

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Manfred Stangassinger

Angefertigt am Deutschen Herzzentrum München
(Prof. Dr. Steffen Massberg)

Rolle der Neutrophil Extracellular Traps (NETs) bei der Entstehung der venösen Thrombose

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

von **Sue Chandraratne**

aus Stuttgart

München, 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Stangassinger

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Ritzmann
Univ.-Prof. Dr. Gerhards
Univ.-Prof. Dr. Hartmann
Univ.-Prof. Dr. Hermanns

Tag der Promotion: 21.Juli 2012

Für meine Eltern

I Einleitung	7
II Literaturübersicht	8
1 Venöse Thrombose	8
1.1 Definition und Bildung von Thrombosen.....	8
1.2 Anatomie und Funktion von Venen.....	8
1.3 Venöse Thrombose: Vorkommen und Entstehung	10
2 Leukozyten	11
2.1 Granulozyten	11
2.2 Bildung von neutrophilen Granulozyten.....	11
2.3 Funktion von neutrophilen Granulozyten	12
2.4 Rolle der Leukozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose	12
2.5 Leukozyten Adhäsionskaskade	13
3 Neutrophil Extracellular Traps (NETs)	14
3.1 Struktur von NETs.....	14
3.2 NETs-Entstehung	14
3.3 Die Funktion von NETs	16
4 Thrombozyten	18
4.1 Bildung und Funktion von Thrombozyten	18
4.2 Thrombozytenadhäsion und –aggregation	18
5 Gerinnung	20
5.1 Gerinnungskaskade.....	20
5.2 Faktor XII-Bildung und –Aktivierung.....	21
5.3 Rolle von FXII und FXI in der Thrombose	21
IV Methoden	24
1 Verwendete Versuchstiere	24
1.1 C57BL/6J.....	24
1.2 LysM-eGFP.....	25
1.4 FXII ^{-/-}	25
1.5 FXI ^{-/-}	26
1.6 Zucht und Haltungsbedingungen der Tiere im Tierstall.....	26
2 Operationsdurchführung	27
2.1 Wahl und Durchführung der Narkose	27
2.2 Operationsvorbereitung.....	28
2.3 Zugang zur Vena jugularis dextra.....	28

2.4 Operationstechnik des venösen Thrombosemodells	29
2.5 Haltungsbedingungen der Tiere im Experiment.....	30
2.6 Thrombus-Entnahme.....	31
2.7 Auswertung und Dokumentation.....	32
2.8 Blutentnahme durch Punktion der Vena facialis	32
2.9 Blutbilder	33
2.10 Schwanzveneninjektion	33
3 Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie (IVM)	34
3.1 Prinzipien der intravitale Videofluoreszenzmikroskopie.....	34
3.2 Durchführung der IVM.....	34
3.3 Verwendete Antikörper und Farbstoffe.....	35
3.3.1 Neutrophile Granulozyten-depletierender Antikörper anti-Ly-6G	35
3.3.2 Desoxyribonuclease (DNase)	35
3.3.3 Fluoreszenzmarkierter Antikörper X488 anti-GPIIb β	36
3.3.4 Sytox green.....	36
3.3.5 Enoxaparin.....	36
3.3.6 PCK (H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethylketone).....	36
3.3.7 Acridin-Orange.....	37
3.3.8 Rhodamin B	38
3.4 Isolierung von murinen Thrombozyten	38
3.5 Auswertung der IVM.....	39
4 2-Photonen-Mikroskopie	40
4.1 Prinzipien und Aufbau des 2-Photonen-Mikroskops.....	40
4.2 Verwendete Reagenzien	40
5 <i>In vitro</i> Präparationen.....	41
5.1 <i>In vitro</i> Präparation von humanen neutrophilen Granulozyten.....	41
5.2 <i>In vitro</i> Präparation von humanen Thrombozyten	41
5.3 <i>In vitro</i> Versuche.....	42
6 Konfokale Mikroskopie	42
7 Histologische Untersuchungen	43
7.1 Paraffinpräparate.....	44
7.1.1 Vorbereitung und Präparation	44
7.1.2 Carstairs Färbung	44
7.2 Immunhistologie	45

7.2.1 Vorbereitung und Präparation	46
7.2.2 Immunhistologische Färbungen.....	46
8 Versuchsplanung und -durchführung.....	49
8.1 Tierzahlen	49
8.2 Versuchsgruppen.....	49
9 Statistik.....	51
V Ergebnisse	52
1 Makroskopische und mikroskopische Untersuchungen der venösen Thromben	52
2 Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose	54
3 Rolle von NETs bei der Entstehung der venösen Thrombose.....	56
4 Rolle der Plättchen bei der Entstehung der venösen Thrombose.....	64
5 Rolle der FXII-abhängigen Koagulation bei der Entstehung der venösen Thrombose	
.....	70
VI Diskussion	75
1 Wahl der Mauslinien.....	75
2 Wahl des Tiermodells für die Induktion der venösen Thrombose	76
3 Neutrophile Granulozyten tragen durch NETs Bildung aktiv zur venösen	
Thrombose bei	77
4 Plättchen unterstützen die TVT-Bildung.....	79
5 Neutrophile Granulozyten verstärken die TVT durch Einleitung der FXII-	
abhängigen Gerinnung	80
6 Ausblick.....	82
VII Zusammenfassung	83
VIII Summary	84
IX Abkürzungsverzeichnis	85
X Abbildungsverzeichnis	88
XI Tabellenverzeichnis	90
XII Literaturverzeichnis.....	91
XIII Danksagung.....	101

I Einleitung

Die venöse Thrombose ist eine häufige und potenziell letale Erkrankung, da sie eine Lungenembolie zur Folge haben kann. Trotz ihrer hohen klinischen Relevanz sind die frühen zellulären und molekularen Mechanismen der Thromboseentstehung nur unzureichend untersucht.

Kürzlich wurde innerhalb unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass es bei der Entstehung der tiefen Venenthrombose zu einer sterilen Inflammationsreaktion kommt, bei der der aktiven Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutstrom eine entscheidende Rolle zukommt. Die resultierende Aktivierung der Venenwand, welche zu einer Entzündungsreaktion führt, wurde bereits ausführlich untersucht. So ist die initiale Phase der Thrombusentstehung durch die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und wenigen Monozyten charakterisiert. Die funktionelle Bedeutung der neutrophilen Granulozyten bei der Thrombogenese ist jedoch bislang weitgehend unbekannt.

Neutrophil Extracellular Traps (NETs), die ein Netzwerk aus DNA-Fasern darstellen, werden von neutrophilen Granulozyten gebildet und haben hauptsächlich antimikrobielle Effekte. Neben ihrer bekannten Rolle bei der Immunabwehr wurde zudem eine Bedeutung der NETs bei der Interaktion vom Immunsystem mit der Koagulation entdeckt.

In der vorliegenden Arbeit wird die funktionelle Rolle der neutrophilen Granulozyten bzw. ihrer NETs während der venösen Thrombogenese *in vivo* in einem bereits etablierten Mausmodell intravitalmikroskopisch, histologisch und *in vitro* untersucht. Die Frage, ob neutrophile Granulozyten mittels ihrer NETs für die Entstehung der venösen Thrombose eine essentielle Rolle spielen und inwieweit es zu einer Interaktion mit dem Gerinnungssystem kommt, soll somit beantwortet werden.

Die detaillierte Untersuchung der pathophysiologischen Vorgänge bei der Entstehung der venösen Thrombose ist von besonderer Bedeutung, um neue therapeutische Ansätze zu entwickeln. Zwar ist bekannt, dass die Entstehung der venösen Thrombose abhängig von der Aktivierung des Gerinnungssystems ist, doch die Mechanismen, die in einer überschießenden Fibrinbildung resultieren, sind weitgehend ungeklärt. Daher soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob und wie neutrophile Granulozyten diesen pathophysiologischen Prozess initiieren.

II Literaturübersicht

1 Venöse Thrombose

1.1 Definition und Bildung von Thrombosen

Die venöse Thrombose ist eine intravasale, intravitale Blutgerinnung unter Entstehung eines Blutgerinnsels, das als Thrombus bezeichnet wird und das Gefäßlumen partiell oder vollständig verschließt¹.

Virchow beschrieb bereits 1856 die ursächlichen drei Gründe für die Bildung eines venösen Thrombus: Veränderungen an der Gefäßwand, der Blutzusammensetzung und der Blutströmungsgeschwindigkeit².

Gefäßwandveränderungen im Sinne von strukturellen und funktionellen Veränderungen des Endothels und der darunterliegenden Basalmembran im Rahmen einer Atherosklerose, durch Traumen, exogene Substanzen (z.B. bakterielle Toxine, Chemotherapeutika), endogene Substanzen (z.B. Hypercholesterinämie) oder durch erhöhte mechanische Belastungen (z.B. Hypertonus) können Thrombosen auslösen.

Änderungen der Blutzusammensetzung durch Hyperkoagulabilität, Änderungen der Zellzahl und der Zellzusammensetzung im Blut sowie Änderungen des Plasmas (Antithrombin-III-Mangel) gehen mit einer Thromboseneigung einher.

Auch Störungen der Hämodynamik im Rahmen einer verlangsamten Blutströmung (Stase) durch Bettruhe, Ruhigstellung von Gliedmaßen oder längeren Flugreisen können typische Auslöser für die Entstehung einer Thrombose sein³.

Venösen Thromben liegen häufig primäre Störungen des Gerinnungssystems, sowie die Verlangsamung der Blutströmungsgeschwindigkeit zugrunde, während arterielle Thromben meist nach Endothelverletzungen oder nach Einbringen von thrombogenem Material in das Gefäßlumen entstehen⁴.

1.2 Anatomie und Funktion von Venen

Venen haben die Funktion das Blut aus den Kapillarnetzen zum Herzen zurückzuführen⁵. Des Weiteren führen sie aktive Stoffwechsellastungen im Bereich der Venolen aus und speichern das zirkulierende Blut in großen Mengen⁶. Dabei verlaufen sie im großen Kreislauf bis auf wenige Ausnahmen parallel zu den Arterien⁵.

Der Aufbau der Venenwand ist an diese Funktionen angepasst⁶ (Abb. 1):

Die Gliederung der Venenwand in Tunica interna, Tunica media und Tunica externa erfolgt nach der typischen Dreischichtung, wie sie bei allen großen Blutgefäßen zu finden ist. Die Tunica interna besteht aus einer Endothelzellschicht, einer Basalmembran und wenigen Fasern des subendothelialen Gewebes. Die Tunica media der Venen ist im Vergleich zu Arterien relativ dünn und die glatte Muskulatur bildet Bündel, die meist zirkulär oder flachspiralig angeordnet sind. Die Tunica externa besteht aus Längsmuskulatur und kollagenfaserreichem Bindegewebe; sie bildet den Abschluss zum interstitiellen Gewebe. Viele mittelgroße Venen besitzen Klappen, welche einen Rückfluss des Blutes verhindern. Große Venen, wie die Vena cava caudalis (V. cava caudalis), haben keine Klappen und weisen eine breite Schicht mit längsverlaufenden glatten Muskelzellen in ihrer Wand auf, welche die Längsspannung der Wand verändern können und auch bei wechselnder Druckdifferenz zwischen Lumen und Umgebung Widerstand entgegengesetzen können⁵.

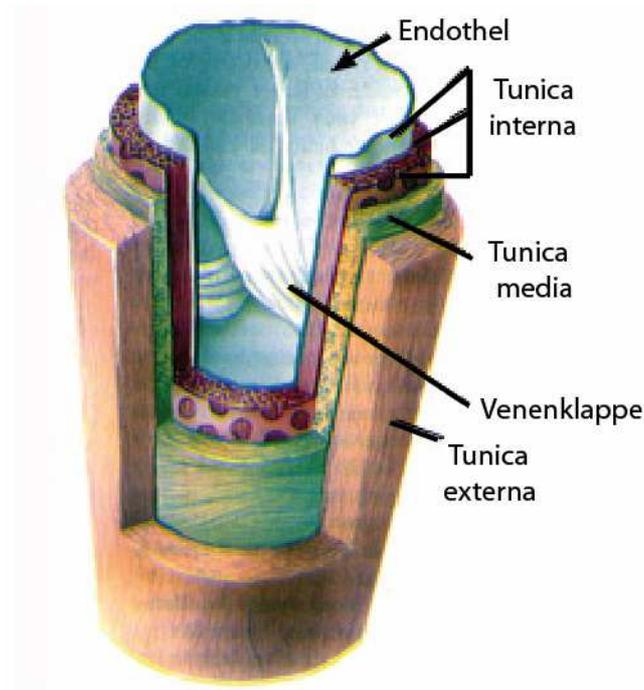


Abbildung 1: Aufbau einer Vene, modifiziert nach EKU⁷

1.3 Venöse Thrombose: Vorkommen und Entstehung

Die tiefe Venenthrombose (TVT) und die Lungenembolie (LE) zählen, nach Herzinfarkt und Schlaganfall, zu den dritthäufigsten Todesursachen des Herz-Kreislauf-Systems und werden zusammengefasst als venöse Thromboembolie (VTE) bezeichnet⁸. Die Häufigkeit der VTE reicht von 300 000 bis über 2 Millionen Fällen pro Jahr allein in den USA, wobei in Europa gleiche Zahlen zu beobachten sind⁹⁻¹¹. Die Wahrscheinlichkeit einer VTE steigt dramatisch ab einem Alter über 45 Jahren¹².

Im Gegensatz zur arteriellen Thrombose, welche typischerweise durch einen Endothelschaden hervorgerufen wird, ist bei der venösen Thrombose die venöse Blutverlangsamung, trotz unverletztem Endothel, ein häufiger Auslöser². Im Zuge dessen etablierte Maria Köllnberger 2007 in unserer Arbeitsgruppe ein neues Modell für die tiefe Venenthrombose, bei dem die alleinige Verringerung der venösen Blutströmungsgeschwindigkeit ausreicht, um die Bildung eines venösen Thrombus zu induzieren¹³. Die vorliegende Arbeit basiert auf diesem neu entwickelten Stenosemodell, welches die häufig vorkommende spontane venöse Thrombusbildung unter eingeschränkten Flussbedingungen widerspiegelt. Basierend auf dem Mechanismus der Flussreduktion bei intaktem Endothel zählen beim Patienten klinische Situationen wie Schwangerschaft, chronisch venöse Insuffizienz, lokale venöse Kompression (z.B. durch ein Hämatom oder einen Tumor) und Immobilisation (z.B. durch einen Langstreckenflug, Hemiplegie oder postoperativ) zu den Hauptrisikofaktoren der TVT¹⁴⁻²⁰.

Humane venöse Thromben bilden sich typischerweise auf der Oberfläche des intakten Endothels und haben keinen direkten Kontakt mit dem Subendothel²¹. Sie sind fibrin- und erythrozytenreich und haben eine charakteristische geschichtete Struktur. Zudem befinden sich viele Leukozyten im Thrombus, welche sich um die Erythrozytenmasse lagern²². Dies zeigt, dass entzündliche Prozesse und die TVT eng miteinander verbunden sind. Um diese These zu untermauern, wurde gezeigt, dass das C-reaktive Protein, welches einen Entzündungsparameter darstellt, bei Patienten mit tiefer Venenthrombose erhöht ist²³. Zusätzlich können akute Infektionen für die TVT prädisponierend sein, was darauf schließen lässt, dass auch inflammatorische Prozesse an der TVT-Bildung beteiligt sind²⁴.

Hypoxie wird als ein Auslöser für die Entstehung einer venösen Thrombose angenommen, da sie als Stimulus für endotheliale Dysfunktion betrachtet wird²⁵. Stase, im Sinne einer

Flussverlangsamung, führt nach neuesten Erkenntnissen zu einer lokalen Hypoxie am Endothel²⁶. Dadurch kommt es zu einer schnellen Aktivierung von Endothelzellen, welche daraufhin ihre Weibel-Palade-Körperchen an die Zelloberfläche mobilisieren²⁷ in denen von Willebrand Faktor (vWF)²⁸ und P-Selektin²⁹ gespeichert sind. Leukozyten binden das vom Endothel exprimierte P-Selektin³⁰ über den P-Selektin Glykoprotein Liganden 1 (PSGL-1)³¹. Durch diese Endothel-Leukozyten-Interaktion kommt es zum Rollen und schließlich zum Arrest von Leukozyten auf dem Endothel, was dieses wiederum aktiviert. Plättchen binden an vWF, welcher auch vom aktivierten Endothel exprimiert wird, über den Glykoprotein (GP)Ib-IX-V-Komplex³². Eine Verlangsamung des Blutflusses führt demzufolge zu einer lokalen Hypoxie, welche über die Endothelaktivierung die lokale Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten zur Folge hat.

2 Leukozyten

2.1 Granulozyten

Granulozyten lassen sich in eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten unterteilen. Namensgebend für die Granulozyten sind die charakteristischen intrazellulären Granula, welche verschiedene Proteine speichern, die Mikroorganismen vernichten und Gewebe verdauen können. Die Einteilung der Granulozyten erfolgt nach dem Färbeverhalten ihrer Granula. Neutrophile Granula können in drei Klassen unterschieden werden: primäre oder azurophile Granula (sie enthalten Myeloperoxidase, Cathepsin G, Neutrophile Elastase, Proteinase 3), welche hauptsächlich für das Vernichten von Mikroorganismen und deren Verdau verantwortlich sind, sekundäre Granula (z.B. mit Lactoferrin) und tertiäre Granula (mit Gelatinase)³³.

2.2 Bildung von neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten, welche zur Gruppe der polymorphkernigen Leukozyten (PMN) gehören, werden im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Diese differenzieren weiter in myeloide Stammzellen, aus denen die Granulozyten hervorgehen³⁴. Neutrophile Granulozyten sind hochspezialisierte, sich nicht weiter teilende Zellen mit einer kurzen Lebensspanne von 3 bis 10 Tagen. Den Großteil dieser Lebensspanne verbringen diese polymorphkernigen Leukozyten im Knochenmark, wo sie verschiedene

Stadien der Reifung durchleben³⁵. Daraufhin werden sie in den Blutstrom abgegeben, in dem sie kurze Zeit zirkulieren, bevor sie aktiv ins Gewebe auswandern, um dort eingewanderte Fremdzellen zu bekämpfen, an Entzündungsreaktionen teilzunehmen oder die Wundheilung zu unterstützen³⁶.

2.3 Funktion von neutrophilen Granulozyten

Neutrophilen Granulozyten besitzen, durch ihre Fähigkeit der Phagozytose, eine wichtige Funktion bei der unspezifischen Abwehr. Nach Opsonisierung eines Fremdorganismus, wird dieser in die phagozytäre Vakuole aufgenommen und meist umgehend vernichtet³⁷. Dies geschieht durch das Verschmelzen von Lysosomen mit der phagozytären Vakuole, zusammen mit der Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen³⁸.

Eine weitere Funktion der neutrophilen Granulozyten besteht in der so genannten NETs (Neutrophil Extracellular Traps) Bildung. Bei diesem extrazellulären Mechanismus können Bakterien auch außerhalb der Zelle bekämpft werden, indem die neutrophilen Granulozyten eine netzartige Struktur produzieren (NETs). In diesem Netz können verschiedene Mikroorganismen gefangen und abgetötet werden³⁹ (siehe 3).

Des Weiteren wurde bereits ein direkter Zusammenhang zwischen neutrophilen Granulozyten und mikrovaskulären thrombotischen Prozessen gezeigt. Die Haupteffektoren der mikrobiziden Abwehr der neutrophilen Granulozyten, die Neutrophile Elastase und das Cathepsin G, können im Zusammenspiel mit den NETs die Koagulation und das intravaskuläre Thrombuswachstum *in vivo* fördern⁴⁰.

2.4 Rolle der Leukozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose

Alexander Steinhart zeigte, basierend auf dem Stenosemodell innerhalb unserer Arbeitsgruppe 2012, dass es bei der Induktion der venösen Thrombose zu einer lokal stattfindenden sterilen Inflammation kommt, bei der hauptsächlich neutrophile Granulozyten und Monozyten rekrutiert werden⁴¹. Initial über die ersten sechs Stunden werden hauptsächlich neutrophile Granulozyten rekrutiert. Über 48 Stunden kommt es zu einer zunehmenden Monozytenrekrutierung, sodass es zusammenfassend zu einer Verteilung von circa 66% neutrophilen Granulozyten und circa 33 % Monozyten kommt. Mittels einer systemischen Depletion der neutrophilen Granulozyten und einer Subpopulation der Monozyten durch einen Antikörper, konnte die Thrombusentstehung verhindert werden⁴¹.

2.5 Leukozyten Adhäsionskaskade

Polymorphkernige Leukozyten können über mehrere Schritte am inflammatorischen Endothel adhären. Die typischen drei Schritte der Adhäsionskaskade bestehen aus 1. dem Selektin-vermittelten Rollen, 2. der Chemokin-verursachten Aktivierung und 3. aus der Integrin-abhängigen Adhäsion⁴² (Abb. 2).

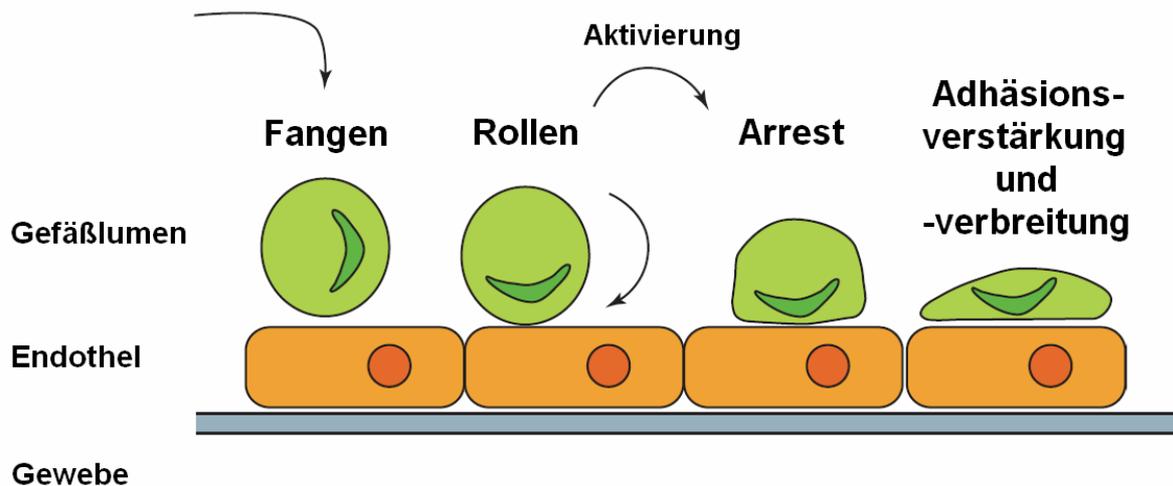


Abbildung 2: Adhäsionskaskade, modifiziert nach Schymeinsky et al.⁴³

Während eines Entzündungsgeschehens werden Endothelzellen durch entzündliche Zytokine aktiviert, exprimieren daraufhin Adhäsionsmoleküle und produzieren Chemokine, welche sie auf der luminalen Oberfläche präsentieren⁴². Es wurde schon sehr früh beobachtet, dass das Rollen von Leukozyten über das Endothel die erste zelluläre Reaktion auf inflammatorische Stimuli oder Gewebeschaden ist⁴⁴. Das Rollen ist eine essentielle Voraussetzung für die spätere Adhäsion und die transendotheliale Migration am Endothel und wird durch Selektine vermittelt. Dabei spielt P-Selektin neben E- und L-Selektin die größte Rolle, welches hauptsächlich mit dem P-Selektin Glycoprotein Liganden 1 (PSGL-1) interagiert⁴⁵. P-Selektin ist in den α -Granula von Plättchen und in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen gespeichert³¹. Nach Aktivierung gelangt P-Selektin an die Oberfläche von Plättchen und Endothelzellen⁴⁶. PSGL-1 wird von den meisten Leukozyten exprimiert und ist entscheidend für das P-Selektin-vermittelte Rollen unter Flussbedingungen⁴⁷.

In vivo und *in vitro* Studien haben gezeigt, dass die Leukozytenadhäsion während des Rollens von Chemokinen unterstützt wird, welche die Leukozyten aktivieren. Dies wird durch die

Bindung von Leukozyten an endotheliale Rezeptoren wie z.B. intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) und vaskuläres Adhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) vermittelt^{48,49}.

3 Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

3.1 Struktur von NETs

Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch Lipopolysaccharide (LPS), Interleukin-8 (IL-8), Phorbol-Myristate-Acetate (PMA) oder durch verschiedene Pathogene wie *Shigella flexneri*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* führt zur Bildung von NETs⁵⁰.

NETs bestehen aus glatten Fasern, welche einen Durchmesser von 15-17 nm besitzen, und kugelförmigen Abschnitten, welche in größeren Fasern aggregiert sind⁵⁰. Sie bilden ein dreidimensionales Netzwerk um den neutrophilen Granulozyten, aus welchem sie entstanden sind⁵⁰. Den Hauptbestandteil der NETs bildet chromosomale DNA, welche auf ihrer Oberfläche mit granulären antimikrobiellen Peptiden und Enzymen, wie Myeloperoxidase (MPO), Neutrophile Elastase, Cathepsin G, Lactoferrin und Gelatinase, bedeckt ist⁵⁰. Zudem bilden die Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4 das Grundgerüst der NETs⁵⁰. Durch eine Behandlung mit Desoxyribonuklease (DNase) lässt sich ein Zerfall dieser Strukturen beobachten, aber nicht durch eine Behandlung mit Peptidasen⁵⁰.

3.2 NETs-Entstehung

Ex vivo Versuche haben gezeigt, dass aktivierte neutrophile Granulozyten einen zelltod-ähnlichen Prozess durchwandern, die so genannte „Netose“, bei dem die Hülle um den Kern zerfällt und die Granula sich auflösen, sodass sich die NETs-Bestandteile im Innern der Zelle mischen können⁵¹. Am Ende dieses Prozesses rupturiert die Plasmamembran und das Chromatin wird zusammen mit den granulären Proteinen in den extrazellulären Raum freigesetzt⁵¹ (Abb. 3).

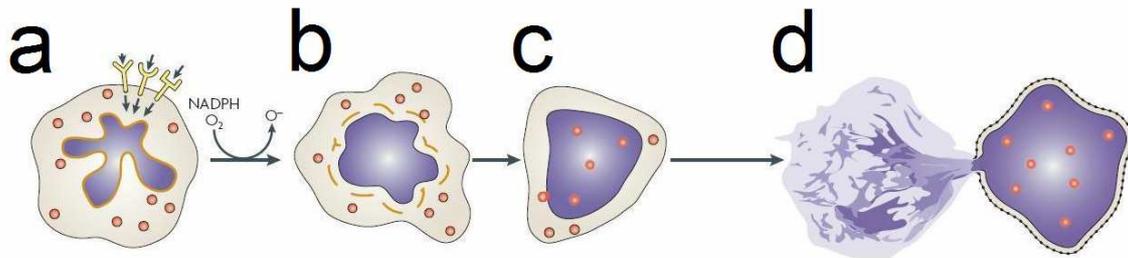


Abbildung 3: Entstehung von NETs, modifiziert nach Brinkmann et al.³⁹

- a)** Durch die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produziert.
- b)** Daraufhin beginnt die Kernmembran sich in kettenartige Stücke aufzulösen und auch die Granulamembranen verlieren an Intaktheit.
- c)** Die Kerne verlieren dann ihr typisches gelapptes Erscheinungsbild und der Kerninhalt mischt sich mit dem Inhalt der Granula.
- d)** Letztlich ist keine Intaktheit des Kerns und der Granula mehr zu erkennen und schließlich wird der neutrophile Granulozyt rund, kontrahiert sich und entlässt die NETs in den extrazellulären Raum.

Die NETs-Bildung lässt sich zu einem frühen Zeitpunkt klar vom nekrotischen Zelltod und von der Apoptose abgrenzen. Dass die NETs-Entstehung kein Resultat vom Auslaufen während eines nekrotischen Zelltods darstellt, lässt sich an der intakten Kernhülle und den intakten Granula in nekrotischen Zellen beweisen. Ein deutlicher Unterschied zu apoptotischen Zellen ist das Auftreten der NETs nach ca. 10 Minuten, was für die Apoptose zu schnell geschehen würde. Des Weiteren fehlt den NETs bildenden neutrophilen Granulozyten die für die Apoptose typische Kondensation des Chromatins, die Fragmentierung des Kerns und die zytoplasmatische Vakuolenbildung, außerdem ist die Kernmembran bei apoptotischen Zellen zu einem frühen Zeitpunkt intakt. Typische Merkmale von NETs bildenden neutrophilen Granulozyten sind eine vollständige Fragmentierung der Kernhülle und eine Auflösung der meisten Granula, aufgrund dessen es zu einer Vermischung von nukleären und zytoplasmatischen Bestandteilen kommt⁵¹.

Verschiedene Studien haben bewiesen, dass die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die NADH Oxidase nötig ist für die NETs-Bildung⁵¹. Durch die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und der daraus resultierende ROS Produktion, kann die Neutrophile Elastase (NE) aus den azurophilen Granula entweichen und in den Kern translozieren, wo sie spezifische Histone (H2A-H2B-DNA-Komplex, H3, H4) degradiert und so die Chromatindekondensation vorantreibt. Relativ spät transloziert die Myeloperoxidase

(MPO) aus den Granula in den Kern, bindet an das Chromatin und verstärkt die Chromatindekondensation⁵² (Abb. 4).

