

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Prokoagulante Thrombozyten verhindern inflammatorische Blutungen
der Lunge durch GPIIbIIIa und GPVI**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Raphael Jean-Jacques Escaig

aus
Rouen

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Steffen Massberg
Zweites Gutachten: Prof. Dr. Christoph Reichel
Drittes Gutachten: Prof. Dr. Jürgen Behr

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Zusammenfassung	6
Abstract (English).....	8
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis.....	12
Abkürzungsverzeichnis	13
1. Einleitung	15
1.1 Klassische Funktion von Thrombozyten in der Hämostase	15
1.1.1 Primäre Hämostase.....	15
1.1.2 Sekundäre Hämostase	18
1.2 Brücke zwischen primärer und sekundärer Hämostase: prokoagulante Thrombozyten	19
1.2.1 Funktionelle Eigenschaften prokoagulanter Thrombozyten	20
1.2.2 Aktivierung und Signalwege prokoagulanter Thrombozyten	21
1.3 Thrombozyten in Inflammation und Immunabwehr	23
1.3.1 Autonome Migration von Thrombozyten	25
1.3.2 Inflammatorische Blutungen.....	26
2. Fragestellung und Hypothesen.....	29
3. Material	30
3.1 Inhibitoren und Agonisten.....	30
3.2 Chemikalien.....	30
3.3 Antikörper und fluoreszierende Proteine	30
4. Methoden	32
4.1 <i>In vitro</i> Untersuchungen	32
4.1.1 Humane Blutspender.....	32
4.1.2 Isolation von humanen und murinen Thrombozyten	32
4.1.3 Migrationsassay	33
4.1.4 Thrombozytenaktivierungs-Assay	37
4.2 <i>In vivo</i> Untersuchungen.....	38
4.2.1 Verwendete Mauslinien	38
4.2.2 Narkose	40
4.2.3 Blutbild.....	40
4.2.4 LPS-induzierte (sub)akute Lungenschädigung	41
4.2.5 LPS-induzierte sterile Peritonitis	43
4.2.6 Schwanzblutungszeittest.....	44
4.2.7 GPVI-Depletion	44
4.2.8 Depletion von Thrombozyten	44
4.2.9 Multiplex-Zytokin-Messungen.....	45
4.2.10 Antikörper und fluoreszenzgekoppelte Proteine für Durchflusszytometrie und Histopathologie.....	46

4.2.11	Histopathologische Färbung.....	46
4.3	Datenerfassung	47
4.3.1	<i>In vitro</i> Migrationsassay.....	47
4.3.2	Formanalyse von Thrombozyten.....	48
4.3.3	Durchflusszytometrie	49
4.3.4	Histopathologische Analysen	49
4.4	Datenvisualisierung	50
4.5	Statistische Analysen	50
5.	Ergebnisse	52
5.1	<i>In vitro</i> Ergebnisse.....	52
5.1.1	Validierung der funktionellen Eigenschaften von prokoagulanten Thrombozyten.....	52
5.1.2	Interaktion mit Kollagen Typ 1 führt zur prokoagulanten Aktivierung von migrierenden Thrombozyten	56
5.1.3	Identifikation der beteiligten Rezeptoren und Signalkaskaden der prokoagulanten Aktivierung migrierender Thrombozyten	59
5.2	<i>In vivo</i> Ergebnisse	68
5.2.1	Systemische Inflammation führt zur Rekrutierung von Thrombozyten und Fibrin(ogen) in der Lunge	68
5.2.2	Einzelne prokoagulante Thrombozyten werden <i>in vivo</i> durch Kontakt mit Kollagen induziert.....	71
5.2.3	Einführung in das Modell der (sub)akuten Lungenschädigung	73
5.2.4	Thrombozytopenie und Antikoagulation verstärken inflammatorische Blutungen in der Lunge	76
5.2.5	Validierung der genetisch modifizierten Mauslinien PF4cre-CypD ^{f/f} und PF4cre-TMEM16F ^{f/f}	82
5.2.6	Genetische Ablation der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten aggraviert inflammatorische Blutungen im ALI-Modell	89
5.2.7	Pharmakologische Inhibition der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten durch kombinierte Hemmung von GPIIbIIIa und GPVI aggraviert inflammatorische Blutungen	94
6.	Diskussion	99
6.1	Rolle von GPVI und GPIIbIIIa in der inflammatorischen Hämostase der Lunge	99
6.2	Einfluss verschiedener Thrombozyten-Rezeptoren und Signalwege auf verschiedene Modelle inflammatorischer Blutungen.....	100
6.3	Prokoagulante Thrombozyten: protektiv oder schädlich?	105
6.4	Einfluss der Gerinnungsfaktoren	106
6.5	Rekrutierung von Thrombozyten in die Lunge	107
6.6	Zusammenfassung der Schlüsselfunktionen von Thrombozyten in der inflammatorischen Hämostase	108
6.7	Limitationen	110
6.7.1	Generalisierbarkeit	110
6.7.2	Ausmaß der pulmonalen Blutung	111
6.7.3	Genetische Ablation von CypD und TMEM16F.....	112
6.8	Klinische Relevanz und Ausblick.....	112
Literaturverzeichnis.....	115	
Danksagung	125	

Affidavit	126
Erklärung der Übereinstimmung.....	127
Publikationsliste	128

Zusammenfassung

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle in der Hämostase, indem sie unter physiologischen Bedingungen Gerinnungsschleifen bilden, um traumatische Blutungen zu verhindern. Neueste Erkenntnisse deuten jedoch darauf hin, dass Thrombozyten auch im Kontext von Entzündungsprozessen eine bislang wenig verstandene Funktion erfüllen. Einzelne immunreaktive Thrombozyten können gezielt an die entzündlich veränderte Gefäßwand rekrutiert werden und aktiv entlang des Endothels migrieren, um Mikroverletzungen zu detektieren und Blutungen zu verhindern. Dieser Mechanismus scheint entscheidend zur Prävention einer überschießenden Bildung von Thromben im inflammatorischen Umfeld beizutragen. Die zugrunde liegenden molekularen und zellulären Mechanismen der entzündungsabhängigen Regulation der Thrombozyten-Aktivität sind derzeit weitgehend ungeklärt. Ein vertieftes Verständnis der lokalen Mechanismen, die einzelne Thrombozyten nutzen, um die vaskuläre Integrität im Rahmen von Entzündungsreaktionen aufrechtzuerhalten, könnte potenzielle therapeutische Ansätze eröffnen.

In dieser Dissertation konnte mithilfe von hochauflösender konfokaler Mikroskopie und genetischen Mausmodellen demonstriert werden, dass die prokoagulante Aktivierung einzelner Thrombozyten sowie die anschließende Rekrutierung der Gerinnungskaskade entscheidend für die Verhinderung inflammatorischer Blutungen sind. Phosphatidylserin (PS)-positive prokoagulante Thrombozyten konnten nach Induktion eines lokalen inflammatorischen Stimulus in der Lunge und dem Mesenterium nachgewiesen werden. Die Interaktion mit freigelegtem Kollagen konnte als zentraler Auslöser identifiziert werden, welcher Thrombozyten an der Gefäßwand arretiert und die nachfolgende prokoagulante Aktivierung in einer CypD- und TMEM16F-abhängigen Weise sowohl *in vivo* als auch *in vitro* initiiert. Die prokoagulante Aktivierung der Thrombozyten fördert die Bindung des Prothrombinase-Komplexes an die Thrombozyten-Membran, was die Thrombin-Aktivität signifikant steigert und zur Fibrinbildung führt. Es wurde mechanistisch aufgezeigt, dass die prokoagulante Aktivierung migrierender Thrombozyten durch die simultane Aktivierung des Integrin- $\alpha IIb\beta 3$ -(GPIIbIIIa)/Gα13-vermittelten Outside-in-Signalwegs und des GPVI-Signalwegs hervorgerufen wird. Durch diese prokoagulante Aktivierung migrierender Thrombozyten wird die Gerinnungskaskade gezielt an Stellen einer gestörten vaskulären Integrität rekrutiert.

Dies dient der Bildung von Mikrothromben und trägt dazu bei, inflammatorisch bedingte Blutungen effektiv zu verhindern, ohne eine überschießende Aktivierung der intravaskulären Gerinnung auszulösen. Die spezifische genetische Ablation von CypD oder TMEM16F in Thrombozyten sowie die kombinierte pharmakologische Hemmung der thrombozytären Glykoprotein-Rezeptoren GPIIbIIIa und GPVI führten *in vivo* zu einer reduzierten prokoagulanten Aktivierung und einer verstärkten pulmonalen inflammatorischen Hämorragie.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine bislang unbekannte protektive Rolle von Thrombozyten im Kontext inflammatorischer Erkrankungen hin. Die gezielte Induktion der prokoagulanten Aktivierung könnte einen vielversprechenden neuen Therapieansatz zur Prävention inflammationsassozierter Blutungen darstellen, insbesondere bei intensivmedizinisch behandelten Patienten.

Abstract (English)

Platelets play a central role in hemostasis by forming clots under physiological conditions to prevent traumatic bleeding. However, recent findings indicate that platelets also perform a previously less understood function in inflammatory processes. Individual immunoreactive platelets can be specifically recruited to the inflamed vessel wall and actively migrate along the endothelium to detect defects and prevent bleeding. This mechanism appears essential for preventing excessive microthrombus formation in an inflammatory environment. The molecular and cellular mechanisms underlying the inflammation-dependent regulation of platelet activity remain largely unclear. A deeper understanding of the local mechanisms by which individual platelets help maintain vascular integrity in the context of inflammatory responses could reveal potential therapeutic approaches.

This dissertation illustrates, using high-resolution confocal microscopy and genetic mouse models, that the procoagulant activation of individual platelets, coupled with the engagement of the coagulation cascade, plays a vital role in preventing inflammatory bleeding to the lungs. Phosphatidylserine (PS)-positive procoagulant platelets were detected in the lungs and mesentery after the induction of a local inflammatory stimulus. The interaction with exposed collagen fibers was identified as the primary trigger, both *in vivo* and *in vitro*, that arrests platelets and initiates subsequent procoagulant activation, relying on CypD and TMEM16F. The procoagulant activation of migrating platelets facilitates the recruitment and assembly of the prothrombinase complex on the platelet membrane, thereby markedly enhancing thrombin generation and driving the subsequent formation of fibrin. Mechanistically, it was elucidated that the procoagulant activation of migrating platelets is triggered by costimulation of the integrin $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIbIIIa)/Gα13-mediated *outside-in* signaling pathway and the GPVI signaling pathway. This allows individual migrating platelets to selectively initiate the coagulation cascade at sites of vascular injury, facilitating the formation of microthrombi, without triggering excessive activation of the intravascular coagulation. This targeted response effectively prevents inflammatory bleeding. Genetic depletion of CypD or TMEM16F specifically in platelets, along with the combined pharmacological inhibition of GPIIbIIIa and GPVI, attenuated procoagulant activation *in vivo* and aggravated pulmonary inflammatory hemorrhage.

In summary, the findings of this study suggest a previously unknown protective role of platelets in the context of inflammatory diseases. Targeted induction of procoagulant activation could represent a promising new therapeutic approach for the prevention of inflammation-associated bleeding, particularly in critically ill patients receiving intensive care.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismen der primären Hämostase nach traumatischer Gefäßverletzung	18
Abbildung 2: Thrombozyten-Subpopulationen mit distinkten Aufgaben bei der Thrombusbildung	20
Abbildung 3: Mechanismen und Funktionen der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten	23
Abbildung 4: Thrombozyten im Kontext von Infektionen und Entzündungen	25
Abbildung 5: Pathophysiologie inflammatorischer Blutungen in der Lunge	28
Abbildung 6: Generierung von Flusskammern mit einer Oberfläche aus Fibrin(ogen), Albumin und Kollagen I-Fasern.....	34
Abbildung 7: Etablierung eines neuartigen Migrationsassays zur Untersuchung prokoagulanter Thrombozyten	35
Abbildung 8: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse von peripherem Vollblut und BAL-Fluid	43
Abbildung 9: Analyse und Quantifizierung der zurückgelegten Migrationsstrecke	48
Abbildung 10: C1 detektiert spezifisch prokoagulante Thrombozyten <i>in vitro</i>	53
Abbildung 11: Prokoagulante Thrombozyten binden vermehrt Gerinnungsfaktoren wie Thrombin oder Fibrin(ogen) auf ihrer Oberfläche	55
Abbildung 12: Interaktion von Kollagen führt zur prokoagulanten Aktivierung von migrierenden Thrombozyten	58
Abbildung 13: Pharmakologische Inhibition von CypD und TMEM16F reduziert die prokoagulante Aktivität von Thrombozyten, ohne die Migrationsfähigkeit zu beeinträchtigen	60
Abbildung 14: Pharmakologische Inhibition von GPIIbIIIa und GPVI führt zu einer Reduktion der prokoagulanten Aktivität von migrierenden Thrombozyten	64
Abbildung 15: Einfluss von Thrombozytenaggregationshemmung auf Migration und prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten.....	66
Abbildung 16: Systemische Inflammation führt zu Rekrutierung von Thrombozyten und Fibrin(ogen) in der Lunge.....	70
Abbildung 17: Interaktion von Thrombozyten mit Kollagenfasern induziert die prokoagulante Aktivierung <i>in vivo</i>	72
Abbildung 18: Validierung des murinen Modells der (sub)akuten Lungenschädigung	75
Abbildung 19: Thrombozytopenie verstärkt inflammatorische Blutungen in dem Modell der (sub)akuten Lungenschädigung.....	78
Abbildung 20: Einfluss von Rivaroxaban und Argatroban auf inflammatorische Blutungen in dem Modell der (sub)akuten Lungenschädigung und auf die Migrationskapazität <i>in vitro</i>	81
Abbildung 21: Validierung der PF4cre-CypD ^{f/f} -Mauslinie	84
Abbildung 22: Validierung der PF4cre-TMEM16F ^{f/f} -Mauslinie	85
Abbildung 23: Genetische Ablation von CypD und TMEM16F reduziert das prokoagulante Potential von Thrombozyten <i>in vitro</i>	87
Abbildung 24: Reduzierte Bindungskapazität von Thrombin auf der Oberfläche von CypD- und TMEM16F-defizienten-Thrombozyten <i>in vitro</i>	89
Abbildung 25: Genetische Ablation von CypD verstärkt inflammatorische Blutungen in der Lunge	91
Abbildung 26: Genetische Ablation von TMEM16F aggraviert entzündungsbedingte Blutungen in der Lunge	93
Abbildung 27: Validierung der effektiven Inhibition von GPIIbIIIa und GPVI <i>in vitro</i>	95
Abbildung 28: Pharmakologische Hemmung der prokoagulanten Aktivierung durch kombinierte Blockade von GPIIbIIIa und GPVI verstärkt entzündliche Blutungen <i>in vivo</i>	97

Abbildung 29: Graphische Zusammenfassung der Thrombozyten-Rezeptoren und Signalwege, welche inflammatorische Blutungen beeinflussen.....	104
Abbildung 30: Graphische Darstellung des mechanistischen Modells der Schlüsselfunktionen von Thrombozyten in der inflammatorischen Hämostase....	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper und fluoreszierende Proteine	31
Tabelle 2: Kriterien zur Evaluierung der klinischen Symptomatik mit zugehöriger Punktbewertung	39
Tabelle 3: Übersicht des Vorgehensmodells bei Erreichen spezifischer Endpunkte.....	40

Abkürzungsverzeichnis

PS	Phosphatidylserin
CypD	Cyclophilin D
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transition-Pore
TMEM16F	Transmembran Protein 16F
ANO6	Anoctamin 6
GP	Glykoprotein
vWF	von-Willebrand-Faktor
vWR	von-Willebrand-Faktor-Rezeptor
ADP	Adenosindiphosphat
TXA ₂	Thromboxan-A ₂
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
CLEC-2	C-Type Lectin-like Receptor 2
PAR	Protease-aktivierte Rezeptor
EZM	extrazelluläre Matrixproteine
AQP1	Aquaporin-1
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
DIC	disseminierte intravasale Koagulation
LPS	Lipopolysaccharid
NaCl	Natriumchlorid
HMDS	Hexamethyldisilazan
PFA	Paraformaldehyd
GDA	Glutaraldehyd
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
BSA	bovines Serum Albumin
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
RT	Raumtemperatur
PRP	Thrombozyten-reiches Plasma

PNA	Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregate
PMN	polymorph-kernige Neutrophile
ALI	akute Lungenschädigung
KG	Körpergewicht
BAL	bronchoalveolare Lavage
i.v.	intravenös
i.p.	intraperitoneal
s.c.	subkutan
i.n.	intranasal
FOV	Bildfeld
mC1/C1	C1-Multimer
AnnV	Annexin V
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
PE	Phycoerythrin
APC	Allophycocyanin
AF	AlexaFluor
PB	Pacific Blue
BV	Brilliant Violet
IL	Interleukin
IFN	Interferon
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Fbg	Fibrinogen
Arpc	Actin-related protein complex
PLC γ 2	Phospholipase C γ 2

1. Einleitung

1.1 Klassische Funktion von Thrombozyten in der Hämostase

Der Bildung von Thromben infolge von traumatischen Gefäßschäden liegt eine gut charakterisierte Kaskade aus Rekrutierung, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten zugrunde (Broos et al., 2011). Diese Signalkaskade wird durch die Bindung spezieller Thrombozyten-Rezeptoren (z. B. GPIb, GPVI) an extrazelluläre Matrixproteine wie von Willebrand-Faktor (vWF) oder Kollagen eingeleitet und führt im weiteren Verlauf zur Bildung eines hämostatischen Gerinnsels, des sogenannten Thrombus, um die vaskuläre Integrität zu bewahren und lebensbedrohliche Komplikationen wie Blutungen zu verhindern. Jedoch kann eine übermäßige Bildung von Thromben mit nachfolgender Embolisation, beispielsweise nach der Ruptur atherosklerotischer Plaques, zu schwerwiegenden Schäden in besonders anfälligen Endorganen wie dem Herzen und dem Gehirn führen (Jackson, 2011). Die klinische Relevanz von Herzinfarkten und Schlaganfällen, welche durch Thrombusbildung und Thromboembolie verursacht werden, wird durch epidemiologische Daten deutlich belegt. Als Bestandteil der kardiovaskulären Erkrankungen stellen sie weltweit die häufigste Todesursache dar (Dagenais et al., 2020).

1.1.1 Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase, auch als zelluläre Hämostase bezeichnet, ist ein gut charakterisierter, mehrstufiger Prozess, der zur Bildung eines dreidimensionalen Netzwerks aus Thrombozyten führt. Diese Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt (kurz: Plättchen, engl.: platelets), sind ca. 3 µm kernlose Zellen und stellen den zweithäufigsten Zelltyp des peripheren Blutes dar (Normbereich: 150.000–400.000/µl) (Gremmel et al., 2016). Hierbei durchlaufen Thrombozyten die drei Phasen der Adhäsion (bzw. Rekrutierung), Aktivierung und Aggregation (Broos et al., 2011; Clemetson, 2012), welche in der graphischen Abbildung 1 visualisiert wurden.

Die vaskuläre Blutstillung beschreibt die unmittelbare reflektorische Vasokonstriktion der Endothel- und glatten Muskelzellen des verletzten Gefäßes. Damit wird die Durchblutung des betroffenen Areals gesenkt und die Adhäsion der

Thrombozyten an die Gefäßwand durch Reduktion des Gefäßdurchmessers und Erhöhung der resultierenden Scherkräfte gefördert (Zucker, 1947).

Eingeleitet wird die Signalkaskade der Adhäsion durch die Bindung spezieller Thrombozyten-Rezeptoren an subendotheliale, extrazelluläre Matrixproteine wie beispielsweise Kollagen. Thrombozyten können mithilfe des membranständigen GPIb-IX-V-Rezeptorkomplexes (= von-Willebrand-Faktor-Rezeptor [vWR]) über den von-Willebrand-Faktor (vWF) indirekt mit Kollagen interagieren (Li et al., 2010). Der vWF ist ein Glykoprotein (GP), welches frei löslich im Blut vorliegt und von Endothelzellen synthetisiert und gespeichert wird. Es wird bei Schädigung des Endothels freigesetzt und bindet an den freigelegten Kollagenfasern (Sadler, 1998). Diese vorübergehende mechanische Interaktion bremst die Thrombozyten weiter ab und leitet die nachfolgenden Schritte der Aktivierung ein (Varga-Szabo et al., 2008). Neben dem vWR haben Thrombozyten auch die Möglichkeit direkt über einen Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM) gekoppelten GPVI-Rezeptor mit Kollagen zu interagieren. Die ausgelöste, nachgeschaltete Signalkaskade führt zu einer zusätzlichen Aktivierung und Formänderung der Thrombozyten (Babur et al., 2020).

Nachdem Thrombozyten spezifisch an endotheliale Defekte adhärieren, sezernieren sie verschiedene Inhaltsstoffe aus ihren zytoplasmatischen Granula. Es existieren drei Formen dieser Granula: α - und δ -Granula setzen gerinnungsfördernde Mediatormoleküle frei, während λ -Granula den thrombozytären Lysosomen entsprechen. Die α -Granula enthalten große Proteine, wie den von Willebrand-Faktor (vWF) zur Thrombozyten-Adhäsion, Fibrinogen sowie verschiedene Gerinnungsfaktoren. (Blair & Flaumenhaft, 2009). δ -Granula, auch als elektronendichte Granula (engl.: dense granules) bezeichnet, beinhalten hingegen nur kleine Moleküle wie Adenosindiphosphat (ADP), den Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) und Calcium-Ionen (Ca^{2+}) für die Thrombozyten-Aktivierung (Koseoglu & Flaumenhaft, 2013). ADP bindet auto- und parakrin an den P2Y12-Rezeptor der Thrombozyten und aktiviert diesen. Dies führt zu einer charakteristischen Morphologie der Thrombozyten mit Ausbildung von Lamellipodien durch Konformationsänderung der Aktin- und Filamin-Filamente des Zytoskeletts, welche die Retraktion des sich bildenden Gerinnsels unterstützt. Darüber hinaus stimuliert die Bindung von ADP das Enzym Cyclooxygenase (COX) in den Thrombozyten, was zu einer gesteigerten Synthese des Arachidonsäure-Derivats

Thromboxan-A2 (TXA₂) führt. TXA₂ bindet an einen Gq-Protein-gekoppelten Rezeptor auf der Membran von Thrombozyten und glatten Muskelzellen, was eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bewirkt. Dies fördert die weitere Ausbildung von Lamellipodien sowie eine verstärkte Vasokonstriktion des verletzten Gefäßes, welche die Thrombozytenaggregation einleitet. Im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus verstärkt die zusätzliche Sekretion gerinnungsfördernder Granula die Aktivierung der Thrombozyten (Woulfe et al., 2001).

Weiterhin bewirkt die Aktivierung des P2Y12-Rezeptores eine Erhöhung der Affinität des Integrin-Rezeptors $\alpha IIb\beta 3$, auch bekannt als GPIIbIIIa-Rezeptor, zu seinem Liganden Fibrinogen (Li et al., 2010; Shen et al., 2012). Integrine sind transmembrane Proteine, die als Rezeptoren an der Thrombozyten-Zelloberfläche eine wichtige Rolle in der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion spielen. Sie sind in der Lage, Signale in beiden Richtungen über die Zellmembran zu vermitteln, was als *inside-out* und *outside-in* Signaling bezeichnet wird. Diese beiden Signalübertragungsmechanismen sind entscheidend für die Regulation der Aktivierung, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten. Beim *inside-out* Signaling wird durch Bindung Intrazelluläre Signalproteine an die zytoplasmatische Domäne des Integrins eine Konformationsänderung des Rezeptors ausgelöst, welches die Bindungsfähigkeit von extrazellulären Liganden steigert (Li et al., 2010). Das *outside-in* Signaling beschreibt den umgekehrten Prozess. Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne des Integrin-Rezeptors führt durch direkte Interaktion zu einer Konformationsänderung, welches intrazelluläre Signalwege zur Reorganisation des Zytoskeletts initiiert (Durrant et al., 2017; O'Brien et al., 2012; Pang et al., 2018). Verschiedene Signalproteine, wie beispielsweise Src-Kinasen, werden aktiviert und steuern zelluläre Prozesse, wie beispielsweise die Zellmigration von Thrombozyten (Kaiser, Anjum, et al., 2023). Diese beiden Mechanismen sind eng miteinander verbunden und stellen einen bidirektionalen Rückkopplungsprozess sicher, welcher essenziell für die primäre Hämostase ist.

Die Thrombozyten-Aggregation wird durch Bindung von frei zirkulierendem Fibrinogen und vWF aus dem Blutplasma an den $\alpha IIb\beta 3/GPIIbIIIa$ -Rezeptorkomplex eingeleitet und aktiviert das Integrin *outside-in* Signaling. Fibrinogen (= Faktor I) ist ein Glykoprotein und Vorstufe des Fibrins, welches im Laufe der späteren plasmatischen Gerinnung gebildet wird. Durch Verbindung mehrerer

Thrombozyten-Ausläufer untereinander mittels Fibrinogen-Brücken entsteht ein dichtes zelluläres Netzwerk aus aktivierte Thrombozyten, dem sogenannten Thrombozyten-Pfropf oder weißen Abscheidungsthrombus (Furie & Furie, 2008; Hoffman & Monroe, 2001; van der Meijden & Heemskerk, 2019).

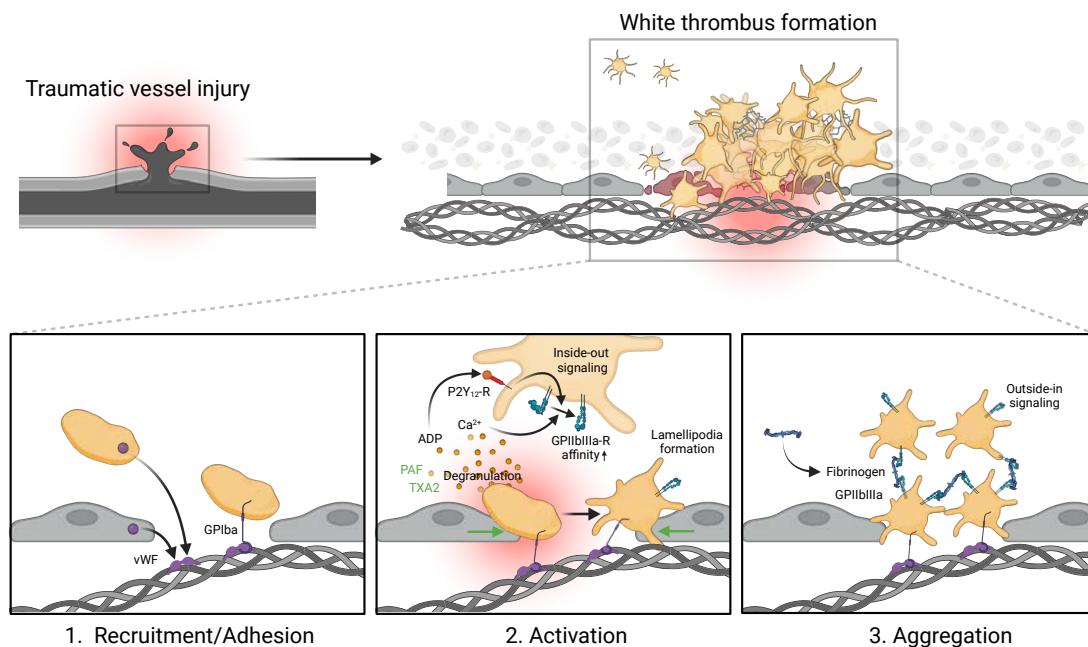


Abbildung 1: Mechanismen der primären Hämostase nach traumatischer Gefäßverletzung

Traumatische Verletzung des Endothels führt zur Exposition von extrazellulären Matrixproteinen (EZM) wie Kollagen und zur Bindung des von-Willebrand-Faktors (vWF), welcher aus Endothelzellen und Thrombozyten sezerniert wird. Adhäsion von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand wird durch das vWF-bindende Glykoprotein GPIba vermittelt. Aktivierung der rekruitierten Thrombozyten durch auto- und parakrine Sekretion prothrombotischer Faktoren wie ADP führt zu morphologischen Veränderungen und Erhöhung der Affinität des $\alpha IIb\beta 3/GPIIb/IIIa$ -Rezeptors. Die Bindung von Fibrinogen aktiviert das Integrin *outside-in* Signaling und fördert die Aggregation benachbarter Thrombozyten, resultierend in der Bildung eines stabilen Thrombus.

Adaptiert nach (Kaiser, Escaig, et al., 2023).

1.1.2 Sekundäre Hämostase

Die sekundäre Hämostase, auch als plasmatische Hämostase bezeichnet, führt zur Gerinnung und Fibrinausfällung im Blutplasma. Sie wird durch eine Abfolge von Aktivierungsschritten spezifischer Gerinnungsfaktoren initiiert und aufgrund ihres stufenweisen, sich selbst verstärkenden Verlaufs als Gerinnungskaskade bezeichnet. Die Thrombozyten-Membran stellt hierbei die erforderliche Oberfläche für die Gerinnungsfaktoren bereit, an die sie binden müssen, um effizient

miteinander zu interagieren. Dadurch wird eine zielgerichtete Gerinnungsreaktion ermöglicht, da die im Plasma frei löslichen Gerinnungsfaktoren in räumlicher Nähe zueinander positioniert werden (Furie & Furie, 2008; Schenone et al., 2004).

Gerinnungsfaktoren sind Plasmaproteine, welche als inaktive Vorstufen frei löslich im Blut zirkulieren. Nach Aktivierung fungieren sie als Serinproteasen und können durch limitierte proteolytische Spaltung weitere Gerinnungsfaktoren in eine aktive und gerinnungsfördernde Form umwandeln. Calcium-Ionen sind hierbei sowohl für die Serinproteasen als auch für die Thrombozytenaggregation der primären Hämostase ein essenzieller Cofaktor (Schenone et al., 2004).

Die Kaskade kann durch das intrinsische oder das extrinsische System in Gang gesetzt werden. Diese endogene und exogene Aktivierung resultiert in der Bildung des TENase-Komplexes, welcher aus verschiedenen Gerinnungsfaktoren, Phospholipiden und Calcium-Ionen besteht. Dieser aktiviert hochspezifisch den Faktor X (engl.: factor ten), welcher den Faktor-Xa-Va-Komplex, auch Prothrombinase-Komplex genannt, bildet, um Thrombin umzusetzen (Grover & Mackman, 2019; Mackman et al., 2007).

In vivo laufen beide Kaskaden immer parallel ab und münden in einer Endstrecke, welche die Schlüsselreaktion der Hämostase beinhaltet. Die aktivierte Serinprotease Thrombin wandelt lösliches Fibrinogen in Fibrinmonomere um und wird im Anschluss über kovalente Bindungen durch Faktor XIII quervernetzt. Dieser unlösliche Fibrinthrombus stellt die Grundsubstanz des eigentlichen stabilen Thrombus dar und wird durch Retraktion der Thrombozyten-Lamellipodien gefestigt (Wolberg, 2007). Zusätzlich lagern sich rote Blutkörperchen an, wodurch der finale rote Thrombus entsteht. Dieser kann den Endotheldefekt effektiv verschließen und dadurch potenzielle Blutungskomplikationen verhindern (Furie & Furie, 2008).

1.2 Brücke zwischen primärer und sekundärer Hämostase: prokoagulante Thrombozyten

Interessanterweise zeigen nicht alle Thrombozyten die gleiche Reaktion auf externe Stimulation. Abhängig von zeitlich-räumlichen Faktoren, wie lokal vorhandenen, löslichen Agonisten, mechanischen Scherkräften sowie Zell-Zell-

Interaktionen mit Endothel und Immunzellen, können Thrombozyten entweder aktiviert werden und aggregieren oder durch Sekretion ihrer Granula die Aktivierung benachbarter Thrombozyten stimulieren (Broos et al., 2011; Ollivier et al., 2014; van der Meijden & Heemskerk, 2019). Eine weitere, besondere Subpopulation hochaktivierter Thrombozyten sind sogenannte prokoagulante Thrombozyten (engl.: necrotic, ballooning, zombie platelet). Diese werden nur durch eine starke, multivalente Stimulation induziert und fördern die sekundäre Hämostase durch vermehrte Bindung von Gerinnungsfaktoren auf ihrer Oberfläche (Agbani & Poole, 2017; van der Meijden & Heemskerk, 2019) (Abbildung 2).

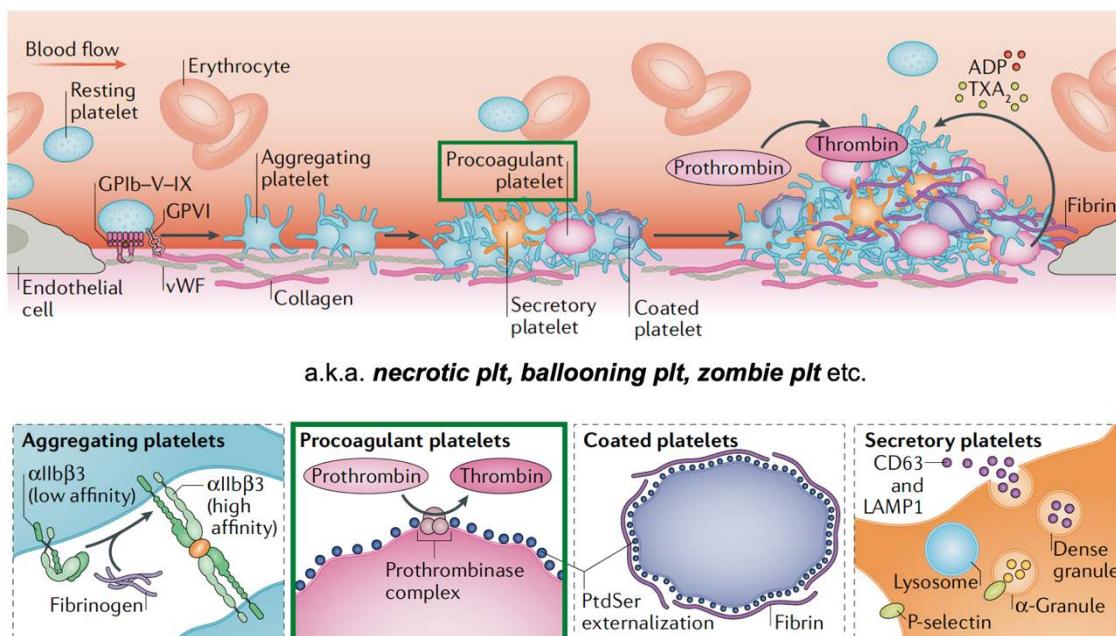


Abbildung 2: Thrombozyten-Subpopulationen mit distinkten Aufgaben bei der Thrombusbildung

Heterogenes Aktivierungsmuster von Thrombozyten durch lokal unterschiedliche Agonisten, mechanische Stimulation sowie Zell-Zell-Kontakte im Rahmen der Thrombusbildung nach Endothelschädigung. Dargestellt sind aggregierende (blau), sekretorische (orange) und prokoagulante Thrombozyten (engl.: necrotic/ballooning/zombie platelet) (grüne Box).

Adaptiert nach (van der Meijden & Heemskerk, 2019). Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, Nature Reviews Cardiology, Copyright © 2018.

1.2.1 Funktionelle Eigenschaften prokoagulanter Thrombozyten

Prokoagulante Thrombozyten zeichnen sich durch eine charakteristische runde Zellmorphologie aus. Nach ihrer Aktivierung erfolgt ein vermehrter Einbau von Wasserkanälen, wie Aquaporin-1 (AQP1), in die Zellmembran, was zu einem Anschwellen der Thrombozyten führt – ein Prozess, der als "Ballooning" bezeichnet wird (Agbani & Poole, 2021; Agbani et al., 2015; Agbani et al., 2018). Sie

exprimieren verstärkt Aktivierungsmarker wie P-Selektin und das negativ geladene Phospholipid Phosphatidylserin (PS) auf ihrer Oberfläche und setzten nach Aktivierung PS-positive Mikrovesikel frei (Agbani & Poole, 2017; Hua et al., 2015; van der Meijden & Heemskerk, 2019) (Abbildung 3). Namensgebend für die Subpopulation der prokoagulanten Thrombozyten ist ihre Fähigkeit, große Mengen an Calcium-Ionen auf ihrer vergrößerten, negativ geladenen Zelloberfläche zu binden. Diese Eigenschaft ermöglicht die lokale Interaktion mit Gerinnungsfaktoren, wie dem Prothrombinase- oder TENase-Komplex. Dadurch wird die plasmatische Gerinnung effizienter gefördert, insbesondere durch eine erhöhte Affinität zu allen Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren, was wesentlich zum Thrombin-Umsatz und zur Fibrinbildung beiträgt. Bisherige Studien deuten darauf hin, dass prokoagulante Thrombozyten durch die Rekrutierung von Gerinnungsfaktoren eine effektive Verbindung zwischen zellulärer und plasmatischer Blutgerinnung darstellen (Agbani & Poole, 2017; Fujii et al., 2015; Hua et al., 2015; Jobe et al., 2008).

1.2.2 Aktivierung und Signalwege prokoagulanter Thrombozyten

Die prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten wird hauptsächlich durch eine duale Stimulation starker Agonisten wie GPVI-Rezeptor-Agonisten (z.B. Kollagen oder Convulxin) sowie Thrombin (Agbani & Poole, 2017; Agbani et al., 2015) induziert. Weitere Studien konnten belegen, dass auch mechanischer Stress, wie lokal erhöhte intravaskuläre Scherkräfte, zu einer verstärkten Aktivierung führt (Delaney et al., 2014; Pang et al., 2018). Der GPIb-Rezeptor spielt ebenso eine Rolle in der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten, die durch das proinflammatorische Protein S100A8/A9 (Calprotectin) vermittelt wird (Colicchia et al., 2022). Die intrazellulären Signalkaskaden, die als Reaktion auf starke Agonisten zur prokoagulanten Aktivierung führen, sind bislang nur teilweise aufgeklärt (Abbildung 3).

Die prokoagulante Aktivität einzelner Thrombozyten wird maßgeblich von ihrer Fähigkeit beeinflusst, die zytosolische Calcium-Konzentration rasch zu erhöhen. Die gleichzeitige Aktivierung des Thrombin- und Kollagenrezeptors führt zu einem verstärkten Einstrom von extrazellulärem Calcium, was wiederum zur Bildung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition-Pore (mPTP) beiträgt. Dies resultiert in einer Destabilisierung der mitochondrialen Membran, einer

konsekutiven Depolarisation sowie einer raschen Freisetzung von Calcium-Ionen aus den mitochondrialen Speichern zurück ins Zytosol. Eine kürzlich durchgeführte Studie beschreibt dabei supramaximale Calciumkonzentrationen von bis zu 100 µM, die die physiologischen intrazellulären Werte deutlich übersteigen (Abbasian et al., 2020). Nach Erreichen der maximalen Calcium-Konzentrationen folgen sowohl morphologische Veränderungen wie die Einnahme der typischen Ballon-Form, als auch die Exposition von PS auf der Oberfläche der Thrombozyten (Agbani & Poole, 2017; Denorme & Campbell, 2022).

Einige Proteine und Ionenkanäle sind hierbei zentrale Treiber der prokoagulanten Aktivierung. Für die Formation der mPTP ist das mitochondriale Transmembranprotein Cyclophilin D (CypD) essenziell (Denorme, Manne, Portier, Eustes, et al., 2020; Hua et al., 2015; Jobe et al., 2008), während das Transmembranprotein TMEM16F, auch bekannt als Anoctamin 6 (ANO6), die Exposition von PS steuert (Baig et al., 2016; Fujii et al., 2015; Schoenwaelder et al., 2009; Suzuki et al., 2010; van Kruchten et al., 2013). In nicht aktivierten Thrombozyten ist PS durch die Aktivität der Flippase auf die innere Schicht der Lipiddoppelmembran beschränkt. Als Reaktion auf supramaximale Calcium-Konzentrationen wird die Flippase inaktiviert und die Scramblase-Aktivität von TMEM16F katalysiert die bidirektionale Mobilisation von PS und anderen Phospholipiden durch Verlust der Membranasymmetrie an der Oberfläche (Millington-Burgess & Harper, 2020).

Interessanterweise resultiert ein nahezu vollständiger Verlust prokoagulanter Thrombozyten aufgrund eines hereditären Mangels von TMEM16F in Menschen lediglich zu einer milden Blutungsneigung ohne therapeutische Konsequenz (Millington-Burgess & Harper, 2020; Weiss et al., 1979). Diese seltene erbliche Krankheit, auch bekannt als Scott-Syndrom, hat eine unklare Prävalenz von etwa 1:1.000.000.

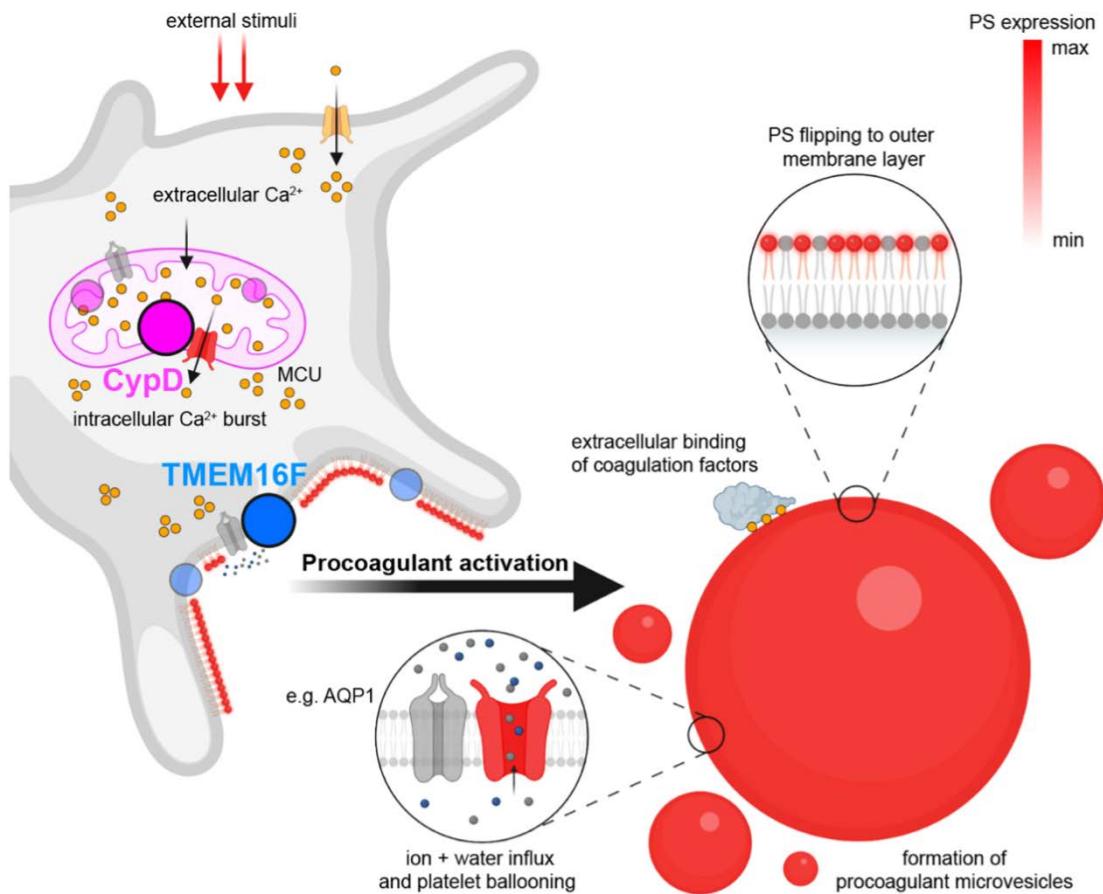


Abbildung 3: Mechanismen und Funktionen der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten

Prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten wird durch externe Stimulation in einer CypD- und TMEM16F-abhängigen Weise ausgelöst. Einnahme der typischen runden Morphologie durch Einbau von AQP1 in die Zellmembran (auch als „Ballooning“ bezeichnet) und Exposition von PS an der äußeren Membranoberfläche. Formation prokoagulanter Mikrovesikel und extrazelluläre Bindung von Gerinnungsfaktoren.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2024).

