

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

Kumulative Habilitationsschrift

***Mechanismen der vaskulären Thrombo-Inflammation***

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach  
Experimentelle Kardiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Dr. med. Leo Johannes Nicolai

2022

---

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	2
2. Wissenschaftliche Arbeiten .....	4
a. Gerichtete Migration von Thrombozyten an der entzündeten Gefäßwand.....	4
b. Ein Mausmodell zur Untersuchung von Thrombozyten auf Einzelzellebene .....	8
c. Ein neuer Mechanismus des Zusammenspiels von Koagulation und Thrombozyten in der Inflammation.....	10
d. Immunothrombose in COVID-19 .....	14
e. Vergleich von Immunothrombose in COVID-19 zu Influenza Pneumonie.....	17
f. IL-8 als Regulator der Neutrophilenfunktion in COVID-19 ARDS.....	19
g. Protektive Faktoren der Immunfunktion bei SARS-CoV-2 Infektion.....	21
h. Mechanismen der impafassozierten Thrombozytopenie nach adenovirus-basierter Impfung23	
3. Zusammenfassung und Ausblick.....	28
4. Abkürzungsverzeichnis.....	32
5. Literaturverzeichnis .....	34
6. Verzeichnis der Arbeiten als Habilitationsleistung .....	39
7. Danksagung.....	41

## 1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die weltweit führende Ursache für Morbidität und Mortalität dar (Organization, 2016). Während bereits große Fortschritte zur Behandlung der jeweiligen Entitäten dieses Überbegriffs gemacht werden konnten, gibt es hierentgehend immer noch großen Bedarf an gezielteren Therapien mit verbesserten Nebenwirkungsprofilen: Antithrombotische Therapien wie auch anti-thrombozytäre Medikamente bergen ein deutlich erhöhtes Blutungsrisiko, insbesondere in Kombination (Husted, 2008; Oldgren et al., 2013). Gleichzeitig beruht in den meisten Fällen der thrombotische Verschluss von End-Arterien im Gehirn – mit der Folge eines Schlaganfalls – oder Herzen – mit der Folge eines Herzinfarktes – auf einer bisher nur unzureichend therapierbaren Grunderkrankung – der Atherosklerose.

Diese Erkrankung ist durch bahnbrechende internationale Forschungsanstrengungen in den letzten Jahrzehnten deutlich besser verstanden. So scheint es sich nicht wie zunächst angenommen um eine degenerative Erkrankung des Gefäßsystems, sondern um eine chronische, inflammatorische Erkrankung zu handeln, welche immunmodulatorischen Therapien zugänglich sein könnte (Libby, 2002). Tatsächlich konnten große, randomisierte Studien eine signifikante Verminderung von kardiovaskulären Ereignissen durch IL-1beta Blockade und Immunmodulation mittels Colchicin aufdecken (Nidorf et al., 2020; Ridker et al., 2017; Tardif et al., 2019). Allerdings sind beide Therapieansätze limitiert, da sie unspezifisch das Immunsystem hemmen und so auch Komplikationen wie eine erhöhte Infektneigung mit sich ziehen können (Aday & Ridker, 2018). Dies unterstreicht die Notwendigkeit, Mechanismen der (chronischen) Inflammation im Gefäßsystem besser zu verstehen. Insbesondere scheinen Thrombozyten als Interaktionspartner mit Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten und Monozyten eine wichtige Rolle im Voranschreiten der Atherosklerose zu spielen (Gawaz et al., 2005; Huo & Ley, 2004).

Interessanterweise beruht auch der auf atherosklerotische Plaque-Ruptur oder -Erosion folgende Gefäßverschluss auf dem Zusammenspiel von Immunzellen, Thrombozyten und der Koagulationskaskade. In hauptsächlich im Mausmodell durchgeführten wegweisenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieses Zusammenspiel primär in der Infektabwehr der lokalen Eindämmung und Kontrolle von Pathogenen dient, welche durch Aktivierung der intravasalen Gerinnung in der Ausbreitung gehindert werden (Engelmann & Massberg, 2013; Massberg et al., 2010). In diesem Kontext können Thrombozyten neutrophile Granulozyten aktivieren, woraufhin es zu einer Freisetzung von sogenannten „Neutrophil Extracellular Traps“ (NETs) kommt (Clark et al., 2007; Wong et al., 2013). Diese NETs bilden Netze, welche Pathogene einfangen und abtöten können, und fungieren auch als ein Gerüst für die Aktivierung der Gerinnungskaskade (McDonald et al., 2012).

Dieses Konzept der Immunothrombose stellt daher am ehesten ein evolutionär erhaltener Mechanismus der Keimabwehr dar, welche aber bei chronischen und auch akuten Entzündungen fehlgeleitet sein kann (Nicolai et al., 2019). Im oben genannten Falle einer sterilen Gefäßverletzung durch atherosklerotische Plaque-Ruptur oder – Erosion erfolgt eine Aktivierung dieser Kaskaden mit der Konsequenz einer intravasalen Thrombusbildung, welche zu Ischämie der nachgeschalteten Gewebereiche führt (Stark & Massberg, 2021). Auch ausgeprägte Entzündungsreaktionen auf z.B. Bakterien, wie beispielsweise eine Sepsis, können immunothrombotische Verschlüsse mit Verschlechterung der Organ-Oxygenierung und des Überlebens in Mäusen verursachen (Rondina & Garraud, 2014).

Diese auch als Thrombo-Inflammation bezeichnete Kaskade ist daher ein attraktives Ziel neuer anti-inflammatorischer als auch anti-thrombotischer Therapien. Jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen nur unvollständig verstanden. Hier kommt der intravitalen Bildgebung im Tiermodell entscheidende Bedeutung zu, da diese Technik die parallele Visualisierung der jeweiligen Bestandteile – von Thrombozyten bis neutrophile Granulozyten – möglich macht und so Einblicke in das Zusammenspiel dieser erlaubt (Stark et al., 2013; von Bruhl et al., 2012). In Kombination mit murinen, konditionalen Knock-Out sowie Fluoreszenz-Reporter- Modellen können so im organspezifischen Kontext Mechanismen visualisiert und verstanden werden. Darüber hinaus bestehen seit kurzem mit neuen Methoden der Biomedizin – namentlich Shot-Gun Proteomik, RNA-Sequenzierung und RNA-Sequenzierung auf Einzelzellebene – ganz neuartige Möglichkeiten, sich diesen Fragestellungen anzunähern (Ando et al., 2020): Diese Technologien ermöglichen eine nie dagewesene Auflösung von zellulärer Kommunikation und Heterogenität und können neue potentielle Zielstrukturen wie auch Mechanismen aufdecken (Hasin et al., 2017).

Dies ist auch hoch relevant im Kontext von humaner Krankheit. Die beschriebenen Mechanismen der Thrombo-Inflammation sind hauptsächlich im Tiermodell untersucht, und die Rolle im Menschen sind unvollständig geklärt (Stark & Massberg, 2021). Im Rahmen der Pandemie ausgelöst durch das SARS-CoV-2 Virus, wurden weltweit einzigartige wissenschaftliche Bemühungen unternommen, um die als COVID-19 bezeichnete Erkrankung zu verstehen, zu therapieren und durch Impfungen zu verhindern. Bereits zu Beginn der Pandemie zeigte sich eine erhöhte Thrombosegefahr bei COVID-19 bei unklaren zugrundeliegenden Mechanismen (Bonow et al., 2020; Malas et al., 2020; Modin et al., 2020). Obwohl das akute Atemnotsyndrom (ARDS) das zentrale Merkmal eines schweren Verlaufs der Erkrankung ist, hat sich eine Organschädigung jenseits der Lunge als wichtiger Prädiktor für Mortalität herausgestellt (Degarege et al., 2020). Die zugrunde liegenden Mechanismen der Lungen- und Gewebeschädigung durch COVID-19 waren zu Beginn der Pandemie unzureichend verstanden. Insbesondere war unklar,

ob und wie die Entzündungsreaktion auf SARS-CoV-2 und die damit verbundene Koagulopathie miteinander verflochten sind.

Ziel der in dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen ist es, ein besseres Verständnis der zellulären Mechanismen der Thrombo-Inflammation durch moderne Methoden der intravitalen Mikroskopie, mit innovativen Mausmodellen und in-vitro Experimenten sowie translational durch die Einbindung von Patientenproben, welche mit Multi-Omics Methodiken untersucht wurden, zu erlangen.

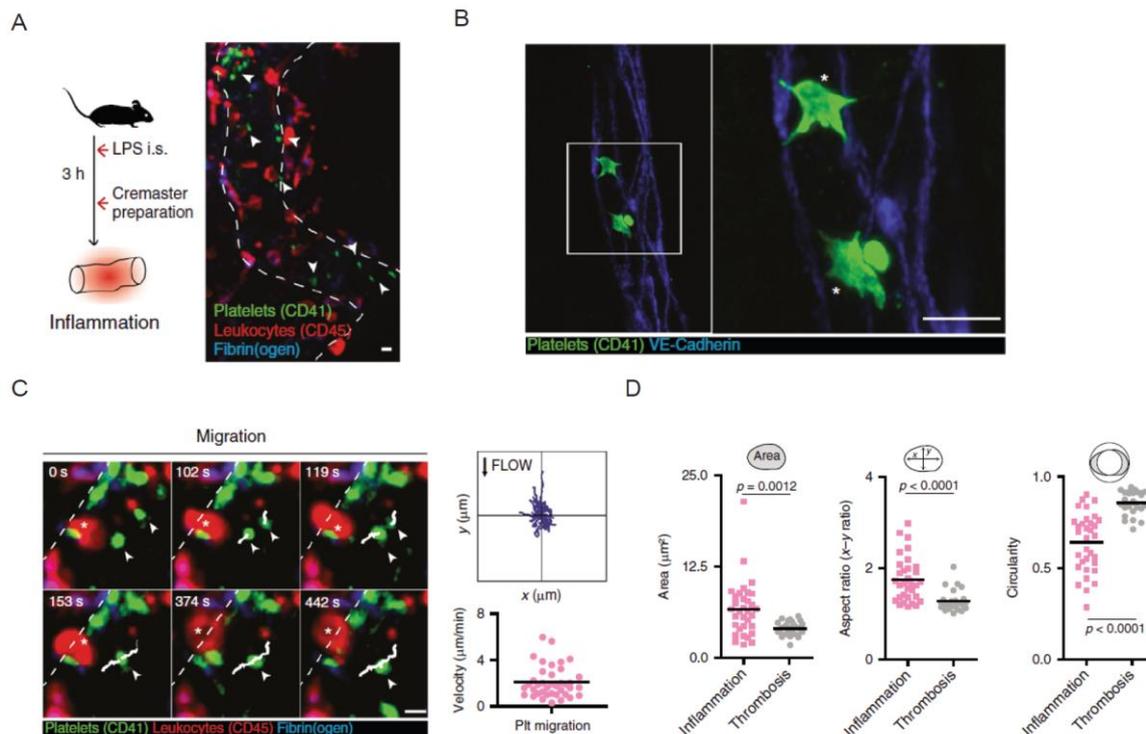
## 2. Wissenschaftliche Arbeiten

### a. Gerichtete Migration von Thrombozyten an der entzündeten Gefäßwand

Die Gruppe um Prof. Steffen Massberg konnte die aktive Migration als neue Effektorfunktion von Thrombozyten erstmals in vivo nachweisen (Gaertner et al., 2017). Diese Funktion ist Myosin-heavy chain 9 (Mhy9) abhängig. Untersuchungen in Mäusen mit einer Thrombozyten-spezifischen Mhy9-Defizienz zeigten ein reduziertes Aufsammeln von Bakterien durch Thrombozyten, sowie eine erhöhte Mortalität durch Hyperaktivierung von neutrophilen Granulozyten in einem Sepsis-Modell. Ob Thrombozytenmigration in vivo gerichtet ist, also Gradienten folgt, und was die physiologische Funktion dieser neuen Effektorfunktion darstellt, blieb unklar.

Ich konzentrierte mich daher auf den Vergleich der Rekrutierung, des Verhaltens und der Morphologie von Thrombozyten im inflammatorischen und thrombotischen Kontext. Hierzu entwickelte ich eine Methode zur hochauflösenden Mikroskopie von Cremaster-Gewebeproben und führte intravitale 4D-Mikroskopie durch (Abbildung 1 A). Diese Untersuchungen ergaben, dass Thrombozyten in der Inflammation als einzelne Zellen an die entzündete Gefäßwand adhäreren, wie bereits von anderen Gruppen gezeigt (Gros et al., 2015). Zusätzlich zeigen diese Thrombozyten teilweise aktive Migration am Endothel, und bilden Lamellipodien, also flächige Zellfortsätze, aus (Abbildung 1 B). Diese aktive Beweglichkeit an der Gefäßwand findet auch gegen Blutfluss statt und erfolgt mit rund 2  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Abbildung 1 C). Dies untermauert weiter, dass es sich hierbei um einen aktiven Prozess handelt. Interessanterweise ist sowohl das Verhalten als auch die Morphologie von Thrombozyten, welche in Thromben rekrutiert werden, davon deutlich unterschiedlich. Mithilfe von Confetti-Reportermäusen (Vergleiche 2b) konnte ich aufdecken, dass Thrombozyten in Thromben gerichtete Retraktionsbewegung zeigen und sich keiner Formveränderung unterziehen. Ein direkter Vergleich der Thrombozyten auf Einzelzellebene in Thrombose und Inflammation zeigte, dass die immunresponsiven Thrombozyten eine größere Fläche aufwiesen, eine erhöhte Polarisation (Aspect Ratio)

zeigten und eine niedrigere Zirkularität hatten (Abbildung 1 D). Zusammenfassend unterstreichen diese Daten, dass Thrombozyten fundamentale unterschiedliche Effektorfunktionen in Inflammation und Thrombose nutzen.

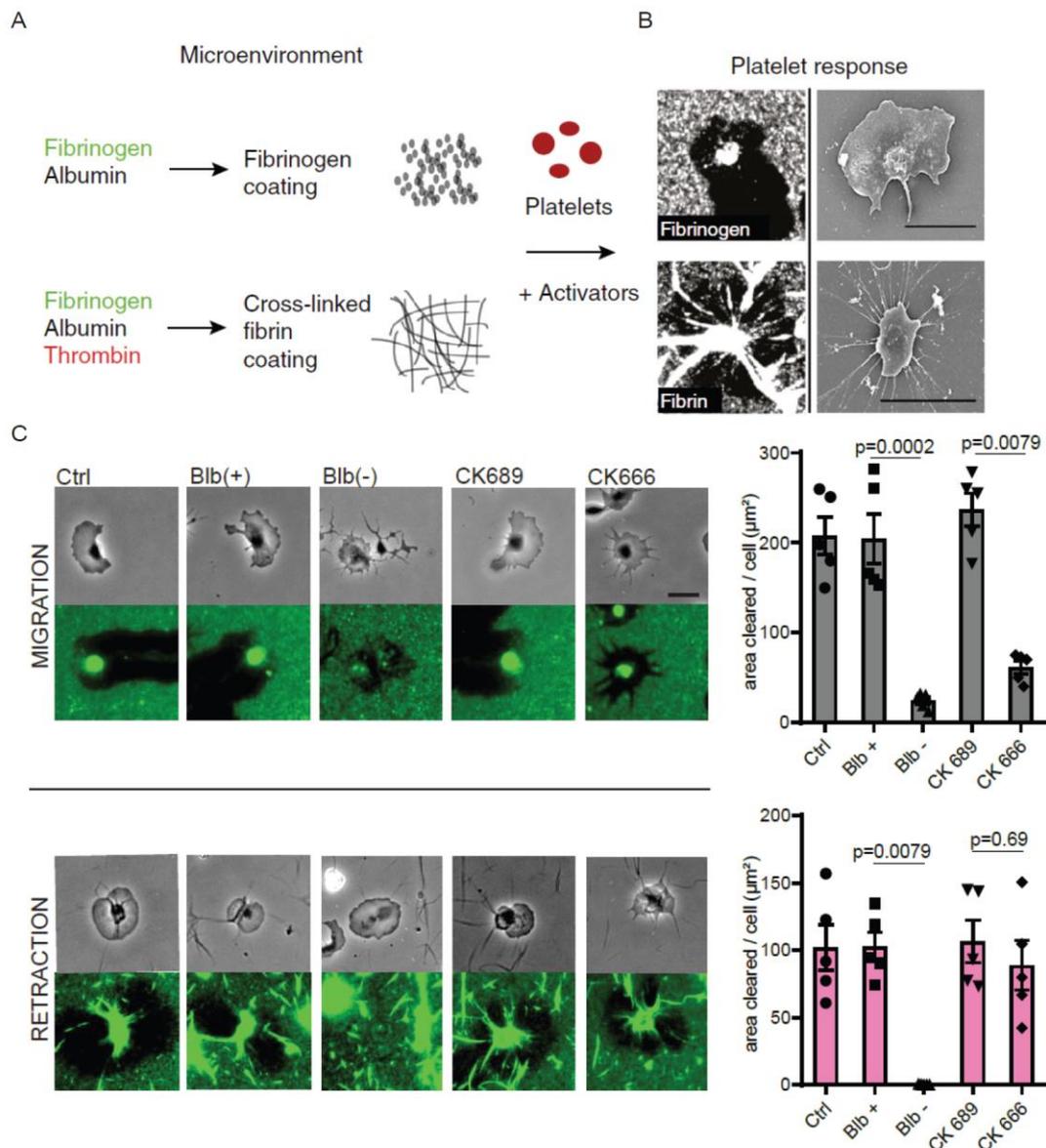


**Abbildung 1:** Untersuchung von Thrombozyten im Kontext von Inflammation und Thrombose in vivo. A, Versuchsaufbau: Injektion von Lipopolysaccharid, nach 3h Präparation des Cremasters und Intravitalmikroskopie. Hierbei zeigten sich zahlreiche einzelne, adhärenente Thrombozyten (Pfeile). B, Hochauflösende Mikroskopie am Whole Mount zeigt einzelne Thrombozyten an der Gefäßwand, welche Lamellipodien (Sterne) ausgebildet haben. C, Auswertung und Beispiel von Thrombozytenmigration im entzündeten Gefäß, erfasst mit 4D Intravitalmikroskopie. n=39 Zellen. D, Vergleich der Größe und Formparametern von rekrutierten Thrombozyten in Inflammation und Thrombose. n=39-59 Zellen. Mann-Whitney-U Test. Skala: 5µm.

