

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

**Kumulative Habilitationsschrift:**

**Neue Mechanismen der Thrombozytenaktivierung in der arteriellen Thrombose**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Innere Medizin

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

**Dr. med. Tobias Petzold**  
**geboren am 05.06.1981 in Lauchhammer**

Eingereicht September 2018

## Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b> .....	4
<b>Zielsetzung</b> .....	6
<b>Publikationen</b> .....	7
<b>Einfluss der <math>\beta</math>1 Integrine auf Thrombozytenaktivierung und arterielle Thrombose</b> .....	7
$\beta$ 1 integrin-mediated signals are required for platelet granula secretion and hemostasis in mouse. ....	7
<b>Rolle der Micro-RNA223 auf die Thrombozytenfunktion</b> .....	12
MiR-223 is dispensable for platelet production and function in mice. ....	12
<b>Einfluss der neuen oralen Antikoagulantien auf die Thrombozytenfunktion und arterielle Thrombose</b> .....	17
Oral thrombin inhibitor aggravates platelet adhesion and aggregation during arterial thrombosis. ....	17
Non-vitamin K oral anticoagulants (NOAC) and the risk of myocardial infarction: Differences between factor IIa and factor Xa inhibition? .....	23
<b>Reduktion der antithrombozytären Wirkung von Aspirin unter Komedikation mit Metamizol</b> .....	27
Dose reduction, oral application, and order of intake to preserve aspirin antiplatelet effects in dipyrrone co-medicated chronic artery disease patients. ....	27
<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	30
<b>Versicherung an Eides Statt</b> .....	34
<b>Danksagung</b> .....	35
<b>Lebenslauf</b> .....	36
<b>Gesamtes Publikationsverzeichnis</b> .....	38
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	41

Für meine Familie

## Einleitung

Die arterielle Thrombose als pathophysiologisches Korrelat des Myokardinfarktes (MI) (Jackson 2011) sowie der ischämisch bedingten Folgeerkrankungen stellen weiterhin die primäre Todesursache in Deutschland dar (Destatis 2015, Todesursachen). Während der Atherothrombose kommt es durch die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque in den Koronararterien zur Freisetzung von subendothelialen Matrixproteinen (z.B. Kollagene, von-Willebrand-Faktor, Laminin, Fibronectin) sowie von löslichen Signalstoffen (z.B. ADP, Lipidmediatoren). Die lokale Freisetzung dieser potenten Thrombozytenagonisten sowie die Exposition der hoch thrombogenen Matrixproteine triggert die Aktivierung von Thrombozyten, die wesentlich zur Thrombusbildung mit anschließender Reduktion des Perfusionsflusses und folglich zur Gewebeischämie des Herzmuskels (Jackson 2011) beitragen.

Thrombozyten sind anukleäre Zellen, die im Knochenmark von ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, im Prozess der Thrombopoiesis (Italiano and Shivdasani 2003) in das Blut freigesetzt werden. Nach einer intravaskulären Lebenszeit von 7-10 Tagen werden sie aus der Zirkulation entfernt und abgebaut. In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten neben ihrer klassischen physiologischen Aufgabe der Überwachung der Integrität der Gefäßwand als korpuskulärer Bestandteil der primären Hämostase vielfältige Aufgaben im Rahmen von Tumorerkrankungen (Labelle, Begum et al. 2011), Infektionen (Gay and Felding-Habermann 2011) sowie der Pathogenese der Atherosklerose (Massberg, Brand et al. 2002) übernehmen.

Im Rahmen der arteriellen Thrombose erfolgt die anfängliche Rekrutierung der Thrombozyten zur Verletzungsstelle über den von-Willebrand-Faktor (vWF), der durch das Glykoprotein GPIIb/IIIa auf dem Thrombozyten gebunden wird. Die dadurch erzielte Dezeleration ermöglicht die Bindung des Glykoproteins GPIIb/IIIa an Kollagen und Fibrinogen, was die initiale Aktivierung der Thrombozyten bedingt. Die vollständige Thrombozytenaktivierung erfolgt durch die Kumulation weiterer Aktivierungssignale über andere Thrombozytenrezeptoren. Dazu gehören unter anderem die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren wie z.B. den ADP-Rezeptor (P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>1</sub>), den Serotoninrezeptor oder den Thrombinrezeptor (Protease aktivierter Rezeptor-1) (Bye, Unsworth et al. 2016). Die Thrombozytenaktivierung geht mit Konformationsänderung der thrombozytären Integrinrezeptoren einher, die durch die Bindung ihres spezifischen Substrates der exponierten Matrixproteine scherkraftresistente Adhäsion formt.

Parallel dazu kommt es auf den aktivierten Thrombozyten zur Exposition negativ geladener Membrananteile, was die Rekrutierung von Gerinnungsfaktoren und die Bildung des Tenasekomplexes auf der Zelloberfläche bedingt (Ivanciu and Stalker 2015). Durch die

Aktivierung von FXa kann in einem nächsten Schritt die Aktivierung von Prothrombin in katalytisch aktives Thrombin erfolgen, was letztlich zur Fibrinogenierung und anschließender Quervernetzung der Thrombozyten im Thrombus führt. Durch die Sezernierung der Thrombozytengranula (z.B. ADP, ATP, Thromboxan, Prothrombin, Fibrinogen), sowie die zunehmende Gerinnungsaktivierung kommt es zur Amplifikation der Thrombozytenaktivierung, was zu einer vermehrten Thrombozytenrekrutierung und Thrombuswachstum führt.

Obwohl das Verständnis über die zugrunde liegenden Mechanismen der Thrombozytenaktivierung stetig wächst, zielen die derzeitig zugelassenen antithrombozytären Therapien lediglich auf eine Reduktion der Thrombozytenaktivierung während der späten Amplifikationsphase. Dazu zählen Aspirin, was die Thromboxan-Generierung durch Acetylierung von Ser530 der Cyclooxygenase I hemmt, die P2Y<sub>12</sub> ADP-Rezeptor-Antagonisten (Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor), ein PAR-1 Thrombinrezeptor-Antagonist (Vorapaxar) und die Glykoprotein GPIIb/IIIa Hemmer (Tirofiban, Abciximab). Bislang sind keine antithrombozytären Therapien, die spezifisch die frühe Phase der Thrombozytenrekrutierung und Aktivierung inhibieren, zugelassen. Ziel einer solchen spezifischen Thrombozyteninhibition soll die Reduktion von Blutungskomplikationen im Rahmen einer primären Blutstillung bei gleichzeitig bestehender suffizienter antithrombotischer Wirkung sein. Aktuell wird das Revacept, ein dimeres lösliches GPVI Fragment (Ungerer, Rosport et al. 2011) das intravaskulär exponierte GPVI Bindungsstellen innerhalb einer Gefäßläsion blockiert und somit eine Aktivierung der Thrombozyten verhindert, als möglicher neuer therapeutischer Ansatz in einer klinischen Phase II Studie (NCT03312855) getestet.

Ein neues Level an Komplexität ergibt sich durch die Einführung der neuen oralen Antikoagulantien (NOAC) die neben der Faktor IIa bzw Xa Inhibition der Gerinnungsreaktion auch Einfluss auf die Thrombozytenfunktion während der arteriellen Thrombose haben können. Auch dahingehend ist eine detaillierte Untersuchung NOAC vermittelter Effekte auf die Thrombozytenfunktion essentiell.

Zusammengefasst ergibt sich, dass ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Thrombozytenaktivierung sowie pharmakodynamischer Medikamenteneffekte auf die Thrombozytenfunktion für die klinische Patientenversorgung und die Entwicklung neuer antithrombotischer Therapien von essentieller Bedeutung ist.

## **Zielsetzung**

1.) Im ersten Projekt wird der Einfluss der  $\beta$ 1 Integrine auf die Kollagen vermittelte Thrombozytenaktivierung und arterielle Thrombose untersucht. Dafür wurden verschiedene genetisch veränderte  $\beta$ 1 Integrin Mauslinien generiert.

2.) Im zweiten Projekt wird die pathophysiologische Relevanz der MicroRNAs als neuer Regulationsmechanismus der Thrombozytenfunktion untersucht. Dafür wird der Einfluss der am häufigsten exprimierten MicroRNA in Thrombozyten miR223 mit Hilfe eines miR223 Knockout-Mausmodells analysiert.

3.) Im dritten Projekt wird der Einfluss der NOACs, im Besonderen des oralen Thrombininhibitors (OTI) Dabigatran, unter dem ein erhöhtes Risiko für Herzinfarkte beobachtet wurde, auf die Thrombozytenfunktion untersucht.

Weitere NOAC assoziierte Effekte auf die Thrombozytenaktivierung werden in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst und diskutiert.

4.) Im vierten Projekt wird die pharmakodynamische Interaktion von Aspirin und dem weitläufig eingesetzten Schmerzmittel Metamizol auf die antithrombozytäre Wirkung von Aspirin untersucht.

## Publikationen

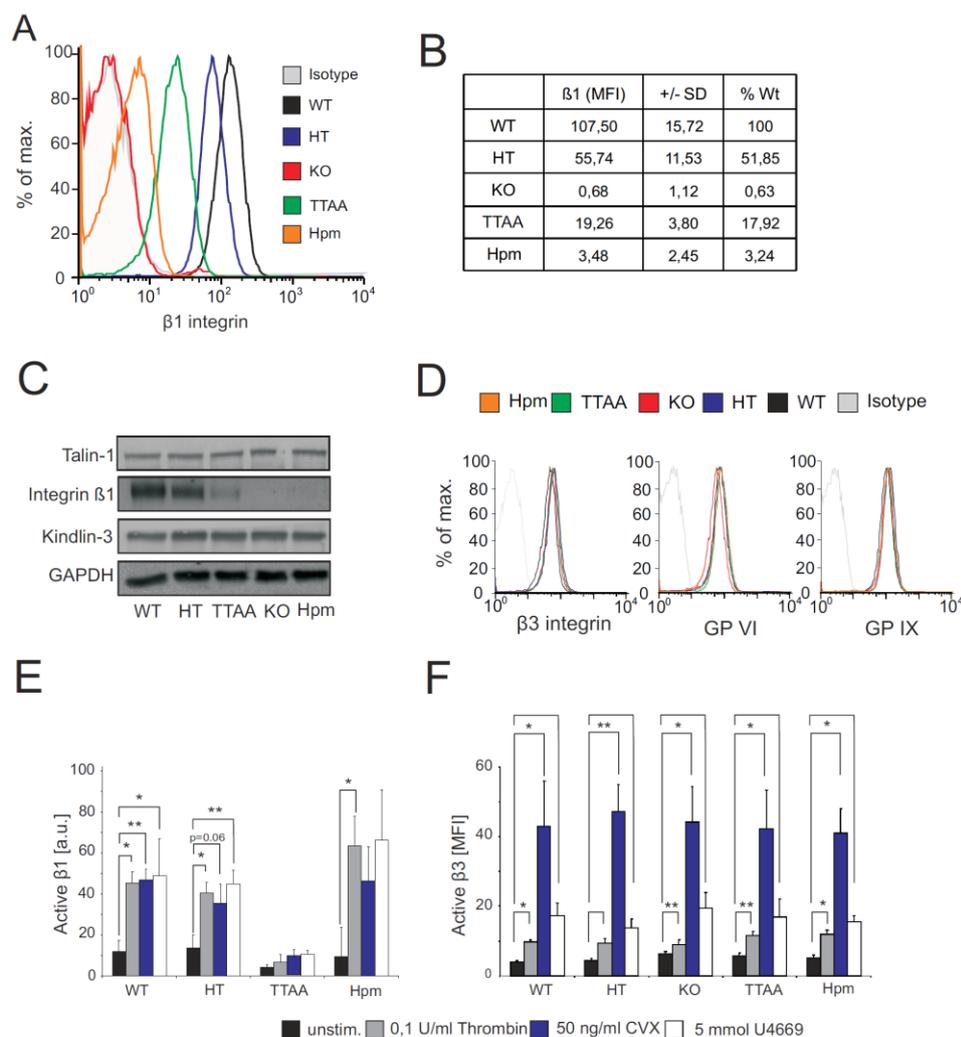
### **Einfluss der $\beta 1$ Integrine auf Thrombozytenaktivierung und arterielle Thrombose**

$\beta 1$  integrin-mediated signals are required for platelet granula secretion and hemostasis in mouse. Petzold T, Ruppert R, Pandey D, Barocke V, Meyer H, Lorenz M, Zhang L, Siess W, Massberg S and Moser M. Blood. 2013;122:2723-31.DOI:10.1182/blood-2013-06-508721.

