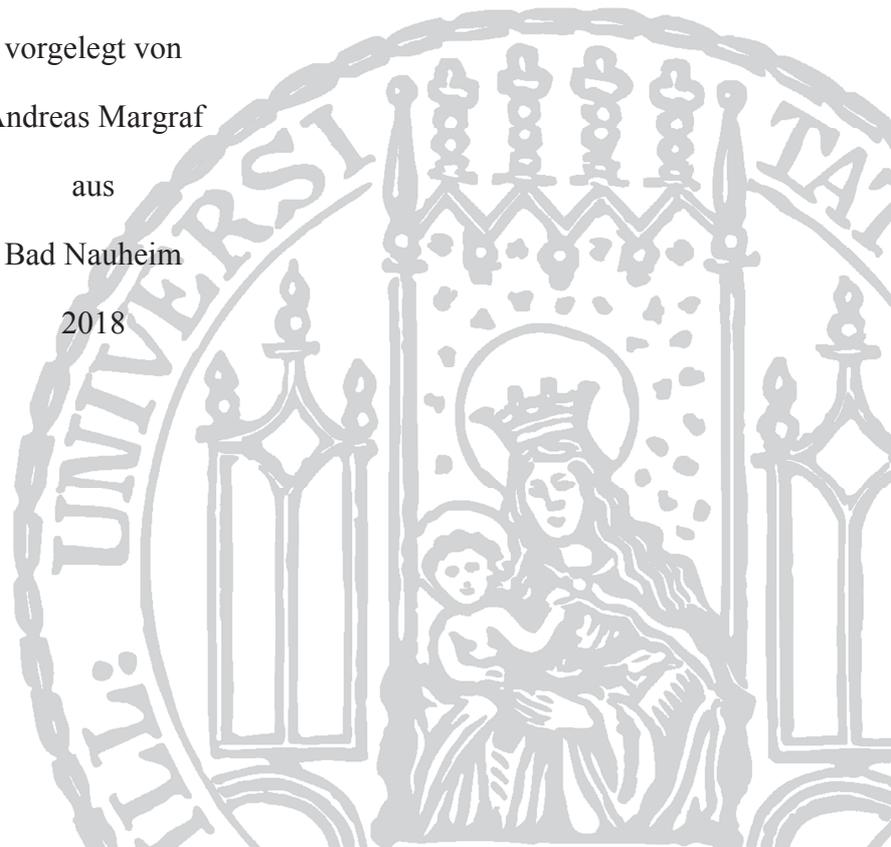


Aus dem Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
komm. Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL  
ehem. Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich POHL

**Untersuchung der ontogenetischen Regulation der Thrombozytenfunktion  
im Mausfetus *in-vivo* und *in-vitro***

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

vorgelegt von  
Andreas Margraf  
aus  
Bad Nauheim  
2018



**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Sperandio

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Welsch  
Prof. Dr. Michael Spannagl  
PD Dr. Christoph Bidlingmaier

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. med. Claudia Nußbaum

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2018

Teile dieser Arbeit (eingeschlossen der Abbildung von Ergebnissen) wurden in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht:

- Sperandio et al.; Blood. 2013; 121:e118-e128; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-447144> (Copyright ASH)
- Margraf und Nussbaum et al.; Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017; 37:1076-1086. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.308464 (Copyright AHA)

Meiner Familie

„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an, interessant zu werden, wo sie aufhört.“ (Justus von Liebig)

# Inhaltsverzeichnis

KAPITEL 1 .....	10
1. Einleitung – Where’s flow, there’s life (Wo Fluss ist, da ist Leben) .....	10
1.1 Thrombozyten und Hämostase .....	10
1.1.1 Thrombozyten Granula .....	11
1.1.2 Thrombozytäre Glykoproteine und Integrine .....	11
1.1.3 ADP-, Kollagen- und Thrombinrezeptoren .....	14
1.1.4 Thrombozytenadhäsion .....	15
1.1.5 Thrombozytenaktivierung .....	16
1.1.6 Thrombozytenaggregation .....	17
1.1.7 Thrombozyten-Leukozyteninteraktion .....	17
1.2 Thrombozyten in der fetalen Entwicklung und bei Neonaten .....	17
1.2.1 Thrombozytäre Reifung .....	17
KAPITEL 2 .....	21
2. Hypothese und Zielsetzung .....	21
KAPITEL 3 .....	22
3. Material und Methoden .....	22
3.1 Material .....	22
3.1.1 Geräte .....	22
3.1.2 Mikroskope und Zubehör .....	24
3.2 Substanzen .....	25
3.2.1 Chemikalien und Substanzen .....	25
3.2.2 Puffer .....	27
3.2.3 Fluoreszenzfarbstoffe .....	28
3.2.4 Primäre Antikörper .....	29
3.2.5 Sekundäre Antikörper .....	30
3.2.6 Verbrauchsmittel .....	30
3.2.7 Narkosemittel .....	30
3.2.8 Software .....	31
3.3 Versuchstiere .....	31
3.4 Narkose .....	32
3.5 Herstellung von Mikroinjektionskapillaren .....	32
3.6 Versuchsablauf .....	33
3.6.1 Präparation der Dottersackgefäße .....	33
3.6.2 Injektion in fetale Dottersackgefäße .....	35
3.6.3 Mikroskopie und Thrombusinduktion .....	36

3.7	Multiphotonenmikroskopie .....	37
3.8	Gewinnung adulter und fetaler Blutproben .....	37
3.9	Verfahren zur Isolierung von Thrombozyten aus Blutproben .....	38
3.10	Thrombozytenparameter .....	39
3.11	Durchflusszytometrie .....	39
3.11.1	Bestimmung der fetalen Thrombozytenzahlen .....	39
3.11.2	Bestimmung der Oberflächenexpression und Aktivität von Thrombozyten .....	40
3.12	Western Blot .....	41
3.13	Thrombozyten-Transfusion und Analyse der Interaktion fetaler Leukozyten mit adulten Thrombozyten .....	41
3.14	<i>In-vivo</i> Färbung und Marker von fetalen Zellen .....	42
3.15	Statistik .....	43
KAPITEL 4	.....	44
4.	Ergebnisse .....	44
4.1	Entwicklung und Etablierung von Präparations- und Bildgebungsmethoden zur Darstellung der Thrombozytenfunktion im Mausfetus <i>in-vivo</i> .....	44
4.1.1	Anatomische Analyse der fetalen Zirkulation .....	44
4.1.2	Vorversuche zur Thrombusinduktion .....	45
4.1.3	Mikroinjektion .....	46
4.1.4	Fluoreszenzmessung .....	46
4.2	<i>In-vivo</i> Analyse der Thrombozytenfunktion und Thrombusbildung .....	47
4.2.1	Thrombozytenadhäsion während der fetalen Entwicklung – „Onset“ .....	47
4.2.2	Thrombusbildung in jungen Feten – „First occlusion“ .....	48
4.2.3	Thrombusstabilität in jungen Feten – „Reflow“ .....	49
4.2.4	Vollständiger, stabiler Gefäßverschluss bei jungen Feten – „Final occlusion“ .....	50
4.2.5	Mikrovaskuläre Parameter .....	51
4.3	Durchflusszytometrische Untersuchungen .....	51
4.3.1	Thrombozytenzahlen während der fetalen Entwicklung .....	52
4.3.2	Expression wichtiger thrombozytärer Oberflächenmoleküle und -rezeptoren .....	52
4.3.3	Aktivierbarkeit von fetalen Thrombozyten .....	53
4.4	Thrombozytenmorphologie während der fetalen Entwicklung .....	55
4.5	Western-Blot Untersuchungen .....	55
4.5.1	P-Selectin Gehalt in fetalen Thrombozyten .....	55
4.5.2	Expression von Thrombinrezeptoren auf fetalen Thrombozyten .....	56
4.5.3	Intrazelluläres Signaling .....	57
4.6	Transfusion adulter Thrombozyten in den fetalen Kreislauf .....	58
4.7	Interaktion fetaler Leukozyten mit adulten Thrombozyten <i>in-vivo</i> .....	59

KAPITEL 5 .....	60
5. Diskussion .....	60
5.1 Diskussion des Tiermodells.....	60
5.1.1 Ethische Bedenken .....	60
5.1.2 Technische Umsetzung und Schwierigkeiten.....	60
5.2 Diskussion weiterer Versuchsmethoden.....	62
5.2.1 Durchflusszytometrie .....	62
5.2.2 Idexx Hematology Analyzer.....	62
5.2.3 Transfusion isolierter Thrombozyten .....	63
5.3 Diskussion der Ergebnisse.....	63
5.3.1 <i>In-vivo</i> Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung in murinen Feten .....	64
5.3.2 Thrombusstabilität in der fetalen Entwicklung .....	65
5.3.3 Thrombozytencounts, -größe und Einfluss auf Thrombusentstehung.....	65
5.3.4 Oberflächenexpression, P-Selectin Gehalt und Aktivierbarkeit fetaler Thrombozyten .....	67
5.3.5 <i>In-vivo</i> Beobachtung transfundierter Thrombozyten in Feten.....	70
5.3.6 Thrombozyten-Leukozyteninteraktion in der fetalen Entwicklung.....	71
5.3.7 Nicht untersuchte Bestandteile .....	71
5.4 Klinische Bedeutung .....	72
5.5 Ausblick.....	72
KAPITEL 6 .....	74
6. Zusammenfassung.....	74
ANHANG.....	76
7. Literaturverzeichnis.....	76
8. Abbildungsverzeichnis .....	88
9. Tabellenverzeichnis.....	89
10. Danksagung.....	90
11. Vorträge und Publikationen.....	92
12. Eidesstattliche Versicherung .....	94

## Abkürzungsverzeichnis:

Standardmäßige Abkürzungen für Einheiten (Liter, Meter etc.) wurden nicht aufgeführt.

ADP	Adenosin Diphosphat
AU	Arbitrary Units
CAM	Cell Adhesion Molecules (Zelladhäsionsmoleküle)
COX	Cyclooxygenase
DA	Ductus Arteriosus
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	Green Fluorescent Protein
Gp	Glykoprotein
HRP	Horseradish-Peroxidase
HSPC	Hematopoietic Stem / Progenitor Cell
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
IVM	Intravitalmikroskopie
JAK2	Janus Kinase 2
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MPLSM	Multiphotonen-Laserscanning-Mikroskopie
MPV	Mean Platelet Volume
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
PAR	Protease Activated Receptor
PDA	Persistierender Ductus Arteriosus
PDW	Platelet Distribution Width

PF4	Platelet-Factor 4
PFA-100	Platelet Function Analyser 100
PLCR	Platelet Large Cell Ratio
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
RFP	Red Fluorescent Protein
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RIAM	RAP1-GTP-interacting adapter molecule
SEM	Standard Error of Mean
SFK	Src-Family-Kinase
TPO	Thrombopoietin
TRITC	Tetramethylrhodamine Isothiocyanat
TxA2	Thromboxan A2
ulvWF	unusually large von-Willebrand-Faktor
vWF	von-Willebrand-Faktor
YS	Yolk-Sac (Dottersack)

# KAPITEL 1

---

## 1. Einleitung – Where’s flow, there’s life (Wo Fluss ist, da ist Leben)

Der menschliche Körper als System einer in sich geschlossenen, funktionell ausgeglichenen Blutzirkulation ist in der Lage sich gegen verschiedene Angriffe von außen zu verteidigen. Voraussetzung hierfür ist jedoch ein intaktes und ausgereiftes Organ- und Gefäßsystem mit funktionsfähigen zirkulierenden Blutbestandteilen. Der genaue Ablauf der Reifung des entstehenden Organismus wirft nach wie vor Fragen auf, insbesondere im Hinblick auf Zeitpunkt und Physiologie der geforderten Funktionen. Unvollständige oder ausbleibende Entwicklungen sind in der Frühgeborenenmedizin sichtbar und stellen das unreife Neugeborene ex-uteri vor die Aufgabe, mit teils unbewältigbaren Stressoren und Gefahren umzugehen.

Frühgeborene haben ein erhöhtes Risiko für Blutungskomplikationen, wie z.B. intraventrikuläre Hämorrhagien (IVH) (Ballabh, 2010). Auch wurde in jüngerer Zeit die Beteiligung von Thrombozyten im Rahmen des Verschlusses des Ductus Arteriosus (DA) beschrieben, bei welchem eine Dysfunktion oder Verminderung der Thrombozytenzahl zur Persistenz (PDA) dieses fetalen Shuntgefäßes führt (Echtler et al., 2010). Während eine gute Aktivierbarkeit und Funktion der Thrombozyten Blutungen stoppen bzw. verhindern kann, könnte eine unverhältnismäßige Überaktivität zu einem pathologischen Verschluss von lebenswichtigen Gefäßrouten führen und hierdurch die lebens- und überlebenswichtige Zufuhr von Sauerstoff, Nährstoffen und auch Wachstumsfaktoren behindern (Michelson, 2013). Die Konsequenz einer unzureichenden Blutversorgung wird unter anderem anhand der Plazentainsuffizienz, z.B. im Rahmen eines Antiphospholipidsyndroms, sichtbar (Di Prima et al., 2011; Neerhof und Thaete, 2008).

Während die hämostatischen Prozesse im adulten Organismus gut erforscht sind, fehlen grundlegende Erkenntnisse zur Thrombozytenfunktion im lebenden, sich entwickelnden Fetus. Vor diesem Hintergrund wird in der vorliegenden Arbeit ein neu entwickeltes Mikroskopiemodell zur *in-vivo* Untersuchung der Reifung der Thrombozytenfunktion in der Maus etabliert und beschrieben. Neben der *in-vivo* Analyse werden *in-vitro* Untersuchungen quantitativer und funktioneller Aspekte der Thrombozyten zur Ursachensuche angeführt, sowie mögliche klinische Konsequenzen der Ergebnisse erörtert und kritisch diskutiert.

### 1.1 Thrombozyten und Hämostase

Thrombozyten, die lange einzig in ihrer Eigenschaft als „First-line-of-defense“ (erste Verteidigungslinie) der Blutgerinnung (Hämostase; griechisch für Blut-Stauung oder -stockung) wahrgenommen wurden (Lowenberg et al., 2010), erfuhren in jüngerer Zeit eine Neuorientierung, indem ihnen auch weitergehende Funktionen im Rahmen der

Atherosklerose, Gefäßentstehung und Immunabwehr zugeschrieben werden (Jenne und Kubes, 2015; Kisucka et al., 2006; Lievens und von Hundelshausen, 2011).

Ihre Erstbeschreibung unter dem Begriff der Blutplättchen geht auf das Jahr 1882 zurück, als sie von dem italienischen Pathologen Giulio Bizzozero als im Blut zirkulierend und an einer Thrombusentstehung beteiligt wahrgenommen wurden (Ribatti und Crivellato, 2007).

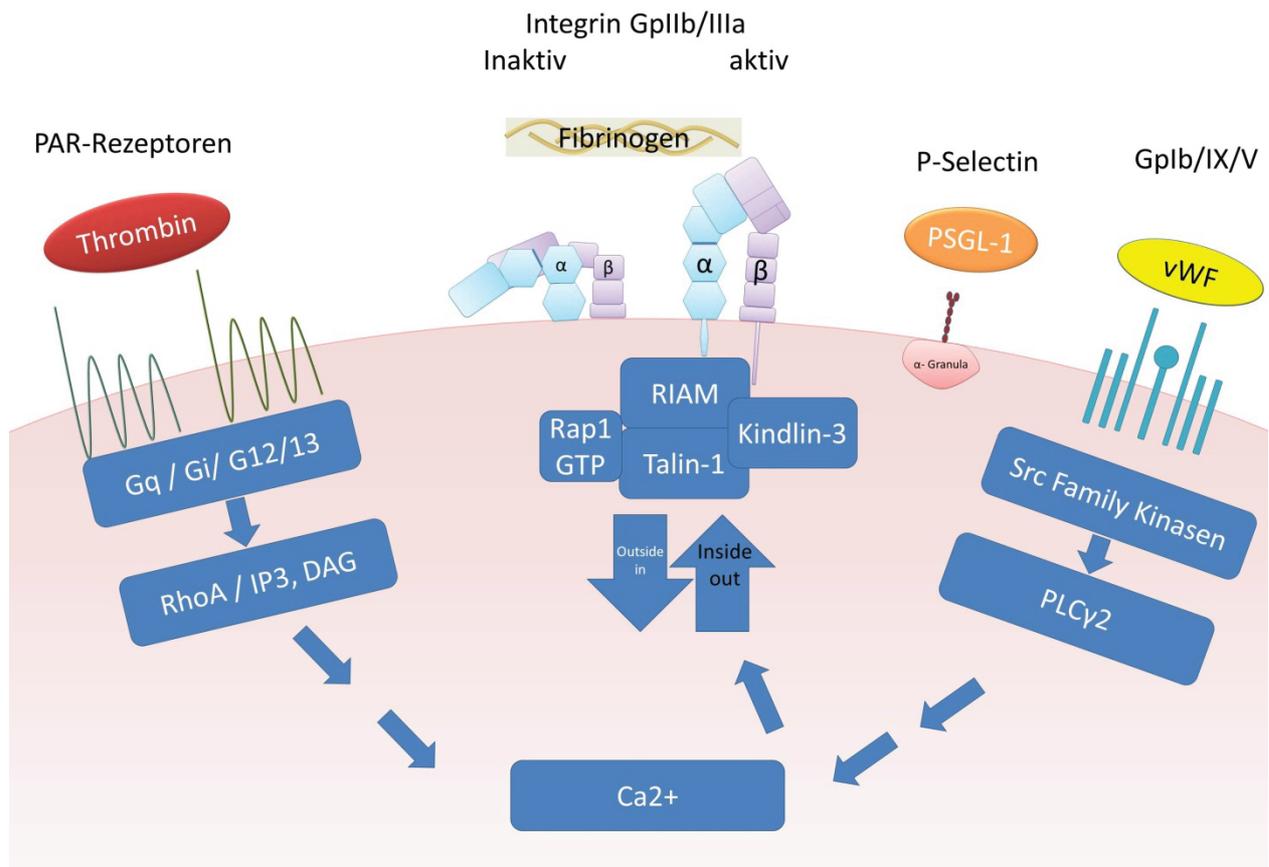
Mit einer Größe von ca. 2,5  $\mu\text{m}$  im adulten Organismus (Tober et al., 2007) zählen die diskoiden, RNA-haltigen Thrombozyten zu den kleinsten korpuskulären Bestandteilen des Blutes. Die Entstehung der Thrombozyten im adulten Organismus erfolgt im Knochenmark und konnte elegant im Tiermodell nachvollzogen werden. Sie entstehen aus Megakaryozyten, ihren um ein vielfaches größeren Vorläuferzellen. Hierbei kommt es zu einer Ausstülpung megakaryozytärer Ausläufer („Proplatelets“) in den Blutstrom und der Abschnürung von Thrombozyten in die Blutbahn (Junt et al., 2007). Die Funktion der Proplatelets im Sinne der Thrombopoese konnte *in-vivo* und *in-vitro* bestätigt werden (Thon und Italiano, 2010). Aufgrund des fehlenden Zellkerns, sowie der Tatsache, dass sie als Abschnürungen aus Megakaryozyten hervorgehen, werden Thrombozyten teilweise als Subfragmente bezeichnet (Wandall et al., 2012).

### **1.1.1 Thrombozyten Granula**

Thrombozyten enthalten  $\alpha$ -Granula und Dense-Granula.  $\alpha$ -Granula beinhalten unter anderem P-Selectin, vWF, Fibrinogen,  $\alpha 2\text{b}\beta 3$ (GpIIb/IIIa)-Integrin, sowie Faktor V und Faktor VIII der Gerinnungskaskade (Reed, 2004). Dense-Granula enthalten unter anderem Calcium, Magnesium, ADP und Serotonin, welche wichtige Bestandteile der Aktivierungsverstärkung im Rahmen der Thrombusentstehung darstellen (Reed, 2004). Während der Thrombozytenaktivierung kommt es zu einer Sekretion des Granula-Inhaltes, bzw. einer Fusion der Granula-Membran mit der Thrombozytenmembran, sodass hierbei das vorher intrazellulär gespeicherte P-Selectin auf der Thrombozytenoberfläche nachweisbar wird (Hattori et al., 1989; Reed, 2004).

### **1.1.2 Thrombozytäre Glykoproteine und Integrine**

Zur Ausübung ihrer vielfältigen Funktionen im Körper müssen Thrombozyten in der Lage sein, Signale zu empfangen und gleichermaßen Befehle an andere Zellen weiterzugeben. Hierzu dienen Oberflächenrezeptoren (Abbildung 1) und – als „Speicherort“ für multiple funktionell wichtige Substanzen – thrombozytäre Granula. Die Oberflächenmoleküle werden in der Literatur verschiedenartig mit ihren Namen als Glykoproteine und Integrine benannt. Glykoproteine sind hierbei Moleküle, die wie der Name andeutet aus einem Protein- und einem Zuckeranteil bestehen. Integrine wiederum sind transmembranäre Proteine, die zu den Glykoproteinen gehören und als Heterodimere vorliegen (Iwamoto und Calderwood, 2015).



**Abbildung 1: Wichtige thrombozytäre Oberflächenmarker und Rezeptoren.** Thrombin aktiviert Thrombozyten über PAR-Rezeptoren (im humanen PAR1 und PAR4; in der Maus PAR3 und PAR4). GpIb-IX-V interagiert mit vWF und vermittelt hierdurch Adhäsion und Aktivierung. Die high-affinity Konformation des GpIIb/IIIa bindet an Fibrinogen und Fibronectin und führt dadurch zur Thrombusstabilisierung und Quervernetzung von aktivierten Thrombozyten. P-Selectin interagiert mit PSGL-1 im Kontext der Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion. Weitere Oberflächenmoleküle (hier nicht abgebildet) sind unter anderem GpIa/IIa, GpIV und GpVI, die in der Lage sind direkt mit Kollagen zu interagieren. Der ADP-Rezeptor P2Y<sub>12</sub> führt zur Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten. Zusätzliche Rezeptoren (u.a. CLEC-2, TLRs) sind an der Immunabwehr und Thrombozytenaktivierung beteiligt (Abbildung basierend auf: Assinger, 2014; Cognasse et al., 2015; Jackson und Schoenwaelder, 2003; Ley und Kansas, 2004; Michelson, 2010; Moser et al., 2009; Nieswandt et al., 2009; Rivera et al., 2009; Senis et al., 2014; Shattil et al., 2010; Shattil und Newman, 2004; Soh et al., 2010 ).

Die für das Verständnis dieser Arbeit wichtigsten Rezeptoren sind der GpIb-IX-V-Komplex und GpIIb/IIIa, auch  $\alpha 2\beta 3$ -Integrin (CD41/61) genannt.

Der GpIb-IX-V-Rezeptorkomplex setzt sich aus drei verschiedenen Glykoproteinen zusammen, dem GpIb, dem GpIX und dem GpV. GpIb besteht wiederum aus einer Untereinheit GpIb $\alpha$  (CD42b) und zwei Untereinheiten GpIb $\beta$  (CD42c) (Li und Emsley, 2013). Bindungspartner des GpIb bzw. GpIb-IX-V-Komplexes sind neben vWF und Thrombin (siehe 1.1.4) auch P-Selectin und Mac-1, welche die Interaktion mit Leukozyten ermöglichen. Hierdurch wird zusammen mit thrombozytärem P-Selectin neben der direkten Regulation von entzündlichen Prozessen an der Gefäßwand auch das Einfangen von Leukozyten (Capturing) im Rahmen der Thrombusbildung beeinflusst (Berndt et al., 2014; Massberg et al., 2002; Palabrica et al., 1992; Wagner und Burger, 2003).

Integrine bestehen als Heterodimere aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die über eine nicht-kovalente Bindung in Kontakt stehen. Im humanen Organismus gibt es 24 verschiedene

Integrin-Dimere, die sich aus unterschiedlichen Kombinationen von 18  $\alpha$  und 8  $\beta$  Untereinheiten ergeben (Moser et al., 2009). Thrombozyten besitzen drei  $\beta$ 1 und zwei  $\beta$ 3-Integrine. (Bennett, 2005; Bennett et al., 2009)

Eines der im Rahmen der Hämostase wichtigsten Integrine ist das thrombozytäre  $\alpha$ 2 $\beta$ 3-Integrin (GpIIb/IIIa, CD41/61). Dieses ist für die Bindung an Fibrin, Fibrinogen und Fibronectin verantwortlich, vermittelt hierdurch die Quervernetzung der Thrombozyten untereinander und führt somit zu deren Aggregation. Darüber hinaus zählen vWF, Vitronectin und Thrombospondin zu den Liganden für GpIIb/IIIa (Bennett, 2005; Bennett et al., 2009; Kowalska und Tuszynski, 1993).

Das Krankheitsbild der Glanzman-Thrombasthenie führt die drastischen Konsequenzen einer thrombozytären Dysfunktion vor Augen. Bei dieser Erkrankung kommt es durch die verminderte Expression von GpIIb/IIIa zu Blutungsphänotypen (Nurden et al., 2013). Auch das Bernard-Soulier Syndrom führt zu Störungen der Thrombozytenfunktion und hierdurch bedingte Blutungskomplikationen. Hierbei liegt ein Defekt des GpIb-IX-V-Rezeptors vor, wodurch die funktionelle Interaktion im Rahmen der Thrombozytenadhäsion und –aktivierung beeinträchtigt ist (Bolton-Maggs et al., 2006).

Eine Ligandenbindung an Integrine erfolgt erst nach Integrin-Aktivierung. Hierbei kann zwischen einer niedrigen (*low*) und einer hohen (*high affinity*) Affinitäts-Konformation unterschieden werden (Adair und Yeager, 2002; Moser et al., 2009). Die auf eine Aktivierung der Thrombozyten folgende Konformationsänderung des Integrins zur high affinity Konformation wird als inside-out Signaling bezeichnet. Dies führt im Rahmen der Thrombusbildung und der damit einhergehenden Aktivierung zu einer gewünschten Interaktion des Integrins mit seinen Bindungspartnern.

Die Aktivierung erfolgt unter Beteiligung von Rap1 (Ras-like GTPase 1), Talin, RIAM (Rap1-GTP-interacting adapter molecule) und Kindlin-3 (Shattil und Newman, 2004). Nach Bindung eines Liganden an einen der weiteren thrombozytären Rezeptoren kommt es durch intrazellulären Anstieg der Calcium-Konzentration zur Aktivierung und Translokation von Rap1. RIAM interagiert sowohl mit Rap1, als auch mit Talin-1, wodurch es zur Freilegung der Integrin-Bindestelle des Talin-1 kommt. Schließlich kommt es durch Talin-1 und die Bindung von Kindlin-3 an das NPXY-Motiv des  $\beta$ -Teiles des Integrins zur Konformationsänderung und somit Aktivierung der hoch-affinen extrazellulären Bindungsstelle (Nieswandt et al., 2009).

So konnte gezeigt werden, dass sowohl Talin-1-defiziente Thrombozyten, als auch Kindlin-3-Defizienz zu massiven Blutungsstörungen, bis hin zu einem postnatal letalen Phänotyp führen (Moser et al., 2008; Nieswandt et al., 2007). RIAM hingegen scheint für die Plättchenfunktion nicht notwendig zu sein (Klapproth et al., 2015b; Stritt et al., 2015).

Rap ist in zwei Unterklassen einteilbar, Rap1 und Rap2, von denen jedoch vor allem Rap1 und hier die Untereinheit Rap1b in Thrombozyten vorherrscht (Guidetti und Torti, 2012). Rap1 ist als Signaling-Element bei der Thrombozytenaktivierung involviert. Versuche mit Rap1-defizienten Tieren offenbarten neben einer verlängerten Tailbleeding-Zeit (Schwanzblutungszeit) und einer verminderten *in-vitro* Thrombozytenaggregation eine

Protektion der Tiere hinsichtlich arterieller Thromben im Karotismodell, sowie eine verminderte GpIIb/IIIa Funktionalität (Chrzanowska-Wodnicka et al., 2005). Während die Expression des GpIIb/IIIa-Rezeptors unverändert ist, hat ein Ausschalten von Rap1 einen negativen Einfluss auf die Affinitätsänderung des Integrins. Weitere Befunde offenbarten zudem den Einfluss von Rap1 auf Adhäsion und weitergehende Aktivierung von Thrombozyten, während eine statische, kollagenvermittelte Thrombozytenantwort unverändert gegenüber den Wildtyp-Kontrollen ist (Guidetti und Torti, 2012; Wang et al., 2009).

Demgegenüber kommt es durch Ligandenbindung und –interaktion an dem Integrin selbst zu einer Übermittlung von Signalen in die Zelle, d.h. einem von außen einwirkenden Signaling, welches folglich als outside-in-signaling bezeichnet wird (Berndt et al., 2014; Moser et al., 2009; Shattil et al., 1998).

Selectine sind Glykoproteine, die zur Familie der Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*, CAM) gehören. Während drei unterschiedliche Selectine (E-, L- und P-Selectin) bekannt sind (Robinson et al., 1999), ist in Thrombozyten lediglich P-Selectin vorhanden. Dieses 140 kDa große Selectin ist in den  $\alpha$ -Granula inaktiver Thrombozyten gespeichert und wird wie oben beschrieben erst bei Aktivierung an die Oberfläche mobilisiert (McEver et al., 1989).

Durch Bindung von P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) auf Leukozyten an thrombozytäres P-Selectin, kommt es zum Einfangen von Entzündungszellen im Rahmen der Thrombusentstehung und zur Interaktion dieser Zellen miteinander.

### **1.1.3 ADP-, Kollagen- und Thrombinrezeptoren**

Die Aktivierung von Thrombozyten erfolgt im Organismus durch eine Vielzahl von Stimulanzen. Hierzu zählen unter anderem ADP, Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), Thrombin, Serotonin und Kollagen. Einer der potentesten Aktivatoren ist Thrombin. In der Gerinnungskaskade wird Thrombin auch als Faktor IIa bezeichnet. Diese Serinprotease entsteht aus dem in der Leber gebildeten Prothrombin. Es wirkt einerseits durch die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin (Davey und Luscher, 1967), andererseits jedoch auch über eine direkte Zellinteraktion durch Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs). PAR-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, von welchen vier verschiedene (PAR 1-4) in der Literatur beschrieben sind.

Während humane Thrombozyten PAR1 und PAR4 exprimieren, finden sich in murinen Blutplättchen lediglich PAR3 und PAR4 (Kahn et al., 1998). Tierversuche zeigten hierbei einen modulierenden Einfluss, indem PAR3 als Co-Faktor auf die durch PAR4-vermittelte Thrombinantwort einwirkt (Nakanishi-Matsui et al., 2000). Darüber hinaus wird die Möglichkeit des GpIb-IX-V-Rezeptorkomplexes als Thrombinrezeptor diskutiert, insbesondere des Glykoproteins Ib. GpIb zeigt eine Thrombin-Bindungsdomäne, während GpV eine Thrombin-cleavage-site besitzt. Es wird erwogen, dass GpIb-IX-V im humanen Organismus hinsichtlich der Thrombin-Interaktion bei niedrigen Thrombin-Konzentrationen eine ähnliche Rolle zukommt wie PAR3 in der Maus (Adam et al., 2003; De Candia et al., 2001; Dormann et al., 2000; Ramakrishnan et al., 2001).

Maßgeblich an der Kollagen-Bindung beteiligt ist das  $\alpha 2\beta 1$ -Integrin. Diese Bindung wird nach der anfänglichen GpIb-IX-V-vWF-vermittelten Interaktion direkt durch  $\alpha 2\beta 1$  (GpIa/IIa), sowie durch GpIIb/IIIa-vWF-Interaktion gefestigt. Im Folgenden steht die GpVI-vermittelte Thrombozyten- und Integrinaktivierung im Vordergrund. (Nieswandt und Watson, 2003; Nissinen et al., 2012; Rivera et al., 2009).

Ein weiterer thrombozytärer Aktivator bzw. Ko-Aktivator ist ADP (Soulet et al., 2005). ADP vermittelt seine Wirkung über die G-Protein gekoppelten Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 auf der Thrombozytenoberfläche und führt zur Thrombozytenaktivierung (Murugappa und Kunapuli, 2006). Ein weiterer Rezeptor, P2X1, wurde in jüngerer Zeit näher untersucht. Dieser ATP-Rezeptor scheint vor allem eine aktivierungsverstärkende bzw. –modulierende Rolle einzunehmen (Mahaut-Smith et al., 2011; Oury et al., 2006).

#### **1.1.4 Thrombozytenadhäsion**

Sobald ein Endothelschaden entsteht, adhären Thrombozyten im Bereich des Schadens (Abbildung 2). Die Erstinteraktion (sogenanntes „Tethering“) von Thrombozyt und subendothelialer Matrix oder anderweitig thrombogenem Material wird hierbei primär durch GpIb-IX-V und vWF-Bindung vermittelt, diese jedoch vor allem unter hoher Schergeschwindigkeit (shear rate). GpIb-IX-V findet sich auch im inaktiven Zustand auf der Oberfläche von Thrombozyten (Obert et al., 1999). Besonders eindrucksvoll ist, dass eine solche Interaktion auch ohne Zugang zu subendothelial gelegenen, thrombogenen Material erfolgen kann. Vielmehr ist GpIb in der Lage mit vWF und P-Selectin zu interagieren, welches von aktivierten Endothelzellen präsentiert wird. Dies spielt insbesondere zu Beginn einer phototoxischen Anregung eine Rolle. (Andre et al., 2000; Massberg et al., 2002).

Unter niedrigem shear, das heißt bei langsamer Blutströmung beziehungsweise nach vorheriger Verlangsamung der Thrombozyten zum Beispiel durch GpIb-IX-V-vermitteltes Tethering, sind die vorrangigen Bindungspartner GpVI-Kollagen bzw. GpIa/IIa-Kollagen (Alevriadou et al., 1993; Munnix et al., 2008; Nieswandt et al., 2001; Nieswandt et al., 2011; Rivera et al., 2009; Watson, 2009).

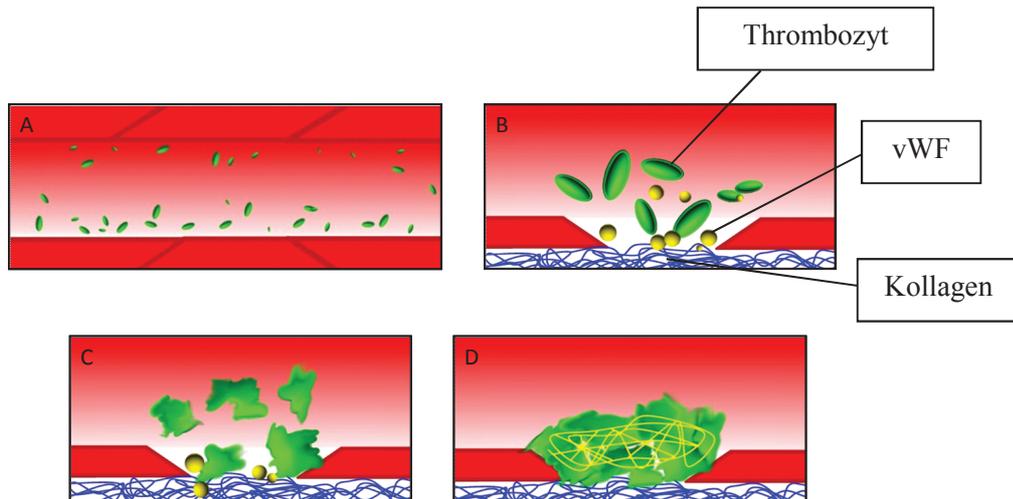


Abbildung 2: Thrombusbildung. Die inaktiv in Gefäßwandnähe zirkulierenden Thrombozyten (A) erlangen bei Schädigung des Endothels unter Vermittlung von zirkulierendem und subendothelial gelegenen vWF Kontakt zu Kollagen (B). Es folgt die Aktivierung und Formänderung der Thrombozyten (C) und schließlich die Quervernetzung und Stabilisierung des sich ausbildenden Thrombus (D) (erstellt und modifiziert nach (Silbernagel, 2007) ).

### 1.1.5 Thrombozytenaktivierung

Das Erkennen eines Gefäßschadens führt zur Aktivierung der Thrombozyten. Hierbei kommt es durch die Bindung an vWF, Kollagen, Fibrinogen und die Ausschüttung von Thrombin, ADP, Adrenalin und TxA<sub>2</sub>, sowie weiterer Stimulanzen (z.B. Serotonin) zur Formänderung der Thrombozyten und zur lawinenartigen Aktivierung von Plättchen (Ghoshal und Bhattacharyya, 2014).

