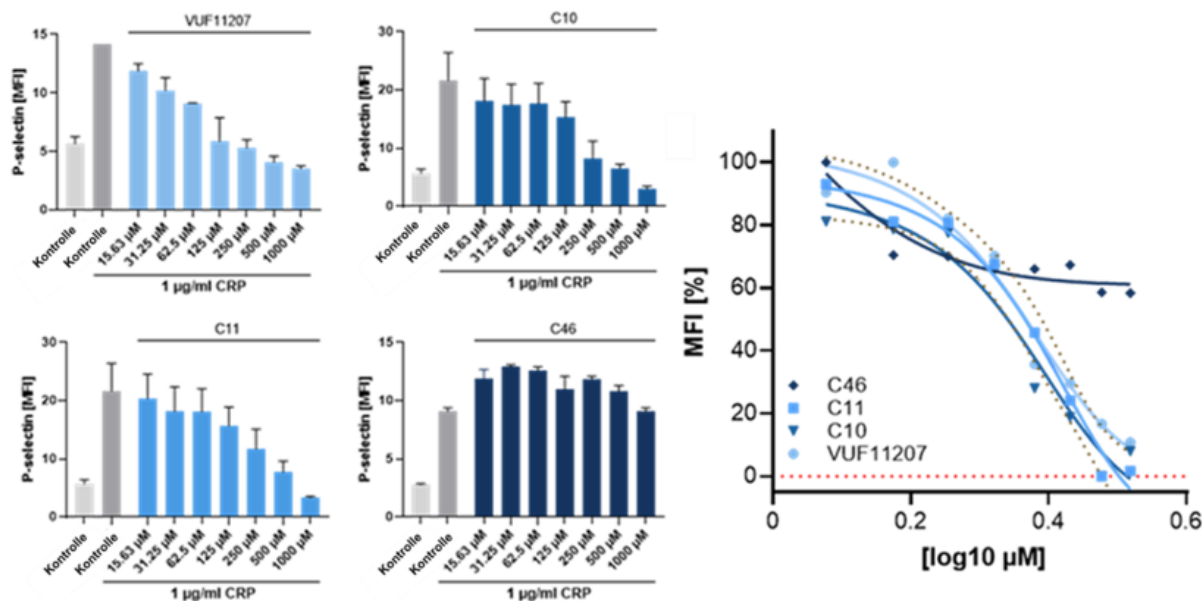


Abbildung 20: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der P-Selektin Expression: Links: Ergebnisse der Messung der P-Selektin Expression auf humanen Thrombozyten nach Behandlung mit einer sinkenden Konzentration der (potenziellen) ACKR3-Agonisten und Aktivierung mit 1 µg/ml CRP sowie jeweils eine nicht aktivierte Kontrolle (hellgrau) und eine aktivierte Kontrolle (dunkelgrau). Mittelwert ± S.E.M.; Rechts: Dosis-Wirkungs-Kurven der P-Selektin-Expression nach Behandlung mit ACKR3-Agonisten (modifiziert nach Rohlfing *et al.* 2022).

3.3.4.2 Einfluss der potenziellen ACKR3-Agonisten auf die *ex vivo* Thrombusformation von humanen Thrombozyten

Für eine Bewertung der Wirkung der Verbindungen VUF11207, C10, C11 und C46 auf die Thrombusbildung wurde humanes Vollblut mit den Verbindungen in einer Konzentration von 100 µM vorinkubiert und anschließend in einem künstlichen Perfusionssystem mit Kollagenbeschichtung getestet. Dieses System simulierte physiologische Flussbedingungen mit einer mittleren Flussgeschwindigkeit von 7,53 ml/h (Scherrate 1000 s⁻¹). Als Referenz wurde unbehandeltes Blut verwendet, um eine Basislinie für die Thrombusbildung festzulegen. Zusätzlich diente C46 als Negativkontrolle, um sicherzustellen, dass nicht alle diese Verbindungen eine Wirkung auf die Thrombusbildung haben.

Die Analyse der Ergebnisse, die in Abbildung 21 dargestellt ist, zeigt die thrombusbedeckte Fläche für jede getestete Verbindung sowie repräsentative Bilder des Experiments. Die Behandlung der Blutprobe mit VUF11207, führte zu einer signifikanten ($p < 0,01$) Reduktion der thrombusbedeckten Fläche im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese Wirkung war ausgeprägter als die der anderen getesteten Verbindungen. Auch die Verbindungen C10 und C11

zeigten eine signifikant ($p < 0,05$) reduzierte thrombusbedeckte Fläche im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Im Gegensatz dazu zeigte C46, das als zusätzliche negative Kontrolle verwendet wurde, keine signifikante Reduktion der thrombusbedeckten Fläche und wies ähnliche Werte wie das unbehandelte Blut auf.

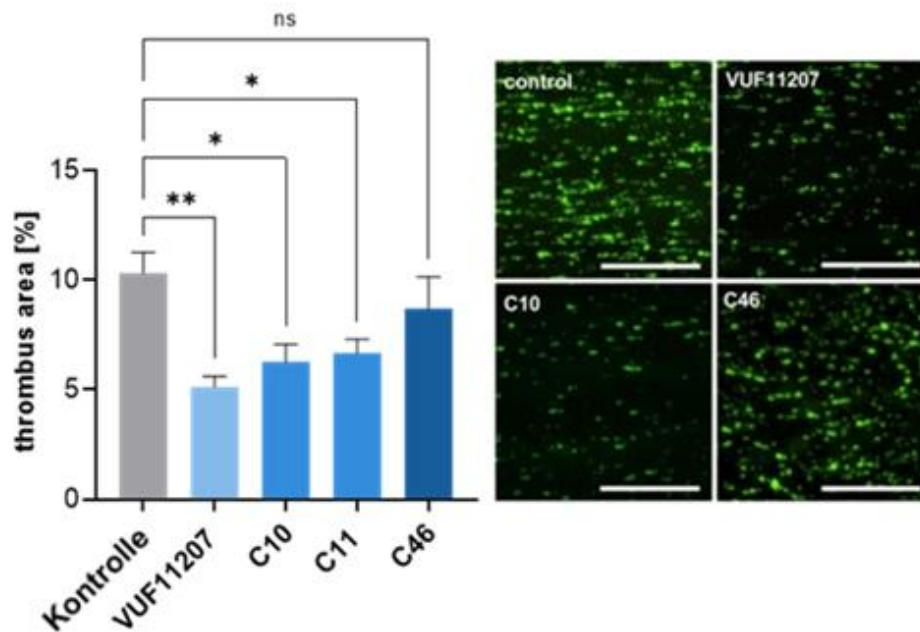


Abbildung 21: Messung der *ex vivo* Perfusion nach Vorbehandlung mit verschiedenen (potenziellen) ACKR3-Agonisten. Links: Darstellung der thrombusbedeckten Fläche für die unbehandelte Probe oder nach Vorbehandlung mit entweder VUF11207, C10, C11 oder C46, jeweils in einer Konzentration von 100 μM . Rechts: repräsentative Fluoreszenzaufnahmen. Mittelwert \pm S.E.M.; one-way ANOVA, 95 % Konfidenzintervall; Kontrolle (Vehicle) (n=9) vs. VUF11207 $p < 0,01$ (n=17), C10 $p < 0,05$ (n=14), C11 $p < 0,05$ (n=15), C46 $p > 0,05$ (n=16). (modifiziert nach Rohlfing *et al.* 2022).

3.3.4.3 Einfluss der potenziellen ACKR3-Agonisten auf die Aggregation von humanen Thrombozyten

Zur Untersuchung der Wirkung der Verbindungen VUF11207, C10, C11 und C46 auf die Thrombozytenaggregation wurde eine Aggregometrie mit dem Chronolog-System (CHRONOLOG Corporation) durchgeführt. Humanes plättchenreiches Plasma (PRP) wurde in einer Konzentration von 100 μM für jede Verbindung behandelt und anschließend mit CRP (10 $\mu\text{g/ml}$) zur Auslösung der Aggregation versetzt.

Die Ergebnisse der Aggregometrie sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Analyse zeigt, dass die Verbindung C10 eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation aufwies, was sich in einer verringerten „area under curve“ (AU) widerspiegelt.

Im Gegensatz dazu führten die Verbindungen VUF11207, C11 und C46 nicht zu signifikanten Änderungen in der Thrombozytenaggregation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die AU-Werte waren zwar von der Kontrolle abweichend allerdings nicht signifikant unterschiedlich, was darauf hinweist, dass diese Verbindungen unter den getesteten Bedingungen keine ausgeprägte Wirkung auf die Thrombozytenaggregation zeigten.

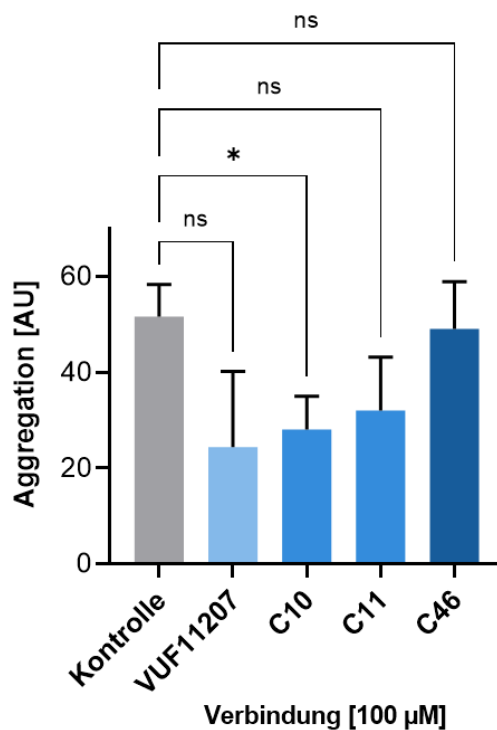


Abbildung 22: Messung der Thrombozytenaggregation nach Vorbehandlung mit verschiedenen (potenziellen) ACKR3-Agonisten. Darstellung der Aggregation („area under curve“) für die unbehandelte Probe oder nach Vorbehandlung mit entweder VUF11207, C10, C11 oder C46 jeweils in einer Konzentration von 100 µM. Mittelwert ± S.E.M.; Student's t test, 95 % Konfidenzintervall; Kontrolle (Vehicle) vs. C10 $p < 0,05$; VUF11207, C11, C46 $p > 0,05$. Ergebnisse von 4 unabhängigen Experimenten.

3.3.4.4 Einfluss der potenziellen ACKR3-Agonisten auf die Calciummobilisierung bei Aktivierung humaner Thrombozyten

Um den Einfluss der Verbindung C10 auf die zytosolische Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten zu untersuchen, wurde eine Calcium-Spektrofluorometrie durchgeführt. Die isolierten humanen Thrombozyten wurden mit 100 μM der Verbindung C10 oder C46 vorbehandelt und anschließend für die Messung mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CRP-XL aktiviert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. Diese Abbildung zeigt sowohl den gemessenen Calciumspiegel als auch die Calcium-Kurven über die Zeit von 0 bis 300 s. Die Daten verdeutlichen, dass die Verbindung C10 einen signifikant reduzierten Calciumanstieg in den Thrombozyten bewirkte. Im Vergleich dazu zeigte C46 keine signifikante Veränderung in der Calciumkonzentration.

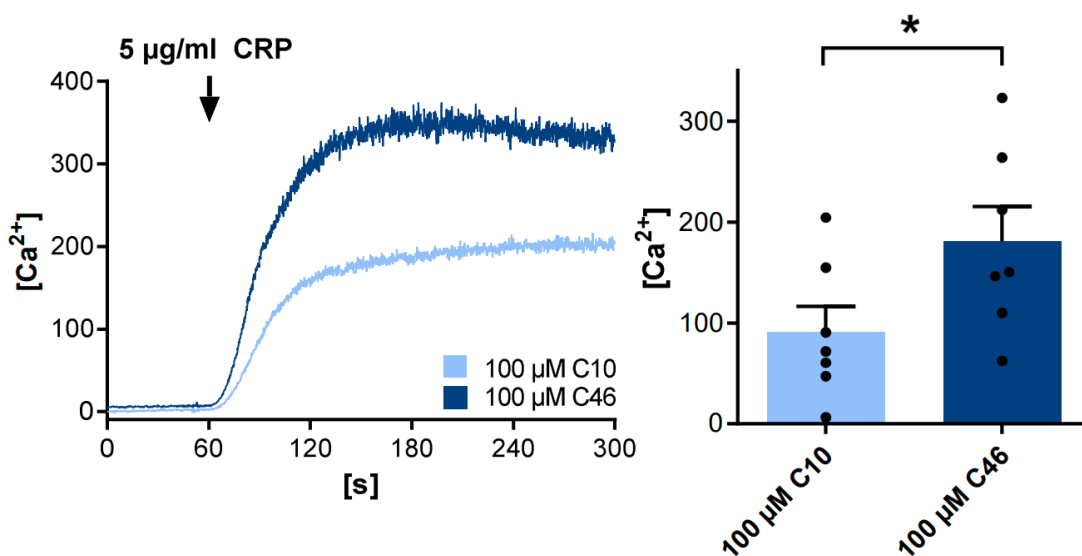


Abbildung 23: Calciummobilisierung- nach Aktivierung von isolierten humanen Thrombozyten: Links: Repräsentative Abbildung der des Calcium-Anstiegs nach Aktivierung von isolierten humanen Thrombozyten mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CRP, nach Behandlung mit 100 μM C10 oder C46. Messung im Zeitraum von 0 bis 300 s. Rechts: Auswertung des Calciumanstiegs. Mittelwert \pm S.E.M.; Student's t test, 95 % Konfidenzintervall; C10 vs. C46 $p < 0,05$. Ergebnisse von 7 unabhängigen Experimenten.

3.4 Versuche mit chemisch modifizierten Strukturen von C10 und C11

In dieser fortlaufenden Forschung zur Identifikation eines ACKR3 Superagonisten, wurden die Auswirkungen von strukturellen Modifikationen an den Verbindungen C10 und C11 untersucht.

Diese Modifikationen wurden mit dem Ziel vorgenommen, die Effizienz und Selektivität dieser Verbindungen weiter zu verbessern und die Erkenntnisse aus der vorherigen Arbeit zu vertiefen. Eines der Ziele war es, die benötigte Konzentration zur Erreichung signifikanter Effekte zu reduzieren. In der vorhergehenden Arbeit lieferten die initialen Verbindungen C10 und C11 zwar vielversprechende Ergebnisse, jedoch waren die Effekte bei vergleichsweise hohen Konzentrationen sichtbar. Diese Erkenntnis führte zu dem Ansatz, die molekularen Strukturen zu modifizieren, um die Potenz zu erhöhen und die erforderlichen Konzentrationen weiter zu minimieren.

3.4.1 Aktivierbarkeit der Thrombozyten

Zur Analyse der neu synthetisierten Verbindungen, für den Vergleich mit deren Ausgangsstrukturen C10 und C11 und zur Erfassung von Verbesserungen oder Verschlechterungen in der Wirksamkeit wurde abermals die bereits gut etablierte Durchflusszytometrie zur Erfassung der P-Selektin-Expression verwendet.

Für die Experimente wurden die Proben mit den zu testenden Verbindungen in einer Konzentration von jeweils 100 μM vorinkubiert, um mögliche Effekte der Verbindungen auf die Zelloberfläche zu initialisieren. Nach der Inkubation wurden die Thrombozyten mit 1 $\mu\text{g/ml}$ CRP aktiviert, um die P-Selektin-Expression zu induzieren.

Abbildung 24 zeigt die Wirkung von C10 und seinen Derivaten auf die Reduktion der P-Selektin-Expression bei einer Konzentration von jeweils 100 μM . C10, als Leitverbindung, zeigte eine moderate Reduktion von 41 %. Die Verbindungen 8, 16 und 28 zeigten vergleichbare Ergebnisse wie C10, aber die Verbindungen 9, 10 und 25 verringerten die P-Selektin-Expression signifikant im Bereich von 71 bis 76 %. Das Derivat 21 reduzierte die P-Selektin-Expression ähnlich wie VUF11207. Tatsächlich zeigten die Superagonisten 26 (interne Bezeichnung: 5972) und 27 (interne Bezeichnung: 6023) bei einer Konzentration von jeweils 100 μM eine deutliche Verringerung der P-Selektin-Expression, insbesondere 27 mit 97 %, was höher ist als bei allen anderen in dieser Arbeit untersuchten Agonisten, einschließlich VUF11207.

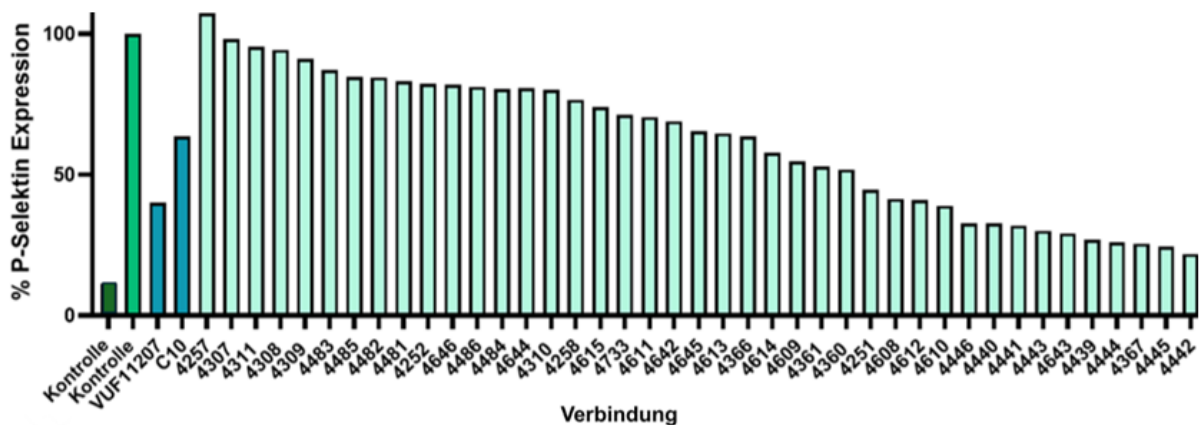


Abbildung 24: Repräsentative Ergebnisse für getestete Verbindungen die auf Basis von Leitverbindung C10 synthetisiert wurden: Ausgewählte repräsentative Diagramme aus Durchflusszytometrieanalysen zur Erfassung der P-Selektin-Expression nach Aktivierung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ CRP und vorheriger Behandlung der Proben mit je 100 μM der jeweiligen getesteten Verbindung, sowie eine nicht aktivierte Kontrolle (dunkelgrün) und eine aktivierte Kontrolle (grün). Die Ergebnisse veranschaulichen die sukzessive Verbesserung aus mehreren Synthese-Runden.

Die aus dem Leitmolekül C11 synthetisierten Verbindungen konnten im Vergleich zu den Verbindungen die aus C10 hergeleitet wurden, keine Verbesserungen aufweisen (Abbildung 25). Keine der strukturellen Änderungen führte bei einer Konzentration von 100 μM zu einer signifikanten Steigerung der Reduktion der P-Selektin-Expression. Das Derivat 4036 erwies sich als das wirksamste in der C11-Reihe und senkte die P-Selektin-Expression um 26 %. Dies könnte auf eine moderate Wirksamkeit zurückzuführen sein. Weitere Versuche zeigten, dass Fraktionen des jeweiligen Liganden je nach Polarität des Verbindungsstoffs durch Plasmaproteine des PRP gebunden werden könnten (Bayrak *et al.* 2022). Daher wurde beschlossen, die Bemühungen auf die C10-Derivate zu konzentrieren.