1.3 Thrombozyten in Inflammation und Immunabwehr

Über ihre klassische Rolle in Thrombose und Hämostase hinaus spielen Thrombozyten eine wichtige Funktion im Kontext der angeborenen und erworbenen Immunität (Nicolai et al., 2019; Nicolai & Massberg, 2020; Stark & Massberg, 2021; Yeaman, 2014). Thrombozyten entfalten eine Vielzahl wichtiger Funktionen in entzündlichen Zuständen, darunter die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten im entzündeten Gewebe (Kaiser et al., 2021; Semple et al., 2011), die Aufnahme und Abtötung von Mikroorganismen zur Verhinderung der Ausbreitung von Pathogenen (Gaertner et al., 2017; Gaertner & Massberg, 2019; Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020), sowie die Antigenpräsentation gegenüber adaptiven

Immunzellen (Elzey et al., 2008; Guo et al., 2021; Verschoor et al., 2011) (Abbildung 4A-B).

Im Rahmen der angeborenen humeralen Immunantwort rekrutieren Thrombozyten Immunzellen zu Entzündungsherden, indem sie beispielsweise patrouillierende neutrophile Granulozyten über TLR4 direkt binden und die Sekretion von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) fördern (Engelmann & Massberg, 2013; Gaertner & Massberg, 2019; Pircher et al., 2019). Zudem sind Thrombozyten essenziell für Teile der adaptiven Immunantwort, da sie durch Interaktionen mit dendritischen Zellen und Lymphozyten beispielsweise die Abwehrreaktion auf Listerien-Infektionen (Verschoor et al., 2011) sowie die hepatische Immunabwehr durch CD8-positive T-Zellen steuern (Guidotti et al., 2015). Durch Sezernierung bakterizider Substanzen, wie beispielsweise saurer Hydrolasen aus λ -Granula, üben Thrombozyten außerdem direkte antimikrobielle Funktionen zur Abtötung von Krankheitserregern aus (Gaertner & Massberg, 2019; Nicolai et al., 2019).

Bei einer systemisch dysregulierten Immunantwort kann jedoch das reaktive Aktivierungspotenzial der Thrombozyten schädlich für den Wirt sein. Aktuelle Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass Thrombozyten als prothrombotische und proinflammatorische Treiber von COVID-19 fungieren. Diese fördern eine disseminierte intravasale Koagulation (DIC) durch ihre Degranulation und induzieren die Rekrutierung sowie Aktivierung von Neutrophilen mit Bildung von NETs bei schwer betroffenen Patienten (Middleton et al., 2020; Nicolai, Leunig, et al., 2020; Zuo et al., 2020).

Interessanterweise nutzen Thrombozyten, die bei Entzündungen rekrutiert werden, Rezeptoren, Signalwege und Effektor-Funktionen, die zumindest teilweise von denen während der klassischen Thrombose und Hämostase abweichen, was die Bedeutung des detaillierten Verständnisses dieser Prozesse betont (Gaertner & Massberg, 2019).

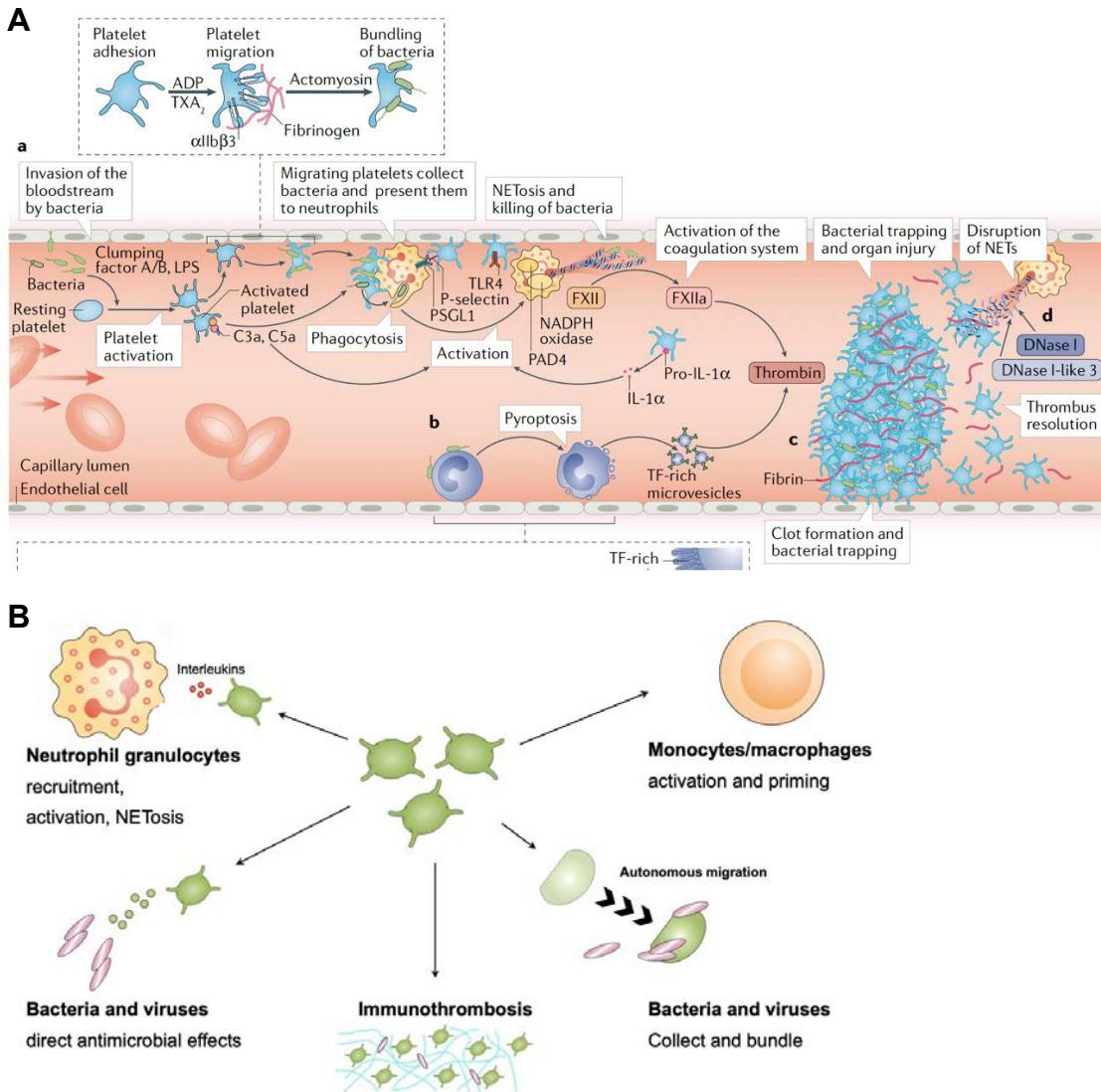


Abbildung 4: Thrombozyten im Kontext von Infektionen und Entzündungen

(A) Durch das Eindringen von Krankheitserregern in den Blutkreislauf werden einzelne Thrombozyten durch Chemokine und Zell-Zell-Interaktionen aktiviert und interagieren mit intravaskulären Leukozyten. Konkret rekrutieren und aktivieren Thrombozyten Neutrophile, aber auch Monozyten und lösen über Bindung des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4) die Bildung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) aus (Stark & Massberg, 2021). Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, Nature Reviews Cardiology, Copyright © 2021. (B) Zudem spielen Thrombozyten eine entscheidende Rolle bei der Abwehr bestimmter Bakterien und Viren, indem sie antimikrobielle Substanzen freisetzen, die Immunthrombose aktivieren und mittels autonomer Migration die Umgebung abtasten, um Bakterien zu bündeln und Neutrophilen zu präsentieren.

1.3.1 Autonome Migration von Thrombozyten

Kürzlich veröffentlichte Studien identifizierten in dem Zusammenhang der Immunabwehr erstmals die Fähigkeit der autonomen Migration von Thrombozyten *in vitro* und *in vivo* (Gaertner et al., 2017). Veränderungen des Zytoskeletts

ermöglicht es, einzelnen immunresponsiven Thrombozyten mittels Haptotaxis adhäsive Fibrin(ogen)-Gradienten zu erkennen. Während sie im Ruhezustand eine durch Mikrotubuli stabilisierte bikonvexe Form aufweisen, kommt es nach Aktivierung des Fibrinogen-Oberflächenrezeptors GPIIbIIIa zur Aktin-Myosin-Interaktion mit Ausbildung von Pseudopodien (Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020). Als Teil des Abwehrsystems wandern die aktivierte Thrombozyten autonom entlang des Endothels und sammeln Bakterien wie *E. coli* oder den klinisch hochrelevanten Keim MRSA (Methicillin-resistenter *S. aureus*) ein, um eine gezielte leukozytäre Immunreaktion zu initiieren. In einem murinen MRSA-Sepsis-Modell ermöglichen einzelne Thrombozyten zudem die Extravasation neutrophiler Granulozyten in entzündetes Gewebe (Gaertner et al., 2017; Gaertner & Massberg, 2019).

1.3.2 Inflammatorische Blutungen

Blutungen sind eine wesentliche Komplikation von Hyperinflammation und Sepsis. Die Pathophysiologie dieser sogenannten inflammatorischen Blutungen ist komplex und Gegenstand aktueller Forschung. Ein charakteristisches Merkmal von inflammatorischen Erkrankungen ist die erhöhte Gefäßpermeabilität mit Neigung zu Mikroblutungen. Diese sogenannten inflammatorischen Blutungen treten überwiegend in Geweben auf, welche ein umfangreiches Netzwerk an kapillarer Mikrozirkulation aufweisen, wie beispielsweise Haut, Schleimhaut des Magen-Darm-Trakts und Lunge (Ho-Tin-Noé et al., 2018). Interessanterweise werden im Gegensatz zu traumatischen Verletzungen Blutungen in der entzündlichen Hämostase hauptsächlich durch Transmigration neutrophiler Granulozyten durch die entzündete Gefäßwand ausgelöst. Dies führt zu Mikrodefekten des Endothels und dem daraus resultierenden Austritt von Plasmahalten und roten Blutkörperchen (Goerge et al., 2008; Gros et al., 2015; Hillgruber et al., 2015; Ho-Tin-Noé et al., 2009) (Abbildung 5).

Die klinische Relevanz entzündungsbedingter Blutungen, liegt insbesondere bei kritisch kranken intensivmedizinisch behandelten Patienten. Diese leiden häufig an akuten entzündlichen Erkrankungen wie dem Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), welches zu verstärkten Blutungen in die Lunge führt (Lara & Schwarz, 2010). Aber auch intrakranielle Blutungen im Rahmen von Therapiestrategien mittels extrakorporaler Membran-Oxygenierung (ECMO) wurden

berichtet (Kasirajan et al., 1999; Lüsebrink et al., 2022). Diese inflammatorischen Blutungen können die Prognose dieser Patienten erheblich beeinflussen (Al-Samkari et al., 2020; Thomas et al., 2018).

Studien konnten zeigen, dass Thrombozyten entscheidend für den Erhalt der endothelialen Integrität in einem gewebeabhängigen inflammatorischen Kontext sind. Es stehen jedoch im Gegensatz zur klassischen Hämostase nicht Thrombozyten-Aggregate, sondern vor allem einzelne Thrombozyten im Vordergrund (Ho-Tin-Noé, 2018; Ho-Tin-Noé et al., 2018; Kaiser, Escaig, et al., 2023). Diese werden an die entzündete Gefäßwand rekrutiert und positionieren sich gezielt an den Extravasation-Stellen von Neutrophilen, um endothiale Leckagen mechanisch zu verschließen und Blutungen zu verhindern (Gros et al., 2015) (Abbildung 5). Diese Studie legt den Fokus insbesondere auf die Rolle der Thrombozyten-Oberflächenrezeptoren, während weitere Untersuchungen spezifische Funktionen der Thrombozyten, wie beispielsweise die Degranulation, im Kontext von entzündlichen Blutungsmodellen der Haut oder Lung detaillierter beleuchtet (Deppermann et al., 2017). Die für die klassische Hämostase relevanten Signallewege scheinen im inflammatorischen Kontext von geringerer Bedeutung zu sein als bei der Thrombusbildung nach traumatischer Gefäßverletzung (Gros et al., 2015; Ho-Tin-Noé, 2018).

Die Fähigkeit von Thrombozyten, autonom zu migrieren, spielt im Rahmen inflammatorischer Blutungen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion. Die Migration ermöglicht es einzelnen Thrombozyten, sich gezielt an Stellen vaskulärer Mikroläsionen, die durch die Diapedese von Neutrophilen ausgelöst wurden, zu repositionieren und dadurch sowohl Mikroblutungen zu kontrollieren als auch die Ausbreitung von Bakterien zu verhindern. Kürzlich veröffentlichte Daten zeigen, dass Thrombozyten durch inflammatorische Stimulation zu verstärkter Migration neigen und das Gefäßbett gezielt nach Endothellecks absuchen. Die genetische oder pharmakologische Hemmung der Fähigkeit zur autonomen Migration von Thrombozyten durch Interferenz mit dem Actin-related protein complex 2/3 (Arpc2/3) führte in einem murinen Modell der akuten Lungenverletzung (engl.: acute lung injury [ALI]) zu einer Exazerbation der pulmonalen Blutung (Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020).

Es bleibt jedoch unklar, wie genau einzelne Thrombozyten, welche den Durchmesser von Neutrophilen um ein Vielfaches unterschreiten, endotheliale Mikrodefekte abdichten, sobald sie an die Verletzungsstelle rekrutiert wurden und welche Rolle plasmatische Gerinnungsfaktoren in der entzündlichen Hämostase spielen.

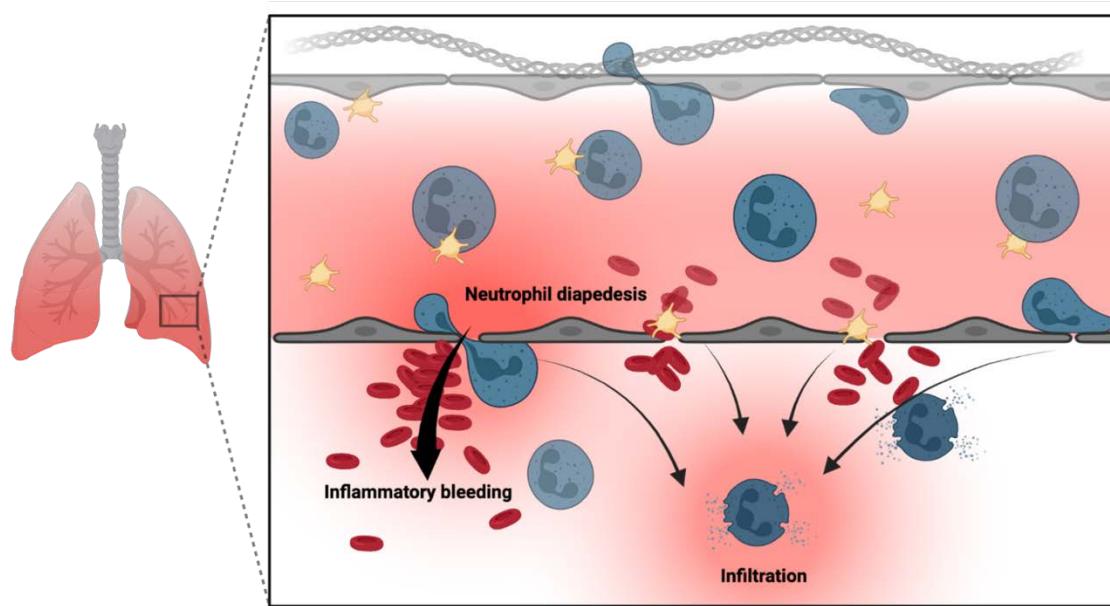


Abbildung 5: Pathophysiologie inflammatorischer Blutungen in der Lunge

Erhöhte Endothelpermeabilität führt zur Transmigration von Neutrophilen durch die entzündete Gefäßwand, was zu mikrovaskulären Defekten und konsekutivem Austritt von Plasma und roten Blutkörperchen führt. In diesem Prozess werden einzelne Thrombozyten an die Gefäßwand rekrutiert und verhindern Blutungen, indem sie die Transmigrationsstellen abdichten.

2. Fragestellung und Hypothesen

Prokoagulante Thrombozyten stellen eine hochaktivierte Subpopulation von Thrombozyten dar, deren genaue Funktion insbesondere abseits der Hämostase weiterhin ungeklärt ist. Eine Schlüsselfunktion prokoagulanter Thrombozyten ist die Bildung einer Plattform für Gerinnungsfaktoren. Thrombozyten sind *in vitro* und *in vivo* zur Migration fähig und bilden bei der Inflammation eine wichtige Schnittstelle zwischen Endothel und Immunzellen (Gaertner et al., 2017; Gaertner & Massberg, 2019; Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020). Der Einfluss von Inflammation und Infektion auf die prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten.

Im Rahmen dieses Promotionsprojekts soll untersucht werden, inwieweit prokoagulante Thrombozyten die inflammatorische Hämostase beeinflussen. Ich stellte die Hypothese auf, dass akute Entzündungen zu einer lokalen Induktion prokoagulanter Thrombozyten führen, welche die Gerinnungskaskade gezielt an Stellen endothelialer Verletzungen aktivieren, um Mikrothromben zu bilden und somit effektiv inflammatorische Blutungen zu verhindern. Die zentralen Fragestellungen umfassen die Identifikation der auslösenden Faktoren der prokoagulanten Aktivierung von migrierenden Thrombozyten im inflammatorischen Milieu sowie die genaue Charakterisierung der involvierten Signalkaskaden und Rezeptoren.

Hierzu sollen *in vitro* Untersuchungen an migrierenden humanen Thrombozyten durchgeführt werden. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse sollen mithilfe genetisch modifizierter Knockout-Thrombozyten validiert werden, die nicht mehr in der Lage sind, einen prokoagulanten Phänotyp auszubilden. Um die funktionelle Relevanz der Interaktion zwischen Thrombozyten und der plasmatischen Gerinnung im Kontext der inflammatorischen Hämostase auch *in vivo* zu bestätigen, werden verschiedene murine Modelle akuter Entzündungen eingesetzt. Im Weiteren soll untersucht werden, inwiefern eine genetische oder pharmakologische Hemmung der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten die endothiale Integrität und das Auftreten inflammatorischer Blutungen beeinflusst.

3. Material

3.1 Inhibitoren und Agonisten

Cyclosporin A (#30024), Nifluminsäure (#N0630), Thrombin (#T4648), E. coli-abgeleitetes Lipopolysaccharid (LPS) O111 (#L2630), Adenosindiphosphat (ADP, #01905) und mP6 (#5098840001) wurden von Sigma-Aldrich und MerckMillipore erworben. Der PAR4-Inhibitor BMS-986120 wurde von CaymanChem (#23497) bezogen. Der Syk-Inhibitor BI-1002494 und die Kontrolle BI-2492 wurden von Boehringer Ingelheim erworben. Die klinisch verwendeten Antikoagulantien Tirofiban und Argatroban wurden jeweils von Ibgan und Mitsubishi Pharma gekauft. Prostaglandin-I2-Natriumsalz wurde von Abcam und U46619 von Tocris bestellt.

3.2 Chemikalien

Horm-Kollagen wurde von Takeda (#1130630) gekauft. Casein, rekombinantes humanes Serumalbumin, Hexamethyldisilazan (HMDS), Paraformaldehyd (PFA) und Glutaraldehyd (GDA) wurden von Sigma bezogen.

3.3 Antikörper und fluoreszierende Proteine

Protein/Epitop	Fluorophor	Spezies	Hersteller	Bestellnummer
act. CD42b (JonA)	PE	Maus	emfret	M023-2
Annexin V	FITC	-	Biolegend	640906
Annexin V	AF649	-	Biolegend	640912
Anti-Kollagen I	-	Hase	abcam	ab260043
Anti-mouse IgG	Cy3	Maus	Invitrogen	A10521
Anti-rabbit IgG	AF546	Hase	Invitrogen	A11037
Anti-rabbit IgG	AF649	Hase	Invitrogen	A21244
Anti-rat IgG	AF488	Ratte	Invitrogen	A21208
Anti-rat IgG	AF546	Ratte	Invitrogen	A11007
C301	-	Maus	emfret	C301
CD107a	BV785	Maus	Biolegend	328643

CD41	Pacific blue	human	Biolegend	303714
CD41	AF700	Maus	Biolegend	133926
CD42b	FITC	Maus	emfret	X488
CD42b	DyeLight-649	Maus	emfret	X649
CD42b	-	Maus	abcam	ab183345
CD45	BV650	human	Biolegend	304044
CD45	PerCp-Cy5.5	Maus	Biolegend	103132
CD9	PE/Dazzle™ 594	Maus	Biolegend	124821
Fibrinogen	-	-	BioRad	4440-8004
Fibrinogen	AF546	-	ThermoFisher	F13192
Fibrinogen	AF488	-	ThermoFisher	F13191
GPVI (JAQ1)	FITC	Maus	emfret	M011-0
Hoechst Dye	-	-	ThermoFisher	H3570
Ly6G	PE	Maus	Biolegend	127608
Ly6G	PB	Maus	Biolegend	127612
Ly6G	BV711	Maus	Biolegend	127643
mC1 multimer	Cy3	-	-	-
mC1 multimer	AF649	-	-	-
PAC-1	AF649	human	Biolegend	362806
P-selectin	BV421	human	Biolegend	304926
P-selectin	PE-Cy7	Maus	Biolegend	148310
P-selectin	PE	human	Biolegend	304905
Phosphatidylserine	-	-	Merck	05-719
R300	-	Maus	emfret	R300
TER119	PE	Maus	Biolegend	116208
TER119	AF488	Maus	Biolegend	116215
Thrombin	5-FAM/QXL™ 520	-	Anaspec	AS-72129

Tabelle 1: Verwendete Antikörper und fluoreszierende Proteine

4. Methoden

4.1 *In vitro* Untersuchungen

4.1.1 Humane Blutspender

Für die Isolation von Thrombozyten und Plasmaproben oder für Durchfluszytometrie-Experimente mit Vollblut dienten gesunde freiwillige männliche und weibliche Blutspender im Alter von 21 bis 45 Jahren. Alle Experimente, die menschliche Probanden betreffen, wurden von der Ethikkommission (LMU München) genehmigt und entsprechen den relevanten Vorschriften für Experimente mit menschlichen Proben.

4.1.2 Isolation von humanen und murinen Thrombozyten

Humanes Vollblut wurde durch sterile Punktion der Kubitalvene mit einer Safety-Multifly®-Kanüle der Größe 21G entnommen. Die Gerinnung wurde durch Zugabe von Säure-Citrat-Dextrose (39 mM Zitronensäure, 75 mM Natriumcitrat, 135 mM Dextrose) in einem Volumen, das 1/7 des Gesamtvolumens ausmacht, gehemmt. Das Blut wurde daraufhin im Verhältnis 1:1 mit einem modifizierten Tyrodes-Puffer (137 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 5,5 mM Saccharose, 10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonsäure [HEPES], pH = 6,5) verdünnt, um die Stabilität der Blutbestandteile zu gewährleisten.

Für die Isolation von murinen Thrombozyten wurden alle Tiere anästhesiert und das Blut anschließend durch Einführung einer Glaskapillare in den retroorbitalen Venenplexus gewonnen und durch Zusatz von Säure-Citrat-Dextrose an der Gerinnung gehemmt. Es erfolgte ebenfalls eine 1:1 Verdünnung in Tyrodes-Puffer. Sowohl menschliche als auch murine Proben wurden anschließend mit 70 g für 35 bzw. 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert, um plättchenreiches Plasma (PRP) zu gewinnen. Nach Abpipettieren des Überstands wurde PRP 1:2 in modifiziertem Tyrodes-Puffer verdünnt und Prostaglandin-I2 (PGI₂, 0,1 mg/ml), auch genannt Prostacyclin, zur Thrombozytenaggregationshemmung ergänzt. Für die Langlebigkeit der fragilen Thrombozyten wurde entweder Albumin (0,1%) bei humanen Proben oder Casein (0,01%) bei murinen Proben hinzugefügt. Abschließend wurde für 5-10 Minuten bei 1000-1200 g zentrifugiert und der gewonnene Niederschlag mit enthaltenen

gewaschenen isolierten Thrombozyten in modifiziertem Tyrodes-Puffer resuspendiert. Eine ausreichende Thrombozyten-Konzentration wurde mit einem Sysmex XN-V Series XN-1000V Zellzähler überprüft. Plättchen-armes Plasma (engl.: platelet-poor plasma, PPP) für den Thrombin-Umsatz-Assay (Kapitel 4.1.3.4) wurde durch Zentrifugation von PRP für 5 Minuten bei 14 000 g erzeugt.

4.1.3 Migrationsassay

Mithilfe des in vorherigen Arbeiten bereits extensiv beschriebenen Migration-Assays lässt sich die autonome Bewegung von Thrombozyten in einem *in vitro* Setting untersuchen (Gaertner et al., 2017; Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020). Um das inflammatorische Mikromilieu intravaskulärer Thrombozyten *in vitro* zu rekonstruieren, wurde für diese Dissertation ein neuartiger Migrationsassay entwickelt. Dieser imitiert die Exposition isolierter wandernder Thrombozyten gegenüber freigelegten extrazellulären Matrixproteinen, welche insbesondere bei schweren Entzündungen im Sinne einer Endotheliopathie auftreten (Ho-Tin-Noé et al., 2018). Hiermit lässt sich das Verhalten von isolierten migrierenden Thrombozyten auf einer Kollagen-Hybridmatrix mit prokoagulanten Aktivierung genauer charakterisieren.

4.1.3.1 Generierung von Fibrin(ogen), Albumin und Kollagen beschichteten Flusskammern

Hierfür wurden in einem ersten Schritt Flusskammern mit einer Oberfläche aus dem Hybridsubstrat Fibrin(ogen), Albumin und Kollagen I-Fasern generiert. Zuerst wurden rechteckige Deckgläser (Nr. 1.5, B x H 24 mm x 60 mm, Corning®, # CLS2980246, Sigmaaldrich) in einer Petrischale (BRAND®, # BR455742, Sigmaaldrich) mit 20 % HNO₃ eine Stunde lang auf einem Orbital-Schüttler mit 100/min gewaschen und 2-3 mal jeweils eine Stunde mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Deckgläser in einem Inkubator bei 37 °C getrocknet und mit HMDS beschichtet. Danach wurden Kunststoffkammern (Ibidi sticky slide VI0.4, #80608) auf das Deckglas angebracht (Abbildung 6A-B). Die Deckgläser wurden mit 37,5 µg/ml AF-konjugiertem oder unkonjugiertem Fibrinogen, 0,2% Humanserumalbumin und/oder Horm Kollagen I (25 µg/ml) gelöst in modifiziertem Tyrodes-Puffer (pH 7,2) für 15 Minuten bei RT beschichtet.

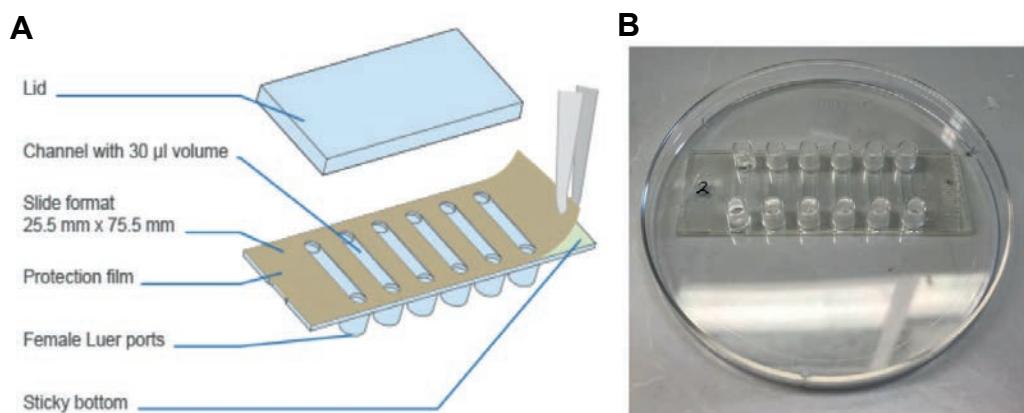


Abbildung 6: Generierung von Flusskammern mit einer Oberfläche aus Fibrin(ogen), Albumin und Kollagen I-Fasern

(A) Technische Merkmale der Ibidi Sticky-Slide VI 0.4 (Abbildung von www.ibidi.com/sticky-slides/65-sticky-slide-vi-04). (B) Erstellung von 6-Kanal Flusskammern für die Migration von isolierten Thrombozyten aus je einem Ibidi Sticky-Slide und einem beschichteten Deckglas für Mikroskopie.

4.1.3.2 Ausbreitung, Migration und prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten

Isolierte murine oder humane Thrombozyten wurden auf eine Konzentration von 150.000 bis 200.000/ μ l verdünnt. Anschließend wurden 4×10^6 Thrombozyten durch Zugabe von ADP (4 μ M), dem TXA₂-Rezeptoragonisten U46619 (2 μ M) und 1 mM Calciumchlorid aktiviert, in die beschichteten Spezialkammern pipettiert und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Diese Aktivierung führte zu einer Ausbreitung und Adhärenz der isolierten Thrombozyten auf der beschichteten Oberfläche. Danach wurden nicht-adhärente Zellen durch drei Waschschrifte mit zellfreiem Waschpuffer, bestehend aus modifiziertem Tyrodes-Puffer, entweder Albumin (0,1%) oder Casein (0,01%) und 1 mM Calcium entfernt. Optional konnten im letzten Waschschritt Antikörper zur Detektion von Thrombozyten und entsprechende Aktivierungsmarker hinzugegeben werden. Adhärente Thrombozyten begannen autonom auf der Hybridmatrix zu migrieren, bis sie eventuell durch Kontakt mit Kollagen-Fasern eine prokoagulante Aktivierung erfahren haben (Abbildung 7A). Nach 30 bis 60 Minuten Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit einer Lösung von 2 % PFA und 0,005 % GDA fixiert. Die Proben wurden entweder mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop (Olympus IX83 Mikroskop) oder einem Zeiss LSM 880 Konfokal-Mikroskop abgebildet (Abbildung 7B). Um eine verblinde Auswahl der analysierten Bildausschnitte zu gewährleiten, wurde im

nichtfokussierten DIC-Kanal eine zufällige mittige Stelle auf der Flusskammer gewählt und pro biologischem Replikat in mäanderförmiger Weise 5 bis 6 Bilder aufgenommen.

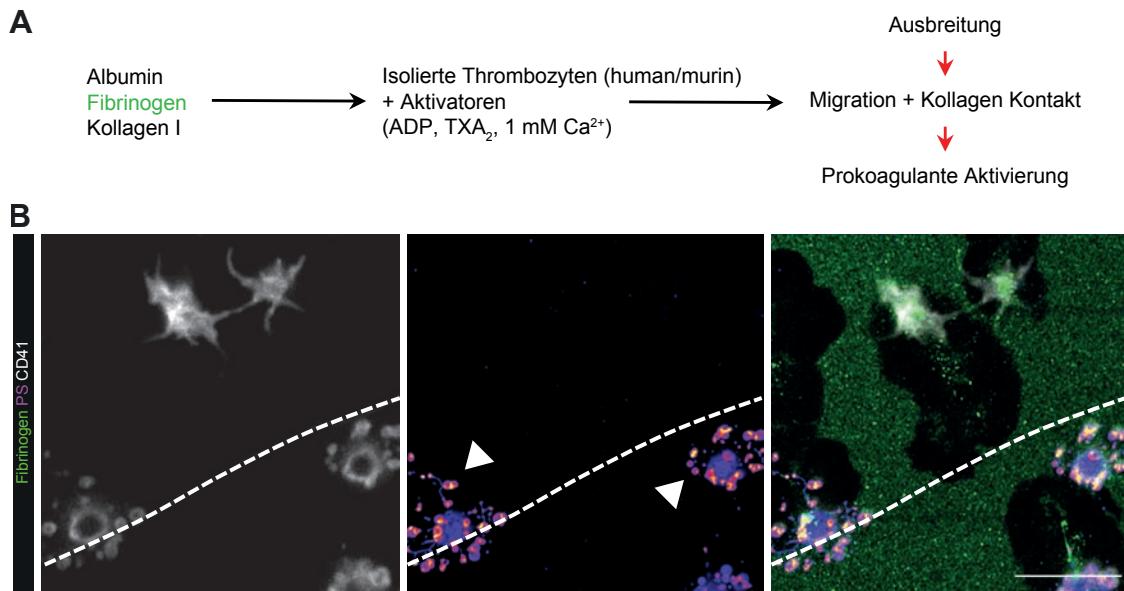


Abbildung 7: Etablierung eines neuartigen Migrationsassays zur Untersuchung prokoagulanter Thrombozyten

(A) Experimenteller Aufbau des Migrationsassays mit Kollagen-Hybridmatrix, Aktivierung, Migration sowie prokoagulante Aktivierung nach Kollagen-Kontakt. (B) Repräsentative Aufnahme von migrierenden humanen Thrombozyten mit oder ohne Kontakt zu Kollagenfasern mithilfe eines Zeiss LSM 880 Konfokal-Mikroskop. Immunfluoreszenzfärbung der Thrombozyten mit CD41 (weiß). Weiße Pfeilspitzen zeigen auf prokoagulante Thrombozyten mit PS-Expression (mC1) und Sekretion von Mikrovesikeln nach dem Erkennen von Kollagen. Die gestrichelte weiße Linie stellt die Kollagenfasern dar. Maßstab 10 µm.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

4.1.3.3 Live-Imaging

Um die Thrombozyten-Migration und PS-Exposition über die Zeit zu analysieren, wurde mit einem invertierten Olympus IX83 auf dem 40 ×/1.0 oder einem 100 ×/1.4 Öl-Immersionsobjektiv Zeitrafferimmunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Die Aufnahmen umfassten die Darstellung des Differential Interference Contrast (DIC)-, Phasenkontrast (PH)- und Epifluoreszenz-Kanals (5 - 20 s/Bild). Ein vorgeheizter Bühneninkubator (Tokai Hit) wurde verwendet, um physiologische Bedingungen (befeuertet, 37°C) nachzuahmen.

4.1.3.4 Thrombin-Umsatz

Isolierte murine oder humane Thrombozyten wurden wie oben beschrieben aktiviert und migrierten auf einer Kollagen/HSA/Fibrinogen-Matrix. Nach 15 Minuten Migration wurde das Medium durch eine Lösung ersetzt, welche 20 % PPP und ein fluoreszierendes Thrombin-Substrat (13,3 µM Endkonzentration, SensoLyte® 520 Thrombin Activity Assay Kit, Anaspec, #AS-72129) enthielt. Zusätzlich wurden zur Detektion prokoagulanter und nicht-prokoagulanter Thrombozyten Antikörper gegen CD41 oder CD42b und das C1-Multimer zu der Lösung hinzugegeben. Der Thrombin-Umsatz wurde durch konfokale Bildgebung (Zeiss LSM 880) bewertet. Thrombin-Positivität und prokoagulante Aktivierung wurden für mindestens 100 Thrombozyten von mindestens n = 2 einzelnen Mäusen beurteilt und mit Fiji ImageJ analysiert.

4.1.3.5 Pharmakologische Hemmung von Thrombozyten-Signalwegen und - Rezeptoren

Zur Untersuchung der an der prokoagulanten Aktivierung beteiligten Signalwege wurden Inhibitoren dem dritten und letzten Waschschritt hinzugefügt, nachdem die Thrombozyten an die jeweilige Beschichtung adhäriert hatten. Die Konzentrationen variierten je nach verwendetem Wirkstoff und sind in den entsprechenden Abbildungen und Legenden angegeben, wobei für alle Verbindungen verschiedene Konzentrationen zum Festlegen des idealen Wirkungsbereiches getestet wurden. In einigen Fällen (z. B. Behandlung mit Cyclosporin A) wurden die Thrombozyten 15 Minuten lang mit der jeweiligen Verbindung oder dem Antikörper inkubiert, bevor sie in die speziellen Flusskammern gegeben wurden. Bei der Hemmung von zwei Rezeptoren, wie beispielsweise GPIIbIIIa und GPVI, wurden gleiche Konzentrationen der jeweiligen Verbindungen verwendet.

4.1.3.6 Immunfluoreszenzfärbung von Thrombozyten

Für zusätzliche Immunfluoreszenzfärbungen von migrierenden Thrombozyten wurde nach 10-minütiger Fixierung mit primären und sekundären Antikörpern oder alternativ primär-fluoreszierenden Antikörpern in phosphatgepufferter Salzlösung (engl.: phosphate-buffered saline, PBS) mit 1 % bovinem Serum-Albumin (BSA) eine Stunde lang im Dunkeln gefärbt. Zwischen den primären und sekundären Antikörpern sowie vor der mikroskopischen Analyse wurden die Thrombozyten dreimal mit PBS (1 % BSA) gewaschen. Die Bildgebung erfolgte mit

einem Zeiss LSM 880 Konfokal-Mikroskop im Airyscan-Modus (40/1.3 und 63/1.3 Öl-Immersionsobjektiv).

4.1.4 Thrombozytenaktivierungs-Assay

Um verschiedene Aktivierungs-Phänotypen von Thrombozyten in Suspension zu analysieren, wurden isolierte humane oder murine Thrombozyten in modifiziertem Tyrodes-Puffer mit 1 mM Calciumchlorid gelöst und mit fluoreszierenden Antikörpern gegen Thrombozyten-Aktivierungsmarker wie unter anderem P-Selektin, aktiviertes GPIIbIIIa JonA bei murinen, bzw. Pac1 bei humanen Thrombozyten und PS inkubiert. Anschließend wurden die Thrombozyten durch Zugabe verschiedener Agonisten gegen den P2Y12-Rezeptor (ADP), PAR-Rezeptor (Thrombin), GPVI-Rezeptor (Convulxin, Kollagen) und TXA₂-Rezeptor (U46119) aktiviert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur oder 37°C inkubiert (Konzentrationen in den jeweiligen Abbildungen angegeben). Abschließend wurden die Thrombozyten für 10 Minuten im Dunkeln mit 1 % PFA fixiert und mithilfe eines BD LSRII Fortessa Durchflusszytometers nach dem Prinzip der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) gemessen. Die Analyse der Subpopulationen sowie die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) wurden mit FlowJo (v10) durchgeführt.

4.2 *In vivo* Untersuchungen

4.2.1 Verwendete Mauslinien

C57BL/6J (Stamm Nr.: 000664, bezeichnet als Bl6 oder Wildtyp/WT), PF4cre (Tiedt et al., 2007) und CypD^{f/f} (Ppiftm1Mmos/J, Stamm Nr.: 005737) Mäuse wurden vom The Jackson Laboratory erworben. Die TMEM16F^{f/f}-Linie wurde vom RIKEN BioResource Center (BRC) (Fujii et al., 2015; Suzuki et al., 2013) zur Verfügung gestellt. Die Mäuse wurden alle in der Tieranlage des Walter-Brendel-Zentrums des LMU-Klinikums gehalten und auf einen C57BL/6-Hintergrund zurückgekreuzt. Es wurden stets Tiere gleichen Geschlechts und Alters zufällig den verschiedenen Versuchsgruppen zugeordnet. Mäuse beider Geschlechter wurden für *in vitro* Studien und Schwanzblutungszeittests verwendet. Für die Modelle der (sub)akuten Lungenschädigung und intraperitonealen Sepsis wurden weibliche Mäuse verwendet. Sofern nicht anders angegeben, waren die Mäuse beim Eintritt in die Experimente 8 bis 14 Wochen alt. Für Experimente mit genetisch modifizierten Mäusen wurden Knockout- und Kontrolltiere nach Alter, Geschlecht und Gewicht gepaart. Mäuse der PF4cre-Linie dienten hierbei als Kontrollgruppe. Bei Experimenten mit LPS-induzierter Entzündungsreaktion wurde die klinische Symptomatik der Tiere regelmäßig anhand eines etablierten klinischen Überwachungsbogens (Sepsis-Score) bewertet.

Die Bewertung umfasste sowohl die äußere Beurteilung des individuellen Tieres (einschließlich Aktivität, Reaktion auf visuelle und akustische Reize sowie Körperhaltung) als auch die Analyse des Verhaltens im Kontext von Interaktionen mit Artgenossen und gezeigtem Sozialverhalten (Tabelle 2). Darüber hinaus wurde das Vorgehen bei Erreichen einer festgelegten Gesamtpunktzahl systematisch berücksichtigt (Tabelle 3). Alle an Mäusen durchgeföhrten Verfahren wurden durch das örtliche Tierschutzgesetz (Regierung von Oberbayern, München) genehmigt.

Parameter	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Allgemeines Erscheinungsbild	Fell glatt, glänzend und anliegend	Fell teilweise gesträubt	Fell großteils gesträubt	vollständige Pi-loarrektion, Maus erscheint geschwächt
Verhalten	normale Aktivität (Futter-, Wasseraufnahme, Klettern, Laufen)	aktiv, vermeidet Aufrichten im Käfig	Aktivität merklich herabgesetzt, Maus noch gehfähig	Aktivität stark beeinträchtigt, Bewegung nur nach manuellem Stimulus
Reaktion auf externe Stimuli	sofortige Reaktion auf akustischen oder manuellen Reiz (Berührung)	Reaktion auf akustischen Reiz vermindert, sofortige Reaktion auf manuellen Reiz (Berührung)	keine Reaktion auf akustischen Reiz, moderate Reaktion auf manuellen Reiz (Berührung)	keine Reaktion auf akustischen Reiz, verzögert auf manuellen Reiz (Berührung); bewegt sich wenige Schritte
Augen	vollständig geöffnet	nicht vollständig geöffnet, Sekretspuren möglich	Augen halb geschlossen, Sekretspuren möglich	Augen fast vollständig geschlossen, Sekretspuren möglich
Atemmuster/-frequenz	Atmung physiologisch	leicht verminderte Frequenz (nicht mit bloßem Auge quantifizierbar), kurze Perioden erschwerter Atmung	Frequenz moderat vermindert (mit bloßem Auge nur schwer zu quantifizieren), erschwerte Atmung, keine Schnappatmung	Frequenz stark vermindert (mit bloßem Auge leicht quantifizierbar), erschwerte Atmung, intertierende Schnappatmung

Tabelle 2: Kriterien zur Evaluierung der klinischen Symptomatik mit zugehöriger Punktbewertung

Score 0	Keine Belastung	Überprüfung der Überwachungshäufigkeit
Score 1	leichte bis mittlere Belastung	Verantwortliche Person/en informieren. Überwachungsfrequenz jede Stunde. Bei 3 oder mehr Symptomen der Kategorie 1 ist von einer mittleren Belastung auszugehen, Anweisungen „Score 2“ sind auszuführen.
Score 2	mittlere Belastung	Das Tier ist der verantwortlichen Person und dem Tierarzt vorzustellen, es sind ggf. Interventionen notwendig (z.B. Analgesie, s.c. Substitution von Flüssigkeit, Feuchtfutter). Überwachungsfrequenz alle 30 Minuten. Bei 3 oder mehr Symptomen der Kategorie 2 ist von einer schweren Belastung auszugehen, Anweisungen „Score 3“ sind auszuführen.
Score 3	schwere Belastung	Beachtung eines möglichst schmerzlosen Endpunkts; Versuchsabbruch.