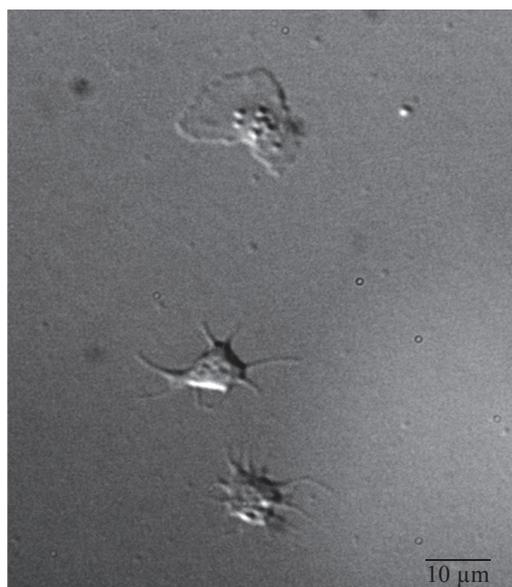


Abbildung 3: Exemplarisches Spreading von isolierten Thrombozyten eines E13.5 Mausfetens. Der aktivierte Thrombozyt stellt sich typisch mit seinen Ausläufern (Filopodia, Mitte), sowie im oberen Abschnitt in „Spiegeleiform“ (Lamellipodia), dar. Hierbei wurden die Thrombozyten auf einem mit Fibrinogen beschichteten Petrigefäß ausgesät und nach Zugabe von Thrombin anhand eines Timelapse-Videos der Spreading-Prozess überwacht (exemplarische Aufnahme mit 100x Objektiv).

### **1.1.6 Thrombozytenaggregation**

Durch die Formänderung, Aktivierung und damit einhergehende Konformationsänderung des GpIIb/IIIa zur high-affinity-Konformation sind Thrombozyten in der Lage ein dichtes Netz zu formen. Hierbei führt die Ausbildung der sternförmigen Ausläufer („Filopodia“) zu einer Oberflächenvergrößerung und damit besserer Überlappung der Thrombozytenfläche (McCarty et al., 2005; Peters et al., 2012). Die Formänderung und Ausbildung der sowohl Filopodia, als auch Lamellipodia wird als „Spreading“ bezeichnet (Abbildung 3). Kürzlich wurden die beiden in der Abbildung sichtbaren Formen (Filo- und Lamellipodia) als zwei verschiedene Mechanismen des Thrombozyten-Spreadings beschrieben. Hierbei dient die Lamellipodia-bedingte Spreadingfunktion vor allem der unspezifischeren Abdeckung eines Gefäßschadens, während Filopodia primär der Interaktion der Thrombozyten untereinander dienlich sind (Sandmann und Koster, 2016). Weiterhin ist das aktivierte GpIIb/IIIa, wie oben beschrieben, in der Lage Fibrinogen zu binden (Faktor I). Es folgt die Stabilisierung des Thrombus durch die thrombingetriggerte Fibrin-Bildung und Faktor XIII-Interaktion, die Quervernetzung (Cross-Linking) und das Zell-Capturing, welches zu einem weiteren Wachstum des Thrombus führt (Aleman et al., 2014; Mitchell et al., 2014; Wolberg und Campbell, 2008).

### **1.1.7 Thrombozyten-Leukozyteninteraktion**

Im Rahmen der Thrombozytenaktivierung kommt es zu der oben dargestellten P-Selectin-Mobilisation an die Oberfläche. Leukozyten sind in der Lage mittels PSGL-1 an dieses Selectin zu binden und auf diese Weise mit Thrombozyten zu interagieren. Hierdurch kommt es zur Initiierung von Entzündungsprozessen (Sreeramkumar et al., 2014), dem weitergehenden Wachstum des Thrombus und einer Interaktion der unterschiedlichen Zellen im Sinne von Hämostase und Immunabwehr (von Bruhl et al., 2012; Wong et al., 2013; Yeaman et al., 1998).

Die zuvor dargestellten Schritte der Thrombusbildung wurden als solche im adulten Organismus erforscht und charakterisiert. Wie sich jedoch die Thrombozytenfunktion und –zahl im Laufe der fetalen Entwicklung verändern und mit Thrombopenie oder Funktionseinschränkungen der Thrombozyten in der Neonatologie umgegangen wird, soll im nächsten Abschnitt genauer beleuchtet werden.

## **1.2 Thrombozyten in der fetalen Entwicklung und bei Neonaten**

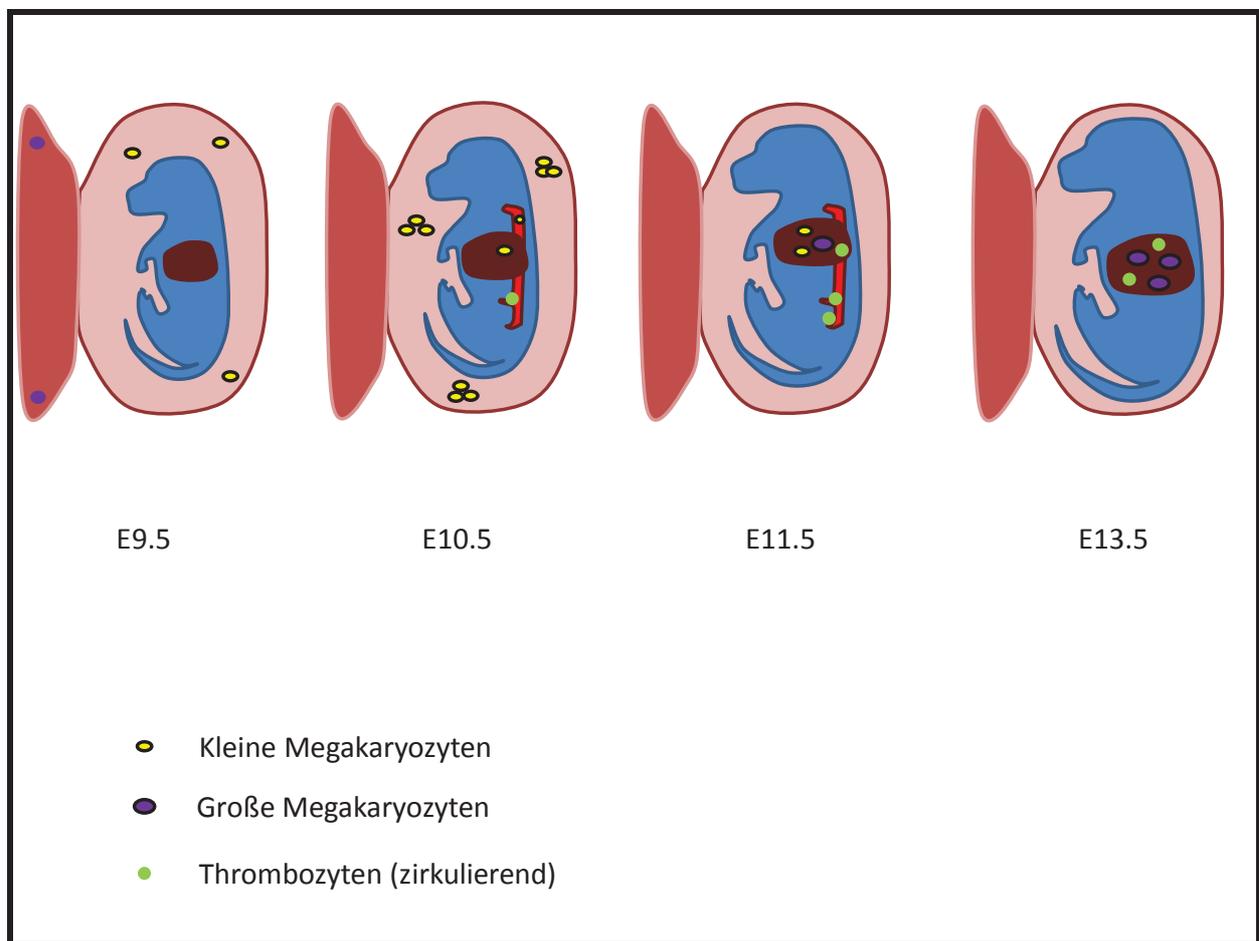
Aufgrund der sehr schwierigen Gewinnung von Blutproben (Israels et al., 2003) und ethischer Bedenken hinsichtlich von Experimenten mit humanen Früh- und reifgeborenen Neonaten, finden sich neben Mausstudien hauptsächlich Untersuchungen, die mit Nabelschnurblut und –zellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) durchgeführt wurden.

### **1.2.1 Thrombozytäre Reifung**

Thrombozyten im adulten Organismus sind in ihrer Funktion ausgereift und unter physiologischen Umständen in der Lage einer überschießenden Aktivierung zu widerstehen, jedoch hämostatische und immunologische Funktionen wahrzunehmen (siehe Kapitel 1.1). Der in der fetalen Entwicklung befindliche Organismus hat jedoch einen anderen

Schwerpunkt an Aufgaben zu bewältigen, unter anderem Wachstum und Entwicklung von Organen.

Die Thrombopoese während der fetalen Entwicklung findet in frühen Stadien im Dottersack durch „Diploid Platelet-Forming Cells“ (DPFCs) (diploide Plättchen-formierende Zellen) statt (Potts et al., 2015; Potts et al., 2014). Im weiteren Verlauf übernehmen Megakaryozyten im Dottersack und vor allem in der Leber die Funktion der Thrombopoese (Abbildung 4). Tober et al. konnten hier anhand immunhistochemischer und histologischer Untersuchungen zeigen, dass in der Maus an Tag E9.5 Megakaryozyten im Dottersack und ab Tag E10.5 erste zirkulierende Thrombozyten im Feten nachweisbar sind (Tober et al., 2007; Tober et al., 2008) (Hierbei bezeichnet E9.5 das intrauterine Entwicklungsstadium anhand des jeweiligen Gestationsstages, wobei die durchschnittliche Gestationsdauer der Maus 18 bis 21 Tage beträgt (Murray et al., 2010; Silver, 1995)).



**Abbildung 4: Nachweis GpIb positiver Megakaryozyten und GpV-positiver Thrombozyten in der fetalen Entwicklung der Maus. Tober et al. konnten zeigen, dass an Tag E9.5 Megakaryozyten in der maternalen Dezidua, sowie teilweise im Dottersack auffindbar sind. An Tag E10.5 zeigen sich Megakaryozyten-Cluster im Dottersack, sowie vereinzelte GpIb-positive Megakaryozyten in der fetalen Leber und im Bereich der Aorta. Weiterhin finden sich ab diesem Stadium GpV-positive zirkulierende Thrombozyten. Ab Tag E11.5 finden sich erstmals größere Megakaryozyten, die zusammen mit in der Leber nachweisbaren Thrombozyten ab E13.5 ausschließlich anstelle der vormalig auffindbaren kleineren Megakaryozyten anzutreffen sind (Daten basierend auf: (Tober et al., 2007)).**

Die Gruppe von James Palis konnte in einer weiteren Publikation zeigen, dass E12.5 Feten geringere totale Thrombozytenzahlen besitzen, als E15.5 Feten (Tober et al., 2008). Ein Zuwachs der Thrombozytenzahlen wird in der Neonatalperiode nach neuen Erkenntnissen hierbei durch die Verlängerung der Thrombozyten-Lebensdauer erreicht (Liu et al., 2014).

Die Lebensdauer der Thrombozyten beträgt im adulten humanen Organismus etwa 10 Tage, in der Maus fünf Tage (Ault und Knowles, 1995; Cohen und Leeksa, 1956). Die früher bestehende Theorie der “multiple hits”, nach der Thrombozyten im Laufe ihrer Lebenszeit eine bestimmte Anzahl an mechanischen Schäden in der Zirkulation zugefügt und diese dadurch für den Abbau erkannt werden, wurde in den vergangenen Jahren zunehmend in Frage gestellt. Vielmehr wird nun von einer intrinsischen Regulation der Lebensdauer ausgegangen (Dowling et al., 2010). Weiterhin wurde kontrovers diskutiert, ob Thrombozyten in ihrer aktiven Form durch die P-Selectin/PSGL-1 Interaktion durch Leukozyten phagozytiert und dadurch aus der Zirkulation entfernt werden könnten (Berger et al., 1998; Maueri et al., 2011). Neben weiteren Mechanismen der antikörper-gesteuerten Clearance, gelten vor allem Milz, Lunge und auch Leber als Abbauorte der Blutplättchen (Grozovsky et al., 2010).

Ebenfalls im humanen Organismus wurde bestätigt, dass die Thrombozytenzahlen im Laufe der fetalen bzw. postnatalen Entwicklung ansteigen (Patrick et al., 1987; Wiedmeier et al., 2009). Signifikant geringere Thrombozytenzahlen zeigten sich in Frühgeborenen verglichen mit Reifgeborenen (Aballi et al., 1968). Zudem konnte ein zweifacher Peak der Thrombozytenzahlen postnatal beobachtet werden, welcher bei zwei bis drei Wochen und sechs bis sieben Wochen liegt. Als ursächlich hierfür wurden erhöhte Thrombopoietin (Tpo)-Konzentrationen angeführt (Wiedmeier et al., 2009). Ebenso konnte eine erhöhte Zahl an retikulierten, unreifen Thrombozyten in der fetalen Zirkulation nachgewiesen werden (Jilma-Stohlawetz et al., 2001).

Ferner konnte in einer prospektiven Studie der Einfluss von verringerten Thrombozytenzahlen auf die Blutungszeit dargelegt werden. Hier zeigte sich, dass ein Thrombozytencount unterhalb von  $100 \times 10^9/L$  zu einer signifikanten Verlängerung der Blutungszeit führte (Andrew et al., 1987).

Hinsichtlich der Thrombopoese wurde gezeigt, dass im Nabelschnurblut früh- und reifgeborener Kinder eine höhere Anzahl megakaryozytärer Vorläuferzellen, als in adultem Vollblut vorhanden ist (Olson et al., 1992). Weiterhin wurde in dieser Studie beschrieben, dass zirkulierende fetale Megakaryozyten signifikant kleiner sind als Megakaryozyten, die aus adultem Vollblut isoliert wurden. Ebenfalls zeigte sich in einer Studie von de Alarcon und Graeve, dass fetale Megakaryozyten eine geringere Ploidität aufwiesen, als adulte (de Alarcon und Graeve, 1996).

Bezüglich der Unterschiede in der thrombozytären Funktion während der fetalen Entwicklung ist eine Unterfunktion der Blutplättchen in Neugeborenen schon seit längerem beschrieben. So konnte unter anderem bereits 1970 nachgewiesen werden, dass Thrombozyten gesunder Reifgeborener eine verminderte Aggregation nach Stimulation mit ADP, Kollagen und Thrombin zeigten (Mull und Hathaway, 1970). Ebenso wurde eine verminderte Anzahl von

$\alpha$ 2-Rezeptoren auf der thrombozytären Oberfläche für die abgeschwächte Stimulationsantwort nach Zugabe von Epinephrin verantwortlich gemacht (Corby und O'Barr, 1981). Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten zudem eine Abhängigkeit der thrombozytären Unterfunktion von dem Gestationsalter und verdeutlichten damit den Reifungsprozess der primären Hämostase (Sitaru et al., 2005).

Betreffend der thrombozytären Signaltransduktion konnten Israels et al. darlegen, dass die Thromboxan A<sub>2</sub>-vermittelte Thrombozytenaktivierung in Neugeborenen abgeschwächt ist (Israels et al., 1997). Ebenso zeigen Thrombozyten von Neugeborenen eine verminderte Calcium-Mobilisierung, was gleichsam durch beeinträchtigte Signaling-Prozesse bedingt wird (Gelman et al., 1996; Israels et al., 2003). Schlagenhaut et al. zeigten kürzlich erniedrigte PAR1/4-Level, erhöhte GpIb-IX-V-Level und unveränderte GpIIb/IIIa-Level in Thrombozyten reifer Neugeborener im Vergleich zu Erwachsenen (Schlagenhaut et al., 2010a; Schlagenhaut et al., 2010b). Ebenso wurde gezeigt, dass erhöhte Prostaglandin E<sub>2</sub>-Konzentrationen in Nabelschnurblut vorzufinden sind und mit zu einer thrombozytären Unterfunktion beitragen könnten (Schlagenhaut et al., 2015).

Dieser thrombozytären Unterfunktion stehen Befunde gegenüber, die eine verkürzte *in-vivo* Blutungszeit von Reifgeborenen berichten (Ferrer-Marin et al., 2013; Saxonhouse und Sola, 2004). Im Weiteren wurde eine verbesserte Ristocetin-induzierte Aggregation beobachtet (Ts'ao et al., 1976). Auch in Tests mithilfe des PFA-100 (Platelet-Function-Analyzer 100) konnte eine verbesserte *in-vivo* Funktionalität der primären Hämostase Reifgeborener nachgewiesen werden (Roschitz et al., 2001). Dies lässt sich auf mehrere Faktoren zurückführen. Einerseits spielen erhöhte vWF-Konzentrationen in den Neonaten eine Rolle (Roschitz et al., 2001) und hier insbesondere die Prävalenz von ulvWF-Multimeren (unusually large von-Willebrand-Factor-Multimers) (Weinstein et al., 1989), die zu einer besseren Interaktion und Aktivierung der funktionell beeinträchtigten Thrombozyten führt (Katz et al., 1989; Shenkman et al., 1999). Andererseits zeigen Neonaten auch einen erhöhten Hämatokrit und ein erhöhtes korpuskuläres Volumen, was ebenfalls zu einer verbesserten *in-vivo* Hämostase führen kann (Saxonhouse und Sola, 2004). Die erhöhten vWF-Konzentrationen und die Prävalenz von ulvWF-Multimeren konnten wiederum auf eine verminderte Aktivität der ADAMTS-13-Protease zurückgeführt werden (Hellstrom-Westas et al., 2005; Schmugge et al., 2004).

Für die Aktivierung von Thrombozyten und die Thrombusentstehung spielt auch Thrombin eine bedeutende Rolle. In Neugeborenen ist die Thrombinentstehung im Vergleich zu Erwachsenen jedoch vermindert, was direkt von der Prothrombin-Konzentration im Plasma abhängig ist (Andrew et al., 1990).

### 2. Hypothese und Zielsetzung

Aus den bisherigen Daten lässt sich erkennen, dass Unterschiede in der primären Hämostase und Thrombozytenfunktion in Neonaten und Adulten existieren. Nach wie vor fehlen jedoch systematische Untersuchungen der Thrombozytenfunktion im sich entwickelnden Fetus *in-vivo*. Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der *in-vivo* Thrombozytenfunktion im Kontext der primären Hämostase und Thrombusformation im Rahmen der murinen fetalen Entwicklung. Hierfür wurde ein Modell zur intravitalmikroskopischen Darstellung der fetalen Zirkulation verwendet (Sperandio et al., 2013), modifiziert und für die thrombozytäre Fragestellung etabliert, wodurch die Darstellung und Manipulation der Thrombozytenfunktion im murinen Feten möglich wurde.

Damit einhergehend ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Kann eine Thrombusbildung im sich entwickelnden Feten induziert werden?
2. Existieren Unterschiede bei der Thrombusentstehung in Abhängigkeit des Gestationsalters?
3. Gibt es Unterschiede in der Thrombusbeschaffenheit (Stabilität) im jungen Feten im Vergleich zum reifen Organismus?
4. Wie hoch ist die Anzahl zirkulierender Thrombozyten in Feten unterschiedlichen Gestationsalters? Wie ändern sich die Thrombozytenzahlen im Laufe der fetalen Entwicklung, d.h. wie effizient ist die fetale Thrombopoese?
5. Existieren Expressionsunterschiede hinsichtlich der Oberflächenmoleküle und thrombozytärer Proteine fetaler Thrombozyten im Vergleich zu adulten?
6. Wie ist die Rezeptorbeschaffenheit fetaler Thrombozyten im Hinblick auf deren Aktivierbarkeit und Funktionalität? Ist diese in fetalen Thrombozyten bereits ausgebildet?
7. Führt die Transfusion von adulten bzw. entwicklungsentsprechenden Thrombozyten in den fetalen Organismus zur Ausbildung von Thromben?
8. Können fetale Leukozyten mit adulten Thrombozyten interagieren?

## KAPITEL 3

---

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung / Herstellerangaben</b>
<b>Chirurgisches Instrumentarium</b>	F.S.T. Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
<b>Coulter-Counter</b>	Beckmann Coulter AC T 8; Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
<b>Durchflusszytometer</b>	Beckmann Coulter Gallios Flow Cytometer; Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
<b>DVD-Recorder</b>	Panasonic DVD Video Recorder LQ-MD800; Panasonic Europe GmbH, Wiesbaden, Deutschland
<b>Feinwaagen</b>	Mettler Toledo AB 104-S-A, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland A&D GR-202; A&D Instruments Ltd, Abingdon, Oxfordshire, Großbritannien Mettler Toledo AG245; Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
<b>Heizplatte</b>	Isopad Icon-CHP; Tyco Thermal Controls, Siegen, Deutschland (jetzt: Pentair Thermal Management)
<b>Idexx ProCyte Dx hematology analyzer</b>	Idexx Europe B.V., Hoofddorp, Netherlands
<b>Kapillarschleifer</b>	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland
<b>Kauter</b>	Electro-Cautery-Device, Gemini; Braintree Scientific Inc., Braintree, MA, USA
<b>Mikromanipulator DC-3K mit Drucktastensteuerung MS314</b>	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
<b>Neubauer Zählkammer</b>	Neubauer Improved, LO LaborOptik, Lancing, UK Bright Line Neubauer Improved Hemacytometer; Reichert, Buffalo, N.Y., USA
<b>pH-Meter</b>	WTW Series InoLab; WTW, Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
<b>Pipetten</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

<b>Pipetten-Puller vertikal</b>	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland
<b>Plate-Reader</b>	Tecan Multiplate Reader; Infinite F200; Tecan AG, Männedorf, Schweiz
<b>Rocker 3D basic</b>	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
<b>Rollpumpe</b>	Stöckert Instrumente, München, Deutschland
<b>Thermo Mixer F1.5</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Videorekorder</b>	Panasonic MD 830; Panasonic Video Cassette Recorder AG-5700; Panasonic Europe GmbH, Wiesbaden, Deutschland
<b>Vortexer</b>	Ms1 Minishaker IKA-Werke GmbH, Staufen Vortex-Genie 2; Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
<b>Wärmebad</b>	Julabo EM; Julabo, Seelbach, Germany
<b>Western Blot Entwicklung</b>	Hamamatsu ; Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland (PIO8255; Serial I/O; ORCA; Darkbox; IT 3900)
<b>Western Entwicklungsgerät Software</b>	Wasabi; Version 1.5; Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland
<b>Western Power Gerät</b>	BioRad Power Pac Basic und Power Pack HC; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<b>Zellflow</b>	Heraeus Laminair, HA 2448; Heraeus, Hanau, Deutschland
<b>Zentrifugen</b>	Merck Eurolab Galaxy Mini; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau Hettich: Rotanta/K; Rotina 420R; Mikro 200R; Universal 30 RF; Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

### 3.1.2 Mikroskope und Zubehör

Typ	Gerät	Hersteller/Eigenschaften
<b>In-vivo Mikroskop</b>	Olympus BX52 WI	Olympus, Hamburg, Deutschland
	Olympus U-RFL-T	
	Olympus BX-UCB	
	Olympus BX51 mercury lamp	
	Spiegel	M70/100
	Spiegel 2	50%
	Olympus TH4-200 (Durchlicht) SP-20 (Blitz)	Rapp Opto-Electronics, Hamburg
EXFO Motorized Platform	Gibraltar Burleigh, Thorlabs, Newton, NJ, USA	
Kappa CF8 HS DRELG (Kamera Video)	Kappa optronics GmbH, Gleichen, Deutschland	
LaVision ImagerPro X (Kamera PC)	LaVision Biotec, Bielefeld, Deutschland	
<b>Objektive in-vivo Mikroskop</b>	Objektiv 5x	Zeiss Achrostigmat 5x/0,12
	Objektiv 10x	∞/-
	Objektiv 20x	Olympus UPlan FI 10x/0.30W ∞/-
	Objektiv 40x	Olympus XLU Plan FI 20x/0.95W ∞/0
	Objektiv 60x	Olympus LUM Plan FI/IR 40x/0.8W ∞/0 Olympus LUM Plan FI/IR 60x/0.90W ∞/0
<b>Multiphotonen Laserscanning Mikroskop</b>	TriMScope mit:	LaVision BioTec, Bielefeld, Deutschland
	Olympus BX51	Olympus, Hamburg, Deutschland
	Ultra II Titanium: Sapphire Laser	Coherent, Dieburg, Deutschland
	Optical Parametric Oscillator (Chameleon OPO; typical pulse width 200 fs, repetition rate 80 MHz), pumped by the Ti:Sa	Chameleon OPO; APE; Berlin, Deutschland
	Olympus XLUMPlanFI 20x/0.95W	Olympus, Hamburg, Deutschland
	Olympus WI-UCD condenser, NA 0.8	Olympus, Hamburg, Deutschland
	Photomultiplier tubes (Hamamatsu H6780-01 und H6780-20); Gallium arsenide phosphide detectors (Hamamatsu H7422-40)	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan

<b>Übersichtsmikroskop</b>	Leica M205 FA; Leica 10450028	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
<b>Stereoskop für Präparation</b>	Olympus SZ61 mit Olympus KL1500 LCD Light source; Kamera: Olympus E-330	Olympus, Hamburg, Deutschland
<b>Mikroskop Spreading</b>	Zeiss Axiovert 200 M, Visitron Systems; Zeiss Plan-Ne0 100x	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
<b>Mikroskop für Ausstriche</b>	Zeiss Axioskope 40; mit AxioCam	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
<b>Konfokalmikroskop</b>	Leica DMI 6000 CS Leica TCS SP5	Leica Microscopy GmbH, Wetzlar, Deutschland

## 3.2 Substanzen

### 3.2.1 Chemikalien und Substanzen

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Antibody Diluent with Background Reducing Components</b>	Dako, Agilent, Santa Clara, USA
<b>BD FACS Lysing Solution</b>	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
<b>Brilliant Kresylblau</b>	Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>BSA</b>	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
<b>Beta-Mercaptoethanol</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Collagen</b>	Sigma (C0543) Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland / Millipore (Type I) Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Fibrinogen from human plasma (F4883)</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<b>Flow-Count Fluorospheres</b>	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
<b>Hemacolor Schnellfärbung von Blutaussstrichen</b>	Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Heparin-Natrium-25000</b>	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
<b>HEPES</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<b>Ilomedin</b>	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
<b>Iloprost</b>	Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Deutschland
<b>Isopropanol /2-Propanol</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>KCl</b>	Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>NaCl 50 ml</b>	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
<b>NaCl</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Natrium-Citrat-Lösung, 13%</b>	Eifelfango, Bad Neuenahr-Ahrweiler, Deutschland
<b>Page Ruler Plus Protein Ladder</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>PBS</b>	Invitrogen, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
<b>Pierce Reagent BCA</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards Western</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<b>Prostaglandin I2</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<b>Protease Inhibitor Cocktail, cOmplete, mini, EDTA-frei</b>	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
<b>SDS ultra pure</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>SPHERO™ rainbow fluorescent beads (5,26 µm)</b>	Spherotech, Lake Forest, USA
<b>Thrombin from bovine plasma (T7513)</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<b>ThromboCount pur</b>	Bioanalytic / Biorapid GmbH, Umkirch/Freiburg, Deutschland
<b>Tris base</b>	Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Triton X-100</b>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Tween20</b>	Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Western Blot Chemilumineszenz HRP Substrate Reagenz</b>	Immobilon Western; Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

### 3.2.2 Puffer

Substanz / Puffer	Zusammensetzung
<b>10x TBS</b>	24,4 g TRIS (200 mM); 80 g NaCl (1,1 M); pH einstellen auf 7,5; 1 L H <sub>2</sub> O hinzufügen
<b>TBS-T</b>	1x TBS (10x TBS 1:10 verdünnt) + 0,1% Tween
<b>Thrombozyten-Lyse-Puffer (Proteinextraktionspuffer)</b>	9,7 mL 1x TBS; 0,1 mL Triton-X-100 (entspricht 1%); 1 Tablette Complete Protease Inhibitor (Roche); 0,1 mL Phosphatase Inhibitor Cocktail 3; 0,1 mL Phosphatase Inhibitor Cocktail 2
<b>Western Blotting Puffer (10x)</b>	30,3 g Tris 144 g Glycin 25 ml Methanol (frisch) Auf 1L mit H <sub>2</sub> O auffüllen
<b>Western SDS Running Puffer</b>	30,3 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS Auf 1L mit H <sub>2</sub> O auffüllen
<b>Stripping Puffer</b>	10 mL 10% SDS (Endkonzentration 2%); 3,11 mL 1M Tris-HCl pH 6,7 (62,5 mM); 357 µL beta-Mercaptoethanol (100 mM); 50 mL H <sub>2</sub> O hinzufügen
<b>Laemmli Loading Puffer (5x)</b>	15 mL 1 M Tris-HCl pH 6,8; 5 g SDS; 25 mL Glycerol; 10 mL beta-Mercaptoethanol; 250 mg Bromphenol Bleu
<b><i>In-Vivo</i> Superfusionspuffer (Klitzman und Duling, 1979)</b>	Bestehend aus: 10% v/v Lösung 1 und 10% v/v Lösung 2 in demineralisiertem Wasser. Begasung mit 95% N <sub>2</sub> und 5% CO <sub>2</sub> mittels eines Sprudelsteines; Zusammensetzung Lösung 1: 292,9 g NaCl, 13,3 g KCl, 11,2 g CaCl <sub>2</sub> , 7,7g MgCl <sub>2</sub> ; lösen in 3,8 L demineralisiertem Wasser Zusammensetzung Lösung 2: 57,7 g NaHCO <sub>3</sub> ; lösen in 3,8 L demineralisiertem Wasser)

<b>Stock (für Tyrodes modified Puffer)</b>	Für 1 L: NaCl 160 g (2,73 M) KCl 4g (53,6 mM) NaHCO <sub>3</sub> 20g (238 mM) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,16g (8,6 mM)
<b>HEPES (Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure) für Tyrodes modified Puffer</b>	Für 1 L Hepes 119 g (0,5 M)
<b>CaCl<sub>2</sub> für Tyrodes modified Puffer</b>	CaCl <sub>2</sub> anhydrous 11g in 1L (0,1 M)
<b>MgCl<sub>2</sub> für Tyrodes modified Puffer</b>	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O 23g in 1L (0,1 M)
<b>Tyrodes modified für 100 ml</b>	Stock – 5 mL CaCl <sub>2</sub> (0,1 M) – 2 mL MgCl <sub>2</sub> (0,1 M) – 1 mL Hepes (0,5 M) – 1 mL Glucose (10%) – 1 mL (direkt vor Verwendung hinzufügen) BSA (10%) – 3,6 mL (direkt vor Verwendung hinzufügen) H <sub>2</sub> O – 86,4 mL → Gesamtlösung pH: 7,35 (Für CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub> freien Tyrodes modified Puffer füge ersatzweise entsprechende Menge an H <sub>2</sub> O hinzu).

### 3.2.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Exzitation (Max)	Emission (Max)	Verwendung als	Hersteller	Bezeichnung
<b>FITC- Dextran</b>	490 nm	525 nm	Plasma-Marker, Phototoxische Thrombusinduktion	Sigma Aldrich	FD150S-1G
<b>TRITC</b>	557 nm	576 nm	Plasma-Marker	Sigma Aldrich	T1287
<b>Rhodamin 6G</b>	526 nm	555 nm	Zell-Anfärbung	Sigma Aldrich	R4127
<b>Acridin- Orange (DNA- gebunden)</b>	502 nm	526 nm	Plasma- und Leukozytenmarker	Sigma Aldrich	A6014

### 3.2.4 Primäre Antikörper

Name	Isotype und Reaktivität	Klon	Farbe	Konzentration verwendet/empfohlene Anwendung	Hersteller
<b>CD42c (GpIbβ)</b>	IgG; rat anti mouse		DyLight 488	1:50 für FACS; für <i>in-vivo</i>	Emfret
<b>CD42c (GpIbβ)</b>	IgG; rat anti mouse		Alexa 649	1:50 für FACS; für <i>in-vivo</i>	Emfret
<b>Jon/A (CD41/61) (GpIIb/IIIa activated)</b>	IgG2b; rat anti mouse	Jon/A	PE	1:10 für FACS	Emfret
<b>CD41 (GpIIb)</b>	IgG1κ; rat anti mouse	MWReg30	FITC	1:25 für FACS	BD
<b>CD41 (GpIIb)</b>	IgG1κ; rat anti mouse	MWReg30	APC	1:25 für FACS	BioLegend
<b>CD62-P</b>	IgG1λ; rat anti mouse	RB40.34	FITC	1:25 für FACS	BD
<b>CD62-P</b>	IgG1λ; rat anti mouse	RB40.34	AlexaFluor647	1:25 für FACS	BD
<b>CD62-P</b>	Polyclonal IgG; rabbit anti human, mouse, rat			1:1000 für Western Blot	Abcam
<b>PAR3</b>	IgG2b; mouse anti mouse, human	8E8	FITC	1:500 für Western Blot	Santa Cruz
<b>PAR4</b>	IgG; rabbit anti human, mouse, rat	polyclonal	A488	1:1000 für Western Blot	Bioss
<b>Talin</b>	IgG1; mouse anti Talin	8d4		1:1000 Western	Sigma
<b>GAPDH</b>	IgG1; mouse anti GAPDH	6C5		1:10000 für Western Blot	Calbiochem (Merck Millipore)
<b>Kindlin-3</b>	Rabbit anti mouse	polyclonal		1:3000 in Milch für Western Blot	Max Planck Institut (PD Dr. Markus Moser) (Ussar et al., 2006)
<b>Rap1</b>	IgG; rabbit anti human, mouse, rat	polyclonal		1:1000 für Western Blot	Millipore
<b>β-Tubulin</b>	mouse anti mouse	TUB2.1		1:10000 für Western Blot	Sigma Aldrich

Erläuterung: Der hier beschriebene Jon/A Antikörper bindet die aktivierte Konformation des GpIIb/IIIa-Integrins und erlaubt somit eine Beurteilung des Aktivitätszustandes (Bergmeier et al., 2002).

### 3.2.5 Sekundäre Antikörper

Name	Isotype und Reaktivität	Konjugat	Konzentration verwendet/empfohlene Anwendung	Hersteller
Goat anti rabbit	IgG(H+L)	HRP; Secondary	1:10000 für Western Blot	Jackson Immunos.
Goat anti mouse	IgG(H+L)	HRP; Secondary	1:10000 für Western Blot	Jackson Immunos.
Donkey anti goat	IgG	HRP; Secondary	1:10000 für Western Blot	Jackson Immunos.
Goat anti rat	IgG(H+L)	HRP; Secondary	1:10000 für Western Blot	Jackson Immunos.

### 3.2.6 Verbrauchsmittel

Gegenstand	Hersteller
6-well Platte	Corning
96-well Platte	Corning
Citrat Monovette	Sarstedt
Falcon Tubes (5, 15, 50 ml)	Falcon, Corning / BD
Glaskapillaren	Clark Capillaries, GC150TF-10; Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, UK
Kanülen (verschiedene Größen)	BD
Micro FACS-Röhrchen (1.2 ml)	Fisher Scientific
Pipettenspitzen (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Corning
Spritzen (1, 10 ml)	Braun
Spritzen (2, 5, 20 ml)	BD

### 3.2.7 Narkosemittel

Substanz	Bezeichnung	Hersteller
Ketamin	Ketavet (100 mg/ml)	Pharmacia GmbH
Xylazin	Rompun 2%	Bayer Health Care

### 3.2.8 Software

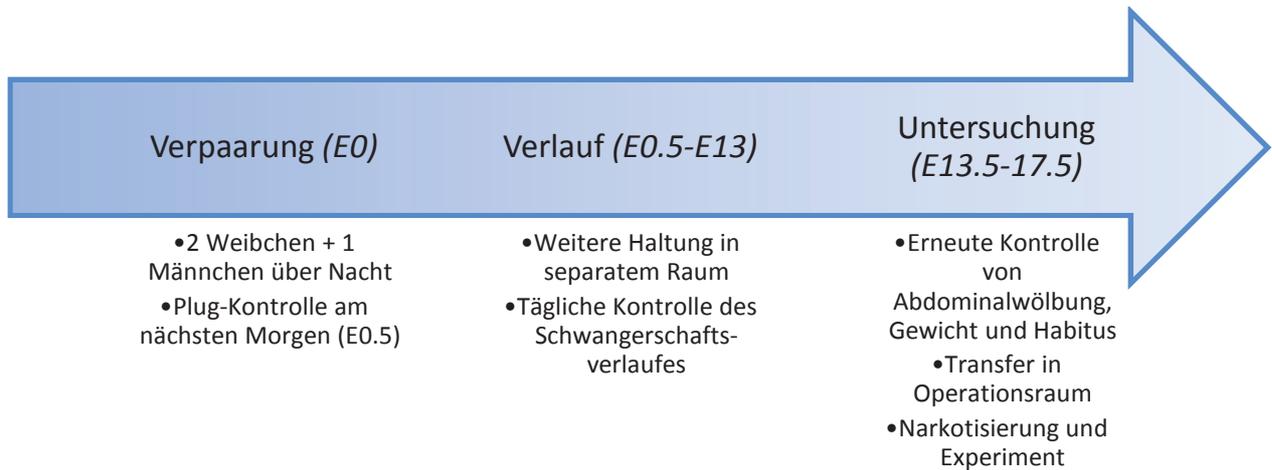
Software	Hersteller
Microsoft Office 2010	Microsoft
ImageJ 1.48	National Institute of Health
Imaris 7	Bitplane
Kaluza 1.3	Beckman Coulter
VirtualDub 1.10.4	Virtualdub.org
SigmaPlot V12.0	Systat Software GmbH
Endnote X7.4	Thomson Reuter
Inspector Pro	LaVision Biotech

### 3.3 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit aufgeführten Versuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Az 55.2-1-54-2531-69-09 und -122-12).

