

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

## **Mechanismen des Zusammenspiels von Thrombozyten und Neutrophilen Granulozyten in der vaskulären Inflammation**



### **Kumulative Habilitationsschrift**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Experimentelle Kardiologie

vorgelegt von

Dr. med. Rainer Walter Johannes Kaiser  
geboren am 23.01.1991 in Frankfurt am Main

2024

## Inhaltsverzeichnis

<b>1) Einleitung .....</b>	<b>- 2 -</b>
<b>2) Wissenschaftliche Arbeiten .....</b>	<b>- 6 -</b>
<i>Molekulare Mechanismen der Plättchenmigration als inflammatorische Effektor-funktion .....</i>	<i>- 6 -</i>
<i>Das Zusammenspiel prokoagulanter Plättchen und plasmatischer Gerinnungsproteine in der inflammatorischen Hämostase .....</i>	<i>- 12 -</i>
<i>Modulation des Interleukin-8-Signalwegs als neuer Therapieansatz der schweren COVID-19-Pneumonie .....</i>	<i>- 18 -</i>
<i>Transkriptionelle Plastizität durch peripheres Priming zirkulierender Neutrophiler als neuer Mechanismus der infektionsassoziierten Adaptation des innaten Immunsystems .....</i>	<i>- 24 -</i>
<b>3) Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>- 29 -</b>
<b>4) Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>- 34 -</b>
<b>5) Literaturverzeichnis.....</b>	<b>- 36 -</b>
<b>6) Verzeichnis der Arbeiten als Habilitationsleistung.....</b>	<b>- 49 -</b>
<b>7) Danksagung .....</b>	<b>- 51 -</b>

## 1) Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die weltweit häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität und stellen daher weltweit eine deutliche Belastung für Gesundheitssysteme dar (Diseases and Injuries, 2020; Martin *et al.*, 2024; Timmis *et al.*, 2022). Trotz beeindruckender Fortschritte sowohl in der medikamentösen Therapie sowie komplexer interventioneller Konzepte beispielsweise in der Behandlung der zwei wichtigsten Entitäten – Myokardinfarkt und Schlaganfall – gehört das kardiovaskuläre Krankheitsspektrum zu den wichtigsten Herausforderungen der modernen Medizin (Byrne *et al.*, 2023).

Frühere pathophysiologische Modelle gehen von Degeneration als führende Ursache der Ausbildung der diese Erkrankungen maßgeblich bedingende Atherosklerose aus. Tatsächlich konnten bahnbrechende Studien der vergangenen Jahrzehnte nachweisen, dass atherosklerotische Veränderungen keiner rein altersbedingten Degeneration, sondern einer chronischen Entzündungsreaktion zugrunde liegen (Libby *et al.*, 2019; Soehnlein and Libby, 2021). Diese chronische Entzündungsreaktion wird einerseits durch klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Dyslipoproteinämie und Diabetes mellitus unterhalten, andererseits aber durch akute Entzündungsreaktionen und Infektionen verstärkt (Libby *et al.*, 2019; Libby *et al.*, 2011). So steigern beispielsweise akute Infektionen mit dem Influenza-Virus die Inzidenz akuter Myokardinfarkte, während eine prophylaktische Grippevirus-Impfung die kardiovaskuläre Mortalität senken kann (Frobert *et al.*, 2021; Kwong *et al.*, 2018).

Der chronisch-inflammatorische Aspekt der Atherosklerose führte weiterhin zur klinischen Untersuchung des Einsatzes von Immunsuppressiva für die kardiovaskuläre Prävention: Bahnbrechende Studien wie die CANVAS- (Ridker *et al.*, 2017) oder COLCOT-Studie (Tardif *et al.*, 2019), die den Einsatz des Interleukin-1beta-Antagonisten Canakinumab und des Spindelgifts Colchicin untersuchten, zeigten zwar eine Reduktion der kardiovaskulären Mortalität, waren jedoch aufgrund der ungerichteten, systemischen Wirkung auf das Immunsystem mit einer erhöhten Inzidenz tödlicher Infektionen assoziiert. Diese Daten unterstreichen, dass eine gezielte antiinflammatorische Modulation zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen ein pathophysiologisches Grundverständnis der parallel stattfindenden Prozesse aus Inflammation und Thrombusformation voraussetzt (Soehnlein and Libby, 2021).

Die Komplexität dieser Prozesse wird durch die reziproke Aktivierung von im Blut zirkulierenden Zellen einerseits und plasmatischen Faktoren wie Gerinnungsproteinen und Teilen des Komplementsystems andererseits unterstrichen (Stark and Massberg, 2021). Beispielhaft hierfür kann das multivalente Zusammenspiel von Blutplättchen, den sogenannten Thrombozyten, und Neutrophilen Granulozyten, der größten Zellpopulation von Immunzellen im Blut, herangezogen werden (Kaiser *et al.*, 2021a). Während Thrombozyten klassischerweise als anukleäre Zellfragmente angesehen werden, die im Rahmen von Hämostase und Thrombosen als multizelluläres Synzytium die Gerinnungsbildung fördern, betrachtet die traditionelle Immunologie Neutrophile als stereotyp agierende „Fußsoldaten“ des Immunsystems, die wesentlich zur Bekämpfung eindringender Pathogene beitragen. Diese simplifizierte Sicht auf beide Zelltypen wurde durch bahnbrechende Forschungsergebnisse überholt, die nachweisen konnten, dass Thrombozyten in der Abwehr eindringender Mikroorganismen wichtige Funktionen übernehmen, indem sie beispielsweise die Rekrutierung von innaten Immunzellen wie Neutrophilen und Monozyten modulieren, oder sogar durch Interaktion mit zirkulierenden Lymphozyten und dendritischen Zellen die adaptive Immunantwort beeinflussen (Boilard *et al.*, 2010; Duerschmied *et al.*, 2013; Engelmann and Massberg, 2013; Gaertner *et al.*, 2017; Massberg *et al.*, 2010; Sreeramkumar *et al.*, 2014; Verschoor *et al.*, 2011; von Bruhl *et al.*, 2012). Die gegenseitige Bindung von Neutrophilen und Thrombozyten wiederum führt zu deren reziproker Aktivierung, die für die Ausübung der Immunabwehr essenziell ist: So führt die Bindung aktiver Thrombozyten an Neutrophile zur Bildung sogenannter *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), einem netzähnlichen Konstrukt, das aus DNA, Histonen, proteolytischen Enzymen und Gerinnungsfaktoren besteht (Brinkmann *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2010). Die NET-Formation wiederum fördert die lokal begrenzte Ausbildung von Gerinnseln, die beispielsweise die Ausbreitung von Bakterien einschränken soll, und wird somit als primär protektiver Abwehrmechanismus betrachtet (Castanheira and Kubes, 2019; Clark *et al.*, 2007; McDonald *et al.*, 2012; Yipp *et al.*, 2012). Dieser Mechanismus, der durch das Zusammenspiel aus Plättchen, Leukozyten und Plasmaproteinen gekennzeichnet ist, wird als Immunothrombose bezeichnet (Engelmann and Massberg, 2013; Fuchs *et al.*, 2010; Stark and Massberg, 2021).

Die simultane Aktivierung von Thrombozyten und Neutrophilen findet aber nicht nur im Rahmen von Infektionen statt, sondern auch während steriler inflammatorischer

Prozesse wie der Atherosklerose oder der akuten Ruptur atherosklerotischer Plaques. Beispielsweise führt die Freisetzung thrombogenen Materials aus diesen Plaques nicht nur zur Aktivierung von Plättchen und Gerinnungsproteinen, sondern auch zur Rekrutierung von Neutrophilen durch chemotaktisch wirksame Moleküle wie HMGB-1 oder Cathelicidine (Pircher *et al.*, 2018; Pircher *et al.*, 2019). Die hierdurch freigesetzten NETs fördern wiederum die Plaque-assoziierte Thrombusformation und können dadurch zu Gefäßverschlüssen beitragen (Fahed and Jang, 2021; Massberg *et al.*, 2010; Pfeiler *et al.*, 2017). Entsprechend wurden sowohl in Koronarthromben als auch in Thrombektomie-Präparaten von Schlaganfall-Patienten nicht nur Plättchen und Gerinnungsproteine, sondern insbesondere auch substanzielle Mengen aktivierter Neutrophiler und prothrombotischer NETs gefunden (Nicolai *et al.*, 2020a; Novotny *et al.*, 2020; Riegger *et al.*, 2016). Interessanterweise können im Blut aktivierte, plaqueinfiltrierende Neutrophile außerdem die Plaqueruptur selbst fördern, indem sie über die Freisetzung NET-assozierter Histone glatte Muskelzellen abtöten und so zur Destabilisierung der Plaque beitragen (Silvestre-Roig *et al.*, 2019). Diese Erkenntnisse unterstreichen das komplexe Zusammenspiel von Plättchen und Neutrophilen sowohl im Rahmen der Infektabwehr als auch der Gerinnungsbildung.

Die protektive Funktion der Immunothrombose kann durch eine Dysregulation und Entkopplung von Kontrollmechanismen in einen Zustand der generalisierten Aktivierung überführen, der durch die systemische Ausbildung von (Immuno)thromben gekennzeichnet ist und als Thromboinflammation bezeichnet wird (Jackson *et al.*, 2019; Kaiser *et al.*, 2021a; Stark and Massberg, 2021; Stoll and Nieswandt, 2019). Thromboinflammatorische Prozesse werden im Rahmen schwerer, teils lebensbedrohlicher Erkrankungen wie dem akuten respiratorischen Distress-Syndrom (ARDS), der infektionsassoziierten Sepsis, der durch das Sarbecovirus SARS-CoV-2 ausgelösten COVID-19-Pneumonie oder auch bei sterilen Schockzuständen nach Trauma und Kreislaufversagen beobachtet (Gando *et al.*, 2016; Giamarellos-Bourboulis *et al.*, 2020; Jackson *et al.*, 2019; Kaiser *et al.*, 2021b; Kwok *et al.*, 2023; Margraf *et al.*, 2022; Matthay *et al.*, 2019; Nicolai *et al.*, 2020a; Schulte-Schrepping *et al.*, 2020; Vulliamy *et al.*, 2019). Auch wenn neuere Forschungsergebnisse die prominente Rolle von Thrombozyten, Neutrophilen und Gerinnungsproteinen in Initiierung und Fortschreiten der Thromboinflammation unterstreichen, ist das pathophysiologische Verständnis dieses Zusammenspiels nur unzureichend verstanden. Konsequenterweise gibt es bisher kein einziges zugelassenes

Medikament, das die gezielte und erfolgreiche therapeutische Modulation thromboinflammatorischer Prozesse zulässt.

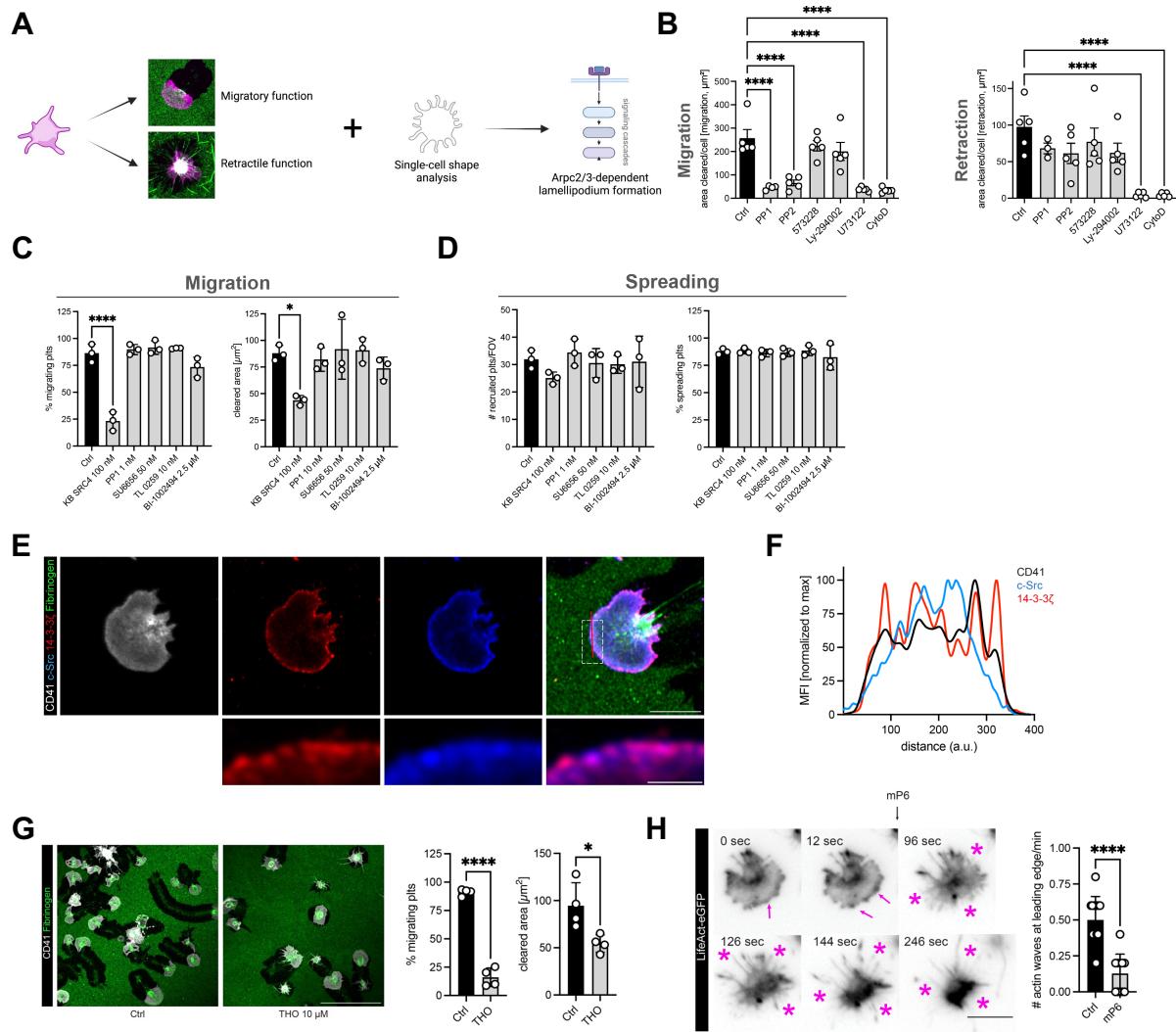
Ziel der im Rahmen dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen ist, durch Einblicke in die molekularen und zellulären Mechanismen, auf die Thrombozyten und Neutrophile im Rahmen von Infektion und Inflammation zurückgreifen, ein tiefergehendes Verständnis beider Zelltypen und ihrer Rolle in akuten entzündlichen Erkrankungen zu ermöglichen, die mit thromboinflammatorischen Phänotypen einhergehen können. Hierfür werden innovative experimentelle Methoden wie die Intravitalmikroskopie, fortgeschrittene Mausmodelle (kardiovaskulärer Erkrankungen sowie modernste Multi-Omics-Methoden verwendet, um Plättchen- und Neutrophilen-spezifische Mechanismen in Inflammation und Infektion verstehen zu können.

## 2) Wissenschaftliche Arbeiten

### Molekulare Mechanismen der Plättchenmigration als inflammatorische Effektorfunktion

Zu den spezialisierten Funktionen, die Thrombozyten im Rahmen von Inflammation und Infektion ausüben können, gehört die Fähigkeit zur autonomen Migration. Diese außergewöhnliche thrombozytäre Funktion wurde erstmals von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Gaertner *et al.*, 2017; Gaertner and Massberg, 2019). Wir konnten zeigen, dass die Migration von Komponenten des Zytoskeletts, insbesondere schweren Myosinketten (Myh9), abhängig ist. In einer weiteren Publikation wiesen wir nach, dass das Aktin-assoziierte Protein Arp2/3 ebenfalls kritisch für die Fähigkeit zur Migration ist, indem es die Aktinpolymerisation und Lamellipodienformation an der sogenannten *leading edge* des migrierenden Plättchens steuert (Gaertner *et al.*, 2017; Nicolai *et al.*, 2020b). Eine pharmakologische oder genetische Hemmung eines der beiden Moleküle führte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer signifikanten Reduktion der migratorischen Aktivität. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass migrierende Plättchen durch direkte Bindung und Bündelung kritisch zur Eindämmung von Bakterien sowie deren nachfolgende Präsentation an professionelle Phagozyten beitragen. Zudem war die Arp2/3-abhängige Fähigkeit der aktiven Detektion von Dichtegradienten von entlang der Gefäßwand abgelagerten Fibrin(ogen)molekülen (sogen. Haptotaxis) essenziell, um durch Transmigration von Leukozyten entstandene Lücken im Gefäßendothel zu identifizieren und zu verschließen. Eine Hemmung der Migration führte konsequenterweise zu einer Zunahme entzündungsassozierter Blutungen sowie einem verstärkten Wachstum von pathogenen Bakterien wie *S. aureus* in Blut und Endorganen (Nicolai *et al.*, 2020b). Auch wenn durch diese beiden Studien hervorgehoben werden konnte, dass Myh9 und Arp2/3 als Teile des Aktomyosin-Skeletts essenziell zur Migration von Thrombozyten beitragen, ist bislang unklar, welche Oberflächenrezeptoren und nachgeschaltete Signalkaskaden auf zellulärer und molekularer Ebene die Fähigkeit zur Migration vermitteln.

Um diese Rezeptoren und Signalkaskaden umfassend zu untersuchen, führte ich einen morphodynamischen Screening-Versuch *in vitro* durch. Hierbei wurden Plättchen mit Inhibitoren inkubiert, die klassische Mediatoren des Plättchen-Signalings hemmen, und auf mit Albumin und Fibrinogen beschichtete Glasplatten gegeben, um



**Abb. 1:** (A) Schematische Darstellung des morphodynamischen Screening-Versuchs zur Identifikation von Migration-assoziierten Signalkaskaden. (B) Quantifizierung von Migration und Retraktion isolierter Plättchen nach Inkubation mit Placebo oder den angezeigten Inhibitoren. (C, D) Quantifizierung von Migration (C) und Spreading (D) humaner Plättchen nach Inkubation mit Placebo oder den beschriebenen SFK-Inhibitoren KB SRC 4, PP1, SL6656, TL 0269 oder BI-1002494 (Konzentrationen s. dort). (E) Repräsentative Konfokalaufnahme der Immunfluoreszenzfärbung eines migrierenden Plättchens, gefärbt für CD41, 14-3-3 $\zeta$  und c-Src, sowie Detailaufnahme der Ko-Lokalisation (darunter). Balken 5  $\mu\text{m}$  (in Detailaufnahme 1  $\mu\text{m}$ ). (F) Histogramm der Expression der angezeigten Marker in Abhängigkeit ihrer Lokalisation entlang des thrombozytären Lamellipodiums. (G) Repräsentative Konfokalaufnahme migrierender Plättchen nach Inkubation mit Vehikel (links) oder dem 14-3-3 $\zeta$ -Inhibitor THO. Rechts: Quantifizierung von Migration und der cleared area als Proxy für die Migrationsweite. (H) Repräsentative Aufnahmen der Live-Mikroskopie muriner Plättchen, die von LifeAct-eGFP-Mäusen isoliert wurden und deren Aktinfasern grün leuchten. Der Zeitverlauf zeigte den Stopp der rhythmischen Aktinwellen entlang des Lamellipodiums (pinke Pfeile) nach Hinzugabe des  $\alpha$ 13-Inhibitors mP6 (nach 12 sek), die fehlende Fortführung der Migration sowie die Ausbildung typischer Filopodien (pinke Sternchen). Rechts: Quantifizierung der Aktinwellen entlang des Lamellipodiums in unbehandelten im Vergleich zu mit mP6-inkubierten Thrombozyten. One-way ANOVA für B, C, D, Student's t-Test (ungepaart, zweiseitig) für G, H.

