

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Thrombose-induzierte inflammatorische Signaturen in
Neutrophilen und Monozyten

von Franziska Wanda Wendler
aus Garmisch-Partenkirchen

München 2023

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

Angefertigt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des
Klinikums der Universität München in Großhadern

Mentor: Prof. Dr. med. Konstantin Stark

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Michèle M.-J. D. Bergmann

Tag der Promotion: 11. Februar 2023

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Die venöse Thrombose	2
1.1.	Definition der venösen Thrombose	2
1.2.	Entstehung einer Thrombose.....	2
1.3.	Komplikationen und klinische Auswirkungen der venösen Thrombose	4
1.4.	Systemische Reaktion und Rolle der Inflammation in der Thrombose	6
2.	Neutrophile in der Thrombose.....	9
2.1.	Neutrophile in der Thrombusentstehung.....	9
2.2.	Rolle der Neutrophilen in der Inflammation	11
3.	Monozyten in der Thrombose	12
3.1.	Unterscheidung klassische und nicht-klassische Monozyten.....	12
3.2.	Monozyten in der Thrombusentstehung.....	13
3.3.	Rolle der Monozyten in der Inflammation	14
4.	Pharmakologische Thrombose­therapie präventiv und kurativ	15
4.1.	Kurative und präventive pharmakologische Therapien	15
4.2.	Risiken und Nebenwirkungen pharmakologischer Therapieschemata	16
4.3.	Antiinflammatorische Ansätze zur Prävention und Therapie der Thrombose.....	17
4.3.1.	Ausgewählte antiinflammatorische Ansätze zur Thromboseprävention....	19
4.3.1.1.	SPP1 – Osteopontin.....	19
4.3.1.2.	TGM2 – Transglutaminase 2.....	20
III.	ZIELSETZUNG	21
IV.	MATERIAL UND METHODEN	22
1.	Versuchstiere	22
1.1.	Mauslinie C57BL/6J	22
1.2.	Tierhaltung	22
2.	Operationsverfahren.....	24
2.1.	Narkose.....	24
2.2.	Stenosierung der <i>Vena cava caudalis</i>	25

2.2.1.	OP-Vorbereitung	25
2.2.2.	Eröffnung der Bauchhöhle	26
2.2.3.	Ligatur der <i>Vena cava caudalis</i>	26
3.	Probenentnahme.....	28
3.1.	Kardiale Blutentnahme.....	28
3.2.	Entnahme <i>Vena cava caudalis</i>	28
3.3.	Blutwertanalyse und Plasmagewinnung	29
3.4.	Knochenmarkentnahme.....	29
4.	Einzelzell-RNA-Sequenzierung.....	30
4.1.	Ablauf der Einzelzell-RNA-Sequenzierung.....	30
4.2.	Probenbearbeitung zur Einzelzell-RNA-Sequenzierung.....	30
4.2.1.	Allgemeine Probenvorbereitung zur Herstellung einer Einzelzellsuspension	30
4.2.1.1.	Vorbereitung der Vollblutproben	31
4.2.1.2.	Vorbereitung der Thrombusproben.....	31
4.2.1.3.	Vorbereitung der Knochenmarkproben.....	32
4.2.2.	Herstellung der 10x-Libraries	32
4.2.3.	Sequenzierung der Libraries.....	32
4.2.4.	Visualisierung und Datenanalyse	33
5.	Umsetzung der Auswahl antiinflammatorischer Ansätze zur Thromboseprävention.....	34
5.1.	Applikation der Inhibitoren.....	34
5.1.1.	Intraperitoneale Injektion	34
5.1.2.	Orale Gavage.....	34
5.2.	Ausgewählte Ziele zur antiinflammatorischen Thromboseprävention	35
5.2.1.	SPP1 - Osteopontin-Inhibitor	35
5.2.2.	TGM2 – Transglutaminase 2-Inhibitor	35
6.	Statistik.....	36
V.	ERGEBNISSE	37
1.	Darstellung thrombose-induzierter inflammatorischer Signaturen in Neutrophilen und Monozyten des Thrombus mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung.....	37
1.1.	Übersichtsanalyse der Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten.....	37

1.2.	Darstellung des neutrophilen Thrombuscluster.....	44
1.2.1.	Darstellung der Thrombusneutrophilen des Thrombusclusters	46
1.2.2.	Darstellung der Blutneutrophilen und Knochenmarkneutrophilen des neutrophilen Thrombusclusters	53
1.3.	Darstellung der neutrophilen Knochenmarkreserve.....	56
1.4.	Darstellung der Thrombusmonozyten.....	58
1.4.1.	Darstellung des monozytären Thrombuscluster	59
2.	Anwendung ausgewählter antiinflammatorischer Ansätze zur Thromboseprävention im Mausmodell	64
2.1.	Mesalazin	65
2.2.	Tgm2-Inhibitor	66
VI.	DISKUSSION	67
1.	Thrombose-induzierte Prozesse in Neutrophilen und Monozyten des Thrombus als Grundlage für antiinflammatorische Thrombosetherapieansätze	68
2.	Hinweise auf antiinflammatorische Therapieansätze in der neutrophilen Knochenmarkreserve.....	72
3.	Ausblick.....	74
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	75
VIII.	SUMMARY.....	77
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	79
X.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	101
XI.	TABELLENVERZEICHNIS	103
XII.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	104
XIII.	DANKSAGUNG	106

I. EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit. Etwa 17,9 Millionen Menschen starben allein 2019 durch kardiovaskuläre Erkrankungen, was 32% der Sterbefälle weltweit ausmacht [1]. Trotz des medizinischen Fortschrittes geht die Zahl der kardiovaskulären Erkrankungen nicht zurück. Die venöse Thrombose ist Teil dieser Erkrankungen.

Venöse Thrombosen und Lungenembolien als deren Komplikation, bilden zusammen den venösen Thromboembolismus. Venöser Thromboembolismus betrifft jährlich etwa 700.000 Menschen in Europa. Die Mortalität der Erkrankung ist zurückgegangen, was auf besseres medikamentöses Management, aber hauptsächlich auf bessere Diagnostik zurückzuführen ist. Die möglichen lebensqualitätseinschränkenden Folgen einer Thrombose bleiben jedoch bestehen. Ohne fortgeführte Langzeitbehandlung erleiden circa 30% der Patienten innerhalb von 10 Jahren eine erneute Thrombose [2, 3].

Die medikamentöse Behandlung basiert nach wie vor auf Antikoagulation, welche mit Blutungen als häufige und gefährliche Nebenwirkungen einhergeht. Eine neuere Erkenntnis ist, dass das Immunsystem und seine inflammatorische Reaktion eine entscheidende Rolle in der Thrombose spielt [4]. Dies bietet erfolgversprechende Angriffspunkte für neue Therapien, welche nicht auf Antikoagulation, sondern auf Antiinflammation basieren und somit keine Blutungen provozieren.

Einzelzell-RNA-Sequenzierung ist eine relativ neue Möglichkeit Zellen zu untersuchen [5]. Diese Methode macht es möglich, verschiedenste Reaktionen, Signalwege, Eigenschaften oder Zustände umfassend zu analysieren und somit ihre Funktion zu deuten [6, 7]. Ziel dieser Arbeit ist, mithilfe dieser Methode, eine neue Herangehensweise an die venöse Thrombose zu zeigen und einen Einblick in inflammatorische Faktoren in Thrombusimmunzellen zu schaffen. Durch diese Analyse können dann mögliche Ansatzpunkte zur anti-inflammatorischen Thrombose-therapie identifiziert werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Die venöse Thrombose

1.1. Definition der venösen Thrombose

Die Thrombose ist definiert als eine intravasale Blutgerinnung, welche zu einem Blutgerinnsel (Thrombus) führt. Dieser Thrombus kann ein oder mehrere Blutgefäße teilweise oder vollständig verschließen und so zu einer Einschränkung oder vollständigen Blockade des Blutstroms in dem jeweiligen Gefäß oder Versorgungsbereich führen. Grundsätzlich können Thrombosen in jedem Blutgefäß auftreten [8]. Es wird zwischen einer venösen und arteriellen Thrombose unterschieden [9].

1.2. Entstehung einer Thrombose

Die drei heute noch gültigen Bestandteile der Virchows-Trias – Veränderungen des Blutflusses, Veränderungen der Gefäßwand und Veränderungen der Blutzusammensetzung – beschreiben die Faktoren, welche zu einer Thrombose führen können. Selbstverständlich wurden diese Punkte bis heute verfeinert und an neue Erkenntnisse angepasst [10].

Unter Veränderungen des Blutflusses versteht man Veränderungen der Fließeigenschaften. Besonders hervorzuheben sind thrombotische Geschehen infolge Immobilisation. Unzählige Studien unterstreichen den Zusammenhang zwischen Flugreisen, beziehungsweise Reisen mit langen Sitzzeiten im Allgemeinen, und thrombotischen Ereignissen [11]. Auch Krankenhausaufenthalte, welche zu langen Immobilisationszeiten oder Liegezeiten führen, werden als Ursache für Thrombose angeführt [12]. Hierzu zählen auch partielle Immobilisationen, beispielsweise Ruhigstellung einzelner Körperteile, welche zu Thrombosen führen können [13]. Im physiologischen Zustand, bei normaler Bewegung, würde die Muskelpumpe den venösen Fluss des Blutes fördern und Stase verhindern. Bei Immobilisation findet dies nicht mehr statt. Dennoch sind die exakten Abläufe und Hintergründe zur Thrombose aufgrund oder nach Immobilisation noch nicht vollständig geklärt. Speziell welche Prophylaxe Nutzen und Risiken ausgleicht und bei welchen Individuen es notwendig wäre [14].

Neuere Studien zeigen zusätzlich einen Zusammenhang zwischen alternden venösen Klappen und der Entstehung der venösen Thrombose. Verstärkter venöser Rückfluss und verstärkte Klappendicke, infolge der Alterung, wird als Risikofaktor angeführt [15].

Veränderungen der Blutzusammensetzung oder Hyperkoagulabilität werden beispielsweise hervorgerufen durch Veränderungen der Plättchen, der Gerinnung oder der fibrinolytischen Kaskade, welche zu einem Ungleichgewicht und Malfunktion der physiologischen koagulatorischen Abläufe führen [10].

Ursächlich für Veränderungen können Tumorerkrankungen sein welche, je nach Malignitätstyp, eine höhere Thromboseinzidenz aufweisen. Pankreas-, Hirn-, Magen- und Eierstocktumore sind Tumorarten mit der höchsten Thromboseinzidenz [16]. Sobald ein metastatisches Tumorgeschehen stattfindet, erhöht sich das Risiko weiter [17]. Erklärt wird diese Korrelation zum einen durch die zirkulierenden, *Tissue-Factor* exprimierenden Tumorzellen. *Tissue-Factor* ist essentiell für Hämostase und ein physiologischer Auslöser der Koagulation [18, 19]. Zusätzlich stellen *Tissue-Factor*-exprimierende Mikropartikel, welche von Tumorzellen freigesetzt werden, eine Quelle für *Tissue-Factor* dar [20].

Genetische Erkrankungen können eine weitere Ursache von Hyperkoagulabilität sein. Antithrombin, Protein C und Protein S sind Koagulationsinhibitoren. Liegt eine genetische Veränderung und somit ein Mangel dieser Proteine vor, führt dies zu einem erhöhten Thromboserisiko [21-23]. Faktor V-Leiden-Mutationen verursachen eine Resistenz gegen Neutralisation durch aktiviertes Protein C [24] auch aktiviertes Protein C - Resistenz (APC-R) genannt. Diese Mutationen resultieren ebenfalls in einem prokoagulatorischen Zustand und erhöhtem Thromboserisiko [25]. Weiter können eine Mutation von Faktor II (Prothrombin) [26], Hyperhomocysteinämie (ausgelöst durch genetische Defekte in Enzymen des intrazellulären Metabolismus von Homocystein) [27] oder erhöhte Plasmaspiegel verschiedener Koagulationsfaktoren (Faktor VIII [28], Fibrinogen [29] oder Faktor XI [30]) zu einem erhöhten Thromboserisiko führen.

Unter Veränderungen der Gefäßwand versteht man Veränderungen des Endothels oder Endokards. Verletzungen der Gefäßwand sind der vorwiegende Auslöser eines prokoagulatorischen Geschehens. Bei Verletzung setzen aktivierte Endothelzellen von-Willebrandt-Faktor frei und rekrutieren so Thrombozyten, welche am Ort der

Verletzung aggregieren und die Vorstufe eines Thrombus bilden [31]. Thrombozyten im zirkulierenden Blut kommen bei Verletzungen des Endothels mit Kollagenfasern in Berührung, weitere Thrombozyten werden aktiviert [32]. Außerdem können Veränderungen der Gefäßwand durch Ablagerungen und Umbauvorgänge wie bei Arteriosklerose entstehen. Es bilden sich Plaques, diese können rupturieren und so eine Thrombose auslösen [33]. Diese Art von Veränderungen treten jedoch häufiger bei arterieller Thrombose auf.

1.3. Komplikationen und klinische Auswirkungen der venösen Thrombose

Die Untersuchungen dieser Arbeit zu Thrombose basieren auf einem Modell der tiefen Venenthrombose (TVT). Die venöse Thrombose tritt jährlich bei etwa 0,1 % der Bevölkerung auf [34]. Etwa 9-11 % der TVT-Verläufe enden durch Lungenembolien tödlich [35]. Symptome einer TVT beim Menschen können Schwellung oder Rötung, bis hin zu Druckempfindlichkeit und Schmerzen des betroffenen Körperteils sein [36].

Die TVT bildet zusammen mit der Lungenembolie den venösen Thromboembolismus (VTE). Die Lungenembolie infolge einer tiefen Venenthrombose ist eine der häufigsten und schwerwiegendsten Komplikationen und tritt in einem Drittel der Fälle von TVT auf [37]. Hierbei löst sich ein Teil des ursprünglichen tiefen Venenthrombus, wandert der venösen Blutstrombahn folgend bis in ein Lungengefäß und verschließt dieses. Im Gegensatz zu einer tiefen Venenthrombose ohne die zusätzliche Komplikation der Lungenembolie kommt es hierbei zu schwerwiegenderen Symptomen, welche häufiger zum Tod führen [38, 39]. Symptome einer Lungenembolie sind vielfältig und reichen von Dyspnoe, Tachykardie, Schwindel, Brustschmerzen, Blutdruckabfall bis hin zu einem Schock [36]. All diese Symptome sind jedoch nicht spezifisch oder pathognomonisch für eine Lungenembolie [40]. Eine Lungenembolie kann auch vollständig asymptomatisch bleiben, was in etwa einem Drittel der Fälle nach TVT der Fall ist [41]. Diese unspezifische Symptomatik kann Diagnose, Behandlung und somit auch die Schwere des Verlaufes, negativ beeinflussen.

Eine weitere mögliche, schwerwiegende Folge der TVT ist das Postthrombotische Syndrom (PTS), welches zum größer gefassten Begriff der chronischen thrombotischen venösen Krankheit (CTDV) zuzuordnen ist [38]. Dieses Postthrombotische Syndrom tritt innerhalb von 2 Jahren nach der Diagnose in 20-50 % der Fälle von TVT auf [42]. Als Folge der Obstruktion der betreffenden Vene, der hiervon geschädigten Venenwand und insuffizienten Venenklappen, ergibt sich ein hoher venöser Druck während der TVT [43]. Inflammatorische Reaktionen während der Auflösung des Thrombus und der Reparatur der Venenwand, können zu einer Fibrose der Venenwand führen [44, 45]. Durch die daraus folgende, meist chronische venöse Insuffizienz, erklären sich die Symptome des PTS, welche denen der chronischen venösen Insuffizienz anderer Ursache gleichen. In milden Fällen bleibt es bei Schwellungen, in schweren Fällen kann es zu Ödemen, Rötungen, starken Schmerzen bis hin zu einem chronischen Ulcus kommen [46]. In schweren Fällen führt PTS zu einer enormen Einschränkung der Lebensqualität [47].

Ein zusätzliches Risiko nach einer TVT ist die Rethrombose, eine erneute venöse Thrombose nach einer bereits diagnostizierten ersten Episode von Thrombose. Ein Jahr nach Diagnose der ersten Thrombose, liegt die Inzidenz der Patienten, die einen Rückfall erleiden bei 5,6 % und steigt im weiteren Zeitverlauf additiv graduell an [48]. Unabhängig von Art und Dauer der Behandlung, besteht das höchste Risiko für eine Rethrombose in den ersten 6-12 Monaten [49]. Somit ist das Risiko und die Wahrscheinlichkeit einer Rethrombose trotz präventiver Behandlung wesentlich höher, als das einer ersten venösen Thrombose.

1.4. Systemische Reaktion und Rolle der Inflammation in der Thrombose

Neben den in 1.3. aufgeführten, vielfältig erforschten Faktoren die zu einem prokoagulatorischen Zustand und somit zu Thrombose führen können, ist in den letzten Jahren die Inflammation im Zusammenhang mit Thromboseentstehung als wichtiger Faktor in den Fokus der Forschung gerückt. Es besteht eine wechselseitige Abhängigkeit zwischen Thrombose und Inflammation.

Die systemische Reaktion während einer venösen Thrombose ist vielschichtig und zeigt Verbindungen und ähnliche Eigenschaften einer Inflammation. In beiden Fällen spielen Zellen des angeborenen Immunsystems und das Gerinnungssystem eine Rolle [50, 51]. Die Inflammation ist ein Signalweg, welcher die Thromboseentstehung durch verschiedene Risikofaktoren in Gang setzt [52]. Einen Hinweis auf die Inflammation gibt der erhöhte CRP-Wert (C-reaktives Protein). Denn C-reaktives Protein ist ein Marker für systemische Inflammation [53]. Auch akute Infektionserkrankungen wie beispielsweise Pneumonie oder akute Bronchitis, und Autoimmunerkrankungen mit chronischen Entzündungen wie beispielsweise systemischer Lupus Erythematosus (SLE), gehen mit einem erhöhten Risiko für Thrombosen einher [54].

Das inflammatorische Zusammenspiel von angeborenen Immunzellen und Thrombozyten und die darauffolgende Aktivierung des Gerinnungs- und Komplementsystems, wird als Immunothrombose bezeichnet [8]. Es ist klassisch gesehen die Antwort des angeborenen Immunsystems auf intravaskuläre Pathogene, welche so an der Ausbreitung und Schädigung des Organismus gehindert werden sollen [55-57]. Die Verbindung zwischen angeborenem Immunsystem und Gerinnung ist vermutlich evolutionär bedingt [58, 59]. Ein Beispiel für diese Verbindung ist Thrombin. Thrombin als Teil der Gerinnungskaskade führt zu Fibrinbildung. In der Inflammation aktiviert es IL-1alpha, welches die Immunantwort stimuliert [60].

Kommt es durch eine überschießende Reaktion der Immunothrombose, ähnlich einer Inflammation, zu einem stark prokoagulatorischen Zustand, wird dieser als Thromboinflammation bezeichnet. Im Falle der Immunothrombose und Thromboinflammation im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen wie venöser Thrombose, liegt meist kein typisches Pathogen wie Bakterien oder Viren vor [61]. Es handelt sich um eine sterile (Thrombo-)Inflammation [4]. Bei dieser überhöhten Aktivierung, kann es zu einem thrombotischen Ereignis kommen [62].

Der primäre Auslöser der systemischen immunologischen Reaktion bei venöser Thrombose ist kein Pathogen und keine Verletzung des Endothels, sondern der in 1.3 bereits genannte Faktor, reduzierter Blutfluss. Der Gefäßbereich im reduzierten Blutfluss oder der Stase wird reduziert mit Sauerstoff versorgt [63]. Lokale und auch systemische Hypoxie stehen in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für venöse Thrombose [64, 65]. Hypoxische Bedingungen aktivieren verschiedene Abläufe im umgebenden Endothel. Mastzellen werden aktiviert und setzen gespeicherte, proinflammatorische Mediatoren wie Histamin und TNF-alpha frei. Diese Mediatoren allein besitzen neben den typischen proinflammatorischen Effekten, auch prothrombotische Effekte. Histamin stimuliert beispielsweise *Tissue-Factor* [66], welcher wie bereits beschrieben Aktivator der extrinsischen Gerinnungskaskade mit stark prothrombotischen Eigenschaften ist [61]. TNF-alpha besitzt ebenfalls neben proinflammatorischen, prothrombotische Eigenschaften [67].

Zusätzlich aktivieren diese Mediatoren Endothelzellen, welche Weibel-Palad-Körperchen (WP-Körperchen) freisetzen [68, 69]. Inhalt von WP-Körperchen sind die Zelladhäsionsmoleküle von-Willebrandt-Faktor und P-Selektin. P-Selektin rekrutiert Leukozyten und spielt eine wichtige Rolle in der interzellulären Kommunikation von Leukozyten und Thrombozyten, sowohl bei steriler Inflammation, als auch bei venöser Thrombose [4]. Verschiedene Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen erhöhten P-Selektin-Werten und venöser Thrombose [70]. Von-Willebrand-Faktor ist ein wichtiger Faktor in der Rekrutierung und Aggregation von Thrombozyten und somit in der Initiation von Thrombose [71].

Hypoxie als Resultat der veränderten Flusseigenschaften des Blutes führt zusammenfassend über die Aktivierung verschiedener Zellen und den daraus resultierenden zellulären und molekularen Abläufen zu einem prokoagulatorischen Zustand [72] und erhöhtem Thromboserisiko.

Durch Hypoxie werden auch ROS (*reactive oxygen species*) synthetisiert, welche ebenfalls Endothelzellen aktivieren [73]. Hypoxie aktiviert außerdem das NLRP3-Inflammasom [74]. Es ist ein Multiproteinkomplex in angeborenen Immunzellen, welcher bei Aktivierung wiederum Entzündungsreaktionen der Zellen aktiviert. Dieses Inflammasom aktiviert die Freisetzung von IL-1beta und IL-18, außerdem *high-mobility group protein B1* (HMGB1) und fördert somit die Inflammation und die venöse Thrombose [75-77].

Neben anderen interzellulären Signalwegen aktivieren beispielsweise ROS und von-Willebrand-Faktor das Komplementsystem [78]. Erhöhte C3 und C5-Level korrelieren mit einem erhöhten Thromboserisiko [79]. Ein weiterer Baustein in der systemischen Reaktion bei venöser Thrombose.

Der enge Zusammenhang zwischen Thrombose und Inflammation wird in den einzelnen Abläufen deutlich. Es fällt auf, dass so gut wie jeder Vorgang und Signalweg sowohl prothrombotisch, als auch proinflammatorisch interpretiert werden kann. Inflammation kann Thrombose auslösen und Thrombose kann Inflammation auslösen.

2. Neutrophile in der Thrombose

Diese Zelltypen bilden den Hauptanteil im venösen Thrombus und spielen eine wichtige Rolle im Prozess der Thrombosierung.

2.1. Neutrophile in der Thrombusentstehung

Neutrophile spielen in der Thrombusentstehung eine prominente Rolle. Sie werden durch in 1.4. bereits beschriebene Signale zum Endothel rekrutiert und heften sich dort an. Die stärksten Auswirkungen auf die Thrombose und Thrombogenese üben Neutrophile durch die Bildung von NETs (*neutrophil extracellular traps*) aus.

NETs sind essentiell für die Thrombogenese und ein struktureller Teil des Thrombus [4, 80]. Patienten mit venöser Thrombose weisen einen erhöhten Plasmaspiegel von NET-Markern auf [81, 82].

Bei venöser Thrombose finden wir nicht die inflammatorischen Signalgeber vor, welche für die NET-Bildung als Reaktion auf Pathogene wie Bakterien verantwortlich sind. Bei steriler Thromboinflammation, in Abwesenheit von Pathogenen, wird NET-Bildung vorrangig durch aktivierte Thrombozyten ausgelöst. Thrombozyten geben verschiedene Chemokine, Transmitter und Proteine ab, um Neutrophile anzulocken und zu aktivieren. Beispielsweise präsentieren Thrombozyten P-Selektin, welches an P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 auf Neutrophilen bindet. P-Selektin-PSGL1-Bindung ist sowohl für die Rekrutierung, als auch für die Auslösung von NET-Bildung wichtig. PSGL1 sitzt konzentriert am führenden Ende der Zellmembran und zusammen mit dem Chemokinrezeptor CXCR2 wird die β 2-Integrin abhängige Anhaftung an der Zellmembran und in Folge NETose ausgelöst [83-85].

HMGB1 als *danger-associated molecular pattern* (DAMP) ist ein weiterer möglicher Auslöser von NETose. Es wird von aktivierten Plättchen an der Endothelwand präsentiert und sezerniert [77, 86].

Als Auslöser der NET-Bildung ist die Aktivierung der NADPH-Oxidase in aktivierten Leukozyten von Bedeutung. Der Signalweg führt zur ROS-Bildung durch Neutrophile, was im weiteren Verlauf Enzyme wie Myeloperoxidase und Neutrophile Elastase stimuliert. Diese Enzyme wiederum führen zur Degranulation und Freisetzung der NET-Komponenten [87, 88].

NETs setzen sich aus Chromatin und granulären Proteinen zusammen, den Inhalten der Neutrophilen. Wirken auf Neutrophile bestimmte Signalwege, verändert sich die Form des Zellkerns und die Chromatinstrukturen. Die Kernmembran und granulären Membranen lösen sich auf. Die Zellkerninhalte werden nach Bruch der zellulären Membran in den extrazellulären Raum abgegeben [89, 90].

Ausgebildete NETs besitzen eine stark prothrombotische Wirkung und eine Rückkopplung zu weiterer NET-Auslösung. NETs stimulieren die Gerinnungskaskade und die Thrombogenese. Über die Präsentation von *Tissue-Factor* an ihrer Oberfläche wird die extrinsische Gerinnungskaskade stimuliert. Außerdem binden und aktivieren NETs Faktor XII, was wiederum die intrinsische Gerinnungskaskade aktiviert [4]. Zusätzlich wird von Neutrophilen-Elastase ein *Tissue-Factor* Inhibitor abgebaut, was wiederum die Wirkung von *Tissue-Factor* potenziert und Thrombinbildung fördert [56].

Die durch NETs freigesetzten Histone aktivieren ebenfalls die Thrombinbildung via Protein-C Stimulation [91] und stimulieren zusätzlich weiter Endothelzellen. Das Komplementsystem wird ebenfalls durch NETs ausgelöst [92].

An Histonen und DNA-Material können weitere Moleküle wie Fibrinogen oder von-Willebrand-Faktor binden, was wiederum zu verstärkter Plättchenaggregation führt und zusammengenommen die Netzstruktur stärkt und weiter wachsen lässt [89, 93]. Neutrophile werden konstant neu gebildet und weisen je nach Alter andere Eigenschaften auf. Ältere Neutrophile besitzen eine stärker ausgeprägte Fähigkeit zur NET-Bildung als neugebildete Neutrophile [94, 95].

Neutropenie, FXII-Defizienz und der Zerfall oder die Zerstörung von NETS schützen in gewissem Maße vor Thrombose [4]. Dies sind weitere Indikatoren für die essentielle Bedeutung von Neutrophilen, insbesondere NET-Bildung.

2.2. Rolle der Neutrophilen in der Inflammation

In der Inflammation besetzen Neutrophile ähnliche Rollen wie im Ablauf der in 2.1. beschriebenen Thrombusentstehung. Tatsächlich sind die ersten Schritte der Inflammation, welche zur Aktivierung des Endothels, zur Rekrutierung von Leukozyten und Plättchen führen, dieselben wie in der Thrombusentstehung [4].

Wieder spielen P-Selektin-PSGL1-Bindung, HMGB1, das Komplementsystem und aktivierte Plättchen ihre Rolle in der Neutrophilenaktivierung und Bildung von NETs. Unterschiede zu Neutrophilen in der Thrombose liegen im Auslöser der Rekrutierung und zu welchem Zweck Neutrophile dienen, auch wenn die Signalgebung der der Thrombusentstehung gleicht [84, 96, 97].

Ursache für Neutrophilenrekrutierung und Aktivierung in der Inflammation sind vorrangig Pathogene wie Bakterien, Viren oder Antikörper, welche in der venösen Thrombose meist fehlen [57, 90]. Neutrophile sind für die Eliminierung des Pathogens durch Phagozytose, Degranulation, antimikrobielle Proteine, ROS oder NETs verantwortlich. Sie sind die erste Verteidigung bei Eindringen von Pathogenen [87]. Neutrophile arbeiten bei der Identifizierung von Pathogenen mit Plättchen zusammen. Plättchen präsentieren Neutrophilen die Pathogene auf ihrer Oberfläche, aktivieren sie und stimulieren die NET-Bildung [98].

NETs im speziellen spielen in der Inflammation ebenfalls eine ausschlaggebende Rolle. Sie verhindern durch ihre Netzstruktur die Ausbreitung der Pathogene und eliminieren sie durch ihre Bestandteile wie Histone, antimikrobielle Granula und Proteine [99, 100]. Neutrophile Elastase wirkt nicht nur prothrombotisch [56] und besitzt in der NET-Bildung eine Rolle [88], sie wirkt nach Freisetzung in den extrazellulären Raum zusätzlich antibakteriell [101].

Zusätzlich zu NET-Bildung besitzen Neutrophile noch weitere Verteidigungsmechanismen. Sie können ROS bilden, diese in die extrazelluläre Umgebung abgegeben und so direkt Pathogene eliminieren [87, 102].

Weiter geben Neutrophile bei Aktivierung Zytokine ab, welche wiederum proinflammatorische Wirkung haben und der Rekrutierung und Aktivierung weiterer Neutrophiler und Leukozyten dienen [103].

