

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

Neue Einflussfaktoren auf die Thrombozytenfunktion



Kumulative Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Innere Medizin und Kardiologie

vorgelegt von

Dr. med. Manuela Thienel

geboren am 20.07.1988 in Gräfelfing

2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Wissenschaftliche Arbeiten	7
1. Einfluss von β1-Integrin Polymorphismen auf das Blutungsrisiko nach koronarer Stentimplantation	7
Integrin β 1 polymorphisms and bleeding risk after coronary artery stenting. Thienel M , Lüsebrink E, Kastrati A, Dannenberg L, Polzin A, Schulz C, Massberg S, Petzold T; Mol Biol Rep. 2019 Dec	7
2. Einfluss einer Thrombin Inhibition auf die Thrombozytenfunktion und arterielle Thrombose	11
Oral thrombin inhibitor aggravates platelet adhesion and aggregation during arterial thrombosis. <i>Sci Transl Med.</i> 2016; 8:367ra168. Petzold T, Thienel M , Konrad I, Schubert I, Regenauer R, Hoppe B, Lorenz M, Eckart A, Chandraratne S, Lennerz C, Kolb C, Braun D, Jamasbi J, Brandl R, Braun S, Siess W, Schulz C and Massberg S ..	11
3. Einfluss einer Faktor Xa Inhibition mit Rivaroxaban auf die arterielle Thrombose ...	15
Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of FXa Driven Platelet Activation Via Protease Activated Receptor-1; Petzold T*, Thienel M* , Dannenberg LK*, Mourikis P, Helten C, Ayhan A, M'Pembele R, Achilles A, Trojovský K, Konsek D, Zang Z, Regenauer R, Pircher J, Ehrlich A, Lüsebrink E, Nicolai L, Stocker T, Brandl R, Röschentaler F, Strecker J, Saleh I, Spannagl M, Mayr CH, Schiller HB, Jung C, Gerdes N, Hoffmann T, Levkau B, Hohlfeld T, Zeus T, Schulz C, Kelm M, Polzin A. <i>Circ Res.</i> 2019 Dec 20; * contributed equally.....	15
4. Einfluss chronischer Immobilisation auf die Thrombozytenfunktion	21
Immobility-associated thromboprotection is conserved across mammalian species from bear to human. Thienel M , Müller-Reif JB, Zhang Z, Ehreiser V, Huth J, Shchurovska K, Kilani B, Schweizer L, Geyer PE, Zwiebel M, Novotny J, Lüsebrink E, Little G, Orban M, Nicolai L, El Nemr S, Titova A, Spannagl M, Kindberg J, Evans AL, Mach O, Vogel M, Tiedt S, Ormanns S, Kessler B, Dueck A, Friebe A, Jørgensen PG, Majzoub-Altweck M, Blutke A, Polzin A, Stark K, Käab S, Maier D, Gibbins JM, Limper U, Frobert O, Mann M, Massberg S, Petzold T. <i>Science.</i> 2023 Apr 14	21
Zusammenfassung und Ausblick	28
Literaturverzeichnis	33
Danksagung	38
Gesamtes Publikationsverzeichnis	39
Eidesstattliche Erklärung	42

Für meine Eltern und Jan.

Einleitung

Thrombozyten sind die korpuskulären Elemente der primären Hämostase und interagieren in komplexer Weise mit dem plasmatischen Gerinnungssystem, um die Integrität der Gefäßwände sicherzustellen. Sie sind kleine, 1,5 - 3 µm große, scheibenförmige Blutzellen, die sich im Rahmen der Thrombopoese von ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, im Knochenmark abspalten. Die Lebensdauer der Thrombozyten beträgt 7-10 Tage, bevor sie hauptsächlich in der Milz, sowie in der Lunge und in der Leber abgebaut werden (Italiano and Shivdasani, 2003). Neben ihrer klassischen Funktion, der Hämostase, konnte in den letzten Jahrzehnten gezeigt werden, dass Thrombozyten in vielfältiger Weise an entzündlichen, immunologischen und tumor-assoziierten Prozessen beteiligt sind (Gaertner and Massberg, 2019; Labelle et al., 2011; McNicol and Israels, 2008).

Venöse Thromboembolien, also tiefe Venenthrombosen und Lungenarterienembolien, gehen mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher und verursachen weltweit immense Kosten für das Gesundheitssystem (Khan et al., 2021). Neben Hyperkoagulabilität des Blutes und Veränderung der Gefäßwände ist Immobilität dabei ein Hauptrisikofaktor (Heit et al., 2016). Der pathophysiologische Mechanismus, der sowohl venösen Thromboembolien als auch anderen kardiovaskulären Erkrankungen wie dem akuten Myokardinfarkt zugrunde liegt, ist eine gestörte Interaktion des Gerinnungssystems, des angeborenen Immunsystems sowie des Gefäßsystems (Stark and Massberg, 2021). Das Konzept der Immunothrombose beschreibt dabei die physiologische Kooperation von Thrombozyten und Zellen des angeborenen Immunsystems mit dem Ziel, die Integrität des Organismus aufrecht zu halten (Engelmann and Massberg, 2013). Im Rahmen von infektiösen, aber auch sterilen Entzündungsreaktionen werden Thrombozyten rekrutiert, wobei durch Aktivierung des intravasalen Gerinnungssystems lokale Mikrothrombosen entstehen, die die Ausbreitung von Pathogenen und damit ein Fortschreiten der Inflammation verhindern sollen (Massberg et al., 2010; Yeaman, 2014). In diesem Rahmen aktivieren die rekrutierten Thrombozyten neutrophile Granulozyten und stimulieren sie zur Freisetzung sogenannter „Neutrophil Extracellular Traps“ (NETs), einem Netzwerk aus dünnen DNA-Fasern, das die pathogenen Keime abfängt und an der weiteren Ausbreitung hindert (Clark et al., 2007; Wong et al., 2013). Die unkontrollierte Aktivierung dieser initial protektiven Mechanismen, zum Beispiel im Rahmen einer venösen Thrombose oder eines akuten Myokardinfarktes, führt zu einer gegenseitigen Verstärkung sowohl der Immunantwort als auch der Gerinnungskaskade. Sie geht deswegen mit einem erhöhten Risiko für thromboembolische Ereignisse einher und wird Thromboinflammation genannt (Stark and Massberg, 2021).

Obwohl das Verständnis über die komplexen, mannigfaltigen Funktionen der Thrombozyten, alleine und in Kooperation mit anderen Blutzellen, stetig zunimmt, ist die wesentliche Säule der medikamentösen Therapie der arteriellen Thrombose weiterhin die Hemmung der Thrombozytenaktivierung. So stellt eine plättchenhemmende Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS) sowie den P2Y₁₂ ADP-Rezeptor Antagonisten, Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor, die Basis einer Leitlinien-gerechten Therapie bei akutem und chronischem Koronarsyndrom dar (2021; Knuuti et al., 2020).

Zur Prävention und Therapie von venösen Thromboembolien und zur Prophylaxe von ischämischen Ereignissen bei Patienten mit Vorhofflimmern stehen seit gut zehn Jahren direkte, orale Antikoagulantien (DOAKs) als Alternative zu Vitamin-K-Antagonisten (VKA) oder einer subkutanen bzw. intravenösen Therapie mit niedermolekularem und unfraktioniertem Heparin zur Verfügung. Mechanistisch unterscheiden sich dabei zwei DOAK-Wirkstoffgruppen: Faktor-Xa-(FXa)-Inhibitoren wie Apixaban, Rivaroxaban sowie Edoxaban und der Thrombin-(FIIa)-Inhibitor Dabigatran. Die große Herausforderung an alle Thrombozytenaggregationshemmer und Antikoagulantien ist dabei die Nutzen-Risiko-Abwägung bezüglich der Prävention ischämischer Ereignisse und der Vermeidung von Blutungskomplikationen. Innovative antithrombotische Konzepte, die spezifisch an der thromboinflammatorischen Komponente von venösen und arteriellen Thrombosen ansetzen, stehen zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die molekularen Mechanismen der Thrombozytenaktivierung sowie ihre spezifischen Einflussfaktoren nur unzureichend verstanden sind, obwohl sie für die klinische Patientenversorgung und die Entwicklung neuer Diagnoseinstrumente sowie therapeutischer Ansätze der arteriellen und der venösen Thrombose von essentieller Bedeutung sind. Ziel dieser Habilitationsschrift ist daher, einen Beitrag zu einem verbesserten Verständnis der Thrombozytenfunktion sowie externe und interne Einflussfaktoren zu leisten:

Zielsetzung

- 1.) Im ersten Projekt wird die pathophysiologische Relevanz genetischer Variationen der β 1-Integrine auf den Thrombozyten in Patienten mit Blutungskomplikationen im Rahmen von Koronarinterventionen untersucht.

- 2.) Im zweiten Projekt wird der Einfluss eines oralen Thrombininhibitors, unter dem klinisch ein erhöhtes Risiko für Myokardinfarkte beobachtet wurde, auf die Thrombozytenfunktion und die Entstehung arterieller Thrombosen untersucht

- 3.) Im dritten Projekt wird analysiert, warum unter dauerhafter Therapie mit oralen Faktor Xa-Inhibitoren das Risiko arterieller Thrombosen reduziert ist und das Risiko für Entstehung von Myokardinfarkten vermindert ist.

- 4.) Im vierten Projekt wird der Einfluss einer chronischen Immobilisation auf die Thrombozytenfunktionalität und die Entstehung venöser Thrombosen analysiert. Hierfür werden winterschlafenden Braunbären, immobile Schweine sowie Patienten mit Querschnittslähmung und freiwillige Studienteilnehmer eines Bed-Rest Tests untersucht.

Wissenschaftliche Arbeiten

1. Einfluss von β 1-Integrin Polymorphismen auf das Blutungsrisiko nach koronarer Stentimplantation

Integrin β 1 polymorphisms and bleeding risk after coronary artery stenting. **Thienel M**, Lüsebrink E, Kastrati A, Dannenberg L, Polzin A, Schulz C, Massberg S, Petzold T; Mol Biol Rep. 2019 Dec

Die gezielte Hemmung der Thrombozytenaktivierung mittels dualer Thrombozytenaggregationshemmer-Therapie (DAPT) schützt nach Koronarintervention effizient gegen ischämische und thrombotische Ereignisse bei gleichzeitiger Zunahme des Blutungsrisikos (Yusuf et al., 2001). Blutungskomplikationen nach einer perkutanen Koronarintervention (PCI) werden dabei unabhängig voneinander mit einer Erhöhung der frühen und späten Mortalität assoziiert (Kwok et al., 2014; Mehran et al., 2011). Ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen, die zu Blutungskomplikationen in dieser Hochrisiko-Patientenkohorte beitragen, ist daher unbedingt erforderlich für ein optimales Patientenergebnis. Im Rahmen einer atherosklerotischen Plaqueruptur kommt es zur Exposition von hoch thrombogenen, subendothelialen Matrixproteinen, die zu einer unmittelbar einsetzenden Rekrutierung und Aktivierung der Thrombozyten führt. Die Aktivierung der Thrombozyten bewirkt dabei die Freisetzung prothrombotischer Granula und die Aktivierung von Integrin-Adhäsionsrezeptoren.

Neben dem am häufigsten exprimierten Fibrinogenrezeptor α IIb β IIIa, auch bekannt unter GPIIb/IIIa, bilden Blutplättchen drei verschiedene β 1-Integrine, die die Adhäsion von Thrombozyten an exponierte subendotheliale Matrixproteine vermitteln, einschließlich Kollagen (Integrin α 2 β 1; GPIa/IIa), Fibronectin (Integrin α 5 β 1) und Laminin (Integrin α 6 β 1) (Nieswandt et al., 2009; Varga-Szabo et al., 2008). Die Aktivierung der Integrine wird dabei streng reguliert durch die zytoplasmatischen Proteine Kindlin-III und Talin-1. Sie interagieren mit dem zytoplasmatischen Ende der Integrine und lösen eine Konformationsänderung des Rezeptors aus, die vor einer Substratbindung nötig ist (Calderwood et al., 2013; Moser et al., 2008). Experimentelle Daten konnten zeigen, dass Mäuse, die eine Mutation innerhalb der zytoplasmatischen Aktivierungsdomäne von β 1-Integrin aufweisen, dieses nicht aktivieren können und in vivo längere Blutungszeiten haben (Petzold et al., 2013).

Bis jetzt gibt es keine Hinweise darauf, dass genetische Mutationen in β 1-Integrinen bei Menschen zu einer verstärkten Blutungsneigung führen. Es könnte jedoch sein, dass kleine Veränderungen der Integrinfunktion, die unter physiologischen Bedingungen inapparent

bleiben, das Blutungsrisiko bei Hochrisiko-Eingriffen erhöhen. Um diese Frage zu beantworten, wurden Daten von 14.160 Patienten aus sieben randomisierten Studien ausgewertet, um Patienten mit Blutungskomplikationen nach PCI zu identifizieren, und nach genetischen Mutationen innerhalb der β 1-Integrin-Aktivierungsdomäne mittels Sequenzierung gescreent (Abb. 1.1A). Innerhalb der Studien (ISAR (intracoronary stenting and antithrombotic research regime)-REACT (Kastrati et al., 2004), ISAR-SWEET (Mehilli et al., 2004), ISAR-SMART-2 (Hausleiter et al., 2004), ISAR-REACT-2 (Kastrati et al., 2006), ISAR-REACT-3 (Kastrati et al., 2008), ISAR-REACT-3A (Schulz et al., 2010) und ISAR-REACT-4 (Kastrati et al., 2011)) wurde bei den Patienten aufgrund stabiler koronarer Herzerkrankung (KHK) oder akutem Koronarsyndrom eine PCI durchgeführt und eine DAPT mit ASS und Clopidogrel sowie je nach Studienprotokoll eine periprozedurale Antikoagulation mit entweder Bivalirudin, unfractioniertem Heparin alleine oder in Kombination mit Abciximab durchgeführt (Abb. 1.1B).