Tabelle 3: Übersicht des Vorgehensmodells bei Erreichen spezifischer Endpunkte

4.2.2 Narkose

Im Rahmen von operativen Eingriffen oder Blutentnahmen wurde die Narkose der Mäuse durch das volatile Anästhetikum Isofluran eingeleitet, gefolgt von einer intraperitonealen (i.p.) Injektion von Medetomidin (0,5 mg/kg Körpergewicht [KG]), Midazolam (5 mg/kg KG) und Fentanyl (0,05 mg/kg KG). Für die physiologische Beurteilung der Anästhesietiefe wurden der Zehenschmerzreflex und das Atemmuster beurteilt. Eine ausreichende Körperkerntemperatur wurde durch Heizkissen sichergestellt. Die Aufrechterhaltung der Narkose wurde falls erforderlich durch wiederholte Injektionen von 50 % der Induktionsdosis sichergestellt.

4.2.3 Blutbild

Differentialblutbilder von EDTA-antikoaguliertem Vollblut wurden mit einem XN-V series cell counter (Sysmex) erstellt.

4.2.4 LPS-induzierte (sub)akute Lungenschädigung

Das murine Modell der (sub)akuten Lungenschädigung (engl.: acute lung injury, ALI) imitiert durch sterile Inflammation der Lunge das klinisch sehr relevante Krankheitsbild des akuten Lungenversagens (Nicolai, Schiebelbein, et al., 2020). Als entzündlicher Stimulus wurde narkotisierten Mäusen 20 µg LPS in 60 µl Natriumchlorid (NaCl) intranasal verabreicht, welcher sich durch eine dreifache Schwenkbewegung der Tiere in das pulmonale Gewebe ausbereitete. Die Anästhesie wurde sofort antagonisiert und die Tiere wurden ständig nach einem Sepsis-Score überwacht.

In einigen Experimenten erhielten die Mäuse Antikoagulantien oder Thrombozytenaggregationshemmer durch intravenöse (i.v.) oder subkutane (s.c.) Injektion. Die hierbei verwendeten Konzentrationen aller Inhibitoren entsprachen den in der klinischen Praxis etablierten Dosierungsschemata oder überstiegen diese sogar in einigen Fällen. Der GPIIbIIIa-Inhibitor Tirofiban wurde mit 0,5 mg/kg KG, der Faktor Xa-Inhibitor Rivaroxaban mit 3 mg/kg KG und der Faktor IIa-Inhibitor Argatroban mit 5 mg/kg KG dosiert. Bei Substanzen mit kurzer Halbwertszeit wurden die Injektionen 4 und 8 Stunden nach LPS-Applikation wiederholt. Frühere Studien haben gezeigt, dass das Maximum der pulmonalen Infiltration angeborener Immunzellen innerhalb der ersten 6 bis 24 Stunden nach Induktion des lokalen pulmonalen Entzündungsreizes auftritt (Bozinovski et al., 2004; Domscheit et al., 2020; Grommes et al., 2012; Matute-Bello et al., 2011). Der Zeitpunkt der Verabreichung und somit der Wirkung der angegebenen Inhibitoren wurde so gewählt, dass sie mit diesem Zeitverlauf übereinstimmen. Speziell für Rivaroxaban, das standardmäßig bei Patienten nach thromboembolischen Ereignissen als Antikoagulans verwendet wird (Bauersachs et al., 2010), wurde ein zusätzlicher Dosierungszeitpunkt nach 8 Stunden festgelegt, um sicherzustellen, dass die durch FXa vermittelte Hämostase effektiv gehemmt wird (Guenther et al., 2013; Swieton et al., 2021). Die beobachteten starken Phänotypen der Antikoagulation (Kapitel 5.2.4) durch intravenöse Applikation bestätigten eine ausreichende therapeutische Hemmung, sodass auf plasmatische Tests zur Überprüfung der Antikoagulans-Effizienz, wie beispielsweise die Anti-FXa-Aktivität, verzichtet wurde. Argatroban und Tirofiban, die üblicherweise als Einzeldosis oder kontinuierliche Infusionen bei Patienten mit Heparin-induzierter Thrombozytopenie Typ II (HIT II) oder bei Hochrisiko-Koronarinterventionen mit hoher

Thrombuslast eingesetzt werden, haben eine ungefähre Serumhalbwertszeit von 50 bzw. 120 Minuten (Collet et al., 2021; Neumann et al., 2001). Die Anpassung der individuellen Injektionsdosis sowie des Dosierungsintervalls nach 0, 4 und 8 Stunden war ausreichend, um die Zielstrukturen, welche auch bei Mäusen exprimiert werden (Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020), effektiv zu hemmen. Die Berechnungen stützten sich hierbei auf frühere Literaturberichte, die niedrigere oder ähnliche Dosierungsschemata und Intervalle verwendet haben (Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020; Rayes et al., 2018).

24 Stunden nach intranasaler LPS-Applikation wurden den erneut narkotisierten Mäusen Blut über den retroorbitalen Venenplexus oder der V. facialis („fragglen“) entnommen. Dieses wurde für durchflusszytometrische Analysen (Gating-Strategie, Abbildung 8A) und für die Isolation von Plasma verwendet. Hierfür wurde das mit ACD oder EDTA antikoagulierte Vollblut bei 2000 g für 20 min bei 4°C zentrifugiert und anschließend der plasmahaltige Überstand abpipettiert und auf Trockeneis eingefroren. Die Plasmaproben wurden bei - 80 °C gelagert. Anschließend wurden die Mäuse einer bronchoalveolären Lavage (BAL) unterzogen, um die pulmonale Rekrutierung von Immunzellen und Thrombozyten sowie mögliche Blutungen zu analysieren. Die Tiere wurden unter Schonung der Trachea und der Halsgefäße durch zervikale Dislokation terminiert. Als nächster Schritt folgte die vorsichtige mikrochirurgische Präparation und Freilegung der Trachea mit Punktions- und Spülung von 2 x 1 ml 1 % BSA und 2 mM EDTA für die Gewinnung des BAL-Fluids. Um systemische Fehler zu vermeiden, wurden die Tiere immer in Gruppen operiert, welche jeweils ein Tier der Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe enthielten. Anschließend wurden makroskopische Aufnahmen des BAL-Fluids gemacht und mit Antikörpern für durchflusszytometrische Analysen gefärbt (Gating-Strategie, Abbildung 8B). BAL-Fluid wurde nur in die Analyse einzbezogen, wenn mindestens die Hälfte des intratracheal applizierten Volumens zurückgewonnen wurde (über 1 ml). Bei einigen Tieren wurden anstelle des BAL-Fluids die Lungen für histopathologische Färbungen und Analysen entnommen (Kapitel 4.2.11).

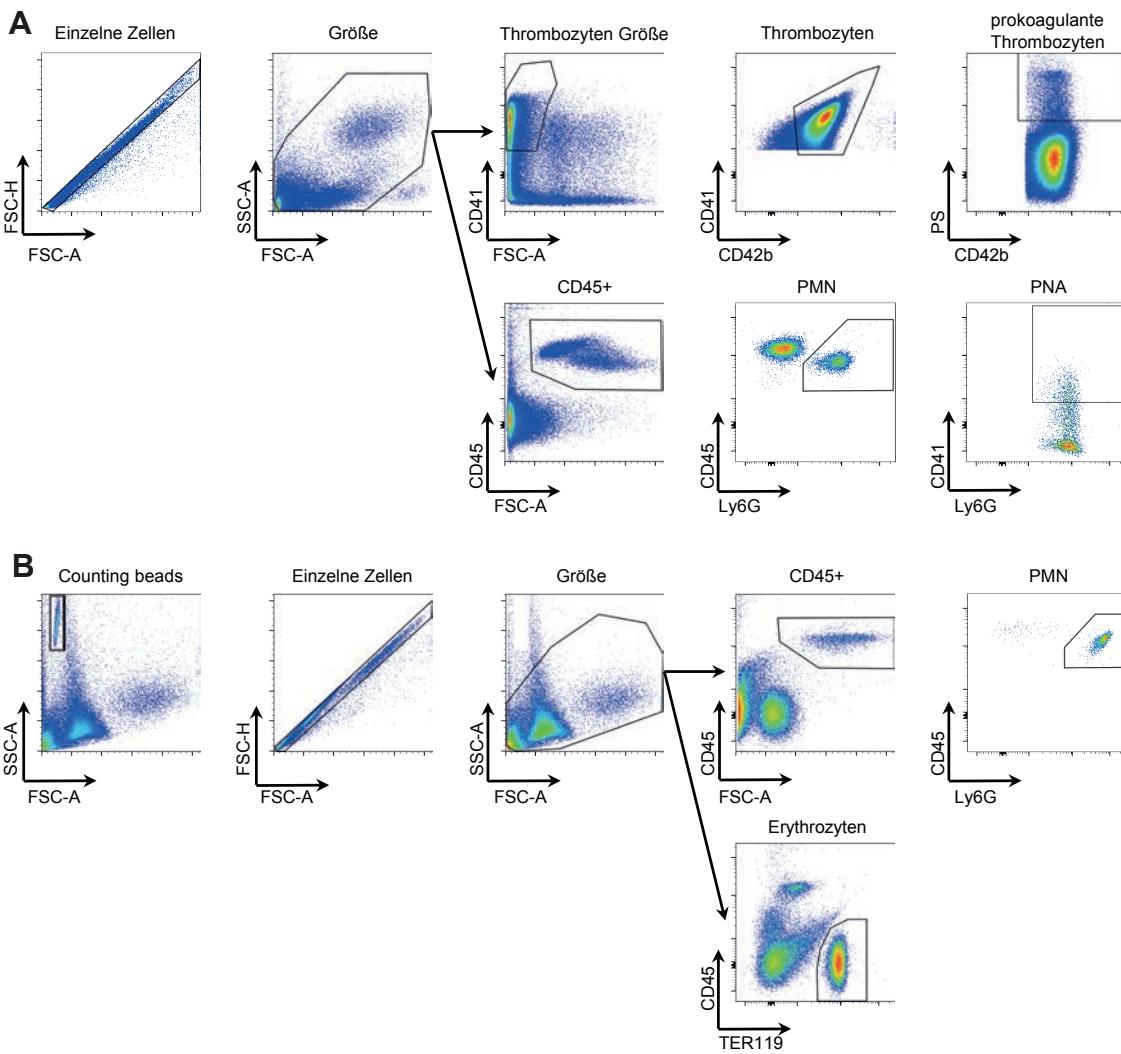


Abbildung 8: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse von peripherem Vollblut und BAL-Fluid

(A) Repräsentative Streudiagramme von peripherem Vollblut zur Identifikation von prokoagulanten Thrombozyten, polymorph-kernigen Neutrophilen (PMN) sowie Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregaten (PNA). (B) Repräsentative Streudiagramme von BAL-Fluid zur Identifikation von PMNs und Erythrozyten. MFIs wurden nach dem Gating für die jeweilige Population gemessen.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

4.2.5 LPS-induzierte sterile Peritonitis

Um eine systemische Entzündungsreaktion mit nachfolgender Entwicklung einer Sepsis auszulösen, wurde bei narkotisierten Mäusen 1 µg/g Körpergewicht LPS intraperitoneal verabreicht und ständig anhand eines definierten Sepsis-Scores (Kapitel 4.2.1) überwacht. Nach 4-6 Stunden wurde der erneut narkotisierten Maus Blut über den retroorbitalen Venenplexus oder der V. facialis („fragglen“) entnommen und einer Differential-Blutbild mittels automatisierter Zellzählung

erstellt. Nach Terminierung der Mäuse mittels zervikaler Dislokation wurden die Lunge und das Mesenterium für histologische Untersuchungen mikrochirurgisch entnommen. Insbesondere die Quantifizierung und Lokalisation von Thrombozyten (Färbung mittels CD42b) und die Infiltration von Immunzellen (Färbung von Neutrophilen mittels Ly6G) wurden in der Analyse berücksichtigt. Durch spezifische Färbung von PS wurde zudem die lokale Akkumulation prokoagulanter Thrombozyten im entzündlich veränderten Lungengewebe sowie am Ort der Schädigung (Mesenterium) analysiert.

4.2.6 Schwanzblutungszeittest

Mäuse wurden wie oben beschrieben anästhesiert. Anschließend wurden 5 mm der distalen Schwanzspitze mit einer Präzisionsschere (MST) reseziert und der Schwanz sofort in 40 ml PBS bei RT gelegt. Die Blutungs- und Nachblutungszeiten wurden für 20 Minuten dokumentiert. Die Blutung wurde weiter quantifiziert, indem der Hämoglobingehalt mit einem automatischen Zellzähler gemessen wurde.

4.2.7 GPVI-Depletion

Zur thrombozytenspezifischen Depletion und Abspaltung des Kollagenrezeptors GPVI wurden Mäuse mit 100 µg des Anti-GPVI-Antikörpers (Klon JAQ1, emfret) intraperitoneal injiziert, wobei ein Isotyp-Antikörper als Kontrolle diente. Erst nach 72 Stunden wurden weitere Experimente initiiert, um eine ausreichende GPVI-Depletion sicherzustellen und die Normalisierung der zuvor beschriebenen transienten Thrombozytopenie abzuwarten (Schulte et al., 2003). Die Effektivität der GPVI-Depletion wurde mithilfe durchflusszytometrischer Analysen der Expression des GPVI-Oberflächenrezeptors unter physiologischen Bedingungen sowie nach Stimulation mit den GPVI-spezifischen Agonisten Kollagen und Convulxin im Thrombozytenaktivierungs-Assay (Kapitel 4.1.4) validiert. Nur Tiere mit ausreichender GPVI-Depletion wurden in die jeweiligen Experimente und Analysen eingeschlossen.

4.2.8 Depletion von Thrombozyten

Für die Depletion von Thrombozyten wurden Bl6-Mäuse intravenös (i.v.) mit 100 µg eines Anti-Gp1b-Antikörpers (R300, emfret) unmittelbar vor der Durchführung

von Experimenten zur (sub)akuten Lungenschädigung injiziert. Ein nicht-immunogener Antikörpermix (C301, emfret) wurde hierbei als Isotyp-Kontrolle verwendet.

4.2.9 Multiplex-Zytokin-Messungen

Im Rahmen der Etablierung des Modells der (sub)akuten Lungenschädigung wurden pro- und antiinflammatorische Zytokin-Spiegel im murinen Plasma und im BAL-Fluid mit dem LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex, Biolegend, #740446) untersucht, welches auf dem Prinzip eines Sandwich-Immunoassays basiert.

Die Plasma- und BAL-Proben wurden aufgetaut, im Verhältnis 1:2 mit Assay-Puffer (LEGENDplex™) verdünnt und in eine 96-Well-V-Platte gegeben. Parallel wurde eine Standardverdünnungsreihe im Verhältnis 1:4 erstellt. In jedes Well wurden 25 µl einer Bead-Suspension hinzugefügt, welche fluoreszierende Partikel gebunden an spezifische Antikörper zur Detektion von 13 verschiedenen Zytokinen enthielt. Diese werden basierend auf ihrer Größe und der variierenden APC-Fluoreszenzintensität in zwei Hauptgruppen und 13 Untergruppen kategorisiert. Die Proben wurden lichtgeschützt auf einem Thermomixer bei RT und 800 Umdrehungen pro Minute für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde für 5 Minuten bei 700 g zentrifugiert, der Überstand durch manuelles Auskippen entfernt und das resultierende Pellet mit 200 µl Waschpuffer (LEGENDplex™) resuspendiert und der Waschschnitt ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden 25 µl eines biotinylierten Detektionsantikörpers zugegeben, welcher spezifisch an die antikörperbeladenen Zytokine bindet und sogenannte Sandwich-Komplexe bildet und für eine weitere Stunde inkubiert. Weiterhin wurden 25 µl einer Streptavidin-PE-Lösung hinzugefügt, die an die biotinylierten Detektionsantikörper bindet, wobei die Fluoreszenzintensität mit der enthaltenen Zytokin-Konzentration korreliert. Die Proben wurden nochmals für 30 Minuten inkubiert und nach Zentrifugation in 150 µl Waschpuffer resuspendiert. Die Messung der Proben erfolgte mittels eines BD LSRII Fortessa Durchflusszytometers.

4.2.10 Antikörper und fluoreszenzgekoppelte Proteine für Durchflusszytometrie und Histopathologie

Die verwendeten Antikörper und fluoreszierenden Proteine oder Peptide sind in Tabelle 1 aufgeführt. Für durchflusszytometrische Analysen wurden die Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Sekundärantikörper für Histopathologie und Immunfluoreszenzfärbungen wurden in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Zur Validierung neuer Antikörper wurden Isotyp-Kontrollfärbungen durchgeführt, um die Spezifität der Färbung sicherzustellen. Zur Darstellung von PS wurde neben dem fluoreszenzgekoppelten Annexin V (AnnV) zusätzlich ein neuartiges Calcium-unabhängiges Färbereagenz verwendet, welches aus der biotinylierten C1-Domäne des murinen Laktadherins besteht und unter Verwendung von Streptavidin multimerisiert wurde. Dieses C1-Multimer (mC1, kurz C1) wurde von Kollaborationspartnern validiert (Rausch et al., 2021) und wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Detektion prokoagulanter Thrombozyten *in vitro* und *in vivo* verwendet. Das mC1 ist kommerziell über Biolegend als ApotrackerTetra-Reagenzien erhältlich. Für die Detektion der Caspase 3/7-Aktivierung in prokoagulanten Thrombozyten wurde das CellEvent-Kit (ThermoFisher, #C10423) mit einer Endkonzentration 20 µM verwendet.

4.2.11 Histopathologische Färbung

Für Immunfluoreszenz- und histopathologische Färbungen wurden die Organe zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur in 4 % PFA fixiert, über Nacht bei 4°C in 30 % Saccharose dehydriert, kryeingebettet und entweder bei -80°C für Langzeitlagerung oder bei -20°C für sofortige Verarbeitung gelagert. Die Organe wurden mit einem Kryotom in 10 bis 12 µm dicke Querschnitte geschnitten und auf Objektträger übertragen. Nach Fixierung mit 4 % methylenfreiem PFA in PBS für 15 Minuten bei RT wurden die Gewebeabschnitte dreimal mit dem Emulgator 0,1 % Tween (TWEEN® 20, Sigmaaldrich, #P9416) in PBS für 5 Minuten auf einem Wipp-Schüttler gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit 10 % Ziegenserum, 0,5 % Saponin und 1 % BSA in PBS für 30 Minuten bei RT permeabilisiert und blockiert.

Für die Darstellung von Erythrozyten, Neutrophilen und Thrombozyten wurden primärfluoreszierende Antikörper gegen TER119, Ly6G und CD42b verwendet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Spezifische Färbungen von Fibrinogen und PS

wurden mithilfe von fluoreszierenden Sekundärantikörpern gegen die Spezies des Primärantikörpers erzielt, welche nach erneutem dreifachen Waschschritt mit BPS-Tween für eine Stunde bei RT gefärbt wurden. Zusätzlich wurde in diesem Schritt der Hoechst-Farbstoff in einer Konzentration von 1:1000 hinzugefügt, um jegliche enthaltenen Zellkerne darzustellen. Nach einem letzten Waschschritt wurden die Objektträger mit einem Deckglas abgedeckt und durch ein Fluoreszenz-Einschlussmedium (Fluorescence Mounting Medium, Agilent Dako, # S302380-2) ausgehärtet, welches die Fluorophore während der Mikroskopie vor Ausbleichen schützte. Die gefärbten Proben wurden im Airyscan Super Resolution (SR) Modus (20x/0,8 Objektiv) an einem Zeiss LSM 880 Konfokal-Mikroskop bei 0,6-facher Vergrößerung abgebildet.

4.3 Datenerfassung

Daten aus *in vivo* und *in vitro* Experimenten wurden mit Fiji ImageJ (Schindelin et al., 2012) gesammelt.

4.3.1 *In vitro* Migrationsassay

Migrierende Thrombozyten wurden mit dem Fiji „Manual Tracking“ Plugin verfolgt und hinsichtlich Bewegungsrichtung, Geschwindigkeit und zurückgelegter Entfernung mit dem Chemotaxis Tool (Ibidi) Plugin analysiert.

Ausbreitete Thrombozyten (migrierend und nicht-migrierend) wurden nach Fixierung entweder in dem DIC/PH-Kanal oder CD41-Fluoreszenzkanal manuell gezählt. Thrombozyten wurden als migrierend definiert, wenn sie sich um mindestens einen Zelldurchmesser bewegt hatten. Beurteilt wurde dies durch die Migrationsspuren im Fibrinogen-Kanal. Der Pseudonukleus eines migrierenden Thrombozyten diente hierbei als morphologischer Anhaltspunkt für das Verfolgen von sich bewegenden Thrombozyten. Der Anteil wandernder Thrombozyten wurde berechnet, indem die Anzahl migrierender Thrombozyten durch die Gesamtzahl der ausbreitenden Thrombozyten geteilt wurde.

Prokoagulante Thrombozyten wurden als solche definiert, die morphologische Veränderungen (Einnehmen der typischen Ballonform, Freisetzung von Mikrovesikeln) durchgemacht hatten und PS exprimierten, wie durch Annexin V oder C1-Färbung detektiert (weiße Pfeilspitze, Abbildung 7B).

Die zurückgelegte Migrationsstrecke wurde als Anteil der abgetragenen Fibrinogen-Oberfläche an der Gesamtoberfläche des Bildausschnittes definiert. Zur Berechnung dieser Strecke wurde fluoreszierendes Fibrinogen als Substrat der Hybridmatrix von Flusskammern des Migrationsassays verwendet.

Mit einem benutzerdefinierten Fiji-Makro wurde im jeweiligen Fluoreszenzkanal die Fibrinogen-Oberfläche unter Verwendung der Gaußschen Weichzeichnung und automatisierter Schwellenwertsetzung in eine zweidimensionale binäre Maske konvertiert (Abbildung 9A-B). Durch Analysen der schwarz markierten Partikel, welche dem Fibrinogen-negativen Bereich entsprechen, wurde die kumulative Migrationsstrecke aller abgebildeten Thrombozyten berechnet und durch den bekannten Flächeninhalt des Bildausschnittes in [μm^2] angegeben.

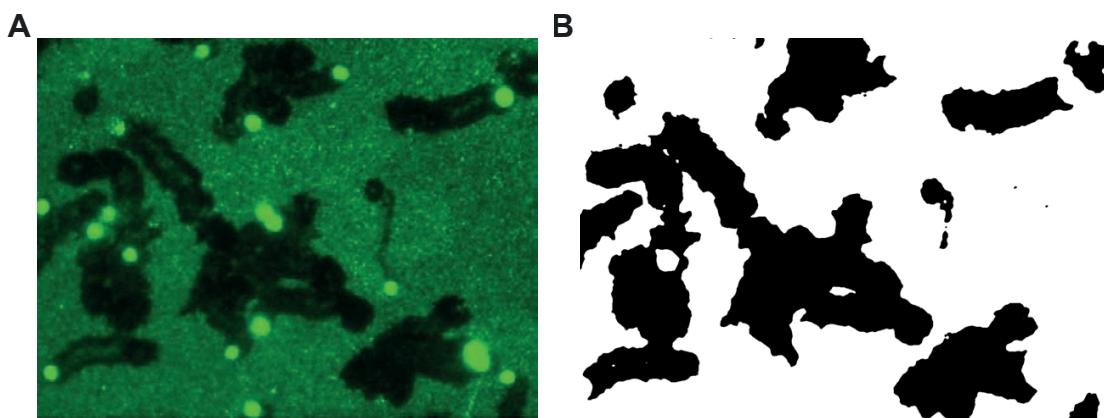


Abbildung 9: Analyse und Quantifizierung der zurückgelegten Migrationsstrecke

(A) Repräsentative Aufnahme des Fibrinogen-Kanals eines Migrationsassays mittels Olympus IX83 Epifluoreszenz-Mikroskop. (B) Resultierende binäre schwarz-weiß Maske nach Konvertierung mittels benutzerdefinierten Fiji-Makro.

4.3.2 Formanalyse von Thrombozyten

Es wurde eine unvoreingenommene, systematische Analyse der Thrombozytentypen durchgeführt, um morphologische Variationen von migrierenden Thrombozyten und den Phänotyp der prokoagulanten Aktivierung zu beschreiben. Thrombozytentypen wurden hierfür als polygonale Umrisslinien dargestellt, indem aus DIC-Aufnahmen die Thrombozyten in Fiji manuell umrandet, maskiert und in binäre Bilder umgewandelt wurden. Mithilfe des Fiji-Formbeschreibers und des Celltools (Pincus & Theriot, 2007) wurden die Fläche, Rundheit und Filopodium-Bildung einzelner Thrombozyten analysiert.

4.3.3 Durchflusszytometrie

In durchflusszytometrischen Experimenten wurden sogenannte „Counting Beads“ verwendet, um die Zellkonzentrationen im peripheren Blut und aus BAL-Proben pro Mikroliter anzugeben. Die in einigen Abbildungen und Legenden verwendete relative MFI bezieht sich auf die durchschnittlichen MFI-Werte aller Kontrollproben, welche zur Normalisierung auf den absoluten Wert 1 gesetzt wurden.

Bei Multiplex Zytokin-Messungen wurden die resultierenden MFIs anhand der frei zugänglichen LEGENDplex™ Data Analysis Software Suite (www.biolegend.com/en-us/legendplex) analysiert, um ungefähre Zytokin-Konzentrationen zu ermitteln.

4.3.4 Histopathologische Analysen

Zur Vermeidung systemischer Fehler und Sicherstellung einer objektiven Messung wurden bei histopathologischen Aufnahmen von Organen mittels Konfokal-Mikroskopie zufällige Bereiche durch Fokussierung von Zellkernen im Hoechst-Kanal erfasst, ohne vorherige Bewertung von Blutungen oder Neutrophilen-Infiltration vorzunehmen.

Die Rekrutierung von Neutrophilen und Thrombozyten wurde mithilfe eines benutzerdefinierten Makros in Fiji ImageJ bewertet. Hierfür wurde im untersuchten Fluoreszenzkanal der Kontrast verstärkt, eine gaußsche Weichzeichnung angewendet und ein automatisierter Schwellenwert gesetzt, um ein zweidimensionales binäres Bild zu kreieren. Nach Applikation des Wasserscheidenalgorithmus wurden die Partikel des Bildausschnittes analysiert. Um die untersuchten Zellpopulationen zu identifizieren, wurden nur spezifische Größenbereiche in die Analyse eingezogen, welche dem physiologischen Durchmesser für Neutrophilen (ca. 12-15 µm) und Thrombozyten (ca. 2-3 µm) entspricht. Die Anzahl der gemessenen Thrombozyten und Neutrophilen wurde auf die bekannte gesamte Lungenoberfläche des analysierten Bildausschnitts normalisiert und in [mm² x 10³] Lunge angegeben. In einigen Fällen wurden die infiltrierenden Neutrophilen pro Bildfeld (engl.: field of view, FOV) oder als Anteil der Ly6G-positiven Fläche an der gesamten Lungenfläche in den Abbildungen und Legenden dargestellt.

Wenn Thrombozyten direkten Kontakt zu Ly6G-positiven Neutrophilen zeigten, wurden sie als PNAs klassifiziert und pro FOV verglichen. Prokoagulante

Thrombozyten wurden als CD42b-positive, ballonartige Formen definiert, die eine ähnliche Größe wie normale Thrombozyten aufwiesen und positiv für PS waren. Angegeben wurden sie als Anteil aller analysierten Thrombozyten eines Bildausschnitts. Thrombozyten-assoziierte Fibrin(ogen)-Ablagerungen wurden als Überlappung des Fibrin(ogen)-Kanals mit CD42b-positiven Bereichen definiert und in [μm^2] angegeben. Prokoagulante Thrombozyten wurden als Fibrinogen-positiv gezählt, wenn eine zusätzliche Überlappung mit den Fibrinogen-Kanälen vorlag.

Pulmonale bzw. alveolare Blutungen wurden als extravaskuläre, TER119-positive Bereiche definiert. Für die Analyse wurden intravaskuläre Erythrozyten durch manuelles Ausschneiden der Blutgefäße aus jeder Lungenübersichtsaufnahme ausgeschlossen. Die TER119-positive Fläche wurde mithilfe eines Makros für den spezifischen Größenbereich von Erythrozyten (ca. 6–8 μm) gemessen und als Anteil der Gesamtfläche abzüglich der Gefäßfläche angegeben.

4.4 Datenvizualisierung

Die einzelnen Graphen wurden mit Prism v9 (Graphpad) erstellt und die Abbildungen mit Illustrator 2024 (Adobe) generiert. Experimentelle Schemata und grafische Abbildungen wurden mit BioRender (www.biorender.com) entworfen.

4.5 Statistische Analysen

Die Daten wurden mit Prism v9 (Graphpad), Excel v16 (Microsoft) und FlowJo v10 (BD) analysiert und als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

In ausgewählten Grafiken werden die Daten als SuperPlots visualisiert, wobei die einzelnen Punkte die gemessenen Einzelwerte der biologischen Replikate repräsentieren und die Fehlerbalken die Standardabweichung des Mittelwerts anzeigen. Sofern nicht anders angegeben, umfassen alle dargestellten Daten aus Bildgebungsexperimenten mindestens drei biologischen Replikaten, mit mindestens 5 bis 6 zufällig aufgenommenen einzelnen Bildern. Repräsentative Bilder oder Durchfluszytometrie-Plots wurden entsprechend dem Mittelwert des jeweiligen Datensatzes ausgewählt.

Die Schätzung der Probengrößen für Tierexperimente erfolgte anhand von Leistungskalkulationen, die bei der ethischen Genehmigung der geplanten Experimente durchgeführt wurden. Diese wurden nach dem 3R-Prinzip von

Tierversuchen zur vollständigen Vermeidung (engl.: Replacement) sowie zur Beschränkung der Zahl der Tiere (engl.: Reduction) und ihrer Leiden (engl.: Refinement) auf das unerlässliche Maß umgesetzt. Hierbei wurden kleine Stichprobengrößen verwendet, wenn große Effekte zu erwarten waren. Trotz der kleinen Stichprobengröße von $n=3 - 4$ pro Versuchsgruppe, waren die beobachteten Effekte deutlich genug, um signifikante Unterschiede zu zeigen. In experimentellen Ansätzen, bei denen kleine phänotypische Unterschiede erwartet wurden, oder wenn frühere Erfahrungen mit dem untersuchten Modell eine große interindividuelle Variabilität gezeigt hatten (z.B. Experimente zur Blutungszeit), wurden die Stichprobengrößen erhöht. Alle Versuchsgruppen wurden entsprechend dem Alter und Geschlecht der jeweiligen Mauslinien abgeglichen.

Statistische Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden unter Verwendung von t-Tests und Varianzanalysen (ANOVA-Test) bewertet, wie in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. In Experimenten mit ungleichen Stichprobengrößen zwischen den Gruppen (z. B. aufgrund des Todes von Tieren in einer Versuchsgruppe) wurde die Normalverteilung der erfassten Daten vor der weiteren statistischen Auswertung mittels Shapiro-Wilk-Tests sichergestellt. Experimente mit mehr als zwei Gruppen wurden mit einseitigem ANOVA-Test und Post-Hoc Holm-Šídáks Mehrfachvergleichstest im Vergleich zu Kontrollgruppen getestet. Bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen am selben biologischen Replikat wurden gepaarte t-Tests verwendet. In allen anderen Fällen wurden ungepaarte t-Tests durchgeführt. Alle t-Tests waren zweiseitig. Bei allen statistischen Tests wurde ein p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant angesehen. P-Werte wurden durch Sternchen wie folgt gekennzeichnet: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,005$, **** $<0,001$, ns = nicht signifikant.

5. Ergebnisse

5.1 *In vitro* Ergebnisse

5.1.1 Validierung der funktionellen Eigenschaften von prokoagulanten Thrombozyten

5.1.1.1 Detektion der Expression von Phosphatidylserin

Die Fähigkeit prokoagulanter Thrombozyten, Phosphatidylserin (PS) auf ihrer Oberfläche zu exprimieren, ist nicht nur ein funktionaler Schlüsselfaktor für die Bindung von Gerinnungsfaktoren, sondern dient auch als eindeutiges Erkennungsmerkmal dieser Subpopulation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Agbani & Poole, 2017). Kürzlich wurde die Entwicklung einer neuartigen, auf Laktadherin basierenden Reagenz (mC1) zur Detektion von PS beschrieben (Rausch et al., 2021). Um die Spezifität und Sensitivität des mC1 in der Darstellung von prokoagulanten Thrombozyten zu validieren, wurden verschiedene *in vitro* Assays durchgeführt.

Bei Migrationsexperimenten detektierten das herkömmlich verwendete Annexin V und das neuartige mC1 zuverlässig alle prokoagulanten Thrombozyten und zeigten nahezu vollständige Überlappung der PS-Expression in den jeweiligen Fluoreszenzkanälen (Abbildung 10A-B). Zusätzlich wurde eine Aktivierungsreihe mit isolierten Thrombozyten durchgeführt, die zeigte, dass sowohl mC1 als auch Annexin V prokoagulante Thrombozyten nach Stimulation mit den Agonisten Thrombin und Convulxin detektieren können. Dabei war mC1 bereits bei niedrigeren Konzentrationen empfindlicher und präziser in der Detektion als Annexin V (Abbildung 10C). Die Bildgebungsbefunde wurden durch eine starke positive Korrelation der mC1- und Annexin V-MFI-Werte nach dualer Agonisten-Stimulation in einem linearen Regressionsmodell bestätigt (Abbildung 10D). Die Menge der PS-Expression kann je nach Inkubationszeit mit den Agonisten variieren. Um den optimalen Zeitpunkt für die PS-Messung in zukünftigen Analysen mittels Aktivierungs-Assay zu bestimmen, wurden zusätzliche Zeitreihenexperimente durchgeführt. Diese zeigten, dass nach 30 Minuten Inkubation keine signifikante Zunahme der PS-Exposition mehr festzustellen ist (Abbildung 10E).

Zusammenfassend können prokoagulante Thrombozyten *in vitro* entweder mithilfe von Annexin V oder alternativ durch C1 spezifisch identifiziert werden.

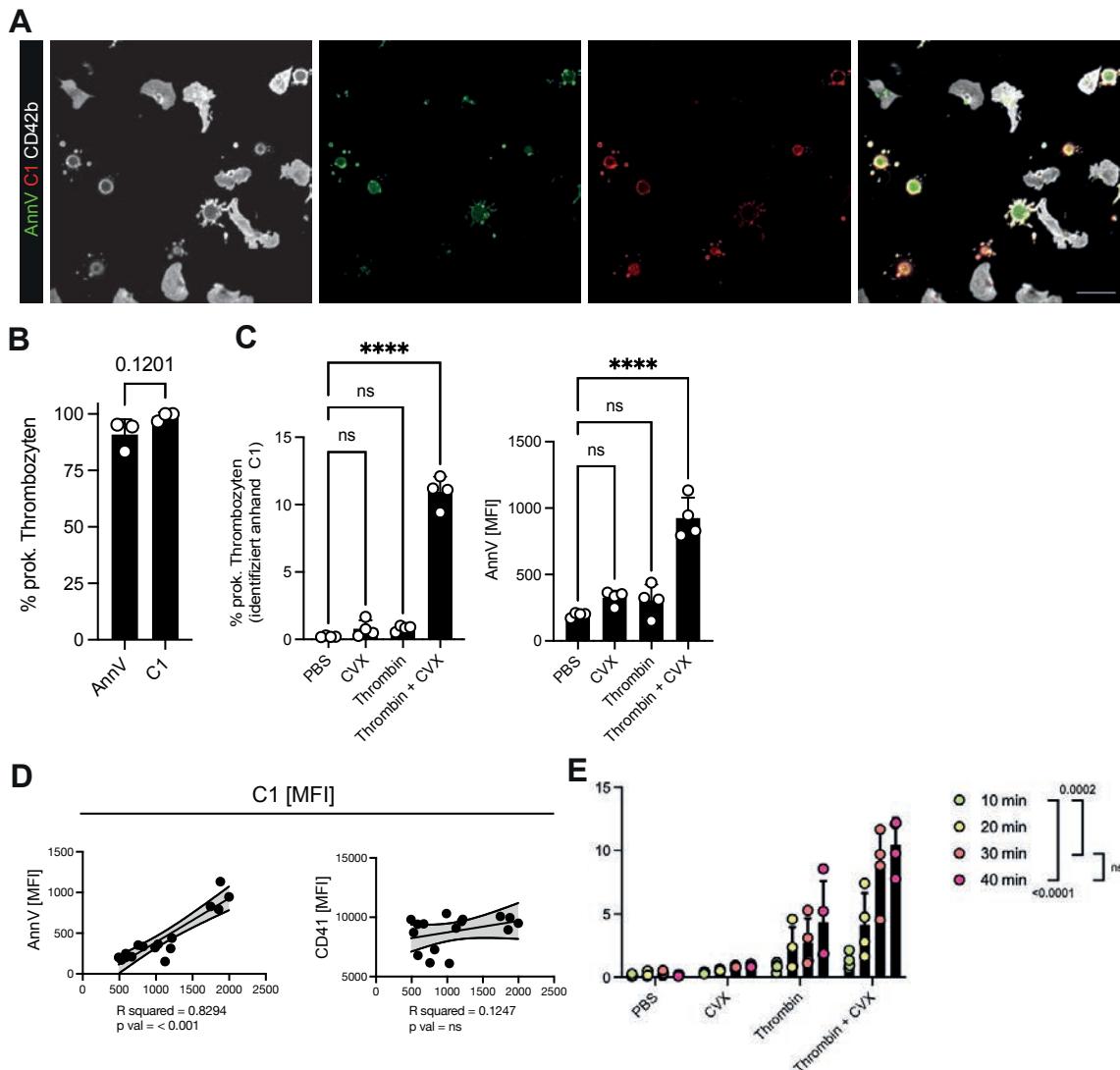


Abbildung 10: C1 detektiert spezifisch prokoagulante Thrombozyten *in vitro*

(A) Repräsentative konfokale Aufnahme migrierender humaner Thrombozyten, gefärbt mit einem Antikörper gegen CD42b (weiß) und PS (C1: rot, Annexin V: grün). Maßstab 10 µm. (B) Quantifizierung der PS-positiven prokoagulanten (prok.) Thrombozyten durch C1 und Annexin V, n = 3. T-Test, gepaart, zweiseitig. (C) Quantifizierung des Prozentsatzes prokoagulanter humaner Thrombozyten identifiziert mit C1 und der Annexin V-MFI nach Stimulation mittels angegebenen Agonisten. Einseitiger ANOVA mit Post-Hoc-Test. (D) Korrelation der C1-MFI mit Annexin V-MFI und CD41-MFI humaner Thrombozyten aus dem gleichen Aktivierungsexperiment. Der P-Wert der linearen Regressionsanalyse zeigte eine signifikante Abweichung von Null. (E) Relative Quantifizierung prokoagulanter humaner Thrombozyten, die mit den angegebenen Agonisten für 10, 20, 30 oder 40 Minuten inkubiert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigen ANOVA mit Post-Hoc-Test.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

5.1.1.2 Vermehrte Bindung von Gerinnungsfaktoren auf der Oberfläche

Ein wesentlicher Mechanismus der gerinnungsfördernden Funktion prokoagulanter Thrombozyten besteht in der Bildung des Prothrombinase-Komplexes auf ihrer Oberfläche, welcher lokales Thrombin bindet. In der Endstrecke der sekundären Hämostase führt dies zur lokalen Generierung von Fibrin(ogen), welches zur Stabilisierung des Thrombus durch Quervernetzung beiträgt (Agbani & Poole, 2017; van der Meijden & Heemskerk, 2019).

Um zu bestätigen, dass die prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten die funktionelle Bindungskapazität von Gerinnungsfaktoren erhöht, wurden verschiedene *in vitro* Assays etabliert. Zur Visualisierung des Thrombin-Umsatzes prokoagulant aktivierter Thrombozyten wurden migrierende Wildtyp-Thrombozyten mit Plättchen-armem Plasma (PPP) als Quelle für exogenes Thrombin inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe einer fluoreszierenden Sonde, die spezifisch den Thrombin-Umsatz anzeigen sollte. Tatsächlich färbten sich ausschließlich prokoagulante Thrombozyten positiv für Thrombin (Abbildung 11A).

Im Rahmen eines Aktivierungs-Assays wurde das Verhalten prokoagulanter Thrombozyten gegenüber löslichem Fibrinogen untersucht. Isolierte Thrombozyten zeigten nur nach prokoagulanter Simulation mittels Thrombin und Convulxin eine erhöhte Bindungskapazität von Fibrin(ogen) auf ihrer Oberfläche (Abbildung 11B). Zusätzlich wurde die Herkunft lokaler Fibrin(ogen)-Ablagerungen in weiteren Migrationsexperimenten untersucht. Dabei wurde bei der Herstellung der Hybridmatrix exogenes Fibrinogen durch die Zugabe von isoliertem AF488-konjugiertem Fibrinogen visualisiert und das Gesamt-Fibrinogen nachträglich mittels AF649-markierten monoklonalen Antikörper gefärbt. Endogenes Fibrinogen wurde berechnet, indem die AF488-positive Fläche von der AF649-positiven Fläche subtrahiert wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine nahezu vollständige Überlappung zwischen beiden Kanälen vorlag und keine signifikante endogene Fibrin(ogen)-Sekretion um migrierende oder prokoagulante Thrombozyten beobachtet wurde (Abbildung 11C). Dies deutet darauf hin, dass die intrinsische Sekretion von Fibrin(ogen)-haltigen α -Granula, welche im Rahmen der prokoagulanten Aktivierung freigesetzt werden, nicht wesentlich zur Fibrin(ogen)-Ablagerung *in vitro* beitragen und aus anderen Quellen stammen muss. Die konfokale Bildgebung einzelner prokoagulanter Thrombozyten zeigte endogenes AF488-negatives Fibrin(ogen) in direkter Nähe der Zellmembran, was mit

früheren Beschreibungen von "coated" Thrombozyten (van der Meijden & Heemskerk, 2019) übereinstimmt (Abbildung 11C).

Hiermit konnte mechanistisch belegt werden, dass PS-positive Thrombozyten *in vitro* prokoagulante Funktionen durch vermehrte Bindung von Gerinnungsfaktoren auf ihrer Oberfläche einnehmen.