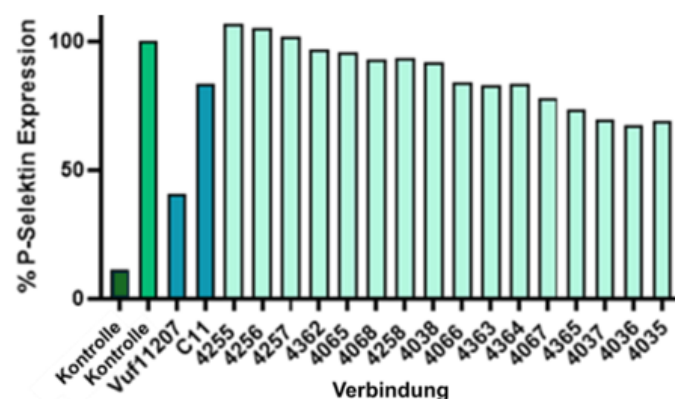


Abbildung 25: Repräsentative Ergebnisse für getestete Verbindungen die auf Basis von Leitverbindung C11 synthetisiert wurden: Ausgewählte repräsentative Diagramme aus Durchflusszytometrieanalysen zur Erfassung der P-Selektin-Expression nach Aktivierung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ CRP und vorheriger Behandlung der Proben mit je 100 μM der jeweiligen getesteten Verbindung, sowie eine nicht aktivierte Kontrolle (dunkelgrün) und eine aktivierte Kontrolle (grün). Die Ergebnisse zeigen ein Ausbleiben einer Verbesserung auch nach mehreren Synthese-Runden.

3.4.2 Untersuchung möglicher zelltoxische Effekte der Verbindungen

Um eventuelle zelltoxische Effekte der getesteten Verbindungen zu bewerten, wurde ein Toxizitätsassay verwendet. Diese Methode misst die Zellviabilität durch die Quantifizierung der ATP-Konzentration, welche als Indikator für die Zellebensfähigkeit dient. Für den Assay wurden HEK293-Zellen genutzt.

Die Zellbehandlung erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen der Verbindungen, und es wurden sowohl DMSO-Kontrollen als auch leere Wells zur Bestimmung des Hintergrundsignals verwendet. Um ein umfassendes Bild der potenziellen Toxizität zu erhalten, wurden die Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden untersucht. Diese zeitlich gestaffelte Vorgehensweise ist entscheidend, um sowohl sofortige als auch verzögerte zelltoxische Effekte zu erfassen, da einige toxische Reaktionen erst über längere Zeiträume auftreten können. Die über einen längeren Zeitraum gesammelten Daten bieten wertvolle Einblicke in die langfristige Verträglichkeit und Sicherheit der Verbindungen.

Die Ergebnisse der Zellviabilitätstests nach 72 h, sind in Abbildung 26 dargestellt, die die Konzentrations-Wirkungs-Kurven zeigt und die Auswirkungen der drei getesteten Verbindungen auf die Zellebensfähigkeit veranschaulicht. Verglichen mit dem Referenzagonisten VUF11207 zeigen die beiden Superagonisten 26 und 27 keine höhere, in hohen Konzentrationen zwischen 1 und 100 μM gar eine geringere Zelltoxizität sowohl in den Versuchen mit HEK293 als auch mit THP1 Zellen. Ab einer Konzentration von 1000 μM ist die Zellviabilität dennoch bei allen Agonisten nicht mehr nachweisbar.

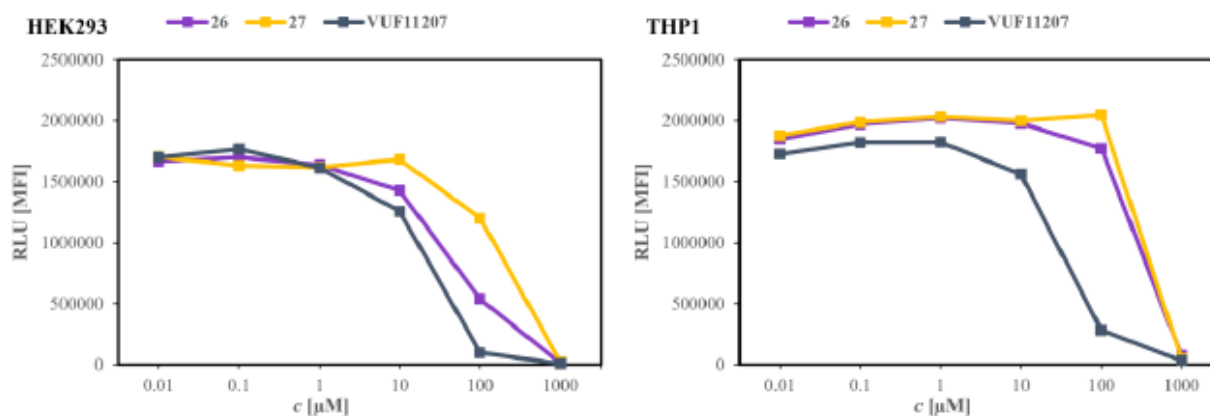


Abbildung 26: Konzentrationsabhängiger Promega RealTimeGlo™ Viability Assay: Konzentrations-Wirkungs-Kurven zur Zellviabilität nach 72 h für die Verbindungen 26, 27 und den Referenzagonisten VUF11207 in HEK293- und THP1-Zellen. Dargestellt ist die Zelllebensfähigkeit (RLU) in Abhängigkeit der Konzentration der Verbindungen ($c[\mu\text{M}]$). Die Verbindungen 26 und 27 weisen im Vergleich zum Referenzagonisten VUF11207 bei hohen Konzentrationen (1–100 μM) eine geringere Zelltoxizität auf. Ab einer Konzentration von 1000 μM ist jedoch bei allen getesteten Verbindungen keine Zellviabilität mehr nachweisbar (übernommen aus Bayrak *et al* 2022).

3.5 Einfluss des CXCR4 Rezeptors und CXCL12 auf die ACKR3-Agonist-Interaktion

Die Wechselwirkungen zwischen den Chemokinrezeptoren ACKR3 und CXCR4 spielen eine entscheidende Rolle für die Regulation von Thrombozytenfunktionen (Chatterjee *et al.* 2015). ACKR3 und CXCR4 können als Heterodimere agieren, was die Signaltransduktion und die Funktion der Thrombozyten beeinflusst (Levoye *et al.* 2009). CXCR4, ein G-Proteingekoppelter Rezeptor, wird durch den Liganden CXCL12 aktiviert, was zur Zellmigration und -adhäsion führt (Busillo und Benovic 2007). ACKR3 hingegen wirkt primär als „scavenger“-Rezeptor, der CXCL12 und CXCL11 endozytiert und abbaut, und durch β -Arrestin-vermittelte Signalwege alternative zelluläre Antworten induziert (Rajagopal *et al.* 2009).

Die Heterodimerisierung von CXCR4 und ACKR3 kann die Signalübertragung modulieren, indem sie die Affinität der Rezeptoren für ihre Liganden verändert und die Aktivierung spezifischer intrazellulärer Signalwege beeinflusst. Beispielsweise kann die Heterodimerisierung die Verfügbarkeit von Liganden wie CXCL12 regulieren und somit die Aktivierung von Signalwegen steuern, die für die Thrombozytenaktivität relevant sind (Levoye *et al.* 2009).

Das Ziel der nachfolgenden Untersuchungen besteht darin, zu klären, ob und in welchem Ausmaß der CXCR4-Rezeptor und CXCL12 die Interaktion oder Signalübertragung des

ACKR3-Rezeptors durch dessen Agonisten beeinflusst. Dadurch soll festgestellt werden, ob die Effekte der ACKR3-Aktivierung auf die Thrombozytenfunktion unabhängig von CXCR4 ablaufen.

3.5.1 Einfluss des CXCR4 Rezeptors und CXCL12 auf Aktivierbarkeit humaner Thrombozyten

Im Folgenden wurde untersucht, ob der Rezeptor CXCR4 und der natürliche Agonist der beiden Rezeptoren ACKR3 und CXCR4, das Chemokin CXCL12, den Einfluss der Verbindung C10 auf die Thrombozytenaktivierung beeinflussen bzw. selbst einen Effekt auf die Thrombozytenaktivierung haben. Dazu wurde eine Durchflusszytometrie zur Messung der P-Selektin-Expression durchgeführt. Alle Proben wurden mit 1 µg/ml CRP aktiviert, außer einer nicht aktivierten Kontrolle. Die Untersuchung umfasste drei Versuchsreihen mit jeweils drei unterschiedlichen Proben. Zunächst eine unbehandelte Versuchsreihe für die Referenzproben, eine zweite Reihe in der alle Proben mit 1 µg/ml CXCL12 vorbehandelt wurden und eine weitere Reihe die mit 100 µM des potenziellen ACKR3-Agonist C10 vorbehandelt wurde. Die drei Proben innerhalb dieser Versuchsreihen waren jeweils eine Probe mit 10 µM AMD3100, eine weitere mit CXCR4-Antikörper und einer sonst weiter unbehandelten Kontrollprobe.

AMD3100, auch bekannt als Plerixafor, ist ein spezifischer Antagonist des CXCR4-Rezeptors, der häufig verwendet wird, um die Interaktion zwischen CXCR4 und seinem natürlichen Liganden CXCL12 zu blockieren (Clercq 2003).

Nach der Inkubation und Aktivierung der Thrombozyten mit CRP wurde die P-Selektin-Expression durchflusszytometrisch erfasst. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse der P-Selektin-Expression für jede getestete Gruppe und jedes Szenario.

Die Ergebnisse zeigen, dass in der ersten und zweiten Gruppe keine signifikanten Unterschiede in der P-Selektin-Expression zwischen den getesteten Szenarien beobachtet wurden. Weder die Zugabe von CXCL12 noch die Hemmung von CXCR4 durch AMD3100 oder den CXCR4-Antikörper beeinflussten die Thrombozytenaktivierung signifikant.

In der dritten Gruppe, die mit C10 behandelt wurde, zeigte sich hingegen eine signifikante Reduktion der P-Selektin-Expression in allen Szenarien. Unabhängig davon, ob die Proben zusätzlich mit AMD3100 oder dem CXCR4-Antikörper behandelt wurden, blieb die hemmende Wirkung von C10 auf die Thrombozytenaktivierung bestehen.

Die Balkendiagramme in Abbildung 27 veranschaulichen diese Ergebnisse und zeigen die P-Selektin-Expression nach den verschiedenen Behandlungen. Die Daten belegen, dass C10 unabhängig von der Präsenz oder Blockade von CXCR4 und CXCL12 eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaktivierung bewirkt.

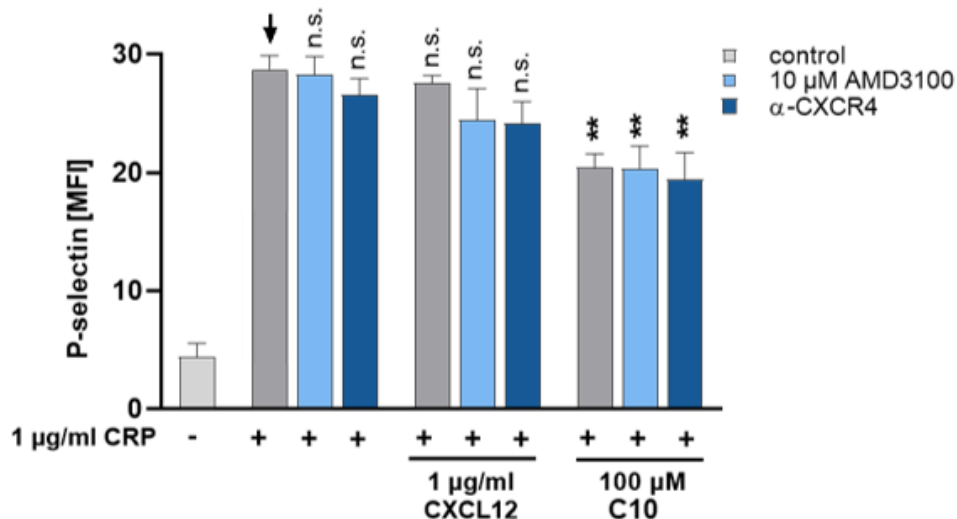


Abbildung 27: Untersuchung des Einflusses des CXCR4 Rezeptors und CXCL12 auf ACKR3-Agonist-Interaktion und der P-Selektin-Expression auf Thrombozyten: Die Proben wurden in drei Versuchsreihen untersucht: eine unbehandelte Kontrollreihe, eine mit CXCL12 (1 µg/ml) vorbehandelte Reihe und eine mit C10 (100 µM) behandelte Reihe. Innerhalb jeder Versuchsreihe wurden drei Bedingungen getestet: unbehandelte Proben, Proben mit dem CXCR4-Antagonisten AMD3100 (10 µM) und Proben mit CXCR4-Antikörper. Die Balkendiagramme stellen die P-Selektin-Expression unter den jeweiligen Bedingungen dar. Mittelwert ± S.E.M.; one-way ANOVA. Aktivierte Kontrolle vs. C10 $p < 0,01$, + 10 µM AMD3100 $p < 0,01$, + CXCR4-Antikörper $p < 0,01$; alle weiteren Bedingungen $p > 0,05$. Ergebnisse von 4 unabhängigen Experimenten.

3.6 Analyse der Rezeptorspezifität des ACKR3-Agonisten C10

Die folgenden Versuche widmen sich der Frage, ob die Wirkung des in dieser Arbeit getesteten ACKR3-Agonisten C10 spezifisch durch die Bindung an den ACKR3-Rezeptor vermittelt wird, oder ob der CXCR4-Rezeptor, der ebenfalls an der Regulation von Thrombozytenfunktionen beteiligt ist, hier auch eine Rolle spielt. In Experimenten mit *Cxcr4*^{-/-}-Mäusen wurde untersucht, ob die Abwesenheit von CXCR4 die Aktivität des ACKR3-Agonisten beeinflusst, um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte ausschließlich auf die Aktivierung von ACKR3 zurückzuführen sind. Ziel dieser Versuche war es, die Rezeptorspezifität des Agonisten und dessen mögliche Interaktionen mit CXCR4 näher zu charakterisieren.

3.6.1 Untersuchung der rezeptorabhängigen Wirkung des ACKR3-Agonisten C10 auf die Thrombusbildung unter Flussbedingungen

Um den Zusammenhang der Rezeptoren und der potenziellen ACKR3-Agonisten C10 in der Thrombusbildung *ex vivo* unter physiologischen Flussbedingungen zu untersuchen, wurde das bereits eingeführte *ex vivo* Perfusionssystem eingesetzt.

Für diesen Versuch wurde murines Vollblut von Wildtyp-Mäusen (*Ackr3^{fl/fl}*) und Tieren mit megakaryozyten-/thrombozytenspezifischer Deletion von ACKR3 (*Ackr3^{-/-}*) oder von CXCR4 Wildtyp (*Cxcr4^{fl/fl}*) und Mäusen mit megakaryozyten-/thrombozytenspezifischer Deletion von CXCR4 (*Cxcr4^{-/-}*) genutzt und jeweils ohne und mit dem Agonisten (C10, 100 μ M) 30 min inkubiert. Eine mittlere Flussgeschwindigkeit von 7,53 ml/h (1000/s) wurde verwendet, um Bedingungen ähnlich denen einer Arterie zu simulieren. Der betrachtete Parameter für den Gruppenvergleich war die thrombusbedeckte Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche.

Die thrombusbedeckte Fläche pro Bild wurde analysiert, um den Mittelwert für jeden Durchlauf zu bestimmen und die Gruppen miteinander zu vergleichen. Die Auswertung der *ex vivo* Thrombusformation zeigt eine signifikant ($p < 0,05$) kleinere thrombusbedeckte Fläche bei Vorbehandlung der Proben mit dem Agonisten bei Verwendung des Vollblutes der Wildtyp-Tiere. Im Vergleich bleibt dieser Effekt, bei Verwendung von Blut der *Ackr3^{-/-}*-Tiere aus während der Effekt für die *Cxcr4^{-/-}*-Tiere bestehen bleibt (Abbildung 28).

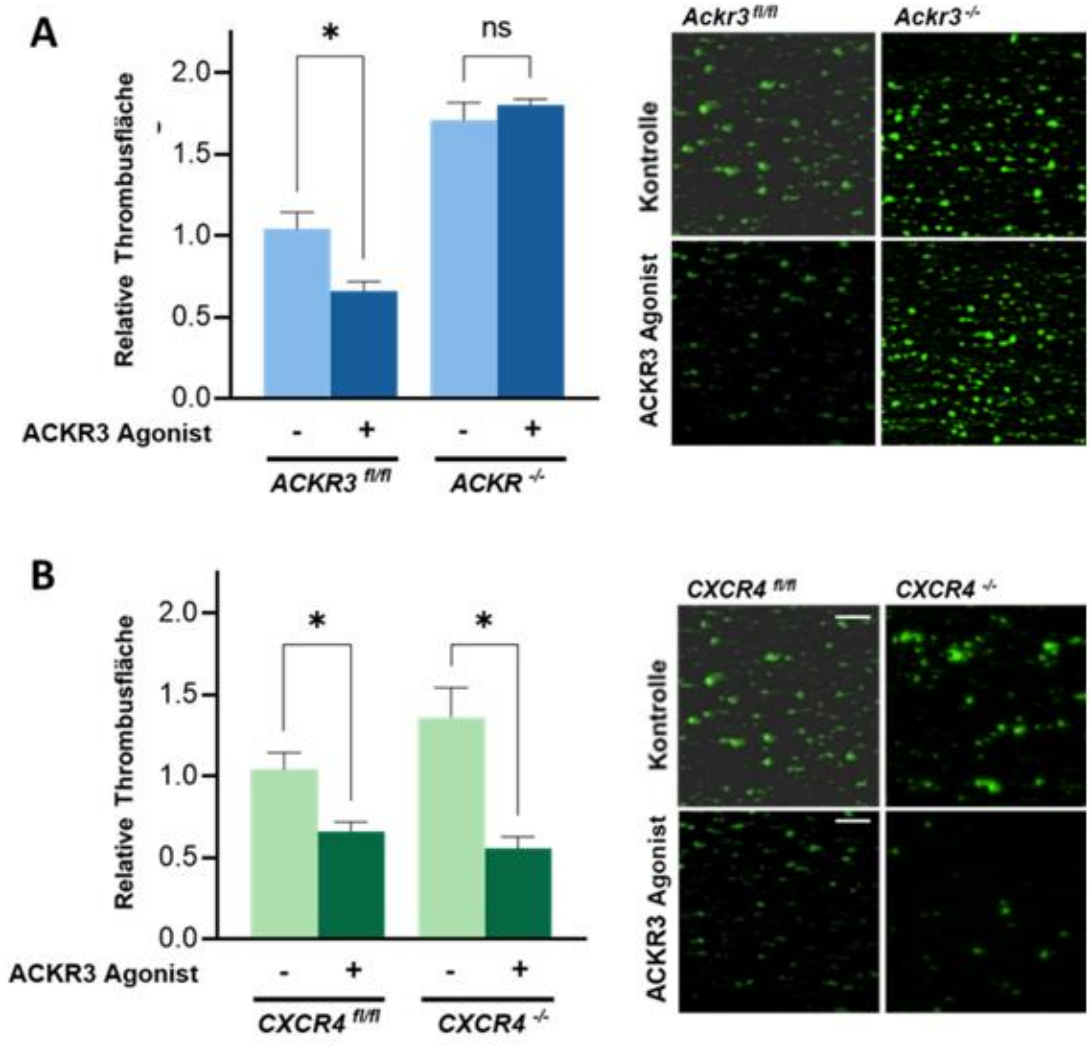


Abbildung 28: Vergleich der *ex vivo* Perfusion unter Einfluss des potenziellen Agonisten C10 mit murinem Blut von *Ackr3^{fl/fl}* vs. *Ackr3^{-/-}* (A) bzw. *Cxcr4^{fl/fl}* vs. *Cxcr4^{-/-}* -Tieren (B). Links: Balkendiagramme und Auswertung der thrombusbedeckten Fläche der Versuche. Rechts: repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der thrombusbedeckten Flächen (grün). Mittelwert ± S.E.M.; Student's t test, 95% Konfidenzintervall. Kontrolle (n=11) vs.C10 (100 µM) bei *Ackr3^{fl/fl}* p < 0,05 (n=4), Kontrolle (n=11) vs.C10 (100 µM) bei *Cxcr4^{fl/fl}* (n=4) und *Cxcr4^{-/-}* p < 0,05 (n=4)

3.6.2 Untersuchung der rezeptorabhängigen Wirkung des ACKR3-Agonisten C10 auf die Thrombozytenaktivierung

Um die Rezeptorspezifität des in dieser Arbeit untersuchten ACKR3-Agonisten C10 zu überprüfen, wurden auch Durchflusszytometrie-Messungen der P-Selektin-Expression auf murinen Thrombozyten durchgeführt. Dabei wurde auch hier murines Vollblut von Wildtyp-Tieren (*Ackr3^{fl/fl}*) und Mäusen mit megakaryozyten-/thrombozytenspezifischer Deletion von ACKR3 (*Ackr3^{-/-}*) sowie von CXCR4-Wildtyp-Tieren (*Cxcr4^{fl/fl}*) und Mäusen mit

megakaryozyten-/thrombozytenspezifischer Deletion von CXCR4 (*Cxcr4^{-/-}*) verwendet. Die Proben wurden wie in vorherigen Experimenten behandelt.

