

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg



Die Antikörper- Thrombozyteninteraktion als zentraler Mechanismus in der Entstehung der venösen Thrombose

Dissertation

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

vorgelegt von

Sven Maximilian Stockhausen

aus

Freiburg im Breisgau

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Steffen Massberg
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Matthias Bauer Prof. Dr. Michael von Bergwelt PD. Dr. Christoph Bidlingmaier
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Konstantin Stark
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL
Tag der mündlichen Prüfung:	04.07.2019

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Literaturübersicht	
1. Die Entstehung venöser Thrombosen	3
2. Epidemiologie und klinische Relevanz	3
3. Risikofaktoren der venösen Thrombose	5
4. Aufbau venöser Thromben	6
5. Pathophysiologie der venösen Thrombose	
5.1. Blutgerinnung.....	7
5.1.1. Extrinsische Gerinnungskaskade.....	8
5.1.2. Intrinsische Gerinnungskaskade.....	9
5.1.3. Gemeinsame Endstrecke.....	10
5.2. Thrombozyten.....	10
5.3. Inflammation in der venösen Thrombose.....	12
6. Antikörper in der venösen Thrombose	
6.1. Aufbau von Antikörpern.....	13
6.2. Entstehungs- und Reifungsprozess.....	14
6.3. Die Antigenbindung.....	15
6.4. Das Fc-Fragment.....	16
6.5. Fc-Rezeptoren.....	17
6.6. Ursprung der Antikörper.....	18
6.7. Natürliche Antikörper.....	18
6.8. Interaktionen von Antikörpern mit Thrombozyten.....	20
6.9. Die Aktivierung des Komplementsystems.....	22
6.9.1. Die klassische Komplementkaskade.....	23
6.9.2. Der Lektinweg.....	23
6.9.3. Die alternative Komplementkaskade.....	23
6.9.4. Der Membranangriffskomplex und dessen Spaltprodukte.....	24
6.10. Einfluss von Komplementaktivierung auf die Thrombozytenfunktion.....	24
6.11. Thrombozytenvermittelte Komplementaktivierung.....	25

III. Zielsetzung

1. Identifikation potentieller Bindungspartner von Antikörpern in der Entstehung der venösen Thrombose28
2. Analyse der Interaktionsmechanismen zwischen Antikörpern und Thrombozyten *in vitro*29
3. Konsequenzen der Antikörper-Thrombozyteninteraktion für die Entstehung der venösen Thrombose29
4. Identifikation des thrombozytenstimulierenden Reizes nach Antikörperbindung30

IV. Methoden

1. Versuchstiere

- 1.1. Wildtypstamm C57Bl/6J Mäuse31
- 1.2. Wildtypstamm Balb/c31
- 1.3. Genetisch veränderte Mauslinien32
 - 1.3.1. sIgM-Knockout Mauslinie32
 - 1.3.2. AID-Knockout Mauslinie32
 - 1.3.3. sIgM-AID-Knockout Mauslinie32
 - 1.3.4. KL25 Mauslinie33
 - 1.3.5. Toso-Knockout Mauslinie33
 - 1.3.6. C μ 13 Mauslinie34
 - 1.3.7. Albumin-Knockout Mauslinie34
 - 1.3.8. PF4Cre/ROSA-YFP Mauslinie35
 - 1.3.9. C1q-Knockout Mauslinie35
 - 1.3.10. C4-Knockout Mauslinie36
 - 1.3.11. C3-Knockout Mauslinie36
 - 1.3.12. C5-Knockout Mauslinie36
- 1.4. Haltung37
- 1.5. Einschlusskriterien für die Tierversuche37

2. Operationsverfahren

- 2.1. Narkose37
- 2.2. Stenosierung der Vena cava caudalis39
- 2.3. Sham-Operation41

2.4.	Entnahme der Vena cava caudalis	41
2.5.	Intrakardiale Blutentnahme.....	42
3.	Gewinnung von humanem Vollblut.....	42
4.	Isolierung der Thrombozyten.....	43
5.	Gewinnung humaner Thromben	44
6.	Immunohistologie	
6.1.	Anfertigung histologischer Cryoschnitte	44
6.2.	Anfertigung histologischer Paraffinschnitte	45
6.3.	Der immunhistologische Färbevorgang bei Gefrierschnitten.....	45
6.3.1.	IgG/IgM-CD31-Färbung an murinen Präparaten	45
6.3.2.	IgG/IgM-CD41-Fibrinogen-Färbung.....	46
6.3.3.	C1q/C4-CD42b-Färbung	46
6.3.4.	IgG-MPO-Färbung.....	47
6.3.5.	Ly6G-MPO-Färbung	47
6.3.6.	F4/80-Färbung.....	48
6.4.	Immunhistologischer Färbevorgang bei paraffinfixierten Präparaten	48
6.4.1.	IgG-CD42b-Färbung an humanen Präparaten.....	48
6.4.2.	IgM-CD42b-Färbung an humanen Präparaten	49
6.5.	Kontrollen.....	49
6.6.	Mikroskopie	51
6.7.	Auswertungen der histologischen Färbungen	51
6.7.1.	Antikörper in Fibrinogen-CD41-IgG/IgM-Färbung.....	51
6.7.2.	Neutrophile Granulozyten in Ly6G-MPO-Färbung.....	52
6.7.3.	Monozyten in F4/80-Färbung.....	52
7.	ELISA	
7.1.	Untersuchung des Bindungsverhaltens von unspezifischen Antikörpern	53
7.2.	Messung der Antikörperkonzentration im Serum der Mäuse	53
8.	Konfokalbilder von isolierten Thrombozyten	54
9.	Aggregometrie	
9.1.	Ablauf und Durchführung	55
9.2.	Referenzen und Standardisierungen.....	56
9.3.	Interpretation der Ergebnisse	57

10. Analyse des Interaktionsverhaltens von Thrombozyten mit Antikörpern in der Durchflusszytometrie	57
11. Statistik.....	59
V. Ergebnisse	
1. Thrombogene Effekte von Antikörpern in der venösen Thrombose	60
2. Interaktion von Antikörpern mit Thrombozyten in der venösen Thrombose	
2.1. Antikörper kolokalisieren mit Thrombozyten während der Entstehung der venösen Thrombose	62
2.2. Thrombozyten-Antikörperinteraktion <i>in vitro</i>	73
2.3. Antikörperbindung in Abhängigkeit von der Aktivität der Thrombozyten.....	75
3. Funktionelle Aspekte der Antikörperbindung an Thrombozyten	79
4. Mechanismen der Antikörperbindung.....	87
5. Einfluss von Chondroitinsulfat auf die Funktion der Thrombozyten	100
6. Komplementsystem und die venöse Thrombose.....	101
7. Molekulare Mechanismen in der Interaktion von Antikörpern und Komplement mit Chondroitinsulfat und Fibrin	107
8. Einfluss auf die Zusammensetzung des Thrombus	110
9. Übertragbarkeit auf den Menschen.....	117
VI. Diskussion	
1. Aktivierung von Thrombozyten durch Interaktion mit Antikörpern	118
2. Chondroitinsulfat und Fibrin als Interaktionspartner der Antikörper auf Thrombozyten	121
3. Differentielle Wirkung verschiedener Antikörper-Klassen auf Thrombozyten	123

VII. Zusammenfassung	127
VIII. Summary	128
IX. Literaturverzeichnis	130
X. Abkürzungsverzeichnis	149
XI. Abbildungsverzeichnis	153
XII. Tabellenverzeichnis	156
XIII. Danksagung	157

I. Einleitung

Die venöse Thrombose gehört zu den häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen. Zusammen mit der Komplikation einer venösen Thrombembolie ist sie mit einer relevanten Mortalität und Morbidität verbunden [1]. Trotz der großflächigen Anwendung prophylaktischer Maßnahmen steigt die Inzidenz weiterhin an [2]. Besonders gefährdet für die Entstehung venöser Thrombosen sind Patienten nach langer Immobilisation, mit fortgeschrittenem Alter, mit prädisponierenden Gerinnungsstörungen und Malignomen.

Die Betroffenen klagen über Schwellung, ziehende Schmerzen und Überwärmung der jeweiligen Extremität. Diese sehr unspezifischen Beschwerden stehen in keiner Relation zu der Lebensgefahr, in der sich die Patienten in dem Moment befinden. In der EU werden pro Jahr etwa 543.454 Todesfälle der Folge einer Venenthrombose zugeschrieben [3]. Werden europaweit die vier medienwirksamsten Todesursachen zusammengezählt (AIDS (5.860/Jahr), Brustkrebs (86.831/Jahr), Prostatakarzinom (63.636/Jahr) und Verkehrsunfälle (53.599/Jahr)), so erhält man eine Zahl die nur der Hälfte entspricht [3]. Dies verdeutlicht die dringende Handlungsnotwendigkeit in diesem Gebiet.

Bisherige Therapieansätze konzentrierten sich hauptsächlich auf mechanische Kompression und auf die medikamentöse Hemmung der plasmatischen Gerinnung. Trotz kontinuierlicher Verbesserungen hat sich die Inzidenz venöser Thrombembolien seit 1980 nur wenig geändert [2, 4]. Es braucht somit dringend neue Therapieansätze, die effektiv die Entstehung dieser Krankheit verhindern können. So konnte gezeigt werden, dass der primär gerinnungsanstoßende Reiz von einer Entzündungsreaktion im Gefäßinneren ausgeht [5]. Die bisherige Thrombotherapie greift demnach relativ unspezifisch in eine Gerinnungskaskade ein, dessen Trigger nicht behandelt wird. Die mit der Antikoagulation verbundenen Blutungskomplikationen werden billigend in Kauf genommen.

Die Forschungsbemühungen der vergangenen Jahre enthüllten vor allem die zentrale Rolle des angeborenen Immunsystems (neutrophilen Granulozyten, Monozyten sowie dessen Interaktion mit Thrombozyten) in der Entstehung der venösen Thrombose [6]. Es gibt jedoch deutliche Hinweise, dass hier auch Antikörper, die Hauptakteure des adaptiven Immunsystems, von Bedeutung sind. Besonders apparent wird dies im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wie dem Antiphospholipid Syndrom [7, 8]. Die gefährlichsten und häufigsten Komplikationen des Antiphospholipid Syndrom sind arterielle und venöse Thrombosen. Dem zugrunde liegen erhöhte Antikörpertiter gerichtet gegen β 2GPI oder Cardiolipin, die teilweise Immunkomplexe bilden. Sie beeinflussen das Gerinnungssystem sowohl auf zellulärer Ebene (Aktivierung von Thrombozyten, Endothelzellen, Monozyten) als

auch auf der Ebene der Plasmaproteine (Inaktivierung des gerinnungshemmenden Antithrombin III und des aktivierten Plasmaprotein C; Aktivierung des Komplementsystems) [8, 9]. Auch die Fibrinolyse wird durch diese Antikörper gehemmt [8].

Über die Bedeutung von Antikörpern in der venösen Thrombose außerhalb von Autoimmunerkrankungen ist bisher noch wenig bekannt. Es gibt bereits sichere Hinweise, dass Patienten mit Monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) ein erhöhtes Risiko für thrombotische Ereignisse haben [10-13]. Im Gegensatz zu Autoimmunerkrankungen sind die hier produzierten Antikörper nicht gegen ein im Körper vorhandenes Antigen gerichtet. Zunehmend an Bedeutung gewinnt auch die therapeutische Anwendung von Immunglobulinen beispielsweise zur Immunsuppression oder Tumorbehandlung [14-19]. Hier wurde vor allem in den ersten 8 Tagen nach Injektion eine erhöhte Inzidenz (ca.6,5%) an venösen und arteriellen Thrombosen beobachtet [14].

Antikörper sind somit in der Entstehung der venösen Thrombose in bisher unbekannter Art und Weise beteiligt. Ein Beitrag zu dem zugrundeliegenden inflammatorischen Prozess ist wahrscheinlich. Eine vielversprechende zukünftige therapeutische Option in der Behandlung und Prävention dieser Erkrankung wäre die Hemmung der Inflammation während der Thrombusbildung. Ein fundiertes Wissen über die genauen Abläufe und involvierten Faktoren ist hierfür essentiell. Darum ist es unser Ziel das Wissen in diesem Gebiet zu vertiefen. Hierbei steht der Fokus vor allem auf der Rolle von Antikörpern.

II. Literaturübersicht

1. Die Entstehung venöser Thrombosen

Unter der Thrombose versteht man eine unphysiologische intravasale Blutgerinnung, welche ein oder mehrere Gefäße ganz oder teilweise verschließen kann [20]. 95% der venösen Thrombosen sind in den tiefen Venen der unteren Extremitäten lokalisiert. In den Taschen der tiefen Venenklappen finden sich optimale Bedingungen für die Entstehung von Gerinnseln. Sie stellen Nischen des Blutkreislaufsystems dar, in denen Verwirbelungen auftreten und besonders niedrige Flussverhältnisse vorgefunden werden [21, 22]. Von diesem Entstehungsort können sich die Thromben entweder nach proximal oder distal ausbreiten.

Im Gegensatz zur arteriellen Thrombose stellt der Verschluss des Gefäßes in der Vene aufgrund ausgedehnter Umgehungskreisläufe am jeweiligen Entstehungsort in der Regel keine ischämische Gefahr für das umgebende Gewebe dar. Die größte Gefährdung besteht in der Embolisation des venösen Thrombus in die Lungenstrombahn und dem damit verbundenen Verschluss der dortigen Gefäße. Um dieses häufige Zusammenspiel zwischen Erkrankung und Komplikation zu würdigen entstand der Begriff der venösen Thrombembolie (VTE).

Die Spätkomplikationen werden nach Definition ab der 4. - 6. Woche nach Entstehung der venösen Thrombose unter dem Begriff des postthrombotischen Syndroms zusammengefasst. Es kann in 20-50% der Fälle innerhalb von zwei Jahren beobachtet werden [23]. Insgesamt betroffen sind ca. 1% der Bevölkerung [24]. Unter dem postthrombotischen Syndrom versteht man u.a. die Rethrombose, Schwellungsneigung, Schmerzen und Ulcusbildung [25]. Die thrombosierte Vene wird teilweise durch intrinsische Fibrinolyseprozesse wiedereröffnet. Es kommt zu einem narbigen Umbauprozess, welcher nicht nur die Venenwand betrifft, sondern auch deren Klappen. So entstehen die Symptome einer chronisch venösen Insuffizienz [26]. Jeder zehnte Patient entwickelt in der Folge einen Ulcus cruris [27, 28]. Dieser ist mit einer hohen Morbidität verbunden. Für die Betroffenen ergeben sich oft einschneidende berufliche und soziale Probleme, welche bis hin zur Arbeitsunfähigkeit gehen [26].

2. Epidemiologie und klinische Relevanz

Um die Bedeutung dieser häufigen Erkrankung für die Allgemeinbevölkerung besser einordnen zu können, ist ein Blick auf epidemiologische Studien hilfreich. Statistisch gesehen wird in 104 bis 183 von 100.000 Personenjahren mit einer VTE gerechnet. Auf der Rangliste

der häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen ist die VTE nach Herzinfarkt und Schlaganfall aktuell auf Platz drei anzusiedeln und zählt somit zu den tödlichsten Erkrankungen in unserer Gesellschaft [29]. Interessanterweise steht die VTE seit 1980 gleichbleibend auf diesem hohen Niveau [2, 4].

Bei Betrachtung der Altersverteilung der VTE, fällt eine starke Häufung der Erkrankungsfälle ab dem 60. Lebensjahr auf. Im Jahr 2003 verzeichnete White 30 Erkrankungsfälle von 100.000 Einwohnern im Altersbereich von 25 bis 35 Jahren und 300-500 Fälle von 100.000 Einwohnern im Alter zwischen 70 und 79 Jahren [30]. Es wird ein exponentieller Zusammenhang zwischen dem Auftreten von VTE und dem Alter vermutet. Im Hinblick auf die demographische Entwicklung der Bevölkerung ist somit in den kommenden Jahren ein Anstieg der Gesamtinzidenz zu erwarten.

Die Entstehung der VTE ist ein schleichender Prozess, der frühestmöglich aufgehalten werden muss. Mit Auftreten einer Lungenembolie steigt das Risiko eines frühen Todes um das 18-fache an [31]. Früherkennung ist somit ein zentrales Thema um die Mortalität dieser Erkrankung dauerhaft zu senken. Eine klinische Autopsie-Studie aus den Jahren 1991 bis 1997 verdeutlicht jedoch die Defizite in der Befundung entsprechender Patienten. Weniger als ein Drittel der Lungenembolie-Patienten konnten ante mortem diagnostiziert werden [32, 33]. Entsprechend hoch muss die Dunkelziffer der an den Folgen der venösen Thrombose versterbenden Patienten bis heute gesehen werden.

Die Diagnostik der VTE hat durch verbesserte Bildgebung bereits an Sensitivität gewonnen. Dies erklärt den Anstieg der Inzidenz zwischen 2001 und 2009 zumindest teilweise [2]. Trotzdem fehlen bis heute effektive Früherkennungsmöglichkeiten. Ein Grund hierfür ist, dass sowohl die Thrombose als auch die resultierende Embolisation mit wenig spezifischen Symptomen verbunden sind. Im Falle der isolierten venösen Thrombose fehlen sie in über 50% der Fälle sogar ganz [34]. Dies erklärt sich aus der Tatsache, dass eine beginnende Thrombose noch keine entzündlich-schmerzhaften Beschwerden der Gefäßwand verursacht und noch kein relevantes venöses Blutabflusshindernis darstellt [35]. Zu diesem Zeitpunkt ist das Risiko einer entstehenden Lungenembolie jedoch am größten [35]. Dies ist der sehr lockeren Struktur des entstehenden Thrombus zuzuschreiben [35]. Betrachtet man die symptomatischen Patienten, so präsentieren sich weniger als ein Drittel mit dem krankheitstypischen Erscheinungsbild wie Spannungsschmerz der Wade, Ödeme und Erweiterung epifaszialer Venen („Pattsche Warnvenen“) [36]. Entsprechend wenig sensitiv ist die alleinige klinische Untersuchung in diesem Zusammenhang. Sie bewegt sich bei stationären Patienten aktuell zwischen 0 und 40 Prozent [37-39]. Umgekehrt kann die Diagnose einer venösen Thrombose bei klinischem Verdacht in nur der Hälfte der Fälle durch

objektive Methoden wie beispielsweise Ultraschall bestätigt werden [37-39]. Angesichts der großen Relevanz und Mortalität dieser Erkrankung ist es somit wichtig, neben dem klinischen Blick auch auf das Risikoprofil eines Patienten zu achten und bei Gefährdungspotential entsprechende Untersuchungen einzuleiten. Die Indikation einer prophylaktischen Antikoagulation ist in solchen Fällen frühzeitig zu stellen [35].

3. Risikofaktoren der venösen Thrombose

Der deutsche Mediziner und Pathologe Rudolf Ludwig Karl Virchow (1821-1902) war einer der ersten Wissenschaftler, der sich mit der Entstehung der Thrombose auseinandersetzte. Auf der Grundlage seiner Forschungsergebnisse konnte später die sogenannte Virchow-Trias verfasst werden. Sie besteht aus allgemeingültigen Faktoren, welche bis heute ihre Bedeutung und Richtigkeit nicht verloren haben [40].

Hyperkoagulabilität: meint eine gesteigerte Gerinnbarkeit des Blutes, wie sie durch ein Ungleichgewicht zwischen prokoagulatorischen und antikoagulatorischen Faktoren zustande kommt. Häufig sind genetische Veränderungen ursächlich für dieses Phänomen. Am weitesten verbreitet mit einer Prävalenz von 11 bzw. 10% sind erhöhte Spiegel an Faktor VIII bzw. XI [41, 42]. Weiterhin kommt der Faktor V-Leiden-Mutation (Prävalenz: 4-6%) und der Prothrombinmutation (Prävalenz 1-2%) eine klinische Relevanz zu [43, 44]. Eher selten zu beobachten sind Mangelzustände antikoagulatorischer Proteine [45-47]. Auch Tumorerkrankungen, insbesondere Adenokarzinome des Pankreas, der Lunge, des Ovars und der Niere sind mit einer gesteigerten Thromboseinzidenz verbunden [48-53]. Die Ursache für die erhöhte Gerinnungsneigung ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Am ehesten können die erhöhten Mikropartikelplasmaspiegel dafür verantwortlich gemacht werden. Sie sind Träger von Tissue Factor (TF), welcher ein bekannter Aktivator der extrinsischen Gerinnungskaskade ist [54, 55].

Gefäßwandverletzungen: Sie können auftreten etwa durch physische- oder toxische Schädigung der Gefäßwand. Der entscheidende gerinnungsauslösende Schritt ist die Verletzung des Endothels, wodurch die stark thrombogene subendotheliale Matrix Kontakt zu den Blutbestandteilen bekommt. Das in der Gefäßwand vorhandene Kollagen ist ein starker Thrombozytenaktivator [56, 57]. TF, welcher dauerhaft von glatten Muskelzellen und Fibroblasten exprimiert wird, aktiviert die extrinsische Gerinnungskaskade [58, 59]. Diese Art der Gerinnungsinduktion spielt vor allem bei Ruptur arteriosklerotischer Plaques eine Rolle [60, 61]. In der venösen Thrombose bleibt das Endothel i.d.R. vollständig intakt.

Verlangsamter Blutfluss: Stase stellt den größten Risikofaktor für die Entstehung der venösen Thrombose dar. Unter physiologischen Verhältnissen unterstützt die Kontraktion der Skelettmuskulatur (Muskelpumpe) den Rückfluss des Blutes zum Herzen. So ist es nicht verwunderlich, dass lange Immobilisationen von Extremitäten gehäuft mit thrombotischen Ereignissen einhergehen [62]. Etwa zwei Drittel der Thrombosen können einer solchen erworbenen, zeitlich begrenzten Risikosituation zugeschrieben werden [4]. Bekannt wurde die Thrombose als „economy class syndrome“, welches bei Langstreckenreisenden in sitzender Position gehäuft auftritt. Innerklinisch sind Patienten während oder nach Operationen besonders gefährdet [35, 63]. Des Weiteren sind Bettlägerigkeit, Ruhigstellung von Extremitäten durch Gipsverbände oder durch Lähmungen nicht zu unterschätzende Risikofaktoren, welche prophylaktisch mit Gerinnungshemmern behandelt werden müssen [4, 35, 64].