3. Monozyten in der Thrombose

3.1. Unterscheidung klassische und nicht-klassische Monozyten

Monozyten werden im humanen Bereich auf Basis unterschiedlicher Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD16 in Untergruppen eingeteilt. Klassische Monozyten, welche etwa 85% der Monozyten ausmachen, exprimieren CD14⁺⁺ und CD16⁻. Nicht klassische Monozyten exprimieren CD14⁺, sowie CD16⁺⁺ und bilden den zweitgrößten Anteil mit 10%. Es wird noch eine weitere Untergruppe mit CD14⁺⁺ und CD16⁺ als intermediate, also „zwischen“ oder „mittlere“ Monozyten, mit etwa 5 % Anteil beschrieben. In der Maus besitzen die jeweiligen Gruppen andere Marker, es werden meist nur zwei Gruppen definiert. Klassische Monozyten exprimieren Ly-6C⁺, nicht klassische weniger bis kein Ly-6C (Ly-6C⁻) [104]. Monozyten werden von hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark gebildet [105]. Ein weiteres Reservoir von Monozyten befindet sich in der Milz [106].

Es ist bisher ungeklärt, ob intermediate Monozyten tatsächlich Zwischenstadien der zwei Untergruppen darstellen, oder eine eigene Untergruppe bilden. Ihre funktionellen Eigenschaften und Oberflächenmarker ähneln sowohl klassischen, als auch nicht-klassischen Monozyten, je nach Studie und auslösendem Faktor. Im genetischen Cluster liegen sie näher an den nicht-klassischen Monozyten [107]. In der Maus existiert ebenfalls eine Zwischenstufe zwischen klassischen und nicht-klassischen Monozyten, die Ly6C^{mid} Untergruppe [108].

Nicht-klassische Monozyten kontrollieren den vaskulären Bereich und haben weniger Verbindung zur Inflammation. Sie sind weniger proliferativ, befinden sich aber über einen längeren Zeitraum in der Blutbahn [109]. Sie können als patrouillierende Monozyten bezeichnet werden [104]. Es bestehen Hinweise, dass sich nicht-klassische aus klassischen Monozyten entwickeln [110]. Auch in der Maus findet man Ly6C⁺ Vorläufer von Ly6C⁻-Zellen [104].

Klassische Monozyten agieren bei infektiösen Geschehen oder Verletzungen und tragen zur Eindämmung von Pathogenen und Inflammation bei. Sie produzieren mehr Zytokine als nicht-klassische Monozyten und tragen sowohl in der Immunantwort, als auch in der Inflammation, erheblich mehr zur interzellulären Kommunikation bei [111, 112]. Sie können auch als inflammatorische Monozyten bezeichnet werden [104]. Nicht-klassische Monozyten sind zu einem späteren Zeitpunkt essentiell für die Thrombolysen [113].

3.2. Monozyten in der Thrombusentstehung

Monozyten bilden zusammen mit Neutrophilen den Hauptanteil der Leukozyten mit Aufgaben in der Thrombogenese. Ihre Rekrutierung in der venösen Thrombose wird durch Chemokinsekretion des aktivierten Endothels (CCL2, CX3CL1 und CCL5) und den entsprechenden Rezeptoren auf Monozyten (CCR2, CX3CR1 und CCR5) gesteuert [114].

Monozyten bilden den größten Anteil an *Tissue-Factor*, als stärkster Auslöser der extrinsischen Gerinnungskaskade und Fibrinbildung [4]. Das Level monozytengedebundenen *Tissue-Factors* ist in Patienten mit tiefer Venenthrombose erhöht. Es dient als Marker in der TVT Diagnostik [115]. Auch hier spielt HMGB1 als DAMP wieder eine Rolle, es fördert Monozytenrekrutierung und die Expression von *Tissue-Factor* in Monozyten [77].

Im hier verwendeten Stenosemodell der venösen Thrombose wird die Gerinnungskaskade hauptsächlich durch *Tissue-Factor* von Blutzellen wie Monozyten ausgelöst, im Stasemodell der venösen Thrombose hingegen durch *Tissue-Factor* von Endothelzellen. Wird im Stenosemodell *Tissue-Factor* in Leukozyten deletiert, findet keine Thrombusbildung statt. Die Leukozytenrekrutierung wird davon nicht beeinträchtigt [116].

Neutrophile sind zwar die Hauptquelle für *extracellular traps* (NETs) und ihre Wirkung in der Thrombose [4], doch auch Monozyten können *extracellular traps* bilden und somit prothrombotisch wirken [117].

3.3. Rolle der Monozyten in der Inflammation

Die Ly6C⁺-Monozytenrekrutierung aus dem Knochenmark ist in der Inflammation vor allem abhängig von CCR2, einem Chemokinrezeptor, und seinen Liganden CCL2 und CCL7 [118].

Monozyten können bei Aktivierung während der Inflammation in das Gewebe einwandern und zu Makrophagen und dendritische Zellen differenzieren. In dieser veränderten Form bekämpfen sie aktiv die Inflammation und tragen zur Wundheilung bei [119].

Auch in der Inflammation werden Monozyten erneut durch HMGB1 beeinflusst und zur Expressierung von IL-6 und IL-1beta angeregt, welche als inflammatorische Mediatoren die Immunantwort stimulieren [120].

Auch in der Inflammation spielt *Tissue-Factor* von Monozyten eine Rolle und aktiviert die extrinsische Gerinnungskaskade [121]. *Tissue-Factor* Aktivierung auf Monozyten wird hier durch Pyroptose ausgelöst. Pyroptose ist ein Zelltod-Programm, welches beispielsweise durch DAMPs ausgelöst wird und im Ablauf mithilfe verschiedener Proteine und Proteasen zur Aktivierung von *Tissue-Factor* und Abgabe *Tissue-Factor*-angereicherter Mikrovesikel von Monozyten führt [122].

Pyroptosis von Monozyten und Makrophagen wirkt zudem prothrombotisch [76]. Dies unterstreicht den engen Zusammenhang und die schwierige Trennung zwischen inflammatorischen und thrombotischen Abläufen.

4. Pharmakologische Thrombotherapie präventiv und kurativ

4.1. Kurative und präventive pharmakologische Therapien

Der aktuelle Standard in präventiver und kurativer Therapie beruht auf Antikoagulation.

Heparin und Vitamin-K-Antagonisten werden seit vielen Jahren verwendet. Direkte orale Antikoagulantien sind erst in den letzten Jahren ebenfalls Bestandteil der Standardtherapien geworden [123]. Es wird je nach Indikation hochmolekulares oder niedrigmolekulares Heparin verwendet. Heparin greift an Thrombin und Faktor Xa in die Gerinnungskaskade ein [51]. Warfarin als Vitamin-K-Antagonist wirkt auf die Vitamin-K-Epoxid-Reduktase und unterbricht so die Gerinnungskaskade [124, 125]. Die Standard-Therapie bestand lange aus niedrigmolekularem Heparin, gefolgt von der oralen Gabe von Vit-K-Antagonisten. Diese verhindern zwar effektiv eine erneute Thrombose, jedoch besitzen sie eine geringe therapeutische Breite [126], was aufwendige Kontrollen der Gerinnung notwendig macht [123].

Zusätzlich wurden direkte orale Antikoagulantien, Nicht-Vitamin-K-Antagonisten, entwickelt. Darunter sind Faktor Xa-Inhibitoren wie beispielsweise Rivaroxaban, Apixaban und Edoxaban [127, 128]. Dabigatran ist ein weiteres Beispiel für Nicht-Vitamin-K-Antagonisten, welches durch die Inhibition von Thrombin wirkt [129]. Diese direkten oralen Antikoagulantien benötigen keine aufwändige Überwachung der Gerinnung und werden regelmäßig in festgelegten Dosen verabreicht, was Handhabung und Sicherheit im Vergleich zu den bisherigen Klassikern Heparin und Vitamin-K-Antagonisten verbessert [130].

Eine weitere Möglichkeit, vor allem zur präventiven Therapie, bieten Thrombozytenaggregationshemmer wie Aspirin. Es wird mitunter als thromboseprophylaktische Medikation nach Operationen verwendet [131]. Ein weiteres Beispiel für Thrombozytenaggregationshemmer sind ADP-Rezeptorblocker wie Clopidogrel [132], welche ebenfalls präventiv eingesetzt werden, um Rethrombosen zu verhindern [133].

Aktuell besteht in der Wissenschaftsgemeinschaft kein einheitlicher oder kontinuierlicher Konsens, welche medikamentöse Therapie und welche Kombinationen bei Individuen mit venöser Thrombose und eventueller Lungenembolie am effektivsten und risikoärmsten sind. Es werden regelmäßig angepasste Empfehlungen ausgesprochen. Hierbei geht es sowohl um die initiale Behandlung 5-21 Tage nach der Diagnose, die Folgebehandlungen 3-6 Monate nach Diagnose und die Entscheidung über den optimalen Zeitpunkt der Beendigung der antikoagulativen Therapie und eine notwendige präventive Weiterbehandlung [134, 135]. Daher wird weiter intensiv an der optimalen Therapie geforscht.

4.2. Risiken und Nebenwirkungen pharmakologischer Therapieschemata

Unkontrollierte Blutung ist die vorherrschende Nebenwirkung der aktuellen pharmakologischen Therapieschemata. In allen Gruppierungen inklusive Heparin, Vitamin-K-Antagonisten, direkte orale Antikoagulatoren etc., treten unerwünschte Blutungen auf [136-139]. Vitamin-K-Antagonisten scheinen mehr unerwünschte Blutungen im Vergleich zu direkten oralen Antikoagulatoren zu verursachen [140].

Eine weitere Nebenwirkung von Heparin ist ein möglicher hochgradiger Verlust an Plättchen, da Heparin an PF4 (platelet-growth-factor 4) bindet und zu heparin-induzierter Thrombozytopenie als eigenem Krankheitsbild führt [137]. Zusätzlich wird Heparin hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden. Bei verringerter Nierenfunktion kann es zu einer Akkumulation kommen und somit zu einer überschießenden Gerinnungshemmung. Auch bei Anwendung direkter oraler Antikoagulantien muss die bestehende Nierenfunktion beachtet werden. Ab einer glomerulären Filtrationsrate unter 30 mg/dL ist die Anwendung kontraindiziert [123].

4.3. Antiinflammatorische Ansätze zur Prävention und Therapie der Thrombose

Einige klassische, etablierte antithrombotisch kurative und präventive Therapien besitzen auch antiinflammatorische Effekte. Heparin besitzt antiinflammatorische Effekte, vermutlich durch NET-Zerstörung [4, 141]. Aspirin besitzt ebenfalls antiinflammatorische Effekte durch die reduzierte Synthese pro-inflammatorischer Proteine und reduzierte Leukozytenrekrutierung [142]. Die unerwünschten Nebenwirkungen, wie vor allem erhöhtes Blutungsrisiko, bleiben aber bestehen.

Die therapeutisch vielversprechende Assoziation von Inflammation und Thrombose ist bereits etabliert und wird intensiv erforscht. Die inflammatorischen Signalwege und Abläufe bieten breite, weit gefächerte Ansatzpunkte. Es sind bereits mehrere antiinflammatorische Ansätze identifiziert, bisher ist jedoch kein spezifisch wirkender, antiinflammatorischer Ansatz als solcher regulär in der kurativen oder präventiven Therapie in Verwendung.

Als ein therapeutischer Ansatzpunkt kann die Aktivierung des Endothels, welche einen zentralen Punkt der systemischen Reaktion darstellt, betrachtet werden. Wie beschrieben spielen WP-Körperchen eine proinflammatorische und prothrombotische Rolle. NO (Stickstoffmonoxid) ist ein Inhibitor der WP-Körperchen-Freisetzung [143], somit stellen medikamentöse NO-Geber eine potentielle Möglichkeit dar, in den inflammatorischen und thrombotischen Prozess einzugreifen und Thrombose zu verhindern [144].

Oxidativer Stress und ROS-Bildung ist wie beschrieben ein vielfältiger, multipel regulierter Prozess und beeinflusst alle nachfolgenden Abläufe, wie beispielsweise NET-Bildung. Die NADPH-Oxidase mit ihrer zentralen Rolle in der ROS-Bildung [145] und somit nachfolgend NET-Bildung ist ein weiterer Ansatzpunkt. Es gibt verschiedene Medikamente, welche die NADPH-Oxidase beeinflussen und potentiell antithrombotisch wirken können, darunter beispielsweise VAS2870 oder APX-115 als NADPH-Oxidase-Inhibitoren [146]. Gp91ds-tat setzt auch bei NADPH-Oxidase an und reduziert ROS-Bildung, sowie die Aktivierung von Plättchen [147]. Diese Medikamente im speziellen sind jedoch noch nicht abschließend in ihrer antithrombotischen Wirkung untersucht. GSK2795039, ein NADPH-Oxidase 2 Inhibitor, verhindert NET-Bildung und reduziert Thrombosen bei Heparin-induzierter Thrombozytopenie [148]. Auch die Zerstörung von NETs durch DNAsen könnte ein therapeutischer Ansatz sein [80].

Das NLRP-3 Inflammasom bietet ebenfalls einen potentiellen Ansatzpunkt. Durch seine Inhibition würden auch seine Effekte, wie die Auslösung der Entzündungsreaktion der Zelle inklusive der Freisetzung von Zytokinen und Adhäsion von Monozyten, gehemmt werden. Es wurde bewiesen, dass viele, bereits lange in anderen Krankheitsbildern verwendete Medikamente, über eine NLRP3-Inflammasom-Inhibition wirken. Der Zusammenhang zwischen NLRP3-Inflammasom-Inhibition und positiven Effekten auf kardiovaskuläre Erkrankungen ist ebenfalls erwiesen [149]. NLRP3-Inflammasom-Inhibition durch MCC950 verhindert die Bildung von atherosklerotischen Läsionen [150]. Muscon (die Hauptkomponente von Moschus), ebenfalls ein NLRP3-Inflammasom-Inhibitor, welcher zusätzlich die Menge inflammatorischer Zytokine reduziert, besitzt positive Effekte auf Umbauprozesse nach Myokardinfarkten [151]. Doch der Effekt dieser Inhibitoren speziell auf venöse Thrombose ist noch nicht bekannt oder publiziert.

DAMPs *danger-associated molecular patterns*, sowie PAMPs *pathogen-associated molecular patterns* stellen in ihrer Verbindung zum NLRP3-Inflammasom und assoziierten inflammatorischen Abläufen einen sehr guten Ansatzpunkt dar. Die Inhibition von HMGB1 wurde bereits in seiner antithrombotischen Wirkung beschrieben. Auf HGMB1-Rezeptoren kann ebenfalls Einfluss genommen werden, jedoch muss hier eine kombinierte Inhibition von mehreren Rezeptoren erfolgen, um eine effektive antithrombotische Wirkung zu erzielen [77].

Das Komplementsystem ist ein weiterer antiinflammatorischer Ansatz im Zusammenhang mit thrombotischen Ereignissen, welcher bereits intensiv erforscht wird [152].

Das PSGL1-P-selektin-Zusammenspiel ist verantwortlich für Rekrutierung, Adhäsion und NET-Bildung in Neutrophilen. Ein P-Selektin-Inhibitor reduziert die Plättchen-Leukozyten Interaktionen, blockiert Aggregation und reduziert die Thrombus Bildung. Die unerwünschten Nebenwirkungen der klassischen Thrombosertherapien in Bezug auf die Homöostase bleiben aus [153].

4.3.1. Ausgewählte antiinflammatorische Ansätze zur Thromboseprävention

4.3.1.1. SPP1 – Osteopontin

SPP1 ist das codierende Gen für Osteopontin. Osteopontin ist ein Glykoprotein und kommt in verschiedensten Geweben wie Odontoblasten, Chondrozyten, Osteoblasten/-klasten, Immunzellen oder Endothelzellen vor und erfüllt dort ebenso vielfältige Funktionen. Vorrangig ist es für die Strukturierung und Destrukturierung von Knochengewebe verantwortlich [154]. In diesem Zusammenhang wurde es auch erstmals identifiziert [155]. Weiterhin hat es Einfluss auf verschiedenste biologische Funktionen und Krankheitsbilder: Auf Wundheilung, indem es Zellproliferation fördert [154] - auf tumoröse Geschehen, indem es Zellmigration fördert [156]- auf Diabetes, indem es die Insulin Resistenz erhöht [157] und auf Inflammation, indem es das Makrophagen und T-Zell-Aufkommen erhöht [154] und generell aktivierend und rekrutierend auf Immunzellen wirkt [158].

In Neutrophilen im Speziellen wirkt Osteopontin stimulierend auf die Migration. Monozyten werden zur Differenzierung zu Makrophagen angeregt, welche wiederum durch Osteopontin in Migration und Zytokinproduktion während der Inflammation gefördert werden [158]. Osteopontin spielt eine Rolle bei Atherosklerose [159, 160], bei Angiogenese, sowie Neovaskularisation nach ischämischen Zuständen [161]. Hypoxie und ROS sind ein Auslöser für Osteopontinproduktion [162, 163]. Der Zusammenhang zwischen Osteopontin, seiner Wirkung auf Immunzellen und Inflammation lässt auf einen zusätzlichen Zusammenhang zu kardiovaskulären Erkrankungen schließen und somit auf potentielle therapeutische Möglichkeiten. Ob und welcher Zusammenhang direkt zur Thrombose besteht, ist nicht klar.

4.3.1.2. TGM2 – Transglutaminase 2

TGM2 codiert für Transglutaminase 2, eine Calcium-abhängig transaminierende Acetyltransferase. Transglutaminase 2 ist ubiquitär in und an fast allen Zelltypen lokalisiert und stellt einen der am meisten exprimierten Vertreter der Transglutaminasefamilie dar [164]. Transglutaminase 2 ist durch sein breites Auftreten mit verschiedensten Pathologien assoziiert.

Tumoröse Geschehen [165], neurodegenerative Erkrankungen [166], Zöliakie [167, 168] und Fibrosen [169, 170] sind Beispiele in denen Transglutaminase 2 eine protektive oder schädigende Wirkung besitzen kann. In der Inflammation und in verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose spielt Transglutaminase 2 erwiesenermaßen ebenfalls eine Rolle [171].

Auch die Rolle von Transglutaminase 2 auf Zellbasis ist kontrovers. Sie ist sowohl wichtig für Apoptose, als auch für das Überleben von Zellen, Zelladhäsion, Zellmobilität und Signalübertragung [172]. Aufgrund ihrer Wirkung auf Neutrophile [173] und Monozyten [174], sowie auf Angiogenese [175, 176] ist sie als Ziel zur antiinflammatorischen Thromboseprävention interessant.

III. ZIELSETZUNG

Die Inflammation spielt in der Thrombose erwiesenermaßen, durch noch nicht abschließend geklärte Abläufe, eine ausschlaggebende Rolle. Diese Verbindung bietet neue Möglichkeiten und potentiell neue Ansatzpunkte einer antiinflammatorischen Thrombose-therapie.

Thrombose-induzierte inflammatorische Abläufe in Neutrophilen und Monozyten stellen solche potentiellen Ansatzpunkte dar. In dieser Arbeit sollen thrombose-induzierte inflammatorische Signaturen oder Faktoren in Neutrophilen und Monozyten auf Transkriptionsebene mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung dargestellt werden. Hierfür werden in *in vivo*- Experimenten Proben von Mäusen mit und ohne Thrombusbildung nach chirurgisch identischer Intervention, welche die tiefe Venenthrombose mithilfe partieller *Vena cava* Ligatur simuliert, entnommen. Diese Proben werden einer Einzelzell-RNA-Sequenzierung unterzogen.

Mithilfe biologischer Prozesszuordnungen und deren Analyse soll dargestellt werden, welche thrombose-induzierten inflammatorischen Reaktionen in Neutrophilen und Monozyten auf Transkriptionsebene ablaufen.

Neutrophile und Monozyten bilden den Hauptanteil der Immunzellen im Thrombus, deshalb wird der Fokus dieser Analyse auf Neutrophilen und Monozyten des Thrombus liegen. So sollen Signalwege und relevante transkriptionelle Abläufe, in Reaktion auf Thrombose, veranschaulicht werden. Werden hier bestimmte inflammatorische Faktoren identifiziert, könnten diese eine ausschlaggebende Rolle in der Thrombose spielen.

Im weiteren Verlauf sollen mithilfe der gewonnenen Daten und Erkenntnisse, antiinflammatorische Ansätze zur Thromboseprävention im Mausmodell identifiziert werden. Hierfür werden auffällige Genexpressionen in Thrombusneutrophilen und -monozyten identifiziert, welche potentiell eine Rolle in der Thrombose spielen. Das entsprechende Gen oder das entsprechende Protein wird dann im Mausmodell der tiefen Venenthrombose inhibiert. Ergibt sich hieraus eine signifikante Änderung der Parameter des Mausmodells, ist es als Hinweis auf einen antiinflammatorischen Ansatz zur Thromboseprävention zu sehen.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Die Grundlage der Untersuchungen und Ergebnisse dieser Doktorarbeit sind *in vivo* Versuche an der Maus. Die Maus ist die am häufigsten verwendete und breitflächig erforschte Tierspezies und stellt ein gutes Modell für die Versuche dar. Durch die breitflächige Verwendung der Maus in der Grundlagenforschung liegen ausführliche Vergleichsdaten und Erfahrungswerte vor. Weitere Vorteile sind die kostengünstigen, einfachen Haltungsbedingungen und die schnelle Reproduktionszeit im Vergleich zu anderen Tiermodellen.

Das verwendete Modell der tiefen Venenthrombose war in unserem Labor bereits etabliert und reproduzierbar [4].

1.1. Mauslinie C57BL/6J

Die für die Versuche verwendete Mauslinie C57BL/6J ist ein Wildtypstamm. Das Genom dieser Linie war das erste das komplett sequenziert wurde. Durch die gute Charakterisierung und die genetische Stabilität dieser Mauslinie ist sie besonders gut als Modell für diese Untersuchungen geeignet [177].

1.2. Tierhaltung

Die Mäuse wurden bei Jackson (The Jackson Laboratory, Bar Harbor) bestellt und in das Walter-Brendel-Zentrum geliefert. Die Tiere hatten nach dem Transport eine Erholungs- und Eingewöhnungsphase von mindestens 6 Tagen vor Versuchsbeginn. Die Haltung der Mäuse erfolgte im Walter-Brendel-Zentrum unter SPF-Bedingungen (*specific pathogen free*). Um die Hygienestandards und Ruhephasen zu gewährleisten, ist der Zutritt zu den Tierhaltungsräumen nur berechtigten Personen in Schutzkleidung vorbehalten. Die Hygieneüberwachung im Walter-Brendel-Zentrum erfolgt vierteljährlich durch Sentinel-Mäuse nach dem erweiterten FELASA-Protokoll und stichprobenartig nach dem kleinen FELASA-Protokoll.

Vor und während dem Experiment wurden die Tiere in Makrolon-Käfigen Typ II long oder bei kleineren Gruppen von 2 Tieren in Käfigen Typ II (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg) in Gruppen gehalten. Die Käfige stehen vor dem Versuch in Cabinets (Ventilated Cabinet, Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg) bei einer Temperatur von 21°C und relativen Luftfeuchte von 55 % +/- 5 %. Während und nach dem Versuch standen die Käfige 24 Stunden auf einer Wärmematte, um eine Auskühlung in der ersten post-OP-Phase zu vermeiden und die Tiere postoperativ zu überwachen. Nach diesen 24 Stunden standen die Käfige in einem Cabinet (Ventilated Cabinet, Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg) im OP-Raum. Dieses Cabinet verfügt über rote Plexiglastüren, welche für Mäuse blickdicht sind, dem Versuchsdurchführenden aber die kontinuierliche und stressarme Überwachung ermöglicht.

Die Tieranzahl pro Käfig richtete sich nach Gewicht und Verträglichkeit und lag bei 2-4 Tieren. Einmal pro Woche wurde die Einstreu und die Wasserflasche gewechselt. Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Das Enrichment in den Käfigen bestand aus der oben beschriebenen staubfreien Einstreu, Papiertüchern, hängenden Röhren, Nestbaumaterial und je nach Größe des Käfigs Maushäuschen.

Die Tiere wurden während der Versuchszeit anhand des im Tierversuchsantrag genehmigten Scoresystems überwacht und beurteilt. In diesem Punktesystem wurden das Allgemeinbefinden, die Atmung, der orbital tightening scale (OTS), das Körpergewicht, der Pflegezustand, das Verhalten, die Wundheilung, der Kotabsatz und der Harnabsatz beurteilt. Je nach Zustand wurden die im Scoresystem vorgesehenen Punkte vergeben. Der Gesamtscore entschied über den weiteren Versuchsverlauf.

Das vorliegende Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt (AZ 55.2-1-54-2532-138-16; AZ 55.2-2532.Vet_02_20-190).

2. Operationsverfahren

2.1. Narkose

Die Tiere wurden für die Operation zur Stenosierung der *Vena cava caudalis* und zur kardialen Blutentnahme vor Tötung in Vollnarkose gelegt. Die Vollnarkose oder Allgemeinanästhesie zeichnet sich durch Hypnose, Relaxation und Sedation aus.

Vor der intraperitoneal verabreichten Tripelnarkose wurden die Mäuse in einer Box aus rotem Plexiglas mit 5,0 Vol.% Isofluran (Isofluran CP, cp pharma, Burgdorf) bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion von 0,35 l/l begast. Nach ausreichender Sedationstiefe wurde die Narkose verabreicht. Die Narkose war eine Tripelnarkose und bestand aus Fentanyl (Fentadon, Albrecht GmbH Aulendorf; Dosierung: 0,05 mg/kg KGW), Midazolam (Midazolam, B. Braun, Melsungen; Dosierung: 5 mg/kg KGW) und Medetomidin (Dorbene vet, zoetis Deutschland GmbH, Berlin; Dosierung: 0,5 mg/kg KGW). Eine Dosis der vollständig antagonisierbaren Anästhesie für eine 20-25 g Maus, bestand aus 90 µl Fentanyl-Verdünnung, 90 µl Midazolam-Verdünnung und 15 µl Medetomidin und wurde in einer Mischspritze (1 ml, Injekt-F, B.Braun, Melsungen) verabreicht. Fentanyl ist ein synthetisches, sehr potentes Opioid und wirkt als Hauptanalgetikum der Tripelnarkose. Medetomidin führt durch seine Wirkung am Hirnstamm, über α_2 -Adrenorezeptoren, zu Muskelrelaxation und Sedation. Dosisabhängig kann es auch analgetisch wirken. Midazolam wirkt ebenfalls sedativ und muskelrelaxierend, hat jedoch keine analgetische Wirkung. Es ist ein Vertreter der Benzodiazepine und wirkt über GABA_A-Rezeptoren [178].

Spätestens nach 30 min, bei Bedarf oder höherem Körpergewicht wurde die erforderliche Dosis zur Aufrechterhaltung oder Vertiefung nachgegeben.

Nach der Applikation der Initialdosis wurden die Mäuse vor visuellen und akustischen Reizen geschützt auf eine Wärmematte gelegt. Die Sinneseindrücke wurden auf ein Minimum reduziert, um eine schnelle Schlafphase zu erreichen. Die Augen wurden mit Bepanthen-Salbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen) behandelt, um ein Austrocknen während der Narkose zu verhindern. Nach Erreichen einer tieferen Sedation mit Erlöschen oder direkt nach i.p. Injektion konstantem Fernbleiben des Stellreflexes, wurde die Maus mit dem Rücken auf die OP-Platte gelegt und über eine Kopfkammer mit 0,5 Vol.% Isofluran bei einer

inspiratorischen Sauerstofffraktion von 0,25-0,3 l/l begast. Dies diente der Unterstützung und Vertiefung der Injektionsnarkose bis zur Antagonisierung. Nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes und somit Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde mit der Operationsvorbereitung begonnen.

Nach Beendigung der Operation wurde die Narkose mit Atipamezol (Revertor, CP Pharma, Burgdorf), als Antagonist zu Medetomidin, und Flumazenil (Flumazenil, Hikma Pharma GmbH, Gräfelfing; Dosierung: 0,5 mg/kg), als Antagonist zu Midazolam, antagonisiert. Fentanyl wurde nicht antagonisiert, da es durch das Buprenorphin vom Rezeptor verdrängt wird [178].

Zur postoperativen Analgesie wurde Buprenorphin (Buprenovet, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) verwendet. 30 min vor Antagonisierung der Narkose wurde die erste Dosis Buprenorphin (Dosierung: 0,1 mg/kg KGW) gegeben. Nachfolgend wurde das Analgesieschema aus dem Tierversuchsantrag verwendet und dokumentiert. Die Tiere erhielten bis zur Eliminierung 48 h nach der ersten Buprenorphingabe alle 8 h eine Dosis subkutan oder oral über das Trinkwasser.

2.2. Stenosierung der *Vena cava caudalis*

Das verwendete Modell der tiefen Venenthrombose ist eine teilweise Ligatur der *Vena cava caudalis*. Der Thrombus entwickelt sich unter im Volumen auf etwa 20 % reduzierten, aber kontinuierlichem Blutfluss. Dieses Modell besitzt eine gewisse Variabilität und ähnelt so der Entwicklung eines Thrombus im Menschen [179].

2.2.1. OP-Vorbereitung

Nach abgeschlossener Narkoseeinleitung wurde das OP-Feld vorbereitet. Das Abdomen wurde rasiert und anschließend mit Enthaarungscreme (asid-med, Asid Bonz, Herrenberg) zwei Minuten lang behandelt. Nach der Einwirkzeit wurden Creme und Haarreste entfernt und die Haut desinfiziert. Nach erneuter Überprüfung der Abwesenheit des Zwischenzehenreflexes wurde mit der Hautinzision in der Linea alba begonnen. Ab diesem Zeitpunkt fand die Operation unter einem Mikroskop (Stemi 2000-C, Carl Zeiss, Jena) mit einer weiteren Lichtquelle (CL 6000 LED, Carl Zeiss, Jena) statt.