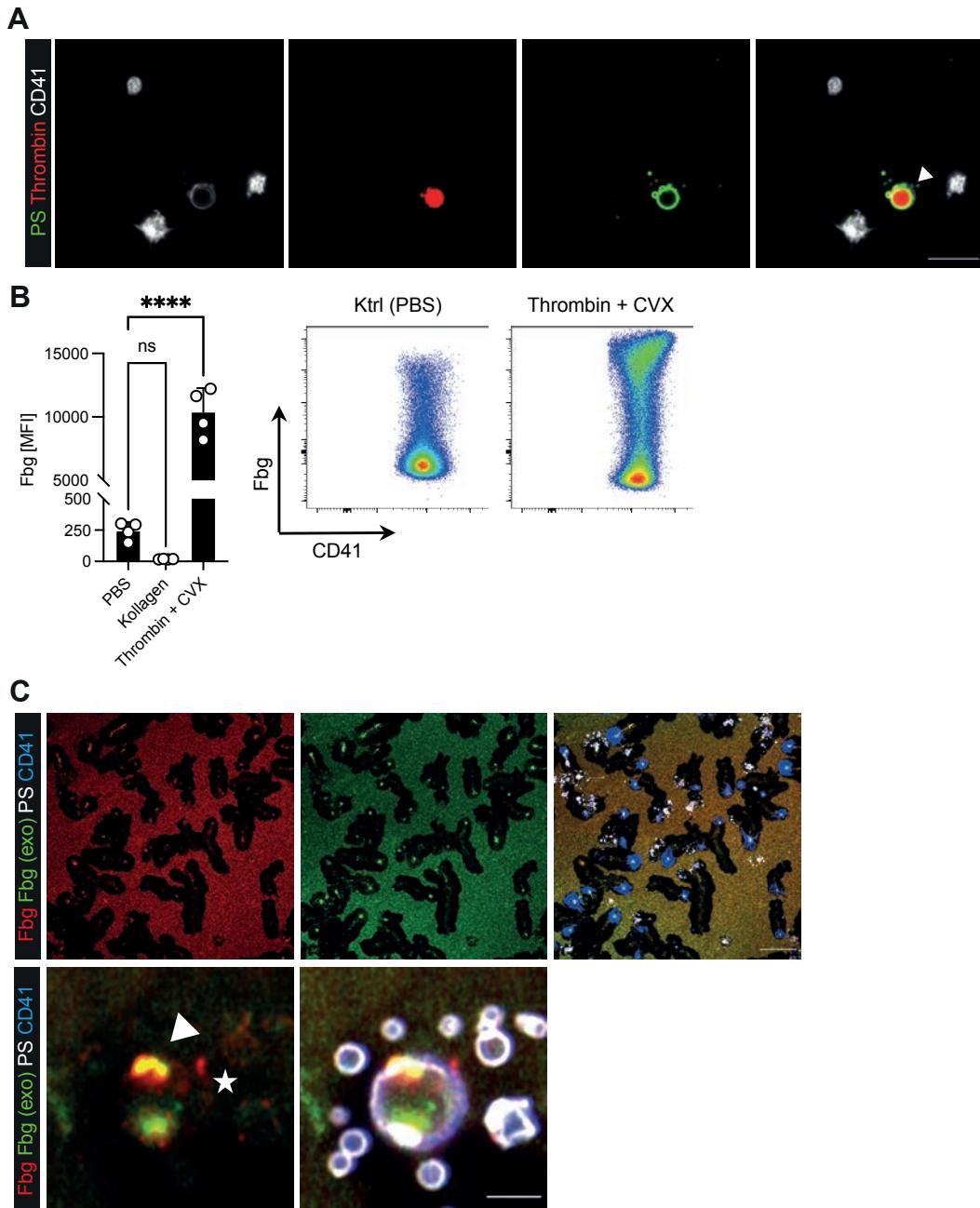


Abbildung 11: Prokoagulante Thrombozyten binden vermehrt Gerinnungsfaktoren wie Thrombin oder Fibrin(ogen) auf ihrer Oberfläche

(A) Repräsentative konfokale Aufnahmen migrierender humaner Thrombozyten, gefärbt für CD41, PS (mC1) und Thrombin (5-FAM/QXL 520 FRET-Substrat). Der weiße Pfeilkopf zeigt einen prokoagulanten, Thrombin-positiven Thrombozyten. Maßstab 10 µm. (B) Absolute

Quantifizierung und repräsentatives Streudiagramm der MFIs von Thrombozyten-gebundenem Fibrinogen-AF488 nach Stimulation mit PBS als Kontrollgruppe (Ktrl), Kollagen oder Convulxin und Thrombin. Humane Thrombozyten n = 4. Einseitiger ANOVA mit Post-Hoc-Test. (C) Repräsentative konfokale Aufnahme von migrierenden humanen Thrombozyten auf einer Hybridmatrix. Rot (Anti-Fbg-Antikörper, Anti-Schaf-Sekundärantikörper gekoppelt an AF649) zeigt gesamtes Fibrin(ogen) an, einschließlich endogenem und exogenem (Fbg-AF488, welches für die Beschichtung verwendet wurde) Fibrin(ogen). Gelb zeigt die Überlappung beider Kanäle an (Pfeilkopf), während der weiße Stern die endogene Fibrin(ogen)-Ablagerung neben einem prokoagulanten Thrombozyten markiert. PS-Detektionsmittel: C1-Cy3. Maßstab 20 µm (obere Abbildung) und 2 µm (untere Abbildung).

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

5.1.2 Interaktion mit Kollagen Typ 1 führt zur prokoagulanten Aktivierung von migrierenden Thrombozyten

Die pathophysiologischen Mechanismen, die zur prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten im Rahmen der Entzündungsreaktion führen, sind bisher unzureichend verstanden. Der neu entwickelte Migrationsassay (Kapitel 4.1.3) ermöglicht die Nachbildung des inflammatorischen Mikromilieus von Thrombozyten *in vitro*, indem extrazelluläre Matrixproteine durch Zugabe zu Kollagenfasern exposiert werden.

Die Zugabe von isolierten, aktivierten Wildtyp-Thrombozyten auf eine Albumin/Fibrinogen/Kollagen-1-Hybridmatrix führte zur Adhäsion der Thrombozyten an der Oberfläche und initiierte die autonome Migration. Nach Kontakt mit den Kollagenfasern wurde die charakteristische Halbmondform migrierender Thrombozyten schnell durch eine ballonartige Morphologie ersetzt, begleitet von einer ausgeprägten Mikrovesikel-Bildung und PS-Exposition (Abbildung 12A). Diese stellen die typischen Merkmale prokoagulanter Thrombozyten dar (Agbani & Poole, 2017; Agbani et al., 2015). Im Unterschied zu bereits veröffentlichten Untersuchungen mit Thrombozyten in Suspension war die prokoagulante Aktivität von migrierenden Thrombozyten nicht von der Anwesenheit löslicher Agonisten abhängig (Hua et al., 2015; Schoenwaelder et al., 2009). Vielmehr scheint die Interaktion mit Kollagenfasern spezifisch für die prokoagulante Aktivierung zu sein, da migrierende Thrombozyten auf einer reinen Albumin/Fibrinogen-Oberfläche kaum einen PS-positiven Phänotyp entwickelten (Abbildung 12A). Diese Beobachtungen konnten in Übersichtsaufnahmen der kollagenhaltigen Hybridmatrix bestätigt werden. Prokoagulant aktivierte Thrombozyten standen im Vergleich zur Gesamtzahl der analysierten Thrombozyten signifikant häufiger in

direkter Assoziation mit Kollagenfasern. Dieser Effekt verstärkte sich deutlich in Zeitverlaufsanalysen mittels Live-Imaging, wodurch die PS-Expression migrierender Thrombozyten über einen Zeitraum von einer Stunde verfolgt werden konnte (Abbildung 12B). Zusätzlich zu den morphologischen Veränderungen verringerten sich sowohl die relative als auch die absolute Geschwindigkeit sowie die Migrationsdistanz der prokoagulant aktivierten Thrombozyten signifikant, so dass sie an der Kontaktstelle mit den Kollagenfasern zum Stillstand kamen (Abbildung 12D).

Gleichzeitig waren die Eigenschaften der bindenden Liganden von entscheidender Bedeutung. Um zu klären, ob die Bindung von löslichem Fibrinogen die prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten *in vitro* prädisponiert, wurden weitere Thrombozyten-Aktivierungsexperimente durchgeführt. Diese zeigten, dass die Ko-Inkubation von Fibrinogen mit Thrombozyten in Suspension die prokoagulante Aktivierung nicht beeinflusst (Abbildung 12C). Darüber hinaus verdeutlicht Abbildung 12C, dass lösliches Kollagen im Vergleich zu gebundenem Kollagen weniger effektiv bei der Induktion der prokoagulanten Aktivierung ist. Dies bestätigt, dass der Zustand des Liganden, abhängig von seiner Bindung an einer Oberfläche im Vergleich zur freien Suspension, eine entscheidende Rolle bei der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten spielt.

Die Fähigkeit zur autonomen Migration *in vitro* bildet die Grundlage für die direkte Interaktion mit Kollagenfasern, welche die Thrombozyten zu einem Stillstand bringt und die prokoagulante Aktivierung unabhängig von einer Stimulation durch lösliche Agonisten einleitet.

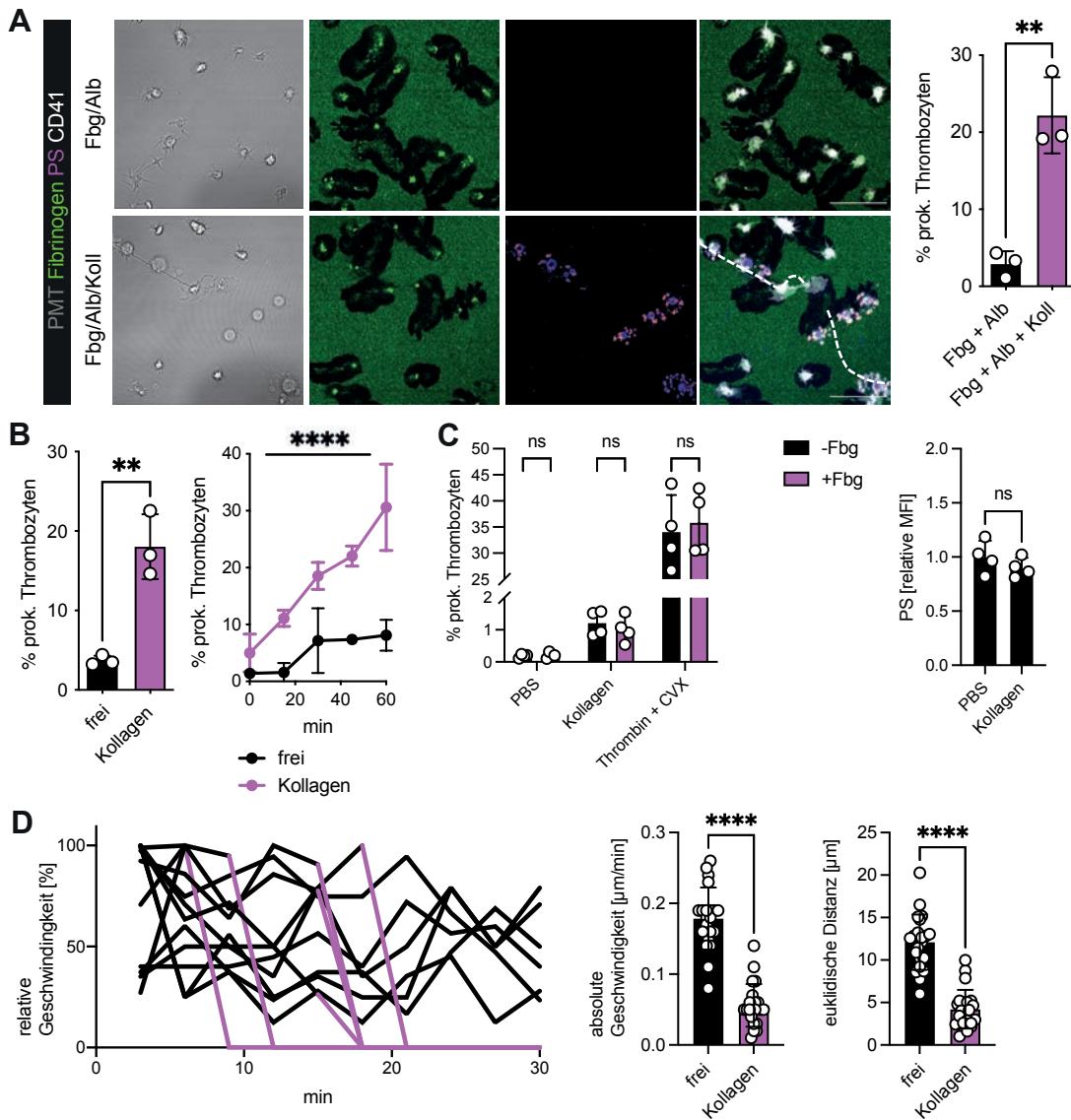


Abbildung 12: Interaktion von Kollagen führt zur prokoagulanten Aktivierung von migrierenden Thrombozyten

(A) Repräsentative konfokale Aufnahmen inklusive Photomultiplier (PMT)-Kanal und relative Quantifizierung der prokoagulante aktiverter humaner Thrombozyten, die auf einer Albumin/Fibrinogen-Matrix (obere Abbildung) oder einer Hybridmatrix aus Albumin (Alb), Fibrinogen (Fbg) und Kollagen (Koll) (untere Abbildung) migrieren. Gestrichelte weiße Linien repräsentieren die Kollagenfasern. PS-Färbemittel: mC1. Maßstab 10 µm. T-Test, zweiseitig, ungepaart. (B) Relative Quantifizierung der prokoagulanten Aktivierung von frei migrierenden im Vergleich zu kollagenbindenden Thrombozyten nach 45 Minuten (fester Zeitpunkt) oder über einen Zeitraum von 1 Stunde (Verlaufsexperiment). T-Test, zweiseitig, ungepaart; einseitiger ANOVA mit Post-Hoc-Test. (C) Relative Quantifizierung der prokoagulanten Aktivierung, bzw. PS MFI (mC1) isolierter Thrombozyten aus durchflusszytometrischen Aktivierungsexperimenten nach Stimulation mit den angegebenen Agonisten in Anwesenheit oder Abwesenheit von Fibrinogen (linker Graph). n = 4. Einseitiger ANOVA; t-Test, ungepaart, zweiseitig. (D) Diagramm der relativen Geschwindigkeit normiert auf die Höchstgeschwindigkeit und Quantifizierung der absoluten Geschwindigkeit und der euklidischen Distanz von migrierenden humanen Thrombozyten basierend auf Live-Imaging-

Daten. Lila Linien markieren den Beginn der prokoagulanten Aktivierung. T-Test, zweiseitig, un gepaart.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

5.1.3 Identifikation der beteiligten Rezeptoren und Signalkaskaden der prokoagulanten Aktivierung migrrierender Thrombozyten

Der aktive Prozess des Abtastens der Mikroumgebung, bekannt als Mechano-sensing (Kaiser, Anjum, et al., 2023), stellt einen entscheidenden Bestandteil des Mechanismus der prokoagulanten Aktivierung migrrierender Thrombozyten nach Interaktion mit Kollagenfasern dar. Insbesondere die beteiligten Rezeptoren und die nachgeschalteten Signalkaskaden in der Inflammation sind bislang nur unzureichend verstanden.

Im Folgenden wurden umfangreiche *in vitro* Screening-Versuche mit Inhibitoren gegen thrombozytäre Rezeptoren und nachgeschaltete Effektor-Moleküle durchgeführt. Durch spezifische Reduktion der prokoagulanten Aktivierung, ohne Hemmung der Migration, können isoliert die Signalwege charakterisiert werden. Eine Einschränkung der Thrombozyten-Migration senkt die Wahrscheinlichkeit einer Kollagenfasern-Interaktion und reduziert unspezifisch die prokoagulante Aktivierung, ohne Hinweise auf den zugrundeliegenden Aktivierungsmechanismus zu liefern.

5.1.3.1 Pharmakologische Inhibition von CypD und TMEM16F reduziert die prokoagulante Aktivität von Thrombozyten

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (Kapitel 1.2.2) spielen das mitochondriale Transmembran-Protein CypD (Jobe et al., 2008) und die calciumabhängige Phosphatidylserin-Scramblase TMEM16F/Anoctamin6 (Suzuki et al., 2010) eine essenzielle Rolle in der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten. Die beiden Proteine können *in vitro* effektiv durch die pharmakologischen Inhibitoren Cyclosporin A (CicA) und Nifluminsäure (NFA) beeinflusst werden (Kim et al., 2014; Yang et al., 2012).

Die Hemmung von CypD durch Cyclosporin A in einer Konzentration von 2 µM führte zu einer signifikanten Reduktion der prokoagulanten Aktivierung muriner Thrombozyten, ohne die Migrationsfähigkeit zu beeinträchtigen. Ebenso die Inhibition von TMEM16F durch Nifluminsäure 20 µM, reduzierte das prokoagulante

Potential migrierender Thrombozyten (Abbildung 13A). Die Ergebnisse konnten in humanen Thrombozyten reproduziert werden (Abbildung 13B).

CypD und TMEM16F bieten somit eine effektive Möglichkeit, die prokoagulante Aktivität von Thrombozyten spezifisch zu reduzieren. Im *in vivo* Teil dieser Arbeit wurden diese Zielstrukturen genutzt, um Knockout-Mäuse mit reduzierter prokoagulanter Aktivierung zu generieren.

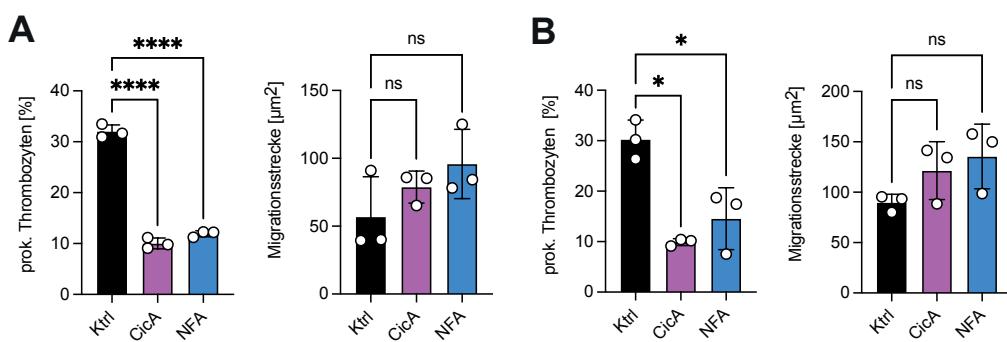


Abbildung 13: Pharmakologische Inhibition von CypD und TMEM16F reduziert die prokoagulante Aktivität von Thrombozyten, ohne die Migrationsfähigkeit zu beeinträchtigen

(A, B) Quantifizierung der prokoagulanten Aktivierung und der Migrationsstrecke von humanen (A) und murinen (B) Thrombozyten nach Behandlung mit Inhibitoren von CypD (Cyclosporin A, CicA 2 µM) oder TMEM16F (Nifluminsäure, NFA 10 µM). Einseitiger ANOVA mit Post-Hoc-Test.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

5.1.3.2 Duale pharmakologische Inhibition der Rezeptoren GPIIbIIIa und GPVI reduziert die prokoagulante Aktivität von Thrombozyten

Der prokoagulanten Aktivierung von migrierenden Thrombozyten *in vitro* wird eine autonome Migration auf der Fibrin(ogen)-Oberfläche und Interaktion mit Kollagenfasern vorausgesetzt, wobei die Stimulation isolierter Thrombozyten in Suspension weder durch lösliches Fibrinogen noch durch Kollagen einen Einfluss zeigte (Kapitel 5.1.2). Es wurde geschlussfolgert, dass die prokoagulante Aktivität migrierender Thrombozyten durch Mechanosensing-vermittelte Fibrinogen (GPIIbIIIa)- und Kollagen (GPVI)-Rezeptor-Aktivierung beeinflusst wird.

Frühere Studien haben die Rolle des GPIIbIIIa *outside-in* Signalwegs in der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten unter mechanischen Scherstress beleuchtet und festgestellt, dass die Blockade dieses Signalwegs durch Inhibition des nachgeschalteten Gα13 die PS-Exposition wirksam reduzieren kann (Pang et al., 2018).

Nach Exposition isolierter humaner und muriner Thrombozyten auf der Kollagen-Hybridmatrix konnte in Anwesenheit des pharmakologischen $\text{G}\alpha 13$ -Inhibitors mP6 eine Reduktion der prokoagulanten Aktivierung beobachtet werden (Abbildung 14A). Der leicht signifikante Anstieg der zurückgelegten Migrationsstrecke, gemessen an der Fibrinogen-abgetragenen Oberfläche nach Inhibition mittels mP6, könnte durch das stark reduzierte prokoagulante Potential der Thrombozyten erklärt werden. Auf der genutzten Hybridmatrix werden migrierende Thrombozyten durch Interaktion mit Kollagenfasern prokoagulant aktiviert und verharren an der Kontaktstelle. Durch zusätzliche *in vitro* Experimente konnte belegt werden, dass frei migrierende mP6-behandelte Thrombozyten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe auf einer Fibrin(ogen)/Albumin-Oberfläche ohne Zugabe von Kollagen keinen Unterschied in der zurückgelegten Migrationsdistanz aufwiesen (Abbildung 14B). Dies ist auf das Fehlen der prokoagulanten Aktivierung zurückzuführen.

Um den Einfluss des GPIIbIIIa-Signalweges weiter zu charakterisieren, wurden Migrationsexperimente mit dem reversiblen, kompetitiven Integrin-Antagonisten Tirofiban durchgeführt. Dieser Inhibitor wird klinisch insbesondere im Rahmen des akuten Koronarsyndroms (ACS) bei Hochrisiko-Interventionen mit hoher Thrombuslast eingesetzt (Byrne et al., 2023; Neumann et al., 2001). Tirofiban bindet kompetitive und reversibel an die Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Bindungsstelle des GPIIbIIIa-Rezeptors und verhindert die Interaktion von Fibrinogen und anderen Liganden, ohne die allgemeine Rezeptorfunktion zu beeinträchtigen (Nurden et al., 1999). Im Migrationsassay hatte Tirofiban bei den angegebenen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Migrationskapazität muriner Thrombozyten, reduzierte jedoch das prokoagulante Potenzial wesentlich (Abbildung 14D).

Der Beitrag des GPVI-Signalwegs zur Mechanosensing-vermittelten, prokoagulanten Aktivierung migrierender Thrombozyten wurde in weiteren Versuchen mit pharmakologischen Inhibitoren des Rezeptorsignalweges an verschiedenen Angriffspunkten untersucht. Hierfür wurden isolierte murine Thrombozyten mit dem direkten GPVI-blockierenden Antikörper JAQ1 in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Massberg et al., 2003) oder dem neuartigen Syk-Kinase-Inhibitor BI-1002494 in einer Konzentration von 5 μM behandelt. Im Migrationsassay führten

beide Inhibitoren zu einer Verringerung der prokoagulanten Aktivierung, ohne die Fähigkeit der autonomen Migration zu beeinträchtigen (Abbildung 14B).

Interessanterweise gibt es Hinweise in der Literatur, dass Fibrin(ogen) auch an den GPVI-Rezeptor von Thrombozyten binden kann, welches die Aktivierung und die Umsetzung von Thrombin verstärkt (Alshehri et al., 2015; Mammadova-Bach et al., 2015; Slater et al., 2019; Xu et al., 2021). Bei den verwendeten niedrigen Konzentrationen von JAQ1 und BI-1002494 war diese Interaktion jedoch entbehrlich für die Migrationsfähigkeit. Um einen Einfluss der GPVI/Fibrin(ogen)-Achse auf die Thrombozyten-Migration endgültig auszuschließen, wurden Migrationsexperimente mit steigenden Inhibitor-Konzentrationen durchgeführt. Nur eine Erhöhung der verabreichten Konzentrationen des Syk-Inhibitors von 2,5 auf 50 µM (20-fach) führte zu einer signifikanten Reduktion der zurückgelegten Migrationsstrecke (Abbildung 14C). Dies könnte jedoch auf eine unspezifische Hemmung der Src-Kinase zurückzuführen sein, welche an multiplen Signalwegen der Thrombozyten-Aktivierung beteiligt ist (Senis et al., 2014). Darüber hinaus wurden zusätzliche Migrationsassays mit murinen Thrombozyten durchgeführt, die mit steigenden Dosen des GPVI-blockierenden Antikörpers JAQ1 (0 vs. 5 vs. 10 vs. 25 µg/ml) vorinkubiert wurden. Dabei zeigte sich kein Einfluss auf die Thrombozyten-Migration auf einer Fibrinogen/Albumin-Matrix ohne Kollagen (Abbildung 14C).

Die Ergebnisse der isolierten Hemmung des GPIIbIIIa- und GPVI-Signalwegs konnten auch in humanen Thrombozyten validiert werden. Sowohl die Hemmung durch den Ga13-Inhibitor mP6 als auch den Syk-Kinase-Inhibitor BI-1002494 verringerte die prokoagulante Aktivität der Thrombozyten, ohne die Migration zu beeinflussen (Abbildung 14A). Bemerkenswerterweise führte eine gleichzeitige Hemmung von GPIIbIIIa und GPVI durch JAQ1 und Tirofiban in isolierten murinen Thrombozyten zu einem additiven Effekt hinsichtlich der Reduktion des prokoagulanten Potentials (Abbildung 14D). Die erhaltene Migrationsfähigkeit der Thrombozyten ermöglicht eine physische Interaktion mit Kollagenfasern, ohne die prokoagulante Aktivierung zu triggern (Abbildung 14D).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die Stimulation von GPVI als auch GPIIbIIIa in migrierenden Thrombozyten erforderlich ist, um die Mechanosensing-vermittelte prokoagulante Funktion wirksam auszuführen.

Insbesondere konnte in diesem *in vitro* Modell die zentrale Rolle des GPIIbIIIa *outside-in* Signalwegs bei der Konditionierung migrierender Thrombozyten für die GPVI-vermittelte Kollageninteraktion und die damit verbundene prokoagulante Aktivierung bestätigt werden, wobei die GPVI-vermittelte Bindung von Fibrinogen für die Migrationsfähigkeit nicht essenziell ist.

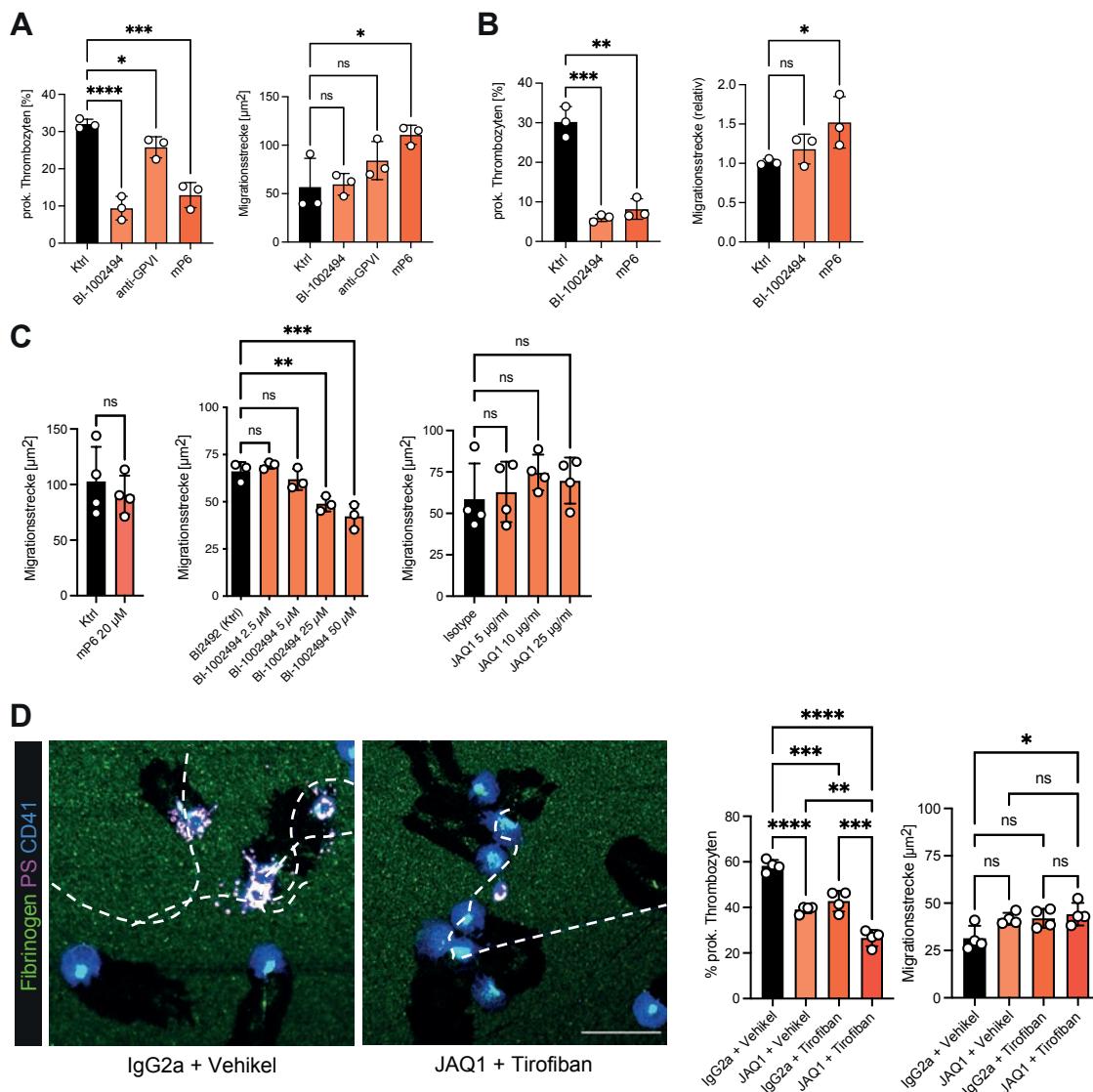


Abbildung 14: Pharmakologische Inhibition von GPIIbIIIa und GPVI führt zu einer Reduktion der prokoagulanten Aktivität von migrierenden Thrombozyten

(A, B) Quantifizierung prokoagulanter Thrombozyten und der zurückgelegten Migrationsstrecke von murinen (A) und humanen Thrombozyten (B), die mit Inhibitoren des GPVI-Signalweges (BI-1002494, Syk-Inhibitor, 5 μ M; JAQ1, Anti-GPVI-Antikörper, 10 μ g/ml) oder des GPIIbIIIa *outside-in* Signalweges (mP6, G α 13-Inhibitor, 20 μ M) behandelt wurden. Einseitiger ANOVA mit Post-Hoc-Test. (C) Quantifizierung der zurückgelegten Migrationsstrecke von murinen Thrombozyten, die mit 20 μ M mP6 oder aufsteigenden Konzentrationen von JAQ1 und BI-1002494 behandelt wurden. T-Test, ungepaart, zweiseitig; einseitiger ANOVA mit Post-Hoc-Test. (D) Repräsentative konfokale Aufnahmen von migrierenden murinen Thrombozyten auf einer Kollagenhybridmatrix und Quantifizierung der zurückgelegten Migrationsstrecke und prokoagulanten Aktivierung nach Behandlung mit JAQ1 (10 μ g/ml) und Tirofiban (1 μ g/ml) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Isotyp-Antikörper IgG2a und Vehikel-Substanz). PS-Färbung: mC1. Maßstab 10 μ m. Einseitiger ANOVA.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

5.1.3.3 Klassische Thrombozytenaggregationshemmer haben keinen Einfluss auf die prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten

In der Literatur werden weitere Agonisten und Rezeptoren mit klinischem Potential beschrieben, die Expression von PS auf Thrombozyten zu beeinflussen. So reguliert beispielsweise der Thrombin-Rezeptor unabhängig von der Calcium-Mobilisierung die Degranulation aktiverter Thrombozyten über den G α 12/13-Signalweg (Jin et al., 2009). In Experimenten zur humanen Thrombusbildung *in vitro* wurde die spezifische prokoagulante Reaktion hauptsächlich durch den PAR-4-Rezeptor ausgelöst (French et al., 2016).

Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR-Rezeptoren) sind eine Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Gefäßfunktion und in immunologischen Vorgängen. Die PAR-Rezeptor-Familie umfasst vier Mitglieder: PAR-1, PAR-2, PAR-3 und PAR-4, die jeweils durch verschiedene Proteasen aktiviert werden (Coughlin, 2005). PAR-1 wird primär durch Thrombin aktiviert und ist von zentraler Bedeutung für die Funktion von Thrombozyten, Endothelzellen sowie für entzündliche Reaktionen. Auch PAR-3 und PAR-4 werden durch Thrombin und andere Proteasen aktiviert und sind maßgeblich an der Regulation der Thrombozytenaggregation beteiligt. PAR-Rezeptoren haben sich als vielversprechende therapeutische Zielstrukturen in der Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen herausgestellt. Ein Beispiel hierfür ist der PAR-1-Inhibitor Vorapaxar, der die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten hemmt. Vorapaxar wird bei thrombotischen Ereignissen wie dem akuten Koronarsyndrom eingesetzt und stellt eine bedeutende Komponente in der antithrombotischen Therapie dar (Tricoci et al., 2012).

Um den Einfluss der PAR-abhängigen Signalwege auf die prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten in Migrationsexperimenten effektiv zu evaluieren, wurden isolierte Thrombozyten mit dem PAR-1-Inhibitor Vorapaxar und dem PAR-4-Inhibitor BMS-986120 inkubiert. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten zeigte die Hemmung von PAR-1 und PAR-4 keine Auswirkungen auf die prokoagulante Aktivierung migrierender Thrombozyten (Abbildung 15A), obwohl höhere Dosen verwendet wurden (French et al., 2016; Stoller et al., 2022).

Auch weitere klinische Thrombozytenaggregationshemmer wie der Thromboxan-Antagonist Terutroban und der P2Y12 (ADP-Rezeptor) -Inhibitor Cangrelor beeinflussten die prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten *in vitro* nicht (Abbildung 15B).

Die Diskrepanz dieser Ergebnisse im Vergleich zu bereits veröffentlichten Studien betont die multimodalen Aktivierungsmechanismen prokoagulanter Thrombozyten, die in Abhängigkeit von ihrer Funktion in der Thrombusbildung nach traumatischer Gefäßverletzung und in der inflammatorischen Hämostase unterschiedlich reguliert werden.

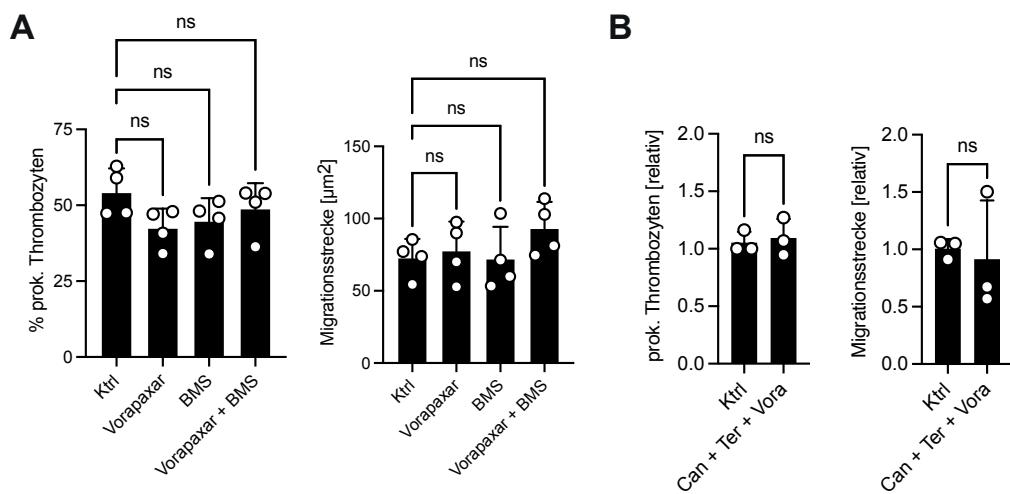


Abbildung 15: Einfluss von Thrombozytenaggregationshemmung auf Migration und prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten

(A) Relative Quantifizierung der prokoagulanten Aktivierung und zurückgelegten Migrationsstrecke von humanen Thrombozyten, die mit PBS als Kontrolle (Ktrl), dem PAR1-Inhibitor Vorapaxar ($1 \mu\text{M}$), dem PAR4-Inhibitor BMS-986120 ($1 \mu\text{M}$) oder beider Inhibitoren inkubiert wurden. n= 4. Einseitiger ANOVA mit Post-Hoc-Test. (B) Relative Quantifizierung der prokoagulanten Aktivierung und zurückgelegten Migrationsstrecke von humanen Thrombozyten welche mit einer Kombination aus Cangrelor (Can, $0,25 \mu\text{M}$), Terutroban (Ter, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) und Vorapaxar (Vora, $1 \mu\text{M}$) behandelt wurden, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. n=3. T-Test, ungepaart, zweiseitig.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

Abschließend werden die *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit noch einmal zusammengefasst. Prokoagulante Thrombozyten können mithilfe eines innovativen Reagenz namens mC1, das auf Laktadherin basiert, effizient und gezielt nachgewiesen werden. Funktionell binden prokoagulante Thrombozyten vermehrte Gerinnungsfaktoren auf ihrer Oberfläche, um als Brücke zwischen primärer und sekundärer Hämostase zu fungieren. Die Fähigkeit zur autonomen Migration einzelner Thrombozyten bildet in dem neu etablierten inflammatorischen Migrationsassay die Grundlage für eine direkte mechanische Interaktion mit Kollagenfaser, welche die Thrombozyten zu einem Stillstand bringt und die prokoagulante Aktivierung unabhängig von einer Stimulation durch lösliche Agonisten einleitet. Die beteiligten nachgeschalteten Rezeptorsignalwege der prokoagulanten Aktivierung werden maßgeblich von CypD und TMEM16F reguliert. Initiiert wird die prokoagulante Aktivierung von migrierenden Thrombozyten durch eine Mechanosensing-vermittelte Stimulation des GPVI- und GPIIbIIIa-Rezeptors. Klinisch relevante Thrombozytenaggregationshemmer wie die PAR1/4-Antagonisten Vorapaxar und BMS-986120, der Thromboxan-Antagonist Terutroban und der P2Y12 (ADP-Rezeptor) -Inhibitor Cangrelor beeinflussten die prokoagulante Aktivierung nicht.

Um die Bedeutung prokoagulanter Thrombozyten in der inflammatorischen Hämostase *in vivo* zu untersuchen, wurden im folgenden Abschnitt verschiedene murine Entzündungsmodelle etabliert und zwei transgene Mauslinien generiert, die einen Thrombozyten-spezifischen Knockout in den Zielstrukturen CypD und TMEM16F aufweisen. Diese Proteine sind für die prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten essenziell. Das Modell der sterilen Peritonitis ermöglicht durch Induktion einer systemischen Entzündungsreaktion die Visualisierung einzelner immunreaktiver Thrombozyten in verschiedenen Organen. Darüber hinaus bietet das Modell der (sub)akuten Lungenschädigung die Möglichkeit, die komplexe Pathophysiologie inflammatorischer Blutungen weiter zu untersuchen. Es dient insbesondere dazu, den Einfluss thrombozytärer Funktionen, wie die prokoagulante Aktivierung, detailliert zu analysieren und deren Rolle im Entzündungsprozess zu verstehen.

5.2 *In vivo* Ergebnisse

5.2.1 Systemische Inflammation führt zur Rekrutierung von Thrombozyten und Fibrin(ogen) in der Lunge

In früheren Studien konnte nachgewiesen werden, dass einzelne immunreaktive Thrombozyten die vaskuläre Hämostase im Rahmen von Entzündungen fördern (Goerge et al., 2008; Gros et al., 2015; Hillgruber et al., 2015). Die kürzlich erschienene Arbeit von (Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020) beleuchtet die Funktion der autonomen Migration und Haptotaxis von Thrombozyten, um gezielt an Stelle entzündungsbedingter endothelialer Defekte rekrutiert zu werden. Unklar bleibt jedoch, welche weiteren vasoprotektiven Thrombozyten-Funktionen durch lokale und systemische Inflammationsreize induziert werden und welche Rolle plasmatische Gerinnungsfaktoren in der entzündlichen Hämostase spielen.

Um die globalen Effekte der systemischen Inflammation auf Thrombozyten *in vivo* zu untersuchen, wurde das Modell der LPS-induzierten, sterilen Peritonitis etabliert (Abbildung 16A). Durch intraperitoneale Applikation von LPS wurde eine systemische Entzündungsreaktion induziert, welche sich nach ca. 4 Stunden zu einer manifesten Sepsis ausbreitete. Dies kann sowohl anhand des kontinuierlich ansteigenden Sepsis-Scores (Abbildung 16B) als auch typischen Veränderungen des peripheren Differential-Blutbildes der LPS-behandelten Tiere nachvollzogen werden (Abbildung 16C). Hierzu zählen eine absolute Leukopenie bei erhöhtem Neutrophilen-Anteil als unspezifischer Entzündungsmarker aufgrund vermehrter Leukozyten-Adhärenz in den kleinen Gefäßen (Belok et al., 2021) sowie eine Thrombozytopenie als frühzeitiger Hinweis eines beginnenden septischen Schocks (Menard et al., 2019). Im Rahmen der septischen Organdysfunktion stellt die Lunge ein besonders vulnerables Organ dar und ist häufig von der Inflammationsreaktion mitbetroffen (Matthay et al., 2019), wobei einzelne Thrombozyten mithilfe hochauflösender, dreidimensionaler, konfokaler Immunhistologie untersucht werden konnten (Abbildung 16D). Auffällig waren eine insgesamt erhöhte Anzahl rekrutierter Thrombozyten sowie die Ablagerung von Fibrin(ogen) im entzündlich veränderten Lungengewebe (Abbildung 16D-E). Die CD42b-positiven Bereiche, die den thrombozytären Rezeptor GPIb markieren, zeigten dabei häufig eine Überlappung mit Fibrinogen. In vergrößerten, hochauflösenden Bildausschnitten konnten einzelne Fibrinfasern auf der Oberfläche von

Thrombozyten nachgewiesen werden (weiße Pfeilspitze, Abbildung 16D). Interessanterweise war ein erheblicher Anteil der rekrutierten Fibrinogen-positiven Thrombozyten in der entzündeten Lunge auch positiv für PS – ein typisches Kennzeichen prokoagulanter Thrombozyten (Abbildung 16D-E). Bei Kontrolltieren ohne inflammatorischen Stimulus konnten kaum PS-positive Thrombozyten detektiert werden (Abbildung 16E).

Die vermehrten Thrombozyten-assoziierten Fibrin(ogen)-Ablagerungen in der Lunge belegen ein enges Zusammenspiel zwischen Thrombozyten und der plasmatischen Gerinnung im Kontext systemischer Entzündungsreaktionen. Der erstmalige Nachweis von lokal PS-positiven prokoagulanten Thrombozyten *in vivo* weist zudem auf eine bislang unzureichend charakterisierte Funktion dieser Zellen hin, nämlich die Vermittlung zwischen primärer und sekundärer Hämostase. Die gezielte Induktion prokoagulanter Thrombozyten durch inflammationsvermittelte Schädigung des Gefäßendothels in betroffenen Organen wie der Lunge könnte durch vermehrte Bindung von Gerinnungsproteinen wie Fibrin(ogen) zur Bildung von Mikrothromben führen, was zum Erhalt der vaskulären Integrität beiträgt. Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle von Thrombozyten in der Regulation inflammatorischer Gerinnungsprozesse.