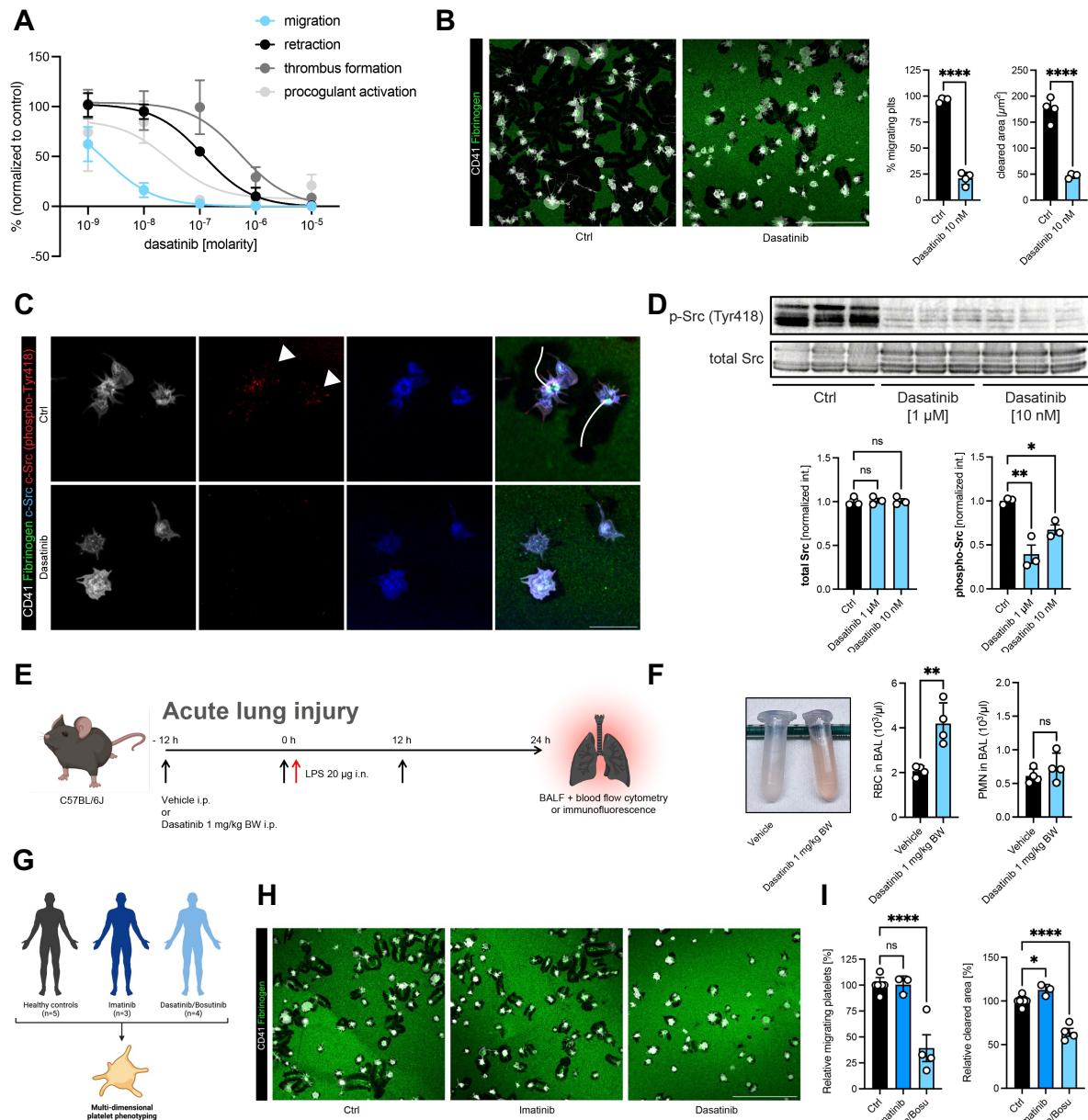
ihre Migrations- und Retraktionsverhalten zu untersuchen (Abb. 1A, B). Ich suchte hierbei spezifisch nach Inhibitoren, die analog zur Hemmung von Arp2/3 1)

ausschließlich die Fähigkeit zur Migration, 2) nicht aber die Fähigkeit zu Spreading und Retraktion hemmten und die 3) zu morphologischen Veränderungen führten, die der pharmakologischen oder genetischen Hemmung von Arp2/3 ähnelten. Insbesondere sollte dies zu einer verminderten Zirkularität mit vermehrter Ausbildung von Filopodien führen. Hierdurch identifizierte ich eine essenzielle Rolle der Sarcoma Family Kinasen (SFKs) (Senis *et al.*, 2014; Senis *et al.*, 2021) für die Plättchenmigration und wies nach, dass ein nachgeschaltetes intrazelluläres Calcium-Signaling ebenfalls zur Migrationsfähigkeit beiträgt (Abb. 1B-D). Da Thrombozyten eine große Zahl von SFKs exprimieren, die verschiedene Aufgaben erfüllen können (Senis *et al.*, 2014), wurden verschiedene SFK-spezifische Inhibitoren hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Hemmung der Migration unter Aufrechterhaltung des Spreadings untersucht. Hierbei zeigte sich eine fast vollständige Aufhebung der Fähigkeit zur Migration, wenn Plättchen mit Inhibitoren der SFK c-Src inkubiert wurden, während die Hemmung anderer SFKs, beispielsweise Lyn oder Fyn, keinen solchen Einfluss hatte (Abb. 1C).

c-Src ist in der Plättchenbiologie insbesondere für seine Rolle im Rahmen des *outside-in signaling* bekannt (Durrant *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2010; Senis *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2020). Frühere Studien belegen, dass ein heterotrimerer Komplex, den c-Src mit dem GPIIBIIA-gekoppelten G-Protein Ga13 sowie der Kinase 14-3-3 $\zeta$  bildet, für verschiedene Plättchenfunktionen essenziell ist (Chen *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2020). Wir konnten nachweisen, dass dieser Komplex auch an der *leading edge* migrierender Plättchen ausgebildet wird, wie durch die Kolokalisation der drei Proteine gezeigt (Abb. 1E, F). Eine pharmakologische Hemmung jedes einzelnen Bestandteils, also c-Src, 14-3-3 $\zeta$  oder Ga13, führte zu einer signifikant reduzierten Migrationsstrecke (Abb. 1G, H). Diese Daten identifizieren erstmals molekulare Signalkaskaden in humanen und murinen Plättchen, die zu Initiation und Aufrechterhaltung der Migration beitragen.

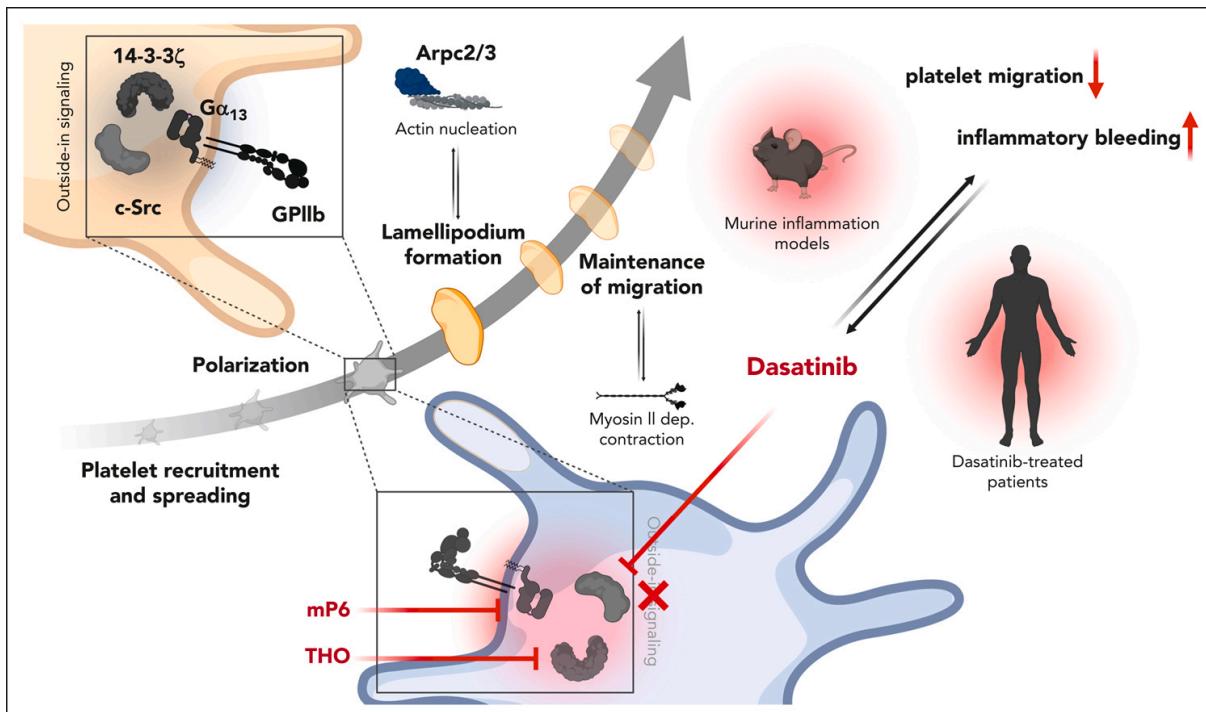
Neben seiner nun neu beschriebenen Rolle in der Plättchenmigration ist c-Src auch eine therapeutische Zielstruktur in der Therapie hämatologischer Neoplasien: So werden Multi-Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) wie der BCR/ABL-c-Src Inhibitor Dasatinib in der Erstlinientherapie der chronisch-myeloischen Leukämie (CML) sowie der Philadelphia-Chromosom-positiven (Ph $^+$ ) akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) eingesetzt (Deininger *et al.*, 2020; Hochhaus *et al.*, 2020; Talpaz *et al.*, 2006). Interessanterweise zeigt Dasatinib ein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil, das neben einer regelmäßig auftretenden Thrombozytopenie durch eine Blutungsneigung auch

bei normalen Thrombozytenzahlen gekennzeichnet ist (Gratacap *et al.*, 2009; Mazharian *et al.*, 2011; Ottmann *et al.*, 2007; Phan *et al.*, 2018; Quintas-Cardama *et al.*, 2009a; Quintas-Cardama *et al.*, 2009b; Quintas-Cardama *et al.*, 2009c; Talpaz *et al.*, 2006). Diese Blutungsneigung betrifft vor allem Schleimhäute, beispielsweise die des Gastrointestinaltrakts. Sie wird auf zellulärer Ebene häufig durch eine entzündungsbedingte Auswanderung von Leukozyten, insbesondere Neutrophilen, bedingt, deren Transmigration durch die Gefäßwand endotheliale Leckagen hinterlassen kann (Ho-Tin-Noe *et al.*, 2018; Ho-Tin-Noe *et al.*, 2009; Kaiser *et al.*, 2023b). Letztere werden normalerweise durch adhärente und migrierende Plättchen, die diese Leckagen unter inflammatorischen Bedingungen aktiv suchen, verschlossen. Eine genetische Ablation von Arp2/3, die die Migration von Plättchen verhindert, führt konsequenterweise zu einer deutlich gesteigerten inflammatorischen Blutungsneigung (Nicolai *et al.*, 2020b). Wir konnten nachweisen, dass Dasatinib durch Reduktion der Phosphorylierung von c-Src am Tyrosinrest T418 zu einer Blockade der c-Src-vermittelten Effektorfunktionen führt (Abb. 2A-D). *In vitro* führte die Applikation von Dasatinib bereits in nanomolaren Dosen so zu einer effektiven Hemmung der Plättchenmigration, während andere basale Plättchenfunktionen im nanomolaren Bereich nicht beeinträchtigt waren. Analog hierzu zeigte sich in mit nur geringen Dasatinib-Dosen behandelten Mäusen einerseits eine signifikant reduzierte Migrationsaktivität von Plättchen entlang des entzündeten Endothels bei Aufrechterhaltung anderer zellulärer Plättchenfunktionen, und andererseits in einem Modell der inflammatorischen Blutung eine unter Dasatinib-Gabe deutlich verstärkte Blutungsneigung (Abb. 2E, F). Um die translationale Relevanz der so erhobenen Daten noch weiter zu unterstreichen, rekrutierte ich CML-Patienten unter TKI-Therapie. Hier zeigte sich eine deutlich reduzierte Migrationsaktivität von Plättchen, die von mit Dasatinib-behandelten Patienten isoliert wurden, im Vergleich zu gesunden Kontrollen und Patienten unter Therapie mit anderen TKI-Präparaten, die keine Hemmung von c-Src vermitteln (Abb. 2G-I).



**Abb. 2:** (A) Dosis-Wirkungskurve für die Wirkung zunehmender Dosen von Dasatinib auf die angezeigten thrombozytären Funktionen. (B) Repräsentative Konfokalaufnahme migrierender Plättchen nach Inkubation mit Vehikel (links) oder Dasatinib. Rechts: Quantifizierung von Migration und der *cleared area* als Proxy für die Migrationsweite. (C) Konfokalaufnahme migrierender Plättchen, die für c-Src und phospho-c-Src (T418) gefärbt wurden. Weiße Pfeile zeigen phospho-c-Src-positive spots in Kontrollplättchen an, die unter Dasatinib-Behandlung verschwinden. (D) Western blot von Plättchenlysaten, die auf c-Src oder phospho-c-Src (T418) gefärbt wurden. Darunter: Quantifizierung der c-Src- und phospho-c-Src-Expression, normalisiert auf totale c-Src-Werte. (E) Schematische Darstellung des *acute lung injury*-Modells, also der inflammatorischen Blutung. (F) Repräsentative Darstellung der alveolären Blutung anhand von Bronchiallavagen. Rechts: Quantifizierung der alveolären Hämorrhagie durch Zählung roter Blutkörperchen, sowie Quantifizierung der Anzahl infiltrierter Neutrophiler. (G) Schematische Darstellung der klinischen Pilotstudie zur Untersuchung der systemischen Wirkung von Tyrosinkinase-Inhibitoren auf Plättchenfunktion. (H) Repräsentative Konfokalaufnahme migrierender Plättchen, die von gesunden Kontrollen oder Patientinnen und Patienten unter TKI-Therapie isoliert wurden (Mitte: Imatinib, rechts: Dasatinib). (I) Quantifizierung von Migration und der *cleared area* als Proxy für die Migrationsweite für die gezeigten Gruppen. One-way ANOVA für D, I, Student's t-Test (ungepaart, zweiseitig) für B, F.

Zusammenfassend heben diese Daten erstmals die molekularen Mechanismen hervor, die der Plättchenmigration auf zellulärer Ebene zugrunde liegen. Mithilfe der klinischen Pilotstudie und den hieraus erhobenen *ex vivo* Daten unterstreichen wir außerdem die translationale Relevanz dieses Mechanismus: Eine reduzierte Plättchenmigration könnte letztlich zum Blutungsphänotyp von mit Dasatinib behandelten Patientinnen und Patienten beitragen (Abb. 3).



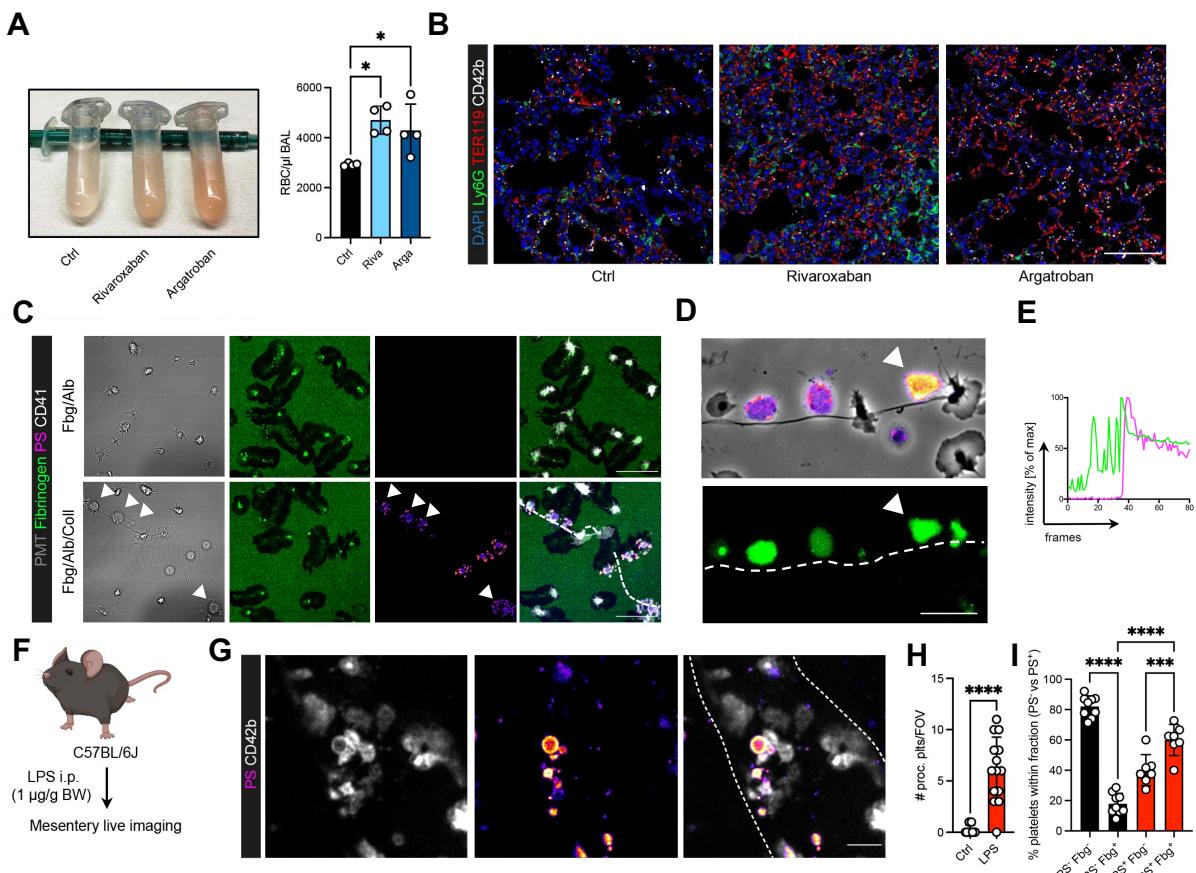
**Abb. 3:** Graphische Zusammenfassung zellulärer Mechanismen der Plättchenmigration sowie der Einfluss pharmakologischer Inhibitoren des Komplexes aus c-Src, 14-3-3 $\zeta$  und Ga13: Die Hemmung der thrombozytären Migrationskapazität durch Blockade jeder einzelnen Komponente des heterotrimeren Komplexes führt zur Zunahme inflammatorischer Blutungen im Mausmodell sowie in mit Dasatinib therapierten Patientinnen und Patienten. Aus (Kaiser et al., 2023a).