4. Aufbau venöser Thromben

Der Auslösemechanismus hat eine direkte Auswirkung auf die Zusammensetzung des Thrombus. Typischerweise entstehen im venösen System sogenannte Gerinnungsthromben [65]. Sie sind gekennzeichnet durch einen hohen Fibringehalt, welcher das Resultat der staseinduzierten Gerinnungsaktivierung ist. In diesem Fibrinnetzwerk finden sich vermehrt Erythrozyten wieder. Sie sind verantwortlich für ca. 50% der Thrombusmasse und entsprechend auch für die Volumenzunahme während der Thrombusentstehung [66]. Die Anzahl der sich hier verfangenden Erythrozyten ist stark abhängig von der Faktor XIII Aktivität [66]. Faktor XIII wiederum interagiert mit Fibrin. Neben roten, erythrozytenreichen Arealen weist der Thrombus auch vereinzelt weiße Areale auf [65]. Die weiße Farbe entspricht den Bereichen mit erhöhtem Thrombozytengehalt. Sie kommen vor allem im proximalen Teil des Thrombus vor, welcher den späten Stadien der Thrombusentstehung entspricht [65].

Neutrophile Granulozyten und Monozyten sind bereits in frühen Stadien entlang des Endothels zu sehen [67]. Sie sind verantwortlich für den initialen inflammatorischen Prozess [5]. In späteren Stadien verteilen sich die Leukozyten unabhängig von der Schichtung im gesamten Thrombus. Dort sind sie teilweise einzeln, teilweise in Gruppen angeordnet [5].

Interindividuell gibt es bezüglich der Thrombusstruktur große Unterschiede. Der grobe Aufbau und die Zusammensetzung der Thromben ist jedoch bei vergleichbaren Bedingungen sehr ähnlich, sodass Vergleiche gezogen werden können. Gleiches gilt auch für den Aufbau muriner Thromben. Unter Berücksichtigung speziesspezifischer Unterschiede können auf diese Weise Ergebnisse aus dem murinen Modell auch auf den Menschen übertragen werden [5].

5. Pathophysiologie der venösen Thrombose

5.1. Blutgerinnung

Fibrin ist das Endprodukt der plasmatischen Gerinnungskaskade und ein essentieller Bestandteil von Thromben [68]. Es stellt den dauerhaften mechanischen Zusammenhalt sicher. Im venösen System ist die plasmatische Gerinnung maßgeblich an der Thrombusentstehung beteiligt. Darum ist die medikamentöse Hemmung der Blutgerinnung bis heute der wichtigste Bestandteil der Thromboseprophylaxe und Behandlung.

Das biochemische Korrelat der plasmatischen Gerinnung sind Serinproteasen, welche im Plasma in Form von Proenzymen und deren Kofaktoren vorliegen [68-70]. Die Aktivierung erfolgt kaskadenartig. Dabei können funktionell zwei Aktivierungswege (extrinsisch und intrinsisch) unterschieden werden [68]. Sie enden in einer gemeinsamen Endstrecke, wodurch ein rigides, quervernetztes Fibringerinnsel entsteht.

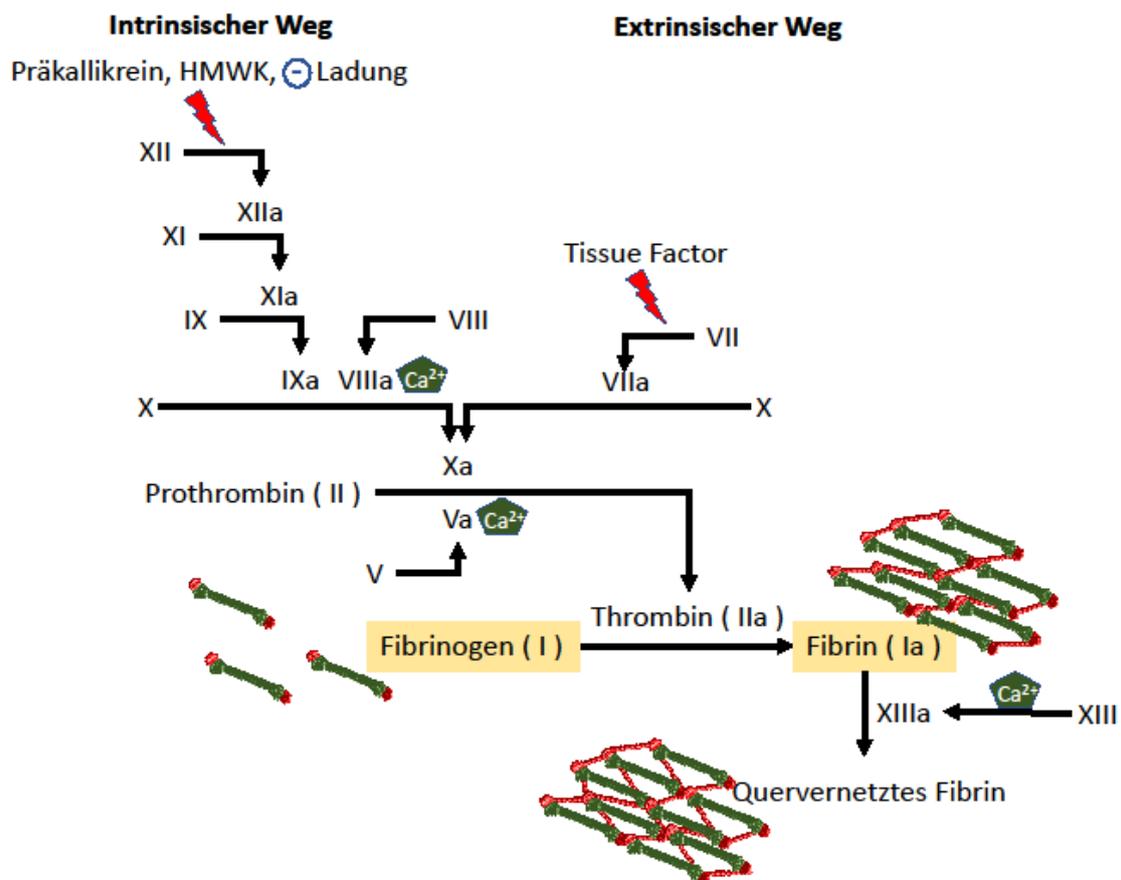


Abbildung 1: Schematische Darstellung der extrinsischen und intrinsischen Gerinnungskaskade modifiziert nach [71]

Links oben: die intrinsische Gerinnungskaskade wird aktiviert durch Präkallikrein und high molecular weight kininogen (HMWK). Letzteres bindet an negativ geladene Oberflächen und ermöglicht so die Aktivierung von Faktor XII. Über Faktor XI und IX kommt es schließlich zur Initiierung der gemeinsamen Endstrecke.

Rechts oben: Die extrinsische Gerinnungskaskade besteht aus dem Faktor VII. Faktor VII wird von TF aktiviert, welcher vor allem in der Adventitia der Gefäße vorhanden ist, unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen jedoch auch von Endothelzellen und Leukozyten exprimiert werden kann.

Unten: Die gemeinsame Endstrecke beginnt mit Faktor X, welcher zusammen mit Calcium und Faktor V Prothrombin zu Thrombin spaltet. Thrombin katalysiert den entscheidenden enzymatischen Schritt von Fibrinogen zu Fibrin.

5.1.1. Extrinsische Gerinnungskaskade

Tissue Factor (TF, Gewebethromboplastin) gilt *in vivo* als Hauptinitiator der Gerinnungskaskade. Im Tiermodell sind Mäuse mit niedrigem TF-Niveau geschützt vor der Entstehung von Thrombosen [5]. TF ist ein transmembranöses Glykoprotein, welches auch häufig auf Mikropartikeln in einem inaktiven Zustand vorkommt [72, 73]. Durch Konformationsänderung der Proteinstruktur geht TF in einen aktiven Zustand über. Daraufhin kann er als zellulärer Rezeptor und enzymatischer Kofaktor für Faktor VIIa dienen [74, 75]. Die Konformationsänderung wird unterstützt durch Enzyme, wie protein disulfid isomerase (PDI) [76]. PDI wird nach Aktivierung von Endothelzellen und Thrombozyten in das Gefäßlumen freigesetzt [6]. Der TF-Faktor VIIa-Komplex aktiviert gleichermaßen Faktor IX sowie Faktor X und initiiert so den weiteren Gerinnungsprozess [68].

TF kann sowohl intravasal als auch extravasal exprimiert werden [77]. Außerhalb des Blutes wird TF konstitutiv von Zellen der Adventitia, sowie auch von Fibroblasten, Fettzellen glatten Muskelzellen und Perizyten in seiner aktiven Form gebildet [58]. Unter physiologischen Bedingungen sind diese Strukturen durch die Endothelzellbarriere für das Gerinnungssystem nicht zugänglich. Nur durch Verletzung der Gefäßintegrität kann der Kontakt entstehen und die Gerinnung auf diese Weise aktiviert werden [68].

Im Intravasalraum findet die Expression von TF nur unter bestimmten meist vaskulär-entzündlichen Bedingungen statt. Die Hauptquellen von TF in der Entstehung der venösen Thrombose sind hierbei Monozyten und neutrophile Granulozyten des Blutes [5, 78, 79]. Endothelzellvermittelte TF-Expression findet fast ausschließlich in Gefäßen der Milz statt [80]. Darum spielen sie in diesem Zusammenhang eher eine Nebenrolle [5]. Stimuli für die Induktion von TF können Lipopolysaccharide, Immunkomplexe und Zytokine, wie Thromboxan A₂, CRP, TNF α und Histamin sein [78, 81-84]. Neutrophile Granulozyten reagieren in besonderem Maße auf Mediatoren der Komplementkaskade wie C5a [85].

Neben den hier genannten Zellen sind auch Thrombozyten zur TF-Synthese und Speicherung in deren α -Granula fähig [86-88]. Dieses kommt jedoch erst nach deren Aktivierung in Kontakt mit Blutbestandteilen. Thrombozytenvermittelte TF-Expression nimmt eine besondere

Bedeutung ein, da es die Gerinnungskaskade nicht nur initiiert, sondern auch verstärkt [77]. Des Weiteren stellt dies eine Schnittstelle zwischen der zellulären und plasmatischen Gerinnung dar.

5.1.2. Intrinsische Gerinnungskaskade

Die intrinsische Gerinnungskaskade wird im Menschen durch vier Plasmaproteine initiiert bzw. reguliert: Faktor XII (Hageman-Faktor), Plasmakallikrein (Fretchen Faktor), high molecular weight kininogen (Williams-Fitzgerald-Flaujeac-Faktor) und C1-Esteraseinhibitor [89]. Negativ geladene Oberflächen stellen den initialen Aktivierungsreiz für diese Proteine dar [90]. Das nicht enzymatische high molecular weight kininogen ist verantwortlich für die Bindung an das jeweilige Material [91]. Es führt die involvierten Faktoren und Kofaktoren zusammen und bildet einen Komplex [91]. Nach Kontaktaufnahme kommt es zu einer Konformationsänderung von Faktor XII [89]. Die aktivierte Form von Faktor XII entsteht anschließend über einen Autoaktivierungsprozess [59, 89, 92]. Faktor XIIa spaltet proteolytisch seine Substrate Plasmakallikrein und Faktor XI [59]. Faktor XI aktiviert Faktor IX. Faktor IX führt wiederum zur Spaltung von Faktor X, welcher der gemeinsamen Endstrecke angehört [68]. Unterstützt wird er dabei von Faktor VIII [68]. Zu beachten sind zudem die Querverbindungen zwischen extrinsischem und intrinsischem Gerinnungssystem. So kann die enzymatisch aktive Form von Faktor VII nicht nur Faktor X aktivieren, sondern auch Faktor IX [92]. Umgekehrt kann Faktor VII durch Spaltprodukte von Faktor XII und von Faktor IX aktiviert werden [93, 94]. Vermutlich ist dies der Grund warum ein genetischer Defekt in Faktor VIII (Hämophilie A) und Faktor IX (Hämophilie B) zu einer bedeutenden Blutungsneigung führt, die Abwesenheit von Faktor XI und Faktor XII jedoch nicht [95-97]. Trotz erhaltener Hämostase schützt die reduzierte Aktivität der Faktoren XII und XI dennoch vor der Entstehung venöser und arterieller Thromben [98-101]. Dadurch nehmen sie eine Sonderrolle in der Gerinnungskaskade ein.

In Bezug auf die venöse Thrombose konnte die negativ geladene Oberfläche von NETs (neutrophil extracellular traps) als ein Aktivierungsreiz für Faktor XII identifiziert werden [5]. In der Folge kann die zuvor erwähnte Kaskade ablaufen. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass der thrombosefördernde Effekt von Faktor XII weitestgehend unabhängig von der weiteren Gerinnungskaskade ist [5]. Zugrunde liegt eine direkte Interaktion von Faktor XII mit Fibrin [102]. Dies führt zu in einer dosisabhängigen Steigerung der Fibrindichte [102]. Wie genau dieses Phänomen erklärt werden kann, ist noch nicht vollständig bekannt.

5.1.3. Die gemeinsame Endstrecke

Der weitaus größte Teil der Fibrinbildung resultiert aus der Aktivierung der gemeinsamen Endstrecke aus intrinsischer und extrinsischer Gerinnungskaskade [59]. Sie wird eingeleitet durch den Prothrombinaktivator-Komplex (Faktor X, Faktor V, Ca^{2+} und Phospholipide) [68]. Dieser spaltet aus Prothrombin das enzymatisch aktive Thrombin ab [59]. Thrombin wiederum spaltet zwei Fibrinmonomere aus einem Fibrinogendimer ab. Mithilfe von Faktor XIII entstehen in Anwesenheit von Ca^{2+} aus Fibrinmonomeren Fibrinpolymere [59, 103]. Diese sind unlöslich. Sie bilden ein Netzwerk aus Fibrinfäden, welches den Thrombus zu einem stabilen, gefäßokkludierenden Gebilde macht.

Damit nicht jede Aktivierung der Gerinnungskaskade zu einer überschießenden Fibrinbildung mit Verbrauchskoagulopathie führt, braucht es ein gut gesteuertes antagonistisches System. Die Hemmung der Gerinnungsfaktoren läuft entweder durch enzymatische Spaltung (Protein C/Protein S) oder durch 1:1 Komplexbildung (Tissue factor pathway inhibitor, Antithrombin, α_2 -Mikroglobulin, α_1 -Antitrypsin) ab [104-107]. Mangel jeder dieser Faktoren ist mit erhöhten Thromboserisiken verbunden [108].

5.2. Thrombozyten

Für die Bildung eines stabilen Thrombus sind neben plasmatischen Faktoren auch zelluläre Faktoren unverzichtbar. Thrombozyten sind 1-3 μm kleine diskoidale Zellfragmente, die durch Abschnürung aus Megakaryozyten im Knochenmark entstehen [109]. Im menschlichen Blut sind sie in einer Konzentration von 150.000-400.000/ μl vertreten [110]. Thrombozyten besitzen weder Zellkern noch DNA. Ihre mRNA megakaryozytären Ursprungs befähigt sie jedoch in begrenztem Umfang zur Proteinsynthese [111, 112]. Zudem werden ihnen von ihrer Ursprungszelle verschiedene Zytokine und Proteine mitgegeben. Sie werden in drei verschiedenen Granulatypen gespeichert. Die α -Granula sind am häufigsten vertreten. Sie enthalten zahlreiche Proteine: Gerinnungsfaktoren, Chemokine, Adhäsionsfaktoren, mitogene Faktoren und Regulatoren der Angiogenese [113, 114]. Die δ -Granula sind reich gefüllt mit Nukleotiden (ADP und ATP), Serotonin, Histamin, Diphosphate und Calcium, welche als Botenstoffe dienen [114]. Lysosomen beinhalten saure Hydrolasen [115, 116]. Sie ermöglichen es den Thrombozyten nach Aktivierung Einfluss auf umliegende Zellen zu nehmen und sie in dessen Aktivität zu steuern [116, 117]. Zudem besitzen aktivierte Thrombozyten negativ geladenes Phosphatidylserin und TF an ihrer Oberfläche, welche effektiv die Gerinnungskaskade aktivieren [118, 119].

Die wichtigste Aufgabe der Thrombozyten wird in der Aufrechterhaltung der Hämostase gesehen. Defekte in der Thrombozytenfunktion gehen mit schweren Blutungskomplikationen

einher. Dennoch werden Thrombozyten regelhaft prophylaktisch oder therapeutisch bei erhöhtem kardiovaskulärem Risikoprofil gehemmt. Überschießende Thrombozytenaggregation wird vor allem in Zusammenhang mit arteriosklerotischen Ereignissen gesehen [120-122]. Nach Ruptur von Plaques werden subendotheliale Kollagenfasern freigelegt und es kommt zu ausgedehnter Thrombozytenaktivierung. Dies führt zu Thrombusbildung bis hin zur vollständigen Okklusion des Gefäßes.

In der venösen Thrombose wurden Thrombozyten lange eine nur untergeordnete Rolle zugeschrieben. Versuche mit Plättchen-depletierten Mäusen ergeben jedoch auch hier eine deutlich reduzierte Thromboserate und widerlegten somit die ursprüngliche Annahme [5]. Auch der Nutzen von Acetylsalicylsäure in der gegenwärtigen Therapie und Vorsorge der venösen Thrombose wird diskutiert [123-125]. Eine solche Thrombozyten-hemmende Therapie senkt das Risiko thrombotischer Ereignisse um 2/5 und um 2/3 im Hinblick auf Lungenembolien im Vergleich zu Placebo [126, 127]. Diese Erkenntnis führte bereits dazu, dass Acetylsalicylsäure seit 2012 von dem American College of Chest Physicians (ACCP) als Alternative zu der üblichen niedermolekularen Heparintherapie empfohlen wird [128-130].

Die Frage, wie Thrombozyten die Entstehung der venösen Thrombose beeinflussen beschäftigt Forscher schon seit einiger Zeit. Bereits zwei Stunden nach Flussverlangsamung können im Mausmodell die ersten adhärennten Thrombozyten am Endothel der Vene beobachtet werden [5]. Die Thrombozyten lagern sich diffus verteilt an, ohne das Endothel ganz zu bedecken. Vereinzelt bilden sie kleine Aggregate. Verantwortlich für die Bindung ist von-Willebrand-Faktor (vWF), der von aktivierten Endothelzellen aus dessen Granula ausgeschüttet und von Thrombozyten mit Hilfe von GPIIb₃ gebunden wird [5, 131].

Neben der Bindung an das Endothel finden auch zahlreiche Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten statt. Bisher herrscht ein nur sehr grobes Verständnis über die Rolle dieser Interaktionen. Bereits bekannt ist jedoch, dass Thrombozyten wesentlich an der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten beteiligt sind. Dies geschieht beispielsweise über GPIIb₃ [132]. Dessen Bindung an Mac1 auf Leukozyten führt zu einer direkten mechanischen Interaktion. In der Folge entstehen Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate [133]. Das Auftreten dieser Aggregate ist von großer Relevanz für die Entstehung arterieller Thrombosen [134-136]. Hier wurde postuliert, dass die Menge der Komplexe mit der Krankheitsaktivität korreliert [134, 135]. Wird die Komplexbildung beispielsweise durch einen Knock-out unterbrochen, so resultiert ein Schutz vor der Entstehung entsprechender Thromben [136].

Darüber hinaus existieren noch zahlreiche weitere thrombozytäre Interaktionsmechanismen. Dazu gehören Integrine (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1, und JAM-A), Selektine (P- und

L-Selektin), sowie CD40-CD40L abhängige Bindungen [137]. Hierüber sind Thrombozyten in der Lage Leukozyten gezielt in entzündete Areale des Körpers zu steuern [137, 138]. Sie gelten teilweise als Initiator der klassischen Adhäsionskaskade auf dem Endothel, welches die Grundlage für Leukozytenakkumulation und -Extravasation darstellt (siehe Abschnitt 5.3.) [137].

Neben der Rekrutierung sind Thrombozyten auch an der Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten beteiligt [6]. Nach Interaktion mit Thrombozyten bilden Granulozyten bevorzugt NETs aus [139, 140]. Diese wirken über verschiedene Mechanismen gerinnungsanstoßend (siehe Abschnitt 5.3.). Darüber hinaus fördern Thrombozyten die Expression von TF auf Leukozyten [6]. TF gilt als Initiator der extrinsischen Gerinnungskaskade. Dies gilt jedoch hauptsächlich für die Disulfid-Form [141]. Auch hier intervenieren Thrombozyten. Nach Stimulation setzen sie Proteindisulfid isomerase (PDI) frei [6]. Dieses Enzym katalysiert über Knüpfung von Disulfidbrücken den Übergang von der eher harmlosen TF-Form in die gerinnungsfreudige Form [76].

Man kann somit sagen, dass Thrombozyten unabhängig von ihrer Funktion als hämostatische Zelle weitreichend Einfluss auf die Leukozytenaktivität und -rekrutierung nehmen. Inflammation bildet den Grundbaustein für die Entstehung venöser Thromben. Es ist somit sinnvoll ihre Rolle in zukünftige Forschungsprojekte mit einzubeziehen.

5.3. Inflammation in der venösen Thrombose

Die Gerinnung ist phylogenetisch eng mit dem Immunsystem verknüpft. In einigen Lebewesen, wie *Drosophila melanogaster* oder Pfeilschwanzkrebse kann das Gerinnungssystem das adaptive Immunsystem ersetzen. Gerinnende Haemolymphe hält die Mikroorganismen fest und verhindert so die weitere Ausbreitung [142-145]. Im Säugetier gehen beide Systeme Hand in Hand einher, was bei der venösen Thrombose besonders deutlich wird. Im Gegensatz zur arteriellen Thrombose, bei der sich die entscheidenden Faktoren direkt in der Gefäßwand befinden, ergibt sich der gerinnungsanstoßende Reiz in der Vene erst im Rahmen eines entzündlichen Prozesses. Das intakte Endothel besitzt selber keine prokoagulatorischen Faktoren. Man spricht in diesem Zusammenhang auch vom Prozess der Immunthrombose [20].

Vor Beginn der Thrombusbildung wird eine Aktivierung des Endothels beobachtet. Als Folge des staseinduzierten hypoxischen Zustandes geben die Endothelzellen den Inhalt ihrer Weibel-Palade Körperchen frei [146-148]. Folglich ist die Innenseite der Gefäßwand, ähnlich wie bei einem entzündlichen Prozess, bestückt mit Selektinen und vWF. Die Selektine, darunter P- und E-Selektin, initiieren die klassische Adhäsionskaskade der Leukozyten [149]. So

werden innerhalb kürzester Zeit (ca. 6h nach Staseinduktion) massenhaft Leukozyten auf der Gefäßwand rekrutiert und aktiviert [5]. Unter ihnen befinden sich vor allem neutrophile Granulozyten (ca. 70%) und Monozyten (ca. 30%). Durch die Expression von TF sind sie größtenteils verantwortlich für den gerinnungsanstoßenden Prozess in der venösen Thrombose [150, 151]. Darüber hinaus haben Neutrophile die besondere Eigenschaft NETs zu bilden. NETs sind extrazelluläre Chromatinstränge deren Oberflächen über eine Vielzahl an Mechanismen prothrombotisch wirken [152]: Neben der Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade über TF, können sie mit ihrer negativ geladenen Oberfläche auch die intrinsische Gerinnungskaskade (Kontaktphase) aktivieren. Dieser Effekt wird noch zusätzlich verstärkt, indem NETs assoziierte Enzyme wie neutrophile Elastase und Myeloperoxidase den Tissue factor pathway inhibitor inaktivieren und somit die Gerinnung enthemmen [153, 154]. Neben Thrombozyten und Endothelzellen können auch neutrophile Granulozyten PDI exprimieren und damit TF gerinnungsfreudiger machen [141, 155, 156]. Zudem greifen die bei der NETosis freigesetzten Histone H3 und H4 in die zellvermittelte Hämostase ein, indem sie Thrombozyten aktivieren [157]. Es findet somit eine gegenseitige Aktivierung von Thrombozyten und Neutrophilen statt, welches letztlich in der Thrombusbildung endet.