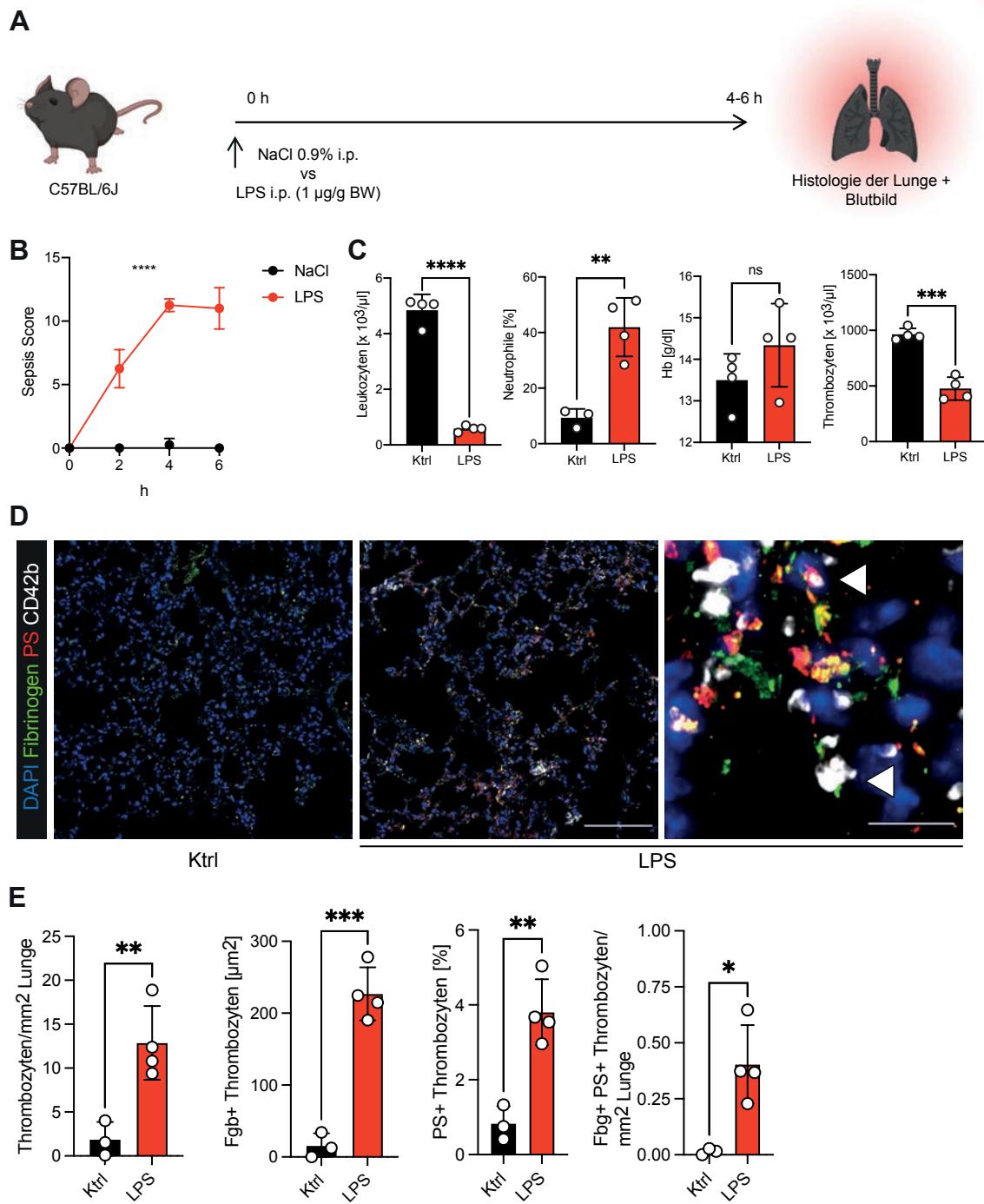


Abbildung 16: Systemische Inflammation führt zu Rekrutierung von Thrombozyten und Fibrin(ogen) in der Lunge

(A) Experimentelles Schema der Peritoneal-Sepsis mit Histologie der Lunge und Analyse des Blutbildes. (B) Klinischer Sepsis-Score der LPS-behandelten Tiere für 6 Stunden im Vergleich zu einer NaCl-Kontrollgruppe. T-Test, zweiseitig, ungepaart. (C) Quantifizierung des Differential-Blutbildes mit Leukozytenzahlen und relativem Neutrophilen-Anteil, Hämoglobin-Konzentration, sowie Thrombozytenzahlen anhand eines automatisierten Zellzählers (Sysmex). n=4. T-Test, zweiseitig, ungepaart. (D) Repräsentative konfokale Aufnahme von Immunfluoreszenzfärbungen der Lungen von Kontrolltieren (Ktrl) oder septischen Tieren (LPS 1 µg/kg KG i.p.). Maßstab 100 µm (linke und mittlere Abbildung) und 20 µm (rechte Abbildung). Weiße Pfeilspitzen

zeigen Fibrin(ogen)- und PS-positive Thrombozyten an. Rot: Anti-PS-Antikörper (Merck), weiß: Anti-CD42b-Antikörper. (E) Quantifizierung der Rekrutierung von Thrombozyten in die Lunge mit Überlappung des Fibrinogen-positiven und/oder PS-positiven Bereiches. n = 3-4. T-Test, zweiseitig, ungepaart.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

5.2.2 Einzelne prokoagulante Thrombozyten werden *in vivo* durch Kontakt mit Kollagen induziert

Um die zugrunde liegenden Mechanismen der prokoagulanten Aktivierung von intravaskulären Thrombozyten *in vivo* im Kontext der Entzündung genauer zu untersuchen, wurden mesenteriale postkapillare Venolen im Modell der LPS-induzierten sterilen Peritonitis mittels hochauflösender konfokaler Immunhistologie analysiert (Abbildung 17A). Die Bildgebung des Mesenteriums ermöglicht eine dynamische Analyse zellulärer Prozesse nach Induktion einer systemischen Entzündung und ermöglicht die Übertragung der daraus gewonnenen Erkenntnisse auf die Pathophysiologie inflammatorisch bedingter Blutungen. Im Zentrum steht dabei insbesondere die Fragestellung, wie Thrombozyten Blutungen verhindern, sobald sie sich an den Extravasations-Stellen von Neutrophilen positionieren.

Im Einklang mit den umfangreichen *in vitro* Studien dieser Arbeit zeigte sich, dass die prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten früh nach Induktion der inflammatorischen Reaktion auftritt. Etwa 4 Stunden nach intraperitonealer LPS-Injektion konnten bereits einzelne PS-positive Thrombozyten-Ballons an der entzündeten Gefäßwand nachgewiesen werden (Abbildung 17B). Wie bereits *in vitro* beobachtet (Kapitel 5.1.2), führt insbesondere die physikalische Interaktion von Thrombozyten mit Kollagenfasern zur Initiierung der prokoagulanten Aktivierung. Dieses Phänomen konnte auch in den entzündlich veränderten Mesenterial-Gefäßen bestätigt werden. Häufig wurden einzelne PS-positive prokoagulante Thrombozyten in enger Assoziation mit freigelegten Kollagenfasern der subendothelialen Matrix bei septischen Tieren beobachtet (Abbildung 17B).

Zusammenfassend wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Exposition subendothelialer Matrixproteine durch die transendotheliale Migration von Neutrophilen sowie durch entzündungsbedingte Schädigung des Gefäßendothels verursacht wird. Die Rekrutierung aktiver Thrombozyten an die entzündlich veränderte Gefäßwand führt, in Analogie zu den *in vitro* beobachteten Phänomenen, zur prokoagulanten Aktivierung und zum Stillstand migrierender Thrombozyten.

Diese binden vermehrt Gerinnungsproteine wie Fibrinogen ihrer Oberfläche, um lokale Mikrothromben zu bilden, die trotz ihrer geringen Größe im Vergleich zu Neutrophilen effektiv Gefäßleckagen verschließen und Blutungen verhindern können. Um das volle Ausmaß inflammatorischer Blutungen zu untersuchen, wurde im Folgenden das Modell der (sub)akuten Lungenverletzung etabliert, bei dem das Maximum der Blutungsintensität mit der Leukozyten-Rekrutierung in den ersten 6 bis 24 Stunden zusammenfällt.

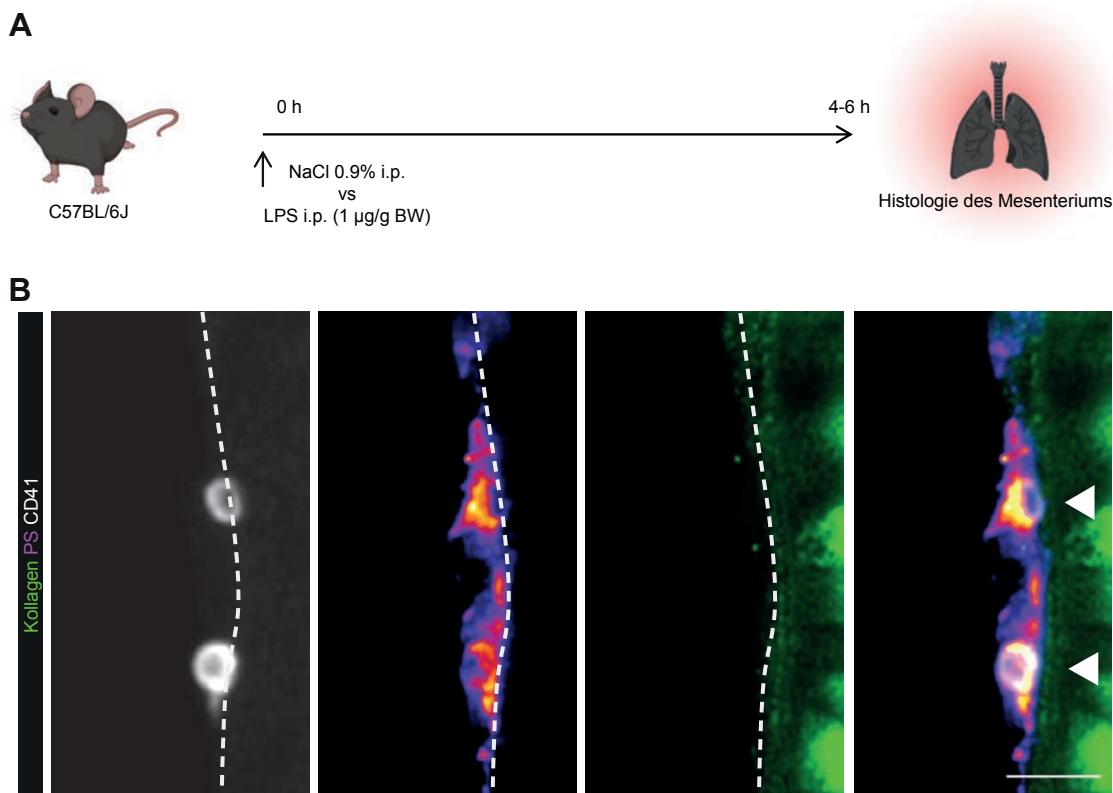


Abbildung 17: Interaktion von Thrombozyten mit Kollagenfasern induziert die prokoagulante Aktivierung *in vivo*

(A) Experimentelles Schema der Peritoneal-Sepsis mit Histologie des Mesenteriums. (B) Repräsentative konfokale Immunfluoreszenz-Aufnahme von mesenterialen Venolen 4 Stunden nach intraperitonealer Injektion von LPS. Weiße Pfeilspitzen zeigen prokoagulante Thrombozyten (CD41/GPIIbIIa-positiv, PS-positiv) in unmittelbarer Nähe zu antikörpergefärbten Kollagenfasern (grün). Maßstab 5 µm. PS-Färbemittel: Anti-PS-Antikörper.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

5.2.3 Einführung in das Modell der (sub)akuten Lungenschädigung

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben (Kapitel 1.3.2), spielen Leukozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten, eine entscheidende Rolle in der Entwicklung inflammatorischer Blutungen. Durch die Transmigration adhärenter intravaskulärer Neutrophilen in das entzündete Gewebe kommt es zu Mikrodefekten an ihren endothelialen Austrittspunkten. Diese Defekte verursachen bedeutende Mikroblutungen in verschiedenen Organen. Wie genau einzelne Thrombozyten dieses Phänomen der inflammatorischen Blutungen verhindern und mit Neutrophilen interagieren, ist noch nicht ausreichend untersucht. Um die beteiligten pathophysiologischen Mechanismen dieser sogenannten inflammatorischen Blutungen zu untersuchen, wurde das Modell der (sub)akuten Lungenschädigung (ALI) etabliert. Mittels Applikation des bakteriellen Strukturproteins Lipopolysaccharid (LPS) über die Atemwege kann im Mausmodell eine sterile Inflammation der Lunge induziert werden, die das klinisch sehr relevante akute Lungenversagen imitiert (Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020). Innerhalb weniger Stunden kommt es zu einer Entzündungsreaktion im pulmonalen Gewebe, die zu einer endothelialen Dysfunktion mit Infiltration von Neutrophilen führt (Deppermann et al., 2017).

Die pathophysiologischen Grundmechanismen von inflammatorischen Blutungen konnten in dem neu etablierten ALI-Modell validiert werden. 24 Stunden nach intranasaler LPS-Applikation wurde den Tieren Blut für die Isolation von Plasma entnommen und eine bronchoalveolare Lavage (BAL) durch tracheale Punktion durchgeführt. Das gewonnene BAL-Fluid wurde anschließend durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 18A). Die Induktion eines lokalen entzündlichen Stimulus in der Lunge führte zu einer vermehrten Rekrutierung von Neutrophilen aus dem ausgeprägten Mikrovaskularisationssystem des Lungengewebes in den Alveolarraum im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, welche nur Natriumchlorid (NaCl) intranasal erhielt (Abbildung 18C). Dies führte konsekutiv zu einem vermehrten Austritt von Blutbestandteilen, wie Erythrozyten, in die Lunge, welcher bereits makroskopisch an dem entnommenen BAL-Fluids beobachtet werden konnte (Abbildung 18B-C). Interessanterweise beeinflusste die lokale Entzündungsreaktion nicht die Rekrutierung von Thrombozyten. Lediglich eine vermehrte Bildung von Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregaten (PNA) konnte gemessen werden (Abbildung 18C). Um die vaskuläre Integrität im Rahmen

inflammatorischer Blutungen zu bewahren, müssen Thrombozyten folglich auf andere protektive Mechanismen zurückgreifen.

Weiterhin wurde die humorale Entzündungsreaktion auf die alveolare LPS-Exposition aufgeklärt. Um sowohl die systemische als auch die lokale Induktion inflammatorischer Mediatoren zu phänotypisieren, wurden Zytokin-Analysen unter Verwendung eines auf Durchfluszytometrie basierenden Multiplex-Panels durchgeführt. Hierbei wurden dreizehn gängige entzündliche Zytokine analysiert: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, MCP-1 (Monozyten-Chemoattraktantes Protein-1), IFN- β , IFN- γ , TNF- α und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor). Die Multiplex-Analysen zeigen signifikante Erhöhungen von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 α , IL-6, IFN- γ und TNF- α speziell im BAL-Fluid, jedoch nicht im peripheren Plasma von LPS-behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 18D-E).

Diese Ergebnisse tragen dazu bei, das Modell der LPS-induzierten (sub)akuten Lungenschädigung genauer zu charakterisieren und liefern Einblicke in die lokale Zytokinsignatur mit der Induktion von löslichen proinflammatorischen Mediatoren, die eine Rolle in der Thromboinflammation spielen könnten.

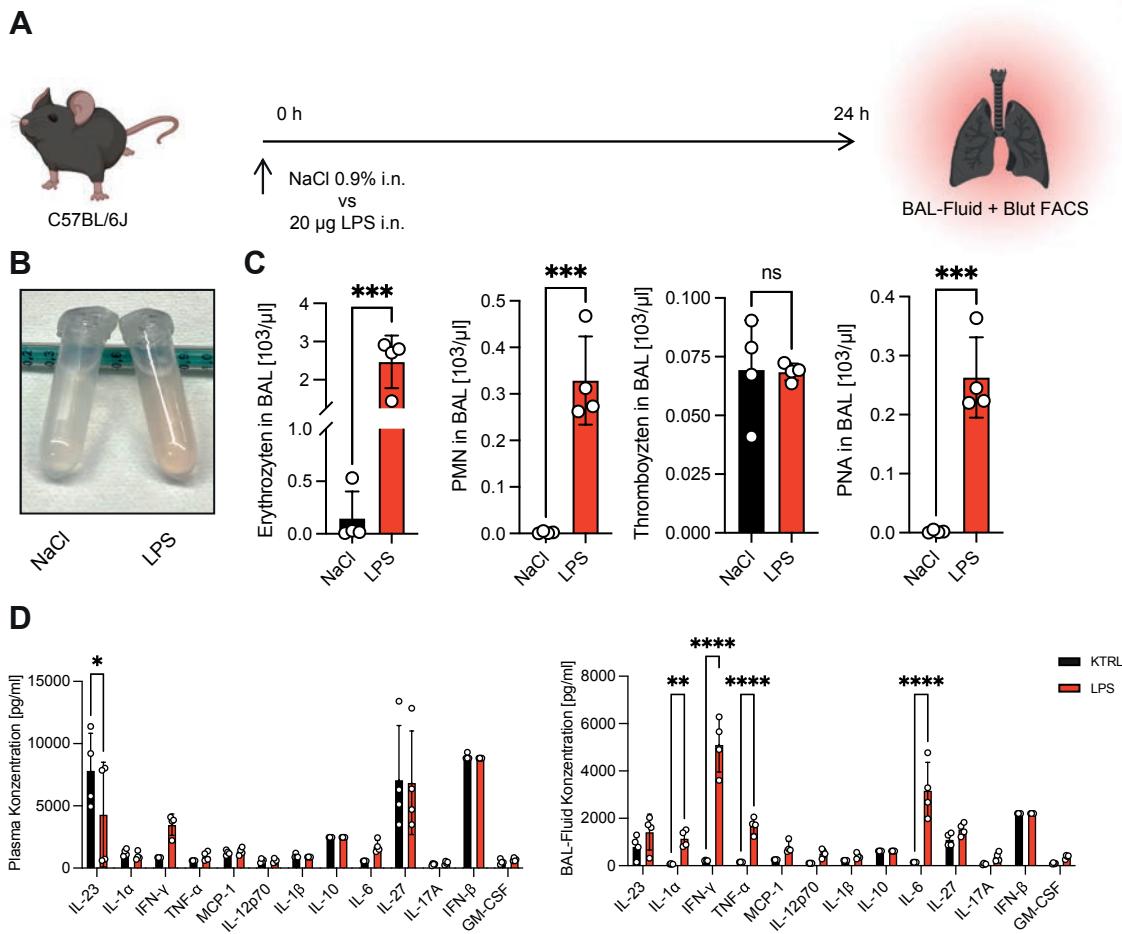


Abbildung 18: Validierung des murinen Modells der (sub)akuten Lungenschädigung

(A) Experimentelles Schema des Modells der (sub)akuten Lungenschädigung mit durchflusszytometrischer Analyse (FACS) von BAL-Fluid und peripherem Blut. Vergleich zwischen intranasaler LPS-Applikation und NaCl-Kontrollgruppe (schwarzer Pfeil). (B) Repräsentatives makroskopisches Bild des BAL-Fluids, welches in 2 ml Eppendorf-Röhrchen gesammelt wurde. (C) Durchflusszytometrische Analysen der Erythrozyten-, Neutrophilen (PMN)-, Thrombozyten- und Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregat (PNA)-Zahlen im BAL-Fluid. n = 4. T-Test, zweiseitig, ungepaart. (D) Quantifizierung der Zytokin-Konzentrationen aus Plasma und BAL-Fluid, die 24 Stunden nach LPS-/NaCl-Behandlung isoliert wurden. Zweiseitiger ANOVA mit Post-Hoc-Test.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

5.2.4 Thrombozytopenie und Antikoagulation verstärken inflammatorische Blutungen in der Lunge

In den etablierten Modellen der systemischen Inflammation und akuten Lungenschädigung wurde eine vermehrte Rekrutierung von Thrombozyten sowie eine assoziierte Fibrinogen-Akkumulation in der Lunge beobachtet. Im nächsten Schritt soll untersucht werden, in welchem Ausmaß Thrombozyten und die sekundäre Gerinnungskaskade zur inflammatorischen Hämostase beitragen und inwiefern diese Mechanismen entzündungsbedingte Blutungen beeinflussen. Frühere Untersuchungen haben aufgezeigt, dass eine Thrombozytopenie in unterschiedlichen Modellen der Inflammation die durch Leukozyten-Transmigration verursachten Mikroblutungen verschlimmert (Boulaftali et al., 2018; Goerge et al., 2008; Hillgruber et al., 2015; Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020). Um diese Ergebnisse in dem murinen Modell der LPS-induzierten Lungenschädigung zu validieren, wurde die pulmonale Hämorrhagie im Kontext der immunvermittelten Depletion von Thrombozyten betrachtet.

Direkt vor intranasaler LPS-Gabe wurde mittels i.v. Injektion eines depletierenden Antikörpers gegen den GP-Ib-Rezeptor (R300) eine Thrombozytopenie in der Versuchsgruppe induziert. Um systematische Fehler durch mögliche Nebenwirkungen einer unspezifischen Antikörperbindung auszuschließen, wurde die Kontrollgruppe mit dem Isotyp-Antikörper C301 behandelt (Abbildung 19A). Die Wirksamkeit der Thrombozyten-Depletion wurde anhand durchflusszytometrischer Analysen des peripheren Blutes 24 Stunden nach Antikörper-Injektion in allen Tieren der Versuchsgruppe sichergestellt. Eine ausreichende Thrombozytopenie wurde als ein Abfall der Thrombozytenzahl auf unter 5000 pro µl definiert und nur die entsprechenden Tiere in weitere Analysen einbezogen (Abbildung 19C). Die massiven Einblutungen in die Lungen der Thrombozyten-depletierten Versuchsgruppe waren bereits makroskopisch nach Entnahme der Lungenpakete für histopathologische Analysen sichtbar (Abbildung 19B). Im ebenfalls entnommenen BAL-Fluid konnte durchflusszytometrisch ein stark erhöhter Erythrozyten-Gehalt bestätigt werden (Abbildung 19C). Auch auf mikroskopischer Ebene wurde in Lungenquerschnitten mittels immunhistologischer Färbung von Erythrozyten durch einen TER119-Antikörper ein erhöhter Anteil an extravasalen Blutungen beschrieben (Abbildung 19D-E). Diese alveolären Blutungen waren bei den

thrombozytopenischen Tieren teilweise so ausgeprägt, dass sie eine Anämie im peripheren Blut verursachten (Abbildung 19C).

In früheren Studien, die inflammatorische Blutungen untersuchten, wurden modell- und organabhängige Effekte der Thrombozytopenie auf die Rekrutierung von Neutrophilen beschrieben (Gros et al., 2015; Hillgruber et al., 2015; Ho-Tin-Noé et al., 2018; Ho-Tin-Noé et al., 2009; Rayes et al., 2018). Teilweise konnte der Effekt einer reduzierten Neutrophilen-Rekrutierung in die Haut und das Peritoneum beobachtet werden. In dem Modell der (sub)akuten Lungenschädigung zeigten jedoch weitere durchflusszytometrische Analysen des BAL-Fluids keine Veränderungen in der Rekrutierung pulmonaler Leukozyten bei Thrombozyten-depletierten Tieren (Abbildung 19C). Zur spezifischen Analyse der Infiltration von Neutrophilen in das Lungengewebe wurde der Anteil des Ly6G-positiven Bereichs histologisch quantifiziert. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, was die durchflusszytometrischen Daten bestätigte (Abbildung 19D-E).

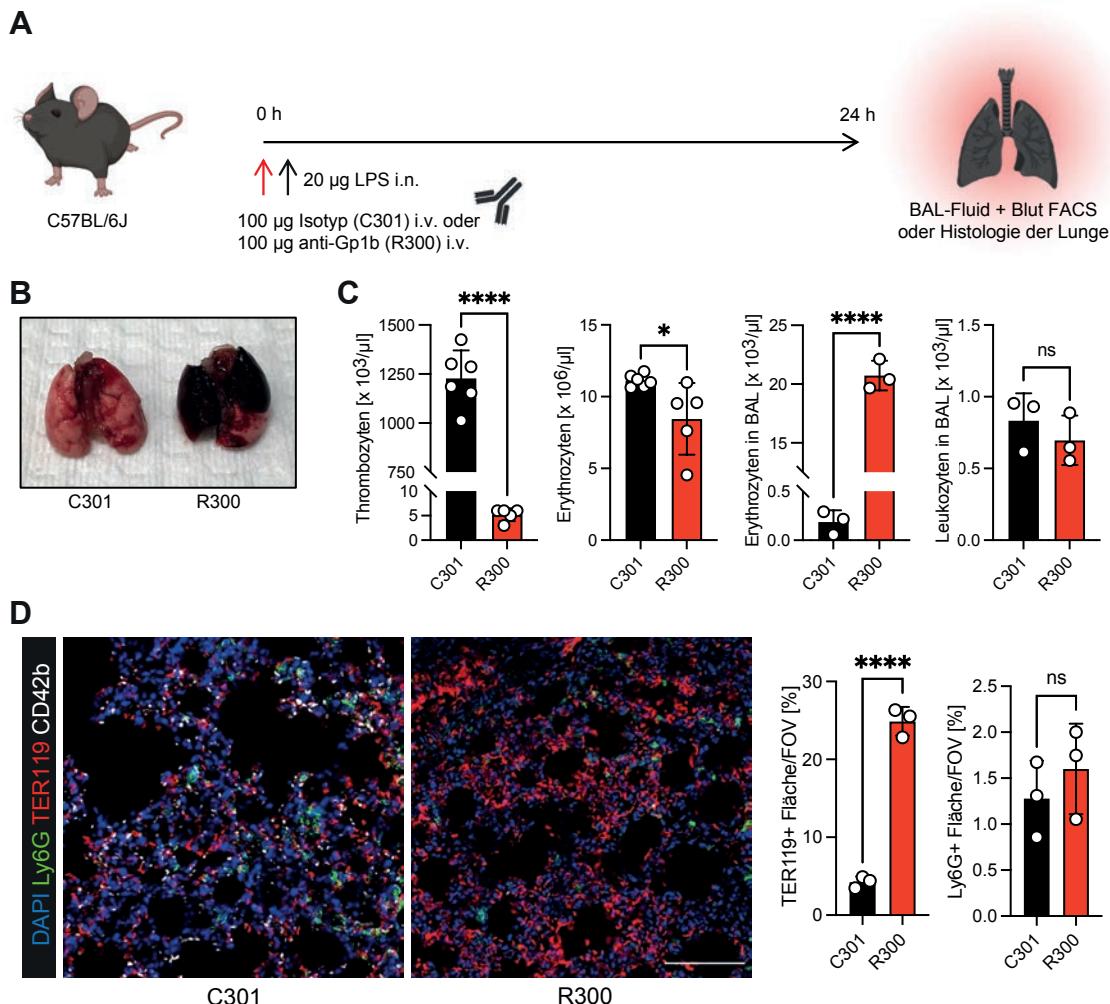


Abbildung 19: Thrombozytopenie verstrttigt inflammatorische Blutungen in dem Modell der (sub)akuten Lungenschädigung

(A) Experimentelles Schema des Modells der (sub)akuten Lungenschädigung mit oder ohne Antikörper vermittelter Thrombozyten-Depletion. Rote Pfeil markiert die i.v. Antikörper-Gabe, schwarzer Pfeil die intranasale LPS-Applikation. (B) Repräsentative makroskopische Bilder von Lungen der Kontrollgruppe (C301) und thrombozytopenischen Tieren (R300) 24 Stunden nach LPS-Gabe. (C) Durchflusszytometrische Analyse von peripherem Blut (Thrombozyten- und Erythrozyten-Zahl/ μl) und BAL-Fluid (Erythrozyten- und Leukozytenzahl/ μl). T-Test, zweiseitig, ungepaart. (D) Repräsentative konfokale immunhistologische Aufnahmen von R300-behandelten Lungen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (C301) und relative Quantifizierung der alveolären Blutung (TER119-positiver Bereich) und der Neutrophilen-Rekrutierung (Ly6G-positiver Bereich). Maßstab 100 μm . T-Test, zweiseitig, ungepaart.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

Die plasmatische Gerinnungskaskade, deren Endpunkt die Fibrin(ogen)-Bildung ist, wurde in dem Modell der (sub)akuten Lungenschädigung durch verschiedene klinisch relevante Antikoagulantien pharmakologisch inhibiert. Zum Einsatz kamen der Faktor-IIa-Inhibitor Argatroban in einer Konzentration von 5 mg/kg KG sowie der Faktor-Xa-Inhibitor Rivaroxaban als Vertreter der direkten oralen Antikoagulantien (DOAK) in einer Konzentration von 3 mg/kg KG. Diese wurden sowohl direkt vor als auch 8 Stunden nach dem entzündlichen Stimulus intravenös verabreicht. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Argatroban erfolgte eine zusätzliche Applikation nach 4 Stunden. Die Versuchsgruppe wurde mit einer Kontrollgruppe verglichen, die lediglich das Vehikel in Form einer 0,9 % NaCl-Lösung in gleicher Injektionsform erhielt (Abbildung 20A).

Sowohl die makroskopische Inspektion als auch die durchflusszytometrische Analyse des BAL-Fluids nach Inhibition von Faktor IIa und Faktor Xa zeigten eine verstärkte Neigung zu alveolären Blutungen (Abbildung 20B, D). Demgegenüber blieben im Blut die peripheren Thrombozyten- und Leukozytenzahlen durch die Behandlung unbeeinflusst (Abbildung 20D). Die histopathologische Analyse entzündlich veränderter Lungenschnitte bestätigte einen signifikanten Anstieg der Lungenblutung bei antikoagulierten Mäusen (Abbildung 20E). Die klinische Relevanz dieser Mikroblutungen wird durch den signifikant steigenden Sepsis-Score zu verschiedenen Zeitpunkten verdeutlicht (Abbildung 20C).

Zwischen den Behandlungsgruppen konnte sowohl durchflusszytometrisch als auch immunhistologisch kein signifikanter Unterschied in der pulmonalen Rekrutierung von Leukozyten festgestellt werden (Abbildung 20D, E). Dies deutet darauf hin, dass eine Behandlung mit Argatroban oder Rivaroxaban die transendotheliale Migration von Leukozyten nicht beeinträchtigt und der beobachtete Effekt der verstärkten Lungenblutung nicht auf eine erhöhte Diapedese von Neutrophilen zurückzuführen ist. Zusätzlich wurden weitere *in vitro* Experimente durchgeführt, um den Einfluss von Antikoagulanzien auf die Migrationsfähigkeit von isolierten humanen Thrombozyten zu untersuchen. Die Inkubation der Thrombozyten mit Argatroban oder Rivaroxaban beeinträchtigte die zurückgelegte Migrationsstrecke nicht (Abbildung 20F), wodurch ein verstärkter Blutungsphänotyp aufgrund eines Migrationsverlusts ausgeschlossen werden konnte.

Zusammenfassend konnte in dem murinen Modell der (sub-)akuten Lungenschädigung bestätigt werden, dass eine Thrombozytopenie zu einer Verstärkung inflammatorischer Blutungen führt, ohne die Rekrutierung von Neutrophilen zu beeinflussen. Die Blockade der plasmatischen Gerinnung und damit die Hemmung der Fibrin(ogen)-Ablagerung, sowohl durch die Inhibition von Thrombin (FIIa) als auch von Faktor Xa (FXa), führte zu einer Zunahme entzündungsbedingter Blutungen im Lungengewebe. Diese Befunde unterstreichen die bedeutende, Thrombozyten-abhängige Rolle der plasmatischen Gerinnung bei der Prävention inflammatorischer Blutungen in der Lunge.

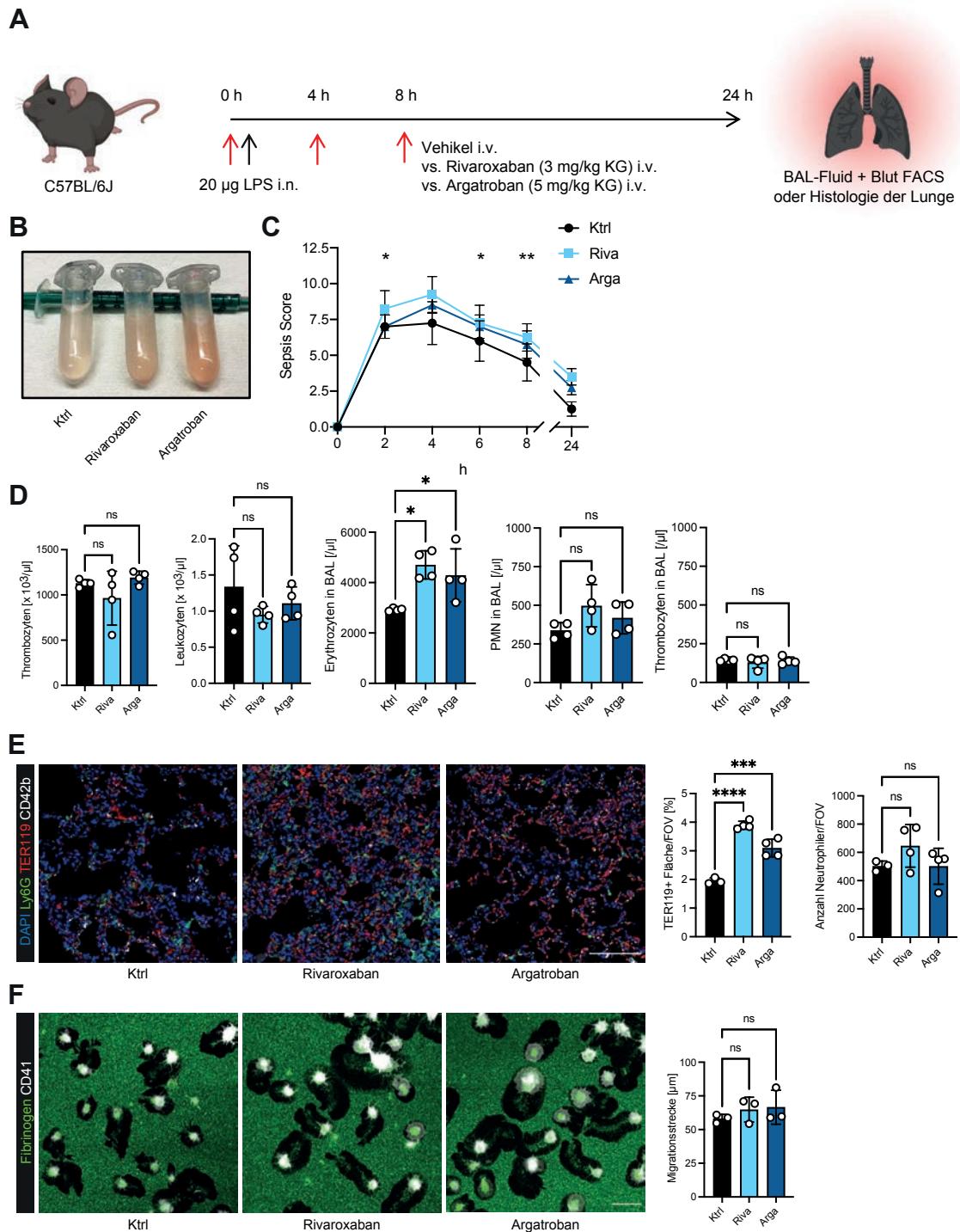


Abbildung 20: Einfluss von Rivaroxaban und Argatroban auf inflammatorische Blutungen in dem Modell der (sub)akuten Lungenschädigung und auf die Migrationskapazität *in vitro*

(A) Experimentelles Schema des Modells der (sub)akuten Lungenschädigung von Bl6-Mäusen, welche mit LPS i.n. (schwarzer Pfeil) und Rivaroxaban (3 mg/kg KG) oder Argatroban (5 mg/kg KG) i.v. (rote Pfeile) behandelt wurden im Vergleich zu einer Vehikel-Kontrollgruppe. (B) Repräsentatives makroskopisches Bild von BAL-Fluid aus der jeweiligen experimentellen Gruppe. (C) Klinische Sepsis-Scores der einzelnen Tiere für 24 Stunden nach LPS-Applikation, behandelt mit Rivaroxaban, Argatroban oder Vehikel. Sepsis-Scores umfassen Aussehen, Aktivität, Reaktionsfähigkeit und Atemmuster. Einseitiger ANOVA mit Post-Hoc-Test. (D) Durchflusszytometrische

Analysen des peripheren Blutes (Thrombozyten-, Leukozyten-Zahlen) und des BAL-Fluids (Erythrozyten-, PMN-, Thrombozyten-Zahlen) nach der jeweiligen Behandlung. Einseitiger ANOVA mit Post-Hoc-Test. (E) Repräsentative konfokale Aufnahmen von Immunfluoreszenz-gefärbten Lungen schnitten aus den verschiedenen experimentellen Gruppen. Maßstab 100 µm. (F) Quantifizierung der alveolaren Blutung (TER119-positive Fläche) und der Anzahl rekrutierter Neutrophiler. n = 3-4. Einseitiger ANOVA mit Post-Hoc-Test. (G) Repräsentative konfokale Aufnahmen und Quantifizierung der zurückgelegten Migrationsstrecke von humanen Thrombozyten, die mit Vehikel, Rivaroxaban (10 µg/ml) oder Argatroban (10 µg/ml) behandelt wurden. Maßstab 10 µm. n = 3. Einseitiger ANOVA mit Post-Hoc-Test.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

5.2.5 Validierung der genetisch modifizierten Mauslinien PF4cre-CypD^{f/f} und PF4cre-TMEM16F^{f/f}

Mittels genetischer Modifikation durch die Cre-Recombinase wurde eine Megakaryozyten- und damit Thrombozyten-selektive Deletion (PF4cre) der calciumabhängigen Phosphatidylserin-Scramblase TMEM16F/Anoctamin6 (PF4cre-TMEM16F^{f/f}) (Suzuki et al., 2010) und des mitochondrialen Transmembran-Proteins CypD (PF4cre-CypD^{f/f}) (Jobe et al., 2008) induziert. Der essenzielle Beitrag beider Proteine zur prokoagulanten Aktivierung ist belegt.

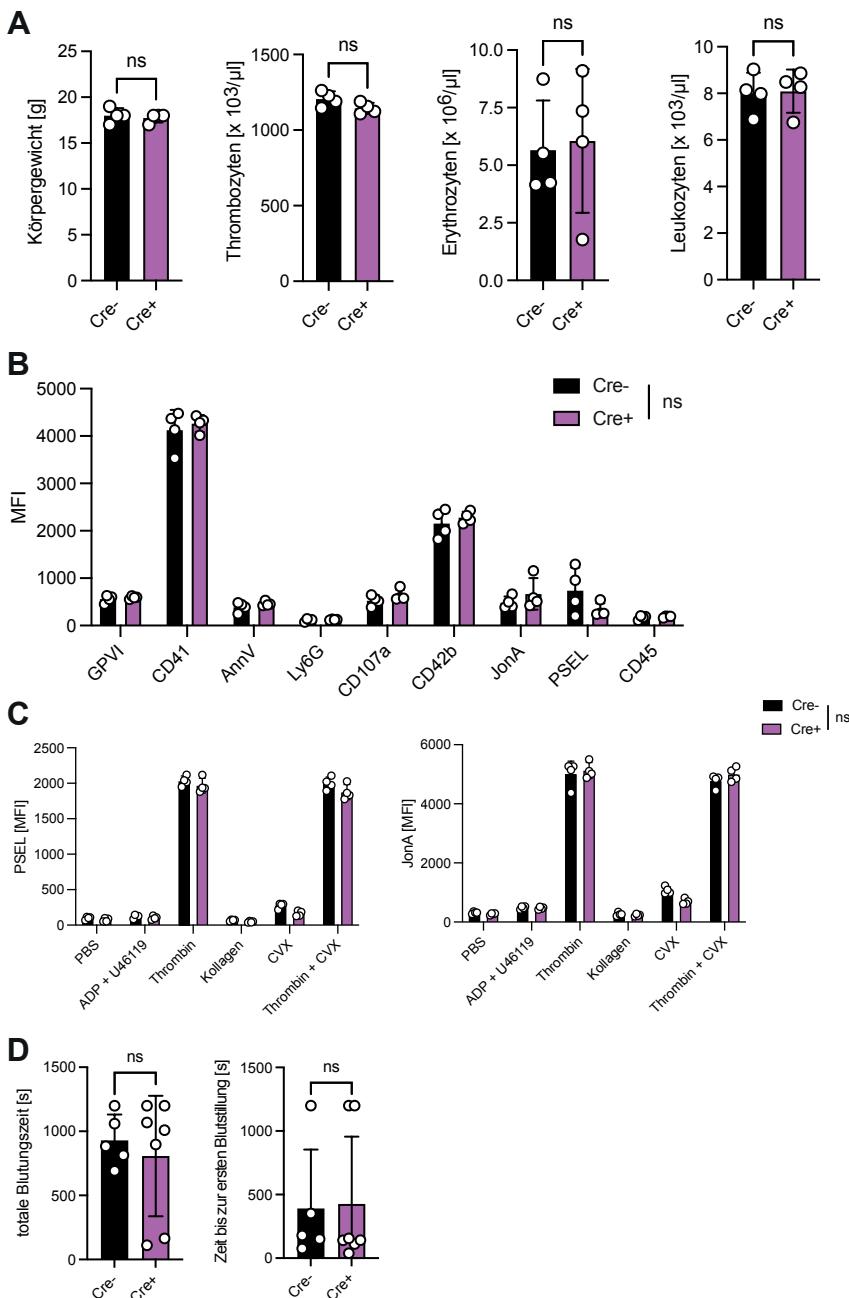
In den folgenden Abschnitten wurden die neu generierten Mauslinien in verschiedenen Validierungsversuchen unter physiologischen Bedingungen charakterisiert, um potenzielle genetische Veränderungen in weiteren Zellpopulationen auszuschließen und die resultierende Reduktion der prokoagulanten Aktivität der Knockout-Thrombozyten zu bestätigen.