## Das Zusammenspiel prokoagulanter Plättchen und plasmatischer Gerinnungsproteine in der inflammatorischen Hämostase

Thrombozyten benötigen verschiedene Effektorfunktionen, um im Rahmen entzündlicher Erkrankungen Mikroblutungen zu verhindern, die durch die Auswanderung von Leukozyten (maßgeblich Neutrophilen) und eine konsekutive Einschränkung der vaskulären Integrität bedingt sind (Hillgruber *et al.*, 2015). Diese Effektorfunktionen sowie die ihnen zugrundeliegenden Signalkaskaden überschneiden sich zwar teilweise mit klassischen Verhaltensweisen, die wir aus der Gerinnselbildung im Rahmen von klassischer Hämostase und Thrombosen kennen, liegen andererseits aber auch inflammationsspezifischen phänotypischen Veränderungen zirkulierender Plättchen zugrunde (van der Meijden and Heemskerk, 2019). Hervorzuheben hierbei ist insbesondere, dass Thrombozyten im Rahmen der Inflammation als Einzelzellen fungieren können, ohne als funktionelles Synzytium an der Gerinnselbildung beteiligt zu sein. Beispiele hierfür sind die Interaktion mit Leukozyten der innaten und adaptiven Immunantwort und die Degranulation zirkulierender Plättchen mit Freisetzung vasoaktiver und proinflammatorischer Substanzen wie ADP, Serotonin oder HMGB1 (Deppermann, 2018; Deppermann *et al.*, 2013; Deppermann *et al.*, 2017; Duerschmied *et al.*, 2013; Ho-Tin-Noe *et al.*, 2008; Mauler *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2018b). Interessanterweise zeigen bisherige Studien ein hohes Maß an kontextabhängiger Variabilität hinsichtlich der Signifikanz bestimmter Signalkaskaden und Rezeptoren, deren Einfluss auf das Entzündungsgeschehen einerseits vom inflammatorischen Stimulus, andererseits auch vom jeweiligen Organ- und Gefäßbett abhängt (Boulaftali *et al.*, 2018; Claushuis *et al.*, 2018; Ho-Tin-Noe *et al.*, 2018; Kaiser *et al.*, 2023b; Rayes *et al.*, 2018; Volz *et al.*, 2019). Während beispielsweise die Blockade von GPVI in Modellen der inflammatorischen Hautblutung sowie bei Tumor-assoziierten Blutungen zu einer deutlichen Zunahme der entzündungsinduzierten Hämorrhagie führt, zeigt sich in LPS-induzierten Modellen der akuten Lungenverletzung keine vermehrte Blutungsneigung (Burkard *et al.*, 2023; Kaiser *et al.*, 2022; Volz *et al.*, 2019). Wie wir in vorherigen Studien nachweisen konnten, ist insbesondere die Fähigkeit zur Migration essenziell, um in verschiedenen Blutungsmodellen eine effektive inflammatorische Hämostase zu garantieren (Nicolai *et al.*, 2020b). Unklar ist jedoch, wie genau Thrombozyten einen lokalen Austritt von Blutbestandteilen verhindern, sobald sie Endothelleckagen erreicht haben. Bisherige Arbeiten hierzu unterstreichen

einerseits ein physikalisches Abdecken der Leckage-Punkte durch einzelne Thrombozyten, andererseits die Aktivierung endothelialer Signalkaskaden, beispielsweise des Tie2-Signalwegs, mit nachfolgender Restrukturierung des endothelialen Zytoskeletts (Braun *et al.*, 2020; Braun *et al.*, 2019). Ob analog zur traumatischen Hämostase auch die plasmatische Gerinnung zur Verhinderung inflammatorischer Blutungen beiträgt, ist bislang jedoch unklar.

Um den Einfluss plasmatischer Gerinnungsproteine zu untersuchen, verwendete ich das bereits erwähnte Modell der LPS-induzierten inflammatorischen Blutung der Lunge. Hier zeigte sich nach systemischer Gabe von klinisch verwendeten Antikoagulanzien wie dem Thrombin-Inhibitor Argatroban sowie den Faktor X-Hemmern Rivaroxaban und Enoxaparin eine signifikante Zunahme der alveolären Hämmorrhagie (Abb. 4A, B). Weiterhin konnte ich nachweisen, dass es nach antikörpervermittelter Plättchendepletion zu einer signifikanten Abnahme von pulmonalen Fibrin(ogen)-Ablagerungen kam. In der Zusammenschau dieser Daten stellte ich die Hypothese auf, dass 1) Gerinnungsproteine maßgeblich an der inflammatorischen Hämostase beteiligt sind, und dass 2) die Rekrutierung von Koagulationsfaktoren ein aktiver, plättchenabhängiger Prozess ist. Zur Untersuchung dieser beiden Punkte etablierte ich ein *in vitro*-Modell der entzündungsbedingten Freilegung von subendothelialer, extrazellulärer Matrix: Isolierte Plättchen migrieren auf einer Hybridmatrix aus Albumin und Fibrinogen, die von Kollagen I-Fibrillen durchzogen ist (Abb. 4C). So lässt sich der *in vivo*-Zustand imitieren, bei dem Plättchen an auf dem Endothel abgelagerten Fibrin(ogen)-Gradienten entlangwandern, bis sie auf durch transmigrierende Neutrophile freigelegte Kollagenfibrillen treffen. Migrierende Thrombozyten, die in Kontakt mit Kollagenfasern kamen, unterliefen dramatischen morphologischen und funktionellen Veränderungen: ein rapider intrazellulärer Calciumanstieg (sogen. *supramaximal calcium bursts*, Abb. 4D, E) (Abbasian *et al.*, 2020), eine Gestaltänderung hin zu einer ballonartigen Form, sowie die massive Expression von Phosphatidylserin (PS) an der plasmamembranösen Oberfläche (Kaiser *et al.*, 2022). Diese drei Charakteristika sind vereinbar mit der sogenannten prokoagulanten Aktivierung (PA) von Thrombozyten (Agbani and Poole, 2017; Agbani *et al.*, 2015; Hua *et al.*, 2015). Die so entstehenden prokoagulanten Plättchen (PP) zeigen aufgrund der hohen Expression von PS eine hohe Affinität für Calcium, über das wiederum Gerinnungsfaktoren gebunden werden können. Neben



**Abb. 4:** (A) Repräsentative Bronchiallavagen von mit LPS inokulierten und mit Vehikel oder den angezeigten Antikoagulanzien behandelten Mäusen nach *acute lung injury*. Rechts: Quantifizierung der alveolären Hämorrhagie mittels Durchflusszytometrie. (B) Repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder, die die alveoläre Hämorrhagie der verschiedenen Konditionen zeigen. Blau: DAPI, grün: Ly6G (Neutrophile), rot: TER119 (Erythrozyten), weiß: Gp1b (Thrombozyten). Scale bar = 50 µm. (C) Konfokalmikroskopische Aufnahmen des Migration Assays (obere Reihe) und des Migration Assays auf der Hybridmatrix, die Kollagenfasern beinhaltet (weiß gestrichelte Linie). Weiße Pfeilköpfe zeigen prokoagulante Plättchen entlang der Kollagenfaser. (D) Repräsentative Aufnahmen aus Live-Mikroskopie-Versuchen zeigen supramaximale Calcium-Signale (grün) und die nachfolgende PS-Expression (pink) mehrere migrierende Plättchen nach Kontakt mit der Kollagenfaser (weiße Linie). (E) Histogramm des Anstiegs des Calcium- und PS-Signals aus Live-Mikroskopieversuchen des in (D) mit weißer Pfeilspitze markierten Thrombozyten. (F) Schematische Darstellung der Sepsis-Induktion im Mausmodell mit nachfolgendem Live-Imaging der Mesenterialvenen. (G) Exemplarische Darstellung eines prokoagulanten Plättchens, das am entzündeten Endothel adhäriert. (H) Quantifizierung prokoagulanter Plättchen in Kontroll- gegenüber mit LPS behandelten Tieren. (I) Quantifizierung der Bindung von Fibrin(ogen) *in vivo* durch PS-negative und-positive Thrombozyten. One-way ANOVA für A, I, Student's t-Test (ungepaart, zweiseitig) für H.

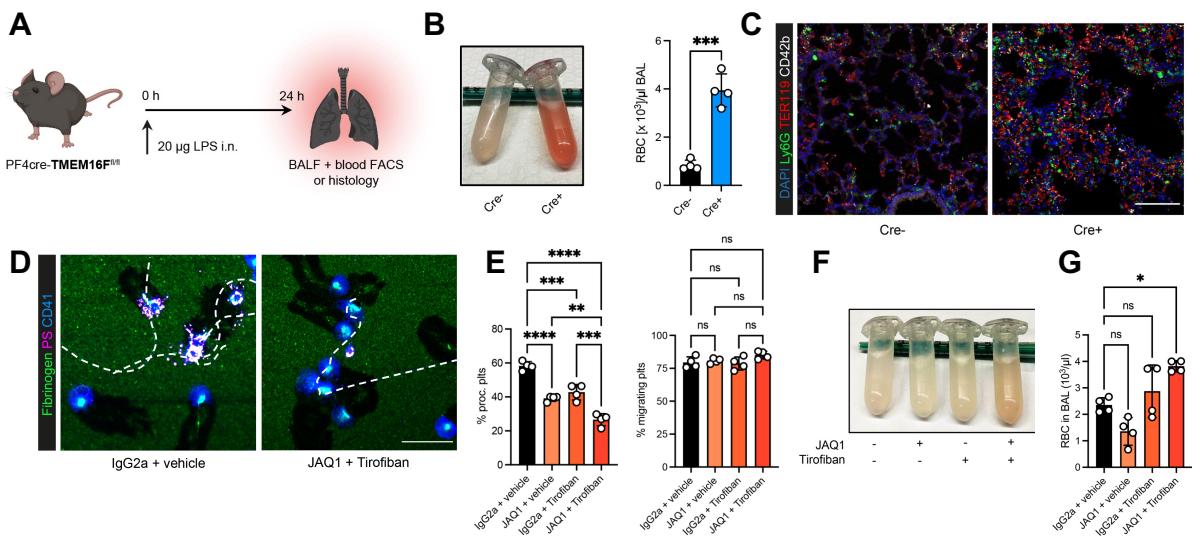
der Bestätigung dieser Beobachtungen *in vitro* zeigte sich auch in einem Entzündungsmodell *in vivo* die Induktion prokoagulanter Thrombozyten entlang des entzündeten Gefäßendothels (Abb. 4F-H). Diese prokoagulanten Plättchen waren analog zu unseren Beobachtungen *in vitro* auch im Mausmodell durch eine

ausgeprägte Bindung von Gerinnungsfaktoren wie Fibrin(ogen) und Thrombin gekennzeichnet (Abb. 4I).

Die prokoagulante Aktivierung entsteht durch simultane Stimulation von Thrombozyten mit besonders starken Aktivatoren wie Thrombin und Kollagen. Auf zellulärer Ebene wird diese durch die beiden Proteine Cyclophilin D (CypD), eine mitochondriale Peptidyl-Prolyl-Cis-Trans-Isomerase (Denorme *et al.*, 2020; Jobe *et al.*, 2008), und das Transmembranprotein 16F (TMEM16F), eine membranständige Scramblase (Suzuki *et al.*, 2010; van Kruchten *et al.*, 2013), vermittelt. Während CypD für die Generierung der supramaximalen Calcium-Bursts essenziell ist, vermittelt TMEM16F die PS-Expression auf der Oberfläche prokoagulanter Plättchen (Fujii *et al.*, 2015). Entsprechend zeigen CypD- oder TMEM16F-defiziente Mäuse eine signifikante Reduktion prokoagulanter Plättchen, die auch mit funktionellen Konsequenzen wie einer reduzierten arteriellen Thrombusformation einhergeht (Baig *et al.*, 2016; Kaiser *et al.*, 2022).

Um den Einfluss prokoagulanter Plättchen auf die inflammatorische Hämostase zu untersuchen, generierte ich zwei transgene Mauslinien mit megakaryozyten- und plättchenspezifischem Knockout für entweder CypD (PFcre-CypD<sup>f/f</sup>) oder TMEM16F (PF4cre-TMEM16F<sup>f/f</sup>). Isolierte Thrombozyten beider Mauslinien zeigten eine signifikante Reduktion prokoagulanter Plättchen nach *in vitro* Stimulation. *In vivo* zeigte sich in Cre-positiven, also CypD- oder TMEM16F-defizienten Tieren, eine signifikante Zunahme der inflammatorischen Blutung, die sowohl mittels Bronchiallavage als auch durch Immunfluoreszenz-Studien bestätigt werden konnte (Abb. 5A-C).

Weiterhin untersuchte ich die der PA migrierender Plättchen zugrundeliegenden Mechanismen. Hierfür wurden erneut *in vitro* Versuche herangezogen: Durch ein systematisches Screening untersuchte ich so, inwieweit sich die Blockade verschiedener Oberflächenrezeptoren und Signalkaskaden auf die PA auswirken könnte. Die Interaktion migrierender Plättchen mit Fibrinogen wird maßgeblich über das Glykoprotein GPIIBIIIA, ein membranständiges Integrin, vermittelt (van der Meijden and Heemskerk, 2019). Wir vermuteten, dass eine simultane Aktivierung über GPIIBIIIA sowie einen Kollagenrezeptor zur Generierung von PPs nötig sein würde. Tatsächlich zeigte sich, dass eine pharmakologische Hemmung von GPIIBIIIA entweder mithilfe des direkten Antagonisten Tirofiban oder des Gα13-Antagonisten mP6 (Gong *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2013), der das GPIIBIIIA-vermittelte outside-in signaling inhibiert, die prokoagulante Aktivierung hemmte, ohne die migratorische Ka-



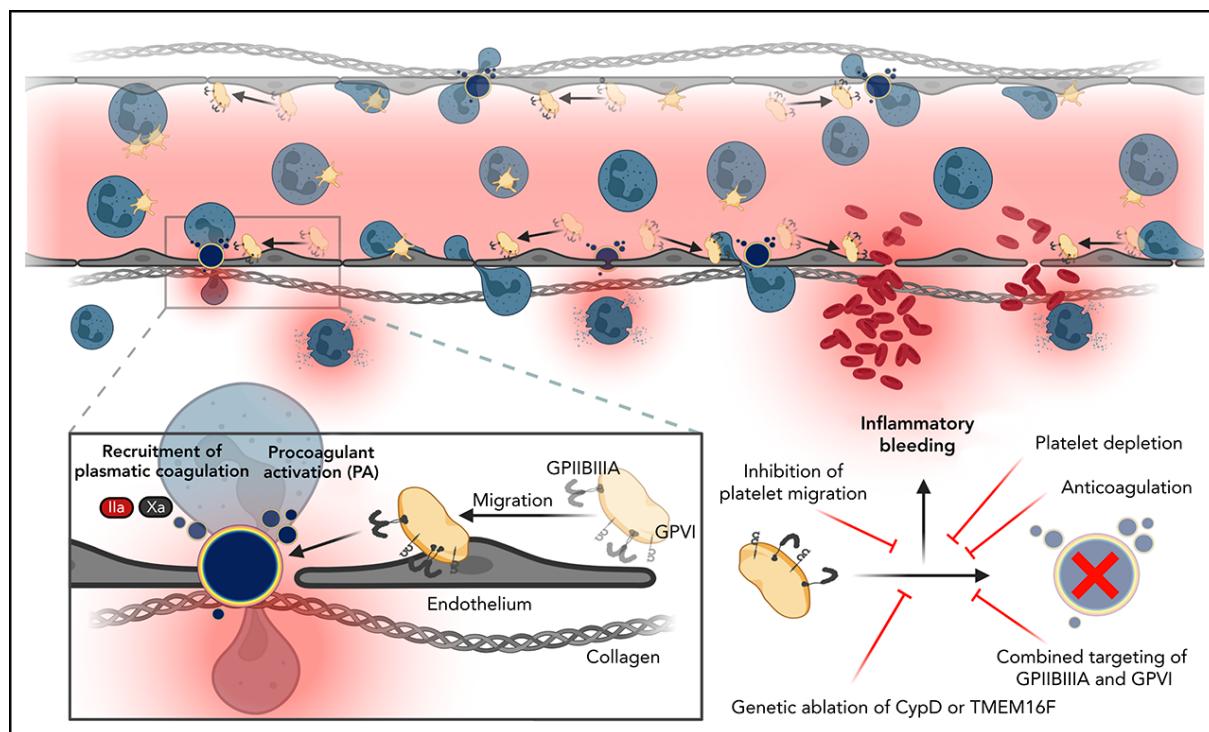
**Abb. 5:** (A) Versuchsschema des *acute lung injury*-Versuchs mit der Linie PF4cre-TMEM16F<sup>fl/fl</sup>. (B) Repräsentative Bronchiallavage. Rechts: Quantifizierung roter Blutkörperchen in der Bronchiallavage von Cre- und Cre+ Tieren. (C) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen der Lunge von Cre- und Cre+ Tieren nach Induktion der *injury*. (D) Exemplarische Konfokalaufnahme von migrierenden Maus-Plättchen in Kollagenkontakt nach Behandlung mit Vehikel oder dem GPVI-depletierenden Antikörper JAQ1 und dem GPIIbIIIA-Antagonisten Tirofiban. (E) Quantifizierung von prokoagulanter Aktivierung sowie migrierenden Plättchen. (F) Repräsentative Bronchiallavage von einzelnen Tieren aus den jeweiligen Versuchsgruppen. (G) Quantifizierung roter Blutkörperchen in der Bronchiallavage der jeweiligen Versuchsgruppen. One-way ANOVA für E, G, Student's t-Test (ungepaart, zweiseitig) für B.

pazität einzuschränken. Weiterhin zeigte sich, dass nach pharmakologischer Blockade des Kollagenrezeptors GPVI – entweder mittels Antikörper (Schulte *et al.*, 2003) oder durch pharmakologische Inhibition der GPVI-assoziierten Kinase Syk – die prokoagulante Aktivierung ebenfalls reduziert werden konnte. Eine simultane Hemmung beider Rezeptoren – GPIIbIIIA und GPVI – verstärkte diesen Effekt noch weiter (Abb. 5D, E).

Um schließlich die Relevanz dieses Rezeptorpaars für die PA *in vivo* zu untermauern und eine mögliche Therapiestrategie hinsichtlich der pharmakologischen Modulation der Plättchen-PA hervorzuheben, führte ich das Modell der alveolären Blutung unter pharmakologischer Hemmung von GPVI (mittels des monoklonalen Antikörpers JAQ1) und von GPIIbIIIA (mittels therapeutischer Dosen von Tirofiban) durch. Hierbei konnte ich eine signifikante Reduktion prokoagulanter Plättchen in der Zirkulation nach dualer Hemmung beider Rezeptoren nachweisen, die letztlich zu einer signifikanten Zunahme der pulmonalen inflammatorischen Blutung führte (Abb. 5F, G).

Zusammenfassend heben wir im Rahmen dieser Studie erstmals die Relevanz der plasmatischen Gerinnungskaskade und ihrer gezielten, plättchenabhängigen

Rekrutierung im Rahmen der inflammatorischen Hämostase hervor. Hierzu nutzen Thrombozyten ihre Fähigkeit zur prokoagulanten Aktivierung aus, die durch eine simultane Stimulation über GPIIBIIIA/Ga13-vermittelte Outside-In-Signale und das GPVI-vermittelte *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)-Signaling initiiert und die Schlüsselmoleküle CypD und TMEM16F propagiert wird. Migrierende, entlang der Gefäßwand patrouillierende Thrombozyten detektieren so effektiv und gezielt endotheliale Leckagen und verhindern durch die lokale Bildung von Mikrothromben einen Austritt von Blutbestandteilen ins Interstitium. Unsere Daten unterstreichen so die Komplexität der der inflammatorischen Blutung zugrundeliegenden Pathophysiologie und heben die prokoagulante Aktivierung – analog zur Plättchenmigration – als neuartige, entzündungstriggerte Verhaltensweise von immunresponsiven Thrombozyten hervor. Damit reiht sich die prokoagulante Aktivierung ebenso wie die Migration in die komplexen Funktionsweisen singulärer Plättchen ein, die eine gezielte und plastische Antwort auf inflammatorische Stimuli ermöglicht (Abb. 6).



**Abb. 6:** Graphische Zusammenfassung protektiver Mechanismen, mit deren Hilfe Thrombozyten in der vaskulären Entzündung zur inflammatorischen Hämostase beitragen: Nach Rekrutierung an das entzündete Endothel wandern aktivierte Plättchen entlang der Gefäßwand, bis sie durch Neutrophilen-Transmigration freigelegte subendotheliale Matrixproteine wie Kollagenfasern wahrnehmen. GPIIBIIIA- und GPVI-vermittelt erfolgt dann die prokoagulante Aktivierung mit nachfolgender Rekrutierung von Gerinnungsproteinen zur effektiven Versiegelung endothelialer Leckagen. Aus (Kaiser et al., 2022).