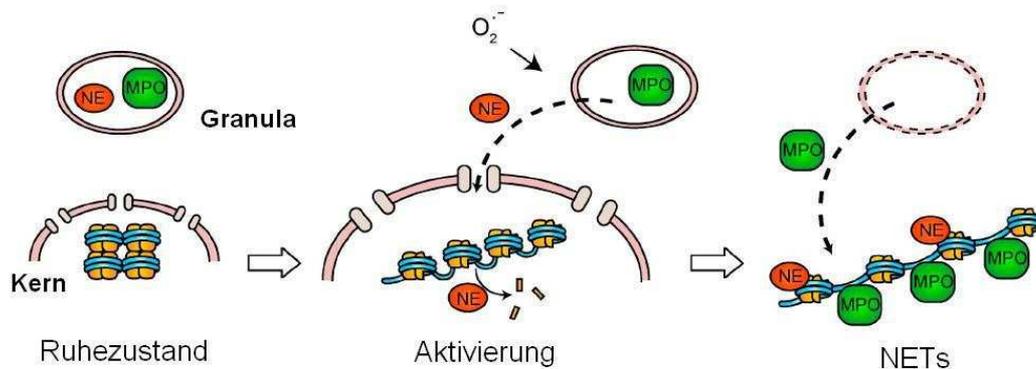


Abbildung 4: NETs Entstehung mit Hilfe von NE und MPO, modifiziert nach Papayannopoulos et al.⁵²

In ruhenden neutrophilen Granulozyten sind die Hauptenzyme Neutrophile Elastase (NE) und Myeloperoxidase (MPO) in den azurophilen Granula gespeichert. Nach Aktivierung und der daraus resultierenden ROS Produktion wird NE aus den Granula entlassen und transloziert in den Kern. Dort kommt es durch NE zum enzymatischen Abbau der Histone und führt so zur Chromatindekondensation. Am Ende transloziert MPO ebenfalls in den Kern, bindet dort an das Chromatin und führt dadurch zur weiteren Dekondensation. Schließlich führt dieser Prozess zum Aufplatzen der Zelle und NETs-Bildung.

3.3 Die Funktion von NETs

Bei Infektionen tragen neutrophile Granulozyten durch Phagozytose und NETs-Bildung aktiv dazu bei Pathogene zu vernichten. Es wurde gezeigt, dass NETs eine Vielzahl von Bakterien, wie *S. aureus*, *S. typhimurium*, *S. pneumoniae*, *S. flexneri*, *S. pyogenes*, und Pilze, wie *C. albicans*, binden und abtöten können^{50,53-55}. Pathogene werden durch die Netzstruktur der NETs eingefangen, wo sie einer hohen Konzentration an antimikrobiellen Molekülen, wie etwa NE, bactericidal permeability-increasing Protein und Histonen, ausgesetzt werden⁵⁰. Die meisten Pathogene werden auf diese Weise vernichtet⁵⁰, doch einige haben Strategien entwickelt diesem Abtötungsmechanismus zu entkommen. So besitzen Bakterien wie *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* und *S. aureus*⁵⁶⁻⁵⁸ die Fähigkeit DNase zu produzieren und können dadurch das DNA-Gerüst zerstören^{54,55}.

In vitro Versuche haben gezeigt, dass die Ko-Kultivierung von aktivierten Endothelzellen mit neutrophilen Granulozyten die NETs-Bildung auslösen kann⁵⁹. Des Weiteren können Thrombozyten, die durch Bindung von LPS an TLR4 aktiviert wurden, an neutrophile

Granulozyten binden, diese dadurch aktivieren und die NETs Freisetzung auslösen⁶⁰. Dies zeigt eine weitere Möglichkeit der NETs-Bildung (Abb. 5).

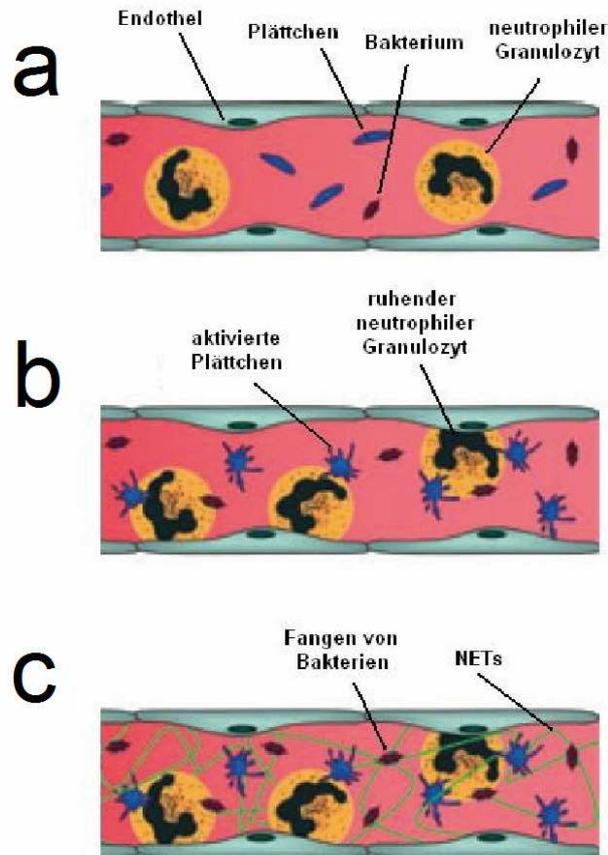


Abbildung 5: Bakterienfang durch NETs, modifiziert nach Ma et al.⁶¹

- a) Inaktivierte Plättchen und neutrophile Granulozyten zirkulieren durch die Gefäße. Durch LPS, von Bakterien, wird TLR4 aktiviert.
- b) Nach der Detektion von LPS werden neutrophile Granulozyten an das Endothel rekrutiert. TLR4 aktivierte Plättchen werden daraufhin zu den adhärenenten neutrophilen Granulozyten rekrutiert.
- c) Dies führt zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und schließlich zur NETs-Bildung. Dadurch können eine Vielzahl von Bakterien in den NETs gefangen und vernichtet werden.

Außerdem können NETs, durch die Spaltung von TFPI durch NE, das Gerinnungssystem aktivieren und mittels ihrer Gerüststruktur die Thrombusbildung unterstützen⁴⁰. Die Perfusion von NETs mit Blut führt zur Plättchenadhäsion, -aktivierung und -aggregation⁶². Diese Plättchenadhäsion auf den NETs kann durch die Gabe von DNase oder Heparin blockiert werden und dadurch kann auch die Thrombusbildung verhindert werden⁶². Heparin

hat eine hohe Affinität zu Histonen⁶³ und kann diese aus dem Chromatin herauslösen⁶⁴. Diese Zerstörung des Grundgerüsts, hat eine Instabilisierung der NETs zur Folge⁶².

Ein weiterer Mechanismus der NETs besteht in der Fähigkeit Erythrozyten zu rekrutieren, was zur Bildung eines typischen roten Thrombus führt⁶². Für die Thrombusstabilisierung können NETs Plättchen und verschiedene Plasmaproteine binden, wie VWF, Fibronektin und Fibrinogen, und so die thrombin-abhängige Fibrinbildung unterstützen⁶².

4 Thrombozyten

4.1 Bildung und Funktion von Thrombozyten

Thrombozyten werden im Knochenmark durch Abschnürung aus Megakaryozyten gebildet, welche Thrombozyten in Konglomeraten ins Blut abgeben. Bei der Passage durch die Pulmonalarterien zerfallen diese in bis zu 1000 kernlose, 2-4µm große Plättchen. Die Plättchen besitzen verschiedene Granula, u.a. die α -Granula, in denen verschiedene Wachstumsfaktoren, Fibrinogen, P-Selektin und von-Willebrand-Faktor gespeichert sind. Thrombozyten spielen eine große Rolle bei der Hämostase, indem durch Thrombozytenadhäsion und -aggregation ein Verschluss von Gefäßverletzungen erreicht wird³⁴. Über den Glykoprotein (GP) Ib-IX-V-Komplex können Thrombozyten an den vom Endothel exprimierten von Willebrand Faktor binden⁶⁵. Der GPIb-IX-V-Komplex besteht aus vier Polypeptiden: GPIb α , GPIb β , GPIX und GPV⁶⁶.

4.2 Thrombozytenadhäsion und -aggregation

Wie bereits bei Punkt 1.3 beschrieben, können Thrombozyten mit dem durch Hypoxie aktivierten Endothel über ihren GPIb-IX-V-Komplex interagieren. Durch diesen initialen Kontakt, über den thrombozytären Rezeptor mit von-Willebrand-Faktor, können die zirkulierenden Blutplättchen im weiteren Verlauf zunächst locker an das Endothel binden bzw. über das aktivierte Endothel rollen⁶⁵. Aufgrund dieser transienten Bindung wird eine thrombozytäre intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die schließlich zur festen Plättchenadhäsion über GPIIb-IIIa und vWF führt⁶⁷ (Abb. 6). Die Tatsache, dass vWF^{-/-} Mäuse nach Flussverlangsamung keinen Thrombus entwickelten, weist darauf hin, dass die von vWF-vermittelte Plättchenadhäsion entscheidend für die Entwicklung einer TVT ist⁶⁸.

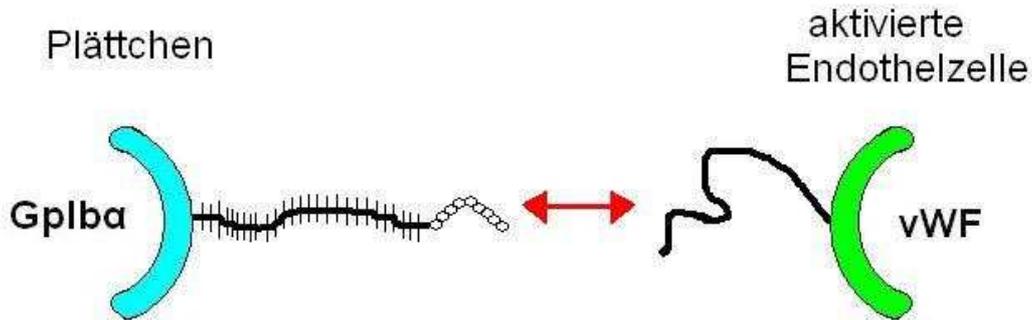


Abbildung 6: Endothel-Thrombozyten-Interaktion

Plättchen interagieren über GPIIb mit vWF auf den aktivierten Endothelzellen.

4.3 Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen

Thrombozyten können auch zur Rekrutierung von polymorphkernigen Leukozyten beitragen. In den α -Granula der Thrombozyten ist P-Selektin gespeichert, welches nach deren Aktivierung an der Oberfläche präsentiert wird⁶⁹. Zirkulierende polymorphkernige Leukozyten können daraufhin aus dem Blutstrom via PSGL-1 gebunden werden⁷⁰ und dadurch an das Endothel immobilisiert werden, an dem sie entzündliche und thrombotische Wechselwirkungen fördern können⁷¹. Eine weitere Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion kann via thrombozytärem GPIIb und leukozytärem Mac-1 erfolgen⁷². *In vitro* und *in vivo* wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von polymorphkernigen Leukozyten durch Plättchen hauptsächlich durch die Interaktion von GPIIb von Thrombozyten und dem Mac-1 Integrin der Leukozyten vermittelt wird⁷³ (Abb. 7). Mit Hilfe eines Antikörpers, welcher die Mac-1-GPIIb-Interaktion blockiert, konnte eine signifikant reduzierte Rekrutierung von polymorphkernigen Leukozyten beobachtet werden⁷⁴.

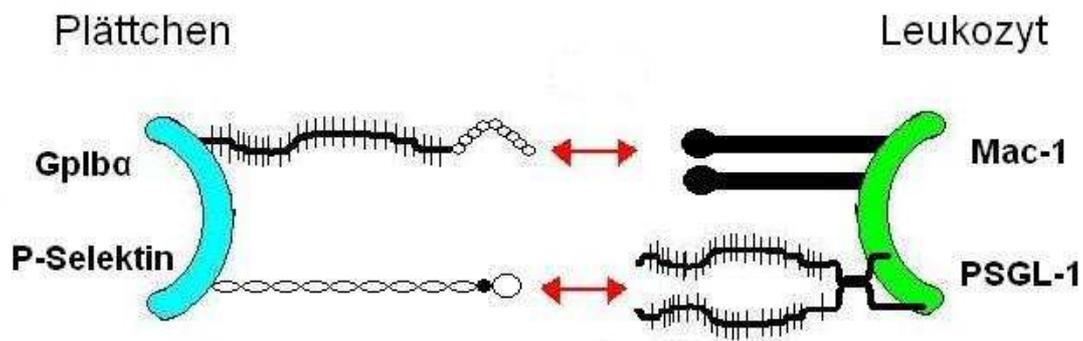


Abbildung 7: Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion

Plättchen interagieren über GPIb α mit Mac-1 auf den Leukozyten oder über P-Selektin mit PSGL-1.

5 Gerinnung

5.1 Gerinnungskaskade

Die Gerinnungskaskade lässt sich in den intrinsischen, den extrinsischen und den gemeinsamen Weg unterteilen (Abb. 8). Durch proteolytische Spaltung können aus inaktiven Vorstufen aktive Faktoren entstehen. Diese sind meist selbst Proteasen, die nachgeschaltete Faktoren wiederum aktivieren können. Im Ablauf der Gerinnungskaskade kommt es zu einer Verstärkung der Reaktion von Stufe zu Stufe. Dieser Prozess resultiert letztlich in der Bildung eines Fibrinnetzwerkes, das zu einem stabilen Gefäßverschluss führt³⁴.

Es wird generell angenommen, dass die Hämostase bei Gefäßverletzungen durch die Bildung des FVIIa/Tissue-Faktor-Komplexes (extrinsische Gerinnung, Tissue-Faktor-Pathway) initiiert wird. Die durch FXIIa eingeleitete intrinsische Gerinnung soll bei der Fibrinbildung *in vivo* keine Rolle spielen, da ein erblich bedingtes FXII-Leiden nicht mit einer Blutungsneigung verbunden ist⁷⁵. Des Weiteren können Komponenten der klassischen intrinsischen Gerinnung von FXII-unabhängigen Mechanismen aktiviert werden. Beispielsweise kann der FVIIa-TF-Komplex FIX aktivieren⁷⁶ und auch Thrombin kann FXI aktivieren⁷⁷. Erst vor kurzem wurde gezeigt, dass FXII^{-/-}-Mäuse vor einer Thrombosebildung geschützt sind⁷⁸. Diese Tatsache zeigt, dass FXII eine Rolle in der Thrombusbildung besitzt ohne dabei einen Einfluss auf die Hämostase zu nehmen.

wird. Auffällig war jedoch, dass der entstandene Thrombus bei FXII^{-/-}-Mäusen instabil war und zerfiel, bevor das Blutgefäß ganz okkludierte, was zu einer deutlichen Reduktion der Thrombusgröße führte^{75,84,78}. Die Infusion von humanem FXII⁷⁸ oder FXI⁸⁵ in FXII^{-/-}- oder FXI^{-/-}-Mäuse führte zur Wiederherstellung des arteriellen Thrombus bzw. zu dessen Stabilisierung.

III Zielsetzung der Arbeit

1 Untersuchung der Rolle von neutrophilen Granulozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose

Zunächst soll immunhistologisch geklärt werden, ob neutrophile Granulozyten rekrutiert werden und auf welche Weise dies geschieht. Weiterhin soll *in vivo* untersucht werden, ob diese Rekrutierung essentiell für die Bildung einer venösen Thrombose ist. Dafür sollen neutrophile Granulozyten depletiert werden.

2 Untersuchung der Rolle der NETs bei der Entstehung der venösen Thrombose

Weiterhin soll *in vivo* und immunhistologisch untersucht werden, ob neutrophile Granulozyten NETs bilden und welche Rolle diese bei der venösen Thrombose spielen. Dafür sollen NETs identifiziert und depletiert werden.

3 Analyse der Rolle der Thrombozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose

Einerseits soll *in vivo* mit Hilfe von GPIb^{-/-} Mäusen die Rekrutierung von Thrombozyten und die Interaktion mit Leukozyten untersucht werden. Andererseits soll mit Hilfe dieses Mausstammes untersucht werden, ob die Plättchen die NETs-Bildung fördern und mit ihnen interagieren können.

4 Untersuchung einer möglichen FXII Aktivierung durch NETs

Außerdem soll analysiert werden, ob das intrinsische Gerinnungssystem an der Entwicklung der venösen Thrombose beteiligt ist. Dazu sollen verschiedene transgene Mausstämme verwendet werden. *In vitro* soll eine mögliche Interaktion von NETs und FXII untersucht werden.

IV Methoden

1 Verwendete Versuchstiere

In dieser Arbeit wurde die Maus als Versuchstier verwendet. Die Vorteile liegen in einer problemlosen Aufzucht, schnellen Generationszeiten und einer kostengünstigen Haltung. Ein weiterer Vorteil im Hinblick auf intravitalmikroskopische Untersuchungen ist die geringe Körpergröße dieser Versuchstiere. Durch die Verfügbarkeit diverser transgener Stämme lassen sich die molekularen Mechanismen der Thrombose gut erforschen.

Folgende Mausstämme wurden für diese Arbeit verwendet:

- C57BL/6J
- LysM-eGFP
- IL4-R/GPIb α
- FXII^{-/-}
- FXI^{-/-}

Da alle verwendeten Mausstämme auf einem C57BL/6J Hintergrund gezüchtet wurden, wurde dieser als Kontrollgruppe verwendet. Durch die Verwendung von transgenen Stämmen lassen sich gezielt Mechanismen und Verhalten verschiedener Moleküle und Zelltypen bei der Entstehung der venösen Thrombose erforschen. Um die Rolle spezieller Proteine oder Rezeptoren näher zu untersuchen, wurden transgene Tiere verwendet, bei denen die entsprechende Genexpression ausgeschaltet wurde. Dadurch können Rückschlüsse auf deren Funktion im Vergleich zu Kontrolltieren gezogen werden.

1.1 C57BL/6J

Der C57BL/6J-Stamm ist der am häufigsten verwendete Inzuchtstamm, welcher sich aus der Verpaarung von Bruder und Schwester ergibt⁸⁶. Dieser Universalstamm wird üblicherweise auch zur Generierung verschiedener transgener Mäuse verwendet.

Die Geschwisterinzuchtpaare, welche kommerziell erworben wurden (Jackson Laboratory, Bar Harbour, Maine, USA), bilden den genetischen Ursprung der eigenen C57BL/6J-Zucht in der Tierhaltung des Deutschen Herzzentrums in München. C57BL/6J-Tiere kamen in dieser Arbeit sowohl als native Kontrolltiere, als auch behandelte Versuchstiere zum Einsatz.

1.2 LysM-eGFP

Der LysM-eGFP-Stamm zeichnet sich durch die genetische Markierung der neutrophilen Granulozyten und zu einem geringen Teil auch der Monozyten aus. Dies wurde durch einen Knock-In des Gens für das grün fluoreszierende Protein (enhanced GFP) in den Locus des murinen Lysozym M-Gens erreicht⁸⁷. Mit Hilfe dieses transgenen Stamms lässt sich die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose sehr gut erforschen.

1.3 IL4-R/Ib α (GPIb α)

Beim transgenen IL4-R/Ib α -Stamm exprimieren Plättchen ein humanes GPIb (GPIb α)-Transgen, bei dem die extrazytoplasmatische Domäne des GPIb-Rezeptors durch die extrazelluläre Domäne der α -Untereinheit des humanen Interleukin-4-Rezeptor (IL-4R) ersetzt wurde. Transgene Mäuse, welche den chimären Fusionsrezeptor exprimieren, wurden generiert und mit Mäusen verpaart, welche defizient sind für den murinen, thrombozytären GPIb-Rezeptor, um als Maus-Modell für das Bernard-Soulier-Syndrom zu dienen. Die transgene Expression des Fusionsrezeptors ist in der Lage den Bernard-Soulier Phänotyp, den die reinen GPIb-Null Mäuse aufweisen, abzumildern. In diesen Mäusen lässt sich ein 2-facher Anstieg von zirkulierenden Plättchen beobachten und die Plättchengröße ist 50% verkleinert⁸⁸. Durch diesen Stamm lässt sich die Rolle des GPIb-Rezeptors bei der Entstehung der venösen Thrombose erforschen.

1.4 FXII^{-/-}

FXII-Knockout-Mäuse (FXII^{-/-}) besitzen keine FXII Plasmaaktivität und haben eine deutlich verlängerte aktivierte partielle Thromboplastinzeit. Allerdings zeigen sich zu den Kontrolltieren keine Unterschiede bei den Gerinnungsfaktoren XI, VIII, IX, X, VII, V, II und Fibrinogen⁷⁵. Durch diesen Mausstamm soll die Rolle des intrinsischen Gerinnungssystems bei der Entwicklung der venösen Thrombose erforscht werden.

1.5 FXI^{-/-}

Bei den verwendeten FXI-Knockout-Mäusen (FXI^{-/-}) wurde mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen der offene Leserahmen des FXI-Gens, durch Insertion einer Neomycin-Resistenzkassette in das fünfte Exon, unterbrochen. Die aktivierte partielle Thrombinzeit ist bei homozygoten Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen und heterozygoten Knockout-Mäusen deutlich verlängert. Eine Faktor XI Aktivität ist bei homozygoten Knockout-Mäusen im Plasma nicht vorhanden⁸⁹.

1.6 Zucht und Haltungsbedingungen der Tiere im Tierstall

Bei allen im Versuch verwendeten Stämmen wurde die Zucht mittels polygamer Verpaarung (Harem-System) durchgeführt, bei der 2 Weibchen zusammen mit einem Männchen gehalten wurden. Die Zucht erfolgte ab einem Alter von 12 Wochen. Nach Sichtbarwerden der Trächtigkeit wurde das Männchen von der Gruppe getrennt. Nach der Geburt erfolgte eine vierwöchige Aufzuchtphase in der das Nestbau- und Brutpflegeverhalten ausgeübt werden konnte. Nach dem Absetzen der Jungtiere wurden die Weibchen erneut verpaart.

Alle Tiere aus dieser Arbeit stammten aus einer so genannten spezifiziert pathogenfreien Tierhaltung im Deutschen Herzzentrum München. Die Tiere wurden getrennt nach Stämmen in leicht zu reinigenden, sterilisierbaren, durchsichtigen und einzelbelüfteten Käfigen (IVC = individuell ventilierte Käfige) vom Typ III, erhöhte Ausfertigung (ca. 820 cm²) (TECNIPLAST, Hohenpeißenberg) gehalten. Dieser Haltungs- und Zuchtkäfig wurde mit einer speziellen Haube verschlossen und über eine Gebläseeinheit mit HEPA-gefilterter, konditionierter Raumluft versorgt. Durch 50-70 Luftwechsel in der Stunde wurde eine sehr gute hygienische Abschirmung der Tiere gewährleistet. Für ein gesichertes Sozialleben wurden die Mäuse in Zweier- bis Sechsergruppen gehalten, somit entsprechen die Mindestflächen/Maus der novellierten Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments. Nur Zuchtböcke wurden zwischen ihrem Zuchteinsatz einzeln gehalten⁹⁰. Als Einstreu wurde ein spezielles Weichholzgranulat (LIGNOCEL® BK 8-15, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg) verwendet, welches sich durch seine weiche Beschaffenheit und besondere Saugfähigkeit auszeichnete und deshalb nur einmal wöchentlich gewechselt wurde. Für den natürlichen Nestbau der Mäuse standen ihnen autoklavierbare, rote Plastikhäuschen (Mouse House, TECNIPLAST, Hohenpeißenberg) und sterilisierter Zellstoff zur Verfügung. Pelletiertes Futter (#1320 Ratte/Maus Haltdiät, Altromin, Lage) und Leitungswasser

standen allen Tieren ad libitum zur Verfügung. Das „Mikroklima“ in den Käfigen sicherte ein komplexes Belüftungssystem bei einer Luftfeuchtigkeit von 60-70% und einer Temperatur von 20 bis 24°C. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch einen zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus geregelt, bei dem während der Hell-Phase 50-100 Lux erreicht wurden.

Das vorliegende Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG, in der Fassung vom 25.05.1998) genehmigt.

2 Operationsdurchführung

2.1 Wahl und Durchführung der Narkose

Die Ligatur der V. cava caudalis und die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden im chirurgischen Toleranzstadium der Narkose durchgeführt. Die Narkose wurde zunächst durch Inhalation eines dreiprozentigen Isofluran-Sauerstoff-Gemisches (Forene 100%, Abott, Wiesbaden) mittels Verdampfer (Cyprane, Keighley, UK) bis zum Erlöschen der Stellreflexe eingeleitet. Im Anschluss erreichte man durch eine Injektionsnarkose das chirurgische Toleranzstadium (Stadium III₂).

Da es bis heute kein einzelnes Injektionsanästhetikum gibt, welches alle Kriterien der eingeschränkten Empfindung und psychische Dämpfung (Sedation), Muskelerschlaffung (Relaxation), Schmerzfreiheit (Analgesie) und Bewusstlosigkeit (Hypnose) vereint, wurden verschiedene Substanzen miteinander kombiniert⁹¹. Durch eine Kombination dreier unterschiedlich wirkender Injektionsanästhetika konnte die Einzeldosierung jedes Anästhetikums deutlich reduziert werden, wodurch es zu einer Minimierung der jeweiligen unerwünschten Nebenwirkungen kam. Das sedativ-hypnotische Analgetikum Medetomidin (α_2 -Adrenorezeptoragonist) wurde durch das potente Analgetikum Fentanyl (stark wirkender Opiatagonist) potenziert. Das zur Gruppe der Benzodiazepine gehörende Midazolam wirkte relaxierend und krampfhemmend.

Nach Narkoseeinleitung mittels Isofluran-Inhalation wurde ein Kombinationsanästhetikum aus 5,0 mg/kg Midazolam (Midazolam-Actavis 5 mg/ml, Actavis, Langenfeld), 0,5 mg/kg Medetomidin (Dorbene vet 1 mg/ml, Fort Dodge, Würselen) und 0,05 mg/kg Fentanyl (Fentanyl-Janssen 0,5 mg, Janssen-Cilag, Neuss) intraperitoneal appliziert. Atemfrequenz, -typ und das Fehlen des Flexorreflexes wurden in regelmäßigen Abständen überprüft, um die

Narkosetiefe gewährleisten zu können. Nach Bedarf wurde zur Aufrechterhaltung der Narkose nachinjiziert. Zur Erhöhung der Narkosesicherheit wurde über eine Nasenmaske die Oxygenierung des Tieres sichergestellt. Aufgrund des enormen Hypothermierisikos wurde die Körpertemperatur regelmäßig kontrolliert und durch ein intraoperatives Tierbewärmungssystem (IOW-3704, FMI, Seeheim-Ober Beerbach) bei 35-37°C aufrecht gehalten.

Der Vorteil der vollständigen Antagonisierbarkeit der Injektionsnarkose wurde nach Durchführung der Stenose-Induktion in der V. cava caudalis genutzt, wenn die Tiere im Anschluss aufwachen sollten und über weitere 48 Stunden gehalten werden sollten. Nach dem operativen Eingriff wurde der Maus eine Kombination aus 1,2 mg/kg Naloxon (Naloxon-hameln 0,4 mg/ml, hameln pharmaplus, Hameln), 2,5 mg/kg Atipamezol (Antisedan, Pfizer, Karlsruhe) und 0,5 mg/kg Flumazenil (Flumazenil Delta Select 0,1 mg/ml, DeltaSelect, Dreiei) subkutan injiziert, woraufhin die Tiere innerhalb von 3-5 Minuten erwachten.

2.2 Operationsvorbereitung

Nach Erreichen des Toleranzstadiums durch die Injektionsnarkose, wurden die Augen mit einer Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen) bedeckt, um diese so vor dem Austrocknen zu schützen. Die zu operierende Region wurde mit einer Haarschneidemaschine (ermila Magnum Handy, Wahl, Unterkirnach) geschoren, mit einer Enthaarungscreme (Pilca, Sodalco, Mailand, IT) enthaart und die Haut mit Alkohol (Cutasept, Bode Chemie, Hamburg) entfettet und desinfiziert. Um eine Auskühlung zu vermeiden, wurde die Maus mit einem Klebeband (Transpore, 3M Health Care, Neuss) in Rückenlage auf einer Heizplatte fixiert. Mit Hilfe eines Stereomikroskops (Stemi-2000-C, Zeiss, Jena), in Kombination mit einer Schwanenhalslampe (Schott-Kaltlichtquelle KL200 und Schwanenhals-Lichtleiter, Zeiss, Jena), wurde das Operationsfeld bei allen Präparationstechniken optimal ausgeleuchtet. Mikrochirurgisches Instrumentarium (micro2000, Medicon, Tuttlingen) wurde als Operationsbesteck verwendet.

2.3 Zugang zur Vena jugularis dextra

Die Applikation von Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte venös über einen Katheter in der Vena jugularis dextra (Jugulariskatheter). Das Tier wurde in Rückenlage mit

dem Kopf Richtung Operateur fixiert und die Haut der Halsregion median vom Sternum bis zum unteren Kinnwinkel eröffnet. Beide Speicheldrüsen kamen zum Vorschein und wurden stumpf durchtrennt und nach kranial gelagert. Die erscheinende Vena jugularis dextra wurde vorsichtig vom umliegenden Fett- und Bindegewebe befreit. Kaudal der Speicheldrüse wurde ein Haltefaden (Prolene, 7-0 metric, Ethicon, Norderstedt) um die Vena jugularis dextra gelegt und mittels einer Moskitoklemme gespannt und fixiert. Am kaudalen Ende der Vene wurde eine doppelte Ligatur (chirurgischer Knoten) vorgelegt. Dazwischen wurde eine einfache Ligatur vorgelegt, welche später die Vene nach kranial verschließen sollte. Die Vene wurde mit Hilfe einer Mikro-Federschere inzidiert, der Katheter (Portex Polythene Tubing, 0,28mm ID 0,61mm OD, Smiths Medical International, Hythe, UK) eingeführt und mittels der doppelten Ligatur fixiert. Daraufhin wurde die mittlere Ligatur nach kaudal geschoben und die Vene kranial des Katheters ligiert. Die intravenöse Lage des Katheters wurde durch Spülung mit isotoner Natriumchloridlösung (Diaco, Trieste, IT) überprüft.