Um diese so diversen Effektorprogramme besser zu verstehen, entwickelte ich einen In-Vitro Ansatz, der die lokale Umgebung, das sogenannte „Microenvironment“, von Thrombose und Inflammation nachzuahmen suchte. Hierzu beschichtete ich Flusskammern entweder mit Fibrinogen/Albumin, um so die Ablagerung von Fibrin(ogen) im Rahmen der Inflammation nachzustellen (Abbildung 2 A). Durch das Hinzufügen von Thrombin konnte ich Beschichtungen herstellen, die hochkomplexe dreidimensionale Vernetzung der Oberflächen mit sich brachten und so die Situation in einem Thrombus simulieren sollten (Abbildung 2 A).

Tatsächlich führten die beiden Substrate zu unterschiedlichen Verhaltensweisen der Thrombozyten, die die beobachteten Phänotypen in vivo widerspiegeln. Auf der unvernetzten Fibrinogen/Albumin Beschichtung kam es zu Polarisierung und Migration, während eine vernetzte Fibrinbeschichtung zu einem statischen Verhalten mit Retraktion des Substrats und fehlender Polarisierung führte

(Abbildung 2 B). Diese Beobachtungen ermöglichten es nun, gezielt Inhibitoren zu testen, welche nur das Verhalten der Zellen im inflammatorischen Kontext beeinflussten.

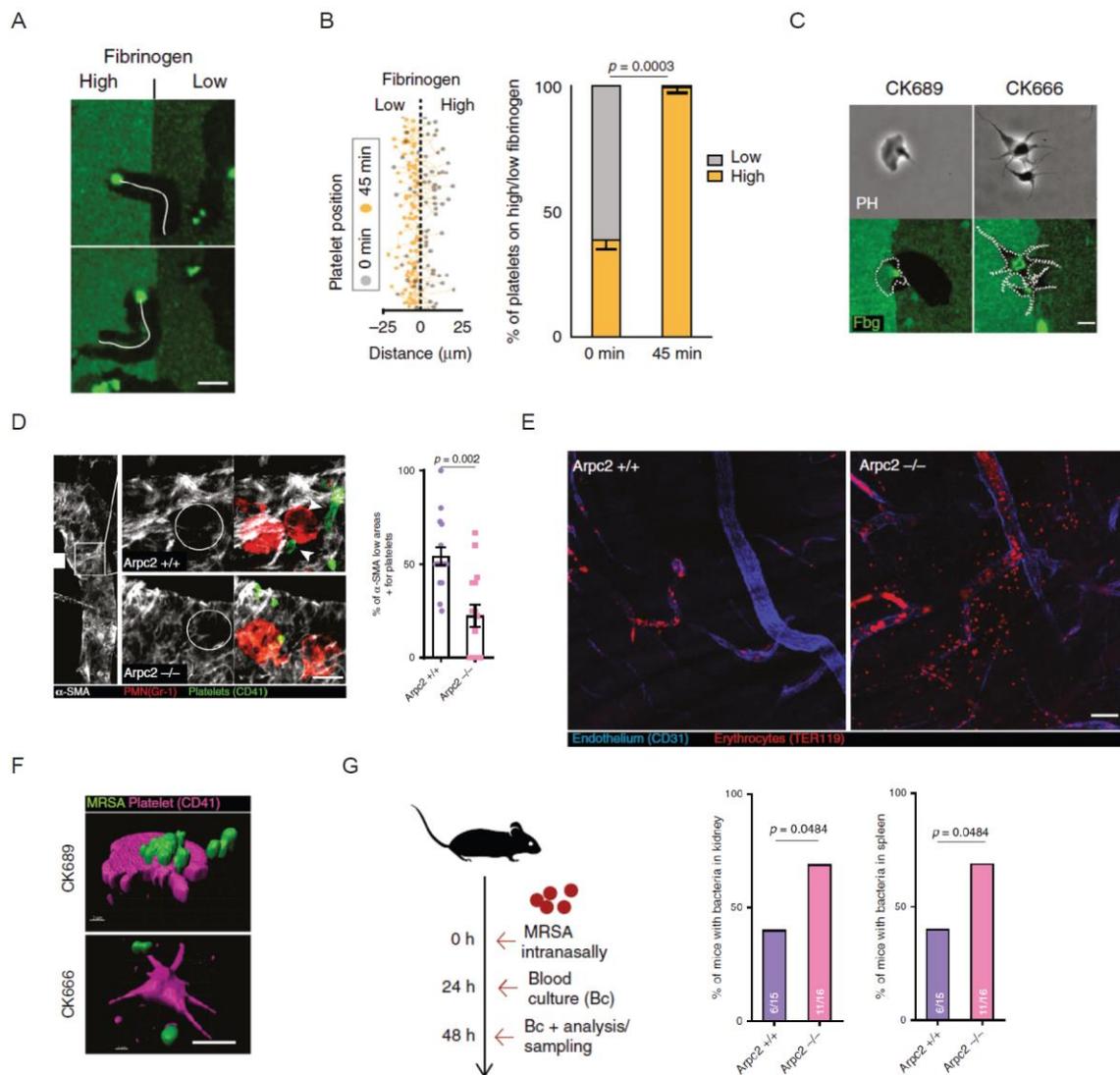


**Abbildung 2:** Untersuchung des Einflusses des „Microenvironments“ auf Verhalten von Thrombozyten. A, Entwicklung eines Ansatzes, welcher ein inflammatorisches sowie ein thrombotisches Umfeld simuliert. B, in komplexen Fibrin-Netzwerken kommt es, analog zur Situation in Thromben, zu einer Retraktion der Zellen, während nicht-vernetztes Fibrinogen zu Polarisierung und Migration führt. C, Verwendung des Setups zum Inhibitor-Screening auf Zielstrukturen, welche nur die Migration beeinflussen. Identifikation von Arp2/3, inhibiert mit CK666, als Aktin-Regulator mit lediglich einer Rolle in der Thrombozytenmigration. Im Gegensatz dazu der Myosin Inhibitor Blebbistatin (Bib-) mit Hemmung beider Effektorfunktionen. Bib +, CK689: Kontrollen. n=5 unabhängige Experimente, t-tests. Skala: 5 µm.

Diese Untersuchungen ergaben, dass das Aktin-Regulierende Protein Arp 2/3 entscheidend für die immun-responsive Migration ist, jedoch das Rektraktionsverhalten der Zellen nicht wesentlich beeinflusst, im Gegensatz zu der Inhibition von Myosin II mittels Blebbistatin, welche beide Funktionen unterdrückt. Durch die Generierung eines murinen Thrombozyten-spezifischen Knock-Out Modells von Arp 2/3 (PF4cre-Arpc2 fl/fl) konnten wir diese Hypothese weiter überprüfen. Tatsächlich zeigte

sich wie erwartet in den klassischen Thrombozytenfunktionen der Thrombosebildung und Hämostase kein Effekt einer Arp2/3 Defizienz (Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020).

Wir versuchten nun eine mögliche gerichtete Komponente der Migration zu identifizieren. Auf homogen beschichteten Oberflächen in vitro zeigten die Zellen eine zufällige Migrationsrichtung.



**Abbildung 3:** Haptotaxis in vitro und in vivo. A, Thrombozyten migrieren von niedriger zu höherer Substrat-Konzentration, farbig durch fluoreszierendes Fibrinogen markiert. B, Entscheidung von Thrombozyten in Kontakt mit verschiedenen Substratdichten führt zur Wanderung in die höhere Densität. n=256 Zellen. Skala 5 µm. C, Inhibition von Arp2/3 unterbindet Haptotaxis. D, Arp2/3 defiziente Thrombozyten im PF4cre-Arpc2fl/fl (Arpc2 -/-) Mausmodell sind seltener in Alpha-SMA niedrigen Bereichen zu finden. E, Vermehrte Mikroblutungen in der Entzündung in Arpc2 -/- Tieren. Skala 50 µm. F, In vitro Ansatz zur Untersuchung von Thrombozytenmigration auf MRSA-Biofilmen. Reduziertes Aufsammeln von Bakterien durch Arp2/3 Inhibition. Skala 5 µm. G, Mausmodell einer MRSA-Pneumonie. Erhöhte Rate an MRSA-Wachstum nach 48h in Milz und Niere von Arpc2-/- Tieren. n=15-16.

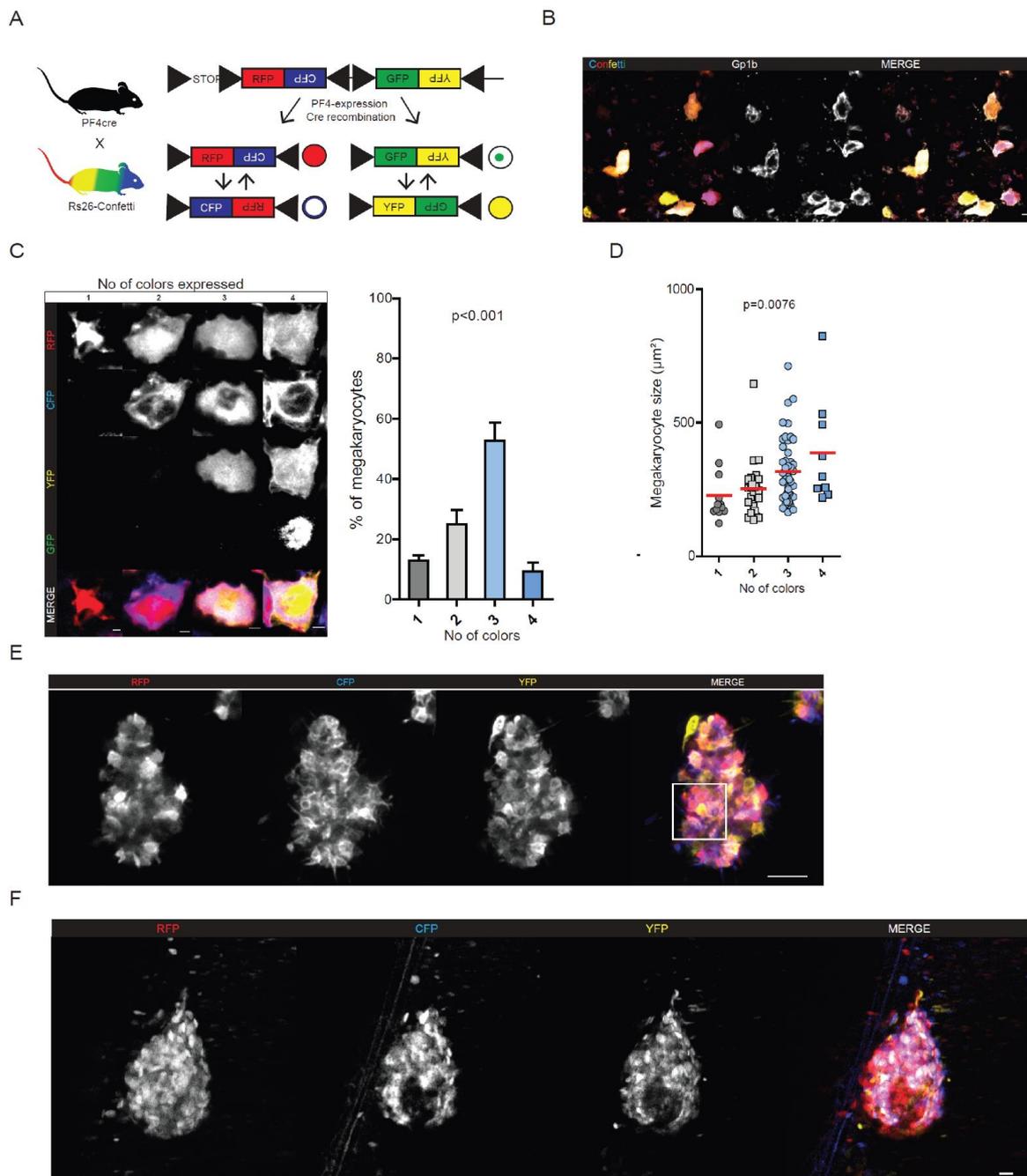
Durch eine inhomogene Beschichtung mit einem Gradienten des Substrats konnten wir nachweisen, das Thrombozyten Substrat-Gradienten folgen (Abbildung 3 A-B). Dieses Verhalten wird auch als Haptotaxis bezeichnet. Eine Inhibition von Arp 2/3 führte zu einer fehlenden Polarisierung der Zellen

zu höheren Substratdichten und war damit ein gezielter Inhibitor für Haptotaxis (Abbildung 3 C). Wir wiesen in vivo Gradienten von Fibrinogen an der Gefäßwand nach, welche eine gerichtete Migration der Thrombozyten zu endothelialen Zellkontaktstellen ermöglicht. Diese Zellkontakte sind Prädilektionsstellen für das Auswandern von Immunzellen, wodurch in diesen Bereichen auch Mikroblutungen auftreten können. Tatsächlich zeigte sich in Thrombozytenmigration-defizienten Tieren eine verminderte Abdeckung dieser nicht durch glatte Muskelzellen bedeckten ( $\alpha$ -SMA low) Bereiche durch Blutplättchen (Abbildung 3 D). Damit gingen vermehrte inflammatorische Mikroblutungen bei *Arpc2* defizienten Tieren einher (Abbildung 3 E). Dies spricht für eine Rolle der Migration in der Re-Positionierung und Identifikation von Gefäßverletzungen in der Entzündung. Außerdem bewirkte die Hemmung von *Arp 2/3* die weniger effektive Aufnahme von Methicillin-Resistenten *Staphylococcus Aureus* (MRSA) in Biofilmen (Abbildung 3 F). Dies bestätigte sich auch in einem Maus-Modell einer MRSA-Pneumonie, in welchem wir eine vermehrte Ausbreitung der Bakterien aus der Lunge in periphere Organe in migrationsdefizienten Mäusen nachweisen konnten (Abbildung 3 G).

Zusammenfassend verwenden Thrombozyten Lamellipodien, um nach Fibrin(ogen) zu scannen, das auf dem entzündeten Gefäßbett abgelagert ist; dies führt zur Polarisierung und in der Folge Migration entlang von Gradienten des adhäsiven Liganden. Die plättchenspezifische Ablation von *Arp2/3* stört die haptotaktische Neupositionierung von Plättchen zu Mikroläsionen, wodurch die Gefäßversiegelung beeinträchtigt und Mikroblutungen provoziert werden. In einem bakteriellen Infektions-Modell fördert diese gerichtete Migration das Einfangen von Bakterien durch Thrombozyten und verhindert die hämatogene Ausbreitung.

#### b. Ein Mausmodell zur Untersuchung von Thrombozyten auf Einzelzellebene

Die Visualisierung des Zellverhaltens und der Effektorfunktion auf Einzelzellebene ist entscheidend für das Verständnis von Schlüsselaspekten der Säugetierbiologie. Aufgrund ihrer geringen Größe, großen Anzahl und schnellen Rekrutierung in Thromben fehlen Daten über Schicksal und Verhalten einzelner Blutplättchen in Thrombose und Hämostase. Wir entwickelten daher ein Mausmodell zur genetischen Fluoreszenzmarkierung einzelnen Thrombozyten. Hierzu verwendeten wir die RS26-Confetti flox Genkassette, welche erfolgreich in den Neurowissenschaften, aber auch in der Immunologie angewendet wird (Livet et al., 2007; Tas et al., 2016). Dieses Konstrukt ermöglicht eine zufällige Rekombination und Expression der Farbstoffe RFP/CFP und YFP/GFP abhängig von einer Cre-getriebenen Rekombinase-Aktivität (Abbildung 4 A).



**Abbildung 4:** Ein Mausmodell zur Untersuchung von Thrombozyten auf Einzelzellebene in vivo und in vitro. A, RS-26 Confetti Genprodukt und Cre-abhängige Rekombination. B, Repräsentatives Bild der Confetti-Fluoreszenz im Knochenmark, Gp1b Färbung mit AF647. C, repräsentative Megakaryozyten mit Farbexpression von 1-4 Farben und Auswertung der Farbverteilung, n= 93 Zellen. D, Größenverteilung von Megakaryozyten abhängig der Anzahl exprimierter Farben. n= 93 Zellen. E, Beispielhafte Darstellung einzelner Thrombozyten in einem Thrombus in vitro. F, Beispielhafte Darstellung einzelner Thrombozyten in einem Thrombus in vivo.