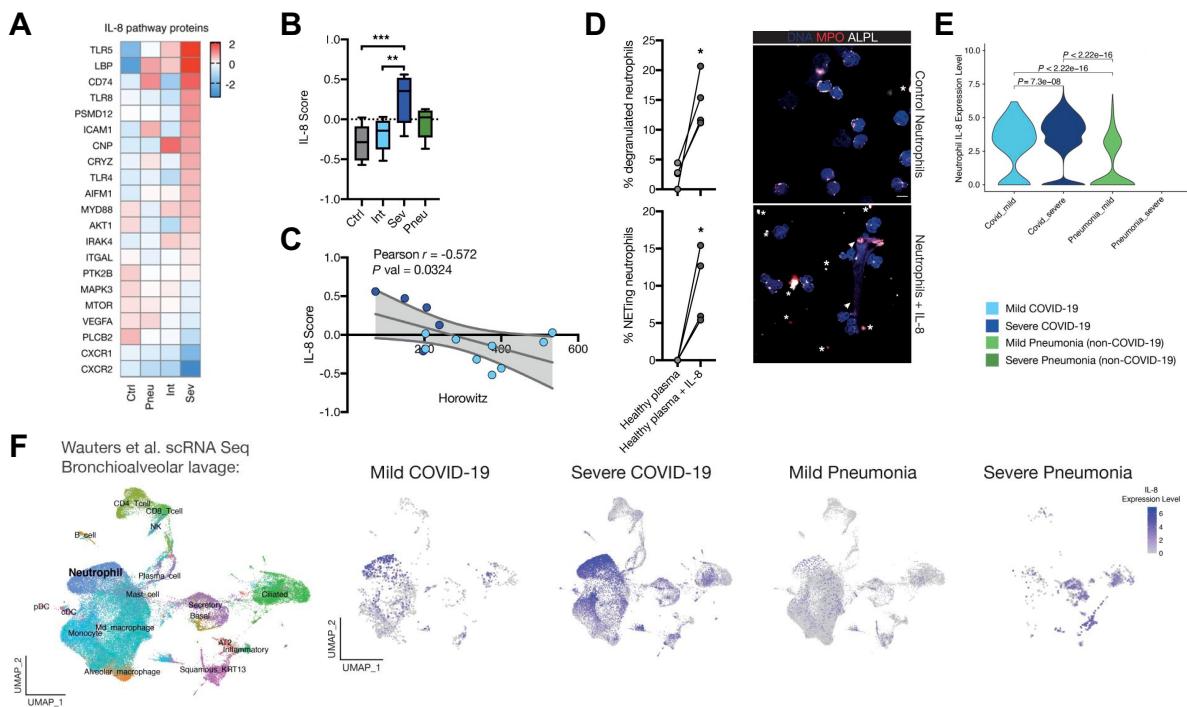
## Modulation des Interleukin-8-Signalwegs als neuer Therapieansatz der schweren COVID-19-Pneumonie

Neutrophile Granulozyten stellen die zahlreichste leukozytäre Subpopulation des peripheren Bluts im Menschen dar und gehören zu den wichtigsten Bestandteilen der körpereigenen Sofortreaktion auf eindringende Pathogene (Burn *et al.*, 2021; Margraf *et al.*, 2022; Quail *et al.*, 2022). Ausgestattet mit einem Arsenal aus antimikrobiellen Granula, der Fähigkeit zur raschen Sekretion proinflammatorischer Zytokine sowie mithilfe verschiedener Effektorfunktionen wie der Phagozytose, einer stark ausgeprägten Chemotaxis sowie der Fähigkeit, eindringende Pathogene durch NETs an der Ausbreitung zu hindern, gehören Neutrophile zu den potentesten Waffen des Körpers im Kampf gegen die Ausbreitung von Mikroorganismen (Bardoele *et al.*, 2014; Brinkmann *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2007; Kolaczkowska and Kubes, 2013; Ley *et al.*, 2018; Massberg *et al.*, 2010). Entsprechend können erworbene oder angeborene Störungen von Neutrophilfunktionen sowie transiente oder dauerhafte Neutropenien zu schweren Immundefekten führen, die durch die Ausbreitung opportunistischer Keime und ein hohes Maß an Morbidität und Mortalität gekennzeichnet sind (Burn *et al.*, 2021; Evans *et al.*, 2021; Silvestre-Roig *et al.*, 2020; Skokowa *et al.*, 2017).

Die traditionelle Immunologie betrachtet Neutrophile noch immer als kurzlebige „Fußsoldaten“ der innaten Immunität, die stereotyp auf interne und externe Reize reagieren und lediglich im Rahmen bakterieller Infektionen eine relevante Rolle spielen. Verschiedene Studien insbesondere des letzten Jahrzehnts konnten jedoch hervorheben, dass Neutrophile auch im Rahmen nichtinfektiöser Erkrankungen essenzielle Funktionen innehaben: Hierzu gehören beispielsweise die Förderung von Wundheilung nach traumatischen Verletzungen sowie die Regeneration von Organen, die beispielsweise im Rahmen von Gefäßverschlüssen und der konsekutiven Ischämie-Reperfusionsdynamik unter Gewebeschädigung leiden (Jenne *et al.*, 2013; Ley *et al.*, 2018; Mauler *et al.*, 2019; Phillipson and Kubes, 2019; Silvestre-Roig *et al.*, 2020). So phagozytieren durch *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) angelockte Neutrophile Überreste von apoptotischen und nekrotischen Zellen und formen durch ihre effiziente interstitielle Migration physische Kanäle, die einspülenden Gefäßen als Vorlage dienen und durch die so vereinfachte Angiogenese die Regeneration beeinflussen (Maugeri *et al.*, 2009; Silvis *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2017). Darüber hinaus konnte kürzlich im Rahmen beeindruckender

Studien gezeigt werden, dass Neutrophile selbst extrazelluläre Matrixproteine produzieren können und durch Aufnahme und den Transport bereits an anderer Stelle synthetisierter Matrixproteine wie Kollagenen zur Wundheilung beitragen (Correa-Gallegos *et al.*, 2019; Fischer *et al.*, 2022).

Allerdings kann eine Überaktivierung von Neutrophilen auch dazu führen, dass die eigentlich protektive Immunantwort in einen Status der Immundysregulation umschlägt, der durch unkontrollierte Degranulation mit Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und zytotoxischer Substanzen sowie der oben bereits erwähnten NETs führt (Gaertner *et al.*, 2017; Kaiser *et al.*, 2021b; Nicolai *et al.*, 2021; Yipp *et al.*, 2012). Diese NETs, ein Netzwerk aus doppelsträngiger, mit proteolytischen Enzymen gespickter DNA, sollen eigentlich die Ausbreitung von Mikroorganismen im Rahmen der sogenannten Immunothrombose verhindern (Branzk *et al.*, 2014; Brinkmann *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2007; Jenne *et al.*, 2013; Martinod *et al.*, 2013; Massberg *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2022; Yipp *et al.*, 2012). Bei diffuser Aktivierung fördern sie aber die lokale und systemische Inflammation durch direkte zytotoxische Effekte auf Bystander-Zellen und eine generalisierte Aktivierung der Gerinnungskaskade, die ihrerseits zur Ausbildung von Mikrothromben und einer Gewebeischämie mit Verstärkung der Entzündungsreaktion führen kann (Castanheira and Kubes, 2019; Leppkes *et al.*, 2016; Noubouossie *et al.*, 2017). Dieser als Thromboinflammation bezeichnete Zustand wird im Rahmen verschiedener akut-entzündlicher sowie kardiovaskulärer Erkrankungen beobachtet, etwa bei ischämischen Schlaganfällen, der venösen Thrombose, akuten Myokardinfarkten und der COVID-19-Erkrankung (Engelmann and Massberg, 2013; Jackson *et al.*, 2019; Kaiser *et al.*, 2021b; Massberg *et al.*, 2010; Nicolai *et al.*, 2020a; Rieger *et al.*, 2016; Stark *et al.*, 2016; von Bruhl *et al.*, 2012). So konnten wir und andere Gruppen nachweisen, dass NETs in Thromben von Patientinnen und Patienten mit Schlaganfällen, frischen Myokardinfarkten sowie Stenthrombosen auftreten und hier durch Bindung von Tissue Faktor die Gerinnungsbildung fördern, und dass dieses Auftreten mit der zukünftigen Inzidenz adverser kardiovaskulärer Events korreliert (Gorog and Massberg, 2022; Novotny *et al.*, 2020; Rieger *et al.*, 2016; Stakos *et al.*, 2015).



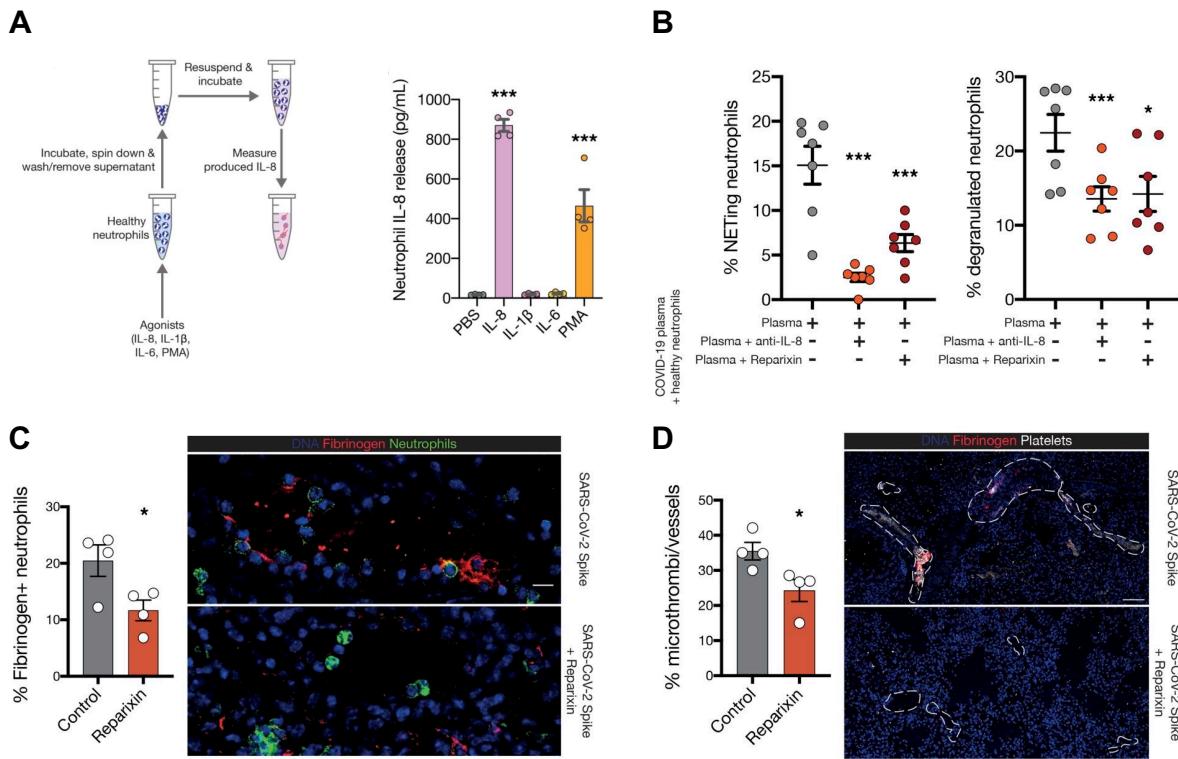
**Abb. 7:** (A) Heatmap der Expression mit dem IL-8-Signalweg assoziierter Proteine, die durch Massenspektrometrie von isolierten Neutrophilen generiert wurden. (B) Quantifizierung des IL-8-Scores (Proxy für die Expression von mit dem IL-8-Signalweg assozierten Proteinen) über die verschiedenen Patientengruppen hinweg (Ctrl = gesunde Kontrollen, Int = intermediate severity, Sev = high severity, Pneu = non-SARS-CoV-2-induced pneumonia. (C) Korrelation des IL-8-Scores mit dem Horowitz-Koeffizienten, einem Oxygenierungsindex. (D) Quantifizierung von Degranulation und NET-Formation gesunder Neutrophiler nach Hinzugabe von rekombinantem IL-8. Rechts: Exemplarische Bilder degranulierender und NETierender Neutrophiler. (E) Quantifizierung der IL-8-Expression auf Transkriptebene von Neutrophilen, die aus der Bronchiallavage von Patientinnen und Patienten mit COVID-19 oder nicht-COVID-19-Pneumonien isoliert wurden. (F) UMAP (links) und Feature plots (rechts), die die hohe Expression von IL-8 durch Neutrophile, insbesondere bei schweren Fällen der COVID-19-Pneumonie, zeigen. One-way ANOVA für B, E, Student's t-Test (ungepaart, zweiseitig) für D.

Die COVID-19-Pandemie stellt das globale Gesundheitssystem und die Weltwirtschaft seit Frühjahr 2020 vor große Herausforderungen. In der frühen Phase der Pandemie war dies durch die rasche Ausbreitung, aber auch die hohe Mortalitätsrate gerade unter kardiovaskulär vorerkrankten Patientinnen und Patienten bedingt (Guan *et al.*, 2020; Vabret *et al.*, 2020). Wir und andere Arbeitsgruppen konnten bereits früh zeigen, dass eine der zugrundeliegenden Ursachen eine Hyperaktivierung von Endothel und Gerinnungskaskade, besonders aber auch von Thrombozyten und innaten Immunzellen ist. Diese Hyperaktivierung insbesondere von Neutrophilen, verstärkt durch die reziproke Bindung und Stimulation von Plättchen, führte vor allem bei den Wildtyp-, Alpha- und Delta-Varianten des SARS-CoV-2-Virus zu einer systemischen Ausbildung von Immunothromben. Diese wiederum waren durch eine hohe Zahl infiltrierender Neutrophiler sowie der Ausbildung von Neutrophil Extracellular Traps

(NETs) gekennzeichnet (Kaiser *et al.*, 2021a; Kaiser *et al.*, 2021b; Middleton *et al.*, 2020; Nicolai *et al.*, 2021; Nicolai *et al.*, 2020a; Schulte-Schrepping *et al.*, 2020; Zuo *et al.*, 2020).

In einer im Frühjahr 2021 publizierten Studie konnten wir eine der Signalkaskaden identifizieren, die Neutrophilenaktivierung und NET-Formation vorantreiben. Mithilfe massenspektrometrischer Proteom-Untersuchungen von Neutrophilen wiesen wir nach, dass isolierte Neutrophile von COVID-19-Patienten mit schweren Verläufen vermehrt Proteine exprimieren, die infolge hoher systemischer Interleukin-8 (IL-8)-Level aktiviert werden und an der Synthese von IL-8 beteiligt sind (Abb. 7A-C). Tatsächlich fand sich in unserer Kohorte insbesondere bei Patientinnen und Patienten mit schweren COVID-19-Verläufen ein signifikanter Anstieg der systemischen IL-8-Werte, die als mögliche Ursache der Neutrophilen-Hyperaktivierung infrage kamen. Hohe IL-8-Werte korrelierten signifikant mit der Krankheitsschwere und einem systemischen Status der Hyperkoaguabilität, wie anhand niedriger Horowitz-Koeffizienten sowie hohen D-Dimer-Werten bei diesem Patientenkollektiv gezeigt werden konnte (Abb. 7B, C). Passend hierzu führte eine Stimulation von gesunden Neutrophilen mit rekombinantem IL-8 oder mit Plasma von COVID-19-Patienten, die durch hohe systemische IL-8-Werte charakterisiert waren, zu einer Exazerbation der NETose und Degranulation von Neutrophilen sowie der vermehrten Expression von Aktivierungsmarkern (Abb. 7D). Weiterhin identifizierten wir Neutrophile selbst als eine der Hauptquellen systemisch erhöhter IL-8-Level: Einerseits zeigten Einzelzell-Sequenzierungsdaten aus Bronchiallavagen von COVID-19-Patientinnen und -Patienten (Wauters *et al.*, 2021) bei schweren Verläufen eine signifikant vermehrte Expression des für IL-8 kodierenden Transkripts (Abb. 7E, F). Andererseits führte die Inkubation gesunder Neutrophiler mit rekombinantem IL-8 zu einer signifikant erhöhten IL-8-Produktion durch eben diese Neutrophile im Vergleich zu Zellen, die mit anderen pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 oder IL-1beta inkubiert worden waren (Abb. 8A).

Die vermehrte Expression gerade bei schweren Verläufen sowie die Assoziation von IL-8-Spiegeln und einerseits Krankheitsschwere sowie der ihr zugrundeliegenden Hyperkoaguabilität legten eine Untersuchung möglicher therapeutischer Implikationen des IL-8-Signalwegs nahe. Hierfür nutzten wir von COVID-19-Patienten gewonnenes Plasma im Vergleich zu Plasma von gesunden Spendern. Eine therapeutische Blockade von im Plasma enthaltenen IL-8, entweder durch eine Antikörper-vermittelte



**Abb. 8:** (A) Schematischer Ablauf der *in vitro* Stimulation humaner Neutrophiler mit den hier beschriebenen Zytokinen und anschließender Messung von IL-8 im Überstand. Rechts: Quantifizierung des IL-8-Release. (B) Quantifizierung von NETose (links) und Neutrophilen-Degranulation von gesunden Neutrophilen, die mit Vehikel, anti-IL-8-Antikörper oder Reparixin präinkubiert und anschließend gegenüber COVID-19-Plasma exponiert wurden. (C) Quantifizierung Fibrinogen-positiver Neutrophiler in der Lunge von hACE2-transgenen Mäusen in einem Modell der Spike-Protein-induzierten Lungenentzündung. Rechts: Repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder pulmonaler Neutrophiler. Rot: Fibrinogen, grün: Ly6G, blau: DAPI. (D) Quantifizierung pulmonaler Mikrothromben im selben Modell der Spike-Protein-induzierten Lungenentzündung. Rechts: Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen, die pulmonale Mikrothromben zeigen. Rot: Fibrin(ogen), weiß: Gp1b, blau: DAPI. One-way ANOVA für A, B, Student's t-Test (ungepaart, zweiseitig) für C, D.

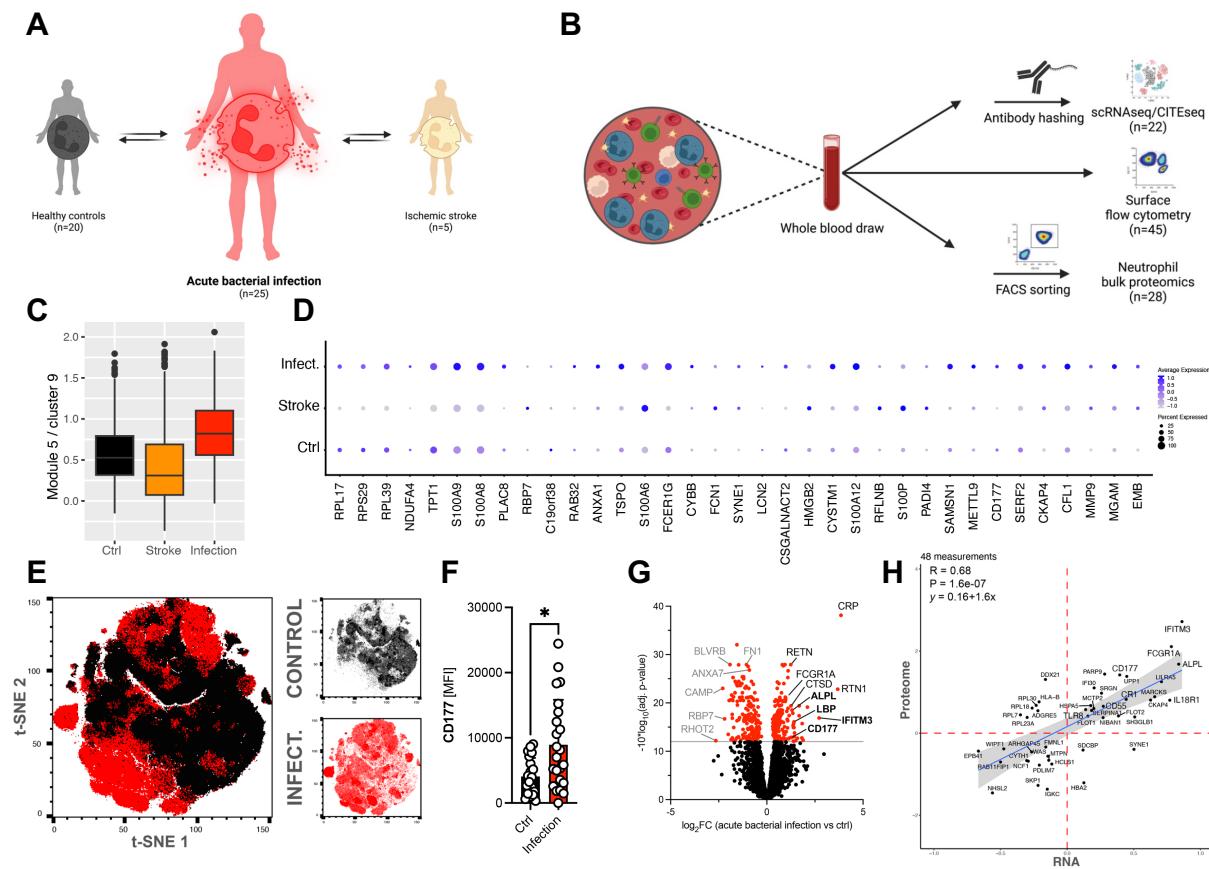
Neutralisation von IL-8 oder einer Blockade der IL-8-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 durch den small molecule inhibitor Reparixin konnte diese Aktivierung von Neutrophilen effektiv reduzieren (Abb. 8B). In einem Mausmodell der SARS-CoV-2-induzierten Lungenentzündung konnten wir nachweisen, dass eine Behandlung mit Reparixin zu einer Reduktion pulmonaler Mikrothromben führt und die systemische Neutrophilenaktivierung signifikant reduziert (Abb. 8C, D;) (Kaiser *et al.*, 2021b). Diese und weitere Ergebnisse führten dazu, dass Reparixin im Rahmen von Phase II-Studien bei Patienten mit schweren COVID-19-Verläufen getestet wurde und hier ebenfalls vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Notwendigkeit invasiver Beatmung und der Verlegung auf Intensivstationen erbrachte (Landoni *et al.*, 2022a; Landoni *et al.*, 2022b).