2.4 Operationstechnik des venösen Thrombosemodells

Die anästhesierte Maus wurde in Rückenlage, mit den Hintergliedmaßen zum Operateur zeigend, fixiert. Die Bauchregion wurde enthaart und mit Alkohol entfettet. Neben die linke Seite der Maus auf Höhe des Abdomens wurde ein Käfig für Histologieproben (Tissue-Loc Cassettes, Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, USA) gelegt und mit steriler Gaze (Gazin Mullkompressen, Lohmann & Rauscher, Rengsdorf) bedeckt, welche mit angewärmter isotonischer Natriumchlorid-Lösung befeuchtet wurde und der ein Stück Parafilm untergelegt wurde.

Zunächst wurde mittels Medianschnitt in der Linea alba eine Laparatomie durchgeführt. Direkt im Anschluss wurde das Darmkonvolut mit feuchten Q-Tips auf die links liegende Gaze vorgelagert, sodass die V. cava caudalis wirbelsäulennah sichtbar wurde. Um den Darm vor dem Austrocknen zu schützen, wurde er mit steriler Gaze bedeckt und befeuchtet. Unterhalb der Vena renalis sinistra wurde die V. cava caudalis stumpf vom umliegenden Gewebe freipräpariert und von der Aorta abdominalis getrennt. Daraufhin wurde mit Hilfe einer gewinkelten Pinzette ein Faden (Premilene 8/0, B. Braun, Melsungen) unter der V. cava caudalis durchgezogen und eine doppelte Ligatur vorgelegt, wobei zwischen Ligatur und V. cava caudalis ein Drahtstück eines humanen Herzkatheter platziert wurde. Der Platzhalter verhinderte dabei den vollständigen Verschluss der V. cava caudalis, so dass das Lumen lediglich auf ca. 30% eingengt wurde und somit eine Flussreduktion erzielt werden konnte.

Nach dem Setzen der Ligatur wurde diese durch einen zweiten Knoten gesichert und der Platzhalter daraufhin entfernt, um einen erhaltenen aber verlangsamten Blutfluss zu gewährleisten (Abb. 9). Ein Teil der Tiere wurde im Anschluss an die Induktion der Flussverlangsamung in der V. cava caudalis für die Intravitalmikroskopie (akute Phase 1-6 Stunden) verwendet. Weitere Versuchsgruppen wurden lediglich ligiert und wachten direkt, für die 48 Stunden Untersuchungen (chronische Phase), wieder auf. Nach der Ligatur oder direkt nach den intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurde der Darm in die Bauchhöhle zurückverlagert. Durch eine fortlaufende Naht wurde das Peritoneum und die Muskulatur verschlossen (Prolene 7-0 metric). Die Haut wurde durch Einzelhefte adaptiert.

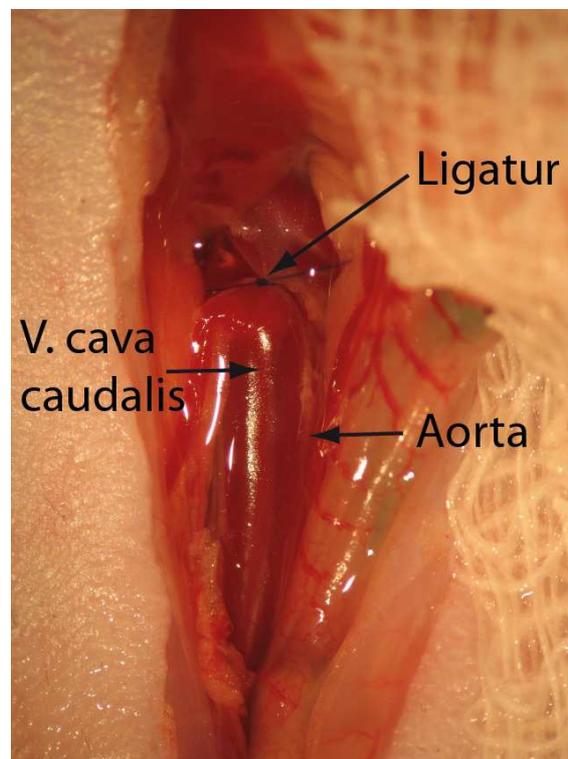


Abbildung 9: Durch die Ligatur verengte V. cava caudalis

2.5 Haltungsbedingungen der Tiere im Experiment

Nach dem Wiedererwachen der Tiere bei chronischen Versuchen über 48 Stunden, wurde ein sorgfältiges, regelmäßiges Monitoring und postoperatives Management durchgeführt. Nach der durchgeführten Operation wurden die Mäuse zur ständigen Beobachtung für 48 Stunden in einem speziellen Tierhaltungsschrank (Ventilated Cabinet, TECNIPLAST,

Hohenpeißenberg) untergebracht. Durch diese optimale klimatische Haltung und die roten Glasscheiben, welche die Mäuse von der Umgebung abschirmen, da sie nicht hindurch sehen können, konnte das Allgemeinbefinden jederzeit überprüft werden, ohne die Tiere in Stress zu versetzen.

Die Käfige waren mit weichen Pflgetüchern (Kimtech, Kimberley-Clark, Koblenz) und mit Kosmetiktüchern (Kleenex, Kimberly-Clark, Koblenz) als Nestbaumaterial ausgestattet. Mit Hilfe eines Scoresystems wurden verschiedene Parameter wie Allgemeinbefinden, Bewegungsaktivität, Verhalten, Kot- und Urinabsatz und Nahrungsaufnahme der Versuchstiere zweimal täglich geprüft und dokumentiert. Vor Versuchsbeginn wurden bereits die Versuchsabbruchkriterien, bei denen die Maus euthanasiert werden musste.

Zur postoperativen Schmerzabdeckung wurde den Versuchstieren perioperativ 0,1 mg/kg Buprenorphin (Temgesic, Reckitt Benckiser, Hull, UK) subkutan injiziert. Dies erfolgte ca. 30 Minuten vor Antagonisierung der Narkose, da die Wirkung von Buprenorphin erst nach 20 bis 30 Minuten eintritt. Aufgrund der Wirkdauer von 8 bis 12 Stunden³⁴ wurden die Versuchstiere morgens und abends mit diesem Opioid versorgt.

2.6 Thrombus-Entnahme

Nach 48 Stunden wurde die Maus getötet und die V. cava caudalis inklusive dem enthaltenen Thrombus entnommen. Dafür wurde die anästhesierte Maus in Rückenlage fixiert. Die Bauchhöhle wurde neben der Hautnaht eröffnet und der Darm nach links herausgelagert. Kranial der Ligatur wurde die V. cava caudalis eingeschnitten. Durch eine intrakardiale Injektion wurde der Kreislauf der Maus mit 5-6 ml Natrium-Chloridlösung gespült und die Maus somit durch Entbluten in tiefer Narkose getötet. Dadurch wurde verhindert, dass Blut post mortem in der V. cava caudalis verbleiben und gerinnen konnte. Die Vene wurde stumpf von Fett und Bindegewebe freipräpariert, wobei die Aorta an der Vene belassen wurde. Kaudal am Zufluss der Venae iliacae communi wurde eine Ligatur gesetzt (Prolene 7-0 metric, Ethicon, Norderstedt), somit wurde gewährleistet, dass immer das gleiche standardisierte Stück der V. cava caudalis entnommen wurde und der vorhandene Thrombus nicht abgeschwemmt werden konnte. Die V. cava caudalis wurde daraufhin mit einer Mikro-Federschere entnommen und auf einem Filterpapier gewogen (Abb.10).

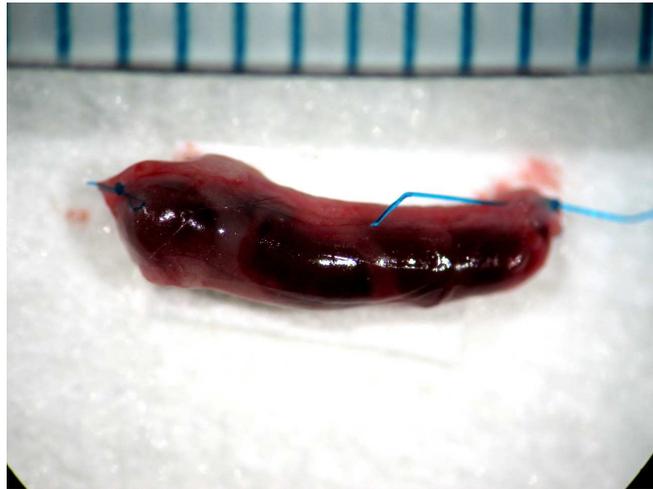


Abbildung 10: Entnommener Thrombus

2.7 Auswertung und Dokumentation

Die Thrombusgewichtbestimmung erfolge wie Steinhart 2012⁴¹ bereits zeigte. Die entnommene V. cava caudalis wurde zusammen mit den umgebenen Strukturen mit Hilfe einer Feinwaage (AE 260 DeltaRange, Mettler, Gießen) gewogen und durch Abzug des Mittelwertes der ermittelten Leergewichte (5,3 mg) erhielt man die reinen Thrombusgewichte in mg.

Eine umfangreiche Dokumentation der Versuche sicherte die Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse über längere Zeit. In diesen schriftlichen Protokollen wurden Versuchsdatum, Tierstamm und -nummer, Alter, Geschlecht, Gewicht und Verlauf des Versuches sowie eventuelle Komplikationen dokumentiert. Antikoagulantien, Farbstoffe und Antikörper wurden ebenfalls mit ihren Konzentrationen und Applikationsweisen festgehalten.

2.8 Blutentnahme durch Punktion der Vena facialis

Durch diese Blutabnahmetechnik konnten der Maus Blutvolumina von circa 100 μ l (unter Beachtung der empfohlenen maximalen Blutvolumina⁹²) entnommen werden. Der Vorteil lag darin, dass diese Technik keinen Terminalversuch darstellt, sondern dass die Maus nach der Blutentnahme weiterleben konnte. Dadurch konnte man einer Maus über längere Zeit mehrmals Blut abnehmen. 30 Minuten vor dem Eingriff wurde der Maus 0,1 mg/kg Buprenorphin subkutan injiziert. Die Maus wurde durch die Inhalationsnarkose mit Isofluran

betäubt. Durch die Fixierung der Nackenhaut am Halsbereich und das Zurückziehen der Gesichtshaut mit zwei Fingern wurde die Vena facialis gestaut. 3-5 mm dorsokaudal des Haarwirbels am Unterkiefer wurde die Vena facialis mit einer sterilen Lanzette (FEATHER BLOOD LANCET, pfm, Köln) punktiert. Die zum Vorschein kommenden Blutropfen wurden mit einem EDTA-Röhrchen (Microvette, Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen. Anschließend wurde die Einstichstelle eine Minute mit einem Wattestäbchen komprimiert, um eine Hämatombildung zu vermeiden⁹³.

2.9 Blutbilder

Das Erstellen von Blutbildern erfolgte, nach der Blutentnahme durch die Punktion der Vena facialis (siehe 2.8), mit Hilfe eines hämatologischen Analysegerätes (Sysmex XE-5000, Sysmex, Norderstedt).

2.10 Schwanzveneninjektion

Für die intravenöse Applikation von Antikörpern oder systemisch wirksamen Substanzen wurde die Schwanzveneninjektion verwendet. Die Vorteile lagen in der geringen Invasivität dieser Methode und der nicht notwendigen Narkose der Mäuse.

Nach der Fixierung der Maus in einer Vorrichtung, wurde das Blut proximal an der Schwanzbasis mit 2 Fingern gestaut. Durch einen mit 37°C warmen Wasser gefüllten Handschuh wurde die Vasodilatation gefördert. Für die Injektion wurden die beiden Kollateralvenen verwendet, wobei distal begonnen wurde. Falls ein zweiter Versuch notwendig war, blieb einem die Möglichkeit proximal erneut zu stechen. Mit Hilfe einer gebogenen Pinzette wurde der Katheter mit aufgesetzter Kanüle (30G) in einem flachen Winkel (fast parallel) in der Vene in Richtung Schwanzwurzel platziert. Wichtig für die Applikation der entsprechenden Substanz war daraufhin die Lösung des proximalen Staus und die korrekte intravenöse Lage der Kanüle.

2.11 Kardiale Blutentnahme

Für die Blutentnahme des Spendertieres (identischer Genotyp und Mausstamm wie das Empfängertier) wurde die Maus im narkotisiertem Zustand in Rückenlage fixiert. Nach Eröffnung der äußeren Haut wurde das Herz auf der Höhe der zweiten Rippe links

paramedian mit einer senkrecht geführten Spritze und einer 26 G Kanüle (BD Microlance, Becton Dickson, Heidelberg) punktiert. Das gewonnene Blut wurde mit 100 µl/ml Citrat (aus S-Monovetten, Sarstedt AG&Co., Nümbrecht) versetzt und so vor der Gerinnung geschützt. Durch die Technik der Herzpunktion konnten ca. 1,5 bis 2 ml Vollblut gewonnen werden. Da die Maus durch diesen Blutentzug verstirbt, handelt es sich bei dieser Blutentnahme um einen terminalen Versuch⁹².

3 Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie (IVM)

3.1 Prinzipien der intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie

Durch die Technik der intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie war es möglich eine Echtzeitdarstellung zellulärer Vorgänge *in vivo* darzustellen. Mit Hilfe von gut verträglichen Fluoreszenzfarbstoffen konnten verschiedene Zellen und zelluläre Strukturen *in* oder *ex vivo* markiert werden.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden bestimmte Moleküle (so genannte Fluorochrome) mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt (Anregung). Die Elektronen dieser Moleküle werden durch das anregende Licht aus ihrem Grundzustand in einen angeregten Zustand gehoben. Beim Zurückkehren in den Grundzustand wird langwelliges Licht in Form von Energie freigesetzt (Emission). Dabei sendet das Fluorochrom Licht mit einer höheren Wellenlänge aus, als das anregende Licht⁹⁴.

Durch ein Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop (BX51WI, Olympus, Hamburg), in Verbindung mit einem komplexen Multifunktions-Beleuchtungssystem MT 20 (Olympus, Hamburg) und einer Xenonlampe als Lichtquelle, konnte kurzwelliges Anregungslicht emittiert werden, wodurch fluoreszenzmarkierte Zellen *in vivo* sichtbar gemacht wurden. Das Emissionssignal wurde daraufhin über eine CCD-Kamera (ORCA-ER, Hamamatsu, Japan) an einen Computer gesendet, an dem die gesamte Erfassung, Bearbeitung, Dokumentation und Auswertung mit der Software Cell[^]R (Olympus, Hamburg) durchgeführt wurde.

3.2 Durchführung der IVM

Zur Erfassung der zellulären Vorgänge in der initialen Phase der Entstehung der venösen Thrombose erfolgte die intravitalem mikroskopische Untersuchung bis zu sechs Stunden nach Induktion der Flussverlangsamung. Der Bereich der V. cava caudalis zwischen der Ligatur

und den Zuflüssen der Venae iliacae wurde mit einer 20-fachen Vergrößerung mit einem Wasserimmersionsobjektiv (UMPlanFL 20x/0,50NA, 3,3mm, Water Dipping Lens, Olympus, Hamburg) aufgenommen. Hierfür wurde körperwarme Natriumchlorid-Lösung in die Bauchhöhle getropft. Es wurden je 100 Einzelaufnahmen erstellt, aus welchen sich je nach Belichtungszeit ein Film von ca. 10 Sekunden ergab.

3.3 Verwendete Antikörper und Farbstoffe

3.3.1 Neutrophile Granulozyten-depletierender Antikörper anti-Ly-6G

Um die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose zu untersuchen, wurden die neutrophilen Granulozyten mit Hilfe eines depletierenden Antikörpers (rat anti-mouse Ly-6G, Klon 1A8, eBioscience, Frankfurt) aus dem zirkulierenden Blut entfernt⁹⁵. Daley zeigte 2008, dass dieser spezifische Antikörper nur die neutrophilen Granulozyten, nicht aber die Gr-1-exprimierenden Monozyten depletiert⁹⁶. Hierfür wurde den Mäusen 12 Stunden vor der Operation 1,7 mg/kg und 24 Stunden nach der Operation 0,8 mg/kg Antikörperlösung per Schwanzveneninjektion verabreicht. 48 Stunden nach der Induktion der venösen Thrombose wurde den Mäusen Blut durch Punktion der Vena facialis entnommen, um die Depletion der neutrophilen Granulozyten im Blutbild zu bestätigen. Nach der Tötung der Maus, wurde die V. cava caudalis entnommen und weitergehend untersucht. Als Isotypkontrolle wurde ein Ratten IgG2a Isotypkontrollantikörper (eBioscience, Frankfurt) in gleicher Vorgehensweise und Konzentration verwendet.

3.3.2 Desoxyribonuclease (DNase)

Die DNase verdaut sowohl Einzelstrang- als auch Doppelstrang-DNA. Diese Endonuklease wurde genutzt, um die Rolle der Neutrophil Extracellular Traps bei der Entstehung der venösen Thrombose näher zu untersuchen. Dafür wurden jeweils 100 Units DNase (DNase I, RNase-free, Fermentas, St. Leon-Rot), 30 Minuten vor und 24 Stunden nach Induktion der Flussverlangsamung, intravenös durch Schwanzveneninjektion verabreicht⁹⁷. Als Kontrolle wurde als Vehikel NaCl verwendet.

3.3.3 Fluoreszenzmarkierter Antikörper X488 anti-GPIIb β

Mit Hilfe dieses Antikörpers war es möglich die zirkulierenden Plättchen *in vivo* für die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie schnell und stabil zu markieren. Ein weiterer Vorteil lag in der nicht-toxischen Wirkung und der nicht vorhandenen Blockierung der Plättchenadhäsion und -aggregation. Dieser Antikörper bindet spezifisch an die GPIIb β Untereinheit des GPIIb-V-IX Komplexes von murinen Plättchen und Megakaryozyten⁹⁸. Der X488 anti-GPIIb β Antikörper (EMFRET Analytics, Eibelstadt) wurde in einer Dosierung von 0,1 mg/kg intravenös über den Jugulariskatheter verabreicht.

3.3.4 Sytox green

Sytox green (SYTOX® Green Nucleic Acid Stain, Life Technologies, Invitrogen, Darmstadt) färbt mit hoher Affinität DNA und besitzt die Fähigkeit die Zellmembran toter Zellen zu durchdringen, nicht aber die Zellmembran lebender Zellen. Durch Injektion des DNA-Farbstoffes von 1 μ Mol/Tier über den Jugulariskatheter wurde das Vorhandensein von Neutrophil Extracellular Traps überprüft. Bei Anregung mit einer Wellenlänge von 450-490 nm emittiert Sytox green im grünen Bereich⁹⁹.

3.3.5 Enoxaparin

Die Behandlung mit Enoxaparin (Clexane multidose, Enoxaparin-Natrium, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main) stellt den Goldstandard für die Therapie der venösen Thrombose beim Menschen dar¹⁰¹. Dafür wurde den Mäusen, drei Stunden vor Induktion der venösen Thrombose und dann alle sechs Stunden, 60 mg/kg von diesem niedermolekularen Heparin subkutan verabreicht.

3.3.6 PCK (H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethylketone)

Mit Hilfe des FXII-Inhibitors (H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethylketone, Bachem, Bubendorf) wurde die Rolle des intrinsischen Gerinnungssystems bei der venösen Thrombose untersucht (Abb. 11). Dafür wurde der Inhibitor den Mäusen in einer Konzentration von 10 mg/kg, direkt vor der Induktion und dann alle 24 Stunden, intravenös durch Schwanzveneninjektion verabreicht. PCK inhibiert jedoch auch zum Teil FX, FVIIa/TF-Komplex und Kallikrein¹⁰².

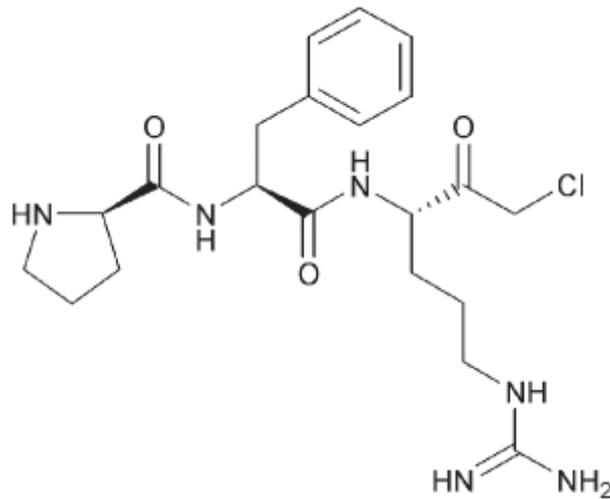


Abbildung 11: Strukturformel von PCK¹⁰³

3.3.7 Acridin-Orange

Acridin-Orange (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) besitzt die Fähigkeit durch Zellmembranen zu diffundieren und sich in die DNA und RNA einzulagern¹⁰⁴ (Abb. 12).

Dieser orangefarbene DNA-Farbstoff akkumuliert in sauren Zellkompartimenten, wie zum Beispiel Endosomen, Lysosomen und dem Golgi-Apparat. Bei der Anregung mit einer Wellenlänge von 495 nm emittiert er im grünen Bereich¹⁰⁵. Für die intravitalmikroskopische Darstellung von Leukozyten wurde den Mäusen 0,05 ml Acridin-Orange in einer Konzentration von 0,05 % intravenös über den Jugulariskatheter appliziert.

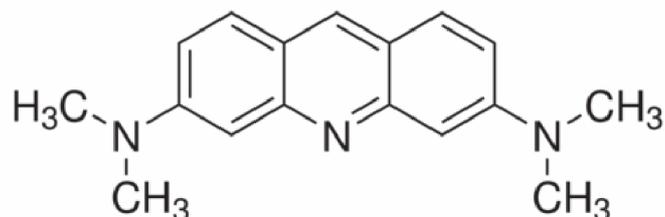


Abbildung 12: Strukturformel von Acridin-Orange¹⁰⁴

3.3.8 Rhodamin B

Rhodamin B Isothiocyanat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)¹⁰⁶ wurde in einer Konzentration von 20 µg/ml zur *ex vivo* Färbung von isolierten Plättchen verwendet (Abb. 13). Dieser Nukleinfarbstoff besitzt die Fähigkeit sich im Zellkern oder in den Mitochondrien lebender Zellen anzureichern. Rhodamin B wird bei 514 nm angeregt und emittiert im grünen Bereich.

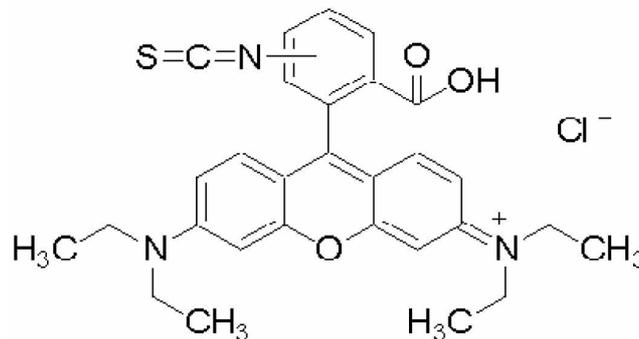


Abbildung 13: Strukturformel von Rhodamin B¹⁰⁶

3.4 Isolierung von murinen Thrombozyten

Wie bei 2.11 beschrieben wurde dem Spendertier durch kardiale Punktion 1,5 bis 2 ml Blut entnommen. Das verwendete Protokoll der Thrombozytenisolierung führt zu keiner relevanten Thrombozytenaktivierung¹⁰⁷. Für die Gewährleistung möglichst physiologischer Verhältnisse wurde ein Tyrode's-Puffer angesetzt. Für die Herstellung von 100 ml Puffer wurde jeweils 0,1 g D(+)-Glukose und bovines Serumalbumin mit Hilfe einer geeichten Waage abgewogen und 90 ml Aqua dest., 1 ml HEPES (Invitrogen, Darmstadt) und 10 ml eines bereits vorbereiteten 10-fach-Tyrode's-Puffer, bestehend aus 10,15 g NaHCO₃ (VWR International, Darmstadt), 1,95 g KCL (VWR International, Darmstadt) und 80 g NaCl (VWR International, Darmstadt) in 1000 ml Aqua dest. gelöst und steril filtriert, hinzugefügt. Durch die Zugabe von 2 mM HCL und NaOH wurden die fertigen Puffer auf die pH-Werte 6,5 und 7,4 eingestellt.

Das entnommene Blut wurde mit Tyrode's-Puffer pH 6,5 auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt und bei 68x g ohne Bremse für 20 Minuten (Haereus, Megafuge, Hanau)

zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand (plättchenreiches Plasma) wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und mit Tyrode`s-Puffer pH 6,5 auf ein Volumen von 4 ml aufgefüllt. Daraufhin wurde das Gemisch bei 1277x g für 10 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Das entstandene Thrombozytenpellet wurde nach Abschütten des Überstandes durch Zugabe von jeweils 250 µl Tyrode`s-Puffer pH 6,5 und pH 7,4 resuspendiert und dadurch wieder in Lösung gebracht. Anschließend wurde die Thrombozytenzahl mit Hilfe eines hämatologischen Analysegeräts (Sysmex XE-2100, Sysmex, Norderstedt) bestimmt. Daraufhin wurde die Thrombozytenzahl mit Tyrode`s-Puffer pH 6,5 auf eine Konzentration von 150000 Blutplättchen pro µl Flüssigkeit eingestellt. Kurz vor Versuchsbeginn wurde dem Empfängertier 250 µl dieser Suspension (150000/µl) intravenös verabreicht. Somit konnte gewährleistet werden, dass jedem Versuchstier die gleiche Zellkonzentration und Flüssigkeitsmenge injiziert wurde. Alle verwendeten und nicht gekennzeichneten Reagenzien stammten von Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

3.5 Auswertung der IVM

Kolokalisation

Für die Bestimmung der Kolokalisationsfläche in μm^2 wurden intravitalmikroskopische Standaufnahmen zum 6-Stunden Zeitpunkt mit Hilfe der ImageJ 1.45 Software ausgewertet. Die Kolokalisationsfläche von Plättchen und Leukozyten, welche sich gelb darstellte, wurde mit diesem Programm umfahren und berechnet.

Fibrinfläche

Die Berechnung der Fibrinfläche erfolgte anhand der Carstairs Färbung von Histologieschnitten ebenfalls mit Hilfe der ImageJ 1.45 Software. Durch die Umfahrung der orangenen Fläche (Fibrin) und der Gesamtthrombusfläche in Längsschnitten konnte das Programm die Flächen jeweils in μm^2 berechnen. Daraufhin wurde die Fibrinfläche im Verhältnis zur Gesamtfläche gesetzt und berechnet.

Auszählen von NETs

Das Auszählen der NETs erfolgte an Thrombusquerschnitten in der V. cava caudalis 48 Stunden nach Flussreduktion, welche mit Hoechst (Hoechst 33342, 10mg/ml, Invitrogen, Darmstadt) gefärbt wurden. Dabei wurden pro Querschnitt vier standardisiert ausgewählte Ausschnitte mit einem 40-fach Objektiv aufgenommen ($176\mu\text{m} \times 131\mu\text{m}$) und ausgezählt.

Farbdarstellung

Zur besseren Unterscheidung und zum besseren Vergleich verschiedener Zelltypen wurde nachträglich mit Hilfe der ImageJ 1.45 Software eine andere Farbdarstellung gewählt.

4 2-Photonen-Mikroskopie

4.1 Prinzipien und Aufbau des 2-Photonen-Mikroskops

Die 2-Photonen-Mikroskopie ist eine optische Schnittbildtechnik, welche eine Weiterentwicklung des Fluoreszenzmikroskops darstellt. Dabei wird das Elektron des Fluorochroms durch die gleichzeitige Absorption zweier Photonen angeregt, welche dadurch energieärmer sein können. Durch die zeitliche und räumliche Konzentrierung eines Infrarot-Lasers wird nur im Fokus eine ausreichend hohe Anregungsenergie generiert, sodass nur dort Fluoreszenzsignale emittiert werden. Durch die Nutzung eines Wasserimmersionsobjektives kann eine hohe Eindringtiefe und gleichzeitig eine hohe Qualität gewährleistet werden⁹⁴. Ein weiterer Vorteil des 2-Photonen-Mikroskops besteht in der Darstellung von Strukturproteinen wie Kollagenfasern durch das Second Harmonic Signal^{108,109}, welches durch Streuung im Gewebe entsteht und sich bei einer Wellenlänge von circa 420 nm blau darstellt⁹⁴.

Für die Visualisierung der V. cava caudalis wurde ein TrimScope Mikroskop der Firma LaVision Biotech (Bielefeld), ausgestattet mit einem MaiTai Laser (Spectra-Physics, Santa Clara, Kalifornien, USA) und einem 20x Wasserimmersionsobjektiv (numerische Apertur 0.95, Olympus), verwendet, unter Benutzung eines Mikroskops von Olympus (Tokio, Japan). Die Bilder wurden bei einer Anregungswellenlänge von 800nm, in einem Ausschnitt von 500x500 μm mit 512x512 Pixeln und in 3 μm Abstand aufgenommenen horizontalen Schnittbildern (z-stacks) visualisiert und anschließend mit der Software von Volocity (Improvision/Perkin-Elmer, Waltham, USA) zu einem drei-dimensionalen Bild rekonstruiert.

4.2 Verwendete Reagenzien

Durch i.v. Injektion von Hoechst oder Sytox orange konnte die DNA in blau oder orange dargestellt werden und durch die Injektion eines FITC markierten anti-Ly-6G Antikörpers konnten neutrophile Granulozyten in grün visualisiert werden. Alle Versuche wurden *in vivo* am anästhesierten Tier durchgeführt (Tab. 1).