6. Antikörper in der venösen Thrombose

Im Gegensatz zu oben genannten Prozessen, welche vor allem das angeborene Immunsystem einbeziehen, zeichnet sich das adaptive Immunsystem durch seine Lernfähigkeit aus. Antikörper sind dabei die wichtigste und zugleich die effektivste Waffe. Aufgrund ihrer kleinen Struktur sind sie in nahezu allen Körperhöhlen vertreten. Sie bedienen zahlreiche immunologische Effektorfunktionen. Darum ist es wichtig sie in Bezug auf die venöse Thrombose in Forschungsüberlegungen einzubeziehen.

6.1. Aufbau von Antikörpern

Antikörper sind Glykoproteine und gehören zu der Familie der Immunglobulinen. Sie sind sowohl im Serum als auch in anderen Körperflüssigkeiten wie Speichel oder Tränen zu finden [158, 159].

Strukturell sind sie aus jeweils zwei identisch kleineren „light chain“ (L) Polypeptidketten und zwei identisch größeren „heavy chain“ (H) Polypeptidketten aufgebaut [160]. Untereinander sind die vier Ketten durch Disulfid- und nichtkovalente Bindungen verbunden, sodass sie ihre typische Y-Form erhalten (siehe Abbildung) [161].

Die Entdeckung der Zerteilbarkeit von Antikörpern durch Papain an dessen Scharnierregion in jeweils zwei Fab- und eine Fc-Region erbrachte eine weitere wichtige funktionelle Unterscheidung. Das Fab-Fragment („antigenbindendes Fragment“) ist für die Bindung an dessen Zielstruktur verantwortlich [160]. Für das Fc-Fragment („crystallizable“) war die Eigenschaft bei niedrigen Temperaturen leicht zu kristallisieren namensgebend. Diese Region ist verantwortlich für die Verankerung in der Zellmembran der B-Zellen [160, 162]. Alternativ kann sie für multiple Effektorfunktionen von Antikörpern (Bindung an Fc-Rezeptoren) oder Transportprozesse (Transport von IgA in Sekretflüssigkeit) genutzt werden [163].

Jede der vier Polypeptidketten hat ein aminoterminal Ende und ein carboxyterminales Ende. Typischerweise zeigt das carboxyterminale Ende eine sehr konservierte Aminosäuresequenz und wird somit als „constant“ (C)-region bezeichnet [160]. Das gegenüberliegende aminoterminal Ende weist jedoch mehrere hypervariable Kettenabschnitte auf, die complementary-determining regions (CDR) und wird daher „variable“ (V)-Region genannt [160]. Die Polypeptidketten falten sich i.d.R. so, dass die CDRs in Form von Schleifen an der Oberfläche des Antikörpers zum Liegen kommen. Ihre Aminosäuresequenz ist verantwortlich für die Form und Ladung der Fab-Region. Dies definiert die Spezifität des Antikörpers zu seinem Antigen [160]. CDRs werden durch relativ konservierte „framework residues“ zwischen den CDR-Schleifen in Position gehalten [164].

6.2. Entstehungs- und Reifungsprozess

Der Entstehungsprozess von Antikörpern ist ein sehr komplexer Vorgang. Daran beteiligt sind vor allem B-Zellen und Plasmazellen, deren Hauptaufenthaltort die sekundär lymphatischen Organe wie Lymphknoten und Milz sind [165, 166]. Aus genetischer Sicht entstehen die vier Polypeptidketten eines Antikörpers durch Rekombination mehrerer Genabschnitte [167]. Diese werden unterteilt in jeweils vier Gruppen: V (Variable), D (Diversity), J (Joining) und C (Constant). Diese wiederum bestehen aus mehreren Segmenten [167, 168]. Die einzelnen Gruppen kodieren für unterschiedliche Abschnitte des Antikörpers. In der schweren Kette kodieren die Genabschnitte der Gruppe C für den Fc-Teil des Antikörpers und bestimmt somit die Antikörperklasse [167]. Die Gruppen V, D und J (Im Falle der leichten Kette fehlt die Gruppe D) kodieren für den variablen Teil des Antikörpers [163, 167, 169].

Um eine möglichst große Anzahl an Antigenen möglichst gut erkennen zu können, braucht es eine große Vielfalt an Antikörpern. Die V(D)J-Rekombination (VDJ Rekombination = somatische Rekombination) ist für das ursprüngliche Antikörperrepertoire verantwortlich. Jedoch geschieht die Rekombination von Genen auf DNA-Ebene sehr unpräzise [163, 167]. An den durch RAG (recombination activating gene) hervorgerufenen Doppelstrangbrüchen

werden an beiden Enden nach dem Zufallsprinzip weitere Nukleotide angebracht. So entstehen willkürlich DNA-Einlagerungen zwischen den Schnittstellen [163, 167].

Um die Diversität der Antikörper noch weiter zu erhöhen, findet zusätzlich die sogenannte somatische Hypermutation statt. Dieses Phänomen kann ausschließlich in B-Lymphozyten nach Antigenkontakt und Stimulation durch T-Lymphozyten (u.a. CD40L) gesehen werden. Dies ist das Startsignal für die AID (activation-induced cytidine deaminase), ein Enzym welches auch für den Antikörperklassenwechsel verantwortlich ist [170, 171]. Die durch AID katalysierte Desaminierung eines Cytidins zu Uracil führt zum Einbau neuer Basen durch zelluläre Reparaturmechanismen und damit zu zahlreichen Punktmutationen. Diese wiederum sind die Basis der Veränderungen in den Antigenbindungseigenschaften von Antikörpern, auf denen die Affinitätsreifung beruht [163, 172].

6.3. Die Antigenbindung

Die Bindung von Antigenen ist der entscheidende Prozess in der Funktion von Antikörpern. Die dafür vorgesehenen Bindungsstellen werden maßgeblich durch CDRs geformt [160, 173]. Sie bestimmen somit die Spezifität des Antikörpers [171]. Um mit einem Antigen interagieren zu können braucht es Kräfte, die unmittelbar entstehen und auch wieder getrennt werden können. Hierbei spielen vor allem lokale elektrische Ladungsunterschiede eine Rolle. Zu dem Formenkreis gehören elektrostatische Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und Van der Waals Kräfte [174-176]. Zudem können von den Aminosäureresten hydrophobe Eigenschaften ausgehen, die wiederum mit der Umgebung interagieren [174].

Je nach Übereinstimmung der CDRs mit der Oberfläche des Antigens, können mehr oder weniger starke Kräfte zwischen den beiden Partnern entstehen, wodurch die Affinität des Antikörpers bestimmt wird [171]. Die Affinität beschreibt somit die Bindungskraft des Antikörpers an ein einzelnes Epitop. Im Gegensatz dazu versteht man unter der Avidität die Gesamtbindungskraft, die an verschiedenen Bindungsstellen zugleich wirkt [175]. Diese spielt vor allem bei multivalenten Antikörpern wie IgM eine Rolle.

Affinität und Avidität sind jedoch keinesfalls Kräfte, die zu jeder Zeit in gleicher Stärke vorhanden sind. Es gibt verschiedene Faktoren, die diese stören können. Dazu gehören hohe Salzkonzentrationen, extreme pH-Werte, Detergenzien und Verdrängungsreaktionen mit hohen Konzentrationen des reinen Epitops [174]. Es handelt sich somit um nicht kovalente und potentiell reversible Wechselwirkungen.

6.4. Das Fc-Fragment

Die Bindung eines Antigens an das Fab-Fragment löst bei Antikörpern eine Konformationsänderung aus. Dies wiederum macht aus dem Antikörper ein Molekül mit Effektorfunktion [177, 178]. Antikörper können nun Bindungen mit spezialisierten Fc-Rezeptoren eingehen. Diese sind u.a. auf Leukozyten zu finden [179, 180]. Zudem kann die klassische Komplementkaskade aktiviert werden [177, 178].

Anhand des konstanten Teils der schweren Kette können im Menschen acht Antikörperklassen unterschieden werden. Die verschiedenen Antikörperklassen unterscheiden sich in Struktur und Eigenschaften:

IgM

Das Fc-Teil von Antikörpern der Klasse IgM besteht aus zwei μ Ketten [160]. IgM ist der erste Rezeptor auf der Oberfläche einer reifenden B-Zelle und es ist auch der erste Antikörper der bis zum Isotypenwechsel von der B-Zelle sezerniert wird [181]. In löslicher Form ordnen sich fünf IgM-Monomere zirkulär über J-Ketten befestigt zusammen [160]. Da zu dem Zeitpunkt der IgM-Sekretion noch keine Reifung stattgefunden hat, ist seine Affinität gering. Durch die pentamere Bauweise (zehn Bindungsstellen pro Molekül) ist die Bindungsavidität jedoch verhältnismäßig hoch. Zudem kann IgM durch seine besondere Struktur Antigene effektiv zur Agglutination bringen und über Komplementaktivierung unschädlich machen [160, 163].

IgG

Etwa 80% aller Antikörper im menschlichen Serum sind vom Typ IgG [182]. Es existieren vier Subklassen die nach ihrer Serumkonzentration absteigend von eins bis vier durchnummeriert wurden [160]. Es ist das klassische Immunglobulin der Sekundärantwort und hat, mit Ausnahme von IgG₃, eine relativ lange Halbwertszeit von ca. 21 Tagen im Serum [176, 183]. IgG ist ein Monomer. Im Vergleich zu IgM hat es eine höhere Affinität, jedoch eine niedrigere Avidität. IgG Antikörper vom Subtyp eins und drei aktivieren ebenfalls die klassische Komplementkaskade, jedoch braucht es hierfür mindestens zwei IgG-Moleküle auf der Antigenoberfläche [175]. Fünf verschiedene Fc-Rezeptoren sind spezialisiert auf die γ -Kette der konstanten Region der schweren Kette [176]. Auf diese Weise können IgG-Antikörpern eine zentrale immunmodulatorische Rolle zugeschrieben werden [184, 185].

IgA

IgA kommt hauptsächlich in Körpersekreten, wie Speichel, Tränenflüssigkeit und Brustmilch vor. Im Serum spielt IgA mit 13% eine nur untergeordnete Rolle [182]. Die sezernierte Form lagert sich in Form von Dimeren aneinander [160, 163].

IgD

IgD kommt zusammen mit IgM auf naiven B-Zellen vor. Es wird in sehr geringen Mengen auch von vereinzelt B-Zellen sezerniert [182]. Seine Funktion ist jedoch nicht bekannt [160, 163].

IgE

IgE spielt eine große Rolle bei der Abwehr von Parasiten und Würmern. Des Weiteren gilt es als Auslöser der allergischen Reaktion vom Soforttyp [186]. Mit Ausnahme von Allergikern ist die Konzentration von IgE im Serum sehr gering [160, 163, 182].

6.5. Fc-Rezeptoren

Insgesamt gibt es acht verschiedene Fc-Rezeptoren. Die Fc-Rezeptorverteilung ist sehr heterogen. Ebenso unterschiedlich ist die Effektorfunktion, die die Bindung von Antikörpern auslöst. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick.

Vorkommen	Rezeptor/Wirkung	IgA ₁	IgA ₂	sIgA	IgD	IgE	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄	IgM
Mastzellen, Basophile, aktivierte Eosinophile	FcεRI Wirkung: Degranulierung					+++					
Makrophagen, DC, aktivierte Neutrophile, aktivierte Eosinophile	FcγRI (CD64) Wirkung: Phagozytose, Aktivierung, Degranulierung						++	(+)	++	+	
Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, Thrombozyten, Langerhanszellen	FcγRIIA (CD32) Wirkung: Phagozytose, Degranulierung						+++	+	+	(+)	
B-Zellen, Mastzellen	FcγRII-B1 (CD32) Wirkung: hemmt Zellaktivierung						++	(+)	++	+	
Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile	FcγRII-B2 (CD32) Wirkung: Aufnahme, hemmt Zell-Aktivierung						++	(+)	++	+	
NK-Zellen, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, Mastzellen	FcγRIII (CD16) Wirkung: Eliminationssignal						++		++		
Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile	FcαRI (CD89) Wirkung: Aufnahme, Eliminationssignal	++	++								
Makrophagen, B- Zellen	Fcα/μP Wirkung: Aufnahme	+	+								+++

Tabelle 1: Vorkommen und Interaktionsvermögen von Fc-Rezeptoren mit verschiedenen Antikörperklassen im Menschen, modifiziert nach [160, 163, 176]

6.6. Ursprung der Antikörper

Die Synthese von Antikörpern findet in B-Lymphozyten statt. B-Lymphozyten haben ihren Ursprung von multipotenten Stammzellen im Knochenmark [187]. Dort durchlaufen sie zahlreiche Reifungsschritte. Ein zweistufiger Selektionsprozess stellt die richtige Funktionsfähigkeit und die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen sicher [188]. Die weitere Entwicklung zum reifen B2-Lymphozyt findet hauptsächlich in den Lymphfollikeln von Milz und Lymphknoten statt [187, 189]. Nach erstem Antigenkontakt und Aktivierung durch T-Lymphozyten findet schließlich die Differenzierung zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen statt [190, 191]. Plasmazellen sind verantwortlich für die Produktion von Antikörpern in großer Stückzahl.

Von den klassischen B2-Lymphozyten können die B1-Lymphozyten und die Lymphozyten der Marginalzone abgegrenzt werden [192-194]. Diese unterscheiden sich von den klassischen B2-Lymphozyten durch ihre vorwiegenden Aufenthaltsorte und die Expression von Oberflächenantigenen. Zudem ist ihnen eine eingeschränkte Antigenspezifität gemeinsam [193-198].

Die vornehmlichen Aufenthaltsorte der B1-Lymphozyten sind die Körperhöhlen (Pleura und Peritoneum) [199]. Sie werden nochmal unterteilt in B1a/CD5-positive und B1b/CD5-negative B-Lymphozyten [200, 201]. Ihre Herkunft ist im Gegensatz zu den anderen B-Lymphozyten umstritten. Es wird vermutet, dass ihre Aufgabe vor allem darin besteht die Körperhöhlen zu schützen [175]. Im Gegensatz zu anderen B-Zellpopulationen, sind sie in der Lage sich selbst zu erneuern [202]. B1-Zellen gelten als Hauptproduzenten der natürlichen Antikörper [203].

Eine weitere B-Zellpopulation sind die B-Lymphozyten der Marginalzone [193, 194, 204]. Sie sind vornehmlich in dem Randsinus der weißen Pulpa in der Milz zu finden. Gegenüber B2-Zellen zeichnen sie sich durch eine starke Expression von Komplementrezeptoren CR1 und CR2 aus. Ein möglicher Beitrag zur Produktion von natürlichen Antikörpern ist umstritten [187, 198, 205-207].

6.7. Natürliche Antikörper

Die bisher besprochenen Antikörper, welche im Rahmen der immunologischen Primärantwort meist von B2-Zellen spezifisch gegen ein körperfremdes Antigen gerichtet sind, werden auch als „immun“-Antikörper bezeichnet [198]. Dieser Abschnitt widmet sich einer weiteren großen Gruppe: den „natürlichen Antikörpern“. In der Maus können ihnen in etwa 80% aller IgM Moleküle zugeschrieben werden [203, 208]. Ein Klassenwechsel zu IgG und IgA ist möglich. Ihr Anteil ist jedoch wesentlich geringer und ihre Interaktionsmöglichkeit mit FcγR ist

beschränkt [203, 209]. Im Gegensatz zu Immunantikörpern können natürliche Antikörper auch schon im menschlichen Nabelschnurblut oder in Mäusen aus antigenfreier Haltung gefunden werden [210, 211]. Demnach werden Sie ausschließlich durch körpereigenen Antigenen immunisiert [198]. Ihre Aufgabe ist es vermutlich Krankheitserreger in der frühen nicht adaptiven Phase zu eliminieren.

Für die Entstehung von natürlichen Antikörpern ist der Komplementrezeptor 2 (CR2) von entscheidender Bedeutung. CR2 ist auf B-Zellen und dendritischen Zellen vorhanden [212, 213]. Er ist Teil des B-Zell-Korezeptorkomplexes [213]. Durch Bindung an seine Liganden C3b und dessen Derivate iC3b und C3dg findet eine deutliche Verstärkung des B-Zellrezeptorsignals statt [213]. So können deutlich niedrigere Antigenmengen zu einer wirkungsvollen B-Zellaktivierung führen [214]. Das Komplementsystem und natürliche Antikörper sind jedoch auch zentrale Bausteine in der Erkennung von Eigenantigenen z.B. bei Apoptose [215, 216]. So führt ein Defekt des CR2 nicht nur zu einer Einschränkung der Antigen-spezifischen T-Zellabhängigen Immunantwort [217-220], sondern auch zu einem veränderten Repertoire natürlicher Antikörper [202, 216, 221]. Ein Grund hierfür ist die starke Abhängigkeit der B1-Zellentwicklung und Selbsterneuerung von Aktivierungssignalen. In Abwesenheit von CR2 scheinen sie nicht in ausreichendem Maße vorhanden zu sein [202]. Die Folge ist eine starke Reduktion der CD5-positiven B1-Zellpopulation im Peritoneum von CR2^{-/-} Mäusen [202, 219].

Was ist nun das Besondere an natürlichen Antikörpern? Natürliche Antikörper zeichnen sich durch ihr polyreaktives Verhalten aus [198]. Dies beinhaltet die Möglichkeit eines Antikörpers verschiedene Strukturen innerhalb eines Pathogens zu binden. Gerichtet sind die Antikörper meist gegen konservierte Strukturen wie Nukleinsäuren, Phospholipiden und Sacchariden, wie sie auch auf häufigen Umweltantigenen vorhanden sind [222]. Dies unterscheidet Sie grundsätzlich von immun Antikörpern, die spezifisch gegen jede denkbare fremde Antigenstruktur gerichtet sind [223]. Antikörpergebundene Keime werden unabhängig vom Antikörpertyp neutralisiert, über das Komplementsystem opsonisiert und durch Phagozyten eliminiert [224]. Auf diese Weise können sie früh ein unkontrolliertes Ausbreiten eingedrungener Erreger verhindern.

Neben den bereits genannten Eigenschaften zeichnen sich einige natürliche Antikörper auch durch ein schwaches autoreaktives Bindungsverhalten aus. Davon leitet sich ihre wichtige Rolle bei der Beseitigung apoptotischer und nekrotischer Zellen ab [225]. Als Zielstrukturen dienen hier beispielsweise enzymatisch oder oxidativ veränderte Phospholipide. Da sie meist erst nach Einleitung eines apoptotischen oder nekrotischen Prozess auftreten, spricht man in dem Zusammenhang auch von Neoantigen [209, 226-230]. Daraufhin stellen die natürlichen

Antikörper, unterstützt durch C1q, den Kontakt zu Phagozyten her [226]. Auf diese Weise findet eine Steigerung der phagozytischen Leistung um den Faktor drei bis vier statt [231]. Fällt diese Unterstützung weg, so kommt es zu Ansammlung von Zelltrümmern, welche die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie dem Systemischen Lupus Erythematoses begünstigt [209, 232-234]. Natürliche Antikörper bekommen so eine Schutzfunktion zugesprochen.

In Sachen Schutzfunktion gibt es jedoch einige Einschränkungen, denn nicht immer bewahren natürliche Antikörper vor Krankheit. Im Ischämie-Reperfusionmodell treten bei reduziertem Repertoire dieser Antikörper in CR2^{-/-} Mäusen deutlich weniger Gewebedefekte auf, als im Wildtyp [202, 235, 236]. Unter diesen Bedingungen konnte nonmuscle myosin und Annexin IV als Ziel-Protein natürlicher Antikörper auf der Oberfläche nekrotischer Zellen identifiziert werden [237, 238]. Durch die Opsonisierung entsteht eine Entzündungsreaktion zu der vor allem das Komplementsystem einen großen Beitrag leistet [239-241]. Diese Entzündungsreaktion vergrößert den Gewebeschaden im Vergleich zur ursprünglichen Ischämie deutlich [236, 242-244]. Die Folgen für Herzinfarkt, Schlaganfall, Mesenterialinfarkt, Herzgefäßchirurgie, Trauma oder Transplantation können verheerend sein [236, 245-247].

6.8. Interaktionen von Antikörpern mit Thrombozyten

Interaktionen von Antikörpern mit Zellen oder Zellbestandteilen besonders des Immunsystems ist wie in Abschnitt 6.5. bereits erwähnt ein häufiges Ereignis und kommt sowohl bei natürlichen, wie auch nicht-natürlichen Antikörpern vor. Etwas ungewohnt ist jedoch die Tatsache, dass Antikörper auch mit Thrombozyten interagieren. Unter Thrombozyten verstand man ursprünglich kernlose Zellen die ausschließlich der Hämostase dienen. Der Zusammenhang zu Antikörpern als Teil des Immunsystems ist auf den ersten Blick somit nicht gegeben. Tatsächlich werden Thrombozyten inzwischen ein wichtiger immunologischer Beitrag zugeschrieben, der auch im inflammatorischen Prozess der venösen Thrombose seinen Anteil nimmt [5, 248]. Über verschiedene Mechanismen (Expression von Selektinen und Rezeptoren, sowie Ausschüttung ihrer Granula [113, 249]) können sie Einfluss auf umliegende Leukozyten, wie auch Endothelzellen nehmen [250, 251] (siehe Abschnitt 5.2.). Über Antikörper greifen Thrombozyten somit ebenfalls auf einen wichtigen Bestandteil des adaptiven Immunsystems zurück. Auf humanen Plättchen konnte der IgG-spezifische niedrigaffine FcγRIIA Rezeptor nachgewiesen werden [119, 252]. Auf dem murinen Pendant fehlt er hingegen [253]. FcγRIIA hat verschiedene Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion und -aktivität. Die Bindung von aggregierten Antikörpern führt zu Aktivierung der Plättchen [252, 254] mit Granulaausschüttung [254-257] und Bildung von Mikropartikeln [256]. Zudem können Thrombozyten auf diese Weise IgG-beschichtete Partikel

aufnehmen. Thrombozyten tragen so zur Beseitigung von Immunkomplexen und damit von potentiell pathogenen, inflammatorisch aktiven Teilchen bei [253].