Im Rahmen einer atherosklerotischen Plaqueruptur kommt es zur Exposition von hoch thrombogenen, subendothelialen Matrixproteinen. Die unmittelbar einsetzende Rekrutierung der Thrombozyten erfolgt dabei durch die Scherkräfte abhängige Interaktion des thrombozytären von-Willebrand-Faktor (vWF) Rezeptors GPIIb/IIIa mit dem an der Gefäßläsion exponierten vWF. Durch die vWF vermittelte Verlangsamung der Plättchen kommt es zur Interaktion und Aktivierung weiterer Matrixrezeptoren, u.a. des primären Kollagenrezeptors Glykoprotein VI (GPVI), durch dessen Signale es zur vollständigen Aktivierung des Thrombozyten kommt. Während des Aktivierungsschritts führt die Bindung der intrazellulären Regulatorproteine Talin-1 und Kindlin-III an den zytoplasmatischen Teil der  $\beta$ -Untereinheit der Integrine zur Konformationsänderung der extrazellulären Domäne des Rezeptors, was die Bindung an Matrixproteine ermöglicht. Die Abwesenheit eines der beiden Aktivatorproteine führt aufgrund der fehlenden Integrinaktivierbarkeit zu einer Protektion vor arteriellen Thrombosen und einer maximal verlängerten Blutungszeit (Nieswandt, Moser et al. 2007, Moser, Nieswandt et al. 2008). Durch die strukturelle Aktivierung der  $\beta 1$  und  $\beta 3$  Integrine wird die Rekrutierung und Scherkraft resistente Adhäsion der Thrombozyten an die Verletzungsstelle ermöglicht.

Die pathophysiologische Relevanz der  $\beta 1$  Integrine ist, im Gegensatz zu den  $\alpha 11b\beta 3$  Integrin, unzureichend verstanden (Gruner, Prostredna et al. 2003). Neben dem am häufigsten exprimierten  $\beta 1$  Integrin, dem Kollagenrezeptor  $\alpha 2\beta 1$ , exprimieren Thrombozyten den Fibronectin-Rezeptor  $\alpha 5\beta 1$  und den Laminin-Rezeptor  $\alpha 6\beta 1$ . Während die dominante Rolle des GPVI hinsichtlich der Kollagen vermittelten Thrombozytenaktivierung während der frühen Phase der arteriellen Thrombose generell akzeptiert ist, bleibt die pathophysiologische Relevanz des  $\alpha 2\beta 1$  Integrins während dieses Prozesses unklar. Um die Fragestellung experimentell zu adressieren wurden verschiedene genetisch veränderte konditionelle Mauslinien generiert, die unterschiedliche Mengen an  $\beta 1$  Integrin auf den Thrombozyten exprimieren (Petzold, Ruppert et al. 2013). Zudem wurde eine Mauslinie ( $\beta 1$ -TTAA) generiert, in der  $\beta 1$  Integrine exprimiert werden, die jedoch aufgrund einer Mutation der intrazellulären Bindungsstelle (d.h. Aminosäure788/789 Threonine/Threonine-> Alanine/Alanine) für das Integrin- Aktivatorprotein Kindlin-III nicht mehr aktiviert werden können. Zuerst erfolgte eine

Charakterisierung der aus 4 verschiedenen konditionellen Knock-out Mäusen isolierten Thrombozyten hinsichtlich der Integrinexpression und Aktivierbarkeit mittels Durchflusszytometrie. Im Vergleich zu den Kontrollen (d.h. 100% aktivierbares  $\beta$ 1-Integrin) fand sich auf der Zelloberfläche der heterozygoten Thrombozyten 52% funktionales  $\beta$ 1, auf den TTAA Thrombozyten 18% nicht aktivierbares, auf den hypomorphen Tieren 3% aktivierbares und auf knock-out Thrombozyten 0%  $\beta$ 1-Integrin (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Charakterisierung der genetisch veränderten konditionellen  $\beta$ 1- Integrin knock-out Mäuse. Quantifizierung der  $\beta$ 1-Integrin Oberflächenexpression auf Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie (A,B) und Immunoblotting (WT: Wildtype Kontrolle, HT: heterozygote, KO: knock-out, TTAA: Kindlin-3 Bindungsstellen Mutante, Hpm: hypomorph). (D) Quantifizierung der Expression der Thrombozytenoberflächen-Rezeptoren  $\beta$ 3-Integrin, Glycoprotein VI (GPVI) und IX (GPIX). (E/F) Quantifizierung der thrombozytären Integrinaktivierung mittels konformationssensiblen Antikörpern nach Stimulation mit den angegebenen Stimuli (d.h. Thrombin, CVX: Convulxin und U4669). Signifikanzlevel sind angegeben (P-Werte: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).**

Die Funktionalität der  $\beta$ 1-Integrine während der Adhäsion und des Spreadings wurde auf Kollagen Substraten quantifiziert. Dabei fand sich eine deutlich reduzierte Spreading Fläche (Area) in den knock-out sowie den TTAA und Hpm Thrombozyten. Diese Ergebnisse ließen sich auch in-vivo während der frühen arteriellen Thrombose bestätigen. In einem Carotis-Ligaturmodell war die Thrombozytenadhäsion in den knock-out sowie den TTAA und Hpm Tiere reduziert, was die Rolle der  $\beta$ 1-Integrine während der Adhäsion zur Gefäßläsion unter hohen, arteriellen Scherkräften unterstreicht. Desweiteren konnten wir zeigen, dass thrombozytäre  $\beta$ 1-Integrine wesentlich zur primären Hämostase beitragen. Während in  $\beta$ 1 knock-out Mäusen die Blutungszeit deutlich verlängert ist, reichten bereits ~3% an aktivierbaren  $\beta$ 1-Integrinen auf den Thrombozyten aus ( $\beta$ 1-hypomorph), um eine normale Blutungszeit zu erhalten (Petzold, Ruppert et al. 2013) (Abb.2).

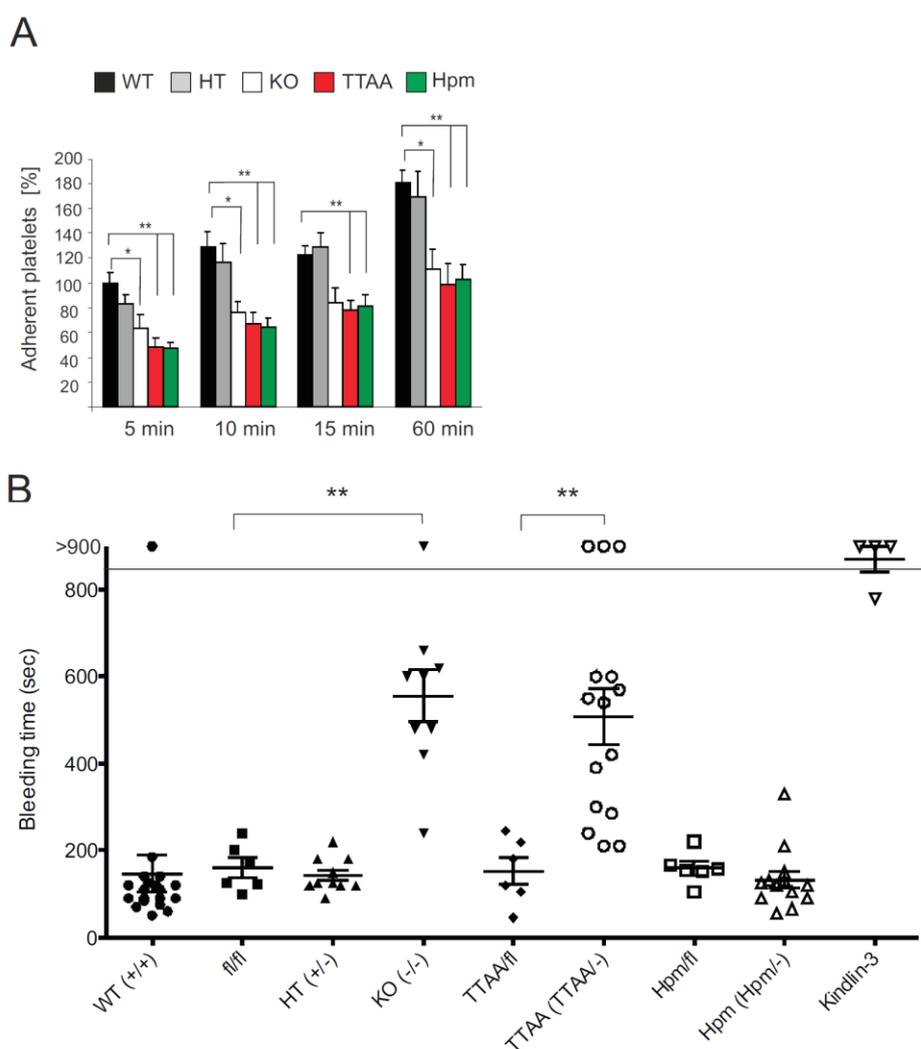


Abbildung 2: Arterielle Thrombose und Blutungszeitmessung. (A) Karotisligaturmodell zur Induktion einer arteriellen Thrombose. Quantifizierung der Thrombozytenadhäsion an der Gefäßläsion zu den angegebenen Zeitpunkten (5min, 10min, 15min, 60min) (B) Bestimmung

*der Blutungszeit in Sekunden. Tierlinien: WT: C57/bl6 Wildtype Kontrolle, fl/fl: Kontrollgruppe aus Geschwistertieren (Cre-), HT: heterozygote, KO: knock-out, TTAA: Kindlin-3 Bindungsstellen Mutante, TTAA/fl: Kontrollgruppe aus Geschwistertieren (Cre-), Hpm: hypomorph, Hpm/fl Kontrollgruppe aus Geschwistertieren (Cre-). Signifikanzlevel sind angegeben (P-Werte: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).*

Als zugrunde liegender Mechanismus konnte gezeigt werden, dass die Kollagen getriggerte Sezernierung von thrombozytären dense-Granula (z.B. ATP) sowie  $\alpha$ -Granula (z.B. vWF, TSP-1, PF-4 und Serotonin) zur Schaffung eines prothrombotischen Mikromilieus und vollen Thrombozytenaggregation notwendig ist und dafür bereits 3% funktionale  $\beta 1$ -Integrine ausreichend sind (Abbildung 3). Dabei geht die Sezernierung mit einer Aktivierung der Rho-GTPase RAC-1 sowie der Reorganisation des Aktinzytoskeletts einher. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die Aktivierung der  $\alpha 2 \beta 1$ -Integrine und die subsequent induzierten Signale einen wesentlichen Beitrag zur Kollagen vermittelten Aktivierung der Thrombozyten während der frühen Phase der art. Thrombose sowie Hämostase leisten. Als zugrundeliegender Mechanismus konnte gezeigt werden, dass  $\beta 1$ -Integrin vermittelte Signale zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts führen, was letztlich eine Granula-Sezernierung auslöst.

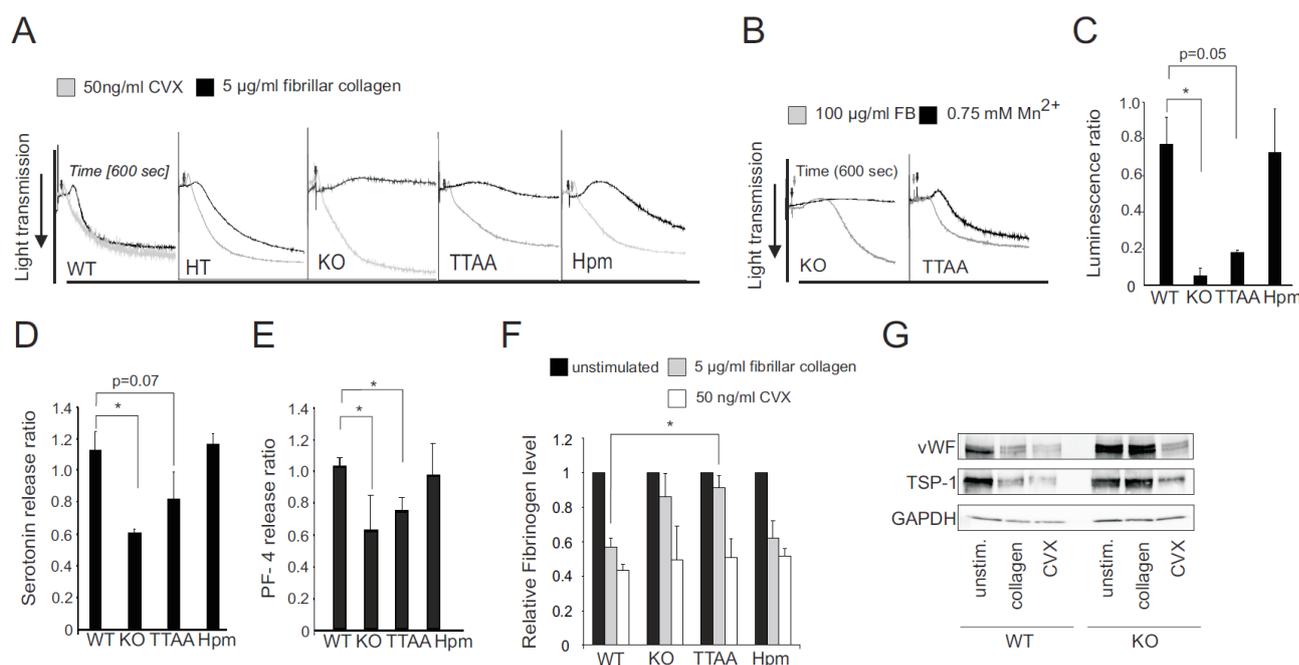


Abbildung 3:  $\beta$ 1-Integrine vermitteln die Thrombozytenaggregation und Granulasekretion. Licht-Transmissionsaggregometrie nach Stimulation von gewaschenen Plättchen mit Kollagen oder CVX (A). Aggregationsreaktion in Gegenwart von Fibrinogen und Mangan (B). Quantifizierung der dense- Granula ATP Sekretion mittels Lumineszenz Reaktion (D), von Serotonin (D), Plättchenfaktor-4 (PF-4; E) und Fibrinogen (F) nach jeweils nach Stimulation mit Kollagen und CVX. Dargestellt ist die Ratio der Sezernierungsantwort (Kollagen/CVX). (G) Immunoblots zur Bestimmung der vWF und TSP-1 Sezernierung aus Thrombozyten nach Stimulation mit Kollagen und CVX. Ein repräsentativer Immunoblot für 3 unabhängige Versuche ist gezeigt. (WT: Wildtype Kontrolle, HT: heterozygote, KO: knock-out, TTAA: Kindlin-3 Bindungsstellen Mutante, Hpm: hypomorph). Signifikanzlevel sind angegeben (P-Werte: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### **Rolle der Micro-RNA223 auf die Thrombozytenfunktion**