Die Verwendung von PF4cre, eines relativ spezifischen Markers der Megakaryozyten/Thrombozyten Linie, ermöglichte eine Farbrekombination in diesen Zellen (Nicolai et al., 2021; Tiedt et al., 2007). Da Megakaryozyten mehrere Zellkerne besitzen, zeigten sich im Knochenmark dieser Tiere mehrfarbige Megakaryozyten (Abbildung 4 B). Im Laufe der Ausreifung kommt es zu einer erhöhten

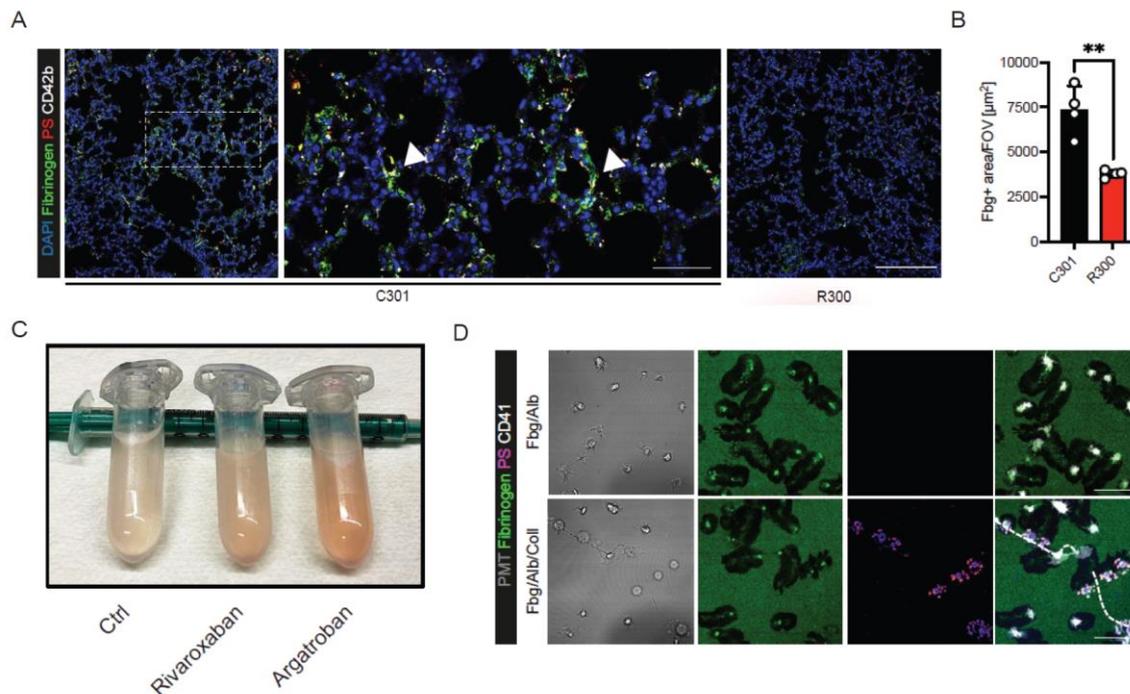
Endomitoserate und einer Zunahme der Zellgröße. Entsprechend zeigten die überwiegende Mehrheit der Megakaryozyten die Expression von drei Farben (Abbildung 4 C). Darüber hinaus korrelierte die Anzahl von exprimierten Farben mit der Größe der jeweiligen Zellen (Abbildung 4 D). Dies zeigt aber auch, dass PF4<sup>cre</sup> in Megakaryozyten nach oder zumindest während des Endomitose-Prozesses exprimiert wird, und damit eher spät in der Megakaryopoese aktiv wird. Wir konnten dies bestätigen, in dem wir die Experimente mit einem frühen Megakaryozyten-Marker, vWF<sup>cre</sup>, wiederholten. Megakaryozyten von diesen Tieren zeigten nur ein bis zwei Farben.

Die Untersuchung von Thrombozyten isoliert aus PF4<sup>cre</sup>-Confetti Tieren zeigte eine robuste Farbexpression mit einer Farbabstufung in den jeweiligen einzelnen Thrombozyten. Wir führten erweiterte Thrombozyten-Funktionstestungen der Tiere *in vitro* und *in vivo* aus, um eine Einschränkung der Megakaryozyten- oder Thrombozytenfunktion in diesen Tieren auszuschließen (Nicolai et al., 2021). Als nächstes untersuchten wir *in vitro* generierte Thromben mittels konfokaler Mikroskopie. Das Reporter-Modell ermöglichte, multiple einzelne Thrombozyten durch Farbvarianz innerhalb des komplexen Thrombus zu identifizieren und zu verfolgen (Abbildung 4 E). Außerdem konnten morphologischen Eigenschaften direkt visualisiert werden: Es zeigte sich eine ausgeprägte Ausbildung von nadelartigen Fortsätzen, sogenannten Filopodien, durch Thrombozyten die in Thromben rekrutiert wurden (Abbildung 4 E). Außerdem zeigten die Thrombozyten innerhalb des Thrombus eine deutliche Motilität, welche sich auch mithilfe der Fluoreszenzmarkierung gut verfolgen ließ. Wir bestätigten, dass dieses Modell auch *in vivo* von Nutzen sein kann: Wir visualisierten die Thrombusbildung in einem Mesenterialgefäß mittels Eisen-(III)Chlorid Verletzung, und konnten hierbei auch einzelne Thrombozyten in den entstehenden Thromben darstellen (Abbildung 4 F). Auch hier zeigte sich eine ausgeprägte Filopodien-Ausbildung ohne Hinweis auf Lamellipodien (Schurr et al., 2019). Auch die Prozesse der Thrombusretraktion konnten durch das Verfolgen einzelner Thrombozyten *in vivo* sehr genau aufgelöst werden. Zusammenfassend erwies sich die mehrfarbige Thrombozyten- Reportermauslinie als nützlich, um das Verständnis der Thrombozyten- und Megakaryozytenbiologie auf Einzelzellebene zu erweitern. Dies ermöglicht neue Einblicke insbesondere in die molekularen Mechanismen der Thrombose.

### c. Ein neuer Mechanismus des Zusammenspiels von Koagulation und Thrombozyten in der Inflammation

Die Beeinträchtigung der Gefäßintegrität ist ein Kennzeichen entzündlicher Erkrankungen. Ich konnte bereits zeigen, dass einzelne immunresponsive Thrombozyten migrieren und sich so zu Stellen mit Gefäßverletzungen positionieren, um Mikro-Blutungen zu verhindern (siehe Abschnitt 2 a). Es bleibt

jedoch unklar, wie einzelne Blutplättchen die Gefäßintegrität aufrechterhalten, sobald sie auf

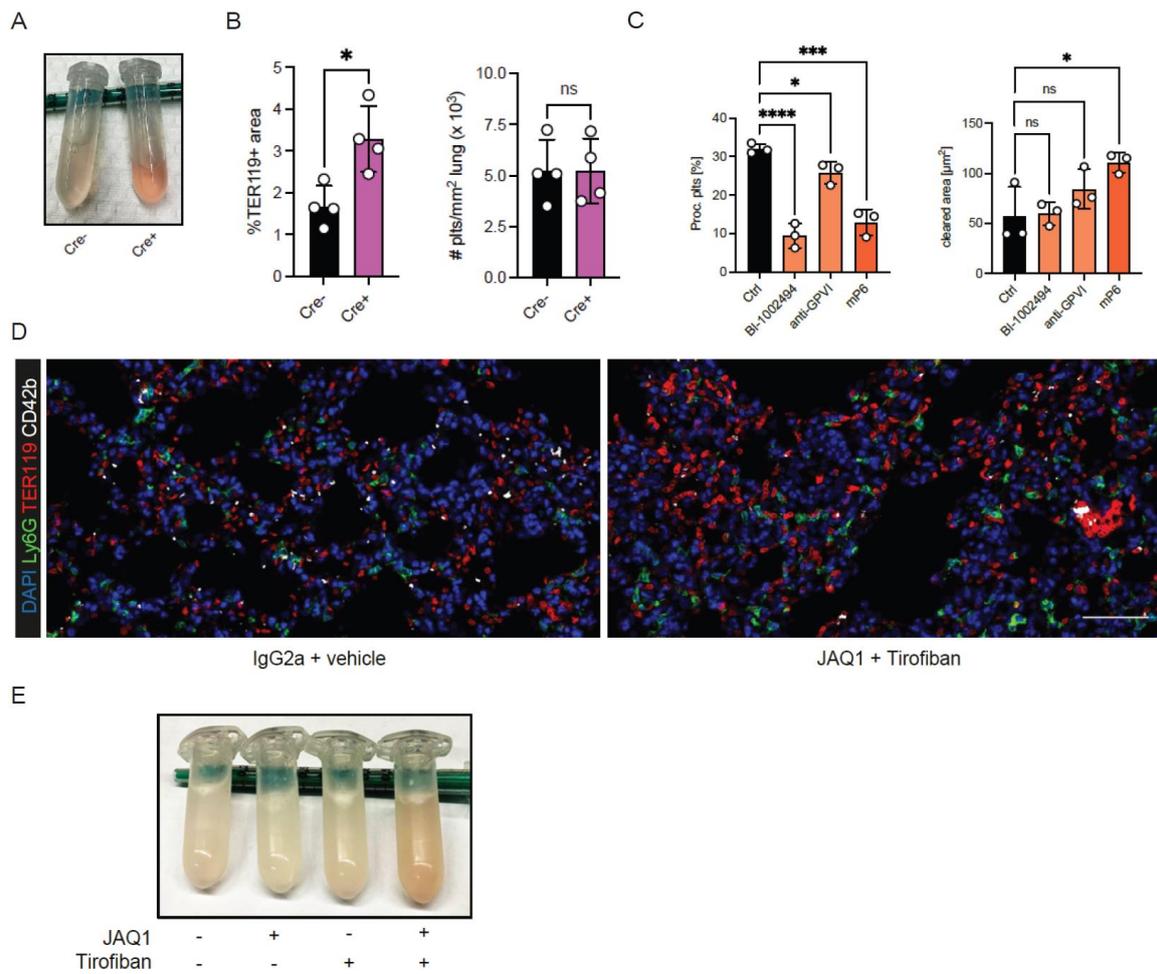


**Abbildung 5:** Zusammenspiel von Thrombozyten und Gerinnung in der Verhinderung von inflammatorischer Blutung. A-B, Lungenhistologie in ARDS-Mäusen, ausgelöst durch intranasale Gabe von Lipopolysaccharid. Nach Thrombozytendepletion mit R300 ist eine reduzierte Ablagerung von Fibrin(ogen) augenscheinlich. n=4 Mäuse pro Gruppe. Skala: 20 µm. C, Beispielhafte bronchoalveoläre Lavage von Kontrollen, Rivaroxaban (Faktor X Hemmer), und Argatroban (Faktor II Hemmer) behandelten ARDS Mäusen. D, In vitro Setup zur Untersuchung von Thrombozyten im Kontext von Mikroverletzungen durch Beschichtung mit Fibrinogen und Kollagenfibrillen (Gestrichelte Linien). Phosphatidylserin (PS) Expression nach Kontakt mit Kollagenfibrillen. Skala: 5 µm.

Endotheldefekte stoßen (Ho-Tin-Noé et al., 2018). Ein Mechanismus scheint die direkte physikalische Abdichtung von Defekten zu sein, aber auch eine Aktivierung des Tie2 Signalwegs in Endothelzellen scheint zur vaskulären Integrität beizutragen (Braun et al., 2020; Ho-Tin-Noé et al., 2018). Inwiefern die Gerinnungskaskade eine Rolle in diesem Prozess spielt, ist unklar.

Wir konnten zeigen, dass in einem durch LPS ausgelöstem ARDS-Modell in der Maus die Depletion von Thrombozyten mittels Antikörpern nicht nur zu einer ausgeprägten Hämorrhagie führt, sondern auch die Ablagerung von Fibrin in den Gefäßen der Lunge deutlich reduziert (Abbildung 5 A und B). Gleichzeitig führte eine Hemmung der plasmatischen Gerinnungskaskade mittels direktem Faktor Xa Inhibitor (Rivaroxaban) oder Faktor IIa Inhibitor (Argatroban) zu einer deutlichen Zunahme von alveolären Blutungen im ARDS-Modell (Abbildung 5 C). Somit stellte ich die Hypothese auf, dass (1) die Koagulationskaskade eine wichtige Rolle in der Verhinderung von inflammatorischen Blutungen spielt und (2) diese durch Thrombozyten aktiviert wird. Um die zugrundeliegenden Mechanismen

näher zu untersuchen, entwickelten wir einen in vitro Ansatz, welcher durch die Beschichtung einer Oberfläche mit Fibrinogen und Kollagenfibrillen das Microenvironment simuliert, auf welches Thrombozyten bei Unterbrechung des Endothels treffen (Abbildung 5 D) (Coughlin, 2005). Interessanterweise kam es zu einer Phosphatidylserin (PS) -Exposition und Transformation in prokoagulante Zellen nach Kontakt mit Kollagenfibrillen (Abbildung 5 D). Thrombozyten, welche durch eine Arp2/3 Defizienz nicht in der Lage waren, zu Kollagenfibrillen zu wandern, zeigten eine reduzierte prokoagulante Aktivierung, und Oberflächen ohne Kollagenzugabe führten nur zu einer



**Abbildung 6:** Das Zusammenspiel von GPVI und GPIIB/IIIa, sowie prokoagulanter Funktion in der Verhinderung inflammatorischer Blutungen. A, Vergleich von bronchoalveolärer Lavage (BAL) zwischen Kontrollen (Cre-) und PF4Cre+ CypD fl/fl Tieren (Cre+), welche ein vermindertes Potential zur prokoagulanten Aktivierung haben. B, Histologische Auswertung von ARDS Lungen zeigt vermehrte Erythrozyten (TER119) bei gleicher Thrombozytenzahl in PF4Cre+ CypD fl/fl Tieren im Vergleich zu Kontrollen. n=4 pro Gruppe. C, in vitro Untersuchung zum Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die prokoagulante Funktion und Migration. mP6 unterbindet Outside-In Signaling via GPIIB, anti-GPVI inhibiert GPVI, und BI1002494 hemmt Syk downstream von GPVI. D, Vermehrte Blutung in der histologischen Auswertung von GPVI depletierten (JAQ1) und GPIIB/IIIa inhibierten (Tirofiban) Mäusen. E, Beispielhafte BAL bei Kontrollen, GPVI depletierten (JAQ1), GPIIB/IIIa inhibierten (Tirofiban) oder in Kombination behandelten Mäusen. Skala 50 µm.

vernachlässigbaren PS-Exposition (Kaiser et al., 2022). Prokoagulante Thrombozyten entstehen nach starker Aktivierung und bilden ein Gerüst für die Funktion von Gerinnungsfaktoren. Wir konnten auch

in unserem Ansatz bestätigen, dass die PS-positiven Thrombozyten Thrombin umsetzen. Ich stellte daher die Hypothese auf, dass Thrombozyten im entzündeten Gefäßsystem über prokoagulante Aktivierung, welche in Thrombozyten von der mitochondrialen Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase Cyclophilin D(CypD) abhängig ist, die Gerinnungskaskade aktivieren. Wir generierten daher konditionale PF4cre-CypD fl/fl Knock-Out Mäuse, und konnten in diesen Tieren eine vermehrte Blutung im ARDS-Modell nachweisen (Abbildung 6 A-B) (Denorme et al., 2020; Kaiser et al., 2022). Die prokoagulante Aktivierung ist auch zum Teil von der Membran-Flippase TMEM16F abhängig (van Kruchten et al., 2013). Patienten, welche unter einer TMEM16F loss-of-function Mutation leiden, haben eine milde Blutungsdiathese (Lhermusier et al., 2011). Tatsächlich ließ sich der Phänotyp von vermehrten inflammatorischen Blutungen auch im PF4cre-TMEM16F Mausmodell bestätigen.

Wir konnten hiermit erstmals eine wichtige physiologische Rolle von Koagulationsaktivierung durch prokoagulante Thrombozyten in der Inflammation zeigen. Ziel war es nun, die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu verstehen. Unser in vitro-Assay zeigte ja eine prokoagulante Transformation nach Kontakt mit Kollagen. Dies legt nahe, dass eine duale Stimulation von Thrombozyten über den GPIIB Rezeptor, welche die Bindung an Fibrin(ogen) ermöglicht, und einem der thrombozytären Kollagen-Rezeptoren zu einer prokoagulanten Aktivierung führt. Tatsächlich zeigte sich unter Verwendung eines intrazellulären Kalzium-Indikators ein supramaximaler Kalzium-Anstieg, welcher der PS-Exposition vorausging. Wir untersuchten daher die involvierten zellulären Signalwege. Es bestätigte sich eine wichtige Rolle des GPIIBIIIA abhängigen Outside-In Signalwegs, da die Zugabe eines Inhibitors (mP6), welcher die Galpha13 Bindung blockiert, die prokoagulante Transformation hemmte. Außerdem konnten wir unter Verwendung eines GPVI-blockierenden Antikörpers als auch eines Syk-Signalweg-Inhibitors zeigen, dass das notwendige zweite Aktivierungssignal über die GPVI-Syk Signalkaskade wahrgenommen wird (Abbildung 6 C).

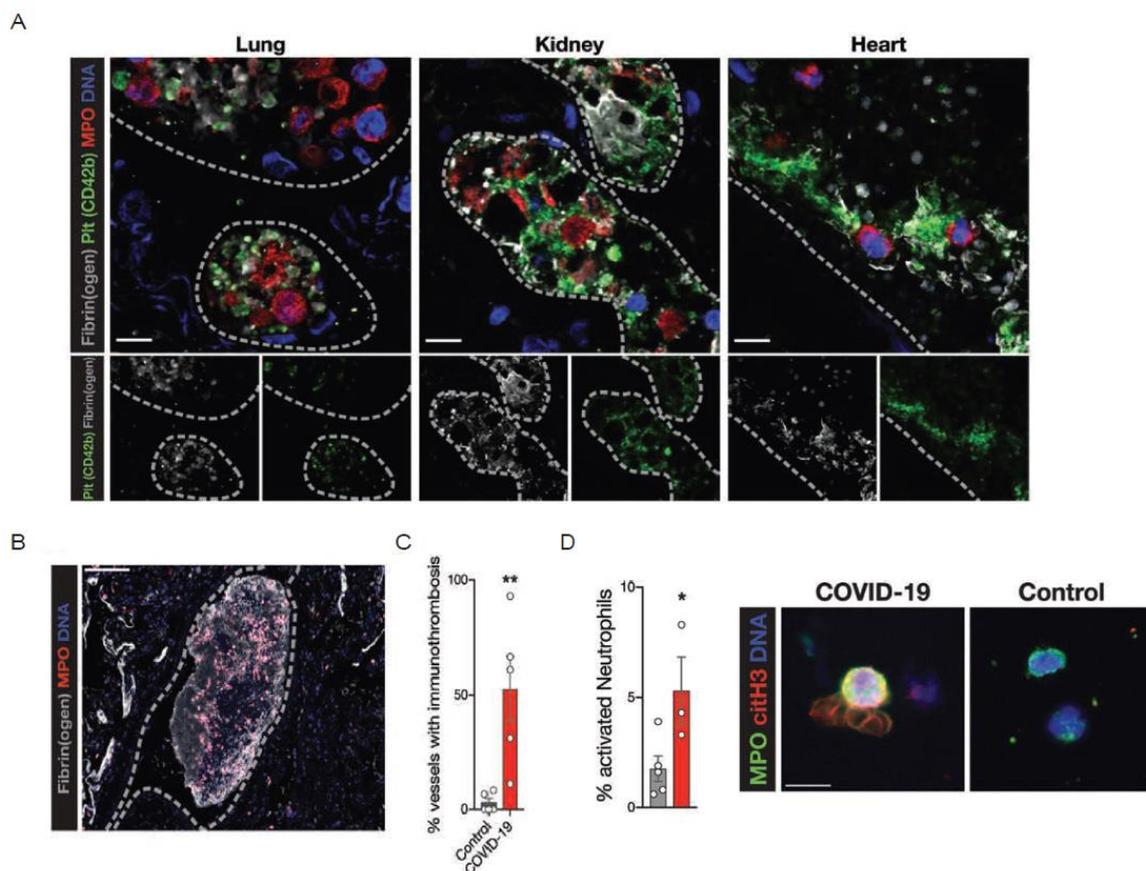
Wir strebten nun an, dies auch im Tiermodell zu bestätigen. Hierzu erfolgte eine Depletion des GPVI Rezeptors von Thrombozyten mittels JAQ-1 Antikörper (Massberg et al., 2003). Direkt vor Auslösung des ARDS wurde außerdem eine Hemmung von GPIIB mittels Tirofiban unternommen. Diese Versuche konnten bestätigen, dass die duale Inhibition die prokoagulante Funktion in vivo hemmt und so wiederum inflammatorische Blutungen provoziert, die histologisch und in der BAL nachweisbar waren (Abbildung 6 D-E).