Zur Durchführung der Versuche wurden C57/Bl6 Wildtyp (WT) Tiere verwendet (Charles River, Sulzfeld, Deutschland; Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich). Zur Betrachtung der Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion wurden LysM-EGFP-Mäuse untersucht (Faust et al., 2000).

Die Analyse von Mausfeten erforderte die Umsetzung einer terminierten Verpaarung (Abbildung 5). Hierbei wurden je zwei weibliche Tiere zu einem Zuchtmännchen gesetzt und über Nacht in Käfigen mit lichtgeschütztem Rückzugsbereich belassen. Am folgenden Morgen wurde das Männchen aus dem Käfig entfernt und die Weibchen auf einen vaginalen Plug untersucht. Der Plug, ein weißlich-cremefarbenes pflanzliches Gebilde, welches den Vaginaleingang nach erfolgter Begattung des Weibchens verschließt, besteht aus dem verfestigten Sperma des Männchens und ist ein Zeichen, dass der Akt der Fortpflanzung vollzogen wurde. Im Anschluss wurden die Weibchen in einem von den Männchen separierten Raum untergebracht. Der Tag der Plugkontrolle wurde als E0.5 gezählt. Regelmäßige Gewichtskontrollen, Kontrolle des Nestbaus, der Agilität, sowie des Bauchumfanges dienten der Überwachung des Schwangerschaftsverlaufes. Am Tag des Versuches wurden die Tiere in den Tier-Operationsraum transferiert.



**Abbildung 5:** Ablauf der terminierten Verpaarung (oberes Schema). Zwei weibliche Mäuse wurden mit einem Männchen über Nacht zur Verpaarung in einen Käfig gesetzt und in einem separaten Raum belassen. Am nächsten Morgen erfolgte die Plug-Kontrolle, hier exemplarisch ein Plug-positives Tier (untere Bildreihe; Pfeil markiert vaginalen Plug).

### 3.4 Narkose

Die Narkose der Muttertiere erfolgte durch intramuskuläre Injektion einer Ketamin/Xylazin-Mischung (125mg/kg Körpergewicht Ketamin, 25 mg/kg Körpergewicht Xylazin). Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch wiederholte i.m. Injektion der Narkosemischung (42mg/kg Ketamin, 8 mg/kg Rompun).

### 3.5 Herstellung von Mikroinjektionskapillaren

Zur Einbringung von Substanzen in die fetale Mikrozirkulation wurden Mikroinjektionskapillaren hergestellt. Hierfür wurden Glaskapillaren mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm unter Zuhilfenahme eines vertikalen Pipetten-Pullers und eines zugehörigen Kapillarschleifers je nach Bedarf auf einen Öffnungsdurchmesser von <0,1 mm (je nach Gefäßgröße und Verlauf) zugespitzt. Zur besseren Gewebepenetration wurde die Öffnung zweiseitig spitzenförmig angeschliffen (Abbildung 6).

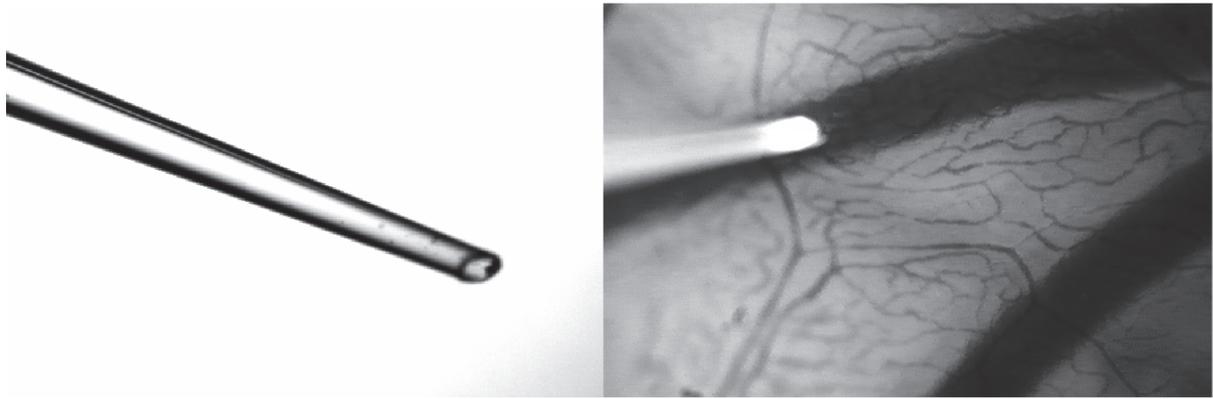


Abbildung 6: Exemplarische Mikroinjektionskapillare. Diese für die Fotoaufnahme speziell größer geschliffene Kapillare lässt den diamantförmigen, spitzen Schliff am oberen Ende erkennen. Das linke Bild zeigt die mit FITC-Dextran gefüllte Kapillare über einem Dottersackgefäß (Aufnahme mit 5x Objektiv).

### 3.6 Versuchsablauf

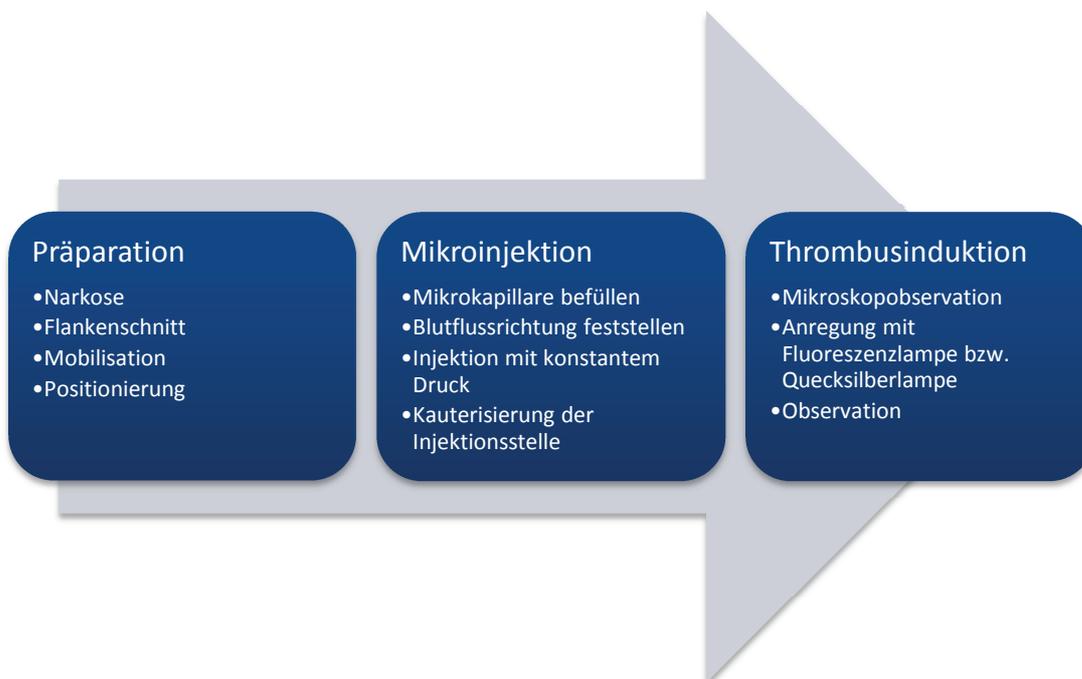
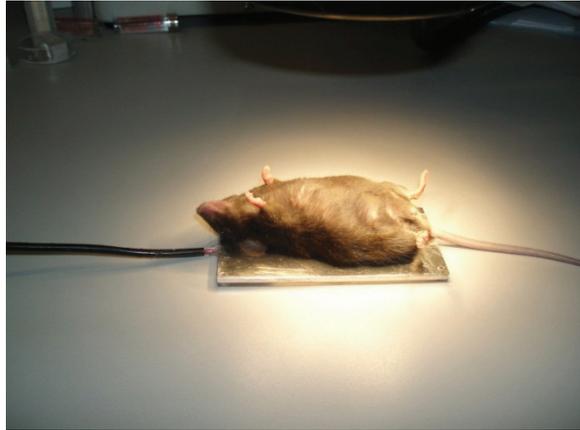


Abbildung 7: Experimenteller Ablauf zur *in-vivo* Thrombusinduktion in fetalen Dottersackgefäßen.

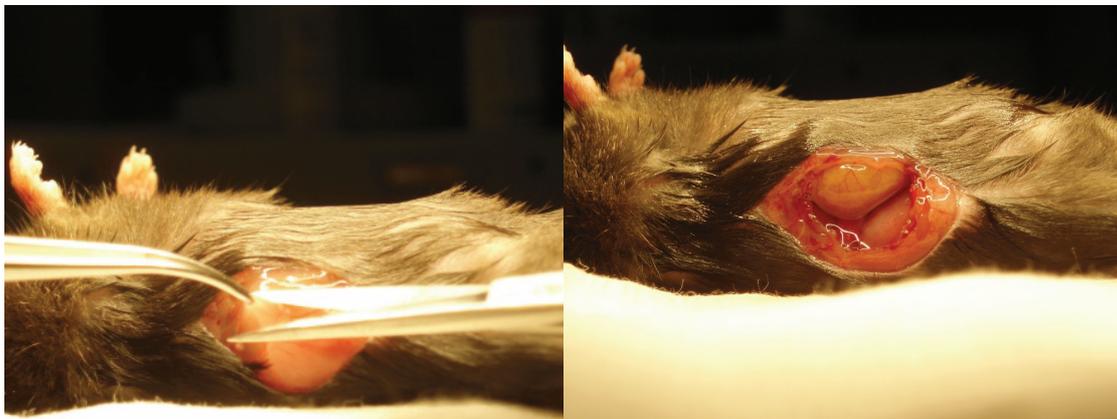
#### 3.6.1 Präparation der Dottersackgefäße

Die Versuchstiere wurden während Präparation und Bildgebung auf einer Heizplatte gelagert, mit deren Hilfe eine konstante Körpertemperatur von 37°C gewährleistet wurde (Frommhold et al., 2010). Die Präparation erfolgte unter einem Präparationsmikroskop der Marke Olympus.



**Abbildung 8: Die trächtige Muttermaus wird auf einer Heizplatte positioniert. Die prominente Flanken- und Bauchwölbung gibt einen Hinweis auf die Lage der Feten.**

Für die chirurgische Präparation wurde das Muttertier in Rückenlage auf die Wärmeplatte positioniert (Abbildung 8). Die Präparationsfläche wurde mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und das Peritoneum durch einen Flankenschnitt eröffnet (Abbildung 9).



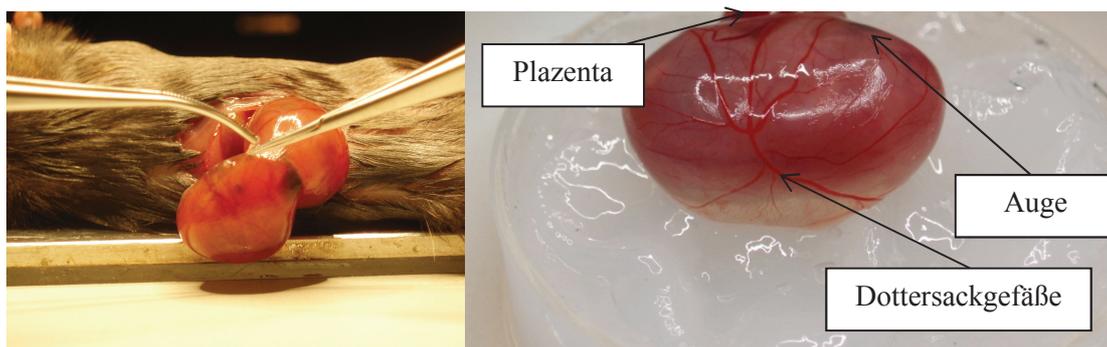
**Abbildung 9: Die Inzision von Haut und Peritoneum ermöglicht den seitlichen Zugang zur Bauchhöhle. Blutgefäße im Peritonealbereich wurden durch Elektrokauterisierung verödet.**

Unter Blutstillung und Superfusion mit 37°C warmer Intravitalmikroskopie-Puffer-Lösung wurden die Feten aufgesucht und das Uterushorn vorsichtig auf eine vorbereitete Präparationsunterlage (beschichtetes und konstant superfundiertes modifiziertes Petri-Gefäß) aus der Abdominalhöhle mobilisiert (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Der Uterusschlauch wird vorsichtig aus der Abdominalhöhle herausmobilisiert und präpariert. Als Zugang zu den einzelnen Feten bzw. den Dottersäcken dient der Bereich zwischen zwei Feten, in dem die Uterusmuskulatur ohne Risiko eines Traumas für die Feten vorsichtig gefasst werden kann.

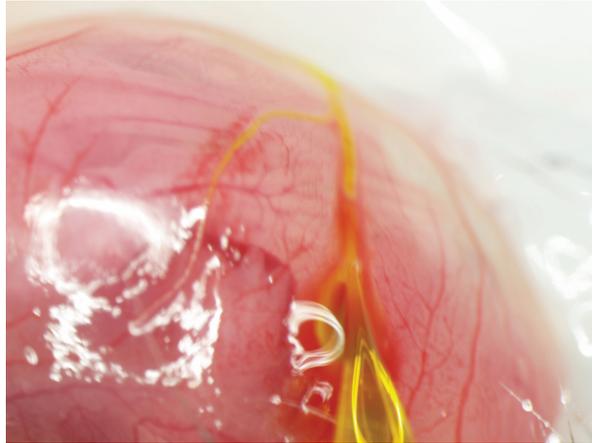
Die Inzision der Uterusmuskulatur ermöglichte das Freipräparieren des Feten im intakten Dottersack und die Darstellung der Dottersackgefäße. Der Fetus bleibt während der gesamten Experimente durch die Plazenta mit der Mutter verbunden, wodurch die intakte Zirkulation gewährleistet wird (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Nach Inzision und Präparation (links) erfolgt die Lagerung des Feten in einem speziell präparierten Petri-Gefäß (rechts), welches mit medizinischer pH-neutraler Vaseline gefüllt und warmem Superfusionspuffer überspült wird.

### 3.6.2 Injektion in fetale Dottersackgefäße

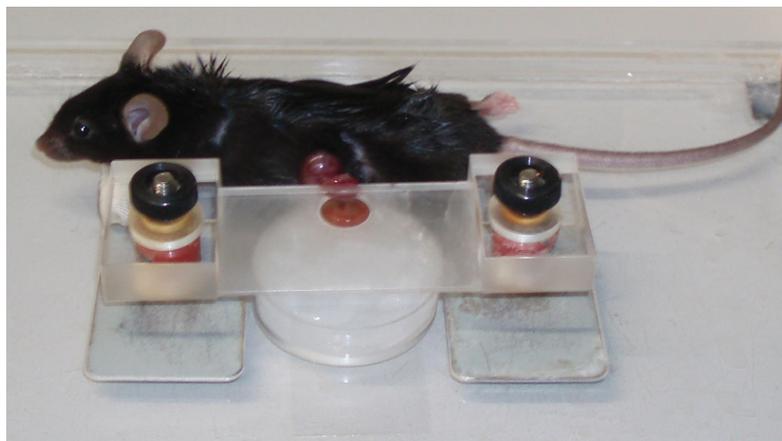
Zur Injektion in fetale Dottersackgefäße wurde ein Seitenast gewählt, der in einen der zum Feten führenden Hauptäste mündete. Ein gerader Verlauf erwies sich als vorteilhaft. Die Flussrichtung des Blutes wurde unter dem Präparationsmikroskop in höherer Vergrößerung nachvollzogen und die Injektionsrichtung in Übereinstimmung mit der Flussrichtung gewählt. Zur Thrombusinduktion wurden 5-10 $\mu$ l einer 10%-igen FITC-Lösung in eine der Mikrokapillaren aufgezogen und unter konstantem Druck in das Gefäßsystem injiziert (Abbildung 12). Die Injektionsstelle wurde danach mittels eines Kauters (Gemini Cautery System) vorsichtig unter Vermeidung einer Schädigung des Dottersackes verschlossen.



**Abbildung 12: Exemplarische Injektion von FITC-Dextran in ein Dottersackgefäß. Die Injektionskapillare folgt dem Verlauf eines Seitenastes, der in ein Hauptgefäß im Dottersack mündet.**

### 3.6.3 Mikroskopie und Thrombusinduktion

Nach erfolgter Präparation und Injektion wurde die Maus mitsamt dem Fetus auf eine handgefertigte Mikroskopiervorrichtung gelagert. Hierbei befindet sich der Fetus in dem modifizierten Petri-Gefäß, welches mit Vaseline gefüllt und mit gewärmtem Superfusions-Puffer überspült wird (siehe Abbildung 11). Durch Auflagerung eines Deckglases (Menzel 24x40 mm #1 Deckgläser) und einer mit Federn gegengelagerten Haltevorrichtung wird ein stabiles Bild erreicht, ohne übermäßigen Druck auf die fetale Zirkulation auszuüben (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Lagerung des präparierten Feten.**

Unter Verwendung des 60x-Objektivs wurde ein Gefäß aufgesucht und der Fluoreszenzfarbstoff mit dem entsprechenden Filterset mit hochenergetischem Licht einer Quecksilberlampe angeregt. Die Thrombusbildung erfolgte wie oben beschrieben durch phototoxische Anregung. Die gleichmäßige Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes wurde zu Anfang eines jeden Experimentes durch Messung der Fluoreszenzintensität anhand der Inspector Pro Software überwacht. Eine Fluoreszenzintensität unter 10000 AU (Arbitrary Units), entsprechend einer anflutenden lokal-messbaren Konzentration von 2,5% FITC-

Dextran-Lösung (vergleiche Abbildung 20), wurde als Exklusionskriterium verwendet. Die Beobachtung bis zu einem primären Gefäßverschluss erfolgte für maximal 60 Minuten. Die erste Thrombozyten-Adhäsion (onset), ein primärer Gefäßverschluss, ein erneutes Durchbrechen des Blutflusses (Reflow), sowie eine stabile Thrombusbildung wurden hierbei beurteilt. Nur Gefäße einer Größe zwischen 20 und 50  $\mu\text{m}$  wurden für die Auswertung berücksichtigt.

### **3.7 Multiphotonenmikroskopie**

Zur Analyse der anatomischen Strukturen, sowie der Zell-Zell-Interaktionen wurde unter anderem die Multiphotonenmikroskopie verwendet. Hierfür kam das unter Punkt 3.1.2. beschriebene System von LaVision BioTec (Kurz et al., 2016) zum Einsatz. Anatomische Übersichtsaufnahmen der Dottersack- und fetalen Zirkulation wurden mittels FITC-Dextran Injektion durchgeführt. Für Zell-Zell-Interaktionsanalysen wurden gefärbte Thrombozyten und LysM-EGFP-exprimierende Tiere bzw. alternativ Injektionen fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet. Auflösung, Aufnahmedauer und Z-Ebenenverschiebung wurden den jeweiligen Erfordernissen angepasst, um die Strukturen bzw. das entsprechende Gefäß mit den Zellen innerhalb der Fokusebene darzustellen.

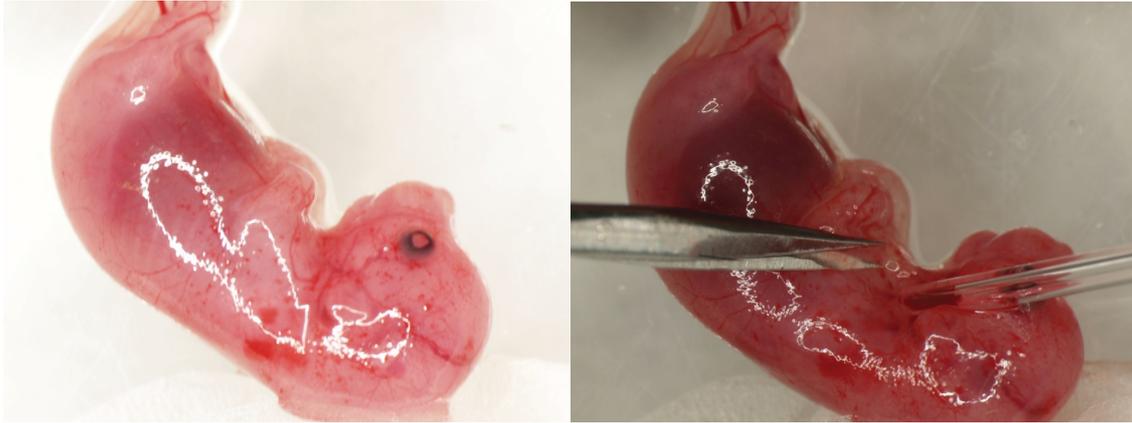
Die Darstellung mittels MPLSM erforderte eine Minimierung der Bewegungsartefakte, sowie die Stabilität des als Medium fungierenden Tropfens am Objektiv. Hierfür wurde der Fetus nicht nur auf Silikon gelagert, sondern eine ringförmige Mulde vorgeformt und die Ränder des Feten ebenfalls mit Silikon stabilisiert. Zudem kann bei Bedarf durch Verwendung von Ultraschallgel das Problem der Tropfenstabilität umgangen werden.

Nachfolgend der Aufnahme wurden die Bilder mit der Bildverarbeitungssoftware Imaris 7 weiterverarbeitet.

### **3.8 Gewinnung adulter und fetaler Blutproben**

Adulte Blutproben können wie vormals beschrieben durch kardiale Punktion, Punktion der Vena cava oder durch retroorbitales Ausbluten gewonnen werden. In dieser Arbeit wurde die kardiale Punktion bzw. Entnahme aus der V. cava durchgeführt.

Zur Analyse fetaler Blutproben benötigt man je nach Anwendung entweder eine möglichst hohe Zellzahl oder ein genau definiertes Volumen. Für die Entnahme eines exakt definierten Blutvolumens wurde ein Fetus aus dem Dottersack mobilisiert, nach Entfernung von Gewebe und Flüssigkeit ein seitlicher Halsschnitt gesetzt und mithilfe einer heparinisierten Kapillare das Blut aus V. subclavia bzw. V. jugularis entnommen (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Blutentnahme aus Feten.** Nach Mobilisation des Feten und seitlicher Halspräparation wird unter Beobachtung mittels Präparations-Stereoskop Blut in eine heparinisierte 5 $\mu$ l Kapillare entnommen.

Für die Aktivitätsuntersuchungen und weitere Analysen mit möglichst hoher Zellzahl wurden mehrere Feten dekapitiert und in modifizierten Tyrodes-Puffer mit Heparin-NaCl ausgeblutet.

Vortests zeigten, dass mit dem hier dargelegten Protokoll der Blutentnahme und Probenaufbereitung nach wie vor eine Thrombinstimulation auslösbar und keine Präaktivierung nachvollziehbar war. Die Blutproben wurden zur Herstellung von gewaschenem Vollblut mehrfach zentrifugiert. 100  $\mu$ l Blut aus der Vena Cava adulter Mäuse wurden in 300  $\mu$ l 20 U Heparin aufgenommen und in 10 ml modifizierten Tyrodes Puffer ohne Calcium und Magnesium mit 700  $\mu$ l 20 U Heparin überführt. Danach erfolgte der erste Zentrifugationsschritt bei 560G für 10 Minuten ohne Bremse. Danach wurde der Bestandteil des gewaschenen Vollblutes in 1 ml Tyrodes Puffer ohne Calcium und Magnesium überführt und für 5 Minuten bei 560G ohne Bremse gewaschen. Im Anschluss wurde das Blutpellet in Tyrodes Puffer mit Calcium und Magnesium resuspendiert. Fetale Blutproben wurden in 10 ml Tyrodes ohne Calcium und Magnesium mit 1 ml 20 U Heparin ausgeblutet und bei 560 G abzentrifugiert und nachfolgend entsprechend dem oben beschriebenen Vorgehen ebenfalls resuspendiert. Die Resuspension erfolgte volumenabhängig je nach Größe des Zellpellet.

### **3.9 Verfahren zur Isolierung von Thrombozyten aus Blutproben**

Die Isolation der Thrombozyten erfolgte mittels mehrfacher Zentrifugations-Schritte mit möglichst geringer Geschwindigkeit (Pircher et al., 2012). Thrombozytenreiches Plasma (Platelet-rich-plasma = PRP) wurde durch zweimalige Zentrifugation bei 180 G (Raumtemperatur, 5 Minuten, ohne Bremse) erhalten und anschließend mit 400 G pelletiert. Das hierdurch gewonnene Thrombozyten-Pellet wurde je nach Größe und Menge in 100 bzw. 200  $\mu$ l Tyrodes-Puffer ohne Calcium und Magnesium resuspendiert und ein Thrombozytencount mithilfe des Idexx hematology analyzers erhoben. Durch Berechnung der Gesamt-Thrombozytenzahl in dem verbleibenden Volumen wurde das restliche Pellet erneut abzentrifugiert (440 G, 5 min, Raumtemperatur) und auf eine Konzentration von 100 K/ $\mu$ l Thrombozyten verdünnt.

### **3.10 Thrombozytenparameter**

Die Analyse von MPV (Mean Platelet Volume), PDW (Platelet Distribution Width) und PLCR (Platelet large cell ratio) erfolgte durch Messung isolierter Thrombozyten mit einem Idexx Procyte hematology analyzer. Die Isolation von Thrombozyten wurde hierbei durchgeführt um eine exaktere Messung zu erhalten, da bei diesem Modell des Idexx hematology analyzer teilweise fetale Leukozyten bzw. Retikulozyten und Thrombozyten nicht voneinander und von anderen Zellen abgegrenzt werden können. Durch die vorherige Aufreinigung der Blutplättchen kann so eine genaue Messung der gewünschten Thrombozyten-Werte erfolgen.

### **3.11 Durchflusszytometrie**

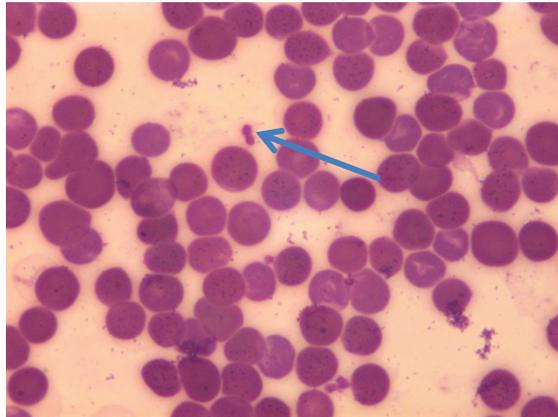
Die Bestimmung der Thrombozytenzahlen, die Analyse des Aktivierungsstatus der Thrombozyten, sowie der Expression von Oberflächenmarkern bzw. Rezeptoren erfolgte mittels durchflusszytometrischer Untersuchung.

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, die eine Analyse von Zellen anhand von Größe, Granularität und Oberflächen- bzw. Zellmerkmalen erlaubt. Hierbei kommen fluoreszenzmarkierte Antikörper zum Einsatz. Diese binden an die jeweiligen Rezeptoren der Zelle. Das Durchflusszytometer regt die Fluorochrome mittels Laserlicht an und die emittierten Strahlen werden durch Detektoren aufgefangen. Die Lichtstreuung bzw. Lichtbeugung eines Laserstrahls durch eine Zelle spiegelt die Granularität (Sideward-Scatter; SS) bzw. die Größe der Zelle (Forward Scatter; FS) wider (Brown und Wittwer, 2000).

#### **3.11.1 Bestimmung der fetalen Thrombozytenzahlen**

Die Bestimmung von Thrombozytenzahlen kann durch verschiedene Methoden erfolgen (Abbildung 15). Die automatische Bestimmung der Thrombozytenzahlen mittels eines Coulter-Counters (Coulter AC-T-Serie; Coulter Corporation) konnte aufgrund des geringen Blutvolumens der Feten und aufgrund der veränderten fetalen Thrombozytenmorphologie nicht durchgeführt werden. Das Anfärben und manuelle Auszählen von Thrombozyten mittels der Brillant-Kresylblau-Methode und auch mit Hilfe des gewerblichen ThromboCount pur Ansatzes funktionierte im adulten System sehr gut, die unterschiedlichen Eigenschaften der fetalen Thrombozyten machten eine Bestimmung hier jedoch erneut unmöglich. Als zielführend zeigte sich die Methode der exakten Bestimmung der Thrombozytenzahlen mittels Durchflusszytometrie (Alugupalli et al., 2001). Diese Methode benötigt jedoch ein genau definiertes Blutvolumen, um durch Bead-Referenzbestimmung einen Rückschluss auf die in dem Volumen enthaltene Zellzahl ziehen zu können. Zur Gewinnung der fetalen Blutproben wurde wie in Kapitel 3.8 dargestellt ein seitlicher Halsschnitt angelegt und durch Verwendung einer heparinisierten 5 µl Glaskapillare das Blut abpunktiert. Danach wurde das Blut der Kapillare 1:10 in Citrat-NaCl verdünnt. 10 µl dieser verdünnten Blutlösung wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln mit dem gleichen Volumen eines DyLight 488 gelabelten GpIb-Antikörpers (emfret) inkubiert. Schließlich erfolgte die Zugabe von 970 µl PBS und 10 µl SPHERO rainbow fluorescent beads (Spherotech), die zuvor nach Herstellerangaben im Ultraschallbad resuspendiert wurden. Nach der durchflusszytometrischen Analyse der Proben konnte so anhand der gemessenen Beads auf

die in dem entsprechenden Volumen befindliche Anzahl von Thrombozyten rückgerechnet werden.



**Abbildung 15: Exemplarischer Blutausschlag eines E16.5 Feten. Mittig zeigen sich zwei Thrombozyten (Pfeil). Hierbei wurde sichtbar, dass Thrombozyten im Blut nachweisbar sind, jedoch in dieser Form nicht ausreichend quantifizierbar. Die Aufnahme erfolgte mit einem 100x Objektiv.**

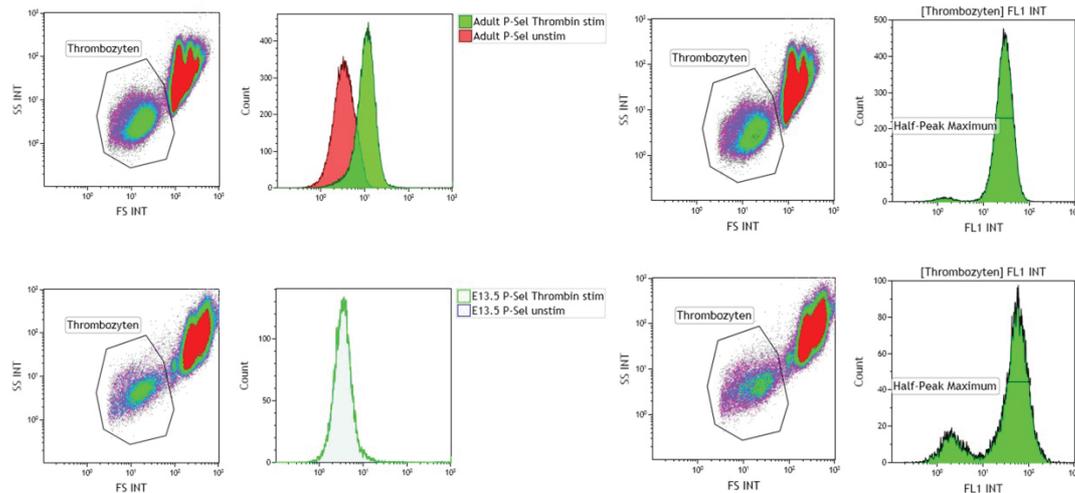
### **3.11.2 Bestimmung der Oberflächenexpression und Aktivität von Thrombozyten**

25  $\mu$ l des gewaschenen Vollblutes wurden in FACS-Röhrchen überführt und mit 25  $\mu$ l Tyrodes mit Calcium und Magnesium und der nach Herstellerangabe verwendeten Menge des entsprechenden Antikörpers für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und hierbei eine Ruhezeit der Thrombozyten gegeben. Anschließend wurden 400  $\mu$ l Tyrodes Puffer mit Calcium und Magnesium hinzugegeben und die Proben im FACS-Gerät analysiert.

Das Thrombozyten-Gate wurde im Rahmen der Countbestimmung per GpIb-Expression und anhand der Größe festgelegt, im Verlauf für die Aktivitätsmessung wurde die Bestimmung mittels der FS/SS-Eigenschaften durchgeführt. Die Oberflächenexpressionsanalyse erfolgte nach Einstellung der Negativ-Proben anhand ungefärbter Kontrollen mit den entsprechenden Laser-Einstellungen für die zugehörigen Antikörper. Als Stopkriterium dienten 50.000 Zellen im Thrombozyten-Gate bei einer maximalen Aufnahmedauer von 300 Sekunden pro Probe.

Für die Stimulation der Thrombozytenproben erfolgte die Herstellung der gewaschenen Vollblutproben wie beschrieben. Im letzten Schritt erfolgte die Stimulation mit 0,1 U/ml Thrombin.

Hierbei wurde die Messung als MFI-Ratio (Mean Fluorescence Intensity) in AU (Arbitrary Units) angegeben. Dies berechnet sich als der Fluoreszenzwert nach Aktivierung dividiert durch den Fluoreszenzwert ohne Aktivierung und gibt so den activational shift, d.h. die Verschiebung in den Aktivierungszustand eines Thrombozyten (-rezeptors) wieder. Eine klassische Aktivierung der Thrombozyten in der adulten Maus spiegelt sich in erhöhten P-Selectin Oberflächenleveln (Abbildung 16), erhöhter GpIIb/IIIa high affinity Konformation und abnehmenden GpIb-Werten wieder. Die Auswertung erfolgte mittels Kaluza-Software. Die Messung des Half-Peak-Maximum-Wertes und die anschließende statistische Analyse der X-Med-Werte wurde durchgeführt.



**Abbildung 16: Exemplarische FACS-Gating Strategie.** Thrombozyten wurden anhand ihrer Größe und Granularität für die Oberflächenexpressionsanalyse definiert. Hervorgehend aus diesem Gate wurde die Fluoreszenzintensität als Full Width at Half Maximum Fluorescence Intensity (FWHM) bestimmt. Hierdurch wird der linke, in repräsentativen Messungen als isotypenidentisch gelegene Peak im Histogramm, nicht berücksichtigt und nur die positiven (das Merkmal exprimierenden) Events bewertet. (Obere Reihe Adult, untere Reihe E13.5; links P-Selectin Oberflächenexpression unter Thrombinstimulation, rechts CD41 Oberflächenexpression).

### 3.12 Western Blot

Isolierte Thrombozyten wurden durch Zugabe des gleichen Volumens Proteinextraktionspuffer (Endkonzentration 50000 Thrombozyten/ $\mu$ l) und Belassen für 10 Minuten auf Eis lysiert. Hiernach wurden die Proben bei 11900 G und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand sofort bei -80°C weggefroren.

Vor Verwendung wurden die Proteinkonzentrationen in den Lysaten mittels Pierce BCA Assay bestimmt und eingestellt. Die Proben wurden auf ein 10% SDS-Polyacrylamidgel geladen und auf eine PVDF Membran per Elektroblothing übertragen. Die Blots wurden in 5% BSA /TBS-T geblockt und über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Sekundäre Antikörper wurden hinzugefügt und nach einem finalen Waschschritt das HRP Chemilumineszenzsubstrat hinzugefügt um Aufnahmen zu erfassen. Die quantifizierten Werte wurden auf entsprechende Haushaltsproteine normalisiert.