MiR-223 is dispensable for platelet production and function in mice. Leierseder S\*, Petzold T\*, Zhang L, Loyer X, Massberg S and Engelhardt S. *Thrombosis and haemostasis*. 2013;110:1207-14. DOI:10.1160/TH13-07-0623. \*contributed equally

MicroRNAs (miRNAs) sind nicht-kodierende 22-23 Nukleotide lange RNAs, die als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression vielfältige physiologische und pathophysiologische Prozesse innerhalb eukaryontischer Zellen regulieren (Bartel 2009) (Chen, Li et al. 2004). Mechanistisch binden die in der Zelle gebildeten reifen, einzelsträngigen miRNA Moleküle an die in der Zelle vorhandenen Boten-RNA (mRNA). Die Bindungsspezifität wird dabei durch die miRNA Sequenz bestimmt. Durch eine komplementäre Bindung der miRNA an die mRNA entstehen RNA-Doppelstränge, die an den RISC-Komplex binden und dadurch die Translation der mRNA hemmen bzw. einen Abbau des RNA-Komplexes triggern (Rowley, Chappaz et al. 2016). Die Alteration der mRNA-Level in den Zellen führt zu einer posttranskriptionellen Regulation der Proteinexpression. Der Einfluss von miRNA auf die Thrombozytenfunktion ist insbesondere vor dem Hintergrund, dass Thrombozyten keinen Zellkern besitzen und eine Translation in begrenzten Maßen stattfindet, unzureichend verstanden (Sunderland, Skroblin et al. 2017). MiRNA223 ist die am häufigsten exprimierte miRNA in Thrombozyten und ist daher aus klinischer und grundlagenwissenschaftlicher Sicht von hohem Interesse.

Um die Rolle von miR223 auf die Thrombozytenfunktion und Hämostase genauer zu untersuchen, wurde ein miRNA223 knock-out (KO) Mausmodell genutzt (Leierseder, Petzold et al. 2013). Initial erfolgte die Charakterisierung der basalen Thrombozytenparameter. Dabei fand sich hinsichtlich der Thrombozytenzahlen, Größe und Lebenszeit in den KO-Tieren kein Unterschied im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 1A-C). Auch hinsichtlich der Expression zentraler Thrombozytenrezeptoren (d.h. GPIb, GPXI, Integrin GPIIb sowie  $\beta$ 1Integrin) fand sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 1D). Um den Einfluss von miR223 auf die Thrombozytenfunktionalität zu adressieren, wurde die Thrombozytenreaktivität nach Stimulation mit Thrombin und CVX auf Einzelzellebene mittels Durchflusszytometrie, das Aggregationsverhalten in plättchenreichen Plasma (PRP) sowie das Thrombuskontraktionsverhalten untersucht (Abbildung 1F-H). Dabei fanden sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Um letztlich die physiologische Relevanz von miR223 unter arteriellen Flussbedingungen zu untersuchen, erfolgten Flusskammerversuche auf Kollagenoberflächen, wobei sich erneut kein Unterschied bezüglich Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation zwischen Kontrolle und KO zeigte (Abbildung 1I). Im Einklang mit den in-vitro Daten fanden sich keine signifikanten Unterschiede auf die primäre Hämostase in-

vivo, die mittels Blutungszeit (Abbildung 1J) bestimmt wurde. Unsere Studie fand keinen Hinweis auf einen relevanten Einfluss von miR223 auf die Thrombozytenfunktion. Obwohl sich auf Grundlage der Thrombozytenzahlen und Parameter unter physiologischen Bedingungen kein Anhalt für einen Einfluss von miR223 auf die Megakaryozytenfunktion und Thrombopoiesis ergeben hat, bleibt unklar, ob diese Beobachtung auch unter Bedingungen mit gesteigertem Verbrauch von Thrombozyten und kompensatorisch erhöhter Thrombozytenbildung zutrifft. Um diese Fragestellung in-vivo zu adressieren wurde ein Modell der Antikörper induzierten Immuno-thrombozytopenie untersucht. Darin fand sich, dass die Erholung der Thrombozytenzahlen in miR223 KO Tieren verzögert erfolgt (Abbildung 2A). Die verzögerte Regeneration der Plättchenzahlen fand sich auch nach Durchführung einer Knochenmarkstransplantation (Abbildung 2B), was für einen Megakaryozyten (MK) intrinsischen Mechanismus spricht. In den anschließenden Versuchen zur Untersuchung der Megakaryozytenfunktion und Proliferation fand sich zwischen den Gruppen kein relevanter Unterschied hinsichtlich des Spreadingverhaltens, der Fähigkeit zur Proplättchenbildung, dem Proliferationspotential von MK-Vorläuferzellen aus isolierten Knochenmark sowie der Anzahl von MK im Knochenmark (Leierseder, Petzold et al. 2013) (Abbildung 2C-F). Inwieweit der moderate Einfluss von miR223 auf die Thrombozyten-Erholungszeit klinisch relevant ist, werden weiterführende Untersuchungen zeigen.

Zusammenfassend ergibt sich auf Grundlage unserer Ergebnisse kein Hinweis auf eine relevante Rolle der am häufigsten exprimierten MicroRNA auf die Plättchenfunktion in murinen Zellen. Zukünftige weiterführende mechanistische Untersuchungen sind nötig, um den direkten Einfluss weiterer in Thrombozyten exprimierten miRNAs auf die Thrombozytenfunktion zu untersuchen.

*Abbildung 1:*

*Copyright protected*

*Abbildung 2:*

*Copyright protected*

*Abbildung 1: (A-C) Charakterisierung der Thrombozytenparameter (Anzahl, Plättchenvolumen und Lebenszeit) in Vollblut bzw. in-vivo im Mausmodell. (D) Quantifizierung der Oberflächenexpression der Thrombozytenrezeptoren mittels Durchflusszytometrie (GPIX, Integrin GPIIb, GPIIb $\alpha$ ; n>3). (E) Thrombozytenaktivierung nach Stimulation mit den angegebenen Stimuli, quantifiziert mittels Durchflusszytometrie zur Messung des aktiven GPIIbIIIa sowie P-selectin (n>3) Expression. (F-G) Aggregationsmessungen in Vollblut und gewaschenen Thrombozyten. (H) Thrombus Retraktions Assay nach Stimulation mit Thrombin. (I) Flusskammerversuche auf Kollagen unter arteriellen Flussbedingungen mit Messung der Oberflächenbedeckung durch Rhodamin gefärbtes Vollblut (Shear rate 1000/s; n>3). (J) Blutungszeitanalyse im Mausmodell dargestellt sind einzelne Individuen. (WT: Kontrolle, KO: knockout).*

*Abbildung 2: (A) Erholungszeit der Thrombozytenzahl nach Induktion einer Immunthrombozytopenie. (B) Thrombozytenzahlen nach Generierung von Knochenmarkschimären. (C) Spreadingverhalten von Megakaryozyten. (D) Quantifizierung der Proplättchenbildung von kultivierten Megakaryozyten. (E) Proliferationsverhalten (CFU: koloniebildende Einheit) von Megakaryozytenvorläuferzellen aus dem Knochenmark. (F) Quantifizierung der Megakaryozytenzahlen im Knochenmark (MK: in rot, Zellkerne in blau gefärbt). (WT: Kontrolle, KO: knockout). Signifikanzlevel sind angegeben (P-Werte: \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).*

## **Einfluss der neuen oralen Antikoagulantien auf die Thrombozytenfunktion und arterielle Thrombose**

Oral thrombin inhibitor aggravates platelet adhesion and aggregation during arterial thrombosis. Petzold T, Thienel M, Konrad I, Schubert I, Regenauer R, Hoppe B, Lorenz M, Eckart A, Chandraratne S, Lennerz C, Kolb C, Braun D, Jamasbi J, Brandl R, Braun S, Siess W, Schulz C and Massberg S. *Sci Transl Med.* 2016;8:367ra168. DOI:10.1126/scitranslmed.aad6712.

Für Patienten, die aufgrund eines Vorhofflimmerns oder einer venösen Thromboembolie eine dauerhafte orale Antikoagulation benötigen, stellen die seit wenigen Jahren verfügbaren sogenannten neuen oralen Antikoagulantien (NOACs), die auch als DOACs (Direkte Orale Antikoagulantien) bezeichnet werden, eine attraktive Alternative zu den bisher genutzten Vitamin-K Antagonisten (VKA, z.B. Marcumar) dar. Zu der Gruppe der klinisch zugelassenen NOACs gehört der direkte Thrombin (Faktor IIa) Inhibitor Dabigatran sowie die Faktor Xa Inhibitoren Rivaroxaban, Apixaban sowie Edoxaban. In den großen klinischen randomisierten Zulassungsstudien zeigte sich eine Gleichwertigkeit der NOACs bzgl. der Prävention von Schlaganfällen gegenüber der Behandlung mit VKA sowie eine Gleichwertigkeit bzw. Überlegenheit hinsichtlich des Auftretens von Blutungskomplikationen. In der Dabigatran-Zulassungsstudie zur Schlaganfall-Prävention bei nicht-valvulärem Vorhofflimmern fanden sich bei Patienten unter Dabigatran im Vergleich zu Patienten, die mit Vitamin-K-Antagonisten behandelt wurden, eine erhöhte Häufigkeit von Herzinfarkten (Connolly, Ezekowitz et al. 2009). Vor dem Hintergrund dieser Beobachtung wurde die vorliegende translationale Studie mit der Fragestellung, ob die erhöhte Rate von Herzinfarkten unter Dabigatrantherapie auf einem zugrundeliegenden Mechanismus beruht, initiiert.

Hierfür wurden 95 Patienten rekrutiert, die aufgrund von Vorhofflimmern mit Dabigatran (n=45; 150mg zweimal täglich) oder Marcumar (n=54; Ziel INR 2-3) zur Prävention systemischer Embolien antikoaguliert waren. Während sich kein Hinweis auf eine Alteration der Thrombozytenaktivierbarkeit auf Einzelzellebene fand, zeigte sich in der Vollblutaggregationsmessung lediglich nach Stimulation mit Ristocetin eine verstärkte Aggregationsantwort. Im Rahmen einer arteriellen Thrombose wird die initiale Thrombozytenrekrutierung durch vWF vermittelt. Da das Schlangengift Ristocetin zu einer strukturellen Aktivierung des vWF-Moleküls führt, die der physiologischen durch intravasale Scherkräfte induzierten Aktivierung gleicht, wurden zur weiteren Analyse Flusskammerversuche durchgeführt. Um die pathophysiologische Relevanz der Versuche zu gewährleisten, wurden Flusskammern verwendet, die mit humanem atherosklerotischen Plaquematerial beschichtet waren (Brandl, Richter et al. 1997, Reiningger, Bernlochner et al.

2010). Wie in Abbildung 1 dargestellt, fanden sich unter arteriellen Flussbedingungen in der OTI im Vergleich zur VKA und unbehandelten Kontrollgruppe eine verstärkte Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung (Abbildung 1).