Gefürchtet wird FcγRIIA aufgrund seiner zentralen Rolle im Krankheitsprozess der Heparin induzierten Thrombozytopenie [258]. Zugrunde liegt hier eine Komplexbildung zwischen dem positiv geladenen Plättchenfaktor 4 (PF4) und dem negativ geladenen Heparin. Dadurch entsteht ein Neoantigen, welches von IgG gebunden werden kann [259, 260]. Andere Antikörperklassen können zwar binden, pathophysiologisch spielen sie jedoch keine Rolle [260-265]. Der auf diese Weise entstehende IgG-PF4-Heparin-Immunkomplex führt, wie oben beschrieben, zur Aktivierung von Thrombozyten. In der Folge können arterielle und venöse Thromben entstehen und es kann zu einem lebensbedrohlichen Abfall der Thrombozytenzahl kommen [266].

Antikörpervermittelte Thrombozytenaktivierung existiert jedoch auch in zahlreichen anderen Erkrankungszuständen. Hierbei wird klar, dass ein solcher Prozess auch Fc-rezeptorunabhängig stattfinden kann [267, 268]. Eine solche Fc-Rezeptor unabhängige Interaktion zwischen Antikörpern und Thrombozyten wurde bisher hauptsächlich im Zusammenhang mit anti-Phospholipid Antikörpern untersucht. Sie gelten als Verursacher von Autoimmunerkrankungen wie Antiphospholipid Syndrom oder dem systemischem Lupus Erythematodes. Beide gehen mit einer erhöhten Inzidenz arterieller und venöser Thrombosen einher [7, 8, 269, 270]. In diesem Krankheitsprozess konnte die vermehrte Ablagerung von Antikörpern auf der Oberfläche von Thrombozyten beobachtet werden, welche zu verstärkten Aktivierungssignalen und Aggregation derselben führt [271-275]. Dabei stellte sich heraus, dass speziell im venösen System der prothrombotische Effekt der Antikörper durch Aktivierung der klassischen Komplementkaskade vermittelt wird [9]. So kann bei gleichzeitigem Auftreten eines Antiphospholipid Syndroms mit einem genetischen Defekt im C2-Gen trotz vorhandener anti-Phospholipid Antikörper eine wesentlich reduzierte Inzidenz an venöser Thrombosen beobachtet werden [276]. Andererseits auch die Abwesenheit von anti-Phospholipid Antikörpern gewährt keinen vollständigen Schutz, denn auch in gesunden Individuen können aktivierte Komplementkomponenten auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten gefunden werden [277-279]. Es lohnt sich somit genauer auf das Komplementsystem zu fokussieren.

6.9. Die Aktivierung des Komplementsystems

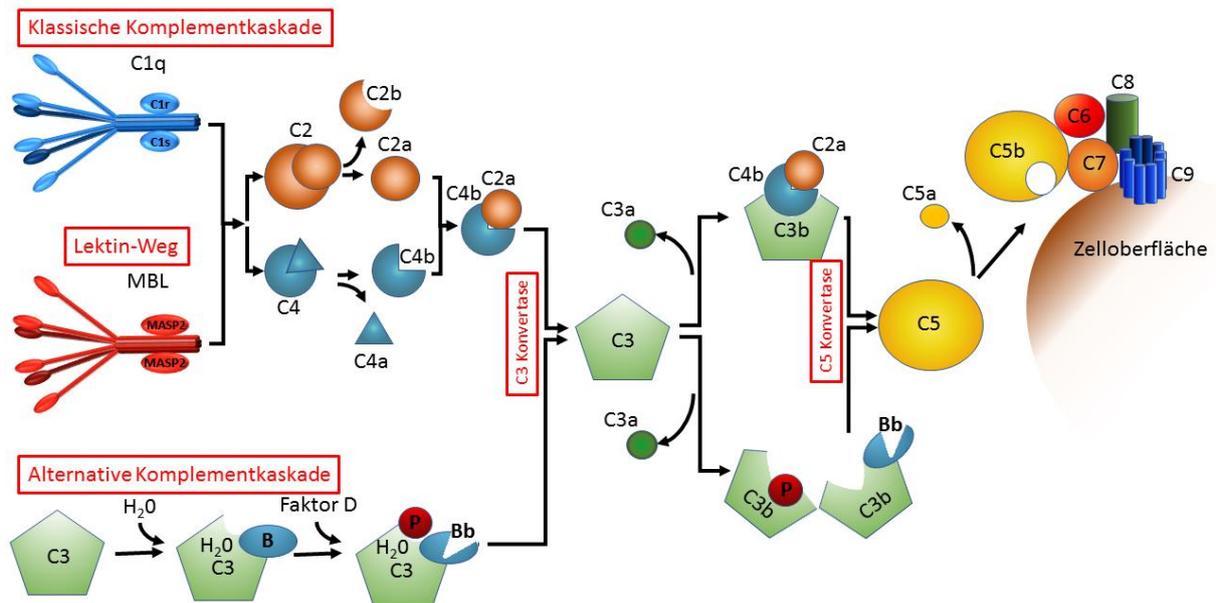


Abbildung 2: Schema des Komplementsystems eingeteilt in klassische Komplementkaskade (oben), Lektin-Weg (mitte) und alternative Komplementkaskade (unten) modifiziert nach [280]

Die klassische Komplementkaskade wird initiiert durch C1q, der Lektin-Weg über Mannosebindendes-Lektin (MBL). Beide Wege führen über die Aktivierung von C2 und C4 zur Bildung der C3-Konvertase C4bC2a. Der alternative Weg beginnt mit spontaner Hydrolyse von C3. C3-H₂O bindet an Faktor B (B). Unter Einfluss von Faktor D entsteht eine zweite Variante der C3-Konvertase C3bBbP (P= Properdin). Beide C3-Konvertasen katalysieren die Spaltung von C3 in C3a und C3b. Letzteres ist beteiligt in der Bildung der C5-Konvertase C3bBbC3b oder C4bC2aC3b. C5b beteiligt sich schließlich an der Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) bestehend aus C5b, C6, C7, C8 und C9.

Das Komplementsystem ist Teil des angeborenen Immunsystems, über die klassische Komplementkaskade ist es jedoch eng mit dem adaptiven Immunsystem verknüpft. Es ist verantwortlich für viele Effektorfunktionen von Antikörpern, wobei seine Hauptaufgabe in der Opsonisierung und Lyse von Erregern besteht [281-283].

Das Komplementsystem besteht aus 35 bis 40 Proteinen und Glykoproteinen, welche ubiquitär im Blutplasma und auf der Oberfläche von Zellen vorhanden sind [284]. Das Kernstück besteht aus neun Zymogenen welche von C1 bis C6 durchnummeriert sind [284]. Von der inaktiven Form können sie durch gegenseitige proteolytische Spaltung in die aktive Form übergehen. Funktionell sind sie kaskadenartig angeordnet (siehe Abbildung 2). Dabei können drei Aktivierungswege unterschieden werden:

6.9.1. Die klassische Komplementkaskade

Der typische Aktivierungsreiz für den klassischen Weg sind aktivierte Antikörper. C1q gilt als Rezeptormolekül für Fc-Stellen von Antikörpern vor allem der Klassen IgM und IgG Subtyp eins und drei [285]. IgM aktiviert C1q am effektivsten, weshalb die klassische Komplementkaskade eng mit dem Aufgabengebiet natürlicher Antikörper verknüpft ist [160]. Strukturell ist C1q ein Hexamer mit sechs globulären Köpfen, welche über kollagenähnliche Schwänze mit einander verbunden sind [286]. Binden mindestens zwei Köpfe an einen Antikörper, so kommt es zu einer Konformationsänderung am Kollagenende. Die aktivierte Serinprotease C1s entsteht, welche auf C2 und C4 proteolytisch wirkt [287]. Neben Antikörpern bindet C1q auch an verschiedene konservierte Oberflächenstrukturen, welche im Zusammenhang mit Zelluntergang oder entzündliche Prozesse im Blut auftreten können. So bewirkt auch der Kontakt von C1q mit Nukleinsäure, Chromatin, zytoplasmatische Filamente, mitochondrialen Membranen, Cardiolipin, gebundenem C-reaktives Protein und Amyloid eine Aktivierung der Komplementkaskade [288, 289].

6.9.2. Der Lektinweg

Der Lektinweg wird durch mannosebindendes Lektin (MBL) initiiert. Die Konzentration von MBL im Blutplasma ist etwa zehn Mal kleiner als C1q [284]. Dem zufolge spielt der Lektinweg eine eher untergeordnete Rolle. MBL ist C1q strukturell sehr ähnlich [286]. Es detektiert repetitive Muster an Mannose- und Fruktoseresten auf der Oberfläche von Zellen. Solche Muster sind kennzeichnend für Bakterien und Pilze, wodurch MBL zwischen fremden und körpereigenen Strukturen unterscheiden kann [284, 286]. Auf dieselbe Weise können jedoch auch späte Stadien apoptotischer oder nekrotischer Zellen erkannt werden [290]. Bindet MBL an seine Zielstruktur, so führt dies ähnlich wie bei der klassischen Komplementkaskade zur Spaltung von C2 und C4 in jeweils einen a-Teil und einen b-Teil [284]. C4b2b bilden einen heterodimeren Proteinkomplex welcher als C3-Konvertase bezeichnet wird [284].

6.9.3. Die alternative Komplementkaskade

C3 besitzt eine Thioesterbindung, welche leicht spontan hydrolysiert werden kann. Mit Hilfe der Plasmaproteine Faktor b und D führt dies zur Bildung des C3(H₂O)Bb-Komplexes, welcher als „alternativer“ Weg die Bildung des terminalen Membranangriffskomplex (C5-9) fördert [283, 284]. Es wurde beschrieben, dass auch dieser Weg durch gebundene Antikörper speziell vom IgG und IgA Typ verstärkt werden kann [289].

6.9.4. Der Membranangriffskomplex und dessen Spaltprodukte

Der am Ende der Kaskade entstehende Membranangriffskomplex (MAC) besteht aus den Komplementproteinen C5-9, welche sich in Form einer 0,4 bis 3nm breiten Poren in die Zellmembran einlagern [291]. Daraufhin kommt es zu einem sofortigen Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle. In der Folge kommt es zum Erliegen des Membranpotentials über den Mitochondrien, welches letztendlich zum Zelltod führt [292, 293]. Aufgrund der Fähigkeit kernhaltiger Zellen zur Selbstreparatur besteht bei niedriger MAC-Dichte die Möglichkeit sich diesem tödlichen Schicksal zu entziehen [294, 295]. Erst das Auftreten mehrerer solcher Ereignisse führt letztendlich zum Untergang der Zelle. Es handelt sich somit um einen Multi-Hit-Prozess [296].

Das Komplementsystem ist jedoch nicht nur eine serumvermittelte Lysemaschine. Im Laufe der Kaskade werden durch die proteolytische Spaltung viele Proteine freigesetzt, die selbst nicht an dem MAC-Komplex beteiligt sind. Dennoch sind sie weit mehr als nur wertlose Spaltprodukte. C3b, C4b und C1q sind verantwortlich für die Opsonisierung von Zielstrukturen [297, 298]. Granulozyten, Monozyten und T-Zellen werden durch C5a, C3a und C4a chemotaktisch angelockt und aktiviert [282, 299]. C3b aktiviert, wie zuvor gesehen, über die Bindung an CR2 die B-Zellen [300, 301]. Dies macht aus dem Komplementsystem ein multipotentes Effektororgan mit herausragender immunregulatorischer Bedeutung.

6.10. Einfluss von Komplementaktivierung auf Thrombozytenfunktion

Der Einfluss des Komplementsystems auf die Entstehung der venösen Thrombose ist bereits bekannt. Sowohl die Abwesenheit von C3 als auch von C5 führt zu einer Reduktion der Thrombusmasse in der Vena cava inferior im Mausmodell [119, 302]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind dabei noch nicht vollständig verstanden. Eine wesentliche Rolle könnte möglicherweise die Interaktion zwischen dem Komplementsystem und Thrombozyten spielen. Dabei können zweierlei Mechanismen unterschieden werden. Zum einen wurde beobachtet, dass sublytische MAC-Konzentrationen zu einer Depolarisation von Endothelzellen, Thrombozyten und Leukozyten führen und auf diese Weise aktiviert werden [303-306]. Dieser Prozess läuft vermehrt bei paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie (PNH) ab [307]. Zugrunde liegt hier eine mangelnde Komplementinaktivierung durch CD55 und CD59 [308, 309]. In der Folge kommt es zu einer vermehrten Thrombozytenaggregation, welche die erhöhte Inzidenz venöser und arterieller Thrombosen erklären kann [307, 310]. Zum anderen gibt es Berichte, dass auch die Bindung von einzelnen Komplementkomponenten ohne Aktivierung der Komplementkaskade Einfluss auf die Plättchenaggregation nehmen können [311]. Besonders im Fokus steht hier C3 [311]. Sein Fehlen führt zu gestörter Thrombozytenfunktion, erkennbar an der verlängerten Blutungszeit [302]. Zudem exponieren

Thrombozyten nach Kollagenaktivierung weniger vWF, P-Selektin, Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ und Phosphatidylserin, welches für eine geringere sekretorische Aktivität der Zellen spricht [119]. Dies spiegelt sich auch in der Entstehung der venösen Thrombose wieder. In C3 defizienten Mäusen werden nach Ligatur der Vena cava inferior schon in der Anfangsphase der Thrombusentstehung weniger Thrombozyten am Endothel adhären, welches nach 48h zu einer reduzierten Thrombusmasse führt [119, 312]. Dies spricht dafür, dass C3-Thrombozyteninteraktionen einen wesentlichen Beitrag zu der Entstehung der venösen Thrombose leistet [119, 312].

Neben der direkten Bindung gibt es auch die rezeptorvermittelte Interaktion zwischen dem Komplementsystem und Thrombozyten. Zu erwähnen sind cC1qR (bindet das Kollagenende von C1q) [313, 314], gC1qR/p33 (bindet die globulären Köpfe von C1q) [315-319] und CR2 (spezifisch für iC3b , C3d und C3dg) [320]. Alle genannten Komplementrezeptoren wurden an humanen Thrombozyten untersucht. Das genaue Rezeptorspektrum auf murinen Thrombozyten ist noch nicht geklärt.

Thrombozyten sind somit in vieler Hinsicht der Schlüssel, um die komplementvermittelte Thromboseentstehung zu verstehen. Die vermehrte Thrombozytenaktivierung hat weitreichende Folgen auch beispielsweise auf das Gerinnungssystem. So kann bei Aktivierung des Komplementsystems eine vermehrte Fibrinbildung in der venösen Thrombose beobachtet werden [119]. Erklärt werden kann dies über die vermehrte Exposition von negativ geladenem Phosphatidylserin und TF auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten [119, 303]. Dies wiederum führt zur Aktivierung sowohl der extrinsischen als auch der intrinsischen Gerinnungskaskade [119]. So konnte in Abwesenheit von C5 eine reduzierte Thrombusstabilität gemessen werden [119].

6.11. Thrombozytenvermittelte Komplementaktivierung

Die Aktivierung von Thrombozyten durch das Komplementsystem ist nicht nur ein einseitiger Prozess. Umgekehrt wird auch das Komplementsystem durch Thrombozyten fortlaufend aktiviert [321]. Daran beteiligt ist P-Selektin, das den alternativen Aktivierungsweg bedient [321]. P-Selektin enthält neun Sushi-domänen, wie sie auch auf vielen Komplementrezeptoren wie z.B. CR1 und 2 vorkommen [322]. Sie vermitteln die Bindung an C3b [277, 278]. Zudem wird die klassische Komplementkaskade auf humanen Thrombozyten durch gC1qR/p33 aktiviert [277]. Jedoch können ca. 80% der Komplementaktivierung auf Thrombozyten nicht durch diesen Mechanismus erklärt werden [277]. Es muss also noch weitere Aktivierungswege geben.

Bereits erwähnt wurde die komplementvermittelte Gerinnungsaktivierung mit Beteiligung von Thrombozyten. Umgekehrt muss in diesem Zusammenhang auf die gerinnungsvermittelte Komplementaktivierung hingewiesen werden. Die Spaltung von C3 und C5 kann beispielsweise direkt über Faktor IXa, Xa, XIa und Thrombin stattfinden [323]. Auch die klassische Komplementkaskade kann über Faktor XIIa gestartet werden [324, 325]. Thrombozyten sind zwar potente Gerinnungsaktivatoren, dennoch ist der hier beschriebene Prozess wenig spezifisch für diese Zellen.

Sehr viel spezifischer ist die Expression von Chondroitinsulfat A. Chondroitinsulfat ist ein Glykosaminoglykan, welches in Neuronen, Gliazellen, Zellen der myeloiden Reihe, Zellen der lymphoiden Reihe und Thrombozyten vorkommt [326-331]. Thrombozyten speichern es in der α -Granula [332-334]. Dies wurde sowohl durch biochemische, als auch histologische Methoden bestätigt [328, 329, 333]. Kommt es beispielsweise durch ADP oder Thrombin zur Aktivierung der Zelle, wird Chondroitinsulfat innerhalb kürzester Zeit ausgeschüttet und befindet sich dann teilweise gelöst, teilweise membrangebunden auf der Oberfläche der Thrombozyten [329, 332]. Dabei liegt es in vollsulfatierter Form vor [328]. Es ist von Chondroitin-4-sulfat zu unterscheiden, welches plasmatischen Ursprungs ist [328, 335]. C1q bindet mit hoher Avidität an das membrangebundene Chondroitinsulfat [336]. Dabei kommt es zur Aktivierung der klassischen Komplementkaskade [336]. Die Potenz, mit der das vollsulfatierte Chondroitinsulfat die klassische Komplementkaskade aktiviert, konnte anhand einer Patientengruppe gesehen werden, welche hiermit kontaminierte Heparinpräparate erhalten hat. Die Injektion führte zu starken anaphylaktischen Reaktionen aufgrund von Komplementüberaktivierung [337].

Der genaue Mechanismus, mit dem Chondroitinsulfat das Komplementsystem aktiviert, ist noch nicht vollständig geklärt. Klar ist, dass verschiedene Plasmaproteine, wie Antikörper, Albumin und Fibronectin, mit derartigen Oberflächen interagieren. Insbesondere Antikörper können hierbei Einfluss auf die Komplementaktivierung nehmen [279]. Tatsächlich sind auch spezifische Antikörper gegen Chondroitinsulfat keine Seltenheit. Während diese in Embryonen noch nicht messbar sind, steigt die Serumkonzentration bei Erwachsenen mit steigendem Alter stetig an [338]. Eine Zugehörigkeit zu der Gruppe der natürlichen Antikörper wurde bereits diskutiert [327, 338]. Besonders hohe Antikörpertiter können jedoch bei Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis und dem systemischen Lupus erythematodes gemessen werden [338, 339]. Beide Erkrankungen können mit Thrombozytopenien und thrombotischen Mikroangiopathien einhergehen [340-344]. Besonders ausgeprägt ist dies jedoch bei der bereits erwähnten Heparin-induzierten Thrombozytopenie. Eine Behandlung mit Chondroitinase ABC führt zu einer 60%-igen Reduktion der HIT-auslösenden Antikörper auf Thrombozyten [345]. Dies gilt ebenfalls für die

sogenannte späte Heparin-induzierte Thrombozytopenie, die auch fünf Tage nach der letzten Heparin-gabe durch anhaltend niedrige Thrombozytenwerte manifest werden kann [346]. Anand Padmanabhan et al. vermuten, dass Chondroitinsulfat ähnlich wie Heparin mit PF4 Komplexe bilden kann und somit immunogen wirkt [345]. Dies weist darauf hin, dass Chondroitinsulfat auf Thrombozyten im Prozess der Heparin-induzierten Thrombozytopenie einen zentralen Beitrag leistet und den Krankheitsprozess aufrechterhält.

III. Zielsetzung

Die venöse Thrombose ist mit zunehmendem Fortschritt der Medizin und Alterung der Gesellschaft ein führendes Problem des Gesundheitssystems. Nicht nur die Zahl der Erkrankten, auch die hohe Todesrate in Folge von Embolisation in die Lungenstrombahn zwingt zum Handeln. Der Beitrag von Antikörpern ist heute schon in verschiedenen klinischen Studien deutlich zu erkennen. So gehen Erkrankungen mit gesteigerter Antikörperproduktion mit oder ohne autoimmuner Komponente wie die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz oder anti-Phospholipid Syndrom mit einer deutlich erhöhten Inzidenz an venöser Thrombosen einher [10, 347-350]. Antikörper werden in der modernen Medizin auch zunehmend therapeutisch eingesetzt [14]. Auch dies ist mit einer erhöhten Thromboserate besonders in den ersten Stunden nach Applikation verbunden [14]. In Vorarbeiten konnte dieser Verdacht am Mausmodell nochmals bestätigt werden [351]. Antikörper-defiziente Tiere weisen einen nahezu vollständigen Schutz vor der Entwicklung venöser Thrombosen auf [351]. Dieser Effekt konnte durch Injektion fremder Antikörper rückgängig gemacht werden [351]. Besonders interessant hierbei ist, dass die spezifische Antigenbindung der Antikörper in diesem Zusammenhang keine Rolle spielt, denn auch Antikörper, welche gegen ein nicht relevantes Antigen gerichtet sind, weisen eine solche thrombosefördernde Eigenschaft auf [351]. Die Evidenz über die thrombogene Wirkung von Antikörpern ist somit groß. Unser oberstes Ziel ist es mehr Erkenntnisse für den zugrunde liegenden Mechanismus zu erhalten. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen für diese Arbeit:

1. Identifikation potentieller Bindungspartner von Antikörpern in der Entstehung der venösen Thrombose

Das Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation neuer potentieller Bindungspartner von Antikörpern in der Entstehung der venösen Thrombose. Hierbei richtet sich der Fokus vor allem auf Antikörper-Thrombozyteninteraktionen.

In Vorarbeiten konnte bereits die Bindung von Antikörpern speziell der Klasse IgM an das Endothel analysiert werden [351]. Mit diesem Ansatz kann das volle Ausmaß der venösen Thrombusbildung jedoch noch nicht erklärt werden. Eine bleibende Frage ist beispielsweise, wie die alleinige Substitution von IgG in antikörperdefizienten Mäusen zu der Entstehung venöser Thrombosen führen kann [351]. Um dieser und weiterer Fragen auf den Grund gehen zu können wird zu Beginn eine genaue Verteilungsanalyse der zwei großen Antikörperklassen IgG und IgM in dem Thrombusmaterial durchgeführt. Methodisch bietet sich die Histologie an, welche in Vorarbeiten bereits wertvolle Hinweise gegeben hat. Ziel dieser Analyse ist es, potentielle Bindungspartner zu identifizieren. Um Signalübereinstimmungen besser feststellen

zu können, werden Doppelfärbungen zum Einsatz kommen. Von besonderem Interesse ist auch die Art der Antikörperbindung im Thrombusinneren. Die histologische Untersuchung der KL25-Thromben sollen hier mehr Aufschluss geben. Entsprechend der Ergebnisse werden einzelne Strukturen des Thrombus im ELISA untersucht. Dies ermöglicht ihr Verhalten gegenüber Antikörpern isoliert zu betrachten und den histologisch erhobenen Verdacht zu erhärten. Auch im Hinblick auf *in-vitro*-Versuche ist es von Interesse, den Zeitpunkt der Antikörperbindung im Entstehungsprozess der venösen Thrombose abschätzen zu können. Hierfür werden frühe Thrombusstadien histologisch untersucht.