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass die prokoagulante Transformation von migrierenden Blutplättchen durch Ko-Stimulation über Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (GPIIBIIIA)/ $\alpha\text{13}$ -vermittelte Outside-In-Signale und GPVI-Signale initiiert wird. Dadurch wird die Gerinnungskaskade nur gezielt an Stellen aktiviert, wo eine (Mikro-) Verletzung der Gefäßintegrität vorliegt, die durch patrouillierende

Blutplättchen identifiziert werden. Der plättchenspezifische genetische Verlust von entweder CypD oder TMEM16F sowie die kombinierte Blockade von Plättchen-GPIIb/IIIa und GPVI reduzieren die prokoagulante Transformation *in vivo* und verstärken entzündliche Lungenblutungen.

#### d. Immuno-thrombose in COVID-19

Erkenntnisse aus unserem Labor zeigen eine weitreichende Verknüpfung von Thrombose und Inflammation. Die zugrundeliegenden Daten sind überwiegend im Tiermodell erhoben worden, translationale Daten fehlen hier weitestgehend. Im Rahmen der COVID-19 Pandemie zeigte sich bereits früh, dass venöse und arterielle Thrombosen bei den betroffenen Patienten vermehrt auftraten (Malas et al., 2020; Modin et al., 2020). Dies legte auch in der SARS-CoV-2 Infektion eine

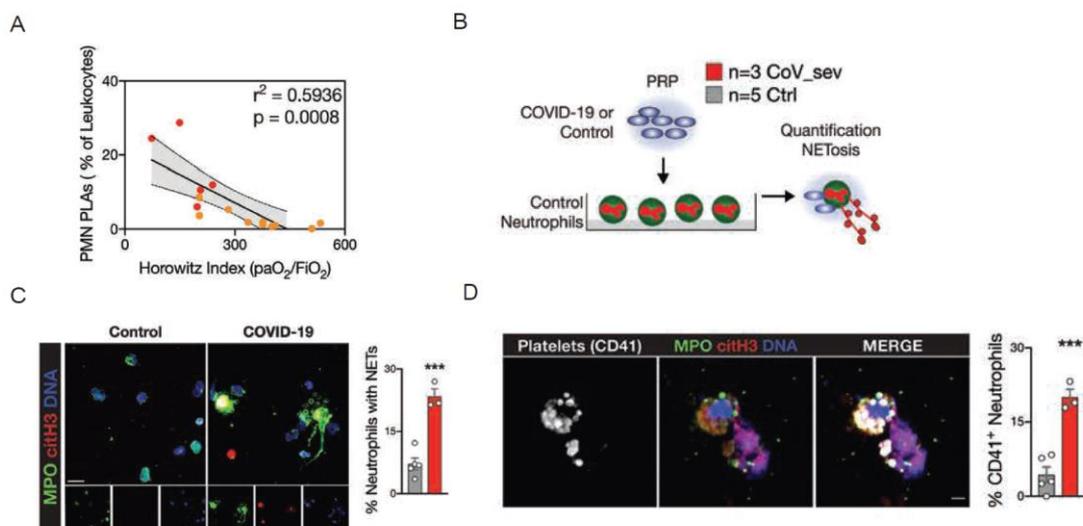


**Abbildung 7:** Evidenz für Immuno-thrombose in COVID-19. A, Histologische Untersuchungen von Lungen, Nieren und Herzgewebe von COVID-19 erkrankten Patienten. Es zeigen sich thrombotische Verschlüsse bestehend aus Thrombozyten, Neutrophilen Granulozyten und Fibrin(ogen) in den untersuchten Organen. Skala 10µm. B, Beispielhaftes Übersichtsbild eines großen Thrombus reich an MPO+ Neutrophilen Granulozyten in der Lunge. C, Erhöhte Anzahl von Gefäßen mit immuno-thrombotischen Verschluss in COVID-19 Patienten im Vergleich zu Kontrollen. n=5 pro Gruppe. D, Untersuchung isolierter Neutrophiler Granulozyten von Kontroll- und COVID-19 erkrankten Patienten. n=3-5 pro Gruppe.

immuno-thrombotische Aktivierung nahe, welche gänzlich unterstanden war.

Wir führten daher eine translationale Studie durch, um die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu verstehen. Insgesamt 62 Probanden wurden in unsere Studie eingeschlossen (n = 38 Patienten mit Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion – bestätigtem COVID-19 und n = 24 Nicht-COVID-19-Kontrollen). Wir führten eine histopathologische Bewertung von Autopsiefällen, Oberflächenmarker-basierte Phänotypisierung von Neutrophilen und Blutplättchen sowie funktionelle Assays für Thrombozyten-, und Neutrophilenfunktionen sowie Gerinnungstests durch.

Wir konnten zeigen, dass es in der Lunge, aber auch der Niere und dem Herzen von an COVID-19 verstorbenen Patienten zu thrombotischen Verschlüssen von kleineren Gefäßen kam. In diesen Mikro-Thromben ließen sich nicht nur Thrombozyten und Fibrin nachweisen, sondern auch zahlreiche neutrophile Granulozyten (Abbildung 7 A-C). Dies legte eine thrombo-inflammatorische Komponente der Thrombusbildung nahe. Wir bestätigten auch, dass das Fibrin-Abbauprodukt D-Dimer bei COVID-19 stark erhöht ist (Mittelwert 1,93 pg/ml), mit 65 % (13/20 Patienten) von mittelschweren und allen



**Abbildung 8:** Mechanismen der Immuno-thrombose in COVID-19. A, Lineare Regressionsanalyse zwischen Neutrophilen-Thrombozyten Aggregaten im Blut (PMN PLAs) und Oxygenierungsindex Horowitz. n=10 CoV\_int, n=5 CoV\_sev. B-D, Untersuchung isolierter Neutrophiler Granulozyten von gesunden Probanden, Inkubation mit thrombozytenreichem Plasma von gesunden Kontrollen oder COVID-19 Patienten. (B), Schematischer Versuchsaufbau. (C), Färbung von DNA-citH3-MPO positiven NETs und Quantifizierung. n=3-5 pro Gruppe. (D), Bindung von Thrombozyten an Neutrophile Granulozyten.

(11/11 Patienten) Patienten mit schwerer COVID-19 Erkrankung über dem Referenzbereich, was auf eine konstante Aktivierung der Gerinnungskaskade hinweist (Nicolai, Leunig, Brambs, Kaiser, Weinberger, et al., 2020). Zusätzlich zeigten neutrophile Granulozyten von COVID-19 Patienten einen hyperreaktiven Phänotyp im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abbildung 7 D).

Thrombozyten können eine Schlüsselrolle insbesondere in der intravasalen Aktivierung von neutrophilen Granulozyten spielen (Clark et al., 2007). Wir führten daher eine erweiterte Phänotypisierung von Thrombozyten in COVID-19 durch. Hierbei zeigte sich ein insgesamt hyporeaktives Muster der Thrombozyten, a.e. bei gleichzeitiger Aktivierung und Rekrutierung in die Lunge der Patienten. Tatsächlich zeigten sich auch vermehrt zirkulierende Thrombozyten-Neutrophilen Aggregate, welche mit der Schwere der Lungenschädigung, die über den Oxygenierungs-Index Horowitz abgeschätzt wurde, positiv korrelierten. Zusammengenommen sprechen diese Daten für eine spezifische Aktivierung von Thrombozyten in COVID-19, welche dann Auswirkungen auf neutrophile Granulozyten hat. Wir untersuchten diesen Aspekt gezielt, in dem wir gesunde neutrophile Granulozyten mit Thrombozyten-reichem Plasma (PRP) von COVID-19 und Kontrollpatienten inkubierten (Abbildung 8 B). Dieser Versuch zeigte eindrücklich, dass Thrombozyten COVID-19 erkrankter Patienten vermehrt an neutrophile Granulozyten adhärten und starke Auslöser von NETose waren (Abbildung 8 C-D). Tatsächlich konnten wir auch in den Autopsie-Schnitten der verstorbenen COVID-19 Patienten NETose in der Mikrovaskulatur, assoziiert mit Fibrinablagerungen, nachweisen.

Zusammenfassend liefern wir Beweise dafür, dass Organbeteiligung und prothrombotischer Zustand in der COVID-19 Erkrankung durch das Konzept Immunthrombose miteinander verbunden sind. Wir zeigen, dass bei COVID-19 mikrovaskuläre Thromben in Lunge, Niere und Herz vorhanden sind, die NETs enthalten, welche wiederum mit Blutplättchen und Fibrin assoziiert sind. Patienten mit COVID-19 weisen im Blut Neutrophilen-Thrombozyten-Aggregate und ein spezifisches Aktivierungsmuster von Neutrophilen und Thrombozyten auf, das sich mit der Schwere der Erkrankung ändert. Während moderate Schwerefälle einen hyporeaktiven Thrombozyten- und Neutrophilen-Phänotyp aufweisen, sind Patienten, die sehr schwer von COVID-19 betroffen sind, durch eine übermäßige Thrombozyten- und Neutrophilen-Aktivierung im Vergleich zu gesunden Kontrollen als auch zu Patienten mit Nicht-COVID-19-Pneumonie gekennzeichnet. Korrelationsanalysen weisen außerdem darauf hin, dass Marker für dysregulierte Immunthrombose bei COVID-19 sowohl mit der Schwere des ARDS als auch mit systemischer Hyperkoagulabilität zusammenhängen. Es ist daher davon auszugehen, dass eine immunthrombotische Dysregulation ein Schlüsselaspekt der Pathophysiologie von COVID-19 ist. Wir schlagen so die Brücke von präklinischer und klinischer Forschung zum Thema Immunthrombose und decken mögliche neue therapeutische Ansätze auf.

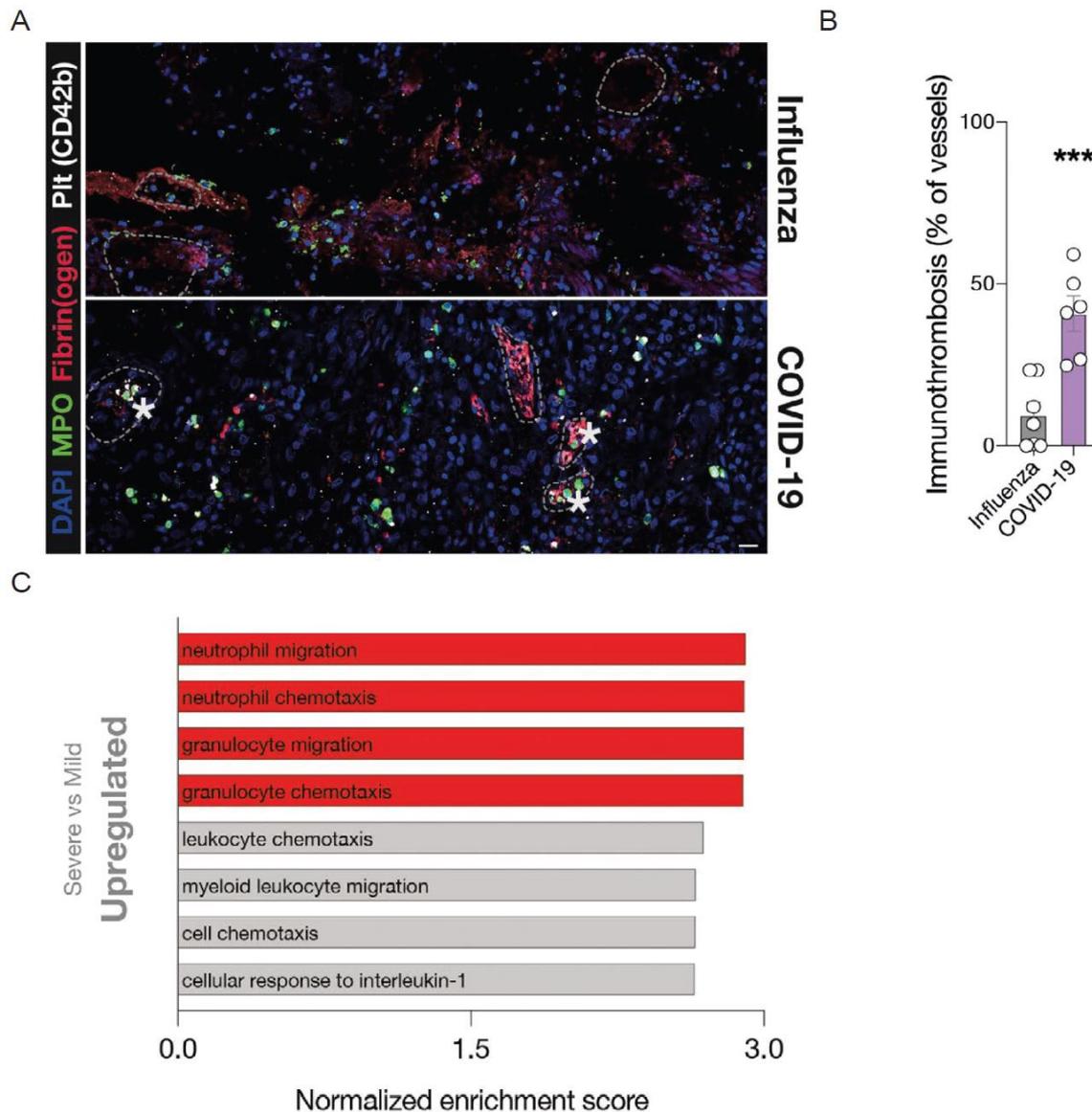
### e. Vergleich von Immunothrombose in COVID-19 zu Influenza Pneumonie

Eine Infektion mit SARS-CoV-2 kann zu einer schweren Lungenentzündung mit ARDS, aber auch zu thrombotischen Komplikationen und nicht-pulmonalem Organversagen führen. Untersuchungen aus unserem Labor und anderen legen nahe, dass die intravaskuläre Neutrophilenaktivierung und die anschließende Immunzell-getriggerte Immunthrombose ein zentraler Pathomechanismus ist, der das heterogene Krankheitsbild der Coronavirus-Erkrankung 2019 (COVID-19) erklärt (siehe auch Abschnitt 2 d) (Bonaventura et al., 2021). Aber auch in anderen inflammatorischen Erkrankungen wird eine immunothrombotische Aktivierung postuliert (Stark & Massberg, 2021). So ist zum Beispiel in der Influenza-Pneumonie eine Aktivierung von Thrombozyten und intravasaler Gerinnung nachgewiesen worden (Boilard et al., 2014). Wir wollten daher untersuchen, ob Immunthrombose ein pathognomonischer Faktor bei COVID-19 oder ein allgemeines Merkmal von (viraler) Lungenentzündung ist.

Hierzu erfolgte der histopathologische Vergleich von SARS-CoV-2 mit von H1N1 Influenza betroffenen Lungen, welche wir in Zusammenarbeit mit der Gruppe um Prof. Boor in Aachen untersuchten. Immunfluoreszenzfärbungen konnten hierbei zeigen, dass die Rekrutierung vaskulärer neutrophiler Granulozyten, NETose und nachfolgende Immunthrombose typische Merkmale von schwerem COVID-19 sind, und weniger ausgeprägt bei Influenza-Pneumonie vorliegen (Abbildung 9 A-B). Als nächstes versuchten wir besser zu verstehen, wie die lokale Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten funktioniert. Ko-Färbungen von neutrophilen Granulozyten und monozytären Zellen zeigten, dass aktivierte neutrophile Granulozyten in der Lunge typischerweise in physischer Assoziation mit Monozyten sind (Nicolai, Leunig, Brambs, Kaiser, Joppich, et al., 2020).

Um dies weiter zu untersuchen, kombinierten wir klinische Daten von COVID-19-Fällen mit umfassender Immunzell-Phänotypisierung und einer Re-Analyse von scRNA-seq-Daten der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit von schwer- und moderat erkrankten Patienten (Liao et al., 2020). Wir konnten zeigen, dass eine HLA-DR<sup>low</sup>-CD9<sup>low</sup> Monozytenpopulation bei schwerem COVID-19 im Blut expandiert. Diese Population korreliert positiv mit der Schwere der Lungenschädigung, die über den Oxygenierungs-Index Horowitz abgeschätzt wurde. Außerdem konnten wir mithilfe der Re-Analyse der RNA Sequenzierungsdaten aus der BAL von Patienten mit COVID-19 nachweisen, dass auch in der Lunge eine HLA-DR<sup>low</sup>-CD9<sup>low</sup> Monozytenpopulation vorliegt. Wir führten nun eine Signalweg-Analyse durch, welche aufzeigte, dass diese Population bei hoher Erkrankungsschwere Transkripte mit einer Rolle in der Neutrophilenmigration und -chemotaxis hochregulierte (Abbildung 9 C). Entsprechend konnten wir vermehrte Transkription von Chemokinen wie CCL2, CCL3, CCL4 und

CXCL8 nachweisen (Nicolai, Leunig, Brambs, Kaiser, Joppich, et al., 2020). Diese wurden bei schwer erkrankten Patienten hauptsächlich durch die HLA-DR<sup>low</sup>-CD9<sup>low</sup> Monozyten-Subpopulation in der



**Abbildung 9:** Vermehrte Immunothrombose in COVID-19 im Vergleich zu Influenza Pneumonie. A, Beispielhafte Immunofluoreszenzfärbungen von Lungenschnitten von COVID-19 im Vergleich zu Influenza Patienten. B; Quantifikation der von Immunothrombose betroffenen Gefäßen n=6-7 pro Gruppe. C, In silico Reanalyse eines publizierten Einzelzell-RNA Sequenzierungsdatensets von Liao et al. (Liao et al., 2020) Hochregulation von Neutrophilen-Chemotaxis Genen in monozytären Makrophagen aus der bronchoalveolären Lavage von schwer an COVID-19 im Vergleich zu leicht erkrankten Patienten.