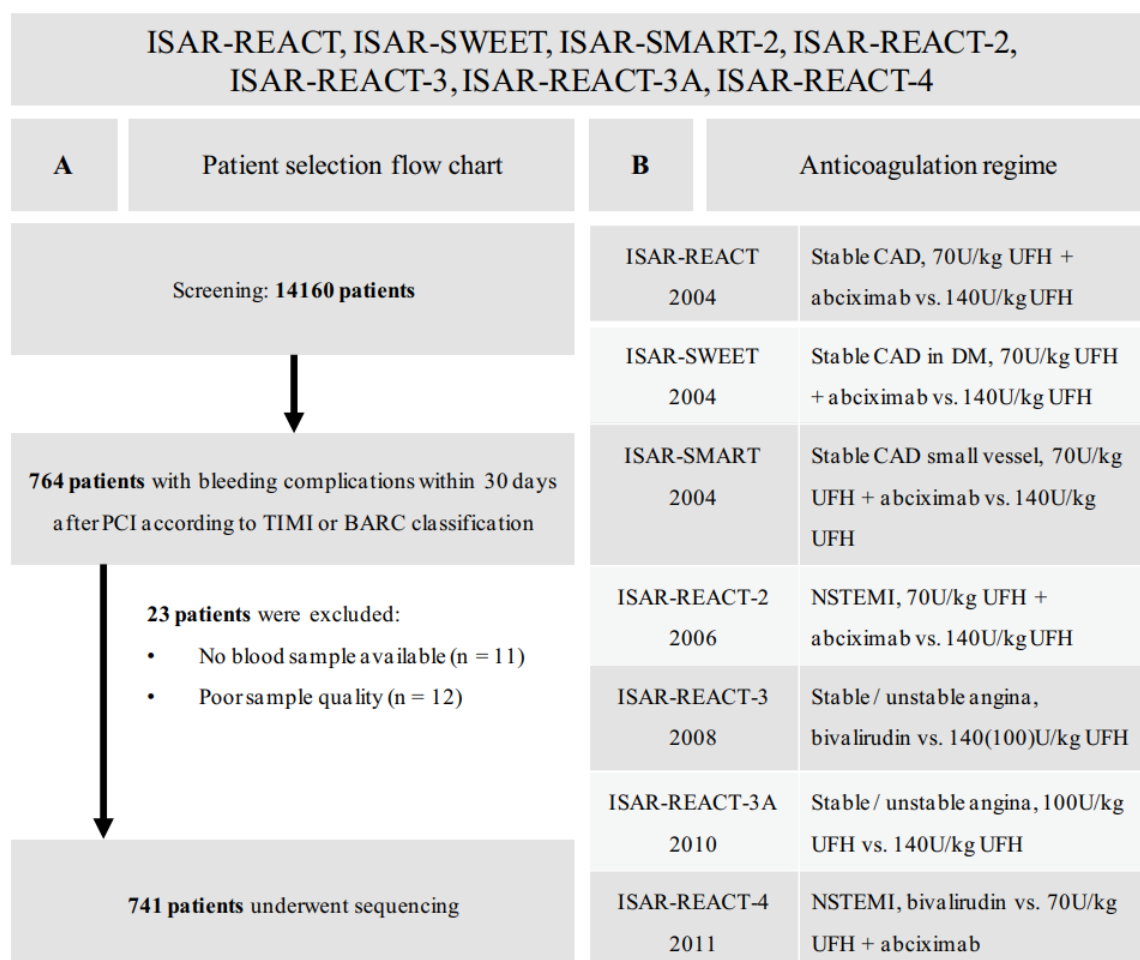


Abbildung 1.1: (A) Flussdiagramm zur Patientenauswahl basierend auf 14.160 rekrutierten Patienten aus sieben randomisierten klinischen Studien der ISAR-Gruppe zwischen Juni 2000 und Mai 2011. (B) Antikoagulationsregime in jeder ISAR-Studie.

Aus diesem Patientenpool wurden insgesamt 764 Patienten identifiziert, die innerhalb von 30 Tagen nach PCI eine Blutungskomplikation nach TIMI- oder BARC-Klassifikation erlitten. Innerhalb dieser Kohorte wurden 58,7 % der Patienten aufgrund KHK interveniert, 41,3 % bei akutem Koronarsyndrom. Innerhalb von 30 Tagen nach PCI erlitten 12,3 % der Patienten eine TIMI major Blutung und 56,5 % der Patienten eine Blutung ≥ 2 nach BARC-Klassifikation, wobei 65 % der Blutung am arteriellen Zugangsweg auftraten. Nach DNA-Isolierung aus Vollblutproben wurde eine Sequenzierung durchgeführt, die die kodierende Region der Integrin- β 1-Aktivierungsdomäne (Exon 16) und ihre benachbarte stromaufwärts gelegene Region (Richtung des 3'-Endes) abdeckte. Innerhalb der kodierenden Region der β 1-Aktivierungsdomäne sind 10 Einzelnukleotidpolymorphismen (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) bekannt, die jedoch alle eine geringe Allelhäufigkeit von < 1 % aufweisen. In meiner Analyse wurde nur eine Genotypvariation für SNP rs2153875 identifiziert, die sich innerhalb der nicht-kodierenden Upstream-Region befindet (Gen: ITGB1;TCTTATAAATAGGATTTTCACCCTA [A/C] AACAAAAAAAAAAGTGAGAAAA ATTA, Chromosom: 10:32901639; geringe Allelfrequenz > 1 %). Die Allelhäufigkeit für SNP rs2153875 innerhalb unserer Blutungskohorte (n = 741) betrug 7,3 % für den CC-, 35 % für den CA- und 57,8 % für den AA-Genotyp (Abb. 1.2A) und ähnelt der Genotypverteilung in der Allgemeinbevölkerung. Einen Zusammenhang der SNP-Genotypverteilung mit der Schwere der Blutungskomplikation konnten wir dabei nicht beobachten (Abb. 1.2B). Andere Genotypvariationen innerhalb der kodierenden Region der Integrin- β 1-Aktivierungsdomäne wurden ebenfalls nicht entdeckt.

Zusammenfassend haben wir basierend auf einer Sequenzierungsanalyse von 741 Patienten mit Blutungskomplikationen nach TIMI- und BARC-Klassifikation nach PCI keinen Hinweis darauf, dass Mutationen innerhalb der Integrin- β 1-Aktivierungsdomäne einen signifikanten Einfluss auf Blutungsereignissen nach PCI haben.

A Genotype variation for SNP rs2153875				
Genotype	CC	CA	AA	
Patients (n)	54	259	431	
Patients (%)	7.3	35.0	57.8	
Population (%)*	5.5	36.5	57.9	

B SNPs genotype and bleeding severity				
SNP rs2153875	CC (n = 54)	CA (n = 259)	AA (n = 431)	p-value**
TIMI minor (%)	31.5	33.6	30.9	ns.
TIMI major (%)	16.7	11.6	12.1	ns.
BARC 1 (%)	44.4	42.9	43.7	ns.
BARC ≥ 2 (%)	55.6	57.1	56.3	ns.
Access site bleeding (%)	57.4	64.1	66.1	ns.
Non-access site bleeding (%)	42.6	35.9	33.9	ns.

Abbildung 1.2: (A) Genotypvariation für SNP rs2153875, *Daten von NHLBI Exom-Sequenzierungsprojekt (n=4300); Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA ([URL:http://evs.gs.washington.edu/EVS/](http://evs.gs.washington.edu/EVS/)), abgerufen 11/2018; (B) Zusammenhang zwischen SNP-Genotyp und Blutungsschwere.

2. Einfluss einer Thrombin Inhibition auf die Thrombozytenfunktion und arterielle Thrombose

Oral thrombin inhibitor aggravates platelet adhesion and aggregation during arterial thrombosis. *Sci Transl Med.* 2016; 8:367ra168. Petzold T, **Thienel M**, Konrad I, Schubert I, Regenauer R, Hoppe B, Lorenz M, Eckart A, Chandraratne S, Lennerz C, Kolb C, Braun D, Jamasbi J, Brandl R, Braun S, Siess W, Schulz C and Massberg S

Seit über einem Jahrzehnt stehen neben Vitamin-K-Antagonisten (VKA) neue, direkte orale Antikoagulantien (NOAK oder DOAK) zur Prävention von ischämischen Ereignissen bei Patienten mit Vorhofflimmern (VHF) zur Verfügung. Hierbei unterscheiden sich zwei Wirkstoffgruppen: Faktor-Xa-(FXa)-Inhibitoren wie Apixaban, Rivaroxaban sowie Edoxaban und der Thrombin-(FIIa)-Inhibitor Dabigatran. In der Zulassungsstudie zeigte sich eine Gleichwertigkeit von oralen Thrombininhibitoren (OTI) bezüglich der Prävention von Schlaganfällen gegenüber der Behandlung mit Vitamin-K-Antagonisten (VKA) sowie eine Gleichwertigkeit bzw. Überlegenheit hinsichtlich des Auftretens von Blutungskomplikationen (Connolly et al., 2009). Allerdings wurde klinisch ein Anstieg an Myokardinfarkten beobachtet (Artang et al., 2013). Bis jetzt ist nicht klar, ob dies dem Zufall geschuldet ist, oder ob OTI eine prothrombotische Wirkung auf die Thrombozyten ausüben. Ziel dieser Studie war, den Einfluss von Dabigatran auf die Plättchenfunktion, deren Adhäsion und Aktivierung zu untersuchen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden 95 Patienten eingeschlossen, die entweder mit Dabigatran (n = 45; 150 mg zweimal täglich) oder Marcumar (n = 54) zur Prävention systemischer Embolien bei Vorhofflimmern antikoaguliert wurden. Auf Single-Cell-Ebene zeigten sich keine Unterschiede in der Thrombozyten-Reaktivität. In Impedanz-basierten Aggregationsmessungen in Vollblut fand sich nur nach Stimulation mit Ristocetin - ein Schlangengift, das zu einer strukturellen Aktivierung des Von-Willebrand-Faktor(vWF) - Rezeptors führt - eine verstärkte Aggregationsantwort. Um den pathophysiologischen Mechanismus während der arteriellen Thrombose nachzustellen, wurden Flusskammerversuche auf humanem atherosklerotischem Plaquematerial unter arteriellen Flussbedingungen durchgeführt. In Dabigatran behandeltem Blut zeigte sich im Vergleich zu VKA-Patienten und unbehandelten Kontrollen eine verstärkte Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung (Abb.2.1).

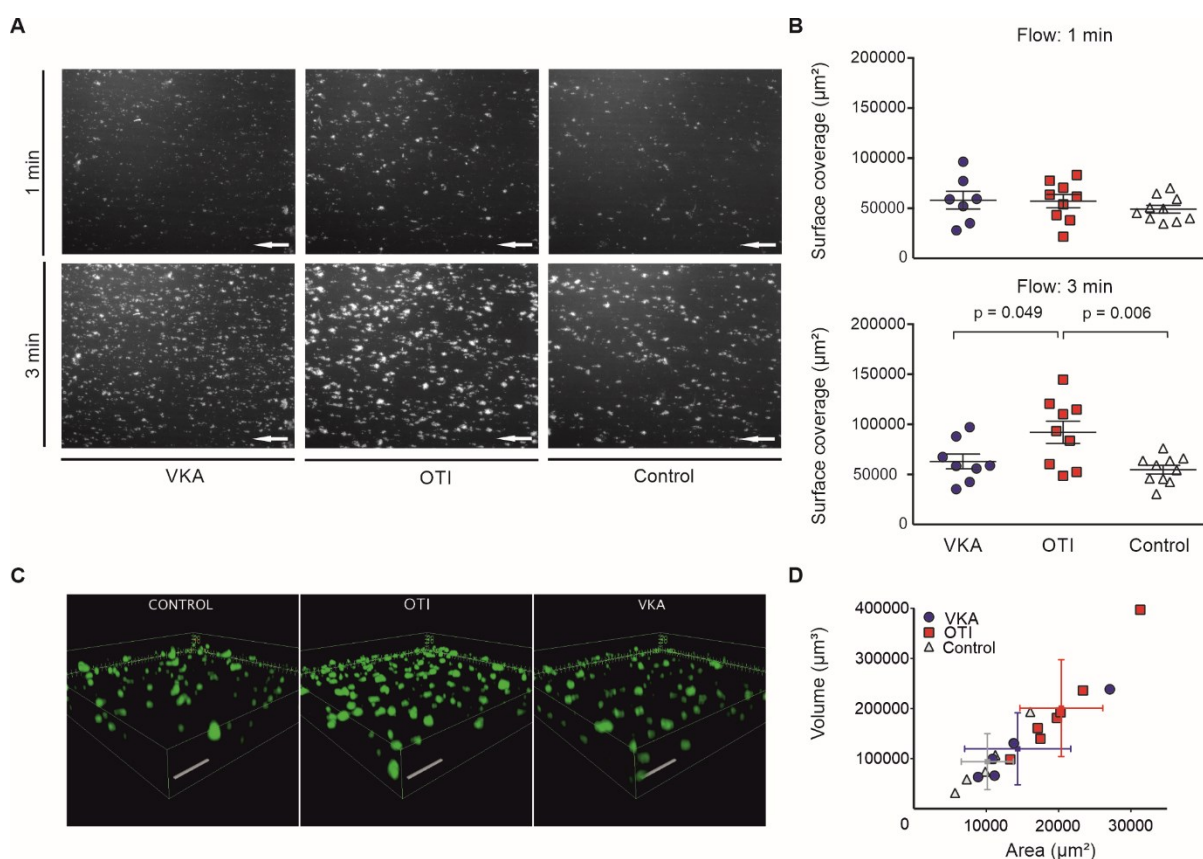


Abbildung 2.1: Vermehrte Thrombozytenadhäsion unter OTI. (A) Repräsentative Fluoreszenzbilder nach 1 und 3 min Blutfluss über humanem Plaquematerial. Der Pfeil gibt die Flussrichtung an und repräsentiert $120 \mu\text{m}$. (B) Quantifizierung der Thrombozytenadhäsion als Gesamtoberflächendeckung. (C) Repräsentative 3D-Rekonstruktionen der Plättchenaggregate auf humanem atherosklerotischen Plaque nach 3 min Fluss; Skala $25 \mu\text{m}$. (D) Oberflächendeckung und Thrombusvolumen nach 3 min.

Um die Relevanz dieser Ergebnisse in vivo zu validieren, analysierten wir die Thromboseentstehung in zwei verschiedenen murinen Modellen der arteriellen Thrombose in OTI und VKA behandelten Mäusen sowie unbehandelten Kontrolltieren. Die Thrombozytenrekrutierung und -adhäsion während der frühen Phase der arteriellen Thrombose im Carotis-Ligatur-Modell wies keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Abb. 2.2A und B). Im Draht-Denudationsmodell, in dem eine deutlich stärkere Gefäßverletzung induziert wird, zeigte sich jedoch, dass die Thrombusstabilität in OTI behandelten Tieren höher ist als in unbehandelten Kontrollen und VKA behandelten Tieren, die sogar komplett vor einer okkludierenden arteriellen Thrombose geschützt waren (Abb. 2.2C).