2. Analyse der Interaktionsmechanismen zwischen Antikörpern und Thrombozyten *in vitro*

Nachdem mögliche Bindungspartner identifiziert wurden, gilt es nun diese näher zu analysieren. Für Thrombozyten eignet sich die Durchflusszytometrie als besonders sensible Methode um das Verhalten fluoreszenzmarkierter Antikörper zu detektieren. Ziel ist es, ein besseres Verständnis für die Dynamik dieser Bindung zu gewinnen. Dies schließt auch die Analyse anderer Plasmaproteine ein. Hierdurch erhoffen wir uns mehr Kenntnisse über den Adhäsionsmechanismus und die Adhäsionsdynamik an Thrombozyten zu erhalten. Von besonderem Interesse ist auch, ob die Antikörperbindung durch äußere Faktoren beeinflussbar ist. Zum Einsatz kommen u.a. oben genannte Plasmaproteine (Albumin, Annexin V), sowie Enzyme mit Einfluss auf die Oberflächenglykokalix der Thrombozyten. Auch der Einfluss der Ladung dieser Zellen soll näher analysiert werden. Ziel dieser Untersuchung ist es u.a., einen therapeutischen Ansatz für dieses Phänomen zu entwickeln.

3. Konsequenzen der Antikörper-Thrombozyteninteraktion für die Entstehung der venösen Thrombose

Von besonderem Interesse ist natürlich, welche Auswirkung die Antikörperbindung auf die Funktion der Thrombozyten hat. Dies soll mit Hilfe von Aggregometrieversuchen genau analysiert werden. Mit Hilfe der Luciferin-Luciferase-Reaktion ist es zudem möglich, die ATP-Freisetzung zu messen. Indirekt ist auf diese Weise ein Rückschluss auf die Granulasekretion der Thrombozyten möglich. Der Einfluss der zwei großen Antikörperklassen IgG und IgM soll anhand der in Vorarbeiten verwendeten Knockout-Mausstämmen (sIgM^{-/-}, AID^{-/-} und sIgM^{-/-} AID^{-/-}) ermittelt werden. Die Rolle von Antikörpern, welche gegen ein irrelevantes Antigen gerichtet sind, können mit Hilfe von KL25 Mäuseplasma untersucht werden. Auf diese Weise sollen die Resultate der Histologie und der Durchflusszytometrieversuche in der Aggregometrie überprüft werden. Ziel ist es, zu testen, ob ein funktionelles Korrelat besteht,

welches die Ergebnisse erklären kann. Auch die Rolle natürlicher Antikörper soll untersucht werden. Das veränderte Repertoire in CR2^{-/-}-Tieren führte in Vorversuchen zu einer reduzierten Thrombusmasse und -inzidenz [351]. Ein möglicher Einfluss auf die Thrombozytenaggregation wurde nie getestet. Auf diese Weise soll eine möglichst genaue Idee davon entwickelt werden, welche Art von Antikörper in diesem Modell eine Rolle spielt. Daraus ergeben sich wiederum Möglichkeiten für die Beeinflussbarkeit der Antikörperbindungen.

4. Identifikation des thrombozytenstimulierenden Reizes nach Antikörperbindung

In einer weiteren Versuchsreihe soll auch geklärt werden, wie diese antikörpervermittelte Thrombozytenaktivierung physiologisch von statten geht. Ein Beitrag von Fcγ-Rezeptoren kann aufgrund mangelnder Expression ausgeschlossen werden [352]. Einen Einfluss durch den IgM-Rezeptor Toso gilt es zu überprüfen. Des Weiteren ist ein enges Zusammenspiel zwischen Antikörpern und dem Komplementsystem bekannt [353]. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass das Komplementsystem (vor allem C1q und C3) in der Entstehung der venösen Thrombose eine bedeutende Rolle spielt [312]. Ein Beitrag zu der Leukozytenrekrutierung nach 48h Ligatur wurde beschrieben [312]. Hier soll geprüft werden welchen Einfluss Komplementproteine auf die Funktion der Thrombozyten haben. Zu diesem Zweck stehen Knockout-Mäuse zur Verfügung. Im Anschluss soll der Zusammenhang zu den gesehenen Antikörpern auf der Oberfläche von Thrombozyten überprüft werden. Auch die Leukozytenrekrutierung soll in diesem Kontext nochmals neu untersucht werden und auf diese Weise die Interaktion zwischen Antikörpern und Thrombozyten in einen großen Zusammenhang gesetzt werden.

IV. Methoden

1. Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden an Mäusen durchgeführt. Diese Tierart bot uns die besten Bedingungen zum Erreichen unseres Forschungsvorhabens. Genetisch und immunologisch wurde die Maus bereits sehr gut erforscht. Sie zeichnen sich durch eine rasche Vermehrung aus. Dadurch sind Knockout-Stämme leichter zu generieren und sind schnell verfügbar. In vorausgegangenen Projekten konnte bereits Erfahrung mit diesen Tieren gesammelt werden. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse von der Maus auf den Menschen ist für die humanmedizinische Forschung von besonderer Bedeutung und stand auch in diesem Projekt stets im Vordergrund. Vorversuche haben hier in Bezug auf die venöse Thrombose eine sehr genaue Übereinstimmung gezeigt [5, 354]. Alle Mausstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind phänotypisch gesund und züchten normal.

Die im folgenden beschriebenen Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt, gemäß §8 des Tierschutzgesetzes (Fassung vom 18. Mai 2006, zuletzt geändert am 28. Juli 2014) mit den Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-30-13, 55.2-1-54-2531.3-41-13 und 55.2-1-54-2532-198-14.

1.1. Wildtypstamm C57Bl/6J Mäuse

C57Bl/6J ist ein weit verbreiteter Wildtypmausstamm. Er stellt häufig den genetischen Hintergrund für Knockout-Stämme dar. Darum wurde C57Bl/6J bei fast allen Mauslinien als Kontrollgruppe verwendet (Ausnahme C μ 13). Dies ist wichtig um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Bezogen wurden die Tiere von The Jackson Laboratory. In Vorarbeiten konnte bereits ausreichend Sicherheit im Umgang mit den Tieren gewonnen werden.

1.2. Wildtypstamm Balb/c

Die Mäuse der Linie balb/c wurden von Janvier Labs erworben. Auch dies ist ein gebräuchlicher Wildtypstamm. Er diente in dieser Arbeit als Kontrollstamm für die Linie C μ 13, welche auf der Grundlage von balb/c gezüchtet wurde.

1.3. Genetisch veränderte Mauslinien

1.3.1. sIgM-Knockout Mauslinie

Die sIgM-Knockout Mauslinie wurde durch gezieltes setzen einer Mutation in dem für die schwere μ -Kette kodierenden DNA-Strang generiert. Hierbei wurde der für die Löslichkeit der IgM-Antikörper verantwortliche μ_S -Exonabschnitt durch μ_M , einen membranbindenden Kettenabschnitt über einen cDNA-Vektor ersetzt [355]. In der Folge können B-Zellen nur noch membrangebundene IgM Rezeptoren produzieren. Der lösliche Anteil beschränkt sich im Serum dieser Mäuse auf eine Konzentration von etwa 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Zum Vergleich, im Serum von Wildtypmäusen finden sich 250 $\mu\text{g/ml}$ IgM) [351, 355]. Die Fähigkeit zum Klassenwechsel bleibt jedoch erhalten. Auf diese Weise kann mit Hilfe der sIgM^{-/-} Mauslinie isoliert der Einfluss von löslichem IgM untersucht werden, ohne dass eine B-Zelldysfunktion aufgrund von fehlenden Rezeptoren vorliegt [355]. Bedingt durch erhöhte IFN- γ Spiegel läuft dieser vermutlich verstärkt ab, sodass die IgG-Konzentration 43% über dem Niveau des Wildtyps liegt [351, 355]. Neben den vier Unterklassen IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 sind auch Antikörper der Klasse IgA im Serum der Mäuse messbar [355]. Aufgrund der niedrigen Konzentration und der eher lokalen Wirkung ist die IgA-Aktivität eher zu vernachlässigen.

1.3.2. AID-Knockout Mauslinie

Diese Mauslinie zeichnet sich durch das Fehlen der Antikörperklasse IgG aus. Dem zugrunde liegt ein Defekt des Enzyms activation-induced cytidine desaminase (AID). Es ist bei dem Klassenwechsel von IgM zu IgG beteiligt und unterstützt auch die somatische Hypermutation während der Reifungsphase der B-Lymphozyten. Dadurch entsteht ein absoluter Mangel an IgG2b, IgG3 und IgA; die Konzentration an IgG1 und IgG2a schrumpft auf weniger als ein Zehntel vom Ausgangswert [356]. Im Gegenzug steigt die IgM Konzentration um 32% an, vermutlich bedingt durch eine stärkere B-Zellakkumulation und Aktivierung [356]. Dies kann zu einer Überschätzung der Bedeutung von IgM in den Versuchsauswertungen führen. Allerdings weisen die IgM-Antikörper durch die fehlende Hypermutation im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Affinität auf [356].

1.3.3. sIgM-AID-Knockout Mauslinie

Durch die Kombination aus sIgM- und AID-Knockout fällt die Synthese löslicher Antikörper vollständig aus. Trotz der fehlenden Antikörper bleibt die Produktion von Lymphozyten erhalten, die membranständigen B- und T-Zellrezeptoren werden durch den Knockout nicht beeinträchtigt [357]. Dies ist ein klarer Vorteil gegenüber der Mauslinie Rag1, bei der die Produktion von Lymphozyten unterbrochen ist [358]. Trotzdem gibt es auch bei der

slgM^{-/-}AID^{-/-}-Linie geringe Einschränkungen in Bezug auf die Vergleichbarkeit der Blutzellzahlen. Im Gegensatz zu den Einzelknockouts zeigt sich hier eine signifikante Erhöhung der Leukozytenzahlen in allen drei Zelllinien [351].

1.3.4. KL25 Mauslinie

KL25 ist eine transgene Mauslinie. Hier wurde der Ig_H (Immunglobulin heavy chain) Lokus (J_H) in embryonalen Stammzellen (Herkunft C57BL/6J) durch Lymphozytic choriomeningitis Virus-spezifische V_HDJ_H Regionen in homologer Rekombination ersetzt [359]. In der erwachsenen KL25 Maus findet sich das auf diese Weise veränderte Antikörpergenom in >95% der B-Zellen [359]. Dies hat Auswirkungen sowohl auf die Spezifität von IgM als auch von IgG Antikörper. Ein anti-Lymphozytic choriomeningitis Virus (LCMV) Titer ist bereits vor Antigenkontakt in niedrigem Ausmaß messbar. Nach Antigenkontakt steigt er deutlich an [359]. Um einen Bias durch inflammatorische Einflüsse zu vermeiden, wurden die Tiere jedoch gezielt unter Verschluss von LCMV gehalten.

Die Mäuse der Linie KL25 eignen sich gut um die Rolle von Antikörpern zu untersuchen, die gegen ein irrelevantes (im Organismus nicht vorhandenes) Antigen gerichtet sind. Im Gegensatz zu injizierten Antikörpern werden sie in diesem Modell von der Maus selbst produziert [359]. Auf diese Weise sind sie funktionsfähig und eine immunologische Beeinflussung durch Fremdproteine kann ausgeschlossen werden. Zudem fallen Titterschwankungen, die durch Injektion von Antikörpern entstehen, weg. Aufgrund der niedrigen Antikörpergesamtkonzentration in LCMV-freien Mäusen, konnte jedoch nicht in jedem Versuchsaufbau auf eine zusätzliche Injektion von Antikörper verzichtet werden [359]. Durch intravenöse Verabreichung von Serum einer zweiten KL25 Maus konnte sie zeitweise auf ein normales Niveau von Wildtypmäusen gehoben werden. Auf diese Weise war eine bessere Vergleichbarkeit gegeben.

1.3.5. Toso-Knockout Mauslinie

Der Toso-Knockout wurden gezüchtet durch isolierte Deletion des für den Toso-Rezeptor verantwortlichen Genabschnitts [360]. Im Wildtyp kommt Toso in Granulozyten, Monozyten und B-Zellen vor [360]. Er ist ein IgM-spezifischer Fc-Rezeptor, der weitreichende Wirkung in Inflammation und Antikörperentwicklung hat. Sein Einfluss reicht bis in den Golgi-Apparat [361]. Die Deletion des Toso-Rezeptors führt von dort aus zu einer starken Überexpression von membrangebundenen Antikörperrezeptoren auf der Zelloberfläche [361]. Auf diese Weise scheint er ein Rezeptorgleichgewicht auf der Zelle herzustellen. Zusätzlich nimmt Toso Einfluss auf das Antikörperrepertoire. In Toso^{-/-} Mäusen können erhöhte Konzentrationen

natürlicher, wie auch autoreaktiver Antikörper gefunden werden [361]. Toso hat somit nicht nur Auswirkungen auf zellulärer Ebene, sondern auch auf den gesamten Organismus. Besonders spürbar wird der Toso-Rezeptormangel bei Immunreaktionen auf einwandernde Bakterien wie *Lysteria monocytogenes*. In der Folge kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Phagozytenleistung von Granulozyten und Monozyten, ebenso wie zu einer deutlich verringerten Zytokinsekretion wie IL-6 und TNF- α [360]. Schlussendlich führt eine vergleichbar harmlose Bakterienzahl zu einem letalen Ausgang in Toso^{-/-} Mäusen [360]. Auswirkungen auf die Leukozytenzellzahl oder Antikörperkonzentration sind jedoch nicht bekannt.

1.3.6. C μ 13 Mauslinie

Anhand der C μ 13 Mauslinie konnten wir den Einfluss der Komplementaktivierung durch IgM untersuchen. Sie war hierfür besonders geeignet, da sie sich von dem Wildtypstamm nur durch eine Punktmutation in der μ -Kette unterscheidet [362]. Dieser genetische Unterschied führte zu einem isolierten Verlust der Fähigkeit zur Komplementaktivierung durch IgM [362]. Trotz des Funktionsverlustes zeigt C μ 13-IgM keine strukturellen Veränderungen [362]. Zudem besitzt es eine vergleichbare Fähigkeit zur Agglutination und eine ähnliche Halbwertszeit, gemessen am Wildtyp. Sowohl die Primär- als auch die Sekundärimmunantwort scheint unverändert [362]. Dadurch bleibt die Vergleichbarkeit bestmöglich erhalten. Dieser Stamm wurde vor einem Balb/c Hintergrund gezüchtet, sodass entsprechend Balb/c Tiere als Kontrollen verwendet wurden.

1.3.7. Albumin-Knockout Mauslinie

Die Albumin-Knockout Mauslinie wurde verwendet um den Einfluss von Albumin auf die Antikörperakkumulation auf aktivierten Thrombozyten zu untersuchen. Gezüchtet wurde sie vor einem C57Bl/6J-Hintergrund durch Bruch im albuminkodierenden DNA-Strang [363]. Dies erfolgte durch Einbringen von TALEN-mRNA (Transcription activator-like effector nuclease) in das Zytoplasma befruchteter Oozyten [363]. Das synthetisierte TALEN wandert in den Zellkern und führt dort zu Doppelstrangbrüchen in den albuminspezifischen Gensegmenten. In der Folge kann kein Albumin mehr produziert werden [363].

Albumin ist das Plasmaprotein mit der höchsten Konzentration im Blut von Säugetieren [363]. Dementsprechend leistet es den größten Beitrag zum Erhalt des intravasalen kolloidosmotischen Druckes. Zudem hat Albumin eine herausragende Rolle als löslicher Speicher und Transporter verschiedenster Hormone, Fettsäuren und Stoffwechselprodukte [364-366]. Entsprechend folgt in diesen Tieren ein Anstieg unter anderem von Bilirubin, Lipase, Calcium, Alanin Aminotransferase, Aspartat Aminotransferase, Low-density-lipoprotein, High-

density-lipoprotein und total Triglyzeride [363]. Durch vermehrte Produktion aller anderen Plasmaproteine wird der kolloidosmotische Druck teilweise auf subphysiologischem Niveau aufrechterhalten [363]. All dies hat Auswirkungen auf das allgemeine Proteingleichgewicht im Blut. Die erhöhten Blutfettwerte sind unabhängige kardiovaskuläre Risikofaktoren, welche Versuchsergebnisse negativ beeinflussen können [367]. Ein Einfluss auf die Blutgerinnung wurde jedoch nicht beschrieben [363]. Neben der Antikörperassoziation zu Thrombozyten konnte auch die Auswirkung fehlender osmotischer Teilchen untersucht werden. Da nicht nur Albumin, sondern auch Antikörper osmotisch wirksam sind, stellt Albumin^{-/-} diesbezüglich eine Art Kontrollgruppe für slgM^{-/-}AID^{-/-} dar. Auf diese Weise kann ausgeschlossen werden, dass der Antikörpermangel einen antikörperspezifischen Effekt vortäuscht, der eigentlich einem Mangel kolloidosmotischer Teilchen zugeschrieben werden kann.

1.3.8. PF4Cre/ROSA-YFP Mauslinie

Die PF4Cre/ROSA-YFP Mauslinie zeichnet sich durch die Expression von YFP (Yellow fluorescent protein) in Megakaryozyten und Thrombozyten aus [368]. Dies macht sie ideal zur sicheren Identifikation dieser Zeller im peripheren Blutstrom. Zudem war der interne Leuchtstoff wichtig, um die Antikörperinteraktion mit der Oberfläche von Thrombozyten frei von zusätzlichen Einflussfaktoren wie etwa Farbstoffen unter dem Mikroskop studieren zu können. Eine zusätzliche Oberflächenmarkierung wäre mit der Gefahr verbunden, die zu untersuchenden Antikörper zu verdrängen oder anderweitig mit der Interaktion zu interferieren. Sie wurde gezüchtet durch den Ersatz des Plättchen Faktor 4 Exons durch einen Cre cDNA-Abschnitt [368]. Daraufhin fand eine Kreuzung mit einer ROSA26-lacZreporter Maus statt. YFP wird bei einer Wellenlänge von 500 +/- 20nm angeregt und emittiert bei einer Wellenlänge von 530nm. Dies ermöglicht es Thrombozyten ohne eine weitere Färbung durch Fluoreszenz zu detektieren. Änderungen im Blutbild oder schwere Einschränkungen in der Funktion sind nicht bekannt.

1.3.9. C1q-Knockout Mauslinie

Die C1q-Knockout Mauslinie wurde hergestellt, indem ein Neogen (pMC1 Neo-poly A⁺) mittels SmaI-Restriktionsendonuklease in den C1q-kodierenden Genabschnitt eingefügt wurde [369]. Entsprechend konnten keine bzw. nicht funktionale C1q-Moleküle im peripheren Blut gemessen werden [369]. Auswirkungen auf das allgemeine Plasmaproteingleichgewicht konnten bisher nicht gesehen werden. C1q-knock-out Tiere zeigen eine gestörte Elimination apoptotischer Zellen. In der Folge können vermehrt Autoimmunantikörper, wie z.B. anti-Nukleäre Antikörper oder anti-Histon Antikörper im Serum der Tiere gemessen [369]. Diese sind verantwortlich für Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes [369].

1.3.10. C4-Knockout Mauslinie

Die C4-Knockout Mauslinie wurde durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen hergestellt. Ersetzt wurde die C4Ss-kodierende DNA-Sequenz durch ein Phosphoglyceratekinase-Neogen [370]. Auch bei C4-Defizienz wurde vor allem im Zusammenhang mit bakteriellen Infektionen ein vermehrtes Auftreten von anti-DNA Autoimmunantikörpern der Klasse IgM und IgA gesehen [370]. Dies deutet darauf hin, dass die klassische Komplementkaskade für die Beseitigung von überflüssigen oder pathogenen Antigenen, von besonderer Bedeutung ist.

1.3.11. C3-Knockout Mauslinie

Die C3-Knockout Mauslinie wurde ebenfalls mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen gezüchtet [371]. Der eingefügte Vektor beinhaltet eine DNA-Kassette aus der Hefe mit Promotor- und Terminatorsequenzen aus Phosphoglyceratekinasegenen [371]. In der Folge konnten im peripheren Blut mittels ELISA keine C3-Moleküle mehr gemessen werden. Die Auswirkungen auf die Immunabwehr der Mäuse war deutlich. Im Gegensatz zu den zuvor gesehenen Knockouts der klassischen Komplementkaskade gibt es bisher noch keine eindeutigen Hinweise auf vermehrtes Vorkommen von Autoimmunantikörpern. Hingegen konnte eine deutlich erhöhte Mortalität bei Streptokokkensepsis gesehen werden [371]. Dies weist auf eine mangelnde Eliminationsfähigkeit gegenüber Pathogenen hin.

1.3.12. C5-Knockout Mauslinie

Die C5-Knockout Mauslinie B10.D2/oSnJ stammt aus normaler C57Bl/6J Inzucht [372]. In seltenen Fällen kommt es hier zu spontanen Mutationen, in der C5-kodierenden DNA-Sequenz [372]. Im Falle der Mauslinie B10.D2/oSnJ konnten mehrere Deletionen und Insertionen nachgewiesen werden [373]. Verantwortlich für den Ausfall der C5-Produktion ist vermutlich eine Deletion in der Nähe des 5'-terminalen Endes. Diese führt zu einem Frameshift, sodass das terminale Codon erst vier Basenpaare später abgelesen wird [374]. In der Folge kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Transkription der C5-kodierenden DNA-Sequenz auf etwa 5% des Ausgangswertes [373, 374]. Aufgrund des längeren Leserahmens ist zudem auch von einer qualitativen Veränderung des resultierenden C5-Proteins auszugehen [373, 374]. C5-defiziente Mäuse zeichnen sich durch fehlende komplementvermittelte hämolytische Aktivität sowie einer schwer beeinträchtigten Chemotaxis aus [375-380]. Die Folgen für das Immunsystem sind schwerwiegend. Die betroffenen Tiere sind deutlich vulnerabler gegenüber bakteriellen Infektionen und Sepsis [379-383].

1.4. Haltung

Die Haltung der Mäuse wurde nach den Richtlinien der Federation of European Laboratory Animal Associations (FELASA) durchgeführt. Die Tiere wurden gewichtsabhängig in Makrolon-Käfigen in Gruppen zwischen zwei bis vier gehalten. Jeder Käfig enthielt saugstarken Weichholzfaser-Einstreu, welcher wöchentlich gewechselt wurde. Das Enrichment bestand aus grobem Einstreu (Abbed Nestbaumaterial B E-011, Faserbreite 3,5mm, E-012, Faserbreite 4mm + NGU E014, Faserbreite 120mm) und aus einem Häuschen aus Pappe. Die Versorgung mit Nahrung und Wasser erfolgte ad libitum vom Käfigdeckel. Zu jeder Zeit stand jedem Tier pelletiertes Futter (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) zur Verfügung und Leitungswasser in Getränkeflaschen.