Lunge exprimiert.

Zusammenfassend weisen unsere Daten darauf hin, dass eine monozytäre Sub-Population in der Lunge und im Blut von Patienten mit schwerer COVID-19 Pneumonie expandiert, welche Neutrophilen- Chemokine in der Lunge freisetzen kann. Dies könnte wiederum die Expansion von

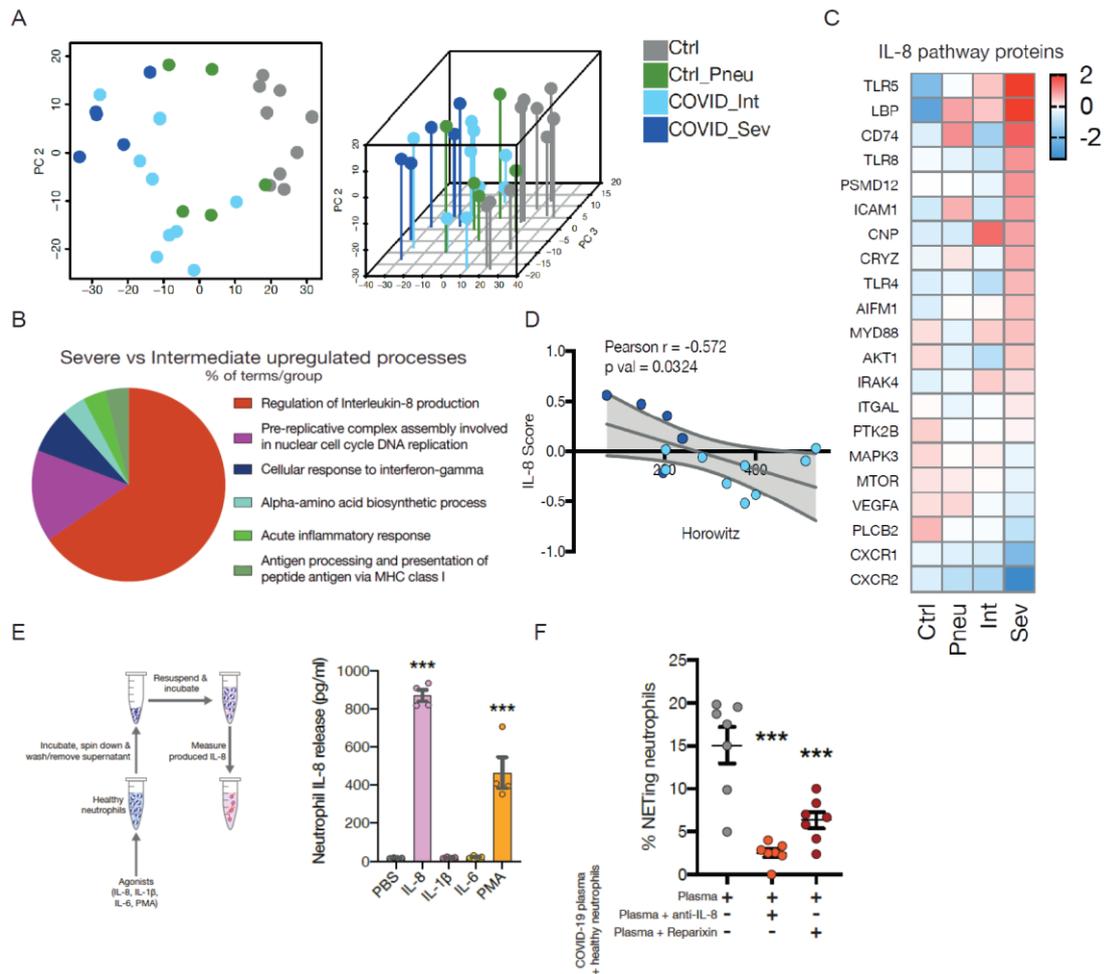
neutrophilen Granulozyten und Rekrutierung dieser in die Lunge in den späten Stadien von schwerem COVID-19 erklären.

Unsere Daten unterstreichen eine fehlgeleitete Achse des angeborenen Immunsystems, welche bei schwerer SARS-CoV-2-Infektion zur lokalen Organschädigung beitragen kann und bei COVID-19 ausgeprägter als bei Influenza-Pneumonie vorliegt.

#### f. IL-8 als Regulator der Neutrophilenfunktion in COVID-19 ARDS

Neutrophile stellen eine kritische Verteidigungslinie gegen verschiedene Krankheitserreger dar. Dies beruht auf ihrer kurzen Reaktionszeit, raschen Infiltration von entzündetem Gewebe und hohen Phagozytose-Kapazität, gepaart mit der Möglichkeit, NETs, Proteasen und Sauerstoffradikale freizusetzen (Lehman & Segal, 2020). Sie können aber über die gleichen Mechanismen auch zur sogenannten Immunpathologie beitragen, also der Schädigung des eigenen Organismus durch eine fehlgerichtete Immunfunktion (Medzhitov et al., 2012). In COVID-19 haben jüngste Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe und anderen proinflammatorische und prothrombotische Funktionen von neutrophilen Granulozyten hervorgehoben, die zu Lungenschädigung und akutem Atemnotsyndrom (ARDS) bei Patienten mit COVID-19 beitragen (Middleton et al., 2020; Nicolai, Leunig, Brambs, Kaiser, Joppich, et al., 2020). Um den Phänotyp von Immunzellen besser zu verstehen, haben sich in den letzten Jahren Omics-Methoden etabliert, die eine Analyse der mRNA Transkription, als auch Proteindiagnostik erlauben (Ando et al., 2020). In Bezug auf neutrophile Granulozyten in COVID-19 war zunächst nur die Untersuchung mittels RNA-Sequenzierung erfolgt (Schulte-Schrepping et al., 2020). Diese Methode ist bei neutrophilen Granulozyten von reduzierter Aussagekraft, da (1) dieser kurzlebige Zelltyp nur eingeschränkte Transkription und Translation betreibt, und (2) Aspekte wie Degranulierung, einer der Schlüsselfunktionen von neutrophilen Granulozyten, nicht abgedeckt werden.

Wir führten daher eine Proteom-Analyse von FACS-gesorteten neutrophilen Granulozyten durch. Hierzu verwenden wir modernste Massenspektrometrie-basierte Proteomik. Wir verglichen 4 Gruppen: Gesunde Kontrollen, Patienten mit nicht-COVID-19 Pneumonie, und schwer sowie intermediär erkrankte COVID-19 Patienten. Eine Principal Component Analyse (PCA) zeigte ein separates clustern der jeweiligen Gruppen. Dies bestätigt spezifische Veränderungen des Neutrophilen-Proteoms abhängig von Erkrankungsart und -schwere (Abbildung 10 A). Wir bestätigten einen CD10low unreifen Phänotyp der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten in COVID-19 (Zhou et al., 2020). Als nächstes konzentrierten wir uns auf Unterschiede im Neutrophilen-Proteom zwischen intermediär erkrankten Patienten und Patienten mit ARDS, da gezeigt werden konnte, dass



**Abbildung 10:** IL-8 als Regulator der Neutrophilen-Funktion in schwerem COVID-19. A, Principal Component Analyse (PCA) von Neutrophilen Granulozyten von Patienten. Proteine mit einem adjustierten p-Wert < 0.1 wurden eingeschlossen. B, ClueGo hochregulierte Protein-Signalwege im Vergleich zwischen intermediärem und schwerem COVID-19. C, Heatmap der Expression von Proteinen im IL-8 Signalweg in den definierten Gruppen. D, Lineare Regressionsanalyse von Oxygenierungsindex (Horowitz index (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>)) und D-Dimer (µg/ml) von COVID-19 Patienten. n=5 schwere and 9 intermediäre COVID-19 Patienten. E Ansatz zur Untersuchung von IL-8 Produktion in vitro. Links: Setup, Rechts; Interleukin 8 Produktion. One-way ANOVA mit post-hoc Dunnett’s multiple comparisons test. n=4 F, In vitro Ansatz zur Untersuchung des Effekts von IL-8 auf Neutrophilen-Aktivierung. Quantifizierung von NETose dargestellt als % der Kontroll-Neutrophilen, stimuliert mit COVID-19 Plasma, sowie CXCL1/2 Blocker Reparixin oder anti-IL8 Antikörper. Paired t-test, n=7 COVID-19 Plasmaproben.

insbesondere für letzteres eine Aktivierung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten mit verantwortlich ist (Meizlish et al., 2021). Die hierbei durchgeführten Signalweg-Analysen zeigten eine prominente Hochregulation des IL8-Signalwegs in Neutrophilen von ARDS Patienten (Abbildung 10 B-C). Ein erstellter Expressions-Score aus Proteinen, welche im IL8 Signalweg impliziert sind, zeigte eine positive Korrelation dieses Scores mit der Schwere der Lungenbeteiligung, der mittels Oxygenierungsindex Horowitz abgeschätzt wurde (Abbildung 10 D). Dies legte die Hypothese nahe, dass dieser Signalweg zur neutrophilen Hyperinflammation in COVID-19 beiträgt. Wir führten daher in vitro Versuche durch, mit welchen wir folgende Erkenntnisse gewannen: 1., neutrophile

Granulozyten produzieren nach Stimulation mit IL-8 selbst zu großem Ausmaß IL-8 (Abbildung 10 E). 2., die Hinzugabe von COVID-19 Plasma führt zu starker Aktivierung und NETose von gesunden Neutrophilen, und dieser Effekt kann durch blockierende anti-IL-8 Antikörper sowie den IL-8 Rezeptor CXCR1/2 Blocker Reparixin deutlich reduziert werden. Diese positive Rückkopplungsschleife der neutrophilen autokrinen IL-8-Produktion führt zu einem aktivierten, prothrombotischen Neutrophilen-Phänotyp, der durch Degranulation und Bildung von NETs durch neutrophile Granulozyten gekennzeichnet ist. Bei schwerem COVID-19 initiieren Neutrophile direkt die Gerinnungs- und Komplementkaskade, was einen Zusammenhang mit dem bei diesen Patienten beobachteten immunthrombotischen Zustand herstellt. Die Hemmung der IL-8-CXCR-1/-2-Achse interferiert mit diesem Teufelskreis und dämpft die Neutrophilenaktivierung, Degranulation, NETosis und IL-8-Freisetzung.

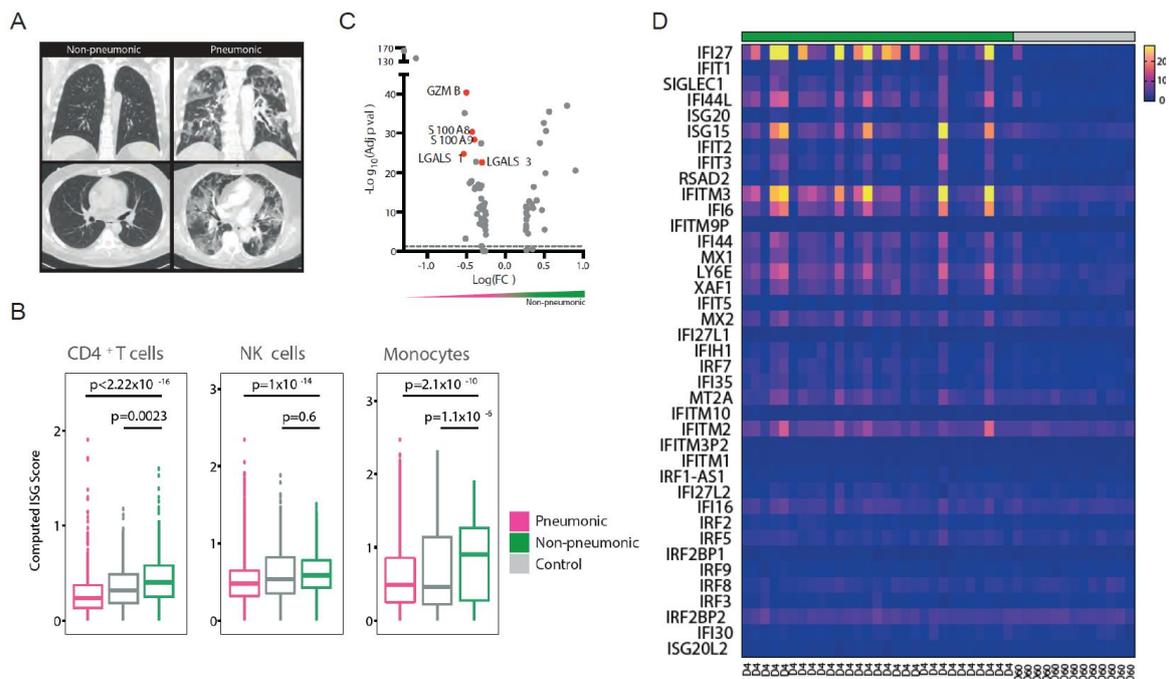
Wir bestätigten die Effektivität von Reparixin in einem murinen nicht-infektiösen Mausmodell des COVID-19 ARDS (Kaiser et al., 2021). Zusammenfassend liefern unsere Daten umfassende Einblicke in die Aktivierungsmechanismen von neutrophilen Granulozyten bei COVID-19 und decken eine sich selbst verstärkende Neutrophilen-IL-8-Achse als vielversprechendes therapeutisches Ziel bei schwerer SARS-CoV-2-Infektion auf. In einer Phase I/II klinischen Studie zeigten sich vielversprechende Ergebnisse mit Reparixin bei schwerer COVID-19 Pneumonie (Landoni et al., 2022).

#### g. Protektive Faktoren der Immunfunktion bei SARS-CoV-2 Infektion

Die antivirale Immunantwort auf eine SARS-CoV-2-Infektion kann die Virusausbreitung begrenzen und so die Entwicklung einer pneumonischen COVID-19 Erkrankung bei den meisten Patienten verhindern. Die schützende immunologische Reaktion, die mit einer erfolgreichen Vireneindämmung in den oberen Atemwegen verbunden ist, blieb jedoch zunächst unklar. Wir untersuchten daher zwei Kohorten von Hochrisiko-Patienten, die sich mit SARS-CoV-2 infizierten, und die entweder einen asymptomatischen bzw. oligosymptomatischen Verlauf ohne Lungenbeteiligung oder eine Pneumonie entwickelten (Abbildung 11 A). Wir analysierten longitudinal Blutproben aus dem Krankheitsverlauf von Infektion bis zur Ausheilungsphase. Das Ziel war es, zeitaufgelöste schützende Immunsignaturen bei nicht-pneumonischen SARS-CoV-2-infizierten Patienten aufzudecken und spezifische Immuntrajektorien mit der Viruseindämmung in den oberen Atemwegen in Verbindung zu bringen. Unsere Analysen umfassten Einzelzell-RNA Sequenzierung, sowie durchflusszytometrische Analysen und Plasma-Proteomik.

Wir beobachteten einen spezifischen systemischen Immunität, der im Zusammenhang mit der Viruseindämmung stand. Er war maßgeblich durch eine Hochregulierung der Interferon-stimulierten

Gene (ISG) Antwort in zirkulierenden Immunzellen geprägt, welche bei den nicht-pneumonischen Patienten früh in der Erkrankung erfolgte (Abbildung 11 B). Außerdem zeigte sich ein verringertes zytotoxisches Potenzial von natürlichen Killer- (NK) und T-Zellen und ein immunmodulatorischer Monozyten-Phänotyp, der mit einer schützenden Immunfunktion bei COVID-19 vergesellschaftet war (Abbildung 11 C).



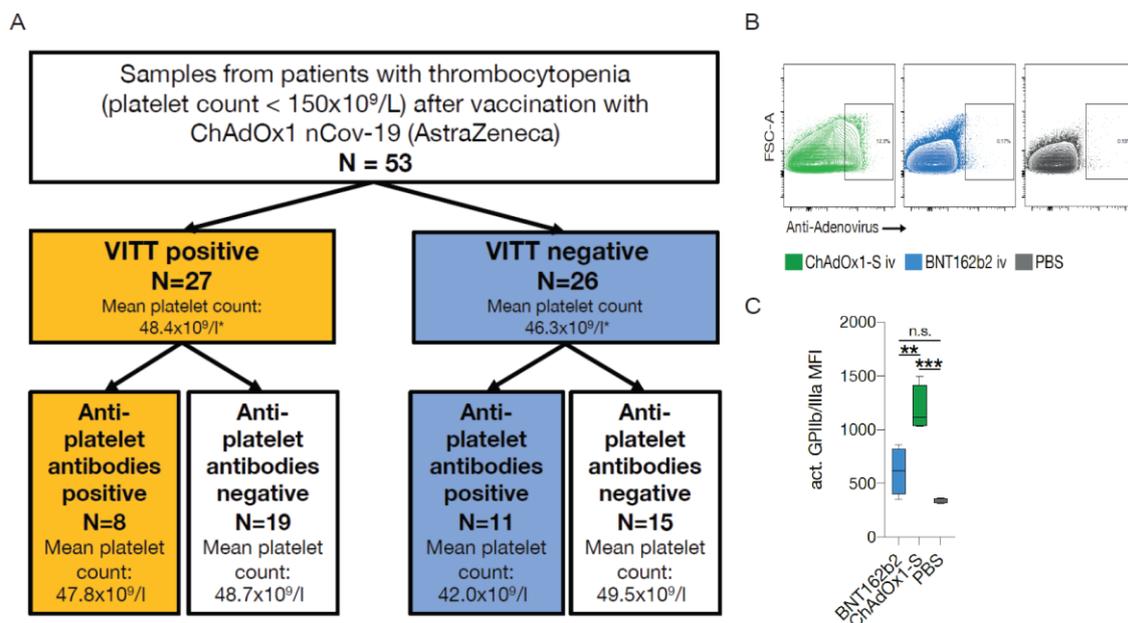
**Abbildung 11:** Eine protektive Immunsignatur in SARS-CoV-2 infizierten Patienten. A, Einschluss von Hochrisiko-Patienten in eine Kohorte mit und ohne CT-morphologischen Hinweis auf Pneumonie. B, Hochregulation des Interferon Stimulated Gene (ISG) Scores in CD4 T Zellen, NK Zellen und Monozyten von Patienten mit nicht-pneumonischen Verlauf im Vergleich zu gesunden Kontrollen und Patienten mit Pneumonie in der Einzel-Zell RNA Sequenzierung von PBMCs. C, Herunterregulation von potenziell proinflammatorischen Genen in NK Zellen von Patienten mit nicht-pneumonischen Verlauf. D, Bestätigung der Hochregulation von ISGs früh nach SARS-CoV-2 Infektion in zirkulierenden Monozyten in einer Kohorte von ambulanten Patienten. Grün: Tag 1-4, Grau: Tag 60 nach Infektion.