Unsere Daten beschreiben zusammenfassend eine wichtige Rolle der IL-8-induzierten Hyperaktivierung von Neutrophilen, die diese Hyperaktivierung durch eine vermehrte IL-8-Produktion, Degranulation und NETose perpetuieren. Mithilfe dieser Daten konnten wir IL-8 als mögliche therapeutische Zielstruktur bei Patientinnen und Patienten mit schwerem COVID-19-Verlauf identifizieren.

## Transkriptionelle Plastizität durch peripheres Priming zirkulierender Neutrophiler als neuer Mechanismus der infektionsassoziierten Adaptation des innaten Immunsystems

Neutrophile reagieren schnell auf Entzündungen und Infektionen, allerdings gilt ihr funktionelles Verhalten nach der Auswanderung aus dem Knochenmark derzeit als prädeterminiert. Daher wird angenommen, dass phänotypische Veränderungen der zirkulierenden Neutrophilen, die im Rahmen systemischer Entzündungen beobachtet werden, maßgeblich durch eine "Linksverschiebung" des Neutrophilen-Kompartiments in Richtung jüngerer Populationen aus dem Knochenmark verursacht werden, ohne signifikante transkriptionelle Plastizität in bereits zirkulierenden, reifen Neutrophilen. Neuere Studien haben eindrucksvoll Indizien dafür beschrieben, dass Neutrophile in Mäusen durch ein hohes Maß an Plastizität und Heterogenität gekennzeichnet sind, das vielseitige Reaktionen auf verschiedene externe Stimuli sowie eine Anpassung an die Anforderungen verschiedener Krankheitsmodelle sowie bestimmter Organsysteme ermöglicht (Ballesteros *et al.*, 2020; Crainiciuc *et al.*, 2022; Ng *et al.*, 2019; Palomino-Segura *et al.*, 2023; Xie *et al.*, 2020). Beispiele hierfür sind die Anpassung der Genexpression durch Organ-residente Neutrophile, die Hochregulation von für Extrazellulärmatrix-Proteine kodierende Transkripte nach Gewebeverletzungen, sowie die Trigger-spezifische Hochregulation bestimmter Transkriptionsfaktoren und nachgeschalteter Gensignaturen, die zu einer spezifischen und plastischen Antwort von Mausneutrophilen führen (Adrover *et al.*, 2020; Ballesteros *et al.*, 2020; Casanova-Acebes *et al.*, 2013; Crainiciuc *et al.*, 2022; Khoyratty *et al.*, 2021; Maas *et al.*, 2023; Montaldo *et al.*, 2022; Palomino-Segura *et al.*, 2023; Quail *et al.*, 2022). Ob auch humane Neutrophile, die traditionell als transkriptionell inaktiv und determiniert gelten und im Vergleich zu anderen Leukozyten relativ niedrige Mengen an zellulärer RNA exprimieren, ebenfalls mithilfe der transkriptionellen Maschinerie plastisch reagieren können, um funktionale Veränderungen herbeizuführen, ist bislang unklar.

Um diese Aspekte zu untersuchen, rekrutierte ich im Rahmen einer translationalen Studie Patientinnen und Patienten mit akuter bakterieller Infektion sowie gesunde Vergleichskontrollen und untersuchte humane Neutrophile mithilfe von Multi-Omics-Methoden, insbesondere Einzelzell-RNA-Sequenzierungen, Durchflusszytometrie und Massenspektrometrie (Abb. 9A-H). Hierbei stellten wir fest, dass plastische Verschiebungen durch Hochregulation von antimikrobiellen Genen bei verschiedenen Arten und überraschenderweise sowohl bei zirkulierenden als auch bei aus dem

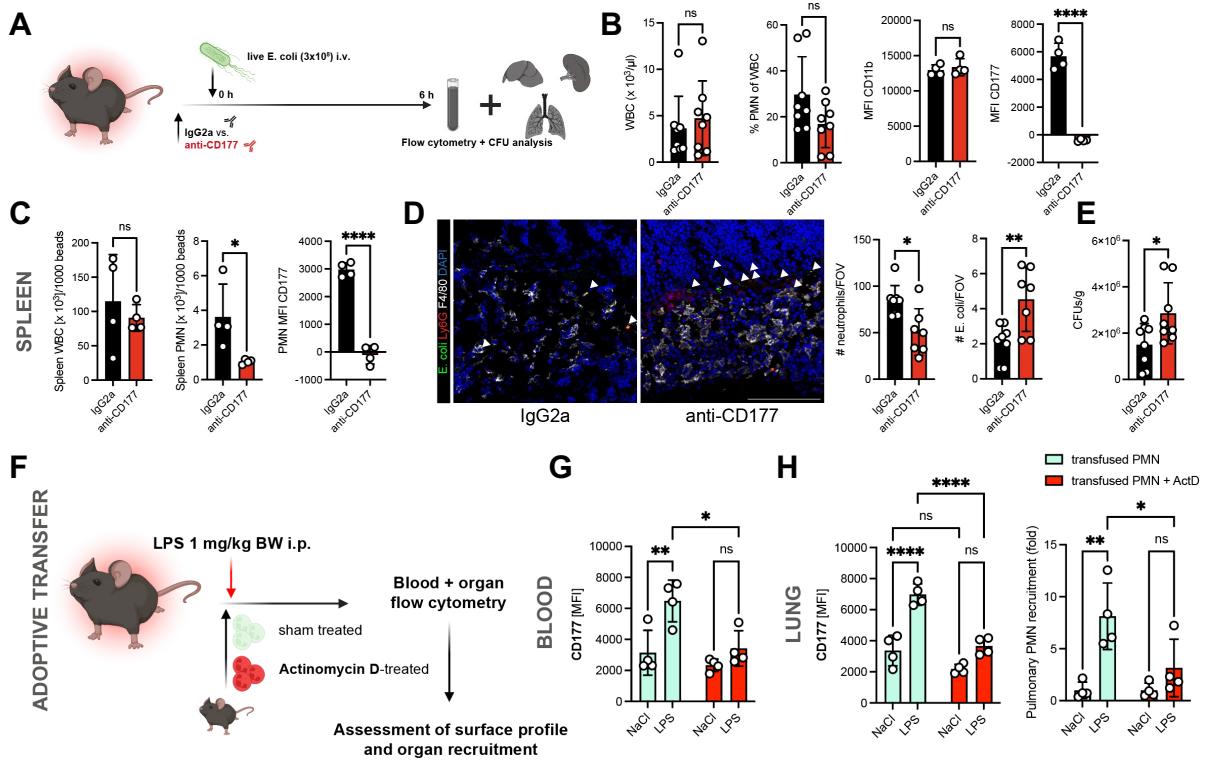


**Abb. 9:** (A) Schematische Übersicht der Studienkohorten. (B) Schematische Übersicht der Omics-Methoden, die im Rahmen dieser Studie mit aus Blut gewonnenen Zellen durchgeführt wurden. (C) Box plot der Expression eines Moduls, das in der bakteriellen Expression vermehrt exprimiert wird, basierend auf WGCNA-Analysen. (D) Dot plot der Expression der im Modul in (C) inkludierten Gene, inklusive antibakterieller Gene wie CST7 und CD177. (E) t-SNE von 900,000 Neutrophilen aus n=45 Individuen. (F) Quantifizierung der Mean Fluorescence Intensity (MFI), d.h. der gemittelten Oberflächenexpression von CD177 auf humanen Neutrophilen von gesunden Kontrollen (schwarz) oder Patientinnen und Patienten mit akuter bakterieller Infektion. (G) Volcano plot der differenziell exprimierten Proteine von gesunden vs. an bakterieller Infektion leidender Probanden. Die auf der rechten Seite markierten, roten Punkte repräsentieren signifikant hochregulierte Proteine in Infektion vs. Kontrollen. (H) Korrelation der Expression hochregulierter Gene und ihrer Genprodukte, d.h. Proteine, gemessen anhand von Einzelzell-Sequenzierungen (RNA) oder Massenspektrometrie (Protein). Student's t-Test (ungepaart, zweiseitig) für F.

Knochenmark mobilisierten Neutrophilen-Subpopulationen beobachtet werden konnten. Dies stellt das Konzept in Frage, dass phänotypische Verschiebungen ausschließlich durch die Mobilisierung von Neutrophilen aus dem Knochenmark und die entsprechende Linksverschiebung verursacht werden. Wir konnten außerdem nachweisen, dass die transkriptionellen Veränderungen mit einer veränderten Proteinexpression einhergingen, wobei Expression von Gen und entsprechendem Genprodukt sehr gut korrelierte (Abb. 9H). Besonders prominent war hierbei die Hochregulation des Adhäsionsmoleküls CD177/NB-1, dessen vermehrte Expression

wir sowohl auf transkriptioneller Ebene sowie durchflusszytometrisch und massenspektrometrisch auf Proteinebene detektieren konnten. CD177 wird einerseits von einem Großteil zirkulierender Neutrophiler exprimiert und wird daher auch als Markerprotein für zirkulierende Neutrophile eingesetzt, stellt aber andererseits auch einen Aktivierungsmarker da, der für die (Trans)migration humaner Neutrophiler essenziell ist und zur Progression der inflammatorischen Antwort auf verschiedene Erkrankungen beiträgt (Bai *et al.*, 2017; Gohring *et al.*, 2004; Gullotta *et al.*, 2023; Jerke *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2018a). Da wir eine Hochregulation von CD177 auf Transkriptebene auch in septischen Mäusen bestätigen konnten, untersuchten wir im nächsten Schritt die funktionelle Relevanz der vermehrten Expression von CD177. Interessanterweise zeigte sich hierbei, dass die Hochregulation von CD177 auf RNA- und Proteinebene für die Infektbekämpfung essenziell ist, indem durch Unterstützung eines effizienten migratorischen Verhaltens und die Förderung der Phagozytose von Neutrophilen eine effektive Eindämmung von Bakterien erreicht wird (Abb. 10A-E). Die Hochregulation von CD177 und weiteren infektionsassoziierten Transkripten beobachteten wir in verschiedenen Neutrophilen-Subpopulationen in der Zirkulation, und zwar unabhängig von ihrem Reifungsstadium und Alter der Neutrophilen. Diese Daten suggerierten so erstmals ein hohes Maß an transkriptionelle Plastizität humaner und muriner Neutrophiler als Reaktionsmechanismus auf externe Stimuli mit unmittelbaren funktionellen Konsequenzen der veränderten Genexpression.

Um die zellulären Mechanismen noch weiter zu untersuchen, die diesem peripheren Priming von Neutrophilen zugrunde liegen, transfundierten wir Neutrophile, die entweder mit Placebo oder dem RNA-Polymerase II-Inhibitor Actinomycin D (ActD), der die Transkription von mRNA unterbindet, inkubiert worden waren, in mit LPS-vorbehandelte Mäuse (Abb. 10F). Hierbei zeigten die mit ActD inkubierten Neutrophilen eine signifikant reduzierte Expression infektionsassozierter Marker wie CD177, und wurden in Konsequenz weniger effektiv in Zielorgane wie Lunge und Leber rekrutiert (Abb. 10G, H). Um den Effekt des peripheren Primings mit nachgeschalteter Neutrophilen-Plastizität weiter zu untermauern, inkubierten wir reife Maus-Neutrophile, die wiederum mit ActD oder Vehikel inkubiert worden waren, mit dem Plasma septischer Versuchstiere. Mithilfe von Bulk-RNA-Sequenzierungen wiesen wir hier drastische transkriptionelle Veränderungen in den Kontroll-Neutrophilen nach, mit Hochregulation von für Immunabwehr, Bakterien-Bekämpfung



**Abb. 10:** (A) Schematische Darstellung des *in vivo*-Infektionsversuchs mit lebenden, eGFP-exprimierenden *E. coli*. (B) Quantifizierung der peripheren Leukozyten- und Neutrophilenzahlen nach Gabe von IgG2a oder anti-CD177-Antikörper sowie der Oberflächenexpression von CD11b und CD177 auf Blut-Neutrophilen. (C) Quantifizierung der Leukozyten- und Neutrophilenzahlen in der Milz sowie der Expression von CD177 auf Neutrophilen in der Milz. (D) Repräsentative Konfokalaufnahmen von Immunfluoreszenz-Schnitten der Milz von mit *E. coli*-infizierten Tieren. Weiße Dreiecke zeigen in der Milz akkumulierte Bakterien an. Rechts: Histologische Quantifizierung der Neutrophilen- und *E. coli*-Zahlen in der Milz. (E) Quantifizierung der colony-forming units in der Milz zwischen den Versuchsgruppen als Proxy für die bakterielle Dissemination. (F) Schematische Darstellung des Transfusionsversuchs verschiedener isolierter Neutrophilenzweiten im Inflammationsmodell. (G) Quantifizierung der Expression von CD177 auf Neutrophilen für die angezeigten Versuchsgruppen und Neutrophilenzweiten (grün: transfundiert, rot: transfundiert und Actinomycin D-vorbehandelt). (H) Quantifizierung der CD177-Expression auf pulmonalen Neutrophilen sowie Quantifizierung der Rekrutierung von Neutrophilen in die Lunge. Two-way ANOVA für G, H, Student's t-Test (ungepaart, zweiseitig) für B-E.

und Phagozytose kodierenden Transkripten, die in mit ActD inkubierten Neutrophilen zu großen Teilen aufgehoben waren.

Zusammenfassend identifizieren diese Daten erstmals ein hohes Maß an transkriptioneller Plastizität zirkulierender humaner Neutrophiler und nachgeschalteter Hochregulation von infektionsassoziierten Effektor-Kaskaden als einen entscheidenden Mechanismus für die funktionelle Reprogrammierung von Neutrophilen zur Eindämmung von Bakterien in der Zirkulation (Kaiser et al., 2024). Mittlerweile konnte dieser Mechanismus in internationalen Kohorten und im Rahmen anderer

Krankheitsbilder, insbesondere bei Patientinnen und Patienten mit malignen Grunderkrankungen und bakteriellen Infektionen sowie Knochenmarktransplantierten, reproduziert werden (Kwok *et al.*, 2023; Montaldo *et al.*, 2022; Palomino-Segura *et al.*, 2023).

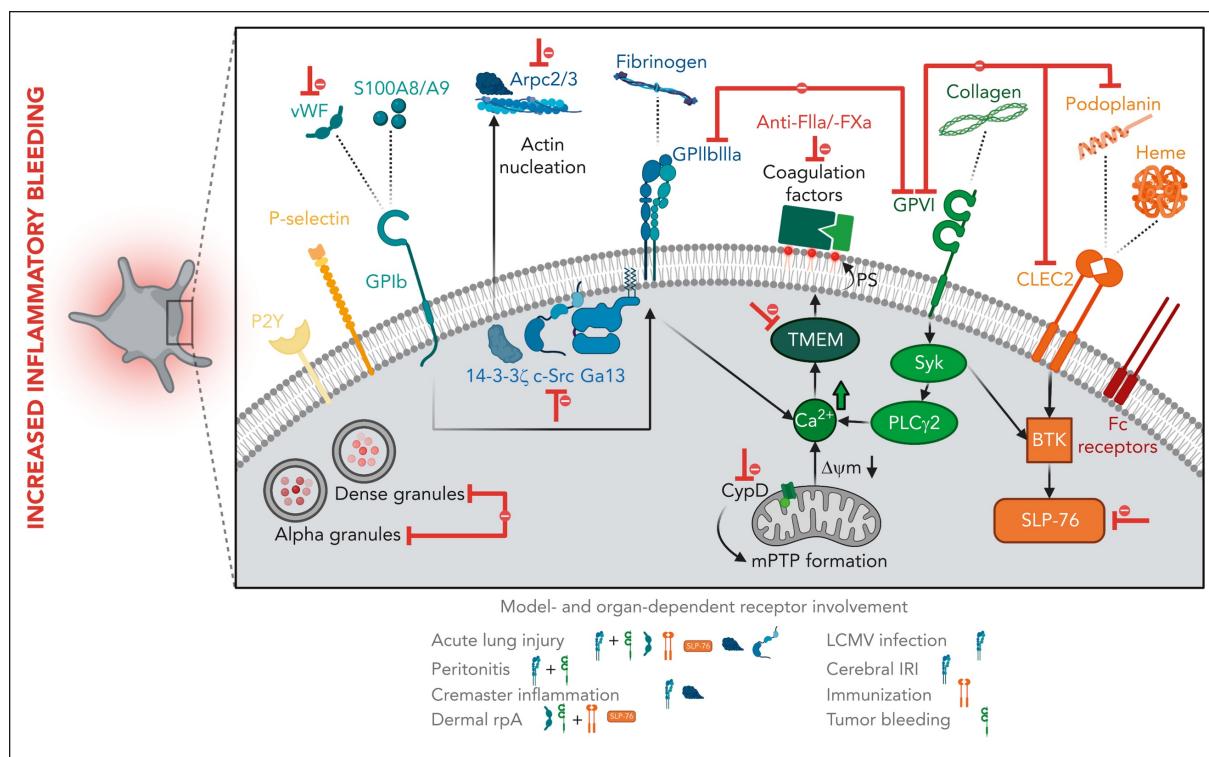
### 3) Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Habilitationsschrift habe ich neue Mechanismen und Phänotypen beschrieben, die von Thrombozyten und Neutrophilen genutzt werden, um einerseits zu einer effektiven Immunantwort, andererseits zur vaskulären Homöostase beizutragen.