Die Käfige wurden in Tierhaltungsschränken (Bioscape Uniprotect, Bioscape GmbH, Castrop-Rauxel) gelagert. In jedem Schrank herrscht ein eigenes Mikroklima. Die Temperatur beträgt $22\pm 1^\circ\text{C}$ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55\pm 5\%$. Zudem wurde künstlich durch elektrisches Licht ein 12-Stunden Tag-Nachrhythmus etabliert. Zugang zu dem Raum haben nur ausgesuchte Tierärzte und Tierpfleger. Vor dem Betreten muss eine hygienische Händedesinfektion durchgeführt werden. Zudem müssen in einer Schleuse Schuhüberzieher angezogen werden und ein Kittel, der den Haltungsraum nicht verlässt. Auf diese Weise werden Kontaminationen bestmöglich vermieden.

1.5. Einschlusskriterien für die Tierversuche

Da die Zucht der Tiere außerhalb unserer Einrichtung stattfand, wurde eine Mindestaufenthaltsdauer von sechs Tagen in unserer Haltung eingehalten. Auf diese Weise konnten sich die Tiere an die veränderten Umweltbedingungen anpassen und Stress konnte reduziert werden. Es wurden keine Tiere in den Versuch genommen, die aus tierärztlicher Sicht äußerlich einen kranken Eindruck machten. Das Alter der Tiere lag zwischen 10 und 20 Wochen. Beide Geschlechter wurden gleichermaßen in den Versuchen berücksichtigt.

2. Operationsverfahren

2.1. Narkose

Die Narkoseeinleitung wurde mithilfe einer durchsichtigen Plexiglasröhre durchgeführt, in die 3.0Vol% Isofluran (Isofluran CP®, cp pharma, Burgdorf) gemischt mit ~97.0 Vol% Sauerstoff eingeführt wurden. Nach Erlöschen der Stellreflexe wurde die Maus stressfrei entnommen und auf eine Trippelnarkose aus Fentanyl (HEXAL®, Hexal AG, Holzkirchen; Dosis 0,05mg/kg

Körpergewicht), Medetomidin (Dorbene®, Pfizer GmbH, Hameln; Dosis 0,5mg/kg Körpergewicht) und Midazolam (Midazolam-hameln®, Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln; Dosis 5mg/kg Körpergewicht) umgestellt. Die Verabreichung erfolgte als single-shot schonend per Intraperitonealinjektion verdünnt mit 0,1ml 0,9%-NaCl-Lösung (Isotonische Kochsalzlösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Bis zum Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurden die Mäuse zum Schutz vor äußeren Reizen in einer belüfteten Box gelagert. Erst nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes wurde die Operation begonnen. Während der Operation wurde dieser Reflex regelmäßig überprüft, um die Narkosetiefe zu überwachen. Ggf. wurde eine halbe Dosis Narkosemischung hinzugegeben. Die Lagerung fand auf einer Heizmatte (Intraoperatives Tierwärmesystem IOW-3704, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach) statt. Die Temperatur der Matte konnte mit Hilfe einer Rektalsonde geregelt werden. Auf diese Weise blieb die Körpertemperatur des Tieres konstant zwischen 37 und 38°C.

Bei chronischen Versuchen, beispielsweise nach Ligatur der Vena cava inferior, wurde nach der Operation die Narkose direkt antagonisiert, um Komplikationen während der Nachschlafphase zu vermeiden. Verwendet wurde Atipamezol (Antisedan®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Germany; Dosis 3,75mg/kg Körpergewicht) und Flumazenil (Flumazenil-Inresa®, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Germany; Dosis 0,72mg/kg Körpergewicht). Die Schmerzstillung fand postoperativ mithilfe von Buprenorphin (Temgesic®, Reckitt Benckiser Healthcare, Hull, UK; Dosis 0,1mg/kg Körpergewicht) statt. Es wurde 30 Minuten vor Operationsende erstmalig subkutan verabreicht und anschließend alle 12h nachdosiert.

Für die Operation wurde mikrochirurgisches Besteck verwendet. Die Desinfektion der Materialien erfolgte vor jeder Operation mit einem Flächendesinfektionsmittel (Bacillol® AF, Bode Chemie GmbH, Heidenheim). Anschließend wurden die Instrumente für 24h in ein Bad aus Instrumentendesinfektionsmittel (Sekusept® Plus, Ecolab GmbH & Co. OHG, Düsseldorf) eingelegt.

Vor der Operation wurden die Mäuse mit einer Analysenwaage (Kern ABJ, Kern&Sohn GmbH) gewogen. Nach Narkoseeinleitung wurde das Operationsfeld vorbereitet. Das Fell wurde am Bauch rasiert (Ermila Magnum Handy, Wahl GmbH, Unterkirnach) und anschließend vollständig mit Enthaarungscreme enthaart (asid®-med, Asid Bonz GmbH, Herrenberg, Germany). Um die Austrocknung der Hornhaut zu verhindern wurde großzügig 5%-ige Dexpanthenol Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vitsl GmbH, Leverkusen, Germany) aufgetragen. Anschließend wurde die Maus mit dünnen Klebestreifen (Transpore™ 3M, 3M Deutschland GmbH, Health Care Business, Neuss, Germany) in

Rückenlage auf der Wärmematte fixiert und das Operationsfeld mit einem Hautantiseptikum (Octenisept®, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) desinfiziert.

Die mikrochirurgische Arbeit wurde unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops (Stemi-2000-C, Zeiss, Jena) mit einer Kaltlichtquelle (Chott-Kaltlichtquelle KI200, Zeiss, Jena) deutlich erleichtert.

2.2. Stenosierung der Vena cava caudalis

Nach Prüfung ausreichender Narkosetiefe wurde das Operationsfeld wie oben beschrieben vorbereitet. Der Eingriff begann mit einem ca. ein Zentimeter langen medianen Hautschnitt vom Xyphoid bis zum Bauchnabel. Die darunter liegende Bauchwand inklusive des Peritoneums wurde vorsichtig vom Nabel ausgehend entlang der Linea alba durchtrennt. Anschließend wurden die Darmschlingen mit Hilfe von angefeuchteten Wattestäbchen (Wattestäbchen, Noba Verbandmittel Danz GmbH, Wetter, Deutschland) aus dem Abdomen auf die linke Seite der Maus nach außen verlagert. Um die Sterilität zu gewährleisten wurde der Darm in etwas erhöhter Lage auf einem Histocage (Rotilabo®- Einbettkassetten für Biopsien, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe) gelagert und in feuchter steriler Gaze (Mullkompressen, NOBA Verbandmittel Danz GmbH, Wetter) eingebettet. Um die Austrocknung der ausgelagerten Organe zu vermeiden, wurde während der Operation mehrfach sterile 0,9%-NaCl-Lösung auf das eingewickelte Konvolut geträufelt. Ggf. wurde zur besseren Übersicht die Bauchwand auf der rechten Seite der Maus mit Haltefäden (7-0, Prolene, monofil, nicht resorbierbar, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) durch Muskulatur und Peritoneum zur Seite gehalten und somit das Operationsfeld vergrößert. Anschließend wurde die Vena cava vorsichtig von dem umliegenden Binde- und Fettgewebe gelöst und ein ca. 1,5cm langer Faden (8.0 Premilene, monofil, nicht resorbierbar, B. Braun Aesculap, Aesculap AG & CO. KG, Tuttlingen) caudal der Vena renalis um das Gefäß geschlungen. Um nach Ligatur eine einheitliche Flussgeschwindigkeit zu erreichen wurde zunächst ein ca. 0,5mm langes Drahtstück als Platzhalter in die Fadenschlinge eingelegt. Die Schlinge wurde mit einem doppelten chirurgischen Knoten zugezogen und der Platzhalter entfernt. Auf diese Weise wurde intravasal eine Flussverlangsamung um 70-80% erreicht. Die Fadenenden wurden ausreichend gekürzt und das Darmkonvolut an seinen ursprünglichen Ort zurückverlagert. Das Peritoneum und die Muskulatur wurden gemeinsam mit Hilfe eines Fadens (7-0 Prolene, monofil, nicht resorbierbar, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) in einer fortlaufenden diagonalen Kürschnernaht verschlossen. Die Haut wurde separat mit dem gleichen Faden vernäht. Abschließend wurde desinfizierende Jodlösung aufgetragen (Braunol®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) und die Narkose wie oben beschrieben antagonisiert.

Ausschlusskriterien für die Weiterführung des Versuches waren Verletzungen oder starke Blutungen im Bereich der Vena cava oder Aorta. Des Weiteren wurden die Tiere bei Verschlechterung des Allgemeinzustandes vorzeitig getötet.

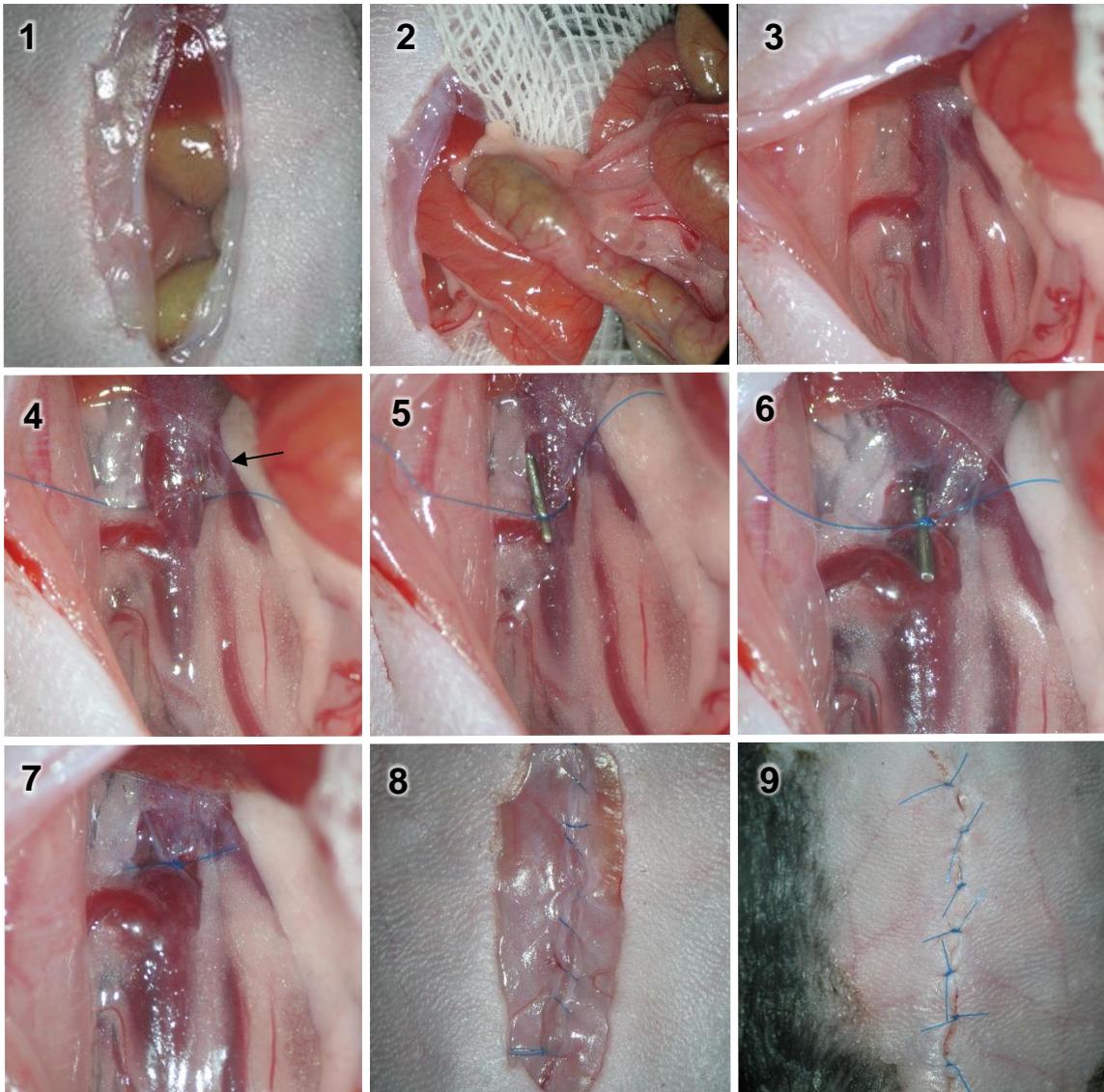


Abbildung 3: Operationsablauf Stenosierung der Vena cava inferior

1. Hautschnitt und Eröffnung des Peritoneums. Blick auf Darmschlingen. 2. Auslagerung der Darmschlingen auf sterile und angefeuchtete Kompressen. 3. Blick auf die Vena cava caudalis. 4. Vorsichtige Untertunnelung der Vena cava und Durchzug eines Ligaturfadens (Dicke: 8-0) kaudal der linken Vena renalis (Pfeil) 5. Vorlegen eines einfachen chirurgischen Knotens und Einführen eines Platzhalters. 6. Setzen der Ligatur und Anlage eines doppelten Knotens bei liegendem Platzhalter. 7. Stenosierte inferiore Vena cava nach Entfernung des Platzhalters. 8. Rückführung der Darmschlingen und Verschluss des Peritoneums in fortlaufender Naht. 9. Hautnaht in Einzelknüpftechnik.

2.3. Sham-Operation

Um auszuschließen, dass das Operationstrauma alleine eine Thrombose auslösen kann wurde die Sham-Operation durchgeführt. Die Operation glich exakt dem oben genannten Ablauf, jedoch wurde anstelle der stenosierenden Ligatur eine lockere nicht einengende Fadenschlinge (8-0) angelegt und doppelt verknotet. Die Maus wurde wieder verschlossen und die Narkose antagonisiert. Nach 48h wurde die Maus wieder in Narkose versetzt. Das Gefäß wurde wie oben beschrieben eröffnet, gespült und entnommen. Das ermittelte Gewicht des entnommenen Präparates diente als Leerwert zur Bestimmung des Thrombusgewichtes.

2.4. Entnahme der Vena cava caudalis

Zur Thrombusgewinnung wurde der Versuch nach 48h beendet. Die Maus wurde wieder in Narkose gelegt und auf dem Rücken fixiert. Der Zugang erfolgte mit einem Paramedianschnitt, der zu einem rechteckigen Lappen erweitert wurde. Das Darmkonvolut wurde erneut aus dem Abdomen nach extern verlagert. Ca. 0,5mm cranial der Ligatur wurde die Vena cava durchtrennt. Dadurch setzte unmittelbar eine starke Blutung ein, an der die Maus verstarb. Daraufhin wurde das Herz transthorakal (siehe Abschnitt zuvor) punktiert und mit einer 5ml-Spritze (BD Discardit™ II, Becton Dickinson S.A., Fraga, Huesca, Spanien) 5ml 0,9%-NaCl-Lösung infundiert. Dadurch wurde der ligierte Abschnitt der Vena cava gespült und verhindert, dass intravasal verbleibendes Blut nachträglich gerinnt und das Ergebnis verfälscht. Die freie Flüssigkeit in der Bauchhöhle wurde entfernt. Im Anschluss wurden die Vena cava und die Aorta an deren Aufzweigung in die Arteriae iliacae gemeinsam untertunnelt und mit dem oben genannten 7-0 Faden abgebunden. Kaudal der Ligatur wurde ein Schnitt gesetzt beide Gefäße als Ganzes stumpf freipräpariert und geborgen.

Nach äußerlicher Inspektion wurde das Präparat auf ein 0,5 x 0,3cm großen Filterpapier (Machery-Nagel GmbH & Co.KG, Düren) gelegt und das Gewicht mit einer Feinwaage bestimmt. Der ermittelte Wert umfasst den Thrombus, den Teilabschnitt der Vena cava caudalis und der Aorta abdominalis, sowie die Ligaturfäden. Das reine Thrombusgewicht wurde errechnet indem der Mittelwert der Shamgruppe (siehe Punkt 2.3) von dem ermittelten Gewicht abgezogen wurde.

Im Anschluss an die Gewichtsbestimmung wurde der Thrombus samt Gefäß in einem transparenten Schlauchstück überführt, in Tissue-Tek (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet und als Ganzes in einem 1,5ml Eppendorf-Gefäß (Eppendorf Tubes®, Eppendorf AG, Hamburg) gelagert. In diesem luft- und wasserdichten Gefäß wurde der Thrombus ohne weitere zeitliche

Verzögerungen in Flüssigstickstoff schockgefroren und für weitere Anwendungen im Tiefkühlschrank bei -80°C gelagert.

2.5. Intrakardiale Blutentnahme

Zur intrakardialen Blutgewinnung wurde eine 2ml-Spritze (BD Discardit™ II, Becton Dickinson S.A., Fraga, Huesca, Spanien) mit einem Antikoagulans präpariert. Je nach Verwendungszweck wurden hierbei verschiedene Substanzen verwendet. Zur Herstellung von Thrombozyten-reichem Plasma (platelet rich plasma = PRP) wurden 3U Heparin in 150µl Tyrode-Lösung pH 7,4 gemischt. Auf diese Weise blieb die Funktion der Thrombozyten durch eine unveränderte Elektrolytzusammensetzung und physiologischem pH unangetastet. Zur Isolierung von Thrombozyten aus dem Vollblut wurde ACD (Acid-Citrat-Dextrose) verwendet. Es besteht aus Zitronensäure, Natriumcitrat und D-Glucose. Auf diese Weise wird das abgenommene Blut auf den pH-Wert von unter 7 gesenkt und das Calcium und Magnesium komplexiert. Dies hat einen hemmenden Einfluss auf die Thrombozyten und verhindert so die Aktivierung durch den Isolierungsprozess. Die Glukose dient den Zellen als Nahrungsgrundlage.

Für die Blutentnahme bei den Mäusen wurde eine Narkose wie oben beschrieben durchgeführt. Zur besseren Übersicht wurde etwas Haut über dem Sternum der Maus entfernt. Daraufhin wurde die zweite Rippe aufgesucht und links lateral neben dem Sternum in einem schrägen 45° Winkel das Herz der Maus punktiert. Auf diese Weise konnte je nach Alter der Maus ein Blutvolumen von ca. 900µl gewonnen werden. Die Maus verstarb in der Regel noch während der Blutentnahme aufgrund des massiven Blutverlustes. Der Sterbevorgang wurde durch Genickbruch beschleunigt.

3. Gewinnung von humanem Vollblut

Menschliches Blut wurde an gesunden Individuen entnommen. Die Kandidaten wurden zuvor mündlich über Risiken und Nebenwirkung des Eingriffes aufgeklärt, ihr Einverständnis wurde eingeholt.

Der Ablauf beinhaltete dreimalige Desinfektion mit einem Desinfektionsspray (Cutasept® F, Bode Chemie, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurden die Venen mit einer elastischen Binde gestaut (Venenstaubinde, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) und mit sterilen Butterflynadeln (Safety-Multifly® 21G 200mm lang, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) die Vene (meist mediana cubiti) punktiert. Anschließend wurde die Vene wieder entstaut, die Nadel entfernt und die Punktionsstelle fünf Minuten manuell komprimiert. Die zur Entnahme

verwendeten Spritzen (Injekt® 5 ml, Luer, exzentrisch, B.Braun Medical AG, Sempach, Schweiz) wurden mit Acid Citrat Dextrose (ACD) in einem Verhältnis 1:7 präpariert. Für die Abnahme war zusätzlich ein Spritzenadapter notwendig (Membran-Adapter für Luer-Systeme, Sarstedt, Nümbrecht, Germany).

4. Isolierung der Thrombozyten

Für die Aktivität der Thrombozyten ist der pH-Wert essentiell. Darum war es wichtig bei jeder Art von Messungen einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu haben. Andererseits half uns ein niedriger pH, bei der Isolation der Plättchen eine vorzeitige Aktivierung zu verhindern. Darum wurde die Tyrode-Lösung standardmäßig mit Hepes (Hepes solution, Sigma, St Louis Missouri, USA) versetzt und der pH tagesaktuell bei Körpertemperatur (37°C) eingestellt. Die Tyrode-Lösung selbst enthielt folgende Elektrolytkonzentrationen: 80g/l NaCl, 10,15g/l NaHCO₃ und 1,95g/l KCl. Das Konzentrat wurde steril filtriert und kurz vor dem Versuch 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und der pH mit Salzsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bzw. Natronlauge (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) angepasst. Zudem wurde die Lösung durch 1mg/ml Glucose (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) ergänzt. Auf diese Weise konnte ein physiologisches Elektrolytgleichgewicht eingestellt werden. Um einer vorzeitigen Thrombozytenaktivierung vorzubeugen, wurde Kalzium und Magnesium frühestens zum Stimulationszeitpunkt mit einer Endkonzentration von 1mmol/l hinzugefügt.

Zur Isolation wurde das ACD-Vollblutgemisch nach der Entnahme mit etwa einem Milliliter Tyrode pH 6,5 verdünnt. Das Blut wurde nun 20 Minuten lang ohne Bremse bei 70G in einer Schleuder (Eppendorf centrifuge Typ 5804, Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Auf diese Weise wurden die Blutbestandteile nach Masse aufgetrennt und die oberste Schicht entnommen. Den abgenommenen Überstand nennt man thrombozytenreiches Plasma (platelet rich plasma = PRP). Das thrombozytenreiche Plasma wurde nochmals stark mit Tyrode-Lösung verdünnt. Auf diese Weise konnte ein pH von 6.5 sichergestellt werden. Speziell bei humanen Blutpräparaten wurde zusätzlich Prostaglandin I₂ (Prostaglandin I₂ from sodium salt, Abcam, Cambridge, USA, Anwendungskonzentration: $1,43 \times 10^{-4}$ mg/ml) zu der Lösung hinzugegeben, um eine vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten zu verhindern. Durch eine weitere Zentrifugation bei 1250G mit abschließender Bremsung wurden die Thrombozyten auf dem Boden sedimentiert. Der Überstand konnte vollständig entfernt werden und die Thrombozyten in Tyrode-Lösung pH6,5 resuspendiert. Nach der Resuspension in kleinem Volumen kann durch Verdünnung der pH auf ein physiologisches Niveau von etwa 7,4 angehoben werden.

5. Gewinnung humaner Thromben

Die humanen Lungenemboliepräparate aus der Arteria pulmonalis stammen aus chirurgischer Thrombektomie und wurden vom Department of Pathology, Academic Medical Center, Amsterdam unter Einwilligung der Patienten bereitgestellt. Sie wurden direkt nach der Entnahme in Paraffin fixiert und konserviert.