2.2.2. Eröffnung der Bauchhöhle

Der Hautschnitt erfolgte etwa 2 mm kaudal des Xyphoids bis 0,5 cm kaudal des Nabels über eine Länge von etwa 1,5 bis 2 cm je nach Größe der Maus. Dann wurde mit besonderer Vorsicht um keine Organe zu verletzen das Peritoneum über die Länge des Hautschnittes eröffnet. Mit von NaCl (NaCl 0,9%, B. Braun, Melsungen) angefeuchteten Wattestäbchen wurde das Darmkonvolut aus dem Abdomen vorgelagert. Das Darmkonvolut wurde in mit NaCl befeuchteten, passend zugeschnittenen Mullkompressen (Noba Verbandmittel Danz, Wetter) eingebettet und auf eine Einbettkassette (Rotilabo, Carl Roth, Karlsruhe) als Schutz vor Austrocknung durch die Wärmematte links neben die Maus gelegt. Über die gesamte Operationsdauer wurde das Darmkonvolut regelmäßig mit NaCl befeuchtet. Um bessere Aufsicht auf die *Vena cava caudalis* und den Ligaturbereich zu erhalten wurde bei Bedarf ein Haltefaden (7-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) durch Muskulatur und Peritoneum dextral der Inzision gezogen und mit leichtem Zug auf der Wärmematte befestigt.

2.2.3. Ligatur der *Vena cava caudalis*

Die Ligatur der *Vena cava caudalis* erfolgt direkt caudal des Abgangs der *Vena renalis sinistra*. In diesem Bereich wurde zunächst das aufliegende Fett- und Bindegewebe abpräpariert. Anschließend wurde zwischen *Vena cava caudalis* und der anliegenden Aorta stumpf ein Durchgang freipräpariert. In gleicher Höhe auf der anderen Seite wurde ebenfalls stumpf in die Tiefe und unter die Hohlvene präpariert um eine Untertunnelung der *Vena cava caudalis* zu erreichen. Durch diesen Tunnel wurde dann ein etwa 1,5-2 cm langes Fadenstück (8-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) gelegt. Insbesondere während diesen Schritten musste äußerst vorsichtig vorgegangen werden, um Verletzungen der filigranen Gefäße, daraus resultierende Blutungen und den Versuchsabbruch zu vermeiden.

Mit dem Fadenstück wurde dann ein chirurgischer Knoten auf der *Vena cava caudalis* vorgelegt. Anschließend wurde als Platzhalter ein etwa 0,5 cm langes Stück eines humanen Herzkatheters zwischen Faden und Vene gelegt. Der chirurgische Knoten wurde nun fest zugezogen und ein weiterer einfacher Knoten daraufgelegt. Danach wurde der Platzhalter entfernt und nach dieser vorübergehenden vollkommenen Stenosierung war nun ein Blutdurchfluss von etwa 20% möglich. Auch nach diesem Schritt wurde genauestens auf Verletzungen und Blutungen geachtet. Die Enden des Ligaturfadens wurden auf etwa 0,4 cm

gekürzt. Anschließend wurde das Darmkonvolut, erneut mit angefeuchteten Wattestäbchen, in die Bauchhöhle zurückverlagert und wieder möglichst anatomisch korrekt angeordnet.

Im letzten Schritt der Operation, wurde das Peritoneum zusammen mit der Muskulatur in der Linea alba mit einer fortlaufenden Kürschnernaht verschlossen und die Haut anschließend mit Einzelknopfnähten adaptiert. Für beide Nähte wurde ein monofiler 7-0 Faden verwendet. Die Wunde wurde nach Verschluss mit Jodlösung (Braunol, B.Braun AG, Melsungen) desinfiziert.

3. Probenentnahme

3.1. Kardiale Blutentnahme

Um Vollblut für die Blutanalyse und Plasmagewinnung zu entnehmen, wurde die kardiale Blutentnahme gewählt. Hierzu wurde eine 2 ml Spritze (Injekt Solo, B. Braun, Melsungen) mit einer aufgesetzten 27G Kanüle (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) verwendet. Diese wurde mit 120µl Citrat befüllt und vorgespült. Vor diesem Eingriff, auf den die Tötung folgt, wurde die Maus, wie zuvor unter 2.1 beschrieben, in Narkose gelegt. Nach Überprüfung des Zwischenzehenreflexes, wurde ein Hautschnitt von etwa 2 cm Durchmesser auf Höhe der ersten und zweiten Rippe etwas links der Medianen durchgeführt. Der Einstich erfolgte zwischen erster und zweiter Rippe sinistral des Sternums. Der Stichwinkel erfolgte 45 Grad zur Wirbelsäule und 45 Grad zur Horizontalen Richtung Herz. Mit leichter Aspiration nach dem Einstich wurde überprüft in welcher Einstichtiefe das Herz getroffen wurde und ein Blutfluss vorhanden war. Es wurde 1-1,5 ml Blut entnommen. Dieser abrupte Blutverlust führt bereits alleinstehend zum Tod der Maus. Zusätzlich wurde ein Genickbruch durchgeführt.

3.2. Entnahme *Vena cava caudalis*

Nach dem Töten wurde erneut die Bauchhöhle durch einen Schnitt parallel der Wundnaht eröffnet. Das Darmkonvolut wurde vorgelagert und vorerst visuell auf eine Thrombusbildung überprüft. Die *Vena cava caudalis* wurde nun auch im Abschnitt der Ligatur bis zur kaudalen Aufzweigung stumpf von auf- und umliegendem Bindegewebe befreit. Mit einer stumpfen Pinzette wurde die *Vena cava caudalis* im Bereich der kaudalen Aufzweigung gefasst und mithilfe einer Federschere kaudal der Pinzette durchtrennt. Die Vene wurde mithilfe der Pinzette leicht ventral gezogen, mit der Feinschere weiter abpräpariert und cranial der Ligatur erneut durchtrennt.

Mithilfe einer Feinwaage wurde die Vene inklusive Thrombus auf einer Einweg-Histologieform gewogen. Anschließend wurde die Vene entweder für die Einzelzell-RNA-Sequenzierung in 1xPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) auf Eis gelagert oder zur Aufbewahrung und weiteren Bearbeitung in Tissue Tek eingebettet und auf Trockeneis gelagert, bis sie in einen -80°-Gefrierschrank eingelagert wurde.

3.3. Blutwertanalyse und Plasmagewinnung

Nach der cardialen Blutentnahme wurde das Vollblut aus der Spritze in ein 2 ml Reaktionsgefäß umgefüllt. Aus diesem Vollblut wurden 120 µl in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß umgefüllt. Dieses Reaktionsgefäß wurde für die Blutanalyse im Sysmex Bloodcounter verwendet, um ein großes Blutbild, inklusive Differentialblutbild, zu erstellen.

Das restliche Vollblut im 2 ml Reaktionsgefäß wurde in einer Zentrifuge 10 Minuten bei 4°Celsius und 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mithilfe einer 1000 µl Pipette in ein beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurde auf Trockeneis gelagert bis es in den -80°Celsius-Kühlschrank zur Aufbewahrung verbracht wurde.

3.4. Knochenmarkentnahme

Um Knochenmark für die Einzelzell-RNA-Sequenzierung zu gewinnen wurde der Oberschenkelknochen gewählt. Nach der Tötung wurde die Haut am betreffenden Hinterbein mit einer Schere großzügig entfernt, sodass mithilfe einer Verbandsschere das Hinterbein proximal des Hüftgelenks durchtrennt werden konnte. Danach wurden mit der Verbandsschere distal des Kniegelenks Tibia und Fibula, inklusive anhängender Muskulatur und Haut durchtrennt. Nun wurde die umgebende Muskulatur mithilfe einer Skalpellklinge entfernt. Zusätzlich wurden Hüft- und Kniegelenk möglichst im Gelenkspalt durchtrennt, um Gewebereste besser entfernen zu können. Mithilfe des Skalpells wurden nun beide Enden des Oberschenkelknochens entfernt, sodass eine gute Öffnung zum Knochenmark sichtbar war. Der Knochen wurde nun mit 5 ml 1xPBS gespült. Hierfür wurde eine 5 ml Spritze (Injekt Solo, B. Braun, Melsungen) mit einer aufgesetzten 26G Kanüle (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) verwendet. Das Knochenmark in 1xPBS wurde dann in einem Falcon auf Eis gestellt.

4. Einzelzell-RNA-Sequenzierung

4.1. Ablauf der Einzelzell-RNA-Sequenzierung

Für die Einzelzell-RNA-Sequenzierung wurden die zu analysierenden Proben im ersten Schritt zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Aus diesen Einzelzellsuspensionen wurden dann 10x-Libraries hergestellt. Diese 10x-Libraries wurden an das BMC (Biomedizinisches Centrum München, Ludwig-Maximilians-Universität München, Planegg-Martinsried) gegeben und dort sequenziert. Die Rohsequenzdaten wurden bioinformatisch im Labor unserer Arbeitsgruppe (MED I, LMU Klinikum Großhadern) analysiert.

4.2. Probenbearbeitung zur Einzelzell-RNA-Sequenzierung

4.2.1. Allgemeine Probenvorbereitung zur Herstellung einer Einzelzellsuspension

Für die Einzelzell-RNA-Sequenzierung mussten Einzelzellsuspensionen aus den jeweiligen Proben hergestellt werden. In der Vorbereitung hierfür wurden Hashtag Master Mixe gemischt. Pro benötigter Hashtagnummer wurde 0,5 µl Hashtag (TotalSeq Antibody, BioLegend, San Diego, USA) in 125 µl FACS Puffer (PBS, 0,5 % BSA (Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)) angemischt. Diese Hashtags binden an ubiquitäre Oberflächenproteine und dienen zur Markierung der jeweiligen Probe für die anschließende Einzelzell-RNA-Sequenzierung.

Die Proben wurden nach Probenentnahme in Erylysis-Puffer (BD Pharm Lyse, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) in einem Falcon (Polypropylene Conical Tube, Falcon, Corning Science, Mexiko) auf Eis inkubiert. Diese Inkubationszeit war je nach Art der Probe unterschiedlich. Anschließend wurden sie für 5 Minuten bei 4° Celsius und 300 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen ohne das Pellet zu lösen. Es wurden 100µl FC-Block (Mouse BD FcBlock, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) zugegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 100 µl des zugeordneten Hashtag-Mastermixes zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden 5 ml kalter FACS-Puffer zugegeben, resuspendiert und alle Proben für 10 Minuten bei 4°Celsius und 250 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt.

Vor der dritten Zentrifugation wurde jede Probe durch ein 50 µm Zellsieb (Cell strainer: 50 µm Nylon, Falcon, Corning, NY, USA) in einen neuen Falcon gefiltert. Nach dem letzten Abnehmen des Überstandes wurden die Proben in je 15 µl FACS Puffer resuspendiert.

11 µl jeder Probe wurden für die weitere Bearbeitung entnommen und beiseitegestellt. In einem neuen 0,5 ml Reaktionsgefäß wurden 3 µl der Zellsuspension, 12 µl Tryptan Blau (Gibco Trypanblaue Lösung 0,4 %, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) und 15 µl FACS Puffer gemischt. Das Trypan Blau diente zur Anfärbung der Zellen. Mithilfe einer Zählkammer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und einem Mikroskop wurde bei jeder Probe die Zellzahl pro Mikroliter ausgezählt. Im Anschluss wurde jede Probe auf Basis der Zählung auf eine Konzentration von 2200 Zellen pro Mikroliter angepasst.

Je 10 µl der mit Hashtags markierten Einzelzellsuspensionen wurden nun gepoolt. Maximal neun unterschiedlich markierte Suspensionen konnten in einen Pool gegeben werden.

4.2.1.1. Vorbereitung der Vollblutproben

200 µl des Vollblutes in Citrat wurden mit 3 ml Erylyse-Puffer für 15 Minuten in einem Falcon für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die restliche Bearbeitung erfolgte nach unter 4.2.1. beschriebenen Protokoll.

4.2.1.2. Vorbereitung der Thrombusproben

Der Thrombus wurde mit einer Pinzette aus dem Falcon entnommen und in einer Petrischale (TC-Schale 35, Standard, Sarstedt, Nümbrecht) vorsichtig von der umgebenden Vene befreit. Der Thrombus wurde anschließend, ohne zu großen Druck auszuüben, durch ein 70 µm Zellsieb (Cell strainer: 70 µm Nylon, Falcon, Corning, NY, USA) in 3 ml 1x PBS gepresst. So wurde die kompakte Struktur des Thrombus aufgelöst.

Die Inkubationszeit des Thrombus in 3 ml Erylyse-Puffer auf Eis betrug 15 Minuten. Die restliche Bearbeitung erfolgte nach dem unter IV. 4.2.1. beschriebenen Protokoll.

4.2.1.3. Vorbereitung der Knochenmarkproben

Das Knochenmark wurde mit 5 ml Erylyse-Puffer für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde es durch ein 50 µm Zellsieb in einen neuen Falcon gefiltert. Die weitere Bearbeitung erfolgte nach dem unter IV. 4.2.1. beschriebenen Protokoll.

4.2.2. Herstellung der 10x-Libraries

Die Einzelzellsuspensionen wurden mithilfe des Chromium Controllers (10xGenomics, Pleasanton, CA, USA San Francisco) verarbeitet. Es wurde das Chromium Next GEM Single Cell 3' reagent kit v3.1 (CG000206 Rev D) von 10X Genomics mit dem zugehörigen Protokoll verwendet. Hierbei wurden die Einzelzellen stabil vereinzelt und mit individuellen 10x Barcodes versehen um jedes einzelne Transkriptom zu kennzeichnen. Jede cDNA die aus diesem Prozess hervorgeht, verfügt über eine 10xKennzeichnung.

Mithilfe verschiedener enzymatischer Prozesse, reverser Transkription und cDNA-Amplifikation werden Libraries hergestellt. Jede Library besteht aus einem Pool an sequenzierfähiger Einzelzell-cDNA und wird aus dem entsprechenden Barcode und der cDNA jeder einzelnen Zelle hergestellt. So kann während der Analyse rückverfolgt werden, zu welcher Unterteilung die jeweiligen Daten gehören und welche cDNA zu welcher Zelle gehört. Durch die in der Herstellung der Einzelzellsuspension verwendeten Oberflächenmarkierungen, kann zusätzlich zugeordnet werden, welche Zelle zu welcher Probe gehört. Im Anschluss wurden die Libraries ausgezählt und auf Qualität geprüft.

4.2.3. Sequenzierung der Libraries

Die 10x-Libraries wurden nach Fertigstellung in einem NextSeq1000 sequenziert.

4.2.4. Visualisierung und Datenanalyse

Die Visualisierung erfolgte in Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe (MED I LMU Klinikum Großhadern). Die Daten wurden mithilfe des R *toolkit for single cell genomics* „Seurat 3.0“ (Satija Lab, New York, USA) prozessiert.

Zur Auswertung und Interpretation der visualisierten RNA-Einzelzell-Sequenzierung und zugehöriger Datensätze wurde die Website DAVID Bioinformatics Resources des Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics (LHRI) verwendet [180, 181].

Es wurde das DAVID Set enrichment analysis Tool zur Annotation biologischer Prozesse und Pathways verwendet. Hierbei wurden verschiedene Datenbanken zu Rate gezogen, unter anderem GOTERM_BP_DIRECT (Gene Ontology Term Biological Process) zur Zuordnung biologischer Prozesse, KEGG- und REACTOME-Pathways zur Zuordnung zu Signalwegen [181-183]. Hierbei wurde auch QuickGo (Gene Ontology and GO Annotations) des EMBL-European Bioinformatics Institute verwendet [184]. Zusätzlich wurde der Gene Ontology Browser der Website www.informatics.jax.org zur Zuordnung, Einteilung und Kontrolle zu Rate gezogen [185, 186].

5. Umsetzung der Auswahl antiinflammatorischer Ansätze zur Thromboseprävention

5.1. Applikation der Inhibitoren

5.1.1. Intraperitoneale Injektion

Die Applikation der Inhibitoren erfolgte je nach Protokoll intraperitoneal vor und nach der Operation zur Stenosierung der *Vena cava caudalis*. Vor der Operation wurden die Inhibitoren am wachen Tier appliziert. Hierfür wurde die Maus im Nackengriff fixiert und in Rückenlage, leicht zum Kopf hin geneigt, gehalten. Der Inhibitor wurde mithilfe einer 1 ml Spritze und aufgesetzter 30G-Kanüle im caudalen Bereich des Abdomens, im rechten oder linken Quadranten verabreicht. Bei mehrmaligen Injektionen wurden die Seiten abgewechselt. Nach der Operation wurde die Maus zur Reduktion des Schmerzreizes und zur Schonung der Wundnaht vor Applikation unter Sedation gesetzt. Hierfür wurde dieselbe Methode verwendet, wie zur Narkoseeinleitung. Die Maus wurde in eine Box aus rotem Plexiglas gesetzt und mit 5,0 Vol.% Isofluran (Isofluran CP, CP Pharma, Burgdorf) bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion von 0,35 l/l begast. Sobald die Atemfrequenz nach anfänglichem Anstieg als Reaktion auf das Isofluran, wieder leicht abfiel, wurde die Maus ebenfalls im Nackengriff genommen und der Inhibitor injiziert. Hierbei wurde aufgrund der Sedation der Maus jedoch keinerlei Spannung auf die Wundnaht ausgeübt und die Maus konnte, sobald die Sedation nachließ, wieder in den Käfig gesetzt werden.

5.1.2. Orale Gavage

Aufgrund der pharmakologischen Eigenschaften des Inhibitorpräparates, war die enterale Applikation notwendig. Hierfür wurde eine 1 ml Spritze mit aufgesetzter, leicht gebogener Knopfkanüle verwendet. Die Maus wurde im wachen Zustand im Nackengriff fixiert und die aufgesetzte Knopfkanüle in das Maul eingeführt. Die Spritze wurde so gehalten, dass die leichte Biegung der Kanüle zur ventralen Seite des Tieres zeigte. Sobald die Kanüle in das Maul eingeführt war, wurde darauf geachtet sie über der Zunge in den Ösophagus einzuführen. Hierfür musste die Maus eine Schluckbewegung ausführen. Sobald die Schluckbewegung ein weiteres Einführen ermöglichte wurde die Kanüle in den Magen vorgeschoben. Hier wurde der Inhibitor appliziert und anschließend die Kanüle langsam wieder ausgeführt.

Der gesamte Vorgang erfolgte vorsichtig und leicht, ohne Druck oder ruckartige Bewegungen auszuführen. So wurden Verletzungen vermieden. Inhibitoren welche die orale Gabe erforderten, wurden ausschließlich präoperativ appliziert.

5.2. Ausgewählte Ziele zur antiinflammatorischen Thromboseprävention

5.2.1. SPP1 - Osteopontin-Inhibitor

Der verwendete Osteopontin-Inhibitor war Mesalazin, auch Mesalamin oder 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) genannt [187]. Als antiinflammatorische Behandlung wird es bereits bei entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt. Mesalazin reduzierte Osteopontin bei dieser Behandlung signifikant. Mesalazin ist der aktive Bestandteil von Sulfasalazin, was zu Sulfapyridin und Mesalazin reduziert wird. Es besitzt im Vergleich zu Sulfalazin geringere Nebenwirkungen. Zusätzlich wird Mesalazin durch seinen Schutz vor oxidativen Schäden und breite antiinflammatorische Wirkung als potentielle antifibrotische Behandlungsmöglichkeit gehandelt [188]. In vitro wurden die antifibrotischen Effekte bereits bei Kardiofibrose nachgewiesen [189]. In diesem Versuch wurde 5-Aminosalicylic Acid (MedChemTronica, Sweden, CAS Number: 89-57-6) verwendet. Es wurde in PEG300 (Polyethylenglycol 300, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) als Medium gelöst und p.o. appliziert. Es wurde 48 und 12 Stunden vor der Operation zur tiefen Venenthrombose appliziert. Die Einzeldosis betrug 50 mg/kg KGW.

5.2.2. TGM2 – Transglutaminase 2-Inhibitor

In diesem Versuch wurde der Transglutaminase 2 Inhibitor II ERW1041E (Sigma-Aldrich, Deutschland, CAS Nummer: 918440-87-6) verwendet. Es handelt sich um einen kompetitiven Inhibitor der Transglutaminase 2 in Pulverform. Es wurde in Miglyol als Medium gelöst und i.p. injiziert. 12 Stunden vor der Operation zur tiefen Venenthrombose wurde die erste Dosis verabreicht, gefolgt von weiteren 4 Injektionen im Abstand von je 12 Stunden. Die Einzeldosis betrug 25 mg/kg KGW.

6. Statistik

In der Prozessierung der Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten wurden die implementierten Statistikfunktionen des *R-toolkit* für Einzelzellgenomik „Seurat 3.0“ genutzt. Für die Volcano-Plots und deren zugehörige Datensätze wurde hier ein t-Test mit Wilcoxon-Korrektur verwendet. Als signifikant wurden adj-P-Werte $<0,05$ auf der $-\log_{10}$ y-Achse betrachtet. Der \log_2 Fold Change als Element des Volcano-Plots diente zur besseren Darstellung und zeigt die Stärke der Genexpression bzw. Regulierung auf der x-Achse an.

Die Abbildungen biologischer Prozesszuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene wurden auf Basis der Ergebnisse des DAVID Set enrichment analysis tool erstellt (siehe IV. 4.2.4.).

In 2.1. und 2.2. des Kapitels V. Ergebnisse wurde untersucht, welchen Effekt die Inhibition ausgewählter Gene auf die Thrombose besitzt. Zu der statistischen Auswertung und der Erstellung der Graphen der antiinflammatorischen Ansätze wurde das Programm GraphPad Prism (Version 5, San Diego, USA) verwendet. Die Gruppen waren unabhängig und wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Da keine Normalverteilung vorlag, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Ergebnisse ab p-Wert (p-value) $<0,05$ gelten als statistisch signifikant („*“ entspricht p-Wert $\leq 0,05$; „n.s.“ entspricht nicht signifikant) und würden für eine Wirkung der Inhibition auf die Thrombose sprechen.

V. ERGEBNISSE

1. Darstellung thrombose-induzierter inflammatorischer Signaturen in Neutrophilen und Monozyten des Thrombus mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung

1.1. Übersichtsanalyse der Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten

Um eine Analyse der Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten auf thrombose-induzierte inflammatorische Abläufe in Thrombusneutrophilen und Thrombusmonozyten vornehmen zu können, mussten die erhaltenen Daten aus der Sequenzierung zuerst weiterverarbeitet und visualisiert werden. Die informatische Verarbeitung wurde mithilfe des *R toolkit for single cell genomics* „Seurat 3.0“ in der Arbeitsgruppe durchgeführt (siehe IV. 4.2.4.). Die Daten wurden in Seurat anhand informatischer Parameter integriert und geclustert (Abb. 1 und 2). Anhand der clusteridentifizierenden Gene (Abb.2), zusammen mit den weiteren clusterzugehörigen Genen, wurden manuell Zelltypen den Populationen zugeordnet. Zudem wurde mithilfe von Seurat eine Markierung der zuvor definierten Populationen nach Herkunftsgewebe vorgenommen, um erkennen zu können wie die Zelltypen zum jeweiligen Herkunftsgewebe stehen (Abb. 3).

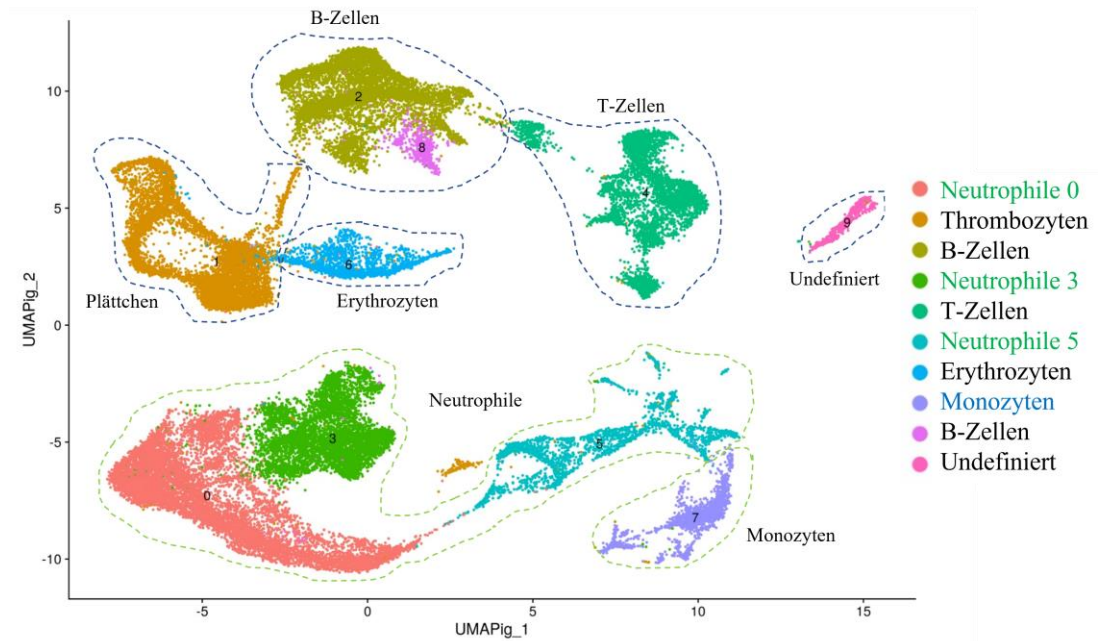


Abbildung 1: Zellcluster der Einzelzell-RNA-Analyse aus Thrombus, Blut und Knochenmark

Diese Abbildung zeigt die Übersicht der Zellpopulationen der Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten aus Thrombus, Blut und Knochenmark analysiert in einer UMAP. Thrombus n=6, Blut (Thrombus+) n=6, Blut (Thrombus-) n=6, Knochenmark (Thrombus+) n=3 und Knochenmark (Thrombus-) n=3.

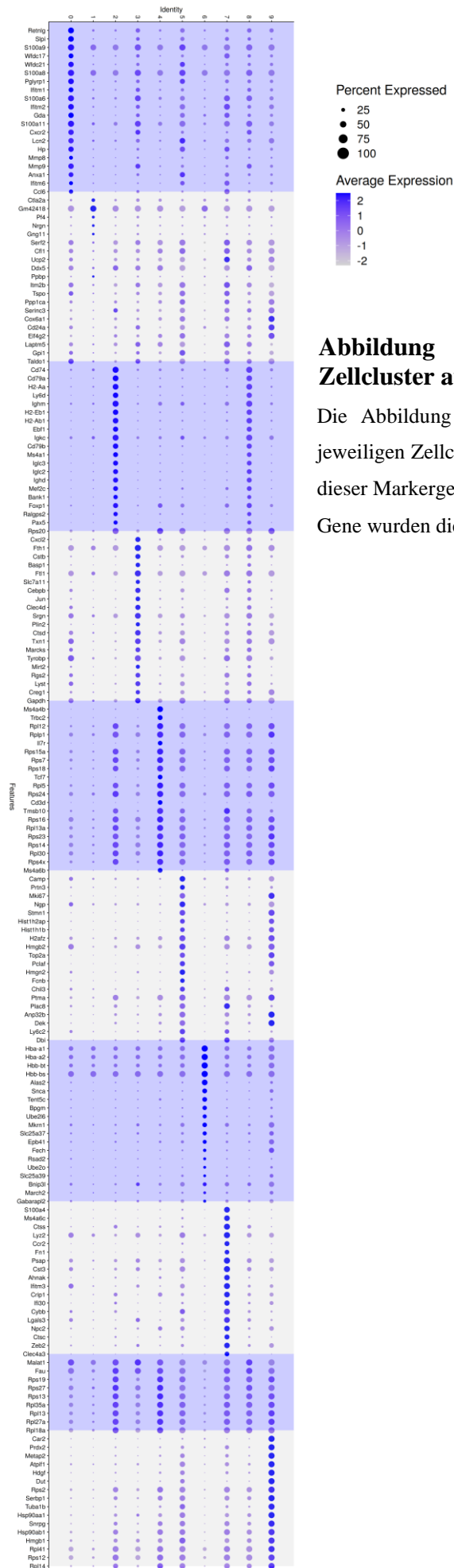


Abbildung 2: Dotplot der Markergene der Zellcluster aus Abb. 1

Die Abbildung 2 zeigt den Dotplot der Markergene der jeweiligen Zellcluster/Populationen aus Abbildung 1. Mithilfe dieser Markergene und der weiteren zugehörigen exprimierten Gene wurden die Zelltypen der Zellcluster bestimmt.