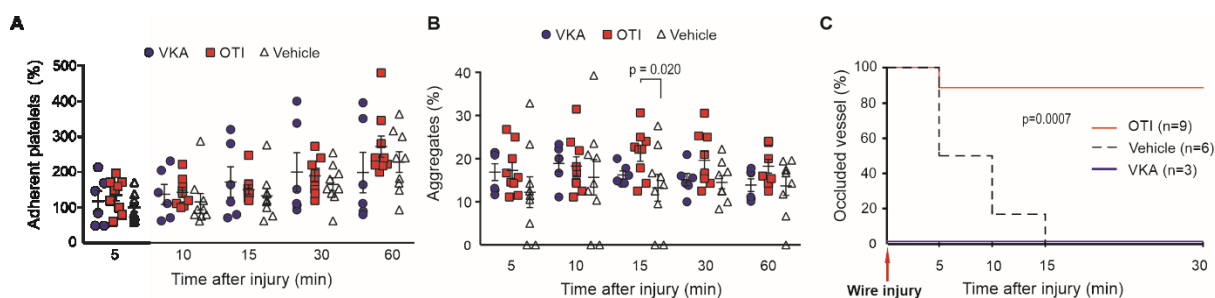
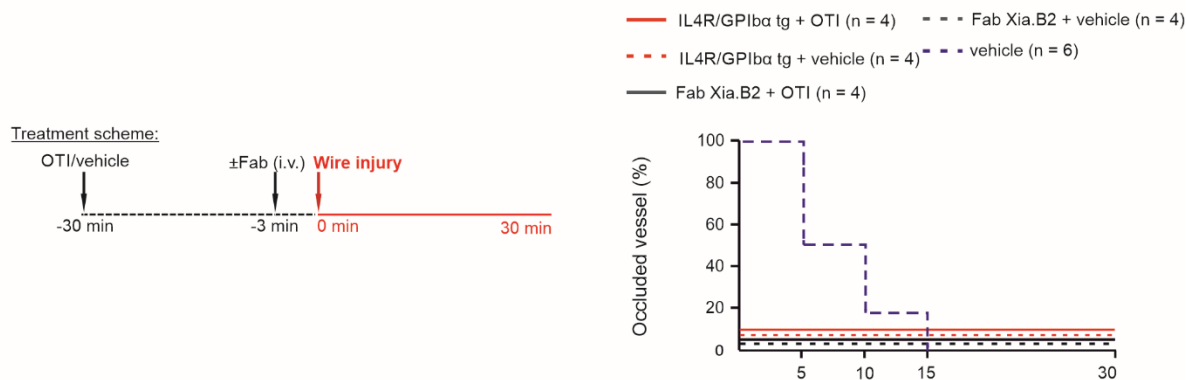


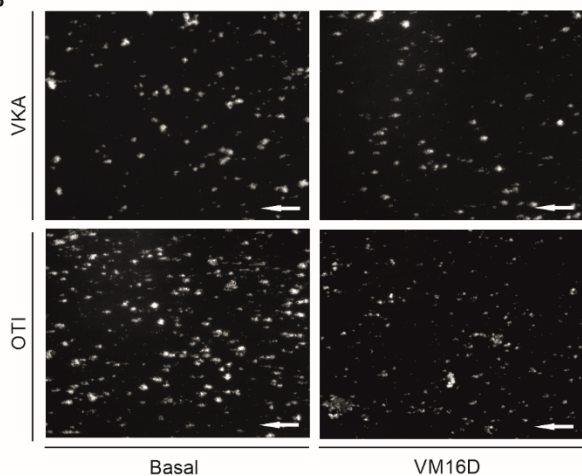
Abbildung 2.2: Arterielle Thrombose in vivo. Wildtyp-Mäusen wurde 30 min nach der Gabe von OTI oder Vehikel oder nach 2 Tagen VKA-Therapie eine Verletzung der Arteria carotis communis induziert. Die Thrombozytenadhäsion (A) und Aggregatbildung (B) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. (C) Im Draht-Denudationsmodell wurde die Bildung eines okklusiven Thrombus und das Wiedereinsetzen eines Blutflusses mittels intravitale Mikroskopie zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert.

Eine antithrombozytäre Therapie mit ASS konnte die beobachteten prothrombotischen Effekte in vitro in den Flusskammerversuchen antagonisieren, was darauf hindeutet, dass die prothrombotischen Effekte durch Thrombozyten vermittelt sind. Da die Thrombinlevel in der OTI-Gruppe erhöht waren und sich in Aggregationsversuchen eine verstärkte Antwort nach Stimulation mit Ristocetin zeigte, untersuchten wir nun die Rolle des vWF-Rezeptors Glykoprotein Iba (GPIb α). GPIb α ist der am häufigsten exprimierte Thrombinrezeptor auf Thrombozyten, wobei die Bindung über die Exosites I und II erfolgt, die außerhalb der katalytisch aktiven Domäne des Thrombinmoleküls liegen (Dumas et al., 2003). Eine genetische Ablation oder pharmakologische Hemmung der GPIb α -Bindungsstelle reduzierte in vivo die Bildung eines okklusiven Thrombus im Draht-Denudationsmodell (Abb. 2.3A). Auch in vitro reduzierte die Hinzugabe eines Antikörpers, der die GPIb α -Thrombin Interaktion blockiert, die prothrombotische Wirkung von OTI im Flusskammermodell (Abb. 2.3B und C).

A



B



C

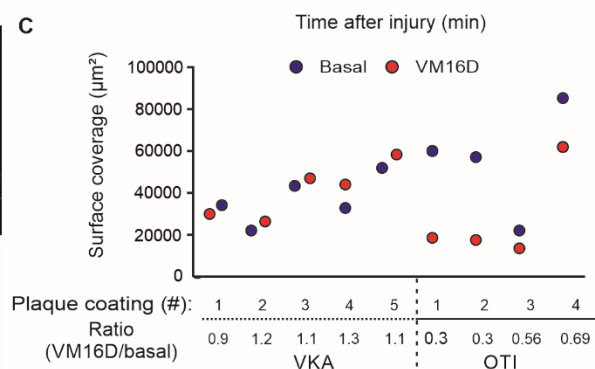


Abbildung 2.3: Verstärkte GPIIb α -Thrombin Interaktion als Ursache des prothrombotischen Effekts unter OTI. (A) Draht-Denudationsmodell in OTI oder Vehikel behandelten Wildtyp- und IL4R/GPIIb α tg chimären Mäusen sowie nach Anti-GPIIb α -Fab Gabe. (B, C) Flusskammerversuche nach Zugabe eines Anti-GPIIb α Antikörpers oder Kontroll-Antikörpers. Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation wurden analysiert. Der Pfeil gibt die Richtung des Blutflusses an und repräsentiert 120 μm .

Zusammenfassend wurde in dieser Studie gezeigt, dass OTI einen prothrombotischen Effekt auf die Thrombozytenfunktion ausüben, der die erhöhte Rate an akuten Koronarsyndromen bei Patienten mit Dabigatran-Therapie erklären kann. Als zugrunde liegender Mechanismus wurde eine verstärkte thrombozytäre Thrombinbindung über den vWF-Rezeptor identifiziert.

3. Einfluss einer Faktor Xa Inhibition mit Rivaroxaban auf die arterielle Thrombose

Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of FXa Driven Platelet Activation Via Protease Activated Receptor-1; Petzold T*, **Thienel M***, Dannenberg LK*, Mourikis P, Helten C, Ayhan A, M'Pembele R, Achilles A, Trojovský K, Konsek D, Zang Z, Regenauer R, Pircher J, Ehrlich A, Lüsebrink E, Nicolai L, Stocker T, Brandl R, Röschentaler F, Strecker J, Saleh I, Spannagl M, Mayr CH, Schiller HB, Jung C, Gerdes N, Hoffmann T, Levkau B, Hohlfeld T, Zeus T, Schulz C, Kelm M, Polzin A. *Circ Res.* 2019 Dec 20; * contributed equally

Alle direkten oralen Antikoagulantien weisen ein im Vergleich zu VKA günstigeres Nutzen/Risiko-Profil bezüglich Blutungen und Prävention von ischämischen Schlaganfällen auf (Connolly et al., 2009; Giugliano et al., 2013; Granger et al., 2011; Patel et al., 2011). Im Gegensatz zu oralen Thrombininhibitoren wie Dabigatran, unter denen ein Anstieg arterieller Thrombosen beobachtet wurde (Artang et al., 2013), ist eine Therapie mit einem FXa-Inhibitor in den Zulassungsstudien sowie in Metaanalysen mit einem geringeren MI-Risiko assoziiert als VKA (Chatterjee et al., 2013; Giugliano et al., 2013; Granger et al., 2011; Patel et al., 2011). Auch bei Patienten ohne VHF mit stabiler KHK (Eikelboom et al., 2017) oder nach kürzlichem MI (Mega et al., 2012) konnte die Gabe von Rivaroxaban zusätzlich zur antithrombozytären Therapie die Rate an MI, Tod kardiovaskulärer Ursache sowie Schlaganfall reduzieren.

Um zu untersuchen, ob FXa-Antagonisten tatsächlich das Risiko von ischämischen Ereignissen bei Patienten mit Atherosklerose reduzieren, analysierten wir zunächst den Effekt von Rivaroxaban auf die Thrombusbildung in einem in vivo Eisen-III-Chlorid Modell der arteriellen Thrombose in Mäusen. In C57BL/6J Wildtyp-Mäusen, die einmalig mit Rivaroxaban (6 mg/kg Körpergewicht) behandelt wurden, fanden sich deutlich instabilere Thromben mit einer höheren Embolisationsrate im Vergleich zu Kontrollen, die mit einem Vehikel behandelt wurden (Abb. 3.1A). Die histologische Analyse zeigte, dass diese Thromben auch in ihrer Struktur weniger kompakt waren und eine geringere Fibrinogen- und Thrombozytendichte aufwiesen (Abb. 3.1B-D).

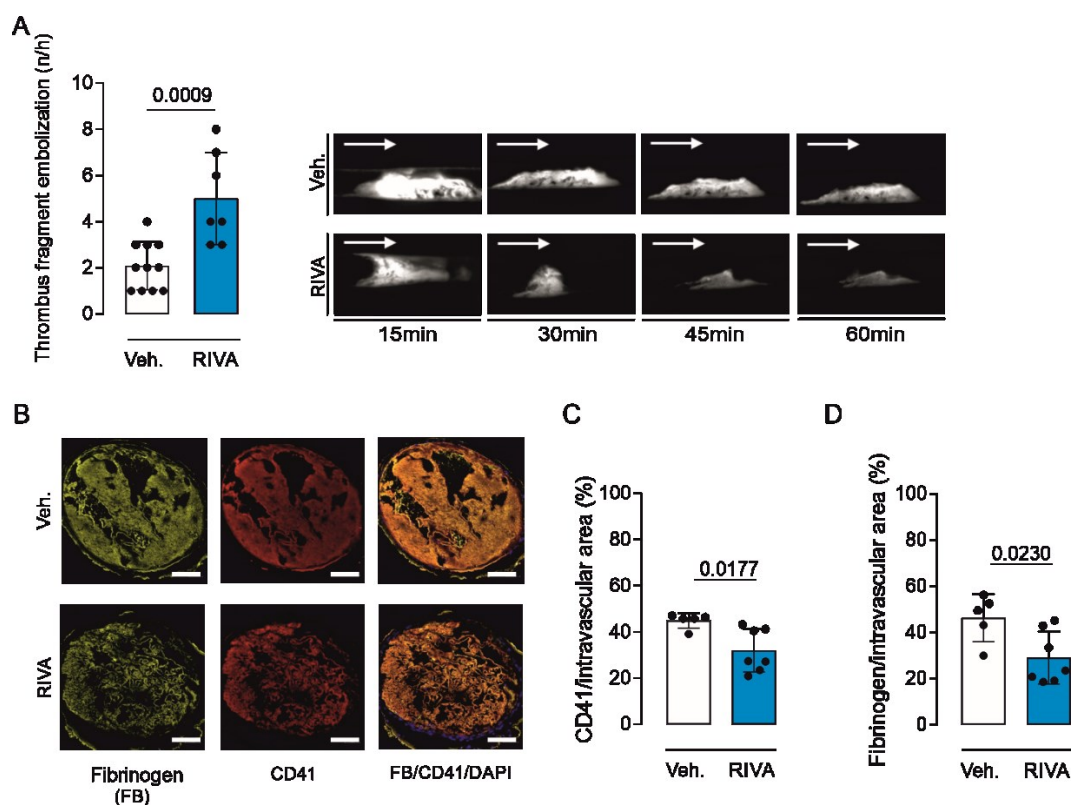


Abbildung 3.1: Verminderte Thrombusstabilität unter Rivaroxaban. (A) Eine Verletzung der Arteria carotis communis wurde mittels Eisen-III-Chlorid an Rivaroxaban behandelten Tieren durchgeführt. Die Thrombusbildung wurde 60 min mittels Fluoreszenz-Mikroskopie beobachtet und die Thrombusembolisation analysiert. Repräsentative Bilder 15, 30, 45 und 60 min nach Induktion der Gefäßverletzung werden gezeigt. Der Pfeil gibt die Flussrichtung an und repräsentiert 500 μ m. (B) Histologische Zusammensetzung der arteriellen Thromben. Beispielhafte Immunfluoreszenzbilder werden gezeigt. Die intravaskuläre Dichte von Thrombozyten (CD41; C) und Fibrinogen (D) wurde quantifiziert. Die Skala stellt 100 μ m dar.

Um einen möglichen direkten antithrombozytären Effekt zusätzlich zur antikoagulatorischen Komponente von Rivaroxaban zu untersuchen, analysierten wir die Thrombozytenaggregation in Vollblut von Patienten unter Rivaroxaban-Therapie mittels Impedanz-basierter Aggregation. Sowohl im Vergleich zu gesunden Patienten als auch bei Patienten vor und nach Therapiebeginn mit Rivaroxaban fanden wir eine deutlich reduzierte Aggregationsantwort nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten (Abb. 3.2A-B). Mittels Plasma-Switch Experiment konnte anschließend gezeigt werden, dass die Hinzugabe von Rivaroxaban-naivem Plasma zu Rivaroxaban behandelten Thrombozyten die Aggregation wieder vollständig herstellen kann (Abb. 3.2C). Weiterhin zeigte sich, dass Rivaroxaban die

Aggregation nur in Thrombozyten reichem Plasma (Platelet-rich-plasma; PRP), nicht jedoch in isolierten, gewaschenen Thrombozyten (washed platelets; WP) beeinflusst (Abb. 3.2D).