Wie auch zuvor war das Ziel dieser Experimente, festzustellen, ob die Wirkung von C10 spezifisch durch die Bindung an den ACKR3-Rezeptor vermittelt wird oder ob der CXCR4-Rezeptor, der ebenfalls an der Regulation von Thrombozytenfunktionen beteiligt ist, diese Wirkung beeinflusst. Die P-Selektin-Expression, ein Indikator für die Thrombozytenaktivierung, wurde dabei genutzt, um mögliche Unterschiede zwischen den *Cxcr4^{fl/fl}* - und *Cxcr4^{-/-}*-Gruppen zu erfassen und die Rolle von CXCR4 bei der Modulation der ACKR3-abhängigen Effekte zu untersuchen.

Die durchflusszytometrische -Messung der P-Selektin-Expression der murinen Thrombozyten zeigte unterschiedliche Ergebnisse abhängig von den Genotypen (Wildtyp vs. Knockout). In den Proben von Wildtyp-ACKR3-Mäusen war die P-Selektin-Expression nach CRP-Aktivierung signifikant geringer im Vergleich zu den Proben der *Ackr3^{-/-}*-Mäusen. Dieses Muster setzte sich auch in den mit dem ACKR3-Agonisten C10 behandelten Proben fort, wo die P-Selektin-Expression bei den Wildtypproben signifikant reduziert war.

In den Proben von Wildtyp-CXCR4-Mäusen (*Cxcr4^{fl/fl}*) war ebenfalls eine geringere P-Selektin-Expression im Vergleich zu den Tieren mit thrombozytenspezifischer CXCR4 Deletion (*Cxcr4^{-/-}*) zu beobachten, jedoch nur in den CRP-aktivierten Proben, die nicht zuvor mit C10 behandelt wurden. Bei den Proben die zuvor mit C10 behandelt wurden zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied in der P-Selektin-Expression zwischen CXCR4 Wildtyp- und Knockout-Tieren.

Diese Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt und umfassen Balkendiagramme, die die P-Selektin-Expression in den verschiedenen Genotypen und Behandlungsgruppen zeigen.

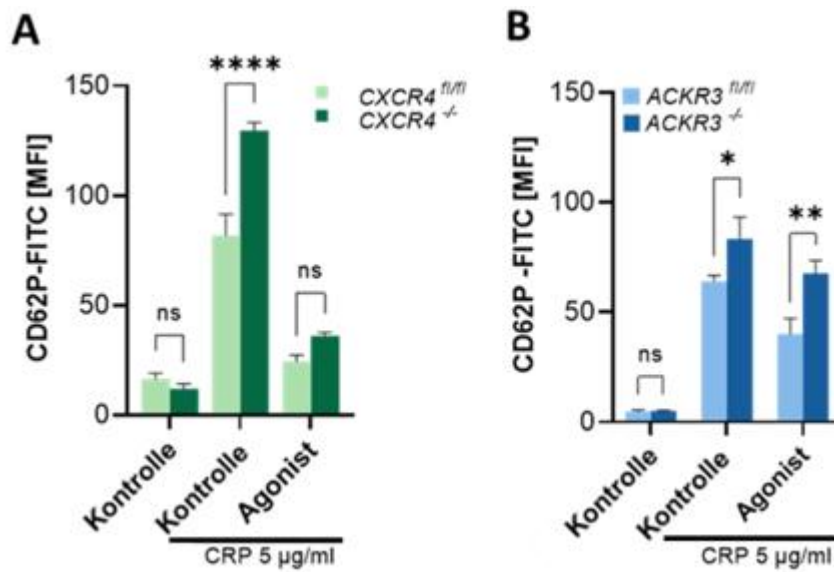


Abbildung 29: Vergleich der P-Selektin Expression unter Einfluss des potenziellen ACKR3-Agonisten C10 mit murinem Blut von *Cxcr4*^{fl/fl} vs. *Cxcr4*^{-/-}-Tieren (A) bzw. *Ackr3*^{fl/fl} vs. *Ackr3*^{-/-} (B). Ergebnisse für jeweils Kontrollen (links), aktivierte Proben mit CRP 5 µg/ml (mitte) und mit C10 (100 µM) vorbehandelte und ebenfalls aktivierte Proben (rechts). Mittelwert ± S.E.M.; Student's t test, 95% Konfidenzintervall. Kontrolle (Vehicle) *Ackr3*^{fl/fl} vs. *Ackr3*^{-/-} $p < 0,05$, C10 (100 µM) *Ackr3*^{fl/fl} vs. *Ackr3*^{-/-} $p < 0,01$; Ergebnisse von 10 unabhängigen Experimenten.; Kontrolle (Vehicle) *Cxcr4*^{fl/fl} vs. *Cxcr4*^{-/-} $p < 0,0001$, C10 (100 µM), *Cxcr4*^{fl/fl} vs. *Cxcr4*^{-/-} $p > 0,05$ Ergebnisse von 5 unabhängigen Experimenten.

3.7 Molekulare Mechanismen der ACKR3-abhängigen Signalübertragung

Dieser Teil der Arbeit zielt darauf ab die molekularen Mechanismen der Aktivierung des ACKR3 Rezeptors durch spezifische Agonisten und dessen Funktionsweise besser zu verstehen.

Dazu wurden in den Versuchen Barbadin, ein spezifischer Inhibitor des β -Arrestin2 Signalwegs, sowie ein spezifischer GRK2 (G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase 2) Inhibitor (Methyl 5-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-2-furoate) eingesetzt. Diese Inhibitoren ermöglichen es, die Rolle von ACKR3 in verschiedenen Signalwegen und seine Funktion in der Thrombozytenmodulation genauer zu untersuchen. Barbadin, beispielsweise, hemmt die β -Arrestin-vermittelte Internalisierung von Rezeptoren und bietet so Einblicke in die nicht-klassischen Signalwege von ACKR3 (Pitcher *et al.* 1998; Beutraut *et al.* 2017). Der GRK2-Inhibitor hingegen ermöglicht die Untersuchung der Regulation durch Phosphorylierung von Rezeptoren, ein Prozess, der oft bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) beobachtet wird. GRK2 spielt eine zentrale Rolle bei der Desensibilisierung von GPCRs durch Phosphorylierung der aktivierten Rezeptoren, was zur Rekrutierung von β -Arrestinen führt.

Diese β -Arrestine können dann beispielweise die Rezeptoren internalisieren und die Signalweiterleitung abschalten (Gurevich & Gurevich, 2019). Durch die Hemmung von GRK2 wird dieser Phosphorylierungsprozess blockiert, was es ermöglicht, die spezifischen Signalwege und Funktionen von ACKR3 detaillierter zu untersuchen (Pitcher *et al.* 1998; Ribas *et al.* 2007). Insbesondere ermöglicht dies Einblicke in die Mechanismen der Rezeptorregulation, die unabhängig von der klassischen G-Protein-Signalübertragung ablaufen und wichtige Rollen im Thrombozytenüberleben und deren Modulation spielen könnten.

Es ist bekannt, dass ACKR3 nicht nur als „scavenger“-Rezeptor für CXCL12 und CXCL11 fungiert, sondern auch durch seine Interaktionen mit β -Arrestin verschiedene Signalwege aktivieren kann. Die komplexe Interaktion zwischen ACKR3 und diesen Signalmolekülen könnte entscheidend sein für die Regulation von Zellüberleben und die Modulation von Thrombozytenfunktionen (Naumann *et al.* 2010; Chen *et al.* 2023).

Durch die Verwendung von genetisch modifizierten Modellen wie den megakaryozyten-/thrombozytenspezifischen ACKR3- und CXCR4-Knockout-Mäusen sowie spezifischen Inhibitoren soll diese Arbeit ein besseres Verständnis in die molekularen Mechanismen der ACKR3-abhängigen Signalübertragung geben und potenzielle neue therapeutische Ansätze zur Behandlung von thromboinflammatorischen Erkrankungen identifizieren.

3.7.1 Einfluss von GRK2- und β -Arrestin-Inhibitoren auf *ex vivo* Thrombusformation humaner Thrombozyten

Um den Einfluss von GRK2- und β -Arrestin-Inhibitoren auf die Thrombusbildung *ex vivo* unter möglichst physiologischen Flussbedingungen zu untersuchen, wurde das zuvor eingeführte *ex vivo* Perfusionssystem mit humanem Vollblut eingesetzt.

Für die Versuche wurde humanes Vollblut entweder unbehandelt als Kontrolle oder nach Vorinkubation mit einem GRK2-Inhibitor (100 μ M) oder dem β -Arrestin-Inhibitor Barbadin (100 μ M) getestet.

Der zentrale Parameter zur Beurteilung der Effekte war die thrombusbedeckte Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche. Die Analyse der thrombusbedeckten Fläche pro Bild ermöglicht es, den Mittelwert für jede Versuchsbedingung zu ermitteln und die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen statistisch auszuwerten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, zusammen mit repräsentativen Abbildungen der Experimente, sind in Abbildung 30 dargestellt. Die Behandlung mit 100 μM β -Arrestin-Inhibitor Barbadin (A) führte zu einer stark signifikanten ($p < 0,001$) Zunahme der thrombusbedeckten Fläche im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu zeigte die Vorbehandlung mit 100 μM GRK2-Inhibitor (B) eine signifikant ($p < 0,05$) reduzierte thrombusbedeckte Fläche.

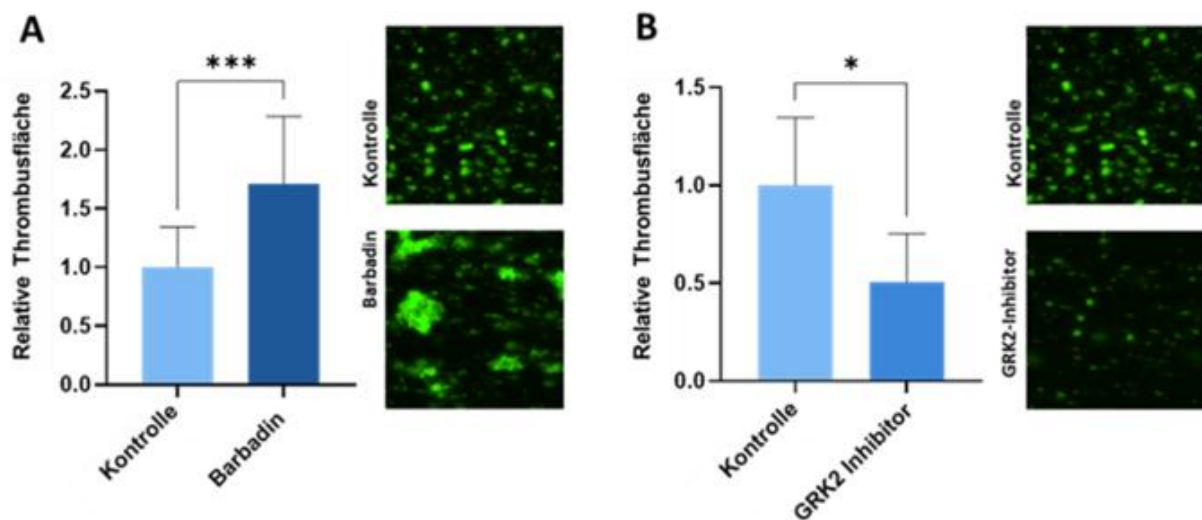


Abbildung 30: Ergebnisse der Thrombusbildung nach Behandlung von humanem Blut mit dem β -Arrestin-Inhibitor Barbadin (A) und dem GRK2-Inhibitor (B) im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen mit repräsentativen Fluoreszenzaufnahmen der thrombusbedeckten Fläche (grün). Mittelwert \pm S.D.; Student's t test, 95% Konfidenzintervall; Kontrolle vs. Barbadin (100 μM) $p < 0,001$; Kontrolle vs. GRK2 Inhibitor (100 μM) $p < 0,05$, Ergebnisse von 12 unabhängigen Experimenten.

3.7.2 Einfluss von GRK2- und β -Arrestin-Inhibitoren auf *ex vivo* Thrombusformation muriner Thrombozyten

Um den Einfluss der Rezeptoren ACKR3 und CXCR4 auf die Thrombusbildung unter physiologischen Flussbedingungen besser zu verstehen, wurden *ex vivo* Experimente auch mit murinem Vollblut durchgeführt. Dabei lag der Fokus darauf, zu klären, welcher der beiden Rezeptoren gegebenenfalls für die Effekte verantwortlich ist, die zuvor im humanen System beobachtet wurden. Zu diesem Zweck wurden Blutproben von Wildtyp-Tieren (*Ackr3^{fl/fl}*) und Tieren mit megakaryozyten-/thrombozytenspezifischer Deletion von ACKR3 (*Ackr3^{-/-}*) sowie von CXCR4-Wildtyp- (*Cxcr4^{fl/fl}*) und Tieren mit megakaryozyten-/thrombozytenspezifischer Deletion von CXCR4 (*Cxcr4^{-/-}*) verwendet. Die Blutproben wurden sowohl unbehandelt als

auch nach Vorinkubation mit dem β -Arrestin-Inhibitor Barbadin (100 μ M) oder dem GRK2-Inhibitor (100 μ M) getestet. Die Thrombusbildung der Tiere mit megakaryozyten-/thrombozytenspezifischer Deletion der Rezeptoren wurden mit ihren Wildtyp-Pendants verglichen, um die Rolle der jeweiligen Rezeptoren in Kombination mit den Inhibitoren zu bestimmen.

Die Ergebnisse zeigten, dass beim Blut der ACKR3-Wildtyp-Mäuse nach Behandlung mit Barbadin eine stark signifikante ($p > 0,001$) Zunahme der thrombusbedeckten Fläche, im Vergleich zum Blut der *Ackr3*^{-/-}-Mäuse, auftritt. Die thrombusbedeckte Fläche der Proben von *Ackr3*^{-/-}-Mäusen bleibt auf demselben Niveau wie die der unbehandelten Kontrollen, so scheint es, dass der zuvor beobachtete Effekte von Barbadin auf die verstärkte Thrombusbildung im Knockout ausbleibt. Im Gegensatz dazu konnte bei der Behandlung mit dem GRK2-Inhibitor zwischen Blut der Wildtyp- und *Ackr3*^{-/-}-Mäusen kein signifikanter Unterschied in der thrombusbedeckten Fläche festgestellt werden.

Bei den Proben der CXCR4-Wildtyp- und *Cxcr4*^{-/-}-Mäusen zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied in der thrombusbedeckten Fläche, unabhängig davon, ob die Tiere mit Barbadin oder dem GRK2-Inhibitor behandelt wurden.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 31 dargestellt. Die Abbildung zeigt sowohl die Balkendiagramme, die die thrombusbedeckte Fläche bei den verschiedenen Behandlungen (Kontrolle, GRK2-Inhibitor, Barbadin) des Bluts der Wildtyp- und *Ackr3*^{-/-} bzw. *Cxcr4*^{-/-}-Mäuse vergleichen, als auch repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Thromben.

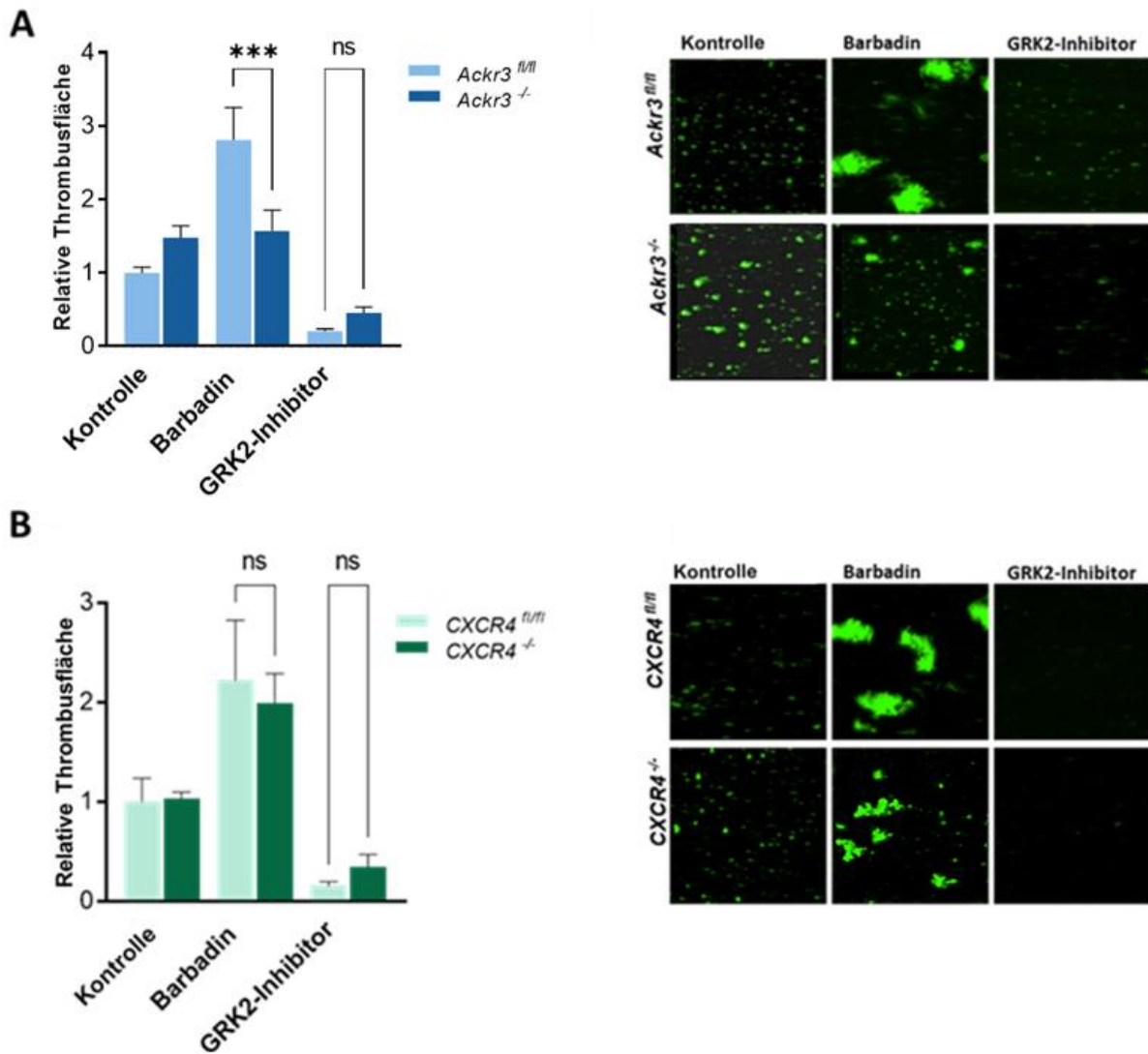


Abbildung 31: Untersuchung der Thrombusbildung von murinem Vollblut von *Ackr3*^{-/-}- sowie *Cxcr4*^{-/-}-Tieren unter Einfluss von Barbadin oder GRK2 Inhibitor. Ergebnisse von ACKR3-Wildtyp- und *Ackr3*^{-/-}-Mäusen (A) sowie CXCR4-Wildtyp- und *Cxcr4*^{-/-}-Mäusen (B) nach Behandlung mit β -Arrestin-Inhibitor Barbadin (100 μ M) und GRK2-Inhibitor (100 μ M) im Vergleich zu jeweiliger unbehandelter Kontrollgruppe. Rechts: repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der thrombusbedeckten Fläche (grün). Mittelwert \pm S.E.M.; Student's t test, 95% Konfidenzintervall; Barbadin *Ackr3*^{fl/fl} vs. *Ackr3*^{-/-} $p < 0,001$, alle weiteren Vergleichsgruppen $p > 0,05$, Ergebnisse von 5 unabhängigen Experimenten; Für CXCR4-Wildtyp- und *Cxcr4*^{-/-}-Mäuse, Ergebnisse von 6 unabhängigen Experimenten.