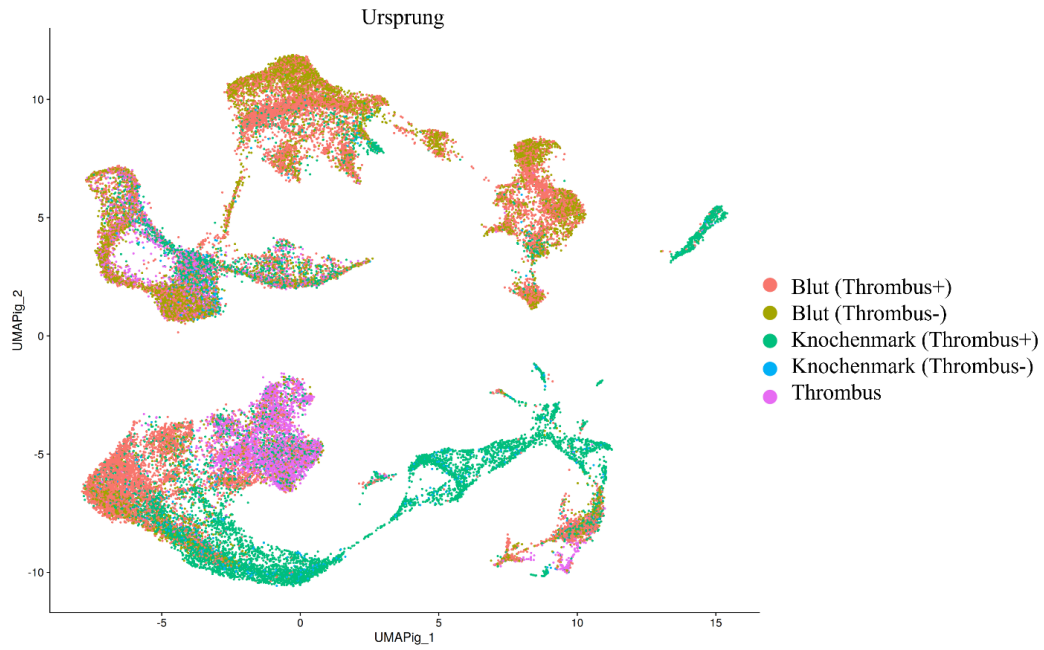


Abbildung 3: Darstellung der Herkunft der Zellcluster aus Abb. 1 mit unterschiedlichen Einfärbungen der Proben

In dieser Abbildung wird die Herkunft (Thrombus, Blut (Thrombus+/-) und Knochenmark (Thrombus+/-)) der jeweiligen Zellcluster aus Abbildung 1 durch unterschiedliche Einfärbung veranschaulicht.

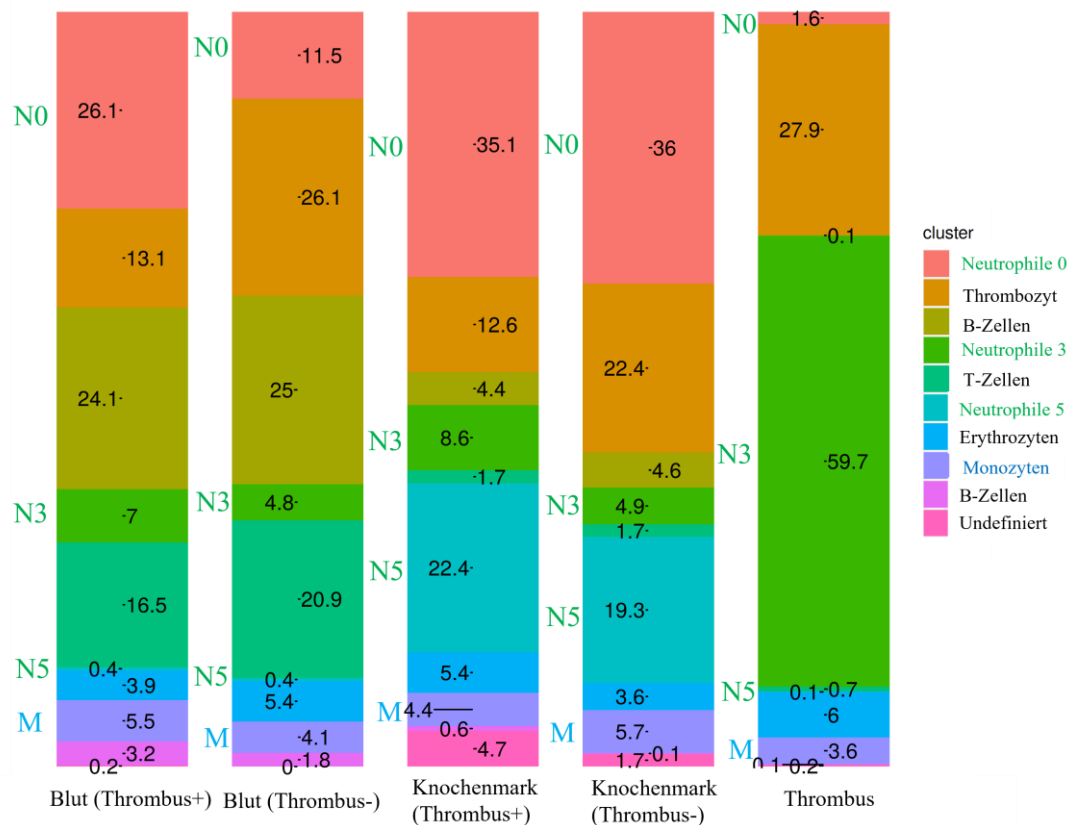


Abbildung 4: Barplot der prozentualen Anteile der Zellcluster und -typen aus Abb. 1 im jeweiligen Herkunftsgewebe

Dieser Barplot zeigt die prozentualen Anteile der Zellcluster im Herkunftsgewebe.

Die Abbildungen 1-4 zeigen die Übersichtsanalyse der Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten. Die Abbildung 2 zeigt den Dotplot der Markergene, und hierbei eine gute Darstellung der gewünschten treppenförmigen Einteilung der Markergene. Abbildung 2 kann somit als Bestätigung der Analysekriterien zur Populationsaufteilung verwendet werden. Die Zellcluster zeigen eine deutliche phänotypbasierte Aufteilung.

In vergleichender Betrachtungsweise der Abbildungen 1, 3 und 4 zeigt sich die erwartete Aufteilung der Zelltypen. Abbildung 4 zeigt Neutrophile (61,4 %) und Monozyten (3,6 %) als vorherrschende Immunzelltypen im Thrombus. Thrombozyten (27,9 %) und Erythrozyten (6 %) bilden den Hauptteil an Nicht-Immunzellen. Die Aufteilung der Thrombuszellen in die jeweiligen Zellcluster veranschaulicht dies ebenfalls, mit einem sichtbaren Signal von Thrombusmaterial im Neutrophilencluster 3, Monozytencluster, Thrombozytencluster und Erythrozytencluster. Der Hauptanteil der Thrombuszellen findet sich in Neutrophilencluster 3.

Das Neutrophilencluster (bestehend aus den Clustern 0, 3 und 5) zeigt die größte Heterogenität in Abhängigkeit der Herkunft und der Thrombosierung (siehe Abbildung 3).

Der Hauptanteil der Thrombusneutrophilen liegt in Cluster 3, gemischt mit Blut- und Knochenmarkzellen aus thrombosierten Proben und geringeren Anteilen aus nicht-thrombosierten Proben. Es kann als neutrophiles Thrombuscluster bezeichnet werden.

Das Neutrophilencluster 5 besteht hauptsächlich aus Zellen von Knochenmarkproben, was im Barplot mit Werten von 0,1 % im Thrombus und 0,4 % im Blut im Vergleich zu signifikant höheren Anteilen im Knochenmark (22,4 % in Knochenmark (Thrombus+), 19,3 % in Knochenmark (Thrombus-)) bestätigt wird.

Das Neutrophilencluster 0 wird hauptsächlich von Blut- und Knochenmarkproben gebildet, allerdings unterscheiden sich die Zelltypen phänotypisch stark (Abb. 3).

Das Monozytencluster zeigt in dieser Übersicht keine deutlichen herkunftsabhängigen Veränderungen. Im Barplot zeigt sich eine leichte prozentuale Veränderung an der Gesamtzahl der Zellen abhängig von der Herkunft. Eine Aufteilung in klassische und nicht klassische Monozyten ist hier noch nicht möglich.

In dieser Arbeit sollen inflammatorische Signaturen in Thrombusneutrophilen und -monozyten dargestellt werden. Thrombusneutrophile werden zu über 97 % von Neutrophilencluster 3 gestellt (siehe Abb. 4). Deshalb wurde in der weiteren Analyse dieses Neutrophilencluster 3 verwendet, um inflammatorische Prozesse und Signalwege in Thrombusneutrophilen auf Transkriptombasis herauszuarbeiten. Als Vergleich wurden Blut- und Knochenmarkneutrophile gleicher phänotypischer Zuteilung zu Neutrophilencluster 3 verwendet. So kann dargestellt werden welche Genexpressionen und eventuelle Regulierungen in Thrombusneutrophilen im Unterschied zu Blut- und Knochenmarkneutrophilen ablaufen, obwohl sie phänotypbasiert zusammen in Neutrophilencluster 3 eingeordnet sind.

Die gleiche Analyse wurde bei Thrombusmonozyten vorgenommen. Hier musste das Monozytencluster aus Abbildung 1 jedoch noch einmal neu unterteilt werden, um herauszuarbeiten, wie Thrombusmonozyten lokalisiert sind. Hierbei wurde auch eine Unterteilung in klassische und nicht-klassische Monozyten und deren Lokalisation in Relation zu Thrombusmonozyten möglich (siehe V. 1.4.).

Das Neutrophilencluster 5 wurde aufgrund seiner interessanten Zusammensetzung in Abb. 3 und 4 zusätzlich analysiert. In Abb. 3 und 4 wird deutlich, dass diese Neutrophilen ausschließlich von Knochenmarkproben gestellt und somit phänotypisch keine Ähnlichkeit oder Zusammenhang zu Thrombusneutrophilen oder anderen Neutrophilen zeigen. Hier war es möglich, ohne weitere bioinformatische Reintegration, den Effekt der Thrombose auf die neutrophile Knochenmarkreserve und deren eventuellen inflammatorischen Signaturen zu untersuchen (siehe V. 1.3.).

1.2. Darstellung des neutrophilen Thrombuscluster

Nach der vorangegangenen Visualisierung und Einteilung der Zellcluster, konnte das neutrophile Thrombuscluster (Neutrophilencluster 3) genauer betrachtet werden. Hierfür wurden Vergleiche zwischen der RNA-Expression der Thrombusneutrophilen und Blut-/Knochenmarkneutrophilen thrombosierter Mäuse des gleichen Clusters erstellt. Basierend auf der Einteilung in Seurat, sind diese den Thrombusneutrophilen also phänotypisch ähnlich (siehe Abb. 1-4). Um nun die Regulationsunterschiede in Thrombusneutrophilen herauszufiltern und darzustellen, wurden Volcano-Plots erstellt. Anhand der Datensätze der Volcanoplots war es nun möglich, angereicherte RNA bzw. zugehörige Gene in Thrombusneutrophilen zu untersuchen. Die angereicherte RNA zeigt welche mRNA zum Zeitpunkt der Probennahme vermehrt exprimiert und welche entsprechende Gene somit hochreguliert sind.

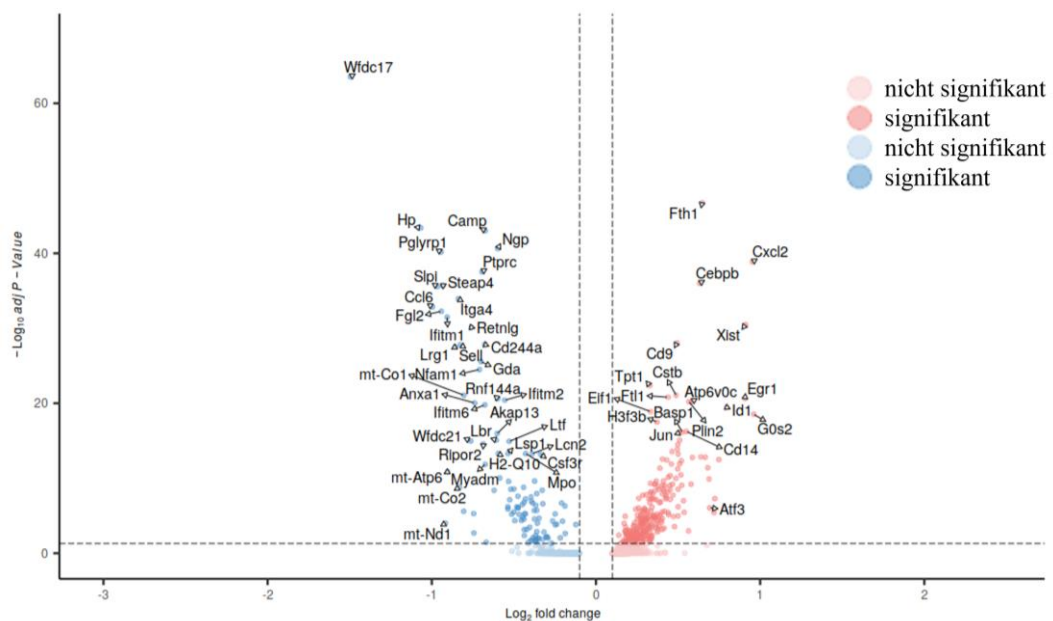


Abbildung 5: Volcano-Plot der signifikant hoch exprimierten Gene der Thrombusneutrophilen (rot) und Blutneutrophilen (Thrombus+) (blau) des Neutrophilenclusters 3 aus Abb. 1

Diese Abbildung zeigt einen Volcano-Plot, welcher die Einzelzell-RNA-Expression des Neutrophilenclusters 3 aus Abb. 1 von Thrombusneutrophilen und Blutneutrophilen aus thrombosierten Mäusen darstellt. Höher exprimierte Gene der Thrombusneutrophilen sind hier rot dargestellt, die der Blutneutrophilen blau. Es wurden Gene betrachtet die signifikant höher exprimiert waren ($\text{adj-P-Wert} < 0,05$ auf der $-\log_{10} y$ -Achse).

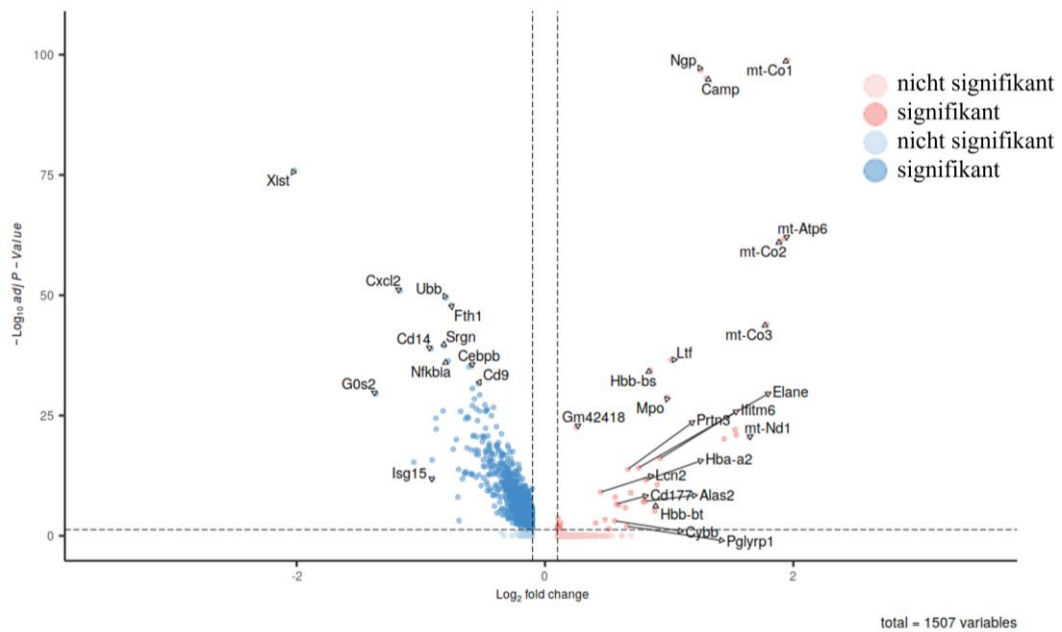


Abbildung 6: Volcano-Plot der signifikant hoch exprimierten Gene aus Knochenmarkneutrophilen (Thrombus+) (rot) und Thrombusneutrophilen (blau) des Neutrophilenclusters 3 aus Abb. 1

Diese Abbildung zeigt einen Volcano-Plot, welcher die Einzelzell-RNA-Expression des Neutrophilenclusters 3 aus Abb. 1 von Knochenmarkneutrophilen aus thrombosierten Mäusen und Thrombusneutrophilen darstellt. Die hoch exprimierten Gene der Knochenmarkneutrophilen sind rot dargestellt, die der Thrombusneutrophilen in blau. Es wurden Gene betrachtet die signifikant höher exprimiert waren (adj-P-Wert $<0,05$ auf der $-\log_{10}$ y-Achse).

In Abbildung 5 und 6 sind die hoch exprimierten Gene der Thrombusneutrophilen des neutrophilen Thrombuscluster (Neutrophilencluster 3) aus Abbildung 1 im Vergleich zu phänotypisch demselben Cluster zugeordneten Blut- und Knochenmarkneutrophilen thrombosierter Mäuse zu sehen. In diesen Volcano-Plots geben beschriftete Gene erste Hinweise darauf, wie sich die Thrombusneutrophilen charakterisieren. Es fallen bereits in diesen Darstellungen inflammatorisch und immunologisch wichtige Gene (beispielsweise CXCL2, CEBPB, CD14 oder JUN) auf. Im weiteren Verlauf der Analyse der Volcano-Plot-Daten bestätigten sich diese als relevant in den Abläufen der Reaktion auf die Thrombose in Thrombusneutrophilen.

1.2.1. Darstellung der Thrombusneutrophilen des Thrombusclusters

Bei Betrachtung der Volcano-Plots ist zu sehen, ob und in welchem Umfang unterschiedliche Expressionen und somit unterschiedliche Regulierungen vorliegen. Sie bilden noch nicht ab, in welchem Zusammenhang die hoch regulierten Gene stehen oder welche Prozesse hier hoch reguliert sind. Hierfür wurde eine Zuordnung der hochregulierten Gene zu biologischen Prozessen vorgenommen.

Die Zuordnungen hoch exprimierter Gene der Thrombusneutrophilen zu biologischen Prozessen wurden über das DAVID set enrichment tool auf Basis der Datenanalyse der Volcano-Plots in Abbildung 5 und 6 erstellt.

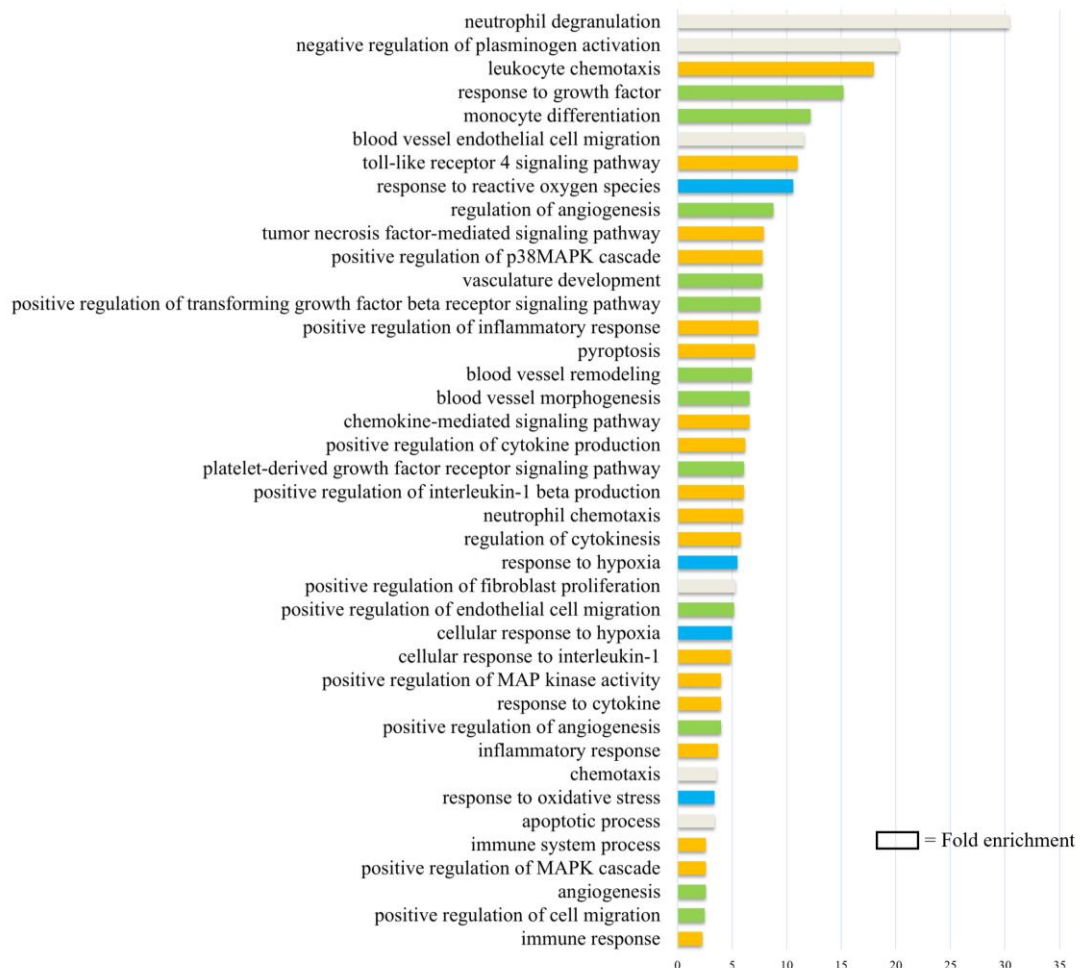


Abbildung 7: Auswahl der biologischen Prozesszuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Thrombusneutrophilen aus Abb. 5

In dieser Abbildung wird eine Auswahl der signifikant hoch exprimierten Gene der Thrombusneutrophilen aus des Neutrophilenclusters 3 Abbildung 5 zu biologischen Prozessen dargestellt.

Tabelle 1: Genliste Thrombusneutrophile zu Abb. 7

In dieser Tabelle sind die hoch exprimierten Gene der Blutneutrophilen im Vergleich zu Thrombusneutrophilen aufgelistet, welche für die Zuordnung zu den biologischen Prozessen in Abbildung 7 verwendet wurden.

Fos Jun Prdx5	Cellular response to reactive oxygen species
Abr Anxa3 Stx11	neutrophil degranulation
Ctsz Thbs1	negative regulation of plasminogen activation
Sbds Cxcl2 Lyst Pf4	leukocyte chemotaxis
Skil Anxa3 Dusp6	response to growth factor
Jun Myh9 Vegfa	monocyte differentiation
Adam8 Cxcr4 Myh9	blood vessel endothelial cell migration
Cd14 Nfkbia Pik3ap1	toll-like receptor 4 signaling pathway
Hif1a Prdx6 Plk3	response to reactive oxygen species
Id1 Ninj1 Ppp1r15a Rnh1	regulation of angiogenesis
Jak2 Pycard Aim2 Nfkbia	tumor necrosis factor-mediated signaling pathway
Hif1a Stk11 Vegfa	vasculature development
Stk11 Sdcbp Thbs1	positive regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway
Cebpb Jak2 Pycard Tnip1 Adam8 Aim2 Ninj1 Nfkbia Tgm2	positive regulation of inflammatory response
Naip2 Pycard Aim2	pyroptosis
Chd Rbpj Tgm3 Vegfa	blood vessel remodeling
Gpr35 Cxcl2 Cxcl3 Pf4	chemokine-mediated signaling pathway
Hif1a Thbs1 Vegfa	blood vessel morphogenesis
Clec5a Cd14 Cd300c2 Gapdh Hilpda Mif	positive regulation of cytokine production
Jak2 Pycard 1810058I24Rik Aim2 Egr1	positive regulation of interleukin-1 beta production
Arid5b Jak2 Tiparp	platelet-derived growth factor receptor signaling pathway
Bsg Cxcl2 Cxcl3 Pf4 Spp1 Trem1	neutrophil chemotaxis
Bnip3 Ddit4 Rest Aldoa Alkbh5 Alas1 Cxcr4 Egr1 Egl3 Hmox1 Hif1a Ldha Slc2a1 Vegfa	response to hypoxia
Brk1 Tgif1 Cdkn1a Jun Mif	positive regulation of fibroblast proliferation
Anxa3 Bsg Thbs1 Vegfa	positive regulation of endothelial cell migration
Bnip3 Adam8 Egl3 Hmox1 Hif1a Hilpda Pk1 Vegfa	cellular response to hypoxia
Cebpb Pycard Acod1 Cxcl2 Hif1a	cellular response to interleukin-1
Anxa3 Hmox1 Hif1a Itgax Ninj1 Runx1 Thbs1 Vegfa	positive regulation of angiogenesis
Bcl2l1 Fos Skil Jun	response to cytokine
Adam8 Mif Thbs1 Vegfa	positive regulation of MAP kinase activity
Cd14 Ddx3x Naip2 Pycard Tnip1 Adam8 Aim2 Acod1 Ccr12 Cxcl2 Cxcl3 Il1rn Irak2 Mif Ninj1 Pf4 Thbs1 Tnfrsf1b	inflammatory response
Ccr12 Cxcl2 Cxcl3 Cxcr4 Ninj1 Pf4	chemotaxis
Bcl2l1 Bnip3 Ddx3x Ddit4 G0s2 Nek6 Pycard Aim2 Bicap Egl3 Gabarap Gapdh Gadd45b Gadd45g Hmox1 Hcar2 Hif1a Id1 Inpp5d Jun Phlda1 Plk3 Ppp1r15a Srgn Stk11 Sra1 Vegfa	apoptotic process
Jak2 Hmox1 Prdx5 Prdx6 Prnp Slc7a11	response to oxidative stress
Adam8 Bsg Hmox1 Hif1a Jun Myh9 Ninj1 Rbpj Vegfa	angiogenesis

Jak2 Gadd45b Gadd45g Laptm5 Spag9 Vegfa	positive regulation of MAPK cascade
Clec4d Clec5a Cd14 Cd300c2 Ddx3x Jak2 Naip2 Pycard 1810058I24Rik Aim2 Acod1 Arg2 Gapdh H2-K1 Inpp5d Mif Trem1	immune system process
Jak2 Aldoa Cxcr4 Itgax Spag9 Sdcbp Thbs1 Vegfa	positive regulation of cell migration
Clec4d Cd80 Jak2 Ccr12 Cxcl2 Cxcl3 Cxcr4 Fth1 H2-K1 Il1rn Nfil3 Pf4 Thbs1 Tnfrsf1b	immune response
Bcl2l1 Bnip3 Ddx3x Jak2 Pycard Rest Dusp6 Gadd45b Gadd45g Hmox1 Hif1a Inpp5d Jun Ldha Osgin1 Phlda1 Ppp1r15a Tgm2 Tnfrsf26	Positive regulation of apoptotic process



Abbildung 8: Teil 1 Auswahl der biologischen Prozesszuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Thrombusneutrophilen aus Abb. 6

In dieser Abbildung wird der erste Teil einer Auswahl der funktionellen Zuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Thrombusneutrophilen aus Abb. 6 zu biologischen Prozessen dargestellt.

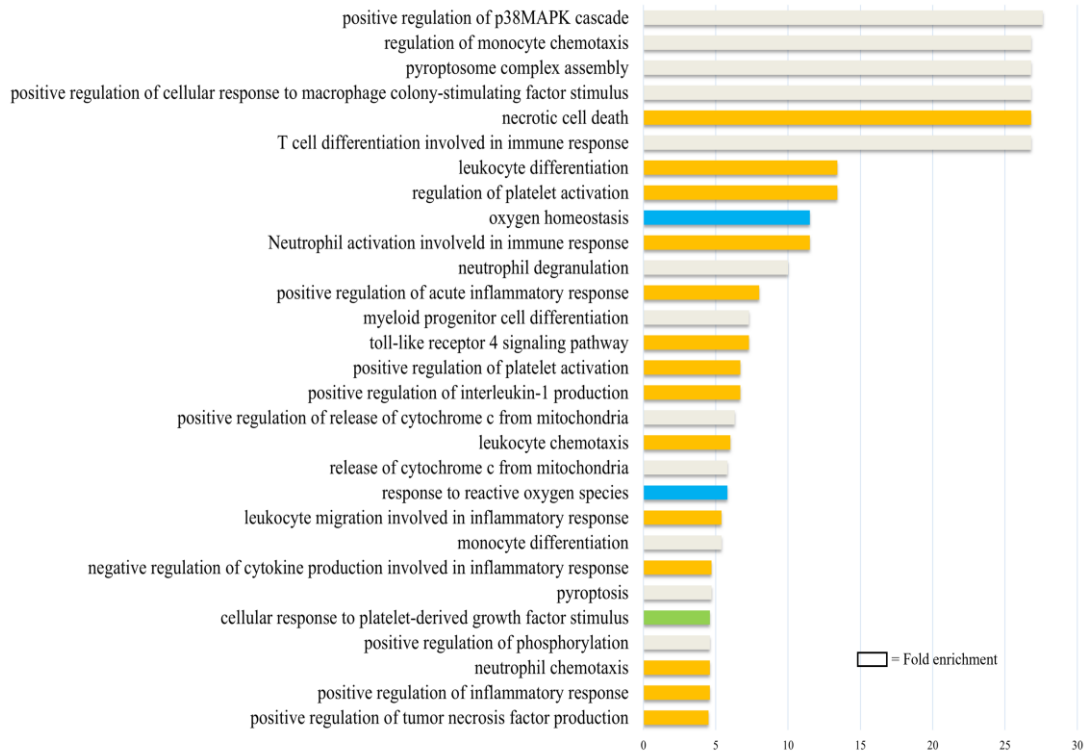


Abbildung 9: Teil 2 Auswahl der biologischen Prozesszuordnung signifikant hoch exprimierter Gene der Thrombusneutrophilen aus Abb. 6

In dieser Abbildung wird der zweite Teil einer Auswahl der Zuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Thrombusneutrophilen aus Abbildung 6 zu biologischen Prozessen im dargestellt.

Tabelle 2: Genliste Thrombusneutrophile zu Abb 8 und 9

In dieser Tabelle sind die hoch exprimierten Gene der Thrombusneutrophilen im Vergleich zu Knochenmarkneutrophilen aufgelistet, welche für die Zuordnung zu den biologischen Prozessen in Abbildung 8 und 9 verwendet wurden.