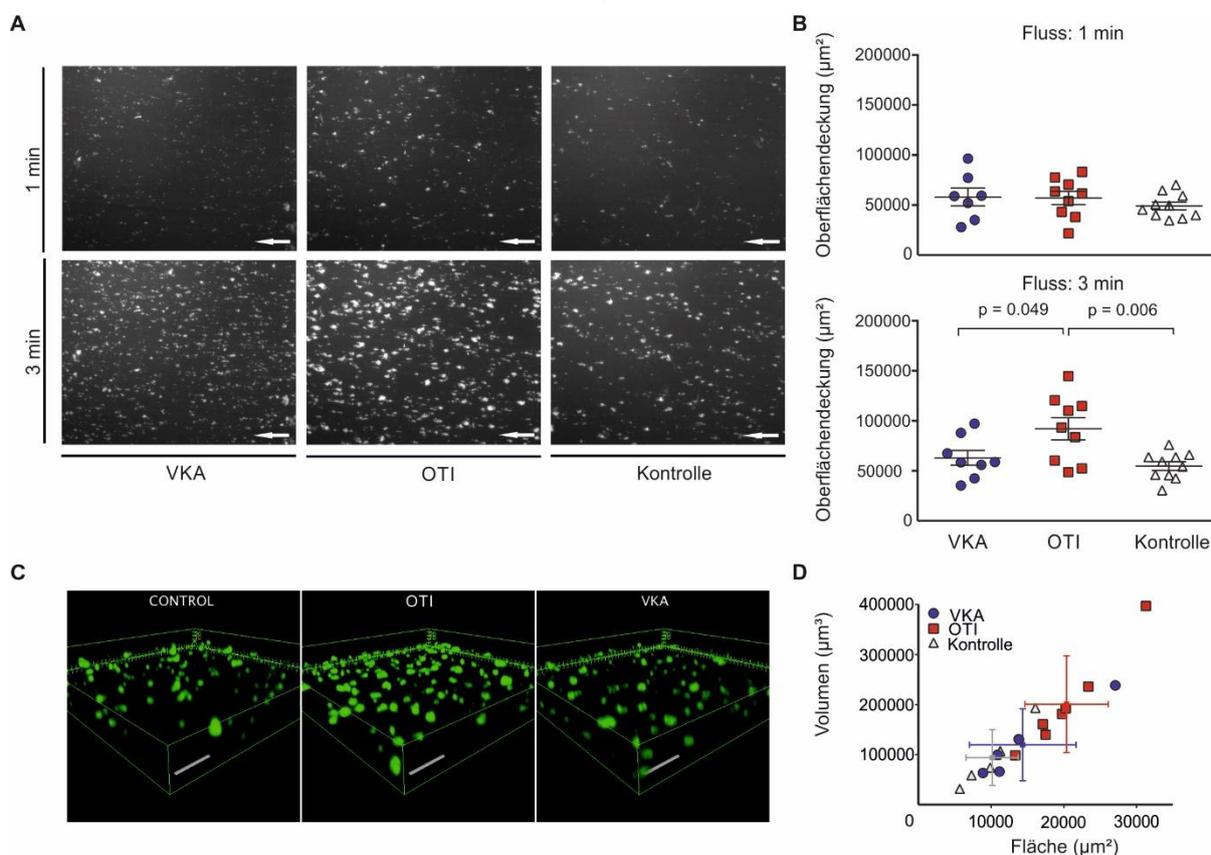


Abbildung 1: Verstärkte Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation auf humanem Plaquematerial unter Flussbedingungen in OTI-behandeltem Patientenblut. Blut von OTI- oder VKA-behandelten Patienten und gesunden Kontrollen wurde mit einer Scherrate von 1000/s für 3min durch eine mit humanem atherosklerotischen Plaquematerial beschichtete Flusskammer perfundiert. (A) Repräsentative Fluoreszenzbilder nach 1 und 3min Blutfluss werden gezeigt (Pfeil 120  $\mu\text{m}$ ). (B) Die Thrombozytenadhäsion wurde als Gesamtoberflächendeckung analysiert. (C) Repräsentative 3D-Rekonstruktionen der Plättchenaggregate und Thromben auf dem atherosklerotischen Plaquematerial nach 3 Minuten Blutfluss (1000/s) werden gezeigt (Maßstabsbalken 25 $\mu\text{m}$ ). (D) Analyse der Oberflächendeckung und Thrombusvolumen nach 3min.

Um die physiologische Relevanz für die arterielle Thromboseentstehung in-vivo zu adressieren wurden zwei Mausmodelle zur arteriellen Thrombose in OTI und VKA behandelten Tieren sowie unbehandelten Kontrollen durchgeführt (Abbildung 2A, B). Während die initiale Rekrutierung und Aggregatbildung der Thrombozyten im Carotis-Ligatur-Modell zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich waren (Abbildung 2C, D), fand sich im Drahtverletzungsmodell, in dem eine deutlich schwerere Gefäßverletzung induziert wird, eine

erhöhte Thrombusstabilität unter OTI. Im Gegensatz dazu waren VKA behandelte Tiere gegen die Bildung einer okkludierenden arteriellen Thrombose geschützt (Abbildung 2E). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die unter OTI Behandlung beobachteten Effekte direkt durch eine veränderte Thrombozytenreaktivität unter Flussbedingungen bedingt sind.

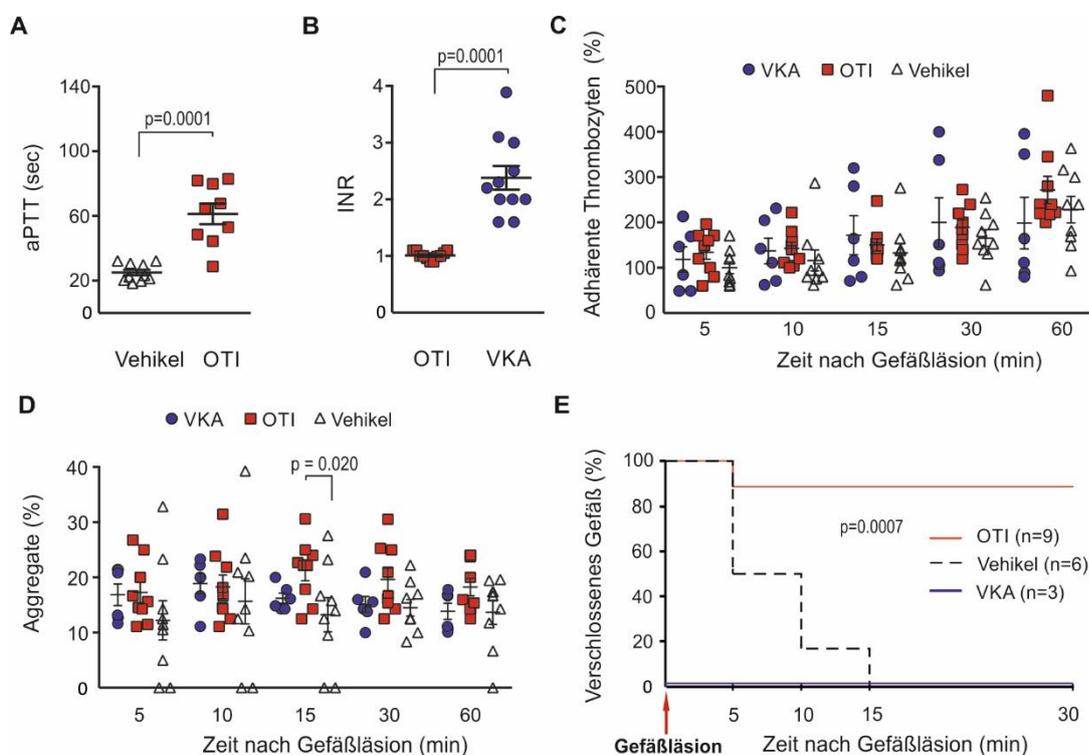


Abbildung 2: (A und B) Gerinnungsparameter (aPTT, INR) in Mäusen nach Behandlung. Im Carotis-Ligatur-Modell wurden die Thrombozytenadhäsion (C) und Aggregatbildung (D) an der Läsionsstelle intravital mikroskopisch beobachtet und zu den angegebenen Zeitpunkten dargestellt. Im Carotis-Denudationsmodell wurden die Bildung eines okklusiven Thrombus und das Wiedereinsetzen des Blutflusses intravital mikroskopisch beobachtet. Die Daten sind in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.

Hierfür wurden die Flusskammerversuche in Gegenwart des am häufigsten klinisch eingesetzten Thrombozytenhemmers, Aspirin (ASS), wiederholt. Wie in Abbildung 3 dargestellt, konnten die prothrombotischen Effekte durch die Gabe von Aspirin antagonisiert werden. Dies zeigt, dass die prothrombotischen Effekte durch Thrombozyten vermittelt sind. Um den zugrundeliegenden Mechanismus zu adressieren, erfolgte die Bestimmung der Thrombinlevel, die in der OTI Gruppe erhöht waren. Vor dem Hintergrund der vorliegenden Ergebnisse, die eine Abhängigkeit des prothrombotischen Effekts von vWF, Thrombozyten in Gegenwart erhöhter Thrombinlevel zeigt, wurde im Folgenden die Rolle des vWF-Rezeptors

GPIIb $\alpha$  untersucht. Neben seiner Funktion als vWF-Rezeptor stellt GPIIb $\alpha$  den am häufigsten exprimierten Thrombinrezeptor auf Thrombozyten dar.

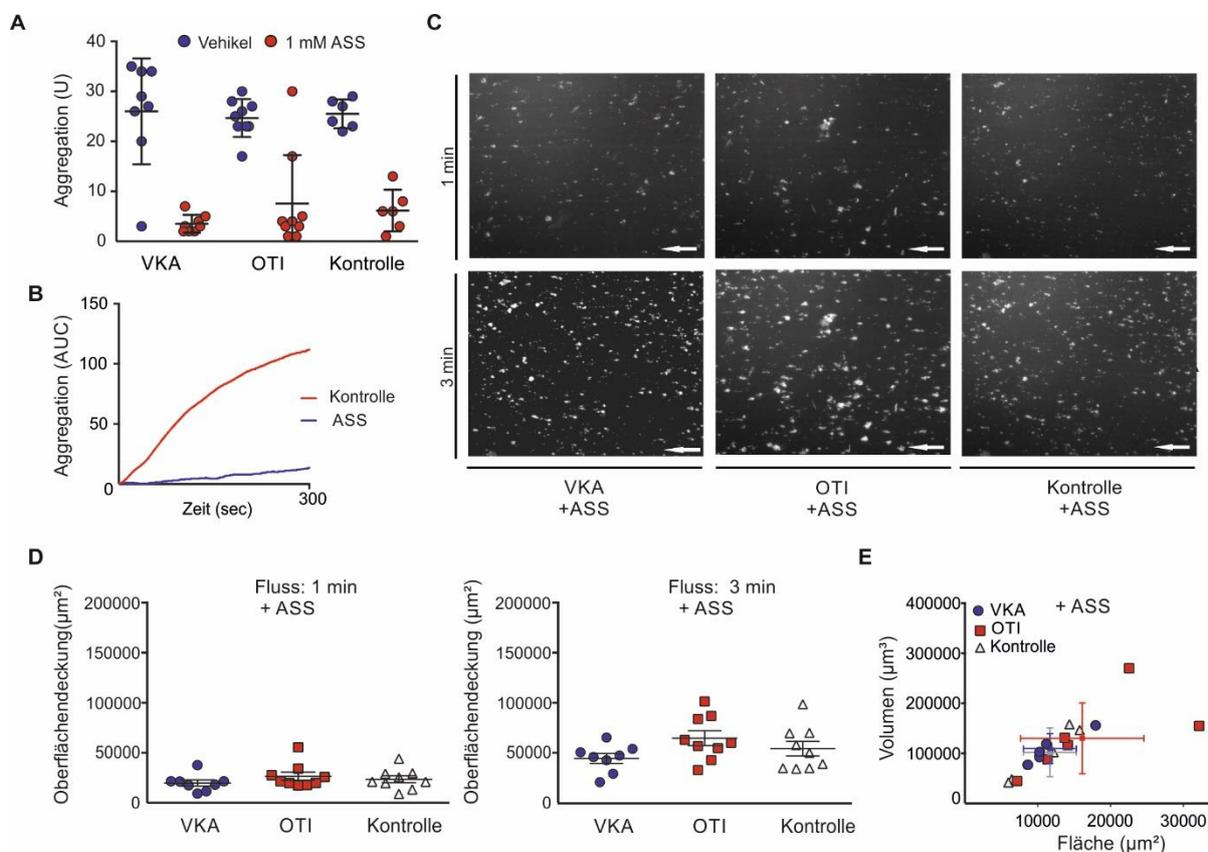


Abbildung 3: (A und B) Die Vollblutaggregation nach Stimulation mit Arachidonsäure wurde in ASS- oder Vehikel-behandeltem Blut gemessen. (C-E) Der Einfluss von ASS auf die Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation auf humanem Plaquematerial im Blut von OTI- oder VKA-behandelten Patienten bzw. von gesunden Kontrollen (Pfeil, 120  $\mu\text{m}$ ) (C). (E) Aggregatgröße versus Thrombusvolumen nach 3min Blutfluss.