### 3.13 Thrombozyten-Transfusion und Analyse der Interaktion fetaler Leukozyten mit adulten Thrombozyten

Nach entsprechender Verdünnung wurden die Thrombozyten mit Rhodamin-6G 0,05%, 200  $\mu$ l/ml (Massberg et al., 1998) unter Zugabe von 1  $\mu$ g/ml Prostaglandin I<sub>2</sub> inkubiert und erneut gewaschen (400 G, 5 Minuten). Nach einer Ruheperiode von 15 Minuten wurde den Feten eine Menge von 200.000 Thrombozyten injiziert und die Feten auf der der Injektionsstelle gegenüberliegenden – und somit am weitesten von der das Gefäß penetrierenden Injektion entfernten – Seite observiert. Folgend der Transfusion adulter fluoreszenzmarkierter Thrombozyten in fetale Dottersackgefäße konnte nicht nur die Interaktion selbiger Zellen

untereinander und mit Endothelzellen betrachtet werden, sondern ebenfalls die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion. Für die Leukozyten-Interaktionsversuche wurden LysM-EGFP-Mäuse verwendet. Diese Tiere exprimieren ein enhanced-green-fluorescent-protein (grün fluoreszierendes Protein) im Lysozym M-Locus (Faust et al., 2000). Durch konventionelle Epifluoreszenzmikroskopie (Aufnahme mit einem vorgeschalteten Breitbandfilter und einem der jeweiligen Kamera vorgeschalteten weiteren Filter; hierdurch parallele Aufzeichnung auf zwei LaVision Digitalkameras gleichzeitig als Überlagerungsbild), sowie durch MPLSM konnte die Interaktion von fluoreszierenden Zellen überwacht werden.

### 3.14 *In-vivo* Färbung und Marker von fetalen Zellen

Die Fluoreszenzanfärbung von Gewebe und Zellen, sowie die Darstellung genetisch modifizierter Zellen erlaubt die detaillierte Untersuchung von Zellfunktionen im Organismus.

Name	Typ	Anfärbung von	Effekt	Vorteil	Nachteil
<b>Acridin-Orange</b>	Farbstoff	Plasma, Leukozyten, Endothel	Phototoxisch in hohen Dosen	Plazenta-gängig	Ungewollte Phototoxizität bei Leukozyten-aufnahmen
<b>FITC-Dextran</b>	Farbstoff	Plasma, Endothel	Phototoxisch in hohen Dosen	Gute Darstellbarkeit und Steuerbarkeit für photo-toxische Thrombus-induktion	Je nach Molekulargewicht als Permeabilitätsmarker geeignet
<b>TRITC</b>	Farbstoff	Plasma	Plasmamarker	Gute Darstellbarkeit	Je nach Molekulargewicht als Permeabilitätsmarker geeignet
<b>GpIb X488</b>	Anti-körper	Thrombozyten, Megakaryozyten	Nicht interagierende Markierung des GpIb		
<b>GpIb X649</b>	Anti-körper	Thrombozyten, Megakaryozyten	Nicht interagierende Markierung des GpIb		
<b>LysM EGFP</b>	Transgen	Zellen der myeloiden Reihe, Endothelzellen	EGFP Signal von Leukozyten		Im fetalen Organismus nicht spezifisch für Neutrophile Granulozyten
<b>Cx3Cr1 GFP</b>	Transgen	Monozyten, Endothelzellen	GFP-Signal von Monozyten	Anfärbung verschiedener Strukturen, u.a. cardial,	Im fetalen Organismus nicht spezifisch für Monozyten

				intestinal, Endothel und Dottersack- inseln	
<b>Sca-1 GFP</b>	Transgen	Hämatopoetische Vorläuferzellen, Endothelzellen	GFP-Signal von hämatopoetischen Vorläuferzellen		Im fetalen Organismus nicht spezifisch für hämatopoetische Progenitorzellen
<b>Pf4 tdRFP</b>	Transgen	Thrombozyten, Megakaryozyten			Nicht nur auf megakaryozytäre Zellen beschränkt (Calaminus et al., 2012)

**Tabelle 11: Darstellung von Anfärbemethoden im fetalen Modell.**

### 3.15 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte nach Dokumentation der Daten in Excel 2010 durch SigmaPlot (Version 12.0; Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Die Analyse der *in-vivo* Raten wurde mittels Chi-Quadrat-Analyse vollzogen. Zur weiteren Unterscheidung der Subgruppen folgte ein paarweiser Z-Test. Die Zeitwerte der *in-vivo* Experimente wurden mittels Kruskal-Wallis ANOVA on ranks mit Dunn's posthoc Analyse untersucht. Durchflusszytometrisch und anhand Western Blot erhobene Werte wurden ebenfalls mittels Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks und Dunn's posthoc Analyse und One way ANOVA mit Holm-Sidak posthoc Analyse examiniert.

# KAPITEL 4

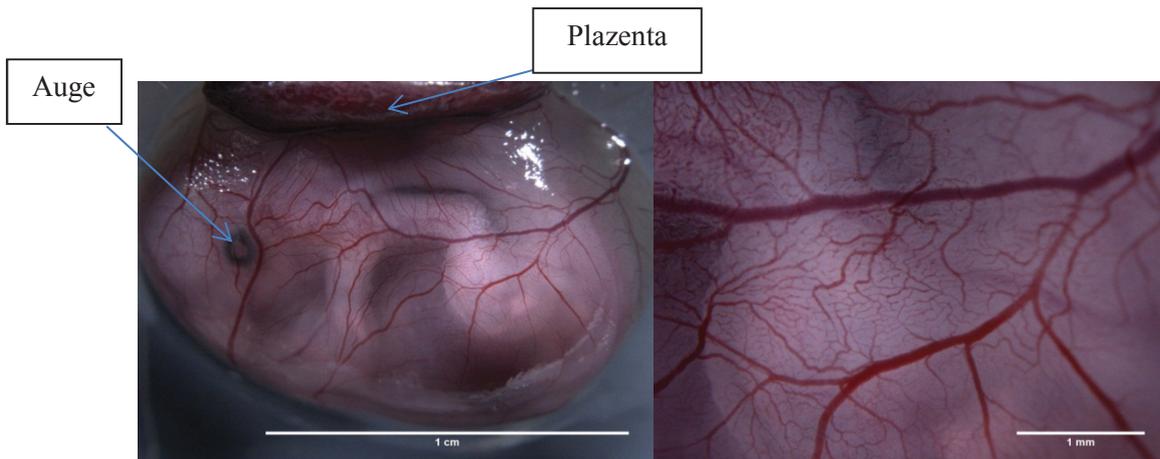
---

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Entwicklung und Etablierung von Präparations- und Bildgebungsmethoden zur Darstellung der Thrombozytenfunktion im Mausfetus *in-vivo*

#### 4.1.1 Anatomische Analyse der fetalen Zirkulation

Zur Untersuchung der fetalen Zirkulation der Maus wurden Übersichtsaufnahmen (Abbildungen 17 und 18), *in-vivo* Epifluoreszenzaufnahmen und Multiphotonenmikroskopie-Aufnahmen angefertigt. Hierbei zeigte sich im Dottersack ein vielfach verzweigtes Gefäßnetz mit Konfluenz und Diffluenz bei unregelmäßigen Flussmustern, die keine genaue Differenzierung in Arteriolen und Venolen zuließ. Eine Aufnahme der Dottersackgefäße, sowie der oberen Hautschichten des Feten ist in allen Regionen möglich.



**Abbildung 17:** E15.5 Fetus in Dottersack. Im oberen Bereich der Abbildung ist die dunkelrote Plazenta sichtbar. Im linken Bereich erkennt man das dunkel pigmentierte Auge des Feten. In der vergrößerten Ansicht (rechts) sieht man die vielfache Vernetzung der Gefäße innerhalb des Dottersacks.



**Abbildung 18: E15.5 Fetus innerhalb des Dottersackes nach Injektion von FITC-Dextran in Dottersackgefäße. Man erkennt die fluoreszierenden Anteile des Gefäßbettes im Vergleich zu dunkleren Gefäßen, in die der Farbstoff noch nicht gelangt ist. Hierdurch wird die Möglichkeit unterschiedlicher Verteilungsmuster je nach Injektionsort und –art deutlich.**

#### **4.1.2 Vorversuche zur Thrombusinduktion**

Basierend auf den unterschiedlichen Protokollen zur Thrombusauslösung im adulten Tier wurden Vorversuche mit verschiedenen Techniken durchgeführt.

Die Applikation von Eisenchlorid stellte sich als schwierig heraus, da durch die Wölbung des Dottersacks keine ausreichende Stabilität eines Tropfens erreicht wird. Bei Aufbringung eines mit  $\text{FeCl}_3$ -durchtränkten Filterpapiers sorgen die sehr weitreichenden Gefäßaufzweigungen dafür, dass zumeist mehrere Gefäße gleichzeitig betroffen sind. Ebenfalls gestaltet sich aufgrund des Filterpapiers die Beobachtung der Thrombusentstehung in diesem Bereich als schwierig bis unmöglich. Weiterhin beobachteten wir eine Schädigung des umliegenden Dottersackgewebes.

Eine weitere elegante Methode ist die Acridin-Orange-Applikation. Hierbei wird dem Muttertier eine Acridin-Orange-Lösung in die Blutbahn appliziert und aufgrund der molekularen Größe der Übertritt in den Feten beobachtet. Bei Exzitation mit hochenergetischem Licht kann dann die Thrombusentstehung durch Endothelanregung und –schädigung überwacht werden. Allerdings sind die Konzentrationsunterschiede bedingt durch das Verteilungsvolumen der Mutter erschwert zu beherrschen, wodurch sich eine zuverlässige Reproduktion der Ergebnisse schwierig gestaltete.

Als zielführend stellte sich die Mikroinjektion von FITC-Dextran in Dottersackgefäße des Feten dar. Hierdurch wurden die Gefäße für Epifluoreszenzaufnahmen zugänglich, während zeitgleich durch die Anregung mit hochenergetischem Licht in dem Observationsfeld ein Thrombus ausgelöst werden konnte und eine präzise Administration eines vordefinierten Volumens möglich war.

### 4.1.3 Mikroinjektion

Die Durchführung der Mikroinjektion kann manuell oder mittels Mikromanipulator erfolgen. Es zeigte sich, dass die manuelle Punktion der fetalen Dottersackgefäße einfacher und besser reproduzierbar ist, als mit dem Mikromanipulator, durch den es zu einem Einreißen des Dottersackes oder krümmungsbedingten Injektionsschwierigkeiten kommen kann.

Anhand der für die Injektion ausgewählten Gefäße kann man die Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes oder anderer Substanzen vorhersehen. Hierbei werden die zum Feten oder zur Plazenta führenden Gefäße unterschieden und in ihrer Versorgungsroute sichtbar (Abbildung 19).

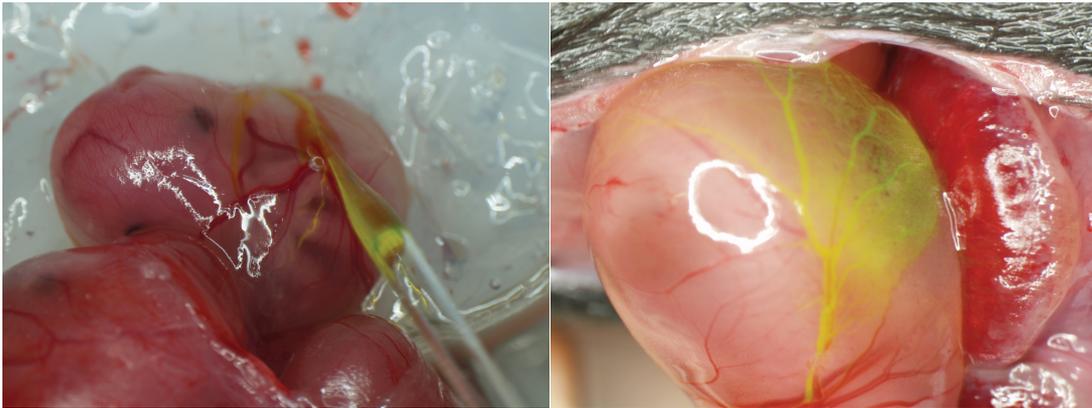


Abbildung 19: Unterschiedliche Verteilungsmuster von Farbstoffen im Feten.

### 4.1.4 Fluoreszenzmessung

Um eine gleichmäßige Anregung von Endothel und Thrombozyten zu erreichen, musste eine Möglichkeit der Messung von lokaler Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes und Lichtintensität gegeben werden.

Die Analyse der phototoxischen Konzentrationen erfolgte durch Messung von Fluoreszenzwerten einer FITC-Dextran-Verdünnungsreihe (Abbildung 20). Um die lokale Konzentration *in-vivo* bestimmen zu können, wurde eine Messung der absoluten Fluoreszenzintensität innerhalb des Gefäßes durch den CCD-Chip der *in-vivo* Mikroskop-Kamera durchgeführt. Hierdurch konnten die gemessenen intravaskulären Fluoreszenzwerte in Bezug zueinander gesetzt werden und eine Mindestintensität und –konzentration für die erfolgreiche Durchführung der Experimente festgelegt werden.

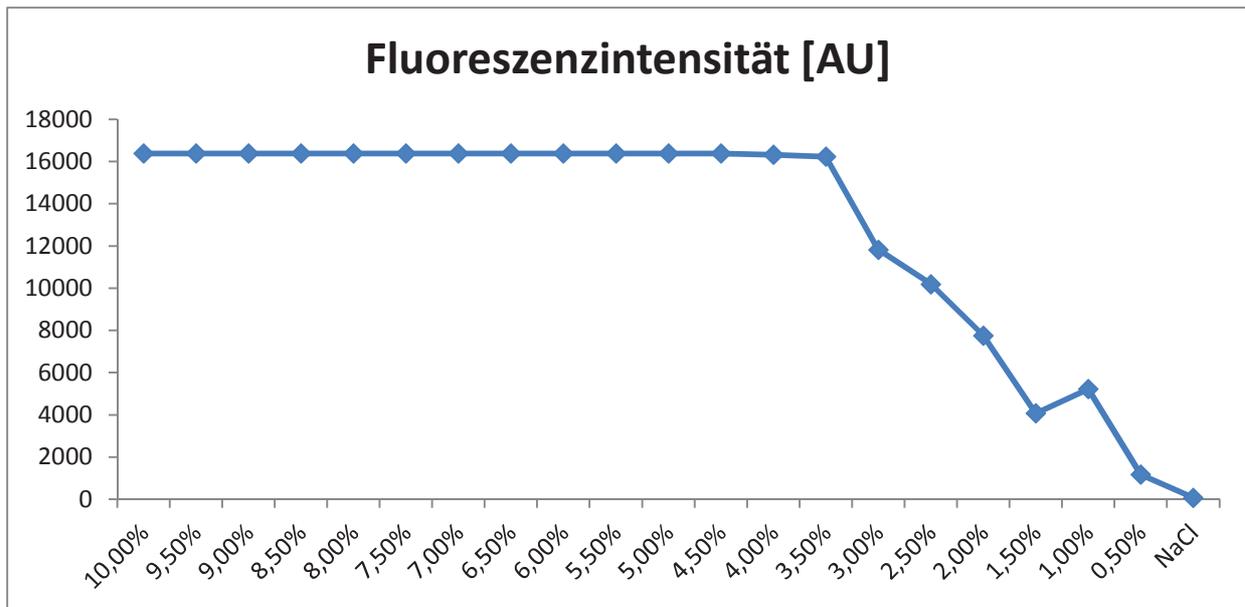


Abbildung 20: Fluoreszenzintensität (angegeben in Arbitrary Units). Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels Herstellung einer FITC-Dextran Verdünnungsreihe *in-vitro* und Analyse der nach Exzitation abgegebenen absoluten Fluoreszenzwerte mittels des Kamera CCD-Chips des *in-vivo* Mikroskops ohne Auto- oder Gammakorrektur.

## 4.2 *In-vivo* Analyse der Thrombozytenfunktion und Thrombusbildung

Die in Kapitel 1.1 erwähnten Schritte der Thrombusbildung und damit einhergehenden fetalen Thrombozytenfunktionen wurden in dem neu entwickelten *in-vivo* Mausmodell untersucht.

### 4.2.1 Thrombozytenadhäsion während der fetalen Entwicklung – „Onset“

Die Anlagerung von Thrombozyten an die Gefäßwand wird als „Onset“, d.h. Anfang der Thrombusformation angesehen. Die Zeit bis zur Erstanlagerung von Thrombozyten, sowie die Anzahl der Tiere, welche eine solche Thrombozytenadhäsion aufwiesen, wurden analysiert. Es zeigte sich ein signifikant geringeres Auftreten von Onset-Bildung in E13.5 Feten gegenüber E14.5-16.5 und E17.5 Feten ( $17,65 \pm 9,53\%$  vs.  $65,63 \pm 8,53\%$  vs.  $75,00 \pm 16,37\%$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p \leq 0,01$ ). Ebenfalls konnte eine Verzögerung der Onset-Bildung in E13.5 Feten beobachtet werden, die sich langsam in Richtung Geburt reduzierte ( $40,60 \pm 3,06$  min vs.  $19,68 \pm 3,46$  min vs.  $16,44 \pm 6,32$  min; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p \leq 0,05$ ). Diese Befunde deuten auf eine verminderte *in-vivo* Aktivität der Thrombozyten hin (Abbildung 21).

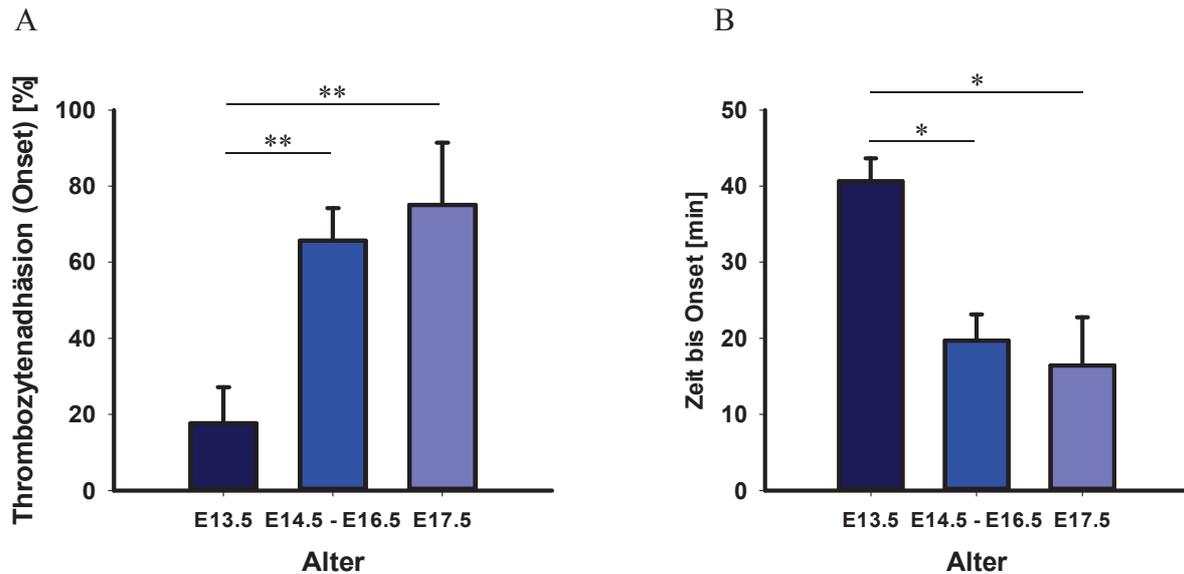


Abbildung 21: Thrombozytenadhäsion, „Onset“. Im Rahmen der *in-vivo* Light-Dye Schädigung fetaler Dottersackgefäße zeigte sich eine verminderte Thrombozytenadhäsionsrate (Onset) (A; \*\* $p \leq 0,01$ ;  $n \geq 8$  Gefäße) in jungen Feten und eine verzögerte Anlagerung von Thrombozyten an das geschädigte Endothel (B; \* $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 8$  Gefäße). Erkennbar wurde ein Ansteigen der Werte im Verlauf der fetalen Reifung.

#### 4.2.2 Thrombusbildung in jungen Feten – „First occlusion“

Die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Thrombozyten im Rahmen der Hämostase führt zur Ausbildung eines Thrombus, der bei konstanter Exzitation des Endothels und der Thrombozyten zu einem vollständigen Gefäßverschluss führen kann. Die Auswertung der Ausbildung eines ersten komplett das Gefäß verschließenden Thrombus, bezeichnet als „First occlusion“, zeigte erneut eine signifikante Verzögerung im frühen fetalen Entwicklungsstadium (E13.5 vs. E14.5-16.5 vs. E17.5:  $56,32 \pm 2,87$  min vs.  $24,83 \pm 4,35$  min vs.  $23,62 \pm 7,27$  min; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p \leq 0,05$ ), das Auftreten der aus einem onset erstmalig entstehenden Thrombusbildung war bei jungen Feten (E13.5) im Vergleich zu späteren Entwicklungszeitpunkten ebenfalls herabgesetzt, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen (E13.5 vs. E14.5-16.5 vs. E17.5:  $66,67 \pm 33,33\%$  vs.  $95,83 \pm 4,17\%$  vs.  $100,00 \pm 0,00\%$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM) (Abbildung 22).

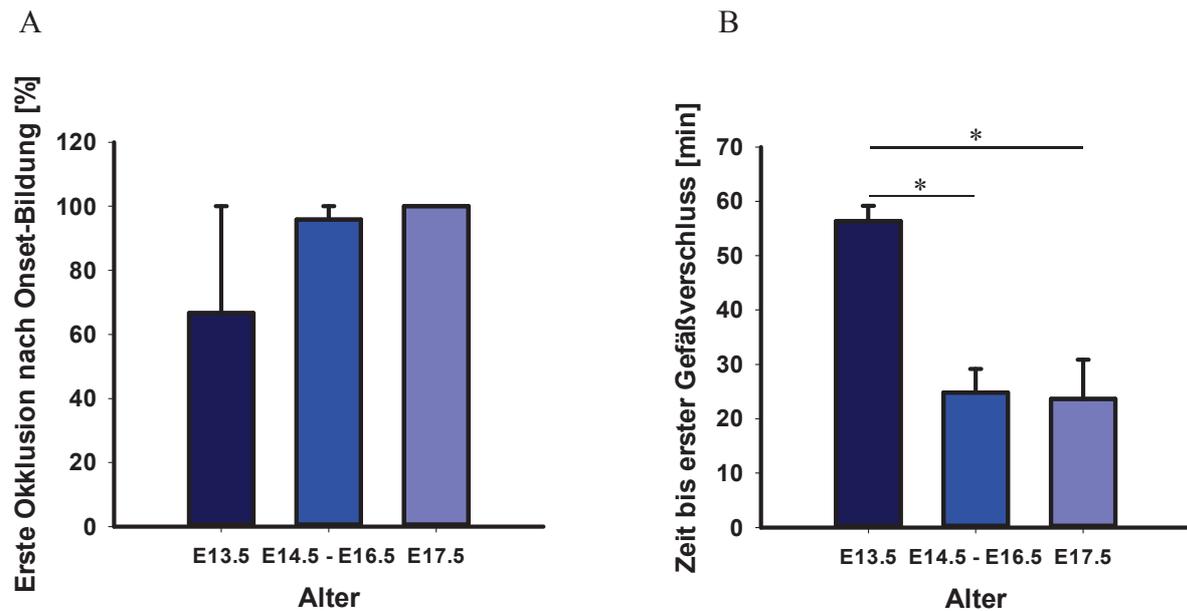


Abbildung 22: Erste Thrombusbildung, „First occlusion“. Das Auftreten der erstmaligen Thrombusentstehung ist im Hinblick auf Gefäße die vormalig einen „Onset“ zeigten bei E13.5 Feten nicht signifikant reduziert (A;  $n \geq 7$  Gefäße). Die Entstehung eines solchen ersten gefäßverschließenden Thrombus ist jedoch verzögert in E13.5 Feten verglichen mit älteren Feten (B;  $*p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$  Gefäße).

#### 4.2.3 Thrombusstabilität in jungen Feten – „Reflow“

Basierend auf den vorhergehenden Analysen zur veränderten *in-vivo* Funktionalität der Thrombozyten in jungen Feten stellte sich die Frage nach weiteren Veränderungen im Rahmen der Hämostase, wie z.B. der stabilen Quervernetzung von Thrombozyten bei der Thrombusentstehung. Interessanterweise zeigte sich in jungen Feten ein erneutes Durchbrechen des Blutflusses durch einen formierten Thrombus, ein Phänomen, das im Folgenden als „Reflow“ bezeichnet wird. Dieses Phänomen kann als Zeichen einer geringeren Thrombusstabilität angesehen werden. In der Analyse zeigte sich eine Reflowrate von  $100,00 \pm 0,00\%$  in E13.5 Feten im Vergleich zu  $64,44 \pm 16,55\%$  bei E14.5-16.5 und  $33,33 \pm 21,08\%$  bei E17.5 Feten. Die Zeit bis ein Reflow eintrat war mit  $0,59 \pm 0,26$  min deutlich kürzer als  $1,77 \pm 0,55$  min in E14.5-16.5 und  $12,57 \pm 1,30$  min in E17.5 Feten (Mittelwert  $\pm$  SEM). Aufgrund der insgesamt sehr geringen Thrombusbildungsrate bei jungen Feten ( $n=2$  für E13.5) ist keine Berechnung von Signifikanzen möglich (Abbildung 23).

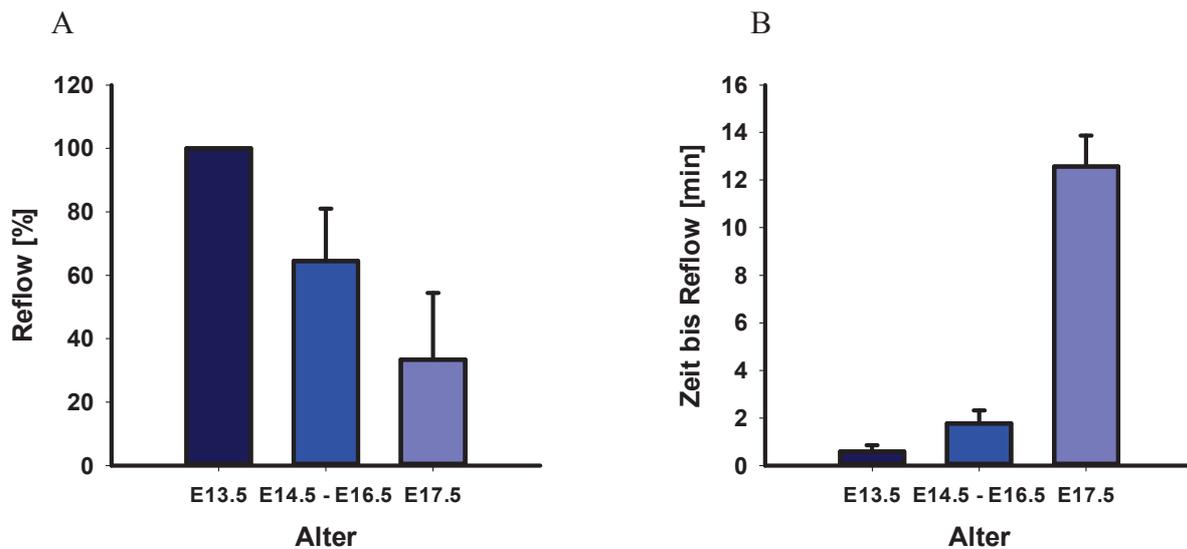


Abbildung 23: Erneutes Durchbrechen des Blutflusses nach primärer Thrombusbildung, „Reflow“. Hier zeigt sich in allen Feten des Alters E13.5, die einen ersten Thrombus ausgebildet hatten, ein erneutes Durchbrechen des Blutflusses (A;  $n \geq 2$ ). Auch die Zeit bis ein solcher Reflow auftrat war kürzer in jungen Feten im Vergleich zu älteren Feten (B;  $n \geq 2$ ).

#### 4.2.4 Vollständiger, stabiler Gefäßverschluss bei jungen Feten – „Final occlusion“

Schließlich stellte sich die Frage, ob Feten verschiedener Entwicklungsstadien eine stabile Thrombusbildung erreichen können, d.h. einen Thrombus ohne erneuten Reflow ausbilden können. Die zu diesem Zwecke durchgeführten *in-vivo* Analysen zeigten eine signifikante Reduktion der Ausbildung stabiler Thromben in frühen Stadien der fetalen Entwicklung (E13.5 vs. E14.5-16.5 vs. E17.5:  $20,00 \pm 13,33\%$  vs.  $70,83 \pm 9,48\%$  vs.  $85,71 \pm 14,29\%$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p \leq 0,05$ ). Weiterhin zeigte sich eine Verzögerung der Thrombusbildung in E13.5 Feten gegenüber E14.5-16.5 und E17.5 Feten ( $58,37 \pm 2,52$  min vs.  $30,21 \pm 4,46$  min vs.  $29,01 \pm 8,43$  min; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p \leq 0,05$ ) (Abbildung 24).

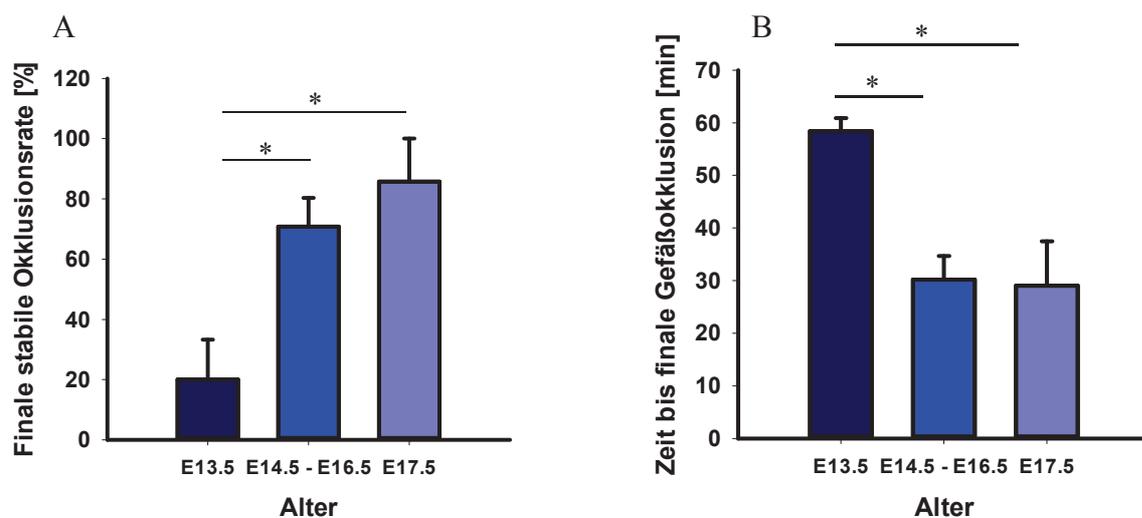


Abbildung 24: Ausbildung eines stabilen gefäßverschließenden Thrombus ohne erneutes Auftreten eines Reflows, „Final Occlusion“. E13.5 Feten zeigten eine signifikant verminderte Rate von stabilen finalen thrombotischen Gefäßverschlüssen im Vergleich zu älteren Feten (A; \* $p \leq 0.05$ ;  $n \geq 7$ ). Ebenfalls war die Zeit bis zur Ausbildung eines solchen stabilen Thrombus in jungen Feten verlängert und reduzierte sich erst im Verlauf der weiteren Reifung (B; \*  $p \leq 0.05$ ;  $n \geq 7$ ).

#### 4.2.5 Mikrovaskuläre Parameter

Zur Abgrenzung der Ursachen für die beobachteten Effekte untersuchten wir die mikrovaskulären Parameter. Hier zeigte sich eine nicht signifikante Zunahme der Blutflussgeschwindigkeiten im Verlauf der fetalen Entwicklung. Die Gefäßdurchmesser waren einheitlich für alle Gruppen. Auffallend war eine signifikant höhere intravasale Fluoreszenzintensität in E13.5 Feten.

	Mutter-tiere (n)	Feten (n)	Gefäße (n)	Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	„Centerline“ Flussgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ )	Fluoreszenzintensität (AU)
E13.5	9	11	17	$32 \pm 2$	$711 \pm 171$	$15260 \pm 980^*$
E14.5-16.5	12	14	32	$31 \pm 1$	$781 \pm 92$	$13490 \pm 430$
E17.5	4	4	8	$33 \pm 3$	$1,741 \pm 743$	$11420 \pm 800$

Tabelle 12: Mikrovaskuläre Parameter der intravitalmikroskopischen Experimente. Die Analyse zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeit im Zentrum des Gefäßes. Die Werte der Fluoreszenzintensität waren in E13.5 Feten erhöht gegenüber den beiden anderen Altersgruppen. (Angaben für Durchmesser, Centerline Geschwindigkeit und Fluoreszenzintensität: Mittelwert  $\pm$  SEM)

### 4.3 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Als Ursache für eine verminderte Thrombusbildung kommen sowohl eine veränderte Quantität, als auch Qualität der Thrombozyten in Frage (Sola-Visner, 2012). Die FACS-

Analyse wurde zur Bestimmung der Thrombozytenzahlen, Oberflächenmarker und der Aktivierbarkeit der Thrombozyten verwendet.

#### 4.3.1 Thrombozytenzahlen während der fetalen Entwicklung

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Thrombozytenzahlen im Verlauf der fetalen Entwicklung wurde anhand einer Bead-Referenzmethode durchgeführt. Thrombozyten wurden mittels Größe, Granularität und GpIb-Expression von anderen Zellen abgegrenzt.

Hierbei zeigten sich signifikant niedrigere Thrombozytenzahlen für Feten aller Altersgruppen im Vergleich zu adulten Kontrolltieren (weibliche Muttertiere) (E13.5 vs. E14.5-16.5 vs. E17.5-18.5 vs. Adult:  $37210 \pm 14891/\mu\text{l}$  vs.  $258439 \pm 24678/\mu\text{l}$  vs.  $325300 \pm 28845/\mu\text{l}$  vs.  $994410 \pm 102753/\mu\text{l}$  Thrombozyten; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p \leq 0,01$ ). In der Subanalyse zeigte sich zudem eine Signifikanz zwischen Feten des Alters E13.5 und E17.5-18.5 (Abbildung 25).

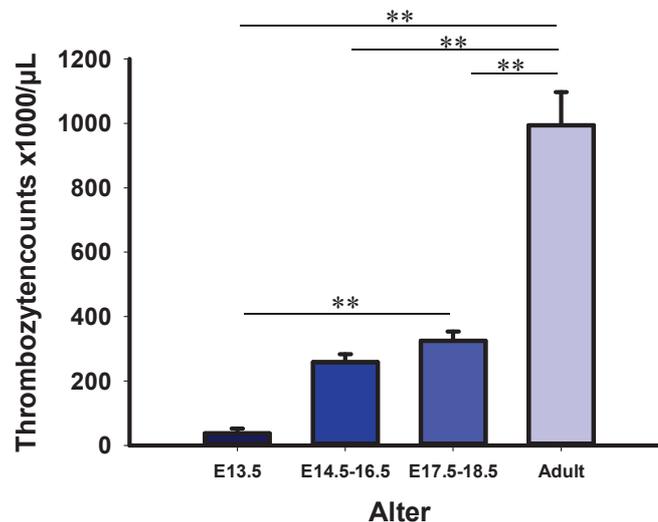


Abbildung 25: Thrombozytenzahlen während der fetalen Entwicklung. Die Anzahl der zirkulierenden Thrombozyten wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hier zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Thrombozytencounts während der fetalen Entwicklung mit den niedrigsten Werten im Stadium E13.5 (\*\* $p \leq 0,01$ ;  $n \geq 5$ ).

#### 4.3.2 Expression wichtiger thrombozytärer Oberflächenmoleküle und -rezeptoren

Als nächstes erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Expression von für die hämostatische Funktion wichtigen Oberflächenmarkern auf unstimulierten Thrombozyten. Hierbei zeigten sich signifikant niedrigere basale Level für GpIb (CD42c) in Feten im Vergleich zu adulten Kontrollen (E13.5 vs. E14.5-16.5 vs. E17.5-18.5 vs. Adult:  $35,93 \pm 0,82$  vs.  $35,14 \pm 1,13$  vs.  $36,07 \pm 1,15$  vs.  $41,02 \pm 0,63$  [AU]; Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). Im Gegensatz hierzu wurden erhöhte GpIIb-Level (CD41) in jungen Feten gemessen (E13.5 vs. E14.5-16.5 vs. E17.5-18.5 vs. Adult:  $48,78 \pm 9,06$  vs.  $27,67 \pm 4,23$  vs.