3.7.3 Bedeutung der pS350/pT352 ACKR3-ST/A Punktmutation in der Thrombusbildung

Um den Einfluss von Barbadin und dem GRK2-Inhibitor auf die Thrombusbildung im Zusammenhang mit ACKR3 weiter zu untersuchen, wurden zusätzliche Experimente mit einer speziellen Mauslinie, den ACKR3-ST/A Mäusen (pS350/pT352 ACKR3-ST/A Punktmutation), durchgeführt. Diese Mauslinie, die uns von Prof. Ralf Stumm (Institut für Pharmakologie und

Toxikologie, Universität Jena) zur Verfügung gestellt wurde, ist ein *in vivo* Modell für einen Phosphorylation-defizienten ACKR3-Rezeptor mit stark beeinträchtigter „scavenger“-Funktion und fehlender Interaktion mit β -Arrestin (Saaber *et al.* 2019). Die ACKR3-ST/A Mäuse wurden gezüchtet, um den Effekt von Phosphorylationsdefiziten auf die Funktion von ACKR3 genauer zu untersuchen, in diesem Fall insbesondere im Hinblick auf seine Rolle in der Thrombusbildung.

Zusätzlich wurden C57BL/6 Mäuse als Wildtyp-Kontrolle herangezogen, um sicherzustellen, dass die Wildtypen der neuen ST/A Mauslinie vergleichbare Ergebnisse liefern. Diese Kontrollen sind entscheidend, um Unterschiede, die durch genetische Modifikationen verursacht werden, zuverlässig zu identifizieren und zu bewerten. Durch den Vergleich der Wildtyp- und Knockout-Mäuse konnte der Einfluss von ACKR3 auf die thrombusbedeckte Fläche sowie die Effekte der Inhibitoren Barbadin und GRK2 in diesem speziellen Kontext untersucht werden.

Die Ergebnisse der Experimente mit Blutproben von C57BL/6 Mäusen, die als zusätzliche Wildtyp-Kontrolle dienten, zeigen klare Effekte der Inhibitoren Barbadin und GRK2 auf die Thrombusbildung bei einer Konzentration von jeweils 100 μ M. Wie bereits in den vorherigen Versuchen mit humanem Blut, führte die Behandlung mit Barbadin zu einer signifikant ($p < 0,05$) vergrößerten thrombusbedeckten Fläche im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Im Gegensatz dazu verringerte die Behandlung mit dem GRK2-Inhibitor die thrombusbedeckte Fläche signifikant ($p < 0,01$).

Die Ergebnisse mit Blut der Wildtyp-Mäuse der ST/A Linie bestätigen diese Befunde: Auch hier führte Barbadin (100 μ M) zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Vergrößerung der thrombusbedeckten Fläche, während der GRK2-Inhibitor (100 μ M) eine deutliche Reduktion bewirkte. Dies zeigt, dass die generellen Mechanismen der Thrombusbildung in dieser speziellen genetischen Linie ähnlich wie bei den C57BL/6 Wildtyp-Mäusen ablaufen.

Besonders auffällig war jedoch das Ergebnis bei Blutproben der phosphorylationsdefizienten ST/A Mäuse. Hier zeigte die Behandlung mit 100 μ M Barbadin einen noch stärker ausgeprägten Effekt, wobei die thrombusbedeckte Fläche im Vergleich zur Kontrolle noch weiter vergrößert wurde ($p < 0,01$). Im Gegensatz dazu blieb der Effekt des GRK2-Inhibitors (100 μ M), der bei den Wildtyp-Tieren zur Reduktion der Thrombusfläche führte, in den phosphorylationsdefizienten Mäusen weitgehend aus.

Die in diesen Experimenten erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 32 und 33 detailliert dargestellt, die sowohl die quantitativen Daten zur thrombusbedeckten Fläche als auch repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Thromben zeigt.

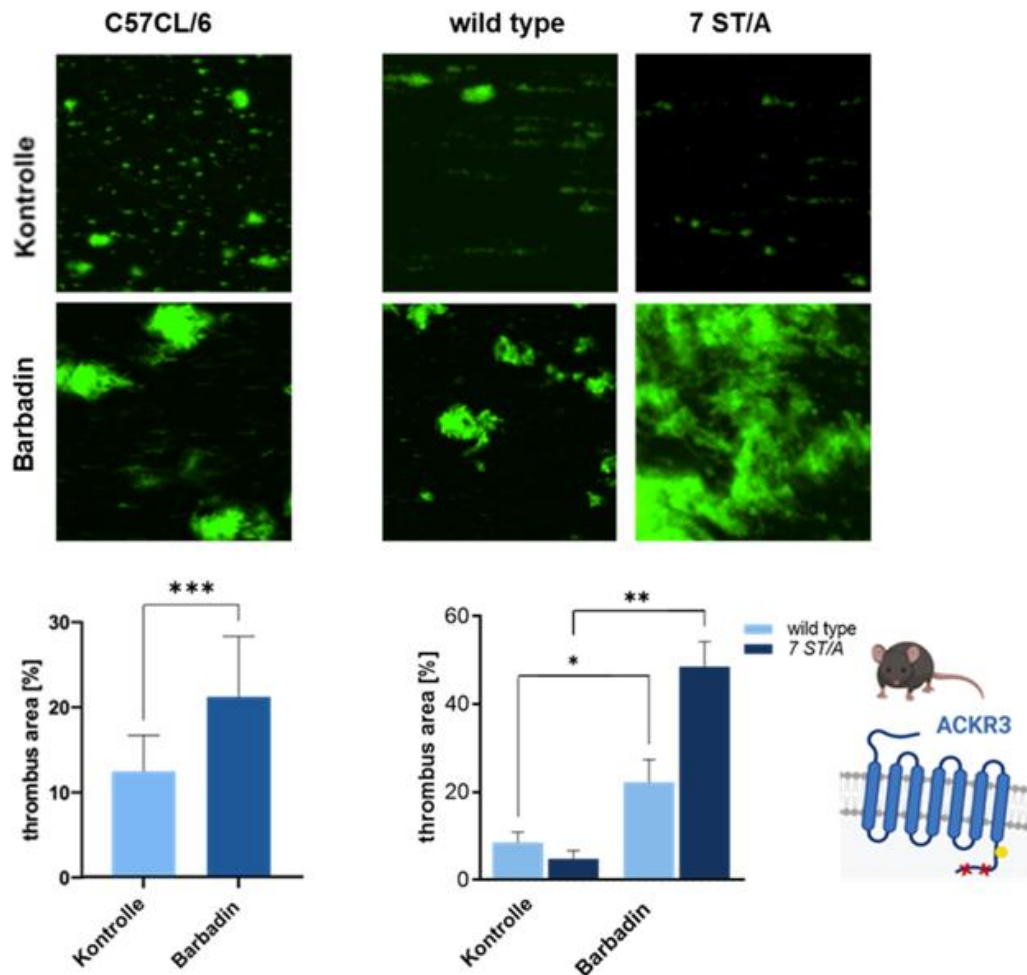


Abbildung 32: Ergebnisse der Experimente mit murinem Vollblut und Behandlung mit Barbadin sowie repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Thrombusbildung: Oben: Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Thrombusbildung (grün) unter den jeweiligen Bedingungen. Unten: Vergleich der thrombusbedeckten Fläche unter Einfluss von Barbadin (100 µM) mit murinem Blut von C57BL/6 Wildtyp-Tieren, Wildtyp-Mäusen der ACKR3-ST/A-Linie und phosphorylationsdefizienten ACKR3-ST/A-Mäusen. Mittelwerte ± S.E.M; Student's t-Test (95%-Konfidenzintervall). C57BL/6 Wildtyp Kontrolle vs. Barbadin: $p < 0,01$ (n=8); ACKR3-ST/A-Mäuse Kontrolle vs. Barbadin $p < 0,05$; Phosphorylationsdefiziente ACKR3-ST/A-Mäuse Kontrolle vs. Barbadin $p < 0,01$ (n=3). Unten rechts: Veranschaulichung der phosphorylationsdefizienten ACKR3-Rezeptoren von ST/A-Mäusen.

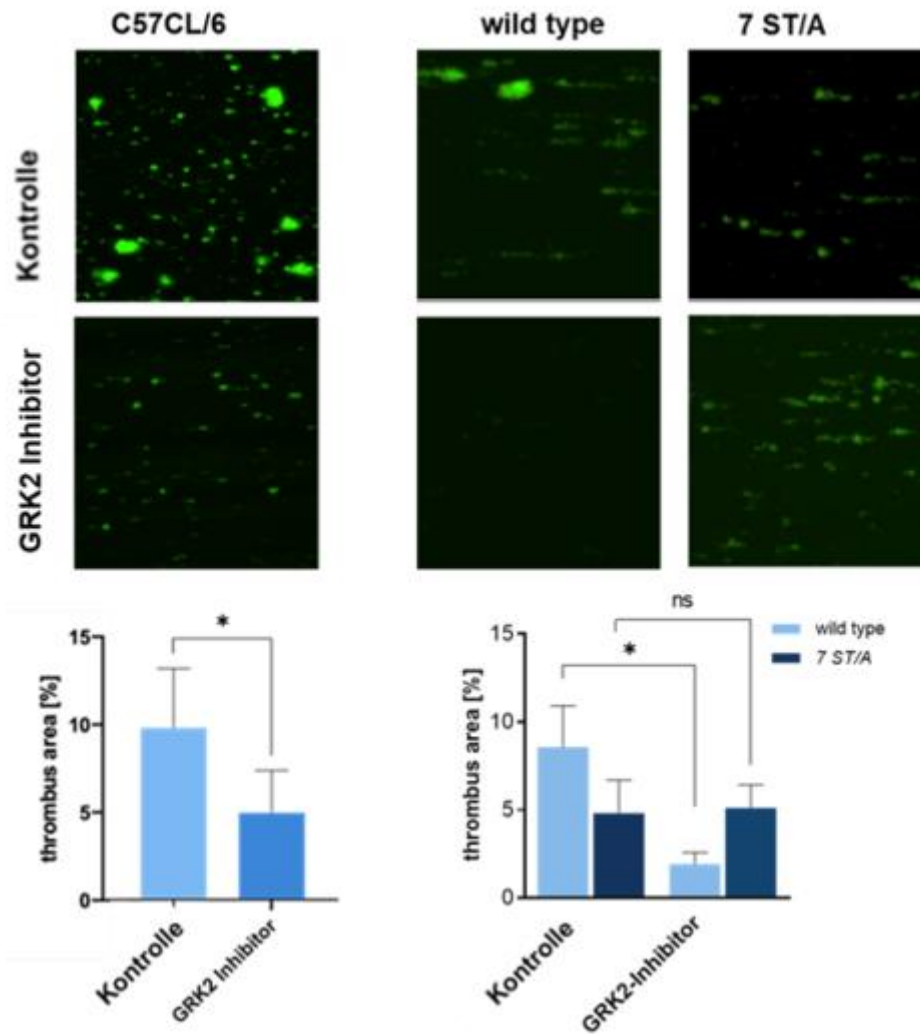


Abbildung 33: Ergebnisse der Experimente mit murinem Vollblut und dem GRK2 Inhibitor sowie repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Thrombusbildung: Oben: Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Thrombusbildung (grün) unter den jeweiligen Bedingungen. Unten: Vergleich der thrombusbedeckten Fläche unter Einfluss des GRK2-Inhibitors (100 μ M) mit murinem Blut von C57BL/6 Wildtyp-Tieren, Wildtyp-Mäusen der ACKR3-ST/A-Linie und phosphorylationsdefiziente ACKR3-ST/A-Mäuse. Mittelwerte \pm S.E.M; Student's t-Test (95%-Konfidenzintervall). C57BL/6 Wildtyp Kontrolle vs. Barbadin: $p < 0,05$ ($n=8$); ACKR3-ST/A-Mäuse Kontrolle vs. Barbadin $p < 0,05$; Phosphorylationsdefiziente ACKR3-ST/A-Mäuse Kontrolle vs. Barbadin $p > 0,05$ ($n=3$).

4 Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen unterstreichen die multifunktionale Bedeutung des atypischen Chemokinrezeptors ACKR3 in der Regulation der Thrombozytenfunktion und dessen Potenzial als therapeutisches Ziel zur Behandlung thrombotischer Erkrankungen. Erstens zeigt der thrombozytenspezifische ACKR3-Knockout bei murinen Thrombozyten eine signifikant erhöhte Thrombusbildung und verstärkte Aktivierbarkeit, was auf eine inhibitorische Funktion von ACKR3 bei der Regulation der Thrombozytenaggregation hinweist (vgl. Rohlfing *et al.* 2022). Zweitens führen natürliche und synthetische Agonisten von ACKR3, wie VUF11207, zu einer Reduktion der Aktivierbarkeit und Apoptoserate von Thrombozyten, was einen neuen Weg für gezielte pharmakologische Eingriffe eröffnen könnte. Drittens deuten funktionelle Wechselwirkungen zwischen ACKR3 und CXCR4 auf spezifische Mechanismen der Rezeptor-Signalübertragung hin, die ACKR3 als Modulationsziel für die Thrombozytenaktivität bestätigen.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die gezielte Manipulation des ACKR3-Signalwegs neue therapeutische Perspektiven für die Prävention thrombotischer Erkrankungen bieten könnte. Im Folgenden werden die zugrunde liegenden Mechanismen und potenziellen Implikationen dieser Erkenntnisse im Detail erläutert.

4.1 Einfluss einer genetischen ACKR3-Defizienz auf die Funktion muriner Thrombozyten

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass der atypische Chemokinrezeptor ACKR3 eine zentrale Rolle in der Regulation der Thrombozytenfunktion spielt. Insbesondere konnte durch *ex vivo*-Perfusionsversuche demonstriert werden, dass die thrombusbedeckte Fläche bei Verwendung von Blut aus Mäusen mit megakaryozyten-/thrombozytenspezifischer Deletion von ACKR3 signifikant größer war als bei Wildtyp-Tieren. Dieses Ergebnis legt nahe, dass ACKR3 eine hemmende Funktion bei der Thrombusbildung ausübt. Der Befund ist bemerkenswert, da er darauf hindeutet, dass ACKR3 nicht nur als „scavenger“ für Chemokine wie CXCL12 fungiert, sondern darüber hinaus direkt in die Regulation thrombozytärer Aktivitätsprozesse eingebunden sein könnte (Rohlfing *et al.* 2022). Bereits frühere Studien betonten die Komplexität der chemokinvermittelten Regulation der Thrombusbildung über verschiedene Signalkaskaden (Noels *et al.* 2019), und der hier beobachtete Effekt könnte durch eine veränderte Signaltransduktion infolge des fehlenden ACKR3 erklärt werden. Eine fehlende

Regulation über ACKR3 könnte demnach zu einer verstärkten Thrombozytenaggregation und folglich zu einer gesteigerten Thrombusbildung führen.

Diese Annahme wird durch die vorliegenden Ergebnisse zur Thrombozytenaktivierbarkeit weiter gestützt. In durchflusszytometrischen Analysen zeigte sich, dass ACKR3-defiziente Thrombozyten nach Stimulation mit CRP eine signifikant höhere P-Selektin-Expression aufwiesen. Da P-Selektin als Marker für die Aktivierung der α -Granula gilt und eine entscheidende Rolle bei Adhäsion und Aggregation spielt (Merten und Thiagarajan 2000), sprechen diese Daten für eine gesteigerte Aktivierbarkeit der Thrombozyten in Abwesenheit von ACKR3. Die Funktionalität der Thrombozyten wird maßgeblich durch die Verfügbarkeit und Modulation membranständiger Rezeptoren beeinflusst. Dabei sind chemokinerge Signalwege zentrale Regulatoren (Gear und Camerini 2003; Gawaz *et al.* 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daher darauf hin, dass ACKR3 eine inhibitorische Rolle bei der Thrombozytenaktivierung spielt, möglicherweise durch Modulation chemokinvermittelter Signaltransduktion. Frühere Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe unterstützen die hier gewonnenen Beobachtungen und erweitern das Verständnis der molekularen Mechanismen: So konnte Chatterjee *et al.* (2014) zeigen, dass der atypische Chemokinrezeptor ACKR3 über den Liganden MIF anti-apoptotische Effekte auf Thrombozyten vermittelt, indem er über einen ACKR3-abhängigen Akt-Signalweg wirkt. Die dort gezeigte Limitierung der aktivierungsinduzierten Apoptose durch ACKR3 betont eine Schutzfunktion des Rezeptors im Kontext der Thrombozytenregulation, die mit den hier beobachteten pro-apoptotischen Effekten bei ACKR3-Defizienz korrespondiert.

Darüber hinaus konnten Alampour-Rajabi *et al.* (2015) zeigen, dass MIF spezifisch mit ACKR3 interagiert und dadurch intrazelluläre Signalkaskaden wie ERK1/2 und ZAP-70 aktiviert. Diese Studie betont nicht nur die Relevanz der Ligandenbindung für die Funktion von ACKR3, sondern auch die Fähigkeit des Rezeptors, alternative, G-Protein-unabhängige Signalwege zu aktivieren. Diese Erkenntnisse stützen die Hypothese, dass ACKR3 weit mehr als ein passiver „Scavenger“ ist, sondern als aktiver Signalmodulator fungiert, eine Rolle, die sich in der Regulation der Thrombozytenaktivierung durch C10 und die hier gezeigten „knockout“-bedingten Veränderungen widerspiegelt.

Darüber hinaus konnte ein Einfluss der ACKR3-Defizienz auf die Apoptoseneigung von Thrombozyten gezeigt werden. Nach Stimulation mit CRP oder dem Bel-2-Inhibitor ABT737 wiesen ACKR3-defiziente Thrombozyten eine verstärkte Annexin-V-Bindung auf, ein klassischer Marker für Phosphatidylserin-Exposition und somit Apoptose (Vermes *et al.* 1995).

Diese Ergebnisse korrespondieren mit früheren Studien, die gezeigt haben, dass Chemokinrezeptoren über ihre Signalwege in die Regulation des Zellüberlebens involviert sind (Rath *et al.* 2018). Auch hier stützen sich die Befunde auf die Arbeit von Chatterjee *et al.* (2014), in der ACKR3 über die Aktivierung von Akt als Überlebenssignal fungiert. Der Verlust dieses Mechanismus könnte die beobachtete Apoptoseneigung erklären.

Insgesamt lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen ableiten, dass der atypische Chemokinrezeptor ACKR3 eine zentrale regulatorische Rolle in der Thrombozytenfunktion einnimmt. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass ACKR3 nicht nur als „scavenger“ für Liganden wie CXCL12 fungiert, sondern aktiv in die Modulation thrombozytärer Signalwege eingebunden ist. Die gezielte Deletion von ACKR3 in der megakaryozytären Zelllinie *führte in vivo* zu einer signifikant verstärkten Thrombusbildung, erhöhten Aktivierbarkeit und einer gesteigerten Apoptoseneigung. Zusammengenommen weisen diese Befunde auf einen funktionellen Verlust der inhibitorischen Kontrolle bei fehlender ACKR3-Signalisierung hin. Dieser Phänotyp ist als prothrombotisch und potenziell pathophysiologisch relevant zu bewerten.