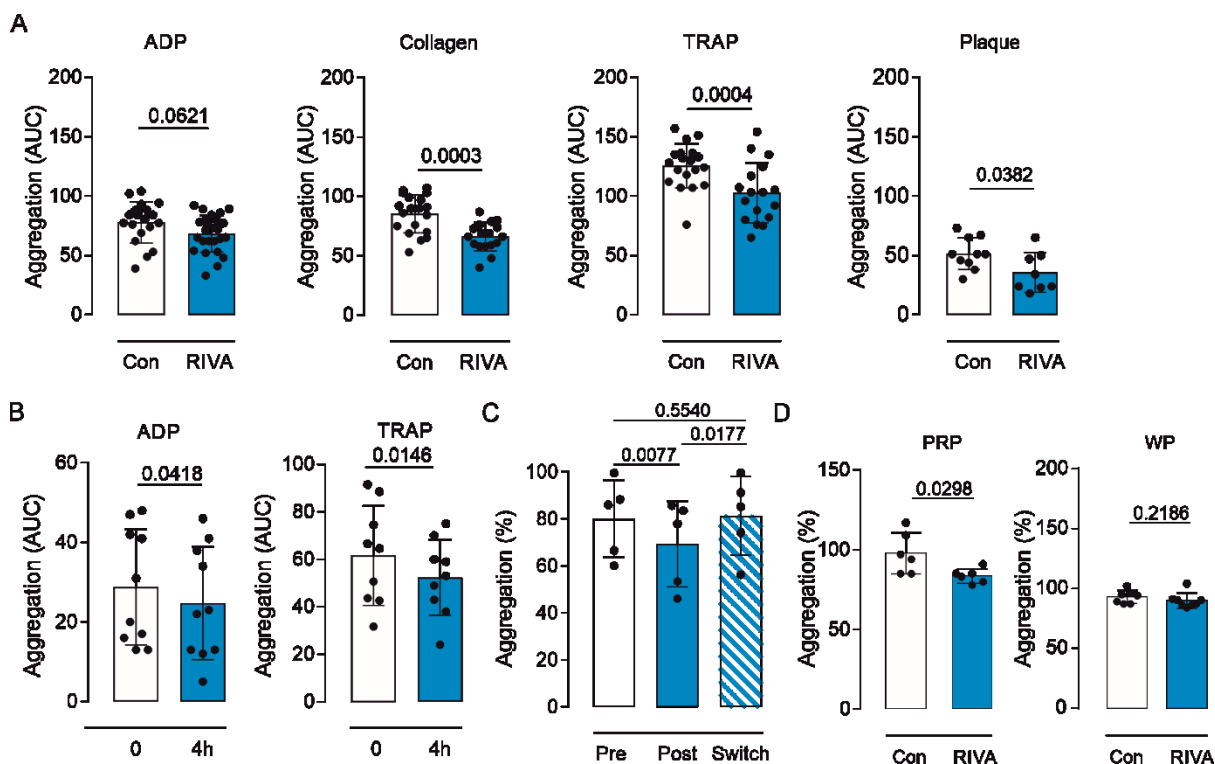


Abbildung 3.2: Verminderte Thrombozytenaggregation unter Rivaroxaban. Aggregation in Vollblut mittels Multiplate nach Stimulation mit den angegebenen Agonisten in (A) Patienten mit dauerhafter Rivaroxaban-Therapie und nicht-behandelten Kontrollen bzw. (B) vor (t:0) und nach (t:4h) Therapiebeginn mit Rivaroxaban. (C) Plasma-Switch Experiment mit Rivaroxaban-naivem Plasma und Rivaroxaban behandelten Thrombozyten und Collagen induzierte Aggregation mittels Lichttransmission. (E) Aggregationsanalyse nach Stimulation mit Collagen in Platelet-rich-Plasma und gewaschenen Thrombozyten aus Rivaroxaban behandelten Patienten oder gesunden Kontrollen.

Um die arterielle Thrombusbildung unter physiologischen Bedingungen beurteilen zu können, führten wir Flusskammerversuche durch, wobei die frühe Phase (< 3 min) der arteriellen Thrombose mit Thrombozytenadhäsion und Aggregatbildung auf einer mit Kollagen beschichteten Oberfläche unter laminaren Flussbedingungen mit einer arteriellen Scherrate von 10 dyn/cm² untersucht wurde. Mittels Fluoreszenzmikroskopie fanden wir eine verminderte Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung in Rivaroxaban behandelten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abb. 3.3A). Um spätere Phasen der Thrombusbildung (3-5 min) zu untersuchen, nutzten wir ein pulsatile arterielles Flusssystem. Sowohl bei dauerhaft behandelten Patienten (Abb. 3.3B) als auch nach einmaliger

Rivaroxaban-Einnahme (Abb. 3.3C) fanden wir eine reduzierte Thrombusbildung auf Collagen. Auch nach Perfusion über pathophysiologisch hoch-relevantem humanem Plaquematerial fanden wir eine verminderte Thrombozytenadhäsion und-aggregation in Rivaroxaban behandeltem Blut (Abb. 3.3D). Das Thrombusvolumen stellte sich in Rivaroxaban behandeltem Blut als deutlich reduziert dar (Abb. 3.3E), wobei die relative Menge an Fluoreszenz-markiertem Fibrinogen, das in den Thrombus integriert wurde, vermindert war, was zu der in vivo beobachteten veränderten Thrombus-Komposition beitragen könnte (Abb. 3.3F).

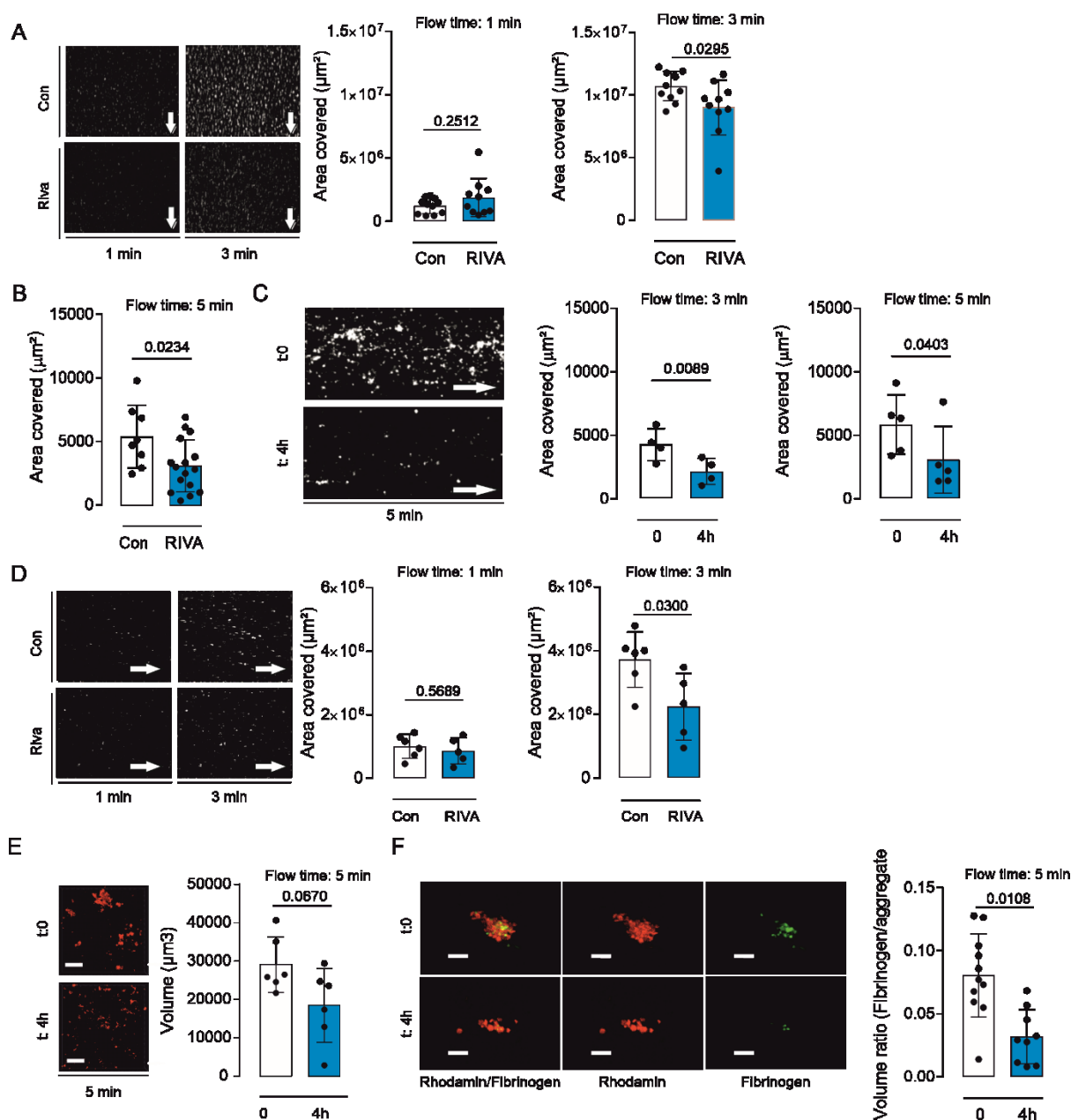


Abbildung 3.3: Rivaroxaban reduziert die Thrombozytenadhäsion unter Flussbedingungen. Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung in Blut von Rivaroxaban behandelten Patienten

oder Kontrollen wurde (A) nach 1 und 3 min laminarem Fluss bzw. (B) nach 5 min pulsatilem Fluss auf Collagen quantifiziert. (C) Serielle Analyse der Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung auf Collagen vor (t:0) und nach (t:4h) Rivaroxaban-Einnahme. (D) Analyse der Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung in Blut von Rivaroxaban behandelten Patienten und Kontrollen nach 1 und 3 min Fluss auf humanem atherosklerotischen Plaquematerial. (E) Analyse des Thrombusvolumen (rot) nach 5 min laminarem Fluss mittels konfokaler Mikroskopie in Blut von Patienten vor (t:0) und nach (t:4h) Rivaroxaban-Einnahme und Hinzugabe von Hirudin (200 U/ml). (F) Analyse der Thrombuskomposition nach 5 min laminarem Fluss mittels konfokaler Mikroskopie in Blut von Patienten vor (t:0) und nach (t:4h) Rivaroxaban-Einnahme und Hinzugabe von Hirudin (200 U/ml). Die relative Fibrinogenmenge (grün) wurde dabei in das Verhältnis zum gesamten Thrombusvolumen (rot) gesetzt. Repräsentative Bilder werden gezeigt. Pfeile geben die Richtung des Blutflusses an und repräsentieren 120 μm in (A), 10 mm in (C), 240 μm in (D), 30 μm in (E) und 4 μm in (F).

Als nächstes testeten wir die Hypothese, dass die FXa-vermittelte Signalübertragung in Abwesenheit von Thrombin direkt zur Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung beiträgt. Daher haben wir in unserem Versuchsaufbau zunächst die Konzentration des katalytisch aktiven FXa bestimmt. Tatsächlich fanden wir in Kontrollblut im Vergleich zu mit Rivaroxaban behandeltem Blut nach 6-minütiger Aggregation in PRP eine erhöhte FXa-Aktivität (Abb. 3.4A). Diese Daten zeigen, dass die Thrombozytenaggregation mit einer FXa-Bildung einhergeht, obwohl sie in Gegenwart von Rivaroxaban katalytisch gehemmt wird. Da FXa und Thrombin Endothelzellen über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) aktivieren können, haben wir die Relevanz dieses Signalwegs nun in Blutplättchen untersucht. Wie in Abbildung 3.4B gezeigt, löst FXa eine frühe Ca^{2+} -Signalisierung aus ähnlich wie TRAP, ein PAR-1-spezifischer Agonist, wobei beides in Gegenwart des klinisch verwendeten PAR-1 Inhibitors Vorapaxar gehemmt werden konnte. Um zu klären, ob FXa-induzierte Signale eine Aggregationsreaktion auslösen können, führten wir Lichttransmissionsaggregometrie in isolierten Thrombozyten durch. Wie in Abbildung 3.4C dargestellt, fanden wir eine dosisabhängige FXa-Aggregationsreaktion, die durch Rivaroxaban gehemmt werden konnte (Abb. 3.4D). Diese Effekte waren spezifisch für FXa, da andere vorgeschaltete Gerinnungsfaktoren wie Faktor Va, Faktor VIIa und Faktor VIIIa keine Thrombozytenaggregation auslösen konnten (Abb. 3.4E).

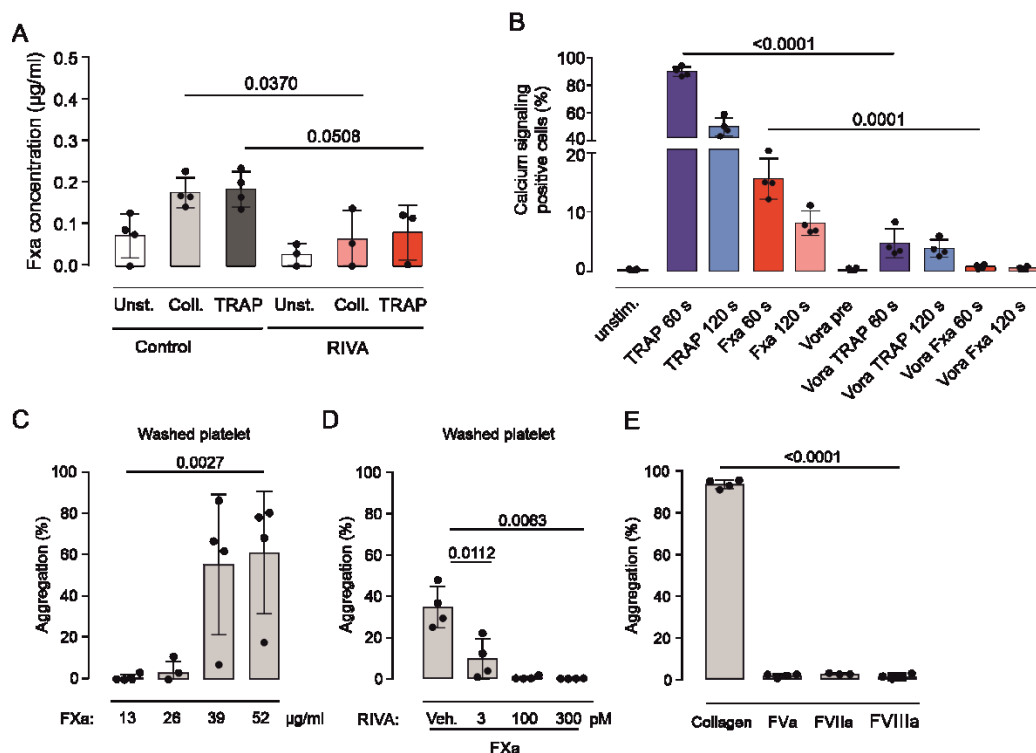


Abbildung 3.4: FXa induziert Thrombozytenaktivierung. (A) Konzentration von katalytisch aktivem FXa nach Lichttransmissionsaggregometrie nach Stimulation mit den angegebenen Agonisten in PRP von Rivaroxaban behandelten Patienten oder Kontrollen. (B) Ca²⁺ Signalling in Thrombozyten nach Stimulation mit FXa und TRAP in Gegenwart des PAR-1 Inhibitors Vorapaxar (VORA) mittels Durchflusszytometrie. (C) Thrombozytenaggregation in isolierten Thrombozyten nach Stimulation mit den angegebenen Konzentrationen von FXa. (D) Thrombozytenaggregation in isolierten Thrombozyten nach Stimulation mit FXa in Gegenwart oder Abwesenheit von Rivaroxaban. (E) Thrombozytenaggregation in isolierten Thrombozyten nach Stimulation mit den angegebenen Agonisten.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass FXa über den PAR-1 Signalweg als potenter Thrombozyten-Agonist unabhängig von Thrombin wirkt. Die Thrombozytenaktivierung, -aggregation und die Thrombusbildung unter Flussbedingungen in vitro sowie die arterielle Thrombose-Bildung in vivo kann dabei durch Rivaroxaban gehemmt werden.