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien für die 2-Photonen Mikroskopie

Farbstoffe	Konzentration	verwendete Verdünnung	Klone	Hersteller
Sytox orange	5 mM	100 µg/Tier	-	Invitrogen
Hoechst	10 mg/ml	100 µg/Tier	-	Invitrogen
FITC anti-Ly-6G	0,5 mg/ml	10 µg/Tier	1A8	BD Pharmingen

5 *In vitro* Präparationen

5.1 *In vitro* Präparation von humanen neutrophilen Granulozyten

Für die Isolierung von humanen neutrophilen Granulozyten wurde Blut von gesunden Spendern in 20 ml Spritzen (B.Braun, Melsungen) mit Tri-Natrium-Citrat entnommen (1:10). Dem Vollblut wurde 3% Dextran (MW 500000) (2:1) hinzugefügt und daraufhin wurde alles gemischt, bevor sich die Erythrozyten für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) absetzen konnten. Danach wurde der Überstand entfernt, auf Ficoll (1:1) (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden) geschichtet und für 30 Minuten bei RT bei 1200rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Thermo Scientific, Rockford, USA). Der Überstand wurde wiederum entfernt und das Pellet wurde in RPMI/10mM HEPES (Biochrom AG, Berlin) resuspendiert. Daraufhin wurde wieder für 10 Minuten bei RT bei 1000rpm zentrifugiert. Um die restlichen Erythrozyten zu lysieren, wurde das Pellet in 1 ml keimfreiem Wasser (ultrapur) resuspendiert und nach dem Hinzufügen von RPMI/10mM HEPES für 10 Minuten bei RT bei 1000rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet wieder in RPMI/10mM HEPES resuspendiert. Alle verwendeten und nicht gekennzeichneten Reagenzien stammten von Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

5.2 *In vitro* Präparation von humanen Thrombozyten

Für die Thrombozytenisolation wurde ein Acid-Citrat-Dextrose-Puffer (ACD-Puffer), bestehend aus 12,5 g Na₃-Citrat, 6,8 g Zitronensäure, 10 g Glucose und 500 ml Aqua dest. hergestellt und mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 4,69 eingestellt, sterilfiltriert und bei 4°C dunkel gelagert. Dadurch sollte eine Aktivierung der Thrombozyten verhindert werden.

Daraufhin wurde von gesunden humanen Spendern Blut in eine 20 ml Spritze, welche 4 ml ACD enthielt, abgenommen und in ein 15 ml Falconröhrchen (Polypropylen Conical Tube, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) überführt. Das Blut wurde dann für 20 Minuten bei RT bei 100rpm zentrifugiert, wobei als Überstand das plättchenreiche Plasma (PRP) entstand und dieses daraufhin mit einer Pasteurpipette (Sarstedt, Nümbrecht) vorsichtig in ein 50ml Falcon überführt wurde. 10 ml PRP wurden mit Tyrode's-Puffer pH 6,5 (Herstellung bereits 3.4 beschrieben) auf 35 ml aufgefüllt und anschließend bei 2100rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen und das Pellet in 500 μ l Tyrode's-Puffer pH 6,5 vorsichtig resuspendiert. Schließlich wurden 500 μ l Tyrode's-Puffer pH 7,4 dazugegeben, vermischt und die Thrombozytenzahl ermittelt. Daraufhin wurden 10^9 Plättchen mit 8 μ g/ml Kollagen und 0,1 U/ml Thrombin für 30 Minuten bei 37°C aktiviert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei 12600rpm zentrifugiert und der Überstand aufgefangen. Alle verwendeten und nicht gekennzeichneten Reagenzien stammten von Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

5.3 *In vitro* Versuche

Frisch isolierte humane neutrophile Granulozyten wurden in einer Dichte von 10^5 auf Poly-L-Lysin beschichteten FluoroDishes ausplattiert. Nach 30 Minuten Koinkubation mit Plättchen (5×10^5) zusammen mit 100 nM PMA (Phorbol-Myristate-Acetate) und 20 μ g/ml Aprotinin in HEPES Puffer, wurde FXII (100 nMol) für weitere 15 Minuten bei 37°C zusammen mit Zink hinzugefügt. Dann wurden die Zellen mit 4% PFA (Paraformaldehyd) fixiert und die DNA mit Sytox Green (SYTOX® Green Nucleic Acid Stain, Life Technologies, Invitrogen, Darmstadt) in einer Konzentration von 1 μ Mol gefärbt. Daraufhin wurden die unspezifischen Bindungen geblockt und FXII durch einen mouse anti-human FXII Antikörper (5 mg/ml, abcam, ab1007, Cambridge, United Kingdom) für eine Stunde gefärbt, gefolgt von einem sekundären Antikörper (anti-mouse Alexa 594, Invitrogen, Darmstadt) in einer Konzentration von 2 mg/ml in PBS für 30 Minuten. Alle verwendeten und nicht gekennzeichneten Reagenzien stammten von Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

6 Konfokale Mikroskopie

Durch die Nutzung eines konfokalen Mikroskops kann die Fluoreszenz außerhalb der Fokusebene deutlich vermindert werden. Durch die Einführung einer Lochblende in die Feldblende eines Mikroskops und einer Lochblende vor den Detektor, wird nur die

Fokusebene des Objektes scharf abgebildet und Signale außerhalb der Fokusebene ausgeblendet. Dabei werden Laser verschiedener Wellenlängen zur Fluoreszenzanregung in das Präparat fokussiert und mittels Scannerspiegel darüber geführt. Ein lichtempfindlicher Sensor detektiert die emittierte Fluoreszenz hinter der konfokalen Lochblende (Abb. 14). Durch diese punktförmige Abtastung des Präparates kann Punkt für Punkt ein zweidimensionales konfokales Fluoreszenzbild erzeugt werden⁹⁴. Diese Visualisierung wurde mit einem konfokalen Mikroskop (LSM 510 META, Zeiss, Jena) basierend auf einem angeschlossenen Mikroskop (Axiovert 200 MOT, Zeiss, Jena) erreicht. Eine 63x Vergrößerung wurde durch die Verwendung von Plan-Apochromat-Linsen (numerische Lochblende 1.4, Ölimmersion) erreicht. Die Bilderfassung wurde durch eine Software (LSM Browser, Zeiss, Jena) durchgeführt.

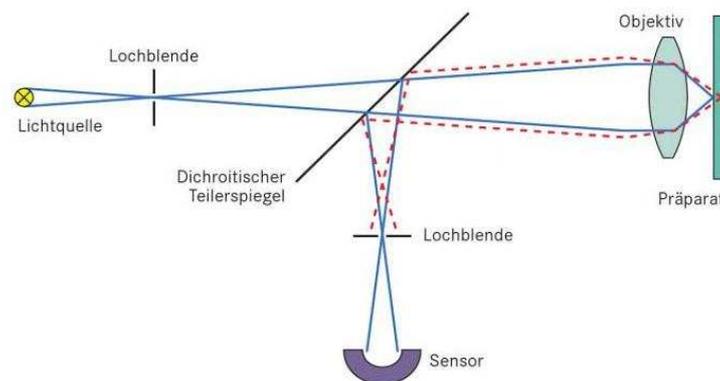


Abbildung 14: Konfokaler Strahlengang⁹⁴

7 Histologische Untersuchungen

48 Stunden nach Induktion der venösen Thrombose wurde der entnommene Thrombus histologisch und immunhistologisch untersucht, um die beteiligten Zelltypen und die genaue Zusammensetzung des Thrombus zu identifizieren.

7.1 Paraffinpräparate

7.1.1 Vorbereitung und Präparation

Für das Anfertigen von Paraffin-Schnitten, wurde das Material in eine verdünnte und phosphatgepufferte Formaldehyd-Lösung (Formaldehyd, 4 %, Thermo Scientific, Rockford, USA) eingelegt und somit fixiert. Nach mindestens 24 Stunden wurden die Thromben 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen und dann in 70%iges Ethanol überführt. Die nun fixierten Thromben wurden mit Hilfe eines Einbettautomats (STP-120, Microm, Walldorf) vollautomatisch entwässert und mit Paraffin (Type 9, Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, USA) getränkt. Mit Hilfe einer Ausgießstation (AP 280-2, Microm, Walldorf) wurden die Thromben waagrecht für Längsschnitte in Paraffin eingebettet. Mit einer Kälteplatte (Tissue Cool Plate COP20, Medite, Burgdorf) wurde das Paraffin schnell abgekühlt und das Präparat konnte daraufhin leicht aus der Ausgießwanne entfernt werden.

Zur Anfertigung der 5 µm dicken Schnitte wurde ein Rotationsmikrotom (HM 340 E, Microm, Walldorf) verwendet. Nach dem Anfertigen von fünf seriellen Schnitten, wurden diese mit einem Pinsel angehoben und in ein 42°C warmes Streckbad (HI 1210, Leica, Nussloch) überführt, um die Schnitte von Falten zu befreien. Anschließend wurden die Schnitte auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Menzel, Braunschweig) aufgebracht und zum Trocknen in einen 37°C warmen Trockenschrank gelegt, um eine bessere Haftung der Schnitte zu gewährleisten.

7.1.2 Carstairs Färbung

Um das entstandene Fibrin in den Thromben darstellen und quantifizieren zu können, wurde auf die Carstairs Färbung zurückgegriffen. Hierbei stellen sich Plättchen blau, Erythrozyten gelb, Fibrin orange bis rot, Muskulatur rot und Kollagen hellblau dar. Färbezubehör und -protokoll wurden von der Firma Electron Microscopy Sciences (EMS, Hatfield, Pennsylvania, USA) bezogen und modifiziert¹¹⁰.

Die Paraffinschnitte wurden in einem Methanol-/Eisessiggemisch im Verhältnis 3:1 rehydriert und anschließend 3 Minuten mit zweifach destilliertem Wasser (Aqua bidest.) gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte für 5 Minuten in Eisenammoniumsulfat getaucht und 3 Minuten unter fließendem Aqua bidest. gewaschen. Dann ließ man für 5 Minuten Mayers

Hämatoxylin einwirken, welches anschließend 10 Minuten unter fließendem Aqua bidest. abgewaschen wurde. Nach einer Einwirkungszeit von 45 Minuten, wurde die Picrinsäure-Orange G-Lösung einmal mit Aqua bidest. abgewaschen. Als nächsten Schritt wurden die Schnitte für 3 Minuten in Ponceau-Säurefuchsin-Lösung getaucht und danach 3 Minuten unter fließendem Aqua bidest. gewaschen. Phosphorwolframsäure 1% wurde 4 Minuten auf die Schnitte aufgebracht und anschließend mit Aqua bidest. abgewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte für 10 Minuten in Anilinblau-Lösung getaucht, anschließend gewaschen und abschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Am Ende der Färbung wurden die Schnitte getrocknet und mit Hilfe eines Eindeckmediums (Pertex, medite, Burgdorf) eingedeckt.

7.2 Immunhistologie

Mit Hilfe der Immunhistologie wurden in Zellen und Geweben definierte Makromoleküle im Fluoreszenz-Mikroskop dargestellt. Gezielt erzeugte Antikörper, welche für antigene Epitope der Makromoleküle spezifisch sind, binden an diese und markieren somit die Makromoleküle spezifisch.

Bei der indirekten Immunmarkierung ist nicht der Primärantikörper, sondern der Sekundärantikörper, welcher an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet, markiert. Das hat den Vorteil einer Signalverstärkung, da mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können⁹⁴ (Abb. 15).

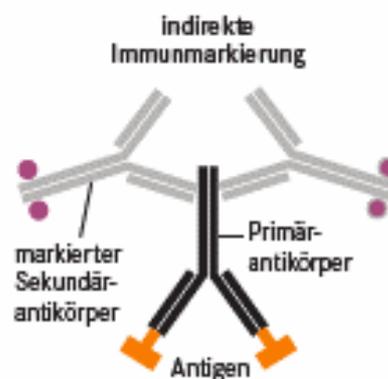


Abbildung 15: Indirekte Immunmarkierung, modifiziert nach Mulisch et al.⁹⁴

Primärantikörper, welcher an das Antigen bindet, wird von markierten Sekundärantikörpern gebunden.

7.2.1 Vorbereitung und Präparation

Für immunhistologische Untersuchungen wurde die V. cava caudalis in ein Schlauchstück mit Einbettmedium (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura, Alphen aan den Rijn, NL) gelegt und bei -80°C gefrierkonserviert. Die eingefrorenen Thromben wurden in einem Kryostat (CM 1850, Leica, Nussloch) mit Hilfe von Tissue-Tek bei -25°C auf vorgekühlte Stempel fixiert. Es wurden $5\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte in fünfer Serien geschnitten und auf beschichtete Objektträger übertragen. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Objektträger im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

7.2.2 Immunhistologische Färbungen

Die Objektträger wurden in eine lichtundurchlässige Färbekammer gelegt, welche mit Wasser gefüllt war, damit die Schnitte nicht austrocknen konnten. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako, Hamburg) umfahren, um die aufgetragenen Lösungen auf dem Präparat zu halten.

Alle Färbungen wurden nach einem Standardfärbeprotokoll⁹⁴ durchgeführt:

Die Präparate wurden für 3 Minuten in 4% Formalin (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) in Aqua dest. bei Raumtemperatur fixiert und daraufhin dreimal mit PBS (Invitrogen, Darmstadt) + 0,1% Tween (Tween 20, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gewaschen. Zur Blockierung der unspezifischen Bindungen am Fc-Rezeptor wurde ein anti-mouse CD16/32 Antikörper (affinity purified rat anti-mouse CD16/32, Clone 93, eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA) in einer Verdünnung von 1:200 ,gemeinsam mit 3% BSA (Bovine Serum Albumin, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) in PBS, für 30 Minuten auf die Präparate gegeben. Die Blockierlösung wurde nur abgeklopft. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tab. 2) für eine Stunde. Ein identischer Antikörper (gleiche IgG-Klasse), der gegen ein irrelevantes Antigen gerichtet war, diente als Isotypkontrolle. Nach der Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern wurde wiederum mit PBS + 0,1% Tween gewaschen. Als Sekundärantikörper wurden Alexa 488 (grün) und Alexa 594 (rot) fluoreszierende Antikörper aus verschiedenen Spezies ebenfalls eine Stunde verwendet (Tab. 3). DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen, Darmstadt) wurde daraufhin zur Darstellung der Zellkerne in einer Verdünnung von 1:3000 für 30 Sekunden eingesetzt und weist mit einem Emissionsmaximum von 461 nm eine blaue Fluoreszenz auf.

Nach erneutem Waschen wurden ein oder zwei Tropfen Eindeckmedium (Mounting Medium, DAKO, Hamburg) auf die Objektträger mit den gefärbten Gewebeschnitten aufgebracht und ein Deckglas darübergelegt, sodass sich das Medium gleichmäßig über die Probe verteilen konnte. Abschließend wurden die Präparate digital am Mikroskop (Leica DMRB, Firma Leica, Bensheim, Deutschland) mit einer Kamera fotografiert (AxioCam, Firma Zeiss, Göttingen, Deutschland).

Bei der CD41, Histon H3 und der anti-PDI (Protein Disulfid-Isomerase) Färbung wurden die Zellen vor dem Blocken noch mit Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) permeabilisiert und dann gewaschen.

Im Unterschied zum Standardprotokoll wurde bei der Histon H3-Färbung nur mit einem Goat Serum (Invitrogen, Darmstadt) 1:3 (verdünnt in PBS) geblockt und die Inkubation des Primärantikörpers fand bei 4°C über Nacht statt.

Bei der Fibrinogen-Färbung wurde nur mit 2% Glycin (Roth, Karlsruhe) und Fc-Block (1:200) geblockt.

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Konzentration	verwendete Verdünnung	Primär-Antikörper	Klon	Hersteller
CD 41	0,2 mg/ml	1:25	Rat	MWReg30	BD Pharmingen
Ly-6G	0,2 mg/ml	1:500	rat	1A8	BD Pharmingen
NE	1 mg/ml	1:200	rabbit	ab68672	Abcam
MPO	3,2 mg/ml	1:500	rabbit	A0398	Dako
Histon H3	1 mg/ml	1:200	rabbit	ab1791	Abcam
antihiston H2A/H2B/DNA Komplex	1 mg/ml	1:400	mouse	Losman M., J Immunol 1992	
Tissue Faktor	1 mg/ml	1:100	rabbit		american diagnostica
anti-PDI	1 mg/ml	1:200	mouse	RL90	Thermo scientific
Fibrinogen	6 mg/ml	1:300	rabbit	A0080	DAKO

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper

Antigen	Konzentration	verwendete Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Hersteller
CD 41	2 mg/ml	1:200	donkey anti-rat Alexa 594	Invitrogen
Ly-6G	2 mg/ml	1:200	donkey anti-rat Alexa 594	Invitrogen
NE	2 mg/ml	1:200	goat anti-rabbit Alexa 594	Invitrogen
MPO	2 mg/ml	1:200	donkey anti-rabbit Alexa 488	Invitrogen
Histon H3	2 mg/ml	1:200	goat anti-rabbit Alexa 594	Invitrogen
antihiston H2A/H2B/DNA Komplex	2 mg/ml	1:200	goat anti-mouse Alexa 594	Invitrogen
Tissue Faktor	2 mg/ml	1:200	donkey anti-rabbit Alexa 594	Invitrogen
anti-PDI	2 mg/ml	1:200	goat anti-mouse Alexa 594	Invitrogen
Fibrinogen	2 mg/ml	1:200	donkey anti-rabbit Alexa 594	Invitrogen

8 Versuchsplanung und -durchführung

8.1 Tierzahlen

Insgesamt wurden 91 Tiere, in einem Alter von 7 bis 19 Wochen, verwendet.

Ausgewertet wurden nur Tiere, bei denen keine intraoperativen Blutungen aufgetreten waren.

8.2 Versuchsgruppen

Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose (Blutbilder, Thrombusgewicht):

Tabelle 4: Versuchsgruppen für die Depletion der neutrophilen Granulozyten

	Stamm	Anzahl	Alter	Gewicht
Isotypkontrolle	C57BL/6J	6	8 Wo	19,0-20,2g
anti-Ly-6G (1A8)	C57BL/6J	6	7-8 Wo	17,1-22,2g

Intravitalmikroskopische Darstellung der Leukozytenrekrutierung:

Tabelle 5: Versuchsgruppen für die Depletion der neutrophilen Granulozyten für die IVM

	Stamm	Anzahl	Alter	Gewicht
Isotyp	LysM-eGFP	1	10 Wo	26,6g
anti-Ly-6G	LysM-eGFP	1	11 Wo	21,3g

Rolle von NETs bei der Entstehung der venösen Thrombose (Thrombusgewicht):

Tabelle 6: Versuchsgruppen für die DNase-Behandlung

	Stamm	Anzahl	Alter	Gewicht
Vehikel	C57BL/6J	14	7-12 Wo	19,3-27,2g
DNase	C57BL/6J	6	9-11 Wo	19,4-25,4g

Visualisierung der NETs (2-Photonen-Mikroskopie):

Tabelle 7: Versuchsgruppen für die 2-Photonen-Mikroskopie

	Stamm	Anzahl	Alter	Gewicht
Hoechst	C57BL/6J	1	8 Wo	18,8g
Sytox orange + FITC anti-Ly-6G	C57BL/6J	1	8 Wo	22,2g

Rolle von Enoxaparin bei der Entstehung der venösen Thrombose (Thrombusgewicht):

Tabelle 8: Versuchsgruppen für die Enoxaparin-Behandlung

	Stamm	Anzahl	Alter	Gewicht
Vehikel	C57BL/6J	6	9-10 Wo	20,7-25,1g
Enoxaparin	C57BL/6J	5	11 Wo	18,5-28,1g

Rolle des GPIIb α -Rezeptors bei der Entstehung der venösen Thrombose (IVM, Thrombusgewicht):

Tabelle 9: Versuchsgruppen für Leukozyten- und Plättchenrekrutierung

	Stamm	Anzahl	Alter	Gewicht
WT	C57BL/6J	8	8-12 Wo	17,8-28,6g
Knockout	GPIIb α ^{-/-}	5	7-19 Wo	18,0-30,0g

Rolle des intrinsischen Gerinnungssystems bei der Entstehung der venösen Thrombose (Thrombusgewicht):

Tabelle 10: Versuchsgruppen für die Rolle des intrinsischen Gerinnungssystems

	Stamm	Anzahl	Alter	Gewicht
WT	C57BL/6J	10	7-12 Wo	17,0-26,2g
Knockout	FXII ^{-/-}	7	9-12 Wo	20,3-27,6g
PCK	C57BL/6J	7	8-9 Wo	18,9-21,3g
Knockout	FXI ^{-/-}	7	7-16 Wo	21,3-27,2g

9 Statistik

Mit Hilfe des Softwareprogramms SigmaPlot 11.0 (Systat, Erkrath) erfolgte die statistische Versuchsauswertung. Die Darstellung der Thrombusgewichte erfolgte durch Einzelwerte (dot plots) der verwendeten Tiere und dem Median-Wert. Der Vergleich dieser Thrombusgewichte erfolgte aufgrund der nicht normalverteilten Werte durch den Mann-Whitney-U-Test. Die statistische Signifikanz wurde für einen p-Wert $< 0,05$ angenommen. Darüber hinaus wurden die Tiere mit entwickeltem Thrombus und die Tiere, welche keinen Thrombus bildeten, mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher verglichen.

Die Darstellung der NETs-Quantifizierung, der Adhäsion und Koloalisation von Plättchen und Leukozyten und der Fibrinfläche erfolgte durch Säulendiagramme nach Ermittlung des Mittelwertes pro Versuchsgruppe mit Angabe des SEM. Der Vergleich dieser Versuche erfolgte durch den T-Test für unabhängige Stichproben nach Ermittlung der Mittelwerte pro Tier. Die statistische Signifikanz wurde für einen p-Wert $< 0,05$ angenommen.

Auch die Darstellung der Thrombusgewichte von WT, FXII^{-/-}, FXI^{-/-} und der mit FXII-Inhibitor behandelten Tieren erfolgte wie bereits beschrieben. Die Versuchsgruppen wurden jeweils durch den Mann-Whitney-U-Test mit dem Wildtyp-Stamm verglichen. Daraufhin wurde eine Bonferoni-Adjustierung mit $n=3$ durchgeführt ($0,05/3 = 0,017$), sodass für einen p-Wert $< 0,017$ eine statistische Signifikanz angenommen wurde.

V Ergebnisse

1 Makroskopische und mikroskopische Untersuchungen der venösen Thromben

48 Stunden nach Induktion der Flussverlangsamung wurden die Thromben entnommen und weitergehend untersucht. Makroskopisch war die charakteristisch geschichtete Morphologie des Thrombus gut zu erkennen, mit einem größeren Anteil an rotem Thrombus und einem kleineren Anteil an weißem Thrombus (Abb. 16 a).

Mikroskopisch war im längs geschnittenen Thrombus, durch eine Zellkernfärbung mittels DAPI, eine Vielzahl von kernhaltigen Zellen zu finden, welche entweder in Gruppen angehäuft waren oder sich als Schichten am intakten Endothel anlagerten (Abb.: 16 b).

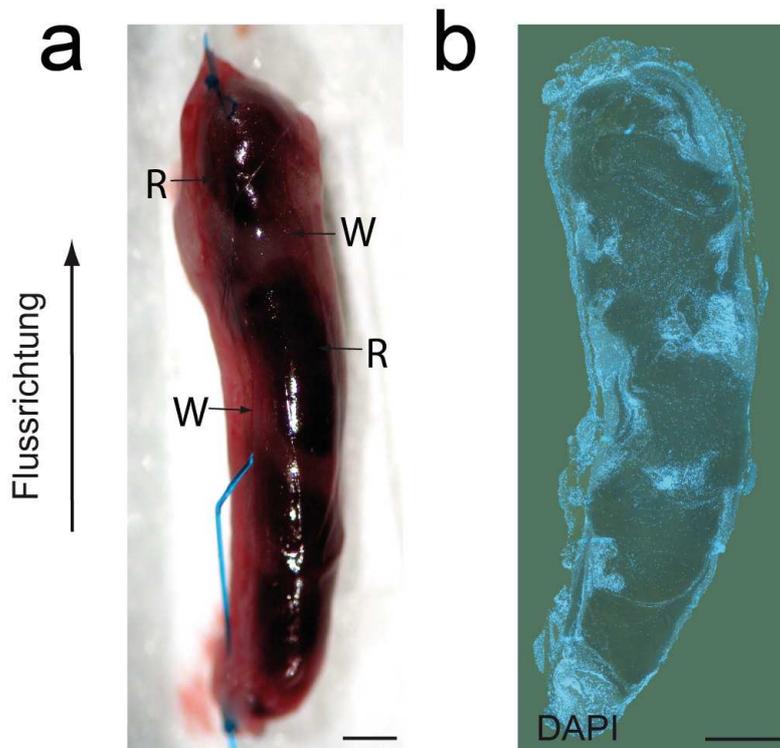


Abbildung 16: Makroskopische und mikroskopische Untersuchung des venösen Thrombus

a) Makroskopische Sicht auf einen entnommenen Thrombus eines C57BL/6J-Tieres 48 Stunden nach Flussverlangsamung (R = roter Thrombusanteil, W = weißer Thrombusanteil). Maßstab = 1 mm.

b) Mikroskopische Sicht auf einen immunhistologisch gefärbten Längsschnitt eines entnommenen Thrombus eines C57BL/6J-Tieres 48h nach Flussverlangsamung. Durch die DAPI-Färbung lässt sich die Verteilung der Leukozyten veranschaulichen. Maßstab = 1 mm.

Um zu verifizieren, welche Zellen an der Entstehung der venösen Thrombose beteiligt sind, wurden Thrombusquerschnitte 48 Stunden nach Flussverlangsamung auf leukozyten-spezifische Marker gefärbt, wobei DAPI immer als Kernfärbung verwendet wurde (Abb. 17). Dabei zeigte sich durch die Ly-6G-Färbung, dass neutrophile Granulozyten den Hauptteil der Leukozytenpopulation darstellt. Als weitere Marker neutrophiler Granulozyten wurden die Schnitte auf Granula-Bestandteile, wie Neutrophile Elastase und Myeloperoxidase, gefärbt.

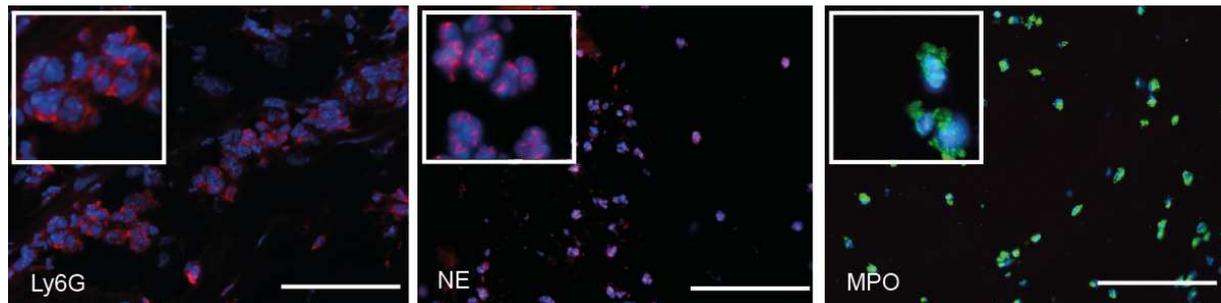


Abbildung 17: Leukozyten Rekrutierung 48h nach Flussverlangsamung

Immunhistologische Schnitte eines entnommenen Thrombus eines C57BL/6J-Tieres. Neutrophile Granulozyten stellen sich durch die Ly-6G-Färbung und die Neutrophile Elastase-Färbung rot und durch die Myeloperoxidase-Färbung grün dar. DAPI dient als Kernfarbstoff. Maßstab = 50 μ m.

Anschließend wurden die molekularen Faktoren untersucht, welche die Akkumulation von Leukozyten während der Entwicklung der TVT vermitteln. Dafür wurde in histologischen Schnitten der V. cava caudalis, welche 48 h nach Flussreduktion entnommen wurde, das Endothel auf Adhäsionsmoleküle gefärbt, an welche Leukozyten spezifisch binden können. Dabei zeigte sich, dass das Endothel P-Selektin exprimiert (Abb. 18). Dies zeigt, dass es als Reaktion auf einen verlangsamten Blutfluss zu einer Aktivierung des intakten Endothels kommt. Dies hat die Exposition von Adhäsionsmolekülen auf den Oberflächen des Endothels zur Folge, was wiederum ausreichend ist, um die Leukozytenrekrutierung und somit die TVT-Bildung zu initiieren.