Diese Ergebnisse erweitern das funktionelle Verständnis von ACKR3 als Bestandteil eines komplexen chemokinerg gesteuerten Modulationsnetzwerks innerhalb der Hämostase. Vor dem Hintergrund dieser Befunde stellt sich die Frage nach den konkreten molekularen Signalwegen, die durch ACKR3 beeinflusst werden. Neben β -Arrestin könnten insbesondere die MAPK- und PI3K/Akt-Kaskaden eine Rolle spielen, da sie sowohl in die Regulation von Thrombozytenaktivierung als auch in Überlebensmechanismen involviert sind (Chen *et al.* 2004). Auch eine Beteiligung der JAK2/STAT3-Signaltransduktion, insbesondere im Rahmen der kollagenabhängigen Thrombozytenaktivierung, erscheint plausibel (Lu *et al.* 2014). Ob und wie ACKR3 diese Signalachsen moduliert, könnte Gegenstand zukünftiger funktioneller Analysen sein.

Im weiteren Sinne liefern die Daten dieser Arbeit neue Hinweise auf das therapeutische Potenzial von ACKR3 als Zielstruktur. Eine selektive Modulation von ACKR3 könnte genutzt werden, um thrombotische Reaktionen in pathologischen Situationen wie zum Beispiel bei kardiovaskulären Erkrankungen oder chronischen Entzündungen zu kontrollieren, mit dem Potenzial, pathologische Thrombusbildung zu unterdrücken, ohne die primäre Hämostase notwendig zu beeinträchtigen. Diese Möglichkeit erscheint besonders attraktiv im Vergleich zu klassischen Antithrombotika, die häufig mit einem erhöhten Blutungsrisiko einhergehen.

4.2 Einfluss natürlicher ACKR3-Liganden und synthetischer Agonisten auf die Thrombozytenfunktion

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde der Einfluss natürlicher Liganden des ACKR3-Rezeptors sowie des synthetischen Agonisten VUF11207 auf die Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung untersucht. Die gewonnenen Daten bieten wertvolle Einblicke in die Rolle des atypischen Chemokinrezeptors ACKR3, im Kontext der Thrombozytenbiologie und thrombotischer Prozesse.

Die Ergebnisse zeigen, dass die natürlichen Liganden MIF, CXCL11 und CXCL12 unterschiedliche Effekte auf die Thrombusbildung haben. Insbesondere führte die Behandlung mit MIF und CXCL11 zu einer signifikanten Reduktion der thrombusbedeckten Fläche, während CXCL12 keine messbaren Effekte zeigte. Diese Unterschiede könnten auf die variierende Affinität und Signaltransduktion der einzelnen Liganden am ACKR3-Rezeptor zurückzuführen sein. Studien haben gezeigt, dass MIF eine wichtige Rolle in entzündlichen Prozessen und der Modulation von Immunantworten spielt, was möglicherweise auch die Thrombozytenfunktion beeinflusst (Alampour-Rajabi *et al.* 2015). CXCL11, ein stark chemoattraktives Zytokin, könnte über ähnliche Mechanismen wirken und dadurch die Thrombozytenaktivierung und -aggregation beeinflussen (Burns *et al.* 2006).

Der synthetische Agonist VUF11207 zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion der thrombusbedeckten Fläche. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass VUF11207 eine spezifische Aktivität am ACKR3-Rezeptor entfaltet, die möglicherweise in der Modulation von Signalwegen resultiert, die die Thrombozytenaggregation unterdrücken. Diese Befunde sind konsistent mit den Ergebnissen von Wijtmans *et al.* (2012), die zeigten, dass VUF11207 als spezifischer ACKR3-Agonist die Rezeptoraktivität moduliert und damit die Thrombozytenaktivität beeinflussen kann.

Die durchflusszytometrische Analyse der P-Selektin-Expression, einem Marker für die Thrombozytenaktivierung, ergab, dass nur die Behandlung mit VUF11207 eine signifikante Reduktion des P-Selektin-Signals zeigte. Diese Daten könnten darauf hindeuten, dass VUF11207 über eine spezifische Modulation des ACKR3-Signalwegs die α -Degranulation der Thrombozyten unterdrückt, während die natürlichen Liganden möglicherweise weniger effektive oder andere Signalwege nutzen. P-Selektin ist ein wichtiger Marker für Thrombozytenaktivierung und spielt eine zentrale Rolle in der Thrombozytenaggregation und der Interaktion mit Leukozyten während entzündlicher Prozesse (Geng *et al.* 2004).

CRP-XL (Collagen-related peptide), ein starkes Reagenz für die Aktivierung von Thrombozyten, simuliert die Wirkung von Kollagen und könnte dabei die Aktivierung verstärken, sodass die natürlichen Liganden von ACKR3 möglicherweise nicht ausreichend effektiv sind, um den Einfluss dieser Aktivierung zu hemmen (Pugh *et al.* 2010).

Die Tatsache, dass VUF11207 die P-Selektin-Expression signifikant reduziert, könnte auf eine mögliche therapeutische Relevanz synthetischer Agonisten in der Regulation von Thrombozytenaktivität und der Prävention von thrombotischen Ereignissen hinweisen. Diese Ergebnisse korrespondieren mit früheren Studien, die gezeigt haben, dass chemokinerge Systeme, insbesondere ACKR3, eine Schlüsselrolle in der Modulation von Zellfunktionen, einschließlich der Thrombozytenaktivierung, spielen (Duchene und Hundelshausen 2015; Rohlfing *et al.* 2022).

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern wertvolle Erkenntnisse über die Rolle von ACKR3 in der Regulation der Thrombozytenaktivierung und -aggregation, wobei der synthetische Agonist VUF11207 im Vergleich zu den natürlichen Liganden MIF und CXCL11 besonders effektiv die P-Selektin-Expression, einen Marker der Thrombozytenaktivierung, reduzieren konnte. Diese spezifische Hemmung durch VUF11207 im Vergleich zu den natürlichen Liganden legt nahe, dass synthetische Agonisten eine gezieltere und stärkere Modulation des ACKR3-Signalweges bieten könnten, wodurch die Thrombozytenaktivierung und -aggregation effizienter unterdrückt wird.

Die natürliche Aktivierung von ACKR3 durch MIF und CXCL11 beeinflusst die Thrombozyten zwar, scheint jedoch weniger stark in der Lage zu sein, thromboinflammatorische Prozesse zu hemmen. Die Ergebnisse deuten daher darauf hin, dass synthetische Agonisten wie VUF11207, durch ihre präzise und potente Rezeptoraktivierung, eine vielversprechende Grundlage für die Entwicklung therapeutischer Ansätze bieten. Diese könnten speziell darauf abzielen, thromboinflammatorische Erkrankungen zu behandeln, indem sie überschießende Thrombozytenaktivierung und -aggregation kontrollieren und so das Risiko kardiovaskulärer Komplikationen reduzieren. Die gezielte Modulation von ACKR3 könnte daher eine Schlüsselstrategie in zukünftigen Behandlungsansätzen für thromboinflammatorische Erkrankungen und damit verbundene kardiovaskuläre Risiken darstellen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass VUF11207 eine präzisere Modulation des ACKR3-Rezeptors als die natürlichen Liganden bewirken kann, was die Hemmung der P-Selektin-Expression betrifft. Für eine detailliertere Analyse wäre eine tiefere Untersuchung der β -Arrestin-abhängigen und -unabhängigen Signalwege empfehlenswert, da

diese Mechanismen maßgeblich zur Modulation der Rezeptoraktivität beitragen könnten (Rajagopal *et al.* 2009). Die Erforschung des Einflusses von VUF11207 auf den PI3K/Akt- und MAPK/ERK-Signalweg könnte zusätzlich aufschlussreich sein, da diese Signalwege für die Regulation des Zellüberlebens und der Thrombozytenfunktion entscheidend sind (Guidetti *et al.* 2015).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten eine solide Grundlage, um den therapeutischen Einsatz von ACKR3-spezifischen synthetischen Agonisten in der Pharmakologie weiter zu untersuchen und innovative Behandlungsmöglichkeiten für thromboinflammatorische Erkrankungen zu entwickeln.

4.3 Strukturbasierte Entwicklung und funktionelle Charakterisierung synthetischer ACKR3-Agonisten

Die vorangegangenen Abschnitte dieser Arbeit haben verdeutlicht, dass synthetische ACKR3-Agonisten vielversprechende Kandidaten für die Behandlung thrombotischer Erkrankungen darstellen. Insbesondere die Fähigkeit dieser Agonisten, die Aktivierung und Funktion von Thrombozyten zu modulieren, hebt ihr therapeutisches Potenzial hervor. Dies legt den Grundstein für die folgenden Untersuchungen, in denen eine detaillierte Analyse der Wirkung von 47 kommerziell erhältlichen potenziellen Agonisten auf die Rekrutierung von β -Arrestin durch ACKR3 und die nachfolgende Aktivierung der Thrombozyten durchgeführt wurde.

Zu Beginn des Projekts wurde unter der Leitung von Prof. Antti Poso ein strukturelles Homologiemodell von ACKR3 erstellt, um ein strukturbasiertes *in silico screening* durchführen zu können. Da zu diesem Zeitpunkt kein Röntgenkristallografiemodell des Rezeptors verfügbar war, diente dieses Modell als Grundlage für das molekulare Docking. Mithilfe dieses Dockings wurden bestehende Verbindungen aus der MolProt Library gescreent und in verschiedene strukturbasierte Gruppen eingeteilt. Diese Methode ermöglichte die Identifizierung, Validierung und Optimierung neuer spezifischer ACKR3-Agonisten, die im späteren Verlauf der Arbeit weiter untersucht wurden.

Die Auswahl und Validierung potenzieller Agonisten erfolgte vor dem Hintergrund, dass der Chemokinrezeptor ACKR3 eine zentrale Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen spielt, wie bereits durch mehrere Studien belegt wurde (Rath *et al.* 2018; Cebo *et al.* 2022; Rohlfing *et al.* 2022).

Um die Aktivierung des ACKR3-Rezeptors zu bewerten, wurde der PathHunter® eXpress CXCR7 CHO-K1 β -Arrestin GPCR Assay verwendet, ein etablierter Ansatz zur Quantifizierung der β -Arrestin-Rekrutierung als Indikator für die Rezeptoraktivierung. β -Arrestin spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) wie ACKR3, indem es sowohl die Desensibilisierung des Rezeptors als auch alternative Signalwege, wie die MAP-Kinase-Signaltransduktion, vermittelt (Luttrell und Lefkowitz 2002; DeWire *et al.* 2007). Dieser Mechanismus ist besonders relevant für die Modulation von Thrombozytenfunktionen, die eine Schlüsselrolle in der Pathogenese thrombotischer Erkrankungen spielen. Eine effiziente Aktivierung des ACKR3-Rezeptors durch synthetische Agonisten könnte daher zur Entwicklung neuer Strategien zur Prävention oder Behandlung dieser Erkrankungen beitragen.

Die Ergebnisse des PathHunter-Assays zeigten, dass insbesondere die Verbindungen C10 und C11 eine starke Rekrutierung von β -Arrestin und damit eine signifikante Aktivierung des ACKR3-Rezeptors bewirkten. Diese Verbindungen wiesen darüber hinaus auch in der Durchflusszytometrie, die zur Messung der P-Selektin-Expression als Indikator für die Thrombozytenaktivierung eingesetzt wurde, überzeugende Ergebnisse auf. Die Entscheidung, C10 und C11 für weitere Untersuchungen auszuwählen, basierte auf der Kombination dieser beiden methodischen Ansätze, die eine umfassende Bewertung der Effizienz und Potenz der Verbindungen ermöglichte.

In den Versuchen wurde die Wirkung dieser Verbindungen auf die Thrombozytenaktivierung, die *ex vivo* Thrombusbildung sowie auf die Thrombozytenaggregation und Calciummobilisierung untersucht. Die Resultate bestätigten die anfänglichen Befunde und zeigten, dass C10 und C11 auch unter unterschiedlichen Bedingungen eine signifikante Wirkung entfalten. Besonders hervorzuheben ist die Beobachtung, dass die strukturellen Modifikationen an C10 zu einer weiteren Steigerung der Wirksamkeit führten, was die Bedeutung der kontinuierlichen Optimierung dieser Verbindungen unterstreicht. Der Toxizitätsassay, der parallel durchgeführt wurde, ergab zudem, dass die optimierten Verbindungen keine signifikant höheren zelltoxischen Effekte im Vergleich zu VUF11207 aufwiesen und in hohen Konzentrationen gar geringere toxische Effekte zeigten, was ihre Eignung als potenzielle Therapeutika weiter unterstützt.

Zusammenfassend bestätigen die vorliegenden Ergebnisse das Potenzial synthetischer ACKR3-Agonisten für die Modulation der Thrombozytenfunktion und legen eine solide Grundlage für folgende Forschungsarbeiten, die sich auf die Entwicklung neuer Therapien für thrombotische

Erkrankungen konzentrieren. Zudem könnten zukünftige Arbeiten sich auf eine tiefergehende Analyse der molekularen Mechanismen konzentrieren, über die β -Arrestin und GRK2 in die Modulation von ACKR3 involviert sind. Der Einfluss der β -Arrestin-abhängigen Signaltransduktion auf die MAP-Kinase-Wege und die Akt-Signalübertragung wäre besonders relevant, um die Bedeutung dieser Modulatoren in der Thrombozytenfunktion weiter zu erforschen.

4.4 Bestimmung des Einfluss des CXCR4-Rezeptors und CXCL12 auf die ACKR3-Agonist-Interaktion

Die hier präsentierten Ergebnisse beleuchten die komplexen Wechselwirkungen zwischen den Chemokinrezeptoren ACKR3 und CXCR4, insbesondere im Hinblick auf deren Einfluss auf die Thrombozytenfunktion. Vorangegangene Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass synthetische ACKR3-Agonisten wie C10 eine signifikante Rolle in der Modulation von Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung spielen. Diese Erkenntnisse werfen die Frage auf, ob die beobachteten Effekte von ACKR3-Agonisten unabhängig von der Funktion des CXCR4-Rezeptors und seines Liganden CXCL12 auftreten.

Vorab ist auch zu berücksichtigen, dass die Effekte agonisten- und spezieabhängig sein können: Die hier untersuchte Verbindung C10 unterscheidet sich chemisch und vermutlich im Signaling-Bias von VUF11207 und anderen Agonisten, und die Datensätze umfassen murine wie humane Thrombozyten, was beobachtete Unterschiede einschließlich der CXCR4-Interaktion erklären kann.

Die Untersuchung der P-Selektin-Expression in menschlichen Thrombozyten zeigte, dass der ACKR3-Agonist C10 eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaktivierung bewirkt, unabhängig von der Präsenz oder Blockade des CXCR4-Rezeptors und seines Liganden CXCL12. Dies legt nahe, dass die Aktivierung von ACKR3 durch C10 weitgehend unabhängig von CXCR4 erfolgt. Obwohl die Dimerisierung von CXCR4 und ACKR3 auch in anderen Zelltypen eine Rolle bei der Modulation von Signalwegen spielen kann (Levoye *et al.* 2009), deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass bei den hier gezeigten Effekten von ACKR3 in Thrombozyten andere, weitgehend CXCR4-unabhängige Mechanismen der Signaltransduktion dominieren.

Auch die Experimente mit thrombozytenspezifischem CXCR4- und ACKR3-Knockout im murinen Modell zeigten deutlich, dass die Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung

signifikant reduziert wurde, wenn ACKR3 in Blut von Wildtyp-Mäusen aktiviert wurde, während diese Effekte in den Versuchen mit Blut der *Ackr3*^{-/-} bzw. -Tieren ausblieben. Dies bestätigt, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf die Aktivierung von ACKR3 zurückzuführen sind und nicht durch eine indirekte Modulation über den CXCR4-Rezeptor vermittelt werden.

Die *ex vivo* Thrombusformation unter Flussbedingungen zeigte eine signifikante Reduktion der thrombusbedeckten Fläche bei Verwendung von Blut der Wildtyp-Mäuse, die mit dem Agonisten C10 behandelt wurden, wohingegen dieser Effekt bei Blut von *Ackr3*^{-/-}-Tieren nicht beobachtet wurde. Interessanterweise blieb der Effekt bei Blut von *Cxcr4*^{-/-}-Tieren bestehen, was weiter darauf hindeutet, dass ein Zusammenspiel mit CXCR4 in diesem Kontext keine wesentliche Rolle spielt.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der durchflusszytometrischen Messung der P-Selektin-Expression festgehalten. Die Aktivierbarkeit der Thrombozyten war in Proben von ACKR3-Wildtyp-Mäusen nach Behandlung mit C10 signifikant reduziert, und zwar unabhängig von der Expression von CXCR4. Dies unterstreicht erneut die Rezeptorspezifität des identifizierten Agonisten für ACKR3, unabhängig von der Anwesenheit des Rezeptors CXCR4.

Diese Befunde stehen allerdings in einem gewissen Widerspruch zu kürzlich publizierten Daten aus unserer Arbeitsgruppe. Dicenta-Baunach *et al.* (2025) konnten in humanen Thrombozyten zeigen, dass die Aktivierung von ACKR3 durch spezifische Agonisten wie VUF11207 oder C23 zur Ausbildung von Heterodimeren mit CXCR4 führt. Diese Heterodimerisierung wurde mithilfe eines Proximity Ligation Assays (PLA) nachgewiesen und ging mit einer funktionellen Hemmung der CXCL12-vermittelten CXCR4-Aktivierung einher. Es zeigten sich reduzierte Signale in der Calciummobilisierung, Akt- und cAMP-Signalübertragung sowie eine verminderte Thrombozytenaggregation. In dieser Studie fungierte ACKR3 also nicht primär als eigenständiger Signalgeber, sondern vielmehr als Modulator der CXCR4-Aktivität über direkte Rezeptorinteraktion.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die Unterschiede zwischen beiden Studien liegt in der molekularen Diversität der verwendeten Agonisten: Während Dicenta-Baunach *et al.* primär VUF11207 und C23 einsetzten, basiert unsere Arbeit auf der funktionellen Charakterisierung der neu identifizierten Verbindung C10. Diese strukturellen Unterschiede könnten eine abweichende Rezeptorbindung, Signaltransduktion oder auch Rezeptorinteraktionen begünstigen. Zudem sind Unterschiede im zellulären Kontext zu berücksichtigen. Während

Dicenta-Baunach *et al.* auf humane Thrombozyten zurückgriffen, wurden unsere Versuche auch mit murinen Zellen durchgeführt, die möglicherweise ein abweichendes Expressionsmuster oder eine unterschiedliche Dimerisierungsneigung der Rezeptoren aufweisen. Wichtig ist hierbei zu betonen, dass diese Untersuchungen nicht darauf abzielen, die CXCR4/ACKR3-Dimerisierung grundsätzlich infrage zu stellen. Vielmehr lag der Fokus darauf, nachzuweisen, dass die beobachteten anti-thrombotischen Effekte des neuartigen Agonisten C10 unabhängig von CXCR4 vermittelt werden. Diese Daten legen somit nahe, dass C10 selektiv und funktionell an ACKR3 bindet und seine Wirkung ausschließlich über diesen Rezeptor entfaltet, ohne eine funktionelle Beteiligung von CXCR4 zu erfordern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass ACKR3 eventuell über die Aktivierung des PI3K/Akt- und des MAPK/ERK-Signalweges das Zellüberleben und die Thrombozytenfunktion modulieren könnte, was entscheidende Implikationen für die Hämostase und thrombozytenvermittelte Immunantworten hat. Die Funktionalität der Thrombozyten kann durch die Aktivierung von Calcium-Signalisierungswegen und die β -Arrestin-abhängige Signalübertragung gesteigert werden, was zu einer feineren Kontrolle der Thrombozytenaggregation und -adhäsion beiträgt. Diese signalübergreifende Interaktion könnte auch zukünftig für die Optimierung pharmakologischer Strategien von Interesse sein, da ACKR3-Agonisten wie die hier entwickelten möglicherweise gezielt die intrazellulären Wege ansprechen können, die das Zellüberleben und die Hämostase fördern, ohne die Funktion von CXCR4 zu beeinträchtigen. Die Erforschung dieser signalvermittelnden Eigenschaften des ACKR3 und seiner Unabhängigkeit von CXCR4 könnte zukünftig dazu beitragen, präzise therapeutische Ansätze für die Thromboseprävention und Immunmodulation zu entwickeln. Zukünftige Forschungen könnten sich gezielt auf die Untersuchung der spezifischen Signalmechanismen von ACKR3 und CXCR4 in Thrombozyten konzentrieren, einschließlich detaillierter Untersuchungen zur Rolle des PI3K/Akt- und MAPK/ERK-Signalweges sowie zur Regulation von Calciumflüssen und β -Arrestin-vermittelten Signalen. Diese Erkenntnisse könnten wesentlich dazu beitragen, die Feinregulation der Thrombozytenfunktion besser zu verstehen und selektivere therapeutische Ansätze zu ermöglichen, die sowohl das Zellüberleben fördern als auch das Risiko für unerwünschte thrombotische Ereignisse minimieren.