Wir bestätigen die gewonnen Erkenntnisse in einer großen Kohorte von ambulanten Patienten, für welche wir sowohl Nasenabstriche, als auch periphere Immunzellen sowie Plasma mittels RNA-Sequenzierung und Zytokin-Multiplex-Analysen untersuchten. Interessanterweise bestätigten wir eine Interferon I Signatur in zirkulierenden Immunzellen (Abbildung 10 D), sahen jedoch keine Unterschiede in der ISG Antwort in Nasenabstrichen, noch erhöhte Interferon alpha/beta Spiegel im Plasma von ambulanten im Vergleich zu hospitalisierten Patienten (Pekayvaz et al., 2022). Zusammenfassend stellten wir eine groß angelegte, integrative und longitudinale Multi-Omics-basierte Analyse der Immunantwort in der Sars-Cov-2 Infektion zusammen, die sich auf ambulante/nicht pneumonische Patienten mit erfolgreicher Eindämmung des Virus in den oberen Atemwegen konzentrierte. Wir definierten frühe, prominente ISG-Signaturen, die kooperativ auf

Einzelzellebene über zirkulierende Immunzelluntergruppen hinweg exprimiert werden, als das definierende immunologische Merkmal einer unkomplizierten, nicht pneumonischen SARS-CoV-2-Infektion.

#### h. Mechanismen der impfassoziierten Thrombozytopenie nach adenovirus-basierten Impfungen

Die bisher einzige effektive Maßnahme zur Vorbeugung der Ausbreitung von und Ansteckung mit SARS-CoV-2 ist die Entwicklung und bevölkerungsweite Anwendung von Impfungen. Im Rahmen dieser Impfbemühungen zeigten sich sehr seltene, zuvor unbekannte Nebenwirkungen der Impfstoffe, welche auf einem adenoviralen Vektor basieren– Thrombozytopenien ohne und mit Thrombosen (impf-assoziierte Thrombozytopenie bzw. VITT).



**Abbildung 12:** Breite anti-thrombozytäre Immunantwort in Patienten mit Thrombozytopenie nach ChAdOx1 nCov-19 Impfung. A, Häufigkeit von anti-thrombozytären Antikörpern in Patienten mit Thrombozytopenie nach ChAdOx1 nCov-19 Impfung, n=27 mit Nachweis einer VITT, n=26 mit Ausschluss einer VITT. B, Inkubation von isolierten humanen Thrombozyten mit ChAdOx1-S, BNT162b2 und PBS und durchflusszytometrische Messung des Fluoreszenzsignals für Anti-Adenovirus. C, Durchflusszytometrische Analyse der Aktivierung von Thrombozyten mittels Antikörper gegen aktiviertes GPIIb/IIIa. Deutliche Aktivierung der Thrombozyten durch Zugabe von ChAdOx1-S im Vergleich zu BNT162b und PBS. n=4 unabhängige Experimente pro Gruppe. One-way ANOVA mit post-hoc Tukey's multiple comparison test.

Hierbei kommt es im Falle der VITT zu einer Bildung von anti-PF4 Antikörpern (Greinacher, Selleng, Palankar, et al., 2021; Greinacher, Selleng, Wesche, et al., 2021). Es treten jedoch auch vermehrt isolierte Thrombozytopenien nach adenoviraler Impfung auf, ohne das PF4 Antikörper nachweisbar

sind (Simpson et al., 2021). Ich stellte daher die Hypothese auf, dass möglicherweise eine breitere anti-thrombozytäre Immunantwort für diese klinischen Präsentationen verantwortlich sein könnte. In Zusammenarbeit mit der Gruppe um Prof. Andreas Greinacher in Greifswald konnten wir zeigen, dass Patienten mit Thrombozytopenie nach adenoviralem Impfstoff zu einem signifikanten Anteil Antikörper gegen thrombozytäre Glykoproteine exprimieren. Dies ist der Fall in Patienten, welche die diagnostischen Kriterien für eine VITT erfüllen, als auch in Patienten, welche diese nicht erfüllen (Abbildung 12 A). Ich nutzte meine Expertise in der Grundlagenforschung zu Thrombozyten und Immunothrombose, um die Mechanismen dieser Nebenwirkungen besser zu verstehen. Zunächst konnten wir zeigen, dass es nach ChAdOx1-S Zugabe zu isolierten, humanen Thrombozyten zu einer Bindung des adenoviralen Vektors kam (Abbildung 12 B). Diese Bindung führte zu einer Aktivierung der Thrombozyten, welche eine erhöhte Expression von aktiviertem GPIIb/IIIa Integrin Rezeptor zeigten, auch im Vergleich mit dem BioNTech mRNA basiertem Impfstoff (BNT162b) (Abbildung 12 C). Zusammenfassend kommt es zu einer Interaktion von adenoviralem Impfvektor und Thrombozyten, welche zu einer Veränderung des Phänotyps und der Aktivierung von Thrombozyten führt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die intravenöse Anwendung von adenovirus-basierten Gentherapien zu Thrombozytopenien führen kann, teilweise mit therapielimitierenden Effekten (Alemany et al., 2000; Othman et al., 2007). Auch hier kommt es zu einer Bindung von Adenovirus an Thrombozyten mit Aktivierung und in Folge einem Abbau dieser Aggregate durch Makrophagen (Othman et al., 2007; Stone et al., 2007).

Ich stellte daher die Hypothese auf, dass ggf. eine fehlerhafte intravasale Injektion des Impfstoffs diese Interaktion und in Folge eine Thrombozytopenie verursachen könnte. Um dies zu untersuchen, etablierten wir ein Mausmodell mit intramuskulärer und intravenöser ChAdOx1-S Applikation. Wir ergänzten außerdem zahlreiche Kontrollgruppen – so injizierten wir mRNA Impfstoff i.v. (BNT162b), sowie Hitze inaktivierten ChAdOx1 und PBS i.v. Diese Versuche zeigten, dass lediglich nach intravenöser Applikation von ChAdOx1-S eine deutliche, transiente Thrombozytopenie auftrat (Abbildung 13 A).

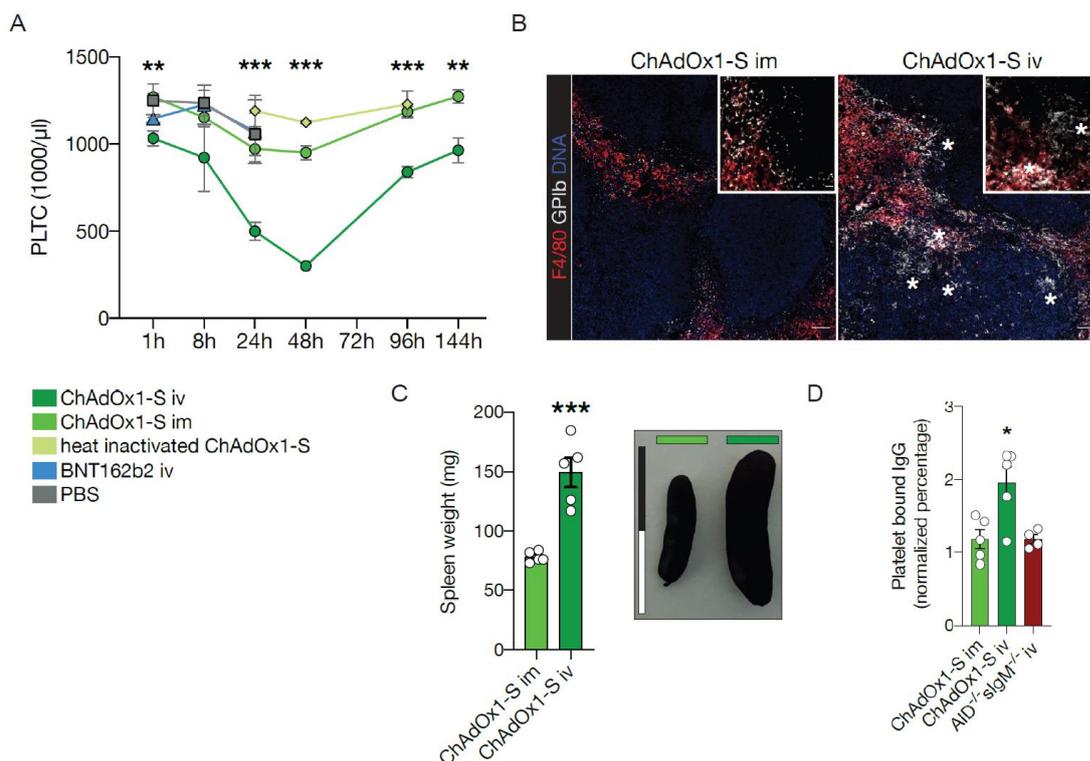
Um dies näher zu untersuchen, injizierten wir parallel fluoreszenzmarkierte Kontroll- und ChAdOx1-S vorinkubierte Thrombozyten in Wildtyp-Kontrollmäuse intravenös und verfolgten diese in vivo. Es bestätigte sich ein schnellerer Abbau der Adenovirus-koinkubierten Thrombozyten (Nicolai et al., 2022). Eine Korrelationsanalyse bestätigte in den Mäusen, welche ChAdOx1-S i.v. erhalten hatten, eine signifikante Korrelation von Adenovirus-Thrombozyten-Aggregatbildung im Blut nach einer Stunde mit dem Abfall der Thrombozytenzahlen nach 24 Stunden (Nicolai et al., 2022). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eine intravenöse Injektion von adenoviralem Impfstoff im

Tiermodell zu einer Adenovirus-Thrombozyten Aggregation führt. Diese Aggregate sind aktiviert und werden abgebaut, es zeigt sich dann eine transiente Thrombozytopenie.

Als nächstes versuchten wir zu verstehen, welche immunologische Folgen der Abbau dieser Thrombozyten-Adenovirus Aggregate hat. Wir untersuchten die Milz als ein Organ, welches eine Schlüsselfunktion im Abbau von aktivierten Thrombozyten innehat (Prislovsky & Strom, 2013). In der roten Pulpa sind histologisch auch unter homöostatischen Bedingungen viele intakte Thrombozyten nachzuweisen, während in den Follikeln keine Thrombozyten zu finden sind (Abbildung 13 B). Nach i.v. Injektion des Impfstoffs änderte sich dieses Bild deutlich: Es zeigten sich Fragmente von Thrombozyten in der splenischen Marginalzone als auch in den Follikeln (Abbildung 13 B). Außerdem kam ein deutlich erhöhtes Thrombozytensignal in den F4/80 positiven Phagozyten der Milz, den sogenannten Rote Pulpa Makrophagen (RPM) zur Darstellung, welche Antigen für das adaptive Immunsystem präsentieren können (Nicolai et al., 2022). Tatsächlich können Thrombozyten Pathogene in die Milz transportieren, und dies ermöglicht eine adaptive Immunantwort durch residente B-Zellen/T-Zellen – dies wurde für das intrazelluläre Pathogen *Listeria monocytogenes* gezeigt (Broadley et al., 2016; Verschoor et al., 2011). Um diesen Effekt besser zu verstehen, injizierten wir gefärbte Kontroll- und ChAdOx1-S inkubierte Thrombozyten, und markierten RPMs mittels fluoreszierender Antikörper. Wir führten dann eine intravitale 4D Fluoreszenzmikroskopie der Milz durch, und konnten direkt die Interaktion der zwei Thrombozytenpopulationen in vivo über die Zeit verfolgen. Eine Einzellzellanalyse zeigte hierbei eine verminderte Geschwindigkeit und zurückgelegte Distanz der adenovirus vorinkubierten Thrombozyten, welche sich auch vermehrt in den F4/80 + RPMs wiederfanden (Nicolai et al., 2022).

Zusammenfassend bestätigen diese Versuche den Abbau von Thrombozyten-Adenovirus-Aggregaten durch antigen-präsentierende Zellen mit Transport von Thrombozytenfragmenten in die für die Antikörperbildung verantwortlichen Follikel. Die adaptive Immunantwort und Bildung von Antikörpern benötigt einige Tage nach Pathogen/Antigen-Kontakt. Wir untersuchten daher Tiere 5-6 Tage nach i.m. bzw. i.v. Injektion von ChAdOx1-S (entspricht 5-6 Tage p.i.).

Hierbei zeigten sich bereits makroskopisch signifikant vergrößerte Milzen in den Tieren, welche eine intravenöse Applikation des Impfstoffs erhalten hatten (Abbildung 13 C). Eine histologische Aufarbeitung zeigte vergrößerte B220+ Follikel und bestätigte damit eine verstärkte adaptive Immunantwort/Antikörperbildung in diesen Tieren. Um zu untersuchen, ob die gebildeten Antikörper auch gegen Thrombozyten gerichtet sind, inkubierten wir isolierte Kontroll-Thrombozyten mit Plasma von i.m. und i.v. injizierten Tieren. Hierbei bestätigte sich eine vermehrte IgG und IgM Bindung an Kontroll-Thrombozyten in der Gruppe mit intravenöser Applikation (Abbildung 13 D). In einem weiteren Kontrollversuch mit sAID-IgM Mäusen, welche keine IgG und IgM Antikörper bilden können,



**Abbildung 13:** Intravenöse Applikation von adenoviralem Impfstoff führt zu Thrombozytopenie und anti-thrombozytärer Antikörperbildung im Mausmodell. A, Thrombozytenzahlen in Mäusen, die zu Zeitpunkt 0 mit ChAdOx1-S i.m., i.v., mit Hitze-inaktiviertem ChAdOx1-S i.v., und BNT 162b2 bzw. PBS i.v. injiziert wurden. Multiple t-tests mit Holm-Sidak Korrektur,  $n \geq 3$  pro Zeitpunkt für ChAdOx1-S Gruppen,  $n \geq 2$  pro Zeitpunkt für alle anderen Gruppen. B, Histologie der Milz nach endogener Thrombozytenmarkierung mit Gp1b-Antikörper 24 Stunden nach i.m. und i.v. ChAdOx1 nCov-19-Verabreichung. Oben links ist der Übergang aus der roten Pulpa zum Follikel zu sehen. Maßstab zur Übersicht sind  $50 \mu\text{m}$ , für Ausschnitte  $10 \mu\text{m}$ . Sterne: Vermehrt Gp1b positives Material in den Follikeln. C, Milzgewichte der Tiere 6d p.i. Repräsentative Bilder der Milzen beider Gruppen, Maßstab = 2 cm. Ungepaarter t-Test.  $n=5$  pro Gruppe. D, Prozent der Kontroll-Thrombozyten positiv für gebundenes IgM und IgG nach Inkubation mit Plasma von Mäusen 6 Tage p.i. entweder mit i.m. oder i.v. ChAdOx1 nCov-19 Gabe. Außerdem zusätzlich i.v. Gabe bei ChAdOx1 nCov-19 AID<sup>-/-</sup>slgM<sup>-/-</sup> Mäuse.  $n=5$  pro Gruppe für i.v. oder i.m.,  $n=4$  für AID<sup>-/-</sup>slgM<sup>-/-</sup>. Ungepaarte t-Tests zwischen i.v. ChAdOx1 nCov-19. Der Prozentsatz der Thrombozyten, die IgM oder IgG binden, wurde auf den Mittelwert von 4 Kontrollplasmen normalisiert.

zeigte sich dieser Effekt erwartungsgemäß nicht (Abbildung 13 D). Zusammenfassend zeigen unsere bisherigen Daten, dass möglicherweise eine fehlerhafte intravenöse Injektion die Bildung von

antithrombozytärer Immunität fördert, welche dann wiederum zu impfassoziierter Thrombozytopenie, aber möglicherweise auch Thrombosen führen kann. Diese Studie zeigt somit mögliche neue Ansätze zur Vermeidung dieser seltenen Impfkomplication auf und ist auch für die Weiterentwicklung von adenoviralen Vektoren im Rahmen von Gentherapien von Bedeutung.

### 3. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnten in der vorgelegten Habilitationsschrift neue Mechanismen und potenzielle Zielstrukturen in der vaskulären Thrombo-Inflammation identifiziert werden. Zunächst konnte ich eine neue Funktion von Thrombozyten in der Inflammation beschreiben: Haptotaxis, also die Fähigkeit, Substratgradienten durch aktive Migration zu folgen. Dieser Prozess ist von dem Aktin-regulatorischen Protein Arp2/3 abhängig und ermöglicht es einzelnen Thrombozyten, welche an die entzündete Gefäßwand rekrutiert wurden, sich in Richtung von Mikro-Verletzungen zu repositionieren und sowohl inflammatorische Blutungen zu verhindern, als auch eindringende Bakterien zu binden und an der Ausbreitung zu hindern (Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020). Diese Funktion spielt in der klassischen Thrombose und Hämostase keine Rolle, und zeigt so auf, dass Thrombozyten teilweise unabhängige Effektorprogramme in Inflammation und Thrombusformation nutzen. Um die Thrombozytenmorphologie, und -funktion auf Einzelzellebene besser zu verstehen, sind neue Fluoreszenz-Reporter-Modelle notwendig. Ich entwickelte und validierte ein Mausmodell – PF4cre-Confetti fl/fl, welches über die stochastische Rekombination von 4 Farben in Megakaryozyten verschiedenfarbige Thrombozyten generierte (Nicolai et al., 2021). Dieses Modell ermöglichte das Nachverfolgen der Morphologie und Bewegung von einzelnen Thrombozyten in komplexen Thromben in vitro als auch in vivo, ohne wesentlich die Funktion der Megakaryozyten oder Thrombozyten einzuschränken. Untersuchungen mit diesem Modell konnten bereits neue Daten liefern – so zeigten Thrombozyten in Thromben keine wesentlichen Formveränderungen, sondern stülpten lediglich kurze, nadelartige Fortsätze, sogenannte Filopodien, aus.