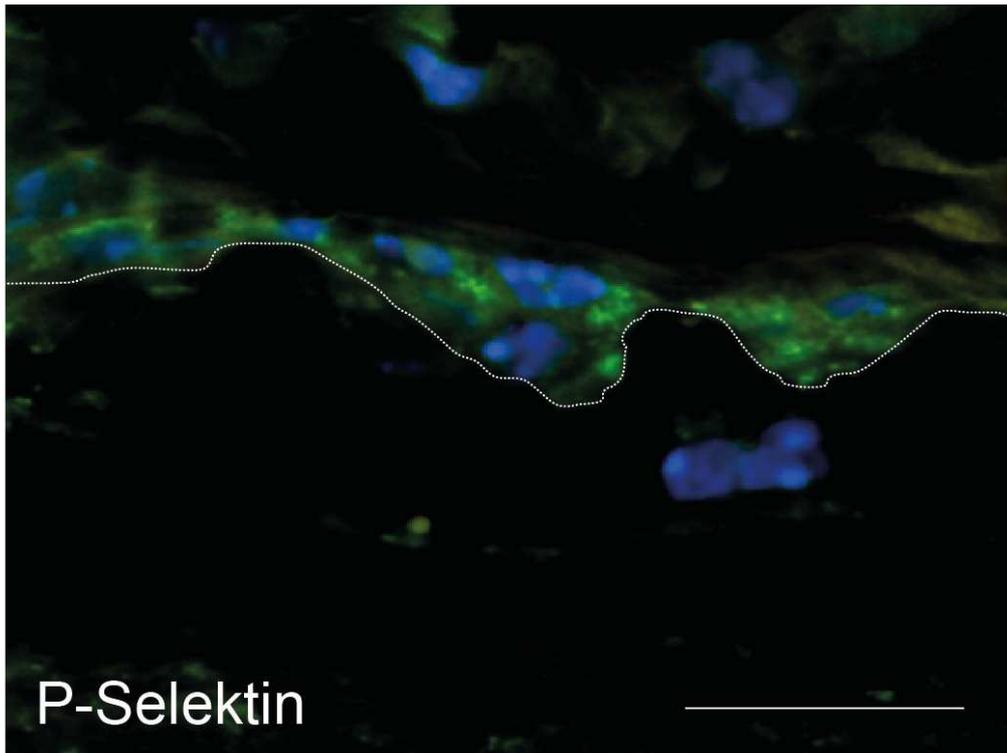


Abbildung 18: P-Selektin Expression des Endothels

Durch eine immunhistologische P-Selektin-Färbung stellt sich das Endothel grün dar. Zellkernfärbung durch DAPI. Maßstab = 50µm.

2 Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose

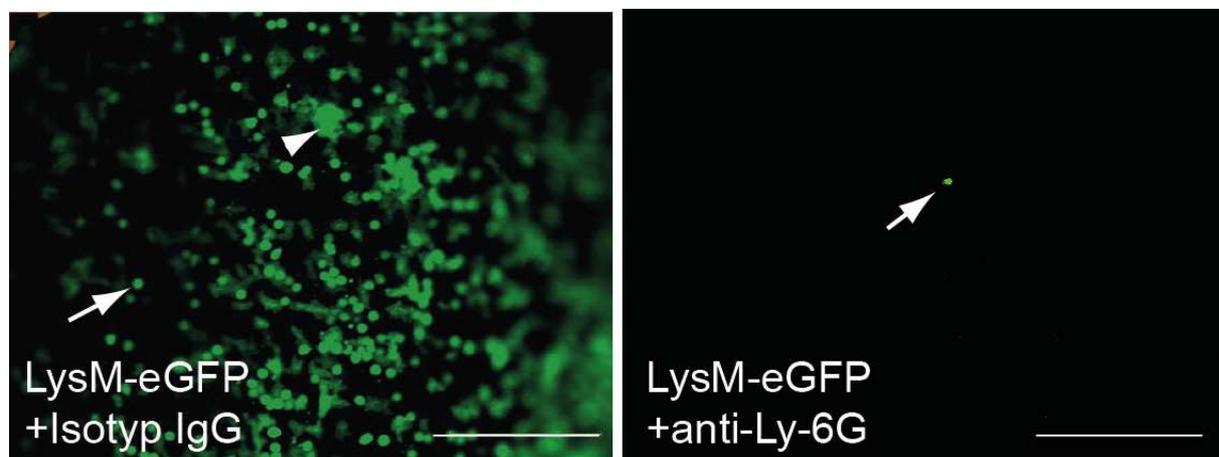
Angesichts der Häufigkeit, mit welcher Leukozyten in der V. cava caudalis rekrutiert werden, wurde der Beitrag der neutrophilen Granulozyten zur Entwicklung der TVT näher untersucht. Dafür wurden bei sechs C57BL/6J-Tieren die neutrophilen Granulozyten durch eine wiederholte i.v. Injektion eines anti-Ly-6G Antikörpers depletiert und die Flussverlangsamung wie oben beschrieben induziert. Als Kontrollgruppe wurden ebenfalls sechs C57BL/6J-Tiere mit einem entsprechenden Isotyp-Antikörper behandelt. Um die Depletion über den Versuchszeitraum zu überprüfen, wurde das Blut 48 Stunden nach Depletion untersucht. Dies zeigte, dass die Anzahl der im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe auf ca. 7% reduziert war (Tab. 11).

Tabelle 11: Blutbild von Kontrollmäusen und neutropenen Mäusen

	Total	Neutrophile	Monozyten	Lymphozyten
Kontrolle	9,41 ± 0,81	1,03 ± 0,15	0,22 ± 0,07	7,85 ± 0,66
anti-Ly-6G	4,78 ± 0,21	0,07 ± 0,01	0,23 ± 0,04	4,46 ± 0,21

Blutbild von C57BL/6J-Kontrollmäusen und Blutbild von C57BL/6J-Mäusen nach der Depletion der neutrophilen Granulozyten (je n=6).

Die Depletion der neutrophilen Granulozyten wurde auch mittels Intravitalmikroskopie überprüft. Unter Verwendung von LysM-eGFP-Mäusen, bei denen die Granulozyten gentechnisch markiert sind und somit grün fluoreszieren, wurde die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an das Endothel der V. cava caudalis sechs Stunden nach TVT-Induktion untersucht (Abb. 19). Während sich bei den Kontrolltieren, welche mit einem Kontrollantikörper behandelt wurden, eine massive Leukozytenakkumulation zeigte, blieb bei den depletierten Tieren die Rekrutierung dieser Leukozyten aus.

**Abbildung 19: Leukozytenakkumulation in vivo 6h nach Flussverlangsamung in der V. cava caudalis**

Leukozytenakkumulation von LysM-eGFP-Mäusen, behandelt mit einem Kontroll-Antikörper (links) oder mit dem anti-Ly-6G Antikörper, um die neutrophilen Granulozyten zu depletieren. Pfeilspitze: aggregierte neutrophile Granulozyten; Pfeil: einzelne, adhärenente Zellen. Maßstab = 100 µm.

Bei der Analyse des Thrombusgewichts zeigte sich, dass die Depletion der neutrophilen Granulozyten die Thrombusbildung signifikant verminderte ($p=0.041$) im Vergleich zur Isotyp-behandelten Kontrollgruppe (Abb. 20). 6 von 6 Mäusen aus der Kontrollgruppe entwickelten einen Thrombus, wohingegen aufgrund der Depletion durch den anti-Ly-6G-Antikörper in der behandelten Gruppe nur bei 2 von 6 Tieren eine Thrombusbildung stattfinden konnte. Diese Häufigkeiten wurden mittels des exakten Tests nach Fisher verglichen ($p=0,0303$).

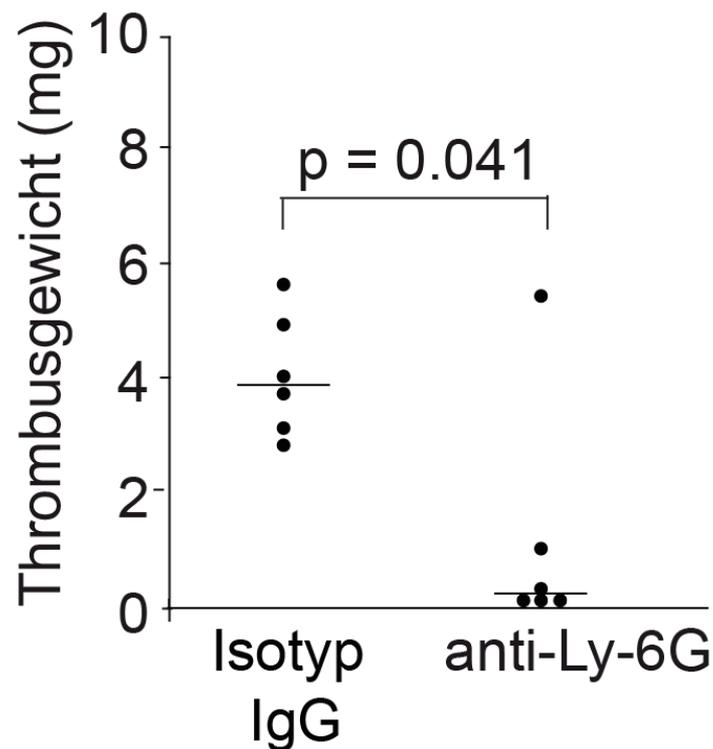


Abbildung 20: Thrombusgewicht bei anti-Ly-6G behandelten Mäusen im Vergleich zu Isotyp IgG behandelten Mäusen

Thrombusgewicht 48h nach Flussverlangsamung in Kontrollmäusen (Isotypkontrollantikörper) und anti-Ly-6G behandelten C57BL/6J-Mäusen ($n=6$ pro Gruppe). Querbalken $\hat{=}$ Median-Wert.

3 Rolle von NETs bei der Entstehung der venösen Thrombose

Da die oben aufgeführten Versuche zeigten, dass neutrophile Granulozyten an der Entstehung der venösen Thrombose beteiligt sind, wurde nun genauer untersucht, welche Faktoren und Mechanismen hierfür verantwortlich sind. Durch die i.v. Injektion von Sytox green, welches mit hoher Affinität Nukleinsäuren bindet, wurde das Vorhandensein von NETs *in vivo*

überprüft. Drei Stunden nach Induktion der Flussverlangsamung wurden mittels Intravitalmikroskopie große Mengen intravaskuläre, extrazelluläre DNA gefunden, welche die typische NETs Morphologie zeigte (Abb. 21 a). Daraufhin wurden Thromben mit Sytox green immunhistologisch gefärbt, die 48 Stunden nach Induktion der Flussverlangsamung entnommen wurden. Der Befund einer extrazellulären DNA konnte somit auch immunhistologisch bestätigt werden und zeigte zudem dieselbe NETs Morphologie (Abb. 21 b). Um eine dreidimensionale Visualisierung der NETs durch die 2-Photonen-Mikroskopie zu erreichen, wurde ein 20 µm dicker Kryoschnitt eines Thrombusquerschnittes mit Hoechst gefärbt. Er zeigte anschaulich den rundlichen Teil des ursprünglichen Granulozyten und den extrazellulären schweiffförmigen NET-Anteil (Abb. 21 c). Darüber hinaus, konnte zudem mit Hilfe der 2-Photonen-Intravitalmikroskopie visualisiert werden, wie die NETs aus den Ursprungs-Granulozyten freigesetzt werden. Mit Hilfe eines i.v. injizierten FITC markierten anti-Ly-6G Antikörpers wurden die neutrophilen Granulozyten in grün dargestellt. Der DNA-Anteil der NETs wurde mittels Sytox orange in orangerot visualisiert. Die Venenwand wurde durch das second harmonic Signal blau dargestellt. Vier Stunden nach Induktion der Flussverlangsamung hefteten sich Ly-6G-positive neutrophile Granulozyten an die Venenwand an und entließen Sytox orange positive NETs-Strukturen in das Lumen der V. cava caudalis. Einige neutrophile Granulozyten, welche erst im Initialstadium der Netose waren und ihre DNA noch nicht in den extrazellulären Raum abgegeben hatten, zeigten zudem Sytox orange positive Kerne (Abb. 21 d). Somit konnte gezeigt werden, dass diese NETs-Strukturen aus den neutrophilen Granulozyten abgegeben werden.

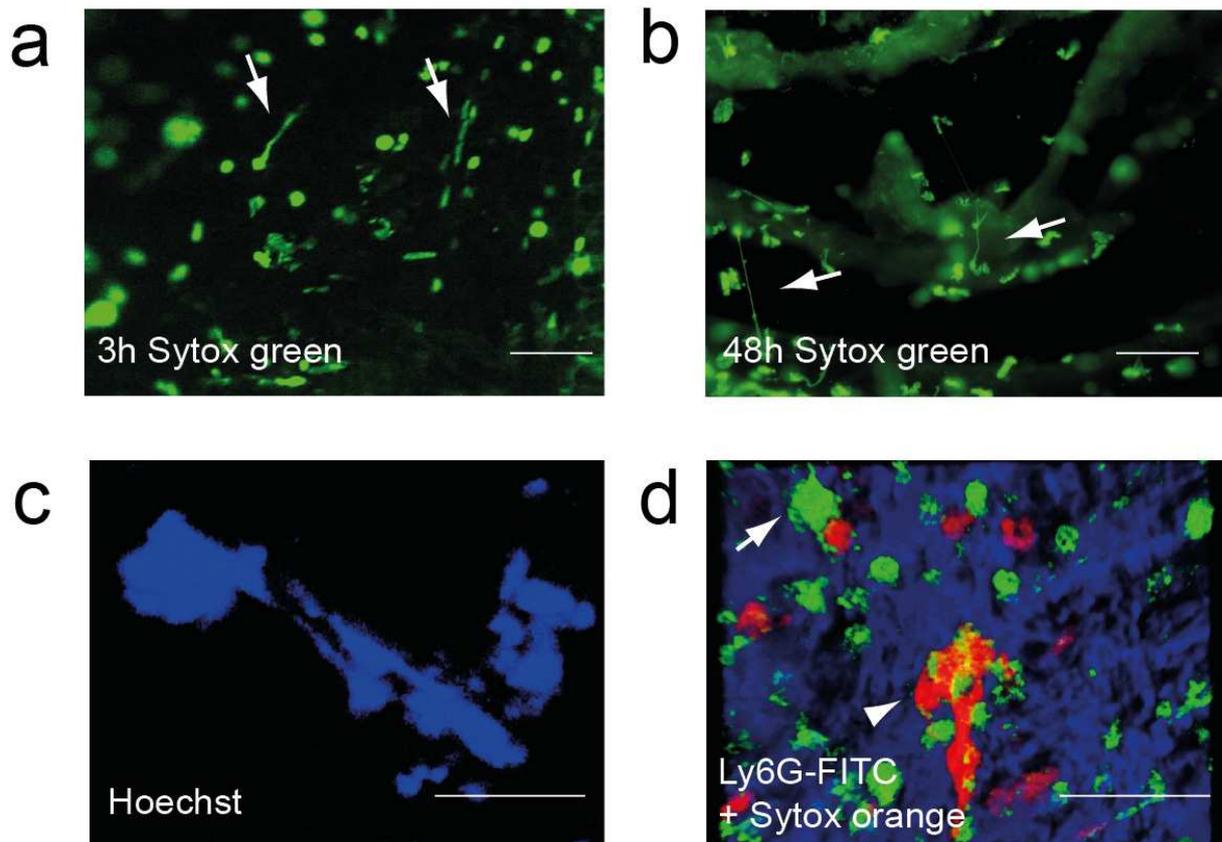


Abbildung 21: Visualisierung von NETs

a) Repräsentatives (n=3) intravitalmikroskopisches Bild 3h nach Flussverlangsamung demonstriert NETs (Sytox green) in der V. cava caudalis (Pfeile = netzartige Strukturen). Maßstab = 50 μ m.

b) Immunhistologische Darstellung von NETs (Sytox green) 48h nach Flussverlangsamung (Pfeile = netzartige Strukturen). Maßstab = 50 μ m.

c) Charakteristisches Bild eines Querschnittes eines WT Thrombus. Aufgenommen mit dem 2-Photonen-Mikroskop, um die dreidimensionale Struktur von NETs (blau; gefärbt mit Hoechst) darzustellen. Maßstab = 25 μ m.

d) Visualisierung von neutrophilen Granulozyten (FITC anti-Ly-6G-Antikörper, grün), welche an die Venenwand (second harmonic signal, blau) angeheftet sind und NETs (Sytox orange, orangerot) entlassen (Pfeil = neutrophiler Granulozyt, Pfeilspitze = extrazelluläre DNA), durch *in vivo* 2-Photonen-Mikroskopie 6 h nach Flussverlangsamung. Maßstab = 50 μ m.

Mit Hilfe spezifischer immunhistologischer Färbungen wurde Hoechst positive extrazelluläre DNA in direkter Nachbarschaft zu neutrophilen Granulozyten gefunden und positiv auf die neutrophilen Granulaproteine Neutrophile Elastase (Abb. 22 a) und Myeloperoxidase (Abb. 22 b), sowie auf die Kernhistone H2A-H2B (Abb. 22 c) und H3 (Abb. 22 d) gefärbt, womit bestätigt wurde, dass diese Strukturen NETs darstellen.

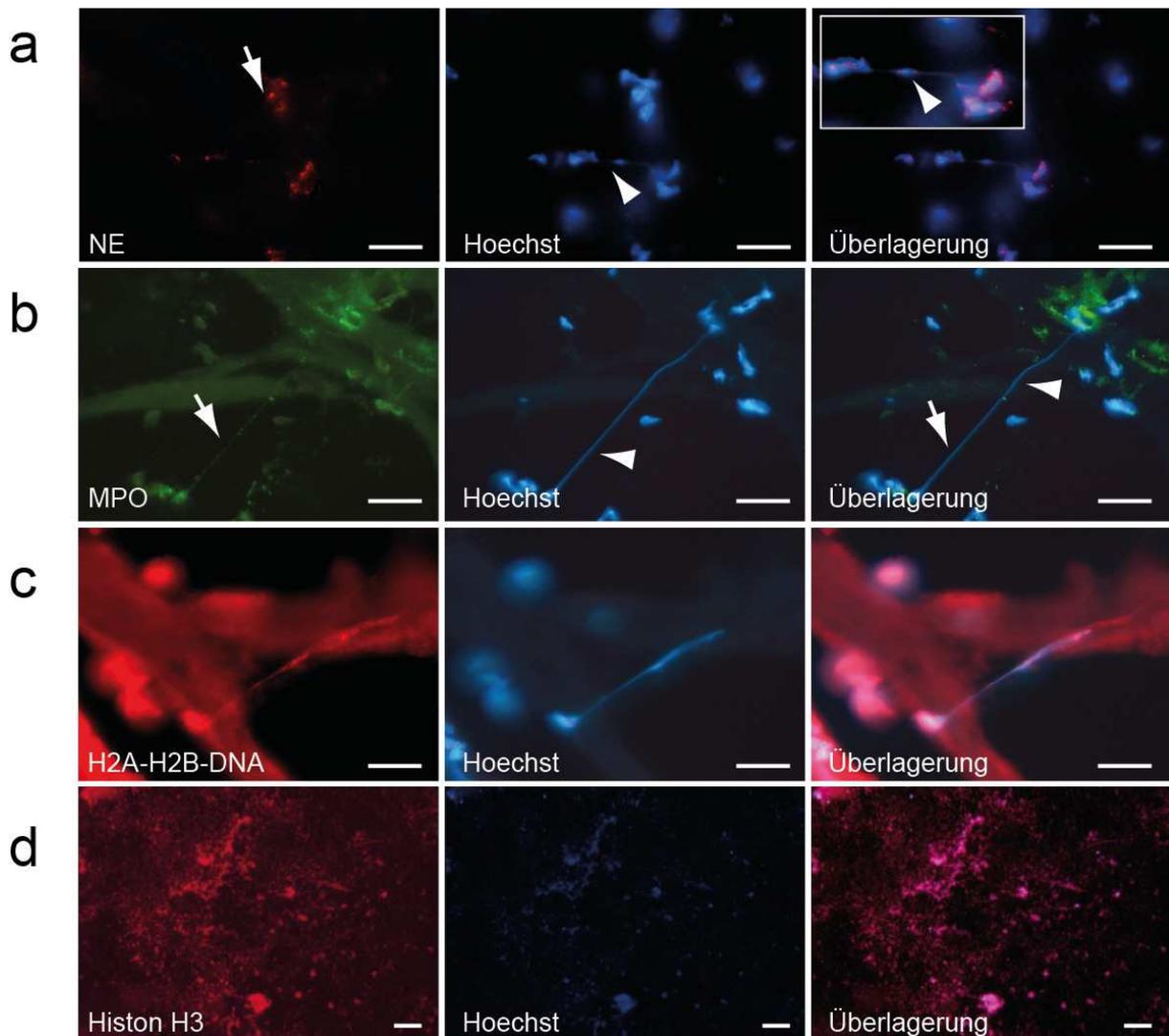


Abbildung 22: Immunhistologische Visualisierung von NETs

Färbung für DNA (Hoechst) und Neutrophile Elastase (a), Myeloperoxidase (b), Kernhistone H2A-H2B-DNA (c) und H3 (d) in WT Mäusen 48h nach Flussverlangsamung in der V. cava caudalis. Maßstab = 10 μm .

In einem weiteren Schritt wurde die Anzahl der NETs/ mm^2 im Querschnitt von Thromben, die 48 Stunden nach Induktion der Flussverlangsamung entnommen wurden, bestimmt (Abb. 23). In neutropenen Mäusen, bei denen nur noch 7% der physiologischen Neutrophilenpopulation vorhanden war, wurden nahezu keine NETs gefunden. Dies stand im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit 217 NETs/ mm^2 . Dies bestätigte, dass neutrophile Granulozyten während der TVT Entwicklung den Ursprung für die NETs-Freisetzung darstellen.

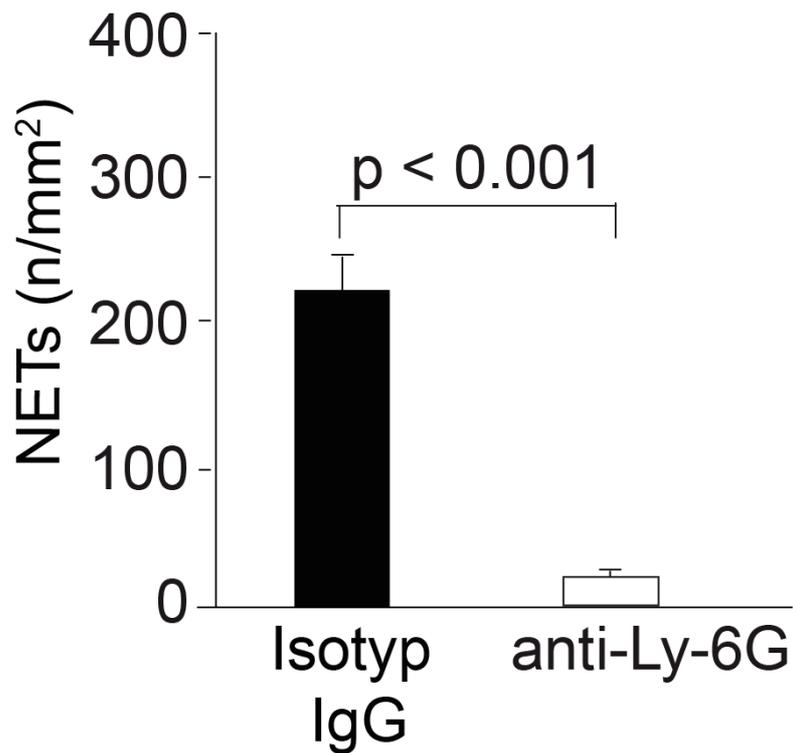


Abbildung 23: Quantifizierung der Anzahl von NETs/mm² in neutropenen Mäusen und Kontrollmäusen
Neutropene Mäuse (anti-Ly-6G Antikörper) und Kontrollmäuse (Isotypkontrollantikörper) 48h nach Flussverlangsamung (n=3 pro Gruppe). Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

Um die funktionelle Bedeutung der NETs bei der Entstehung der TVT zu untersuchen, wurden verschiedene Immunhistologien durchgeführt. Da sich um die NETs ein dichtes Netzwerk von Fibrin/Fibrinogen bildete (Abb. 24 a), wurde weitergehend analysiert, ob NETs prothrombotische Faktoren auf ihrer Oberfläche konzentrieren können. In der Tat wurden auf den NETs Tissue Faktor (TF) (Abb. 24 b) und dessen Aktivierungsenzym, die Protein Disulfid Isomerase (PDI) (Abb. 24 c), entdeckt. Daher scheint es plausibel, dass NETs bei der venösen Thrombose als prothrombotische Oberflächen agieren können.

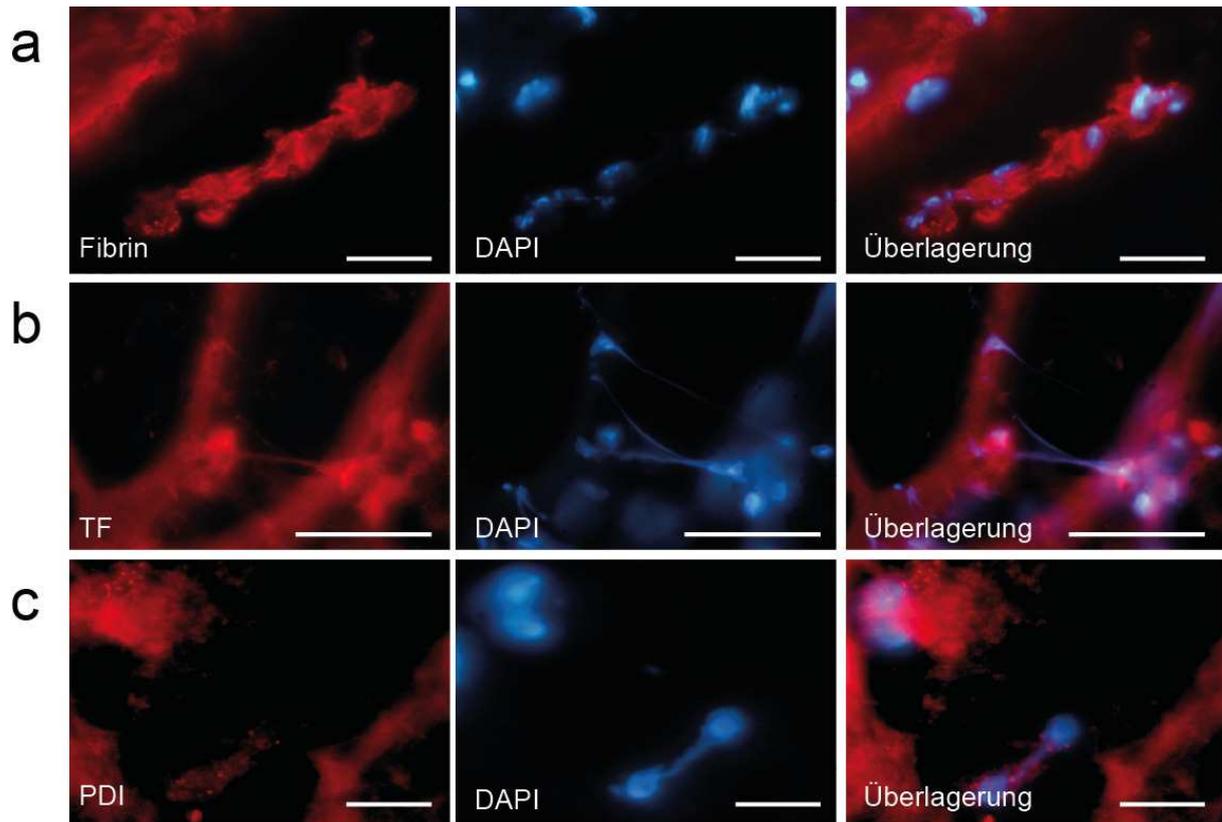


Abbildung 24: Immunhistologische Visualisierung von NETs und prothrombotischen Faktoren

Immunhistologische Färbungen für Fibrin (**a**), Tissue Faktor (**b**) und für die Protein Disulfid Isomerase (**c**) belegen, dass es auf der NETs Oberfläche zu einer Konzentration von prothrombotischen Faktoren kommt. Hoechst färbt die DNA blau an. Maßstab = 10 µm.

Um dies zu beweisen, wurde die funktionelle Relevanz der NETs für die TVT Bildung genauer untersucht. Durch die i.v. Injektion von *DNase* wurde das Grundgerüst der NETs zerstört und somit konnten im Vergleich zu Kontrolltieren keine NETs in Thrombusquerschnitten der *DNase* behandelten Tieren nachgewiesen werden (Abb. 25 a). Zudem wurde die Entwicklung der TVT in *DNase* behandelten Tieren stark unterdrückt, sodass das Thrombusgewicht 48 Stunden nach Flussreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert war ($p=0,015$) (Abb. 25 b). 14 von 14 Kontrolltieren entwickelten einen Thrombus; im Gegensatz dazu konnte durch die *DNase* Verabreichung nur bei 1 von 6 Tieren eine Thrombusbildung stattfinden. Diese Häufigkeiten wurden mittels des exakten Tests nach Fisher verglichen ($p<0,01$).

Die quantitative Auswertung der NETs ergab eine signifikante Reduktion der NETs/mm² bei DNase behandelten Mäusen (Abb. 25 c).