4.5 Molekulare Mechanismen der ACKR3-abhängigen Signalübertragung

Die vorliegenden Ergebnisse bieten Einblicke in die komplexen molekularen Mechanismen, die an der Regulation der Thrombozytenfunktion durch den atypischen Chemokinrezeptor ACKR3 beteiligt sind. Diese Erkenntnisse ergänzen und erweitern die bisherigen Beobachtungen, die in den vorherigen Kapiteln dargestellt wurden, und liefern neue Ansatzpunkte für das Verständnis der spezifischen Rolle von ACKR3 in der Thrombozytenmodulation.

Die Experimente zur Signalübertragung von ACKR3 unterstreichen die Bedeutung von β -Arrestin und GRK2 in der Modulation von Thrombozytenfunktionen. Wie die Ergebnisse zeigen, führt die Inhibition von β -Arrestin durch Barbadin zu einer signifikanten Zunahme der thrombusbedeckten Fläche sowohl in humanen als auch in murinen Blutproben. Dies deutet darauf hin, dass β -Arrestin eine zentrale Rolle in der negativen Regulation der Thrombozytenaktivierung durch ACKR3 spielt. Barbadin blockiert die β -Arrestin-vermittelte Internalisierung von Rezeptoren, was darauf hindeutet, dass die Signalwege von ACKR3, die unabhängig von der klassischen G-Protein-gekoppelten Signalübertragung funktionieren, eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Thrombozytenreaktion einnehmen (Pitcher *et al.* 1998; Beaufraisat *et al.* 2017).

Die Hemmung von GRK2 zeigte hingegen einen gegenteiligen Effekt, indem sie die thrombusbedeckte Fläche signifikant reduzierte. Dies unterstützt die Hypothese, dass GRK2 durch die Phosphorylierung von ACKR3 dessen Signalaktivität reguliert und somit die Thrombozytenfunktion moduliert. Die GRK2-abhängige Phosphorylierung könnte zur Rekrutierung von β -Arrestin führen, welches die Internalisierung und anschließende Desensibilisierung von ACKR3 vermittelt (Ribas *et al.* 2007). Diese Mechanismen zeigen deutlich, dass die Signaltransduktion von ACKR3 stark von der Balance zwischen GRK2-vermittelter Phosphorylierung und β -Arrestin-vermittelter Regulation abhängt.

Obwohl eine GRK2-abhängige Phosphorylierung klassischerweise die β -Arrestin-Rekrutierung an GPCRs fördert (Luttrell & Lefkowitz 2002; Ribas *et al.* 2007), spricht die hier beobachtete Abnahme der Thrombusbildung unter GRK2-Inhibition dafür, dass GRK2 in Thrombozyten zusätzlich ACKR3-externe prothrombotische Signalachsen unterstützt. Hierzu könnten, in Analogie zu den beschriebenen kardiovaskulären Kontexten, auch GRK2-abhängige Modulationen anderer GPCR-Signale und Wege downstream von Kollagen und Thrombin beitragen (Penela *et al.* 2006; Cannavo *et al.* 2013). Damit lässt sich die scheinbar gegenläufige

Richtung zu Barbadin mechanistisch versöhnen: Barbadin hebt eine ACKR3-abhängige, β -Arrestin-vermittelte Bremse auf und verstärkt die Thrombusbildung, während die GRK2-Hemmung übergreifend prothrombotische Signale schwächt. Insgesamt legt dies eine duale Rolle nahe, in der β -Arrestin über ACKR3 antithrombotisch wirkt, GRK2 jedoch nettoprothrombotische Funktionen in der Thrombozytensignalgebung unterstützt.

Die Experimente mit humanem und murinem Vollblut bestätigen die zentralen Rollen von β -Arrestin und GRK2 in der Regulation der Thrombusbildung. Die Ergebnisse der Versuche mit Blut von Tieren mit einer thrombozytenspezifischen Rezeptor-Deletion liefern weitere Evidenz für die spezifische Funktion von ACKR3 in der Thrombozytenmodulation. Während bei Blutproben der ACKR3-Wildtyp-Mäuse die Inhibition von β -Arrestin zu einer signifikanten Verstärkung der Thrombusbildung führte, war dieser Effekt beim Blut der *Ackr3*^{-/-}-Mäuse deutlich abgeschwächt. Dies deutet darauf hin, dass die β -Arrestin-abhängige Regulation der Thrombozytenaktivität maßgeblich über ACKR3 vermittelt wird. Im Gegensatz dazu zeigte die GRK2-Hemmung keinen signifikanten Unterschied zwischen den Wildtyp- und Knockout-Mäusen, was darauf hindeutet, dass GRK2 möglicherweise eine allgemeinere Rolle in der Thrombozytenregulation spielt, die nicht ausschließlich an ACKR3 gebunden ist.

Die Versuche mit Blut von CXCR4-Wildtyp- und *Cxcr4*^{-/-}-Mäusen zeigen hingegen keine signifikanten Unterschiede in der Thrombusbildung, was darauf hindeutet, dass die beobachteten Effekte spezifisch für ACKR3 und nicht für CXCR4 sind. Dies ist ein wichtiger Befund, da er die Hypothese unterstützt, dass ACKR3 unabhängig von CXCR4 in der Regulation der Thrombozytenfunktionen wirkt.

Die Untersuchung der phosphorylationsdefizienten ST/A Mäuse liefert weitere wichtige Hinweise auf die Rolle der Phosphorylierung und β -Arrestin-Interaktion in der Funktion von ACKR3. Die verstärkte Thrombusbildung nach Behandlung der Blutproben von ST/A Mäusen mit Barbadin zeigt, dass die Phosphorylierung von ACKR3 entscheidend für seine Fähigkeit ist, die Thrombozytenfunktion zu regulieren. Der weitgehende Verlust des Effekts des GRK2-Inhibitors in Blutproben von diesen Mäusen deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung von ACKR3 durch GRK2 eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Thrombozytenaktivität spielt, wahrscheinlich durch die Beeinflussung der β -Arrestin-abhängigen Signalwege.

Die vorliegenden Ergebnisse tragen wesentlich zum Verständnis der molekularen Mechanismen der ACKR3-abhängigen Signalübertragung in Thrombozyten bei. Sie zeigen, dass ACKR3 durch die gezielte Regulation von β -Arrestin und GRK2 eine zentrale Rolle in der Steuerung der Thrombozytenaktivierung und -aggregation einnimmt. Insbesondere verdeutlicht die

Blockade von β -Arrestin durch Barbadin die Bedeutung dieses Proteins für die negative Regulation der Thrombozytenfunktion. Die verstärkte Thrombozytenaktivierung und erhöhte Thrombusbildung nach β -Arrestin-Inhibition legen nahe, dass β -Arrestin über ACKR3 eine wichtige hemmende Rolle in der Thrombozytenmodulation übernimmt.

Gleichzeitig weisen die Erkenntnisse zur GRK2-Hemmung auf eine differenzierte Funktion dieses Enzyms hin: Durch GRK2-vermittelte Phosphorylierung wird ACKR3 möglicherweise zur Interaktion mit β -Arrestin angeregt, was zur Internalisierung und Desensibilisierung von ACKR3 beiträgt. Die Blockade von GRK2 führte, anders als die β -Arrestin-Inhibition, zu einer Reduktion der Thrombusfläche, was darauf hindeutet, dass GRK2 in der Thrombozytenregulation allgemein und nicht ausschließlich über ACKR3 wirkt.

Ergänzend bestätigen die Versuche mit den phosphorylationsdefizienten ST/A-Mäusen, dass die Fähigkeit von ACKR3, Thrombozytenfunktionen zu regulieren, eng an seine Phosphorylierung gebunden ist. Die im Blut von ST/A-Mäusen beobachtete verstärkte Thrombusbildung nach Barbadin-Behandlung zeigt, dass die Phosphorylierung von ACKR3 für eine kontrollierte Modulation der Thrombozytenaktivität essenziell ist. Interessanterweise verlor der GRK2-Inhibitor in Proben der ST/A-Mäusen seine hemmende Wirkung, was auf eine direkte Rolle der Phosphorylierung in der β -Arrestin-Regulation hinweist.

Die vorliegenden Erkenntnisse zu β -Arrestin und GRK2 als zentrale Regulatoren der ACKR3-Funktion bieten wichtige Implikationen für zukünftige therapeutische Ansätze. Ein besseres Verständnis der Balance zwischen GRK2-abhängiger Phosphorylierung und β -Arrestin-vermittelter Regulation könnte zur gezielten Modulation der Thrombozytenaktivität genutzt werden, um thromboinflammatorische Erkrankungen zu behandeln. Zukünftige Studien könnten sich darauf konzentrieren, wie spezifische Signalwege, insbesondere ERK1/2 und Akt, durch ACKR3 gesteuert werden, um neue molekulare Ziele für eine präzise Beeinflussung der Thrombozytenfunktion zu identifizieren und therapeutisch zu nutzen.

Zusammengefasst liefern diese Ergebnisse eine differenzierte Sichtweise auf die Funktion von ACKR3 und zeigen, dass seine Modulation über β -Arrestin und GRK2 das Potenzial hat, neue Wege zur Behandlung von thromboinflammatorischen Erkrankungen zu eröffnen. Durch die gezielte Beeinflussung von ACKR3 könnten so künftig Behandlungsmethoden entwickelt werden, die Thrombozytenaktivierung und -aggregation präzise steuern und somit das Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen verringern.

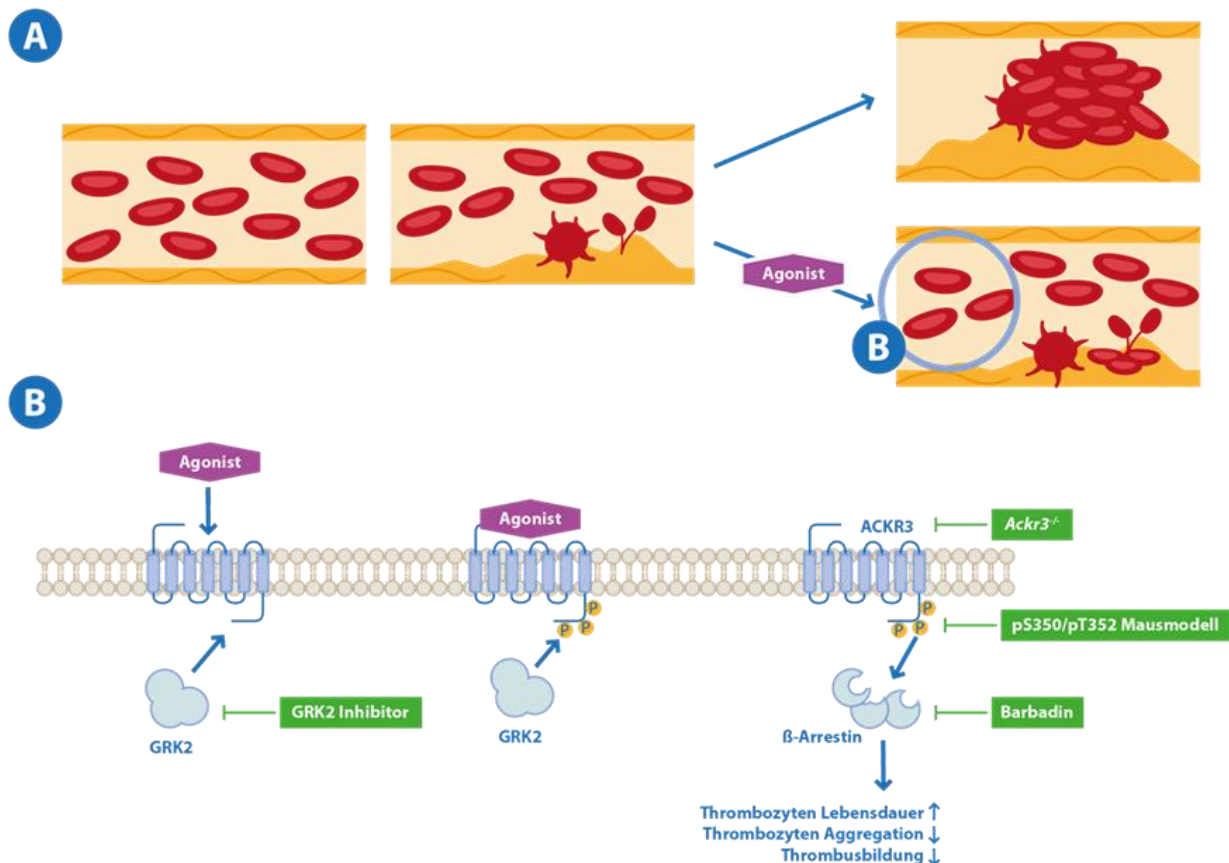


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Hypothese

A Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien der Thrombozytenaktivierung im Blutgefäß: Ruhende Thrombozyten zirkulieren frei im Blutstrom, zeigen eine glatte, scheibenförmige Morphologie. Bei Gefäßverletzung und Kontakt mit subendothelalem Kollagen kommt es zur partiellen Thrombozytenaktivierung mit Ausbildung erster Pseudopodien und Adhäsion an das Endothel. Ohne pharmakologische Intervention folgt eine vollständige Aktivierung mit massiver Aggregation und Ausbildung eines okklusiven Thrombus. Die alternative Reaktion unter Einfluss eines des hier identifizierten spezifischen ACKR3-Agonisten führt zu einer funktionellen Hemmung der übermäßigen Thrombozytenaktivierung: Es bildet sich ein protektiver, aber nicht okklusiver Thrombozytenfilm, ohne die Gefäßintegrität pathologisch zu beeinträchtigen.

B Hypothetischer molekularer Mechanismus der ACKR3-vermittelten Signaltransduktion in Thrombozyten: Bindet der Agonist an den atypischen Chemokinrezeptor ACKR3, wird die G-Proteingekoppelte Rezeptorkinase GRK2 rekrutiert und phosphoryliert den C-terminalen Rezeptorbereich. Dies führt zur β -Arrestin-Rekrutierung und Initiierung alternativer Signalwege, die eine Stabilisierung der Thrombozyten und Hemmung prothrombotischer Funktionen bewirken können. Die Signalkaskade wurde funktionell untersucht durch den Einsatz von (grün hinterlegt): genetisch veränderten Mausstämmen mit megakaryozyten-/thrombozytenspezifischer Deletion von *Ackr3* (*Ackr3*^{-/-}), phosphomutanten Mausmodellen (pS350/pT352), pharmakologischer GRK2-Inhibition sowie β -Arrestin-Blockade (Barbadin). Diese experimentellen Ansätze dienen der Validierung der postulierten β -Arrestin-vermittelten anti-thrombotischen Effekte von ACKR3.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit beleuchtet die multifunktionale Rolle des atypischen Chemokinrezeptors ACKR3 in der Regulation von Thrombozytenfunktionen und seiner potenziellen Bedeutung für die Behandlung thrombotischer Erkrankungen. Durch spezifische Experimente mit murinen und humanen Thrombozyten konnte gezeigt werden, dass der Knockout von ACKR3 signifikante Auswirkungen auf die Thrombusbildung, Thrombozytenaktivierung und Apoptose hat. Dies deutet darauf hin, dass ACKR3 eine hemmende Funktion in diesen Prozessen ausübt, was durch die signifikante Zunahme der thrombusbedeckten Fläche und der P-Selektin-Expression bei ACKR3-defizienten Thrombozyten belegt wird. Die vorliegenden Befunde erweitern das Verständnis über die Rolle von Chemokinrezeptoren in der Hämostase und Thrombose, insbesondere durch die Modulation der Signaltransduktion, die auf einer veränderten Balance zwischen pro- und anti-apoptischen Signalen basiert (Vermes *et al.* 1995; Rohlfing *et al.* 2022). Diese Ergebnisse deuten auf eine antithrombotische Funktion von ACKR3 hin, deren klinische Relevanz jedoch noch in weiterführenden präklinischen Modellen, einschließlich Blutungs- und Hämostase-Assays, überprüft werden muss.

Während natürliche ACKR3 Liganden unterschiedliche Auswirkungen auf die Thrombusbildung zeigten, erwies sich VUF11207 als besonders effektiv in der Reduktion der P-Selektin-Expression und der Thrombozytenaktivierung. Diese Ergebnisse unterstreichen das therapeutische Potenzial synthetischer Agonisten zur gezielten Modulation von ACKR3 und damit zur Kontrolle von Thrombozytenaktivität und Thrombose.

Ein weiterer zentraler Aspekt der Arbeit war das *in silico screening* und die Analyse von 47 potenziellen ACKR3-Agonisten, von denen die Verbindungen C10 und C11 vielversprechende Resultate in der Aktivierung von β -Arrestin und der Hemmung der Thrombozytenaktivierung zeigten. Diese Erkenntnisse legen den Grundstein für die Entwicklung neuer Therapeutika, die spezifisch auf die Modulation des ACKR3-Signalwegs abzielen, um thromboinflammatorische Erkrankungen zu behandeln.

Zudem liefert diese Arbeit Erkenntnisse über die Unabhängigkeit der ACKR3-Funktion von CXCR4, was die Spezifität und das Potenzial von ACKR3 als therapeutisches Ziel weiter stärkt. Besonders die selektive Wirkung des neuartigen Agonisten C10 über ACKR3, unabhängig von CXCR4, hebt die funktionelle Eigenständigkeit dieses Rezeptors hervor und bietet damit einen differenzierten therapeutischen Angriffspunkt. Die molekularen Mechanismen der ACKR3-Signalübertragung, insbesondere die Rollen von β -Arrestin und GRK2, wurden ebenfalls untersucht. Die beobachtete Regulation über G-Protein-unabhängige Signalwege (insbesondere

die β -Arrestin-vermittelte Internalisierung sowie GRK2-abhängige Phosphorylierung) erweitert das Verständnis atypischer Signalübertragung in Thrombozyten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition dieser Signalwege einen signifikanten Einfluss auf die Thrombusbildung hat und liefern gleichzeitig tiefere Einblicke in die Funktion des ACKR3-Rezeptors. Die Ergebnisse weisen zudem auf eine duale Rolle dieser Regulatoren hin: Während β -Arrestin über ACKR3 antithrombotisch wirkt, unterstützt GRK2 auch ACKR3-externe prothrombotische Signalwege, sodass seine Inhibition insgesamt einen protektiven Effekt entfaltet.

Zusammenfassend zeigt die Arbeit wichtige Einblicke in die Rolle von ACKR3 in der Thrombozytenbiologie und legt nahe, dass dieser Rezeptor ein vielversprechendes Ziel für neue therapeutische Ansätze zur Prävention und Behandlung thrombotischer Erkrankungen darstellt. Die weiteren Forschungen sollten sich darauf konzentrieren, die molekularen Interaktionen und Signalwege von ACKR3 weiter zu charakterisieren, um diese Erkenntnisse in klinisch relevante Therapien umzusetzen.