26,73±4,33 vs. 18,71±1,47 [AU]; Mittelwert ± SEM;  $p \leq 0,05$ ). Die Analyse der P-Selectin-Oberflächenlevel zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 26).

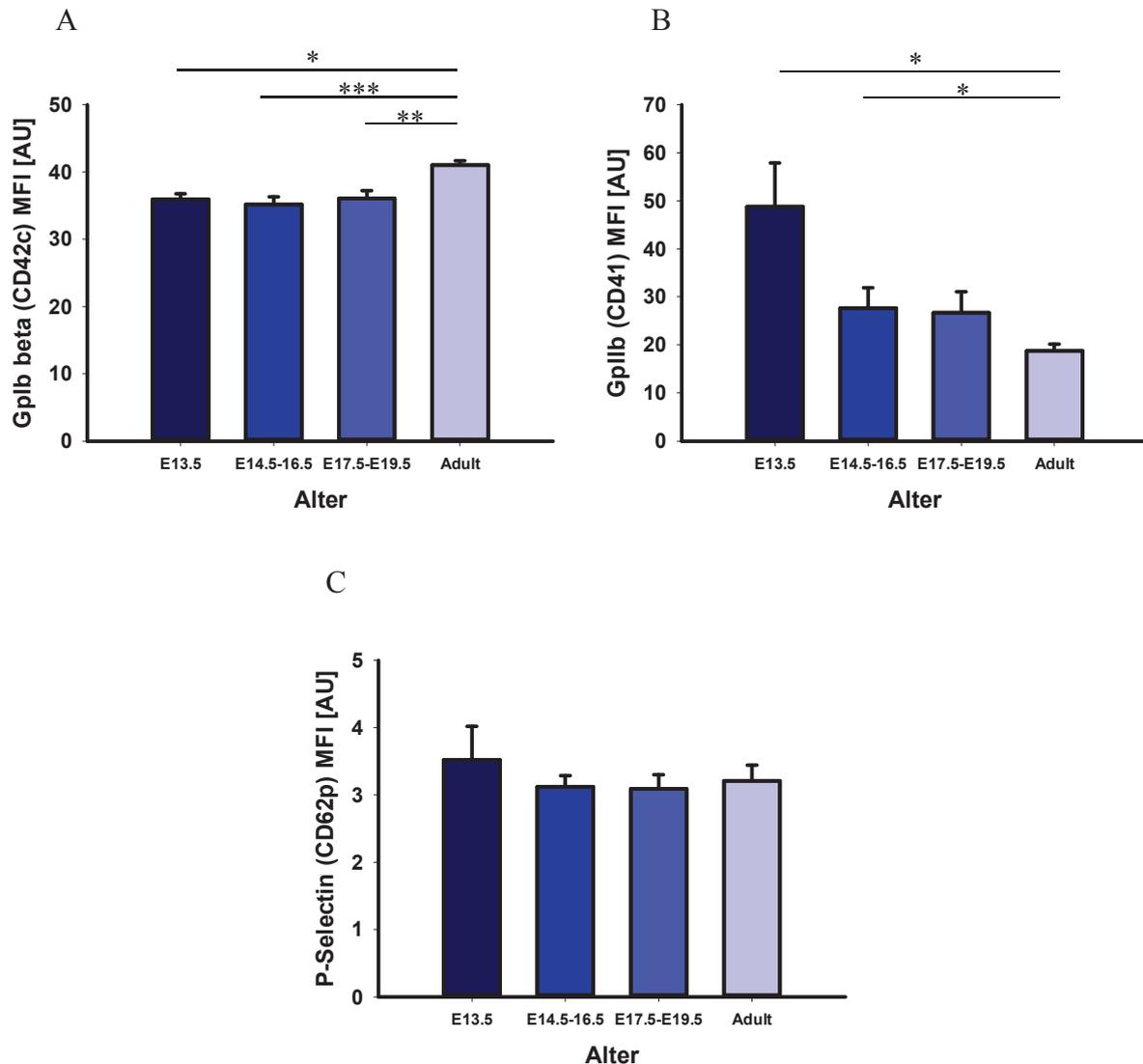


Abbildung 26: Basale Expression von thrombozytären Oberflächenmolekülen. GpIb war signifikant geringer auf der Oberfläche unstimulierter fetaler Thrombozyten nachweisbar, als in adulten unstimulierten Kontrollproben (A). Die GpIIb-Expression war signifikant erhöht in E13.5 Feten, sowie in E14.5-16.5 Feten gegenüber adulten Tieren (B). Die P-Selectin Oberflächenexpression war in allen Altersgruppen gleichermaßen niedrig. (\* $p \leq 0,05$  \*\* $p \leq 0,01$  \*\*\* $p \leq 0,001$ ;  $n \geq 3$ )

### 4.3.3 Aktivierbarkeit von fetalen Thrombozyten

Die Bestimmung der Aktivierbarkeit der Thrombozyten im Verlauf der fetalen Entwicklung erfolgte ebenfalls durchflusszytometrisch. Hierbei wurden die Proben aus gewaschenem Vollblut mit Thrombin (0,1 U) stimuliert und die aktivierungsbedingte Verschiebung der Expressionsmuster respektive die Zustandsänderung von thrombozytären Oberflächenmolekülen im Vergleich zum unstimulierten Basalzustand untersucht. Es zeigte sich eine stark verminderte Konformationsänderung des GpIIb/IIIa-Integrins in den Zustand hoher Affinität (E13.5 vs. E14.5-16.5 vs. E17.5-18.5 vs. Adult:  $3,34 \pm 0,52$  vs.  $2,37 \pm 0,20$  vs.  $2,66 \pm 0,46$  vs.  $8,56 \pm 1,1$ ; Mittelwert ± SEM;  $p \leq 0,05$ ) in Feten, während die GpIIb-

Gesamtexpression unverändert blieb (Abbildung 27 B, C). Ferner beobachteten wir eine ausbleibende P-Selectin-Mobilisierung (E13.5 vs. E14.5-16.5 vs. E17.5-18.5 vs. Adult:  $1,02 \pm 0,05$  vs.  $1,12 \pm 0,04$  vs.  $1,38 \pm 0,11$  vs.  $3,23 \pm 0,27$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p \leq 0,01$ ). Zeitgleich zeigte sich jedoch eine gesteigerte Internalisierung von GpIb $\beta$  (E13.5 vs. E14.5-16.5 vs. E17.5-18.5 vs. Adult:  $0,72 \pm 0,03$  vs.  $0,63 \pm 0,04$  vs.  $0,66 \pm 0,03$  vs.  $0,81 \pm 0,02$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $**p \leq 0,01$ ;  $***p \leq 0,001$ ) (Abbildung 27).

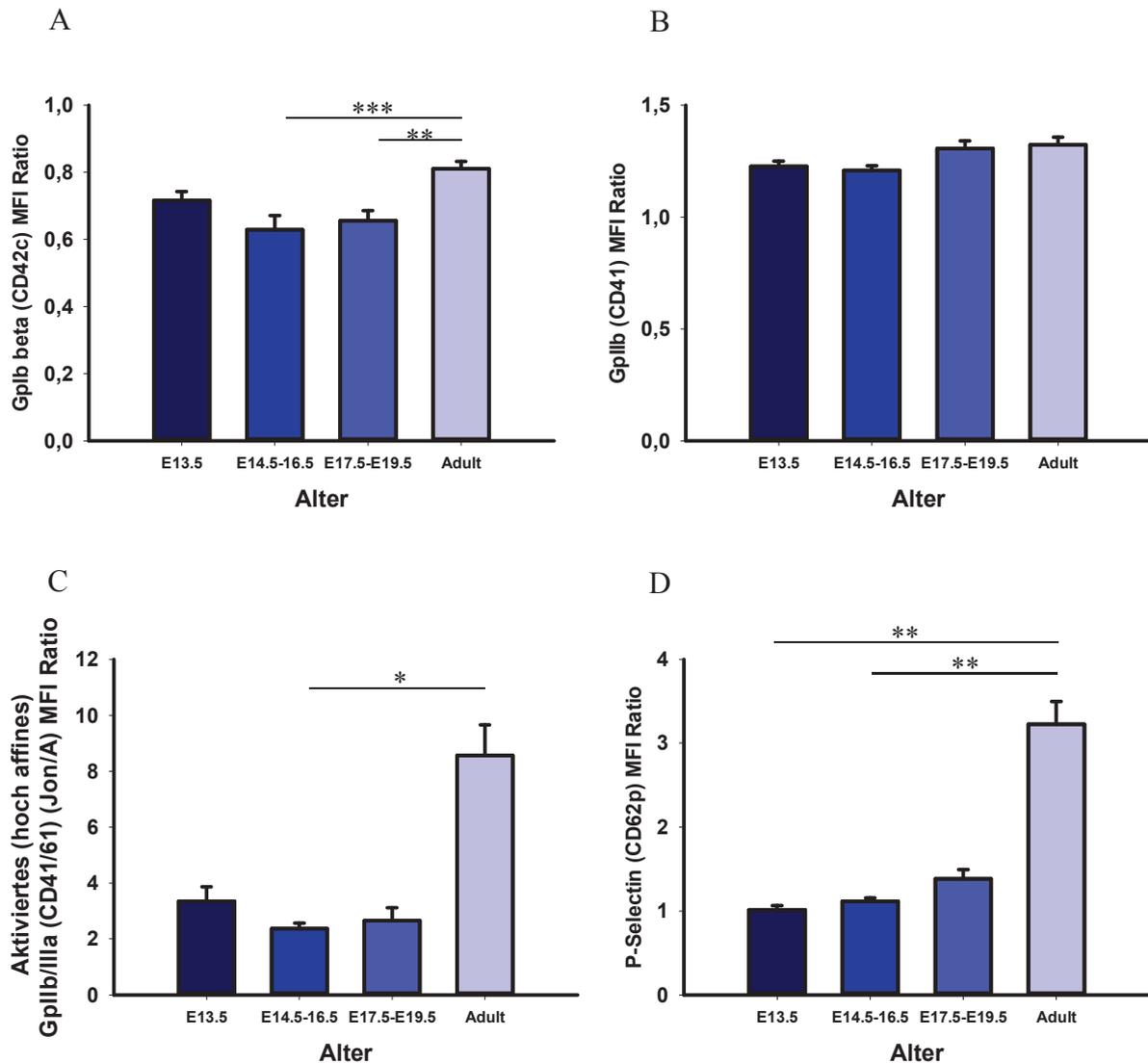


Abbildung 27: Analyse der Aktivierbarkeit fetaler Thrombozyten unterschiedlicher Altersstufen im Vergleich zu adulten Kontrollen. Neben einer stärkeren GpIb-Reduktion (A) bleibt die Konformationsänderung des GpIIb/IIIa Integrins (C) bei gleichbleibender Expression (B), sowie die P-Selectin Mobilisierung (D) aus. (\* $p \leq 0,05$  \*\* $p \leq 0,01$  \*\*\* $p \leq 0,001$ ;  $n \geq 3$ )

## 4.4 Thrombozytenmorphologie während der fetalen Entwicklung

Die Thrombozytenparameter MPV (Mean Platelet Volume), P-LCR (Platelet Large Cell Ratio) und PDW (Platelet Distribution Width) wurden mithilfe des IDEXX ProCyte Dx hematology analyzers bestimmt. Hier konnte eine Vergrößerung, sowie eine breitere Größenverteilung der Thrombozyten junger Feten festgestellt werden. (PDW: E13.5 vs. E17.5 vs. Adult:  $11,06 \pm 0,46$  vs.  $8,29 \pm 0,86$  vs.  $5,59 \pm 0,14$  [fL]; MPV: E13.5 vs. E17.5 vs. Adult:  $7,87 \pm 0,15$  vs.  $6,00 \pm 0,38$  vs.  $4,72 \pm 0,19$  [fL]; P-LCR: E13.5 vs. E17.5 vs. Adult:  $14,96 \pm 0,92$  vs.  $6,30 \pm 1,89$  vs.  $2,21 \pm 0,84$  [%]; Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ) (Abbildung 28).

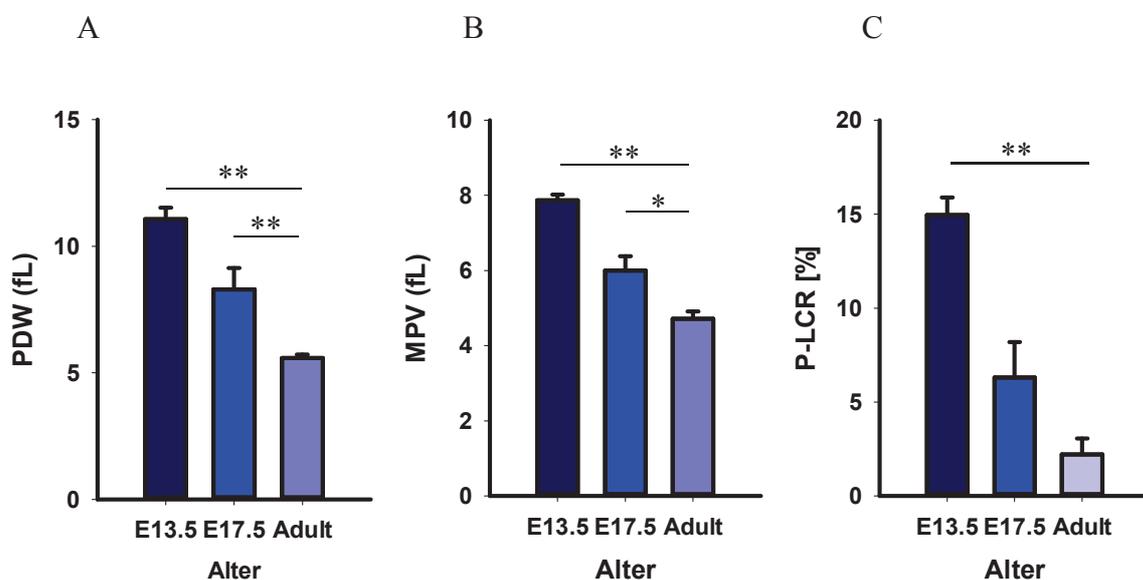


Abbildung 28: Thrombozytenparameter in der fetalen Entwicklung. Die Parameter PDW (A), MPV (B) und P-LCR (C) nehmen im Verlauf der Fetalzeit ab. (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ;  $n \geq 9$ )

## 4.5 Western-Blot Untersuchungen

### 4.5.1 P-Selectin Gehalt in fetalen Thrombozyten

Eine verminderte P-Selectin Oberflächenexpression unter Stimulation, wie in jungen Feten beobachtet, kann verschiedene Gründe haben. Als Ursache kommen einerseits eine unzureichende Mobilisierbarkeit der Granula in Frage, oder andererseits ein geringerer Gesamtgehalt an P-Selectin. Zur Abgrenzung dieser zwei Möglichkeiten, führten wir Western-Blot-Analysen von Thrombozytenlysaten durch. Hierbei zeigte sich, dass Feten der Altersstufe E13.5 signifikant geringere totale P-Selectin-Level aufwiesen, als adulte Kontrollen. Auch ältere Feten zeigten tendenziell geringere P-Selectin-Werte (E13.5 vs. E17.5 vs. Adult:  $0,11 \pm 0,03$  vs.  $0,40 \pm 0,12$  vs.  $1,82 \pm 0,16$  [% relativ zu GAPDH]; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p \leq 0,01$ ) (Abbildung 29).

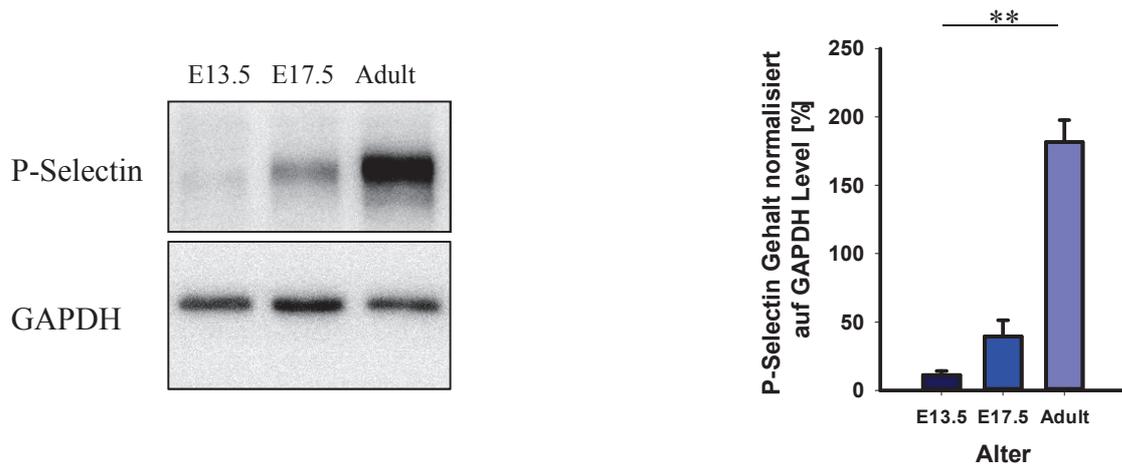


Abbildung 29: P-Selectin Gehalt fetaler Thrombozyten. Lysate fetaler Thrombozyten wurden mittels Western-Blot analysiert und der P-Selectin-Gesamtgehalt, normalisiert auf GAPDH, errechnet. (\*\* $p \leq 0.01$ ;  $n \geq 4$ )

#### 4.5.2 Expression von Thrombinrezeptoren auf fetalen Thrombozyten

Die Stimulationsanalyse der Thrombozyten wurde mittels Thrombinstimulation erwirkt. Basierend auf humanen Befunden (siehe Einleitung) stellte sich die Frage, ob die verminderte Aktivierbarkeit in fetalen Thrombozyten durch eine verringerte Thrombinrezeptor-Expression erklärbar wäre. Die Westernblot-Analyse fetaler Thrombozytenlysate zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede der PAR3-Expression (E13.5 vs. E17.5 vs. Adult:  $0,75 \pm 0,07$  vs.  $0,83 \pm 0,23$  vs.  $0,87 \pm 0,35$  [% relativ zu  $\beta$ -Tubulin]; Mittelwert  $\pm$  SEM). Hingegen zeigte sich vielmehr eine Erhöhung der PAR4-Level bei sehr kleinen Feten (E13.5 vs. E17.5 vs. Adult:  $1,41 \pm 0,29$  vs.  $0,67 \pm 0,24$  vs.  $0,31 \pm 0,05$  [% relativ zu  $\beta$ -Tubulin]; Mittelwert  $\pm$  SEM;  $p \leq 0,01$ ) (Abbildung 30).

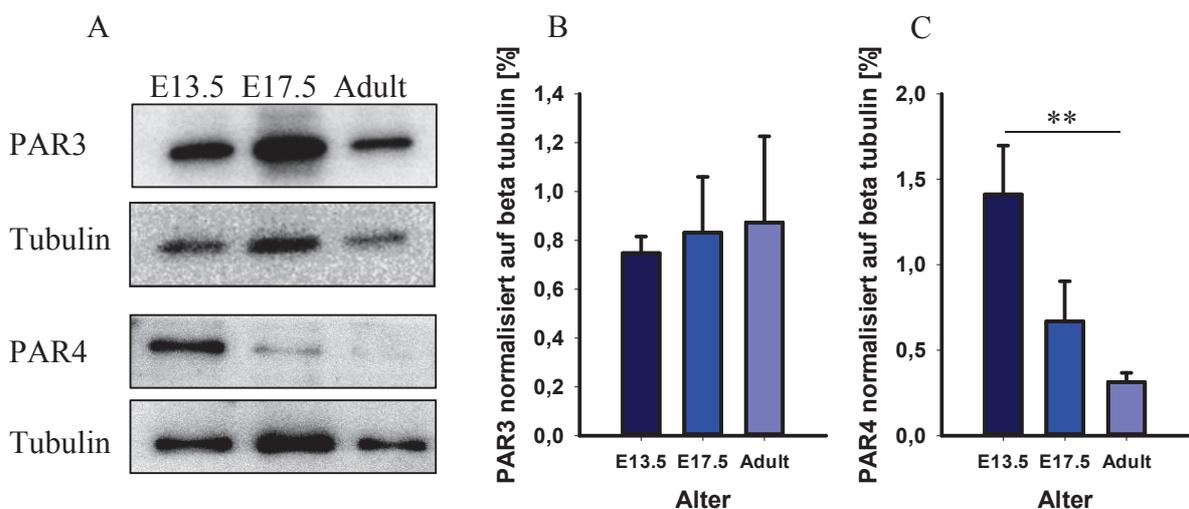


Abbildung 30: Protease-activated-receptor (PAR) 3 und 4 Level. Thrombozyten von Feten junger Altersstufen (E13.5) zeigten keinen Unterschied in der Expression von PAR3 im Vergleich zu älteren (E17.5) Feten und adulten Kontrollen (A, B). Hingegen wird signifikant mehr PAR4 auf der Oberfläche junger Feten (E13.5) im Vergleich zu adulten Tieren exprimiert (A, C). (\*\* $p \leq 0.01$ ;  $n \geq 3$ )

### 4.5.3 Intrazelluläres Signaling

Die Konformationsänderung und somit Funktion von Integrinen ist abhängig von verschiedenen Signalweg-Komponenten. In jüngerer Zeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Kindlin-3, als auch Talin in Thrombozyten für eine reibungslose Funktionsausübung der Integrine erforderlich sind. Basierend auf diesen Erkenntnissen und der Beobachtung einer verminderten Konformationsänderung zur high affinity Konformation bei jungen Feten untersuchten wir die Level von Kindlin-3 und Talin1 in Thrombozytenlysaten von Mausfeten und adulten Kontrolltieren. In der Tat zeigten fetale Thrombozyten verringerte Talin1- und auch Kindlin-3-Level (E13.5 vs. E17.5 vs. Adult: Talin:  $0,74 \pm 0,19$  vs.  $0,82 \pm 0,06$  vs.  $2,14 \pm 0,53$ ; Kindlin-3:  $0,46 \pm 0,11$  vs.  $0,89 \pm 0,16$  vs.  $1,74 \pm 0,22$  [% relativ zu GAPDH]; Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ) (Abbildung 31). Ein weiteres wichtiges Element der Signaltransduktionskaskade ist Rap1, welches in Feten ebenfalls signifikant reduziert exprimiert wird (E13.5 vs. E17.5 vs. Adult:  $0,96 \pm 0,18$  vs.  $1,09 \pm 0,11$  vs.  $2,46 \pm 0,54$ ; [% relativ zu GAPDH]; Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ).

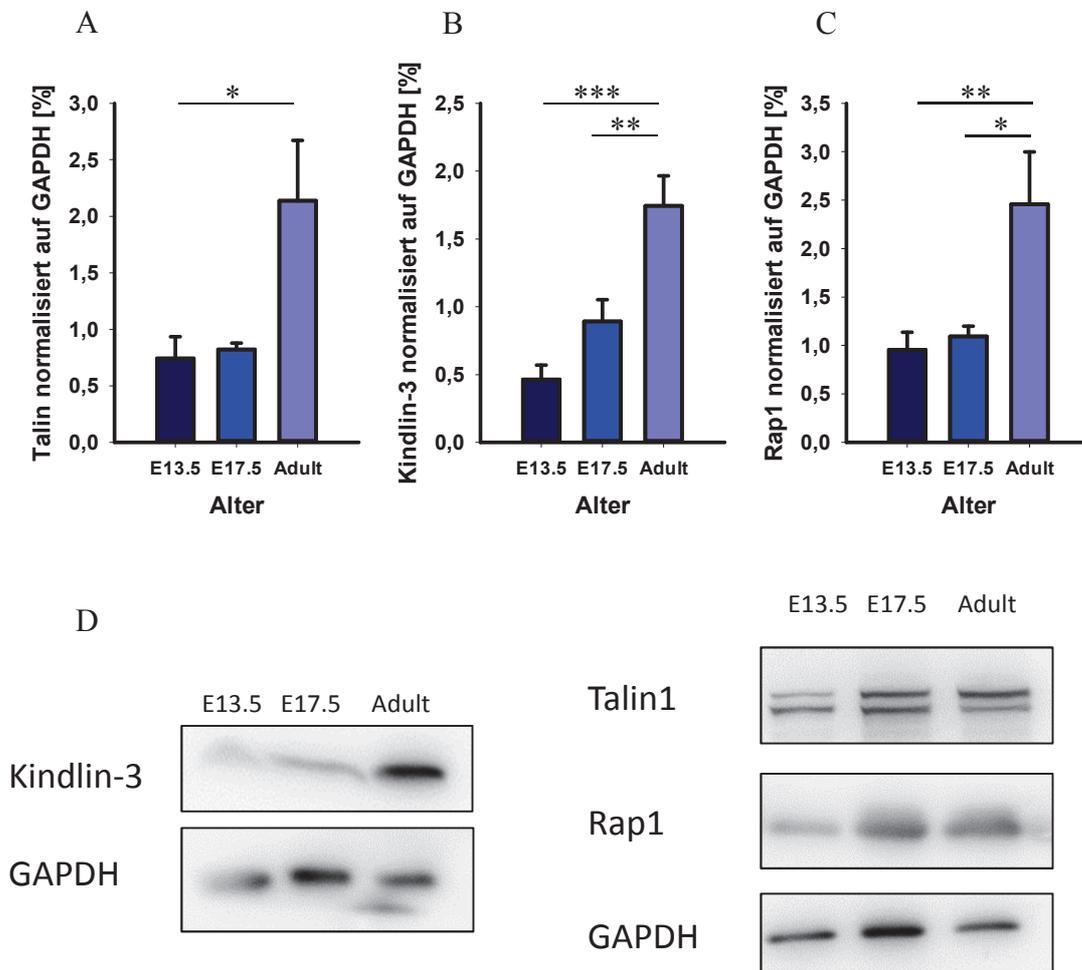


Abbildung 31: Expression intrazellulärer Signaltransduktionsmoleküle. Die Level der für die Integrinfunktionalität wichtigen Elemente Talin (A, D), Kindlin-3 (B, D), sowie Rap1 (C, D) sind signifikant reduziert in der frühen fetalen Entwicklung. (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ;  $n \geq 5$ )

#### 4.6 Transfusion adulter Thrombozyten in den fetalen Kreislauf

Ein häufig genutztes Therapeutikum zur Bekämpfung von Thrombopenien ist die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten. Ob ein Einsatz von Thrombozytenkonzentraten in der Frühgeborenenmedizin immer sinnvoll ist, wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Zur besseren Beurteilbarkeit der Konsequenzen einer Transfusion adulter Thrombozyten in das fetale Gefäßbett, führten wir Transfusionsexperimente mit isolierten adulten Thrombozyten der Maus durch. Hierbei wurden 200.000 Thrombozyten pro Fetus in Dottersackgefäße injiziert.

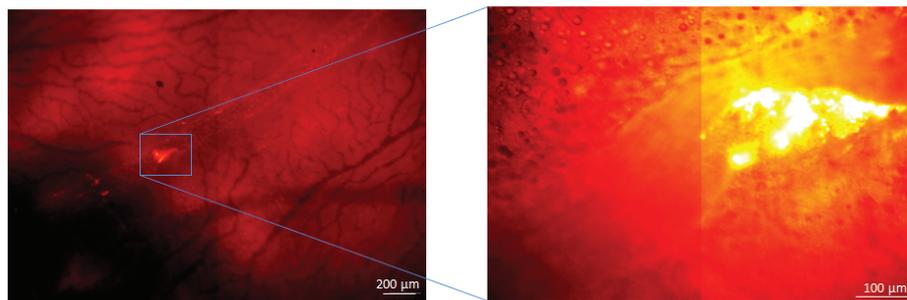


Abbildung 32: Transfusion fluoreszenzmarkierter adulter Thrombozyten in einen E14.5 Fetus.

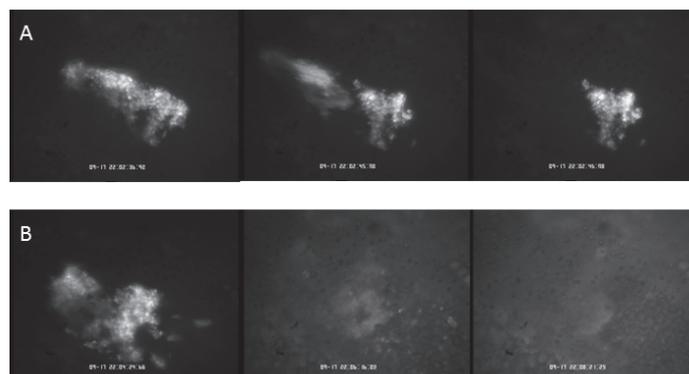


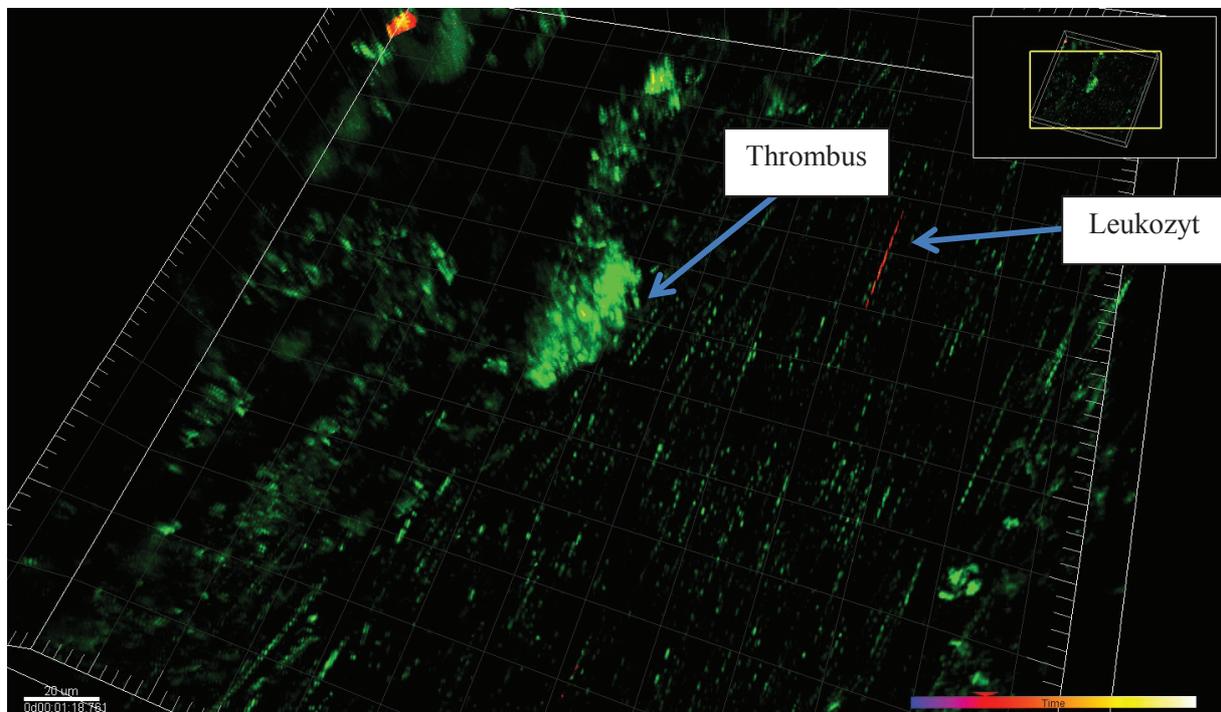
Abbildung 33: Embolisation nachfolgend Transfusion adulter Thrombozyten in einen E14.5 Fetus. Der Blutfluss ist von rechts nach links gerichtet. Man erkennt einen sich ablösenden Embolus (A), während nachfolgend dennoch das Gefäß vollständig durch die Thrombozyten okkludiert wird (B), welche unter konstanter Beleuchtung nach und nach ausbleichen.

Die adulten fluoreszenzmarkierten Thrombozyten lagerten sich spontan an verschiedenen Stellen des fetalen Gefäßbettes an (Abbildung 32). Unter Aufsicht bildeten sich hierbei in einigen Bereichen Thromben aus, die eine hohe Embolisationsrate zeigten, schließlich aber dennoch zu einem kompletten Verschluss des Gefäßes führten (Abbildung 33).

In einer weiteren Testung wurden Feten des Alters E14.5 altersentsprechende fetale Thrombozyten (isoliert aus Feten des Alters E14.5; 200.000 pro Fetus) injiziert und die Interaktion im Gefäß mittels IVM und MPLSM überwacht. Hierbei zeigte sich ein Touch-and-Go Verhalten, d.h. eine kurzzeitige Adhäsion von Thrombozyten mit jedoch einer deutlich reduzierten finalen Thrombusbildung (für beide Konditionen, adult und fetal: gegenüberliegende Dottersackseite, maximale Entfernung von Injektionsort) (Gefäßverschluss-Rate nach Thrombozytentransfusion: Adult in E14.5: 100% vs. E14.5 in E14.5 33,3%; n=3 Feten pro Gruppe).

#### 4.7 Interaktion fetaler Leukozyten mit adulten Thrombozyten *in-vivo*

Im Rahmen der Thrombusentstehung spielt ebenfalls die Interaktion mit anderen Zellen, unter anderem Leukozyten, eine entscheidende Rolle für das Thrombuswachstum und die – stabilisierung (sogenanntes Cell-Capturing). Auch ist dieses Zusammenspiel verschiedenartiger Zellarten im Sinne der Immunabwehr und Immunthrombose von Bedeutung (Engelmann und Massberg, 2013; Zuchtriegel et al., 2016). Vor diesem Hintergrund führten wir *in-vivo* Versuche mit LysM-EGFP-positiven Tieren durch, denen fluoreszenzmarkierte adulte Thrombozyten transfundiert wurden. Hierdurch kann die Interaktion von fetalen Leukozyten und adulten Thrombozyten überwacht werden. Trotz spontaner Thrombozytenadhäsion und -aggregation zeigte sich ein vollständiges Ausbleiben von Interaktionen fetaler Leukozyten mit adulten Thrombozyten (Abbildung 34).



**Abbildung 34: MPLSM-Aufnahme der ausbleibenden Interaktion fetaler Leukozyten mit adulten transfundierten Thrombozyten. Die rote Linie im rechten mittleren Bildfeld stellt einen schnell vorbeifließenden Leukozyten dar, während der gut erkennbare grüne Thrombus im mittleren Bildfeld liegt. Eine Interaktion von fetalen Leukozyten mit den aktivierten adulten Thrombozyten blieb aus.**

# KAPITEL 5

---

## 5. Diskussion

### 5.1 Diskussion des Tiermodells

#### 5.1.1 Ethische Bedenken

Tiermodelle sind ein von der Allgemeinheit stark kritisierendes und immer wieder in Frage gestelltes experimentelles Instrument (Ferdowsian und Beck, 2011). Experimente an Feten sind hierbei umso kritischer, als dass wissenschaftliche Untersuchungen an ungeborenem Leben oftmals als Überschreitung einer moralisch-ethischen Grenze betrachtet werden, da sich ein Fetus noch nicht selbst schützen kann und somit auf die Fürsorge der ethischen Instanzen angewiesen ist. Die Experimente dieser Arbeit wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt. Dennoch sei explizit darauf hingewiesen, dass die Durchführung von Tierexperimenten nicht als leichtfertig wahrgenommen wird, sondern auch für den Experimentator selbst eine moralisch-ethische Belastung darstellt. Letztlich ist die Etablierung des hier aufgeführten Modells zum jetzigen Zeitpunkt jedoch in keiner tierversuchsfreien Art möglich. Tierversuche als derzeit noch unumgängliches Instrument der Medizin und Forschung ermöglichen einen Einblick in den lebenden Organismus, in welchem das Zusammenspiel aller physiologischen und in Krankheitsmodellen auch pathologischen Faktoren beobachtet werden kann. Hieraus lassen sich wichtige Rückschlüsse für künftige Ansätze in der humanen Patientenversorgung ziehen. Insbesondere die Anwendung neuer therapeutischer Strategien am Menschen ohne vorherige Erprobung am lebenden Organismus ist aktuell ethisch nicht zu rechtfertigen. Neben der ethischen Problematik von Untersuchungen an menschlichen Feten kann mit den derzeit verfügbaren technischen Mitteln noch keine *in-vivo* Bildgebung in humanen Feten auf zellulärer Ebene erfolgen, wodurch die genauen Mechanismen von Blutungen und Entzündungen in der Neonatologie im Detail noch immer ungeklärt sind.