Im ersten Teil habe ich zunächst zelluläre Mechanismen beschrieben, die der Fähigkeit zur autonomen Plättchenmigration zugrunde liegen. Hierbei wurde der heterotrimere Komplex aus c-Src, 14-3-3 $\zeta$  und Ga13 identifiziert, der einerseits das *outside-in signaling* von Thrombozyten beeinflusst, und andererseits über die Ausbildung von Lamellipodien die Migration initiiert und aufrechterhält. Diese Daten unterstreichen erstmals die Komplexität des thrombozytären Migrationsprozesses abseits des Aktomyosin-Zytoskeletts und unterstreichen zudem seine translationale Relevanz: Die Blockade eines jeden Bestandteils, insbesondere der als molekulares Ziel antineoplastischer Therapien etablierten Tyrosinkinase c-Src, resultiert über die Inhibition der Migration in einer Einschränkung der vaskulären Homöostase insbesondere unter inflammatorischen Bedingungen. Dies führt sowohl in mit dem c-Src-Inhibitor Dasatinib behandelten Mäusen sowie in Leukämie-Patientinnen und -Patienten unter Dasatinib-Therapie zu einer möglicherweise auf den beobachteten Migrationsdefekt zurückführbaren Blutungsneigung. Unsere Daten tragen so zum molekularen Verständnis dieser besonderen Plättchenfunktion bei und ermöglichen zudem erstmals eine therapeutische Modulation der thrombozytären Migration *in vivo* (Abb. 11).

Neben der Migration erforschte ich im Rahmen dieser Habilitationsarbeit weitere inflammationsspezifische Plättchen-Funktionen. Thrombozyten erhalten in der Inflammation die vaskuläre Integrität aufrecht, indem sie aktiv entlang von Fibrin(ogen)-Gradienten am entzündeten Endothel entlangwandern, um durch die Extravasation von Neutrophilen verursachte Gefäßleckagen zu identifizieren. Wie eben diese Gefäßleckagen letztlich von Thrombozyten verschlossen werden, deren Größe die von Leukozyten um ein Vielfaches unterschreitet, war bislang unklar. Wir stellten die Hypothese auf, dass Plasmaproteine der Gerinnungskaskade an der Verhinderung inflammatorischer Blutungen beteiligt sind. Tatsächlich zeigte sich nach Antikoagulation mit klinisch zugelassenen Faktor IIa- und Xa-Hemmern eine Zunahme der alveolären Hämorrhagie in Entzündungsmodellen. Wir wiesen außerdem die

Induktion von prokoagulanten Thrombozyten am entzündeten Gefäßendothel nach, die zudem lokal Gerinnungsfaktoren rekrutierten. Diese prokoagulante Aktivierung erfolgte durch GPIIBIIIA- und GPVI-vermitteltes Sensing von subendothelial freigelegter Extrazellulärmatrix, insbesondere Kollagen, sowie der nachfolgenden Induktion von supramaximalen Calciumströmen in Abhängigkeit von Cyclophilin D. Die hiernach beobachtete, TMEM16F-abhängige Expression von Phosphatidylserin (PS) an der Oberfläche prokoagulanter Plättchen ermöglichte es einzelnen Plättchen, lokal große Mengen an Gerinnungsfaktoren zu rekrutieren und durch die Ausbildung von Mikrothromben die Endothelleckagen abzudichten. Um die essenzielle Rolle der prokoagulanten Aktivierung zu unterstreichen, führten wir inflammatorische Blutungsmodelle mit plättchenspezifischen Knockout-Mäusen ( $\text{PF4cre-CypD}^{\text{fl/fl}}$  und  $\text{PF4cre-TMEM16F}^{\text{fl/fl}}$ ) durch oder inhibierten die prokoagulante Aktivierung pharmakologisch durch Blockade von GPIIBIIIA und GPVI. Hierbei zeigte sich eine Zunahme der LPS-induzierten inflammatorischen (Mikro)Blutung in Lunge und Peritoneum, die die Wichtigkeit der lokalen Rekrutierung von Gerinnungsfaktoren durch prokoagulante Plättchen unterstreicht. Durch die lokal limitierte Ausbildung von (Mikro)thromben wird so einerseits die vaskuläre Integrität unterstützt, und andererseits eine generalisierte Gerinnselbildung mit konsekutiven thrombembolischen Komplikationen verhindert.

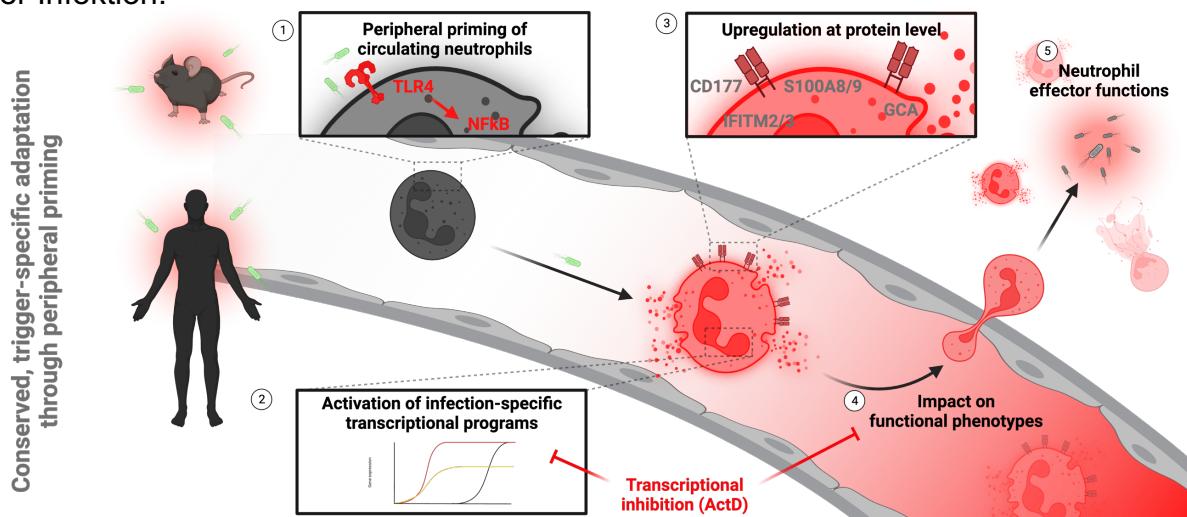


**Abb. 11:** Graphische Zusammenfassung von Rezeptoren und Signalkaskaden, die entscheidend zur Thrombozyten-vermittelten inflammatorischen Hämostase beitragen. Aus (Kaiser et al., 2023b).

Im zweiten Teil dieses Habilitationsprojekts beschäftigte ich mich mit entzündungsspezifischen Funktionen von Neutrophilen Granulozyten. Hierbei fokussierte ich mich zunächst auf die der Neutrophilen-Hyperaktivierung im Rahmen der COVID-19-Erkrankung zugrundeliegenden Mechanismen. Wir konnten nachweisen, dass der Interleukin-8-Signalweg bei schwer an COVID-19 erkrankten Patientinnen und -Patienten hochreguliert wird, und dass zirkulierendes IL-8 zu den am höchsten exprimierten Zytokinen dieses Patientenkollektivs zählt. Das Ausmaß der IL-8-Expression korrelierte hierbei mit Markern der Krankheitsschwere wie dem Oxygenierungskoeffizienten (Horowitz-Index) und einem systemischen prothrombotischen Status, was eine mechanistische Beteiligung des IL-8-Signalings suggeriert. Tatsächlich zeigte sich einerseits, dass Neutrophile selbst bei schweren COVID-19-Verläufen hohe Mengen an IL-8 produzieren und diese so durch para- und autokrine Aktivierung im Rahmen eines sich selbst verstärkenden Kreislaufs fördern, sowie andererseits eine IL-8-induzierte Hyperaktivierung von gesunden Neutrophilen, die sich durch Degranulation und NET-Formation manifestierte. Diese Beobachtung birgt therapeutisches Potential: Der hyperaktivierte Phänotyp von mit COVID-19-Plasma inkubierten, von gesunden Spendern isolierten Neutrophilen war reversibel, wenn das IL-8-Signaling entweder mittels blockierendem Antikörper oder einem die IL-8-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 blockierenden *small molecule inhibitor* (Reparixin) inhibiert wurde. Abschließend konnten wir zeigen, dass die systemische Gabe von Reparixin den prothrombotischen Phänotyp sowie die Ausbildung pulmonaler Mikrothromben in einem Mausmodell der SARS-CoV-2-Infektion zurückbilden konnte. Auf Grundlage dieser und anderer Studien wurde Reparixin letztlich im Rahmen von Phase 1- und Phase 2-Studien bei schweren COVID-19-Verläufen getestet und zeigte hier vielversprechende Ergebnisse.

In einem weiteren Projekt widmete ich mich ebenfalls neuen Aspekten der Neutrophilenfunktion, in diesem Fall jedoch im Kontext bakterieller Infektionen. Obwohl Neutrophile bislang als terminal differenzierte, unplastische und stereotyp agierende „Fußsoldaten“ betrachtet wurden, stellten wir auf der Grundlage von experimentellen Studien in der Maus die Hypothese auf, dass Neutrophile einerseits plastisch auf externe Stimuli wie eindringende Bakterien reagieren können, und dass sie hierfür zudem nicht nur eine Anpassung auf Protein-, sondern auch auf Transkriptebene vornehmen. Um diese Hypothesen zu testen, führten wir eine prospektive translationale Immunphänotypisierungsstudie durch, in deren Rahmen wir

Neutrophile Granulozyten zunächst mittels Einzelzellsequenzierungen untersuchten. Hierbei zeigte sich eine infektionsspezifische Hochregulation bestimmter Gensignaturen, die auf Neutrophilen-Ebene insbesondere Aktivierungsmarker wie CD177 umfasste. Diese Hochregulation auf Transkriptebene konnte mittels Durchflusszytometrie und Massenspektrometrie auch auf Proteomebene objektiviert werden. Insbesondere die Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD177 war hierbei relevant: Wir konnten zeigen, dass eine Blockade des hochregulierten CD177 in verschiedenen Mausmodellen der Sepsis sowie 4D-*in vivo*-Mikroskopie-Modellen 1) zu einer verminderten Rekrutierung und Migration von Neutrophilen führte, die 2) konsekutiv zu einer signifikant erhöhten Ausbreitung von Bakterien in Endorganen wie Milz und Leber führte. Interessanterweise war die Hochregulation von CD177 und anderer infektionsassoziiierter Transkripte auf ein peripheres Priming zirkulierender Neutrophiler zurückzuführen, und nicht allein auf die sogenannte „Linksverschiebung“, also die Rekrutierung junger, noch unreifer Neutrophiler aus dem Knochenmark. Eine Hemmung der transkriptionellen Aktivität dieser Neutrophiler zeigte einerseits eine deutliche reduzierte Hochregulation infektionsassoziiierter Transkripte und andererseits funktionelle Konsequenzen: Neutrophile, deren transkriptionelle Aktivität mittels RNA-Polymerase-Inhibitoren gehemmt wurde, wurden in einem murinen Sepsis-Modell weniger effizient in Zielorgane wie Leber und Lunge rekrutiert. Diese Daten unterstreichen somit erstmals die transkriptionelle und somit auch funktionelle Plastizität zirkulierender, reifer Neutrophiler im Menschen und zeigen eine direkte Konsequenz transkriptioneller Anpassung auf Neutrophilen-Phänotypen im Rahmen der Infektion.



**Abb. 12:** Graphische Zusammenfassung der transkriptionellen Plastizität zirkulierender Neutrophiler als neuem Mechanismus der Anpassungsfähigkeit an akute Stimuli wie bakterielle Infektionen. Aus (Kaiser et al., 2024).

Zusammenfassend beleuchten die in dieser Habilitationsschrift beschriebenen Projekte neue zelluläre Mechanismen und Funktionen von Thrombozyten und Neutrophilen Granulozyten, die für die Ausübung ihrer inflammations- und infektions-spezifischen Aufgaben essenziell sind. Die so gewonnenen Einblicke, beispielsweise die molekularen Mechanismen der Plättchenmigration, die Rolle der prokoagulanten Aktivierung in der vaskulären Homöostase, oder der Einfluss einerseits des IL-8-Signalwegs sowie der transkriptionellen Plastizität auf Neutrophilen-(Hyper)aktivierung, fördern das mechanistische Verständnis des Zusammenspiels beider Zelltypen. Sie legen darüber hinaus die Grundlage für weitere Studien, die darauf abzielen werden, das pathophysiologische Verständnis beider Zelltypen zu erweitern, um neue Strategien der therapeutischen Modulation im Rahmen (thrombo)inflammatorischer Erkrankungen zu entwickeln.

#### 4) Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1
ActD	Actinomycin D (RNA-Polymerase II-Inhibitor)
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
Arp2/3	Actin-related protein complex 2/3
BAL	Bronchoalveolare Lavage
BCR	Breakpoint cluster region
c-Src	Tyrosinkinase Src
CANTOS	Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study
CML	Chronisch-myeloische Leukämie
COLCOT	Colchicine Cardiovascular Outcomes Trial
COVID-19	Coronavirus disease 2019
CXCL8	Interleukin-8
CXCR1	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1
CXCR2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2
CypD	Cyclophilin D
E. coli	Escherichia coli
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
FiO <sub>2</sub>	Inspiratorische Sauerstofffraktion (O <sub>2</sub> -Zumischung)
GPIIbIIIA	Glykoprotein IIbIIIa (Fibrinogen-Rezeptor)
GPVI	Glykoprotein VI (Kollagen-Rezeptor)
IL-8	Interleukin-8
LPS	Lipopolysaccharid
Myh9	Myosin heavy chain 9
NET	Neutrophil Extracellular Trap

PA	Prokoagulante Aktivierung
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP	Prokoagulante(s) Plättchen
PS	Phosphatidylserin
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SFK	Sarcoma Family Kinase
Syk	Spleen Tyrosine Kinase
THO	3',4',7'-Trihydroxyisoflavan
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TMEM16F	Transmembranprotein 16F
t-SNE	t-Stochastic Neighbour Embedding
WGCNA	Weighted Gene Cluster Network Analysis
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

## 5) Literaturverzeichnis

- Abbasian, N., Millington-Burgess, S.L., Chabra, S., Malcor, J.D., and Harper, M.T. (2020). Supramaximal calcium signaling triggers procoagulant platelet formation. *Blood Adv* 4, 154-164. 10.1182/bloodadvances.2019000182.
- Adrover, J.M., Aroca-Crevillen, A., Crainiciuc, G., Ostos, F., Rojas-Vega, Y., Rubio-Ponce, A., Cilloniz, C., Bonzon-Kulichenko, E., Calvo, E., Rico, D., *et al.* (2020). Programmed 'disarming' of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation. *Nat Immunol* 21, 135-144. 10.1038/s41590-019-0571-2.
- Agbani, E.O., and Poole, A.W. (2017). Procoagulant platelets: generation, function, and therapeutic targeting in thrombosis. *Blood* 130, 2171-2179. 10.1182/blood-2017-05-787259.
- Agbani, E.O., van den Bosch, M.T., Brown, E., Williams, C.M., Mattheij, N.J., Cosemans, J.M., Collins, P.W., Heemskerk, J.W., Hers, I., and Poole, A.W. (2015). Coordinated Membrane Ballooning and Procoagulant Spreading in Human Platelets. *Circulation* 132, 1414-1424. 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.015036.
- Bai, M., Grieshaber-Bouyer, R., Wang, J., Schmider, A.B., Wilson, Z.S., Zeng, L., Halyabar, O., Godin, M.D., Nguyen, H.N., Levescot, A., *et al.* (2017). CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation. *Blood* 130, 2092-2100. 10.1182/blood-2017-03-768507.
- Baig, A.A., Haining, E.J., Geuss, E., Beck, S., Swieringa, F., Wanitchakool, P., Schuhmann, M.K., Stegner, D., Kunzelmann, K., Kleinschnitz, C., *et al.* (2016). TMEM16F-Mediated Platelet Membrane Phospholipid Scrambling Is Critical for Hemostasis and Thrombosis but not Thromboinflammation in Mice-Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36, 2152-2157. 10.1161/ATVBAHA.116.307727.
- Ballesteros, I., Rubio-Ponce, A., Genua, M., Lusito, E., Kwok, I., Fernandez-Calvo, G., Khoyratty, T.E., van Grinsven, E., Gonzalez-Hernandez, S., Nicolas-Avila, J.A., *et al.* (2020). Co-option of Neutrophil Fates by Tissue Environments. *Cell* 183, 1282-1297 e1218. 10.1016/j.cell.2020.10.003.
- Bardoel, B.W., Kenny, E.F., Sollberger, G., and Zychlinsky, A. (2014). The balancing act of neutrophils. *Cell Host Microbe* 15, 526-536. 10.1016/j.chom.2014.04.011.
- Boilard, E., Nigrovic, P.A., Larabee, K., Watts, G.F., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Massarotti, E.M., Remold-O'Donnell, E., Farndale, R.W., Ware, J., and Lee, D.M. (2010). Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 327, 580-583. 10.1126/science.1181928.
- Boulaftali, Y., Mawhin, M.A., Jandrot-Perrus, M., and Ho-Tin-Noe, B. (2018). Glycoprotein VI in securing vascular integrity in inflamed vessels. *Res Pract Thromb Haemost* 2, 228-239. 10.1002/rth2.12092.
- Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S.E., Wang, Q., Gutierrez, M.G., Brown, G.D., and Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively

release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol* 15, 1017-1025. 10.1038/ni.2987.

Braun, L.J., Stegmeyer, R.I., Schafer, K., Volkery, S., Currie, S.M., Kempe, B., Nottebaum, A.F., and Vestweber, D. (2020). Platelets docking to VWF prevent leaks during leukocyte extravasation by stimulating Tie-2. *Blood* 136, 627-639. 10.1182/blood.2019003442.

Braun, L.J., Zinnhardt, M., Vockel, M., Drexler, H.C., Peters, K., and Vestweber, D. (2019). VE-PTP inhibition stabilizes endothelial junctions by activating FGD5. *EMBO Rep* 20, e47046. 10.15252/embr.201847046.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-1535. 10.1126/science.1092385.

Burkard, P., Schonhart, C., Vogtle, T., Kohler, D., Tang, L., Johnson, D., Hemmen, K., Heinze, K.G., Zarbock, A., Hermanns, H.M., *et al.* (2023). A key role for platelet GPVI in neutrophil recruitment, migration and NETosis in the early stages of acute lung injury. *Blood*. 10.1182/blood.2023019940.

Burn, G.L., Foti, A., Marsman, G., Patel, D.F., and Zychlinsky, A. (2021). The Neutrophil. *Immunity* 54, 1377-1391. 10.1016/j.immuni.2021.06.006.

Byrne, R.A., Rossello, X., Coughlan, J.J., Barbato, E., Berry, C., Chieffo, A., Claeys, M.J., Dan, G.A., Dweck, M.R., Galbraith, M., *et al.* (2023). 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes. *European heart journal* 44, 3720-3826. 10.1093/eurheartj/ehad191.

Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L.A., Nombela-Arrieta, C., Chevre, R., N, A.G., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L.E., *et al.* (2013). Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* 153, 1025-1035. 10.1016/j.cell.2013.04.040.

Castanheira, F.V.S., and Kubes, P. (2019). Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood* 133, 2178-2185. 10.1182/blood-2018-11-844530.

Chen, Y., Ruggeri, Z.M., and Du, X. (2018). 14-3-3 proteins in platelet biology and glycoprotein Ib-IX signaling. *Blood* 131, 2436-2448. 10.1182/blood-2017-09-742650.

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. 10.1038/nm1565.

Claushuis, T.A.M., de Vos, A.F., Nieswandt, B., Boon, L., Roelofs, J., de Boer, O.J., van 't Veer, C., and van der Poll, T. (2018). Platelet glycoprotein VI aids in local immunity during pneumonia-derived sepsis caused by gram-negative bacteria. *Blood* 131, 864-876. 10.1182/blood-2017-06-788067.

Correa-Gallegos, D., Jiang, D., Christ, S., Ramesh, P., Ye, H., Wannemacher, J., Kalgudde Gopal, S., Yu, Q., Aichler, M., Walch, A., *et al.* (2019). Patch repair of deep wounds by mobilized fascia. *Nature* 576, 287-292. 10.1038/s41586-019-1794-y.

Crainiciuc, G., Palomino-Segura, M., Molina-Moreno, M., Sicilia, J., Aragones, D.G., Li, J.L.Y., Madurga, R., Adrover, J.M., Aroca-Crevillen, A., Martin-Salamanca, S., *et al.* (2022). Behavioural immune landscapes of inflammation. *Nature* 601, 415-421. 10.1038/s41586-021-04263-y.