Clk4 Jak2 Lyn Mknk2 Nuak2 Riok3 Rictor Rock2 Csnk1e Cdk12 Cdk17 Cdk9 Dgkz Gsk3a Hk2 Ikbkb Igf1r Mapk6 Map2k4 Map3k14 Map3k5 Nmrk1 Pik3c2a Pfk1 Pfkp Pgl1 Plk3 Pim1 Pkm Sik1 Sephs2 Sgms2 Syk Tec	phosphorylation
Wasf2 Adam8 Actg1 Bsg Fmnl3 Hmox1 Hif1a Jun Myh9 Ninj1 Pdcl3 Pdc10 Rhob Rbpj Rnf213 Sema4a Syk Vegfa	angiogenesis
Jak2 Rock2 App Gsdme Gadd45b Hmgb1 Igf1r Lamtor1 Map3k5 Spag9 Syk Sod1 Timp2 Vegfa	positive regulation of MAPK cascade
Anxa3 C5ar1 Hmox1 Hk2 Hif1a Itgb1 Lgals3 Ninj1 Pdcl3 Rhob Runx1 Thbs1 Vegfa	positive regulation of angiogenesis
Naip2 Pycard App Gadd45b Hmgb1 Lmnbl Map2k4 Map3k5 Tlr4	positive regulation of JNK cascade
Bnip3 Cited2 Rest Smad4 Aldoa Alkbh5 Alas1 Cxcr4 Egr1 Egln1 Fosl2 Hmox1 Hk2 Hif1a Ldha Rhoa Slc2a1 Sod2 Tlr2 Vegfa	response to hypoxia
Bcl2l1 Fos Skil Jun Mcl1 Rel Stat6 Timp2	response to cytokine
Cd14 Lyn Mefv Naip2 Nlrp3 Pxx Pycard Tnip1 Adam8 Aim2 Acod1 Ccrl2 Cxcl2	inflammatory response

Cxcl3 C5ar1 Cul3 Fpr1 Havcr2 Hnrpa0 Hmgb1 Il1rap Il1rn Irak2 Lilrb4a Ly96 Mif Ninj1 Nfkbiz Pla2g7 Plgrkt Pf4 Ppbp Rel Thbs1 Tlr13 Tlr2 Tlr4 Tnfrsf1b Tnfaip3	
Smad7 Igflr Nr3c1 Pdcd5 Runx1 Zfp3611 Zfp3612	cellular response to transforming growth factor beta stimulus
	regulation of apoptotic process
Atp7a Cited2 Chd7 Hif1a Jmjd6 Psen1 mdm2 Vegfa	blood vessel development
Kras Adam8 App Mif Psen1 Pdcd10 Thbs1 Tlr4 Vegfa	positive regulation of MAP kinase activity
Bax Bcl2l1 Bcl2l11 Bnip3 Bnip3l Ddit3 Dnaja1 Jak2 Pycard Rest Rybp Rnps1 Sap18 App Calm1 Calm2 Dusp1 Egn1 Fam162a Gadd45b Hmox1 Hmgb1 Hif1a Ing3 Ing4 Itgb1 Jun Ldha Map2k4 Map3k5 Mcl1 Osgin1 Phlda1 Psen1 Pdcd5 Ppp1r15a Rhob Slc27a4 Suds3 Txnip Tlr4 Tgm2 Tomm22	positive regulation of apoptotic process
Rac1 Rock2 Anxa3 Bsg Rhob Thbs1 Vegfa	positive regulation of endothelial cell migration
Arid4b Sap30l Skil Smad7 Glg1 Hspa5 Strap Sap30 Snx6 Suds3 Zbtb7a	negative regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway
Bax Emd Fth1 Morc3 Sod2	negative regulation of fibroblast proliferation
Arid5b Jak2 Tiparp Csrnp1 Txnip	platelet-derived growth factor receptor signaling pathway
Lilrb4a Lcp2 Rel Tut4 Trem1	cytokine production
Jak2 Pycard Aim2 Ikbkb Nfkbia	tumor necrosis factor-mediated signaling pathway
Abcc1 Jak2 1600014C10Rik App Gpx4 Hmox1 Prdx5 Prdx6 Psen1 Prnp Selenok Slc7a11 Srxn1 Sod1 Sod2 Txnip Txnrd1 Tlr4	response to oxidative stress
Abca1 cxcr4 Cdk9 Ldlrap1 Nfkbia Rhoa	cellular response to cytokine stimulus
Atp7a Bnip3 Bnip3l Higd1a Adam8 Npepps Egn1 Eif4ebp1 Fam162a Hmox1 Hif1a Hilpda Pkg1 P4hb Rgcc Mdm2 Vegfa Zfp3611	cellular response to hypoxia
Atp7a Bax chd7 Rbpj Mdm2 Tgm2 Vegfa	blood vessel remodeling
Atfa4 Bsg C5ar1 Hifa	positive regulation of vascular endothelial growth factor production
Egn1 Id1 Ninj1 Pdcd10 Ppp1r15a Rnh1	regulation of angiogenesis
Clec4e Clec5a Cd14 Cd300c2 Gapdh Havrc2 Hilpda Mif Peli1 Rgcc Syk Sod1 Tlr2	positive regulation of cytokine production
Tyrobp Hmgb1 Jmjd6 Tgm2	apoptotic cell clearance
Cd14 Fcer1g Fcgr3 Jak2 Pycard Tyrobp App Havcr2 Hmgb1 H2-T23 Lrrfip2 Ly96 Mif Pf4 Psen1 Selenok Syk Thbs1 Tlr2 Tlr4	positive regulation of tumor necrosis factor production
Abcc1 Cebpb Gpsm3 Jak2 Mefv Nlrp3 Pycard Tnip1 Adam8 Aim2 App Ninj1 Nfkbia Nfkbiz Tlr2 Tlr4 Tgm2	positive regulation of inflammatory response
Fcer1g Fcgr3 Bsg Cxcl2 Cxcl3 C5ar1 Itgam Lgals3 Pde4b Pf4 Ppbp Spp1 Syk Trem1	neutrophil chemotaxis
Lyn App Mif Psen1 Sdebp Thbs1 Vegfa	positive regulation of phosphorylation
Atp7a Errfi1 Arpc2 Syap1 Tlr4	cellular response to platelet-derived growth factor stimulus
Mefv Naip2 Nlrp3 Pycard Aim2 Gsdme	pyroptosis
Mefv Pycard Il1r2 Llilrb4a	negative regulation of cytokine production involved in inflammatory response
Ifi204 Jun Myh9 Vegfa	monocyte differentiation
Nlrp3 Adam8 Itgam Ppbp	leukocyte migration involved in inflammatory response

Hif1a Prdx6 Plk3 Sod1 Sod2	response to reactive oxygen species
Bax Bcl2l11 Bnip3 Pycard Fam162a Plaur Pcd5	release of cytochrome c from mitochondria
Sbds Cxcl2 Lyst Pf4	leukocyte chemotaxis
Bax Bcl2l11 Bnip3 Pycard Fam162a Plaur Pcd5	positive regulation of release of cytochrome c from mitochondria
Havcr2 Hmgb1 Tlr4	positive regulation of interleukin-1 production
Jak2 Gp9 Tlr4	positive regulation of platelet activation
pos reg Hmgb1 Ninj1 Peli1 pathway Cd14 Lyn Ly96 Nfkbia Pik3ap1 Tlr4	toll-like receptor 4 signaling pathway
Hmgb1 Runx1 Tet2	myeloid progenitor cell differentiation
Adam8 Alox5ap Mif	positive regulation of acute inflammatory response
Abr Anxa3 Stx11	neutrophil degranulation
Fcer1g Tyrobp Syk	Neutrophil activation involved in immune response
Egln1 Sif1a Sod2	oxygen homeostasis
Fcer1g Syk Tec	regulation of platelet activation
Cited2 Id2 Tet2	leukocyte differentiation
Clec4d Clec4e Fcer1g Sema4a	T cell differentiation involved in immune response
Oga Gsdme Ninj1	necrotic cell death
Tlr2 Tlr4	positive regulation of cellular response to macrophage colony-stimulating factor stimulus
Mefv Aim2	pyroptosome complex assembly
Lyn Ninj1	regulation of monocyte chemotaxis
Gadd45b Vegfa	Positive regulation of p38MAPK cascase

Die unterschiedliche Einfärbung der Balken in den Abbildungen 7, 8 und 9 zeigt eine grobe Einordnung in verschiedene übergeordnete biologische Prozesse.

Orange Balken stellen generelle Immun- und Inflammationsprozesse dar, blaue Balken zeigen Reaktionen auf Hypoxie an. Grüne Balken stehen für biologische Prozesse in Zusammenhang mit Angiogenese. Graue Balken sind nicht eindeutig den vorher genannten Untergruppen zuzuordnen, da sie entweder in mehreren bedeutsam sind oder spezielle Vorgänge darstellen.

Die ersten Erkenntnisse aus der Betrachtung der Volcano-Plots (Abb. 5 und 6) setzen sich hier fort. Es ist eine große Anzahl inflammatorischer und immunologischer Prozesse und Signalwege (z.B. *neutrophil activation involved in immune response*; *positive regulation of inflammatory response*) zu sehen, außerdem im speziellen Hinweise auf angiogenetische Prozesse (z.B. *positive regulation of VEGF production*) und Reaktionen auf Hypoxie (z.B. *response to hypoxia*).

In den Tabellen 1 und 2 sind die Gene aufgelistet, welche für die Annotation zum jeweiligen Prozess oder Signalweg verantwortlich sind. Bei Durchsicht sind erneut einige inflammatorisch und immunologisch wichtige Gene vermehrt vorzufinden, welche bereits in der Übersicht im Volcano-Plot zu sehen waren. In diesen Tabellen sind jedoch auch weitere relevante Gene zu erkennen, welche gehäuft (beispielsweise VEGFA, HIF1a, HMOX1) oder exklusiv in einem einzelnen Prozess (siehe SPP1 in *neutrophil chemotaxis*) auftreten.

1.2.2. Darstellung der Blutneutrophilen und Knochenmarkneutrophilen des neutrophilen Thrombusclusters

Die Analyse zu Blut- und Knochenmarkneutrophilen wurde als Vergleich und Kontrolle zur vorherigen Analyse der Thrombusneutrophilen erstellt.

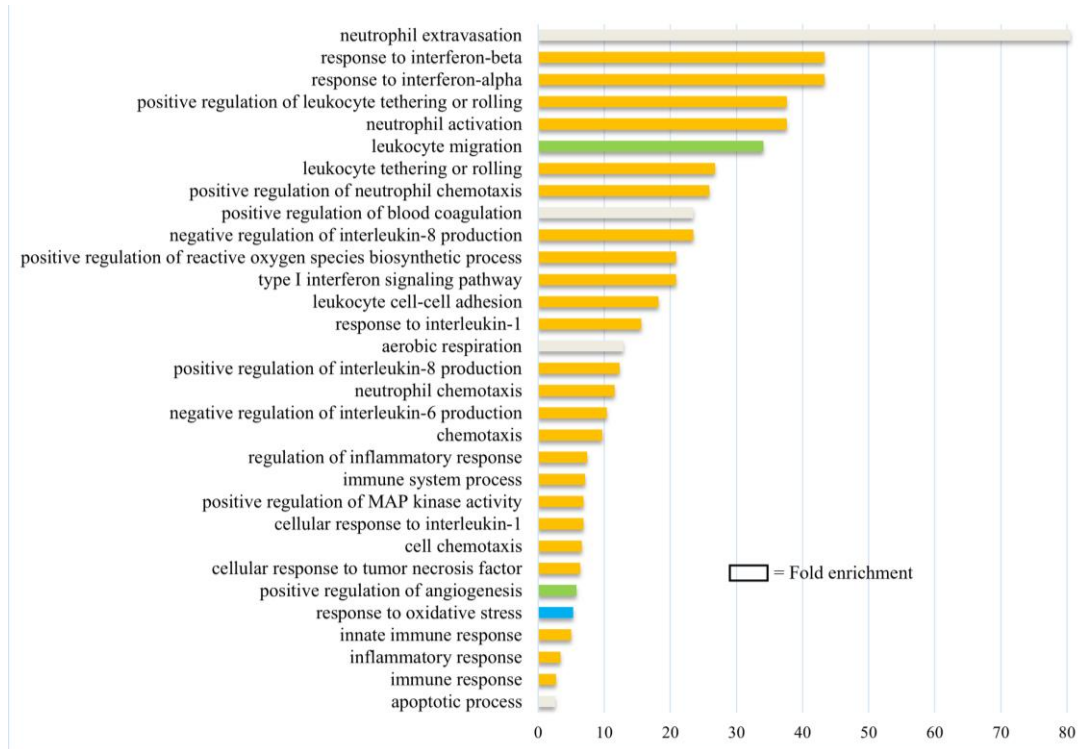


Abbildung 10: Auswahl der biologischen Prozesszuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Blutneutrophilen aus Abb. 5

In dieser Abbildung wird eine Auswahl der Zuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Blutneutrophilen thrombosierter Mäuse aus Abb. 5 zu biologischen Prozessen dargestellt.

Tabelle 3: Genliste Blutneutrophile zu Abb. 10

In dieser Tabelle sind die hoch exprimierten Gene der Blutneutrophilen thrombosierter Mäuse im Vergleich zu Thrombusneutrophilen aufgelistet, welche für die Zuordnung zu den biologischen Prozessen in Abb. 10 verwendet wurden.

Cd117 Jaml Prtn3	neutrophil extravasation
Ifitm1 Ifitm2 Ifitm6	response to interferon-alpha and beta
Anxa1 Camp Cxcr2	neutrophil activation
St3gal4 Elane Itga4	positive regulation of leukocyte tethering or rolling
Elane Itga4 Jaml Mmp9 Sell Selplg	leukocyte migration
Itga4 Sell Selplg	leukocyte tethering or rolling
Ripor2 Rac2 Cxcr2 Sell	positive regulation of neutrophil chemotaxis
Anxa1 Elane	negative regulation of interleukin-8 production
S100a9 St3gal4	positive regulation of blood coagulation
Ifitm1 Ifitm2 Ifitm6	type I interferon signaling pathway

Hdac4 Lcn2	positive regulation of reactive oxygen species biosynthetic process
Cd177 Itga4 Ptprc	leukocyte cell-cell adhesion
Anxa1 Chil1 Hdac4	response to interleukin-1
Mt- Nd1 Mt-Nd2 mt-Nd4 Mt-Co1 mt-Co3	aerobic respiration
Cd244a Camp Chil1 Elane	positive regulation of interleukin-8 production
S100a9 Ccl6 Cxcr2 Csf3r Jaml	neutrophil chemotaxis
Cd84 Klf2 Nlrp12	negative regulation of interleukin-6 production
Ripor2 Rac2 S100a9 Ccl6 Cxcr2 Hmgb2 Lsp1	chemotaxis
Nlrp12 Anxa1 Casp4 Zyx	regulation of inflammatory response
Cd177 Cd244a Cd84 Fgr S100a9 Samhd1 Anxa1 Casp4 Hp Hmgb2 H2-Q10 Ifitm1 Ifitm2 Jaml Lrf Lst1 Lcn2 Pirb Pglyrp1 Slpi	immune system process
Klf2 Camp Ccl6	cellular response to interleukin-1
Akap13 Iqgap1 Ptprc	positive regulation of MAP kinase activity
Ccl6 Cxcr2 Hmgb2	cell chemotaxis
Klf2 Camp Ccl6 Chil1 Hdac4	cellular response to tumor necrosis factor
Camp Cxcr2 Chil1 Lrg1 Mmp9	positive regulation of angiogenesis
Mt-Co1 Gpx1 Mmp9 Mpo	response to oxidative stress
Cd177 Cd244a Cd84 Fgr S100a9 Samhd1 Wfdc17 Wfc21 Anxa1 Casp4 Camp Hmgb2 Ifitm1 Ifitm2 Ltf Lcn2 Pglyrp1 Slpi Trim30b	innate immune response
S100a9 Anxa1 Casp4 Ccl6 Chil1 Hmgb2 Siglece	inflammatory response
Sc244a Fyb Ccl6 Cxcr2 H2-Q10 Lst1 Slpi	immune response
Rassf5 S100a9 Chil1 Gpx1 Lcn2 Lsp1 Mmp9 Pglyrp1 Slc40a1	apoptotic process

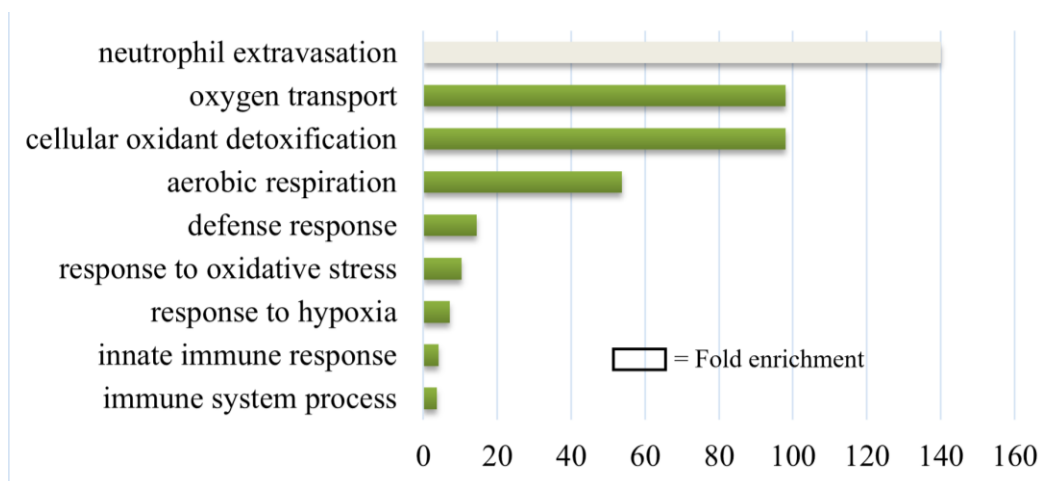


Abbildung 11: Auswahl der biologischen Prozesszuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Knochenmarkneutrophilen aus Abb. 6

In dieser Abbildung wird eine Auswahl der Zuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Knochenmarkneutrophilen thrombosierter Mäuse aus Abb. 6 des Neutrophilencluster 3 zu biologischen Prozessen dargestellt.

Tabelle 4: Genliste Knochenmarkneutrophile zu Abb. 11

In dieser Tabelle sind die hoch exprimierten Gene der Knochenmarkneutrophilen thrombosierter Mäuse im Vergleich zu Thrombusneutrophilen aufgelistet, welche für die Zuordnung zu den biologischen Prozessen in Abb. 11 verwendet wurden.

Cd177 Ltf Lcn2 Pglyrp1	immune system process
Cd177 Camp Cybb Ltf Lcn2 Pglyrp1	innate immune response
Mt-Nd4 Mt-Nd5 Alas2	response to hypoxia
mt-Nd3 Mt-Co1 Mpo	response to oxidative stress
Camp Cybb Mpo Ngp	defense response
mt-Nd1 mt-nd2 mt-nd3 mt-nd4 mt-nd4l mt-nd5 mt-Co1 mt-Co3	aerobic respiration
Hba-a1 Hba-a2 Hbb-bs Hbb-bt	cellular oxidant detoxification
Hba-a1 Hbb-bt	oxygen transport
Cd177 Prtn3	neutrophil extravasation

In Abbildung 10 und 11 und Tabelle 3 und 4 ist die in V. 1.2.1. erklärte Analyse für die Blut- und Knochenmarkneutrophilen im Vergleich zu Thrombusneutrophilen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass im Blut sehr ähnliche Prozesse und Signalwege annotiert wurden. Diese wurden jedoch, wie erwartet, aufgrund anderer Genexpressionen als in Thrombusneutrophilen annotiert und können somit als Bestätigung der vorangegangenen Analyse verwendet werden. Im Knochenmark sind ähnliche Reaktionen vorzufinden, wie in der phänotypbasiert in Neutrophilencluster 5 eingeordneten, neutrophilen Knochenmarkreserve (siehe V. 1.3.). Diese Gene sind in Thrombusneutrophilen reduziert exprimiert oder nicht exprimiert. Der biologische Prozess *neutrophil extravasation* ist sowohl in Blut- als auch in Knochenmark stark annotiert, jedoch nicht in Thrombusneutrophilen.

1.3. Darstellung der neutrophilen Knochenmarkreserve

Aufgrund der Zusammensetzung des Neutrophilenclusters 5 aus Knochenmarkproben, konnte ohne neue bioinformatische Reintegration eine, wie in 1.2.1. bereits beschriebene, Analyse vorgenommen werden. So konnten die thrombose-induzierten inflammatorischen Abläufe der neutrophilen Knochenmarkreserve dargestellt werden.

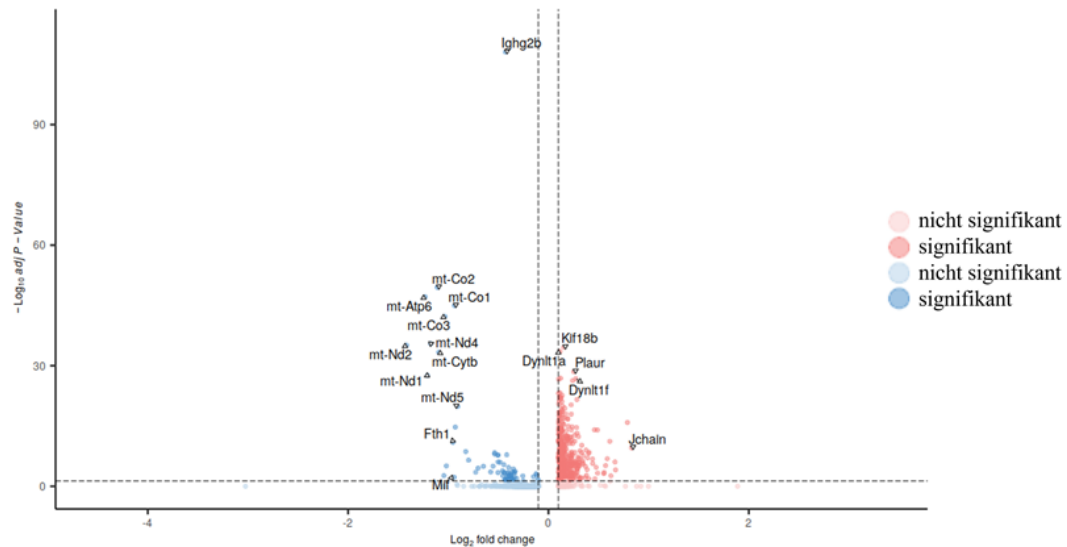


Abbildung 12: Volcano-Plot der exprimierten Gene der Einzelzell-RNA-Sequenzierung aus Neutrophilencluster 5 aus Abb. 1 vergleichend zwischen Knochenmark (Thrombus-) (rot) und Knochenmark (Thrombus+) (blau)

Diese Abbildung zeigt einen Volcano-Plot, welcher die Einzelzell-RNA-Expression des Neutrophilenclusters 5 von Knochenmarkneutrophilen aus thrombosierte Mäusen im Vergleich zu nicht thrombosierte Mäusen darstellt. Die hoch exprimierten Gene der Knochenmarkneutrophilen nicht-thrombosierter Mäuse sind rot dargestellt, die der thrombosierten Mäuse in blau. Es wurden Gene betrachtet die signifikant höher exprimiert waren (adj-P-Wert <0,05 auf der $-\log_{10}$ y-Achse).

Abbildung 12 zeigt einen Volcano-Plot, welcher die Einzelzell-RNA-Expression des Clusters 5 von Knochenmarkneutrophilen ohne Thrombosierung und Knochenmarkneutrophilen aus thrombosierte Mäusen darstellt. Die angereicherte RNA zeigt, welche Gene zum Zeitpunkt der Probennahme vermehrt exprimiert und somit hochreguliert sind. Höher exprimierte Gene der Knochenmarkneutrophilen (Thrombus-) sind hier rot dargestellt, die der Knochenmarkneutrophilen (Thrombus+) blau. Es ist anzumerken, dass CXCR4 in den Daten der Knochenmarkneutrophilen ohne Thrombosierung ohne explizite Markierung im Volcano-Plot vorzufinden ist.

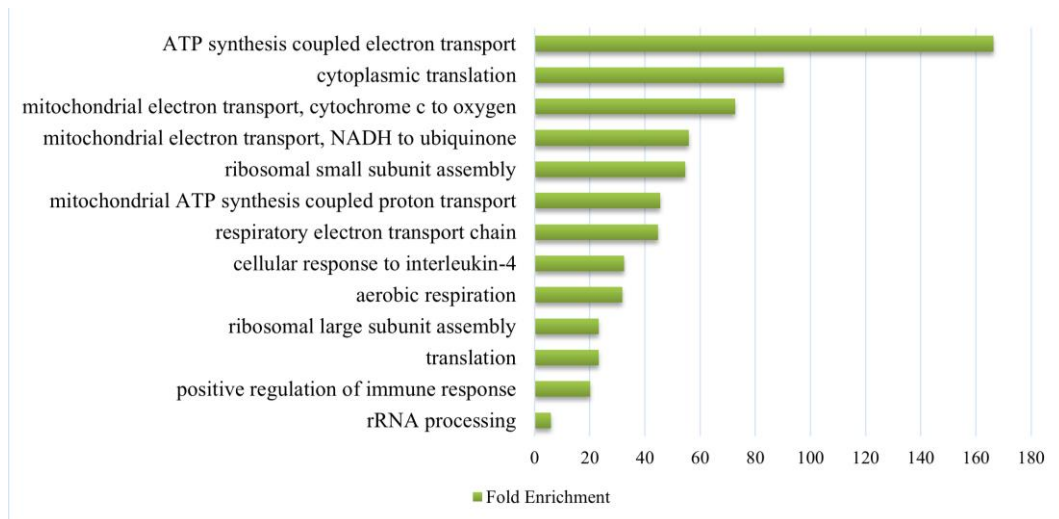


Abbildung 13: Auswahl der Zuordnung signifikant hoch exprimierter Gene zu biologischen Prozessen der Neutrophilen des Knochenmarks (Thrombus+) Cluster 5 aus Abb. 1

In dieser Abbildung wird eine Auswahl der Zuordnung signifikant hoch exprimierter Gene der Knochenmarkneutrophilen thrombosierter Mäuse aus Abb. 12 zu biologischen Prozessen dargestellt.

Die vermehrte Expression der Gene zu den biologischen Prozessen *translation*, *rRNA processing*, *cytoplasmic translation*, *ribosomal large subunit assembly* und *ribosomal small subunit assembly* deuten auf eine gesteigerte Genexpression hin. Die vermehrte Expression der Gene zu *positive regulation of immune response* zeigt die allgemein verstärkte Immunantwort in den Knochenmarkneutrophilen bei Thrombosierung. Die vermehrten Expressionen der Gene zu *ATP synthesis coupled electron transport*, *mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen*, *mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone*, *aerobic respiration* und *respiratory electron transport chain* deuten auf ein Energiedefizit oder den erhöhten Bedarf an Energie hin.

1.4. Darstellung der Thrombusmonozyten

Da in Abbildung 1 noch keine Unterteilung in klassische und nicht-klassische Monozyten vorgenommen werden konnte und auch keine Hinweise auf die genaue Lokalisation von Thrombusmonozyten vorlagen, wurde eine verfeinerte Reintegration des Monozytenclusters in Seurat durchgeführt (Abb. 14). Hierbei wurde erneut eine UMAP erstellt, welche eine Markierung der zuvor erstellten Populationen nach Herkunftsgewebe zeigt (Abb. 15). So wird auch hier erkennbar, in welcher Population Thrombusmonozyten lokalisiert sind.

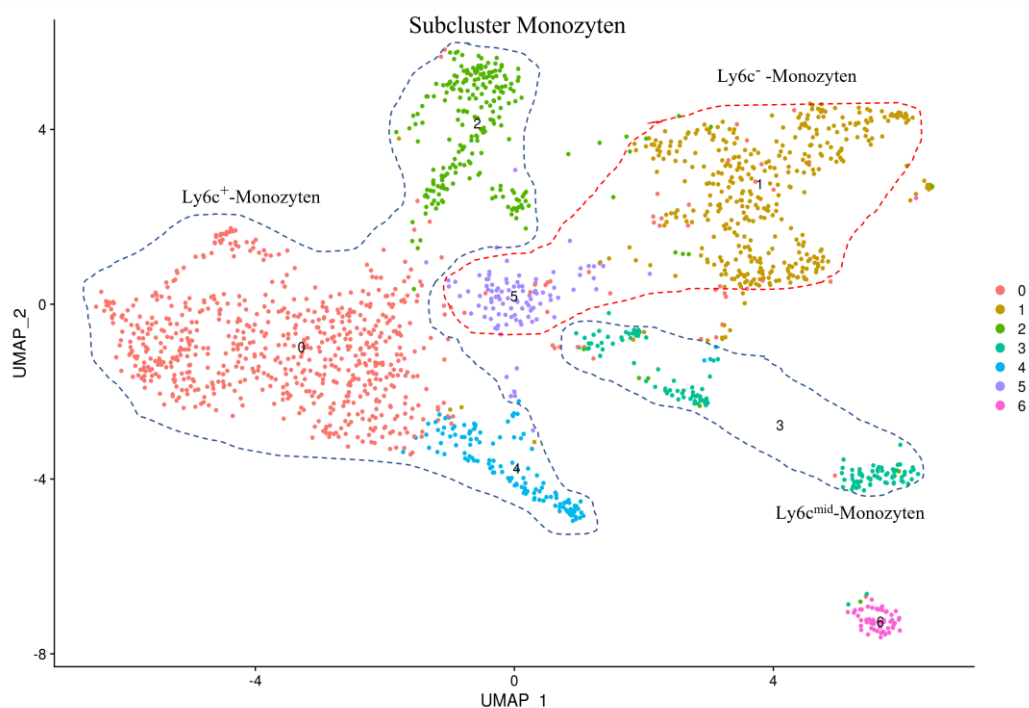


Abbildung 14: Abbildung der Monozyten der Einzelzell-RNA-Analyse

Verfeinerte Unterteilung des Monozytenclusters aus Übersichtsabbildung 1 in einer UMAP. Einteilung in Ly6c⁺ und Ly6c⁻ und Ly6c^{mid} Monozyten anhand der Datensätze.