Arterielle Thromben stammen aus kathedergesteuerter Thrombektomie von Apoplexpatienten. Sie wurden uns von der neurologischen Abteilung des Klinikums „Rechts der Isar“ (Technische Universität) in München unter Einwilligung der Patienten zur Verfügung gestellt. Die Fixierung fand auch hier mit Paraffin statt.

6. Immunohistologie

Die histologischen Untersuchungen von Thrombusgewebe gibt sehr viel Auskunft über das Vorkommen, die Verteilung und die Morphologie der darin enthaltenen molekularen und zellulären Bestandteile. Zudem bietet es auch als semiquantitatives Verfahren einen ungefähren Eindruck über die Menge der hier detektierten Antigene. Dies sind wertvolle Informationen, weshalb diese Methode im Laufe dieser Forschungsarbeiten sehr häufig Verwendung fand. Auf die genaue Durchführung wird in den folgenden Abschnitten eingegangen

6.1. Anfertigung histologischer Cryoschnitte

Durch die sofortige Einbettung und Schockfrostern des Thrombus in Tissue-Tek® konnte die Kühlkette von dem Zeitpunkt der Entnahme bis zum Start der histologischen Färbungen ohne Unterbrechung erhalten werden. Dies ist wichtig, um eine konstante Qualität der Färbungen zu garantieren. Der Schneidevorgang fand mit Hilfe eines selbstkühlenden Kryotoms statt (Cryostar NX70, Histo Service GmbH, Celle). Bei einer konstanten Kammertemperatur von ca. -20°C wurde das Thrombusmaterial in fünf Mikrometer dicke Scheiben geschnitten und auf speziell beschichtete Objektträger (Thermo Scientific, Superfrost® Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) überführt. Für die Schnitfführung wurde hierbei die Transversalebene gewählt. Auf diese Weise konnte eine ausreichende Anzahl an Schnitte mit möglichst großer Aussagekraft gewonnen werden. Für die Färbungen wurden möglichst mittig gelegene Schnitte verwendet. Um eine möglichst große Standardisierung in der Probenentnahme zu erreichen, wurde der Schneidevorgang stets von kranial begonnen. Die Lagerung der Schnitte bis zur Anfertigung der histologischen Schnitte fand bei -20°C statt.

6.2. Anfertigung histologischer Paraffinschnitte

Die humanen Präparate wurden aufgrund der besseren Handhabung nach der Entnahme in Paraffinblöcken eingebettet und konserviert. Die Paraffinblöcke wurden mittels Schneidegerät (Microtom HM340E, Thermo Scientific, Waltham, USA) in fünf Mikrometer dicke Scheiben geschnitten und in ein 42°C warmes Wasserbad (Typ HI1210 Leica, Wetzlar, Deutschland) gelegt. Dadurch war eine faltenfreie Streckung des geschnittenen Präparates und die Überführung auf einen Objektträger (Thermo Scientific, Superfrost® Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) problemlos möglich. Die Trocknung fand in einem Inkubationsschrank (Typ FD23, Binder, Tuttlingen, Deutschland) statt. Die Lagerung geschah bei Raumtemperatur.

6.3. Der immunhistologische Färbevorgang bei Gefrierschnitten

Bevor der Färbevorgang beginnen konnte, wurden die Schnitte aufgetaut. Um das Präparat während des Färbevorganges vor Austrocknung und Ausbleichung zu schützen wurden die Objektträger stets in einer feuchten, lichtundurchlässigen Kammer gelagert. Zum besseren Handling der Antikörperlösung auf dem Objektträger wurde das Präparat zudem mit einem hydrophoben Fettstift (Dako Pen, Dako Deutschland GmbH, Hamburg) umrandet.

6.3.1. IgG/IgM-CD31-Färbung an murinen Präparaten

Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die Präparate grundsätzlich drei Minuten in einer vierprozentigen Formalinlösung (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) fixiert. Dieser Vorgang wurde durch 15-minütiges Waschen in einer PBS-Lösung (gibico® by life technologies, Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA), versetzt mit 0,1% Tween (Tween® 20, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) beendet. Anschließend wurden unspezifische Antikörperbindungen an dem Präparat durch 30-minütige Inkubation in 10% Ziegenserum (Normal goat serum ready-to-use, invitrogen cooperation, Frederick, MD, USA) blockiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Serum vorsichtig entfernt und durch die erste Antikörperlösung ersetzt. Diese bestand aus einer CD31-Antikörperlösung (CD31 (PECAM-1) monoclonal antibody (390), functional Grade, eBioscience™, Thermo Fisher scientific, San Diego, CA, USA, Anwendungskonzentration 10mg/l) in PBS. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde der Primäantikörper mit der oben genannten PBS-0,1% Tweenlösung 15 Minuten lang abgewaschen und durch eine weitere Antikörperlösung ersetzt. Diese bestand zunächst aus dem Sekundäantikörper für die CD31 Färbung (Alexa Fluor® 594 Goat anti-Rat IgG (H+L), Life Technologies GmbH, Darmstadt; Anwendungskonzentration 10mg/l) und zusätzlich aus der IgG- (Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat anti-

Mouse IgG, Fcγ Fragment Specific, Anwendungskonzentration 30mg/l) bzw. aus der IgM-Färbung (Goat anti-Mouse IgM Heavy Chain, Alexa Fluor® 488, ThermoFisher, Waltham, USA, Anwendungskonzentration 40mg/l). Nach einer weiteren Stunde wurde die Antikörperlösung entfernt und das Präparat für drei Minuten mit einer Kernfärbelösung (Hoechst 33342 trihydrochloride trihydrate, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA, Anwendungskonzentration 10mg/l) inkubiert. Abschließend folgte ein gründlicher Waschschrift in PBS-0,1% Tween. Um das Präparat vor äußeren Einflüssen besser zu schützen und die Bildqualität zu verbessern wurde ein Deckglas (MEDITE GmbH, Burgdorf) mit Hilfe eines speziellen Eindeckmediums (Dako Fluorescent Mounting Medium, Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA) auf den Objektträger geklebt und für mindestens eine Stunde bei völliger Dunkelheit ruhen gelassen.

6.3.2. IgG/IgM-CD41-Fibrinogen-Färbung

Die IgG/IgM CD41 Fibrinogen Trippelfärbung beginnt wie zuvor mit einem dreiminütigen Fixationsschritt mit Formalin 4%. Nach einem Waschvorgang in PBS-0,1%Tween wurde das Präparat in 10% Ziegen Serum inkubiert. Die Primärantikörperlösung bestand aus einer Mischung aus anti-Fibrinogen (Polyclonal Rabbit anti-Human Fibrinogen, Dako, Glostrup, Dänemark, Anwendungskonzentration 15,33mg/l) und anti-CD41 (CD41a monoclonal antibody, PE, eBioscience™, Thermo Fisher scientific, San Diego, CA, USA, Anwendungskonzentration 2mg/l). Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden überflüssige Antikörper mit oben genannter Waschlösung entfernt. Im Anschluss wurden die beiden Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 594 Goat anti-Rat IgG (H+L), Life Technologies GmbH, Darmstadt; Anwendungskonzentration 10mg/l und Alexa Fluor® 350 Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Life Technologies GmbH, Darmstadt; Anwendungskonzentration 10mg/l) zusammen mit anti-IgG (Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG, Fcγ Fragment Specific, Anwendungskonzentration 30mg/l) oder anti-IgM Antikörpern (goat anti mouse IgM Heavy Chain, Alexa Fluor® 488, ThermoFisher, Waltham, USA, Anwendungskonzentration 40mg/l). Das Präparat wurde in dieser Lösung eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurde es gründlich gewaschen und mit einem Deckglas versehen.

6.3.3. C1q/C4-CD42b-Färbung

Die Präparate wurden fixiert und unspezifische Bindungen geblockt. Auch hier fand wie zuvor beschrieben Formalin und Ziegen Serum Anwendung. Die Primärantikörper bestanden aus anti-C4 (Complement C4 Monoclonal Antibody (16D2), ThermoFisher scientific, Rockford, USA, Anwendungskonzentration 1mg/ml) und anti-CD42b (Anti-CD42b antibody, Abcam, Cambridge, USA, Anwendungskonzentration 5mg/ml). Alternativ zu dem C4-Antikörper konnte

auch ein Anti-C1q-Antikörper (zur Verfügung gestellt durch Prof Dr. A. Verschoor, Anwendungskonzentration: 50mg/l) verwendet werden. Als Sekundärantikörper wurden ein Ziege anti-Ratte (Alexa Fluor® 594 Goat anti-Rat IgG (H+L), Life Technologies GmbH, Darmstadt; Anwendungskonzentration 10mg/l) und ein Ziege anti-Hase Antikörper (Alexa Fluor® 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Life Technologies GmbH, Darmstadt; Anwendungskonzentration 10mg/l) verwendet. Abschließend wurden auch hier die Kerne mit Höchst gefärbt und gut gewaschen.

6.3.4. IgG-MPO-Färbung

Die IgG-MPO-Doppelfärbung begann mit dreiminütiger Formalinfixierung und 30-minütiger Ziegenserumbehandlung. Der Primärantikörper gerichtet gegen Myeloperoxidase (polyclonal Rabbit anti-Human Myeloperoxidase, Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, USA) wurde in einer Anwendungskonzentration von 11mg/ml eingesetzt und eine Stunde auf dem Präparat belassen. Es wurde gewaschen und die Antikörper Ziege anti-Kaninchen (Alexa Fluor® 594 Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Life Technologies GmbH, Darmstadt; Anwendungskonzentration 10mg/l) auf das Präparat gegeben. Zeitgleich wurde ein Ziege anti Maus IgG (Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat anti-Mouse IgG (H+L), Anwendungskonzentration 30mg/l) Antikörper in die Lösung gegeben. Dieser war gegen die leichte und schwere Kette der Antikörper gerichtet, sodass sowohl Antikörper der Klasse IgG, als auch IgM und weitere durch die Färbung markiert wurden. Diese Kreuzreaktion war gewünscht, da auf diese Weise mögliche Bindungen aller Antikörperklassen an neutrophile Granulozyten und NETs gesehen werden können. Nach einer Stunde wurden die Kerne mit Höchst (Anwendungskonzentration 10mg/l) angefärbt und abschließend gründlich gewaschen.

6.3.5. Ly6G-MPO-Färbung

Nach Formalinfixierung und Vorbehandlung mit Ziegenserum wurden die Primärantikörper Myeloperoxidase (polyclonal Rabbit anti-Human Myeloperoxidase, Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, USA, Anwendungskonzentration 11mg/ml) und LY6G (PE Rat anti-Mouse Ly-6G, BD Biosciences, San Jose, USA, Anwendungskonzentration 0,67mg/l). Die Inkubationszeit betrug eine Stunde. Nach einem Waschvorgang wurden die Sekundärantikörper Ziege anti Kaninchen (Alexa Fluor® 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Life Technologies GmbH, Darmstadt; Anwendungskonzentration 10mg/l) und Ziege anti Ratte (Alexa Fluor® 594 Goat anti-Rat IgG (H+L), Life Technologies GmbH, Darmstadt; Anwendungskonzentration 10mg/l) auf das Präparat gegeben. Die Kerne wurden mit Höchst gefärbt

6.3.6. F4/80-Färbung

F4/80 ist ein gebräuchlicher Marker für Makrophagen im peripheren Blut [384]. Die Präparate wurden mit Formalin fixiert, gewaschen und wie gewohnt in Ziegenerum inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper gegen das Oberflächenantigen F4/80 (Rat anti mouse F4/80, BioRad, Oxford, United Kingdom, Anwendungskonzentration 10mg/l). Es wurde gewaschen und mit dem Sekundärantikörper Ziege anti Ratte (Alexa Fluor® 594 Goat anti-Rat IgG (H+L), Life Technologies GmbH, Darmstadt; Anwendungskonzentration 10mg/l) inkubiert. Auch hier war die Kernfärbung mittels Höchst sehr wichtig.

6.4. Immunhistologischer Färbevorgang bei paraffinfixierten Präparaten

Aufgrund der Paraffinfixierung humaner Thromben sind zu Beginn der Färbung einige Vorbereitungen zur Antigendemaskierung notwendig. Zunächst fand eine Deparaffinierung zusammen mit einer Rehydrierung statt. Ohne diese Schritte wäre aufgrund der hydrophoben Beschaffenheit eine zu schwache Färbung die Folge. Zunächst wurden die Präparate 20 Minuten in einem Xylol-Bad belassen. Nach Ablauf der Zeit wurden die Schnitte für 10 Minuten in ein 100% Ethanolbad überführt. Die Schritte wiederholten sich für 96%, 80% und 70% Ethanol, in denen die Schnitte jeweils für fünf Minuten verblieben. Abschließend werden die Schnitte in destilliertes Wasser überführt. Durch das Ethanol findet zugleich eine Fixierung der Präparate statt. Dabei entstehen Methylenbrücken auf der Oberfläche, welche das Antigen bedecken und Interaktion mit Antikörpern verhindern können. Diese Bindungen können durch einen sogenannten „antigen retrieval“ gespalten und somit auch zugänglich für die Antikörper gemacht werden. Dies erfolgt in einer zweiprozentigen Citrat-Pufferlösung in destilliertem Wasser (Citric acid monohydrate, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), eingestellt auf pH 6 bei ca. 116°C in einem Dampfdrucktopf (Typ Sicomatic t-plus, Silit, Riedlingen, Deutschland) bei dem 1,8-fachen Umgebungsdruck. Die Kochzeit betrug acht Minuten. Die folgenden Schritte gleichen dem Ablauf von Gefrierschnitten.

6.4.1. IgG-CD42b-Färbung an humanen Präparaten

Nach Durchlaufen der oben beschriebenen antigendemaskierenden Schritte wurden die Präparate in 10% Schafsserum inkubiert. Dieser Vorgang dauerte 30 Minuten. Anschließend wurde der anti-CD42b-Antikörper (CD42b monoclonal antibody (42C01) ThermoFisher Scientific, Rockford, USA) in einer Anwendungskonzentration von 2mg/l hinzugegeben. Nach einer Stunde Inkubation und einem Waschschrift wurde der Sekundärantikörper (Goat anti-Mouse IgG (H+L) highly cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor® 594, ThermoFisher Scientific, Rockford, USA, Anwendungskonzentration 10mg/l) zusammen mit

der IgG-Färbung (Goat F(ab')₂ Anti-Human IgG-Fc DyLight® 650, Abcam, Cambridge, USA, Anwendungskonzentration: 10mg/l) auf das Präparat gegeben. Nach einer weiteren Stunde wurde die Färbung durch Hoechst vervollständigt. Abschließend wurden die Schnitte gründlich gewaschen und mit einem Deckglas versehen.

6.4.2. IgM-CD42b-Färbung an humanen Präparaten

Die Antigendemaskierung und Fixierung der Schnitte find wie zuvor beschrieben statt. Anschließend wurden die Präparate 30 Minuten in 10% Schafsserum inkubiert. Es folgt ein einstündiger CD42b-Färbevorgang (CD42b monoclonal antibody (42C01) ThermoFisher Scientific, Rockford, USA). Die Anwendungskonzentration des Antikörpers beträgt 2mg/l. Danach wurde mit zuvor genannter PBS 0,1%-Tweenlösung gewaschen. Der zweite Färbevorgang erfolgte mit einem passenden Sekundärantikörper (Goat anti-Mouse IgG (H+L) highly cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor® 594, ThermoFisher Scientific, Rockford, USA, Anwendungskonzentration 10mg/l) zusammen mit der IgM-Färbung (Goat Anti-Human IgM DyLight® 650, ThermoFisher scientific, Rockford, USA, Anwendungskonzentration 10mg/l). Nach einer weiteren Stunde wurde die Färbung durch Hoechst vervollständigt. Abschließend wurden die Schnitte gewaschen und mit einem Deckglas versehen.

6.5. Kontrollen

Um sicher zu gehen, dass die Färbungen auf spezifischen Antikörperbindungen beruhen, wurden Isotypkontrollen angefertigt, sowie Färbungen an Präparaten von Tieren vorgenommen, die einen genetischen Knockout für das Antigen hatten. Dabei wurden unspezifische Antikörper derselben Antikörperklasse mit derselben Konzentration für dieselbe Dauer auf ein vergleichbares Präparat gegeben. Alle anderen Färbeschritte wurden absolut identisch zur eigentlichen Färbung durchgeführt. Auch die Belichtungszeit am Mikroskop unterschied sich nicht. Auf diese Weise erhielt man ein Vergleichsbild, welches Aufschluss über das Verhalten der Antikörper auf dem Präparat gab. Ein deutlicher Unterschied spricht für eine spezifische Färbung. Welche Kontrollantikörper für welche Färbung verwendet wurden, ist den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen.

Färbung	Hersteller	Klon	Anwendungskonzentration	Isotypkontrolle	Verwendeter Sekundär-Ak
MPO	Dako	polyklonal	11mg/l	Kaninchen IgG	Ziege anti Kaninchen
Ly6G	Bd pharmingen	1A8	0,67mg/l	Ratte IgG2a κ	Ziege anti Ratte
CD41	eBioscience	eBioMWRReg30	2mg/l	Ratte IgG1 κ	Ziege anti Ratte
Fibrinogen	Dako	polyklonal	15,33mg/l	Kaninchen IgG	Ziege anti Kaninchen
F4/80	AbD Serotec	Cl:A3-1	10mg/l	Ratte IgG2b	Ziegen anti Ratte
C1q	Zur Verfügung gestellt durch Prof Dr. A. Verschoor	polyklonal	50mg/ml	Ratte IgG1	Ziegen anti Ratte
C4	Thermo scientific	16D2	1mg/l	Ratte IgG2a κ	Ziegen anti Ratte
CD42b	Abcam	polyklonal	5mg/l	Kaninchen IgG	Ziegen anti Kaninchen
CD31	Thermo scientific	390	10mg/l	Ratte IgG2a κ	Ziegen anti Ratte
IgM schwere Kette	Invitrogen/ ThermoFisher	polyklonal	40mg/l	Ziegen IgG	-
IgG Fcγ-Fragment	JacksonImmuno-research	polyklonal	30mg/l	Ziegen F(ab)2	-
IgG schwere + leichte Kette	JacksonImmuno-research	polyklonal	30mg/l	Ziegen F(ab)2	-

Tabelle 2: Antikörper für immunhistologische Färbungen an murinen Präparaten

Färbung	Hersteller	Klon	Anwendungskonzentration	Isotypkontrolle	Verwendeter Sekundär-Ak
CD42b	ThermoFisher	42C01	2mg/l	Maus IgG1	Kaninchen anti mouse
IgG Fc-Fragment	Abcam	polyklonal	10mg/l	Ziegen F(ab)2	-
IgM	ThermoFisher	polyklonal	10mg/l	Ziegen IgG	-

Tabelle 3: Antikörper für immunhistologische Färbungen an humanen Präparaten

Färbung	Hersteller	Klon	Anwendungskonzentration
Ziege anti Ratte Alexa Fluor® 594	ThermoFisher Scientific	polyklonal	10mg/l
Ziege anti Kaninchen Alexa Fluor® 594	ThermoFisher Scientific	polyklonal	10mg/l
Ziege anti Kaninchen Alexa Fluor® 488	ThermoFisher Scientific	polyklonal	10mg/l
Ziege anti Maus IgG Alexa Fluor® 594	ThermoFisher Scientific	polyklonal	10mg/l

Tabelle 4: Sekundärantikörper zur Anwendung an Primärantikörpern aus Tabelle 2 + 3

6.6. Mikroskopie

Das Mikroskopieren und Fotografieren der histologischen Präparate fand unter einem Axio Imager.M2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) statt. Die Bilder wurden mit den Objektiven x20, x40 oder x63 oil (20x/0,8 ∞ /0,7 Plan Apo Chromat; 40x/0,75 ES Plan NEO Fluar; 63x/1,4 OIL ∞ /0,17 Plan Apo Chromat, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) aufgenommen. Hierfür wurde eine Schwarzweiß-Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) verwendet. Dies hatte deutliche Vorteile, sowohl für die Auswertung, als auch für Bildqualität. Zur besseren Interpretation bei Mehrfachfärbungen wurden den einzelnen Kanälen nachträglich Farben gegeben und deckungsgleich zu einem Bild zusammengesetzt.

Um eine höhere Auflösung zu erreichen, wurden manche Bilder mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen (LSM 880 mit Airyscan, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Die Bildnachbearbeitung erfolgte mit Hilfe der Software ZEN (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena).

6.7. Auswertungen der histologischen Färbungen

6.7.1. Antikörper in Fibrinogen-CD41-IgG/IgM-Färbung

Bei der Dreifachfärbung wurde bereits bei dem Färbevorgang penibel darauf geachtet, dass dieselbe Inkubationszeit und dieselbe Antikörperkonzentration für alle Präparate verwendet wurden. Beim Abfotografieren wurde dieselbe Lichtintensität und dieselbe Belichtungszeit verwendet. Dadurch wurde die Vergleichbarkeit der Bilder sichergestellt. Die Grauwertberechnung fand mit der Software AxioVision SE65 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) statt. Ziel der Auswertung war es sowohl die Färbeintensität der Antikörperfärbungen, als auch die Überlappung zu den beiden anderen Färbungen CD41 und Fibrinogen besser objektivieren zu können. Dabei wurde anhand eines repräsentativen Bildes ein Grauwert festgelegt, ab dem das Fluoreszenzsignal der Antikörperfärbung als positiv gewertet werden soll. Diese positive Fläche zusammen ergab eine Art „Landkarte“, die mit Hilfe des Programms deckungsgleich auf die beiden anderen Kanäle gelegt werden konnte. Nun waren die Bilder unterteilt in Antikörper-positive Areale und Antikörper-negative Areale. Innerhalb der positiven Areale wurden nun die Grauwerte bestimmt und ins Verhältnis gesetzt zu den Grauwerten der signalnegativen Areale. Kleine oder keine Unterschiede in den Grauwerten (Beispielsweise 16760 in IgG positiven Arealen und 10284 in IgG negativen Arealen) sprechen gegen einen Zusammenhang zwischen den beiden Färbungen. Messwerte, die sich um den Faktor zwei und mehr unterscheiden (Beispiel CD41 in Wildtypthromben: 22491 in IgG positiven Arealen; 8869 in IgG negativen Arealen) spricht deutlich für einen Zusammenhang.