Die oben genannte Funktion von Thrombozyten, inflammatorische Blutungen zu verhindern, ist nur unzureichend verstanden. So ist es nicht klar, wie Thrombozyten nach dem Erreichen der Mikro-Verletzungen diese abdichten. Wir konnten mithilfe genetische Mausmodelle, in vitro und in vivo Ansätzen und Intravitalmikroskopie zeigen, dass Thrombozyten nach Erreichen des vaskulären Defekts einen prokoagulanten Phänotyp annehmen. Dieser ist abhängig von der Membran-Scramblase TMEM16F und dem mitochondrialen Protein Cyclophilin D, und ermöglicht die effektive Bindung von Komponenten der Gerinnungskaskade, wodurch nur lokal eine Gerinnungsaktivierung stattfindet, welche zur Abdichtung der Defekte beiträgt. Diese Funktion beruht auf dem gleichzeitigen Wahrnehmen von Fibrin(ogen) via Rezeptor GPIIb/IIIa, und Kollagen mittels GPVI (Kaiser et al., 2022). Diese duale Stimulation führt zu einer Überhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und in Folge der prokoagulanten Transformation. Diese Daten zeigen also einen neuen Mechanismus auf, in dem Thrombozyten Defekte im Gefäßsystem identifizieren und gezielt und präzise die Gerinnungskaskade an diese Stelle rekrutieren. Dies trägt wahrscheinlich zur Verhinderung einer generellen Hyperkoaguabilität bei, welche ein erhöhtes Risiko von Gefäßverschlüssen mit sich bringen

würde. Diese grundlagenwissenschaftlichen Studien verknüpfen Immunität und Thrombozytenfunktion sowie Thrombusformation im Tiermodell. Diesbezüglich liegen beim Menschen aber nur wenige Daten vor. Wir initiierten im Rahmen der Sars-CoV-2 Pandemie daher mehrere translationale Projekte, um (1) Konzepte der Thrombo-Inflammation translational zu validieren und (2) so potenzielle neue Therapieoptionen und Biomarker zu identifizieren. So konnten wir zeigen, dass es zu immuno-thrombotischen Verschlüssen von kleinen Gefäßen sowohl in der Lunge, als auch der Niere und dem Herzen von an COVID-19 verstorbenen Patienten kommt (Nicolai, Leunig, Brambs, Kaiser, Weinberger, et al., 2020). Diese bestehen aus neutrophilen Granulozyten, NETs und Thrombozyten sowie Fibrin. Thrombozyten zeigen außerdem in COVID-19 ein spezifisches Aktivierungsmuster und sind in der Lage, neutrophile Granulozyten zu aktivieren und NETose zu provozieren. Interessanterweise korrelieren Marker der Immuno-thrombose, wie Thrombozyten-Neutrophile Aggregate und D-Dimer mit der Schwere der Lungenschädigung. Dies deutet auf einen möglichen pathomechanistischen Zusammenhang zwischen Thrombo-Inflammation und dem schweren Atemnotsyndrom bei COVID-19 sowie einem Regelkreis aus neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten hin. In einer weiteren vergleichenden Studie konnten wir offenlegen, dass immuno-thrombotische Verschlüsse in der Lunge in der letalen COVID-19 Pneumonie signifikant häufiger auftreten als bei tödlicher Influenza-Infektion (Nicolai, Leunig, Brambs, Kaiser, Joppich, et al., 2020). Dies deutet auf einen spezifischen Regulationsweg in ersterer Erkrankung hin. Tatsächlich zeigt sich ein in zahlreichen Studien bestätigter HLA-DRlow CD9low Phänotyp von zirkulierenden Monozyten in COVID-19, welcher sich auch lokal in der bronchoalveolären Lavage nachweisen ließ. Diese Population exprimiert im schweren Atemnotsyndrom neutrophilen-wirksame Chemokine, welche möglicherweise zu einer pulmonalen Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und somit zu Gefäßverschlüssen in der Lunge beitragen.

Um besser zu verstehen, welche Regulationswege spezifisch in neutrophilen Granulozyten in der schweren COVID-19 Infektion im Vergleich zu moderaten Verläufen aktiviert werden, führten wir Proteomanalysen dieser Zellen durch. Diese deckten auf, dass in der schweren COVID-19 Pneumonie eine Hochregulierung des IL-8 Signalwegs erfolgt. In vitro Versuche und ein ARDS-Mausmodell legten nahe, dass IL-8 via CXCL1/2 wiederum zu einer vermehrten Freisetzung von IL-8 aus neutrophilen Granulozyten führt und so eine para- und autokrine Verstärkungswirkung hat. Außerdem resultiert IL-8 in einer verstärkten Aktivierung und NETose von neutrophilen Granulozyten. Eine Unterbindung des Signalwegs mittels CXCL1/2 Inhibitor Reparixin führt zu reduzierten pulmonalen Gefäßverschlüssen im ARDS-Mausmodell. Zusammenfassend zeigt sich hier ein möglicherweise therapeutisch nutzbarer Signalweg, dessen Blockade der beobachteten Hyperinflammation entgegenwirken könnte. Erste klinische Phase 1/2 Studien weisen in Übereinstimmung mit unseren translationalen

Studienergebnissen auf einen schützenden Effekt in der COVID-19 Pneumonie durch Gabe von Reparixin hin (Landoni et al., 2022). Die Infektion mit Sars-CoV-2 verläuft in den meisten Fällen auch bei Hochrisiko-Patienten ohne Thrombo-Inflammation und Lungenentzündung. Wie das Immunsystem in diesen Fällen die Infektion in den oberen Atemwegen kontrolliert, ist unklar. Wir führten eine zwei-phasige translationale Studie durch, in welcher wir eine kleine, engmaschig untersuchte Patientenkohorte mittels longitudinaler Einzelzell- RNA-Sequenzierung, Plasma-Proteomik und Mehrfarben-Durchflusszytometrie analysierten. Hierbei zeigte sich ein Immunzellphänotyp, welcher mit einer Kontrolle des Virus in den oberen Atemwegen vergesellschaftet ist: Die Hochregulierung der Interferon I Antwort und eine Herunterregulierung von zytotoxischen Signalwegen mit einem immunmodulatorischen Gensignatur der Monozyten (Pekayvaz et al., 2021). Wir konnten die Interferon-Antwort als Schlüsselement in einer großen Kohorte von ambulanten Patienten bestätigen. Diese Daten deuten auf eine schützende Rolle der Interferon I Antwort in der Immunzellantwort gegen Sars-CoV-2 hin und könnten hier neue therapeutische Möglichkeiten nahelegen, wie zum Beispiel eine Stimulation mit Agonisten des Interferon I/ISG Signalwegs. Die Impfungen gegen Sars-CoV-2 erbringen eine sehr gute Schutzwirkung und basieren auf verschiedenen, neuartigen Impflplattformen. Eine dieser Plattformen basiert auf adenoviralen Vektoren. Hierbei zeigte sich eine neuartige Komplikation nach Impfung, die Vakzin-induzierte thrombotische Immunthrombozytopenie (VITT), in welcher PF4 Antikörper ähnlich wie in der Heparin induzierten Thrombozytopenie (HIT) sowie Thrombosen an atypischen Lokalisationen nachzuweisen sind. Dieses Krankheitsbild ist unzureichend verstanden. Außerdem zeigen sich in Zusammenhang mit adenoviraler Impfung auch vermehrt isolierte Thrombozytopenien ohne Thrombosen oder Nachweis von PF4 Antikörpern. Wir konnten nun zeigen, dass in einer relevanten Anzahl von Patienten mit isolierter Thrombozytopenie nach adenoviraler Impfung wie auch VITT Antikörper gegen Glykoproteine von Thrombozyten nachweisbar waren (Nicolai et al., 2022). In vitro Versuche zeigten eine starke Bindung und Aktivierung von Thrombozyten bei Inkubation mit dem adenoviralen Impfstoff. In einem translationalen Mausmodell führte eine intravenöse Applikation des adenoviralen Impfstoffs zu einem Binden des Vektors an Thrombozyten, einer Aktivierung dieser und in Folge zu einer transienten Thrombozytopenie. Die zirkulierenden Thrombozyten-Adenovirus-Aggregate werden in Folge in der Milz abgebaut und führen zu einer Antikörperreaktion gegen körpereigene Thrombozyten. Diese Daten weisen darauf hin, dass möglicherweise eine versehentliche i.v. Injektion des Impfstoffs zur Ausprägung von VITT beitragen kann. Dies könnte bedeuten, dass eine Aspiration vor Injektion eine VITT oder Immunthrombozytopenie nach adenoviraler Impfung verhindern könnte.

Zusammenfassend konnte die hier vorgelegte Arbeit und die entsprechenden Publikationen neue (1) zelluläre Mechanismen, (2) Modelle, (3) Signalwege und (4) Interaktionen in der vaskulären Thrombo-

Inflammation aufdecken und entwickeln. Dies öffnet die Türe für neue therapeutische Ansätze und erweitert das mechanistische Verständnis für Thrombo-Inflammation auch in der Pathophysiologie von humanen Krankheiten.

## 4. Abkürzungsverzeichnis

ARDS	Akutes Atemnot Syndrom - Acute respiratory distress syndrome
Arp2/3	Actin Related Protein 2/3
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CCl3	CC-Chemokinligand 3
CCL4	CC-Chemokinligand 4
CFP	Cyan Fluorescent Protein
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019
CXCL8	Interleukin 8
CypD	Cyclophilin D
CypD	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase Cyclophilin D
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FiO <sub>2</sub>	Anteil der Sauerstoffzumischung
GFP	Green Fluorescent Protein
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
HIT	Heparin Induzierte Thrombozytopenie
i.m.	Intramuskulär
i.v.	Intravenös
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-8	Interleukin 8
ISG	Interferon Stimulated Gene
LPS	Lipopolysaccharide

MRSA	Methicillin-Resistenten Staphylococcus Aureus
NETosis	Freisetzung von Neutrophil Extracellular Traps
PaO <sub>2</sub>	Partieller Sauerstoff Druck
PBS	Phosphate Buffered Saline
PF4	Plättchen Faktor 4
PS	Phosphatidylserine
RFP	Red Fluorescent Protein
RPM	Rote Pulpa Makrophagen
RNA	Ribonukleinsäure
Sars-CoV-2	Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2
TMEM16F	Transmembrane protein 16F
VITT	Vakzin-induzierte thrombotische Immunthrombozytopenie
YFP	Yellow Fluorescent Protein

## 5. Literaturverzeichnis

- Aday, A. W., & Ridker, P. M. (2018). Antiinflammatory therapy in clinical care: the CANTOS trial and beyond. *Frontiers in cardiovascular medicine*, *5*, 62.
- Alemay, R., Suzuki, K., & Curiel, D. T. (2000). Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *Journal of General Virology*, *81*(11), 2605-2609.
- Ando, Y., Kwon, A. T.-J., & Shin, J. W. (2020). An era of single-cell genomics consortia. *Exp Mol Med*, *52*(9), 1409-1418.
- Boilard, E., Pare, G., Rousseau, M., Cloutier, N., Dubuc, I., Levesque, T., Borgeat, P., & Flamand, L. (2014). Influenza virus H1N1 activates platelets through FcγRIIA signaling and thrombin generation. *Blood*, *123*(18), 2854-2863. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-515536>
- Bonaventura, A., Vecchié, A., Dagna, L., Martinod, K., Dixon, D. L., Van Tassel, B. W., Dentali, F., Montecucco, F., Massberg, S., & Levi, M. (2021). Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, *21*(5), 319-329.
- Bonow, R. O., Fonarow, G. C., O’Gara, P. T., & Yancy, C. W. (2020). Association of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) With Myocardial Injury and Mortality. *JAMA Cardiology*, *5*(7), 751-753. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.1105>
- Braun, L. J., Stegmeyer, R. I., Schäfer, K., Volkery, S., Currie, S. M., Kempe, B., Nottebaum, A. F., & Vestweber, D. (2020). Platelets docking to VWF prevent leaks during leukocyte extravasation by stimulating Tie-2. *Blood*, *136*(5), 627-639.
- Broadley, S. P., Plaumann, A., Coletti, R., Lehmann, C., Wanisch, A., Seidlmeier, A., Esser, K., Luo, S., Rämer, P. C., & Massberg, S. (2016). Dual-track clearance of circulating bacteria balances rapid restoration of blood sterility with induction of adaptive immunity. *Cell Host Microbe*, *20*(1), 36-48.
- Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M., Patel, K. D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G. D., Keys, E. M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C. J., Green, F. H., & Kubes, P. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*, *13*(4), 463-469. <https://doi.org/10.1038/nm1565>
- Coughlin, S. R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*, *3*(8), 1800-1814. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01377.x>
- Degarege, A., Naveed, Z., Kabayundo, J., & Brett-Major, D. (2020). Risk factors for severe illness and death in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *medRxiv*, 2020.2012.2003.20243659. <https://doi.org/10.1101/2020.12.03.20243659>
- Denorme, F., Manne, B. K., Portier, I., Eustes, A. S., Kosaka, Y., Kile, B. T., Rondina, M. T., & Campbell, R. A. (2020). Platelet necrosis mediates ischemic stroke outcome in mice. *Blood*, *135*(6), 429-440. <https://doi.org/10.1182/blood.2019002124>
- Engelmann, B., & Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, *13*(1), 34-45. <https://doi.org/10.1038/nri3345>
- Gaertner, F., Ahmad, Z., Rosenberger, G., Fan, S., Nicolai, L., Busch, B., Yavuz, G., Luckner, M., Ishikawa-Ankerhold, H., Hennel, R., Benechet, A., Lorenz, M., Chandraratne, S., Schubert, I., Helmer, S., Striednig, B., Stark, K., Janko, M., Böttcher, R. T., . . . Massberg, S. (2017). Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria. *Cell*, *171*(6), 1368-1382.e1323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.001>
- Gawaz, M., Langer, H., & May, A. E. (2005). Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*, *115*(12), 3378-3384. <https://doi.org/10.1172/jci27196>
- Greinacher, A., Selleng, K., Palankar, R., Wesche, J., Handtke, S., Wolff, M., Aurich, K., Lalk, M., Methling, K., & Völker, U. (2021). Insights in ChAdOx1 nCov-19 Vaccine-induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia (VITT). *Blood*.

- Greinacher, A., Selleng, K., Wesche, J., Handtke, S., Palankar, R., Aurich, K., Lalk, M., Methling, K., Völker, U., & Hentschker, C. (2021). Towards Understanding ChAdOx1 nCov-19 Vaccine-induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia (VITT).
- Gros, A., Syvannarath, V., Lamrani, L., Ollivier, V., Loyau, S., Goerge, T., Nieswandt, B., Jandrot-Perrus, M., & Ho-Tin-Noé, B. (2015). Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood*, *126*(8), 1017-1026.
- Hasin, Y., Seldin, M., & Lusic, A. (2017). Multi-omics approaches to disease. *Genome biology*, *18*(1), 1-15.
- Ho-Tin-Noé, B., Boulaftali, Y., & Camerer, E. (2018). Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation. *Blood*, *131*(3), 277-288.
- Huo, Y., & Ley, K. F. (2004). Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends in cardiovascular medicine*, *14*(1), 18-22.
- Husted, S. (2008). Benefits and risks with antiplatelet therapy: how great a problem is bleeding? *European Heart Journal Supplements*, *10*(suppl\_1), I19-I24. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/sun036>
- Kaiser, R., Escaig, R., Kranich, J., Hoffknecht, M.-L., Anjum, A., Polewka, V., Mader, M., Hu, W., Belz, L., Gold, C., Titova, A., Lorenz, M., Pekayvaz, K., Käab, S., Gaertner, F., Stark, K., Brocker, T., Massberg, S., & Nicolai, L. (2022). Procoagulant platelet sentinels prevent inflammatory bleeding through GPIIB/IIIa and GPVI. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.2021014914>
- Kaiser, R., Leunig, A., Pekayvaz, K., Popp, O., Joppich, M., Polewka, V., Escaig, R., Anjum, A., Hoffknecht, M.-L., Gold, C., Brambs, S., Engel, A., Stockhausen, S., Knottenberg, V., Titova, A., Haji, M., Scherer, C., Muenchhoff, M., Hellmuth, J. C., . . . Stark, K. (2021). Self-sustaining interleukin-8 loops drive a prothrombotic neutrophil phenotype in severe COVID-19. *JCI insight*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.150862>
- Landoni, G., Piemonti, L., Monforte, A. D., Grossi, P., Zangrillo, A., Bucci, E., Allegretti, M., Goisis, G., Gavioli, E. M., Patel, N., De Pizzol, M., Pasedis, G., & Mantelli, F. (2022). A Multicenter Phase 2 Randomized Controlled Study on the Efficacy and Safety of Reparixin in the Treatment of Hospitalized Patients with COVID-19 Pneumonia. *Infect Dis Ther*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00644-6>
- Lehman, H. K., & Segal, B. H. (2020). The role of neutrophils in host defense and disease. *J Allergy Clin Immunol*, *145*(6), 1535-1544. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.02.038>
- Lhermusier, T., Chap, H., & Payrastre, B. (2011). Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *9*(10), 1883-1891.
- Liao, M., Liu, Y., Yuan, J., Wen, Y., Xu, G., Zhao, J., Cheng, L., Li, J., Wang, X., & Wang, F. (2020). Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med*, 1-3.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, *420*, 868-874.
- Livet, J., Weissman, T. A., Kang, H., Draft, R. W., Lu, J., Bennis, R. A., Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (2007). Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, *450*(7166), 56-62. <https://doi.org/10.1038/nature06293>
- Malas, M. B., Naazie, I. N., Elsayed, N., Mathlouthi, A., Marmor, R., & Clary, B. (2020). Thromboembolism risk of COVID-19 is high and associated with a higher risk of mortality: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*, *29*, 100639.
- Massberg, S., Gawaz, M., Grüner, S., Schulte, V., Konrad, I., Zohlnhöfer, D., Heinzmann, U., & Nieswandt, B. (2003). A Crucial Role of Glycoprotein VI for Platelet Recruitment to the Injured Arterial Wall In Vivo. *J Exp Med*, *197*(1), 41-49. <https://doi.org/10.1084/jem.20020945>
- Massberg, S., Grahl, L., von Bruehl, M. L., Manukyan, D., Pfeiler, S., Goosmann, C., Brinkmann, V., Lorenz, M., Bidzhekov, K., Khandagale, A. B., Konrad, I., Kennerknecht, E., Reges, K., Holdenrieder, S., Braun, S., Reinhardt, C., Spannagl, M., Preissner, K. T., & Engelmann, B. (2010). Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*, *16*(8), 887-896. <https://doi.org/10.1038/nm.2184>

- McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B. G., Jenne, C. N., & Kubes, P. (2012). Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe*, *12*(3), 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.011>
- Medzhitov, R., Schneider, D. S., & Soares, M. P. (2012). Disease tolerance as a defense strategy. *Science*, *335*(6071), 936-941.
- Meizlish, M. L., Pine, A. B., Bishai, J. D., Goshua, G., Nadelmann, E. R., Simonov, M., Chang, C. H., Zhang, H., Shallow, M., & Bahel, P. (2021). A neutrophil activation signature predicts critical illness and mortality in COVID-19. *Blood advances*, *5*(5), 1164-1177.
- Middleton, E. A., He, X.-Y., Denorme, F., Campbell, R. A., Ng, D., Salvatore, S. P., Mostyka, M., Baxter-Stoltzfus, A., Borczuk, A. C., & Loda, M. (2020). Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *136*(10), 1169-1179.
- Modin, D., Claggett, B., Sindet-Pedersen, C., Lassen Mats Christian, H., Skaarup Kristoffer, G., Jensen Jens Ulrik, S., Fralick, M., Schou, M., Lamberts, M., Gerds, T., Fosbøl Emil, L., Phelps, M., Kragholm Kristian, H., Andersen Mikkel, P., Køber, L., Torp-Pedersen, C., Solomon Scott, D., Gislason, G., & Biering-Sørensen, T. (2020). Acute COVID-19 and the Incidence of Ischemic Stroke and Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, *142*(21), 2080-2082. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050809>
- Nicolai, L., Gaertner, F., & Massberg, S. (2019). Platelets in Host Defense: Experimental and Clinical Insights. *Trends in immunology*, *40*(10), 922-938.
- Nicolai, L., Kaiser, R., Escaig, R., Hoffknecht, M.-L., Anjum, A., Leunig, A., Pircher, J., Ehrlich, A., Lorenz, M., & Ishikawa-Ankerhold, H. (2021). Single platelet and megakaryocyte morpho-dynamics uncovered by multicolor reporter mouse strains in vitro and in vivo. *Haematologica*.
- Nicolai, L., Leunig, A., Brambs, S., Kaiser, R., Joppich, M., Hoffknecht, M., Gold, C., Engel, A., Polewka, V., Muenchhoff, M., Hellmuth, J. C., Ruhle, A., Ledderose, S., Weinberger, T., Schulz, H., Scherer, C., Rudelius, M., Zoller, M., Keppler, O. T., . . . Stark, K. (2020). Vascular neutrophilic inflammation and immunothrombosis distinguish severe COVID-19 from influenza pneumonia [<https://doi.org/10.1111/jth.15179>]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *n/a*(*n/a*). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jth.15179>
- Nicolai, L., Leunig, A., Brambs, S., Kaiser, R., Weinberger, T., Weigand, M., Muenchhoff, M., Hellmuth, J. C., Ledderose, S., & Schulz, H. (2020). Immunothrombotic dysregulation in COVID-19 pneumonia is associated with respiratory failure and coagulopathy. *Circulation*.
- Nicolai, L., Leunig, A., Pekayvaz, K., Esefeld, M., Anjum, A., Rath, J., Riedlinger, E., Ehreiser, V., Mader, M., & Eivers, L. (2022). Thrombocytopenia and splenic platelet directed immune responses after intravenous ChAdOx1 nCov-19 administration. *Blood*.
- Nicolai, L., Schiefelbein, K., Lipsky, S., Leunig, A., Hoffknecht, M., Pekayvaz, K., Raude, B., Marx, C., Ehrlich, A., Pircher, J., Zhang, Z., Saleh, I., Marel, A.-K., Löf, A., Petzold, T., Lorenz, M., Stark, K., Pick, R., Rosenberger, G., . . . Gaertner, F. (2020). Vascular surveillance by haptotactic blood platelets in inflammation and infection. *Nat Commun*, *11*(1), 5778. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19515-0>
- Nidorf, S. M., Fiolet, A. T. L., Mosterd, A., Eikelboom, J. W., Schut, A., Opstal, T. S. J., The, S. H. K., Xu, X.-F., Ireland, M. A., Lenderink, T., Latchem, D., Hoogslag, P., Jerzewski, A., Nierop, P., Whelan, A., Hendriks, R., Swart, H., Schaap, J., Kuijper, A. F. M., . . . Thompson, P. L. (2020). Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021372>
- Oldgren, J., Wallentin, L., Alexander, J. H., James, S., Jonelid, B., Steg, G., & Sundstrom, J. (2013). New oral anticoagulants in addition to single or dual antiplatelet therapy after an acute coronary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J*, *34*(22), 1670-1680. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh049>
- Organization, W. H. (2016). *Cardiovascular diseases (CVDs)*. Retrieved 28. June from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>

- Othman, M., Labelle, A., Mazzetti, I., Elbatarny, H. S., & Lillicrap, D. (2007). Adenovirus-induced thrombocytopenia: the role of von Willebrand factor and P-selectin in mediating accelerated platelet clearance. *Blood*, *109*(7), 2832-2839.
- Pekayvaz, K., Leunig, A., Kaiser, R., Brambs, S., Joppich, M., Janjic, A., Popp, O., Polewka, V., Wange, L. E., Gold, C., Kirchner, M., Muenchhoff, M., Hellmuth, J. C., Scherer, C., Eser, T., Deák, F., Kuhl, N., Linder, A., Saar, K., . . . Nicolai, L. (2021). Protective immune trajectories in early viral containment of non-pneumonic SARS-CoV-2 infection. *bioRxiv*, 2021.2002.2003.429351. <https://doi.org/10.1101/2021.02.03.429351>
- Pekayvaz, K., Leunig, A., Kaiser, R., Joppich, M., Brambs, S., Janjic, A., Popp, O., Nixdorf, D., Fumagalli, V., & Schmidt, N. (2022). Protective immune trajectories in early viral containment of non-pneumonic SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*, *13*(1), 1-21.
- Prislovsky, A., & Strom, T. S. (2013). Increased uptake by splenic red pulp macrophages contributes to rapid platelet turnover in WASP(-) mice. *Exp Hematol*, *41*(9), 789-798. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2013.05.003>
- Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S. D., Kastelein, J. J. P., Cornel, J. H., Pais, P., Pella, D., Genest, J., Cifkova, R., Lorenzatti, A., Forster, T., Kobalava, Z., . . . Glynn, R. J. (2017). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New England Journal of Medicine*, *377*(12), 1119-1131. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707914>
- Rondina, M. T., & Garraud, O. (2014). Emerging evidence for platelets as immune and inflammatory effector cells. *Front Immunol*, *5*, 653. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00653>
- Schulte-Schrepping, J., Reusch, N., Paclik, D., Baßler, K., Schlickeiser, S., Zhang, B., Krämer, B., Krammer, T., Brumhard, S., & Bonaguro, L. (2020). Severe COVID-19 is marked by a dysregulated myeloid cell compartment. *Cell*, *182*(6), 1419-1440.
- Schurr, Y., Sperr, A., Volz, J., Beck, S., Reil, L., Kusch, C., Eiring, P., Bryson, S., Sauer, M., & Nieswandt, B. (2019). Platelet lamellipodium formation is not required for thrombus formation and stability. *Blood*, *134*(25), 2318-2329.
- Simpson, C. R., Shi, T., Vasileiou, E., Katikireddi, S. V., Kerr, S., Moore, E., McCowan, C., Agrawal, U., Shah, S. A., & Ritchie, L. D. (2021). First-dose ChAdOx1 and BNT162b2 COVID-19 vaccines and thrombocytopenic, thromboembolic and hemorrhagic events in Scotland. *Nat Med*, 1-8.
- Stark, K., Eckart, A., Haidari, S., Tirniceriu, A., Lorenz, M., von Brühl, M.-L., Gärtner, F., Khandoga, A. G., Legate, K. R., & Pless, R. (2013). Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and instruct them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol*, *14*(1), 41-51.
- Stark, K., & Massberg, S. (2021). Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *Nature Reviews Cardiology*, *18*(9), 666-682. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00552-1>
- Stone, D., Liu, Y., Shayakhmetov, D., Li, Z.-Y., Ni, S., & Lieber, A. (2007). Adenovirus-platelet interaction in blood causes virus sequestration to the reticuloendothelial system of the liver. *Journal of virology*, *81*(9), 4866-4871.
- Tardif, J.-C., Kouz, S., Waters, D. D., Bertrand, O. F., Diaz, R., Maggioni, A. P., Pinto, F. J., Ibrahim, R., Gamra, H., & Kiwan, G. S. (2019). Efficacy and safety of low-dose colchicine after myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*, *381*(26), 2497-2505.
- Tas, J. M. J., Mesin, L., Pasqual, G., Targ, S., Jacobsen, J. T., Mano, Y. M., Chen, C. S., Weill, J.-C., Reynaud, C.-A., & Browne, E. P. (2016). Visualizing antibody affinity maturation in germinal centers. *Science*, *351*(6277), 1048-1054.
- Tiedt, R., Schomber, T., Hao-Shen, H., & Skoda, R. C. (2007). Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood*, *109*(4), 1503-1506.
- van Kruchten, R., Mattheij, N. J. A., Saunders, C., Feijge, M. A. H., Swieringa, F., Wolfs, J. L. N., Collins, P. W., Heemskerk, J. W. M., & Bevers, E. M. (2013). Both TMEM16F-dependent and TMEM16F-

- independent pathways contribute to phosphatidylserine exposure in platelet apoptosis and platelet activation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 121(10), 1850-1857.
- Verschoor, A., Neuenhahn, M., Navarini, A. A., Graef, P., Plaumann, A., Seidlmeier, A., Nieswandt, B., Massberg, S., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H., & Busch, D. H. (2011). A platelet-mediated system for shuttling blood-borne bacteria to CD8alpha+ dendritic cells depends on glycoprotein GPIb and complement C3. *Nat Immunol*, 12(12), 1194-1201. <https://doi.org/10.1038/ni.2140>
- von Bruhl, M. L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., Khandoga, A., Tirniceriu, A., Coletti, R., Kollnberger, M., Byrne, R. A., Laitinen, I., Walch, A., Brill, A., Pfeiler, S., Manukyan, D., Braun, S., Lange, P., Riegger, J., . . . Massberg, S. (2012). Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*, 209(4), 819-835. <https://doi.org/10.1084/jem.20112322>
- Wong, C. H., Jenne, C. N., Petri, B., Chrobok, N. L., & Kubes, P. (2013). Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat Immunol*, 14(8), 785-792. <https://doi.org/10.1038/ni.2631>
- Zhou, Z., Ren, L., Zhang, L., Zhong, J., Xiao, Y., Jia, Z., Guo, L., Yang, J., Wang, C., Jiang, S., Yang, D., Zhang, G., Li, H., Chen, F., Xu, Y., Chen, M., Gao, Z., Yang, J., Dong, J., . . . Wang, J. (2020). Heightened Innate Immune Responses in the Respiratory Tract of COVID-19 Patients. *Cell Host Microbe*, 27(6), 883-890.e882. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.017>

## 6. Verzeichnis der Arbeiten als Habilitationsleistung

**Nicolai L**, Schiefelbein K, Lipsky S, Leunig A, Hoffknecht M, Pekayvaz K, Raude B, Marx C, Ehrlich A, Pircher J, Zhang Z, Saleh I, Marel AK, Löf A, Petzold T, Lorenz M, Stark K, Pick R, Rosenberger G, Weckbach L, Uhl B, Xia S, Reichel CA, Walzog B, Schulz C, Zheden V, Bender M, Li R, Massberg S, Gaertner F. Vascular surveillance by haptotactic blood platelets in inflammation and infection. *Nat Commun.* 2020, 11:5778. PMID: 33188196 (IF 2020: 14.919)

**Nicolai L**, Kaiser R, Escaig R, Hoffknecht ML, Anjum A, Leunig A, Pircher J, Ehrlich A, Lorenz M, Ishikawa-Ankerhold H, Aird WC. Single platelet and megakaryocyte morpho-dynamics uncovered by multicolor reporter mouse strains in vitro and in vivo. *Haematologica.* 2021 Sep 16. PMID: 34525794 (IF 2020: 9.941)

Kaiser R, Escaig R, Kranich J, Hoffknecht M, Anjum A, Polewka V, Mader M, Hu W, Belz L, Hold C, Titova A, Lorenz M, Pekayvaz P, Kääb S, Gaertner F, Stark K, Brocker T, Massberg S, **Nicolai L**. Procoagulant platelet sentinels prevent inflammatory bleeding through GPIIB/IIIa. *Blood.* (IF 2020: 23.63)

**Nicolai L**, Leunig A, Brambs S, Kaiser R, Weinberger T, Weigand M, Muenchhoff M, Hellmuth JC, Ledderose S, Schulz H, Scherer C, Rudelius M, Zoller M, Höchter D, Keppler O, Teupser D, Zwißler B, von Bergwelt-Baildon M, Kääb S, Massberg S, Pekayvaz K, Stark K. Immunothrombotic dysregulation in COVID-19 pneumonia is associated with respiratory failure and coagulopathy. *Circulation.* 2020, 142:1176-1189. PMID: 32755393, *\*shared first authors* (IF 2020: 29.690)

**Nicolai L**, Leunig A, Brambs S, Kaiser R, Joppich M, Hoffknecht ML, Gold C, Engel A, Polewka V, Muenchhoff M, Hellmuth JC, Ruhle A, Ledderose S, Weinberger T, Schulz H, Scherer C, Rudelius M, Zoller M, Keppler OT, Zwißler B, von Bergwelt-Baildon M, Kääb S, Zimmer R, Bülow RD, von Stillfried S, Boor P, Massberg S, Pekayvaz K, Stark K. Vascular neutrophilic inflammation and immunothrombosis distinguish severe COVID-19 from influenza pneumonia. *J Thromb Haemost.* 2021, 19:574-581. PMID: 33217134, *\*shared first authors* (IF 2020: 5.824)

Kaiser R, Leunig A, Pekayvaz K, Popp O, Joppich M, Polewka V, Escaig R, Anjum A, Hoffknecht ML, Gold C, Brambs S, [...], **Nicolai L\***, Stark K\*. Self-sustaining IL-8 loops drive a prothrombotic neutrophil phenotype in severe COVID-19. *JCI insight.* 2021 Sep 22;6(18). PMID: 34403366 *\*shared last authors* (IF 2020: 8.315) *\*shared last authors*

---

Pekayvaz K, Leunig A, Kaiser R, Joppich M, Brambs S, Janjic A, Popp O, Nixdorf D, Fumagalli V, Schmidt N, Polewka V.,Anjum A, Knottenberg V, Eivers L, Wange L, Gold C, Kirchner M, Muenchhoff M, Hellmuth J, Scherer C, Rubio.Acero R, Eser T, Deak F, Puchinger K, Kuhl N, Linder A, Saar K, Tomas L, Schulz C, Wieser A, Enard W, Kroidl I, Geldmacher C, Bergwelt—Baildon M, Keppler O, Munschauer M, Iannacone M, Zimmer, R, Mertins P, Hubner N, Hoelscher M, Massberg S, Stark K, **Nicolai L**. Protective immune trajectories in early viral containment of non-pneumonic SARS-CoV-2 infection. *Nature Communications*.13(1):1-21. *\*shared last authors* (IF 2020: 14.919)

**Nicolai L**, Leunig A, Pekayvaz P, Anjum A, Esefeld M, Riedlinger R, Ehreiser V, Mader M, Eivers L, Hoffknecht M, Zhang Z, Kugelmann D, Rossaro D, Rath J, Escaig R, Kaiser R, Polewka V, Titova A, Petzold T, Spiekermann K, Iannacone M, Theile T, Greinacher A, Stark K, Massberg S. Thrombocytopenia and splenic platelet directed immune responses after intravenous ChAdOx1 nCov-19 administration. *Blood* (IF 2020: 23.63)

## 7. Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie bei meiner Familie für die stete Unterstützung in allen Aspekten des Lebens bedanken, die meine wissenschaftliche Arbeit ermöglicht hat.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Steffen Massberg für seine Unterstützung und Förderung meines wissenschaftlichen Werdegangs, sowie seinem Vertrauen in meine wissenschaftlichen Fähigkeiten. Ich möchte außerdem für die wissenschaftliche Zusammenarbeit, den regen Austausch und freundschaftliche Hilfestellung bei Tobias Petzold und Konstantin Stark bedanken.

Ich möchte mich außerdem bei dem exzellenten wissenschaftlichen Team bedanken, welche diese Arbeiten erst möglich gemacht hat: Afra Anjum, Alexander Leunig, Dario Rossaro, Kathrin Schiefelbein, Kami Pekayvaz, Magdalena Mader, Marie-Louise Hoffknecht, Markus Joppich, Rainer Kaiser, Raphael Escaig, Silvia Lipsky, Sophia Brambs, Viktoria Knottenberg. Mein Dank gilt auch den zahlreichen Kooperationspartnern, mit welchen wir so erfolgreich und inspirierend zusammengearbeitet haben und in vielen Fällen auch weiterhin zusammenarbeiten.