5.1 Summary

This study elucidates the multifunctional role of the atypical chemokine receptor ACKR3 in the regulation of platelet functions and its potential significance for the treatment of thrombotic diseases. Specific experiments with murine and human platelets demonstrated that the knockout of ACKR3 has significant effects on thrombus formation, platelet activation, and apoptosis. This suggests that ACKR3 exerts an inhibitory function in these processes, as evidenced by the substantial increase in thrombus-covered area and P-selectin expression in ACKR3-deficient platelets. These findings enhance the understanding of the role of chemokine receptors in hemostasis and thrombosis, particularly through the modulation of signal transduction based on a changed balance between pro- and anti-apoptotic signals (Vermees *et al.* 1995; Rohlfing *et al.* 2022). These findings point to an antithrombotic function of ACKR3, the clinical relevance of which still needs to be validated in further preclinical models, including bleeding and hemostasis assays.

While natural ACKR3 agonists showed varying effects on thrombus formation, VUF11207 proved particularly effective in reducing P-selectin expression and platelet activation. These results highlight the therapeutic potential of synthetic agonists for targeted modulation of ACKR3, thereby controlling platelet activity and thrombosis.

Another key aspect of the study was the screening and analysis of 47 potential ACKR3 agonists, among which compounds C10 and C11 showed promising results in β -arrestin activation and inhibition of platelet activation. These findings lay the foundation for the development of new therapeutics specifically targeting the modulation of the ACKR3 signaling pathway to treat thromboinflammatory diseases.

Furthermore, this work provides insights into the independence of ACKR3 function from CXCR4, thereby strengthening the specificity and potential of ACKR3 as a therapeutic target. The molecular mechanisms of ACKR3 signaling, particularly the roles of β -arrestin and GRK2, were also investigated. The results show that inhibition of these signaling pathways significantly impacts thrombus formation and provides deeper insights into ACKR3 receptor function. The findings further indicate a dual role of these regulators: while β -arrestin acts antithrombotically via ACKR3, GRK2 also supports ACKR3-external pro-thrombotic signaling pathways, so that its inhibition exerts an overall protective effect.

In summary, this work offers important insights into the role of ACKR3 in platelet biology and suggests that this receptor is a promising target for new therapeutic approaches for the prevention and treatment of thrombotic diseases. Further research should focus on

characterizing the molecular interactions and signaling pathways of ACKR3 to translate these findings into clinically relevant therapies.

6 Literaturverzeichnis

Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD, 2000. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circulation research*, 86 (2), 131–138.

Abi-Younes S, Si-Tahar M, Luster AD, 2001. The CC chemokines MDC and TARC induce platelet activation via CCR4. *Thrombosis research*, 101 (4), 279–289.

Addison W, 1842. *Experimental Researches on the Blood Corpuscule**. *Provincial Medical Journal and Retrospect of the Medical Sciences*, 4 (99), 403–407.

Agno W, Donadini M, 2018. Breadth of complications of long-term oral anticoagulant care. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2018 (1), 432–438.

Alampour-Rajabi S, El Bounkari O, Rot A, Müller-Newen G, Bachelierie F, Gawaz M, Weber C, Schober A, Bernhagen J, 2015. MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29 (11), 4497–4511.

Ambrosio AL, Di Pietro SM, 2017. Storage pool diseases illuminate platelet dense granule biogenesis. *Platelets*, 28 (2), 138–146.

André P, 2004. P-selectin in haemostasis. *British journal of haematology*, 126 (3), 298–306.

Bachelierie F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A, Matsushima K, Murphy PM, Nibbs R, Nomiyama H, Power CA, Proudfoot AEI, Rosenkilde MM, Rot A, Sozzani S, Thelen M, Yoshie O, Zlotnik A, 2014. *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. corrected. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. Pharmacological reviews*, 66 (1), 1–79.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B, 1997. Human chemokines: an update. *Annual review of immunology*, 15, 675–705.

Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KYC, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelierie F, 2005. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*, 280 (42), 35760–35766.

- Bayrak A, Mohr F, Kolb K, Szpakowska M, Shevchenko E, Dicenta V, Rohlfing A-K, Kudolo M, Pantsar T, Günther M, Kaczor AA, Poso A, Chevigné A, Pillaiyar T, Gawaz M, Laufer SA, 2022. Discovery and Development of First-in-Class ACKR3/CXCR7 Superagonists for Platelet Degranulation Modulation. *Journal of medicinal chemistry*, 65 (19), 13365–13384.
- Beautrait A, Paradis JS, Zimmerman B, Giubilaro J, Nikolajev L, Armando S, Kobayashi H, Yamani L, Namkung Y, Heydenreich FM, Khoury E, Audet M, Roux PP, Veprintsev DB, Laporte SA, Bouvier M, 2017. A new inhibitor of the β -arrestin/AP2 endocytic complex reveals interplay between GPCR internalization and signalling. *Nature communications*, 8, 15054, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28416805/>
- Behnke O, 1970. The morphology of blood platelet membrane systems. *Series haematologica* (1968), 3 (4), 3–16.
- Bennett JS, 2005. Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3. *The Journal of clinical investigation*, 115 (12), 3363–3369.
- Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF, 1983. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochimica et biophysica acta*, 736 (1), 57–66.
- Bizzozero J, 1882. Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin*, 90 (2), 261–332.
- Blanchet X, Langer M, Weber C, Koenen RR, Hundelshausen P von, 2012. Touch of Chemokines. *Frontiers in Immunology*, 3.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA, 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 382 (6594), 829–833.
- Blombäck B, Hessel B, Hogg D, Therkildsen L, 1978. A two-step fibrinogen--fibrin transition in blood coagulation. *Nature*, 275 (5680), 501–505.
- Bloom, D.E., Cafiero, E.T., Jané-Llopis, *et al*, 2011. The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases.
- Braunersreuther V, Mach F, Steffens S, 2007. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*, 97 (5), 714–721.
- Broos K, Feys HB, Meyer SF de, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H, 2011. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews*, 25 (4), 155–167.

Brühl M-L von, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B, Massberg S, 2012. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 209 (4), 819–835.

Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold MET, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ, 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of Experimental Medicine*, 203 (9), 2201–2213.

Busillo JM, Benovic JL, 2007. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochimica et biophysica acta*, 1768 (4), 952–963.

Calaminus SDJ, Guitart AV, Sinclair A, Schachtner H, Watson SP, Holyoake TL, Kranc KR, Machesky LM, 2012. Lineage tracing of Pf4-Cre marks hematopoietic stem cells and their progeny. *PloS one*, 7 (12), e51361, <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0051361>

Cannavo, A., Liccardo, D., & Koch, W. J. (2013). Targeting cardiac β -adrenergic signaling via GRK2 inhibition for heart failure therapy. *Frontiers in physiology*, 4, 264.

Cebo M, Dittrich K, Fu X, Manke MC, Emschermann F, Rheinlaender J, Eysmond H von, Ferreirós N, Sudman J, Witte A, Pelzl L, Borst O, Geisler T, Rath D, Bakchoul T, Gawaz M, Schäffer TE, Lämmerhofer M, Chatterjee M, 2022. Platelet ACKR3/CXCR7 favors antiplatelet lipids over an atherothrombotic lipidome and regulates thromboinflammation. *Blood*, 139 (11), 1722–1742.

Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, Gianfagna F, Gaetano G de, 2012. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thrombosis research*, 129 (3), 263–266.

Charo IF, Ransohoff RM, 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *The New England journal of medicine*, 354 (6), 610–621.

Chatterjee M, Borst O, Walker B, Fotinos A, Vogel S, Seizer P, Mack A, Alampour-Rajabi S, Rath D, Geisler T, Lang F, Langer HF, Bernhagen J, Gawaz M, 2014. Macrophage migration inhibitory factor limits activation-induced apoptosis of platelets via CXCR7-dependent Akt signaling. *Circulation research*, 115 (11), 939–949.

Chatterjee M, Gawaz M, 2013. Platelet-derived CXCL12 (SDF-1 α): basic mechanisms and clinical implications. *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH, 11 (11), 1954–1967.

Chatterjee M, Geisler T, 2016. Inflammatory Contribution of Platelets Revisited: New Players in the Arena of Inflammation. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 42 (3), 205–214.

Chatterjee M, Rath D, Gawaz M, 2015. Role of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 for platelet function. *Biochemical Society transactions*, 43 (4), 720–726.

Chen J, De S, Damron DS, Chen WS, Hay N, Byzova TV, 2004. Impaired platelet responses to thrombin and collagen in AKT-1-deficient mice. *Blood*, 104 (6), 1703–1710.

Chen Q, Schafer CT, Mukherjee S, Gustavsson M, Agrawal P, Yao X-Q, Kossiakoff AA, Handel TM, Tesmer JGG, 2023. ACKR3-arrestin2/3 complexes reveal molecular consequences of GRK-dependent barcoding. *bioRxiv* : the preprint server for biology.

Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA, 2002. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science (New York, N.Y.)*, 296 (5567), 539–541.

Clercq E de, 2003. The bicyclam AMD3100 story. *Nature reviews. Drug discovery*, 2 (7), 581–587, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12815382/>

Coller BS, 1984. Bizzozero and the discovery of the blood platelet. *Lancet (London, England)*, 1 (8380), 804.

Dahlbäck B, 2005. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *Journal of internal medicine*, 257 (3), 209–223.

Davì G, Patrono C, 2007. Platelet activation and atherothrombosis. *The New England journal of medicine*, 357 (24), 2482–2494.

Décaillot FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P, 2011. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *The Journal of biological chemistry*, 286 (37), 32188–32197.

DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK, 2007. Beta-arrestins and cell signaling. *Annual review of physiology*, 69, 483–510.

Dinarello CA, 2010. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*, 140 (6), 935–950.

Doherty S, 2017. Pulmonary embolism An update. *Australian family physician*, 46 (11), 816–820.

Dorobantu M, Simionescu M, Popa-Fotea N-M, 2021. Molecular Research in Cardiovascular Disease. *International journal of molecular sciences*, 22 (13).

Duchene J, Hundelshausen P von, 2015. Platelet-derived chemokines in atherosclerosis. *Hamostaseologie*, 35 (2), 137–141.

Engelmann B, Massberg S, 2013. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature reviews. Immunology*, 13 (1), 34–45.

Essien E-O, Rali P, Mathai SC, 2019. Pulmonary Embolism. *The Medical clinics of North America*, 103 (3), 549–564.

Falati S, Edmead CE, Poole AW, 1999. 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*, 94 (5), 1648–1656.

FitzGerald GA, 2003. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nature reviews. Drug discovery*, 2 (11), 879–890.

Fitzmaurice DA, Blann AD, Lip GYH, 2002. Bleeding risks of antithrombotic therapy. *BMJ (Clinical research ed.)*, 325 (7368), 828–831.

Frąk W, Wojtasińska A, Lisińska W, Młynarska E, Franczyk B, Rysz J, 2022. Pathophysiology of Cardiovascular Diseases: New Insights into Molecular Mechanisms of Atherosclerosis, Arterial Hypertension, and Coronary Artery Disease. *Biomedicines*, 10 (8).

Frojmovic MM, Milton JG, 1982. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiological reviews*, 62 (1), 185–261.

Furie B, Furie BC, 2008. Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine*, 359 (9), 938–949.

Gawaz M, 2004. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovascular research*, 61 (3), 498–511.

Gawaz M, Langer H, May AE, 2005. Platelets in inflammation and atherogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 115 (12), 3378–3384.

Gawaz MP, 1999. Das Blutplättchen. *Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung ; 31 Tabellen*. Thieme, Stuttgart, New York, NY, VII, 144 S.

Gear AR, Suttitanamongkol S, Viisoreanu D, Polanowska-Grabowska RK, Raha S, Camerini D, 2001. Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC, and SDF-1 to stimulate platelet function. *Blood*, 97 (4), 937–945.

Gear ARL, Camerini D, 2003. Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 10 (3-4), 335–350.

Geng J-G, Chen M, Chou K-C, 2004. P-selectin cell adhesion molecule in inflammation, thrombosis, cancer growth and metastasis. *Current medicinal chemistry*, 11 (16), 2153–2160.

George JN, 2000. Platelets. *Lancet (London, England)*, 355 (9214), 1531–1539.

Gerrard JM, White JG, Peterson DA, 1978. The platelet dense tubular system: its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux. *Thrombosis and haemostasis*, 40 (2), 224–231.

Gibbins JM, 2004. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *Journal of cell science*, 117 (Pt 16), 3415–3425.

Gleissner CA, Hundelshausen P von, Ley K, 2008. Platelet chemokines in vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28 (11), 1920–1927.

Golebiewska EM, Poole AW, 2015. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood reviews*, 29 (3), 153–162.

Gremmel T, Ay C, Riedl J, Kopp CW, Eichelberger B, Koppensteiner R, Panzer S, 2016a. Platelet-specific markers are associated with monocyte-platelet aggregate formation and thrombin generation potential in advanced atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*, 115 (3), 615–621.

Gremmel T, Frelinger AL, Michelson AD, 2016b. Platelet Physiology. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 42 (3), 191–204.

Griffith JW, Sokol CL, Luster AD, 2014. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*, 32, 659–702.

Grysiewicz RA, Thomas K, Pandey DK, 2008. Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors. *Neurologic clinics*, 26 (4), 871-95, vii.

Guidetti GF, Canobbio I, Torti M, 2015. PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis. *Advances in biological regulation*, 59, 36–52.

Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V., 2019. GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Frontiers in pharmacology*, 10, 125.

- Gutermann IK, Niggemeier V, Zimmerli LU, Holzer BM, Battagay E, Scharl M, 2015. Gastrointestinal bleeding and anticoagulant or antiplatelet drugs: systematic search for clinical practice guidelines. *Medicine*, 94 (1), e377.
- Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V, 2012. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 33 (4), 397–411.
- Heijnen H, van der Sluijs P, 2015. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 13 (12), 2141–2151, [https://www.jthjournal.org/article/S1538-7836\(22\)08763-3/fulltext](https://www.jthjournal.org/article/S1538-7836(22)08763-3/fulltext)
- Hoffman M, Monroe DM, 2001. A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and haemostasis*, 85 (6), 958–965.
- Hundelshausen P von, Weber C, 2007. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circulation research*, 100 (1), 27–40.
- Italiano JE, Bergmeier W, Tiwari S, Falet H, Hartwig JH, Hoffmeister KM, André P, Wagner DD, Shivdasani RA, 2003. Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood*, 101 (12), 4789–4796.
- Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S, 2003. Signaling events underlying thrombus formation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 1 (7), 1602–1612.
- Josefsson EC, 2023. Platelet intrinsic apoptosis. *Thrombosis research*, 231, 206–213.
- Kaplan KL, Owen J, 1986. Plasma levels of platelet secretory proteins. *Critical reviews in oncology/hematology*, 5 (3), 235–255.
- Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL, 1996. Platelets and shear stress. *Blood*, 88 (5), 1525–1541.
- Leberzammer J, Agten SM, Blanchet X, Duan R, Ippel H, Megens RTA, Schulz C, Aslani M, Duchene J, Döring Y, Jooss NJ, Zhang P, Brandl R, Stark K, Siess W, Jurk K, Heemskerk JWM, Hackeng TM, Mayo KH, Weber C, Hundelshausen P von, 2022. Targeting platelet-derived CXCL12 impedes arterial thrombosis. *Blood*, 139 (17), 2691–2705.
- Leberzammer J, Hundelshausen P von, 2023. Chemokines, molecular drivers of thromboinflammation and immunothrombosis. *Frontiers in Immunology*, 14.
- Lebois M, Josefsson EC, 2016. Regulation of platelet lifespan by apoptosis. *Platelets*, 27 (6), 497–504.

- Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelier F, Lagane B, 2009. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*, 113 (24), 6085–6093.
- Leytin V, 2012. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood reviews*, 26 (2), 51–63.
- Li Z, Kim ES, Bearer EL, 2002. Arp2/3 complex is required for actin polymerization during platelet shape change. *Blood*, 99 (12), 4466–4474.
- Libby P, 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420 (6917), 868–874.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A, 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105 (9), 1135–1143.
- Liberale L, Montecucco F, Schwarz L, Lüscher TF, Camici GG, 2021. Inflammation and cardiovascular diseases: lessons from seminal clinical trials. *Cardiovascular research*, 117 (2), 411–422.
- Linden MD, Frelinger AL 3rd, Barnard MR, Przyklenk K, Furman MI, Michelson AD. Application of flow cytometry to platelet disorders. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30(5):501-511. doi:10.1055/s-2004-835671
- Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL, 2006. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet (London, England)*, 367 (9524), 1747–1757.
- Lu W-J, Lin K-C, Huang S-Y, Thomas PA, Wu Y-H, Wu H-C, Lin K-H, Sheu J-R, 2014. Role of a Janus kinase 2-dependent signaling pathway in platelet activation. *Thrombosis research*, 133 (6), 1088–1096.
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ, 2002. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of cell science*, 115 (Pt 3), 455–465.
- Machlus KR, Italiano JE, 2013. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *The Journal of cell biology*, 201 (6), 785–796.
- Mackman N, 2008. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, 451 (7181), 914–918.
- Mann KG, Brummel K, Butenas S, 2003. What is all that thrombin for? *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 1 (7), 1504–1514.

Marguerie GA, Edgington TS, Plow EF, 1980. Interaction of fibrinogen with its platelet receptor as part of a multistep reaction in ADP-induced platelet aggregation. *The Journal of biological chemistry*, 255 (1), 154–161.

McArthur K, Chappaz S, Kile BT, 2018. Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage. *Blood*, 131 (6), 605–610.

McNicol A, Israels SJ, 2003. Platelets and anti-platelet therapy. *Journal of pharmacological sciences*, 93 (4), 381–396.

Merten M, Thiagarajan P, 2000. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation*, 102 (16), 1931–1936.

Michelson AD, 2011. *Platelets* (2nd ed.). Academic Press, [Place of publication not identified], 1376 S.

Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes H-G, Rot A, Thelen M, 2010. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PloS one*, 5 (2), e9175.

Noels H, Weber C, Koenen RR, 2019. Chemokines as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 39 (4), 583–592.

O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S, Xavier D, Liu L, Zhang H, Rao-Melacini P, Zhang X, Pais P, Agapay S, Lopez-Jaramillo P, Damasceno A, Langhorne P, McQueen MJ, Rosengren A, Dehghan M, Hankey GJ, Dans AL, Elsayed A, Avezum A, Mondo C, Diener H-C, Ryglewicz D, Czlonkowska A, Pogosova N, Weimar C, Iqbal R, Diaz R, Yusoff K, Yusufali A, Oguz A, Wang X, Penaherrera E, Lanus F, Ogah OS, Ogunniyi A, Iversen HK, Malaga G, Rumboldt Z, Oveisgharan S, Al Hussain F, Magazi D, Nilanont Y, Ferguson J, Pare G, Yusuf S, 2016. Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *Lancet (London, England)*, 388 (10046), 761–775.

Patrono C, García Rodríguez LA, Landolfi R, Baigent C, 2005. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *The New England journal of medicine*, 353 (22), 2373–2383.

Penela, P., Murga, C., Ribas, C., Tutor, A. S., Peregrín, S., & Mayor, F., Jr (2006). Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovascular research*, 69(1), 46–56

Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ, 1998. G protein-coupled receptor kinases. *Annual review of biochemistry*, 67, 653–692.