5.2.5.1 Basisdaten unter physiologischen Bedingungen

Das Körpergewicht sowie die peripheren Thrombozyten-, Erythrozyten- und Leukozytenzahlen im Vollblut wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen Cre-positiven und -negativen Tieren der PF4cre-CypD^{f/f}- und TMEM16F^{f/f}-Linien auf (Abbildung 21/22A). Auch durchflusszytometrische Untersuchungen zur Expression relevanter Oberflächenrezeptoren in isolierten Knock-out (Cre-positiven) - und Kontroll (Cre-negativen) -Thrombozyten ergaben unter physiologischen Bedingungen keine signifikanten Abweichungen (Abbildung 21/22B). Wie bereits in früheren Studien belegt, zeigten sowohl CypD- als auch TMEM16F-defiziente Thrombozyten eine intakte Funktion der Degranulation und Integrin-Aktivierung, gemessen anhand der P-Selektin- und aktivierten GPIIbIIIa-Expression nach Stimulation mit den jeweiligen Agonisten (Baig et al., 2016) (Abbildung 21/22C). In

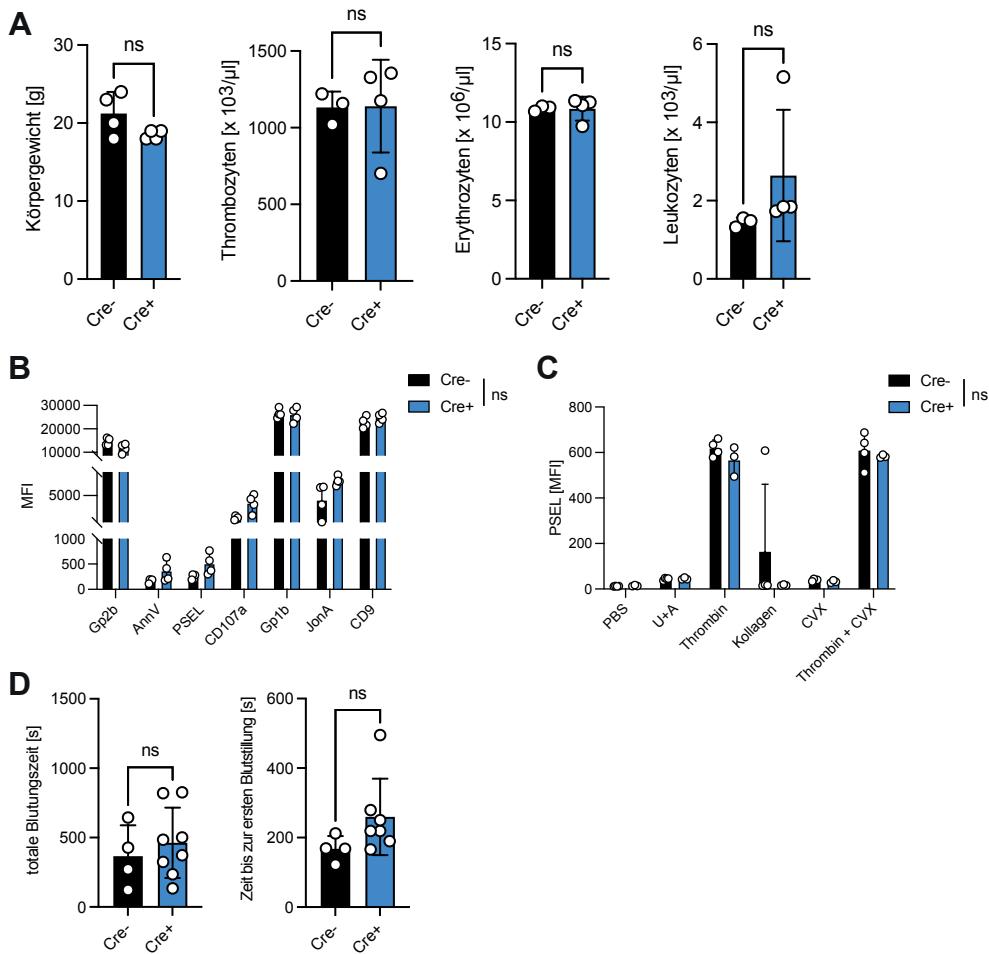
Experimenten zur Untersuchung der Blutgerinnung nach traumatischer Gefäßverletzung mittels Schwanzblutungszeit konnten in beiden Mauslinien keine Unterschiede in der Zeit bis zum Sistieren der Blutung festgestellt werden (Abbildung 21/22D). Interessanterweise wiesen TMEM16F-defiziente Mäuse – passend zu Patienten mit einer TMEM16F-Defizienz im Rahmen des Scott-Syndroms (Millington-Burgess & Harper, 2020) – einen nicht signifikanten Trend zu einer verlängerten Blutungszeit auf (Abbildung 22D).

Die neu generierten Mauslinien PF4cre-CypD^{f/f} und TMEM16F^{f/f} wiesen unter physiologischen Bedingungen keine Veränderung der peripheren Zellzahlen sowie der Thrombozyten-Rezeptorexpression und -Funktion im Rahmen der primären Hämostase auf.

Abbildung 21: Validierung der PF4cre-CypD^{fl/fl}-Mauslinie

(A) Quantifizierung des Körpergewichts sowie der peripheren Thrombozyten-, Erythrozyten- und Leukozytenzahlen von Cre-positiven und -negativen Tieren unter physiologischen Bedingungen, n=4. T-Test, ungepaart, zweiseitig. (B) Durchflusszytometrische Analysen der Ausgangsexpressionen der angegebenen Oberflächenrezeptoren von isolierten Knockout-Thrombozyten. n=4. Zweiseitiger ANOVA. (C) Quantifizierung der absoluten MFIs der P-Selektin-Expression und der GPIIbIIIA-Integrin-Aktivierung von isolierten Knockout-Thrombozyten nach Exposition gegenüber den angegebenen Agonisten. n=4. Zweiseitiger ANOVA. (D) Quantifizierung der gesamten Blutungszeit und der Zeit bis zum ersten Sistieren der Schwanzblutung. n = 5-7 pro Gruppe. T-Test, ungepaart, zweiseitig.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

Abbildung 22: Validierung der PF4cre-TMEM16F^{fl/fl}-Mauslinie

(A) Quantifizierung des Körpergewichts sowie der peripheren Thrombozyten-, Erythrozyten- und Leukozytenzahlen von Cre-positiven und -negativen Tieren unter physiologischen Bedingungen, n=3-4. T-Test, ungepaart, zweiseitig. (B) Durchflusszytometrische Analysen der Ausgangsexpressionen der angegebenen Oberflächenrezeptoren von isolierten Knockout-Thrombozyten. n=4. Zweiseitiger ANOVA. (C) Quantifizierung der absoluten MFIs der P-Selektin-Expression von isolierten Knockout-Thrombozyten nach Exposition gegenüber den angegebenen Agonisten. n=4. Zweiseitiger ANOVA. (D) Quantifizierung der gesamten Blutungszeit und der Zeit bis zum ersten Sistieren der Schwanzblutung. n = 4-8 pro Gruppe. T-Test, ungepaart, zweiseitig.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

5.2.5.2 Reduktion des prokoagulanten Potentials von CypD- oder TMEM16F-Knockout-Thrombozyten

Um die erfolgreiche genetische Ablation von prokoagulanten Thrombozyten durch Knockout von CypD und TMEM16F zu validieren, wurden isolierte Knockout-Thrombozyten in durchflusszytometrischen Analysen nach Aktivierung und in Migrationsexperimenten analysiert.

Die kombinierte Exposition gegenüber starken Agonisten wie Thrombin und Convulxin resultierte in beiden Mauslinien in einer signifikanten Reduktion der PS-Expression (Abbildung 23A). Dieses reduzierte prokoagulante Potenzial in Suspension wurde ebenfalls in Migrationsassays bestätigt. Trotz der signifikanten Verringerung der beobachteten prokoagulanten Aktivierung der Thrombozyten nach Kontakt mit Kollagen behielten sowohl CypD- als auch TMEM16F-defiziente Thrombozyten ihre Migrationsfähigkeit bei (Abbildung 23B).

Interessanterweise entwickelten migrierende TMEM16F-defiziente Thrombozyten bei Kontakt mit Kollagenfasern einen charakteristischen morphologischen Phänotyp (Abbildung 23C). Die typische ballonförmige Morphologie prokoagulanter Thrombozyten wurde durch eine vermehrte Ausbildung fadenförmiger Filopodien mit reduzierter PS-Exposition ersetzt (Abbildung 23C). Dieser bereits in früheren Arbeiten beschriebene Phänotyp (Fujii et al., 2015) könnte auf einen Funktionsverlust von TMEM16F zurückzuführen sein. Aktivierte Knockout-Thrombozyten waren nicht mehr in der Lage, PS auf die äußere Seite der Lipiddoppelschicht zu mobilisieren und die gebildeten PS-positiven Mikrovesikel von der Zellmembran abzuspalten (Abbildung 23C).

CypD und TMEM16F bilden eine wirksame molekulare Zielstruktur, um die prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten in Migrationsexperimenten und in Suspension nach Aktivierung mit starken Agonisten effektiv zu reduzieren.

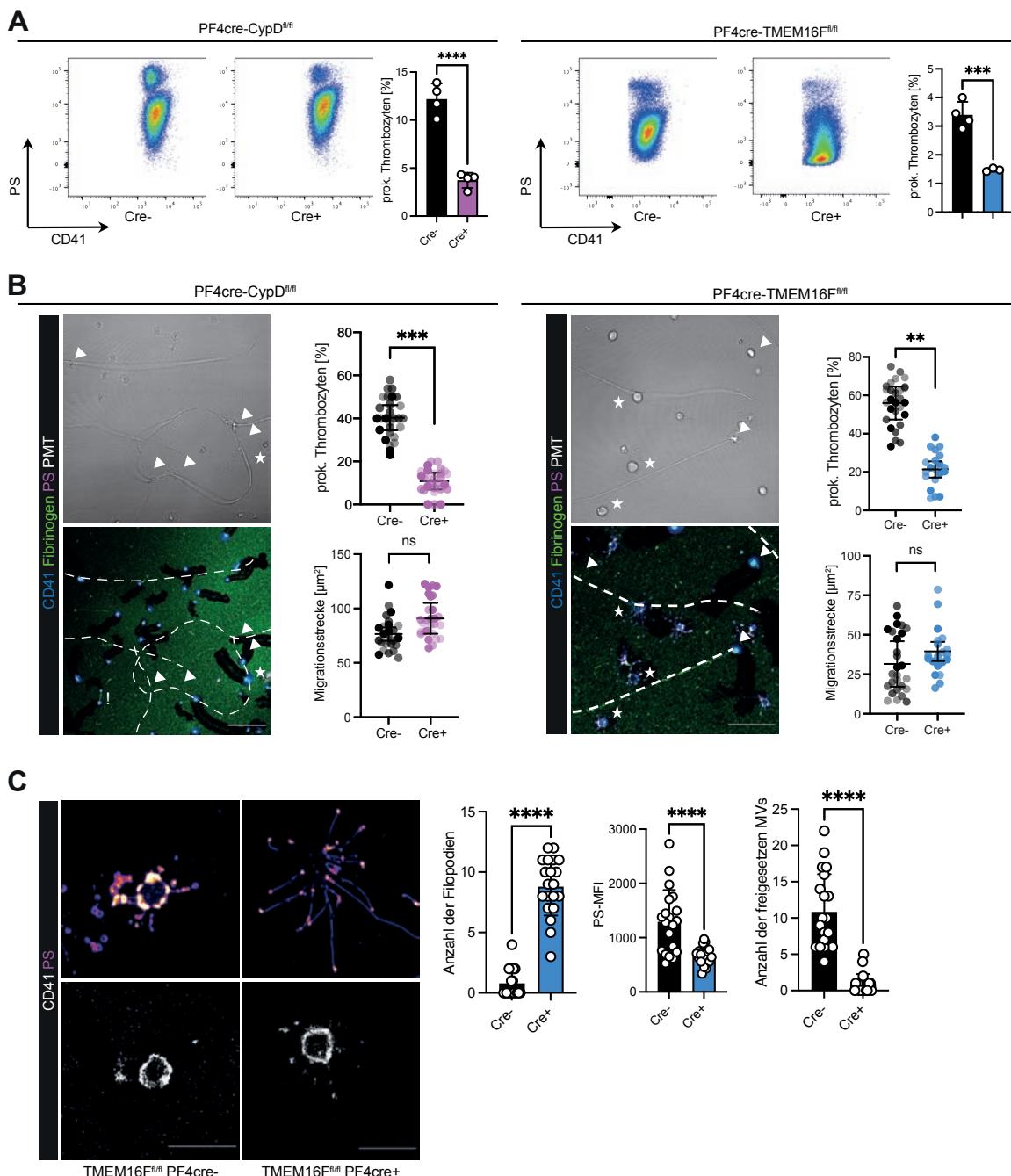


Abbildung 23: Genetische Ablation von CypD und TMEM16F reduziert das prokoagulante Potential von Thrombozyten *in vitro*

(A) Repräsentative Streudiagramme der PS-Expression und relative Quantifizierung der prokoagulanten Aktivierung von durchflusszytometrischen Analysen isolierter Thrombozyten aus CypD und TMEM16F Cre-positiven sowie Cre-negativen Mäusen als Kontrollgruppe, welche 30 Minuten bei RT mit Thrombin (0,1 U/l) und Convulxin (0,1 µg/ml) stimuliert wurden, n = 3-4, PS-Fär bemittel: mC1. T-Test, zweiseitig, ungepaart. (B) Repräsentative konfokale Aufnahmen von migrerenden murinen Knockout-Thrombozyten auf einer Albumin/Fibrinogen/Kollagen-I-Hybridmatrix, welche nach Kollagenkontakt häufig nicht prokoagulant aktiviert werden (weiße Pfeilspitzen) und relative Quantifizierung der prokoagulanten Aktivierung und zurückgelegten Migrationsstrecke dargestellt als SuperPlots von n = 3-4 Mäusen pro Cre-positiver oder -negativer Gruppe.

Maßstab 25 µm und 15 µm. PS-Färbemittel: mC1. T-Test, zweiseitig, ungepaart. (C) Repräsentative konfokale Aufnahmen der prokoagulant aktivierten Cre-negativen und Cre-positiven muri-nen Thrombozyten von PF4cre-TMEM16F^{f/f}-Tieren und zellbasierte Quantifizierung der Anzahl von Filopodien, freigesetzter Mikrovesikel (MVs) und der MFI der PS-Exposition. PS-Färbung: mC1. Maßstab 5 µm. T-Test, ungepaart, zweiseitig.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

5.2.5.3 Funktionelle Reduktion der Bindungskapazität von Gerinnungsfaktoren der CypD- oder TMEM16F-Knockout-Thrombozyten

Um abschließend zu bestätigen, dass die genetische Ablation von CypD oder TMEM16F nicht nur das prokoagulante Potenzial verringert, sondern auch zu einer funktionellen Reduktion der gerinnungsfördernden Aktivität führt, wurden Knockout- und Kontroll-Thrombozyten mithilfe des Thrombin-Umsatz-Assays analysiert. Der Verlust eines der beiden Proteine führte zu einem signifikanten Rückgang Thrombin-positiver Thrombozyten (Abbildung 24). Zusätzlich zeigten die TMEM16F-Knockout-Thrombozyten trotz prokoagulanter Aktivierung eine reduzierte Kapazität, Thrombin auf der Oberfläche umzusetzen (Abbildung 24). Die Verhinderung der TMEM16F-abhängigen PS-Exposition auf die äußere Thrombozyten-Membran verhindert eine Bindung von Calcium-Ionen an der negativ geladenen Oberfläche und die Interaktion mit Gerinnungsfaktoren wie Thrombin.

Zusammenfassend konnte durch verschiedene *in vitro* und *in vivo* Validierungsversuche nachgewiesen werden, dass die genetische Ablation von CypD und TMEM16F spezifisch die prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten reduziert und wirksam die funktionelle Bindung von Thrombin auf der Thrombozyten-Oberfläche verhindert. Die Verbindung zwischen der primären Hämostase und der plasmatischen Gerinnungskaskade wird dadurch effektiv inhibiert, was die Möglichkeit eröffnet, in weiteren *in vivo* Experimenten die Funktion der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten bei inflammatorischen Blutungen genauer zu untersuchen.

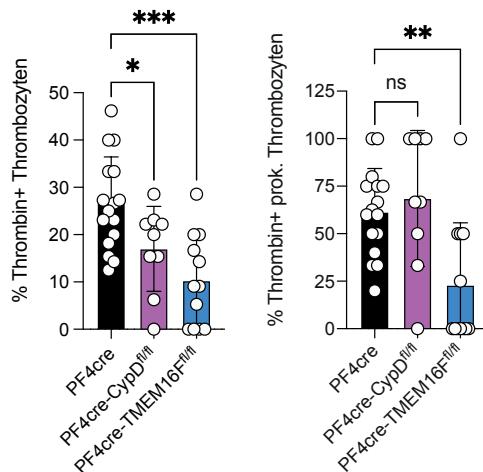


Abbildung 24: Reduzierte Bindungskapazität von Thrombin auf der Oberfläche von CypD- und TMEM16F-defizienten-Thrombozyten *in vitro*

Relative zellbasierte Quantifizierung der Thrombin-Positivität aller analysierten Thrombozyten und nur der prokoagulant aktivierten Thrombozyten pro Bildausschnitt in Migrationsexperimenten auf einer Kollagen-Hybridmatrix. In jeder Versuchsgruppe wurden über 100 Zellen von mindestens n=2 Tieren analysiert. Einseitiger-ANOVA mit Post-Hoc-Test.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

5.2.6 Genetische Ablation der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten agraviert inflammatorische Blutungen im ALI-Modell

Nach Validierung der genetisch modifizierten Mauslinien PF4cre-CypD^{fl/fl} und PF4cre-TMEM16F^{fl/fl} wurde im Modell der (sub)akuten Lungenschädigung spezifisch der Einfluss der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten auf inflammationsbedingte Blutungen untersucht. Anhand der bisher erhobenen *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass die lokale Ablagerung von Gerinnungsfaktoren an Stellen entzündungsbedingter Endothelschädigungen Mikroblutungen in der Lunge verhindert. Diese werden besonders durch prokoagulant aktivierte Thrombozyten rekrutiert, welche als mobile Wächter der vaskulären Integrität fungieren.

Um diese protektive Funktion von prokoagulanten Thrombozyten bei inflammatorischen Blutungen nachzuweisen, wurden Experimente zur (sub)akuten Lungenschädigung an den Mauslinien PF4cre-CypD^{fl/fl} und PF4cre-TMEM16F^{fl/fl} durchgeführt (Abbildung 25/26A). Die Thrombozyten-spezifische genetische Ablation von CypD und damit die Hemmung der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten verstärkte 24 Stunden nach LPS-Exposition die entzündungs-

assoziierte alveoläre Hämorrhagie (Abbildung 25B). Die durchflusszytometrische Analyse des BAL-Fluids zeigte einen Anstieg der intraalveolären Erythrozyten-Konzentration in Cre-positiven Knockout-Tieren im Vergleich zu Cre-negativen Kontrollen, während die Leukozyten-Konzentration unverändert blieb (Abbildung 25C).

Die geringe Anzahl einzelner, nicht leukozytengebundener Thrombozyten im BAL-Fluid bestätigte, dass der Anstieg der pulmonalen Blutung nicht auf ein versehentliches stumpfes Gefäßtrauma im Rahmen der mikrochirurgischen Präparation des Halses mit direkter Proben-Entnahme des BAL-Fluids über die Trachea zurückzuführen war (Abbildung 25C). Zudem zeigte sich keine signifikante Änderung der peripheren Thrombozyten- und Leukozytenzahlen zwischen CypD-Knockout-Mäusen und Cre-negativen Kontrollen nach akutem Lungenversagen. Dies schließt eine Thrombozytopenie oder Leukozytose als mögliche Ursachen der erhöhten Lungenblutung aus (Abbildung 25C). Ebenso die Anzahl infiltrierender Neutrophile in das entzündlich veränderte Lungengewebe unterschied sich nicht signifikant (Abbildung 25C).

Immunfluoreszenzfärbungen der LPS-behandelten Lungen bestätigten einen signifikanten Anstieg der alveolären Blutung bei Mäusen mit CypD-defizienten Thrombozyten, während die pulmonale Rekrutierung von Thrombozyten und Neutrophilen zwischen den Genotypen unverändert blieb (Abbildung 25D).

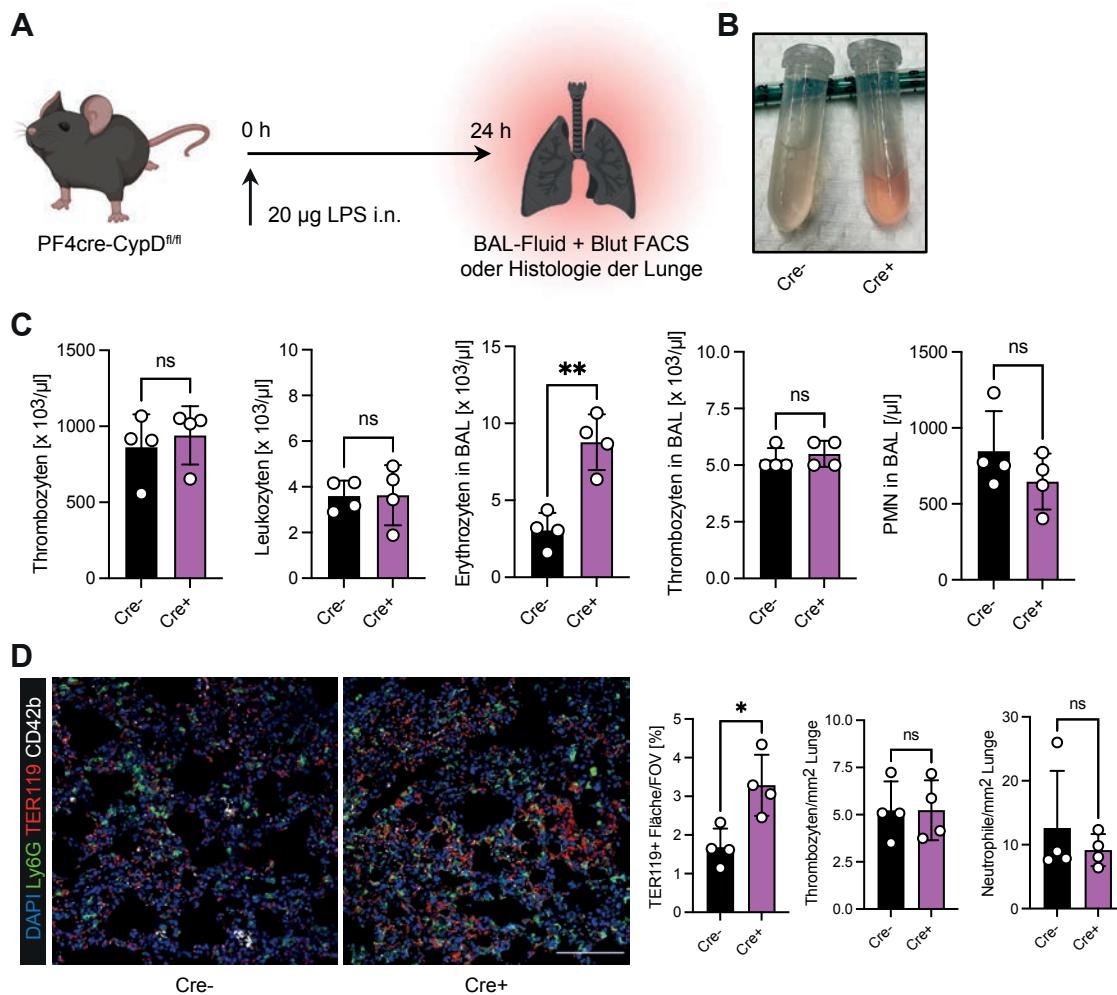


Abbildung 25: Genetische Ablation von CypD verstärkt inflammatorische Blutungen in der Lunge

(A) Experimentelles Schema zum Modell der (sub)akuten Lungenschädigung in der thrombozyten-spezifischen CypD-Knockout-Mauslinie. (B) Repräsentatives Bild von BAL-Fluid der Cre-positiven Knockout-Mäuse im Vergleich zu Cre-negativen Kontrolltieren. (C) Durchflusszytometrische Analyse der peripheren Thrombozyten- und Leukozytenzahlen im Blut und der Erythrozyten-, Thrombozyten- und Neutrophilenzahlen des BAL-Fluids 24 Stunden nach LPS-Applikation. T-Test, ungepaart, zweiseitig. (D) Repräsentative konfokale Aufnahmen von Immunfluoreszenz-gefärbten Lungenschnitten der CypD-Knockout-Mäuse und Quantifizierung der alveolären Blutung (TER119-positive Fläche) sowie Rekrutierung von Neutrophilen und Thrombozyten in das Lungengewebe. Maßstab 100 µm. T-Test, zweiseitig, ungepaart.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

TMEM16F-Knockout-Mäuse zeigten ebenfalls einen verstärkten Blutungsphänotyp nach pulmonaler LPS-Exposition. Sowohl durchflusszytometrische Analysen des BAL-Fluids als auch histologische Untersuchungen von Lungengewebe-schnitten zeigten eine deutliche Zunahme der pulmonalen Blutung (Abbildung 26B-D). Ebenfalls konnten im Vergleich zu peripheren Thrombozytenzahlen kaum freie Thrombozyten nachgewiesen werden (Abbildung 26C). Interessanterweise zeigten genauere Analysen des BAL-Fluids eine signifikant erhöhte Anzahl an infiltrierenden PNAs in Cre-positiven TMEM16F-Knockout-Mäusen (Abbildung 26C). Entsprechend den Ergebnissen bei CypD-defizienten Mäusen zeigten weder die Rekrutierung von Thrombozyten und Neutrophilen in die Lunge noch die peripheren Thrombozyten- und Leukozytenzahlen in TMEM16F-Knockout-Tieren 24 Stunden nach LPS-Exposition signifikante Unterschiede (Abbildung 26C-D).

Diese Daten deuten darauf hin, dass die prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten zur Verhinderung von transmigrationsassoziierten pulmonalen Blutungen durch Neutrophile beiträgt und damit eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität im Rahmen von inflammatorischen Erkrankungen einnimmt.

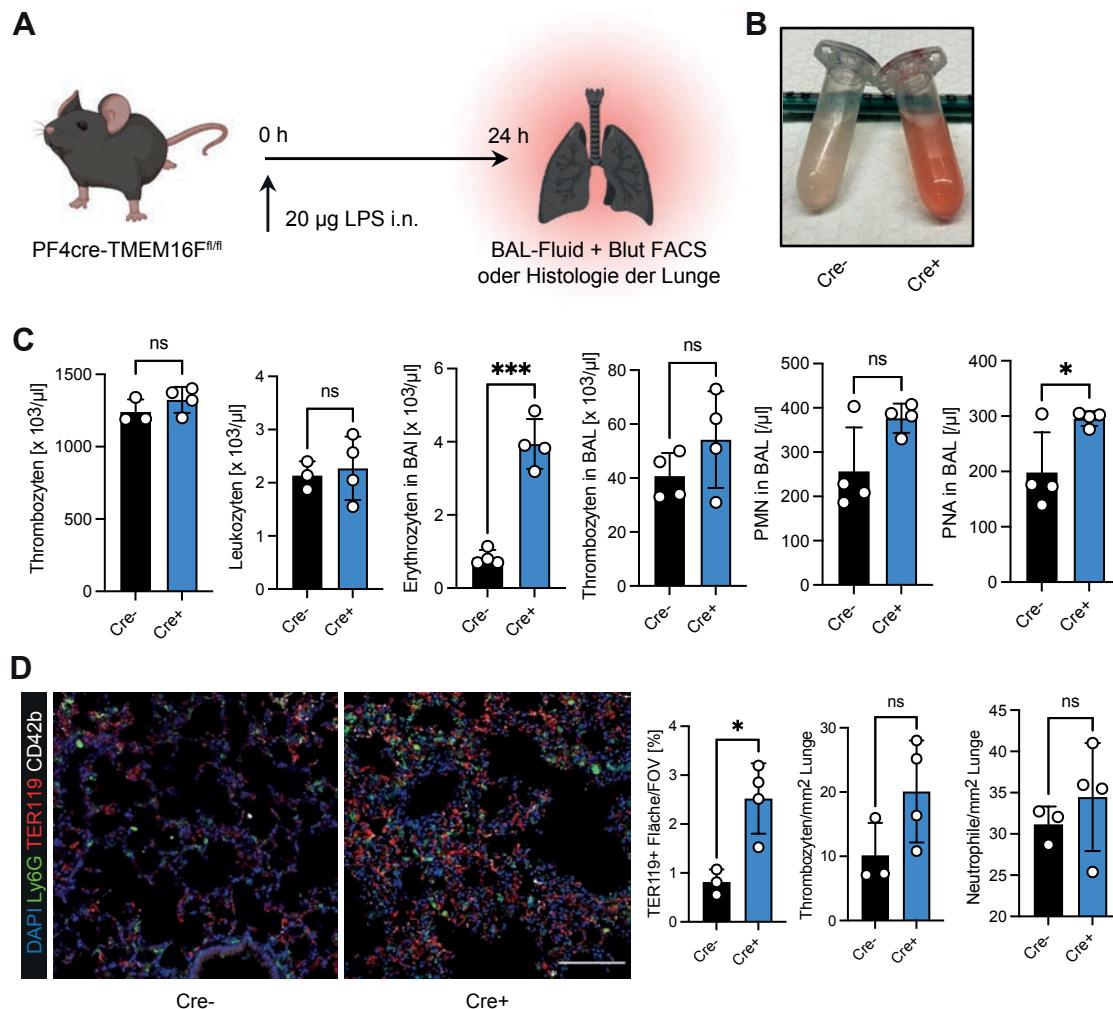


Abbildung 26: Genetische Ablation von TMEM16F agraviert entzündungsbedingte Blutungen in der Lunge

(A) Experimentelles Schema zum Modell der (sub)akuten Lungenschädigung in der Thrombozyten-spezifischen TMEM16F-Knockout-Mauslinie. (B) Repräsentatives Bild des BAL-Fluids von Cre-positiven Knockout-Mäusen und Cre-negativen Kontrolltieren. (C) Durchflusszytometrische Analyse der peripheren Thrombozyten- und Leukozytenzahlen und der Erythrozyten-, Thrombozyten-, Neutrophilen- und PNA-Zahlen im BAL-Fluid 24 Stunden nach der LPS-Exposition. n = 4. T-Test, zweiseitig, ungepaart. (D) Repräsentative konfokale Aufnahmen von Immunfluoreszenzgefärbten Lungenschnitten von TMEM16F-Knockout-Mäusen und Quantifizierung der alveolären Blutung (TER119-positive Fläche) sowie Rekrutierung von Neutrophilen und Thrombozyten in die Lunge. Maßstab 100 µm. T-Test, zweiseitig, ungepaart.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

5.2.7 Pharmakologische Inhibition der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten durch kombinierte Hemmung von GPIIbIIIa und GPVI agraviert inflammatorische Blutungen

Abschließend wurde untersucht, ob eine Hemmung der *in vitro* identifizierten Signalwege der prokoagulanten Aktivierung (Kapitel 5.1.3.2) auch *in vivo* zu einer Reduktion prokoagulanter Thrombozyten führt und konsekutiv inflammatorische Blutungen verstärkt.

Zunächst wurden die effektive Blockade der thrombozytären Oberflächenrezeptoren GPIIbIIIa durch Tirofiban (Neumann et al., 2001) sowie die Depletion von GPVI mittels des Antikörpers JAQ1 (Massberg et al., 2003) in Mäusen evaluiert. 72 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 100 µg JAQ1 zeigte sich in isolierten Thrombozyten eine signifikante Reduktion der durchflusszytometrisch bestimmten Basisexpression von GPVI im Vergleich zu Tieren, welche mit einem IgG2a-Isotyp-Kontrollantikörper behandelt wurden (Abbildung 27A). Isolierte Thrombozyten von Wildtyp-Mäusen, die mit 1 µg/ml Tirofiban inkubiert wurden, wiesen nach Stimulation mit Convulxin eine deutliche Verringerung der Oberflächenexpression von JonA, einem Surrogat-Marker für das aktivierte Integrin GPIIbIIIa, im Vergleich zu einer PBS-behandelten Kontrollgruppe auf (Abbildung 27B).

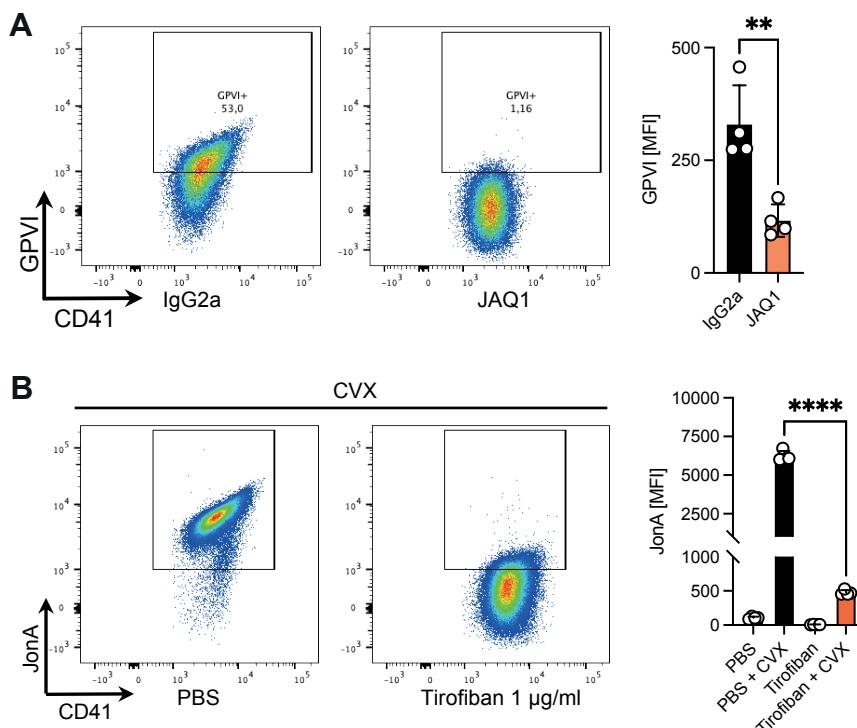


Abbildung 27: Validierung der effektiven Inhibition von GPIIbIIIa und GPVI *in vitro*

(A) Repräsentative Streudiagramme aus durchflusszytometrischen Experimenten mit isolierten muriner Thrombozyten, welche mit dem GPVI-blockierenden Antikörper JAQ1 oder einem IgG2a-Isotyp-Kontrollantikörper behandelt wurden (100 µg i.p. 72 Stunden vor der Thrombozyten-Isolierung). Quantifizierung der absoluten MFI-Werte für GPVI. T-Test, ungepaart, zweiseitig. (B) Repräsentative Streudiagramme aus durchflusszytometrischen Analysen isolierter muriner Thrombozyten nach Inkubation mit PBS oder dem GPIIbIIIa-Antagonisten Tirofiban (1 µg/ml) und anschließender Aktivierung mit Convulxin. Quantifizierung der absoluten MFI-Werte für aktivierte GPIIbIIIa (JonA). Einseitiger ANOVA.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der pharmakologischen *in vivo* Hemmung von GPIIbIIIa und GPVI durch Tirofiban und JAQ1 auf inflammatorische Blutungen im Modell des (sub)akuten Lungenschadens untersucht. Der Antikörper JAQ1 bzw. die Isotyp-Kontrolle wurden bereits 72 Stunden vor der LPS-Gabe intraperitoneal injiziert, um eine ausreichende Depletion von GPVI sicherzustellen und eine Normalisierung der in Studien beschriebenen vorübergehenden Thrombozytopenie zu ermöglichen (Schulte et al., 2003). Tirofiban und 0,9 % NaCl-Lösung als Vehikel wurden aufgrund der geringen klinischen Halbwertszeit intravenös kurz vor sowie 4 und 8 Stunden nach LPS-Applikation verabreicht (Abbildung 28A). Der klinische Zustand der Mäuse, der anhand des Sepsis-Scores erhoben wurde, blieb zwischen den verschiedenen Behandlungsbedingungen vergleichbar (Abbildung 28C).

Nur eine kombinierte Blockade mit beiden Inhibitoren, JAQ1 und Tirofiban, führte in Analysen des BAL-Fluids von behandelten Bl6-Wildtyp-Mäusen 24 Stunden nach intranasaler LPS-Applikation zu einer verstärkten pulmonalen Blutung (Abbildung 28B, D). Die alveolare Neutrophilenrekrutierung unterschied sich dabei nicht zwischen den Versuchsgruppen. Zudem wurden im BAL-Fluid kaum freie Thrombozyten detektiert, was eine Kontamination der Probe durch traumatische Gefäßverletzung unwahrscheinlich macht (Abbildung 28D).

Interessanterweise zeigten durchflusszytometrische Analysen von Vollblutproben einen signifikanten Rückgang zirkulierender peripherer prokoagulanter Thrombozyten im Blutkreislauf von Mäusen, die einer dualen Inhibition von GPIIbIIIa und GPVI unterzogen wurden (Abbildung 28E). Die Anzahl der prokoagulanten Thrombozyten korrelierte dabei in einem linearen Regressionsmodell negativ mit der Schwere der entzündlichen Blutungen, bewertet durch die Anzahl der Erythrozyten pro μl BAL-Fluid (Abbildung 28E).

Die verstärkte alveolare Mikroblutung, die nach dualer Inhibition beobachtet wurde, konnte immunhistologisch bestätigt werden. Auch zwischen den Behandlungsgruppen zeigten sich keine Unterschiede in der Rekrutierung von Neutrophilen und Thrombozyten in die Lunge (Abbildung 28F). Wichtig hervorzuheben ist, dass weder die Behandlung mit Tirofiban noch mit JAQ1 die Migration der Thrombozyten *in vitro* beeinflusste (Kapitel 5.1.3.2) und somit den beobachteten Blutungsphänotypen erklären könnte.

Es lässt sich festhalten, dass die effektive pharmakologische Inhibition der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten *in vivo* durch kombinierte Blockade von GPIIbIIIa und GPVI inflammatorische Blutungen in der Lunge verstärkt.

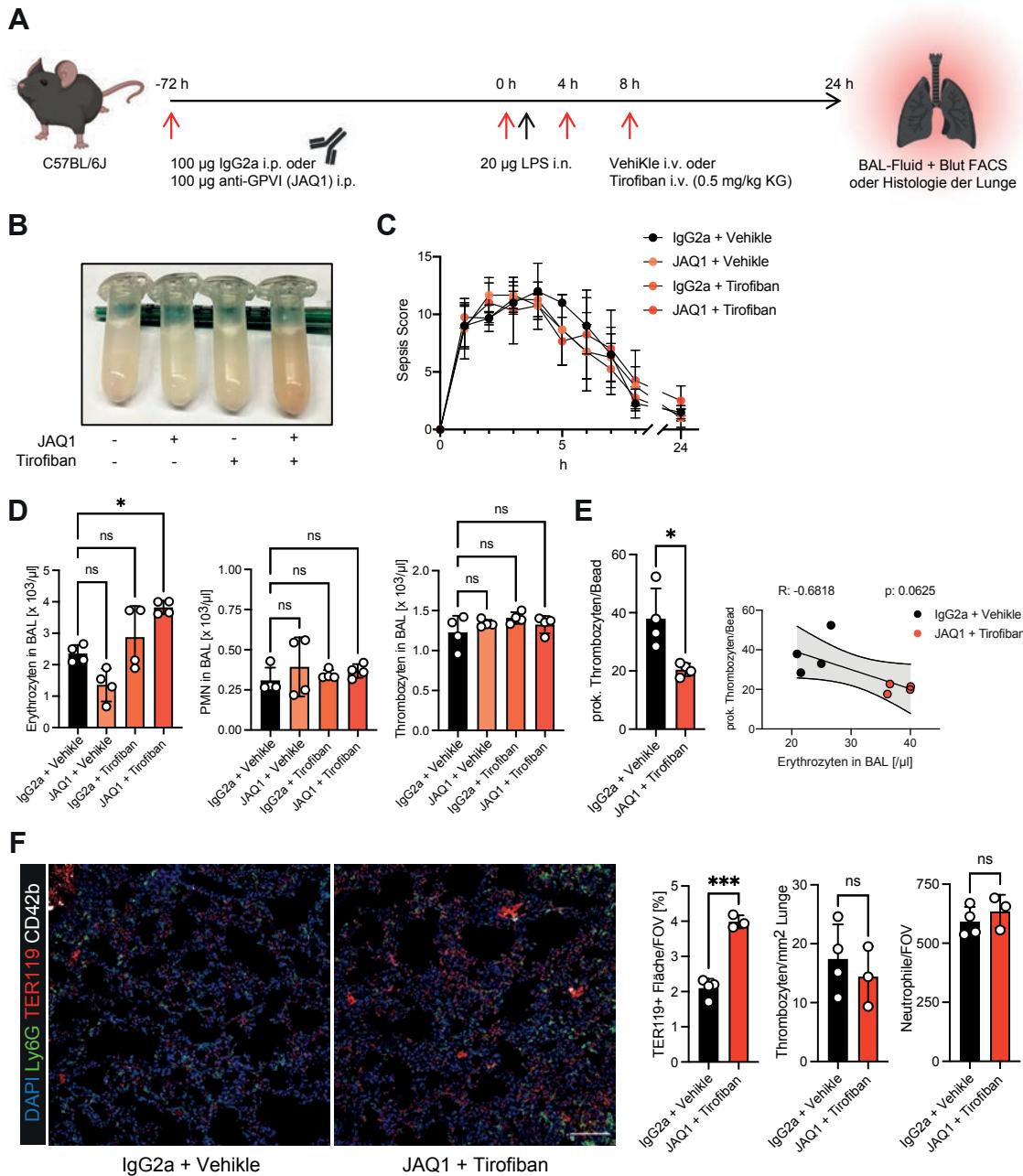


Abbildung 28: Pharmakologische Hemmung der prokoagulanten Aktivierung durch kombinierte Blockade von GPIIbIIIa und GPVI verstärkt entzündliche Blutungen *in vivo*

(A) Experimentelles Schema des Modells der (sub)akuten Lungenschädigung in BI6-Wildtyp-Mäusen, die mit JAQ1 (GPVI-blockierender Antikörper) oder Isotyp-Antikörper (roter Pfeil) 72 Stunden vor der LPS-Applikation (schwarzer Pfeil) behandelt wurden, sowie mit Vehikel- oder Tirofiban-Injektionen (rote Pfeile) 0, 4 und 8 Stunden nach LPS-Gabe. (B) Repräsentatives Bild des gesammelten BAL-Fluids aus den verschiedenen Versuchsgruppen. (C) Klinische Sepsis-Scores der einzelnen Tiere in den Behandlungsgruppen über 24 Stunden nach LPS-Applikation.

Die Sepsis-Scores beinhalten Aussehen, Aktivität, Reaktionsfähigkeit und Atemmuster. Einseitiger ANOVA. (D) Durchflusszytometrische Analyse der Erythrozyten-, Neutrophilen- und Thrombozytenzahlen im BAL-Fluid. n = 4. Einseitiger ANOVA mit Post-Hoc-Test. (E) Durchflusszytometrische Messung peripher zirkulierender prokoagulanter Thrombozyten im Blut, normalisiert auf „Counting Beads“ und lineare Regressionsanalyse der Korrelation zwischen zirkulierenden prokoagulanten Thrombozyten und übermäßiger alveolärer Blutung. PS-Färbemittel: mC1. T-Test, zweiseitig, ungepaart. (F) Repräsentative konfokale Aufnahme von Immunfluoreszenz-gefärbten Lungenschnitten von JAQ1- und Tirofiban-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe und Quantifizierung der alveolären Blutungen (TER119 positive Fläche) sowie Rekrutierung von Thrombozyten und Neutrophilen in die Lunge. Maßstab 100 µm. n = 4. T-Test, zweiseitig, ungepaart.

Adaptiert nach (Kaiser et al., 2022).