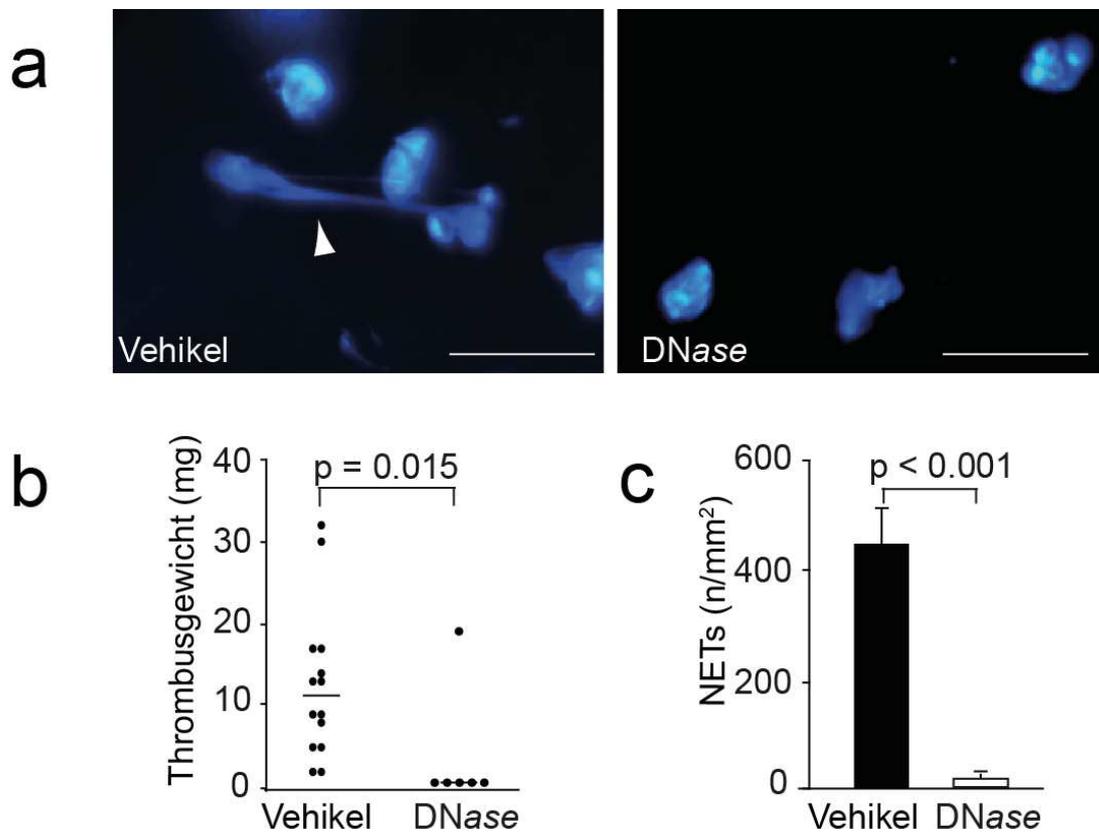


Abbildung 25: NETs und Thrombusgewicht bei DNase behandelten Mäusen im Vergleich zu Vehikel behandelten Mäusen

a) Repräsentative immunhistologische Bilder von WT Thromben zeigen, mittels der blauen Färbung (Hoechst), die vom Kern der neutrophilen Granulozyten freigesetzte DNA, welche die NETs bildet (links). Im Gegensatz dazu fehlen die NETs in Mäusen, welche mit DNase behandelt wurden (rechts). Maßstab = 10 µm.

b) Das Thrombusgewicht 48 Stunden nach Flussverlangsamung war bei Mäusen nach Injektion von DNase (n=6) gegenüber C57BL/6J-Kontrollmäusen (n=14) signifikant reduziert. Querbalken ≙ Median-Wert.

c) Quantifizierung der Anzahl von NETs im Thrombus 48h nach Flussverlangsamung in Mäusen, welche mit Vehikel oder DNase behandelt wurden (n=3 pro Gruppe). Fehlerbalken ≙ SEM.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass NETs nicht nur unbeteiligte Nebendarsteller sind, sondern aktiv zur neutrophile-abhängigen Koagulation bei der TVT Entstehung beitragen.

Nachweislich hat das klinisch häufig eingesetzte Heparin eine hohe Affinität zu Histonen und kann diese aus dem Chromatin lösen⁶². Dieser klinisch interessante Aspekt wurde mittels

einer Enoxaparin Gabe überprüft. Die Quantifizierung von NETs/mm² in Thrombusquerschnitten 48 Stunden nach Flussreduktion ergab eine signifikante Reduzierung bei den Enoxaparin behandelten Tieren, im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb. 26 a). Somit reduzierte Enoxaparin die NETs-Bildung *in vivo* während der TVT Entwicklung. Außerdem zeigte sich ein Effekt auf die Thrombusentstehung, da das Thrombusgewicht bei Enoxaparin behandelten Mäusen signifikant reduziert war im Vergleich zur Kontrollgruppe (p=0,045) (Abb. 26 b). 6 von 6 Tieren entwickelten in der Kontrollgruppe einen Thrombus; im Gegensatz dazu konnte die Thrombusentwicklung durch die Enoxaparingabe nur bei 2 von 5 Tieren stattfinden. Diese Häufigkeiten wurden mittels des exakten Tests nach Fisher verglichen (p=0,0152).

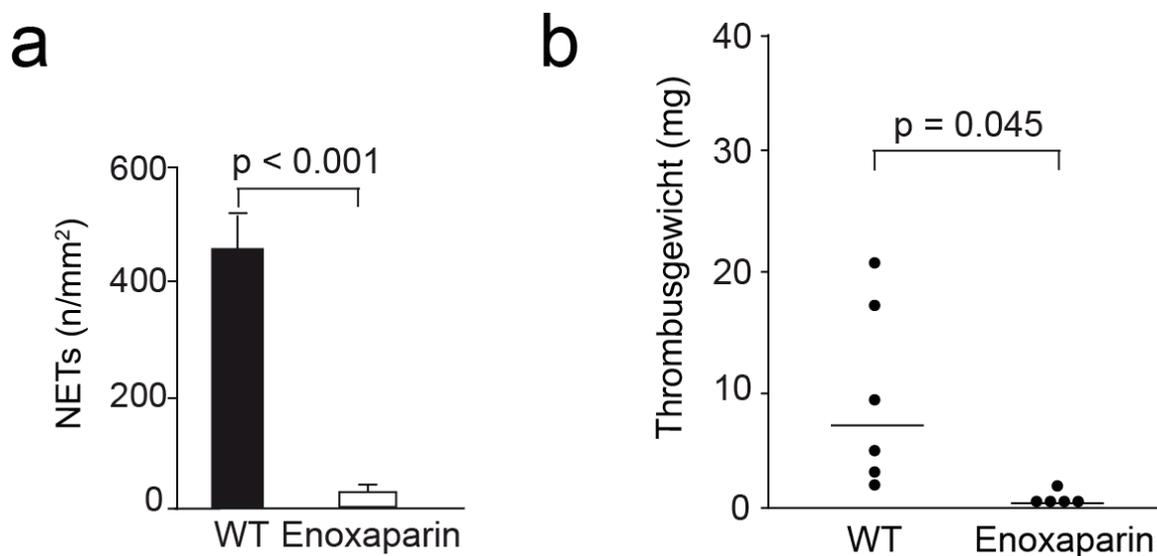


Abbildung 26: NETs und Thrombusgewicht bei Enoxaparin behandelten Tieren im Vergleich zu Wildtypmice

a) Quantifizierung der Anzahl von NETs/mm² im Thrombus 48h nach Flussverlangsamung von Kontrollmäusen im Vergleich zu Enoxaparin behandelten Mäusen (n=3 pro Gruppe). Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

b) Thrombusgewicht von C57BL/6J-Mäusen (n=6) und Enoxaparin behandelten Mäusen (n=5) 48h nach Flussverlangsamung. Querbalken $\hat{=}$ Median-Wert.

4 Rolle der Plättchen bei der Entstehung der venösen Thrombose

Um neben den Leukozyten eine mögliche Beteiligung von Plättchen während der TVT Bildung zu untersuchen, wurden Querschnitte von Thromben, die 48 Stunden nach Flussverlangsamung entnommen wurden, immunhistologisch analysiert. Durch den thrombozytenspezifischen CD41-Antikörper wurden Plättchen rot und mit Hilfe von DAPI die Zellkerne blau gefärbt (Abb. 27). Es zeigte sich eine massive Plättchenakkumulation im gesamten Thrombusquerschnitt.

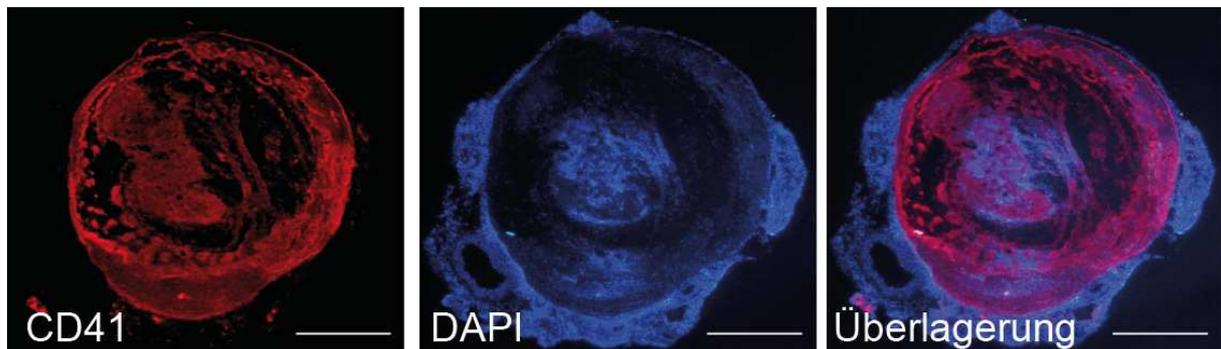


Abbildung 27: Immunhistologische Visualisierung von Thrombozyten

Immunhistologische Färbung für Plättchen (CD41) in C57BL/6J-Mäusen 48h nach Flussverlangsamung in der V. cava caudalis. DAPI diente als Kernfärbung. Maßstab = 200µm.

Da das Adhäsionsprotein vWF maßgeblich an der Rekrutierung von Thrombozyten beteiligt ist, wurde die V. cava caudalis 48 Stunden nach Flussverlangsamung immunhistologisch auf vWF gefärbt (Abb. 28). Dies zeigte, dass die Endothelzellen nach Aktivierung vWF exponieren und damit Plättchen binden können.

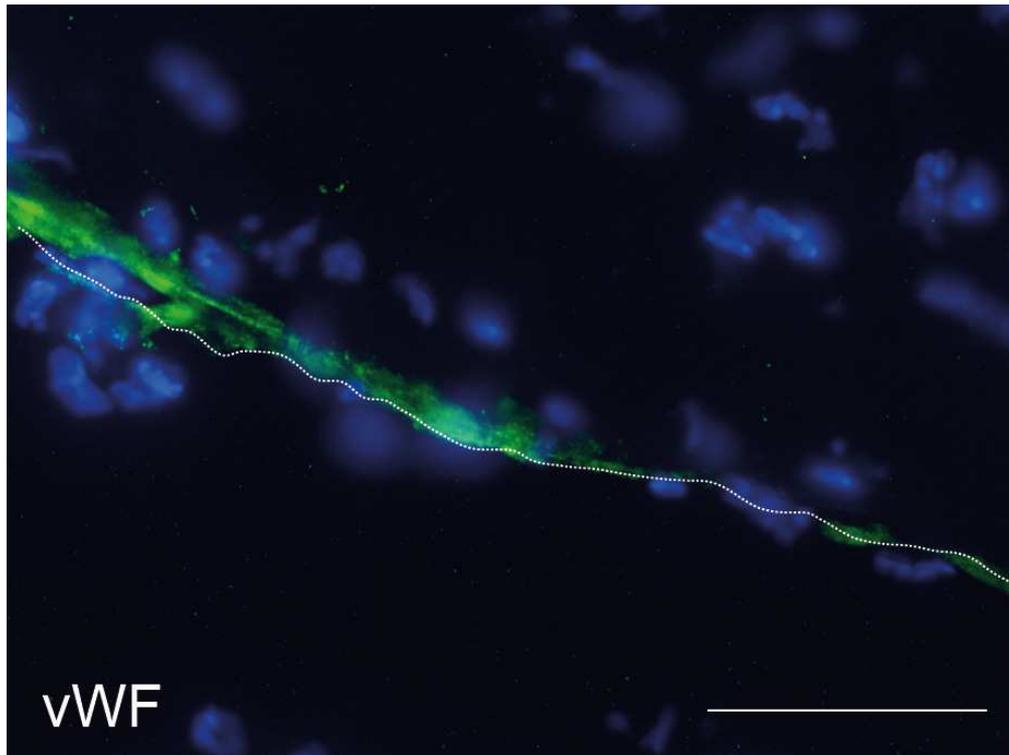


Abbildung 28: Immunhistologische Visualisierung von vWF

Immunhistologische Färbung des Endothels 48 Stunden nach Flussverlangsamung. VWF stellt sich grün dar, Zellkerne durch eine DAPI Färbung blau. Maßstab = 50 µm.

Um die molekularen Mechanismen der Plättchenrekrutierung an der Endothelwand zu untersuchen, wurde die Intravitalmikroskopie angewendet und auf eine transgene Mauslinie zurückgegriffen, welche keine funktionale, extrazelluläre GpIb α -Domäne besitzt (IL4-R/Iba). Der auf aktivierten Plättchen exprimierte GpIb α -Rezeptor vermittelt die Interaktion von Plättchen mit dem Endothel sowie Leukozyten.

Um die Rolle des GPIb α -Rezeptors *in vivo* zu analysieren, wurden Plättchen *ex vivo* mit Rhodamin B gefärbt und intravenös verabreicht. Die Leukozyten wurden mit Acridin Orange, einem DNA-Farbstoff, grün dargestellt. In der C57BL/6J-Kontrollgruppe zeigte sich sechs Stunden nach Flussverlangsamung eine massive Leukozytenakkumulation und eine moderatere Thrombozytenpräsenz in der V. cava caudalis. Im Gegensatz dazu wurde bei den IL4-R/Iba-Mäusen sechs Stunden nach Flussverlangsamung eine reduzierte Leukozytenakkumulation, eine diffuse Verteilung von einzelnen Thrombozyten und eine blockierte Plättchen-Aggregatbildung in der V. cava caudalis beobachtet (Abb. 29 a). Durch Quantifizierung der adhärenenten Leukozyten konnte eine signifikante Reduktion der Leukozytenadhäsion bei IL4-R/Iba-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen gezeigt werden

($p=0,001$), da bei Wildtypmäusen 7727 Leukozyten pro mm^2 adhärten, wohingegen bei IL4-R/Iba-Mäusen nur 2788 Leukozyten pro mm^2 adhärten (Abb. 29 b). Die Quantifizierung der Plättchen ergab, dass bei Wildtypmäusen 775 Thrombozyten pro mm^2 adhärten, wohingegen bei IL4-R/Iba-Mäusen nur 179 Thrombozyten pro mm^2 adhärten. Dies spiegelt sich nur in einer erkennbaren biologisch relevanten Differenz wieder ($p=0,199$), wobei weitere Tiere in diese Statistik einfließen müssten (Abb. 29 b).

Auch bei den Thrombusgewichten von Wildtypmäusen im Vergleich zu IL4-R/Iba-Mäusen ist eine biologisch relevante Differenz zu erkennen ($p=0,065$). 6 von 7 Wildtyptieren entwickelten einen Thrombus; im Gegensatz dazu konnte nur bei 1 von 5 IL4-R/Iba-Tieren eine Thrombusentwicklung stattfinden (Abb. 29 c). Diese Häufigkeiten wurden mittels des exakten Tests nach Fisher verglichen ($p=0,0319$).

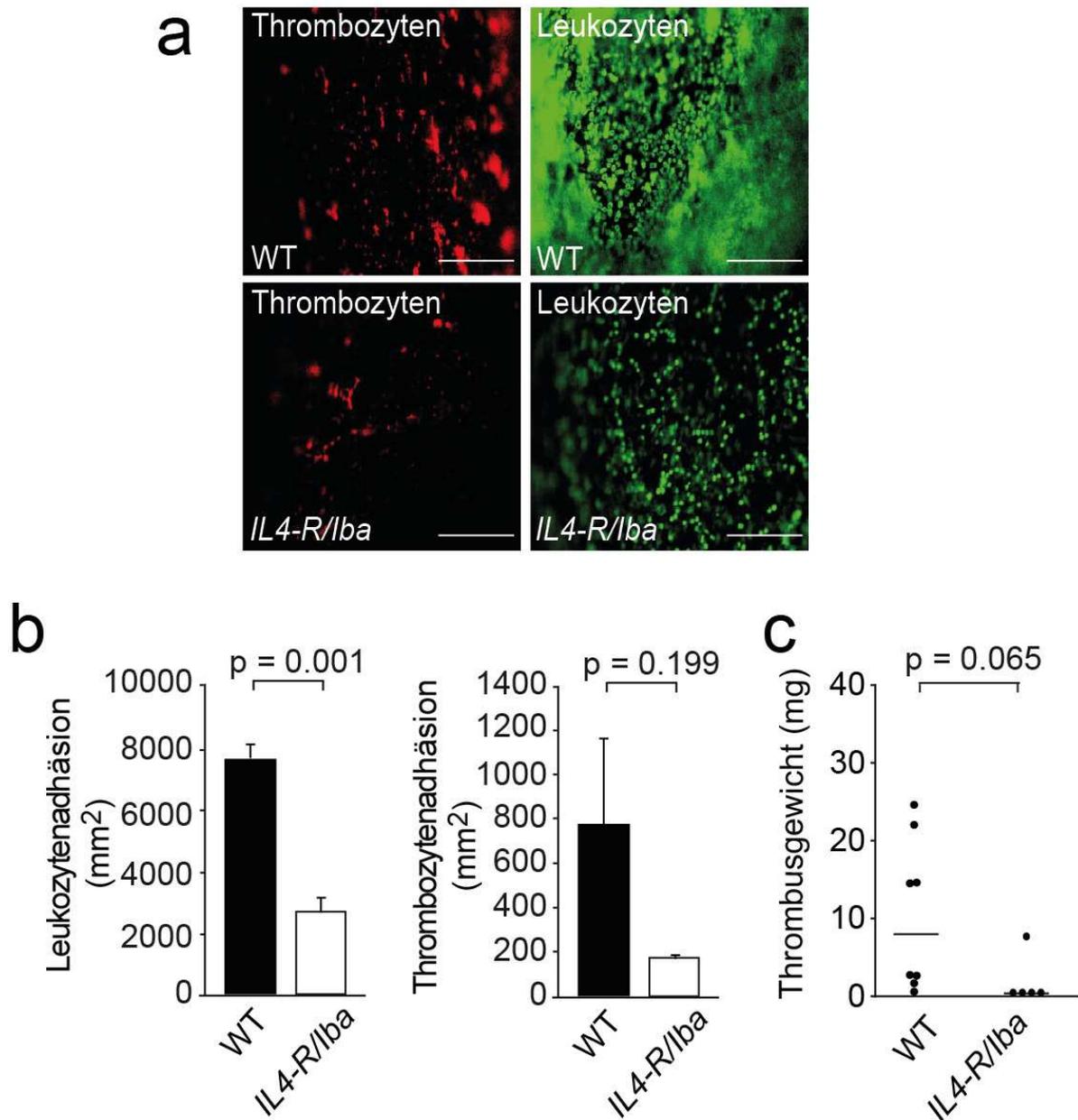


Abbildung 29: Leukozytenadhäsion, Plättchenadhäsion und Thrombusgewicht bei IL4-R/Iba-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen

a) Intravitalmikroskopische Bilder 6h nach Flussverlangsamung in C57BL/6J- und IL4-R/Iba-Mäusen (n=3 pro Gruppe). Eine vermehrte Akkumulation von Plättchen (rot, Farbe nachträglich geändert, Rhodamin B) und Leukozyten (grün, Acridin Orange) ist nur in Kontrollmäusen zu beobachten. Maßstab = 100µm.

b) Quantitative Analyse der Leukozytenadhäsion bei IL4-R/Iba-Mäusen (n=2) und Wildtypmäusen (n=5) und Thrombozytenadhäsion bei IL4-R/Iba-Mäusen (n=3) und Wildtypmäusen (n=3). Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

c) Thrombusgewicht 48h nach Flussverlangsamung bei C57BL/6J-Kontrollmäusen (n=8) und IL4-R/Iba-Mäusen (n=5). Querbalken $\hat{=}$ Median-Wert.

Da bekannt ist, dass über den GPIIb α -Rezeptor neben Plättchen-Endothel-Interaktionen via MAC-1 auch eine direkte Interaktion mit Leukozyten erfolgen kann bzw. denkbar wäre, dass Plättchen über diesen Mechanismus zur Leukozytenrekrutierung beitragen, wurde in einem nächsten Schritt der Einfluss von GPIIb α auf die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion untersucht. Durch Übereinanderlegen der IVM-Bilder wurde die Interaktionsfläche von Plättchen und Leukozyten in gelb dargestellt. Hier wurde deutlich, dass es bei IL4-R/Iba-Mäusen zu fast keiner Interaktion kommt (Abb. 30 a). Die Quantifizierung der Kolokalisationsfläche von Leukozyten und Thrombozyten zeigte eine signifikante Reduktion ($p=0,018$) im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb. 30 b).

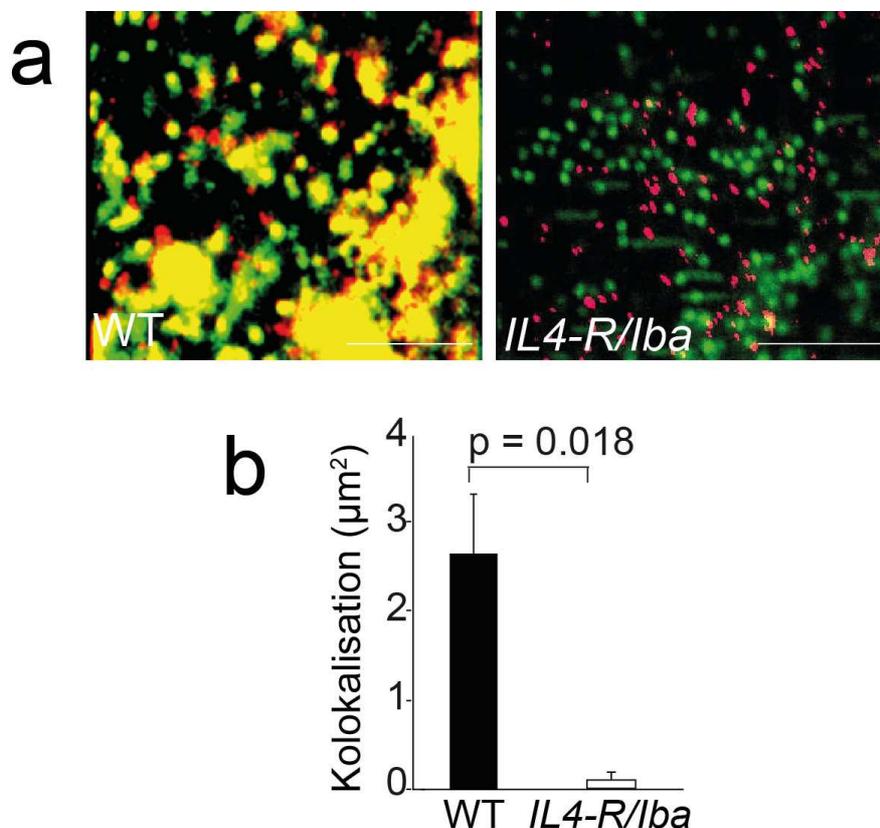


Abbildung 30: Interaktion von Leukozyten und Plättchen bei Wildtypmäusen und IL4-R/Iba-Mäusen

a) Intravitalmikroskopische Bilder der Plättchen-Leukozyten-Interaktion 6h nach Flussverlangsamung in C57BL/6J- und IL4-R/Iba-Mäusen. Linker Maßstab = 50 μm . Rechter Maßstab = 100 μm .

b) Quantifizierung der Kolokalisation von Plättchen und Leukozyten in WT (n=5) und IL4-R/Iba-Mäusen (n=5). Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

In vitro und *in vivo* Untersuchungen zeigen, dass die Interaktion von Leukozyten und Plättchen zu einer Aktivierung der Leukozyten und dann zur NETs-Bildung führt⁶⁰. Deshalb wurde als nächster Schritt eine mögliche Kolo-kalisation von Plättchen und NETs untersucht. Es zeigten sich, in immunhistologischen Schnitten aus Thrombusgewebe 48h nach TVT-Induktion, NETs, welche auf ihrer Oberfläche Plättchen gebunden hatten (Abb. 31). Dies lässt darauf schließen, dass Thrombozyten die TVT Bildung unterstützen, indem sie die Leukozyten-abhängige bzw. NETs- induzierte Koagulation fördern.

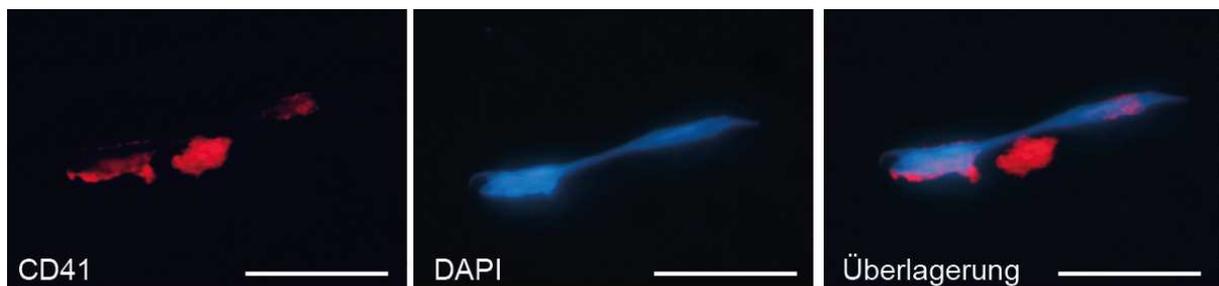


Abbildung 31: Immunhistologische Visualisierung der Kolo-kalisation von Plättchen und NETs

Immunhistologische Färbung für Plättchen (CD41, rot) in C57BL/6J-Mäusen 48h nach Flussverlangsamung in der V. cava caudalis. NETs wurden mit Hoechst gefärbt. Maßstab = 10µm.

Weil nachgewiesen wurde, dass es in der IL4-R/Iba-Gruppe zu einer per se reduzierten Leukozytenakkumulation, sowie einer blockierten Leukozyten-Plättchen-Interaktion kommt, und beide Phänomene Einfluss auf die NETs-Bildung haben, wurde in einem letzten Schritt der mögliche Einfluss des GPIb α -Rezeptors auf das Vorkommen der NETs analysiert. In den Thromben der IL4-R/Iba-Gruppe zeigte sich 48 Stunden nach Flussreduktion eine signifikant reduzierte Bildung der NETs/mm² (p=0,001). Auch die NETs-Bildung pro 100 Leukozyten war signifikant erniedrigt (p<0,001) (Abb. 32).

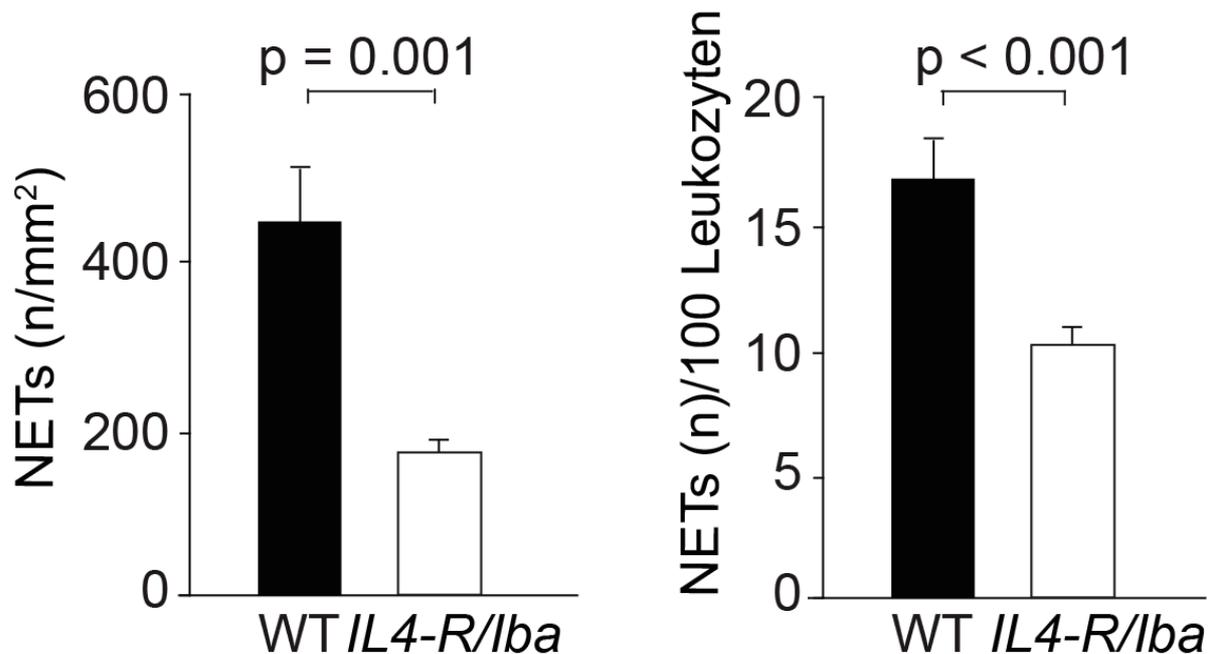


Abbildung 32: NETs Bildung in IL4-R/Iba-Tieren im Vergleich zu Kontrollmäusen

Die Gesamtanzahl von NETs/mm² (je n=3) und die Anzahl von NETs pro 100 Leukozyten (je n=3) wurden in immunhistologischen Schnitten 48h nach Flussverlangsamung in WT und IL4-R/Iba-Mäusen quantifiziert.

Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

Folglich hat die GpIb α -abhängige Interaktion von Plättchen mit Leukozyten während der TVT Bildung mehrere Funktionen: Sie unterstützt die Leukozytenrekrutierung und sie stimuliert die NETs Bildung durch neutrophile Granulozyten.

5 Rolle der FXII-abhängigen Koagulation bei der Entstehung der venösen Thrombose

Um eine mögliche Bedeutung des intrinsischen Systems und seines Initiators FXII bei der Entstehung der TVT zu beleuchten und aufgrund der Hypothese, dass die nachgewiesenen NETs durch ihre negativ geladene Oberfläche FXII aktivieren könnten, wurde die Rolle von Faktor XII bei der Entstehung der TVT näher untersucht. Anhand einer Fibrindarstellung mittels Carstairs Färbung wurde deutlich, dass die Thrombusbildung entscheidend von einer Aktivierung des Gerinnungssystems und der daraus resultierenden Fibrinbildung abhängt (Abb. 33).



Abbildung 33: Carstairs-Färbung eines entnommenen Thrombus 48h nach Flussverlangsamung in C57BL/6J-Mäusen

Die Carstairs-Färbung zeigt die verschiedenen Schichten von Fibrin (orange), Plättchen (blau) und roten Blutkörperchen (rot) durch den Thrombus. Maßstab = 1mm.