#### 5.1.2 Technische Umsetzung und Schwierigkeiten

Der Etablierungsprozess eines neuen Modells dient der Herstellung gleichmäßiger, reproduzierbarer Bedingungen, die als optimal für den zu untersuchenden Sachverhalt angesehen werden können (Justice und Dhillon, 2016).

Schwierigkeiten des hier beschriebenen Modells bestanden vor allem in der Abwägung präparatorischer und methodischer Schritte zur Konstruktion eines stabilen, mit möglichst geringen Manipulationen und Schädigungen verbundenen Bildgebungsumfeldes.

Die Atembewegungen des Muttertiers erforderten die Anfertigung einer Haltevorrichtung. Durch diese Vorrichtung wird die detailgenaue Analyse der *in-vivo* Aufnahmen ohne Bewegungsartefakte ermöglicht. Der in diesem Modell durch Deckglas und Haltevorrichtung ausgeübte Druck auf den Fetus kann zu einer Verminderung der Perfusion von Dottersack und Fetus führen. Hierdurch wäre es denkbar, dass es zu einer verminderten Flussgeschwindigkeit kommt. Somit ist eine veränderte Thrombozyten-Endothelinteraktion möglich, im Sinne der

Virchow'schen Trias. Letztlich bestehen die gleichen Versuchsbedingungen jedoch für alle Altersgruppen, sodass eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben ist. Ebenso kann mittels der *in-vivo* Mikroskopie eine Unregelmäßigkeit, d.h. zum Beispiel ein pulsatil-stockender, unphysiologischer Fluss, festgestellt werden und dieses Tier von der weitergehenden Analyse ausgeschlossen werden. Dennoch wurde erkennbar, dass die Flussgeschwindigkeiten im Verlauf der fetalen Entwicklung anstiegen. Im Sinne der Virchow'schen Trias wäre somit zu erwarten, dass eine erleichterte Thrombozyten-Endothelinteraktion, d.h. eine vermehrte Thrombusbildung in jungen Feten (E13.5) vorliegt, was jedoch nicht der Fall war.

Problematisch für das von uns ausgewählte Modell ist die Auslagerung des Feten, bei der sowohl eine Temperaturabnahme und ein Austrocknen des Fetus die Folge wären. Die gewählte Superfusionsmethodik führt zu einem pH-gepufferten Milieu der gleichbleibenden Temperatur und bewahrt den Fetus vor dem Austrocknen. Durch die Präparation des Fetus kommt es trotz aller Vorsicht zu einer Reizung und hierdurch zu einem traumatisch-inflammatorischen Stimulus. Dies führt zu einem Rollen von Leukozyten auf dem stimulierten Endothel in späten pränatalen Stadien der Entwicklung (Sperandio et al., 2013).

Die Mikroinjektion ermöglicht das Einbringen von Substanzen in die fetale Zirkulation. Dies erfordert jedoch eine Punktion mittels Injektionskapillare und damit Schädigung des Gefäßsystems. Auch die im Anschluss erfolgende Kauterisierung führt zu einer Schädigung, Stimulation und Beeinträchtigung von Zellen und Versuchsmilieu. Aus diesem Grunde wurde nach anfänglichen Tests für die Injektion ein kleiner seitlicher Zufluss gewählt, der möglichst weit entfernt von der Observationsstelle lag.

Die durchgeführte Fluoreszenzmessung und Anregung kann durch die über dem Gefäß liegende Gewebedicke und damit verbundene Streuung und Absorption beeinflusst werden. Vor diesem Hintergrund wurden nur Gefäße des oberflächlich gelegenen Dottersackes verwendet und keine in tieferen Schichten liegenden Gefäße des fetalen Körpers selbst.

Hinsichtlich der mikrovaskulären und Fluoreszenzparameter zeigte sich eine signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität in E13.5 Feten. Eine Interpretation dieser Werte kann in unterschiedliche Richtungen erfolgen: Einerseits führt eine erhöhte Konzentration der phototoxischen Substanz theoretisch zu einer schnelleren und intensiveren Schädigung des Endothels und somit einer schnelleren Thrombusausbildung. Andererseits kann eine erhöhte lokale Fluoreszenzintensität auch für eine höhere Verdünnung des Blutes durch die phototoxische Substanz sprechen, wodurch es zu einer relativen Reduktion der Zellkonzentration käme. Im Rahmen der Experimente wurden zur Gewährleistung einer gleichbleibenden minimalen Konzentration Gefäße mit Fluoreszenzintensitäten unter 10000 AU ausgeschlossen. Dies geschah nach Erstellung und Messung einer Verdünnungsreihe. Die Obergrenze der Messungen liegt bei 16383 AU. Werte oberhalb dieses Cut-offs können nicht unterschieden werden. Hierdurch ist eine Varianz der Konzentrationen innerhalb der Gruppen möglich. Jedoch wurde bei Feten jüngerer Alters eine erhöhte Fluoreszenzintensität festgestellt, sodass die beobachtete verminderte Thrombusbildung nicht durch Messfehler erklärbar ist.

## 5.2 Diskussion weiterer Versuchsmethoden

### 5.2.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine zellbiologische Methode, die dem Nachweis und der Quantifizierung von Zelleigenschaften dient. Neben Größe und Granularität kann durch Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper oder Fluorochrome eine weitergehende Analyse erfolgen (Alvarez et al., 2010).

Die Thrombozytenpopulation wurde nach Größe und GpIb-Bindung ermittelt. Im Rahmen der Aktivierung kann es zu einer Formänderung und somit einer Verschiebung der Population kommen, welche gegebenenfalls überdeckt durch andere Zellpopulationen nicht mehr erkennbar wird. Durch thrombinvermittelte Aktivierung kann es zu Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen und Thrombozyten-Aggregatbildung kommen, welche folglich nicht mehr von dem definierten Thrombozyten-Gate erfasst werden. Bei einer verminderten Aktivierung fetaler Thrombozyten im Vergleich mit adulten Thrombozyten ist es somit denkbar, dass die aktiveren und damit von einer Formänderung vermehrt betroffenen adulten Thrombozyten im Vergleich mit den inaktiveren fetalen Thrombozyten verhältnismäßig häufiger außerhalb des Gates liegen könnten. Ebenfalls ist es möglich, dass eine Voraktivierung der fetalen Proben zu einer vermehrten Formänderung und Aggregatbildung führen könnte, wodurch eine Verzerrung der Ergebnisse möglich ist. Durch die gleich bleibenden Konditionen und hinreichend große Gates bei adulten und fetalen Tieren wurde versucht die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Ebenso ist in den adulten Kontrollen eine normwertige Aktivierung auslösbar und die Werteverchiebung im Sinne der Aktivierbarkeit im Durchflusszytometer erkennbar. Weiterhin wird durch die Waschschrte die Fibrinogen-Konzentration in der Vollblutprobe reduziert, sodass die Quervernetzung möglichst minimal sein sollte.

Als weiterer kritischer Punkt sind die adulten Thrombozytenproben zu werten, welche zur Einsparung von Tieren aus den trächtigen Muttertieren gewonnen wurden. Es ist bekannt, dass in der Schwangerschaft unter anderem eine veränderte Thrombozytenaggregation vorliegt (Nicolini et al., 1994; Sheu et al., 2002a; Sheu et al., 2002b). Vorexperimente zeigten dennoch eine Aktivierbarkeit vergleichbar mit der von nicht-schwangeren Tieren, entsprechend einer voll ausgereiften Hämostase, sodass sie eine geeignete Referenz für die fetalen Proben bieten. Ebenfalls muss man die Methodik der Probengewinnung und Aufreinigung aus Feten kritisch hinterfragen. Durch das Trauma der Dekapitation, sowie die folgende Zentrifugation und Handhabung ist es möglich, dass eine Kontakt- bzw. Präaktivierung der Proben erfolgt. Da die Methodik jedoch für alle Altersstufen gleich war, sind die Ergebnisse weniger als Einzelwerte, sondern in Zusammenschau mit den anderen Alters- und Referenzgruppen zu interpretieren. Isotypenkontrollen wurden zusätzlich zu Leerproben an einzelnen Stichproben exemplarisch analysiert, aufgrund fehlender Unterschiede und des geringen Probenmaterials wurde dies im Verlauf nicht weitergeführt.

### 5.2.2 Idexx Hematology Analyzer

Die Bestimmung von PDW, MPV und P-LCR erfolgte mittels eines automatisierten Idexx ProCyte Dx Hematology Analyzers. Zellen der verwendeten Proben werden in das Gerät

eingesogen und durchflusszytometrisch, mittels optischer Fluoreszenzmessung und Impedanzmessung analysiert.

Als Nachteil zur regulären Durchflusszytometrie gestattet es jedoch keine variable Zuordnung von Populations-Gates. Hierdurch werden die gemessenen Zellen in einem vorgegebenen Bereich registriert. Teurere Geräte verfügen über ein spezielles fetales Thrombozytengating, welches variabel veränderbar ist, dieses stand uns jedoch leider nicht zur Verfügung. Die Bestimmung der Thrombozytenproben erfolgte deshalb nicht im Vollblut, sondern in isolierten Thrombozytenproben. Hierdurch wurde die Genauigkeit der Messung verbessert, indem eine Verunreinigung durch fetale Vorläuferzellen und Verschiebung des Gates umgangen wurde.

### **5.2.3 Transfusion isolierter Thrombozyten**

Die Transfusionsexperimente wurden mit isolierten, fluoreszenzmarkierten Thrombozyten durchgeführt. Durch die Aufreinigung und Markierung der Zellen kann es zu einer Präaktivierung selbiger kommen. Insbesondere die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes im Verlauf der Experimente kann zu einer Freisetzung von Radikalen und phototoxischen Anregung der Zellen führen. Um die Präaktivierung zu minimieren wurde den Proben während der Zentrifugation Prostaglandin I<sub>2</sub> zugegeben und die Zellen nach Wasch-, Färbeschritten und einer Ruheperiode verwendet. Als Kontrollexperiment haben wir zudem isolierte adulte Thrombozyten im Cremaster beobachtet, wobei keine spontane Aggregation sichtbar war. Dies spricht ebenfalls gegen eine starke Präaktivierung der gewonnenen Proben.

## **5.3 Diskussion der Ergebnisse**

Der Prozess der primären Hämostase erfordert die Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten zur Ausbildung eines stabilen Thrombus. Hierbei lagern sich die im Blut zirkulierenden Thrombozyten klassischerweise über GpIb-IX-V-vWF-Interaktion und GpIV/GpVI-Kollagen-Bindung, sowie  $\alpha 2\beta 1$ -Kollagen-Interaktion an das geschädigte Endothel an (Nuyttens et al., 2011). Durch Aktivierung, Granulasekretion und die damit einhergehende lawinenartige Rekrutierung weiterer Thrombozyten kommt es zur Ausbildung eines den Gefäßschaden bedeckenden Thrombozytenfilms (Broos et al., 2011). Die Formänderung führt zur besseren Vernetzung der Thrombozyten untereinander und Defektdeckung. Weiterhin kommt es zur Konformationsänderung von Integrinen, namentlich des GpIIb/IIIa-Integrins, welches in der hochaffinen Konformation in der Lage ist an Fibrinogen und Fibronectin zu binden und hierdurch die Aggregation und das Cross-Linking der Thrombozyten fördert (Fullard, 2004; Schneider, 2011). Eine funktionelle Hämostase erfordert eine voll ausgeprägte, nicht überschießende Thrombozytenfunktion zusammen mit einer ausreichend hohen Anzahl von im Blut zirkulierenden Thrombozyten, wie man unter anderem anhand verschiedener thrombozytärer Störungen erkennen kann (Bolton-Maggs et al., 2006).

Die fetale Entwicklung verlangt einerseits die Sicherstellung einer ausreichenden Perfusion zur Organentwicklung und –reifung, andererseits jedoch auch ein intaktes Gefäßsystem ohne

Blutungen oder traumatische Schädigung. Entsprechend ist eine exakte, altersentsprechende Balance der Hämostase von Nöten. Eine Fehlfunktion des hämostatischen Systems führt zu dramatischen Konsequenzen für das ungeborene Kind. Insbesondere Frühgeborene zeigen ein erhöhtes Blutungsrisiko (Levene et al., 1982), während eine pathologische Thrombusneigung und eine verminderte Mikrozirkulation (wie zum Beispiel ersichtlich am Bild der Plazentainsuffizienz (Neerhof und Thaete, 2008)) zu einer Minderentwicklung des Kindes führen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Prozess der Thrombusbildung und Thrombozyten-Endothelinteraktion im sich entwickelnden Feten zunächst *in-vivo* untersucht. Die hierdurch gewonnenen Erkenntnisse wurden mittels *in-vitro* Verfahren aufgeschlüsselt und durch weitere *in-vivo* Versuche zur Zellinteraktion und Thrombozytentransfusion ergänzt.

### 5.3.1 *In-vivo* Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung in murinen Feten

Die *in-vivo* Analyse der Thrombozytenfunktion und Thrombusentstehung erfolgte durch die Etablierung eines neuen Mikroskopieverfahrens zur phototoxischen Induktion eines Endothelschadens und einer Thrombozytenaktivierung in Dottersackgefäßen muriner Feten unterschiedlicher Gestationsstadien. Hierbei zeigten sich eine erniedrigte Rate der Thrombozytenadhäsion und eine reduzierte Thrombusbildungskapazität, sowie eine Verzögerung dieser Prozesse in frühen Entwicklungsstadien der Feten (E13.5). Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit Untersuchungen in Früh- und Reifgeborenen. Del Vecchio et al. konnten belegen, dass Frühgeborene im Vergleich zu Reifgeborenen eine verlängerte Blutungszeit zeigen (Del Vecchio et al., 2008). Auch Aggregometrie-Versuche offenbarten eine reifungsabhängige Thrombozytenfunktion (Mull und Hathaway, 1970).

Ursächlich für die verminderte Thrombusentstehung könnten qualitative und/oder quantitative Defizite im Bereich der Hämostase sein. Eine funktionelle Einschränkung und entwicklungsabhängige Reifung der Thrombozyten, verminderte Thrombozytenzahlen oder Änderungen der plasmatischen Komponenten, sowie der Endothelzellfunktionalität sind hier als mögliche Kontributoren zu benennen. Eine reduzierte Thrombinkonzentration könnte mit zu einer verzögerten Thrombusentstehung beitragen. Andrew et al. zeigten, dass Neugeborene eine verminderte Thrombingenerierung aufweisen und aus neonatalem Plasma nur eine Peak-Thrombin-Aktivität von 30 bis 50% der adulten Werte erzielt werden kann (Andrew et al., 1990). Aufgrund des geringen Blutvolumens waren vergleichbare Messungen in unserem Modell in murinen Feten aktuell nicht möglich und sind somit als Ursache für die verminderte *in-vivo* Thrombusbildung nicht auszuschließen.

Weiterhin können mögliche Unterschiede zwischen Dottersack-Endothel und intrakorporalem Endothel angeführt werden. Es erscheint logisch, dass sich die zelluläre Umgebung im Laufe der fetalen Entwicklung verändert. Insbesondere der Dottersack stellt in frühen Gestationsstadien den Ort der Hämatopoese dar, während im Verlauf eine Verlagerung der Blutzellproduktion hin zum fetalen Körper erfolgt. Zudem ändert sich die hämatopoetische Zellpopulation selbst im Übergang von primitiver zu definitiver Hämatopoese (c-myb unabhängig versus c-myb abhängig) (Mucenski et al., 1991). Interessanterweise gibt es *in-vitro* Belege, dass fetale Endothelzellen der jeweiligen hämatopoetisch-relevanten Region zur

Proliferation bzw. Differenzierung von HSPCs beitragen (Fennie et al., 1995; Li et al., 2003; Ohneda et al., 1998). Als problematisch kann im Hinblick auf das hier entwickelte Modell die Dottersack-Involution betrachtet werden. Hierdurch kommt es zu einer verminderten Stabilität des Gewebes für präparatorische Schritte in fortgeschrittenen Reifungsstadien ( $\geq$ E18.5). Im Sinne dieses Vorgangs sind Beeinträchtigungen oder Veränderungen der endothelialen Barrierefunktion, sowie weiterer Prozesse, wie zum Beispiel der Tissue Factor Expression, denkbar (Guedes et al., 2014).

### 5.3.2 Thrombusstabilität in der fetalen Entwicklung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir eine erhöhte Rekanalisierung nach primärer Thrombusbildung und damit eine reduzierte Thrombusstabilität in jungen Feten beobachten. In der Literatur wurde beschrieben, dass die mittels Thrombelastographie ermittelte maximale clot firmness, d.h. die Stabilität eines sich bildenden Blutgerinnsels *in-vitro*, in Früh- und Reifgeborenen signifikant vermindert ist im Vergleich zu adulten Kontrollen, und mit dem Gestationsalter korreliert (Strauss et al., 2010).

Eine mögliche Erklärung für die Thrombusinstabilität lieferten Pinacho et al. Sie untersuchten Nabelschnurblutproben gesunder Neugeborener. Hierbei stellten sie fest, dass diese eine erhöhte Aktivität des fibrinolytischen Systems besitzen (Pinacho et al., 1995). Demgegenüber stehen jedoch Untersuchungen, die eine verminderte fibrinolytische Aktivität in Neugeborenen aufzeigten (Edelberg et al., 1990). Problematisch vor dem Hintergrund dieser Erklärungsansätze und Vorbefunde ist die Tatsache, dass vor allem Feten des Alters E13.5 die Thrombusinstabilität *in-vivo* zeigten, während in den Studien nahegelegt wird, dass Frühgeborene eine geringere fibrinolytische Aktivität besitzen als Reifgeborene. Dennoch zeigt sich in Zusammenschau, wie von Revel-Vilk dargelegt, dass offenbar sowohl pro- als auch antithrombotische Elemente gleichermaßen in Frühgeborenen reduziert sind (Revel-Vilk, 2012).

Neben der fibrinolytischen Komponente spielt jedoch die primäre Vernetzung und Stabilisierung des Thrombus eine entscheidende Rolle. Diese wird unter anderem, wie in der Einleitung geschildert, durch die hochaffine Konformation des GpIIb/IIIa Rezeptors, welcher eine Bindung an Fibrinogen ermöglicht, gewährleistet. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die Konformationsänderung in jungen Feten reduziert ist. Interessanterweise waren die für die Konformationsänderung erforderlichen Integrinadaptermoleküle Talin1, Kindlin-3 und auch Rap1 in jungen Feten ebenfalls erniedrigt.

### 5.3.3 Thrombozytencounts, -größe und Einfluss auf Thrombusentstehung

Die Ausbildung stabiler Thromben erfordert eine ausreichend hohe Anzahl zirkulierender Thrombozyten. Vor diesem Hintergrund führten wir durchflusszytometrische Untersuchungen fetaler Blutproben durch. Hierbei offenbarten sich insbesondere in E13.5-Feten drastisch reduzierte Zellzahlen, die zur Geburt hin langsam ansteigen, jedoch signifikant unter den adulten Werten liegen. Die Problematik des geringen Blutvolumens und der geforderten exakten Abnahmemenge konnten wir durch Verwendung spezieller Kapillaren und direkte gefäßbasierte Abnahme der Blutproben lösen. Durch die Abnahmetechnik kann eine

Verdünnung von Proben mit Gewebeflüssigkeit jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dies wurde durch Beobachtung der Abnahme mittels eines Präparationsmikroskops überwacht und entsprechende Proben nicht weiter verwendet.

Im Einklang mit unseren Befunden konnte in der Vergangenheit durch Analyse von über 47000 Patienten ein Ansteigen der Thrombozytenzahlen während der Neonatalperiode belegt werden. Weiterhin wird in derselben Studie eine Korrelation des Gestationsalters bei Geburt mit der Zeit, die benötigt wird, bis ein Ansteigen der Thrombozytenzahlen postnatal beobachtet wird, beschrieben (Wiedmeier et al., 2009). Auch weitere Studien belegen eine Korrelation von Gestationsalter bzw. Geburtsgewicht und Thrombozytenzahlen (Fustolo-Gunnink et al., 2016; Patrick et al., 1987). In der sich entwickelnden Maus konnten Tober et al. analog zeigen, dass E12.5 Feten geringere totale Thrombozytenzahlen aufweisen, als E15.5 Feten (Tober et al., 2008).

Während adulte Mäuse regelhaft Thrombozytenzahlen von ca. 1.000.000 Zellen/  $\mu\text{l}$  aufweisen, liegen diese im humanen System bei etwa 150.000/ $\mu\text{l}$  - 400.000/ $\mu\text{l}$  (Schmitt et al., 2001). Messungen mittels Thrombelastographie, einer *in-vitro* Methode zur Prüfung der hämostatischen Kapazität, zeigten, dass die Grenze der die maximale Gerinnelbildung (clot formation) beeinflussenden Thrombozytencounts bei  $31 \times 10^3 / \mu\text{L}$  liegt (Gunduz et al., 2011). Humane Studien konnten belegen, dass erst ein Absinken der Thrombozytencounts auf unter  $10 \times 10^3$  pro  $\mu\text{L}$  zu spontanen Blutungskomplikationen führt. Dies geht einher mit der Beobachtung, dass erst eine Reduktion der Thrombozytenzahlen um mehr als 70% im Mausmodell zu einer Beeinflussung der *in-vivo* Thrombusbildung und Blutungszeiten führt (Morowski et al., 2013).

Unsere Ergebnisse bestätigen den entwicklungsabhängigen pränatalen Anstieg der Thrombozytenzahlen. In wieweit die geringen Thrombozytenzahlen für die beeinträchtigte Thrombusformation verantwortlich zeichnen bleibt in unserem Setting unklar. Jedoch scheinen neben dem quantitativen Defizit auch qualitative, funktionelle Defizite eine Rolle zu spielen, da die im Feten junger Entwicklungsstadien vorhandenen Thrombozytenzahlen (E13.5) noch für eine Thrombusbildung suffizient sein sollten (Morowski et al., 2013). Als einen Ansatz zur Entschlüsselung des Einflusses der Zellzahl auf die *in-vivo* Thrombusbildung führten wir Transfusionsexperimente durch, die weiter unten behandelt werden.

Hinsichtlich der im Verlauf der prä- und postnatalen Entwicklung zunehmenden Zellzahlen könnte man spekulieren, dass eine erhöhte Thrombozytenproduktion aufgrund der hämatopoetischen Reifung zu einer Zunahme der Thrombozytenpopulation führt. Dies wurde jedoch nicht bestätigt und stattdessen gezeigt, dass eine verlängerte Lebensdauer der Thrombozyten mit der regulär fortgeführten Produktion von Thrombozyten zu einer Gesamtzunahme der Thrombozytenpopulation führt (Liu et al., 2014).

Das MPV spiegelt die Größe der Thrombozyten wieder. Wiedmeier et al. konnten in der zuvor erwähnten, groß angelegten Studie zur Untersuchung der Normwerte von Thrombozyten in Neugeborenen einen signifikanten Abfall der MPV-Werte im Verlauf der Gestation mit einem postnatalen erneuten Anstieg selbiger Werte feststellen (Arad et al.,

1986; Wiedmeier et al., 2009). Park et al. zeigten hingegen, dass eine Aktivierung von Thrombozyten zu einem erhöhten MPV führen kann (Park et al., 2002). Ebenfalls ist bekannt, dass unreife Thrombozyten größer sind als reife Thrombozyten, wobei hier der Begriff der Immature Platelet Fraction eine Rolle spielt, der auf die Menge der retikulierten Thrombozyten eingeht (Briggs et al., 2004; Ingram und Coopersmith, 1969). Tober et al. zeigten 2007, dass Thrombozyten in jungen Gestationsstadien einen größeren Durchmesser und vermehrte Retikulation aufweisen (Tober et al., 2007). Weiterhin konnte – in der adulten Zirkulation, d.h. unabhängig vom Entwicklungsstand – nachgewiesen werden, dass junge, unreife Thrombozyten retikulierter sind, als ihre reiferen Entsprechungen (Ault und Knowles, 1995). Somit können die erhöhten MPV-Werte in E13.5-Feten im Sinne einer physiologischen Unreife verstanden werden, oder auf eine Präaktivierung schließen lassen, was wir in den durchflusszytometrischen Untersuchungen jedoch nicht beobachten konnten.

#### **5.3.4 Oberflächenexpression, P-Selectin Gehalt und Aktivierbarkeit fetaler Thrombozyten**

Neben einer ausreichenden Thrombozytenzahl ist auch eine suffiziente funktionelle Zellreifung erforderlich, die eine vollständige Aktivierbarkeit der Thrombozyten mit sich bringt. In der Literatur finden sich Hinweise auf eine veränderte Aktivität neonataler Thrombozyten nach Stimulation (Israels et al., 2003). So zeigten sowohl FACS-, als auch Aggregometrie-Untersuchungen eine verminderte Aktivierbarkeit von Thrombozyten frühgeborener Neonaten. Dies konnte unter anderem in Zusammenhang mit verminderten alpha-adrenergen Rezeptoren auf der Oberfläche von Thrombozyten Neugeborener, sowie einer unzureichenden Thromboxan-Synthese und verändertem Calcium-Signaling gebracht werden (Corby und O'Barr, 1981; Gelman et al., 1996; Israels et al., 1999; Israels et al., 1997; Sitaru et al., 2005).

Unsere Versuche belegen die Hyporeaktivität fetaler Thrombozyten. Sowohl eine verminderte Oberflächenexpression von P-Selectin als Aktivierungsmarker, als auch die verringerte Konformationsänderung des GpIIb/IIIa-Integrins sprechen für eine abgeschwächte Aktivierbarkeit der Thrombozyten. Wie oben angeführt spielt GpIIb/IIIa eine Rolle für die Quervernetzung von Thrombozyten und die Thrombusstabilisierung.

Bei der Untersuchung der GpIb-Oberflächenexpression fanden wir eine erhöhte Internalisierung, d.h. Abnahme der Oberflächenexpression in jungen Feten, was für eine verstärkte Aktivierbarkeit oder verminderte Stabilität des GpIb spräche. Demgegenüber stehen Befunde die eine erhöhte Expression des GpIb in Nabelschnurblut zeigten (Schlagenhauf et al., 2010b). Mögliche Ursachen für die Unterschiede könnten speziesbedingte Differenzen, sowie präparatorisch-methodisch (u.a. Nabelblut vs. Vollblut, sowie Probenaufbereitung) bedingte Abweichungen sein.

Ein weiterer Aktivierungsmarker von Thrombozyten ist P-Selectin. Dieses 62 kDa große Protein wird in  $\alpha$ -Granula gespeichert und unter Aktivierung der Thrombozyten auf der Oberfläche selbiger exprimiert (Furie et al., 2001). Interessanterweise zeigten FACS-Analysen eine verringerte, fast komplett ausbleibende P-Selectin Expression auf der

Oberfläche fetaler muriner Thrombozyten. Dies ist in Übereinstimmung mit vorbestehenden Befunden aus dem humanen System (Sitaru et al., 2005; Wasiluk et al., 2008). Eine verringerte Oberflächenexpression kann einerseits durch eine reduzierte Aktivierbarkeit und damit einhergehende abnehmende Mobilisation, andererseits durch einen verminderten P-Selectin-Gehalt bedingt sein. Zur Beurteilung des P-Selectin-Gehaltes fetaler Thrombozyten wurden Thrombozytenlysate mittels Western Blot analysiert. Unsere Untersuchungen zeigten hier erstmalig einen stark reduzierten P-Selectin Gehalt fetaler Thrombozyten im Vergleich zu adulten Werten. Interessant ist dieser Befund vor allem auch im Rahmen inflammatorischer Prozesse, also bei Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten, worauf in Punkt 5.3.6 noch Bezug genommen wird.

Die Resultate sprechen in Zusammenschau somit für eine nicht gleichförmige, sondern sehr präzise und differenzierte altersabhängige Regulation der Aktivierungsmechanismen fetaler Thrombozyten, die durch unterschiedliche Signaltransduktionswege und Signaling-Elemente bedingt ist. Eine Notwendigkeit für solch eine Regulation liegt neben den oben erwähnten verheerenden Auswirkungen einer pathologischen Thrombusbildung im sich entwickelnden Organismus (Michelson, 2013) vermutlich vor allem auch in der Vielfältigkeit der thrombozytären Funktionen (u.a. Lymphangiogenese (Bertozzi et al., 2010)).

Da die Thrombozytenstimulation mit Thrombin erfolgte, kommt als weitere mögliche Ursache der Hyporeaktivität eine Verminderung der Thrombinrezeptoren in Frage.

Eine vollständige Ausprägung der Funktionsfähigkeit von Thrombozyten erfordert die korrekte Weitergabe von Signalen in das Zellinnere, sprich eine akkurate Signaltransduktion. Hierfür stehen Rezeptoren auf der Oberfläche zur Verfügung, die durch Ligandenbindung Signale überführen und unter anderem eine Aktivierung der Thrombozyten erwirken können.

Ältere Untersuchungen zeigten, dass Thrombozyten Neugeborener über weniger  $\alpha$ -adrenerge-Rezeptoren verfügen, was die Minderaktivierung folgend einer Epinephrinstimulation erklärt (vergleiche vorherigen Abschnitt).

In den in dieser Arbeit angeführten Versuchen wurde vorwiegend mit Thrombin stimuliert. Thrombin vermittelt seine aktivierende Wirkung in humanen Thrombozyten über PAR1/4 und in der Maus über PAR3/4 (Kahn et al., 1999; Kahn et al., 1998). PAR3 wirkt hierbei vornehmlich als Coaktivator für die PAR4 vermittelte Aktivierung (Nakanishi-Matsui et al., 2000). Vorarbeiten von Schlagenhaut et al. zeigten, dass die Expression von PAR1/4 auf Thrombozyten aus Nabelschnurblut von Neugeborenen im Vergleich zu adulten Kontrollen vermindert ist (Schlagenhaut et al., 2010a).

In unseren Untersuchungen fanden wir überraschenderweise keine verminderten Thrombinrezeptorlevel auf Thrombozyten fetaler Mäuse, sondern vielmehr signifikant erhöhte PAR4-Level bei unveränderter PAR3-Expression. Die Unterschiede im Vergleich zur humanen Studie könnten erneut speziesbedingt (z.B. andere Rezeptorfunktionen / Signalwege) oder methodisch (Nabelschnurblut vs. Vollblut) erklärbar sein.

Eine erhöhte Expression von Thrombinrezeptoren könnte bedeuten, dass die fetalen Thrombozyten theoretisch besser aktivierbar sein sollten. Eine reduzierte

Thrombinkonzentration *in-vivo* könnte somit als Erklärung für die verminderte Thrombusbildung mit in Frage kommen. In der Tat wiesen Andrew et al. wie oben beschrieben verminderte Thrombinkonzentrationen in humanen Neugeborenen nach (Andrew et al., 1990). In unseren *in-vitro* Untersuchungen wurden jedoch hohe Thrombinkonzentrationen verwendet, die bei adulten Thrombozyten zur gewünschten Aktivierung führten. Somit kann die hier beobachtete Hyporeaktivität in erster Linie durch einen zellintrinsic Signaldefekt erklärt werden, während jedoch auch weitere Rezeptoren (z.B. GpIb) eine Rolle spielen könnten.

Im obigen Abschnitt wurde eine verminderte Aktivierung des GpIIb/IIIa-Integrins erwähnt. Für die intakte Funktion von Integrinen werden verschiedene Integrin-Adaptermoleküle benötigt. Als besonders wichtig für thrombozytäre Funktionen zeigten sich hier Talin1, Kindlin-3 und auch Rap1, Proteine deren Fehlen zu mehr oder minder ausgeprägten Blutungsphänotypen führt (Bernardi et al., 2006; Guidetti und Torti, 2012; Moser et al., 2008; Petrich et al., 2007; Stefanini et al., 2012; Stefanini et al., 2014).

<b>Knockout</b>	<b>Autoren</b>	<b>Blutungsphänotyp (Ja/nein)</b>
<b>Kindlin-3</b>	Moser et al.	Ja
<b>Talin1</b>	Petrich et al.	Ja
<b>Rap1</b>	Chrzanowska-Wodnicka et al.; Guidetti und Torti et al.	Verlängerte Schwanzblutungszeit
<b>RIAM</b>	Stritt et al.	Nein

**Tabelle 13: Befunde von Knockouttieren vor dem Hintergrund der Integrinfunktion.**

In der Tat konnten wir zeigen, dass sowohl Talin1, als auch Kindlin-3 und Rap1 in fetalen Thrombozyten signifikant reduziert sind. Die Notwendigkeit der hier angeführten Proteine für eine intakte Thrombozytenfunktion konnte in adulten Tieren nachgewiesen werden. Insbesondere die Rolle von Kindlin-3 wurde detailliert aufgeschlüsselt und bewiesen, dass zwar minimale Kindlin-3 Mengen eine grundlegende, basale Thrombozytenfunktion gewährleisten können, für eine vollständige Ausprägung der funktionellen Aspekte von Thrombozyten jedoch größere Kindlin-3 Mengen erforderlich sind (Klapproth et al., 2015a).

Der abschließende Beweis, dass die Reduktion dieser Signalmoleküle für unsere *in-vivo* Befunde mit verantwortlich ist, steht derzeit noch aus. Dies könnte zum Beispiel durch Experimente mit Knochenmarkschimären bzw. Transfusion von Kindlin-3-defizienten Thrombozyten in die jeweiligen Feten unterschiedlichen Gestationsalters untermauert werden. Dennoch zeigt sich hier eindrücklich und erstmalig eine gestationsabhängige Reifung der involvierten Integrin-Aktivierungsmechanismen. Während man spekulieren kann, inwieweit die jeweilige Reduktion der einzelnen Proteine selbst zu einer beeinträchtigten Thrombozytenfunktion führt, so erscheint es wahrscheinlich, dass die gleichzeitige Reduktion der hier bestimmten Signalproteine in Kombination in einer eingeschränkten Funktionsfähigkeit resultiert.

Folgend der Stimulation mit Thrombin erwartet man eine Internalisierung bzw. ein mögliches Cleaving und damit einhergehende Abnahme der Oberflächenlevel von GpIb (Gardiner und

Andrews, 2014; Gardiner et al., 2007; Han et al., 2003). Schlagenhauf et al. konnten zeigen, dass Thrombozyten humaner Neugeborener mehr GpIb-IX-V auf ihrer Oberfläche tragen, während GpIIb/IIIa Level unverändert waren (Schlagenhauf et al., 2010b). Diesen Befund der GpIb-Expression konnten wir nicht bestätigen, da sich in unserem Modell in unstimulierten Thrombozyten niedrigere GpIb-Oberflächenlevel fanden. Fetale Thrombozyten zeigten in unseren Untersuchungen insbesondere ab Tag E14.5 eine erhöhte Internalisierung/Downregulation bzw. Shedding auf der Oberfläche. Die genaue Aufschlüsselung nach Internalisierung und Shedding ließe sich durch Fragmentanalysen auf der Suche nach GpIb-Cleavage-Fragmenten, sowie zytosolische GpIb-Bestimmungen beantworten, wobei hier zwischen GpIb $\alpha$  (v.a. Shedding) und GpIb $\beta$  (v.a. Internalisierung) unterschieden werden muss (Bergmeier et al., 2000). Ebenfalls wäre die Bestimmung von Metalloproteinasen der ADAM-Familie für das weitergehende Verständnis sinnvoll. Eine mögliche abnahmebedingte Voraktivierung der Thrombozyten im humanen System oder auch anhand der in dieser Arbeit verwendeten Methodik muss desgleichen mit in Betrachtung gezogen werden. Ebenso spielen unterschiedliche Nachweismethoden eine mögliche Rolle für die verschiedenartigen Befunde. Weiterhin sind Speziesunterschiede zwischen murinen und humanen Proben als mögliche Ursache für Diskrepanzen zu benennen. Interessanterweise spielt GpIb zudem eine Rolle für die Vermittlung der thrombininduzierten Thrombozytenaktivierung (Dormann et al., 2000). Es wäre vor diesem Hintergrund denkbar, dass niedrigere GpIb-Level ebenfalls zu der in dieser Arbeit erkennbaren verminderten Thrombinantwort beitragen.

Auch die Rolle von PECAM-1 als aktivierungsmodifizierender Rezeptor muss für die Thrombozytenaktivierung im Verlauf der fetalen Entwicklung abschließend geklärt werden (Jones et al., 2014; Jones et al., 2001).

### **5.3.5 *In-vivo* Beobachtung transfundierter Thrombozyten in Feten**

Dieser methodisch aufwendige Schritt diente einerseits der genaueren Abgrenzung von endothelialen und thrombozytären funktionellen Defiziten, andererseits der Untersuchung der Therapieoption der Transfusion von Thrombozytenkonzentraten in der Neonatologie.