Die Interaktion des Thrombins mit dem GPIIb $\alpha$  erfolgte dabei über die so genannten Exosites I und II, die als Proteinbindungsstellen außerhalb des katalytischen Zentrums von Thrombin fungieren (Dumas, Kumar et al. 2003). Um den Einfluss der Exosite vermittelten Thrombinbindung an den Thrombozyten in Gegenwart von Dabigatran auf die Thrombozytenfunktion zu untersuchen, wurden drei Ansätze gewählt. In-vivo wurde ein die GPIIb $\alpha$ -vWF Interaktion blockierender Antikörper sowie ein Mausmodell, in dem die extrazelluläre Domäne des GPIIb $\alpha$ -Rezeptors fehlt, untersucht. Dabei fand sich in beiden Ansätzen eine Thrombusprotektion, was für eine Abhängigkeit des prothrombotischen Effekts von einer regelrechten GPIIb $\alpha$ -Funktion spricht. In einem in-vitro Ansatz wurde in Flusskammerversuchen durch die Verwendung eines spezifischen die GPIIb $\alpha$ -Thrombin

Interaktion blockierenden Antikörpers eine Aufhebung des prothrombotischen Phänotyps unter OTI erreicht. Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass OTI (d.h. Dabigatran) behandeltes Blut einen prothrombotischen Effekt hat, der zu der erhöhten Anzahl von MI in Patienten beitragen kann. Als zugrunde liegenden Mechanismus wurde eine veränderte Thrombinbindung an den vWF-Rezeptor GPIIb/IIIa auf Thrombozyten identifiziert, was zu einer vermehrten Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung beiträgt.

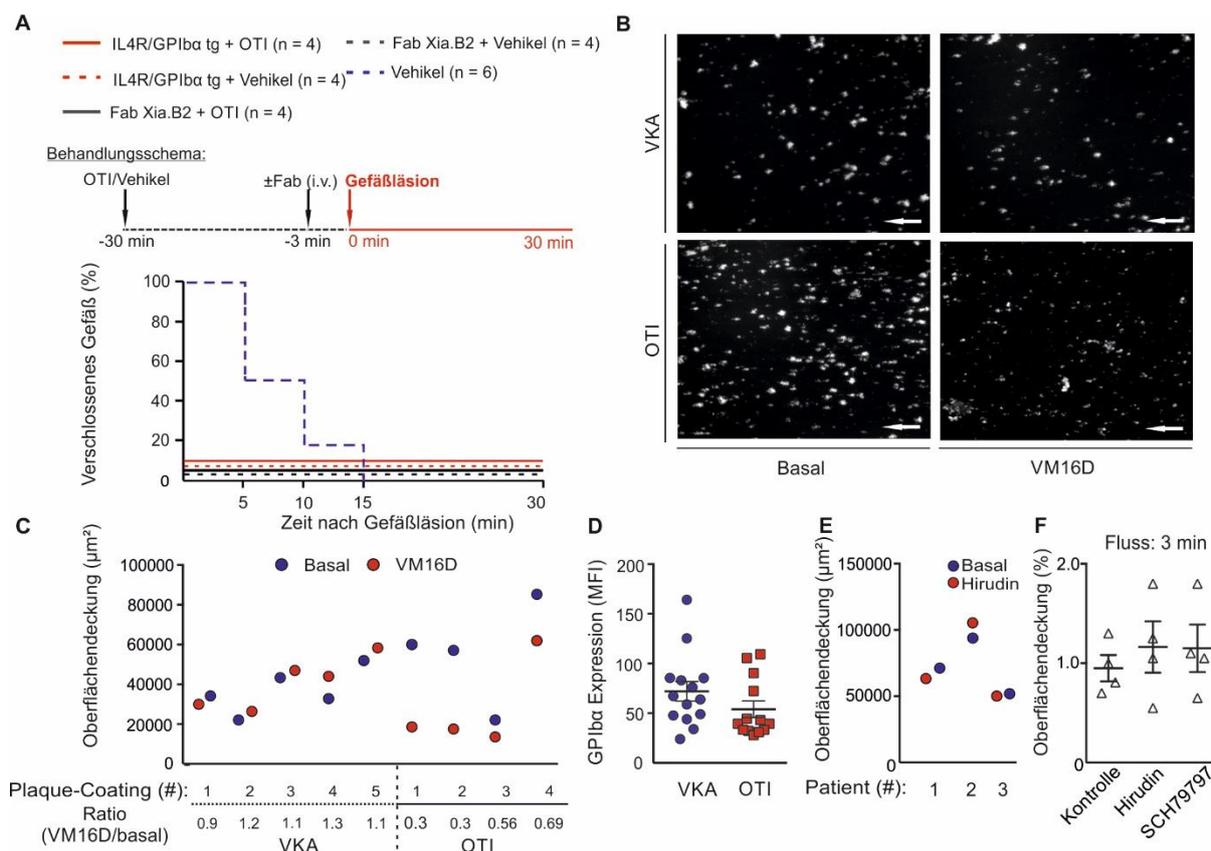


Abbildung 4:

(A) Drahtdenudationsmodell in OTI oder Vehikel (DMSO) behandelten Wildtyp-, IL4R/GPIIb/IIIa tg chimären Mäusen und WT-Tieren nach Anti-GPIIb/IIIa-Fab oder Kontroll-Fab-Fragmente Gabe. (B, C) Flusskammerversuche nach Zugabe von 20 µg/ml VM16D Anti-GPIIb/IIIa Antikörper oder 20 µg/ml Ct6 Kontroll-Antikörper. Thrombozytenadhäsion und Thrombusformation wurden analysiert (Pfeil, 120µm). (D) Die GPIIb/IIIa-Oberflächenexpression wurde bei Patienten durchflusszytometrisch bestimmt. (E) Blut von OTI-behandelten Patienten wurde nach Zugabe von 26 µg/ml Hirudin durch eine Flusskammer perfundiert, die Gesamtoberflächendeckung wurde bestimmt. (F) Flusskammerversuche mit Kontrollblut auf Plaquematerial nach Zugabe von Vehikel, 26 µg/ml Hirudin oder 2,5 µM PAR-1 Antagonist SCH79797, die Gesamtoberflächendeckung wurde bestimmt.



Non-vitamin K oral anticoagulants (NOAC) and the risk of myocardial infarction: Differences between factor IIa and factor Xa inhibition? Polzin A, Dannenberg L, Wolff G, Helten C, Achilles A, Hohlfeld T, Zeus T, Kelm M, Massberg S, Petzold T. *Pharmacol Ther.* 2018 Oct 12. pii: S0163-7258(18)30186-4. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.10.005

In der vorliegenden Arbeit wurden die klinischen Daten über das Herzinfarkttrisiko bei Patienten mit Vorhofflimmern unter NOAK Therapie aus den großen klinischen Zulassungsstudien aufgearbeitet. Zudem wurden die bisher bekannten, in grundlagenwissenschaftlichen Studien herausgearbeiteten zugrunde liegenden Mechanismen auf die Thrombozytenfunktion zusammengefasst. In den großen, klinischen randomisierten Zulassungsstudien zeigte sich eine Gleichwertigkeit der NOACs bzgl. der Prävention von Schlaganfällen gegenüber der Behandlung mit VKA sowie eine Gleichwertigkeit bzw. Überlegenheit hinsichtlich des Auftretens von Blutungskomplikationen. In den aktuellen Leitlinien zur Antikoagulation bei Vorhofflimmern wird die Gabe von NOACs gegenüber VKA präferiert, ohne dass eine weiterführende Empfehlung für die Verwendung eines spezifischen NOACs gegeben wird (Kirchhof, Benussi et al. 2016).

Überraschenderweise fanden sich jedoch in den Zulassungsstudien substanzspezifische Unterschiede hinsichtlich des Risikos für das Auftreten eines akuten Koronarsyndroms. Dabei fand sich in der RE-LY Studie (Connolly, Ezekowitz et al. 2009) ein erhöhtes Risiko unter Dabigatran, wohingegen für Rivaroxaban (Rocket-AF)(Patel, Mahaffey et al. 2011), Apixaban (Aristotle)(Granger, Alexander et al. 2011) sowie Edoxaban (60mg einmal täglich Dosierung Engage-AF) (Giugliano, Ruff et al. 2013) ein reduziertes Herzinfarkttrisiko auftrat. Im Einklang mit diesen Daten fand sich in der Re-Dual PCI Studie(Cannon, Bhatt et al. 2017), die verschiedene antithrombotische Therapie- Regime nach PCI bei Patienten mit Vorhofflimmern untersuchte, unter Dabigatran 150mg zweimal täglich in Kombination mit einem P2Y12-Inhibitor ein erhöhtes MI-Risiko im Vergleich zur herkömmlichen Triple-Therapie, die aus einer Kombination von ASS, P2Y12-Inhibitor und VKA besteht. Im Gegensatz dazu fand sich in der PIONEER-AF Studie (Gibson, Mehran et al. 2016), in der Rivaroxaban in einem ähnlichen Studiendesign untersucht wurde, eine Reduktion des MI Risikos. Die Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit von Herzinfarkten zwischen den beiden NOAC Gruppen bestätigten sich in aktuellen Metaanalysen (Uchino and Hernandez 2012, Chatterjee, Sharma et al. 2013). In verschiedenen experimentellen Studien wurde der Einfluss der FIIa und FXa Inhibitoren auf die Thrombozytenfunktion untersucht. Dabei konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Therapie mit FIIa-Inhibitoren (d.h. Dabigatran) zu prothrombotischen Effekten führt, die auf einer verstärkten Thrombozytenaktivierung beruhen. So konnten in der oben zitierten Arbeit gezeigt werden, dass es in Gegenwart von Dabigatran zu einer vermehrten GPIIb/

vermittelten Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung unter Flussbedingungen kommt. Desweiteren wurde gezeigt, dass es bereits nach einer Einmaldosis von Dabigatran zu einer vermehrten Oberflächenexpression des Proteasen-aktivierten Rezeptor-1 (PAR-1) auf den Thrombozyten kommt, worunter die Thrombozytenaktivierung durch Thrombin oder durch TRAP6, ein spezifisches PAR-1 Rezeptor aktivierendes Peptide, verstärkt ist (Achilles, Mohring et al. 2017). Dieser prothrombotische Effekt ist durch die reduzierte Thrombin vermittelte Spaltung des Rezeptors und dessen anschließende Internalisierung bedingt (Chen, Soto et al. 2015). Im Gegensatz dazu findet sich nach Behandlung mit dem FXa Inhibitor RIVA eine reduzierte Tissue-Faktor induzierte (Perzborn, Heitmeier et al. 2015) und für RIVA und Apixaban eine reduzierte TRAP-6 induzierte Thrombozytenaggregation (Nehaj, Sokol et al. 2018). Dem gegenüber fand eine andere Studie keinen Unterschied auf die ADP, Epinephrin oder Kollagen induzierte Plättchenaggregation (Banovcin, Skornova et al. 2017). Vor dem Hintergrund der zunehmenden klinischen und experimentellen Evidenz kann man sagen, dass die Einnahme von Dabigatran das Risiko für Herzinfarkte erhöht, wohingegen eine FXa-Inhibition das Risiko eher reduziert. Nichtsdestotrotz sind weitere klinische und experimentelle Studien nötig, um abschließend eine Empfehlung hinsichtlich einer Personalisierung der NOAK Therapie unter Berücksichtigung des individuellen Risikos für einen MI geben zu können.

*Table 1: Rate an Herzinfarkten (MI) in den NOAK Meilensteinstudien*

*Copyright protected*



*Abbildung 1: Schematische Zusammenfassung der durch NOAK vermittelten Effekte auf die Thrombozytenfunktion.*

## **Reduktion der antithrombozytären Wirkung von Aspirin unter Komedikation mit Metamizol**

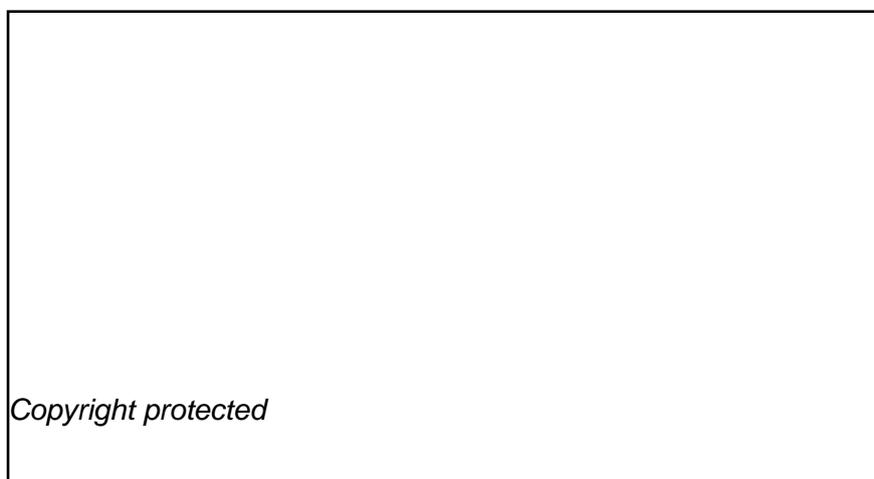
Dose reduction, oral application, and order of intake to preserve aspirin antiplatelet effects in dipyrrone co-medicated chronic artery disease patients. Dannenberg L\*, Petzold T\*, Achilles A, Naguib D, Zako S, Helten C, M'Pembele R, Mourikis P, Podsvyadek Y, Grandoch M, Levkau B, Zeus T, Kelm M, Hohlfeld T, Polzin A. Eur J Clin Pharmacol. 2018 Sep 24. DOI: 10.1007/s00228-018-2560-z. \*contributed equally

Chronische Schmerzsyndrome sind bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung eine häufige Begleiterkrankung. Aufgrund des ungünstigen Nebenwirkungsprofils der NSRAs, die mit einem vermehrten Auftreten von MACCE Ereignissen einhergeht (McMurray, Adamopoulos et al. 2012, Schjerning Olsen, Gislason et al. 2015, Schmidt, Lamberts et al. 2016) stellt die Klasse der Pyrazolonderivate mit der klinischen Leitsubstanz -dem Metamizol- eine wichtige alternative analgetische Substanzklasse dar. In vorangegangenen Studien zeigte sich, dass eine Begleitmedikation mit Metamizol die Pharmakodynamik von Aspirin verlangsamt und dabei die antithrombotischen Effekte von Aspirin auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation aufheben (Polzin, Zeus et al. 2013) kann. Pharmakodynamisch führen Aspirin und Metamizol zu einer Hemmung der katalytischen Domäne der Cyclooxygenase-1. Metamizol bildet reversible Wasserstoffbrückenbindungen mit der Aminosäure Tyrosin 385 und Serin 530 (Ser530), während Aspirin zu einer irreversiblen Acetylierung von Ser530 führt und somit beide Substanzen um die Interaktion an Ser530 kompetitieren.