Die Abbildung 14 zeigt die reintegrierte Einzelansicht des Monozytenclusters aus der Übersicht des Gesamtzellbildes in Abbildung 1 in einer UMAP.

In Abbildung 14 konnte nun eine Einteilung in Ly6c⁺ (klassische Monozyten), Ly6c⁻ (nicht-klassische Monozyten) und Ly6c^{mid} (intermediäre Monozyten) vorgenommen werden. Cluster 0, 2 und 4 stellen sich als Ly6c⁺-Monozyten dar, Cluster 1 und 5 als Ly6c⁻ Monozyten. Cluster 3 ist als Ly6c^{mid} zu werten.

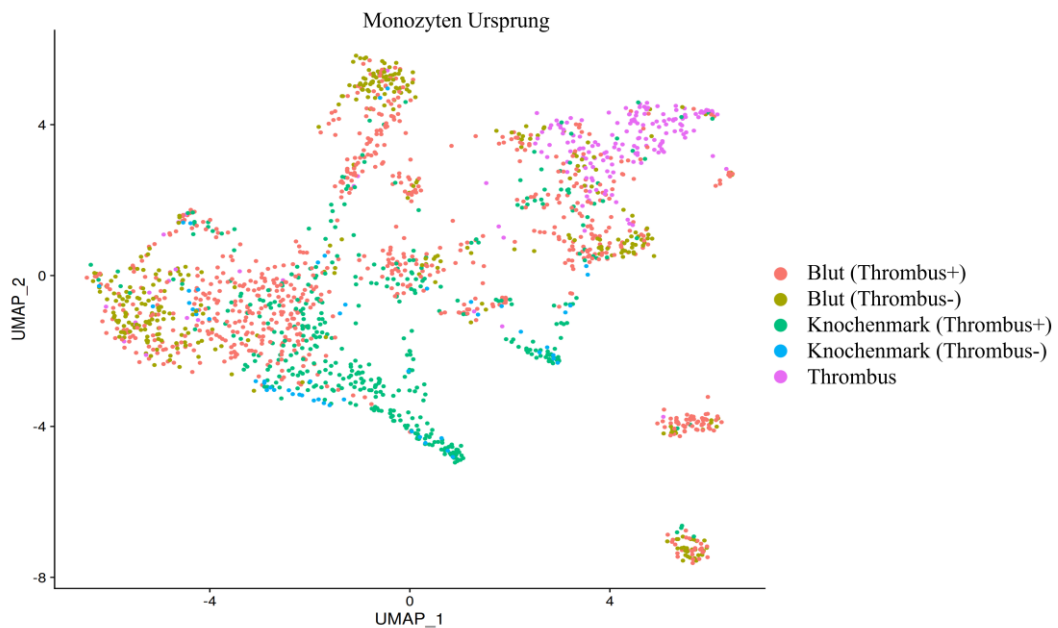


Abbildung 15: Darstellung des Ursprungs der Zellcluster aus Abb. 14 mit unterschiedlicher Einfärbungen der Proben

In dieser Abbildung wird der Ursprung (Thrombus, Blut (Thrombus+/-) und Knochenmark (Thrombus+/-)) der jeweiligen Zellcluster aus Abb. 14 durch unterschiedliche Einfärbung veranschaulicht.

In vergleichender Betrachtung der Abb. 14 und 15 ist zu sehen, dass sich Monozyten aus dem Thrombus auf das Cluster 1 konzentrieren (= monozytäres Thrombuscluster).

1.4.1. Darstellung des monozytären Thrombuscluster

Nach der vorangegangenen Visualisierung und Einteilung der Zellcluster, konnte nun auch das monozytäre Thrombuscluster genauer betrachtet werden. Hierfür wurden erneut Vergleiche zwischen der RNA-Expression der Thrombusmonozyten und Blut-/Knochenmarkmonozyten thrombosierter Mäuse des gleichen Clusters erstellt. Basierend auf der Einteilung in Seurat, sind diese den Thrombusmonozyten also phänotypisch ähnlich (siehe Abb. 14 und 15). Um Regulationsunterschiede herauszufiltern und darzustellen, wurden Volcano-Plots erstellt.

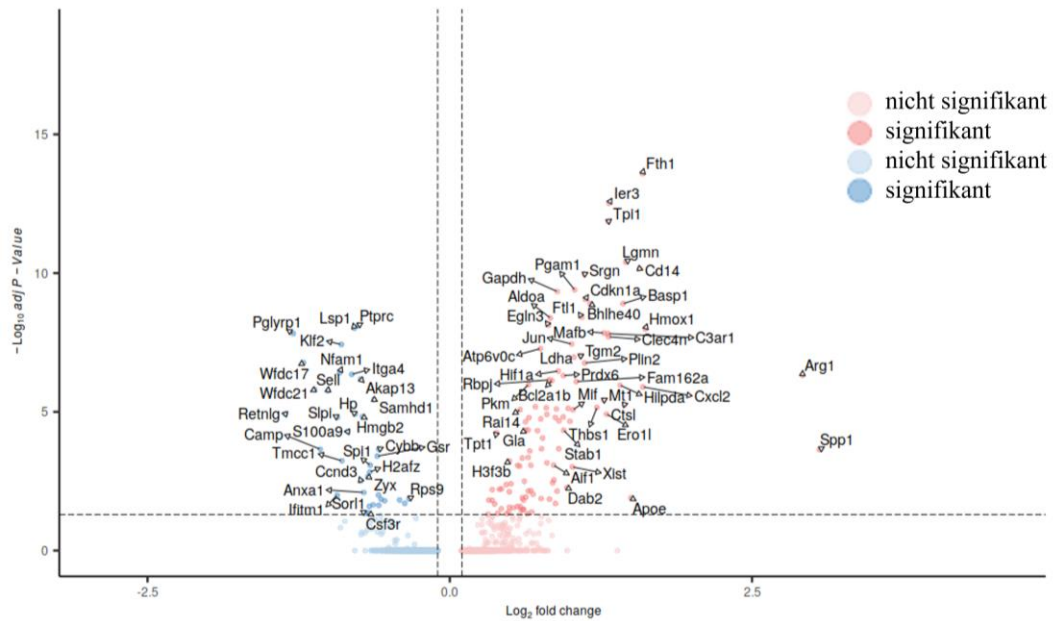


Abbildung 16: Volcano-Plot der signifikant hoch exprimierten Gene aus Thrombusmonozyten (rot) und Blutmonozyten (Thrombus+) (blau)

In dieser Abbildung sind die hoch exprimierten Gene der Thrombusmonozyten (rot) im Vergleich zu den Blutmonozyten (blau) thrombosierter Mäuse des Cluster 1 aus Abb. 14 in einem Volcano-Plot abgebildet. Es wurden Gene betrachtet die signifikant höher exprimiert waren (adj-P-Wert $<0,05$ auf der $-\log_{10}$ y-Achse).

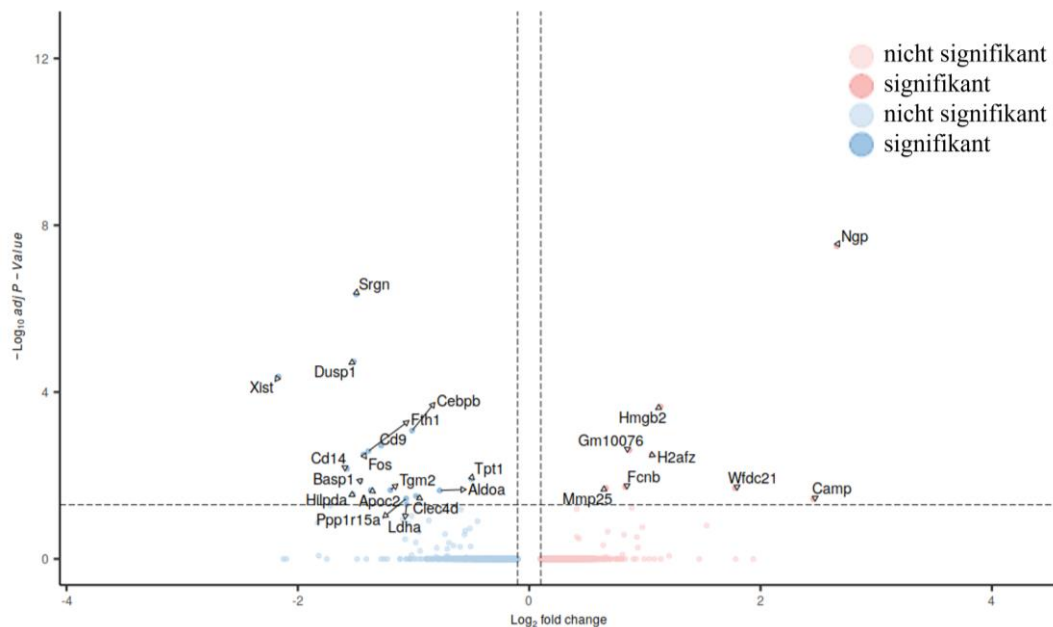


Abbildung 17: Volcano-Plot der signifikant hoch exprimierten Gene aus Knochenmarkmonozyten (Thrombus+) (rot) und Thrombusmonozyten (blau)

In dieser Abbildung sind die hoch exprimierten Gene der Thrombusmonozyten (blau) im Vergleich zu den Knochenmarkmonozyten (rot) thrombosierter Mäuse des Cluster 1 aus Abb. 14 in einem Volcano-Plot abgebildet. Es wurden Gene betrachtet die signifikant höher exprimiert waren (adj-P-Wert $<0,05$ auf der $-\log_{10}$ y-Achse).

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen Volcano-Plots, welche die Einzelzell-RNA-Expression der Thrombusmonozyten des Cluster 1 aus Abb. 14 und phänotypisch dem selben Cluster zugeordneten Blut- und Knochenmarkmonozyten thrombosierter Mäuse darstellen. Hier fallen Gene wie TGM2, SPP1 und HIF1a auf, welche teilweise bereits in Thrombusneutrophilen als auffällig erachtet wurden.

Um die gleiche Analyse wie in Thrombusneutrophilen (siehe 1.2.1.) vornehmen zu können, wurde auch hier die Zuordnung der hochregulierten Gene zu biologischen Prozessen vorgenommen.

Die Zuordnungen hoch exprimierter Gene der Thrombusmonozyten zu biologischen Prozessen wurden über das DAVID set enrichment tool auf Basis der Datenanalyse der Volcano-Plots in Abbildung 16 und 17 erstellt.

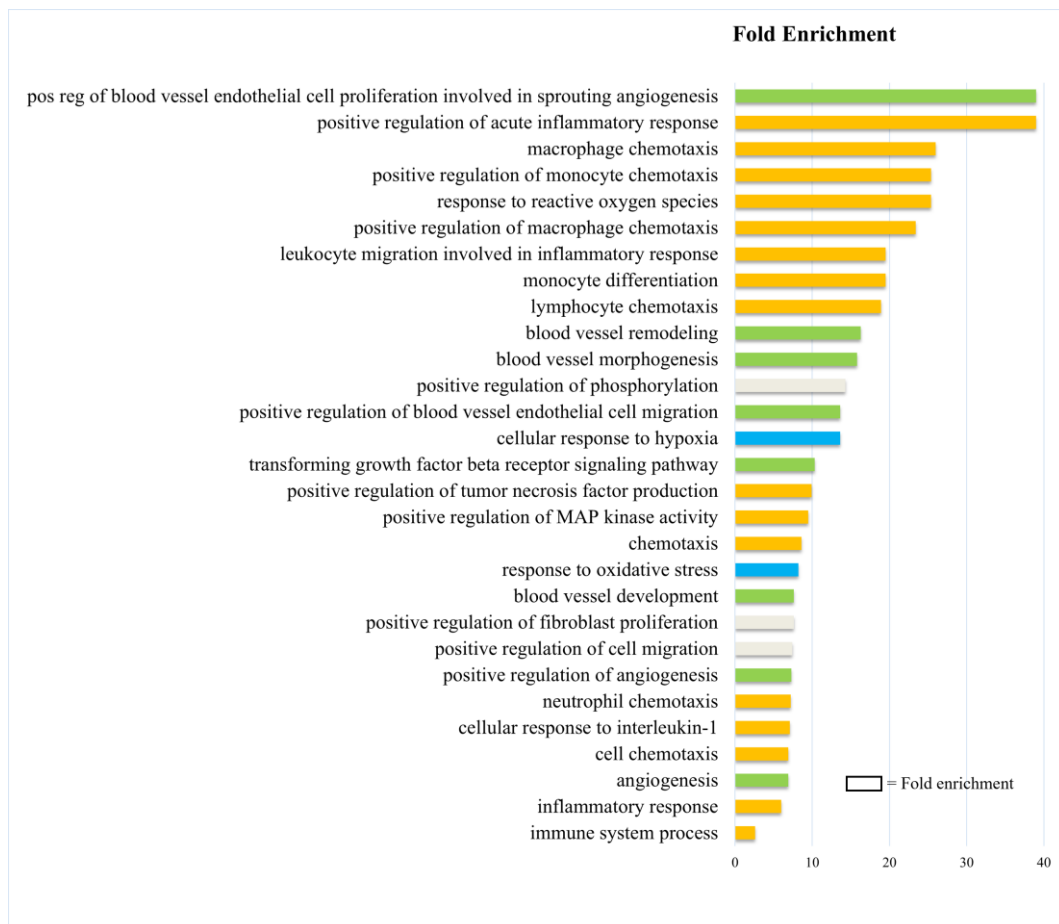


Abbildung 18: Auswahl der biologischen Prozesszuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Thrombusmonozyten aus Abb. 16.

In dieser Abbildung wird eine Auswahl der Zuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Thrombusmonozyten aus Abb. 16 zu biologischen Prozessen dargestellt.

Tabelle 5: Genliste Thrombusmonozyten zu Abb. 18

In dieser Tabelle sind die hoch exprimierte Gene der Thrombusmonozyten im Vergleich zu Blutmonozyten aufgelistet, welche für die Zuordnung zu den biologischen Prozessen aus Abb. 18 verwendet wurden.

Adam8 Mif	positive regulation of acute inflammatory response
Hmox1 Vegfa	pos reg of blood vessel endothelial cell proliferation involved in sprouting angiogenesis
Ccl2 Ninj1	macrophage chemotaxis
Hif1a Prdx6 Plk3	response to reactive oxygen species
Aif1 Ccl2 Lgmn	positive regulation of monocyte chemotaxis
Ccl2 C3ar1 Thbs1	positive regulation of macrophage chemotaxis
Jun Vegfa	monocyte differentiation
Adam8 Ccl2	leukocyte migration involved in inflammatory response
Adam8 Ccl2 Cxcl16	lymphocyte chemotaxis
Chd7 Rbpj Tgm2 Vegfa	blood vessel remodeling
Hif1a Thbs1 Vegfa	blood vessel morphogenesis
Mif Thbs1 Vegfa	positive regulation of phosphorylation
Bnip3 Adam8 Egl3 Fam162a Hmox1 Hif1a Hilpda Rgcc Vegfa	cellular response to hypoxia
Hif1a Thbs1 Vegfa	positive regulation of blood vessel endothelial cell migration
Fos Skil Ccl2 Itgb5 Jun	transforming growth factor beta receptor signaling pathway
Cd14 Ccl2 Ccr5 Havcr2 Mif Thbs1	positive regulation of tumor necrosis factor production
Adam8 Mif Thbs1 Vegfa	positive regulation of MAP kinase activity
Ccl2 Ccr5 Cxcl16 Cxcl2 C3ar1 Ninj1	chemotaxis
Abcc1 Apoe Hmox1 Mmp14 Prdx6 Txnrd1	response to oxidative stress
Cdkn1a Jun Mif	positive regulation of fibroblast proliferation
Chd7 Hif1a Vegfa	blood vessel development
Abcc1 Aldoa Aif1 Cxcl16 C3ar1 Dab2 Hspa5 Mmp14 Thbs1 Vegfa	positive regulation of cell migration
C3ar1 Hmox1 Hif1a Ninj1 Thbs1 Vegfa	positive regulation of angiogenesis
Ccl2 Cxcl2 Spp1	neutrophil chemotaxis
Ccl2 Cxcl2 Hif1a	cellular response to interleukin-1
Adam8 Ccl2 Fmn13 Hmox1 Hif1a Jun Mmp14 Ninj1 Rbpj Vegfa	angiogenesis
Abcc1 Ccr5 Vegfa	cell chemotaxis
Clec4d Clec4n Cts1 Ccl2 Ccr5 Cxcl2 Fth1 Thbs1	inflammatory response
Clec4d Clec4n Cd14 Arg1 Gapdh Havcr2 Mif	immune system process

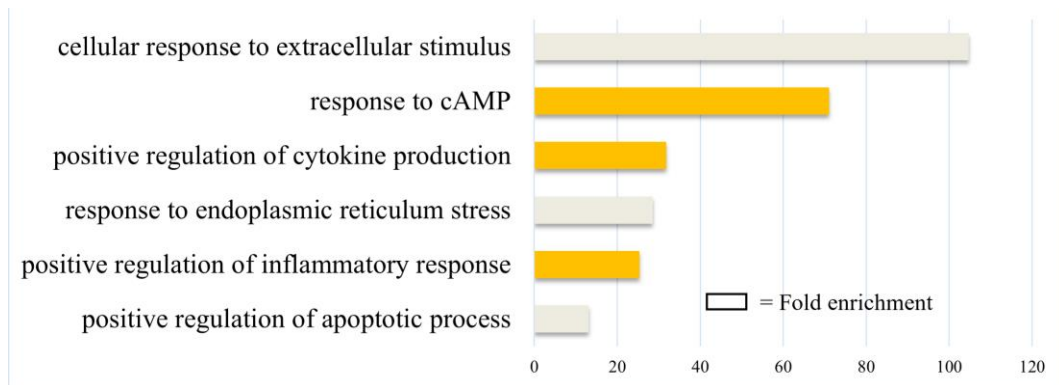


Abbildung 19: Auswahl der biologischen Prozesszuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Thrombusmonozyten aus Abb. 17.

In dieser Abbildung wird eine Auswahl der Zuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Thrombusmonozyten aus Abb. 17 zu biologischen Prozessen dargestellt.

Tabelle 6: Genliste Thrombusmonozyten zu Abb. 19

In dieser Tabelle sind die hoch exprimierten Gene der Thrombusmonozyten im Vergleich zu Knochenmarkmonozyten aufgelistet, welche für die Zuordnung zu den biologischen Prozessen aus Abb. 19 verwendet wurden.

Dusp1 Ldha Ppp1r15a Tgm2	positive regulation of apoptotic process
Cebpb Tgm2	positive regulation of inflammatory response
Cebpb Ppp1r15a	response to endoplasmic reticulum stress
Cd14 Hlplda	positive regulation of cytokine production
Fos Dusp1 Ldha	response to cAMP
Fos Ldha	cellular response to extracellular stimulus

In den Abbildungen 18 und 19 stellen sich Thrombusmonozyten in ihren inflammatorischen und immunologischen Reaktionen ähnlich dar, wie Thrombusneutrophile. Es ist ein geringerer, aber vorhandener Teil an regulierten angiogenen und hypoxiebedingten Signalwegen vorzufinden. Die Tabellen 5 und 6 zeigen eine etwas andere Genannotation als Thrombusneutrophile. Es sind Gene vorzufinden welche bereits in Neutrophilen annotiert wurden und hier in Monozyten in einer höheren Anzahl von Prozessen beteiligt sind (beispielsweise TGM2, MIF, JUN).

2. Anwendung ausgewählter antiinflammatorischer Ansätze zur Thromboseprävention im Mausmodell

Aus der vorangegangenen Analyse der hochregulierten Gene ergaben sich bereits mögliche antiinflammatorische Ansatzpunkte zur Thrombosetherapie. Es wurden hochregulierte Gene in Thrombusmonozyten und Thrombusneutrophilen in Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen betrachtet. Die Beeinflussung beteiligter, hoch regulierter Gene, könnte eine Wirkung auf die Thrombose haben. In dieser Arbeit wurden jeweilige Proteine als Genprodukte inhibiert. Die Hochregulation des Gens und die Beteiligung in der Analyse von sowohl Thrombusneutrophilen, als auch Thrombusmonozyten, wurde als erste Eigenschaft zugrunde gelegt. So wurde sich eine effektive Wirkung erhofft, da es beide Hauptzelltypen des Thrombus beeinflusst. Es wurden zwei unterschiedliche Ansatzpunkte ausgewählt. Zum einen SPP1, welches in Thrombusneutrophilen und Thrombusmonozyten ausschließlich in neutrophiler Chemotaxis beteiligt ist und sonst in keinem anderen Prozess (Tab. 1, 2, 5). SPP1, beziehungsweise seinem Protein Osteopontin, wurde deshalb eine ausschlaggebende Wirkung in der neutrophilen Chemotaxis und somit eine Auswirkung auf die Thrombose bei Inhibition beigemessen. Als zweiter Ansatzpunkt wurde TGM2 (Transglutaminase-2) ausgewählt. Es war im Gegensatz zu SPP1 an wesentlich mehr Prozessen beteiligt (Tab. 1, 2, 5, 6). Deshalb wurde erwartet, dass die Inhibition von Transglutaminase-2 eine deutliche Wirkung in dem hier verwendeten Thrombosemodell zeigt. Die Inzidenzen in den Gruppen und die Unterschiede im Thrombusgewicht wurden als Parameter der Auswirkung des Inhibitors in dieser Methode betrachtet.

2.1. Mesalazin

Osteopontin wurde in dem in III. 2. beschriebenen Mausmodell der TVT inhibiert. Hierfür wurde der in III. 5.2.1. beschriebene Osteopontin-Inhibitor Mesalazin verwendet.

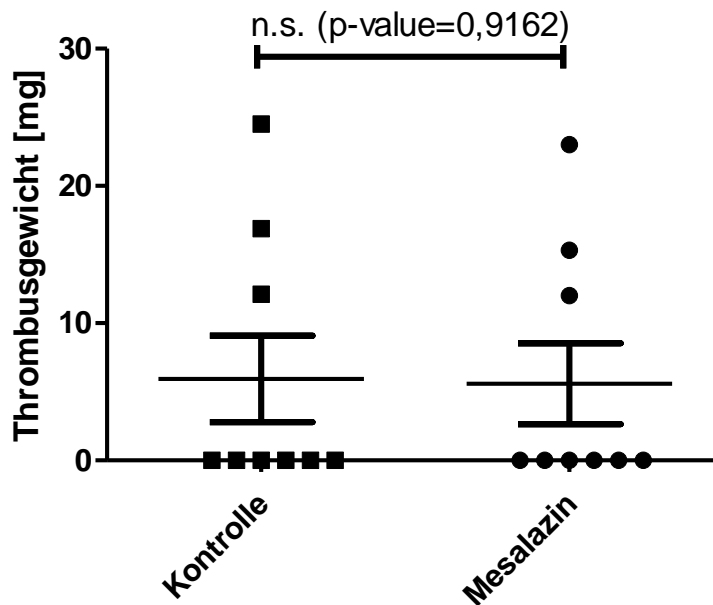


Abbildung 20: Thrombusgewichte der TVT-Gruppe unter Mesalazinbehandlung

Die Kontrollgruppe (n=10) und die Mesalazingruppe (n=10) zeigten eine identische Inzidenz von 30%. Die statistische Auswertung der Thrombusgewichte der jeweiligen Gruppen ergab einen P-Wert (p-value) von 0,9162.

Die Behandlung mit Mesalazin ergab keine signifikanten Veränderungen des Thrombusgewichtes. Es zeigen sich nahezu identische Gewichte und eine identische Verteilung. Auch die Inzidenz ist identisch (30 %), somit besteht kein Einfluss von Mesalazin auf die TVT.

2.2. Tgm2-Inhibitor

Transglutaminase-2 wurde in dem in III. 2. beschriebenen Mausmodell der TVT inhibiert. Hierfür wurde der in III. 5.2.2. beschriebene Transglutaminase 2 Inhibitor II ERW1041E verwendet.

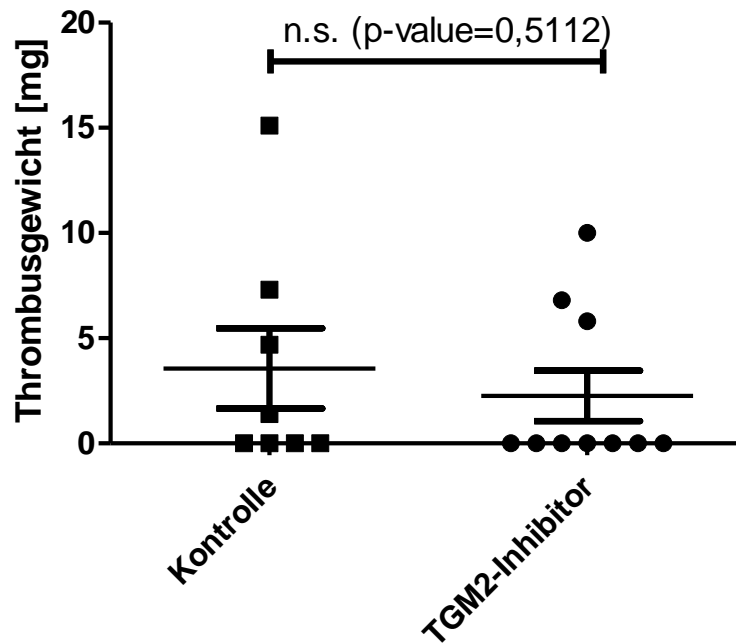


Abbildung 21: Thrombusgewichte der TVT-Gruppe unter TGM2-Inhibitorbehandlung

Die Kontrollgruppe (n=9) zeigte eine Inzidenz von 44,4%, die Inhibitorgruppe (n=10) eine Inzidenz von 30%. Der Vergleich der Thrombusgewichte der jeweiligen Gruppen p-Wert (p-value) von 0,5112.

Die Behandlung mit Tgm2-Inhibitor ergab keine signifikanten Veränderungen des Thrombusgewichtes. Eine Veränderung von 44,4 % zu 30 % in dieser Versuchsgruppe ist nicht ausreichend, um von einer ausschlaggebenden Wirkung des TGM2-Inhibitors zu sprechen.

VI. DISKUSSION

Um die thrombose-induzierten inflammatorischen Signaturen in Neutrophilen und Monozyten darzustellen, wurde mit Thrombus-, Blut- und Knochenmarkzellen von thrombosierte und nicht-thrombosierte Mäusen eine Einzelzell-RNA-Analyse durchgeführt. Hiermit soll eine Einsicht in die Regulierung thrombose-induzierter biologischer Prozesse, in Zusammenhang mit den betroffenen Genen, geschaffen werden. In dieser Arbeit konnte eine zu analysierende genetische Datenbank der thrombose-induzierten Reaktionen im Thrombus selbst, sowie in Blut und Knochenmarkzellen erstellt werden. Es liegt nun ein sehr großer Umfang an Datensätzen der Einzelzell-RNA-Analyse vor. Neutrophile und Monozyten haben im Vergleich zu anderen Immunzellarten, große Beteiligung am Thrombus und der Thrombosierung. Deshalb liegt der Fokus in dieser Arbeit auf den regulierten Prozessen in Neutrophilen und Monozyten des Thrombus. Aufgrund der interessanten Zusammensetzung aus ausschließlich Knochenmarkneutrophilen, wurden zusätzlich die regulierten Prozesse der neutrophilen Knochenmarkreserve bei Thrombose betrachtet.

1. Thrombose-induzierte Prozesse in Neutrophilen und Monozyten des Thrombus als Grundlage für antiinflammatorische Thrombosederapieansätze

In vergleichender Betrachtungsweise der Abbildungen 1, 3 und 4 ist erkennbar, dass die Zellcluster unterschiedlich aus den Herkunftsgeweben zusammengesetzt sind. Es besteht eine deutliche Heterogenität zwischen den Zelltypen und -clustern, abhängig von der Herkunft und der Thrombosierung. Hier wird noch einmal bestätigt, dass Neutrophile und Monozyten die vorherrschenden Immunzelltypen im Thrombus stellen [4].

Die Zuordnung der hoch exprimierten Gene zu biologischen Prozessen liefert einen Einblick in Zusammenhänge und die diverse Wirkung einzelner Gene in verschiedenen Bereichen. Die hoch exprimierten Gene der Thrombusneutrophilen im „neutrophilen Thrombuscluster“ (Cluster 3 Abb.1) wurden mit den hoch exprimierten Genen der, in der Analyse phänotypisch demselben Cluster zugeordneten, Neutrophilen aus Knochenmark und Blut thrombosierter Mäuse verglichen.