Die Ergebnisse dieser Studie, die *in vivo* gewonnen wurden, werden abschließend zusammengefasst. In dem Modell der LPS-induzierten sterilen Peritonitis konnten im Rahmen einer systemischen Inflammationsreaktion sowohl Thrombozyten-assoziierte Fibrin(ogen)-Ablagerungen im entzündlich veränderten Lungengewebe als auch lokale PS-positive, prokoagulante Thrombozyten nach Interaktion mit Kollagen nachgewiesen werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die gezielte Induktion prokoagulanter Thrombozyten in betroffenen Organen wie der Lunge die Rekrutierung von Gerinnungsproteinen verstärkt und die Bildung von Mikrothromben fördert, was zur Prävention inflammatorischer Blutungen beitragen könnte. Diese Annahme wurde in einem neu entwickelten murinen Modell der (sub)akuten Lungenschädigung bestätigt, welches inflammatorische Mikroblutungen, die durch Neutrophilen-Transmigration induziert werden, untersucht. Sowohl Thrombozytopenie als auch Antikoagulation durch Rivaroxaban und Argatroban führten zu einer Zunahme inflammatorischer Blutungen, ohne die Neutrophilen-Rekrutierung zu beeinflussen. Ebenso führte die spezifische Reduktion der prokoagulanten Aktivität von Thrombozyten in den neu generierten Mauslinien PF4cre-CypD^{f/f} und TMEM16F^{f/f} zu einer vermehrten pulmonalen Hämorrhagie. Eine duale Hemmung der *in vitro* identifizierten Signalwege GPIIbIIIa und GPVI verringerte die Zahl der peripher zirkulierenden prokoagulanten Thrombozyten, was die inflammatorischen Blutungen in der Lunge aggravierte. Prokoagulante Thrombozyten entstehen infolge von entzündungsbedingten Veränderungen der Blutgefäße durch die Wechselwirkung mit Kollagen und die Aktivierung der Rezeptorsignalwege GPIIbIIIa und GPVI, wodurch sie eine wichtige Schutzfunktion zur Erhaltung der vaskulären Integrität übernehmen.

6. Diskussion

Thrombozyten sind aufgrund ihrer kurzen Reaktionszeit und ihrer hohen Konzentration im peripheren Blut die erste zelluläre Antwort auf traumatische oder Inflammationsvermittelte Endothelschädigungen. Neuere Studien zeigen, dass Thrombozyten im Rahmen von Entzündungsreaktionen wichtige immunologische Funktionen erfüllen und dabei ein spezifisches Set von Rezeptoren und Signalwegen nutzen (Nicolai et al., 2024). Anders als bei der klassischen Hämostase, die mit einer Thrombusbildung einhergeht, werden bei entzündlichen Prozessen nur einzelne Thrombozyten an die Gefäßwand rekrutiert (Gros et al., 2015; Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020). Diese Thrombozyten sind wesentlich für die Erhaltung der lokalen Gefäßintegrität verantwortlich, da eine schwere Thrombozytopenie zu einer Erhöhung der endothelialen Permeabilität führt und somit zu entzündlichen Blutungen führen kann (Goerge et al., 2008; Gupta et al., 2020; Ho-Tin-Noé et al., 2011; Ho-Tin-Noe et al., 2009). Dennoch ist bislang unzureichend verstanden, wie einzelne Thrombozyten Endotheldefekte effektiv verschließen, ohne dabei die Bildung eines Thrombus mit möglichen Nebenwirkungen auszulösen (Ho-Tin-Noé et al., 2018).

6.1 Rolle von GPVI und GPIIbIIIa in der inflammatorischen Hämostase der Lunge

Der identifizierte Mechanismus der prokoagulanten Aktivierung migrierender Thrombozyten über die Rezeptorkaskaden GPVI und GPIIbIIIa zielt auf die spezifische Rekrutierung der Gerinnungskaskade an Stellen von Endotheldefekten ab, ohne eine systemische Aktivierung der Koagulation auszulösen. Entsprechend führte die duale Blockade von GPVI und GPIIbIIIa *in vivo* zu einer Reduktion zirkulierender prokoagulanter Thrombozyten und zu verstärkten Blutungen in die Lunge nach LPS-Exposition.

Bisher wurde angenommen, dass der Oberflächenrezeptor GPVI auf Thrombozyten entbehrlich für die Verhinderung von inflammationsvermittelten Blutungen sei. Studien mit GPVI-Knockout-Tieren oder Antikörper-vermittelter Blockade von GPVI konnten aufzeigen, dass die alleinige Inhibition von GPVI pulmonale Blutungen in dem murinen ALI-Modell nicht verstärkt (Claushuis et al., 2018; Gros et al., 2015; Ho-Tin-Noé et al., 2018; Rayes et al., 2018). Darüber hinaus

identifizierte eine aktuelle Studie GPVI als einen entscheidenden Vermittler der Neutrophilen-Rekrutierung sowie der Bildung von PNAs und NETs, was nachweislich zur Entstehung inflammatorischer Blutungen in der Lunge beiträgt (Burkard et al., 2023).

Ebenso ist die Rolle von GPIIbIIIa in der inflammatorischen Hämostase der Lunge nicht eindeutig geklärt. Studien konnten aufzeigen, dass die pharmakologische Inhibition von GPIIbIIIa durch den kompetitiv und reversibel bindenden Rezeptor-Antagonisten Integrillin oder einen direkten Rezeptor-blockierenden Antikörper keinen signifikanten Effekt auf entzündliche Blutungen, Plasmaaustritt oder die alveoläre Neutrophilen-Rekrutierung hat (Grommes et al., 2012; Rayes et al., 2018). Eine weitere kürzlich veröffentlichte Studie hat den Einfluss der genetischen Ablation von GPIIbIIIa in Knochenmark-chimären Mäusen auf LPS-induzierte inflammatorische Blutung untersucht und einen verstärkten Austritt von Erythrozyten in das Lungengewebe beobachtet (Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020). Dieser beobachtete Blutungsphänotyp könnte jedoch auch auf den Verlust der Migrationsfähigkeit von GPIIbIIIa-defizienten Thrombozyten zurückzuführen sein, welcher unter pharmakologischer Inhibition mit reversiblen und kompetitiven Antagonisten wie Integrillin oder Tirofiban nicht auftritt (Gaertner et al., 2017).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein signifikanter Anstieg der pulmonalen Hämorrhagie im ALI-Modell nur bei duality pharmakologischer Inhibition mittels Rezeptor-blockierenden GPVI-Antikörper JAQ1 und kompetitiven GPIIbIIIa-Rezeptor-Antagonisten Tirofiban beobachtet. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass weder die einzelne noch die duale Hemmung eines der Rezeptoren die Migrationsfähigkeit von Thrombozyten *in vitro* beeinträchtigte.

6.2 Einfluss verschiedener Thrombozyten-Rezeptoren und Signalwege auf verschiedene Modelle inflammatorischer Blutungen

Studien haben eine erhebliche Heterogenität und Redundanz der beteiligten thrombozytären Rezeptoren und Signalkaskaden in inflammatorischen Blutungen aufgezeigt (Depermann, 2018; Ho-Tin-Noé et al., 2018). Die Wirksamkeit spezifischer Rezeptoren bei der Prävention inflammatorischer Blutungen ist dabei maßgeblich abhängig vom jeweiligen Organmodell und der betroffenen

Mikrovaskulatur. Diese Abhängigkeit erklärt sich durch die unterschiedlichen Eigenschaften des Endothels sowie durch die spezifischen hämodynamischen Bedingungen in den jeweiligen Gefäßbetten (Baeyens et al., 2016). Die Interaktion von Thrombozyten und Endothelzellen durch spezifische Rezeptoren spielt eine zentrale Rolle in der Modulation von Entzündungsreaktionen und der Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion (Siegel-Axel & Gawaz, 2007). In Abhängigkeit von Gewebe und Organstruktur können Unterschiede in der Dichte, Spezifität und Signaltransduktion der Rezeptoren auftreten, die die Effektivität der Prävention inflammatorischer Blutungen wesentlich beeinflussen. Neben den in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren GPIIbIIIa und GPVI sind auch weitere Glykoproteine wie der C-Type Lectin-like Rezeptor 2 (CLEC-2) und der GPIb-IX-V-Komplex im Kontext inflammatorischer Blutungen relevant. Die grafische Darstellung in Abbildung 29 fasst die Interaktionen und nachgeschalteten Signalkaskaden in verschiedenen Modellen inflammatorischer Blutungen zusammen.

Die Hemmung von GPIIbIIIa bei (sub)akuter Lungenschädigung, lymphozytärer Choriomeningitis-Virus (LCMV) -Infektion, zerebraler Ischämie-Reperfusions-schädigung (IRI) und Kremaster-Entzündung mittels direkter Rezeptor-Antikörper oder durch Ganzkörper-Knockout war ausreichend, um inflammatorische Blutungen zu verstärken (Goerge et al., 2008; Ho-Tin-Noé et al., 2009). In einem Modell der Tumor-Mikrovaskulatur führte die Inhibition von GPVI mittels blockierenden Antikörper JAQ1 zu einer vermehrten Induktion intratumoraler Blutungen und erhöhte die Wirksamkeit der Chemotherapie (Volz et al., 2019). Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigten jedoch, dass nur die kombinierte pharmakologische Hemmung von GPIIbIIIa und GPVI zu einer Verstärkung des Blutungsphänotyps im Modell der (sub)akuten Lungenschädigung führte. Die GPIIbIIIa *outside-in* Signalkaskade kann effektiv durch den Ga13/c-Src/14-3-3 ζ -Komplex sowie Arpc2, welcher für die Aktin-Nukleation und Lamellipodien-Bildung relevant ist, beeinflusst werden (Kaiser, Anjum, et al., 2023; Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020). Die nachgeschalteten Signalwege von GPIIbIIIa und GPVI erhöhen den intrazellulären Calcium-Einstrom in einer Syk- und Phospholipase Cy2 (PLC γ 2) -abhangigen Weise, welche zur PS-Expression auf der äußeren Thrombozyten-Membran führt (Gupta et al., 2020; Pircher et al., 2019). Weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation identifizierten CypD, einen Bestandteil der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitionsapore (mPTP), und TMEM16F, eine

calciumabhängige Scramblase, als relevante Effektoren für die prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten. Eine genetische Inhibition dieser Zielmoleküle führte zu verstärkten inflammatorischen Blutungen in der Lunge. Zusätzlich wurde die lokale Rekrutierung von Gerinnungsfaktoren auf PS-positiven prokoagulanten Thrombozyten durch die Antikoagulantien Rivaroxaban und Argatroban gegen die Gerinnungsfaktoren IIa und Xa effektiv gehemmt, resultierend in einer verstärkten pulmonalen Hämmorrhagie. GPIb kann durch einen Ganzkörper-Knockout oder durch Blockade des Liganden vWF bei (sub)akuten Lungenschädigungen und der dermalen revers-passiven Arthus-Reaktion (rpA) die Entzündungsblutungen verstärken (Hillgruber et al., 2015; Ho-Tin-Noé et al., 2009). Es ist bekannt, dass CLEC-2 akute Lungenschäden durch die Podoplanin-vermittelte Interaktion mit Alveolar-Makrophagen abschwächt (Lax et al., 2017). Allerdings scheinen CLEC-2-defiziente Mäuse keinen Einfluss auf den Schweregrad entzündungsbedingter Blutungen zu haben. Die Hemmung der nachgeschalteten Signaltransduktion durch das Adapterprotein SH2-Domain-containing Leukozyten-Protein 76 kDa (SLP-76) war ausreichend, um inflammatorische Blutungen bei (sub)akuter Lungenschädigung zu verstärken (Boulaftali et al., 2013), während bei dermaler rpA eine gleichzeitige Blockade von CLEC-2 oder dessen Liganden Podoplanin und GPVI erforderlich war (Boulaftali et al., 2013; Herzog et al., 2013; Rayes et al., 2018; Rayes et al., 2019). Die gleichzeitige genetische Ablation sowohl der Alpha- als auch der elektronendichten Thrombozyten-Granula war notwendig, um die inflammatorische Hämostase zu beeinflussen, beispielsweise bei zerebraler Ischämie-Reperfusionsschädigung (Deppermann et al., 2017).

Unklar bleibt jedoch, in welchem Ausmaß die kombinierte Hemmung der hier vorgestellten Rezeptoren das prokoagulante Potenzial der Thrombozyten beeinflusst und welche organ- und gefäßspezifischen Effekte durch die endothelspezifische Heterogenität und die mechanischen Flusseigenschaften bedingt werden. Das Endothel verschiedener Organe weist spezifische morphologische und funktionelle Anpassungen auf, die durch Faktoren wie Blutflussgeschwindigkeit, Scherkräfte und chemische Signale moduliert werden. Diese Unterschiede könnten zu unterschiedlichen Rezeptoraktivitäten führen und daher die Regulierung von entzündlichen Prozessen beeinflussen. Weiterführende Untersuchungen zur prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten in verschiedenen

Organmodellen, unter Berücksichtigung lokaler endothelialer und hämodynamischer Einflussfaktoren, könnten neue Einblicke in die funktionelle Redundanz der Mechanismen zur Prävention inflammatorischer Blutungen liefern.

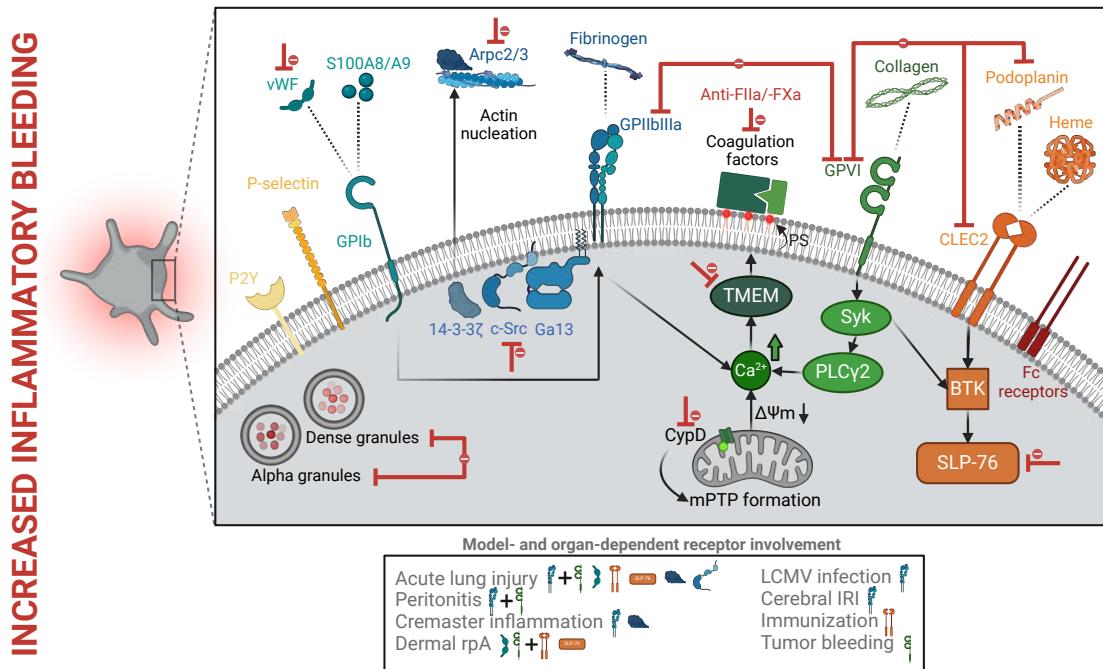


Abbildung 29: Graphische Zusammenfassung der Thrombozyten-Rezeptoren und Signalwege, welche inflammatorische Blutungen beeinflussen

Darstellung der relevanten thrombozytären Oberflächenrezeptoren und ihrer Liganden: ADP-Rezeptor (P2Y), P-Selektin, GPIb in Verbindung mit dem von-Willebrand-Faktor sowie den Proteinen S100A8/A9 (Calprotektin), GPIIbIIIa mit Fibrinogen, GPVI mit Kollagen, C-Typ-Lektin-ähnlicher Rezeptor 2 (CLEC-2) mit Podoplanin und der Häm-Gruppe sowie dem Fc-Rezeptor. Subzelluläre Signalkaskaden durch Rezeptoraktivierung: Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration über eine Syk- und Phospholipase Cy2 (PLC γ 2)-abhängige Aktivierung, ausgelöst durch die Veränderung des mitochondrialen Potentials nach CypD-abhängiger Bildung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitionsapore (mPTP). Aktivierung von TMEM16F und Phosphatidylserin (PS)-Expression an der Zelloberfläche, was zur Bindung von Gerinnungsfaktoren führt, sowie Aktivierung der Effektorproteine Bruton-Tyrosinkinase (BTK) und SH2-Domänen-haltiges Leukozyten-Protein 76 kDa (SLP-76). Morphologische Veränderungen zur Einleitung der Thrombozyten-Migration erfolgen durch Arpc-abhängige Aktin-Nukleation nach GPIIbIIIa-Interaktion und Aktivierung des Ga13/c-Src/14-3-3 ζ -Komplexes. Degranulation der verschiedenen gespeicherten Alpha- und elektronendichten Granula der Thrombozyten. Rote Hemmungszeichen veranschaulichen die einzelne oder kombinierte Blockierung der involvierten Rezeptoren und nachgeschalteten Effektoren, was in verschiedenen Organmodellen inflammatorischer Blutungen (grauer Kasten) zu verstärkten Hämorragien führt.

Adaptiert nach (Kaiser, Escaig, et al., 2023).

6.3 Prokoagulante Thrombozyten: protektiv oder schädlich?

In dieser Dissertation wurde prokoagulanten Thrombozyten ein protektiver, lokaler Effekt zugeschrieben. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass zirkulierende prokoagulante Thrombozyten mit lokalen Organschäden und disseminierter intravaskulärer Koagulation in Verbindung gebracht werden können, insbesondere durch die Interaktion mit Neutrophilen (Denorme, Manne, Portier, Eustes, et al., 2020; Denorme et al., 2021; Yuan et al., 2017). Denorme et al. konnten eine schädliche Rolle PS-positiver PNAs im Kontext des ischämischen Schlaganfalls aufzeigen. Die vaskuläre Okklusion wurde nach Reperfusion verstärkt und exazerbierte somit die Hirnschäden. Darüber hinaus sind hinsichtlich der Rolle prokoagulanter Thrombozyten in der Thrombusbildung widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur zu finden. Während in CypD-Ganzkörper-Knockout-Mäusen eine erhöhte Thromboseneigung beschrieben wurde (Jobe et al., 2008), konnten andere Autoren einen gerinnungs- und thrombosehemmenden Effekt in Abwesenheit prokoagulanter Thrombozyten durch spezifischen PF4cre-CypD-Knockout bestätigen (Agbani et al., 2018; Baig et al., 2016; Hua et al., 2015).

Es lässt sich schlussfolgern, dass die lokale Bildung prokoagulanter Thrombozyten entscheidend für die Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität bei Entzündungen ist, während eine dysregulierte Aktivierung zur Induktion einer systemischen Koagulation führt (Agbani & Poole, 2017; Agbani et al., 2018; Chen et al., 2018; Yuan et al., 2017). Die Rolle der prokoagulanten Aktivität von Thrombozyten in anderen Zuständen mit erhöhter Gefäßpermeabilität, wie beispielsweise neoplastischen Grunderkrankungen, ist nur teilweise verstanden (Gaertner & Massberg, 2019). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit beleuchtete erstmalig die tumorfördernde Eigenschaft prokoagulanter Thrombozyten in einem murinen Brustkrebsmodell durch Fehlregulation der Immunantwort (Schaubaecher et al., 2024). Weitere Studien haben die Relevanz von GPVI bei der Prävention tumorassozierter Blutungen belegt. Diese Wirkung könnte in Kombination mit lokalen Tumorfaktoren durch eine verstärkte prokoagulante Aktivierung der Thrombozyten vermittelt werden (Volz et al., 2019).

Diese Ergebnisse unterstreichen die Dichotomie dieser spezifischen Subpopulation von Thrombozyten, abhängig vom betroffenen Gewebe und entzündlichen

Stimulus. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um inflammatorische Faktoren zu identifizieren, die eine systemische PS-Exposition von Thrombozyten induzieren. Zudem ist eine detaillierte Analyse der Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und der Gerinnung in verschiedenen entzündlichen Kontexten erforderlich.

6.4 Einfluss der Gerinnungsfaktoren

Gerinnungsfaktoren wie Thrombin und Fibrinogen spielen eine bedeutende Rolle bei entzündlichen Prozessen. Sie fördern die antimikrobielle Clearance durch Leukozyten, wobei Fibrin maßgeblich an der Regulation von Neutrophilen beteiligt ist (Chen & Dorling, 2009; Prasad et al., 2015; Silva et al., 2021). Eine Dysregulation dieser Proteine, die durch ein Ungleichgewicht zwischen anti- und prokoagulatorischen Faktoren verursacht wird, kann zu schwerwiegenden und potenziell lebensbedrohlichen Krankheitsbildern führen, wie beispielsweise hereditären Immundefekten oder einer diffusen intravasalen Koagulopathie (DIC). Letztere sind charakterisiert durch eine kombinierte Fehlfunktion der plasmatischen Hämostase und der Thrombozyten-Funktion (Gaertner & Massberg, 2019; Gando et al., 2016).

Weiterhin ist unklar, inwieweit einzelne Thrombozyten im Rahmen der Entzündungsreaktion für die Ausübung ihrer prokoagulanten Funktion hämostatisch aktive Plasmaproteine benötigen. In dieser Arbeit wird nicht die Herkunft der Fibrin(ogen)-Ablagerungen in der entzündlich veränderten Lunge behandelt, sodass offen bleibt, ob diese aus dem Plasma oder aus Thrombozyten-intrinsischen Speicherpools stammen.

Frühere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Sekretion thrombozytärer α -Granula und die damit verbundene Freisetzung von Fibrin(ogen) für die inflammatorische Hämostase in der Lunge entbehrlich sind (Deppermann, 2018; Deppermann et al., 2017). Dies legt die Existenz alternativer Fibrin(ogen)-Quellen nahe. Im Rahmen von *in vitro* Untersuchungen konnte keine signifikante Fibrinogen-Sekretion durch prokoagulante Thrombozyten festgestellt werden. Um den Einfluss der Thrombozyten-Sekretion auf die Fibrin(ogen)-Ablagerung *in vivo* eindeutig zu klären, sind Untersuchungen an genetisch veränderten

Mausmodellen mit gezielter Beeinträchtigung des thrombozytären Sekretionssystems notwendig.

6.5 Rekrutierung von Thrombozyten in die Lunge

In allen ALI-Experimenten konnte im bronchoalveolären Lavagefluid (BAL-Fluid) mittels durchflusszytometrischer Analysen niedrige Konzentrationen freier, singulärer Thrombozyten nachgewiesen werden, die nach Induktion eines entzündlichen Reizes keinen signifikanten Anstieg zeigten. Dennoch wiesen histologische Untersuchungen Unterschiede in der alveolären Rekrutierung von Thrombozyten im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion, hervorgerufen durch eine sterile Peritonitis, nach. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Bildung von Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregaten bzw. allgemein Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten sein. Tatsächlich bestätigten Analysen das Vorhandensein von Thrombozyten-gebundenen Neutrophilen im BAL-Fluid, welche insbesondere nach einer LPS-Behandlung deutlich vermehrt auftraten.

Die fehlende Hemmung der Thrombozytenaggregation in der LPS-induzierten entzündeten Lunge nach Inhibition der Oberflächenrezeptoren GPVI und GPIIbIIIa war unerwartet. Frühere Untersuchungen deuten darauf hin, dass zusätzliche Rezeptoren wie P-Selektin (Zarbock et al., 2006) und CLEC-2 (Lax et al., 2017) eine wichtige Funktion bei der Rekrutierung von Thrombozyten in entzündetem Lungengewebe haben könnten. Diese alternativen Mechanismen könnten die Hemmung von GPVI und GPIIbIIIa kompensieren, was die beobachtete Persistenz der Thrombozyten-Akkumulation erklärt und die redundanten Mechanismen der Thrombozyten-Aktivierung im Kontext pulmonaler Entzündungen unterstreicht. Eine kürzlich publizierte Studie lieferte jedoch Hinweise darauf, dass die antikörpervermittelte oder genetische Ausschaltung von CLEC-2 die durch Entzündung bedingte Blutung in der Lunge nicht verstärkt (Rayes et al., 2018). Angesichts der Vielzahl alternativer Rezeptoren, die von Thrombozyten exprimiert werden, ist es denkbar, dass auch andere Rezeptoren, wie beispielsweise GP1b, eine relevante Rolle in diesem Kontext spielen.

6.6 Zusammenfassung der Schlüsselfunktionen von Thrombozyten in der inflammatorischen Hämostase

Die Ergebnisse dieser Dissertation beschreiben eine neuartige protektive Funktion von immunreaktiven Thrombozyten. Durch prokoagulante Aktivierung und gezielte Rekrutierung der Gerinnungskaskade spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung inflammatorischer Blutungen, ohne eine diffuse intravaskuläre Gerinnung auszulösen. Das vorgeschlagene mechanistische Modell der verschiedenen Schlüsselfunktionen von Thrombozyten in der inflammatorischen Hämostase wird in Abbildung 30 visualisiert.

Proinflammatorische Mediatoren, wie exogenes LPS oder endogene Zytokine, führen zum Priming lokaler Thrombozyten und Endothelzellen, welches zur Expression spezifischer Rezeptoren wie GPIIbIIIa und verschiedener ITAM-Rezeptoren führt. Die beiden ITAM-Rezeptoren GPVI und CLEC-2 werden sowohl von humanen als auch murinen Thrombozyten stark exprimiert (Lee & Bergmeier, 2016; Rayes et al., 2017; Rayes et al., 2019). Diese Rezeptoren erleichtern die Adhäsion und Rekrutierung der Thrombozyten an der entzündeten Gefäßwand. Die autonome Migration der Thrombozyten wird durch die Aktivierung der Lamellipodien-Bildung eingeleitet und erfolgt durch Haptotaxis-vermitteltes Abtasten von abgelagerten Fibrin(ogen)-Dichtegradienten (Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020). Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass migrierende Thrombozyten hierbei ihre Mikroumgebung kontinuierlich mithilfe der exprimierten Rezeptoren GPVI und GPIIbIIIa überwachen, um inflammationsinduzierte Endothelschäden, die durch die Transmigration neutrophiler Granulozyten verursacht werden, zu erkennen. Diese Schäden werden durch freigelegte extrazelluläre Matrixproteine, wie subendothiales Kollagen, erkannt und mithilfe des Oberflächenrezeptors GPVI gebunden. Dies aktiviert verschiedene Effektor-Funktionen der Thrombozyten, die an der Abdichtung der Verletzungsstelle beteiligt sind.

Durch Degranulation aktiverter Thrombozyten können lösliche Mediatoren sezerniert werden, welche die lokale vaskuläre Integrität erhöhen (Deppermann et al., 2017). Beispielsweise stabilisiert freigesetztes Angiopoietin-1 (Angpt1) die endothelialen Zellverbindungen und verhindert die Transmigration weiterer Leukozyten (Braun et al., 2020).

Die duale Stimulation der Rezeptorsignalwege GPII und GPIIbIIIa führt zur Mechanosensing-vermittelten prokoagulanten Aktivierung einzelner Thrombozyten, die an der Verletzungsstelle verbleiben und diese mechanisch verschließen. Zusätzlich ermöglichen prokoagulante Thrombozyten die gezielte Rekrutierung plasmatischer Gerinnungsfaktoren. Durch die Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der Oberfläche prokoagulanter Thrombozyten kann der Prothrombinase-Komplex gebunden werden, welches zu einer erheblichen Steigerung der Thrombin-Aktivität führt. Dies fördert die lokale Fibrinbildung und die Entstehung eines hämostatischen Mikrothrombus, der die Endothelverletzung verschließt und den Übertritt von Erythrozyten verhindert. Außerdem kann die Rekrutierung von Leukozyten durch direkte Rezeptorinteraktionen beeinflusst werden (Kaiser et al., 2021).

Es ist darauf hinzuweisen, dass dieses mechanistische Modell bei LPS-induzierter (sub-)akuter Lungenschädigung nachgewiesen wurde. Die Relevanz in anderen Modellen inflammatorischer Blutungen muss in weiteren Studien untersucht werden.

Zusammenfassend stellt die prokoagulante Aktivierung von Thrombozyten eine essenzielle Funktion zur Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität in der inflammatorischen Hämostase dar. Die Verknüpfung von Entzündung, Thrombozyten und Gerinnung unterstreicht die zentrale immunologische Rolle von Thrombozyten im Gesamtspektrum entzündlicher Grunderkrankungen und liefert wichtige mechanistische Einblicke in die komplexe Pathophysiologie entzündlicher Blutungen. Hierdurch wird das Verständnis der Funktionen immunreaktiver Thrombozyten erweitert, die unter inflammatorischen Bedingungen aktiv sind.

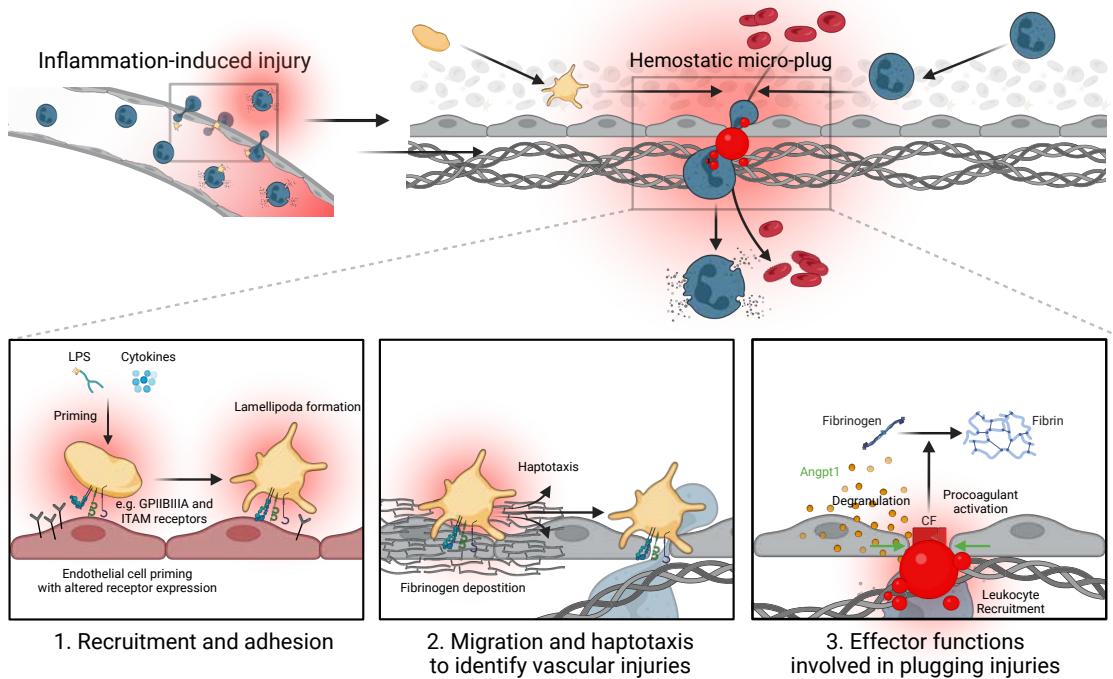


Abbildung 30: Graphische Darstellung des mechanistischen Modells der Schlüsselfunktionen von Thrombozyten in der inflammatorischen Hämostase

Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten an die entzündete Gefäßwand über spezifische Rezeptoren. Ausbildung von Lamellipodien sowie autonome Migration und Haptotaxis der Thrombozyten entlang abgelagerter Fibrinogen-Depositionen. Detektion von Transmigrationsstellen neutrophiler Granulozyten durch freigelegte extrazelluläre Matrixproteine (ECM). Auslösung der Degranulation mit Sekretion löslicher Mediatoren und prokoagulanter Aktivierung der Thrombozyten. Rekrutierung plasmatischer Gerinnungsfaktoren an die Oberfläche prokoagulanter Thrombozyten, Förderung der lokalen Fibrinbildung und Ausbildung eines hämostatischen Mikrothrombus, der inflammatorische Blutungen verhindert.

Adaptiert nach (Kaiser, Escaig, et al., 2023).

6.7 Limitationen

6.7.1 Generalisierbarkeit

Die Generalisierbarkeit der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse auf verschiedene Modelle inflammatorischer Blutungen ist nur bedingt möglich. Der Begriff "Entzündung" dient als Sammelbegriff für zahlreiche unterschiedliche Zustände, die sich in Art und Ausmaß der Gefäßverletzungen unterscheiden. Frühere Studien haben eindeutig aufgezeigt, dass die Mechanismen der Hämostase in entzündeten Organen stark von der spezifischen

Entzündungssituation abhängen. Auch das Ausmaß inflammatorischer Blutungen variiert stark in Abhängigkeit vom Kontext der betroffenen Mikrovaskulatur.

Die *in vivo* Beobachtungen hinsichtlich der Blutungen konzentrierten sich in dieser Arbeit bislang auf die Lunge – ein Organ, welches im Mittelpunkt zahlreicher Studien zur Untersuchung entzündlicher Blutungen und der Hämostase steht und von hoher klinischer Relevanz ist. Die Anwendung des vorgestellten Modells ist daher auf die in dieser Arbeit untersuchte inflammatorische pulmonale Hämorrhagie beschränkt.

Zu weiteren Einschränkungen dieser Dissertation zählt die Übertragbarkeit der prokoagulanten Aktivierung als intrinsisch protektive Funktion von Thrombozyten. Insbesondere ist der Einfluss in anderen etablierten Modellen entzündungs-assozierter Blutungen – wie etwa Neutrophilen-induzierte ischämische Reperfusionschäden des Gehirns, sterile Verletzungen der Mikrovaskulatur der Haut, Entzündungen der Cremaster-Mikrozirkulation sowie tumorassoziierte Blutungen – bisher unzureichend untersucht. Eine umfassendere Charakterisierung verschiedener *in vivo* Modelle der lokalen wie auch systemischen Inflammation könnte dazu beitragen, den in der Lunge beobachteten Mechanismus auch in anderen Organmanifestationen zu validieren. Künftige Untersuchungen an CypD- und TMEM16F-defizienten Mäusen sowie Analysen der identifizierten pharmakologischen Signalwege könnten dabei zusätzliche Erkenntnisse über die funktionelle Relevanz prokoagulanter Thrombozyten in der inflammatorischen Hämostase liefern.

6.7.2 Ausmaß der pulmonalen Blutung

Der ausgeprägte Blutungsphänotyp, der in der Lunge bei Thrombozytopenie beobachtet wurde, war durch die pharmakologische und genetische Inhibition der prokoagulanten Aktivierung weniger schwerwiegend. Dieser Befund könnte auf mögliche kompensatorische Reparatur- oder Schutzmechanismen hinweisen, die über die in dieser Arbeit untersuchten Pathomechanismen hinausgehen und möglicherweise einen intrinsischen Beitrag zur inflammatorischen Hämostase leisten. Frühere Studien konnten ähnliche milde Blutungsphänotypen im Modell der akuten Lungenschädigung bei Arpc2-defizienten Mäusen sowie bei αIIb -Knockout-Chimären beobachten, insbesondere hinsichtlich des relativen

Anstiegs des alveolären Hämoglobins bzw. der Erythrozyten-Zahl (Nicolai, Schiefelbein, et al., 2020; Rayes et al., 2018).

Eine funktionelle Kompensation der pulmonalen Blutung durch redundante Thrombozyten-Aktivierungswege könnte den tatsächlichen Beitrag des untersuchten Mechanismus verschleiern. Gewebe- und modellabhängige, spezifische Funktionen, wie beispielsweise die Sekretion verschiedener Thrombozyten-Granula, könnten den zentralen Signalweg der prokoagulanten Thrombozyten-Aktivierung in der inflammatorischen Hämostase der Lunge überdecken.

6.7.3 Genetische Ablation von CypD und TMEM16F

Die genetische Ablation der prokoagulanten Aktivierung von Thrombozyten in CypD- und TMEM16F-defizienten Tieren führte zu einer verstärkten inflammatorischen Blutung in der Lunge. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei diesen Tieren ein vernachlässigbarer Einfluss auf die klassische Hämostase, wie durch den Schwanzblutungstest gemessen (Fujii et al., 2015).

Die entzündlich veränderten Lungen beider Knockout-Mauslinien zeigten keine Unterschiede in der pulmonalen Rekrutierung von Neutrophilen. Der Einfluss auf andere Leukozyten-Populationen wurde in dieser Studie nicht untersucht, könnte jedoch durch eine verminderte Rekrutierung die primäre Entzündungsreaktion und die Schädigung des Endothels abschwächen. Eine reduzierte prokoagulante Aktivierung der Thrombozyten könnte das inflammatorische Mikromilieu beeinflussen und zur endothelialen Dysfunktion beitragen.

Ein weiterer limitierender Faktor ist die fehlende Spezifität der PF4cre-vermittelten Genmodifikation. Neben der beabsichtigten Deletion von CypD und TMEM16F in Thrombozyten und Megakaryozyten könnten unerwünschte Wirkungen weitere Zellpopulation wie Monozyten betreffen. Diese spielen eine wichtige Rolle in der inflammatorischen Hämostase und könnten daher potenziell die Forschungsergebnisse beeinflussen (Pertuy et al., 2015).

6.8 Klinische Relevanz und Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert Evidenz für die zentrale Rolle sowohl der Thrombozyten als auch der Gerinnungsproteine bei der Regulation inflammatorischer Blutungen und trägt somit zu einem tieferen Verständnis dieses

pathophysiologischen Prozesses auf Einzelzellebene bei. Die Erkenntnisse könnten bedeutende Implikationen für den Einsatz von Antikoagulantien und Thrombozyten-Aggregationshemmer bei entzündlichen Erkrankungen haben und den Weg für die Entwicklung neuer pharmakologischer Zielstrukturen bahnen. Frühere Studien, welche die protektive Funktion von Thrombozyten bei inflammatorischen Blutungen untersucht haben, können durch den gemeinsamen Mechanismus der prokoagulanten Aktivierung erklärt werden. Dabei wird insbesondere die Bedeutung der kombinierten Aktivierung der Thrombozyten-Rezeptoren GPIIbIIIa und GPVI für die Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität in der entzündeten Lunge hervorgehoben.

In klinisch-translationalen Studien konnten prokoagulante Thrombozyten mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert werden. Als bedeutende Beispiele dafür gelten die koronare Herzerkrankung (Pasalic et al., 2016; Pasalic et al., 2018), venöse Thrombose (Kaiser et al. 2024), arterielle Hypertonie (Li et al., 2021) sowie schwere mechanische Traumata (Vulliamy et al., 2019), die sowohl mit lokalen als auch systemischen Entzündungsreaktionen einhergehen und mit dem Auftreten hochaktivierter, PS-positiver Thrombozyten in Verbindung stehen. Ein weiteres relevantes Beispiel für ein systemisches Krankheitsbild, welches mit prokoagulanten Thrombozyten assoziiert ist, stellt die COVID-19-Erkrankung dar. Untersuchungen an Patienten mit schwerem COVID-19-Verlauf und intensivmedizinischer Betreuung zeigten eine Korrelation zwischen antikörperinduzierten, zirkulierenden prokoagulanten Thrombozyten im peripheren Blut und der D-Dimer-Konzentration, was in einer erhöhten Inzidenz systemischer Thromboembolien resultierte (Althaus et al., 2021). Diese systemische Induktion prokoagulanter Thrombozyten könnte als prädiktiver diagnostischer Biomarker für systemische Inflammationskrankheiten dienen. Im Kontrast hierzu demonstrierte eine Studie von Denorme et al. ein reduziertes prokoagulantes Potenzial isolierter Thrombozyten von COVID-19-Patienten (Denorme, Manne, Portier, Petrey, et al., 2020). Diese widersprüchlichen Ergebnisse verdeutlichen das unzureichende Verständnis der Immunreaktion auf systemische Entzündungserkrankungen, die mit einer diffusen Aktivierung von Thrombozyten und der Rekrutierung der Gerinnungskaskade einhergehen.

Zusammenfassend konnten die Erkenntnisse dieser Dissertation zu einem vertieften Verständnis des Zusammenspiels zwischen Thrombozyten, der

angeborenen humoralen Immunabwehr und der Koagulationskaskade im Kontext inflammatorischer Blutungen beitragen. Insbesondere die *in vitro* und *in vivo* beobachtete Rekrutierung von Gerinnungsproteinen durch prokoagulante Thrombozyten deutet darauf hin, dass diese hochaktivierte Subpopulation eine zentrale Rolle bei akut-infektiösen sowie chronisch-inflammatorischen Erkrankungen spielen könnte. Ein erweitertes Verständnis der Integration von Thrombozyten-Funktion und Koagulationskaskade sowie deren Wechselwirkungen mit Immunzellen könnte neue Wege für die Entwicklung innovativer therapeutischer Ansätze im inflammatorischen und ischämisch-thrombotischen Kontext eröffnen.