4. Einfluss chronischer Immobilisation auf die Thrombozytenfunktion

Immobility-associated thromboprotection is conserved across mammalian species from bear to human. **Thienel M**, Müller-Reif JB, Zhang Z, Ehreiser V, Huth J, Shchurovska K, Kilani B, Schweizer L, Geyer PE, Zwiebel M, Novotny J, Lüsebrink E, Little G, Orban M, Nicolai L, El Nemr S, Titova A, Spannagl M, Kindberg J, Evans AL, Mach O, Vogel M, Tiedt S, Ormanns S, Kessler B, Dueck A, Friebe A, Jørgensen PG, Majzoub-Altweck M, Blutke A, Polzin A, Stark K, Kääb S, Maier D, Gibbins JM, Limper U, Frobert O, Mann M, Massberg S, Petzold T. *Science*. 2023 Apr 14

Akute Immobilisation ist ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung venöser Thromboembolien (VTE), auch wenn keine zusätzlichen Faktoren wie Trauma oder medizinische Eingriffe vorliegen (Engbers et al., 2014). Ein verminderter Blutfluss in den venösen Gefäßen führt dabei zu einer Hypoxie der Endothelzellen (Stark and Massberg, 2021). Durch Rekrutierung von Thrombozyten zum aktivierten Endothel werden das plasmatische Gerinnungssystem und angeborene Immunzellen aktiviert, was schließlich im zentralen Pathomechanismus der venösen Thromboembolie, der Thromboinflammation, gipfelt (Engelmann and Massberg, 2013; von Bruhl et al., 2012). Obwohl Immobilisation ein starker Risikofaktor für venöse Thromboembolien ist, weisen chronisch gelähmte Patienten nach Rückenmarksverletzung trotz langfristiger Immobilisierung ein Thromboserisiko auf, das dem der Allgemeinbevölkerung ähnlich ist (Giorgi Pierfranceschi et al., 2013; Godat et al., 2015; Maxwell et al., 2002).

Winterschlafende Braunbären (*Ursus arctos*) sind ein weiteres Beispiel für einen Organismus, der langfristiger Immobilität ausgesetzt ist. Während ihres 4-7 Monate langen Winterschlafes zeigen Braunbären bemerkenswerte metabolische Plastizität, um sich an die feindlichen Umweltbedingungen im Winter anzupassen. Diese langanhaltende Immobilisation während des Winterschlafs wurde jedoch nicht mit einer erhöhten Rate an VTE-assoziierten Komplikationen in Verbindung gebracht. Ein typisches Beispiel hierfür sind schwedische Braunbären, die eine Mortalität von nur 0,4 % während des Winterschlafs im Vergleich zu 58,4 % während der aktiven Phase aufweisen. Bei diesen Bären waren die D-Dimer-Werte, ein etablierter klinischer Parameter für venöse Thrombosen, im Vergleich zu den aktiven Bären sogar reduziert (Abb. 4.1A). Dies deutet darauf hin, dass die Immobilisierung während des Winterschlafs nicht mit einem relevanten Anstieg der VTE-Raten verbunden ist. Anhand von Autopsie-Proben von nicht-winterschlafenden Zoobären konnte die Antragstellerin allerdings zeigen, dass aktive Braunbären sehr wohl in der Lage sind VTE zu entwickeln. So zeigte die histologische Analyse von Lungenschnitten bei einigen Bären venöse Thromben wie sie auch

bei Patienten mit Lungenembolien gefunden werden, einschließlich intravaskulärer NETs (Abb. 4.1B und C). Braunbären verfügen also über ein Gerinnungssystem, das es ihnen ermöglicht, VTE zu entwickeln, aber sie scheinen vor Immobilitäts-assoziierten VTE während des Winterschlafs geschützt zu sein.

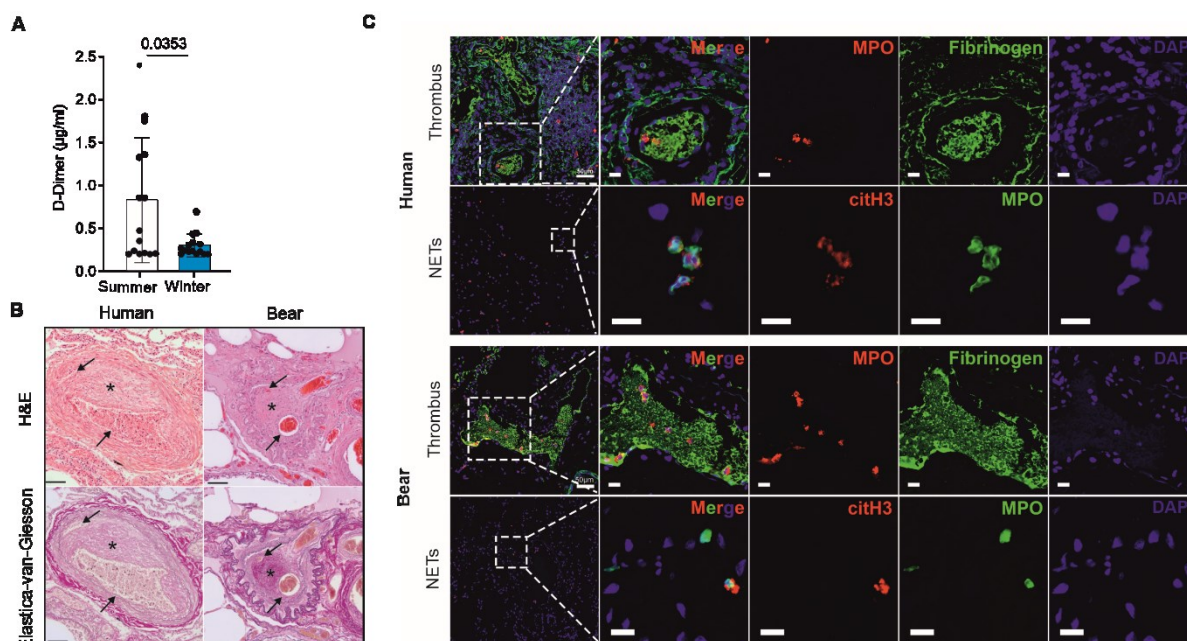


Abbildung 4.1: Venöse Thrombose bei Braunbären. (A) D-Dimer-Werte wurden seriell in Plasma von Braunbären, die im Rahmen des Scandinavian Brown Bear Research Projekts beobachtet wurden, in der aktiven Phase und während des Winterschlafs gemessen. (B) Histologische Bilder von organisierten und rekanalisierten pulmonalen Thromben in humanen und Bärenlungen. Pfeile zeigen Neo-Gefäßlumina innerhalb organisierter Thromben (Sternchen). Hämatoxylin-Eosin (H&E), Elastica-van-Giesson. Skala repräsentiert 50 mm. (C) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von pulmonalen Thromben in menschlichen (oberer Satz) und Bärenlungen (unterer Satz). (Oben) rot = MPO; grün = Fibrinogen; blau = 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI). Skalenbalken zeigen 50 mm an. (Unten) Vergrößerung der Thrombusbereiche mit NET-Strukturen. Grün = MPO; blau = DAPI; rot = CitH3; Skalenbalken zeigen 10 mm an.

Um Faktoren zu identifizieren, die möglicherweise zu einem antithrombotischen Mechanismus während des Winterschlafs beitragen, haben wir 13 subadulte Braunbären während des Winterschlafs und der anschließenden Aktivitätsperiode im Frühsommer in Mittelschweden untersucht. Thrombelastographische Analysen mittels ROTEM-System in Vollblut sowie Aktivitätsanalysen einzelner Gerinnungsfaktoren erbrachten keine relevanten Unterschiede zwischen Sommer- und Winterblut. Um die Thrombozytenfunktion zu untersuchen, führten wir

anschließend Aggregationsversuche in frisch isolierten, gewaschenen Thrombozyten durch. Im Vergleich zum Sommer war die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit fibrillärem Kollagen und niedrigen, aber nicht hohen Thrombin-Konzentrationen im Winter verzögert (Abb. 4.2A). Um die molekulare Grundlage der verminderten Thrombozytenreaktivität gegenüber Kollagen und Thrombin während der Immobilität zu klären, führten wir Massenspektrometrie-basierten Proteom-Analysen durch. Trotz schlechter Annotation des Bärengenoms konnten über 2678 Proteine identifiziert und quantifiziert werden. Das Proteom der Thrombozyten unterscheidet sich deutlich zwischen winterschlafenden und aktiven Braunbären, wobei 151 Proteinen signifikant (FDR < 5 %) und im absoluten Durchschnitt um das 2,1-fache verändert waren. Es zeigte sich, dass die Thrombozyten im Winter einen antithrombotischen Phänotyp aufweisen, wobei das von den Thrombozyten exprimierte Hitzeschockprotein 47 (HSP47) das am stärksten herunterregulierte Protein war (Abb. 4.2B). Im Durchschnitt war HSP47 55-fach in den Blutplättchen überwinternder Bären herunterreguliert, 10-mal mehr als das am zweitstärksten regulierte Protein (Abb. 4.2C).

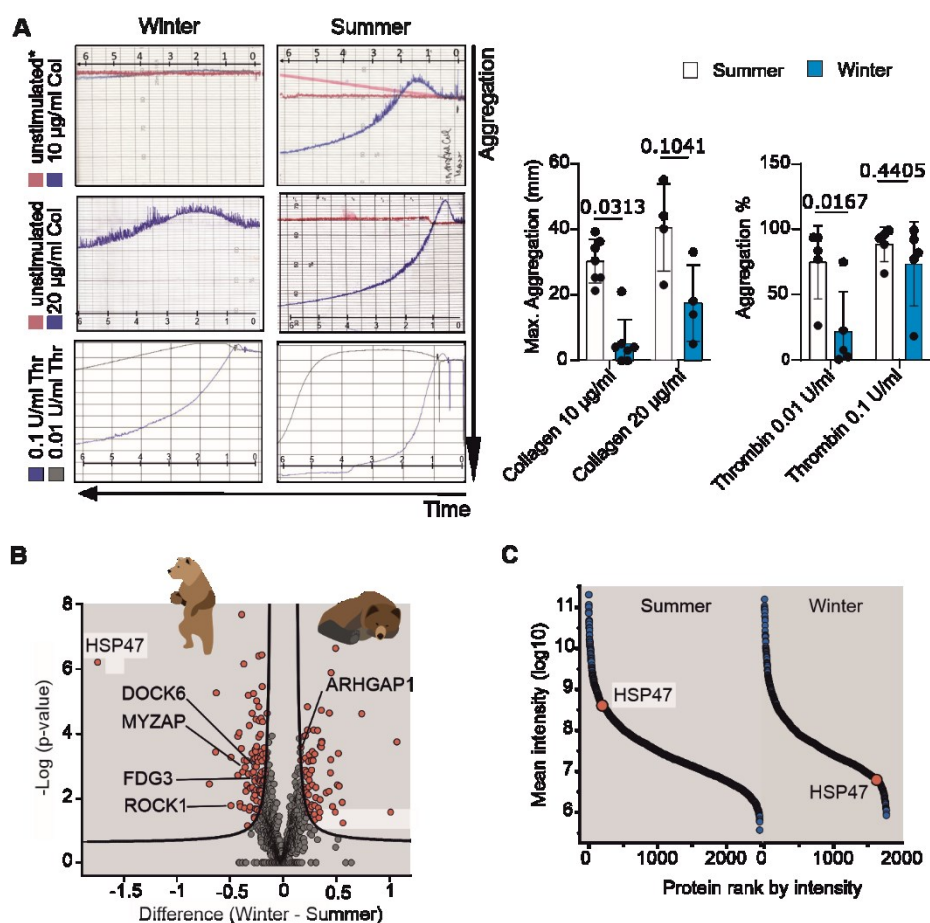


Abbildung 4.2: Thrombozytenfunktion in winterschlafenden Braunbären. (A) Lichttransmissionsaggregometrie in gewaschenen Thrombozyten von Winter- und

Sommerbären wurde nach Stimulation mit den angegebenen Agonisten durchgeführt. Die maximale Aggregation nach 6 min wurde ermittelt, repräsentative Aggregationskurven sind dargestellt. (B) Die statistische Analyse des Thrombozytenproteoms von winterschlafenden und aktiven Bären zeigt HSP47 als das am stärksten veränderte Protein. (C) Proteom von Bärenplättchen, geordnet nach der mittleren Proteinintensität der acht Individuen für Sommer und Winter. Der Rang von HSP47 ändert sich von 184 (Sommer) auf 1624 (Winter).

HSP47, auch bekannt unter Serin Protease Inhibitor H1 (SERPINH1), gehört zur SERPIN-Superfamilie, besitzt jedoch selbst keine hemmende Wirkung auf Serin Proteasen. In Fibroblasten wirkt es als Chaperon im endoplasmatischen Retikulum und ermöglicht speziell die Kollagenfaltung und -sekretion in den extrazellulären Raum. Kürzlich wurde es auf der Thrombozytenoberfläche nachgewiesen, wo es zusammen mit GPVI und Integrin $\alpha 2\beta 1$ die Thrombozytenaktivierung über Kollagen verstärkt (Sasikumar et al., 2018). In unserer Forschungsarbeit fanden wir nach genetischer Ablation von HSP47 in einem in vivo Mausmodell der venösen Thrombose eine reduzierte Thrombusinzidenz und -größe (Abb. 4.3A und B). Gleichzeitig war die Rate von NETs in den murinen Thromben deutlich reduziert (Abb. 4.3C). Auch in vitro in isolierten Zellen von Braunbären (Abb. 4.3D) sowie nach pharmazeutischer Hemmung durch einen Small-Molecule-Inhibitor (SMI) in humanen Zellen (Abb. 4.3E) fanden wir eine verminderte Thrombozyten-Neutrophilen-Interaktion.