Deshalb wurde die Thrombusbildung in FXII defizienten Mäusen, FXII-Inhibitor behandelten Mäusen und FXI defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen analysiert (Abb. 34). Das Thrombusgewicht von FXII^{-/-}-Tieren zeigte nur eine biologisch relevante Differenz ($p=0,138$). Für eine statistische Signifikanz müssten mehr Tiere in den Versuch einfließen. 9 von 9 Wildtyptieren entwickelten einen Thrombus; im Gegensatz dazu konnte nur bei 5 von 7 FXII^{-/-}-Tieren eine Thrombusbildung stattfinden, jedoch waren die Gewichte der gebildeten Thromben mit $< 9,4$ mg relativ gering. Diese Häufigkeiten wurden mittels des exakten Tests nach Fisher verglichen ($p=0,175$). Das Thrombusgewicht von FXII-Inhibitor behandelten Tieren war im Vergleich zu Wildtyptieren signifikant erniedrigt ($p=0,011$). Dabei hatten wie bereits erwähnt 9 von 9 Wildtyptieren einen Thrombus entwickelt, wohingegen nur bei 2 von 7 mit FXII-Inhibitor behandelten Tieren eine Thrombusbildung stattfinden konnte. Diese Häufigkeiten wurden mittels des exakten Tests nach Fisher verglichen ($p<0,001$). Im Gegensatz dazu zeigte das Thrombusgewicht von FXI^{-/-}-Mäusen nur einen geringen

Unterschied zum Wildtyp ($p=0,459$). Bei diesen Tieren entwickelten 6 von 7 Tieren einen Thrombus.

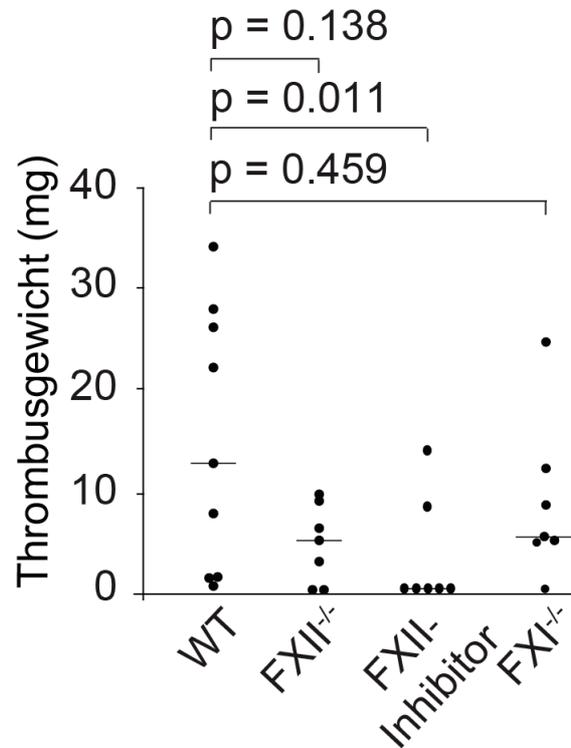


Abbildung 34: Thrombusgewicht von FXII^{-/-}-Mäusen, FXII-Inhibitor behandelten Mäusen und FXI^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen

Thrombusgewicht 48h nach Flussverlangsamung in C57BL/6J-Mäusen (n=9), FXII^{-/-}-Mäusen (n=7), FXI^{-/-}-Mäusen (n=7) und WT Mäusen, welche mit FXII-Inhibitor (n=7) behandelt wurden. Querbalken \triangleq Median-Wert.

Daraufhin wurde die Fibrindichte im Thrombus bestimmt. Dies geschah anhand von Carstairs gefärbten Schnitten von FXII^{-/-}-Tieren und Kontrolltieren. Dabei war der Prozentsatz der Fibrin-bedeckten Fläche im Thrombus von FXII^{-/-}-Tieren signifikant verringert im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb. 35).

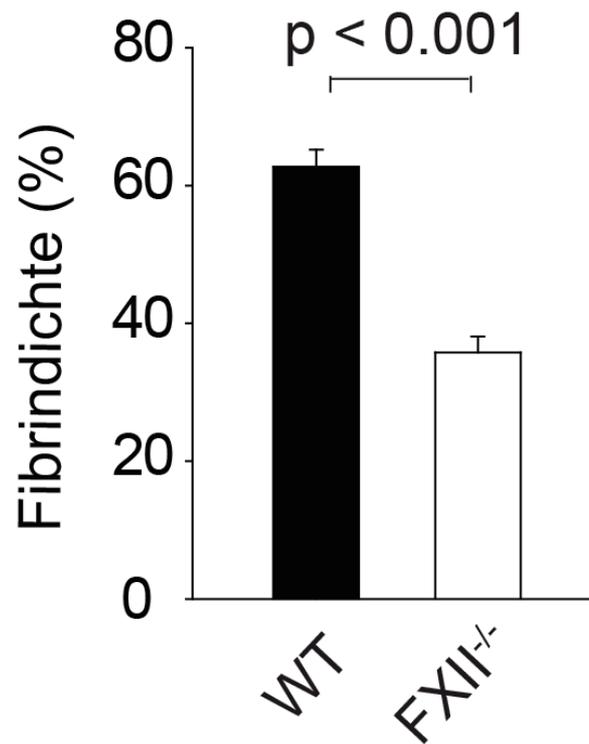


Abbildung 35: Quantifizierung der Fibrindichte in Wildtypmäusen und FXII^{-/-}-Mäusen

Quantifizierung der Fibrindichte als prozentualer Anteil der Fibrinfläche zur Gesamtfläche (n=3 pro Gruppe).

Als letzter Schritt wurden NETs mit Hilfe des konfokalen Mikroskops visualisiert und dabei konnte beobachtet werden, dass NETs, welche von isolierten humanen neutrophilen Granulozyten entlassen wurden, auf ihren Oberflächen FXII binden (Abb. 36).

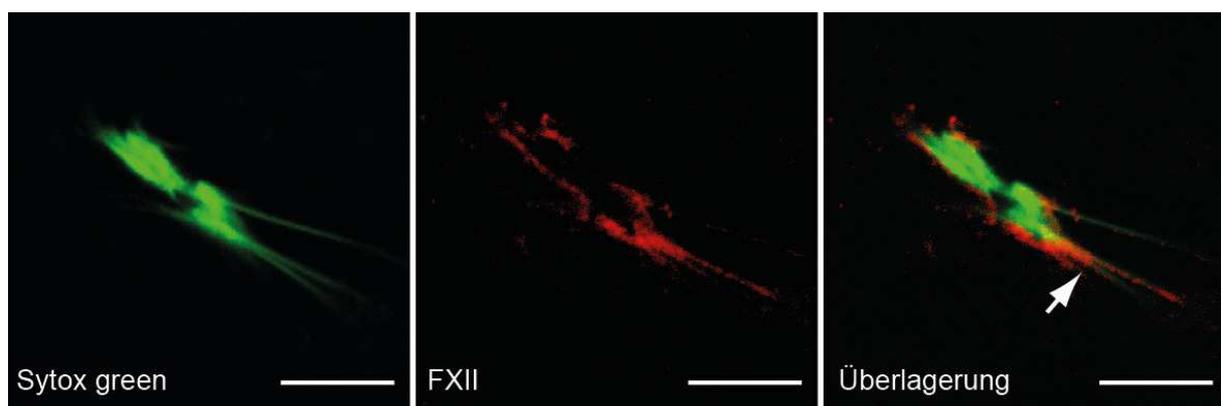


Abbildung 36: Konfokale Visualisierung von NETs und FXII

Konfokale Visualisierung der Kolokalisation von NETs (Sytox green) und Faktor XII (rot). Maßstab = 10µm.

Zusammengefasst zeigen die beschriebenen Ergebnisse, dass NETs die Fähigkeit besitzen FXII auf ihrer Oberfläche zu binden und so die Autoaktivierung von FXII durch ihre negativ geladene extrazelluläre DNA Oberfläche begünstigen. Daher ist die NETs-induzierte FXII-Aktivierung von großer Bedeutung für die intravaskuläre Thrombusentstehung während der TVT.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind Teil des Paper "Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo", welches am 14.02.2012 beim Journal of Experimental Medicine angenommen wurde.

Zudem wurden diese Ergebnisse als Poster mit dem Titel "Neutrophil Extracellular Traps as an Interface between Inflammation and Thrombosis" beim SFB 914 Retreat (26.-29.02.2012) auf Schloss Ringberg vorgestellt.

VI Diskussion

1 Wahl der Mauslinien

Vorteilhaft an der Maus ist im Allgemeinen die einfache und kostengünstige Haltung, auch in größerer Anzahl, die schnelle Reproduktion der Tiere und auch die relativ einfache Manipulationsmöglichkeit des Mäusegenoms. Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit das venöse Thrombosemodell an der Maus gewählt, da es bereits in der Arbeitsgruppe etabliert ist, inklusive den vorhandenen Möglichkeiten der standardisierten intravitalmikroskopischen und histologischen Untersuchungen. Zudem wurde die Maus als Versuchstier herangezogen, da durch das Vorhandensein zahlreicher gentechnisch veränderter Linien umfassende Untersuchungen im Hinblick auf die Fragestellungen der molekularen Mechanismen durchführbar waren.

Dabei diente der C57BL/6J-Stamm als Kontrollstamm für die verwendeten gentechnisch modifizierten Mausstämme, da er als Hintergrundstamm für alle in dieser Arbeit untersuchten Mauslinien dient^{87,88,75,89}. Dieser am häufigsten verwendete Inzuchtstamm zeichnet sich außerdem durch eine problemlose Zucht aus, wobei die Genotypisierung der Nachzucht nicht erforderlich ist⁸⁶. Behandelte C56BL6/J-Tiere wurden mit C57BL/6J-Tieren verglichen, welche ein entsprechendes Vehikel oder die Isotypkontrolle erhielten. Des Weiteren wurden anhand der C57BL/6J-Mäuse die Kontrollwerte für die Leukozyten- und Plättchenrekrutierung, für die NETs-Bildung und die Fibrinbildung ermittelt, um später einen Vergleich zu den gentechnisch modifizierten Mäusen gewährleisten zu können. Zusätzlich diente der Median-Wert der Thrombusgewichte dieser Tiere als Vergleichswert für die Versuchsgruppen.

Die gentechnisch veränderten Mauslinien wurden ausgewählt, um die Beteiligung von Leukozyten, Plättchen und des intrinsischen Gerinnungssystems bei der Entstehung der TVT zu untersuchen.

Der transgene LysM-eGFP-Stamm⁸⁷ wurde für die intravitalmikroskopische Visualisierung der Leukozytenrekrutierung in der initialen Phase der Thrombusentstehung verwendet. Durch die genetische Veränderung fluoreszieren die Leukozyten grün, wobei 98% der Zellen neutrophile Granulozyten sind und nur 2% der leuchtenden Zellen Monozyten darstellen⁸⁷.

Mit Hilfe des IL4-R/Ib α -Stamms⁸⁸ wurde die Rolle des thrombozytären GPIb-Rezeptors bei der Thrombusentstehung analysiert. Dadurch konnte die Rolle der Thrombozyten-Rekrutierung und die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion näher untersucht werden.

Zur Erforschung der Beteiligung des intrinsischen Gerinnungssystems an der Entstehung der TVT wurden FXII^{-/-}- und FXI^{-/-}-Mäuse^{75,89} verwendet. Diese Mauslinien besitzen keine Plasma-Aktivität der jeweiligen Faktoren.

2 Wahl des Tiermodells für die Induktion der venösen Thrombose

Die meisten der derzeitigen Erkenntnisse über die Pathophysiologie der arteriellen und venösen Thrombose wurden von Mausmodellen erworben, welche auf einer Schädigung des arteriellen bzw. venösen Endothels^{40,78,111-114} oder auf einem komplett sistierenden Blutfluss^{68,111,115-117} beruhen. Doch anders als bei der arteriellen Thrombose, der meist eine Endothelschädigung vorangeht, ist die Flussverlangsamung ohne Endothelschaden einer der häufigsten Auslöser der TVT beim Menschen. Zusammen mit anderen Faktoren, wie z.B. einem Alter über 45 Jahre¹² oder Schwangerschaft²⁰, werden TVTs in Situationen der venösen Flussverlangsamung, z.B. bei längerer Immobilisation durch Bettlägerigkeit oder bei einem Langstreckenflug, ausgelöst^{14-16,118}. Deshalb können die Modelle, welche die Thrombose über eine Endothelschädigung oder das vollständige Sistieren des Blutflusses induzieren, nicht auf die häufige klinische Situation der reinen Flussreduktion übertragen werden.

Ein von Köllnberger 2007 innerhalb unserer Arbeitsgruppe entwickeltes und durch Steinhart 2012 weiter untersuchtes neuartiges Modell zeichnet sich durch eine um ca. 75 % verlangsamte, aber bestehende Blutströmungsgeschwindigkeit bei unversehrtem Endothel aus^{13,41}. Des Weiteren wurde das Thrombusgewicht als Maß für die Thrombusbildung eingeführt. Dabei wird ein definiertes Leergewicht der standardisiert entnommenen V. cava caudalis (5,3 mg) von dem in den Versuchsgruppen ermittelten Gesamtgewicht (einschließlich Thrombus, V. cava caudalis und Aorta) abgezogen und so das tatsächliche Gewicht des venösen Thrombus ermittelt⁴¹. Mehrere Aspekte zeigen, dass dieses Modell der TVT Entwicklung der beschriebenen Klinik der TVT beim Menschen sehr ähnelt: **(1)** Die Störung oder Verlangsamung, aber nicht der vollständige Verschluss des venösen Blutflusses, ist ein häufiger Auslöser der TVT Bildung bei Patienten¹¹⁹⁻¹²². **(2)** Ähnlich zum zeitlichen Verlauf bei Menschen¹²³, entwickelt sich die TVT über einen längeren Zeitraum (12-48 Stunden)⁴¹. **(3)** Der geschichtete, mehrzellige Aufbau des Thrombus spiegelt sich in menschlichen venösen Thromben wieder¹²⁴. **(4)** Die erfolgreiche Thromboseprophylaxe mittels Enoxaparin in unserem Modell entspricht dem Vorgehen beim Menschen¹²⁵. Gerade weil nicht alle Tiere im gezeigten Modell eine Thrombose entwickeln, spiegelt es die klinische Situation besser wieder, als Modelle mit Endotheldenudation. Denn selbst wenn

Patienten mit dem gleichen Risikoprofil den gleichen Bedingungen, wie z.B. bei einem Langstreckenflug, ausgesetzt sind, entwickeln diese nicht in sämtlichen Fällen eine TVT.

Obwohl dieses TVT-Modell keine weiteren Auslöser der venösen Thrombose, wie Krebs, Sepsis oder Erbkrankheiten berücksichtigt, könnte es trotzdem für die Evaluation neuartiger Prophylaxe- oder Behandlungsmedikamente für die TVT wertvoll sein, vor allem für die große Anzahl humaner Patienten, bei denen ein beeinträchtigter Blutfluss der Hauptauslöser der TVT-Bildung ist.

3 Neutrophile Granulozyten tragen durch NETs Bildung aktiv zur venösen Thrombose bei

Obwohl die jüngsten Studien gezeigt haben, dass es eine direkte Verbindung zwischen Entzündung und TVT gibt^{126,127}, ist die genaue Rolle der Immunzellen in der TVT Entstehung bisher unklar. Nach der Untersuchung der venösen Thromben 48 Stunden nach Flussverlangsamung, zeigte sich, dass inflammatorische Leukozyten in der Tat den Hauptbestandteil der im Thrombus rekrutierten Zellen ausmachen. Übereinstimmend mit anderen Modellen, wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass neutrophile Granulozyten die überwiegende Leukozyten-Subpopulation darstellen^{128,129,130}. Die Rolle der Leukozyten ist zwar für das postthrombotische Remodelling der Venenwand beschrieben¹³¹, jedoch war ihre Rolle bei der Entstehung der venösen Thrombose bis vor kurzem unklar. Steinhart zeigte 2012, dass es in den ersten Stunden nach Flussverlangsamung zu einer massiven Rekrutierung neutrophiler Granulozyten kommt, was entscheidend über das endotheliale P-Selektin vermittelt wird⁴¹. Dieses wird in endothelialen Weibel-Palade-Körperchen gespeichert und nach Zellaktivierung als Adhäsionsmolekül an die endotheliale Oberfläche mobilisiert¹³². Durch immunhistologische Untersuchungen 48 Stunden nach Induktion der Flussverlangsamung zeigte sich, als Reaktion auf den verlangsamten Blutfluss, eine endotheliale Exposition von P-Selektin. Vor kurzem hat sich zudem lösliches P-Selektin als diagnostischer Marker für ein erhöhtes venöses Thromboembolierisiko etabliert, was die klinische Rolle dieses Adhäsionsmoleküls weiter unterstützt¹³³. Zusammengefasst zeigen diese experimentellen Beobachtungen übereinstimmend mit den klinischen Befunden von erhöhten inflammatorischen Markern, wie CRP bei humanen Patienten, dass die venöse Thrombogenese in der frühen Phase eine sterile Inflammationsreaktion darstellt²³.

Obwohl die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ein prominentes Phänomen in der Frühphase der Thrombusbildung darstellt, ist ihre funktionelle Bedeutung weitgehend

unbekannt. Aufgrund der nachgewiesenen, intravaskulären Fibrinbildung bei der TVT wurde stets angenommen, dass das Gerinnungssystem eine entscheidende Rolle für die venöse Thrombogenese darstellt. Dennoch sind die Mechanismen, welche zur Fibrinbildung führen, bisher unklar.

Um die funktionelle Rolle der neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurde eine Depletion der neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Dabei wurde die Anzahl der im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten durch die Gabe eines depletierenden Antikörpers stark reduziert. Dies hatte eine deutliche Reduktion des Thrombusgewichtes und somit der TVT-Bildung zur Folge. Damit konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten eine essentielle funktionelle Bedeutung für die Initiierung des venösen Thrombus haben. Des Weiteren ist in anderen Zusammenhängen aus *in vitro* und *in vivo* Studien von neutrophilen Granulozyten bekannt, dass sie nach Rekrutierung an die Gefäßwand und Aktivierung so genannte NETs bilden können^{59,62}. Außerdem ist bekannt, dass die Bildung von NETs eng verbunden ist mit einem erhöhten Risiko für thrombotische Erkrankungen, wie dies etwas beim systemischen Lupus erythematodes der Fall ist¹³⁴.

In Studien zur arteriellen bzw. venösen Thrombose und *in vitro* wurde bereits gezeigt, dass die Oberflächen der NETs als prothrombotisches Gerüst agieren, indem sie vWF binden, stark wirkende Antikoagulantien wie Tissue-Faktor-Inhibitor abbauen und die thrombomodulin-abhängige Protein C Aktivierung reduzieren können^{62,135,40,113}. Jedoch fehlen bislang detaillierte Untersuchungen zum Vorhandensein und zur Rolle von NETs bei der Entstehung der TVT. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig anhand der Intravitalmikroskopie *in vivo* die NETs-Bildung innerhalb von 3h nach Flussreduktion gezeigt werden. Darüber hinaus bestätigten sich diese Befunde anhand spezifischen Immunhistologien der 48 Stunden nach Flussreduktion entnommenen Thromben und die NETs konnten durch verschiedene Immunhistologien zusätzlich identifiziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die neutrophilen Granulozyten die Quelle der NETs darstellen, was auch dadurch bestätigt wird, dass bei deren Depletion fast keine NETs mehr im Thrombus zu finden sind.

Die prothrombotische Funktion der NETs während der TVT konnte immunhistologisch durch die Bindung von Tissue Faktor und PDI auf ihren Oberflächenstrukturen bewiesen werden. Diese Beobachtungen decken sich mit den publizierten Erkenntnissen bezüglich dem Vorhandensein von NETs im Zuge der induzierten TVT bei Pavianen⁶². Jedoch blieb ihre funktionelle Bedeutung für die venöse Thrombogenese bisher unklar. Durch die Injektion von NETs abbauender DNase konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass NETs essentiell für die venöse Thrombogenese sind. Es ist bereits bekannt, dass aktivierte Plättchen mit neutrophilen

Granulozyten interagieren können und dadurch die Netose fördern⁶⁰. Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse wurden diese Studien bestätigt. Es zeigte sich, dass neutrophile Granulozyten im Zuge der frühen Phase der TVT tatsächlich mit Plättchen Kolokalisieren, was wiederum die NETs-Bildung fördern kann⁶⁰. Dieser Prozess ist vom Plättchenrezeptor GPIb abhängig, denn bei GPIb defizienten Tieren blieb die Interaktion zwischen Plättchen und neutrophilen Granulozyten aus und zudem war auch die Anzahl der NETs im Thrombus deutlich reduziert. Zusätzlich konnte anhand immunhistologischer Analysen gezeigt werden, dass Plättchen auch direkt an Oberflächenstrukturen von NETs binden, was über die beschriebenen Interaktionen von Plättchen-assoziiierter PDI mit TF zum prokoagulatorischen Effekt der NETs beitragen könnte. Interessanterweise resultierte auch die Verabreichung von Enoxaparin in einer Reduktion der NETs im Thrombus, wie es auch in einer Studie von Fuchs et al. beschrieben wurde⁶².

Zusammenfassend tragen rekrutierte neutrophile Granulozyten über eine Vielzahl an Mechanismen zur Induktion der TVT bei: **1)** Durch ihre endotheliale Rekrutierung und nachfolgende NET-Bildung stellen sie eine adhäsive Oberfläche für die weitergehende Rekrutierung von Plättchen dar. **2)** Des Weiteren kommt es zur Netose, d.h. der Bildung von NETs, die durch ihre Struktur weitere Anlagerungsflächen für die Thrombusbildung darstellen. **3)** Die Oberflächen dieser NETs binden prokoagulatorische Faktoren wie TF und PDI, welche zur Gerinnung beitragen.

Zusammenfassend stellen NETs eine wichtige Verbindung zwischen der von neutrophilen Granulozyten gesteuerten sterilen Inflammationsreaktion und dem ablaufenden Gerinnungsgeschehen während der venösen Thrombogenese dar.

4 Plättchen unterstützen die TVT-Bildung

Im Gegensatz zur arteriellen Thrombose, bei der die Endothelverletzung mit Exposition der subendothelialen Matrix und nachfolgende Thrombozytenrekrutierung die Hauptrolle spielen, zeigen Histologien von humanen venöse Thromben ein intaktes Endothel¹²⁴. Für die TVT wurde bereits gezeigt, dass die entstehende Hypoxie das Endothel aktivieren kann, welches daraufhin seine Weibel-Palade-Körperchen entlässt²⁷, in welchen vWF und P-Selektin gespeichert sind^{29,136}. Durch die Bindung von Plättchen über GPIb α an vWF können Plättchen an das Endothel rekrutiert werden³². In einer Studie von Brill et al. wurde zudem gezeigt, dass vWF-defiziente Mäuse vor der venösen Thrombose geschützt sind. Somit ist die Plättchen-Bindung via vWF am aktivierten Endothel essentiell⁶⁸.

Diese Ergebnisse decken sich mit den in dieser Arbeit durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen des venösen Thrombus 48 Stunden nach Flussverlangsamung, welche zeigen, dass Plättchen in großen Mengen im Thrombus vorhanden sind und dass das aktivierte Endothel vWF exprimiert. Zudem konnte *in vivo* beobachtet werden, dass es zu einer Verringerung der Thrombozytenadhäsion kommt, wobei aber auch die Leukozytenadhäsion signifikant reduziert ist. Dies bestätigt die These, dass Plättchen die Leukozytenrekrutierung durch die Interaktion von GpIb α der Thrombozyten mit dem Mac-1 Integrin der Leukozyten vermitteln⁷³. Zusätzlich zeigte sich eine biologisch relevante Differenz des Thrombusgewichtes bei IL4-R/Iba-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, wobei höhere Tierzahlen angestrebt werden müssten, um eine statistische Signifikanz zu erreichen. GPIb α ist somit essentiell für die Plättchen-Rekrutierung per se, sowie für die Unterstützung der Rekrutierung von Leukozyten in der TVT. Darüber hinaus ist es für die Plättchen-Leukozyten-Interaktion erforderlich, damit neutrophilen Granulozyten prokoagulatorische NETs entlassen können, da bei IL4R-Iba-Tieren die NETs-Bildung signifikant reduziert ist. Folglich fördern Plättchen, durch ihre Rolle bei der Leukozytenrekrutierung, die sterile Entzündungsreaktion und lösen zudem die NET-Bildung der neutrophilen Granulozyten aus. Diese entscheidende Rolle von Plättchen bei der TVT wird weiter untermauert mit der klinische Beobachtung, dass das gegen Plättchen gerichtete Aspirin prophylaktisch gegen venöse Thrombose bei postoperativen immobilisierten Hochrisikopatienten wirkt¹³⁷.

5 Neutrophile Granulozyten verstärken die TVT durch Einleitung der FXII-abhängigen Gerinnung

Vorausgegangene Studien, welche als Methoden eine Endothelverletzung oder eine komplette V. cava caudalis Okklusion verwendeten, zeigten, dass die Thrombusbildung in den venösen Gefäßen hauptsächlich durch Tissue Faktor der Gefäßwand gesteuert wird^{126,130}. Bisher wird Tissue Faktor, als Hauptinitiator der Blutgerinnung, eine Schlüsselrolle in der Entstehung der venösen und arteriellen Thrombose zugesprochen¹³⁸. Die Rolle von FXII in der Hämostase wurde lange bestritten, da eine FXII-Defizienz weder bei Menschen¹³⁹ noch bei Mäusen⁷⁸ mit einer erhöhten Blutungsneigung verbunden ist. Es wurde jedoch bereits in verschiedenen arteriellen Thrombosemodellen gezeigt, dass FXII eine wichtige Rolle in der Thrombusentwicklung, -bildung und -stabilisierung hat^{78,140,141}.

Im Hinblick auf die funktionelle Rolle von FXII während der TVT zeigte sich anhand des signifikant reduzierten Thrombusgewichtes, dass die Verabreichung des FXII-Inhibitors PCK

vor der TVT-Bildung schützt, da 5 von 7 Tieren keinen Thrombus entwickelten. Dies lässt sich durch eine größere Wirkung des Inhibitors auf das Gerinnungssystem erklären, da PCK nicht nur FXII, sondern auch FX, FVIIa/TF-Komplex und Kallikrein inhibiert¹⁰². Jedoch waren bei den FXII^{-/-}-Mäusen nur 2 von 7 Tieren vor einer Thrombusbildung geschützt. Die entstandenen fünf Thromben waren jedoch von einem sehr geringen Gewicht. Aus der arteriellen Thrombogenese ist bekannt, dass FXII durch eine direkte Bindung an Fibrin, die Struktur des Fibrin-Gerinnsels regulieren kann¹⁴⁰. Durch Quantifizierung der Fibrinflächen in diesen Thromben konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es bei FXII^{-/-}-Tieren zu einer signifikant reduzierten Fibrinbildung kommt. Somit lässt sich die deutliche Gewichtsreduzierung durch eine reduzierte Fibrindichte in den entstandenen Thromben erklären.

Da negativ geladene Oberflächen als Auslöser für die FXII-Aktivierung agieren können⁷⁹, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich untersucht, ob diese Kontakt-Aktivierung möglicherweise auf eine Interaktion der negativ geladenen Oberflächen der NETs mit FXII zurückzuführen ist. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Bindung von FXII auf der NET-Oberfläche *in vitro* nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aktivierung von FXII zur prokoagulatorischen Wirkung der NETs beiträgt.

Im Einklang mit Beobachtungen in der arteriellen Thrombose¹⁴¹, hatte ein FXI-Mangel nur einen moderaten Effekt auf die venöse Thrombogenese. Dies zeigt, dass FXII die venöse Thrombogenese vorwiegend durch FXI-unabhängige Wege verstärkt, wie z.B. durch die direkte Stabilisierung des Fibrinnetzwerkes¹⁴⁰. Im Gegensatz zu Mäusen, bei denen Tissue Faktor selektiv in hämatopoetischen Zellen genetisch ablatiert ist und keine Thrombusbildung stattfand¹⁴², zeigten FXII-defiziente Mäuse vorrangig eine stark verminderte TVT-Bildung. Dies deutet darauf hin, dass die durch neutrophile Granulozyten gesteuerte Thrombusbildung, einschließlich der FXII-Aktivierung zur Verstärkung und Stabilisierung der TVT beitragen, wohingegen TF von elementarer Bedeutung für die Frühphase der Thrombose-Initiierung ist.

6 Ausblick

Aufbauend auf der vorliegenden Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass Neutrophile Extracellular Traps das Gerinnungssystem aktivieren können, wäre es interessant die genauen Mechanismen zu klären, die zur NETosis bei venöser Thrombose führen. Zwar konnte hier gezeigt werden, dass Thrombozyten hieran beteiligt sind, jedoch sind auf molekularer Ebene die beteiligten Faktoren noch zu klären. Zudem gilt es weiter zu untersuchen, welche Rolle den neutrophilen Granulozyten bei Prozessen wie paraneoplastisch oder traumatisch induzierter venöser Thrombose zukommt.