Literaturverzeichnis

- Abbasian, N., Millington-Burgess, S. L., Chabra, S., Malcor, J. D., & Harper, M. T. (2020). Supramaximal calcium signaling triggers procoagulant platelet formation. *Blood Adv*, 4(1), 154-164. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000182>
- Agbani, E. O., & Poole, A. W. (2017). Procoagulant platelets: generation, function, and therapeutic targeting in thrombosis. *Blood*, 130(20), 2171-2179. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-787259>
- Agbani, E. O., & Poole, A. W. (2021). Aquaporins in platelet function. *Platelets*, 32(7), 895-901. <https://doi.org/10.1080/09537104.2021.1904133>
- 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., & Poole, A. W. (2015). Coordinated Membrane Ballooning and Procoagulant Spreading in Human Platelets. *Circulation*, 132(15), 1414-1424. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.114.015036>
- Agbani, E. O., Williams, C. M., Li, Y., van den Bosch, M. T., Moore, S. F., Mauroux, A., Hodgson, L., Verkman, A. S., Hers, I., & Poole, A. W. (2018). Aquaporin-1 regulates platelet procoagulant membrane dynamics and in vivo thrombosis. *JCI Insight*, 3(10). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99062>
- Al-Samkari, H., Karp Leaf, R. S., Dzik, W. H., Carlson, J. C. T., Fogerty, A. E., Waheed, A., Goodarzi, K., Bendapudi, P. K., Bornikova, L., Gupta, S., Leaf, D. E., Kuter, D. J., & Rosovsky, R. P. (2020). COVID-19 and coagulation: bleeding and thrombotic manifestations of SARS-CoV-2 infection. *Blood*, 136(4), 489-500. <https://doi.org/10.1182/blood.2020006520>
- Alshehri, O. M., Hughes, C. E., Montague, S., Watson, S. K., Frampton, J., Bender, M., & Watson, S. P. (2015). Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood*, 126(13), 1601-1608. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-641654>
- Althaus, K., Marini, I., Zlamal, J., Pelzl, L., Singh, A., Häberle, H., Mehrländer, M., Hammer, S., Schulze, H., Bitzer, M., Malek, N., Rath, D., Bösmüller, H., Nieswandt, B., Gawaz, M., Bakchoul, T., & Rosenberger, P. (2021). Antibody-induced procoagulant platelets in severe COVID-19 infection. *Blood*, 137(8), 1061-1071. <https://doi.org/10.1182/blood.2020008762>
- Babur, Ö., Melrose, A. R., Cunliffe, J. M., Klimek, J., Pang, J., Sepp, A. I., Zilberman-Rudenko, J., Tassi Yunga, S., Zheng, T., Parra-Izquierdo, I., Minnier, J., McCarty, O. J. T., Demir, E., Reddy, A. P., Wilmarth, P. A., David, L. L., & Aslan, J. E. (2020). Phosphoproteomic quantitation and causal analysis reveal pathways in GPVI/ITAM-mediated platelet activation programs. *Blood*, 136(20), 2346-2358. <https://doi.org/10.1182/blood.2020005496>
- Baevens, N., Bandyopadhyay, C., Coon, B. G., Yun, S., & Schwartz, M. A. (2016). Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease. *J Clin Invest*, 126(3), 821-828. <https://doi.org/10.1172/jci83083>
- Baig, A. A., Haining, E. J., Geuss, E., Beck, S., Swieringa, F., Wanitchakool, P., Schuhmann, M. K., Stegner, D., Kunzelmann, K., Kleinschmitz, C., Heemskerk, J. W., Braun, A., & Nieswandt, B. (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(11), 2152-2157. <https://doi.org/10.1161/atvbah.116.307727>
- Bauersachs, R., Berkowitz, S. D., Brenner, B., Buller, H. R., Decousus, H., Gallus, A. S., Lensing, A. W., Misselwitz, F., Prins, M. H., Raskob, G. E., Segers, A., Verhamme, P., Wells, P., Agnelli, G., Bounameaux, H., Cohen, A., Davidson, B. L., Piovella, F., & Schellong, S. (2010). Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. *N Engl J Med*, 363(26), 2499-2510. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1007903>
- Belok, S. H., Bosch, N. A., Klings, E. S., & Walkey, A. J. (2021). Evaluation of leukopenia during sepsis as a marker of sepsis-defining organ dysfunction. *PLoS One*, 16(6), e0252206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252206>

- Blair, P., & Flaumenhaft, R. (2009). Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*, 23(4), 177-189. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2009.04.001>
- Boulaftali, Y., Hess, P. R., Getz, T. M., Cholka, A., Stolla, M., Mackman, N., Owens, A. P., 3rd, Ware, J., Kahn, M. L., & Bergmeier, W. (2013). Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J Clin Invest*, 123(2), 908-916. <https://doi.org/10.1172/jci65154>
- Boulaftali, Y., Mawhin, M. A., Jandrot-Perrus, M., & Ho-Tin-Noé, B. (2018). Glycoprotein VI in securing vascular integrity in inflamed vessels. *Res Pract Thromb Haemost*, 2(2), 228-239. <https://doi.org/10.1002/rth2.12092>
- Bozinovski, S., Jones, J., Beavitt, S. J., Cook, A. D., Hamilton, J. A., & Anderson, G. P. (2004). Innate immune responses to LPS in mouse lung are suppressed and reversed by neutralization of GM-CSF via repression of TLR-4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286(4), L877-885. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00275.2003>
- Braun, L. J., Stegmeyer, R. I., Schafer, K., Volkery, S., Currie, S. M., Kempe, B., Nottebaum, A. F., & Vestweber, D. (2020). Platelets docking to VWF prevent leaks during leukocyte extravasation by stimulating Tie-2. *Blood*, 136(5), 627-639. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003442>
- Broos, K., Feys, H. B., De Meyer, S. F., Vanhoorelbeke, K., & Deckmyn, H. (2011). Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev*, 25(4), 155-167. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2011.03.002>
- Burkard, P., Schonhart, C., Vögtle, T., Köhler, D., Tang, L., Johnson, D., Hemmen, K., Heinze, K. G., Zarbock, A., Hermanns, H. M., Rosenberger, P., & Nieswandt, B. (2023). A key role for platelet GPVI in neutrophil recruitment, migration, and NETosis in the early stages of acute lung injury. *Blood*, 142(17), 1463-1477. <https://doi.org/10.1182/blood.2023019940>
- 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., Gilard, M., Hinterbuchner, L., Jankowska, E. A., Jüni, P., Kimura, T., Kunadian, V., Leosdottir, M., Lorusso, R., Pedretti, R. F. E.,...Ibanez, B. (2023). 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes. *Eur Heart J*, 44(38), 3720-3826. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehad191>
- Chen, D., & Dorling, A. (2009). Critical roles for thrombin in acute and chronic inflammation. *J Thromb Haemost, 7 Suppl 1*, 122-126. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03413.x>
- Chen, M., Yan, R., Zhou, K., Li, X., Zhang, Y., Liu, C., Jiang, M., Ye, H., Meng, X., Pang, N., Zhao, L., Liu, J., Xiao, W., Hu, R., Cui, Q., Zhong, W., Zhao, Y., Zhu, M., Lin, A.,...Dai, K. (2018). Akt-mediated platelet apoptosis and its therapeutic implications in immune thrombocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(45), E10682-E10691. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808217115>
- Claushuis, T. A. M., de Vos, A. F., Nieswandt, B., Boon, L., Roelofs, J., de Boer, O. J., van 't Veer, C., & van der Poll, T. (2018). Platelet glycoprotein VI aids in local immunity during pneumonia-derived sepsis caused by gram-negative bacteria. *Blood*, 131(8), 864-876. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-788067>
- Clemetson, K. J. (2012). Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res*, 129(3), 220-224. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.11.036>
- Colicchia, M., Schrottmaier, W. C., Perrella, G., Reyat, J. S., Begum, J., Slater, A., Price, J., Clark, J. C., Zhi, Z., Simpson, M., Bourne, J., Poulter, N. S., Khan, A. O., Nicolson, P. L. R., Pugh, M. R., Harrison, P., Iqbal, A. J., Rainger, G. E., Watson, S. P.,...Rayes, J. (2022). S100A8/A9 drives the formation of procoagulant platelets through GPIba. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.2021014966>
- Collet, J. P., Thiele, H., Barbato, E., Barthélémy, O., Bauersachs, J., Bhatt, D. L., Dendale, P., Dorobantu, M., Edvardsen, T., Folliguet, T., Gale, C. P., Gilard, M., Jobs, A., Jüni, P., Lambrinou, E., Lewis, B. S., Mehilli, J., Meliga, E., Merkely, B.,...Siontis, G. C. M. (2021). 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*, 42(14), 1289-1367. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa575>

- Coughlin, S. R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*, 3(8), 1800-1814. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01377.x>
- Dagenais, G. R., Leong, D. P., Rangarajan, S., Lanas, F., Lopez-Jaramillo, P., Gupta, R., Diaz, R., Avezum, A., Oliveira, G. B. F., Wielgosz, A., Parambath, S. R., Mony, P., Alhabib, K. F., Temizhan, A., Ismail, N., Chifamba, J., Yeates, K., Khatib, R., Rahman, O.,...Yusuf, S. (2020). Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *Lancet*, 395(10226), 785-794. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32007-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32007-0)
- Delaney, M. K., Liu, J., Kim, K., Shen, B., Stojanovic-Terpo, A., Zheng, Y., Cho, J., & Du, X. (2014). Agonist-induced platelet procoagulant activity requires shear and a Rac1-dependent signaling mechanism. *Blood*, 124(12), 1957-1967. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-560821>
- Denorme, F., & Campbell, R. A. (2022). Procoagulant platelets: novel players in thromboinflammation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 323(4), C951-c958. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00252.2022>
- Denorme, F., Manne, B. K., Portier, I., Eustes, A. S., Kosaka, Y., Kile, B. T., Rondina, M. T., & Campbell, R. A. (2020). Platelet necrosis mediates ischemic stroke outcome in mice. *Blood*, 135(6), 429-440. <https://doi.org/10.1182/blood.2019002124>
- Denorme, F., Manne, B. K., Portier, I., Petrey, A. C., Middleton, E. A., Kile, B. T., Rondina, M. T., & Campbell, R. A. (2020). COVID-19 patients exhibit reduced procoagulant platelet responses. *J Thromb Haemost*, 18(11), 3067-3073. <https://doi.org/10.1111/jth.15107>
- Denorme, F., Rustad, J. L., & Campbell, R. A. (2021). Brothers in arms: platelets and neutrophils in ischemic stroke. *Curr Opin Hematol*, 28(5), 301-307. <https://doi.org/10.1097/moh.0000000000000665>
- Deppermann, C. (2018). Platelets and vascular integrity. *Platelets*, 29(6), 549-555. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1428739>
- Deppermann, C., Kraft, P., Volz, J., Schuhmann, M. K., Beck, S., Wolf, K., Stegner, D., Stoll, G., & 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(12), 1702-1706. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-750711>
- Domscheit, H., Hegeman, M. A., Carvalho, N., & Spieth, P. M. (2020). Molecular Dynamics of Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury in Rodents. *Front Physiol*, 11, 36. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00036>
- Durrant, T. N., van den Bosch, M. T., & Hers, I. (2017). Integrin α (IIb) β (3) outside-in signaling. *Blood*, 130(14), 1607-1619. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-03-773614>
- Elzey, B. D., Schmidt, N. W., Crist, S. A., Kresowik, T. P., Harty, J. T., Nieswandt, B., & Ratliff, T. L. (2008). Platelet-derived CD154 enables T-cell priming and protection against Listeria monocytogenes challenge. *Blood*, 111(7), 3684-3691. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-091728>
- Engelmann, B., & Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 13(1), 34-45. <https://doi.org/10.1038/nri3345>
- French, S. L., Arthur, J. F., Lee, H., Nesbitt, W. S., Andrews, R. K., Gardiner, E. E., & Hamilton, J. R. (2016). Inhibition of protease-activated receptor 4 impairs platelet procoagulant activity during thrombus formation in human blood. *J Thromb Haemost*, 14(8), 1642-1654. <https://doi.org/10.1111/jth.13293>
- Fujii, T., Sakata, A., Nishimura, S., Eto, K., & Nagata, S. (2015). TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(41), 12800-12805. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516594112>
- Furie, B., & Furie, B. C. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*, 359(9), 938-949. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0801082>
- Gaertner, F., Ahmad, Z., Rosenberger, G., Fan, S., Nicolai, L., Busch, B., Yavuz, G., Luckner, M., Ishikawa-Ankerhold, H., Hennel, R., Benechet, A., Lorenz, M., Chandraratne, S.,

- Schubert, I., Helmer, S., Striednig, B., Stark, K., Janko, M., Böttcher, R. T.,...Massberg, S. (2017). Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria. *Cell*, 171(6), 1368-1382.e1323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.001>
- Gaertner, F., & Massberg, S. (2019). Patrolling the vascular borders: platelets in immunity to infection and cancer. *Nat Rev Immunol*, 19(12), 747-760. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0202-z>
- Gando, S., Levi, M., & Toh, C. H. (2016). Disseminated intravascular coagulation. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16037. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.37>
- Goerge, T., Ho-Tin-Noe, B., Carbo, C., Benarafa, C., Remold-O'Donnell, E., Zhao, B. Q., Cifuni, S. M., & Wagner, D. D. (2008). Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood*, 111(10), 4958-4964. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-123620>
- Gremmel, T., Frelinger, A. L., 3rd, & Michelson, A. D. (2016). Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost*, 42(3), 191-204. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1564835>
- Grommes, J., Alard, J. E., Drechsler, M., Wantha, S., Mörgelin, M., Kuebler, W. M., Jacobs, M., von Hundelshausen, P., Markart, P., Wygrecka, M., Preissner, K. T., Hackeng, T. M., Koenen, R. R., Weber, C., & Soehnlein, O. (2012). Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 185(6), 628-636. <https://doi.org/10.1164/rccm.201108-1533OC>
- Gros, A., Syvannarath, V., Lamrani, L., Ollivier, V., Loyau, S., Goerge, T., Nieswandt, B., Jandrot-Perrus, M., & Ho-Tin-Noé, B. (2015). Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood*, 126(8), 1017-1026. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-617159>
- Grover, S. P., & Mackman, N. (2019). Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39(3), 331-338. <https://doi.org/10.1161/atvaha.118.312130>
- Guenther, F., Herr, N., Mauler, M., Witsch, T., Roming, F., Hein, L., Boeynaems, J. M., Robaye, B., Idzko, M., Bode, C., Von Zur Muhlen, C., & Duerschmied, D. (2013). Contrast ultrasound for the quantification of deep vein thrombosis in living mice: effects of enoxaparin and P2Y12 receptor inhibition. *J Thromb Haemost*, 11(6), 1154-1162. <https://doi.org/10.1111/jth.12206>
- Guidotti, L. G., Inverso, D., Sironi, L., Di Lucia, P., Fioravanti, J., Ganzer, L., Fiocchi, A., Vacca, M., Aiolfi, R., Sammiceli, S., Mainetti, M., Cataudella, T., Raimondi, A., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Protzer, U., Ruggeri, Z. M., Chisari, F. V., Isogawa, M., Sitia, G., & Iannacone, M. (2015). Immunosurveillance of the liver by intravascular effector CD8(+) T cells. *Cell*, 161(3), 486-500. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.005>
- Guo, L., Shen, S., Rowley, J. W., Tolley, N. D., Jia, W., Manne, B. K., McComas, K. N., Bolingbroke, B., Kosaka, Y., Krauel, K., Denorme, F., Jacob, S. P., Eustes, A. S., Campbell, R. A., Middleton, E. A., He, X., Brown, S. M., Morrell, C. N., Weyrich, A. S., & Rondina, M. T. (2021). Platelet MHC class I mediates CD8+ T-cell suppression during sepsis. *Blood*, 138(5), 401-416. <https://doi.org/10.1182/blood.2020008958>
- Gupta, S., Konradt, C., Corken, A., Ware, J., Nieswandt, B., Di Paola, J., Yu, M., Wang, D., Nieman, M. T., Whiteheart, S. W., & Brass, L. F. (2020). Hemostasis vs. homeostasis: Platelets are essential for preserving vascular barrier function in the absence of injury or inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(39), 24316-24325. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007642117>
- Herzog, B. H., Fu, J., Wilson, S. J., Hess, P. R., Sen, A., McDaniel, J. M., Pan, Y., Sheng, M., Yago, T., Silasi-Mansat, R., McGee, S., May, F., Nieswandt, B., Morris, A. J., Lupu, F., Coughlin, S. R., McEver, R. P., Chen, H., Kahn, M. L., & Xia, L. (2013). Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2. *Nature*, 502(7469), 105-109. <https://doi.org/10.1038/nature12501>
- Hillgruber, C., Pöppelmann, B., Weishaupt, C., Steingräber, A. K., Wessel, F., Berdel, W. E., Gessner, J. E., Ho-Tin-Noé, B., Vestweber, D., & Goerge, T. (2015). Blocking neutrophil diapedesis prevents hemorrhage during thrombocytopenia. *J Exp Med*, 212(8), 1255-1266. <https://doi.org/10.1084/jem.20142076>

- Ho-Tin-Noé, B. (2018). The multifaceted roles of platelets in inflammation and innate immunity. *Platelets*, 29(6), 531-532. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1458519>
- Ho-Tin-Noé, B., Boulaftali, Y., & Camerer, E. (2018). Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation. *Blood*, 131(3), 277-288. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-742676>
- Ho-Tin-Noé, B., Carbo, C., Demers, M., Cifuni, S. M., Goerge, T., & Wagner, D. D. (2009). Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia. *Am J Pathol*, 175(4), 1699-1708. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090460>
- Ho-Tin-Noé, B., Demers, M., & Wagner, D. D. (2011). How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost*, 9 Suppl 1(Suppl 1), 56-65. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04317.x>
- Ho-Tin-Noe, B., Goerge, T., & Wagner, D. D. (2009). Platelets: guardians of tumor vasculature. *Cancer Res*, 69(14), 5623-5626. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1370>
- Hoffman, M., & Monroe, D. M., 3rd. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*, 85(6), 958-965.
- Hua, V. M., Abeynaike, L., Glaros, E., Campbell, H., Pasalic, L., Hogg, P. J., & Chen, V. M. (2015). Necrotic platelets provide a procoagulant surface during thrombosis. *Blood*, 126(26), 2852-2862. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-663005>
- Jackson, S. P. (2011). Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*, 17(11), 1423-1436. <https://doi.org/10.1038/nm.2515>
- Jin, J., Mao, Y., Thomas, D., Kim, S., Daniel, J. L., & Kunapuli, S. P. (2009). RhoA downstream of G(q) and G(12/13) pathways regulates protease-activated receptor-mediated dense granule release in platelets. *Biochem Pharmacol*, 77(5), 835-844. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.017>
- Jobe, S. M., Wilson, K. M., Leo, L., Raimondi, A., Molkentin, J. D., Lentz, S. R., & Di Paola, J. (2008). Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood*, 111(3), 1257-1265. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-092684>
- 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, J. W., Spiekermann, K., Massberg, S., Gaertner, F., & Nicolai, L. (2023). Mechanosensing via a GpIIb/Src/14-3-3ζ axis critically regulates platelet migration in vascular inflammation. *Blood*, 141(24), 2973-2992. <https://doi.org/10.1182/blood.2022019210>
- Kaiser, R., Dewender, R., Mulkers, M., Stermann, J., Rossaro, D., Di Fina, L., Li, L., Gold, C., Schmid, M., Käab, L., Eivers, L., Akgöl, S., Yue, K., Kammerer, L. M., Loew, Q., Anjum, A., Escaig, R., Akhalkatsi, A., Laun, L. S.,...Nicolai, L. (2024). Procoagulant platelet activation promotes venous thrombosis. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.2024025476>
- Kaiser, R., Escaig, R., Erber, J., & Nicolai, L. (2021). Neutrophil-Platelet Interactions as Novel Treatment Targets in Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*, 8, 824112. <https://doi.org/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., Titova, A., Lorenz, M., Pekayvaz, K., Käab, S., Gaertner, F., Stark, K., Brocker, T., Massberg, S., & Nicolai, L. (2022). Procoagulant platelet sentinels prevent inflammatory bleeding through GPIIbIIIA and GPVI. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.2021014914>
- Kaiser, R., Escaig, R., & Nicolai, L. (2023). Hemostasis without clot formation: how platelets guard the vasculature in inflammation, infection, and malignancy. *Blood*, 142(17), 1413-1425. <https://doi.org/10.1182/blood.2023020535>
- Kasirajan, V., Smedira, N. G., McCarthy, J. F., Casselman, F., Boparai, N., & McCarthy, P. M. (1999). Risk factors for intracranial hemorrhage in adults on extracorporeal membrane oxygenation. *Eur J Cardiothorac Surg*, 15(4), 508-514. [https://doi.org/10.1016/s1010-7940\(99\)00061-5](https://doi.org/10.1016/s1010-7940(99)00061-5)

- Kim, S. Y., Shim, M. S., Kim, K. Y., Weinreb, R. N., Wheeler, L. A., & Ju, W. K. (2014). Inhibition of cyclophilin D by cyclosporin A promotes retinal ganglion cell survival by preventing mitochondrial alteration in ischemic injury. *Cell Death Dis*, 5(3), e1105. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.80>
- Koseoglu, S., & Flaumenhaft, R. (2013). Advances in platelet granule biology. *Curr Opin Hematol*, 20(5), 464-471. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283632e6b>
- Lara, A. R., & Schwarz, M. I. (2010). Diffuse alveolar hemorrhage. *Chest*, 137(5), 1164-1171. <https://doi.org/10.1378/chest.08-2084>
- Lax, S., Rayes, J., Wichaiyo, S., Haining, E. J., Lowe, K., Grygielska, B., Laloo, R., Flodby, P., Borok, Z., Crandall, E. D., Thickett, D. R., & Watson, S. P. (2017). Platelet CLEC-2 protects against lung injury via effects of its ligand podoplanin on inflammatory alveolar macrophages in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 313(6), L1016-L1029. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00023.2017>
- Lee, R. H., & Bergmeier, W. (2016). Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) and hemITAM signaling and vascular integrity in inflammation and development. *J Thromb Haemost*, 14(4), 645-654. <https://doi.org/10.1111/jth.13250>
- Li, J., Tong, D., Chen, F., Song, B., Wang, Y., Liu, Y., Zhang, X., Liu, N., Xu, Y., Li, Y., Yin, X., & Liu, W. (2021). Inflammatory cytokines enhance procoagulant activity of platelets and endothelial cells through phosphatidylserine exposure in patients with essential hypertension. *J Thromb Thrombolysis*, 51(4), 933-940. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02342-x>
- Li, Z., Delaney, M. K., O'Brien, K. A., & Du, X. (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(12), 2341-2349. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207522>
- Lüsebrink, E., Zimmer, S., Schrage, B., Dabboura, S., Majunke, N., Scherer, C., Aksoy, A., Krogmann, A., Hoffmann, S., Szczanowicz, L., Binzenhöfer, L., Peterss, S., Kühn, C., Hagl, C., Massberg, S., Schäfer, A., Thiele, H., Westermann, D., & Orban, M. (2022). Intracranial haemorrhage in adult patients on venoarterial extracorporeal membrane oxygenation. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 11(4), 303-311. <https://doi.org/10.1093/ehjacc/zuac018>
- Mackman, N., Tilley, R. E., & Key, N. S. (2007). Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(8), 1687-1693. <https://doi.org/10.1161/atvaha.107.141911>
- Mammadova-Bach, E., Ollivier, V., Loyau, S., Schaff, M., Dumont, B., Favier, R., Freyburger, G., Latger-Cannard, V., Nieswandt, B., Gachet, C., Mangin, P. H., & Jandrot-Perrus, M. (2015). Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood*, 126(5), 683-691. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-629717>
- Massberg, S., Gawaz, M., Grüner, S., Schulte, V., Konrad, I., Zohlnhöfer, D., Heinzmann, U., & Nieswandt, B. (2003). A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med*, 197(1), 41-49. <https://doi.org/10.1084/jem.20020945>
- Matthay, M. A., Zemans, R. L., Zimmerman, G. A., Arabi, Y. M., Beitzler, J. R., Mercat, A., Herridge, M., Randolph, A. G., & Calfee, C. S. (2019). Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), 18. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0069-0>
- Matute-Bello, G., Downey, G., Moore, B. B., Groshong, S. D., Matthay, M. A., Slutsky, A. S., & Kuebler, W. M. (2011). An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 44(5), 725-738. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0210ST>
- Menard, C. E., Kumar, A., Houston, D. S., Turgeon, A. F., Rimmer, E., Houston, B. L., Doucette, S., & Zarychanski, R. (2019). Evolution and Impact of Thrombocytopenia in Septic Shock: A Retrospective Cohort Study. *Crit Care Med*, 47(4), 558-565. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003644>
- 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., Cody, M. J., Manne, B. K., Portier, I.,

- Harris, E. S., Petrey, A. C., Beswick, E. J., Caulin, A. F., Iovino, A., Abegglen, L. M.,...Yost, C. C. (2020). Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood*, 136(10), 1169-1179. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007008>
- Millington-Burgess, S. L., & Harper, M. T. (2020). Gene of the issue: ANO6 and Scott Syndrome. *Platelets*, 31(7), 964-967. <https://doi.org/10.1080/09537104.2019.1693039>
- Neumann, F. J., Hochholzer, W., Pogatsa-Murray, G., Schömig, A., & Gawaz, M. (2001). Antiplatelet effects of abciximab, tirofiban and eptifibatide in patients undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol*, 37(5), 1323-1328. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(01\)01165-2](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(01)01165-2)
- Nicolai, L., Gaertner, F., & Massberg, S. (2019). Platelets in Host Defense: Experimental and Clinical Insights. *Trends Immunol*, 40(10), 922-938. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.08.004>
- Nicolai, L., Leunig, A., Brambs, S., Kaiser, R., Weinberger, T., Weigand, M., Muenchhoff, M., Hellmuth, J. C., Ledderose, S., Schulz, H., Scherer, C., Rudelius, M., Zoller, M., Höchter, D., Keppler, O., Teupser, D., Zwißler, B., von Bergwelt-Baildon, M., Käab, S.,...Stark, K. (2020). Immunothrombotic Dysregulation in COVID-19 Pneumonia Is Associated With Respiratory Failure and Coagulopathy. *Circulation*, 142(12), 1176-1189. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.120.048488>
- Nicolai, L., & Massberg, S. (2020). Platelets as key players in inflammation and infection. *Curr Opin Hematol*, 27(1), 34-40. <https://doi.org/10.1097/moh.0000000000000551>
- Nicolai, L., Pekayvaz, K., & Massberg, S. (2024). Platelets: Orchestrators of immunity in host defense and beyond. *Immunity*, 57(5), 957-972. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.04.008>
- Nicolai, L., Schiefelbein, K., Lipsky, S., Leunig, A., Hoffknecht, M., Pekayvaz, K., Raude, B., Marx, C., Ehrlich, A., Pircher, J., Zhang, Z., Saleh, I., Marel, A. K., Löf, A., Petzold, T., Lorenz, M., Stark, K., Pick, R., Rosenberger, G.,...Gaertner, F. (2020). Vascular surveillance by haptotactic blood platelets in inflammation and infection. *Nat Commun*, 11(1), 5778. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19515-0>
- Nurden, A. T., Poujol, C., Durrieu-Jais, C., & Nurden, P. (1999). Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(12), 2835-2840. <https://doi.org/10.1161/01.atv.19.12.2835>
- O'Brien, K. A., Gartner, T. K., Hay, N., & Du, X. (2012). ADP-stimulated activation of Akt during integrin outside-in signaling promotes platelet spreading by inhibiting glycogen synthase kinase-3β. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(9), 2232-2240. <https://doi.org/10.1161/atvaha.112.254680>
- Ollivier, V., Syvannarath, V., Gros, A., Butt, A., Loyau, S., Jandrot-Perrus, M., & Ho-Tin-Noe, B. (2014). Collagen can selectively trigger a platelet secretory phenotype via glycoprotein VI. *PLoS One*, 9(8), e104712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104712>
- Pang, A., Cui, Y., Chen, Y., Cheng, N., Delaney, M. K., Gu, M., Stojanovic-Terpo, A., Zhu, C., & Du, X. (2018). Shear-induced integrin signaling in platelet phosphatidylserine exposure, microvesicle release, and coagulation. *Blood*, 132(5), 533-543. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-785253>
- Pasalic, L., Wang, S. S., & Chen, V. M. (2016). Platelets as Biomarkers of Coronary Artery Disease. *Semin Thromb Hemost*, 42(3), 223-233. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1572328>
- Pasalic, L., Wing-Lun, E., Lau, J. K., Campbell, H., Pennings, G. J., Lau, E., Connor, D., Liang, H. P., Muller, D., Kritharides, L., Hogg, P. J., & Chen, V. M. (2018). Novel assay demonstrates that coronary artery disease patients have heightened procoagulant platelet response. *J Thromb Haemost*, 16(6), 1198-1210. <https://doi.org/10.1111/jth.14008>
- Pertuy, F., Aguilar, A., Strassel, C., Eckly, A., Freund, J. N., Duluc, I., Gachet, C., Lanza, F., & Léon, C. (2015). Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond

- the megakaryocyte lineage. *J Thromb Haemost*, 13(1), 115-125. <https://doi.org/10.1111/jth.12784>
- Pincus, Z., & Theriot, J. A. (2007). Comparison of quantitative methods for cell-shape analysis. *J Microsc*, 227(Pt 2), 140-156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2007.01799.x>
- Pircher, J., Engelmann, B., Massberg, S., & Schulz, C. (2019). Platelet-Neutrophil Crosstalk in Atherothrombosis. *Thromb Haemost*, 119(8), 1274-1282. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1692983>
- Prasad, J. M., Gorkun, O. V., Raghu, H., Thornton, S., Mullins, E. S., Palumbo, J. S., Ko, Y. P., Höök, M., David, T., Coughlin, S. R., Degen, J. L., & Flick, M. J. (2015). Mice expressing a mutant form of fibrinogen that cannot support fibrin formation exhibit compromised antimicrobial host defense. *Blood*, 126(17), 2047-2058. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-639849>
- Rausch, L., Lutz, K., Schifferer, M., Winheim, E., Gruber, R., Rinke, L., Hellmuth, J. C., Scherer, C., Muenchhoff, M., Mandel, C., Bergwelt-Baildon, M., Simons, M., Straub, T., Krug, A. B., Kranich, J., & Brocker, T. (2021). Binding of phosphatidylserine-positive microparticles by PBMCs classifies disease severity in COVID-19 patients. *bioRxiv*, 2021.2006.2018.448935. <https://doi.org/10.1101/2021.06.18.448935>
- Rayes, J., Jadoui, S., Lax, S., Gros, A., Wichaiyo, S., Ollivier, V., Denis, C. V., Ware, J., Nieswandt, B., Jandrot-Perrus, M., Watson, S. P., & Ho-Tin-Noé, B. (2018). The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent. *Haematologica*, 103(6), e256-e258. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.182162>
- Rayes, J., Lax, S., Wichaiyo, S., Watson, S. K., Di, Y., Lombard, S., Grygielska, B., Smith, S. W., Skordilis, K., & Watson, S. P. (2017). The podoplanin-CLEC-2 axis inhibits inflammation in sepsis. *Nat Commun*, 8(1), 2239. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02402-6>
- Rayes, J., Watson, S. P., & Nieswandt, B. (2019). Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2. *J Clin Invest*, 129(1), 12-23. <https://doi.org/10.1172/JCI122955>
- Sadler, J. E. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*, 67, 395-424. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.395>
- Schaubaecher, J. B., Smiljanov, B., Haring, F., Steiger, K., Wu, Z., Ugurluoglu, A., Luft, J., Ballke, S., Mahameed, S., Schneewind, V., Hildinger, J., Canis, M., Mittmann, L. A., Braun, C., Zuchtriegel, G., Kaiser, R., Nicolai, L., Mack, M., Weichert, W.,...Reichel, C. A. (2024). Procoagulant platelets promote immune evasion in triple-negative breast cancer. *Blood*, 144(2), 216-226. <https://doi.org/10.1182/blood.2023022928>
- Schenone, M., Furie, B. C., & Furie, B. (2004). The blood coagulation cascade. *Curr Opin Hematol*, 11(4), 272-277. <https://doi.org/10.1097/01.moh.0000130308.37353.d4>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schoenwaelder, S. M., Yuan, Y., Josefsson, E. C., White, M. J., Yao, Y., Mason, K. D., O'Reilly, L. A., Henley, K. J., Ono, A., Hsiao, S., Willcox, A., Roberts, A. W., Huang, D. C., Salem, H. H., Kile, B. T., & Jackson, S. P. (2009). Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood*, 114(3), 663-666. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-200345>
- Schulte, V., Rabie, T., Prostredna, M., Aktas, B., Grüner, S., & Nieswandt, B. (2003). Targeting of the collagen-binding site on glycoprotein VI is not essential for in vivo depletion of the receptor. *Blood*, 101(10), 3948-3952. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3242>
- Semple, J. W., Italiano, J. E., Jr., & Freedman, J. (2011). Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*, 11(4), 264-274. <https://doi.org/10.1038/nri2956>
- Senis, Y. A., Mazharian, A., & Mori, J. (2014). Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood*, 124(13), 2013-2024. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-453134>

- Shen, B., Delaney, M. K., & Du, X. (2012). Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Curr Opin Cell Biol*, 24(5), 600-606. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.08.011>
- Siegel-Axel, D. I., & Gawaz, M. (2007). Platelets and endothelial cells. *Semin Thromb Hemost*, 33(2), 128-135. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969025>
- Silva, L. M., Doyle, A. D., Greenwell-Wild, T., Dutzan, N., Tran, C. L., Abusleme, L., Juang, L. J., Leung, J., Chun, E. M., Lum, A. G., Agler, C. S., Zuazo, C. E., Sibree, M., Jani, P., Kram, V., Martin, D., Moss, K., Lionakis, M. S., Castellino, F. J.,...Moutsopoulos, N. M. (2021). Fibrin is a critical regulator of neutrophil effector function at the oral mucosal barrier. *Science*, 374(6575), eabl5450. <https://doi.org/10.1126/science.abl5450>
- Slater, A., Perrella, G., Onselaer, M. B., Martin, E. M., Gauer, J. S., Xu, R. G., Heemskerk, J. W., Ariëns, R. A. S., & Watson, S. P. (2019). Does fibrin(ogen) bind to monomeric or dimeric GPVI, or not at all? *Platelets*, 30(3), 281-289. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1508649>
- Stark, K., & Massberg, S. (2021). Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *Nat Rev Cardiol*, 18(9), 666-682. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00552-1>
- Stoller, M. L., Basak, I., Denorme, F., Rowley, J. W., Alsobrooks, J., Parsawar, K., Nieman, M. T., Yost, C. C., Hamilton, J. R., Bray, P. F., & Campbell, R. A. (2022). Neutrophil cathepsin G proteolysis of protease-activated receptor 4 generates a novel, functional tethered ligand. *Blood Adv*, 6(7), 2303-2308. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006133>
- Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., & Nagata, S. (2013). Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members. *J Biol Chem*, 288(19), 13305-13316. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457937>
- Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P. J., & Nagata, S. (2010). Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*, 468(7325), 834-838. <https://doi.org/10.1038/nature09583>
- Swieton, J., Miklosz, J., Yusa, S. I., Szczubialka, K., Pawlak, D., Mogielnicki, A., & Kalaska, B. (2021). Reversal Activity and Toxicity of Heparin-Binding Copolymer after Subcutaneous Administration of Enoxaparin in Mice. *Int J Mol Sci*, 22(20). <https://doi.org/10.3390/ijms222011149>
- Thomas, J., Kostousov, V., & Teruya, J. (2018). Bleeding and Thrombotic Complications in the Use of Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Semin Thromb Hemost*, 44(1), 20-29. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1606179>
- Tiedt, R., Schomber, T., Hao-Shen, H., & Skoda, R. C. (2007). Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood*, 109(4), 1503-1506. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-020362>
- Tricoci, P., Huang, Z., Held, C., Moliterno, D. J., Armstrong, P. W., Van de Werf, F., White, H. D., Aylward, P. E., Wallentin, L., Chen, E., Lokhnygina, Y., Pei, J., Leonardi, S., Rorick, T. L., Kilian, A. M., Jennings, L. H., Ambrosio, G., Bode, C., Cequier, A.,...Mahaffey, K. W. (2012). Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 366(1), 20-33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109719>
- van der Meijden, P. E. J., & Heemskerk, J. W. M. (2019). Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol*, 16(3), 166-179. <https://doi.org/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., & Bevers, E. M. (2013). Both TMEM16F-dependent and TMEM16F-independent pathways contribute to phosphatidylserine exposure in platelet apoptosis and platelet activation. *Blood*, 121(10), 1850-1857. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-454314>
- Varga-Szabo, D., Pleines, I., & Nieswandt, B. (2008). Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(3), 403-412. <https://doi.org/10.1161/atvaha.107.150474>

- Verschoor, A., Neuenhahn, M., Navarini, A. A., Graef, P., Plaumann, A., Seidlmeier, A., Nieswandt, B., Massberg, S., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H., & Busch, D. H. (2011). A platelet-mediated system for shuttling blood-borne bacteria to CD8 α + dendritic cells depends on glycoprotein GPIb and complement C3. *Nat Immunol*, 12(12), 1194-1201. <https://doi.org/10.1038/ni.2140>
- Volz, J., Mammadova-Bach, E., Gil-Pulido, J., Nandigama, R., Remer, K., Sorokin, L., Zernecke, A., Abrams, S. I., Ergün, S., Henke, E., & Nieswandt, B. (2019). Inhibition of platelet GPVI induces intratumor hemorrhage and increases efficacy of chemotherapy in mice. *Blood*, 133(25), 2696-2706. <https://doi.org/10.1182/blood.2018877043>
- Weiss, H. J., Vicic, W. J., Lages, B. A., & Rogers, J. (1979). Isolated deficiency of platelet procoagulant activity. *Am J Med*, 67(2), 206-213. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(79\)90392-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(79)90392-9)
- Wolberg, A. S. (2007). Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev*, 21(3), 131-142. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2006.11.001>
- Woulfe, D., Yang, J., & Brass, L. (2001). ADP and platelets: the end of the beginning. *J Clin Invest*, 107(12), 1503-1505. <https://doi.org/10.1172/jci13361>
- Xu, R. G., Gauer, J. S., Baker, S. R., Slater, A., Martin, E. M., McPherson, H. R., Duval, C., Manfield, I. W., Bonna, A. M., Watson, S. P., & Ariëns, R. A. S. (2021). GPVI (Glycoprotein VI) Interaction With Fibrinogen Is Mediated by Avidity and the Fibrinogen α C-Region. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 41(3), 1092-1104. <https://doi.org/10.1161/atvaha.120.315030>
- Yang, H., Kim, A., David, T., Palmer, D., Jin, T., Tien, J., Huang, F., Cheng, T., Coughlin, S. R., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2012). TMEM16F forms a Ca $^{2+}$ -activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation. *Cell*, 151(1), 111-122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.036>
- Yeaman, M. R. (2014). Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat Rev Microbiol*, 12(6), 426-437. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3269>
- Yuan, Y., Alwis, I., Wu, M. C. L., Kaplan, Z., Ashworth, K., Bark, D., Jr., Pham, A., McFadyen, J., Schoenwaelder, S. M., Josefsson, E. C., Kile, B. T., & Jackson, S. P. (2017). Neutrophil macroaggregates promote widespread pulmonary thrombosis after gut ischemia. *Sci Transl Med*, 9(409). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam5861>
- Zarbock, A., Singbartl, K., & Ley, K. (2006). Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J Clin Invest*, 116(12), 3211-3219. <https://doi.org/10.1172/jci29499>
- Zucker, M. B. (1947). Platelet agglutination and vasoconstriction as factors in spontaneous hemostasis in normal, thrombocytopenic, heparinized and hypoprothrombinemic rats. *Am J Physiol*, 148(2), 275-288. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1947.148.2.275>
- Zuo, Y., Yalavarthi, S., Shi, H., Gockman, K., Zuo, M., Madison, J. A., Blair, C., Weber, A., Barnes, B. J., Egeblad, M., Woods, R. J., Kanthi, Y., & Knight, J. S. (2020). Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*, 5(11). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.138999>

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre ohne die Unterstützung, Inspiration und Hilfe vieler Menschen nicht möglich gewesen. Mein herzlicher Dank gilt allen, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Steffen Massberg, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Arbeitsgruppe an diesem spannenden Thema zu forschen. Seine Unterstützung und das Vertrauen in meine Fähigkeiten haben dieses Projekt erst möglich gemacht.

Ein besonderer Dank gilt meinen Betreuern, PD Dr. Leo Nicolai und PD Dr. Rainer Kaiser, für ihre exzellente wissenschaftliche und persönliche Betreuung. Herr Kaiser hat durch seine Leidenschaft für die Wissenschaft und sein unermüdliches Engagement nicht nur mein Interesse für die Grundlagenforschung geweckt, sondern auch nachhaltig geprägt.

Ich danke dem gesamten Team der AG Massberg sowie allen Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden. Ihre Unterstützung, die vielen wertvollen Diskussionen und die gemeinsamen langen Nächte im Labor haben diese herausfordernde Zeit nicht nur erträglicher, sondern auch bereichernd gemacht.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die immer eine unermüdliche Quelle der Unterstützung und Kraft für mich war. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Eva Escaig und Dr. Yves Escaig, für ihre bedingungslose Unterstützung in jeder Lebenslage. Ebenso danke ich meinem Großvater, Dr. Johann Gassmann, der von Klein auf seine Begeisterung für Naturwissenschaften und Forschung mit mir geteilt hat und so den Grundstein für meine wissenschaftliche Neugier gelegt hat. Zusätzlich möchte ich ihm für das sorgfältige Lektorat meiner Dissertation danken, das wesentlich zur finalen Qualität dieser Arbeit beigetragen hat. Meine Brüder waren stets da, um mir in schwierigen Zeiten ein offenes Ohr zu schenken, wofür ich ihnen sehr dankbar bin.

Ohne die Unterstützung all dieser Menschen wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Ihnen allen gilt mein tiefster Dank.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Escaig, Raphael

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Prokoagulante Thrombozyten verhindern inflammatorische Blutungen der Lunge durch GPIIbIIIa und GPVI.“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 23.11.2025

Raphael Escaig

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Erklärung der Übereinstimmung



**Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation
mit der elektronischen Fassung**

Escaig, Raphael

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

„Prokoagulante Thrombozyten verhindern inflammatorische Blutungen der Lunge durch GPIIbIIIa und GPVI.“

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 23.11.2025

Ort, Datum

Raphael Escaig

Unterschrift Doktorand

Publikationsliste

Aus der dieser Dissertation hervorgegangene Publikationen

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 GPIIBIIIA and GPVI. *Blood*. 2022 Jul 14;140(2):121-139.

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.

Weitere Publikationen

Kaiser R, Dewender R, Mulkers M, Stermann J, Rossaro D, Di Fina L, Li L, Gold C, Schmid M, Käab L, Eivers L, Akgöl S, Yue K, Kammerer L, Loew Q, Anjum A, **Escaig R**, Akhalkatsi A, Laun L, Kranich J, Brocker T, Mueller TT, Krächan A, Gmeiner J, Pekayvaz K, Thienel M, Massberg S, Stark K, Kilani B, Nicolai L. Procoagulant platelet activation promotes venous thrombosis. *Blood*. 2024 Dec 12;144(24):2546-2553.

Pekayvaz K, Losert C, Knottenberg V, Gold C, van Blokland IV, Oelen R, Groot HE, Benjamins JW, Brambs S, Kaiser R, Gottschlich A, Hoffmann GV, Eivers L, Martinez-Navarro A, Bruns N, Stiller S, Akgöl S, Yue K, Polewka V, **Escaig R**, Joppich M, Janjic A, Popp O, Kobold S, Petzold T, Zimmer R, Enard W, Saar K, Mertins P, Huebner N, van der Harst P, Franke LH, van der Wijst MGP, Massberg S, Heinig M, Nicolai L, Stark K. Multiomic analyses uncover immunological signatures in acute and chronic coronary syndromes. *Nat Med*. 2024 Jun;30(6):1696-1710.

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 JKL, Polewka V, Khaled NB, Allgeier J, Tiedt S, Dichgans M, Engelmann B, Enard W, Mertins P, Hubner 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. *Sci Adv*. 2024 Mar 22;10(12):eadl1710.

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 ζ axis critically regulates platelet migration in vascular inflammation. *Blood*. 2023 Jun 15;141(24):2973-2992.

Nicolai L, Leunig A, Pekayvaz K, Esefeld M, Anjum A, Rath J, Riedlinger E, Ehreiser V, Mader M, Eivers L, Hoffknecht ML, Zhang Z, Kugelmann D, Rossaro D, **Escaig R**, Kaiser R, Polewka V, Titova A, Petzold T, Spiekermann K, Iannaccone M, Thiele T, Greinacher A, Stark K, Massberg S. Thrombocytopenia and splenic platelet-directed immune responses after IV ChAdOx1 nCov-19 administration. *Blood*. 2022 Aug 4;140(5):478-490.

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.

Nicolai L, Kaiser R, **Escaig R**, Hoffknecht ML, Anjum A, Leunig A, Pircher J, Ehrlich A, Lorenz M, Ishikawa-Ankerhold H, Aird WC, Massberg S, Gaertner F. Single platelet and megakaryocyte morpho-dynamics uncovered by multicolor reporter mouse strains in vitro and in vivo. *Haematologica*. 2022 Jul 1;107(7):1669-1680.

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, Martins P, Nicolai L, Stark K. Self-sustaining IL-8 loops drive a prothrombotic neutrophil phenotype in severe COVID-19. *JCI Insight*. 2021 Sep 22;6(18):e150862.

Präsentationen

Escaig R, Kaiser R, Nicolai L. Procoagulant platelet sentinels prevent inflammatory bleeding through GPIIBIIIA and GPVI. 2nd Immunothrombosis Symposium. LMU. 2024 Oct, München.

Escaig R, Kaiser R, Nicolai L. Procoagulant platelet sentinels prevent inflammatory bleeding through GPIIBIIIA and GPVI. 6th International Medical Student Research Conference, Korea University College of Medicine (KUMC) & Global Alliance of Medical Excellence (GAME). 2023 Dec, Seoul.

Escaig R, Kaiser R, Nicolai L. Procoagulant platelet sentinels prevent inflammatory bleeding through GPIIBIIIA and GPVI. Weekend seminar of the 20th FöFoLe doctoral program. 2022 April, Herrsching.