Die von uns in die fetale Zirkulation transfundierten adulten Thrombozyten bildeten in 100% der Untersuchungen an verschiedenen Stellen Emboli und Thromben aus, die bis zu einem Gefäßverschluss anwachsen konnten. Fetale, altersadaptierte transfundierte Thrombozyten zeigten dies nur in 33%. Hierbei wurden in beiden Fällen 200.000 Thrombozyten transfundiert. In Kontrollexperimenten unserer Arbeitsgruppe (siehe Publikation) wurde deshalb eine auf das Gesamtblutvolumen normalisierte vergleichbare Menge Thrombozyten in adulte Tiere transfundiert. Hier zeigte sich keine spontane Thromboembolisation im Visualisierungsfeld des adulten Musculus Cremaster. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass nicht die Thrombozytenzahl, sondern in der Tat der Phänotyp adulter Thrombozyten im fetalen Milieu für die Beobachtungen verantwortlich zeichnen. Weiterhin sprechen diese Beobachtungen gegen eine artifizielle „Präaktivierung“ der adulten Thrombozyten durch die Isolationsprozedur, sondern vielmehr für das Vorliegen prokoagulatorischer Faktoren im fetalen Plasma. In einer eleganten *in-vitro* Studie konnte die Arbeitsgruppe von Martha Sola-

Visner analog zu unseren Ergebnissen zeigen, dass adulte Thrombozyten im fetalen Plasma signifikant besser aggregieren und auch eine erhöhte Thrombusstabilität zeigen im Vergleich zu adultem Plasma, eine Beobachtung, die wir nun erstmals auch *in-vivo* belegen konnten (Ferrer-Marin et al., 2011).

Auffällig in der Thrombusentstehung war die Beobachtung, dass das Thrombuswachstum nach Transfusion vor allem durch Einfangen von fluoreszenzmarkierten adulten Thrombozyten zustande kam, während die fetalen Thrombozyten lediglich ein „Touch and go“-Verhalten (Jenne und Kubes, 2015) zeigten, ansonsten jedoch überwiegend unbeteiligt blieben. Zur genaueren Analyse dieses Vorganges wären künftige Experimente mit Doppelfärbungen von adulten und fetalen Thrombozyten sinnvoll.

Eine Beteiligung der endothelialen Reifung (Pearce und Khorram, 2013) am Prozess der ontogenetischen Regulation der Thrombusentstehung ist nicht auszuschließen. Die in diesem Abschnitt diskutierten Beobachtungen sprechen jedoch dafür, dass die beschriebenen Prozesse vor allem thrombozytären und nur in geringerem Maße endothelialen Ursprungs sind.

### **5.3.6 Thrombozyten-Leukozyteninteraktion in der fetalen Entwicklung**

Thrombozyten sind in der Lage mit anderen Zellen, unter anderem Endothelzellen und Leukozyten, zu interagieren. Die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten spielt hierbei insbesondere für inflammatorische Prozesse (Zuchtriegel et al., 2016) und thrombotische Erkrankungen (Cerletti et al., 2012; von Bruhl et al., 2012) eine wichtige Rolle.

Vor diesem Hintergrund untersuchten wir die Interaktion von fluoreszenzmarkierten transfundierten adulten Thrombozyten mit EGFP-exprimierenden fetalen Leukozyten. In diesen Experimenten konnten wir zeigen, dass keine Interaktion zustande kommt. Es erscheint logisch, dass fetale Thrombozyten, die kein P-Selectin auf der Oberfläche aufweisen, nicht in der Lage sind mit Leukozyten über PSGL-1 zu interagieren. Doch wie erklärt sich die fehlende Interaktion mit adulten P-Selectin exprimierenden Thrombozyten? Unsere Gruppe konnte in einer vorherigen Studie zeigen, dass im humanen System ein Rolldefekt isolierter neutrophiler Granulozyten auf HUVECs vorliegt. Interessanterweise zeigten sich in neutrophilen Granulozyten aus jungen Neonaten erniedrigte PSGL-1 Level, was neben den niedrigen P-Selectin Leveln in Feten als ursächlich für die fehlende Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion angenommen werden kann (Nussbaum et al., 2013; Sperandio et al., 2013). Das fehlende Einfangen zusätzlicher Zellen könnte so ebenfalls zu einem verzögerten Thrombuswachstum beitragen.

### **5.3.7 Nicht untersuchte Bestandteile**

Neben den Thrombozyten spielen weitere Elemente eine wichtige Rolle für die Hämostase. Wir untersuchten in unserer Arbeitsgruppe somit ebenfalls die Entwicklung des Hämatokrits und fanden, dass auch dieser erst im Verlauf der fetalen Entwicklung ansteigt (vergleiche Publikation).

Nicht untersucht wurden die vWF-Level, Fibrinogen-Spiegel (Barker et al., 1992; Legrele et al., 1978) und endotheliale Reifungsprozesse (Chang et al., 2016). Dies war nicht zuletzt aufgrund des geringen Blutvolumens und der fehlenden Möglichkeit, ausreichende Mengen reinen Plasmas zu isolieren (gepooltes Blut von mehreren Feten) in unseren Experimenten nicht möglich. Auch Versuche der Endothelzellaufreinigung gestalteten sich schwierig.

## 5.4 Klinische Bedeutung

Thrombozyten spielen eine entscheidende Rolle für hämostatische und immunologische Prozesse. Eine Studie der Arbeitsgruppe von Professor Massberg konnte zeigen, dass Thrombozyten zu dem Verschluss des Ductus Arteriosus beitragen (Echtler et al., 2010). In dieser Veröffentlichung wurde zudem ein Zusammenhang zwischen Thrombozytopenie und dem Auftreten eines persistierenden Ductus Arteriosus hergestellt, ein Befund, der aktuell noch kontrovers diskutiert wird (Mitra et al., 2017; Murphy et al., 2016). Auch wurde in anderen Arbeiten der Beitrag von Thrombozyten zum Auftreten des multifaktoriellen Geschehens der intraventrikulären Hämorrhagie diskutiert (Naidech et al., 2009; Piotrowski et al., 2010; von Lindern et al., 2011).

In Kooperation mit der Universitätsklinik Großhadern untersuchten wir retrospektiv die Auswirkungen einer Thrombozytentransfusion auf den Verschluss eines hämodynamisch relevanten PDA. Hier konnten wir jedoch keinen positiven Zusammenhang zwischen der Verabreichung von Thrombozytenkonzentraten und dem Verschluss des PDA herstellen ((Margraf et al., 2017), vergleiche Publikation).

Die Resultate der *in-vivo* Versuche zeigen eindrücklich, dass die in der Neonatologie vollzogene Thrombozytentransfusion kritisch diskutiert werden muss. In Zusammenschau mit der vormals erwähnten Studie zur Bestimmung neuer thrombozytärer Referenzwerte für Neugeborene (Wiedmeier et al., 2009) und weiterer *in-vitro* Daten zeigt sich ein ontogenetischer Reifungsprozess der hämostatischen und thrombopoetischen Funktionen, der in die klinische Entscheidungsfindung mit einfließen muss. Es fehlen – auch mangels alternativer Transfusionsprodukte – Langzeitergebnisse und Effekte der Thrombozytentransfusion in der Neonatologie, genauso wie geeignete Grenzwerte für adäquate Transfusionsmaßnahmen (Curley et al., 2014). Es stellt sich bei den erwähnten Studien, insbesondere der Studie von Wiedmeier et al., wie dort auch angesprochen, die Frage nach einem Selektions-Bias, da nur besonders kranke Neonaten und Frühgeborene Thrombozytenkonzentrate erhalten und spezielle oder wiederholte Labortests, wodurch in eine Datenerhebung folglich möglicherweise nur Referenzwerte von im Vergleich kränkeren Neugeborenen mit einfließen konnten (Wiedmeier et al., 2009). Aktuell gibt es Hinweise auf eine gesteigerte Mortalität folgend der Verabreichung von Thrombozytenkonzentraten (Bonifacio et al., 2007; Garcia et al., 2001).

## 5.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit fordern nicht nur eine weitergehende Untersuchung der Signaltransduktions- und Aktivierungsmechanismen fetaler Thrombozyten, sondern zudem Experimente unter Anwendung der neu entwickelten fetalen Bildgebungsmethodik.

Es muss künftig nicht nur geklärt werden, ob die in unseren Untersuchungen aufgezeigten reduzierten Integrin-Adapterproteine wirklich für das funktionelle Defizit verantwortlich zeichnen, sondern auch ob alternative Signaling-Prozesse in fetalen Thrombozyten existieren. Dies wäre insbesondere für die Ausübung der nicht-hämostatischen Prozesse (z.B. CLEC-Rezeptoren im Rahmen der Lymphangiogenese (Bertozzi et al., 2010), oder auch Immunabwehr (Wong et al., 2013)) von Bedeutung. Auch die Frage nach unterschiedlichen Thrombozyten-Subpopulationen im Verlauf der fetalen Entwicklung ist spannend. Speziell die Verschiebung der hämato- und thrombopoietischen Orte könnte dazu führen, dass sich ebenfalls der auszubildende Phänotyp der nachproduzierten Thrombozyten ändert. Dies würde sich durch *in-vivo* Biotinylierung und nachfolgende Isolierung (zum Beispiel durch FACS-basiertes Sorten) näher untersuchen lassen. Ebenfalls wurden in dieser Arbeit nicht alle thrombozytären Rezeptoren ausreichend beleuchtet. Insbesondere die Glykoproteine GpIV und GpVI bedürfen weitergehender Analysen, wie auch die ADP-Rezeptoren.

Klinisch betrachtet zeigt diese Arbeit erstmals eine ontogenetische Regulation der Thrombozytenfunktion *in-vivo*. Hierdurch erlaubt sich eine kritische Betrachtung der vollzogenen Transfusionspraktiken in Neonatologie und Pädiatrie, bei welcher eine nicht-altersentsprechende Transfusion von Thrombozytenkonzentraten erfolgt. Ein möglicher Ansatz wäre die Herstellung altersadaptierter Thrombozytenkonzentrate. Diese Maßnahme könnte es ermöglichen einen Anstieg der Thrombozytenzahlen zu erwirken, wodurch eine verbesserte Reifung und ggf. Blutstillung erreicht würde, ohne jedoch ein pathologisches Clotting aufgrund unverhältnismäßig ausgeprägter Aktivierungszustände auszulösen. Früh- und Neugeborene können aktuell aufgrund ihres geringen Blutvolumens praktisch jedoch nicht als Thrombozytenspender fungieren. Interessant sind vor diesem Hintergrund die aktuellen Entwicklungen zur *in-vitro* Produktion von Thrombozyten. Ein aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joseph E. Italiano Jr. hervorgegangenes Startup-Unternehmen (platelet biogenesis) widmet sich aktuell dieser Thematik, indem versucht wird aus Stamm- oder Vorläuferzellen mittels eines Bioreaktors funktionierende Thrombozyten anzuzüchten. Dies würde die Problematik der Sammlung und Lagerung von altersentsprechenden Thrombozytenkonzentraten massiv mindern (Thon et al., 2014).

Auch eine Modulation der Rezeptoren könnte es ermöglichen ein dem fetalen Phänotyp entsprechendes Aktivierungsmuster adulter Thrombozyten vor Transfusion zu erreichen. Hierdurch könnte man zwar keinen „Developmental-Mismatch“ vermeiden (Ferrer-Marin et al., 2011), jedoch einen „Reactivity-Mismatch“, was erneut die Problematik altersentsprechender Thrombozytenkonzentrate umginge.

Künftige Studien müssen abschließend klären, inwiefern die Transfusion adulter Thrombozyten nachteilige Effekte für Patienten der Neonatologie und Pädiatrie birgt und ob positive Effekte durch altersentsprechende Transfusionen erreicht werden können. Auch die Frage nach adäquaten Thrombozytenzahlen muss weitergehend untersucht werden.

## KAPITEL 6

---

### 6. Zusammenfassung

Eine funktionierende Hämostase erfordert eine ausbalancierte, regulierte Thrombozytenfunktion. Die Rolle von Thrombozyten im adulten Organismus ist bereits detailliert untersucht und aufgeschlüsselt worden. Frühgeborene hingegen zeichnen sich durch ein erhöhtes Risiko an Blutungskomplikationen aus, während noch wenig zur *in-vivo* Funktionalität fetaler Thrombozyten bekannt ist. *In-vitro* Befunde aus Nabelschnurblut zeigten unter anderem eine verringerte Thrombozytenaktivität, bei jedoch gleichzeitig erhöhter Ristocetin induzierter Agglutination. Aufgrund der fehlenden Daten für das hämostatische Verhalten *in-vivo*, stellten wir die Untersuchung der Thrombozytenfunktion *in-vivo*, sowie die Aufarbeitung der zugrundeliegenden Mechanismen selbiger *in-vitro*, in den Vordergrund dieser Arbeit.

Durch die Entwicklung eines neuen Tiermodells in der Maus konnte die *in-vivo* Thrombusbildung im sich entwickelnden Fetus erstmalig nachvollzogen werden. Hierbei zeigten sich eine verminderte Thrombozytenadhäsion, eine verringerte und verzögerte Thrombusbildung, sowie eine reduzierte Thrombusstabilität in jungen (E13.5) Feten verglichen mit älteren Feten. Zur Aufarbeitung dieser Befunde wurden Thrombozytenzahlen untersucht und Aktivierungsmessungen fetaler Thrombozyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien durchgeführt. Hier zeigte sich ein altersabhängiger Anstieg der Thrombozytenzahlen, wobei alle fetalen Werte weit unter den adulten Referenzwerten lagen. In der thrombinbasierten Aktivierungsanalyse zeigte sich ebenfalls ein altersabhängiger Verlauf der untersuchten Parameter (GpIb, GpIIb/IIIa, P-Selectin). Interessanterweise zeigte sich ein stark verminderter Konformationswechsel des GpIIb/IIIa-Integrin-Rezeptors in den Zustand hoher Affinität, welcher unter anderem für die Quervernetzung im sich entwickelnden Thrombus mit verantwortlich zeichnet. Auf molekularer Ebene offenbarten sich signifikant reduzierte Integrin-Adaptermolekül-Level (Talin1, Kindlin-3, Rap1), welche als mögliche Ursache für diesen Phänotypen in Betracht kommen. Auch war in der Durchflusszytometrie kein P-Selectin auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten junger Entwicklungsstadien vorzufinden. Bei genauerer Analyse zeigte sich, dass nur geringste Mengen P-Selectin in den Granula fetaler Thrombozyten gespeichert sind.

Zur weiteren Ursachenbestimmung und Analyse der Konsequenz einer Thrombozytentransfusion wurden adulte und fetale Thrombozyten aufgereinigt und in Feten des Alters E14.5 injiziert. Die injizierten adulten Thrombozyten lagerten sich schnell und vielerorts dem fetalen Dottersack-Endothel an und waren in der Lage einen kompletten Thrombus auszubilden, während dies nur in 33% der fetalen isolierten Thrombozyten der Fall war.

Im Zusammenhang der weitergehenden Zellinteraktion wurde ebenfalls die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion untersucht. Hier zeigte sich in fetalen LysM-EGFP-Tieren, die mit adulten, aktivierbaren Thrombozyten transfundiert wurden, keine Interaktion der beiden fluoreszierenden Zellpopulationen trotz spontaner Aggregation der transfundierten adulten Thrombozyten.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit somit erstmals eine altersabhängige Regulation der Thrombozytenfunktion *in-vivo* nachgewiesen werden. Diese ist einerseits auf reduzierte Thrombozytenzahlen, andererseits auf eine verminderte Thrombozytenaktivierbarkeit zurückzuführen. Eine Transfusion adulter Thrombozyten kann diese ausbleibende hämostatische Funktion zwar offenbar kompensieren, jedoch muss hier das Risiko einer unverhältnismäßigen Aktivierung mit pathologischer Thrombusbildung in Betracht gezogen werden.

### 7. Literaturverzeichnis

- Aballi, A.J., Y. Puapondh, und F. Desposito. 1968. Platelet counts in thriving premature infants. *Pediatrics* 42:685-689.
- Adair, B.D., und M. Yeager. 2002. Three-dimensional model of the human platelet integrin alpha IIb beta 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:14059-14064.
- Adam, F., M.C. Guillin, und M. Jandrot-Perrus. 2003. Glycoprotein Ib-mediated platelet activation. A signalling pathway triggered by thrombin. *European journal of biochemistry / FEBS* 270:2959-2970.
- Aleman, M.M., J.R. Byrnes, J.G. Wang, R. Tran, W.A. Lam, J. Di Paola, N. Mackman, J.L. Degen, M.J. Flick, und A.S. Wolberg. 2014. Factor XIII activity mediates red blood cell retention in venous thrombi. *The Journal of clinical investigation* 124:3590-3600.
- Alevriadou, B.R., J.L. Moake, N.A. Turner, Z.M. Ruggeri, B.J. Folie, M.D. Phillips, A.B. Schreiber, M.E. Hrinda, und L.V. McIntire. 1993. Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets. *Blood* 81:1263-1276.
- Alugupalli, K.R., A.D. Michelson, M.R. Barnard, und J.M. Leong. 2001. Serial determinations of platelet counts in mice by flow cytometry. *Thrombosis and haemostasis* 86:668-671.
- Alvarez, D.F., K. Helm, J. Degregori, M. Roederer, und S. Majka. 2010. Publishing flow cytometry data. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 298:L127-130.
- Andre, P., C.V. Denis, J. Ware, S. Saffaripour, R.O. Hynes, Z.M. Ruggeri, und D.D. Wagner. 2000. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood* 96:3322-3328.
- Andrew, M., V. Castle, S. Saigal, C. Carter, und J.G. Kelton. 1987. Clinical impact of neonatal thrombocytopenia. *The Journal of pediatrics* 110:457-464.
- Andrew, M., B. Schmidt, L. Mitchell, B. Paes, und F. Ofosu. 1990. Thrombin generation in newborn plasma is critically dependent on the concentration of prothrombin. *Thrombosis and haemostasis* 63:27-30.
- Arad, I.D., G. Alpan, S.D. Sznajderman, und A. Eldor. 1986. The mean platelet volume (MPV) in the neonatal period. *American journal of perinatology* 3:1-3.
- Assinger, A. 2014. Platelets and infection - an emerging role of platelets in viral infection. *Frontiers in immunology* 5:649.
- Ault, K.A., und C. Knowles. 1995. In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. *Experimental hematology* 23:996-1001.
- Ballabh, P. 2010. Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease. *Pediatric research* 67:1-8.
- Barker, D.J., T.W. Meade, C.H. Fall, A. Lee, C. Osmond, K. Phipps, und Y. Stirling. 1992. Relation of fetal and infant growth to plasma fibrinogen and factor VII concentrations in adult life. *Bmj* 304:148-152.
- Bennett, J.S. 2005. Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3. *The Journal of clinical investigation* 115:3363-3369.

- Bennett, J.S., B.W. Berger, und P.C. Billings. 2009. The structure and function of platelet integrins. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 Suppl 1:200-205.
- Berger, G., D.W. Hartwell, und D.D. Wagner. 1998. P-Selectin and platelet clearance. *Blood* 92:4446-4452.
- Bergmeier, W., K. Rackebandt, W. Schroder, H. Zirngibl, und B. Nieswandt. 2000. Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor GPIb-IX with novel monoclonal antibodies. *Blood* 95:886-893.
- Bergmeier, W., V. Schulte, G. Brockhoff, U. Bier, H. Zirngibl, und B. Nieswandt. 2002. Flow cytometric detection of activated mouse integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 with a novel monoclonal antibody. *Cytometry* 48:80-86.
- Bernardi, B., G.F. Guidetti, F. Campus, J.R. Crittenden, A.M. Graybiel, C. Balduini, und M. Torti. 2006. The small GTPase Rap1b regulates the cross talk between platelet integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 and integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Blood* 107:2728-2735.
- Berndt, M.C., P. Metharom, und R.K. Andrews. 2014. Primary haemostasis: newer insights. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 20 Suppl 4:15-22.
- Bertozzi, C.C., A.A. Schmaier, P. Mericko, P.R. Hess, Z. Zou, M. Chen, C.Y. Chen, B. Xu, M.M. Lu, D. Zhou, E. Sebzda, M.T. Santore, D.J. Merianos, M. Stadtfeld, A.W. Flake, T. Graf, R. Skoda, J.S. Maltzman, G.A. Koretzky, und M.L. Kahn. 2010. Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood* 116:661-670.
- Bolton-Maggs, P.H., E.A. Chalmers, P.W. Collins, P. Harrison, S. Kitchen, R.J. Liesner, A. Minford, A.D. Mumford, L.A. Parapia, D.J. Perry, S.P. Watson, J.T. Wilde, M.D. Williams, und Ukhcdo. 2006. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *British journal of haematology* 135:603-633.
- Bonifacio, L., A. Petrova, S. Nanjundaswamy, und R. Mehta. 2007. Thrombocytopenia related neonatal outcome in preterms. *Indian journal of pediatrics* 74:269-274.
- Briggs, C., S. Kunka, D. Hart, S. Oguni, und S.J. Machin. 2004. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *British journal of haematology* 126:93-99.
- Broos, K., H.B. Feys, S.F. De Meyer, K. Vanhoorelbeke, und H. Deckmyn. 2011. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews* 25:155-167.
- Brown, M., und C. Wittwer. 2000. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical chemistry* 46:1221-1229.
- Calaminus, S.D., A.V. Guitart, A. Sinclair, H. Schachtner, S.P. Watson, T.L. Holyoake, K.R. Kranc, und L.M. Machesky. 2012. Lineage tracing of Pf4-Cre marks hematopoietic stem cells and their progeny. *PloS one* 7:e51361.
- Cerletti, C., C. Tamburrelli, B. Izzì, F. Gianfagna, und G. de Gaetano. 2012. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thrombosis research* 129:263-266.
- Chang, F., S. Flavahan, und N.A. Flavahan. 2016. Immature endothelial cells initiate endothelin-mediated constriction of newborn arteries. *The Journal of physiology* 594:4933-4944.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., S.S. Smyth, S.M. Schoenwaelder, T.H. Fischer, und G.C. White, 2nd. 2005. Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. *The Journal of clinical investigation* 115:680-687.
- Cognasse, F., K.A. Nguyen, P. Damien, A. McNicol, B. Pozzetto, H. Hamzeh-Cognasse, und O. Garraud. 2015. The Inflammatory Role of Platelets via Their TLRs and Siglec Receptors. *Frontiers in immunology* 6:83.
- Cohen, J.A., und C.H. Leeksa. 1956. Determination of the life span of human blood platelets using labelled diisopropylfluorophosphonate. *The Journal of clinical investigation* 35:964-969.

- Corby, D.G., und T.P. O'Barr. 1981. Decreased alpha-adrenergic receptors in newborn platelets: cause of abnormal response to epinephrine. *Developmental pharmacology and therapeutics* 2:215-225.
- Curley, A., V. Venkatesh, S. Stanworth, P. Clarke, T. Watts, H. New, K. Willoughby, R. Khan, P. Muthukumar, und A. Deary. 2014. Platelets for neonatal transfusion - study 2: a randomised controlled trial to compare two different platelet count thresholds for prophylactic platelet transfusion to preterm neonates. *Neonatology* 106:102-106.
- Davey, M.G., und E.F. Luscher. 1967. Actions of thrombin and other coagulant and proteolytic enzymes on blood platelets. *Nature* 216:857-858.
- de Alarcon, P.A., und J.L. Graeve. 1996. Analysis of megakaryocyte ploidy in fetal bone marrow biopsies using a new adaptation of the feulgen technique to measure DNA content and estimate megakaryocyte ploidy from biopsy specimens. *Pediatric research* 39:166-170.
- De Candia, E., S.W. Hall, S. Rutella, R. Landolfi, R.K. Andrews, und R. De Cristofaro. 2001. Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets. *The Journal of biological chemistry* 276:4692-4698.
- Del Vecchio, A., G. Latini, E. Henry, und R.D. Christensen. 2008. Template bleeding times of 240 neonates born at 24 to 41 weeks gestation. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 28:427-431.
- Di Prima, F.A., O. Valenti, E. Hyseni, E. Giorgio, M. Faraci, E. Renda, R. De Domenico, und S. Monte. 2011. Antiphospholipid Syndrome during pregnancy: the state of the art. *Journal of prenatal medicine* 5:41-53.
- Dormann, D., K.J. Clemetson, und B.E. Kehrel. 2000. The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood* 96:2469-2478.
- Dowling, M.R., E.C. Josefsson, K.J. Henley, P.D. Hodgkin, und B.T. Kile. 2010. Platelet senescence is regulated by an internal timer, not damage inflicted by hits. *Blood* 116:1776-1778.
- Echtler, K., K. Stark, M. Lorenz, S. Kerstan, A. Walch, L. Jennen, M. Rudelius, S. Seidl, E. Kremmer, N.R. Emambokus, M.L. von Bruehl, J. Frampton, B. Isermann, O. Genzel-Boroviczeny, C. Schreiber, J. Mehilli, A. Kastrati, M. Schwaiger, R.A. Shivdasani, und S. Massberg. 2010. Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus. *Nature medicine* 16:75-82.
- Edelberg, J.M., J.J. Enghild, S.V. Pizzo, und M. Gonzalez-Gronow. 1990. Neonatal plasminogen displays altered cell surface binding and activation kinetics. Correlation with increased glycosylation of the protein. *The Journal of clinical investigation* 86:107-112.
- Engelmann, B., und S. Massberg. 2013. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 13:34-45.
- Faust, N., F. Varas, L.M. Kelly, S. Heck, und T. Graf. 2000. Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* 96:719-726.
- Fennie, C., J. Cheng, D. Dowbenko, P. Young, und L.A. Lasky. 1995. CD34+ endothelial cell lines derived from murine yolk sac induce the proliferation and differentiation of yolk sac CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood* 86:4454-4467.
- Ferdowsian, H.R., und N. Beck. 2011. Ethical and scientific considerations regarding animal testing and research. *PloS one* 6:e24059.
- Ferrer-Marin, F., C. Chavda, M. Lampa, A.D. Michelson, A.L. Frelinger, 3rd, und M. Sola-Visner. 2011. Effects of in vitro adult platelet transfusions on neonatal hemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 9:1020-1028.

- Ferrer-Marin, F., S. Stanworth, C. Josephson, and M. Sola-Visner. 2013. Distinct differences in platelet production and function between neonates and adults: implications for platelet transfusion practice. *Transfusion* 53:2814-2821; quiz 2813.
- Frommhold, D., A. Kamphues, I. Hepper, M. Pruenster, I.K. Lukic, I. Socher, V. Zablotskaya, K. Buschmann, B. Lange-Sperandio, J. Schymeinsky, E. Ryschich, J. Poeschl, C. Kupatt, P.P. Nawroth, M. Moser, B. Walzog, A. Bierhaus, and M. Sperandio. 2010. RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo. *Blood* 116:841-849.
- Fullard, J.F. 2004. The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis. *Current pharmaceutical design* 10:1567-1576.
- Furie, B., B.C. Furie, and R. Flaumenhaft. 2001. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thrombosis and haemostasis* 86:214-221.
- Fustolo-Gunnink, S.F., R.D. Vlug, V.E. Smits-Wintjens, E.J. Heckman, A.B. Te Pas, K. Fijnvandraat, and E. Lopriore. 2016. Early-Onset Thrombocytopenia in Small-For-Gestational-Age Neonates: A Retrospective Cohort Study. *PloS one* 11:e0154853.
- Garcia, M.G., E. Duenas, M.C. Sola, A.D. Hutson, D. Theriaque, and R.D. Christensen. 2001. Epidemiologic and outcome studies of patients who received platelet transfusions in the neonatal intensive care unit. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 21:415-420.
- Gardiner, E.E., and R.K. Andrews. 2014. Platelet receptor expression and shedding: glycoprotein Ib-IX-V and glycoprotein VI. *Transfusion medicine reviews* 28:56-60.
- Gardiner, E.E., D. Karunakaran, Y. Shen, J.F. Arthur, R.K. Andrews, and M.C. Berndt. 2007. Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5:1530-1537.
- Gelman, B., B.N. Setty, D. Chen, S. Amin-Hanjani, and M.J. Stuart. 1996. Impaired mobilization of intracellular calcium in neonatal platelets. *Pediatric research* 39:692-696.
- Ghoshal, K., and M. Bhattacharyya. 2014. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *TheScientificWorldJournal* 2014:781857.
- Grozovsky, R., K.M. Hoffmeister, and H. Falet. 2010. Novel clearance mechanisms of platelets. *Current opinion in hematology* 17:585-589.
- Guedes, P.T., B.C. de Oliveira, P.P. Manso, L.F. Caputo, G. Cotta-Pereira, and M. Pelajo-Machado. 2014. Histological analyses demonstrate the temporary contribution of yolk sac, liver, and bone marrow to hematopoiesis during chicken development. *PloS one* 9:e90975.
- Guidetti, G.F., and M. Torti. 2012. The Small GTPase Rap1b: A Bidirectional Regulator of Platelet Adhesion Receptors. *Journal of signal transduction* 2012:412089.
- Gunduz, E., O.M. Akay, C. Bal, and Z. Gulbas. 2011. Can thrombelastography be a new tool to assess bleeding risk in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura? *Platelets* 22:516-520.
- Han, Y., A. Nurden, R. Combrie, and J.M. Pasquet. 2003. Redistribution of glycoprotein Ib within platelets in response to protease-activated receptors 1 and 4: roles of cytoskeleton and calcium. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 1:2206-2215.
- Hattori, R., K.K. Hamilton, R.D. Fugate, R.P. McEver, and P.J. Sims. 1989. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *The Journal of biological chemistry* 264:7768-7771.
- Hellstrom-Westas, L., D. Ley, A.C. Berg, A.C. Kristoffersson, and L. Holmberg. 2005. VWF-cleaving protease (ADAMTS13) in premature infants. *Acta paediatrica* 94:205-210.

- Ingram, M., und A. Coopersmith. 1969. Reticulated platelets following acute blood loss. *British journal of haematology* 17:225-229.
- Israels, S.J., T. Cheang, C. Roberston, E.M. McMillan-Ward, und A. McNicol. 1999. Impaired signal transduction in neonatal platelets. *Pediatric research* 45:687-691.
- Israels, S.J., F.S. Odaibo, C. Robertson, E.M. McMillan, und A. McNicol. 1997. Deficient thromboxane synthesis and response in platelets from premature infants. *Pediatric research* 41:218-223.
- Israels, S.J., M.L. Rand, und A.D. Michelson. 2003. Neonatal platelet function. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 29:363-372.
- Iwamoto, D.V., und D.A. Calderwood. 2015. Regulation of integrin-mediated adhesions. *Current opinion in cell biology* 36:41-47.
- Jackson, S.P., und S.M. Schoenwaelder. 2003. Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'. *Nature reviews. Drug discovery* 2:775-789.
- Jenne, C.N., und P. Kubes. 2015. Platelets in inflammation and infection. *Platelets* 26:286-292.
- Jilma-Stohlawetz, P., M. Homoncik, B. Jilma, C.C. Folman, A.E. von dem Borne, G. Bernaschek, J. Deutinger, B. Ulm, W. Eppel, und S. Panzer. 2001. High levels of reticulated platelets and thrombopoietin characterize fetal thrombopoiesis. *British journal of haematology* 112:466-468.
- Jones, C.I., T. Sage, L.A. Moraes, S. Vaiyapuri, U. Hussain, K.L. Tucker, N.E. Barrett, und J.M. Gibbins. 2014. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 inhibits platelet response to thrombin and von Willebrand factor by regulating the internalization of glycoprotein Ib via AKT/glycogen synthase kinase-3/dynamin and integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34:1968-1976.
- Jones, K.L., S.C. Hughan, S.M. Dopheide, R.W. Farndale, S.P. Jackson, und D.E. Jackson. 2001. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a negative regulator of platelet-collagen interactions. *Blood* 98:1456-1463.
- Junt, T., H. Schulze, Z. Chen, S. Massberg, T. Goerge, A. Krueger, D.D. Wagner, T. Graf, J.E. Italiano, Jr., R.A. Shivdasani, und U.H. von Andrian. 2007. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 317:1767-1770.
- Justice, M.J., und P. Dhillon. 2016. Using the mouse to model human disease: increasing validity and reproducibility. *Disease models & mechanisms* 9:101-103.
- Kahn, M.L., M. Nakanishi-Matsui, M.J. Shapiro, H. Ishihara, und S.R. Coughlin. 1999. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *The Journal of clinical investigation* 103:879-887.
- Kahn, M.L., Y.W. Zheng, W. Huang, V. Bigornia, D. Zeng, S. Moff, R.V. Farese, Jr., C. Tam, und S.R. Coughlin. 1998. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394:690-694.
- Katz, J.A., J.L. Moake, P.D. McPherson, M.J. Weinstein, K.J. Moise, R.J. Carpenter, und D.J. Sala. 1989. Relationship between human development and disappearance of unusually large von Willebrand factor multimers from plasma. *Blood* 73:1851-1858.
- Kisucka, J., C.E. Butterfield, D.G. Duda, S.C. Eichenberger, S. Saffaripour, J. Ware, Z.M. Ruggeri, R.K. Jain, J. Folkman, und D.D. Wagner. 2006. Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:855-860.
- Klapproth, S., F.A. Moretti, M. Zeiler, R. Ruppert, U. Breithaupt, S. Mueller, R. Haas, M. Mann, M. Sperandio, R. Fassler, und M. Moser. 2015a. Minimal amounts of kindlin-3 suffice for basal platelet and leukocyte functions in mice. *Blood* 126:2592-2600.

- Klapproth, S., M. Sperandio, E.M. Pinheiro, M. Prunster, O. Soehnlein, F.B. Gertler, R. Fassler, und M. Moser. 2015b. Loss of the Rap1 effector RIAM results in leukocyte adhesion deficiency due to impaired beta2 integrin function in mice. *Blood* 126:2704-2712.
- Klitzman, B., und B.R. Duling. 1979. Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. *The American journal of physiology* 237:H481-490.
- Kowalska, M.A., und G.P. Tuszyński. 1993. Interaction of thrombospondin with platelet glycoproteins GPIa-IIa and GPIIb-IIIa. *The Biochemical journal* 295 ( Pt 3):725-730.
- Kurz, A.R., M. Pruenster, I. Rohwedder, M. Ramadass, K. Schafer, U. Harrison, G. Gouveia, C. Nussbaum, R. Immler, J.R. Wiessner, A. Margraf, D.S. Lim, B. Walzog, S. Dietzel, M. Moser, C. Klein, D. Vestweber, R. Haas, S.D. Catz, und M. Sperandio. 2016. MST1-dependent vesicle trafficking regulates neutrophil transmigration through the vascular basement membrane. *The Journal of clinical investigation* 126:4125-4139.
- Legrele, C., J.M. Felix, C. Droulle-Bertignon, G. Potron, und R. Jacquot. 1978. Evolution of fibrinogen levels in rat fetal and maternal blood during gestation. *Biology of the neonate* 33:201-206.
- Levene, M.I., C.L. Fawer, und R.F. Lamont. 1982. Risk factors in the development of intraventricular haemorrhage in the preterm neonate. *Archives of disease in childhood* 57:410-417.
- Ley, K., und G.S. Kansas. 2004. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nature reviews. Immunology* 4:325-335.
- Li, R., und J. Emsley. 2013. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 11:605-614.
- Li, W., S.A. Johnson, W.C. Shelley, M. Ferkowicz, P. Morrison, Y. Li, und M.C. Yoder. 2003. Primary endothelial cells isolated from the yolk sac and para-aortic splanchnopleura support the expansion of adult marrow stem cells in vitro. *Blood* 102:4345-4353.
- Lievens, D., und P. von Hundelshausen. 2011. Platelets in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis* 106:827-838.
- Liu, Z.J., K.M. Hoffmeister, Z. Hu, D.E. Mager, S. Ait-Oudhia, M.A. Debrincat, I. Pleines, E.C. Josefsson, B.T. Kile, J. Italiano, Jr., H. Ramsey, R. Grozovsky, P. Veng-Pedersen, C. Chavda, und M. Sola-Visner. 2014. Expansion of the neonatal platelet mass is achieved via an extension of platelet lifespan. *Blood* 123:3381-3389.
- Lowenberg, E.C., J.C. Meijers, und M. Levi. 2010. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. *The Netherlands journal of medicine* 68:242-251.
- Mahaut-Smith, M.P., S. Jones, und R.J. Evans. 2011. The P2X1 receptor and platelet function. *Purinergic signalling* 7:341-356.
- Margraf, A., C. Nussbaum, I. Rohwedder, S. Klapproth, A.R.M. Kurz, A. Florian, V. Wiebking, J. Pircher, M. Pruenster, R. Immler, S. Dietzel, L. Kremer, F. Kiefer, M. Moser, A.W. Flemmer, E. Quackenbush, U.H. von Andrian, und M. Sperandio. 2017. Maturation of Platelet Function During Murine Fetal Development In Vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 37:1076-1086.
- Massberg, S., K. Brand, S. Gruner, S. Page, E. Muller, I. Muller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt, und M. Gawaz. 2002. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine* 196:887-896.
- Massberg, S., G. Enders, R. Leiderer, S. Eisenmenger, D. Vestweber, F. Krombach, und K. Messmer. 1998. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 92:507-515.