Deininger, M.W., Shah, N.P., Altman, J.K., Berman, E., Bhatia, R., Bhatnagar, B., DeAngelo, D.J., Gotlib, J., Hobbs, G., Maness, L., *et al.* (2020). Chronic Myeloid Leukemia, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 18, 1385-1415. 10.6004/jnccn.2020.0047.

Denorme, F., Manne, B.K., Portier, I., Eustes, A.S., Kosaka, Y., Kile, B.T., Rondina, M.T., and Campbell, R.A. (2020). Platelet necrosis mediates ischemic stroke outcome in mice. *Blood* 135, 429-440. 10.1182/blood.2019002124.

Deppermann, C. (2018). Platelets and vascular integrity. *Platelets* 29, 549-555. 10.1080/09537104.2018.1428739.

Deppermann, C., Cherpokova, D., Nurden, P., Schulz, J.N., Thielmann, I., Kraft, P., Vogtle, T., Kleinschmitz, C., Dutting, S., Krohne, G., *et al.* (2013). Gray platelet syndrome and defective thrombo-inflammation in Nbeal2-deficient mice. *J Clin Invest*. 10.1172/JCI69210.

Deppermann, C., Kraft, P., Volz, J., Schuhmann, M.K., Beck, S., Wolf, K., Stegner, D., Stoll, G., and Nieswandt, B. (2017). Platelet secretion is crucial to prevent bleeding in the ischemic brain but not in the inflamed skin or lung in mice. *Blood* 129, 1702-1706. 10.1182/blood-2016-12-750711.

Diseases, G.B.D., and Injuries, C. (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 396, 1204-1222. 10.1016/S0140-6736(20)30925-9.

Duerschmied, D., Suidan, G.L., Demers, M., Herr, N., Carbo, C., Brill, A., Cifuni, S.M., Mauler, M., Cicko, S., Bader, M., *et al.* (2013). Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood* 121, 1008-1015. 10.1182/blood-2012-06-437392.

Durrant, T.N., van den Bosch, M.T., and Hers, I. (2017). Integrin alphallbbeta3 outside-in signaling. *Blood* 130, 1607-1619. 10.1182/blood-2017-03-773614.

Engelmann, B., and Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 34-45. 10.1038/nri3345.

Evans, L., Rhodes, A., Alhazzani, W., Antonelli, M., Coopersmith, C.M., French, C., Machado, F.R., McIntyre, L., Ostermann, M., Prescott, H.C., *et al.* (2021). Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med* 49, e1063-e1143. 10.1097/CCM.0000000000005337.

Fahed, A.C., and Jang, I.K. (2021). Plaque erosion and acute coronary syndromes: phenotype, molecular characteristics and future directions. *Nat Rev Cardiol* 18, 724-734. 10.1038/s41569-021-00542-3.

Fischer, A., Wannemacher, J., Christ, S., Koopmans, T., Kadri, S., Zhao, J., Gouda, M., Ye, H., Muck-Hausl, M., Krenn, P.W., *et al.* (2022). Neutrophils direct preexisting matrix

to initiate repair in damaged tissues. *Nat Immunol* 23, 518-531. 10.1038/s41590-022-01166-6.

Frobert, O., Gotberg, M., Erlinge, D., Akhtar, Z., Christiansen, E.H., MacIntyre, C.R., Oldroyd, K.G., Motovska, Z., Erglis, A., Moer, R., *et al.* (2021). Influenza Vaccination After Myocardial Infarction: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Trial. *Circulation* 144, 1476-1484. 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.057042.

Fuchs, T.A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D.D., Jr., Wroblewski, S.K., Wakefield, T.W., Hartwig, J.H., and Wagner, D.D. (2010). Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15880-15885. 10.1073/pnas.1005743107.

Fujii, T., Sakata, A., Nishimura, S., Eto, K., and Nagata, S. (2015). TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 12800-12805. 10.1073/pnas.1516594112.

Gaertner, F., Ahmad, Z., Rosenberger, G., Fan, S., Nicolai, L., Busch, B., Yavuz, G., Luckner, M., Ishikawa-Ankerhold, H., Hennel, R., *et al.* (2017). Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria. *Cell* 171, 1368-1382 e1323. 10.1016/j.cell.2017.11.001.

Gaertner, F., and Massberg, S. (2019). Patrolling the vascular borders: platelets in immunity to infection and cancer. *Nat Rev Immunol*. 10.1038/s41577-019-0202-z.

Gando, S., Levi, M., and Toh, C.H. (2016). Disseminated intravascular coagulation. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16037. 10.1038/nrdp.2016.37.

Giamparellos-Bourboulis, E.J., Netea, M.G., Rovina, N., Akinosoglou, K., Antoniadou, A., Antonakos, N., Damoraki, G., Gkavogianni, T., Adami, M.E., Katsaounou, P., *et al.* (2020). Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe* 27, 992-1000 e1003. 10.1016/j.chom.2020.04.009.

Gohring, K., Wolff, J., Doppl, W., Schmidt, K.L., Fenchel, K., Pralle, H., Sibelius, U., and Bux, J. (2004). Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera. *Br J Haematol* 126, 252-254. 10.1111/j.1365-2141.2004.05027.x.

Gong, H., Shen, B., Flevaris, P., Chow, C., Lam, S.C., Voyno-Yasenetskaya, T.A., Kozasa, T., and Du, X. (2010). G protein subunit Galphai3 binds to integrin alphai1bbeta3 and mediates integrin "outside-in" signaling. *Science* 327, 340-343. 10.1126/science.1174779.

Gorog, D.A., and Massberg, S. (2022). Neutrophil Extracellular Traps in the Infarct-Related Coronary Artery-A Marker or Mediator of Adverse Outcome? *Thromb Haemost* 122, 1251-1254. 10.1055/a-1733-9217.

Gratacap, M.P., Martin, V., Valera, M.C., Allart, S., Garcia, C., Sie, P., Recher, C., and Payrastre, B. (2009). The new tyrosine-kinase inhibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelet activation in vitro and in vivo. *Blood* 114, 1884-1892. 10.1182/blood-2009-02-205328.

Guan, W.J., Ni, Z.Y., Hu, Y., Liang, W.H., Ou, C.Q., He, J.X., Liu, L., Shan, H., Lei, C.L., Hui, D.S.C., *et al.* (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *The New England journal of medicine* 382, 1708-1720. 10.1056/NEJMoa2002032.

Gullotta, G.S., De Feo, D., Friebel, E., Semerano, A., Scotti, G.M., Bergamaschi, A., Butti, E., Brambilla, E., Genchi, A., Capotondo, A., *et al.* (2023). Age-induced alterations of granulopoiesis generate atypical neutrophils that aggravate stroke pathology. *Nat Immunol.* 10.1038/s41590-023-01505-1.

Hillgruber, C., Poppelmann, B., Weishaupt, C., Steingraber, A.K., Wessel, F., Berdel, W.E., Gessner, J.E., Ho-Tin-Noe, B., Vestweber, D., and Goerge, T. (2015). Blocking neutrophil diapedesis prevents hemorrhage during thrombocytopenia. *J Exp Med* 212, 1255-1266. 10.1084/jem.20142076.

Ho-Tin-Noe, B., Boulaftali, Y., and Camerer, E. (2018). Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation. *Blood* 131, 277-288. 10.1182/blood-2017-06-742676.

Ho-Tin-Noe, B., Carbo, C., Demers, M., Cifuni, S.M., Goerge, T., and Wagner, D.D. (2009). Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia. *Am J Pathol* 175, 1699-1708. 10.2353/ajpath.2009.090460.

Ho-Tin-Noe, B., Goerge, T., Cifuni, S.M., Duerschmied, D., and Wagner, D.D. (2008). Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Res* 68, 6851-6858. 10.1158/0008-5472.CAN-08-0718.

Hochhaus, A., Baccarani, M., Silver, R.T., Schiffer, C., Apperley, J.F., Cervantes, F., Clark, R.E., Cortes, J.E., Deininger, M.W., Guilhot, F., *et al.* (2020). European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 34, 966-984. 10.1038/s41375-020-0776-2.

Hua, V.M., Abeynaike, L., Glaros, E., Campbell, H., Pasalic, L., Hogg, P.J., and Chen, V.M. (2015). Necrotic platelets provide a procoagulant surface during thrombosis. *Blood* 126, 2852-2862. 10.1182/blood-2015-08-663005.

Jackson, S.P., Darbousset, R., and Schoenwaelder, S.M. (2019). Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood* 133, 906-918. 10.1182/blood-2018-11-882993.

Jenne, C.N., Wong, C.H., Zemp, F.J., McDonald, B., Rahman, M.M., Forsyth, P.A., McFadden, G., and Kubes, P. (2013). Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe* 13, 169-180. 10.1016/j.chom.2013.01.005.

Jerke, U., Rolle, S., Dittmar, G., Bayat, B., Santoso, S., Sporbert, A., Luft, F., and Kettritz, R. (2011). Complement receptor Mac-1 is an adaptor for NB1 (CD177)-mediated PR3-ANCA neutrophil activation. *J Biol Chem* 286, 7070-7081. 10.1074/jbc.M110.171256.

Jobe, S.M., Wilson, K.M., Leo, L., Raimondi, A., Molkentin, J.D., Lentz, S.R., and Di Paola, J. (2008). Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and

cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood* 111, 1257-1265. 10.1182/blood-2007-05-092684.

Kaiser, R., Anjum, A., Kammerer, L.M., Loew, Q., Akhalkatsi, A., Rossaro, D., Escaig, R., Droste Zu Senden, A., Raude, B., Lorenz, M., *et al.* (2023a). Mechanosensing via a GpIIb/Src/14-3-3zeta axis critically regulates platelet migration in vascular inflammation. *Blood*. 10.1182/blood.2022019210.

Kaiser, R., Escaig, R., Erber, J., and Nicolai, L. (2021a). Neutrophil-Platelet Interactions as Novel Treatment Targets in Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med* 8, 824112. 10.3389/fcvm.2021.824112.

Kaiser, R., Escaig, R., Kranich, J., Hoffknecht, M.L., Anjum, A., Polewka, V., Mader, M., Hu, W., Belz, L., Gold, C., *et al.* (2022). Procoagulant platelet sentinels prevent inflammatory bleeding through GPIIbIIIA and GPVI. *Blood*. 10.1182/blood.2021014914.

Kaiser, R., Escaig, R., and Nicolai, L. (2023b). Hemostasis without clot formation - how platelets guard the vasculature in inflammation, infection, and malignancy. *Blood*. 10.1182/blood.2023020535.

Kaiser, R., Leunig, A., Pekayvaz, K., Popp, O., Joppich, M., Polewka, V., Escaig, R., Anjum, A., Hoffknecht, M.L., Gold, C., *et al.* (2021b). Self-sustaining IL-8 loops drive a prothrombotic neutrophil phenotype in severe COVID-19. *JCI Insight* 6. 10.1172/jci.insight.150862.

Kaiser, R.G., C.; Joppich, M.; Loew, Q.; Akhalkatsi, A.; Mueller, T.T.; Offensperger, F.; Droste zu Senden, A.; Popp, O.; Di Fina, L.; Knottenberg, V.; *et al.* (2024). Peripheral priming induces plastic transcriptomic and proteomic responses in circulating neutrophils required for pathogen containment. *Sci Adv* (in press).

Khoyratty, T.E., Ai, Z., Ballesteros, I., Eames, H.L., Mathie, S., Martin-Salamanca, S., Wang, L., Hemmings, A., Willemsen, N., von Werz, V., *et al.* (2021). Distinct transcription factor networks control neutrophil-driven inflammation. *Nat Immunol* 22, 1093-1106. 10.1038/s41590-021-00968-4.

Kolaczkowska, E., and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13, 159-175. 10.1038/nri3399.

Kwok, A.J., Allcock, A., Ferreira, R.C., Cano-Gamez, E., Smee, M., Burnham, K.L., Zurke, Y.X., Emergency Medicine Research, O., McKechnie, S., Mentzer, A.J., *et al.* (2023). Neutrophils and emergency granulopoiesis drive immune suppression and an extreme response endotype during sepsis. *Nat Immunol* 24, 767-779. 10.1038/s41590-023-01490-5.

Kwong, J.C., Schwartz, K.L., Campitelli, M.A., Chung, H., Crowcroft, N.S., Karnauchow, T., Katz, K., Ko, D.T., McGeer, A.J., McNally, D., *et al.* (2018). Acute Myocardial Infarction after Laboratory-Confirmed Influenza Infection. *The New England journal of medicine* 378, 345-353. 10.1056/NEJMoa1702090.

Landoni, G., Piemonti, L., Monforte, A.D., Grossi, P., Zangrillo, A., Bucci, E., Allegretti, M., Goisis, G., Gavioli, E.M., Patel, N., *et al.* (2022a). A Multicenter Phase 2 Randomized Controlled Study on the Efficacy and Safety of Reparin in the Treatment

of Hospitalized Patients with COVID-19 Pneumonia. *Infect Dis Ther* 11, 1559-1574. 10.1007/s40121-022-00644-6.

Landoni, G., Zangrillo, A., Piersanti, G., Scquizzato, T., and Piemonti, L. (2022b). The effect of reparixin on survival in patients at high risk for in-hospital mortality: a meta-analysis of randomized trials. *Front Immunol* 13, 932251. 10.3389/fimmu.2022.932251.

Leppkes, M., Maueroder, C., Hirth, S., Nowecki, S., Gunther, C., Billmeier, U., Paulus, S., Biermann, M., Munoz, L.E., Hoffmann, M., *et al.* (2016). Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. *Nat Commun* 7, 10973. 10.1038/ncomms10973.

Ley, K., Hoffman, H.M., Kubes, P., Cassatella, M.A., Zychlinsky, A., Hedrick, C.C., and Catz, S.D. (2018). Neutrophils: New insights and open questions. *Sci Immunol* 3. 10.1126/sciimmunol.aat4579.

Li, Z., Delaney, M.K., O'Brien, K.A., and Du, X. (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 2341-2349. 10.1161/ATVBAHA.110.207522.

Libby, P., Buring, J.E., Badimon, L., Hansson, G.K., Deanfield, J., Bittencourt, M.S., Tokgozoglu, L., and Lewis, E.F. (2019). Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 5, 56. 10.1038/s41572-019-0106-z.

Libby, P., Ridker, P.M., and Hansson, G.K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317-325. 10.1038/nature10146.

Maas, R.R., Soukup, K., Fournier, N., Massara, M., Galland, S., Kornete, M., Wischnewski, V., Lourenco, J., Croci, D., Alvarez-Prado, A.F., *et al.* (2023). The local microenvironment drives activation of neutrophils in human brain tumors. *Cell* 186, 4546-4566 e4527. 10.1016/j.cell.2023.08.043.

Margraf, A., Lowell, C.A., and Zarbock, A. (2022). Neutrophils in acute inflammation: current concepts and translational implications. *Blood* 139, 2130-2144. 10.1182/blood.2021012295.

Martin, S.S., Aday, A.W., Almarzooq, Z.I., Anderson, C.A.M., Arora, P., Avery, C.L., Baker-Smith, C.M., Barone Gibbs, B., Beaton, A.Z., Boehme, A.K., *et al.* (2024). 2024 Heart Disease and Stroke Statistics: A Report of US and Global Data From the American Heart Association. *Circulation*. 10.1161/CIR.0000000000001209.

Martinod, K., Demers, M., Fuchs, T.A., Wong, S.L., Brill, A., Gallant, M., Hu, J., Wang, Y., and Wagner, D.D. (2013). Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 8674-8679. 10.1073/pnas.1301059110.

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. 10.1038/nm.2184.

Matthay, M.A., Zemans, R.L., Zimmerman, G.A., Arabi, Y.M., Beitzler, J.R., Mercat, A., Herridge, M., Randolph, A.G., and Calfee, C.S. (2019). Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 5, 18. 10.1038/s41572-019-0069-0.

Maugeri, N., Rovere-Querini, P., Evangelista, V., Covino, C., Capobianco, A., Bertilaccio, M.T., Piccoli, A., Totani, L., Cianflone, D., Maseri, A., and Manfredi, A.A. (2009). Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: a phosphatidylserine, P-selectin, and beta2 integrin-dependent cell clearance program. *Blood* 113, 5254-5265. 10.1182/blood-2008-09-180794.

Mauler, M., Herr, N., Schoenichen, C., Witsch, T., Marchini, T., Hardtner, C., Koentges, C., Kienle, K., Ollivier, V., Schell, M., et al. (2019). Platelet Serotonin Aggravates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury via Neutrophil Degranulation. *Circulation* 139, 918-931. 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033942.

Mazharian, A., Ghevaert, C., Zhang, L., Massberg, S., and Watson, S.P. (2011). Dasatinib enhances megakaryocyte differentiation but inhibits platelet formation. *Blood* 117, 5198-5206. 10.1182/blood-2010-12-326850.

McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B.G., Jenne, C.N., and Kubes, P. (2012). Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* 12, 324-333. 10.1016/j.chom.2012.06.011.

Middleton, E.A., He, X.Y., Denorme, F., Campbell, R.A., Ng, D., Salvatore, S.P., Mostyka, M., Baxter-Stoltzfus, A., Borczuk, A.C., Loda, M., et al. (2020). Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood* 136, 1169-1179. 10.1182/blood.2020007008.

Montaldo, E., Lusito, E., Bianchessi, V., Caronni, N., Scala, S., Basso-Ricci, L., Cantaffa, C., Masserdotti, A., Barilaro, M., Barresi, S., et al. (2022). Cellular and transcriptional dynamics of human neutrophils at steady state and upon stress. *Nat Immunol* 23, 1470-1483. 10.1038/s41590-022-01311-1.

Ng, L.G., Ostuni, R., and Hidalgo, A. (2019). Heterogeneity of neutrophils. *Nat Rev Immunol* 19, 255-265. 10.1038/s41577-019-0141-8.

Nicolai, L., Leunig, A., Brambs, S., Kaiser, R., Joppich, M., Hoffknecht, M.L., Gold, C., Engel, A., Polewka, V., Muenchhoff, M., et al. (2021). Vascular neutrophilic inflammation and immunothrombosis distinguish severe COVID-19 from influenza pneumonia. *J Thromb Haemost* 19, 574-581. 10.1111/jth.15179.

Nicolai, L., Leunig, A., Brambs, S., Kaiser, R., Weinberger, T., Weigand, M., Muenchhoff, M., Hellmuth, J.C., Ledderose, S., Schulz, H., et al. (2020a). Immunothrombotic Dysregulation in COVID-19 Pneumonia Is Associated With Respiratory Failure and Coagulopathy. *Circulation* 142, 1176-1189. 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048488.

Nicolai, L., Schiefelbein, K., Lipsky, S., Leunig, A., Hoffknecht, M., Pekayvaz, K., Raude, B., Marx, C., Ehrlich, A., Pircher, J., et al. (2020b). Vascular surveillance by haptotactic blood platelets in inflammation and infection. *Nat Commun* 11, 5778. 10.1038/s41467-020-19515-0.

Noubouossie, D.F., Whelihan, M.F., Yu, Y.B., Sparkenbaugh, E., Pawlinski, R., Monroe, D.M., and Key, N.S. (2017). In vitro activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps. *Blood* 129, 1021-1029. 10.1182/blood-2016-06-722298.

Novotny, J., Oberdieck, P., Titova, A., Pelisek, J., Chandraratne, S., Nicol, P., Hapfelmeier, A., Joner, M., Maegdefessel, L., Poppert, H., et al. (2020). Thrombus NET content is associated with clinical outcome in stroke and myocardial infarction. *Neurology* 94, e2346-e2360. 10.1212/WNL.0000000000009532.

Ottmann, O., Dombret, H., Martinelli, G., Simonsson, B., Guilhot, F., Larson, R.A., Rege-Cambrin, G., Radich, J., Hochhaus, A., Apanovitch, A.M., et al. (2007). Dasatinib induces rapid hematologic and cytogenetic responses in adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia with resistance or intolerance to imatinib: interim results of a phase 2 study. *Blood* 110, 2309-2315. 10.1182/blood-2007-02-073528.