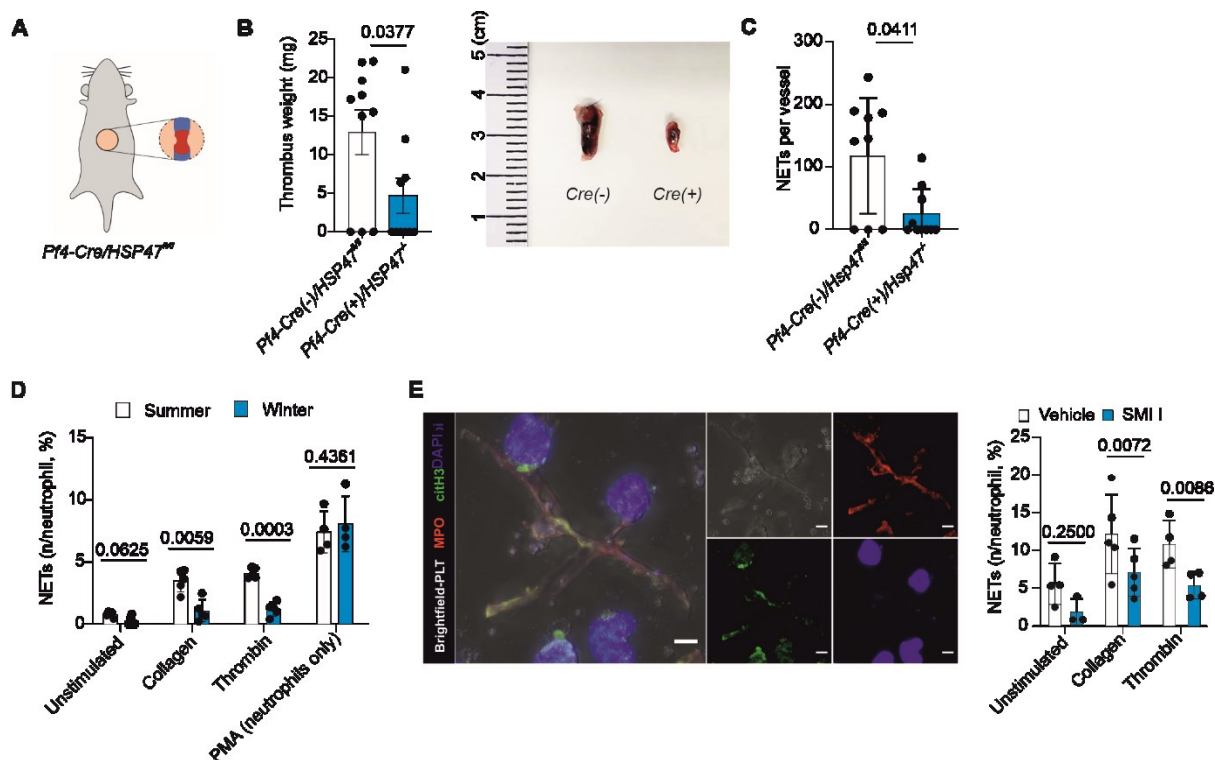


Abbildung 4.3: Antithrombotische Mechanismen der HSP47 Inhibition. (A) Schema des Vena cava Thrombose Modells in Mäusen. (B) Thrombusgewicht nach 48 Stunden. (C) NETs in

explantierten Thromben von HSP47 Knock-out Mäusen und Kontrolltieren. (D) Quantifizierung von NETs pro Neutrophilen in Bären nach Stimulation der Thrombozyten mit den angegebenen Agonisten. (E) In vitro NET Formation nach HSP47 Inhibition mittels Small Molecule Inhibitor (SMI) in einem Co-Kulturmodell humaner Thrombozyten und neutrophiler Granulozyten nach Stimulation mit den angegebenen Agonisten wurde mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Skala repräsentiert 5 μ m.

Zur Verifizierung der Relevanz dieses thromboprotektiven Mechanismus in Menschen, rekrutierten wir 23 chronisch (> 1 Jahr) immobile Patienten, die aufgrund einer Rückenmarksverletzung entweder bettlägerig oder an den Rollstuhl gebunden waren (Abb. 4.4A). Idem zu den Ergebnissen in winterschlafenden Braunbären fanden wir in dauerhaft immobilen Patienten deutlich reduzierte HSP47-Werte im Vergleich zu alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen sowohl mittels Durchflusszytometrie (Abb. 4.4B) als auch mittels Immunoblotting (Abb. 4.4C). Die Thrombozyten-Neutrophilen-Interaktion gemessen an Neutrophilen-Thrombozyten-Aggregaten (Abb. 4.4D) und NET-Formation in vitro (Abb. 4.4E) war deutlich vermindert und korrelierte positiv mit den gemessenen HSP47-Werten, wobei niedrigere HSP47-Werte mit einer geringeren Zell-Zell-Interaktion einhergingen (Abb. 4.4F). Um diese Ergebnisse zusätzlich in einem physiologischen Setting zu prüfen, analysierten wir in Kooperation mit dem Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) und der National Aeronautics and Space Administration (NASA) Thrombozytenproben von gesunden Probanden einer Bed-Rest Studie (Abb. 4.4G). Hier bestätigte sich nach 27 Tagen Immobilität ein deutlicher Abfall der HSP47-Werte (Abb. 4.4H). In der Analyse von immobilen (d.h. weniger aktiven) Mutterschweinen 4 Wochen nach Geburt der Ferkel zeigte sich ebenso eine Herabregulation von HSP47, was unterstreicht, dass der Mechanismus über verschiedene Spezies konserviert ist (Abb. 4.4I).

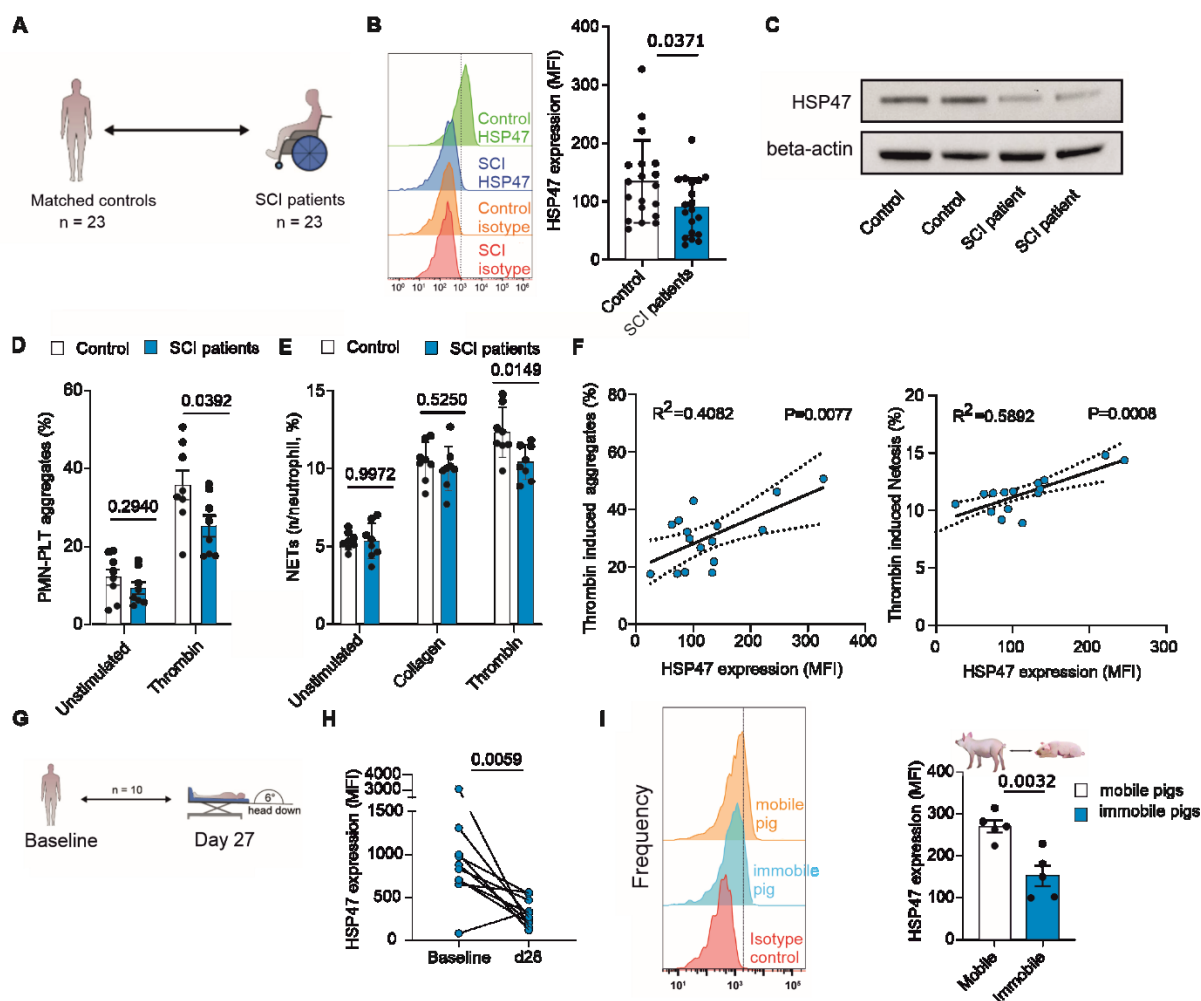


Abbildung 4.4: Verminderte Thrombosebildung durch HSP47 Herabregulation. (A) Schematische Darstellung der rekrutierten immobilen Patienten mit Rückenmarksverletzung (spinal cord injury = SCI). (B) HSP47 Expression (MFI) auf den Thrombozyten in gesunden Kontrollen und immobilen Patienten. Repräsentative Histogramme werden gezeigt. (C) Repräsentative HSP47 Immunoblots aus humanen Thrombozyten von immobilen Patienten und gematchten gesunden Kontrollen. (D) Quantifizierung von Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregaten nach Stimulation der Thrombozyten mit Thrombin. (E) Quantifizierung von NETs pro Neutrophilen nach Stimulation der Thrombozyten mit den angegebenen Agonisten. (F) Gepoolte Korrelationsanalyse (Patienten und gesunde Kontrollen) der HSP47 Expression mit den Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregaten (links) bzw. der NET-Formation (rechts) nach Stimulation mit Thrombin, dargestellt als R^2 -Werte. (G) Schematische Darstellung der Bed-Rest-Kohorte. (H) Serielle Analyse der HSP47-Expression zu den angegebenen Zeitpunkten. (I) HSP47-Expression auf Thrombozyten von immobilen and mobilen Schweinen. Repräsentative Histogramme werden gezeigt.

Zusammenfassend konnte ich in dieser Arbeit anhand verschiedener Spezies, darunter Mäuse, Schweine, Braunbären und Menschen, einen bisher nicht bekannten, evolutionär konservierten, antithrombotischen Mechanismus nachweisen, der bei dauerhafter Immobilisation vor venösen Thrombosen schützt. Diese revolutionäre Entdeckung ebnet den Weg für neue Therapien, die spezifisch an der thromboinflammatorischen Komponente venöser Thrombose ansetzen. Weiterführende Studien werden mögliche Therapieansätze testen und eine klinische Umsetzung dieser Ergebnisse ermöglichen.

Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl die molekularen Mechanismen der Thrombozytenaktivierung sowie ihre spezifischen Einflussfaktoren für die klinische Patientenversorgung und die Entwicklung neuer Therapieansätze der arteriellen und venösen Thrombose von essentieller Bedeutung sind, sind sie nur unzureichend verstanden. Ziel dieser Habilitationsschrift ist daher, einen Beitrag zu einem verbesserten Verständnis der Thrombozytenfunktion sowie externe und interne Einflussfaktoren zu leisten.

In der ersten Studie zur Rolle thrombozytärer β 1-Integrine wurde analysiert, ob genetische Veränderungen in der β 1-Aktivierungsdomäne zu Blutungskomplikationen in einem Hochrisiko-Kollektiv beitragen. Vorab konnte gezeigt werden, dass Kollagen induzierte und β 1-Integrin vermittelte Signale die Granula-Sezernierung aus Thrombozyten regulieren und somit zur Schaffung eines prothrombotischen Mikromilieus während der Thrombusbildung beitragen (Petzold et al., 2013). Nach retrospektiver Datenanalyse von 14.160 Patienten aus sieben randomisierten klinischen Studien, wurde bei 741 Patienten mit Blutungskomplikationen post-PCI nach genetischen Mutationen innerhalb der β 1-Integrin-Aktivierungsdomäne mittels Sequenzierung gescreent. Es ergab sich allerdings kein Hinweis darauf, dass Mutationen innerhalb der Integrin- β 1-Aktivierungsdomäne einen signifikanten Einfluss auf Blutungsereignissen nach PCI haben.

Die vorliegenden Daten unterstreichen, dass die Aktivierungsdomäne des β 1-Integrins evolutionär konserviert ist und genetische Veränderungen äußerst selten vorkommen. Das scheint plausibel, da ein völliger Mangel an funktionalem Integrin- β 1 zu einer frühen embryonalen Letalität bei Mäusen führt (Lowell and Mayadas, 2012). Darüber hinaus stimmen unsere Daten mit früheren Studien überein, die sich auf die Rolle des Kollagenrezeptor-Integrins α 2 β 1 konzentrierten. Obwohl gezeigt wurde, dass die α 2-Integrin-Polymorphismen C807T und G873A mit der Expression der Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche zusammenhängen (Kunicki et al., 1997; Kunicki et al., 1993), konnten sie jedoch nicht mit thrombo-ischämischen Endpunkten in Hochrisiko-Populationen in Verbindung gebracht werden (Moshfegh et al., 1999; Santoso et al., 1999; von Beckerath et al., 2000). Diese Erkenntnisse sprechen in Summe gegen eine relevante Rolle des Integrins α 2 β 1 während der primären Hämostase und somit in der Prävention von Blutungskomplikationen. Um Patienten ausfindig zu machen, die einem hohen periprozeduralen Risiko ausgesetzt sind, sind daher weitere genomweite Assoziationsstudien erforderlich, um SNPs zu identifizieren, die mit klinisch relevanten Blutungen assoziiert sind.

In weiteren Projekten wurde die Rolle der DOAKs auf die Thrombozytenfunktion untersucht. Bereits in den Zulassungsstudien zeigten sich überraschende Effekte auf die Thrombozytenfunktion und die Häufigkeit arterieller Thrombosen (Connolly et al., 2009; Giugliano et al., 2013; Granger et al., 2011; Patel et al., 2011). In der hier berichteten Forschungsarbeit zu oralen Thrombininhibitoren konnte gezeigt werden, dass Dabigatran über eine verstärkte thrombozytäre Thrombinbindung einen prothrombotischen Effekt auf die Thrombozytenfunktion ausübt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer translationaler Studien, die ebenfalls einen prothrombotischen Einfluss von Dabigatran beobachtet haben (Achilles et al., 2017). Im Gegensatz dazu wurde eine FXa-Inhibition mit einer geringeren Rate an arteriellen Thrombosen assoziiert. So konnte die COMPASS-Studie zeigen, dass eine niedrigdosierte Rivaroxaban Therapie von 2,5 mg zweimal täglich zusätzlich zu ASS die Mortalität von Patienten mit stabiler KHK reduziert (Eikelboom et al., 2017), was auch Eingang in die aktuellen Leitlinien fand (Collet et al., 2021). In der ATLAS ACS 2-TIMI 51 Studie wurde Rivaroxaban bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom zusätzlich zur DAPT mit Clopidogrel und ASS untersucht. Hier zeigte sich eine Reduzierung von ischämischen Ereignissen und kardiovaskuläre Mortalität bei allerdings erhöhtem Risiko für Blutungen (Mega et al., 2012). Passend dazu konnte in meiner dritten Forschungsarbeit gezeigt werden, dass die Thrombozytenaggregation unter arteriellen Flussbedingungen *in vitro* sowie die Thrombose-Bildung *in vivo* in einem murinen Modell der arteriellen Thrombose durch FXa-Inhibition reduziert werden.