- Maugeri, N., S. Malato, E.A. Femia, M. Pugliano, L. Campana, F. Lunghi, P. Rovere-Querini, F. Lussana, G. Podda, M. Cattaneo, F. Ciceri, and A.A. Manfredi. 2011. Clearance of circulating activated platelets in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* 118:3359-3366.
- McCarty, O.J., M.K. Larson, J.M. Auger, N. Kalia, B.T. Atkinson, A.C. Pearce, S. Ruf, R.B. Henderson, V.L. Tybulewicz, L.M. Machesky, and S.P. Watson. 2005. Rac1 is essential for platelet lamellipodia formation and aggregate stability under flow. *The Journal of biological chemistry* 280:39474-39484.
- McEver, R.P., J.H. Beckstead, K.L. Moore, L. Marshall-Carlson, and D.F. Bainton. 1989. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *The Journal of clinical investigation* 84:92-99.
- Michelson, A.D. 2010. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nature reviews. Drug discovery* 9:154-169.
- Michelson, A.D. 2013. Platelets. Academic Press, London ; Waltham, MA. xlv, 1353 p. pp.512-512
- Mitchell, J.L., A.S. Lionikiene, S.R. Fraser, C.S. Whyte, N.A. Booth, and N.J. Mutch. 2014. Functional factor XIII-A is exposed on the stimulated platelet surface. *Blood* 124:3982-3990.
- Mitra, S., A.K. Chan, B.A. Paes, Thrombosis, and G. Hemostasis in Newborns. 2017. The association of platelets with failed patent ductus arteriosus closure after a primary course of indomethacin or ibuprofen: a systematic review and meta-analysis. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 30:127-133.
- Morowski, M., T. Vogtle, P. Kraft, C. Kleinschnitz, G. Stoll, and B. Nieswandt. 2013. Only severe thrombocytopenia results in bleeding and defective thrombus formation in mice. *Blood* 121:4938-4947.
- Moser, M., K.R. Legate, R. Zent, and R. Fassler. 2009. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 324:895-899.
- Moser, M., B. Nieswandt, S. Ussar, M. Pozgajova, and R. Fassler. 2008. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nature medicine* 14:325-330.
- Mucenski, M.L., K. McLain, A.B. Kier, S.H. Swerdlow, C.M. Schreiner, T.A. Miller, D.W. Pietryga, W.J. Scott, Jr., and S.S. Potter. 1991. A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 65:677-689.
- Mull, M.M., and W.E. Hathaway. 1970. Altered platelet function in newborns. *Pediatric research* 4:229-237.
- Munnix, I.C., K. Gilio, P.R. Siljander, N. Raynal, M.A. Feijge, T.M. Hackeng, H. Deckmyn, P.A. Smethurst, R.W. Farndale, and J.W. Heemskerk. 2008. Collagen-mimetic peptides mediate flow-dependent thrombus formation by high- or low-affinity binding of integrin alpha2beta1 and glycoprotein VI. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 6:2132-2142.
- Murphy, D.P., H.C. Lee, K.S. Payton, and R.J. Powers. 2016. Platelet count and associated morbidities in VLBW infants with pharmacologically treated patent ductus arteriosus. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 29:2045-2048.
- Murray, S.A., J.L. Morgan, C. Kane, Y. Sharma, C.S. Heffner, J. Lake, and L.R. Donahue. 2010. Mouse gestation length is genetically determined. *PloS one* 5:e12418.
- Murugappa, S., and S.P. Kunapuli. 2006. The role of ADP receptors in platelet function. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 11:1977-1986.

- Naidech, A.M., B.R. Bendok, R.K. Garg, R.A. Bernstein, M.J. Alberts, T.P. Bleck, and H.H. Batjer. 2009. Reduced platelet activity is associated with more intraventricular hemorrhage. *Neurosurgery* 65:684-688; discussion 688.
- Nakanishi-Matsui, M., Y.W. Zheng, D.J. Sulciner, E.J. Weiss, M.J. Ludeman, and S.R. Coughlin. 2000. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 404:609-613.
- Neerhof, M.G., and L.G. Thaete. 2008. The fetal response to chronic placental insufficiency. *Seminars in perinatology* 32:201-205.
- Nicolini, U., D. Guarneri, G.A. Gianotti, C. Campagnoli, P.G. Crosignani, and L. Gatti. 1994. Maternal and fetal platelet activation in normal pregnancy. *Obstetrics and gynecology* 83:65-69.
- Nieswandt, B., C. Brakebusch, W. Bergmeier, V. Schulte, D. Bouvard, R. Mokhtari-Nejad, T. Lindhout, J.W. Heemskerk, H. Zirngibl, and R. Fassler. 2001. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *The EMBO journal* 20:2120-2130.
- Nieswandt, B., M. Moser, I. Pleines, D. Varga-Szabo, S. Monkley, D. Critchley, and R. Fassler. 2007. Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine* 204:3113-3118.
- Nieswandt, B., I. Pleines, and M. Bender. 2011. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 9 Suppl 1:92-104.
- Nieswandt, B., D. Varga-Szabo, and M. Elvers. 2009. Integrins in platelet activation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 Suppl 1:206-209.
- Nieswandt, B., and S.P. Watson. 2003. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 102:449-461.
- Nissinen, L., J. Koivunen, J. Kapyla, M. Salmela, J. Nieminen, J. Jokinen, K. Sipila, M. Pihlavisto, O.T. Pentikainen, A. Marjamaki, and J. Heino. 2012. Novel alpha2beta1 integrin inhibitors reveal that integrin binding to collagen under shear stress conditions does not require receptor preactivation. *The Journal of biological chemistry* 287:44694-44702.
- Nurden, A.T., X. Pillois, and D.A. Wilcox. 2013. Glanzmann thrombasthenia: state of the art and future directions. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 39:642-655.
- Nussbaum, C., A. Gloning, M. Pruenster, D. Frommhold, S. Bierschenk, O. Genzel-Boroviczeny, U.H. von Andrian, E. Quackenbush, and M. Sperandio. 2013. Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny. *Journal of leukocyte biology* 93:175-184.
- Nuyttens, B.P., T. Thijs, H. Deckmyn, and K. Broos. 2011. Platelet adhesion to collagen. *Thrombosis research* 127 Suppl 2:S26-29.
- Obert, B., A. Houllier, D. Meyer, and J.P. Girma. 1999. Conformational changes in the A3 domain of von Willebrand factor modulate the interaction of the A1 domain with platelet glycoprotein Ib. *Blood* 93:1959-1968.
- Ohneda, O., C. Fennie, Z. Zheng, C. Donahue, H. La, R. Villacorta, B. Cairns, and L.A. Lasky. 1998. Hematopoietic stem cell maintenance and differentiation are supported by embryonic aorta-gonad-mesonephros region-derived endothelium. *Blood* 92:908-919.
- Olson, T.A., R.F. Levine, E.M. Mazur, D.G. Wright, and A.J. Salvado. 1992. Megakaryocytes and megakaryocyte progenitors in human cord blood. *The American journal of pediatric hematology/oncology* 14:241-247.
- Oury, C., E. Toth-Zsomboki, J. Vermynen, and M.F. Hoylaerts. 2006. The platelet ATP and ADP receptors. *Current pharmaceutical design* 12:859-875.

- Palabrica, T., R. Lobb, B.C. Furie, M. Aronovitz, C. Benjamin, Y.M. Hsu, S.A. Sajer, und B. Furie. 1992. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 359:848-851.
- Park, Y., N. Schoene, und W. Harris. 2002. Mean platelet volume as an indicator of platelet activation: methodological issues. *Platelets* 13:301-306.
- Patrick, C.H., J. Lazarchick, T. Stubbs, und W.B. Pittard. 1987. Mean platelet volume and platelet distribution width in the neonate. *The American journal of pediatric hematology/oncology* 9:130-132.
- Pearce, W.J., und O. Khorram. 2013. Maturation and differentiation of the fetal vasculature. *Clinical obstetrics and gynecology* 56:537-548.
- Peters, C.G., A.D. Michelson, und R. Flaumenhaft. 2012. Granule exocytosis is required for platelet spreading: differential sorting of alpha-granules expressing VAMP-7. *Blood* 120:199-206.
- Petrich, B.G., P. Marchese, Z.M. Ruggeri, S. Spiess, R.A. Weichert, F. Ye, R. Tiedt, R.C. Skoda, S.J. Monkley, D.R. Critchley, und M.H. Ginsberg. 2007. Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis. *The Journal of experimental medicine* 204:3103-3111.
- Pinacho, A., J.A. Paramo, M. Ezcurdia, und E. Rocha. 1995. Evaluation of the fibrinolytic system in full-term neonates. *International journal of clinical & laboratory research* 25:149-152.
- Piotrowski, A., I. Dabrowska-Wojciak, M. Mikinka, W. Fendler, W. Walas, W. Sobala, und K.M. Kuczkowski. 2010. Coagulation abnormalities and severe intraventricular hemorrhage in extremely low birth weight infants. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 23:601-606.
- Pircher, J., F. Fochler, T. Czermak, H. Mannell, B.F. Kraemer, M. Wornle, A. Sparatore, P. Del Soldato, U. Pohl, und F. Krotz. 2012. Hydrogen sulfide-releasing aspirin derivative ACS14 exerts strong antithrombotic effects in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32:2884-2891.
- Potts, K.S., T.J. Sargeant, C.A. Dawson, E.C. Josefsson, D.J. Hilton, W.S. Alexander, und S. Taoudi. 2015. Mouse prenatal platelet-forming lineages share a core transcriptional program but divergent dependence on MPL. *Blood* 126:807-816.
- Potts, K.S., T.J. Sargeant, J.F. Markham, W. Shi, C. Biben, E.C. Josefsson, L.W. Whitehead, K.L. Rogers, A. Liakhovitskaia, G.K. Smyth, B.T. Kile, A. Medvinsky, W.S. Alexander, D.J. Hilton, und S. Taoudi. 2014. A lineage of diploid platelet-forming cells precedes polyploid megakaryocyte formation in the mouse embryo. *Blood* 124:2725-2729.
- Ramakrishnan, V., F. DeGuzman, M. Bao, S.W. Hall, L.L. Leung, und D.R. Phillips. 2001. A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein V. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:1823-1828.
- Reed, G.L. 2004. Platelet secretory mechanisms. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 30:441-450.
- Revel-Vilk, S. 2012. The conundrum of neonatal coagulopathy. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2012:450-454.
- Ribatti, D., und E. Crivellato. 2007. Giulio Bizzozero and the discovery of platelets. *Leukemia research* 31:1339-1341.
- Rivera, J., M.L. Lozano, L. Navarro-Nunez, und V. Vicente. 2009. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* 94:700-711.

- Robinson, S.D., P.S. Frenette, H. Rayburn, M. Cumiskey, M. Ullman-Cullere, D.D. Wagner, und R.O. Hynes. 1999. Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:11452-11457.
- Roschitz, B., K. Sudi, M. Kostenberger, und W. Muntean. 2001. Shorter PFA-100 closure times in neonates than in adults: role of red cells, white cells, platelets and von Willebrand factor. *Acta paediatrica* 90:664-670.
- Sandmann, R., und S. Koster. 2016. Topographic Cues Reveal Two Distinct Spreading Mechanisms in Blood Platelets. *Scientific reports* 6:22357.
- Saxonhouse, M.A., und M.C. Sola. 2004. Platelet function in term and preterm neonates. *Clinics in perinatology* 31:15-28.
- Schlagenhauf, A., H. Haidl, B. Leschnik, H.J. Leis, A. Heinemann, und W. Muntean. 2015. Prostaglandin E2 levels and platelet function are different in cord blood compared to adults. *Thrombosis and haemostasis* 113:97-106.
- Schlagenhauf, A., S. Schweintzger, R. Birner-Gruenberger, B. Leschnik, und W. Muntean. 2010a. Newborn platelets: lower levels of protease-activated receptors cause hypoaggregability to thrombin. *Platelets* 21:641-647.
- Schlagenhauf, A., S. Schweintzger, R. Birner-Gruenberger, B. Leschnik, und W. Muntean. 2010b. Comparative evaluation of PAR1, GPIb-IX-V, and integrin alphaIIb beta3 levels in cord and adult platelets. *Hamostaseologie* 30 Suppl 1:S164-167.
- Schmitt, A., J. Guichard, J.M. Masse, N. Debili, und E.M. Cramer. 2001. Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Experimental hematology* 29:1295-1302.
- Schmugge, M., M.S. Dunn, K.S. Amankwah, V.S. Blanchette, J. Freedman, und M.L. Rand. 2004. The activity of the von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS-13 in newborn infants. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2:228-233.
- Schneider, D.J. 2011. Anti-platelet therapy: glycoprotein IIb/IIIa antagonists. *British journal of clinical pharmacology* 72:672-682.
- Senis, Y.A., A. Mazharian, und J. Mori. 2014. Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood* 124:2013-2024.
- Shattil, S.J., H. Kashiwagi, und N. Pampori. 1998. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 91:2645-2657.
- Shattil, S.J., C. Kim, und M.H. Ginsberg. 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11:288-300.
- Shattil, S.J., und P.J. Newman. 2004. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 104:1606-1615.
- Shenkman, B., N. Linder, N. Savion, I. Tamarin, R. Dardik, G. Kennet, B. German, und D. Varon. 1999. Increased neonatal platelet deposition on subendothelium under flow conditions: the role of plasma von Willebrand factor. *Pediatric research* 45:270-275.
- Sheu, J.R., G. Hsiao, W.Y. Lin, T.F. Chen, Y.Y. Chien, C.H. Lin, und C.R. Tzeng. 2002a. Mechanisms involved in agonist-induced hyperaggregability of platelets from normal pregnancy. *Journal of biomedical science* 9:17-25.
- Sheu, J.R., G. Hsiao, M.Y. Shen, W.Y. Lin, und C.R. Tzeng. 2002b. The hyperaggregability of platelets from normal pregnancy is mediated through thromboxane A2 and cyclic AMP pathways. *Clinical and laboratory haematology* 24:121-129.
- Silbernagel, S. 2007. Taschenatlas Physiologie. Thieme Verlag, Stuttgart. 441 pp.

- Silver, L.M. 1995. Mouse genetics : concepts and applications. Oxford University Press, New York. xiii, 362 p. pp.
- Sitaru, A.G., S. Holzhauer, C.P. Speer, D. Singer, A. Obergfell, U. Walter, und R. Grossmann. 2005. Neonatal platelets from cord blood and peripheral blood. *Platelets* 16:203-210.
- Soh, U.J., M.R. Dores, B. Chen, und J. Trejo. 2010. Signal transduction by protease-activated receptors. *British journal of pharmacology* 160:191-203.
- Sola-Visner, M. 2012. Platelets in the neonatal period: developmental differences in platelet production, function, and hemostasis and the potential impact of therapies. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2012:506-511.
- Soulet, C., B. Hechler, M.P. Gratacap, M. Plantavid, S. Offermanns, C. Gachet, und B. Payrastre. 2005. A differential role of the platelet ADP receptors P2Y1 and P2Y12 in Rac activation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 3:2296-2306.
- Sperandio, M., E.J. Quackenbush, N. Sushkova, J. Altstatter, C. Nussbaum, S. Schmid, M. Pruenster, A. Kurz, A. Margraf, A. Steppner, N. Schweiger, L. Borsig, I. Boros, N. Krajewski, O. Genzel-Boroviczeny, U. Jeschke, D. Frommhold, und U.H. von Andrian. 2013. Ontogenetic regulation of leukocyte recruitment in mouse yolk sac vessels. *Blood* 121:e118-128.
- Sreeramkumar, V., J.M. Adrover, I. Ballesteros, M.I. Cuartero, J. Rossaint, I. Bilbao, M. Nacher, C. Pitaval, I. Radovanovic, Y. Fukui, R.P. McEver, M.D. Filippi, I. Lizasoain, J. Ruiz-Cabello, A. Zarbock, M.A. Moro, und A. Hidalgo. 2014. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 346:1234-1238.
- Stefanini, L., Y. Boulaftali, T.D. Ouellette, M. Holinstat, L. Desire, B. Leblond, P. Andre, P.B. Conley, und W. Bergmeier. 2012. Rap1-Rac1 circuits potentiate platelet activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32:434-441.
- Stefanini, L., F. Ye, A.K. Snider, K. Sarabakhsh, R. Piatt, D.S. Paul, W. Bergmeier, und B.G. Petrich. 2014. A talin mutant that impairs talin-integrin binding in platelets decelerates alphaIIb beta3 activation without pathological bleeding. *Blood* 123:2722-2731.
- Strauss, T., Y. Levy-Shraga, B. Ravid, I. Schushan-Eisen, A. Maayan-Metzger, J. Kuint, und G. Kenet. 2010. Clot formation of neonates tested by thromboelastography correlates with gestational age. *Thrombosis and haemostasis* 103:344-350.
- Stritt, S., K. Wolf, V. Lorenz, T. Vogtle, S. Gupta, M.R. Bosl, und B. Nieswandt. 2015. Rap1-GTP-interacting adaptor molecule (RIAM) is dispensable for platelet integrin activation and function in mice. *Blood* 125:219-222.
- Thon, J.N., und J.E. Italiano. 2010. Platelet formation. *Seminars in hematology* 47:220-226.
- Thon, J.N., L. Mazutis, S. Wu, J.L. Sylman, A. Ehrlicher, K.R. Machlus, Q. Feng, S. Lu, R. Lanza, K.B. Neeves, D.A. Weitz, und J.E. Italiano, Jr. 2014. Platelet bioreactor-on-a-chip. *Blood* 124:1857-1867.
- Tober, J., A. Koniski, K.E. McGrath, R. Vemishetti, R. Emerson, K.K. de Mesy-Bentley, R. Waugh, und J. Palis. 2007. The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood* 109:1433-1441.
- Tober, J., K.E. McGrath, und J. Palis. 2008. Primitive erythropoiesis and megakaryopoiesis in the yolk sac are independent of c-myb. *Blood* 111:2636-2639.
- Ts'ao, C.H., D. Green, und K. Schultz. 1976. Function and ultrastructure of platelets of neonates: enhanced ristocetin aggregation of neonatal platelets. *British journal of haematology* 32:225-233.

- Ussar, S., H.V. Wang, S. Linder, R. Fassler, und M. Moser. 2006. The Kindlins: subcellular localization and expression during murine development. *Experimental cell research* 312:3142-3151.
- von Bruhl, M.L., K. Stark, A. Steinhart, S. Chandraratne, I. Konrad, M. Lorenz, A. Khandoga, A. Tirniceriu, R. Coletti, M. Kollnberger, R.A. Byrne, I. Laitinen, A. Walch, A. Brill, S. Pfeiler, D. Manukyan, S. Braun, P. Lange, J. Riegger, J. Ware, A. Eckart, S. Haidari, M. Rudelius, C. Schulz, K. Echtler, V. Brinkmann, M. Schwaiger, K.T. Preissner, D.D. Wagner, N. Mackman, B. Engelmann, und S. Massberg. 2012. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of experimental medicine* 209:819-835.
- von Lindern, J.S., T. van den Bruele, E. Lopriore, und F.J. Walther. 2011. Thrombocytopenia in neonates and the risk of intraventricular hemorrhage: a retrospective cohort study. *BMC pediatrics* 11:16.
- Wagner, D.D., und P.C. Burger. 2003. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23:2131-2137.
- Wandall, H.H., V. Rumjantseva, A.L. Sorensen, S. Patel-Hett, E.C. Josefsson, E.P. Bennett, J.E. Italiano, Jr., H. Clausen, J.H. Hartwig, und K.M. Hoffmeister. 2012. The origin and function of platelet glycosyltransferases. *Blood* 120:626-635.
- Wang, Z., S.P. Holly, M.K. Larson, J. Liu, W. Yuan, M. Chrzanowska-Wodnicka, G.C. White, 2nd, und L.V. Parise. 2009. Rap1b is critical for glycoprotein VI-mediated but not ADP receptor-mediated alpha2beta1 activation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7:693-700.
- Wasiluk, A., M. Mantur, M. Szczepanski, H. Kemon, E. Baran, und I. Kemon-Chetnik. 2008. The effect of gestational age on platelet surface expression of CD62P in preterm newborns. *Platelets* 19:236-238.
- Watson, S.P. 2009. Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis. *Current pharmaceutical design* 15:1358-1372.
- Weinstein, M.J., R. Blanchard, J.L. Moake, E. Vosburgh, und K. Moise. 1989. Fetal and neonatal von Willebrand factor (vWF) is unusually large and similar to the vWF in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *British journal of haematology* 72:68-72.
- Wiedmeier, S.E., E. Henry, M.C. Sola-Visner, und R.D. Christensen. 2009. Platelet reference ranges for neonates, defined using data from over 47,000 patients in a multihospital healthcare system. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 29:130-136.
- Wolberg, A.S., und R.A. Campbell. 2008. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 38:15-23.
- Wong, C.H., C.N. Jenne, B. Petri, N.L. Chrobok, und P. Kubes. 2013. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nature immunology* 14:785-792.
- Yeaman, M.R., A.S. Bayer, S.P. Koo, W. Foss, und P.M. Sullam. 1998. Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. *The Journal of clinical investigation* 101:178-187.
- Zuchtriegel, G., B. Uhl, D. Pühr-Westerheide, M. Pornbacher, K. Lauber, F. Krombach, und C.A. Reichel. 2016. Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation. *PLoS biology* 14:e1002459.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wichtige thrombozytäre Oberflächenmarker und Rezeptoren.....	12
Abbildung 2: Thrombusbildung.....	16
Abbildung 3: Exemplarisches Spreading von isolierten Thrombozyten eines E13.5 Mausfeten.....	16
Abbildung 4: Nachweis GpIb positiver Megakaryozyten und GpV-positiver Thrombozyten in der fetalen Entwicklung der Maus.....	18
Abbildung 5: Ablauf der terminierten Verpaarung.....	32
Abbildung 6: Exemplarische Mikroinjektionskapillare.....	33
Abbildung 7: Experimenteller Ablauf zur <i>in-vivo</i> Thrombusinduktion in fetalen Dottersackgefäßen.....	33
Abbildung 8: Die trächtige Muttermaus wird auf einer Heizplatte positioniert.....	34
Abbildung 9: Seitlicher Zugang zur Bauchhöhle.....	34
Abbildung 10: Der Uterusschlauch wird vorsichtig aus der Abdominalhöhle herausmobilisiert und präpariert.....	35
Abbildung 11: Präparation und Lagerung des Feten.....	35
Abbildung 12: Exemplarische Injektion von FITC-Dextran in ein Dottersackgefäß.....	36
Abbildung 13: Lagerung des präparierten Feten.....	36
Abbildung 14: Blutentnahme aus Feten.....	38
Abbildung 15: Exemplarischer Blutausschrieb eines E16.5 Feten.....	40
Abbildung 16: Exemplarische FACS-Gating Strategie.....	41
Abbildung 17: E15.5 Fetus in Dottersack.....	44
Abbildung 18: E15.5 Fetus innerhalb des Dottersackes nach Injektion von FITC-Dextran in Dottersackgefäße.....	45
Abbildung 19: Unterschiedliche Verteilungsmuster von Farbstoffen im Feten.....	46
Abbildung 20: Fluoreszenzintensität (angegeben in Arbitrary Units).....	47
Abbildung 21: Thrombozytenadhäsion, „Onset“.....	48
Abbildung 22: Erste Thrombusbildung, „First occlusion“.....	49
Abbildung 23: Erneutes Durchbrechen des Blutflusses nach primärer Thrombusbildung, „Reflow“..	50
Abbildung 24: Ausbildung eines stabilen gefäßverschließenden Thrombus ohne erneutes Auftreten eines Reflows, „Final Occlusion“.....	51
Abbildung 25: Thrombozytenzahlen während der fetalen Entwicklung.....	52
Abbildung 26: Basale Expression von thrombozytären Oberflächenmolekülen.....	53
Abbildung 27: Analyse der Aktivierbarkeit fetaler Thrombozyten unterschiedlicher Altersstufen im Vergleich zu adulten Kontrollen.....	54
Abbildung 28: Thrombozytenparameter in der fetalen Entwicklung.....	55
Abbildung 29: P-Selectin Gehalt fetaler Thrombozyten.....	56
Abbildung 30: Protease-activated-receptor (PAR) 3 und 4 Level.....	56
Abbildung 31: Expression intrazellulärer Signaltransduktionsmoleküle.....	57
Abbildung 32: Transfusion fluoreszenzmarkierter adulter Thrombozyten in einen E14.5 Fetus.....	58
Abbildung 33: Embolisation nachfolgend Transfusion adulter Thrombozyten in einen E14.5 Fetus..	58
Abbildung 34: MPLSM-Aufnahme der ausbleibenden Interaktion fetaler Leukozyten mit adulten transfundierten Thrombozyten.....	59

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte. ....	23
Tabelle 2: Mikroskope und Zubehör. ....	25
Tabelle 3: Chemikalien und Substanzen. ....	26
Tabelle 4: Puffer. ....	28
Tabelle 5: Fluoreszenzfarbstoffe. ....	28
Tabelle 6: Primäre Antikörper. ....	29
Tabelle 7: Sekundäre Antikörper. ....	30
Tabelle 8: Verbrauchsmittel. ....	30
Tabelle 9: Narkosemittel. ....	30
Tabelle 10: Software. ....	31
Tabelle 11: Darstellung von Anfärbemethoden im fetalen Modell. ....	43
Tabelle 12: Mikrovaskuläre Parameter der intravitalmikroskopischen Experimente. ....	51
Tabelle 13: Befunde von Knockouttieren vor dem Hintergrund der Integrinfunktion. ....	69

## 10. Danksagung

Ich möchte mich bei allen herzlichst bedanken, die mich während meines Medizinstudiums und der Dissertation unterstützt haben.

Zunächst mein ausdrücklicher Dank an Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl für die Möglichkeit meine Experimente am Walter-Brendel-Zentrum durchführen zu können und seine uneingeschränkte Unterstützung für meinen beruflichen Werdegang.

Mein größter Dank gilt auch in erster Linie meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Markus Sperandio, der mich von Anfang an für die Wissenschaft und dieses spannende Thema zu begeistern wusste und der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Seine Geduld mich das wissenschaftliche Denken zu lehren, seine Motivation und auch sein Ehrgeiz mich in meinem Tun zu fördern, machten die Arbeit zu einer äußerst positiv-prägenden Erfahrung. Auch für die Ratschläge, Unterstützung und Förderung außerhalb der Dissertation und die anhaltende Kooperation möchte ich mich auf das herzlichste bedanken und werde die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit in sehr guter Erinnerung behalten.

Weiterhin gilt mein Dank Frau PD Dr. med. Claudia Nussbaum, die mich sehr gut angeleitet und durch die Dissertation hinweg als Betreuerin begleitet hat. Ihre zielstrebige und gut organisierte Art diente mir als Vorbild und hat mir den Umgang mit den Daten erleichtert. Ihre klaren Gedankengänge und ihr strukturierter Umgang mit wissenschaftlichen Hypothesen halfen mir insbesondere in schwierigen Phasen des Projektes weiterzukommen und auch abseits davon war sie immer als Ansprechpartnerin verfügbar, wofür ich ihr sehr dankbar bin.

Ich möchte mich bei meiner Arbeitsgruppe und den Kooperationspartnern bedanken, insbesondere Frau Dr. Sarah Klapproth, Frau Dr. Ina Rohwedder, Frau Dr. Monika Prünster und Frau Dr. Angela Kurz für das Anlernen von neuen Techniken und die Unterstützung bei Experimenten. Weiterhin gilt mein Dank Frau Susanne Bierschenk, sowie Frau Nadine Schmidt die mich bei technischen Fragen und insbesondere der Tierhaltung unterstützten. Ebenso gilt mein Dank auch Frau Dr. Kristina Heinig, Herrn Dr. Johannes Altstätter und Frau Tanja Eggersmann, die mich mit der terminierten Verpaarung unterstützt haben. Auch möchte ich den anderen Doktoranden des Institutes, vor allem Herrn Roland Immler und Herrn Johannes Wiesner, für vortreffliche Gespräche und den wissenschaftlichen Austausch danken. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn PD Dr. rer. nat. Steffen Dietzel für die kompetente Beratung bei mikroskopischen Fragen und die Hilfe bei den Multiphotonenexperimenten.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Mitarbeiter/innen des Walter-Brendel-Zentrums, die mich im täglichen Umgang unterstützten, insbesondere Herrn Müller für die Fahrdienste, Herrn Adams für Druckerarbeiten, sowie Herrn Singer für handwerkliche Problemstellungen. Herrn Dr. Peters danke ich für die kompetente Beratung bei allen statistischen Fragen. Die einzigartige Atmosphäre am Walter-Brendel-Zentrum ist geprägt durch das Miteinander und den guten Umgang aller seiner „Bewohner“.

Auch gilt mein Dank Herrn Dr. med. Joachim Pircher mit dem es sich bestens über Thrombozytenfragen austauschen lies, man jederzeit weitere Projekte in die Wege leiten konnte und mit dem auch außerhalb des Labors immer ein sehr kameradschaftlicher Umgang gegeben war.

Dem IRTG-Programm des SFB914 und dem SFB914 selbst möchte ich danken für die unentwegte ideelle und auch finanzielle Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn, den wissenschaftlichen Austausch, sowie das Lehren von wissenschaftlichen Grundlagen im Graduiertenprogramm. Insbesondere möchte ich mich auch bei Frau Dr. Verena Kochan für die unentwegte organisatorische Unterstützung bedanken, sowie ebenfalls bei Herrn Dr. Tobias Kemme und Frau Prof. Dr. Walzog.

Der medizinischen Fakultät der LMU München danke ich für die finanzielle Unterstützung, ebenso auch dem FöFoLe-Graduierten-Programm für die finanzielle und curriculare Förderung, sowie die fundierte wissenschaftliche Ausbildung. Auch möchte ich dem Förderprogramm Lehre@LMU, dem Internationalen Forschungsstipendium der LMU, sowie der Munich-Harvard-Alliance für die finanzielle und ideelle Unterstützung auf meinem Weg danken.

Danken möchte ich zudem ganz besonders meiner Familie, die mich in allen Lebenslagen unterstützt hat, mir immer Halt gab und gibt und ohne die ich meine Ziele nicht erreicht hätte. Danke meinen Eltern Reinhilde und Peter Margraf, für die Hilfe, die guten Worte in schwierigen Zeiten und die Anerkennung in Guten. Meinem Bruder Tobias und meinen Schwestern Katharina und Christina danke ich für die Aufmunterung, Unterstützung, Ablenkung neben der Arbeit und die vielen Telefonate. Meiner weiteren Verwandtschaft danke ich für das stetige Interesse und den Rückhalt. Meinen verstorbenen Großeltern danke ich ebenfalls für das Interesse an meiner Ausbildung und ihre immerwährende liebevolle Unterstützung in jungen Jahren.

Nicht zuletzt möchte ich Dr. med. Simone Mrotzek für ihre Unterstützung und Hilfe danken. Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Freunden in Heimat und Ferne, für die Ablenkung und den Zusammenhalt, insbesondere auch Herrn Konstantin Mende, der mir im und außerhalb des Studiums und auch der gemeinsamen Laborzeit kameradschaftlich allzeit zur Seite stand.

## 11. Vorträge und Publikationen

### Kongress- und Seminarvorträge

- „In-vivo observation of thrombus formation and platelet function during development – impact of prematurity on primary hemostasis“; 57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thrombose und Hämostasieforschung, München; Februar 2013
- „Platelets in fetal hemostasis“; IRTG Retreat des SFB 914, Venedig, Italien; Oktober 2012
- „Thrombozytenfunktion und Blutgerinnung im fetalen Modell“; FöFoLe-Abschlussseminar, Herrsching am Ammersee, Mai 2012
- „From young to even younger – a new model for thrombus induction and platelet examination in murine yolk sac vessels“; 91. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Dresden, März 2012
- “Developmental differences in the murine fetus – looking at the role of platelets in hemostasis”; Doctoral students day des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin, München; März 2012
- “When do platelets learn to clot? A new model for studying in vivo thrombus formation in murine fetuses”; Kolloquium für experimentelle Pathophysiologie, Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München; November 2011
- „Das fetale Modell – in-vivo Mikroskopie, Mikroinjektion und Präparationstechniken eines neuen Tiermodells; FöFoLe-Methoden-Seminar, Ludwig-Maximilians-Universität, München; 2011

### Postervorträge

- “To clot or not to clot – insights into the developmental regulation of platelet function using a novel intravital microscopy model”. Joint Symposium des SFB688 & des Comprehensive Heart Failure Center, Würzburg; Oktober 2017 (*Posterpreis*)
- “In vivo analysis of platelet function during murine fetal development reveals maturation dependent primary hemostasis.” Gordon Research Conference “Cell Biology of Megakaryocytes & Platelets, Barga, Lucca, Italien; März 2017
- “Platelet function and non-function in murine fetuses”; Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mikrozirkulation und vaskuläre Biologie und der Schweizer Gesellschaft für Mikrozirkulation und vaskuläre Biologie, Dresden; September 2013 (*Posterpreis*)
- “When platelets start to function – insight into primary hemostasis in developing murine fetuses using a new in-vivo microscopy model”; International Union of the Physiological Societies, Birmingham, United Kingdom; Juli 2013 (*Travel Award*)
- „Thrombus formation in murine fetuses – Developmental aspects of platelet function“; Joint Meeting GfMvB, DEBS and MiVaB, Mannheim; September 2012
- „Platelets go to school – Thrombus formation and platelet function throughout fetal development“; Cardiac Regeneration and Vascular Biology Conference 2012 der

Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Venice-International-University, Venedig, Italien; Mai 2012

- “Fetal platelet function – In-vivo Observation an murinen Feten”; DoktaMed Doktorandenforum, Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern; Mai 2012

Weitere Abstracts:

- Ontogeny of polymorphonuclear neutrophil recruitment in the human fetus and neonate. Nussbaum C., Gloning A., Pruenster M., **Margraf A.**, Genzel-Boroviczeny O., Sperandio M.; Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Immunologie, Mai 2011, Ittingen, Schweiz
- Vestibular syndromes in emergency medicine: a retrospective analysis. Ciupe A., **Margraf A.**, Zwergal A., Brandt Th., Jahn K.; Abstract für das Meeting 2012 der Bárány Society.

Publikationen:

- Maturation of platelet function during murine fetal development in vivo; **Margraf A.**, Nussbaum C., Rohwedder I., Klapproth S., Kurz A.R.M., Florian A., Wiebking V., Pircher J., Pruenster M., Immler R., Dietzel S., Kremer L., Kiefer F., Moser M., Flemmer A.W., Quackenbush E., von Andrian U.H., Sperandio M.; Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017 Jun;37(6):1076-1086
- MST1-dependent vesicle trafficking regulates neutrophil transmigration through the vascular basement membrane; Kurz A.R.M., Pruenster M., Rohwedder I., Ramadass M., Schäfer K., Harrison U., Gouveia G., Nussbaum C., Immler R., Wiessner J.R., **Margraf A.**, Lim D.S., Walzog B., Dietzel S., Moser M., Klein C., Vestweber D., Haas R., Catz S.D., Sperandio M.; J Clin Invest. 2016 Nov 1;126(11):4125-4139.
- Ontogenetic regulation of leukocyte recruitment in the mouse yolk sac vessels; Sperandio M., Quackenbush E., Sushkova N., Altstätter J., Nussbaum C., Schmid S., Prünster M., Kurz A., **Margraf A.**, Steppner N., Schweiger N., Borsig L., Boros I., Krajewski N., Genzel-Boroviczeny O., Jeschke U., Frommhold D., von Andrian U.; Blood. 2013 May 23; 121(21):e118-28

## 12. Eidesstattliche Versicherung

Margraf, Andreas

Name, Vorname

---

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Untersuchung der ontogenetischen Regulation der Thrombozytenfunktion im Mausfetus *in-vivo* und *in-vitro***

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

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

München, 05.10.2018

Ort, Datum

Andreas Margraf

Unterschrift Doktorandin/Doktorand