In den Thrombusneutrophilen äußert sich die allgemeine Immun- und Inflamationsreaktion der Thrombose in verschiedensten Signalwegen (Abb. 7-9) und macht, wie erwartet, einen großen Teil der biologischen Prozesse aus, welche den hoch exprimierten Genen zugeordnet werden konnten. Zudem kann eine große Gruppe der Prozesse der Reaktion auf Hypoxie im Thrombus zugeordnet werden. Hypoxie korreliert wiederum mit verstärkter Angiogenese [190], welche in den Prozesszuordnungen ebenfalls stark vertreten ist. Diese verstärkte Angiogenese [191] und kontroverse einzelne biologische Prozesse wie *negative regulation of plasminogen activation*, *negative regulation of fibroblast proliferation* und *positive regulation of fibroblast proliferation* deuten darauf hin, dass sowohl, wie erwartet pro-thrombotische, aber auch bereits antithrombotische und thrombolytische Signalwege in den Thrombusneutrophilen aktiviert wurden.

Die hoch exprimierten Gene der Thrombusmonozyten im monozytären Subcluster 1 wurden mit den hoch exprimierten Genen der, in der Analyse phänotypisch demselben Cluster zugeordneten, Monozyten aus Knochenmark und Blut thrombosierter Mäuse verglichen. Die Lokalisation der Thrombusmonozyten im Ly6C⁻-Bereich lässt darauf schließen, dass Monozyten, welche im Thrombus

lokalisiert oder an der Thrombusbildung oder -auflösung beteiligt sind, in die Gruppe der nicht-klassischen Monozyten einzuordnen sind. Es wurde vor Versuchsbeginn davon ausgegangen, dass in dieser frühen Phase der Thrombusbildung klassische Monozyten, durch ihre inflammatorischen und zytokinetisch aktiven Eigenschaften, einen größeren Einfluss auf die Thrombose besitzen als nicht-klassische Monozyten [113]. Hier stellen sich Thrombusmonozyten als nicht-klassische Monozyten dar. Es sind deshalb vermutlich weniger pro-inflammatorische Signalwege zugeordnet, als das in klassischen Monozyten der Fall gewesen wäre. Dies ändert jedoch nichts an der Verwendungsmöglichkeit der hier generierten Daten und deren Analyse, um zu einer potentiellen Therapiemöglichkeit zu gelangen. Auch nicht-klassische Monozyten stellen mit regulierten Genen einen Angriffspunkt für eine antiinflammatorische Thrombotherapie dar.

Die in der Zuordnung aufgezeigten biologischen Prozesse in den Thrombusmonozyten zeigen, ähnlich wie in Thrombusneutrophilen, Inflammations- und Immunreaktionen, Angiogenesesignale und Reaktionen auf Hypoxie. Bei der Durchsicht der annotierten Signalwege stellt sich die Reaktion auf Thrombose, ähnlich wie in Thrombusneutrophilen, sowohl als pro-thrombotisch als auch bereits als thrombolytisch dar.

Zusätzlich sind allgemein beteiligte Gene/Prozesse, beispielsweise zur verstärkten Phosphorylierung in Thrombusneutrophilen, in beiden Zelltypen als essentieller Bestandteil verschiedenster immunologischer und inflammatorischer Prozessregulierungen, wie erwartet, verstärkt exprimiert [192].

Die als Kontrolle betrachteten Blut- und Knochenmarkneutrophilen des neutrophilen Thrombuscluster zeigen ein ähnliches Bild an Prozessen wie Thrombusneutrophile. Es sind ähnliche Signalwege annotiert, jedoch wie erwartet aufgrund anderer Genzuordnungen als in Thrombusneutrophilen. Diese Gene sind in Thrombusneutrophilen gering oder nicht exprimiert und somit herunter reguliert. Es wäre eine weitere Möglichkeit diese Signale zu analysieren und zu testen, ob die Aktivierung dieser Gene einen anderen Effekt bezüglich antiinflammatorischer Therapiemöglichkeiten zeigt, als die in dieser Arbeit fokussierte Inhibition stark exprimierter Gene oder Genprodukten in Thrombusneutrophilen.

In der vergleichenden Betrachtung der an den biologischen Prozessen beteiligten Gene fällt auf, welche übergreifend an Prozessen, neben der direkten inflammatorischen Regulation beteiligt sind. Zusätzlich sind einige Gene sowohl in Thrombusneutrophilen als auch in Thrombusmonozyten in gleichen Prozessen beteiligt. TGM2 ist beispielsweise in Thrombusneutrophilen und zugleich in Thrombusmonozyten sowohl in eindeutig inflammatorischen Prozessen als auch in angiogenetischen Prozessen beteiligt. Einige Gene werden spezifisch in einem Signalwegbereich exprimiert. SPP1 ist in Thrombusneutrophilen, als auch in Thrombusmonozyten, ausschließlich in neutrophiler Chemotaxis beteiligt und in keinem anderen Prozess zu finden. Beide Möglichkeiten der Beteiligung stellen eine Basis für potentielle therapeutische antiinflammatorische Ansatzpunkte dar, vor allem wenn sie in Thrombusneutrophilen und -monozyten gleichermaßen auftreten.

Entgegen gängiger Literatur (siehe 4.3.1.1.) konnte hier keine breite Beteiligung von SPP1 bzw. von dem codierten Protein Osteopontin, an biologischen Prozessen bestätigt werden. Dies weist darauf hin, dass SPP1 spezifisch wirksam für die Rekrutierung von Neutrophilen zum Ort der Thrombose sein könnte. Das Ergebnis der hier im Mausmodell durchgeführten Osteopontin-Inhibition belegt jedoch, dass Osteopontin offensichtlich nicht ausreichend für die Rekrutierung und somit bei Inhibition nicht ausreichend für eine Reduktion der Inzidenzen oder Thrombusgewichte verantwortlich ist.

Das zweite ausgewählte Gen TGM2, bzw. das entsprechende Protein Transglutaminase-2, weist als multifunktionelles Protein ebenfalls eine breite Wirkung in Zellen auf [164]. In diesen Ergebnissen ist es sowohl an inflammatorischen, apoptotischen und angiogenetischen Prozessen beteiligt. Ein antiinflammatorischer Therapieansatz mit breiter Wirkung auf die Thrombose wäre denkbar gewesen, wurde jedoch durch die hier im Mausmodell durchgeführte Transglutaminase 2-Inhibition widerlegt.

Bei Durchsicht der hier vorgelegten Ergebnisse könnten noch weitere vielversprechende potentielle Inhibitionsandidaten für eine antiinflammatorische Thrombose-therapie erfasst werden. Allerdings muss zur Auswahl der aktuellen Stand der Wissenschaft bezüglich der Proteine, sowie pharmakologische Wirkung und Verfügbarkeit passender Inhibitoren, welche in diesem Modell anwendbar sind, mit einbezogen werden. Auf Basis der Ergebnisse der Inhibitions-Gruppen sollte

jedoch in Betracht gezogen werden, mit breiter aufgestellter Inhibition zu arbeiten. Eventuell ist es nicht ausreichend ein einzelnes Gen bzw. sein Proteinprodukt zu inhibieren, um eine wirksame Thrombose-therapie zu entwickeln. Mit der Durchsicht der Prozesszuordnungen und weiterer Analyse der Datensätze, wäre es auch möglich ganze Signalwege und Muster herauszufiltern, welche potentiell Einfluss auf die Thrombose nehmen. Durch Manipulation dieser Signalwege oder Muster, könnte eventuell ein stärkerer Einfluss auf die Thrombose erwirkt werden.

Das hier verwendete Mausmodell der tiefen Venenthrombose ist darauf ausgelegt, nur eine ausreichend starke Wirkung zur potentiellen Thrombose-therapie anzuzeigen. Es ist möglich, dass die Therapie durchaus auf kleineren Ebenen, in den Zellen selbst, in der Gefäßwand, im Aufbau des Thrombus oder ähnlichen beteiligten Faktoren, einen Effekt hat, allerdings kann dies im verwendeten Modell nicht nachgewiesen werden. Das gewählte Modell besitzt variable Eigenschaften, der Thrombus entwickelt sich unter Blutfluss und somit ist die Vergleichbarkeit zur humanen Venenthrombose sehr hoch [179]. Deshalb wurde dieses Modell für die Gewinnung der Proben zur Einzelzell-RNA-Sequenzierung und die Tests potentieller antiinflammatorischer Therapieansätze gewählt. Für die weiteren ersten Tests potentieller antiinflammatorischer Thrombose-therapiekandidaten, könnten der Gefäßwandaufbau und der eventuell veränderte Aufbau des Thrombus histologisch untersucht werden, um erste Anzeichen einer Wirkung besser zu erkennen. Diese Wirkung könnte dann so genauer untersucht und eventuell anderweitig verstärkt werden.

Zusätzlich muss beachtet werden, dass hier nur eine Transkriptomanalyse vorgenommen wurde. Allerdings entspricht dies nicht dem Proteom, da Proteine auch der post-transkriptionalen Regulation unterliegen. Daher könnte eine zusätzliche Proteomanalyse oder sogar eine Multiomics-Analyse das vollständigste Bild und neue Therapieansätze zeigen [193]. Selbst hier würden diese Mausdaten jedoch an ihre Grenzen stoßen. Die Mehrzahl der Gene von Immunzellen besitzt zwar eine konservierte Expression im Vergleich zwischen Mensch und Maus, jedoch treten auch hier Ausnahmen auf, welche in weiteren Analysen und Therapieansätzen berücksichtigt werden müssen [194]. Die Vergleichbarkeit zur humanen Thrombose und im späteren Verlauf die Vergleichbarkeit der Wirkung von Therapeutika in Menschen, bleibt zu testen.

2. Hinweise auf antiinflammatorische Therapieansätze in der neutrophilen Knochenmarkreserve

Es zeigt sich ein Neutrophilencluster (Cluster 5 Abb. 1) welches auf Basis der Analyse der Einzelzell-RNA-Daten nahezu ausschließlich von Knochenmarkzellen gestellt wird. Hier ist die Neutrophilenreserve des Knochenmarks abgebildet. *Cxcr4* ist für die Retention der Neutrophilen im Knochenmark verantwortlich [195]. Es ist in den Daten des Volcano-Plot (Abb. 7) in Knochenmarkneutrophilen aus Mäusen mit Thrombose, im Vergleich zu ohne, geringer exprimiert. Neutrophile werden bei Inflammation verstärkt aus dem Knochenmark mobilisiert [195]. Hier führt die Thrombosierung, vermutlich durch die damit einhergehende Thromboinflammation, zu einem erhöhten Austrittssignal für Neutrophile aus dem Knochenmark.

Die Betrachtung der funktionellen Zuordnung der biologischen Prozesse anhand der regulierten Gene zeigt im Knochenmark eine Hochregulierung von Translationsprozessen, die verstärkte Immunantwort und eine Reaktion auf einen erhöhten Bedarf an Energie.

Die gesteigerte Genexpression kann als Reaktion auf die thrombose-induzierte systemische Entzündungsreaktion gesehen werden [196]. Es zeigt sich die allgemeine verstärkte Immunreaktion auf den thrombotischen Prozess. Die Annotation des Prozesses *response to Interleukin-4* ist insofern interessant, da IL-4 ein paradoxes Interleukin ist und antiinflammatorische Effekte haben kann [197]. Die Annotation der biologischen Prozesse zur Energiegewinnung spiegelt die Reaktion auf ein Energiedefizit oder den erhöhten Bedarf an Energie wieder. Mitochondrieller Elektronen Transport ist Teil der mitochondrialen ATP-Synthese, welche wiederum mit oxidativer Phosphorylierung gekoppelt ist. Oxidative Phosphorylierung ist ein Teil der aeroben Respiration, eine Form der zellulären Respiration, bei der Zellen durch Oxidation organischer Verbindungen Energie generieren [181]. Der Prozess *mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport* hat neben dem Zusammenhang zur oxidativen Phosphorylierung zusätzlich eine direkt positiv regulierende Wirkung auf das Mitochondrium [196]. Dies zeigt, dass die thrombose-induzierte systemische Reaktion mit einem Energiedefizit im Vergleich zu nicht-thrombosierten Zuständen einhergeht. Ob das Energiedefizit in einer Form Ursache oder Auswirkung der Thrombose darstellt,

kann hier nicht geklärt werden. Selbstverständlich benötigen vermehrt ablaufende Immunprozesse an sich bereits mehr Energie [198].

Eventuell stellen diese grundlegenden Abläufe im Knochenmark bereits eine Möglichkeit zur antiinflammatorischen Ansätzen der Thrombose-therapie auf Ebene der Knochenmarkneutrophilen, unabhängig der Thrombusneutrophilen, dar. Dies ist hier nicht abschließend beantwortbar. Für tiefere Analysen der Sequenzierungsdaten müsste die Knochenmark-Einzelzell-RNA-Sequenzierung aus nicht-thrombosierten Mäusen wiederholt werden, da in den Proben im Vergleich zu Knochenmark thrombosierter Mäuse, eine geringere Zellzahl zur Sequenzierung zur Verfügung stand.

3. Ausblick

Die vorhandene Rolle inflammatorischer und damit zusammenhängenden Abläufen, in an der Thrombose beteiligten Immunzellen wurde hier auf Transkriptombasis dargestellt. Mit den hier vorgelegten Ergebnissen lassen sich bereits mögliche ausschlaggebende Faktoren der Immunzellen in der Thrombose identifizieren. Eine tiefergehende bioinformatische Analyse der Datensätze wird weitere, breiter wirksame Ansatzpunkte zu Tage fördern. Die Analyse der generierten Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten bietet ein breites Feld an Möglichkeiten. Die erneute Einzelzell-RNA-Sequenzierung von Knochenmarkzellen nicht thrombosierter Mäuse muss hierfür vorgenommen werden, außerdem wird das angewandte Mausmodell für erste Tests antiinflammatorischer Kandidaten neu bewertet werden müssen. Wie bereits beschrieben wurde mit dieser Arbeit zwar eine noch weiter zu analysierende genetische Datenbank für alle Belange der thrombose-induzierten Reaktionen in Thrombus, Blut und Knochenmarkzellen geschaffen. Ein Pool an eventuell noch nicht festgestellten Zusammenhängen und biologischen Prozessen, welche die Thrombose-therapie nicht nur in antiinflammatorischer Sichtweise vorantreiben könnte. Trotzdem würde eine breiter aufgestellte Multiomics-Analyse ein umfassenderes Bild liefern. Zusätzlich muss im weiteren Verlauf der Therapieentwicklung die Vergleichbarkeit zu menschlicher Thrombose-therapie gewährleistet werden. Hierfür müssen humane Transkriptomdaten zu Rate gezogen werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Thrombose-induzierte inflammatorische Signaturen in Neutrophilen und Monozyten

In der hier vorliegenden Arbeit wurden mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung thrombose-induzierte inflammatorische Abläufe in Thrombusneutrophilen und -monozyten, sowie in der neutrophilen Knochenmarkreserve, dargestellt. Die gewonnenen Ergebnisse wurden zur Auswahl potentiell antiinflammatorischer Thrombosetherapie verwendet. Hierfür wurden Wildtypmäuse einer Operation zur tiefen Venenthrombose unterzogen. Nach dem Eingriff wurden diesen Mäusen Thrombus-, Knochenmark- und Blutzellen entnommen und der Einzelzell-RNA-Sequenzierung unterzogen. Mit der Analyse dieser Sequenzierungsdaten wurden inflammatorische und damit zusammenhängende Prozesse und hierfür regulierte Gene identifiziert.

Der Fokus lag auf Thrombusneutrophilen und Thrombusmonozyten welche ähnliche inflammatorische, hypoxische und angiogenetische Prozesse, jedoch leicht unterschiedliche Genzuordnungen aufwiesen. Sie zeigten sich sowohl pro-inflammatorisch und pro-thrombotisch, zusätzlich breits pro-angiogenetisch und somit thrombolytisch.

In der neutrophilen Knochenmarkreserve zeigt sich auf Transkriptombasis eine verstärkte Immunantwort und Translationsprozesse, ein erhöhter Energiebedarf und die verstärkte Mobilisierung von Neutrophilen als Reaktion auf die Thrombose. Diese Reaktionen könnten einen Ansatzpunkt zur Thrombosetherapie auf Knochenmarkebene darstellen, welcher jedoch durch eingehendere Analysen zielgerichteter definiert werden muss.

Die gewonnenen Erkenntnisse zu inflammatorischen Abläufen und den einzelnen beteiligten Genregulationen in Thrombusneutrophilen- und monozyten, führten zur Auswahl von zwei potentiellen antiinflammatorischen Therapieansätzen. Das Transglutaminase-2- und das Osteopontingen waren in Thrombusneutrophilen und Thrombusmonozyten stark exprimiert. Sie wurden im Mausmodell der tiefen Venenthrombose, welches bereits zur Generierung der Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten verwendet wurde, inhibiert. Es zeigte sich keine Veränderung in den Parametern der Thrombose. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die

Inhibition eines einzelnen Gens keinen ausreichenden Effekt in diesem Mausmodell besitzt, um als effektive antiinflammatorische Thrombotherapie oder -prävention einsetzbar zu sein.

Die nun vorliegende Datenbank besitzt ein hohes Potential zur Identifikation neuer inflammatorischer Zusammenhänge und Abläufe bei Thrombose und damit zusammenhängenden neuen therapeutischen Ansätzen. Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen inflammatorische, hypoxische und angiogenetische Abläufe in Immunzellen auf Transkriptombasis. Zusätzlich zeigen sie, dass voraussichtlich breitere Therapieansätze notwendig sind, als hier angewandt, um den gewünschten antiinflammatorischen therapeutischen Effekt auf die Thrombose zu erzielen.

VIII. SUMMARY

Thrombosis-induced inflammatory signatures in neutrophils and monocytes

In the work presented here, thrombosis-induced inflammatory processes in thrombus neutrophils and monocytes, as well as in the neutrophilic bone marrow reserve, were shown using single-cell-RNA-sequencing. The results obtained were used to select potential antiinflammatory thrombosis therapy targets. For this purpose, wild-type mice underwent surgery to simulate deep vein thrombosis. After the procedure, thrombus, bone marrow and blood cells were removed from these mice and subjected to single-cell-RNA-sequencing. By analyzing this sequencing data, inflammatory and related processes and the according regulated genes were identified.

The focus was on thrombus neutrophils and thrombus monocytes which showed similar inflammatory, hypoxic and angiogenic processes but slightly different gene assignments. They were both pro-inflammatory and pro-thrombotic, in addition to being pro-angiogenic and thus thrombolytic. In the neutrophilic bone marrow-reserve shows transcriptome-based enhanced immune response and translational processes, increased energy requirements, and increased neutrophil mobilization in response to thrombosis. These reactions could represent a starting point for thrombosis therapy at the bone marrow level, which however, must be defined in a more targeted manner through more detailed analyses.

The knowledge gained on inflammatory processes and the individually involved gene regulations in thrombus neutrophils and thrombus monocytes was used to select two potential antiinflammatory therapy approaches. The Transglutaminase-2- and the Osteopontingene were highly expressed in thrombus neutrophils and thrombus monocytes. They were inhibited in the mouse model of deep vein thrombosis, previously used to generate the single-cell RNA sequencing data. There was no change in the parameters of thrombosis. The results indicate that inhibition of a single gene does not have a sufficient effect in this mouse model to be used as an effective antiinflammatory thrombosis therapy or prevention.

The database now available has a high potential for identifying new inflammatory connections and processes in thrombosis and new therapeutic approaches related to it. The knowledge gained shows inflammatory, hypoxic and angiogenic processes

in immune cells on the basis of transcriptomes. Additionally it suggests that broader therapeutic approaches than those used here are likely to be necessary in order to achieve the desired antiinflammatory therapeutic effect on thrombosis.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. WorldHealthOrganization. *Cardiovascular diseases (CVDs)*. 11.06.2021 31.08.2022]; Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
2. Benjamin, E.J., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association*. *Circulation*, 2019. **139**(10).
3. Rabinovich, A. and S.R. Kahn, *The postthrombotic syndrome: current evidence and future challenges*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2017. **15**(2): p. 230-241.
4. Von Brühl, M.-L., et al., *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*. *Journal of Experimental Medicine*, 2012. **209**(4): p. 819-835.
5. *Method of the Year 2013*. *Nature Methods*, 2014. **11**(1): p. 1-1.
6. Eberwine, J., et al., *The promise of single-cell sequencing*. *Nature Methods*, 2014. **11**(1): p. 25-27.
7. Jovic, D., et al., *Single-cell RNA sequencing technologies and applications: A brief overview*. *Clinical and Translational Medicine*, 2022. **12**(3).
8. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. *Nature Reviews Immunology*, 2013. **13**(1): p. 34-45.
9. Schulz, C., B. Engelmann, and S. Massberg, *Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2013. **11**: p. 233-241.

10. Chung, I. and G.Y.H. Lip, *Virchow's Triad Revisited: Blood Constituents*. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 2003. **33**(5-6): p. 449-454.
11. Kraaijenhagen, R.A., et al., *Travel and risk of venous thrombosis*. *Lancet*, 2000. **356**(9240): p. 1492-3.
12. Anderson, F.A. and F.A. Spencer, *Risk Factors for Venous Thromboembolism*. *Circulation*, 2003. **107**(23_suppl_1): p. 9I--16.
13. Braithwaite, I., et al., *Lower limb immobilisation and venous thromboembolism risk: combined case-control studies*. *Postgrad Med J*, 2017. **93**(1100): p. 354-359.
14. Kuipers, S., et al., *Travel and venous thrombosis: a systematic review*. *Journal of Internal Medicine*, 2007. **262**(6): p. 615-634.
15. Karasu, A., et al., *Aging of the venous valves as a new risk factor for venous thrombosis in the elderly: the BATAVIA study*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2018. **16**(1): p. 96-103.
16. Mahajan, A., et al., *The Epidemiology of Cancer-Associated Venous Thromboembolism: An Update*. *Semin Thromb Hemost*, 2019. **45**(4): p. 321-325.
17. Franco, A.T., A. Corken, and J. Ware, *Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer*. *Blood*, 2015. **126**(5): p. 582-588.
18. Hisada, Y. and N. Mackman, *Tissue Factor and Cancer: Regulation, Tumor Growth, and Metastasis*. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2019. **45**(04): p. 385-395.
19. Tormoen, G.W., et al., *Do circulating tumor cells play a role in coagulation and thrombosis?* *Front Oncol*, 2012. **2**: p. 115.

20. Kasthuri, R.S., M.B. Taubman, and N. Mackman, *Role of Tissue Factor in Cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2009. **27**(29): p. 4834-4838.
21. Klingemann, H.-G., et al., *Protein C Mangel — Risikofaktor für venöse Thrombosen*. *Klinische Wochenschrift*, 1984. **62**(20): p. 975-978.
22. Makris, M., et al., *Genetic analysis, phenotypic diagnosis, and risk of venous thrombosis in families with inherited deficiencies of protein S*. *Blood*, 2000. **95**(6): p. 1935-41.
23. van Boven, H.H. and D.A. Lane, *Antithrombin and its inherited deficiency states*. *Semin Hematol*, 1997. **34**(3): p. 188-204.
24. Bernardi, F., et al., *A Factor V Genetic Component Differing From Factor V R506Q Contributes to the Activated Protein C Resistance Phenotype*. *Blood*, 1997. **90**(4): p. 1552-1557.
25. Nicolaes, G.A. and B. Dahlback, *Activated protein C resistance (FV(Leiden)) and thrombosis: factor V mutations causing hypercoagulable states*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2003. **17**(1): p. 37-61, vi.
26. Kapur, R.K., et al., *A Prothrombin Gene Mutation Is Significantly Associated With Venous Thrombosis*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1997. **17**(11): p. 2875-2879.
27. Eldibany, M.M. and J.A. Caprini, *Hyperhomocysteinemia and Thrombosis: An Overview*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2007. **131**(6): p. 872-884.
28. Jenkins, P.V., et al., *Elevated factor VIII levels and risk of venous thrombosis*. *British Journal of Haematology*, 2012. **157**(6): p. 653-663.

29. Koster, T., et al., *Factor VII and fibrinogen levels as risk factors for venous thrombosis. A case-control study of plasma levels and DNA polymorphisms--the Leiden Thrombophilia Study (LETS)*. *Thromb Haemost*, 1994. **71**(6): p. 719-22.
30. Meijers, J.C.M., et al., *High Levels of Coagulation Factor XI as a Risk Factor for Venous Thrombosis*. *New England Journal of Medicine*, 2000. **342**(10): p. 696-701.
31. Sakariassen, K.S., P.A. Bolhuis, and J.J. Sixma, *Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII--Von Willebrand factor bound to the subendothelium*. *Nature*, 1979. **279**(5714): p. 636-638.
32. Andrews, R.K. and M.C. Berndt, *Platelet physiology and thrombosis*. *Thromb Res*, 2004. **114**(5-6): p. 447-53.
33. Insull, W., Jr., *The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment*. *Am J Med*, 2009. **122**(1 Suppl): p. S3-S14.
34. White, R.H., *The epidemiology of venous thromboembolism*. *Circulation*, 2003. **107**(23 Suppl 1): p. I4-8.
35. Cushman, M., et al., *Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in two cohorts: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology*. *Am J Med*, 2004. **117**(1): p. 19-25.
36. Di Nisio, M., N. van Es, and H.R. Buller, *Deep vein thrombosis and pulmonary embolism*. *Lancet*, 2016. **388**(10063): p. 3060-3073.
37. Kearon, C., *Natural History of Venous Thromboembolism*. *Circulation*, 2003. **107**(23_suppl_1): p. 22I--30.
38. Morris, T.A., *Natural history of venous thromboembolism*. *Crit Care Clin*, 2011. **27**(4): p. 869-84, vi.

39. Spencer, F.A., *Patient Outcomes After Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism*_{title>*The Worcester Venous Thromboembolism Study*}. Archives of Internal Medicine, 2008. **168**(4): p. 425.
40. Bauersachs, R.M., *Clinical presentation of deep vein thrombosis and pulmonary embolism*. Best Practice & Research Clinical Haematology, 2012. **25**(3): p. 243-251.
41. Stein, P.D., et al., *Silent pulmonary embolism in patients with deep venous thrombosis: a systematic review*. Am J Med, 2010. **123**(5): p. 426-31.
42. Kahn, S.R., et al., *The Postthrombotic Syndrome: Evidence-Based Prevention, Diagnosis, and Treatment Strategies*. Circulation, 2014. **130**(18): p. 1636-1661.
43. Vedantham, S., *Valvular dysfunction and venous obstruction in the post-thrombotic syndrome*. Thromb Res, 2009. **123 Suppl 4**: p. S62-5.
44. Deatrick, K.B., et al., *Postthrombotic vein wall remodeling: Preliminary observations*. Journal of Vascular Surgery, 2011. **53**(1): p. 139-146.
45. Rabinovich, A., et al., *Inflammation markers and their trajectories after deep vein thrombosis in relation to risk of post-thrombotic syndrome*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2015. **13**(3): p. 398-408.
46. Pikovsky, O. and A. Rabinovich, *Prevention and treatment of the post-thrombotic syndrome*. Thromb Res, 2018. **164**: p. 116-124.
47. Galanaud, J.-P., et al., *Predictors of Post-Thrombotic Ulcer after Acute DVT: The RIETE Registry*. Thrombosis and Haemostasis, 2018. **118**(02): p. 320-328.

-
48. Heit, J.A., et al., *Predictors of Recurrence After Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism*. Archives of Internal Medicine, 2000. **160**(6): p. 761.
49. Agnelli, G., et al., *Three Months versus One Year of Oral Anticoagulant Therapy for Idiopathic Deep Venous Thrombosis*. New England Journal of Medicine, 2001. **345**(3): p. 165-169.
50. Esmon, C.T., *The interactions between inflammation and coagulation*. British Journal of Haematology, 2005. **131**(4): p. 417-430.
51. Mackman, N., *Triggers, targets and treatments for thrombosis*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 914-918.
52. Branchford, B.R. and S.L. Carpenter, *The Role of Inflammation in Venous Thromboembolism*. Front Pediatr, 2018. **6**: p. 142.
53. Bucek, R.A., et al., *C-reactive protein in the diagnosis of deep vein thrombosis*. British Journal of Haematology, 2002. **119**(2): p. 385-389.
54. Magder, L.S. and M. Petri, *Incidence of and Risk Factors for Adverse Cardiovascular Events Among Patients With Systemic Lupus Erythematosus*. American Journal of Epidemiology, 2012. **176**(8): p. 708-719.
55. Clark, S.R., et al., *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nature Medicine, 2007. **13**(4): p. 463-469.
56. Massberg, S., et al., *Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases*. Nature Medicine, 2010. **16**(8): p. 887-896.
57. Schonrich, G. and M.J. Raftery, *Neutrophil Extracellular Traps Go Viral*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 366.

58. Loof, T.G., et al., *Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense*. *Blood*, 2011. **118**(9): p. 2589-2598.
59. Loof, T.G., et al., *Coagulation Systems of Invertebrates and Vertebrates and Their Roles in Innate Immunity: The Same Side of Two Coins?* *Journal of Innate Immunity*, 2011. **3**(1): p. 34-40.
60. Burzynski, L.C., et al., *The Coagulation and Immune Systems Are Directly Linked through the Activation of Interleukin-1 α by Thrombin*. *Immunity*, 2019. **50**(4): p. 1033-1042.e6.
61. Mackman, N., *New insights into the mechanisms of venous thrombosis*. *Journal of Clinical Investigation*, 2012. **122**(7): p. 2331-2336.
62. Jackson, S.P., R. Darbousset, and S.M. Schoenwaelder, *Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms*. *Blood*, 2019. **133**(9): p. 906-918.
63. Hamer, J.D., P.C. Malone, and I.A. Silver, *The PO₂ in venous valve pockets: its possible bearing on thrombogenesis*. *Br J Surg*, 1981. **68**(3): p. 166-70.
64. Gupta, N., Y.Y. Zhao, and C.E. Evans, *The stimulation of thrombosis by hypoxia*. *Thromb Res*, 2019. **181**: p. 77-83.
65. Brill, A., G.L. Suidan, and D.D. Wagner, *Hypoxia, such as encountered at high altitude, promotes deep vein thrombosis in mice*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2013. **11**(9): p. 1773-1775.
66. Steffel, J., et al., *Histamine Induces Tissue Factor Expression*. *Circulation*, 2005. **112**(3): p. 341-349.