Ziel dieser Arbeit war es, die Medikamenteninteraktionen zwischen Aspirin und Metamizol hinsichtlich ihrer Dosis-Wirkungs-Beziehung zu untersuchen. Zudem wurde der Einfluss des Dosisapplikationsintervalls auf die AA-induzierte Thrombozytenaggregation mittels LTA untersucht. In dieser hypothesengenerierenden Studie wurden 80 Patienten, die sich aufgrund einer bekannten koronaren Herzerkrankung, unter einer chronischen Medikation mit Aspirin (ASS) sowie einer begleitenden Metamizol Therapie befanden eingeschlossen. Die Patienten wurden hinsichtlich ihrer AA-induzierten Aggregationsantwort in Aspirin Responder und Non-Responder, die ein unzureichendes Ansprechen hinsichtlich der antithrombotischen Aspirinwirkung zeigten (d.h. max. Aggregationantwort (MoA) >20%; HTPR: high on therapy platelet reactivity) kategorisiert. Wie in Abbildung 1 dargestellt fand sich in der Studie eine Assoziation zwischen HTPR und der kumulativen Metamizoldosis, wobei höhere Dosen, jedoch nicht eine häufigere Applikation, mit einen erhöhten HTPR-Anteil einhergehen. Desweiteren fand sich eine höhere HTPR-Häufigkeit in der intravenösen im Vergleich zur p.o. Gruppe (Abbildung 2). Letztlich konnten wir zeigen, dass durch eine zeitlich getrennte Einnahme von Aspirin und konsekutiver Metamizoleinnahme (d.h. 30min. nach ASS-

Einnahme) nach fünf Tagen den inhibitorische Effekt des Metamizol auf die Aspirin vermittelte antithrombozytäre Wirkung aufheben kann.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass bei gleichzeitig bestehender Medikation von Aspirin und Metamizol die antithrombozytäre Aspirinwirkung unter hohen und insbesondere intravenöse Dosen von Metamizol reduziert ist. Durch eine zeitlich getrennte Einnahme der Medikamente sind diese Effekte jedoch reversibel. Bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung unter Aspirineinnahme sollte die Aspirineinnahme mindestens 30 Minuten vor der Metamizoleinnahme erfolgen, um pharmakodynamische Interaktionen beider Medikamente zu verhindern.



*Abbildung 1: Dosisabhängigkeit der HTPR in der LTA nach Stimulation mit Arachidonsäure (High on-treatment platelet reactivity: ist definiert als max. Aggregationantwort (MoA ) von >20%). (A) Darstellung der MoA für die jeweilige Metamizoldosis. (B) HTPR Häufigkeit für die jeweilige Metamizoldosis ist prozentual dargestellt. (C) Darstellung der MoA (in %) für die jeweilige Applikationshäufigkeit. (D) Abhängigkeit der HTPR Häufigkeit (in %) von der Anzahl an Applikationen. Signifikanzlevel sind angegeben.*

*Copyright protected*

*Abbildung 2: HTPR Häufigkeit in der LTA nach Stimulation mit Arachidonsäure nach i.v. versus p.o. Gabe (High on-treatment platelet reactivity: ist definiert als max. Aggregationantwort (MoA) von >20%). (A) Darstellung der MoA für die jeweilige Applikationsroute. (D) HTPR Häufigkeit (in %) für die jeweilige Applikationsroute ist prozentual dargestellt. Signifikanzlevel sind angegeben.*

## **Zusammenfassung und Ausblick**

Thrombozyten spielen in der Entstehung arterieller Thrombosen eine zentrale Rolle und antithrombozytäre Therapieregime stellen einen Grundpfeiler der modernen interventionellen Therapie dar. Die Untersuchung der grundlegenden Mechanismen der Thrombozytenfunktion ist daher essentiell und soll zum Verständnis sowie zur Entwicklung neuer antithrombozytärer Therapieansätze beitragen.

Die Studie zur Rolle der  $\beta$ 1-Integrin auf die Thrombozytenfunktion und die primäre Hämostase konnte zeigen, dass Kollagen induzierte und  $\beta$ 1-Integrin vermittelte Signale die Granula-Sezernierung aus Thrombozyten regulieren und somit zur Schaffung eines prothrombotischen Mikromillieus während der Thrombusbildung beitragen. Die neuen Ergebnisse integrieren den Kollagenrezeptor  $\alpha$ 2 $\beta$ 1-Integrin in das bestehende Konzept der Kollagen vermittelten Thrombozytenaktivierung, die bisher alleinig dem GPVI zugeschrieben wurde (Massberg, Gawaz et al. 2003, Varga-Szabo, Pleines et al. 2008). Die klinische Relevanz der Beobachtung ist jedoch bisher nicht bekannt. Frühere Studien fokussierten sich auf den klinischen Einfluss des Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) C807T der  $\alpha$ 2 Integrin Untereinheit, der die Oberflächenexpression des Kollagenrezeptors ( $\alpha$ 2 $\beta$ 1Integrin) auf Thrombozyten reguliert hinsichtlich des Auftretens von thrombotischen Events in Patienten mit koronarer Herzerkrankung (Ye, Liu et al. 2006). Dabei fand sich keine Assoziation zwischen den SNP-Genotypen und ischämischen Endpunkten. In Analogie dazu soll nun in einer retrospektiven Studie nach genetischen Veränderungen im zytoplasmatischen Teil des  $\beta$ 1 Integrins, der die Aktivität des Integrins durch die Bindung der zytoplasmatischen Protein Talin-1 und Kindlin-3 (Nieswandt, Moser et al. 2007, Moser, Nieswandt et al. 2008) reguliert, gescreent werden. In der Arbeit soll zudem nach Veränderungen der Allelhäufigkeit der 10 bekannten in diesen Bereich lokalisierten SNPs im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv gesucht werden. Dafür wurde ein Hochrisikokollektiv von 14180 Patienten aus 7 randomisierten, klinischen Studien, die eine Koronarintervention mit Stentimplantation aufgrund unterschiedlicher Indikation erhalten haben gescreent. Alle eingeschlossenen Patienten standen unter DAPT und eine Vollblutprobe war in einer Biobank verfügbar. Im Gegensatz zu früheren Studien, die thromboembolische Endpunkte untersuchten, soll in Analogie zu der experimentellen Studie der Einfluss der  $\beta$ 1-Integrine auf das Auftreten von Blutungsereignissen untersucht werden. Aus dem Gesamtpatientenkollektiv konnten 764 Patienten mit einer Blutungskomplikation identifiziert werden. Derzeit erfolgt nach Isolation der DNA die Analyse der Proben.

In dem zweiten Projekt wurde die Rolle der am häufigsten in Thrombozyten exprimierten microRNA miR223 untersucht. Die Studie zeigte, dass miR223 keinen relevanten Einfluss auf die Funktion muriner Thrombozyten und deren Vorläufern, den Megakaryozyten hat. Dies steht im Gegensatz zu Studien an humanen Plättchen, in denen gezeigt werden konnte, dass miR223 an die 3'UTR Region des P2Y12 Rezeptors bindet (Landry, Plante et al. 2009) und somit die Expression des dominanten und klinisch relevanten ADP-Rezeptors regulieren kann. Desweiteren konnte in Patientenproben gezeigt werden, dass die Herabregulation der thrombozytären miR223 mit einer stärkeren Thrombozytenaktivierung gegenüber ADP einhergeht, während hohe miRNA Level zu einer Herabregulation von P2Y12 und reduzierten Thrombozytenaktivierung führen (Landry, Plante et al. 2009). Ob die in Patienten beobachteten Schwankungen der miR223 über den oben beschriebenen Mechanismus mit dem Wiederauftreten eines Myokardinfarktes korreliert (Zampetaki, Willeit et al. 2012), muss in zukünftigen Studien analysiert werden. Insbesondere, da kürzlich gezeigt wurde, dass miR223 die Endothelfunktion beeinflussen kann (Shi, Fisslthaler et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit fand sich kein Hinweis auf eine veränderte Thrombozytenreaktivität der murinen Thrombozyten, wobei der murine P2Y12 Rezeptor kein Target von muriner miR223 ist. In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass miR223 in murinen Thrombozyten funktional ist und die RNA Level ihrer Targetgene Fbxw7 (F-box and WD repeat domain containing E3 ubiquitin protein ligase 7) und des Transkriptionsfaktors Sp3 reguliert. Daher sind weiterführende Studien zur besseren molekularen Charakterisierung der miR223 Funktion in humanen Thrombozyten nötig, bevor therapeutische Ansätze auf Basis von miRNA Antagomeren in die klinische Testung eintreten.

In den Zulassungsstudien zur Einführung der NOACs fanden sich einige unerwartete Ergebnisse, welche die pharmakodynamische Komplexität einer gezielten Einzelfaktorinhibition des Gerinnungssystems unterstreichen. Neben den bereits erwähnten Unterschieden hinsichtlich der Herzinfarkttraten zwischen Faktor IIA und Xa Inhibitoren zeigten sich überraschenderweise für beide Substanzgruppen in Studien zur Antikoagulation nach mechanischer Herzklappenersatz für das Dabigatran (Eikelboom, Connolly et al. 2013) und nach biologischen transfemorale Aortenklappenersatzes unter Rivaroxaban in Kombination mit ASS vermehrte thromboembolische Ereignisse (Gallileo Studie, NCT02556203). Die Ursachen für die erhöhten thromboembolischen Events erscheinen vor dem Hintergrund der effizienten Antikoagulation durch NOACs paradox. Weiterführende klinische und mechanistische Untersuchungen sind nötig, um eine effiziente und sichere individualisierte antithrombotische Therapie für die verschiedenen klinischen Szenarien zu ermöglichen. Die Studie zum Einfluss von Dabigatran auf die Thrombozytenfunktion steht im Einklang mit anderen translationalen Studien die ebenso prothrombotische Mechanismen des Dabigatrans

identifiziert haben (Achilles, Mohring et al. 2017). Kumulativ können die verschiedenen Effekte von Dabigatran zu der klinisch beobachteten erhöhten Anzahl an MI beitragen. Im Gegensatz dazu ist die mechanistische Grundlage des antithrombotischen Effekts des Rivaroxaban unzureichend verstanden. Insbesondere vor dem Hintergrund der kürzlich veröffentlichten COMPASS-Studie, die für Patienten mit koronarer Herzerkrankung oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit zeigen konnte, dass die Hinzunahme einer niedrigdosierten RIVA Gabe (2,5mg zweimal täglich) zur chronisch bestehenden Aspirin Gabe die Gesamtsterblichkeit reduziert. Interessanterweise fand sich im zweiten Studienarm, indem eine RIVA Monotherapie (5mg zweimal täglich) gegen Aspirin verglichen wurde, eine Gleichwertigkeit hinsichtlich der Mortalität und thrombotischer Ereignisse (Eikelboom, Connolly et al. 2017). In einer translationalen Studie, in der Patienten die unter DAPT zusätzlich mit niedrigdosierten RIVA nach dem ATLAS TIMI ACS 52 (Mega, Braunwald et al. 2012) Regime behandelt wurden, fand sich im Vergleich zu der Kontrollgruppe (DAPT) auf Einzelzellebene eine reduzierte Thrombozytenreaktivität in der Durchflusszytometrie (Borst, Munzer et al. 2018). Inwieweit die klinisch reduzierten thrombotischen Endpunkte auf einen direkten antithrombozytären Effekt von RIVA zurückzuführen sind, wird derzeit in einer translationalen Studie in Kooperation mit der Universität Düsseldorf untersucht. Dafür werden Patienten, die unter RIVA Therapie bei Vorhofflimmern stehen sowie Patienten mit der Erstdiagnose eines VHF vor der ersten RIVA Einnahme rekrutiert. Ergänzend wird der Einfluss von RIVA auf die arterielle Thromboseentstehung in einem Mausmodell in-vivo untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen in Zusammenschau mit den klinischen Studienergebnissen zur Etablierung von individualisierten, antithrombotischen Therapiekonzepten beitragen.