- Pugh N, Simpson AMC, Smethurst PA, Groot PG de, Raynal N, Farndale RW, 2010. Synergism between platelet collagen receptors defined using receptor-specific collagen-mimetic peptide substrata in flowing blood. *Blood*, 115 (24), 5069–5079.
- Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, Gerard C, Lefkowitz RJ, 2009. β -arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (2), 628–632.
- Rath D, Chatterjee M, Holtkamp A, Tekath N, Borst O, Vogel S, Müller K, Gawaz M, Geisler T, 2016. Evidence of an interaction between TGF- β 1 and the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis in human platelets. *Thrombosis research*, 144, 79–84.
- Rath D, Chatterjee M, Meyer L, Tekath N, Olma C, Krumm P, Adams C, Borst O, Müller K, Droppa M, Nikolaou K, Riethmüller J, Gawaz M, Geisler T, 2018. Relative survival potential of platelets is associated with platelet CXCR4/CXCR7 surface exposure and functional recovery following STEMI. *Atherosclerosis*, 278, 269–277.
- Rendu F, Brohard-Bohn B, 2001. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12 (5), 261–273.
- Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, García-Hoz C, Jurado-Pueyo M, Aymerich I, Mayor F, 2007. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochimica et biophysica acta*, 1768 (4), 913–922.
- Roest M, Reininger A, Zwaginga JJ, King MR, Heemskerk JW; Biorheology Subcommittee of the SSC of the ISTH. Flow chamber-based assays to measure thrombus formation in vitro: requirements for standardization. *J Thromb Haemost.* 2011;9(11):2322-2324. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04492.x
- Rohlfing A-K, Kolb K, Sigle M, Ziegler M, Bild A, Münzer P, Sudmann J, Dicenta V, Harm T, Manke M-C, Geue S, Kremser M, Chatterjee M, Liang C, Eysmond H von, Dandekar T, Heinzmann D, Günter M, Ungern-Sternberg S von, Büttcher M, Castor T, Mencl S, Langhauser F, Sies K, Ashour D, Beker MC, Lämmerhofer M, Autenrieth SE, Schäffer TE, Laufer S, Szklanna P, Maguire P, Heikenwalder M, Müller KAL, Hermann DM, Kilic E, Stumm R, Ramos G, Kleinschnitz C, Borst O, Langer HF, Rath D, Gawaz M, 2022. ACKR3 regulates platelet activation and ischemia-reperfusion tissue injury. *Nature communications*, 13 (1), 1823.
- Rollins BJ, 1997. Chemokines. *Blood*, 90 (3), 909–928, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9242519/>

Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, Barengo NC, Beaton AZ, Benjamin EJ, Benziger CP, Bonny A, Brauer M, Brodmann M, Cahill TJ, Carapetis J, Catapano AL, Chugh SS, Cooper LT, Coresh J, Criqui M, DeCleene N, Eagle KA, Emmons-Bell S, Feigin VL, Fernández-Solà J, Fowkes G, Gakidou E, Grundy SM, He FJ, Howard G, Hu F, Inker L, Karthikeyan G, Kassebaum N, Koroshetz W, Lavie C, Lloyd-Jones D, Lu HS, Mirijello A, Temesgen AM, Mokdad A, Moran AE, Muntner P, Narula J, Neal B, Ntsekhe M, Moraes de Oliveira G, Otto C, Owolabi M, Pratt M, Rajagopalan S, Reitsma M, Ribeiro ALP, Rigotti N, Rodgers A, Sable C, Shakil S, Sliwa-Hahnle K, Stark B, Sundström J, Timpel P, Tleyjeh IM, Valgimigli M, Vos T, Whelton PK, Yacoub M, Zuhlke L, Murray C, Fuster V, 2020. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 76 (25), 2982–3021.

Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, Hoffman EB, Deenadayalu N, Ezekowitz MD, Camm AJ, Weitz JI, Lewis BS, Parkhomenko A, Yamashita T, Antman EM, 2014. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet (London, England)*, 383 (9921), 955–962.

Ruggeri ZM, 2002. Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine*, 8 (11), 1227–1234.

Ruggeri ZM, Dent JA, Saldívar E, 1999. Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood*, 94 (1), 172–178.

Ruggeri ZM, Mendolicchio GL, 2007. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circulation research*, 100 (12), 1673–1685.

Ruiz-Nodar JM, Marín F, Hurtado JA, Valencia J, Pinar E, Pineda J, Gimeno JR, Sogorb F, Valdés M, Lip GYH, 2008. Anticoagulant and antiplatelet therapy use in 426 patients with atrial fibrillation undergoing percutaneous coronary intervention and stent implantation implications for bleeding risk and prognosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 51 (8), 818–825.

Saaber F, Schütz D, Miess E, Abe P, Desikan S, Ashok Kumar P, Balk S, Huang K, Beaulieu JM, Schulz S, Stumm R, 2019. ACKR3 Regulation of Neuronal Migration Requires ACKR3 Phosphorylation, but Not β -Arrestin. *Cell reports*, 26 (6), 1473-1488.e9.

Savarese G, Savonitto S, Lund LH, Paolillo S, Marciano C, Dellegrottaglie S, Parente A, Trimarco B, Luscher TF, Perrone-Filardi P, 2016. Efficacy and safety of prolonged dual antiplatelet therapy: a meta-analysis of 15 randomized trials enrolling 85 265 patients. *European heart journal. Cardiovascular pharmacotherapy*, 2 (4), 218–228.

Scharf RE, 2009. Management of bleeding in patients using antithrombotic agents: prediction, prevention, protection and problem-oriented intervention. *Hamostaseologie*, 29 (4), 388–398.

Sharma S, Tyagi T, Antoniak S, 2022. Platelet in thrombo-inflammation: Unraveling new therapeutic targets. *Frontiers in Immunology*, 13.

Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF, 1985. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *The Journal of biological chemistry*, 260 (20), 11107–11114.

Standeven KF, Ariëns RAS, Grant PJ, 2005. The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. *Blood reviews*, 19 (5), 275–288.

Steiner T, Rosand J, Diring M, 2006. Intracerebral hemorrhage associated with oral anticoagulant therapy: current practices and unresolved questions. *Stroke*, 37 (1), 256–262.

Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, Fry ETA, DeLago A, Wilmer C, Topol EJ, 2002. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA*, 288 (19), 2411–2420.

Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol.* 1985;101(3):880-886. doi:10.1083/jcb.101.3.880

Stenberg PE, Levin J, 1989. Mechanisms of platelet production. *Blood cells*, 15 (1), 23–47.

Sugimoto M, Tsuji S, Kuwahara M, Matsui H, Miyata S, Fujimura Y, Yoshioka A, 1999. Shear-dependent functions of the interaction between soluble von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib in mural thrombus formation on a collagen surface. *International journal of hematology*, 69 (1), 48–53.

Thon JN, Italiano JE, 2012. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handbook of experimental pharmacology*, 210, 3–22.

Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, Boehme AK, Buxton AE, Carson AP, Commodore-Mensah Y, Elkind MSV, Evenson KR, Eze-Nliam C, Ferguson JF, Generoso G, Ho JE, Kalani R, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Levine DA, Lewis TT, Liu J, Loop MS, Ma J, Mussolino ME, Navaneethan SD, Perak AM, Poudel R, Rezk-Hanna M, Roth GA, Schroeder EB, Shah SH, Thacker EL, VanWagner LB, Virani SS, Voecks JH, Wang N-Y, Yaffe K, Martin SS, 2022. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 145 (8), e153-e639.

Turitto VT, Weiss HJ, Zimmerman TS, Sussman II, 1985. Factor VIII/von Willebrand factor in subendothelium mediates platelet adhesion. *Blood*, 65 (4), 823–831.

Turner NA, Moake JL, McIntire LV, 2001. Blockade of adenosine diphosphate receptors P2Y₁₂ and P2Y₁ is required to inhibit platelet aggregation in whole blood under flow. *Blood*, 98 (12), 3340–3345.

Udell JA, Bonaca MP, Collet J-P, Lincoff AM, Kereiakes DJ, Costa F, Lee CW, Mauri L, Valgimigli M, Park S-J, Montalescot G, Sabatine MS, Braunwald E, Bhatt DL, 2016. Long-term dual antiplatelet therapy for secondary prevention of cardiovascular events in the subgroup of patients with previous myocardial infarction: a collaborative meta-analysis of randomized trials. *European heart journal*, 37 (4), 390–399.

Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B, 2009. Calcium signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 7 (7), 1057–1066.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C, 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods*, 184 (1), 39–51.

Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH, 2013. New fundamentals in hemostasis. *Physiological reviews*, 93 (1), 327–358.

Viola A, Luster AD, 2008. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 48, 171–197.

Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Cheng S, Delling FN, Elkind MSV, Evenson KR, Ferguson JF, Gupta DK, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Lee CD, Lewis TT, Liu J, Loop MS, Lutsey PL, Ma J, Mackey J, Martin SS, Matchar DB, Mussolino ME, Navaneethan SD, Perak AM, Roth GA, Samad Z, Satou GM, Schroeder EB, Shah SH, Shay CM, Stokes A, VanWagner LB, Wang N-Y, Tsao CW, 2021. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 143 (8), e254-e743.

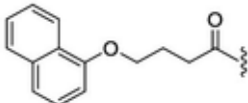
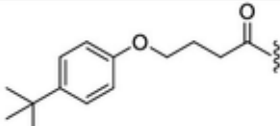
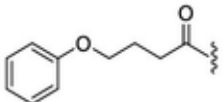
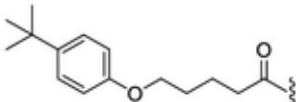
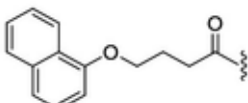
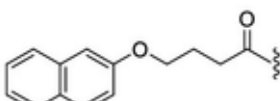
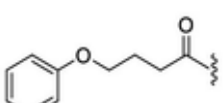
Wagner J, Lock JF, Kastner C, Klein I, Krajcinovic K, Löb S, Germer C-T, Wiegering A, 2019. Perioperative management of anticoagulant therapy. *Innovative surgical sciences*, 4 (4), 144–151.

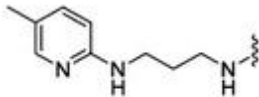
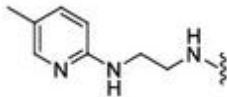
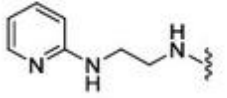
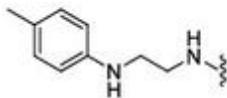
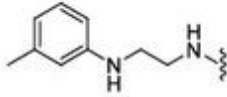
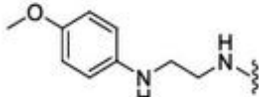
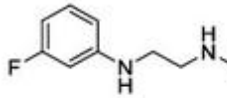
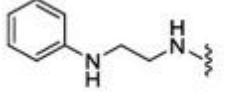
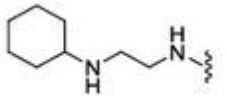
Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, Horrow J, Husted S, James S, Katus H, Mahaffey KW, Scirica BM, Skene A, Steg PG, Storey RF, Harrington RA,

- Freij A, Thorsén M, 2009. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine*, 361 (11), 1045–1057.
- Wang C, Chen W, Shen J, 2018. CXCR7 Targeting and Its Major Disease Relevance. *Frontiers in pharmacology*, 9, 641.
- Weisel JW, 2005. Fibrinogen and fibrin. *Advances in protein chemistry*, 70, 247–299, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15837518/>
- White JG, Clawson CC, 1980. The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system. *The American Journal of Pathology*, 101 (2), 353–364.
- White JG, Krumwiede M, 2007. Some contributions of electron microscopy to knowledge of human platelets. *Thrombosis and haemostasis*, 98 (1), 69–72.
- Wijtmans M, Maussang D, Sirci F, Scholten DJ, Canals M, Mujić-Delić A, Chong M, Chatalic KLS, Custers H, Janssen E, Graaf C de, Smit MJ, Esch IJP de, Leurs R, 2012. Synthesis, modeling and functional activity of substituted styrene-amides as small-molecule CXCR7 agonists. *European journal of medicinal chemistry*, 51, 184–192.
- Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, Neumann F-J, Ardissino D, Servi S de, Murphy SA, Riesmeyer J, Weerakkody G, Gibson CM, Antman EM, 2007. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine*, 357 (20), 2001–2015.
- World Health Organisation, 2021. Cardiovascular Diseases (CVDs). Abgerufen am 04.03.2024, [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L, 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet (London, England)*, 364 (9438), 937–952.
- Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK, 2001. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *The New England journal of medicine*, 345 (7), 494–502.
- Zucker-Franklin D, 2003. *Atlas of Blood Cells. Megakaryocytes and platelets* (3rd edition). Edi. Ermes, 810–863.

7 Addendum

C10 und C11 Derivate

Compound	R ¹	R ²	ACKR3		Flow cytometry
			β -Arrestin recruitment EC ₅₀ (μ M) ^a	Efficacy (E _{max}) vs CXCL12 (%) ^b	P-Selectin expression reduction (%) ^c
C11	H		11.4 [8.2–16.2]	33±0	17±5
VUF11207	see Figure 2 for the structure		0.04 [0.03–0.05]	95±1	65±6
1	H		2.30 [1.51–3.50]	37±0	0±8
2	H		18.8 [9.1–40]	53±1	12±11
3	H		2.06 [0.96–4.25]	21±0	0±12
4	CH ₃		1.80 [1.28–2.51]	52±1	26±9
5	CH ₃		1.44 [0.92–2.23]	36±0	8±8
6	CH ₃		2.67 [2.05–3.47]	50±0	11±13

Compound	R ¹	ACKR3		Flow cytometry
		β -Arrestin recruitment EC ₅₀ (μ M) ^a	Efficacy (E _{max}) vs CXCL12 (%) ^b	P-Selectin expression reduction (%) ^c
Structure A: Linker C2 with different terminal rings				
C10		19.1 [13.8–26.5]	96±2	41±5
VUF11207	see Figure 2 for the structure	0.04 [0.033–0.056]	95±1	65±6
7		74.7 [58.5–98.3]	58±0	0±4
8		58.6 [46.7–74.9]	50±0	42±14
9		85.7 [60.2–131.4]	45±1	76±7
10		76.2 [57.0–106.2]	42±1	71±9
11		>100	n.d.	-
12		>100	n.d.	-
13		>100	n.d.	-
14		57.7 [44.8-76.1]	57±1	-

Structure B: Linker C2 with the terminal piperazine ring				
15	-Me	>100	n.d.	-
16		45.6 [40.0–52.1]	97±0	42±4
17		>100	n.d.	-
18		>100	n.d.	-
19		>100	n.d.	-
20		>100	n.d.	-
21		52.9 [42.3–67.2]	88±0	60±12
22		62.7 [51.1–78.2]	91±1	-
23		>100	n.d.	-
24		>100	n.d.	-
25		17.4 [15.7–19.1]	133±0	75±19
Structure C: Linker C3 with different terminal rings				
26 (LN5972)		3.40 [2.49–4.74]	161±1	76±11
27 (LN6023)		3.50 [2.69–4.59]	164±1	97±2
28		11.7± [9.8–13.8]	72±0	36±15

Abbildung 35: Strukturelle Modifikationen der Verbindungen aus den Ausgangstrukturen C10 und C11 (nach Bayrak *et al.* 2022)

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät unter Betreuung von Prof. Dr. Robert Lukowski (Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Institut für Pharmazie, Experimentelle Pharmakologie), durchgeführt.

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

Das *in silico modelling* wurde durch Ekaterina Shevchenko, Mark Kudolo und Tatu Pantsar in Betreuung durch Prof. Dr. Antti Poso (University of Eastern Finland, School of Pharmacy) entwickelt und durchgeführt.

Die Synthese der Verbindungen erfolgte durch Alp Bayrak, Florian Mohr und Marcel Günther in Betreuung durch Prof. Dr. Stefan A. Laufer (Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Chemie).

Die Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt. Die Methode der Calciummobilisierung wurde mit Unterstützung von Anne-Katrin Rohlfing (Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung Kardiologie und Angiologie, AG Prof. Gawaz) 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.

Berlin, den 30.06.2025

9 Veröffentlichungen

Rohlfing, A. K., **Kolb, K.**, Sigle, M., Ziegler, M., Bild, A., Münzer, P., Sudmann, J., Dicenta, V., Harm, T., Manke, M. C., Geue, S., Kremser, M., Chatterjee, M., Liang, C., von Eysmond, H., Dandekar, T., Heinzmann, D., Günter, M., von Ungern-Sternberg, S., Büttcher, M., Gawaz, M. (2022). ACKR3 regulates platelet activation and ischemia-reperfusion tissue injury. *Nature communications*, 13(1), 1823. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29341-1>

Bayrak, A., Mohr, F., **Kolb, K.**, Szpakowska, M., Shevchenko, E., Dicenta, V., Rohlfing, A. K., Kudolo, M., Pantsar, T., Günther, M., Kaczor, A. A., Poso, A., Chevigné, A., Pillaiyar, T., Gawaz, M., & Laufer, S. A. (2022). Discovery and Development of First-in-Class ACKR3/CXCR7 Superagonists for Platelet Degranulation Modulation. *Journal of medicinal chemistry*, 65(19), 13365–13384. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01198>

Harm, T., Bild, A., Dittrich, K., Goldschmied, A., Nestele, J., Chatterjee, M., Fu, X., **Kolb, K.**, Castor, T., Borst, O., Geisler, T., Rath, D., Lämmerhofer, M., & Gawaz, M. (2022). Acute coronary syndrome is associated with a substantial change in the platelet lipidome. *Cardiovascular research*, 118(8), 1904–1916. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab238>

Petersen-Urbe, Á., Kremser, M., Rohlfing, A. K., Castor, T., **Kolb, K.**, Dicenta, V., Emschermann, F., Li, B., Borst, O., Rath, D., Müller, K. A. L., & Gawaz, M. P. (2021). Platelet-Derived PCSK9 Is Associated with LDL Metabolism and Modulates Atherothrombotic Mechanisms in Coronary Artery Disease. *International journal of molecular sciences*, 22(20), 11179. <https://doi.org/10.3390/ijms222011179>

Witte, A., Rohlfing, A. K., Dannenmann, B., Dicenta, V., Nasri, M., **Kolb, K.**, Sudmann, J., Castor, T., Rath, D., Borst, O., Skokowa, J., & Gawaz, M. (2021). The chemokine CXCL14 mediates platelet function and migration via direct interaction with CXCR4. *Cardiovascular research*, 117(3), 903–917. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa080>

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz danken. Mit seiner Unterstützung konnte ich meine Dissertation in der Inneren Medizin III des Universitätsklinikums Tübingen durchführen. Sein wertvoller Rat hat maßgeblich zur erfolgreichen Betreuung meiner Arbeit beigetragen.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Robert Lukowski für die Übernahme der Betreuung und die Möglichkeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen zu promovieren.

Zudem möchte ich Dr. Tatsiana Castor danken, für ihre stets hilfsbereite Unterstützung bei täglichen Herausforderungen. Auch Dr. Anne-Katrin Rohlfing danke ich für das Teilen ihrer Expertise, ihre Betreuung und Unterstützung im Labor. Darüber hinaus möchte ich all jenen danken, die die Zeit im Labor maßgeblich geprägt haben, allen voran Valerie Dicenta. Eure tatkräftige Unterstützung und mentaler Beistand waren eine große Hilfe und haben die Arbeit oft zu einem Vergnügen gemacht.

Mein besonderer Dank geht auch an Dr. Barbara Schörg. Ohne dich hätte ich womöglich das ein oder andere Mal aufgegeben. Du warst und bist stets eine Motivation und ein Vorbild für mich.

Von Herzen danke ich meiner Mutter, die immer an mich glaubt. Ihre Unterstützung und ihr Verständnis haben mich auf diesem Weg begleitet, ohne jemals Druck auszuüben. Ebenso danke ich meinem Vater, dessen Vertrauen in meine Fähigkeiten mich stets gestärkt und motiviert hat.

Mein Dank gilt auch meinem Partner Nico. Die Jahre während der Arbeit an dieser Dissertation waren sicher nicht immer einfach. Deine Geduld, dein Rückhalt und dein Beistand haben mir enorm geholfen, diese Phase zu meistern.

Ich danke zudem meinen Freundinnen und Freunden für ihre kreative und mentale Unterstützung, allen voran Jana und Henri.

Und last but not least gilt mein tiefster Dank meiner **Oma**. Ohne sie wäre all das nicht möglich gewesen.