67. Pircher, J., et al., *Prothrombotic effects of tumor necrosis factor alpha in vivo are amplified by the absence of TNF-alpha receptor subtype 1 and require TNF-alpha receptor subtype 2*. Arthritis Research & Therapy, 2012. **14**(5): p. R225.
68. Ponomaryov, T., et al., *Mast Cells Granular Contents Are Crucial for Deep Vein Thrombosis in Mice*. Circulation Research, 2017. **121**(8): p. 941-950.
69. Erent, M., et al., *Rate, extent and concentration dependence of histamine-evoked Weibel-Palade body exocytosis determined from individual fusion events in human endothelial cells*. The Journal of Physiology, 2007. **583**(1): p. 195-212.
70. Culmer, D.L., et al., *Circulating and vein wall P-selectin promote venous thrombogenesis during aging in a rodent model*. Thromb Res, 2013. **131**(1): p. 42-8.
71. Brill, A., et al., *von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models*. Blood, 2011. **117**(4): p. 1400-1407.
72. Yau, J.W., H. Teoh, and S. Verma, *Endothelial cell control of thrombosis*. BMC Cardiovascular Disorders, 2015. **15**(1).
73. Incalza, M.A., et al., *Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases*. Vascul Pharmacol, 2018. **100**: p. 1-19.
74. Gupta, N., et al., *Activation of NLRP3 inflammasome complex potentiates venous thrombosis in response to hypoxia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017. **114**(18): p. 4763-4768.
75. Zhong, W.J., et al., *Activation of NLRP3 inflammasome up-regulates TREM-1 expression in murine macrophages via HMGB1 and IL-18*. Int Immunopharmacol, 2020. **89**(Pt A): p. 107045.

76. Zhang, Y., et al., *Inflammasome activation promotes venous thrombosis through pyroptosis*. Blood Advances, 2021. **5**(12): p. 2619-2623.
77. Stark, K., et al., *Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice*. Blood, 2016. **128**(20): p. 2435-2449.
78. Bettoni, S., et al., *Interaction between Multimeric von Willebrand Factor and Complement: A Fresh Look to the Pathophysiology of Microvascular Thrombosis*. The Journal of Immunology, 2017. **199**(3): p. 1021-1040.
79. Nørgaard, I., S.F. Nielsen, and B.G. Nordestgaard, *Complement C3 and High Risk of Venous Thromboembolism: 80517 Individuals from the Copenhagen General Population Study*. Clinical Chemistry, 2016. **62**(3): p. 525-534.
80. Brill, A., et al., *Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2012. **10**(1): p. 136-144.
81. Diaz, J.A., et al., *Plasma DNA is elevated in patients with deep vein thrombosis*. Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders, 2013. **1**(4): p. 341-348.e1.
82. Van Montfoort, M.L., et al., *Circulating Nucleosomes and Neutrophil Activation as Risk Factors for Deep Vein Thrombosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2013. **33**(1): p. 147-151.
83. Sreeramkumar, V., et al., *Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation*. Science, 2014. **346**(6214): p. 1234-8.
84. Etulain, J., et al., *P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice*. Blood, 2015. **126**(2): p. 242-246.
85. Yago, T., et al., *Cooperative PSGL-1 and CXCR2 signaling in neutrophils promotes deep vein thrombosis in mice*. Blood, 2018. **132**(13): p. 1426-1437.

86. Dyer, M.R., et al., *Deep vein thrombosis in mice is regulated by platelet HMGB1 through release of neutrophil-extracellular traps and DNA*. Scientific Reports, 2018. **8**(1).
87. Amulic, B., et al., *Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease*. Annual Review of Immunology, 2012. **30**(1): p. 459-489.
88. Papayannopoulos, V., et al., *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps*. Journal of Cell Biology, 2010. **191**(3): p. 677-691.
89. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(36): p. 15880-5.
90. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
91. Ammollo, C.T., et al., *Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2011. **9**(9): p. 1795-1803.
92. Wang, H., et al., *Neutrophil extracellular traps can activate alternative complement pathways*. Clinical and Experimental Immunology, 2015. **181**(3): p. 518-527.
93. Fuchs, T.A., A.A. Bhandari, and D.D. Wagner, *Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice*. Blood, 2011. **118**(13): p. 3708-3714.
94. Silvestre-Roig, C., A. Hidalgo, and O. Soehnlein, *Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis*. Blood, 2016. **127**(18): p. 2173-2181.

-
95. Uhl, B., et al., *Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response*. *Blood*, 2016. **128**(19): p. 2327-2337.
96. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. *Nature*, 2002. **418**(6894): p. 191-195.
97. Langer, H.F. and A. Verschoor, *Crosstalk between platelets and the complement system in immune protection and disease*. *Thrombosis and Haemostasis*, 2013. **110**(11): p. 910-919.
98. Gaertner, F., et al., *Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria*. *Cell*, 2017. **171**(6): p. 1368-1382.e23.
99. Yipp, B.G., et al., *Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo*. *Nature Medicine*, 2012. **18**(9): p. 1386-1393.
100. Papayannopoulos, V. and A. Zychlinsky, *NETs: a new strategy for using old weapons*. *Trends Immunol*, 2009. **30**(11): p. 513-21.
101. Sonawane, A., et al., *Neutrophil Elastase, an Innate Immunity Effector Molecule, Represses Flagellin Transcription in Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 2006. **74**(12): p. 6682-6689.
102. Bogdan, C., M. Rollinghoff, and A. Diefenbach, *Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity*. *Curr Opin Immunol*, 2000. **12**(1): p. 64-76.
103. Scapini, P., et al., *The neutrophil as a cellular source of chemokines*. *Immunol Rev*, 2000. **177**: p. 195-203.
104. Mildner, A., G. Marinkovic, and S. Jung, *Murine Monocytes: Origins, Subsets, Fates, and Functions*. *Microbiol Spectr*, 2016. **4**(5).

105. Hettlinger, J., et al., *Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor*. *Nature Immunology*, 2013. **14**(8): p. 821-830.
106. Swirski, F.K., et al., *Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites*. *Science*, 2009. **325**(5940): p. 612-616.
107. Wong, K.L., et al., *Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets*. *Blood*, 2011. **118**(5): p. e16-e31.
108. Qu, C., et al., *Role of CCR8 and Other Chemokine Pathways in the Migration of Monocyte-derived Dendritic Cells to Lymph Nodes*. *Journal of Experimental Medicine*, 2004. **200**(10): p. 1231-1241.
109. Patel, A.A., et al., *The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation*. *Journal of Experimental Medicine*, 2017. **214**(7): p. 1913-1923.
110. Zhu, Y.P., G.D. Thomas, and C.C. Hedrick, *2014 Jeffrey M. Hoeg Award Lecture*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2016. **36**(9): p. 1722-1733.
111. Boyette, L.B., et al., *Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets*. *PLOS ONE*, 2017. **12**(4): p. e0176460.
112. Ingersoll, M.A., et al., *Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation*. *Trends in Immunology*, 2011. **32**(10): p. 470-477.
113. Kimball, A.S., et al., *Ly6C^{Lo} Monocyte/Macrophages are Essential for Thrombus Resolution in a Murine Model of Venous Thrombosis*. *Thrombosis and Haemostasis*, 2020. **120**(02): p. 289-299.

114. Laurance, S., et al., *Gas6 Promotes Inflammatory (CCR2hi CX3CR1 lo) Monocyte Recruitment in Venous Thrombosis*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2017. **37**(7): p. 1315-1322.
115. Vieira, L.M., et al., *Monocytes and plasma tissue factor levels in normal individuals and patients with deep venous thrombosis of the lower limbs: potential diagnostic tools?* *Thromb Res*, 2007. **119**(2): p. 157-65.
116. Subramaniam, S., et al., *Distinct contributions of complement factors to platelet activation and fibrin formation in venous thrombus development*. *Blood*, 2017. **129**(16): p. 2291-2302.
117. Granger, V., et al., *Human blood monocytes are able to form extracellular traps*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2017. **102**(3): p. 775-781.
118. Tsou, C.-L., et al., *Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites*. *Journal of Clinical Investigation*, 2007. **117**(4): p. 902-909.
119. Kratofil, R.M., P. Kubes, and J.F. Deniset, *Monocyte Conversion During Inflammation and Injury*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2017. **37**(1): p. 35-42.
120. Venereau, E., et al., *Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release*. *Journal of Experimental Medicine*, 2012. **209**(9): p. 1519-1528.
121. Levi, M., T. Van Der Poll, and H. Ten Cate, *Tissue Factor in Infection and Severe Inflammation*. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2006. **32**(01): p. 033-039.
122. Wei, Y., et al., *Pyroptosis-Induced Inflammation and Tissue Damage*. *J Mol Biol*, 2022. **434**(4): p. 167301.

123. Thaler, J., I. Pabinger, and C. Ay, *Anticoagulant Treatment of Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: The Present State of the Art*. Front Cardiovasc Med, 2015. **2**: p. 30.
124. Li, N., et al., *Individualised strategy of warfarin treatment for deep vein thromboembolism - case reports*. Heart, 2011. **97**(Suppl 3): p. A190-A191.
125. Patel, S., et al., *Warfarin*, in *StatPearls*. 2022: Treasure Island (FL).
126. Coons, J.C., et al., *Effectiveness and Safety of Direct Oral Anticoagulants versus Warfarin in Obese Patients with Acute Venous Thromboembolism*. Pharmacotherapy, 2020. **40**(3): p. 204-210.
127. Shirley, M. and S. Dhillon, *Edoxaban: A Review in Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism*. Drugs, 2015. **75**(17): p. 2025-2034.
128. Burness, C.B. and C.M. Perry, *Rivaroxaban: A Review of Its Use in the Treatment of Deep Vein Thrombosis or Pulmonary Embolism and the Prevention of Recurrent Venous Thromboembolism*. Drugs, 2014. **74**(2): p. 243-262.
129. Ogbonna, K. and D. Dixon, *Critical appraisal of dabigatran in the treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism*. Journal of Blood Medicine, 2015: p. 177.
130. Almarshad, F., et al., *Use of direct oral anticoagulants in daily practice*. Am J Blood Res, 2018. **8**(4): p. 57-72.
131. Mistry, D., A. Chandratreya, and P. Lee, *A Systematic Review on the Use of Aspirin in the Prevention of Deep Vein Thrombosis in Major Elective Lower Limb Orthopedic Surgery: An Update from the Past 3 Years*. The Surgery Journal, 2017. **03**(04): p. e191-e196.

132. Patti, G., et al., *The Role of Clopidogrel in 2020: A Reappraisal*. Cardiovascular Therapeutics, 2020. **2020**: p. 1-12.
133. Plosker, G.L. and K.A. Lyseng-Williamson, *Clopidogrel*. Drugs, 2007. **67**(4): p. 613-646.
134. Ortel, T.L., et al., *American Society of Hematology 2020 guidelines for management of venous thromboembolism: treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism*. Blood Advances, 2020. **4**(19): p. 4693-4738.
135. Alexander, P., et al., *Current Trends in the Duration of Anticoagulant Therapy for Venous Thromboembolism: A Systematic Review*. Cureus, 2021. **13**(10): p. e18992.
136. Lafon, T., et al., *[Misuse and adverse effects of new direct oral anticoagulants: A prospective observational study in patients admitted to an emergency unit of a French university hospital]*. Therapie, 2018. **73**(3): p. 209-215.
137. Linhardt, R.J., *Heparin and anticoagulation*. Frontiers in Bioscience, 2016. **21**(7): p. 1372-1392.
138. Lindh, J.D., et al., *Incidence and predictors of severe bleeding during warfarin treatment*. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 2008. **25**(2): p. 151-159.
139. Zheng, S.L. and A.J. Roddick, *Association of Aspirin Use for Primary Prevention With Cardiovascular Events and Bleeding Events*. JAMA, 2019. **321**(3): p. 277.
140. Al Rowily, A., et al., *Prevalence, contributory factors and severity of medication errors associated with direct-acting oral anticoagulants in adult patients: a systematic review and meta-analysis*. European Journal of Clinical Pharmacology, 2022. **78**(4): p. 623-645.

141. Mousavi, S., et al., *Anti-Inflammatory Effects of Heparin and Its Derivatives: A Systematic Review*. *Adv Pharmacol Sci*, 2015. **2015**: p. 507151.
142. Paul-Clark, M.J., et al., *15-epi-lipoxin A4-mediated Induction of Nitric Oxide Explains How Aspirin Inhibits Acute Inflammation*. *Journal of Experimental Medicine*, 2004. **200**(1): p. 69-78.
143. Matsushita, K., et al., *Nitric Oxide Regulates Exocytosis by S-Nitrosylation of N-ethylmaleimide-Sensitive Factor*. *Cell*, 2003. **115**(2): p. 139-150.
144. Gresele, P., S. Momi, and G. Guglielmini, *Nitric oxide-enhancing or -releasing agents as antithrombotic drugs*. *Biochem Pharmacol*, 2019. **166**: p. 300-312.
145. Konior, A., et al., *NADPH Oxidases in Vascular Pathology*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014. **20**(17): p. 2794-2814.
146. Sancho, P. and I. Fabregat, *The NADPH oxidase inhibitor VAS2870 impairs cell growth and enhances TGF- β -induced apoptosis of liver tumor cells*. *Biochemical Pharmacology*, 2011. **81**(7): p. 917-924.
147. Lopes, N., et al., *Thrombospondin 2 regulates cell proliferation induced by Rac1 redox-dependent signaling*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(15): p. 5401-8.
148. Leung, H.H.L., et al., *Inhibition of NADPH oxidase blocks NETosis and reduces thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia*. *Blood Advances*, 2021. **5**(23): p. 5439-5451.
149. Wang, Y., et al., *NLRP3 inflammasome, an immune-inflammatory target in pathogenesis and treatment of cardiovascular diseases*. *Clinical and Translational Medicine*, 2020. **10**(1): p. 91-106.

150. Van Der Heijden, T., et al., *NLRP3 Inflammasome Inhibition by MCC950 Reduces Atherosclerotic Lesion Development in Apolipoprotein E-Deficient Mice—Brief Report*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2017. **37**(8): p. 1457-1461.
151. Wang, X., et al., *Beneficial effects of muscone on cardiac remodeling in a mouse model of myocardial infarction*. *International Journal of Molecular Medicine*, 2014. **34**(1): p. 103-111.
152. Garred, P., A.J. Tenner, and T.E. Mollnes, *Therapeutic Targeting of the Complement System: From Rare Diseases to Pandemics*. *Pharmacological Reviews*, 2021. **73**(2): p. 792-827.
153. Wong, D.J., et al., *A PSGL-1 glycomimetic reduces thrombus burden without affecting hemostasis*. *Blood*, 2021. **138**(13): p. 1182-1193.
154. Mazzali, M., et al., *Osteopontin—a molecule for all seasons*. *QJM: An International Journal of Medicine*, 2002. **95**(1): p. 3-13.
155. Franzén, A. and D. Heinegård, *Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix*. *Biochemical Journal*, 1985. **232**(3): p. 715-724.
156. Rangaswami, H., A. Bulbule, and G.C. Kundu, *Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression*. *Trends Cell Biol*, 2006. **16**(2): p. 79-87.
157. Nomiya, T., et al., *Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice*. *Journal of Clinical Investigation*, 2007. **117**(10): p. 2877-2888.
158. Iida, T., et al., *Is Osteopontin a Friend or Foe of Cell Apoptosis in Inflammatory Gastrointestinal and Liver Diseases?* *International Journal of Molecular Sciences*, 2017. **19**(1): p. 7.

159. Cho, H.-J., H.-J. Cho, and H.-S. Kim, *Osteopontin: A multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification*. Current Atherosclerosis Reports, 2009. **11**(3): p. 206-213.
160. Strobescu-Ciobanu, C., et al., *Osteopontin and osteoprotegerin in atherosclerotic plaque – are they significant markers of plaque vulnerability?* Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2021. **61**(3): p. 793-801.
161. Duvall, C.L., et al., *The Role of Osteopontin in Recovery from Hind Limb Ischemia*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2008. **28**(2): p. 290-295.
162. Lyle, A.N., et al., *Reactive Oxygen Species Regulate Osteopontin Expression in a Murine Model of Postischemic Neovascularization*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2012. **32**(6): p. 1383-1391.
163. Sodhi, C.P., et al., *Hypoxia Stimulates Osteopontin Expression and Proliferation of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells*. Diabetes, 2001. **50**(6): p. 1482-1490.
164. Eckert, R.L., et al., *Transglutaminase regulation of cell function*. Physiol Rev, 2014. **94**(2): p. 383-417.
165. Huang, L., A.M. Xu, and W. Liu, *Transglutaminase 2 in cancer*. Am J Cancer Res, 2015. **5**(9): p. 2756-76.
166. Andre, W., et al., *Identification of brain substrates of transglutaminase by functional proteomics supports its role in neurodegenerative diseases*. Neurobiol Dis, 2017. **101**: p. 40-58.
167. Qiao, S.-W., L.M. Sollid, and R.S. Blumberg, *Antigen presentation in celiac disease*. Current Opinion in Immunology, 2009. **21**(1): p. 111-117.

168. Jabri, B., *Transglutaminase 2 Inhibition for Prevention of Mucosal Damage in Celiac Disease*. New England Journal of Medicine, 2021. **385**(1): p. 76-77.
169. Olsen, K.C., et al., *Transglutaminase 2 and Its Role in Pulmonary Fibrosis*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2011. **184**(6): p. 699-707.
170. Fell, S., et al., *Transglutaminase 2: a novel therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis using selective small molecule inhibitors*. Amino Acids, 2021. **53**(2): p. 205-217.
171. Sane, D., C., *Roles of transglutaminases in cardiac and vascular diseases*. Frontiers in Bioscience, 2007. **12**(1): p. 2530.
172. Tatsukawa, H., et al., *Transglutaminase 2 has opposing roles in the regulation of cellular functions as well as cell growth and death*. Cell Death & Disease, 2016. **7**(6): p. e2244-e2244.
173. Balajthy, Z.N., et al., *Tissue-transglutaminase contributes to neutrophil granulocyte differentiation and functions*. Blood, 2006. **108**(6): p. 2045-2054.
174. Chrobok, N.L., et al., *Is monocyte- and macrophage-derived tissue transglutaminase involved in inflammatory processes?* Amino Acids, 2017. **49**(3): p. 441-452.
175. Haroon, Z.A., et al., *Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis*. FASEB J, 1999. **13**(13): p. 1787-95.
176. Jones, R.A., et al., *Matrix changes induced by transglutaminase 2 lead to inhibition of angiogenesis and tumor growth*. Cell Death & Differentiation, 2006. **13**(9): p. 1442-1453.

177. Jackson Laboratory, *JAX Mice Database - 000664 C57BL/6J*. [cited 09.05.2022; Available from: <https://www.jax.org/strain/000664>].
178. Erhardt, W., Henke, J., Haberstroh, J., Baumgartner, C., Tacke, S., Kölle, P., Korbel, R., Kroker, R., Lendl, C., Lierz, M., *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed. 2011, Stuttgart: Schattauer GmbH. p. p. 980.
179. Diaz, J.A., et al., *Choosing a Mouse Model of Venous Thrombosis*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2019. **39**(3): p. 311-318.
180. Huang, D.W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. *Nature Protocols*, 2009. **4**(1): p. 44-57.
181. Sherman, B.T., et al., *DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update)*. *Nucleic Acids Research*, 2022. **50**(W1): p. W216-W221.
182. Kanehisa, M., et al., *KEGG as a reference resource for gene and protein annotation*. *Nucleic Acids Research*, 2016. **44**(D1): p. D457-D462.
183. Gillespie, M., et al., *The reactome pathway knowledgebase 2022*. *Nucleic Acids Research*, 2022. **50**(D1): p. D687-D692.
184. Huntley, R.P., et al., *The GOA database: gene Ontology annotation updates for 2015*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(Database issue): p. D1057-63.
185. Hayamizu, T.F., et al., *Genome Biology*, 2005. **6**(3): p. R29.

186. Blake, J.A., et al., *Mouse Genome Database (MGD): Knowledgebase for mouse-human comparative biology*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(D1): p. D981-D987.
187. Beiranvand, M., *A review of the biological and pharmacological activities of mesalazine or 5-aminosalicylic acid (5-ASA): an anti-ulcer and anti-oxidant drug*. Inflammopharmacology, 2021. **29**(5): p. 1279-1290.
188. Ramadan, A., et al., *Mesalazine, an osteopontin inhibitor: The potential prophylactic and remedial roles in induced liver fibrosis in rats*. Chem Biol Interact, 2018. **289**: p. 109-118.
189. Hoffmann, M., et al., *Repurposing mesalazine against cardiac fibrosis in vitro*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2021. **394**(3): p. 533-543.
190. Evans, C.E., et al., *Hypoxia and Upregulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Stimulate Venous Thrombus Recanalization*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2010. **30**(12): p. 2443-2451.
191. Evans, C.E., et al., *Suppression of angiogenic response in local vein wall is associated with reduced thrombus resolution*. Thromb Res, 2014. **134**(3): p. 682-5.
192. Nestler EJ, G.P., *Protein Phosphorylation is of Fundamental Importance in Biological Regulation*. Vol. 6th Edition. 1999, Philadelphia: Lippincott-Raven.
193. Hasin, Y., M. Seldin, and A. Lusis, *Multi-omics approaches to disease*. Genome Biology, 2017. **18**(1).
194. Shay, T., et al., *Conservation and divergence in the transcriptional programs of the human and mouse immune systems*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(8): p. 2946-2951.

-
195. Furze, R.C. and S.M. Rankin, *Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow*. *Immunology*, 2008. **125**(3): p. 281-288.
196. Binns, D., et al., *QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(22): p. 3045-3046.
197. Biedermann, T. and M. Röcken, *Pro- and Anti-inflammatory Effects of IL-4: From Studies in Mice to Therapy of Autoimmune Diseases in Humans*, in *Animal Models of T Cell-Mediated Skin Diseases*. Springer Berlin Heidelberg. p. 235-242.
198. Bird, L., *Getting enough energy for immunity*. *Nature Reviews Immunology*, 2019. **19**(5): p. 269-269.

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Zellcluster der Einzelzell-RNA-Analyse aus Thrombus, Blut und Knochenmark</i>	38
<i>Abbildung 2: Dotplot der Markergene der Zellcluster aus Abb. 1</i>	39
<i>Abbildung 3: Darstellung der Herkunft der Zellcluster aus Abb. 1 mit unterschiedlichen Einfärbungen der Proben</i>	40
<i>Abbildung 4: Barplot der prozentualen Anteile der Zellcluster und -typen aus Abb. 1 im jeweiligen Herkunftsgewebe</i>	41
<i>Abbildung 5: Volcano-Plot der signifikant hoch exprimierten Gene der Thrombusneutrophilen (rot) und Blutneutrophilen (Thrombus+) (blau) des Neutrophilenclusters 3 aus Abb. 1</i>	44
<i>Abbildung 6: Volcano-Plot der signifikant hoch exprimierten Gene aus Knochenmarkneutrophilen (Thrombus+) (rot) und Thrombusneutrophilen (blau) des Neutrophilenclusters 3 aus Abb. 1</i>	45
<i>Abbildung 7: Auswahl der biologischen Prozesszuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Thrombusneutrophilen aus Abb. 5</i>	46
<i>Abbildung 8: Teil 1 Auswahl der biologischen Prozesszuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Thrombusneutrophilen aus Abb. 6</i>	48
<i>Abbildung 9: Teil 2 Auswahl der biologischen Prozesszuordnung signifikant hoch exprimierter Gene der Thrombusneutrophilen aus Abb. 6</i>	49
<i>Abbildung 10: Auswahl der biologischen Prozesszuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Blutneutrophilen aus Abb. 5</i>	53
<i>Abbildung 11: Auswahl der biologischen Prozesszuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Knochenmarkneutrophilen aus Abb. 6</i>	54
<i>Abbildung 12: Volcano-Plot der exprimierten Gene der Einzelzell-RNA-Sequenzierung aus Neutrophilencluster 5 aus Abb. 1 vergleichend zwischen Knochenmark (Thrombus-) (rot) und Knochenmark (Thrombus+) (blau)</i>	56
<i>Abbildung 13: Auswahl der Zuordnung signifikant hoch exprimierter Gene zu biologischen Prozessen der Neutrophilen des Knochenmarks (Thrombus+) Cluster 5 aus Abb. 1</i>	57
<i>Abbildung 14: Abbildung der Monozyten der Einzelzell-RNA-Analyse</i>	58
<i>Abbildung 15: Darstellung des Ursprungs der Zellcluster aus Abb. 14 mit unterschiedlicher Einfärbungen der Proben</i>	59
<i>Abbildung 16: Volcano-Plot der signifikant hoch exprimierten Gene aus</i>	

<i>Thrombusmonozyten (rot) und Blutmonozyten (Thrombus+) (blau).....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 17: Volcano-Plot der signifikant hoch exprimierten Gene aus Knochenmarkmonozyten (Thrombus+) (rot) und Thrombusmonozyten (blau)....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 18: Auswahl der biologischen Prozesszuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Thrombusmonozyten aus Abb. 16.....</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 19: Auswahl der biologischen Prozesszuordnungen signifikant hoch exprimierter Gene der Thrombusmonozyten aus Abb. 17.....</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 20: Thrombusgewichte der TVT-Gruppe unter Mesalazinbehandlung</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 21: Thrombusgewichte der TVT-Gruppe unter TGM2-Inhibitorbehandlung.....</i>	<i>66</i>

XI. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Genliste Thrombusneutrophile zu Abb. 7</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 2: Genliste Thrombusneutrophile zu Abb 8 und 9</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 3: Genliste Blutneutrophile zu Abb. 10.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 4: Genliste Knochenmarkneutrophile zu Abb. 11</i>	<i>55</i>
<i>Tabelle 5: Genliste Thrombusmonozyten zu Abb. 18.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 6: Genliste Thrombusmonozyten zu Abb. 19.....</i>	<i>63</i>

XII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APC-R	Aktiviertes Protein-C Resistenz
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CCL	Chemokine C-C motif ligand
cDNA	Komplementäre DNA
CD	Cluster of differentiation
CEBPB	Gen für CCAT/enhancer-binding protein beta
CRP	C-reaktives Protein
CTDV	Chronische thrombotische venöse Krankheit
CXCR	CXC-Motiv-Chemonikrezeptor
CX3CL	chemokine C-X3-C motif ligand
CX3CR	chemokine C-X3-C motif receptor
cm	Zentimeter
°C	Grad Celcius
DAMP	danger- oder damage-associated molecular pattern
dL	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FC	Fold Change
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
g	Gramm
h	Stunden
HIF1a	Gen für Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HMGB1	high-mobility group protein B1
HMOX1	heme oxygenase 1 Gen
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
JUN	Jun proto-oncogen, AP-1 transcription factor subunit
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
Ly-6C	lymphocyte antigen 6 complex locus c
µl	Mikroliter

ml	Milliliter
mg	Milligramm
MIF	Gen für Migration inhibitory factor
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Red. Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NET	neutrophil extracellular traps
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	Nicht signifikant
OTS	Orbital tightening scale
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphat buffered saline
PEG300	Polyethylenglycol 300
PF4	Platelet growth factor 4
p.o.	Per os
PSGL1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1
PTS	Postthrombotisches Syndrom
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rounds per minute
rRNA	Ribosomale RNA
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
SPF	Specific pathogen free
SPP1	Gen für secreted phosphoprotein 1 (=Osteopontin)
TGM2	Gen für Transglutaminase-2
Tgm2	Transglutaminase-2
TNF	Tissue necrosis factor
TVT	Tiefe Venenthrombose
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction
VEGF	Gen für Vascular endothelial growth factor
Vit-K	Vitamin-K
Vol.	Volumen
VTE	Venöser Thromboembolismus
WP-Körperchen	Weibel-Palad-Körperchen
*	signifikant

XIII. DANKSAGUNG

Zuerst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Konstantin Stark, für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und die Übernahme der Betreuung dieser Doktorarbeit.

Besonders danke ich Herrn Prof Dr. med. vet. Thomas Göbel für die Übernahme des Dissertationsvorhabens, die Durchsicht der Arbeit und deren Einreichung an der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Außerdem möchte ich mich für die unkomplizierte und effiziente Kommunikation bedanken.

Ein großer Dank geht an meine Vets(+) Dr. med. vet. Susanne Sauer, Larissa Belz, Dr. med. vet. Denise Messerer und Dr. med. vet. Julia Winterhalter. Ohne Euch gäbe es diese Doktorarbeit definitiv nicht. Vielen Dank für eure Freundschaft, die riesige Unterstützung in allen Lebenslagen und eure unermüdlich aufbauenden und beruhigenden Worte. Ein weiterer großer Dank geht hier an Badr Kilani, PhD, for being a patient teacher and for endless talks about all life aspects. Und Dominic van den Heuvel, thanks for keeping my mice busy and my cola level on a working high.

Thanks to Alejandro Martinez for processing my data and the patient explanations as my seuratexpert. Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe, für die Unterstützung und die Zusammenarbeit, welche zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen hat. Insbesondere möchte ich mich bei Zeljka Sisic und Michael Lorenz bedanken.

Abseits des Labors geht ein ganz besonderer Dank an meine Eltern, an Ela und an Channi, die mich immer und bei Allem unterstützt haben. Und allen voran Simon Viehrig, ohne Dich gäbe es nicht nur diese Doktorarbeit nicht. Du, Dr. Timon und Dr. Pumbaa seids mei dahoam.