VII Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Rolle der neutrophilen Granulozyten bzw. der von ihnen gebildeten Neutrophil Extracellular Traps bei der Entstehung der tiefen Venenthrombose. Bisher ist ungeklärt, welche Rolle diesem Zelltyp bei der Thrombogenese zukommt, obwohl neutrophile Granulozyten die größte Zellpopulation darstellen, die an den Ort der Flussverlangsamung rekrutiert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten essentiell für die Entstehung der venösen Thrombose sind und dass sie den Ursprung der NETs bilden. Erstmals konnte intravitalmikroskopisch die NETs-Bildung wenige Stunden nach Induktion der Flussverlangsamung *in vivo* gezeigt werden. Bei der Bildung der NETs kommt Thrombozyten eine entscheidende Rolle zu, da sie zum einen die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten fördern und zum anderen die NETosis induzieren. Diese extrazellulären DNA-Strukturen konzentrieren prokoagulatorische und prothrombotische Faktoren, wie Thrombozyten und Tissue Faktor, auf ihrer Oberfläche, was die vermehrte Fibrinbildung in ihrer Umgebung erklärt. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass NETs auf ihren Oberflächen FXII binden und diesen aktivieren können und dadurch die intrinsische Gerinnung auslösen können. FXII wiederum hat eine fördernde Funktion bei der Thrombusstabilisierung durch die Bildung von Fibrin. Es wurde deutlich, dass NETs durch ihre prokoagulatorische Funktion von essentieller Bedeutung bei der Entstehung der venösen Thrombose sind. Die funktionelle Bedeutung der NETs wird dadurch belegt, dass die Zerstörung des Grundgerüsts der NETs durch DNase und niedermolekulares Heparin in einer verminderten Thrombusbildung resultiert.

Diese Arbeit leistet demnach einen großen Beitrag zum Verständnis der funktionellen Bedeutung von NETs bei der venösen Thrombogenese. Die Inhibition der NETs-Bildung könnte eine zukünftige Präventionsoption der Thrombusbildung darstellen und so neue therapeutische Ansätze für die Behandlung der tiefen Venenthrombose bieten.

VIII Summary

The role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in venous thrombosis

This dissertation examined the role of neutrophils and in particular Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in deep venous thrombosis. Although neutrophils represent the predominant population of cells recruited to the site of flow reduction their impact on thrombogenesis has not been investigated *in vivo*.

Here, we show that neutrophils are essential for the initiation of deep venous thrombosis (DVT) by releasing NETs. Using intravital microscopy, formation of NETs shortly after DVT induction could be demonstrated *in vivo*. In addition, platelets are critically involved in neutrophil recruitment and induction of NET formation. In turn, these extracellular DNA structures concentrate procoagulant and prothrombotic factors on their surface such as platelets and tissue factor, which explains the increased fibrin formation in their vicinity.

Further, it was shown that NETs act as a negatively charged surface, which binds Factor XII (FXII) on their surface, thereby activating it and initiating the intrinsic pathway of coagulation. Finally, FXII contributed to thrombus stabilisation and propagation by affecting fibrin formation. Since NETs had a variety of procoagulant functions crucial for DVT development, their functional importance was evidenced by the fact that destruction of NETs by DNase or low molecular weight heparin resulted in substantially decreased thrombus formation.

In conclusion, this work uncovers the functional importance of NETs in venous thrombogenesis, which serve as an interface between inflammation and thrombosis by serving as a prothrombotic platform and by concentrating procoagulant factors on their surface. The inhibition of the formation of NETs could be a future option to prevent thrombus formation and thus to offer new therapeutic approaches for the treatment of deep venous thrombosis.

IX Abkürzungsverzeichnis

A.	Aqua
Abb.	Abbildung
ACD-Puffer	Acetat-Citrat-Dextrose-Puffer
bidest.	bidestillierte
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCD-Kamera	charged coupled device-Kamera
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuclease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Faktor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
x g	x-faches der Erdbeschleunigung
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GP	Glykoprotein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPA	High-Efficiency Particulate Air
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ICAM 1	intrazelluläres Adäsionsmolekül-1
IgG	Immunglobulin
i.v.	intra venös
IVC	individuell ventilierte Käfige

IVM	intravitale Videofluoreszenzmikroskopie
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
LE	Lungenembolie
LPS	Lipopolysaccharide
MAC-1	Macrophage Antigen Complex-1
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MP	Mikropartikel
MPO	Myeloperoxidase
MW	molecular weight
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
µmol	Mikromol
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NADH	reduziertes Nicotinamidadeninukleotid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NE	Neutrophile Elastase
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
nm	Nanometer
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PBS	phosphate buffered saline
PCK	H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethylketone
PDI	Proteindisulfid-Isomerase
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität.
PMA	Porbol-Myristate-Acetate
PMN	polymorphkernige Leukozyten

PFA	Paraformaldehyd
PRP	platelet-rich plasma
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand 1
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
sog.	so genannt
Tab.	Tabelle
TAFI	thrombin activatable fibrinolysis inhibitor
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TLR4	thrombin-activated fibrinolytic inhibitor
TVT	tiefe Venenthrombose
U	Units
V.	Vena (lat.)
VAA	vollständig antagonisierbare Anästhesie
VTE	venöse Thromboembolie
vWF	von Willebrand Faktor
Wo	Woche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

X Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau einer Vene, modifiziert nach EKV ⁷	9
Abbildung 2: Adhäsionskaskade, modifiziert nach Schymeinsky et al. ⁴³	13
Abbildung 3: Entstehung von NETs, modifiziert nach Brinkmann et al. ³⁹	15
Abbildung 4: NETs Entstehung mit Hilfe von NE und MPO, modifiziert nach Papayannopoulos et al. ⁵²	16
Abbildung 5: Bakterienfang durch NETs, modifiziert nach Ma et al. ⁶¹	17
Abbildung 6: Endothel-Thrombozyten-Interaktion	19
Abbildung 7: Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion.....	20
Abbildung 8: Gerinnungskaskade, modifiziert nach Gailani et al. ⁸⁴	21
Abbildung 9: Durch die Ligatur verengte V. cava caudalis.....	30
Abbildung 10: Entnommener Thrombus	32
Abbildung 11: Strukturformel von PCK ¹⁰⁴	37
Abbildung 12: Strukturformel von Acridin-Orange ¹⁰⁵	37
Abbildung 13: Strukturformel von Rhodamin B ¹⁰⁷	38
Abbildung 14: Konfokaler Strahlengang ⁹⁵	43
Abbildung 15: Indirekte Immunmaskierung, modifiziert nach Mulisch et al. ⁹⁵	45
Abbildung 16: Makroskopische und mikroskopische Untersuchung des venösen Thrombus .	52
Abbildung 17: Leukozyten Rekrutierung 48h nach Flussverlangsamung.....	53
Abbildung 18: P-Selektin Expression des Endothels.....	54
Abbildung 19: Leukozytenakkumulation in vivo 6h nach Flussverlangsamung in der V. cava caudalis	55
Abbildung 20: Thrombusgewicht bei anti-Ly-6G behandelten Mäusen im Vergleich zu Isotyp IgG behandelten Mäusen	56
Abbildung 21: Visualisierung von NETs.....	58
Abbildung 22: Immunhistologische Visualisierung von NETs	59
Abbildung 23: Quantifizierung der Anzahl von NETs/mm ² in neutropenen Mäusen und Kontrollmäusen.....	60
Abbildung 24: Immunhistologische Visualisierung von NETs und prothrombotischen Faktoren	61
Abbildung 25: NETs und Thrombusgewicht bei DNase behandelten Mäusen im Vergleich zu Vehikel behandelten Mäusen.....	62

Abbildung 26: NETs und Thrombusgewicht bei Enoxaparin behandelten Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren.....	63
Abbildung 27: Immunhistologische Visualisierung von Thrombozyten.....	64
Abbildung 28: Immunhistologische Visualisierung von vWF	65
Abbildung 29: Leukozytenadhäsion, Plättchenadhäsion und Thrombusgewicht bei IL4-R/Iba-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen	67
Abbildung 30: Interaktion von Leukozyten und Plättchen bei Wildtypmäusen und IL4-R/Iba-Mäusen.....	68
Abbildung 31: Immunhistologische Visualisierung der Kolo-kalisation von Plättchen und NETs	69
Abbildung 32: NETs Bildung in IL4-R/Iba-Tieren im Vergleich zu Kontrollmäusen.....	70
Abbildung 33: Carstairs-Färbung eines entnommenen Thrombus 48h nach Flussverlangsamung in C57BL/6J-Mäusen	71
Abbildung 34: Thrombusgewicht von FXII ^{-/-} -Mäusen, FXII-Inhibitor behandelten Mäusen und FXI ^{-/-} -Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen	72
Abbildung 35: Quantifizierung der Fibrindichte in Wildtypmäusen und FXII ^{-/-} -Mäusen.....	73
Abbildung 36: Konfokale Visualisierung von NETs und FXII.....	73

XI Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien für die 2-Photonen Mikroskopie	41
Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper	48
Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper	48
Tabelle 4: Versuchsgruppen für die Depletion der neutrophilen Granulozyten	49
Tabelle 5: Versuchsgruppen für die Depletion der neutrophilen Granulozyten für die IVM ..	49
Tabelle 6: Versuchsgruppen für die DNase-Behandlung	49
Tabelle 7: Versuchsgruppen für die 2-Photonen-Mikroskopie	50
Tabelle 8: Versuchsgruppen für die Enoxaparin-Behandlung	50
Tabelle 9: Versuchsgruppen für Leukozyten- und Plättchenrekrutierung	50
Tabelle 10: Versuchsgruppen für die Rolle des intrinsischen Gerinnungssystems	50
Tabelle 11: Blutbild von Kontrollmäusen und neutropenen Mäusen	55

XII Literaturverzeichnis

1. Pötzsch, B. & Madlener, K. Gerinnungskonsil, Rationelle Diagnostik und Therapie von Gerinnungsstörungen, (Thieme Verlag, Stuttgart).
2. Esmon, C. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Rev* 23, 225-229. (2009).
3. Böcker, Repetitorium der Pathologie, (Urban & Fischer, München, 2008).
4. Schmidt & Lang, Physiologie des Menschen, (Springer, Heidelberg, 2007).
5. Welsch, Histologie, (Urban & Fischer, München, 2006).
6. Liebich, H.-G. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, (Schattauer, Stuttgart, 2004).
7. EKU, <http://people.eku.edu/ritchisong/301notes5.htm>, (Zugriff: 30.01.12).
8. Roger, V.L., et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 123, e18-e209 (2011).
9. Moll, S. & Mackman, N. Venous thromboembolism: a need for more public awareness and research into mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 367-369 (2008).
10. Heit, J.A. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 370-372 (2008).
11. Cohen, A.T., et al. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost* 98, 756-764. (2007).
12. Silverstein, M.D., et al. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med* 158, 585-593 (1998).
13. Koellnberger, M. In vivo Analyse der zellulären und molekularen Mechanismen der arteriellen und venösen Thrombose. (2007).
14. Payling Weight, H., Osborn, S.B. & Edmonds, D. EFFECT OF POSTOPERATIVE BED REST AND EARLY AMBULATION ON THE RATE OF VENOUS BLOOD-FLOW. *The Lancet* 257, 22-25 (1951).
15. Wright, H.P., Osborn, S.B. & Hayden, M. VENOUS VELOCITY IN BEDRIDDEN MEDICAL PATIENTS. *The Lancet* 260, 699-700 (1952).
16. Hughes, R.J., et al. Frequency of venous thromboembolism in low to moderate risk long distance air travellers: the New Zealand Air Traveller's Thrombosis (NZATT) study. *The Lancet* 362, 2039-2044 (2003).

17. Heit, J.A., et al. Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: a 30-year population-based study. *Ann Intern Med* 143, 697-706 (2005).
18. Chew, H.K., Wun, T., Harvey, D., Zhou, H. & White, R.H. Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. *Arch Intern Med* 166, 458-464 (2006).
19. Lapostolle, F., et al. Severe pulmonary embolism associated with air travel. *N Engl J Med* 345, 779-783 (2001).
20. Goodrich, S.M. & Wood, J.E. Peripheral Venous Distensibility and Velocity of Venous Blood Flow During Pregnancy or During Oral Contraceptive Therapy. *Am J Obstet Gynecol* 90, 740-744 (1964).
21. Sevitt, S. Organic canalisation and vascularisation of deep vein thrombi studied with dyed-micropaque injected at necropsy. *J Pathol* 100, Pi (1970).
22. Wakefield, T.W., et al. Venous Thrombosis–Associated Inflammation and Attenuation With Neutralizing Antibodies to Cytokines and Adhesion Molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 258-268 (1995).
23. Bucek, R.A., Reiter, M., Quehenberger, P. & Minar, E. C-reactive protein in the diagnosis of deep vein thrombosis. *Br J Haematol* 119, 385-389 (2002).
24. Smeeth, L., et al. Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet* 367, 1075-1079 (2006).
25. Lopez, J.A., Kearon, C. & Lee, A.Y.Y. Deep Venous Thrombosis. *Hematology* 2004, 439-456 (2004).
26. Hamer, J.D., Malone, P.C. & Silver, I.A. The PO₂ in venous valve pockets: its possible bearing on thrombogenesis. *Br J Surg* 68, 166-170 (1981).
27. Pinsky, D.J., et al. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J Clin Invest* 97, 493-500 (1996).
28. Wagner, D.D., Olmsted, J.B. & Marder, V.J. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol* 95, 355-360 (1982).
29. Bonfanti, R., Furie, B.C., Furie, B. & Wagner, D.D. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 73, 1109-1112 (1989).
30. Closse, C., et al. Influence of hypoxia and hypoxia-reoxygenation on endothelial P-selectin expression. *Thromb Res* 85, 159-164 (1997).
31. McEver, R.P. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* 86, 746-756 (2001).

32. Ruggeri, Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 1, 1335-1342 (2003).
33. Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33, 657-670 (2010).
34. von Engelhardt, W. *Physiologie der Haustiere*, (Enke Verlag, Stuttgart, 2010).
35. Bainton, D.F., Ullyot, J.L. & Farquhar, M.G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* 134, 907-934 (1971).
36. Harris, E.S., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. & Zimmerman, G.A. The leukocyte integrins. *J Biol Chem* 275, 23409-23412 (2000).
37. Segal, A.W., Geisow, M., Garcia, R., Harper, A. & Miller, R. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* 290, 406-409 (1981).
38. Segal, A.W., Dorling, J. & Coade, S. Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and morphological studies. J Cell Biol* 85, 42-59 (1980).
39. Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 5, 577-582 (2007).
40. Massberg, S., et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 16, 887-896 (2010).
41. Steinhart, A. *Die Rolle von Leukozyten in der Entstehung der venösen Thrombose-in vivo Untersuchungen im Mausmodell* (2012).
42. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678-689 (2007).
43. Schymeinsky, J., Sperandio, M. & Walzog, B. The mammalian actin-binding protein 1 (mAbp1): a novel molecular player in leukocyte biology. *Trends Cell Biol* 21, 247-255 (2011).
44. Atherton, A. & Born, G.V. Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leucocytes to blood vessel walls. *J Physiol* 222, 447-474 (1972).
45. Kansas, G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88, 3259-3287 (1996).
46. Ley, K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 9, 263-268 (2003).
47. Norman, K.E., Moore, K.L., McEver, R.P. & Ley, K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 86, 4417-4421 (1995).

48. Campbell, J.J., et al. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279, 381-384 (1998).
49. Campbell, J.J., Qin, S., Bacon, K.B., Mackay, C.R. & Butcher, E.C. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J Cell Biol* 134, 255-266 (1996).
50. Brinkmann, V., et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-1535 (2004).
51. Fuchs, T.A., et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176, 231-241 (2007).
52. Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., Hakkim, A. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 191, 677-691 (2010).
53. Urban, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 8, 668-676 (2006).
54. Beiter, K., et al. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16, 401-407 (2006).
55. Buchanan, J.T., et al. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16, 396-400 (2006).
56. Sumbly, P., et al. Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1679-1684 (2005).
57. Udou, T. & Ichikawa, Y. Characteristics of extracellular nuclease production in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 23, 679-684 (1979).
58. Puyet, A., Greenberg, B. & Lacks, S.A. Genetic and structural characterization of endA. A membrane-bound nuclease required for transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* 213, 727-738 (1990).
59. Gupta, A.K., et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett* 584, 3193-3197 (2010).
60. Clark, S.R., et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13, 463-469 (2007).
61. Ma, A.C. & Kubes, P. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J Thromb Haemost* 6, 415-420 (2008).
62. Fuchs, T.A., et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15880-15885 (2010).

63. Pal, P., Starr, T. & Gertler, M. Neutralization of heparin by histone and its subfractions. *Thromb Res* 31, 69-79. (1983).
64. Napirei, M., Ludwig, S., Mezrhah, J., Klockl, T. & Mannherz, H.G. Murine serum nucleases--contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNase1 and DNase1-like 3 (DNase113). *FEBS J* 276, 1059-1073 (2009).
65. Cruz, M.A., Diacovo, T.G., Emsley, J., Liddington, R. & Handin, R.I. Mapping the glycoprotein Ib-binding site in the von willebrand factor A1 domain. *J Biol Chem* 275, 19098-19105 (2000).
66. Lopez, J.A. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coagul Fibrinolysis* 5, 97-119 (1994).
67. Kuwahara, M., Sugimoto, M., Tsuji, S., Miyata, S. & Yoshioka, A. Cytosolic calcium changes in a process of platelet adhesion and cohesion on a von Willebrand factor-coated surface under flow conditions. *Blood* 94, 1149-1155 (1999).
68. Brill, A., et al. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* 117, 1400-1407. Epub 2010 Oct 1419. (2010).
69. Stenberg, P.E., McEver, R.P., Shuman, M.A., Jacques, Y.V. & Bainton, D.F. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 101, 880-886 (1985).
70. Evangelista, V., et al. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 93, 876-885 (1999).
71. Kirton, C.M. & Nash, G.B. Activated platelets adherent to an intact endothelial cell monolayer bind flowing neutrophils and enable them to transfer to the endothelial surface. *J Lab Clin Med* 136, 303-313 (2000).
72. Simon, D.I., et al. Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 192, 193-204 (2000).
73. Wang, Y., et al. Leukocyte engagement of platelet glycoprotein Iba1 via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury. *Circulation* 112, 2993-3000 (2005).
74. Zago, A.C., et al. The importance of the interaction between leukocyte integrin Mac-1 and platelet glycoprotein Iba1 for leukocyte recruitment by platelets and for the inflammatory response to vascular injury. *Arq Bras Cardiol* 90, 54-63 (2008).
75. Pauer, H., et al. Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene-a model for contact phase activation in vivo. *Thromb Haemost* 92, 503-508. (2004).
76. Osterud, B. & Rapaport, S.I. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5260-5264 (1977).

77. Gailani, D. & Broze, G.J., Jr. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 253, 909-912 (1991).
78. Renne, T., et al. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 202, 271-281 (2005).
79. Griep, M.A., Fujikawa, K. & Nelsestuen, G.L. Binding and activation properties of human factor XII, prekallikrein, and derived peptides with acidic lipid vesicles. *Biochemistry* 24, 4124-4130 (1985).
80. Smith, S.A., et al. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 903-908 (2006).
81. Ruiz, F.A., Lea, C.R., Oldfield, E. & Docampo, R. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *J Biol Chem* 279, 44250-44257 (2004).
82. Kaminishi, H., et al. Activation of blood clotting factors by microbial proteinases. *FEMS Microbiol Lett* 121, 327-332 (1994).
83. Gailani, D. & Renne, T. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *J Thromb Haemost* 5, 1106-1112 (2007).
84. Wang, X., et al. Effects of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice. *J Thromb Haemost* 3, 695-702 (2005).
85. Rosen, E.D., Gailani, D. & Castellino, F.J. FXI is essential for thrombus formation following FeCl₃-induced injury of the carotid artery in the mouse. *Thromb Haemost* 87, 774-776 (2002).
86. Jackson Laboratory. JAX Mice Database - 000664 C57BL/6J. <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html> (Zugriff: 30.01.2012).
87. Faust, N., Varas, F., Kelly, L.M., Heck, S. & Graf, T. Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* 96, 719-726 (2000).
88. Kanaji, T., Russell, S. & Ware, J. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 100, 2102-2107 (2002).
89. Gailani, D., Lasky, N.M. & Broze, G.J., Jr. A murine model of factor XI deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 8, 134-144 (1997).
90. Gesellschaft für Versuchstierkunde. Tiergerechte Haltung: Labormäuse. (2007).
91. Erhardt, W. Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen, (Schattauer, Stuttgart, 2004).
92. Gesellschaft für Versuchstierkunde. Empfehlungen zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. (2009).

93. Golde, W.T., Gollobin, P. & Rodriguez, L.L. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY)* 34, 39-43 (2005).
94. Mulisch, M. & Welsch, U. *Romeis Mikroskopische Technik*, (Spektrum, Heidelberg, 2010).
95. BD Bioscience. Purified Rat Anti-Mouse Ly6G.
http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/mouse/live/web_enabled/28551D_551459.pdf (Zugriff: 30.01.2012).
96. Daley, J.M., Thomay, A.A., Connolly, M.D., Reichner, J.S. & Albina, J.E. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *Journal of Leukocyte Biology* 83, 64-70 (2008).
97. Fermentas. DNase I, RNase-free.
http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/coa_pdf/coa_en0521.pdf (Zugriff: 30.01.12).
98. Emfret analytics. X488.
http://www.emfret.com/fileadmin/user_upload/Datasheets/X488.pdf (Zugriff: 30.01.2012).
99. Invitrogen. Sytox Green Nuclei Acid Stain.
<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07020.pdf> (Zugriff: 30.01.2012).
100. Losman, M.J., Fasy, T.M., Novick, K.E. & Monestier, M. Monoclonal autoantibodies to subnucleosomes from a MRL/Mp(-)/+ mouse. Oligoclonality of the antibody response and recognition of a determinant composed of histones H2A, H2B, and DNA. *J Immunol* 148, 1561-1569 (1992).
101. Mousa, S.A., Linhardt, R., Francis, J.L. & Amirkhosravi, A. Anti-metastatic effect of a non-anticoagulant low-molecular-weight heparin versus the standard low-molecular-weight heparin, enoxaparin. *Thromb Haemost* 96, 816-821 (2006).
102. Robert, S., Bertolla, C., Masereel, B., Dogne, J.M. & Pochet, L. Novel 3-carboxamide-coumarins as potent and selective FXIIa inhibitors. *J Med Chem* 51, 3077-3080 (2008).
103. Bachem. H-D-Pro-Phe-Arg-chloromethylketone.
<http://shop.bachem.com/ep6sf/peptides/chloromethylketones/4013721/prodN1210.html> (Zugriff: 30.01.2012).
104. Sigma-Aldrich. Acridine Orange hemi(zinc chloride) salt.
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=de&N4=A6014|SIGMA&N=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC&cm_sp=Customer_Favorites_-_Detail_Page_-_Image-A6014 (Zugriff: 30.01.2012).
105. Molecular Probes. Acridine orange, 1g.
<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/A1301?ICID=search-product> (Zugriff: 30.01.2012).

106. Sigma-Aldrich. Rhodamin B.
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=283924|ALDRICH&N25=0&QS=ON&F=SPEC
(Zugriff: 30.01.2012).
107. Massberg, S., Eisenmenger, S., Enders, G., Krombach, F. & Messmer, K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)* 198, 23-35 (1998).
108. Campagnola, P.J. & Loew, L.M. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nat Biotechnol* 21, 1356-1360 (2003).
109. Mohler, W., Millard, A.C. & Campagnola, P.J. Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods* 29, 97-109 (2003).
110. Electron Microscopy Science. Carstairs' Method for Fibrin & Platelets.
<http://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/26381.aspx> (Zugriff: 30.01.2012).
111. Angelillo-Scherrer, A., et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med* 7, 215-221. (2001).
112. Eitzman, D.T., Westrick, R.J., Nabel, E.G. & Ginsburg, D. Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote vascular thrombosis in mice. *Blood* 95, 577-580 (2000).
113. Ward, C.M., Tetaz, T.J., Andrews, R.K. & Berndt, M.C. Binding of the von Willebrand factor A1 domain to histone. *Thromb Res* 86, 469-477 (1997).
114. Bergmeier, W., Chauhan, A.K. & Wagner, D.D. Glycoprotein Ibalpha and von Willebrand factor in primary platelet adhesion and thrombus formation: lessons from mutant mice. *Thromb Haemost* 99, 264-270 (2008).
115. Henke, P., et al. Deep vein thrombosis resolution is modulated by monocyte CXCR2-mediated activity in a mouse model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1130-1137. Epub 2004 Apr 1122. (2004).
116. Day, S., Reeve, J., Myers, D. & Fay, W. Murine thrombosis models. *Thromb Haemost* 92, 486-494. (2004).
117. Myers, D., et al. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Surg* 38, 1075-1089. (2003).
118. Mammen, E. Pathogenesis of venous thrombosis. *Chest* 102, 640S-644S. (1992).
119. Warlow, C., Ogston, D. & Douglas, A. Deep venous thrombosis of the legs after strokes. Part I--incidence and predisposing factors. *Br Med J* 1, 1178-1181. (1976).
120. Scurr, J.H., et al. Frequency and prevention of symptomless deep-vein thrombosis in long-haul flights: a randomised trial. *Lancet* 357, 1485-1489 (2001).

121. Risk of and prophylaxis for venous thromboembolism in hospital patients. Thromboembolic Risk Factors (THRIFT) Consensus Group. *BMJ* 305, 567-574 (1992).
122. Culver, D., Crawford, J.S., Gardiner, J.H. & Wiley, A.M. Venous thrombosis after fractures of the upper end of the femur. A study of incidence and site. *J Bone Joint Surg Br* 52, 61-69 (1970).
123. Warlow, C., Ogston, D. & Douglas, A.S. Deep venous thrombosis of the legs after strokes: Part 2-Natural history. *Br Med J* 1, 1181-1183 (1976).
124. Sevitt, S. The structure and growth of valve-pocket thrombi in femoral veins. *J Clin Pathol* 27, 517-528. (1974).
125. Diehm, C., Stammler, F. & Amendt, K. Die tiefe Venenthrombose. (Deutsches Ärzteblatt, 1997).
126. Day, S.M., et al. Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood* 105, 192-198 (2005).
127. Roumen-Klappe, E., et al. Inflammation in deep vein thrombosis and the development of post-thrombotic syndrome: a prospective study. *J Thromb Haemost* 7, 582-587. Epub 2009 Jan 2019. (2009).
128. Diaz, J., et al. Thrombogenesis with continuous blood flow in the inferior vena cava. *Thrombosis and Haemostasis* 104, 366-375 (2010).
129. Stewart, G.J., Ritchie, W.G. & Lynch, P.R. Venous endothelial damage produced by massive sticking and emigration of leukocytes. *Am J Pathol* 74, 507-532 (1974).
130. Zhou, J., May, L., P, L., Gross, P. & Weitz, J. Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 863-869. Epub 2009 Mar 2005. (2009).
131. Varma, M., et al. Neutropenia impairs venous thrombosis resolution in the rat. *J Vasc Surg* 38, 1090-1098. (2003).
132. Myers, D., et al. Selectins Influence Thrombosis in a Mouse Model of Experimental Deep Venous Thrombosis. *Journal of Surgical Research* 108, 212-221 (2002).
133. Ramacciotti, E., et al. Evaluation of Soluble P-Selectin as a Marker for the Diagnosis of Deep Venous Thrombosis. (2011).
134. Garcia-Romo, G., et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci* 3, 73ra20. (2011).
135. Ammollo, C.T., Semeraro, F., Xu, J., Esmon, N.L. & Esmon, C.T. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Thromb Haemost* 9, 1795-1803 (2011).

136. McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L. & Bainton, D.F. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 84, 92-99 (1989).
137. PEP-Group, P.E.P.P.t.C.G. Prevention of pulmonary embolism and deep vein thrombosis with low dose aspirin: Pulmonary Embolism Prevention (PEP) trial. *Lancet* 355, 1295-1302 (2000).
138. Owens, A.P., 3rd & Mackman, N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. *Thromb Haemost* 104, 432-439 (2010).
139. Colman, R.W. & Schmaier, A.H. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 90, 3819-3843 (1997).
140. Konings, J., et al. Factor XIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin. *Blood* 118, 3942-3951 (2011).
141. Cheng, Q., et al. A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo. *Blood* 116, 3981-3989 (2010).
142. Koellnberger, M. Abstract 448: Platelets Contribute to Arterial and Venous Thrombosis in vivo. *Circulation* (2007).

XIII Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Manfred Stangassinger bedanke ich mich für die Übernahme der Arbeit, deren Durchsicht und Einreichung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg bedanke ich mich besonders für die interessante Themenstellung und die kompetente wissenschaftliche Projektbetreuung, sowie für seine Hilfestellungen, Anregungen und Diskussionsbereitschaft bei allen auftretenden Fragen.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe Dr. med. vet. Marie-Luise von Brühl, Dr. med. Konstantin Stark, Dr. med. vet. Susanne Sauer, Annekathrin Eckart, Dipl.-Biologe Michael Lorenz, Dr. Anca Laura Tirniceriu, Raphaelae Coletti, Irene Schubert, Anne-Maria Suhr und Dr. med. vet. Alexander Steinhart für die liebevolle, herzliche Arbeitsatmosphäre, die unvergleichliche, hervorragende Betreuung, sowie für die kompetente Hilfestellung, einmalige Unterstützung und Motivation.

Vor allem bei meiner Betreuerin, Frau Dr. med. vet. Marie-Luise von Brühl, möchte ich mich nochmals besonders für die beispiellose Betreuung und Unterstützung bedanken.

Bei Nicole Blount, Tanja Irl und Bastian Helmer möchte ich mich besonders für die kompetente, verantwortungsbewusste und zuverlässige Tierpflege bedanken.

Desweiteren bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Engelmann für die Möglichkeit der Durchführung der konfokalen Mikroskopie.

Zudem danke ich Herrn PD. Dr. med. vet. Sven Reese für seine Hilfestellung bei der Erstellung der Statistik.

Ich möchte mich auch besonders bei meinen Freunden Raphaela Kläger, Maureen Wagener, Dr. med. vet. Franziska Holder, Gisela Treyz und Manuel Menze bedanken, welche mich durch meine Dissertation begleitet und großartig unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, welche mir mein Studium ermöglicht haben und mir immer mit Unterstützung und großem Interesse zur Seite gestanden haben.