Palomino-Segura, M., Sicilia, J., Ballesteros, I., and Hidalgo, A. (2023). Strategies of neutrophil diversification. *Nat Immunol* 24, 575-584. 10.1038/s41590-023-01452-x.

Pfeiler, S., Stark, K., Massberg, S., and Engelmann, B. (2017). Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks. *Haematologica* 102, 206-213. 10.3324/haematol.2016.142471.

Phan, C., Jutant, E.M., Tu, L., Thuillet, R., Seferian, A., Montani, D., Huertas, A., Bezu, J.V., Breijer, F., Vonk Noordegraaf, A., et al. (2018). Dasatinib increases endothelial permeability leading to pleural effusion. *Eur Respir J* 51. 10.1183/13993003.01096-2017.

Phillipson, M., and Kubes, P. (2019). The Healing Power of Neutrophils. *Trends Immunol* 40, 635-647. 10.1016/j.it.2019.05.001.

Pircher, J., Czermak, T., Ehrlich, A., Eberle, C., Gaitzsch, E., Margraf, A., Grommes, J., Saha, P., Titova, A., Ishikawa-Ankerhold, H., et al. (2018). Cathelicidins prime platelets to mediate arterial thrombosis and tissue inflammation. *Nat Commun* 9, 1523. 10.1038/s41467-018-03925-2.

Pircher, J., Engelmann, B., Massberg, S., and Schulz, C. (2019). Platelet-Neutrophil Crosstalk in Atherothrombosis. *Thromb Haemost* 119, 1274-1282. 10.1055/s-0039-1692983.

Quail, D.F., Amulic, B., Aziz, M., Barnes, B.J., Eruslanov, E., Fridlender, Z.G., Goodridge, H.S., Granot, Z., Hidalgo, A., Huttenlocher, A., et al. (2022). Neutrophil phenotypes and functions in cancer: A consensus statement. *J Exp Med* 219. 10.1084/jem.20220011.

Quintas-Cardama, A., De Souza Santos, F.P., Kantarjian, H., O'Brien, S., Faderl, S., Awais, A., Borthakur, G., and Cortes, J. (2009a). Dynamics and management of cytopenias associated with dasatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib failure. *Cancer* 115, 3935-3943. 10.1002/cncr.24432.

Quintas-Cardama, A., Han, X., Kantarjian, H., and Cortes, J. (2009b). Tyrosine kinase inhibitor-induced platelet dysfunction in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 114, 261-263. 10.1182/blood-2008-09-180604.

Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H., Ravandi, F., O'Brien, S., Thomas, D., Vidal-Senmache, G., Wierda, W., Kornblau, S., and Cortes, J. (2009c). Bleeding diathesis in patients with chronic myelogenous leukemia receiving dasatinib therapy. *Cancer* 115, 2482-2490. 10.1002/cncr.24257.

Rayes, J., Jadoui, S., Lax, S., Gros, A., Wichaiyo, S., Ollivier, V., Denis, C.V., Ware, J., Nieswandt, B., Jandrot-Perrus, M., et al. (2018). The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent. *Haematologica* 103, e256-e258. 10.3324/haematol.2017.182162.

Ridker, P.M., Everett, B.M., Thuren, T., MacFadyen, J.G., Chang, W.H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S.D., et al. (2017). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *The New England journal of medicine* 377, 1119-1131. 10.1056/NEJMoa1707914.

Riegger, J., Byrne, R.A., Joner, M., Chandraratne, S., Gershlick, A.H., Ten Berg, J.M., Adriaenssens, T., Guagliumi, G., Godschalk, T.C., Neumann, F.J., et al. (2016). Histopathological evaluation of thrombus in patients presenting with stent thrombosis. A multicenter European study: a report of the prevention of late stent thrombosis by an interdisciplinary global European effort consortium. *European heart journal* 37, 1538-1549. 10.1093/eurheartj/ehv419.

Schulte, V., Rabie, T., Prostredna, M., Aktas, B., Gruner, S., and Nieswandt, B. (2003). Targeting of the collagen-binding site on glycoprotein VI is not essential for in vivo depletion of the receptor. *Blood* 101, 3948-3952. 10.1182/blood-2002-10-3242.

Schulte-Schrepping, J., Reusch, N., Paclik, D., Bassler, K., Schlickeiser, S., Zhang, B., Kramer, B., Krammer, T., Brumhard, S., Bonaguro, L., et al. (2020). Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell* 182, 1419-1440 e1423. 10.1016/j.cell.2020.08.001.

Senis, Y.A., Mazharian, A., and Mori, J. (2014). Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood* 124, 2013-2024. 10.1182/blood-2014-01-453134.

Senis, Y.A., Nagy, Z., Mori, J., Lane, S., and Lane, P. (2021). Platelet Src family kinases: A tale of reversible phosphorylation. *Res Pract Thromb Haemost* 5, 376-389. 10.1002/rth2.12495.

Shen, B., Zhao, X., O'Brien, K.A., Stojanovic-Terpo, A., Delaney, M.K., Kim, K., Cho, J., Lam, S.C., and Du, X. (2013). A directional switch of integrin signalling and a new anti-thrombotic strategy. *Nature* 503, 131-135. 10.1038/nature12613.

Shen, C., Liu, M., Xu, R., Wang, G., Li, J., Chen, P., Ma, W., Mwangi, J., Lu, Q., Duan, Z., et al. (2020). The 14-3-3zeta-c-Src-integrin-beta3 complex is vital for platelet activation. *Blood* 136, 974-988. 10.1182/blood.2019002314.

Silvestre-Roig, C., Braster, Q., Ortega-Gomez, A., and Soehnlein, O. (2020). Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nat Rev Cardiol* 17, 327-340. 10.1038/s41569-019-0326-7.

Silvestre-Roig, C., Braster, Q., Wichapong, K., Lee, E.Y., Teulon, J.M., Berrebeh, N., Winter, J., Adrover, J.M., Santos, G.S., Froese, A., *et al.* (2019). Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death. *Nature* 569, 236-240. 10.1038/s41586-019-1167-6.

Silvis, M.J.M., Kaffka Genaamd Dengler, S.E., Odille, C.A., Mishra, M., van der Kaaij, N.P., Doevedans, P.A., Sluijter, J.P.G., de Kleijn, D.P.V., de Jager, S.C.A., Bosch, L., and van Hout, G.P.J. (2020). Damage-Associated Molecular Patterns in Myocardial Infarction and Heart Transplantation: The Road to Translational Success. *Front Immunol* 11, 599511. 10.3389/fimmu.2020.599511.

Skokowa, J., Dale, D.C., Touw, I.P., Zeidler, C., and Welte, K. (2017). Severe congenital neutropenias. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17032. 10.1038/nrdp.2017.32.

Soehnlein, O., and Libby, P. (2021). Targeting inflammation in atherosclerosis - from experimental insights to the clinic. *Nat Rev Drug Discov* 20, 589-610. 10.1038/s41573-021-00198-1.

Sreeramkumar, V., Adrover, J.M., Ballesteros, I., Cuartero, M.I., Rossaint, J., Bilbao, I., Nacher, M., Pitaval, C., Radovanovic, I., Fukui, Y., *et al.* (2014). Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 346, 1234-1238. 10.1126/science.1256478.

Stakos, D.A., Kambas, K., Konstantinidis, T., Mitroulis, I., Apostolidou, E., Arelaki, S., Tsironidou, V., Giatromanolaki, A., Skendros, P., Konstantinides, S., and Ritis, K. (2015). Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *European heart journal* 36, 1405-1414. 10.1093/eurheartj/ehv007.

Stark, K., and Massberg, S. (2021). Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *Nat Rev Cardiol.* 10.1038/s41569-021-00552-1.

Stark, K., Philippi, V., Stockhausen, S., Busse, J., Antonelli, A., Miller, M., Schubert, I., Hoseinpour, P., Chandraratne, S., von Bruhl, M.L., *et al.* (2016). Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice. *Blood* 128, 2435-2449. 10.1182/blood-2016-04-710632.

Stoll, G., and Nieswandt, B. (2019). Thrombo-inflammation in acute ischaemic stroke - implications for treatment. *Nat Rev Neurol* 15, 473-481. 10.1038/s41582-019-0221-1.

Su, M., Chen, C., Li, S., Li, M., Zeng, Z., Zhang, Y., Xia, L., Li, X., Zheng, D., Lin, Q., *et al.* (2022). Gasdermin D-dependent platelet pyroptosis exacerbates NET formation and inflammation in severe sepsis. *Nat Cardiovasc Res* 1, 732-747. 10.1038/s44161-022-00108-7.

Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P.J., and Nagata, S. (2010). Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 468, 834-838. 10.1038/nature09583.

Talpaz, M., Shah, N.P., Kantarjian, H., Donato, N., Nicoll, J., Paquette, R., Cortes, J., O'Brien, S., Nicaise, C., Bleickardt, E., *et al.* (2006). Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England journal of medicine* 354, 2531-2541. 10.1056/NEJMoa055229.

Tardif, J.C., Kouz, S., Waters, D.D., Bertrand, O.F., Diaz, R., Maggioni, A.P., Pinto, F.J., Ibrahim, R., Gamra, H., Kiwan, G.S., *et al.* (2019). Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *The New England journal of medicine* 381, 2497-2505. 10.1056/NEJMoa1912388.

Timmis, A., Vardas, P., Townsend, N., Torbica, A., Katus, H., De Smedt, D., Gale, C.P., Maggioni, A.P., Petersen, S.E., Huculeci, R., *et al.* (2022). European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *European heart journal* 43, 716-799. 10.1093/eurheartj/ehab892.

Vabret, N., Britton, G.J., Gruber, C., Hegde, S., Kim, J., Kuksin, M., Levantovsky, R., Malle, L., Moreira, A., Park, M.D., *et al.* (2020). Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity* 52, 910-941. 10.1016/j.immuni.2020.05.002.

van der Meijden, P.E.J., and Heemskerk, J.W.M. (2019). Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol* 16, 166-179. 10.1038/s41569-018-0110-0.

van Kruchten, R., Mattheij, N.J., Saunders, C., Feijge, M.A., Swieringa, F., Wolfs, J.L., Collins, P.W., Heemskerk, J.W., and Bevers, E.M. (2013). Both TMEM16F-dependent and TMEM16F-independent pathways contribute to phosphatidylserine exposure in platelet apoptosis and platelet activation. *Blood* 121, 1850-1857. 10.1182/blood-2012-09-454314.

Verschoor, A., Neuenhahn, M., Navarini, A.A., Graef, P., Plaumann, A., Seidlmeier, A., Nieswandt, B., Massberg, S., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H., and Busch, D.H. (2011). A platelet-mediated system for shuttling blood-borne bacteria to CD8alpha+ dendritic cells depends on glycoprotein GPIb and complement C3. *Nat Immunol* 12, 1194-1201. 10.1038/ni.2140.

Volz, J., Mammadova-Bach, E., Gil-Pulido, J., Nandigama, R., Remer, K., Sorokin, L., Zernecke, A., Abrams, S.I., Ergun, S., Henke, E., and Nieswandt, B. (2019). Inhibition of platelet GPVI induces intratumor hemorrhage and increases efficacy of chemotherapy in mice. *Blood* 133, 2696-2706. 10.1182/blood.2018877043.

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. 10.1084/jem.20112322.

Vulliamy, P., Gillespie, S., Armstrong, P.C., Allan, H.E., Warner, T.D., and Brohi, K. (2019). Histone H4 induces platelet ballooning and microparticle release during trauma hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 17444-17449. 10.1073/pnas.1904978116.

Wang, J., Hossain, M., Thanabalanur, A., Gunzer, M., Meininger, C., and Kubes, P. (2017). Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science* 358, 111-116. 10.1126/science.aam9690.

Wang, L., Ge, S., Agustian, A., Hiss, M., Haller, H., and von Vietinghoff, S. (2013). Surface receptor CD177/NB1 does not confer a recruitment advantage to neutrophilic granulocytes during human peritonitis. *Eur J Haematol* 90, 436-437. 10.1111/ejh.12095.

Wauters, E., Van Mol, P., Garg, A.D., Jansen, S., Van Herck, Y., Vanderbeke, L., Bassez, A., Boeckx, B., Malengier-Devlies, B., Timmerman, A., *et al.* (2021). Discriminating mild from critical COVID-19 by innate and adaptive immune single-cell profiling of bronchoalveolar lavages. *Cell Res* 31, 272-290. 10.1038/s41422-020-00455-9.

Xie, Q., Klesney-Tait, J., Keck, K., Parlet, C., Borcherding, N., Kolb, R., Li, W., Tygrett, L., Waldschmidt, T., Olivier, A., *et al.* (2015). Characterization of a novel mouse model with genetic deletion of CD177. *Protein Cell* 6, 117-126. 10.1007/s13238-014-0109-1.

Xie, X., Shi, Q., Wu, P., Zhang, X., Kambara, H., Su, J., Yu, H., Park, S.Y., Guo, R., Ren, Q., *et al.* (2020). Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection. *Nat Immunol* 21, 1119-1133. 10.1038/s41590-020-0736-z.

Yipp, B.G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C.N., Scott, B.N., Zbytnuik, L.D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H.C., *et al.* (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking *in vivo*. *Nat Med* 18, 1386-1393. 10.1038/nm.2847.

Zhang, R., Su, L., Fu, M., Wang, Z., Tan, L., Chen, H., Lin, Z., Tong, Y., Ma, S., Ye, R., *et al.* (2022). CD177(+) cells produce neutrophil extracellular traps that promote biliary atresia. *J Hepatol* 77, 1299-1310. 10.1016/j.jhep.2022.06.015.

Zhou, G., Yu, L., Fang, L., Yang, W., Yu, T., Miao, Y., Chen, M., Wu, K., Chen, F., Cong, Y., and Liu, Z. (2018a). CD177(+) neutrophils as functionally activated neutrophils negatively regulate IBD. *Gut* 67, 1052-1063. 10.1136/gutjnl-2016-313535.

Zhou, H., Deng, M., Liu, Y., Yang, C., Hoffman, R., Zhou, J., Loughran, P.A., Scott, M.J., Neal, M.D., and Billiar, T.R. (2018b). Platelet HMGB1 is required for efficient bacterial clearance in intra-abdominal bacterial sepsis in mice. *Blood Adv* 2, 638-648. 10.1182/bloodadvances.2017011817.

Zuo, Y., Yalavarthi, S., Shi, H., Gockman, K., Zuo, M., Madison, J.A., Blair, C., Weber, A., Barnes, B.J., Egeblad, M., *et al.* (2020). Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight* 5. 10.1172/jci.insight.138999.

## 6) Verzeichnis der Arbeiten als Habilitationsleistung

**Kaiser R**, Gold C, Joppich M, Loew Q, Akhalkatsi A, Mueller TT, Offensperger F, Droste zu Senden A, Popp O, Di Fina L, Knottenberg V, Martinez-Navarro A, Eivers L, Anjum A, Escaig R, Bruns N, Briem E, Dewender R, Muraly A, Akgöl S, Ferraro B, Hoeflinger J, Polewka V, Ben Khaled N, Allgeier J, Tiedt S, Dichgans M, Engelmann B, Enard W, Mertins P, Hübner N, Weckbach L, Zimmer R, Massberg S, Stark K, Nicolai L, Pekayvaz K. Peripheral priming induces plastic transcriptomic and proteomic responses in circulating neutrophils required for pathogen containment.

*Science Advances*. (2024, in press). IF 2022/2023: 14.98.

**Kaiser R**, Anjum A, Kammerer L, Loew Q, Akhalkatsi A, Rossaro D, Escaig R, Droste Zu Senden A, Raude B, Lorenz M, Gold C, Pekayvaz K, Brocker T, Kranich J, Holch JW, Spiekermann K, Massberg S, Gaertner F, Nicolai L. Mechanosensing via a GpIIb/Src/14-3-3 $\zeta$  axis critically regulates platelet migration in vascular inflammation.

*Blood*. 2023 Jun 15;141(24):2973-2992. PMID 37018659. IF 2022/2023: 25.67.

**Kaiser R**, Escaig R, Nicolai L. Hemostasis without clot formation – how platelets guard the vasculature in inflammation, infection, and malignancy.

*Blood*. 2023 Oct 26;142(17):1413-1425. IF 2022/2023: 25.67.

**Kaiser R**, Escaig R, Kranich J, Hoffknecht ML, Anjum A, Polewka V, Mader M, Hu W, Belz L, Gold C, Titova A, Lorenz M, Pekayvaz K, Käab S, Gaertner F, Stark K, Brocker T, Massberg S, Nicolai L. Procoagulant platelet sentinels prevent inflammatory bleeding through GPIIb/IIIA and GPVI.

*Blood*. 2022 Jul 14;140(2):121-139. PMID: 35472164. IF 2022/2023: 25.67.

**Kaiser R**, Escaig R, Erber J, Nicolai L. Neutrophil-Platelet Interactions as Novel Treatment Targets in Cardiovascular Disease.

*Front Cardiovasc Med*. 2022 Jan 31;8:824112. PMID: 35174225. IF 2022: 5.85.

**Kaiser R**, Leunig A, Pekayvaz K, Popp O, Joppich M, Polewka V, Escaig R, Anjum A, Hoffknecht ML, Gold C, Brambs S, Engel A, Stockhausen S, Knottenberg V, Titova A,

Haji M, Scherer C, Muenchhoff M, Hellmuth JC, Saar K, Schubert B, Hilgendorff A, Schulz C, Käab S, Zimmer R, Hübner N, Massberg S, Mertins P, Nicolai L, Stark K. *JCI Insight*. 2021 Sep 22;6(18):e150862. PMID: 34403366. IF 2021: 9.48.

## 7) Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Professor Steffen Massberg für die Förderung meines akademischen Werdegangs und die Unterstützung bei der Umsetzung dabei, neben einer profunden klinischen Ausbildung erfolgreiche und kompetitive experimentelle Forschung zu betreiben.

Besonders danken möchte ich meinen Kolleginnen und Kollegen der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, unter denen ich viele Freundinnen und Freunde zähle. Privatdozent Dr. Leo Nicolai, der mich im Sommer 2019 in seine Arbeitsgruppe rekrutiert hat, danke ich herzlich für die hochproduktive Zusammenarbeit der letzten Jahre, die freundschaftliche Unterstützung meines akademischen Fortschritts und die Durchführung gemeinsamer Projekte, die mir viel Freude bereiten. Sein Wissensdurst und seine innovativen Ideen haben meinen bisherigen wissenschaftlichen Werdegang maßgeblich geprägt. Dr. Kami Pekayvaz danke ich ebenfalls für die vergangenen Jahre der Freundschaft und der wissenschaftlichen Kooperation, von denen ich sehr profitiert habe.

Ich danke Professor Konstantin Stark, der meine akademische und klinische Laufbahn unterstützt und mir ein wichtiger Ansprechpartner ist. Außerdem danke ich Professorin Julia Mayerle, die diese Arbeit als Mitglied meines Fachmentorats gefördert hat.

Herzlich danke ich Michael Lorenz für die fachliche und logistische Unterstützung im Labor. Danken möchte ich außerdem den Menschen, mit denen ich viele Stunden, lange Wochenenden und Nächte im Labor verbracht habe, und die die vorgestellten Studien durch ihre exzellente wissenschaftliche Mitarbeit erst möglich gemacht haben; stellvertretend für sie danke ich Afra Anjum, Anastassia Akhalkhati, Lea Di Fina, Augustin Droste zu Senden, Raphael Escaig, Dr. Christoph Gold, Dr. Marie-Louise Hoffknecht, Lisa Kammerer, Viktoria Knottenberg, Quentin Löw und Dario Rossaro.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie für die uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen, insbesondere meinen Eltern, Großeltern und meinen drei Geschwistern. Zuletzt danke ich meiner Frau, Dr. Johanna Erber, die für meinen Forschungsdrang viel Verständnis aufbringt und mir in ihrer unstillbaren Antriebskraft ein Vorbild ist.