Um die klinische Relevanz der Ergebnisse des vierten Projektes hinsichtlich pharmakodynamischer Interaktion von Aspirin und Metamizol zu untersuchen, laufen derzeit große retrospektive Untersuchungen. In Abhängigkeit der Ergebnisse werden weiterführende klinisch randomisierte Interventionsstudien nötig sein. Auf Grundlage dieser translationalen Studie, sollte bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung im klinischen Alltag vorerst die geringstmögliche orale Dosierung von Metamizol zur Schmerzkontrolle genutzt werden.

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Aspirin
ATP	Adenosintriphosphat
CVX	Convulxin (Thrombozytenagonist)
DAPT	Duale antithrombozytäre Therapie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOAC	Direkt orale Antikoagulantien
FIIa	Aktivierter Faktor II (Thrombin)
FXa	Aktivierter Faktor X
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
GPIX	Glykoprotein IX
GPVI	Glykoprotein VI
KO	Knock-out (Genetische Deletion der DNA eines Zielproteins)
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
MACCE	Major Adverse Cardiac and Cerebrovascular Events (klinische kardiale und zerebralvaskuläre Endpunkte)
MEA	Multi-Elektrodenimpedanz-Aggregometrie
MI	Myokardinfarkt (Herzinfarkt)
miR223	MikroRNA223
MK	Megakaryozyten
NOAC	Neue orale Antikoagulantien
NSRAs	Nichtsteroidales Antirheumatikum
OTI	Oraler Thrombininhibitor
PCI	Perkutane Koronarintervention
PF-4	Plättchenfaktor-4
RIVA	Rivaroxaban
SNPs	Einzelnukleotid-Polymorphismus
TSP-1	Thrombospondin-1
VKA	Vitamin-K Antagonist
vWF	von-Willebrand-Faktor

### **Versicherung an Eides Statt**

Hiermit erkläre ich:

- a) dass ich die vorliegende schriftliche Habilitationsleistung selbstständig verfasst und die Herkunft des verwendeten oder zitierten Materials ordnungsgemäß kenntlich gemacht habe.
- b) dass ich außer dem derzeitigen kein weiteres Habilitationsgesuch für das Fach Innere Medizin oder ein anderes Fach an der LMU München oder an einer anderen Hochschule eingereicht habe und mir bisher kein akademischer Grad entzogen wurde. Weiterhin ist kein Verfahren gegen mich anhängig, das die Entziehung eines akademischen Grades zur Folge haben könnte.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Professor Massberg sowie Professor Schulz, die mich als wissenschaftliche Mentoren bei der Planung und Durchführung der Studien inspiriert, begleitet und über Jahre kontinuierlich tatkräftig unterstützt und gefördert haben. Der enge Dialog hat mein wissenschaftliches Denken und Arbeiten nachhaltig geprägt. Danke!

Zudem möchte ich mich bei Frau Dr. Thienel, meiner ersten Doktorandin, sowie Herrn Lorenz, Frau Raatz, Herrn Kieu sowie den vielen Begleitern und Freunden, die ich während der Arbeit kennen gelernt habe, bedanken. Erst durch ihr anhaltendes Engagement und Einsatzbereitschaft war es möglich die Forschungsarbeiten durchzuführen.

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

## **Lebenslauf**

Online nicht verfügbar



## Gesamtes Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor

Dannenberg L\*, **Petzold T\***, Achilles A, Naguib D, Zako S, Helten C, M'Pembele R, Mourikis P, Podsvyadek Y, Grandoch M, Levkau B, Zeus T, Kelm M, Hohlfeld T, Polzin A. Dose reduction, oral application, and order of intake to preserve aspirin antiplatelet effects in dipyron co-medicated chronic artery disease patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2018 Sep 24.

\*contributed equally

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

**Petzold T**, Ruppert R, Pandey D, Barocke V, Meyer H, Lorenz M, Zhang L, Siess W, Massberg S and Moser M. beta1 integrin-mediated signals are required for platelet granule secretion and hemostasis in mouse. *Blood*. 2013;122:2723-31.

Leierseder S\*, **Petzold T\***, Zhang L, Loyer X, Massberg S and Engelhardt S. MiR-223 is dispensable for platelet production and function in mice. *Thrombosis and haemostasis*. 2013;110:1207-14. \*contributed equally.

**Petzold T**, Orr AW, Hahn C, Jhaveri KA, Parsons JT and Schwartz MA. Focal adhesion kinase modulates activation of NF-kappaB by flow in endothelial cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2009;297:C814-22.

### Originalarbeiten als Koautor

Stocker TJ, Pircher J, Skenderi A, Ehrlich A, Eberle C, Megens RTA, **Petzold T**, Zhang Z, Walzog B, Müller-Taubenberger A, Weber C, Massberg S, Ishikawa-Ankerhold H, Schulz C. The Actin Regulator Coronin-1A Modulates Platelet Shape Change and Consolidates Arterial Thrombosis. *Thromb Haemost*. 2018 Dec.

Pircher J, Czermak T, Ehrlich A, Eberle C, Gaitzsch E, Margraf A, Grommes J, Saha P, Titova A, Ishikawa-Ankerhold H, Stark K, **Petzold T**, Stocker T, Weckbach LT, Novotny J, Sperandio M, Nieswandt B, Smith A, Mannell H, Walzog B, Horst D, Soehnlein O, Massberg S and Schulz C. Cathelicidins prime platelets to mediate arterial thrombosis and tissue inflammation. *Nat Commun*. 2018;9:1523.

Benito-Jardon M, Klapproth S, Gimeno LI, **Petzold T**, Bharadwaj M, Muller DJ, Zuchtriegel G, Reichel CA and Costell M. The fibronectin synergy site re-enforces cell adhesion and mediates a crosstalk between integrin classes. *Elife*. 2017;6.

Lennerz C, Vrazic H, Haller B, Braun S, **Petzold T**, Ott I, Lennerz A, Michel J, Blazek P, Deisenhofer I, Whittaker P and Kolb C. Biomarker-based diagnosis of pacemaker and implantable cardioverter defibrillator pocket infections: A prospective, multicentre, case-control evaluation. *PloS one*. 2017;12:e0172384.

Braun D, Knipper A, Orban M, Sibbing D, **Petzold T**, Braun S, Schulz S, Hausleiter J, Kastrati A, Mehilli J and Massberg S. Platelet function and coagulation in patients with STEMI and peri-interventional clopidogrel plus heparin vs. prasugrel plus bivalirudin therapy (BRAVE 4 substudy). *Thrombosis research*. 2016;137:72-8.

Martischinig AM, Mehilli J, Pollak J, **Petzold T**, Fiedler AK, Mayer K, Schulz-Schupke S, Sibbing D, Massberg S, Kastrati A and Sarafoff N. Impact of Dabigatran versus Phenprocoumon on ADP Induced Platelet Aggregation in Patients with Atrial Fibrillation with or without Concomitant Clopidogrel Therapy (the Dabi-ADP-1 and Dabi-ADP-2 Trials). *BioMed research international*. 2015;2015:798486.

Speicher T, Siegenthaler B, Bogorad RL, Ruppert R, **Petzold T**, Padriassa-Altes S, Bachofner M, Anderson DG, Koteliansky V, Fassler R and Werner S. Knockdown and knockout of beta1-integrin in hepatocytes impairs liver regeneration through inhibition of growth factor signalling. *Nature communications*. 2014;5:3862.

Zhang L, Urtz N, Gaertner F, Legate KR, **Petzold T**, Lorenz M, Mazharian A, Watson SP and Massberg S. Sphingosine kinase 2 (Sphk2) regulates platelet biogenesis by providing intracellular sphingosine 1-phosphate (S1P). *Blood*. 2013;122:791-802.

#### Übersichtsartikel

Gross L, Sibbing D, Schulz C, Gartner F, Pircher J, Massberg S and **Petzold T**. LMU Munich: platelet inhibition novel aspects on platelet inhibition and function. *Clin Res Cardiol*. 2018. doi: 10.1007/s00392-018-1325-0

Polzin A, Dannenberg L, Wolff G, Helten C, Achilles A, Hohlfeld T, Zeus T, Kelm M, Massberg S, **Petzold T**. Non-vitamin K oral anticoagulants (NOAC) and the risk of myocardial infarction: Differences between factor IIa and factor Xa inhibition? *Pharmacol Ther*. 2018 Oct 12. S0163-7258(18)30186-4

#### Kasuistiken, Kurzartikel

**Tobias Petzold**, Manuela Thienel, Enzo Lüsebrink, Steffen Massberg. Emergency venous angioplasty of a complete vena cava superior thrombosis. Journal of invasive cardiology (*accepted for publication*).

Polzin A, Dannenberg L, Wolff G, Zeus T, Kelm M, **Petzold T**. Increased risk of myocardial infarction with dabigatran etexilate: Fact or fiction? A critical meta-analysis from integrating randomized controlled trials and real-world studies: Wine or spritzer? Int J Cardiol. 2018 Nov

## Literaturverzeichnis

- Achilles, A., A. Mohring, L. Dannenberg, M. Grandoch, T. Hohlfeld, J. W. Fischer, B. Levkau, M. Kelm, T. Zeus and A. Polzin (2017). "Dabigatran enhances platelet reactivity and platelet thrombin receptor expression in patients with atrial fibrillation." J Thromb Haemost **15**(3): 473-476.
- Achilles, A., A. Mohring, T. Zeus, M. Kelm and A. Polzin (2017). "Dabigatran enhances platelet reactivity and platelet thrombin receptor expression in patients with atrial fibrillation: reply." J Thromb Haemost **15**(7): 1524-1525.
- Banovcin, P., Jr., I. Skornova, M. Samos, M. Schnierer, T. Bolek, F. Kovar, J. Stasko, P. Kubisz and M. Mekan (2017). "Platelet Aggregation in Direct Oral Factor Xa Inhibitors-treated Patients With Atrial Fibrillation: A Pilot Study." J Cardiovasc Pharmacol **70**(4): 263-266.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell **136**(2): 215-233.
- Borst, O., P. Munzer, N. Alnaggar, S. Geue, R. Tegtmeyer, D. Rath, M. Droppa, P. Seizer, S. Heitmeier, J. W. M. Heemskerk, L. K. Jennings, R. F. Storey, D. J. Angiolillo, B. Rocca, H. Spronk, H. Ten Cate, M. Gawaz and T. Geisler (2018). "Inhibitory mechanisms of very low-dose rivaroxaban in non-ST-elevation myocardial infarction." Blood Adv **2**(6): 715-730.
- Brandl, R., T. Richter, K. Haug, M. G. Wilhelm, P. C. Maurer and W. Nathrath (1997). "Topographic analysis of proliferative activity in carotid endarterectomy specimens by immunocytochemical detection of the cell cycle-related antigen Ki-67." Circulation **96**(10): 3360-3368.
- Bye, A. P., A. J. Unsworth and J. M. Gibbins (2016). "Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks." J Thromb Haemost **14**(5): 918-930.
- Cannon, C. P., D. L. Bhatt, J. Oldgren, G. Y. H. Lip, S. G. Ellis, T. Kimura, M. Maeng, B. Merkely, U. Zeymer, S. Gropper, M. Nordaby, E. Kleine, R. Harper, J. Manassie, J. L. Januzzi, J. M. Ten Berg, P. G. Steg, S. H. Hohnloser, R.-D. P. S. Committee and Investigators (2017). "Dual Antithrombotic Therapy with Dabigatran after PCI in Atrial Fibrillation." N Engl J Med **377**(16): 1513-1524.
- Chatterjee, S., A. Sharma, K. Uchino, G. Biondi-Zoccai, E. Lichstein and D. Mukherjee (2013). "Rivaroxaban and risk of myocardial infarction: insights from a meta-analysis and trial sequential analysis of randomized clinical trials." Coron Artery Dis **24**(8): 628-635.
- Chen, B., A. G. Soto, L. J. Coronel, A. Goss, J. van Ryn and J. Trejo (2015). "Characterization of thrombin-bound dabigatran effects on protease-activated receptor-1 expression and signaling in vitro." Mol Pharmacol **88**(1): 95-105.