Neben der VHF-KHK-Achse stellt die Aortenklappenstenose mit dem kathetergestützten Aortenklappenersatz aufgrund des Risikos einer subklinischen Leaflet-Thrombose eine komplexe Herausforderung an eine suffiziente Plättcheninhibition dar. Interessanterweise konnten DOAKs hier bislang als Therapie-Alternative zu Thrombozytenaggregationshemmern nicht überzeugen. In der GALILEO-Studie wurde bei Patienten nach transfemoralem Aortenklappenersatz ohne Indikation für eine orale Antikoagulation unter Rivaroxaban höhere Raten an Tod, Thrombembolien und Blutungen beobachtet im Vergleich zur dualen antithrombozytären Therapie (Dangas et al., 2020). Auch bei Patienten die nach mechanischem Aortenklappenersatz mit Dabigatran antikoagulierte wurden, zeigten sich vermehrt thrombembolische Ereignisse (Eikelboom et al., 2013). Vor dem Hintergrund der per se effizienten Antikoagulation durch DOAKs erscheinen diese klinischen Daten paradox und belegen, dass es neben den bereits gezeigten weitere relevante additive Effekte von DOAKs zu geben scheint, die bislang nicht ausreichend bekannt sind. Weiterführende klinische und experimentelle Studien sind daher nötig, um eine effiziente, aber sichere Antikoagulation zu ermöglichen.

Thrombozyten sind neben ihrer Hauptaufgabe der Gerinnung an zahlreichen weiteren Prozessen wie Inflammation und Gewebsregeneration beteiligt (Gawaz et al., 2005; Liu et al., 2011; Menter et al., 2017). Bei all diesen Prozessen ist entscheidend, dass Thrombozyten in der Lage sind, eine Vielzahl bioaktiver Substanzen – das sogenannte Sekretom - zielgerichtet freizusetzen. Trotz des fehlenden Zellkerns in Thrombozyten kann eine translationale Regulation auf Ebene der Megakaryozyten, als Thrombozyten-Vorläufer, sowie zum geringen Teil in Thrombozyten selbst erfolgen (McRedmond et al., 2004; Weyrich et al., 2004). In einer translationalen Studie in Kooperation mit der Universität Düsseldorf soll nun in einer nachfolgenden Studie untersucht werden, inwieweit die thrombozytäre Proteinbiosynthese sowie Granula-Sekretion unter dauerhafter DOAK-Einnahme verändert ist.

Eine weitere Indikation für DOAKs stellt die Prävention und Behandlung venöser Thrombosen dar. Trotz eines erhöhten Blutungsrisikos weist eine alleinige antikoagulatorische Therapie jedoch keinen umfassenden Schutz vor der Entstehung venöser Thromboembolien auf. In den letzten Jahren rückte eine gestörte Thrombozyten-Neutrophilen Interaktion als zentraler Pathomechanismus venöser Thrombosen immer mehr in den Fokus der Forschung (Stark and Massberg, 2021). Innovative Therapiekonzepte, die spezifisch an der thromboinflammatorischen Komponente ansetzen, stehen bisher allerdings noch nicht zur Verfügung. Im vierten Forschungsprojekt wurde anhand verschiedener Spezies - darunter winterschlafende Braunbären, immobile Schweine, freiwillige Teilnehmer einer Bed-Rest Studie und dauerhaft immobile Patienten nach Rückenmarksverletzung - ein bisher nicht bekannter, evolutionär konservierter, antithrombotischer Mechanismus nachgewiesen, der bei dauerhafter Immobilisation vor venösen Thrombosen schützt. Hierbei wird HSP47 auf der Oberfläche der Thrombozyten herabreguliert und vermindert so die Thrombozyten-Neutrophilen Interaktion. Diese revolutionäre Entdeckung erklärt, warum das VTE-Risiko langfristig immobilisierter Patienten nach Rückenmarksverletzung ähnlich hoch ist wie das der Allgemeinbevölkerung (Godat et al., 2015; Maxwell et al., 2002). Es ebnet den Weg für neue Therapien, die spezifisch an der thromboinflammatorischen Komponente venöser Thrombosen ansetzen. Weiterführende Studien werden die molekulare Basis der HSP47 Herabregulation untersuchen sowie mögliche Therapieansätze testen und eine klinische Umsetzung dieser Ergebnisse prüfen. Zusammenfassend wird unsere Entdeckung zur Entwicklung, neuer, innovativer Therapieansätze bei Patienten mit venöser Thrombose sowie anderen thromboinflammatorischen, kardiovaskulären Erkrankungen beitragen.

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Aspirin
CitH3	Citrullinated Histone H3
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DAPT	Duale antithrombozytäre Therapie
DLR	Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOAK	Direkt orale Antikoagulantien
ESA	European Space Agency
FB	Fibrinogen
FDR	False discovery rate
FIIa	Aktivierter Faktor II (Thrombin)
FXa	Aktivierter Faktor X
GP1a/IIa	Glykoprotein Ia/IIa
GPIba	Glykoprotein Iba
GPIIbIIIa	Glykoprotein IIbIIIa
GPVI	Glykoprotein VI
HSP47	Hitzeschockprotein 47
H&E	Hämatoxylin-Eosin
KHK	Koronare Herzerkrankung
MI	Myokardinfarkt (Herzinfarkt)
MPO	Myeloperoxidase
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NET	Neutrophil extracellular trap
NOAK	Neue orale Antikoagulantien
OTI	Oraler Thrombininhibitor
PAR	Protease-activated Rezeptor
PCI	Perkutane Koronarintervention
PRP	Platlet-rich-Plasma
RIVA	Rivaroxaban
SERPINH1	Serine Protease Inhibitor H1
SMI	Small molecule inhibitor

SCI	Spinal cord injury
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
TRAP	Thrombin-Rezeptor aktivierendes Protein
Veh	Vehikel
VHF	Vorhofflimme
VKA	Vitamin-K Antagonist
VORA	Vorapaxar
VTE	Venöse Thrombembolie
vWF	von-Willebrand-Faktor
WP	Washed platelets

Literaturverzeichnis

(2021). Corrigendum to: 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 42, 2298.

Achilles, A., Mohring, A., Zeus, T., Kelm, M., and Polzin, A. (2017). Dabigatran enhances platelet reactivity and platelet thrombin receptor expression in patients with atrial fibrillation: reply. *J Thromb Haemost* 15, 1524-1525.

Artang, R., Rome, E., Nielsen, J.D., and Vidaillet, H.J. (2013). Meta-analysis of randomized controlled trials on risk of myocardial infarction from the use of oral direct thrombin inhibitors. *Am J Cardiol* 112, 1973-1979.

Calderwood, D.A., Campbell, I.D., and Critchley, D.R. (2013). Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 503-517.

Chatterjee, S., Sharma, A., Uchino, K., Biondi-Zoccai, G., Lichstein, E., and Mukherjee, D. (2013). Rivaroxaban and risk of myocardial infarction: insights from a meta-analysis and trial sequential analysis of randomized clinical trials. *Coron Artery Dis* 24, 628-635.

Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., *et al.* (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13, 463-469.

Collet, J.P., Thiele, H., Barbato, E., Barthélémy, O., Bauersachs, J., Bhatt, D.L., Dendale, P., Dorobantu, M., Edvardsen, T., Folliguet, T., *et al.* (2021). 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 42, 1289-1367.

Connolly, S.J., Ezekowitz, M.D., Yusuf, S., Eikelboom, J., Oldgren, J., Parekh, A., Pogue, J., Reilly, P.A., Themeles, E., Varrone, J., *et al.* (2009). Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 361, 1139-1151.

Dangas, G.D., Tijssen, J.G.P., Wöhrle, J., Søndergaard, L., Gilard, M., Möllmann, H., Makkar, R.R., Herrmann, H.C., Giustino, G., Baldus, S., *et al.* (2020). A Controlled Trial of Rivaroxaban after Transcatheter Aortic-Valve Replacement. *N Engl J Med* 382, 120-129.

Dumas, J.J., Kumar, R., Seehra, J., Somers, W.S., and Mosyak, L. (2003). Crystal structure of the GpIb α -thrombin complex essential for platelet aggregation. *Science* 301, 222-226.

Eikelboom, J.W., Connolly, S.J., Bosch, J., Dagenais, G.R., Hart, R.G., Shestakovska, O., Diaz, R., Alings, M., Lonn, E.M., Anand, S.S., *et al.* (2017). Rivaroxaban with or without Aspirin in Stable Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 377, 1319-1330.

Eikelboom, J.W., Connolly, S.J., Brueckmann, M., Granger, C.B., Kappetein, A.P., Mack, M.J., Blatchford, J., Devenny, K., Friedman, J., Guiver, K., *et al.* (2013). Dabigatran versus warfarin in patients with mechanical heart valves. *N Engl J Med* 369, 1206-1214.

Engbers, M.J., Blom, J.W., Cushman, M., Rosendaal, F.R., and van Hylckama Vlieg, A. (2014). The contribution of immobility risk factors to the incidence of venous thrombosis in an older population. *J Thromb Haemost* 12, 290-296.

Engelmann, B., and Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 34-45.

Gaertner, F., and Massberg, S. (2019). Patrolling the vascular borders: platelets in immunity to infection and cancer. *Nat Rev Immunol* 19, 747-760.

Gawaz, M., Langer, H., and May, A.E. (2005). Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 115, 3378-3384.

Giorgi Pierfranceschi, M., Donadini, M.P., Dentali, F., Ageno, W., Marazzi, M., Bocchi, R., and Imberti, D. (2013). The short- and long-term risk of venous thromboembolism in patients with acute spinal cord injury: a prospective cohort study. *Thromb Haemost* 109, 34-38.

Giugliano, R.P., Ruff, C.T., Braunwald, E., Murphy, S.A., Wiviott, S.D., Halperin, J.L., Waldo, A.L., Ezekowitz, M.D., Weitz, J.I., Spinar, J., *et al.* (2013). Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 369, 2093-2104.

Godat, L.N., Kobayashi, L., Chang, D.C., and Coimbra, R. (2015). Can we ever stop worrying about venous thromboembolism after trauma? *J Trauma Acute Care Surg* 78, 475-480; discussion 480-471.

Granger, C.B., Alexander, J.H., McMurray, J.J., Lopes, R.D., Hylek, E.M., Hanna, M., Al-Khalidi, H.R., Ansell, J., Atar, D., Avezum, A., *et al.* (2011). Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 365, 981-992.

Hausleiter, J., Kastrati, A., Mehilli, J., Schühlen, H., Pache, J., Dotzer, F., Glatthor, C., Siebert, S., Dirschinger, J., and Schömig, A. (2004). A randomized trial comparing phosphorylcholine-coated stenting with balloon angioplasty as well as abciximab with placebo for restenosis reduction in small coronary arteries. *J Intern Med* 256, 388-397.

Heit, J.A., Spencer, F.A., and White, R.H. (2016). The epidemiology of venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis* 41, 3-14.

Italiano, J.E., Jr., and Shivdasani, R.A. (2003). Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost* 1, 1174-1182.

Kastrati, A., Mehilli, J., Neumann, F.J., Dotzer, F., ten Berg, J., Bollwein, H., Graf, I., Ibrahim, M., Pache, J., Seyfarth, M., *et al.* (2006). Abciximab in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention after clopidogrel pretreatment: the ISAR-REACT 2 randomized trial. *Jama* 295, 1531-1538.

Kastrati, A., Mehilli, J., Schühlen, H., Dirschinger, J., Dotzer, F., ten Berg, J.M., Neumann, F.J., Bollwein, H., Volmer, C., Gawaz, M., *et al.* (2004). A clinical trial of abciximab in elective percutaneous coronary intervention after pretreatment with clopidogrel. *N Engl J Med* 350, 232-238.

Kastrati, A., Neumann, F.J., Mehilli, J., Byrne, R.A., Iijima, R., Büttner, H.J., Khattab, A.A., Schulz, S., Blankenship, J.C., Pache, J., *et al.* (2008). Bivalirudin versus unfractionated heparin during percutaneous coronary intervention. *N Engl J Med* 359, 688-696.

Kastrati, A., Neumann, F.J., Schulz, S., Massberg, S., Byrne, R.A., Ferenc, M., Laugwitz, K.L., Pache, J., Ott, I., Hausleiter, J., *et al.* (2011). Abciximab and heparin versus bivalirudin for non-ST-elevation myocardial infarction. *N Engl J Med* 365, 1980-1989.

Khan, F., Tritschler, T., Kahn, S.R., and Rodger, M.A. (2021). Venous thromboembolism. *Lancet* 398, 64-77.

Knuuti, J., Wijns, W., Saraste, A., Capodanno, D., Barbato, E., Funck-Brentano, C., Prescott, E., Storey, R.F., Deaton, C., Cuisset, T., *et al.* (2020). 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J* 41, 407-477.

Kunicki, T.J., Kritzik, M., Annis, D.S., and Nugent, D.J. (1997). Hereditary variation in platelet integrin alpha 2 beta 1 density is associated with two silent polymorphisms in the alpha 2 gene coding sequence. *Blood* 89, 1939-1943.

Kunicki, T.J., Orzechowski, R., Annis, D., and Honda, Y. (1993). Variability of integrin alpha 2 beta 1 activity on human platelets. *Blood* 82, 2693-2703.

Kwok, C.S., Rao, S.V., Myint, P.K., Keavney, B., Nolan, J., Ludman, P.F., de Belder, M.A., Loke, Y.K., and Mamas, M.A. (2014). Major bleeding after percutaneous coronary intervention and risk of subsequent mortality: a systematic review and meta-analysis. *Open Heart* 1, e000021.

Labelle, M., Begum, S., and Hynes, R.O. (2011). Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 20, 576-590.

Liu, Y., Gao, X.M., Fang, L., Jennings, N.L., Su, Y., Q, X., Samson, A.L., Kiriazis, H., Wang, X.F., Shan, L., *et al.* (2011). Novel role of platelets in mediating inflammatory responses and ventricular rupture or remodeling following myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 834-841.

Lowell, C.A., and Mayadas, T.N. (2012). Overview: studying integrins in vivo. *Methods Mol Biol* 757, 369-397.

Massberg, S., Grahl, L., von Bruehl, M.L., Manukyan, D., Pfeiler, S., Goosmann, C., Brinkmann, V., Lorenz, M., Bidzhekov, K., Khandagale, A.B., *et al.* (2010). Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 16, 887-896.

Maxwell, R.A., Chavarria-Aguilar, M., Cockerham, W.T., Lewis, P.L., Barker, D.E., Durham, R.M., Ciraulo, D.L., and Richart, C.M. (2002). Routine prophylactic vena cava filtration is not indicated after acute spinal cord injury. *J Trauma* 52, 902-906.

McNicol, A., and Israels, S.J. (2008). Beyond hemostasis: the role of platelets in inflammation, malignancy and infection. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 8, 99-117.

McRedmond, J.P., Park, S.D., Reilly, D.F., Coppinger, J.A., Maguire, P.B., Shields, D.C., and Fitzgerald, D.J. (2004). Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol Cell Proteomics* 3, 133-144.

Mega, J.L., Braunwald, E., Wiviott, S.D., Bassand, J.P., Bhatt, D.L., Bode, C., Burton, P., Cohen, M., Cook-Bruns, N., Fox, K.A., *et al.* (2012). Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 366, 9-19.

Mehilli, J., Kastrati, A., Schühlen, H., Dibra, A., Dotzer, F., von Beckerath, N., Bollwein, H., Pache, J., Dirschinger, J., Berger, P.P., *et al.* (2004). Randomized clinical trial of abciximab in diabetic patients

undergoing elective percutaneous coronary interventions after treatment with a high loading dose of clopidogrel. *Circulation* 110, 3627-3635.