- Chen, C. Z., L. Li, H. F. Lodish and D. P. Bartel (2004). "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." Science **303**(5654): 83-86.
- Connolly, S. J., M. D. Ezekowitz, S. Yusuf, J. Eikelboom, J. Oldgren, A. Parekh, J. Pogue, P. A. Reilly, E. Themeles, J. Varrone, S. Wang, M. Alings, D. Xavier, J. Zhu, R. Diaz, B. S. Lewis, H. Darius, H. C. Diener, C. D. Joyner, L. Wallentin, R.-L. S. Committee and Investigators (2009). "Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation." N Engl J Med **361**(12): 1139-1151.
- Dumas, J. J., R. Kumar, J. Seehra, W. S. Somers and L. Mosyak (2003). "Crystal structure of the GpIb $\alpha$ -thrombin complex essential for platelet aggregation." Science **301**(5630): 222-226.
- Eikelboom, J. W., S. J. Connolly, J. Bosch, G. R. Dagenais, R. G. Hart, O. Shestakovska, R. Diaz, M. Alings, E. M. Lonn, S. S. Anand, P. Widimsky, M. Hori, A. Avezum, L. S. Piegas, K. R. H. Branch, J. Probstfield, D. L. Bhatt, J. Zhu, Y. Liang, A. P. Maggioni, P. Lopez-Jaramillo, M. O'Donnell, A. K. Kakkar, K. A. A. Fox, A. N. Parkhomenko, G. Ertl, S. Stork, M. Keltai, L. Ryden, N. Pogossova, A. L. Dans, F. Lanus, P. J. Commerford, C. Torp-Pedersen, T. J. Guzik, P. B. Verhamme, D. Vinereanu, J. H. Kim, A. M. Tonkin, B. S. Lewis, C. Felix, K. Yusoff, P. G. Steg, K. P. Metsarinne, N. Cook Bruns, F. Misselwitz, E. Chen, D. Leong, S. Yusuf and C. Investigators (2017). "Rivaroxaban with or without Aspirin in Stable Cardiovascular Disease." N Engl J Med **377**(14): 1319-1330.
- Eikelboom, J. W., S. J. Connolly, M. Brueckmann, C. B. Granger, A. P. Kappetein, M. J. Mack, J. Blatchford, K. Devenny, J. Friedman, K. Guiver, R. Harper, Y. Khder, M. T. Lobmeyer, H. Maas, J. U. Voigt, M. L. Simoons, F. Van de Werf and R.-A. Investigators (2013). "Dabigatran versus warfarin in patients with mechanical heart valves." N Engl J Med **369**(13): 1206-1214.
- Gay, L. J. and B. Felding-Habermann (2011). "Platelets alter tumor cell attributes to propel metastasis: programming in transit." Cancer Cell **20**(5): 553-554.
- Gibson, C. M., R. Mehran, C. Bode, J. Halperin, F. W. Verheugt, P. Wildgoose, M. Birmingham, J. Janus, P. Burton, M. van Eickels, S. Korjian, Y. Daaboul, G. Y. Lip, M. Cohen, S. Husted, E. D. Peterson and K. A. Fox (2016). "Prevention of Bleeding in Patients with Atrial Fibrillation Undergoing PCI." N Engl J Med **375**(25): 2423-2434.
- Giugliano, R. P., C. T. Ruff, E. Braunwald, S. A. Murphy, S. D. Wiviott, J. L. Halperin, A. L. Waldo, M. D. Ezekowitz, J. I. Weitz, J. Spinar, W. Ruzylo, M. Ruda, Y. Koretsune, J. Betcher, M. Shi, L. T. Grip, S. P. Patel, I. Patel, J. J. Hanyok, M. Mercuri, E. M. Antman and E. A.-T. Investigators (2013). "Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation." N Engl J Med **369**(22): 2093-2104.
- Granger, C. B., J. H. Alexander, J. J. McMurray, R. D. Lopes, E. M. Hylek, M. Hanna, H. R. Al-Khalidi, J. Ansell, D. Atar, A. Avezum, M. C. Bahit, R. Diaz, J. D. Easton, J. A. Ezekowitz,

- G. Flaker, D. Garcia, M. Geraldes, B. J. Gersh, S. Golitsyn, S. Goto, A. G. Hermosillo, S. H. Hohnloser, J. Horowitz, P. Mohan, P. Jansky, B. S. Lewis, J. L. Lopez-Sendon, P. Pais, A. Parkhomenko, F. W. Verheugt, J. Zhu, L. Wallentin, A. Committees and Investigators (2011). "Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation." N Engl J Med **365**(11): 981-992.
- Gruner, S., M. Prostredna, V. Schulte, T. Krieg, B. Eckes, C. Brakebusch and B. Nieswandt (2003). "Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo." Blood **102**(12): 4021-4027.
- Italiano, J. E., Jr. and R. A. Shivdasani (2003). "Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets." J Thromb Haemost **1**(6): 1174-1182.
- Ivanciu, L. and T. J. Stalker (2015). "Spatiotemporal regulation of coagulation and platelet activation during the hemostatic response in vivo." J Thromb Haemost **13**(11): 1949-1959.
- Jackson, S. P. (2011). "Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly." Nat Med **17**(11): 1423-1436.
- Kirchhof, P., S. Benussi, D. Kotecha, A. Ahlsson, D. Atar, B. Casadei, M. Castella, H. C. Diener, H. Heidbuchel, J. Hendriks, G. Hindricks, A. S. Manolis, J. Oldgren, B. A. Popescu, U. Schotten, B. Van Putte and P. Vardas (2016). "[2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS]." Kardiol Pol **74**(12): 1359-1469.
- Labelle, M., S. Begum and R. O. Hynes (2011). "Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis." Cancer Cell **20**(5): 576-590.
- Landry, P., I. Plante, D. L. Ouellet, M. P. Perron, G. Rousseau and P. Provost (2009). "Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets." Nat Struct Mol Biol **16**(9): 961-966.
- Leierseder, S., T. Petzold, L. Zhang, X. Loyer, S. Massberg and S. Engelhardt (2013). "MiR-223 is dispensable for platelet production and function in mice." Thromb Haemost **110**(6): 1207-1214.
- Massberg, S., K. Brand, S. Gruner, S. Page, E. Muller, I. Muller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt and M. Gawaz (2002). "A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation." J Exp Med **196**(7): 887-896.
- Massberg, S., M. Gawaz, S. Gruner, V. Schulte, I. Konrad, D. Zohlnhofer, U. Heinzmann and B. Nieswandt (2003). "A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo." J Exp Med **197**(1): 41-49.
- McMurray, J. J., S. Adamopoulos, S. D. Anker, A. Auricchio, M. Bohm, K. Dickstein, V. Falk, G. Filippatos, C. Fonseca, M. A. Gomez-Sanchez, T. Jaarsma, L. Kober, G. Y. Lip, A. P. Maggioni, A. Parkhomenko, B. M. Pieske, B. A. Popescu, P. K. Ronnevik, F. H. Rutten, J. Schwitter, P. Seferovic, J. Stepinska, P. T. Trindade, A. A. Voors, F. Zannad, A. Zeiher, D.

Task Force for the, A. Treatment of, C. Chronic Heart Failure of the European Society of, J. J. Bax, H. Baumgartner, C. Ceconi, V. Dean, C. Deaton, R. Fagard, C. Funck-Brentano, D. Hasdai, A. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, T. McDonagh, C. Moulin, B. A. Popescu, Z. Reiner, U. Sechtem, P. A. Sirnes, M. Tendera, A. Torbicki, A. Vahanian, S. Windecker, T. McDonagh, U. Sechtem, L. A. Bonet, P. Avraamides, H. A. Ben Lamin, M. Brignole, A. Coca, P. Cowburn, H. Dargie, P. Elliott, F. A. Flachskampf, G. F. Guida, S. Hardman, B. Lung, B. Merkely, C. Mueller, J. N. Nanas, O. W. Nielsen, S. Orn, J. T. Parissis, P. Ponikowski and E. S. C. C. f. P. Guidelines (2012). "ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC." Eur J Heart Fail **14**(8): 803-869.

Mega, J. L., E. Braunwald, S. D. Wiviott, J. P. Bassand, D. L. Bhatt, C. Bode, P. Burton, M. Cohen, N. Cook-Bruns, K. A. Fox, S. Goto, S. A. Murphy, A. N. Plotnikov, D. Schneider, X. Sun, F. W. Verheugt, C. M. Gibson and A. A. T. Investigators (2012). "Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome." N Engl J Med **366**(1): 9-19.

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

Nehaj, F., J. Sokol, J. Ivankova, M. Mokan, F. Kovar, J. Stasko and M. Mokan (2018). "First Evidence: TRAP-Induced Platelet Aggregation Is Reduced in Patients Receiving Xabans." Clin Appl Thromb Hemost **24**(6): 914-919.

Nieswandt, B., M. Moser, I. Pleines, D. Varga-Szabo, S. Monkley, D. Critchley and R. Fassler (2007). "Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo." J Exp Med **204**(13): 3113-3118.

Patel, M. R., K. W. Mahaffey, J. Garg, G. Pan, D. E. Singer, W. Hacke, G. Breithardt, J. L. Halperin, G. J. Hankey, J. P. Piccini, R. C. Becker, C. C. Nessel, J. F. Paolini, S. D. Berkowitz, K. A. Fox, R. M. Califf and R. A. Investigators (2011). "Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation." N Engl J Med **365**(10): 883-891.

Perzborn, E., S. Heitmeier and V. Laux (2015). "Effects of Rivaroxaban on Platelet Activation and Platelet-Coagulation Pathway Interaction: In Vitro and In Vivo Studies." J Cardiovasc Pharmacol Ther **20**(6): 554-562.

Petzold, T., R. Ruppert, D. Pandey, V. Barocke, H. Meyer, M. Lorenz, L. Zhang, W. Siess, S. Massberg and M. Moser (2013). "beta1 integrin-mediated signals are required for platelet granule secretion and hemostasis in mouse." Blood **122**(15): 2723-2731.

Polzin, A., T. Zeus, K. Schror, M. Kelm and T. Hohlfeld (2013). "Dipyron (metamizole) can nullify the antiplatelet effect of aspirin in patients with coronary artery disease." J Am Coll Cardiol **62**(18): 1725-1726.

- Reininger, A. J., I. Bernlochner, S. M. Penz, C. Ravanat, P. Smethurst, R. W. Farndale, C. Gachet, R. Brandl and W. Siess (2010). "A 2-step mechanism of arterial thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques." J Am Coll Cardiol **55**(11): 1147-1158.
- Rowley, J. W., S. Chappaz, A. Corduan, M. M. Chong, R. Campbell, A. Khoury, B. K. Manne, J. G. Wurtzel, J. V. Michael, L. E. Goldfinger, M. M. Mumaw, M. T. Nieman, B. T. Kile, P. Provost and A. S. Weyrich (2016). "Dicer1-mediated miRNA processing shapes the mRNA profile and function of murine platelets." Blood **127**(14): 1743-1751.
- Schjerning Olsen, A. M., G. H. Gislason, P. McGettigan, E. Fosbol, R. Sorensen, M. L. Hansen, L. Kober, C. Torp-Pedersen and M. Lamberts (2015). "Association of NSAID use with risk of bleeding and cardiovascular events in patients receiving antithrombotic therapy after myocardial infarction." JAMA **313**(8): 805-814.
- Schmidt, M., M. Lamberts, A. M. Olsen, E. Fosboll, A. Niessner, J. Tamargo, G. Rosano, S. Agewall, J. C. Kaski, K. Kjeldsen, B. S. Lewis and C. Torp-Pedersen (2016). "Cardiovascular safety of non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs: review and position paper by the working group for Cardiovascular Pharmacotherapy of the European Society of Cardiology." Eur Heart J **37**(13): 1015-1023.
- Shi, L., B. Fisslthaler, N. Zippel, T. Fromel, J. Hu, A. Elgheznawy, H. Heide, R. Popp and I. Fleming (2013). "MicroRNA-223 antagonizes angiogenesis by targeting beta1 integrin and preventing growth factor signaling in endothelial cells." Circ Res **113**(12): 1320-1330.
- Sunderland, N., P. Skroblin, T. Barwari, R. P. Huntley, R. Lu, A. Joshi, R. C. Lovering and M. Mayr (2017). "MicroRNA Biomarkers and Platelet Reactivity: The Clot Thickens." Circ Res **120**(2): 418-435.
- Uchino, K. and A. V. Hernandez (2012). "Dabigatran association with higher risk of acute coronary events: meta-analysis of noninferiority randomized controlled trials." Arch Intern Med **172**(5): 397-402.
- Ungerer, M., K. Rosport, A. Bultmann, R. Piechatzek, K. Uhland, P. Schlieper, M. Gawaz and G. Munch (2011). "Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans." Circulation **123**(17): 1891-1899.
- Varga-Szabo, D., I. Pleines and B. Nieswandt (2008). "Cell adhesion mechanisms in platelets." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): 403-412.
- Ye, Z., E. H. Liu, J. P. Higgins, B. D. Keavney, G. D. Lowe, R. Collins and J. Danesh (2006). "Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls." Lancet **367**(9511): 651-658.
- Zampetaki, A., P. Willeit, L. Tilling, I. Drozdov, M. Prokopi, J. M. Renard, A. Mayr, S. Weger, G. Schett, A. Shah, C. M. Boulanger, J. Willeit, P. J. Chowienczyk, S. Kiechl and M. Mayr

(2012). "Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **60**(4): 290-299.