Mehran, R., Pocock, S., Nikolsky, E., Dangas, G.D., Clayton, T., Claessen, B.E., Caixeta, A., Feit, F., Manoukian, S.V., White, H., *et al.* (2011). Impact of bleeding on mortality after percutaneous coronary intervention results from a patient-level pooled analysis of the REPLACE-2 (randomized evaluation of PCI linking angiomas to reduced clinical events), ACUITY (acute catheterization and urgent intervention triage strategy), and HORIZONS-AMI (harmonizing outcomes with revascularization and stents in acute myocardial infarction) trials. *JACC Cardiovasc Interv* 4, 654-664.

Menter, D.G., Kopetz, S., Hawk, E., Sood, A.K., Loree, J.M., Gresele, P., and Honn, K.V. (2017). Platelet "first responders" in wound response, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 36, 199-213.

Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M., and Fassler, R. (2008). Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med* 14, 325-330.

Moshfegh, K., Wuillemin, W.A., Redondo, M., Lämmle, B., Beer, J.H., Liechti-Gallati, S., and Meyer, B.J. (1999). Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *Lancet* 353, 351-354.

Nieswandt, B., Varga-Szabo, D., and Elvers, M. (2009). Integrins in platelet activation. *J Thromb Haemost* 7 *Suppl* 1, 206-209.

Patel, M.R., Mahaffey, K.W., Garg, J., Pan, G., Singer, D.E., Hacke, W., Breithardt, G., Halperin, J.L., Hankey, G.J., Piccini, J.P., *et al.* (2011). Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med* 365, 883-891.

Petzold, T., Ruppert, R., Pandey, D., Barocke, V., Meyer, H., Lorenz, M., Zhang, L., Siess, W., Massberg, S., and Moser, M. (2013). β 1 integrin-mediated signals are required for platelet granule secretion and hemostasis in mouse. *Blood* 122, 2723-2731.

Santoso, S., Kunicki, T.J., Kroll, H., Haberbosch, W., and Gardemann, A. (1999). Association of the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood* 93, 2449-2453.

Sasikumar, P., AlOuda, K.S., Kaiser, W.J., Holbrook, L.M., Kriek, N., Unsworth, A.J., Bye, A.P., Sage, T., Ushioda, R., Nagata, K., *et al.* (2018). The chaperone protein HSP47: a platelet collagen binding protein that contributes to thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost* 16, 946-959.

Schulz, S., Mehilli, J., Neumann, F.J., Schuster, T., Massberg, S., Valina, C., Seyfarth, M., Pache, J., Laugwitz, K.L., Büttner, H.J., *et al.* (2010). ISAR-REACT 3A: a study of reduced dose of unfractionated heparin in biomarker negative patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 31, 2482-2491.

Stark, K., and Massberg, S. (2021). Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *Nat Rev Cardiol* 18, 666-682.

Varga-Szabo, D., Pleines, I., and Nieswandt, B. (2008). Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 403-412.

von Beckerath, N., Koch, W., Mehilli, J., Böttiger, C., Schömig, A., and Kastrati, A. (2000). Glycoprotein Ia gene C807T polymorphism and risk for major adverse cardiac events within the first 30 days after coronary artery stenting. *Blood* 95, 3297-3301.

von Bruhl, M.L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., Khandoga, A., Tirniceriu, A., Coletti, R., Kollnberger, M., *et al.* (2012). Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 209, 819-835.

Weyrich, A.S., Lindemann, S., Tolley, N.D., Kraiss, L.W., Dixon, D.A., Mahoney, T.M., Prescott, S.P., McIntyre, T.M., and Zimmerman, G.A. (2004). Change in protein phenotype without a nucleus: translational control in platelets. *Semin Thromb Hemost* 30, 491-498.

Wong, C.H., Jenne, C.N., Petri, B., Chrobok, N.L., and Kubes, P. (2013). Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat Immunol* 14, 785-792.

Yeaman, M.R. (2014). Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat Rev Microbiol* 12, 426-437.

Yusuf, S., Zhao, F., Mehta, S.R., Chrolavicius, S., Tognoni, G., and Fox, K.K. (2001). Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 345, 494-502.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. med. Tobias Petzold, der mich als wissenschaftlicher Mentor seit meiner Doktorarbeit bei der Planung und Durchführung der Studien inspiriert, begleitet und über Jahre kontinuierlich tatkräftig unterstützt und gefördert hat. Der enge Dialog und die Kooperation haben mein wissenschaftliches Denken und Arbeiten nachhaltig geprägt. Vielen Dank!

In besonderem Maße danke ich Professor Steffen Massberg, der mir nicht nur als Doktorvater im Rahmen meiner Promotion eine exzellente wissenschaftliche Ausbildung ermöglicht hat, die bis heute meine Arbeitsweise maßgeblich beeinflusst, sondern als Klinikdirektor stets auch die nötigen Freiräume schaffte und Unterstützung in jeder Hinsicht bietet, um Wissenschaft auf höchstem Niveau durchführen zu können.

Abschließend möchte ich den zahlreichen Mitarbeiter*innen danken, ohne die diese großen wissenschaftlichen Projekte nicht möglich gewesen wären und die meine Arbeit in den letzten Jahren wesentlich geprägt haben: Vincent Ehreiser, Zhe Zhang, Inas Saleh, Judith Huth, Khrystyna Shchurovska, Shaza El Nemr, Franziska von Wulffen, Ron Regenauer und Elisabeth Raatz.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Jan, die mir durch ihre Unterstützung den Freiraum geschaffen haben, meiner Faszination an der Wissenschaft nachzugehen.

Gesamtes Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor

Thienel M, Müller-Reif JB, Zhang Z, Ehreiser V, Huth J, Shchurovska K, Kilani B, Schweizer L, Geyer PE, Zwiebel M, Novotny J, Lüsebrink E, Little G, Orban M, Nicolai L, El Nemr S, Titova A, Spannagl M, Kindberg J, Evans AL, Mach O, Vogel M, Tiedt S, Ormanns S, Kessler B, Dueck A, Friebe A, Jørgensen PG, Majzoub-Altweck M, Blutke A, Polzin A, Stark K, Kääh S, Maier D, Gibbins JM, Limper U, Frobert O, Mann M, Massberg S, Petzold T. Immobility-associated thromboprotection is conserved across mammalian species from bear to human. *Science*. 2023 Apr 14

Thienel M, Haum M, Sadoni S, Novotny J, Estner H, Fichtner S, Lackermair K. Impairment of Quality of Life in Patients with implanted subcutaneous Cardioverter Defibrillator (S-ICD) compared to implanted transvenous Cardioverter Defibrillator Therapy. *Patient Preference Adherence*. 2022 Nov 5

Novotny J, Klein MM, Haum M, Fichtner SR, **Thienel MB**. Prevalence of pathological arrhythmia in patients triaged to "cardiac arrhythmia" in the emergency department: a preliminary study. *Int J Emerg Med*. 2022 Sep 13

Thienel M, Woernle M, Sinner MF, Brunner S, Petzold T. Atrioventricular block grade III in the context of acute alcohol intake. *Eur J Emerg Med*. 2020 Sep 23

Petzold T*, Dannenberg L*, **Thienel M***, Ahlbrecht S, Mourikis P, Helten C, M'Pembele R, Achilles A, Zikeli D, Zhang Z, Lüsebrink E, Nicolai L, Saleh I, Jung C, Gerdes N, Hoffmann T, Levkau B, Hohlfeld T, Zeus T, Schulz C, Kelm M, Polzin A. Response by Petzold et al to Letter Regarding Article, "Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of Fxa-Driven Platelet Activation via Protease Activated Receptor-1". *Circ Res*. 2020 May 8; * contributed equally

Petzold T*, **Thienel M***, Dannenberg LK*, Mourikis P, Helten C, Ayhan A, M'Pembele R, Achilles A, Trojovsky K, Konsek D, Zang Z, Regenauer R, Pircher J, Ehrlich A, Lüsebrink E, Nicolai L, Stocker T, Brandl R, Röschentaler F, Strecker J, Saleh I, Spannagl M, Mayr CH, Schiller HB, Jung C, Gerdes N, Hoffmann T, Levkau B, Hohlfeld T, Zeus T, Schulz C, Kelm M, Polzin A; Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of FXa Driven Platelet Activation Via Protease Activated Receptor-1. *Circ Res*. 2019 Dec 20; * contributed equally

Thienel M, Lüsebrink E, Kastrati A, Dannenberg L, Polzin A, Schulz C, Massberg S, Petzold T; Integrin $\beta 1$ polymorphisms and bleeding risk after coronary artery stenting. *Mol Biol Rep*. 2019 Dec

Originalarbeiten als Koautor:

Lüsebrink E, Scherer C, Binzenhöfer L, Hoffmann S, Höpler J, Kellnar A, **Thienel M**, Joskowiak D, Peterß S, Petzold T, Deseive S, Hein R, Brunner S, Kääb S, Braun D, Theiss H, Hausleiter J, Hagl C, Massberg S, Orban M. Heparin-Induced Thrombocytopenia in Patients Undergoing Venoarterial Extracorporeal Membrane Oxygenation. *J Clin Med*. 2023 Jan 2

Petzold T, Zhang Z, Ballesteros I, Saleh I, Polzin A, **Thienel M**, Liu L, Ain Q, Ehreiser V, Weber C, Kilani B, Mertsch P, Götschke J, Cremer S, Fu W, Lorenz M, Ishikawa-Ankerhold H, Raatz E, El-Nemr S, Görlach A, Marhuenda, Stark K, Pircher J, Stegner D, Gieger C, Schmidt-Supprian M, Gaertner F, Almendros I, Kelm M, Schulz C, Hidalgo A, Massberg S. Neutrophil “plucking” drives platelet production and boosts cardiovascular disease. *Immunity*. 2022 Dec 13

Scherer C, Kleeberger J, Kellnar A, Binzenhöfer L, Lüsebrink E, Stocker TJ, Berghoff SA, Keutner A, **Thienel M**, Deseive S, Stark K, Braun D, Orban M, Petzold T, Brunner S, Hagl C, Hausleiter J, Massberg S, Orban M. Propofol versus midazolam sedation in patients with cardiogenic shock - an observational propensity-matched study. *J Crit Care*. 2022 May

Mehilli J, Baquet M, Hochholzer W, Mayer K, Tesche C, Aradi D, Xu Y, **Thienel M**, Gschwendtner S, Zadrozny M, Jochheim D, Sibbing D, Schüpke S, Mansmann U, Hoffmann E, Kastrati A, Neumann FJ, Massberg S. Randomized Comparison of Intensified and Standard P2Y12-Receptor-Inhibition Before Elective Percutaneous Coronary Intervention: The SASSICAIA Trial. *Circ Cardiovasc Interv*. 2020 Jun 13

Petzold T, Bagaev E, Herzog H, Born F, Hoechter D, Michel S, Rutkowski S, Lüsebrink E, **Thienel M**, Massberg S, Hagl C, Guenther SP; Whole blood platelet aggregation kinetics under cardiopulmonary bypass: A pilot study. *Int J Artif Organs*. 2019 Nov 1

Baquet M, Grundmann D, Schmidt W, **Thienel M**, Jochheim D, Tesche C, Theiss HD, Brunner S, Massberg S, Mehilli J; Hybrid-stenting with metallic and bioresorbable drug-eluting stents 2-year clinical outcomes in KUM ABSORB registry. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2019 Jan 1

Eickhoff M, Schüpke S, Khandoga A, Fabian J, Baquet M, Jochheim D, Grundmann D, **Thienel M**, Bauer A, Theiss H, Brunner S, Hausleiter J, Massberg S, Mehilli J; Age-dependent impact of the SYNTAX-score on longer-term mortality after percutaneous coronary intervention in an all-comer population. *J Geriatr Cardiol*. 2018 Sep 28

Petzold T, **Thienel M**, Konrad I, Schubert I, Regenauer R, Hoppe B, Lorenz M, Eckart A, Chandraratne S, Lennerz C, Kolb C, Braun D, Jamasbi J, Brandl R, Braun S, Siess W, Schulz C, Massberg S; Oral thrombin inhibitor aggravates platelet adhesion and aggregation during arterial thrombosis. *Sci Transl Med*. 2016 Nov 30;

Kasuistiken/Case Reports:

Petzold T, Thienel M, Lüsebrink E, Massberg S. Emergency venous angioplasty of a complete vena cava superior thrombosis. J Invasive Cardiol. 2019 Jun

Übersichtsartikel/Review:

Haum M, Kellnar A, **Thienel M***, Lackermair K*. Review: Sex-related differences in the treatment of cardiac arrhythmia. Pharmacol Ther. 2023 Mar 20; * contributed equally

Dannenberg L, M'Pembele R, Mourikis P, Helten C, Zako S, Ahlbrecht S, Richter H, Zikeli D, Benkhoff M, Huhn-Wientgen R, **Thienel M**, Levkau B, Kelm M, Petzold T, Polzin A. Rivaroxaban reduces thromboxane induced platelet aggregation - the forgotten compass arm? Platelets. 2021 Nov 17

Polzin A, Dannenberg L, **Thienel M**, Orban M, Wolff G, Hohlfeld T, Zeus T, Kelm M, Petzold T. Noncanonical Effects of Oral Thrombin and Factor Xa Inhibitors in Platelet Activation and Arterial Thrombosis. Thromb Haemost. 2020 Sep 17

Response Letters:

M'Pembele R, Metzen D, Czychy N, Zako S, Mourikis P, Helten C, Trojovsky K, Ignatov D, Petzold T, **Thienel M**, Vornholz L, Bönner F, Levkau B, Zeus T, Kelm M, Dannenberg L, Polzin A. Diabetes mellitus is not associated with enhanced bleeding risk in patients after percutaneous coronary intervention. Diabet Med. 2021 May

Petzold T*, **Thienel M***, Dannenberg L*, Mourikis P, Helten C, Ayhan A, M'Pembele R, Achilles A, Trojovsky K, Zhang Z, Regenauer R, Pircher J, Ehrlich A, Lüsebrink E, Nicolai L, Stocker TJ, Brandl R, Röschentaler F, Strecker J, Saleh I, Spannagl M, Mayr CH, Schiller HB, Jung C, Gerdes N, Hoffmann T, Levkau B, Hohlfeld T, Zeus T, Schulz C, Kelm M, Polzin A. Response by Petzold et al to Letter Regarding Article, "Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of FXa-Driven Platelet Activation via Protease Activated Receptor-1". Circ Res. 2020 Apr 10; * contributed equally

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Manuela Thienel, dass die schriftliche Habilitationsleistung selbständig verfasst wurde und die Herkunft des verwendeten oder zitierten Materials ordnungsgemäß kenntlich gemacht wurde. Zudem erkläre ich, dass außer dem derzeitigen kein weiteres Habilitationsgesuch im gleichen oder einem anderen Fach an der LMU München oder einer anderen Hochschule eingereicht wurde. Mir ist bisher kein akademischer Grad entzogen worden oder ein Verfahren gegen mich anhängig, welches die Entziehung eines akademischen Grades zur Folge haben könnte.

München, 26.10.2023

Dr. med. Manuela Thienel