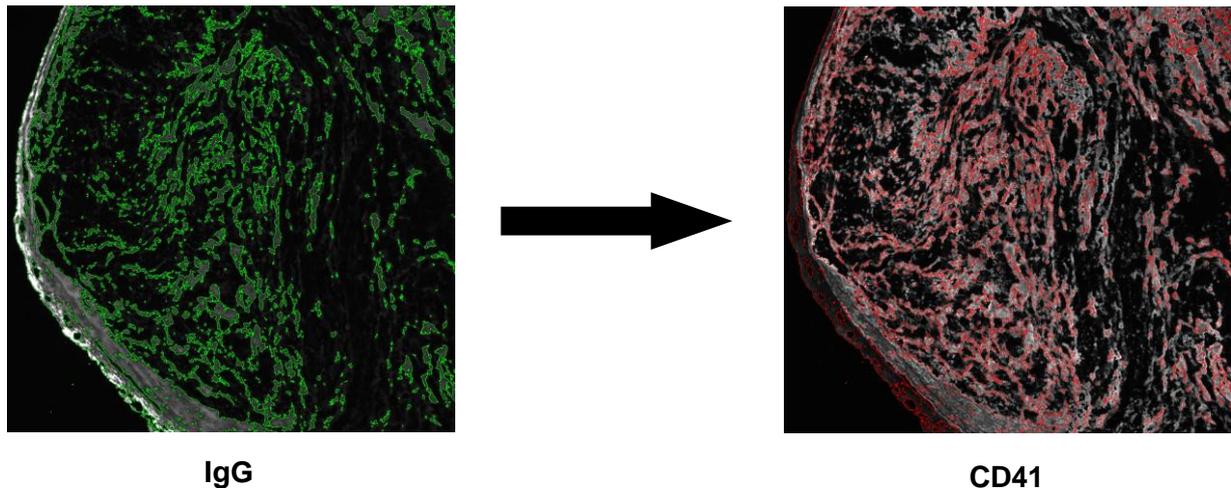


Abbildung 4: Digitale Auswertung der Assoziation von Antikörpern zu Thrombozyten und Fibrinogen im histologischen Bild

6.7.2. Neutrophile Granulozyten in Ly6G-MPO-Färbung

Die Doppelfärbung von Ly6G mit MPO war wichtig, um eine fehlerfreie Auswertung der neutrophilen Granulozyten zu erhalten. MPO ist sowohl in neutrophilen Granulozyten enthalten, als auch in manchen Monozyten [385]. Ly6G wird hingegen neben den neutrophilen auch auf einigen nicht neutrophilen Granulozyten exprimiert [386, 387]. Gewertet wurden somit nur die doppelt positiven Zellen. Die gezählten Zellen wurden stets ins Verhältnis gesetzt mit der Thrombusfläche. Diese wurde mit Hilfe von AxioVision SE65 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) bestimmt. Neben den Zellen wurde auch die Anzahl der gebildeten NETs bewertet. Dank der Doppelfärbung konnten sie eindeutig von Artefakten unterschieden werden. Klassischerweise sind dies DNA-Stränge, die aus Ly6G-positiven Zellen entspringen und mit Myeloperoxidase aus intrazellulären Vesikeln bedeckt sind.

6.7.3. Monozyten in F4/80-Färbung

Die Auswertung der F4/80-Färbung geschah durch zählen der Zellen. Die Zahl wurde dann ins Verhältnis gesetzt zur Gesamtfläche des Thrombus, welche mit Hilfe der Software AxioVision SE65 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) ermittelt wurde.

7. ELISA

7.1. Untersuchung des Bindungsverhaltens von unspezifischen Antikörpern

Die enzyme linked immunosorbent (ELISA) Versuche zur Untersuchung thrombusbezogener Oberflächen wurden auf Nunc MaxiSorp™ flat-bottom Well plates (ThermoFisher Scientific, Rockford, USA) durchgeführt. Um die einzelnen Bestandteile eines Thrombus zu imitieren, wurde 1mg/ml Fibrinogen (Murine Fibrinogen, Enzyme research laboratory, South Bend, USA) in jeweils drei Wellvertiefungen gegeben und 15 Minuten unter leichten Schwenkbewegungen inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschriff mit PBS um überflüssige Substanz zu entfernen. Ganz ähnlich erfolgte die Fibrinbeschichtung, die durch Hinzufügen von 0,5U Thrombin (Thrombin from bovine plasma, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit Substitution von 0,25µg Calcium und Magnesium pro 100µl Lösung. Chondroitinsulfat (Chondroitin sulfate A sodium salt from bovine trachea, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde in einer Konzentration von 50mg/ml appliziert. Ähnlich wurde auch das Albumin (Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe) für die Wellplattenbeschichtung mit einer initialen Konzentration von 50mg/ml aufgetragen. Sowohl das Plasma, als auch die Thrombozyten wurden von C57Bl/6J Mäusen durch intrakardiale Punktion gewonnen (Details zur Blutentnahme siehe oben). Das Plasma wurde aus heparinisierem Vollblut gewonnen. Die Thrombozyten wurden aus ACD-Vollblut isoliert. Um einen Bias durch unterschiedliche Seren zu vermeiden, wurden die Thrombozyten für den Versuch wieder mit heparinisierem Serum vermischt. Untersucht wurde das Verhalten von FITC markierten murinen Antikörpern (FITC mouse IgG1, κ Isotype control, BD Biosciences, San Jose, USA; FITC mouse IgM, κ Isotype control, BD Biosciences, San Jose, USA). Sie wurden durch Immunisierung von Balb/c Mäusen mit Mineralöl, bzw. TNP-Keyhole Limpet Hemocyanin hergestellt. Die Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe eines ELISA-Gerätes gemessen (infinite 200, Tecan, Männedorf, Schweiz).

7.2. Messung der Antikörperkonzentration im Serum der Mäuse

Die Messungen der Immunglobulinkonzentration wurden mit Hilfe von ELISA-Kits (IgG- bzw. IgM-Mouse ELISA Kit, abcam®, Cambridge, United Kingdom) durchgeführt. Die intrakardiale Blutentnahme erfolgte wie zuvor beschrieben. 150µl Vollblut wurden in eine Serum-Microvette (Microvette® 100 Z, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) überführt. Nach ca. 15 Minuten wurden die Proben in einer 4°C gekühlten Schleuder (Eppendorf centrifuge 5424 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) 10 Minuten lang bei 1500G zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und der Bodenstand verworfen. Das Serum wurde in einem Verhältnis von 1:10 000 mit einer mitgelieferten Pufferlösung verdünnt.

Um einen Referenzwert für die IgG-Antikörperkonzentration zu haben, wurde eine Antikörperverdünnungsreihe mit einem „normal mouse IgG standard“ hergestellt. Die Ursprungskonzentration der Antikörper betrug $1\mu\text{g/ml}$. $50\mu\text{l}$ davon wurden zu $150\mu\text{l}$ einer Pufferlösung hinzugefügt. Die Konzentration betrug nun $0,25\mu\text{g/ml}$. Nach gründlichem Mischen wurden wiederum $50\mu\text{l}$ dieser Lösung entnommen und in ein weiteres Eppendorf-Gefäß mit wiederum $150\mu\text{l}$ einer Pufferlösung gegeben. Dadurch verdünnte sich der Antikörper weiter auf $0,0625\mu\text{g/ml}$. Diese Schritte wurden insgesamt sechs Mal wiederholt bis zu einer Konzentration von $2,4 \times 10^{-4}\mu\text{g/ml}$. Das letzte Eppendorf-Gefäß enthielt nur Pufferlösung. Daraufhin wurden jeweils $50\mu\text{l}$ der Antikörperlösungen oder Serum in eines der 96-Wellplattenvertiefung pipettiert und zwei Stunden lang bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenmischer (Duomax 1030, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) inkubiert. Die Well-Platte wurde zuvor vom Hersteller mit einer anti-Mouse IgG Beschichtung ausgestattet. Dies führte dazu, dass Antikörper, sofern vorhanden, auf dem Boden der Wellplatte festgehalten wurden. Es folgten zwei Waschschrte mit insgesamt $300\mu\text{l}$ Waschpufferlösung. Daraufhin wurde in jede Wellplattenvertiefung $50\mu\text{l}$ eines Horseradish Peroxidase-konjugierten anti-IgG/IgM Antikörpers gegeben. Es folgt erneut eine 60-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf dem ELISA-Plattenmischer. Daraufhin wird die Wellplatte drei Mal mit Pufferlösung gewaschen und eine 3,3',5,5-Tetramethylbenzidin-Chromogenlösung (TMB) hinzugegeben. Die auf den Antikörpern vorhandene Horseradish Peroxidase (HRP) beginnen nun das TMB zu zerteilen, was zu einem Farbumschlag von farblos zu blau führt. Dieser Vorgang wird nach 15 Minuten mit einer entsprechenden Lösung unterbrochen. Das veränderte Absorptionsspektrum durch die Farbänderung kann anschließend im 450nm-Bereich von dem ELISA-Geräte gemessen werden (infinite 200, Tecan, Männedorf, Schweiz). Der Vergleich mit der zuvor beschriebenen Standardverdünnungsreihe ermöglicht eine ungefähre Abschätzung der Antikörperkonzentration im Serum.

Derselbe Vorgang wurde mit einem IgM-spezifischen ELISA-Kit durchgeführt. Abweichungen gab es lediglich in Bezug auf die Herstellung der Verdünnungsreihe. Diese wurde durch Überführen von $500\mu\text{l}$ einer $0,25\mu\text{g/ml}$ IgM-Lösung in vorgefertigte $500\mu\text{l}$ Pufferlösungen hergestellt. Es ergab sich somit jeweils eine 1:2 Verdünnung: $0,125\mu\text{g/ml}$, $0,062\mu\text{g/ml}$, $0,031\mu\text{g/ml}$, $0,015\mu\text{g/ml}$, $0,008\mu\text{g/ml}$ und $0,004\mu\text{g/ml}$. Schlussendlich betrug die HRP in TMB Inkubationszeit 30, anstatt 15 Minuten.

8. Konfokalbilder von isolierten Thrombozyten

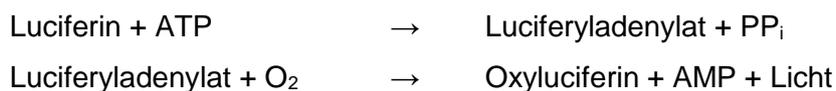
Die Bilder wurden mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen (LSM 880 mit Airyscan, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Hierfür wurde Vollblut einer PF4Cre/ROSA-YFP-Maus

in ACD entnommen und die Thrombozyten nach oben genanntem Protokoll gewaschen. Nach Resuspension wurde die Thrombozytenlösung in ein Eppendorfgefäß (Eppendorf Tubes® 3810X, 1.5 ml, g-Safe®, Eppendorf, Hamburg, Germany) überführt, auf ein Gesamtvolumen von 500µl verdünnt und in zwei Gruppen geteilt. Ein Teil wurde mit einem PAR4-Rezeptoragonist stimuliert (Ala-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-NH₂ trifluoroacetate salt, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), die Kontrollgruppe blieb unaktiviert. Im Anschluss wurde ein muriner IgG1 Isotypantikörper (PE mouse IgG1, κ isotype control, BD Biosciences, San Jose, USA) zu der Lösung gegeben. Zur Mikroskopie wurde die Lösung auf eine mit einem Fettstift umrandete Stelle auf einem Objektträger platziert und mit vier Prozent Formalin fixiert. Überflüssige Flüssigkeit wurde mit einem Papiertuch vorsichtig entfernt. Zur besseren Handhabung wurden ein bis zwei Tropfen Fluorescent mounting medium auf die Präparate gegeben und mit einem Deckglas versehen.

9. Aggregometrie

9.1. Ablauf und Durchführung

Mit Hilfe der Aggregometrie konnte das Ausmaß der Thrombozytenaggregation gemessen werden. Bei dieser Methode wird die Lichtdurchlässigkeit der Lösung gemessen, welche zunimmt je stärker eine Verklumpung der Thrombozyten stattgefunden hat. Zusätzlich kann mit Hilfe der Luciferin-Luciferase-Reaktion die Freisetzung von ATP gemessen werden. Diese funktioniert nach folgender Reaktion:



(ATP= Adenosintriphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, PP_i = Diphosphat, O₂ = Sauerstoff)

Das freigesetzte Licht kann gemessen werden und gibt somit indirekt Aufschluss über das bei der Reaktion freigesetzte ATP.

Für Aggregometrierversuche wurde in der Regel heparinisiertes thrombozytenreiches Plasma verwendet. Auf diese Weise konnte die Thrombozytenaktivität unter möglichst physiologischen Verhältnissen unter Ausschaltung der Gerinnungskaskade gemessen werden. Bei der Präparation wurde auf einen neutralen pH-Wert geachtet, da dies die Aktivität der Thrombozyten beeinflussen kann. Zudem war es wichtig, eine einheitliche Thrombozytenzahl in der Lösung zu haben. Sie wurde standardmäßig auf 200.000/µl eingestellt. Bestimmt wurde dies durch die Erstellung eines kleinen Blutbildes mit Hilfe eines Zellcounters (ABX Micros ES

60, Horiba ABX, Kyoto, Japan). Zusätzlich konnte auf diese Weise der Erfolg der Thrombozytenisolation bestätigt werden. Für den Versuch wurde das PRP in Glasküvetten (Probe&Go Labordiagnostica GmbH, Lemgo, Germany) überführt und 10 Minuten in der dafür vorgesehenen Wärmeposition des Aggregometers (4-Kanal-Gerät Modell 700-4, CHRONO-LUME® Corporation, Havertown, USA) auf 37°C erwärmt. Für die ausreichende Durchmischung der Proben während der Messung sorgte ein Rührstäbchen (Probe&Go Labordiagnostica GmbH, Lemgo, Germany), eingestellt auf etwa 1000 Umdrehungen pro Minute. Durch Verwendung von Distanzstücken (Probe&Go Labordiagnostica GmbH, Lemgo, Germany) an der Unterseite der Glasküvetten konnte das nötige Blutvolumen deutlich reduziert werden und damit auch die für die Versuche benötigten Mäuse. Nach ausreichender Wärmeinkubation wurde die Küvette in die Messposition überführt, mit Luciferin+Luciferase (CHRONO-LUME®, Probe&Go Labordiagnostica GmbH, Lemgo, Germany) versetzt und das Programm gestartet. Um eine vergleichbare Fluoreszenzintensität durch ausreichende Durchmischung der Lösung zu garantieren, wurden sekundengenau zwei Minuten in der Messposition inkubiert. Gleichzeitig konnte auf eine ruhige Ausgangskurve geachtet werden. Wurde eine Voraktivierung beobachtet, so konnte die Messung nicht in die Auswertung mit aufgenommen werden. Anschließend fand die Aktivierung der Proben statt. Hierfür wurde meist ein Protease-aktivierender-Rezeptor-4-Agonist (PAR4) (Ala-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-NH₂ trifluoroacetate salt, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) verwendet. PAR4 ist ein Vermittler der Thrombozytenaktivierung durch Thrombin [388, 389]. Ala-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-NH₂ gehört somit zu der Familie der TRAP (thrombin receptor-activating peptides). Dabei wurde eine Endkonzentration von 200µmol/l angestrebt. Die Messung wurde nach sechs Minuten beendet.

9.2. Referenzen und Standardisierungen

Um die Messungen besser interpretieren zu können, waren Referenzen und Vergleichsmessungen notwendig. Dies lief für die optische Aggregometrie wie für die Lumineszenzmessung auf unterschiedliche Art und Weise ab. Im Falle der optischen Aggregometrie war es wichtig, die Lichtdurchlässigkeit des Blutplasmas zu berücksichtigen. Darum wurden Proben mit sichtbarer Hämolyse oder Verunreinigung verworfen und nicht in den Versuch aufgenommen. Trotzdem waren kleine individuelle Unterschiede in dem Trübheitsgrad des Plasmas nicht zu vermeiden. Darum wurde für jede Maus separat Platelet-poor-plasma (PPP) durch 10-minütige Zentrifugation bei 1800g hergestellt und in eine frische Glasküvette überführt. Sie wurde dem Messgerät zur Vergleichsmessung an der dafür vorgesehenen Stelle angeboten.

Bei der Lumineszenzmessung war es wichtig, die Fluoreszenzintensität in eine quantitative Menge an freigesetztem ATP zu übersetzen. Dies gelang durch eine Referenzmessung, die ebenfalls für jedes Tier separat durchgeführt wurde. Die Durchführung glich exakt dem oben beschriebenen, mit dem einzigen Unterschied, dass anstelle des Stimulanz ein Nanomol ATP (CHRONO-LUME[®], Probe&Go Labordiagnostica GmbH, Lemgo, Germany) hinzugefügt wurde. Durch den hierbei entstandenen Fluoreszenzausschlag konnte für jede weitere Lumineszenzmessung eine genaue mengenmäßige Aussage über das dabei freigesetzte ATP getroffen werden.

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Mit Hilfe der Messungen konnte sowohl die Fläche unter der Kurve (Area under the curve, AUC) als auch die maximale Amplitude der Kurve bestimmt werden. Aufgrund des Kurvenverlaufes war die Amplitude bei optischen Messungen wenig aufschlussreich, weshalb die AUC als Parameter gewählt wurde. Für die Lumineszenzmessung wurde primär auf die Kurvenamplitude zurückgegriffen. Mit Hilfe der zuvor beschriebenen Eichkurve war die quantitative Umrechnung in die freigesetzte ATP-Menge (gemessen in Nanomol) möglich. Zudem konnte die Steigung (slope) der Kurve bestimmt werden. Sie gibt Aufschluss über die Aggregationsgeschwindigkeit.

10. Analyse des Interaktionsverhaltens von Thrombozyten mit Antikörpern in der Durchflusszytometrie

Die Versuche wurden am Durchflusszytometer (Gallios, Beckman Coulter, Brea, USA oder LSR Fortessa, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) durchgeführt. Für den Versuch wurden Vollblut nach obenstehendem Protokoll gewonnen und Thrombozyten gewaschen. Dank sehr feiner Messtechnik konnte die Thrombozytenkonzentration auf Werte unter 100.000/ μ l verdünnt werden. Gleichzeitig konnte der pH durch Tyrode-Puffer-Lösung sicher auf Werte um pH=7,4 eingestellt werden. Für die Messungen wurde die Lösung in Plastikröhrchen überführt (Falcon Round-bottom tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Jede Gruppe wurde mit aktivierten und nicht aktivierten Thrombozyten gemessen. Die Aktivierung fand auch hier wieder mit obenstehendem PAR4-Aktivator statt. Aus technischen Gründen konnten nur kleine Aggregate im Durchflusszytometer gemessen werden. Darum wurde die Stimulationskonzentration von PAR4 auf 100 μ mol/l reduziert. Im Anschluss wurde das zu messende Reagenz hinzugegeben und 10 Minuten in einem Wasserbad (Typ HI1210 Leica, Wetzlar, Deutschland) bei 37°C inkubiert. Genaue Angaben über die Beschaffenheit und Konzentration der Reagenzien sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Produkt	Firma	Anwendungskonzentration
FITC Maus IgG1, κ Isotypkontrolle	BD Biosciences, San Jose, USA	7,5mg/l
FITC Maus IgM, κ Isotypkontrolle	BD Biosciences, San Jose, USA	7,5mg/l
Albumin aus Rinderserum, Alexa Fluor® 488 konjugiert	ThermoFisher Scientific, Paisley, United Kingdom	7,5mg/l
Annexin V rekombinantes Protein, eBioscience™	ThermoFisher Scientific, San Diego, USA	8,1mg/l
<i>In Vivo</i> MAB anti-Influenza A Virus NP	BioXcell, West Lebanon, USA	37,5mg/l
Anti-Fluorescein IgG1 κ , Maus	Absolute Antibody, Oxford, United Kingdom	7,48mg/l
Anti-Fluorescein IgG1 κ , Fc Silent™ Maus	Absolute Antibody, Oxford, United Kingdom	7,48mg/l
Human IgG Isotypkontrolle FITC konjugiert	Antikörper-online.de, Aachen, Germany	7,5mg/l
Rat anti Mäuse-CD62P Alexa Fluor® 647	BD Biosciences	4mg/l
Mouse anti Menschen-CD62P PE konjugiert	Immunotech A Coulter company	4mg/l

Tabelle 5: Reagenzien zur Anwendung in durchflusszytometrischen Untersuchungen

Die Succinylierung der anti-Influenza-Antikörper wurde durchgeführt in Kooperation mit dem Max-Planck Institut für Biochemie nach publiziertem Schema [390]. Um von unseren Messgeräten detektiert werden zu können, wurden die Antikörper zusätzlich gelabelt. Hierfür wurde ein Labeling-Kit verwendet (CF™ Dye SE Protein Labeling Kit, Biotium™, Hayward, USA).

Die Enzymversuche waren ein zentrales Element, um Bindungspartner der Antikörper zu identifizieren. Sie wurden nach separater Suspension in Tyrode-Lösung pH=7,4 nach der Aktivierung der Thrombozyten zu der Lösung hinzugegeben und fünf Minuten in einem 37°C-warmen Wasserbad (Typ HI1210 Leica, Wetzlar, Deutschland) inkubiert. Die Konzentrationen sind Tabelle 6 zu entnehmen. Erst nach Ablauf dieser Zeit wurden die Antikörper hinzugegeben und weitere fünf Minuten inkubiert.

Produkt	Firma	Verwendete Konzentration
Chondroitinase ABC from <i>Proteus vulgaris</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	20U/ml
Exo- α -sialidase from <i>Clostridium perfringens</i> (Neuraminidase)	Foresight Biosciences, Huntsville, USA	20U/ml

Tabelle 6: Enzyme zur Anwendung in *in vitro*-Versuchen

Die Rolle des GPIIb/IIIa-Rezeptors wurde mit Hilfe des synthetischen Hemmstoffes Tirofiban (Tirofiban, Ibisqus GmbH, Heppenheim, Deutschland) untersucht. Es wurde in drei verschiedenen Konzentrationen angewandt: 1,2µg/ml, 0,6µg/ml und 0,2µg/ml. Nach Überführen der Thrombozytenlösung in Plastikröhrchen (Falcon Round-bottom tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) wurde Tirofiban als erstes zu der Lösung hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug zwei Minuten. Der Aktivitätszustand der Thrombozyten konnte mit anti-CD62P Antikörper (siehe Tabelle 5) überwacht werden.

11. Statistik

Nach unseren Kenntnissen ist dies die erste Arbeit, die die Interaktion von Antikörpern mit der Oberfläche von Thrombozyten systematisch untersucht. Es handelt sich hierbei um eine Orientierungsstudie.

Die statistische Auswertung wurde durchgeführt mit Hilfe von Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc., Erkrath). Als statistisch signifikant wurden p-Werte von $\leq 0,05$ angesehen. Als Entscheidungshilfe für die richtige Testwahl wurde in einem ersten Schritt die Normalverteilung der Daten beurteilt. Dies fand mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests statt. War die Normalverteilung gegeben so wurde der T-Test angewendet. Lag diese nicht vor, so wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Bei Vergleichen mehrere Interventionsgruppen mit einer Kontrollgruppe wurde die one-way ANOVA (analysis of variance) angewendet. Damit verbunden wächst die Gefahr des α -Fehlers. Um dem entgegen zu wirken, wurde der Dunnett-Test für multiples Testen eingesetzt. Im Kern vergleicht er die Mittelwerte der Interventionsgruppen einzeln mit der Kontrollgruppe und setzt sie ins Verhältnis mit der mittleren quadratischen Abweichung. Auf diese Weise kann ein für multiples Testen adjustierter p-Wert berechnet werden.

Wurden mehrere Gruppen untereinander verglichen, so wurde die Fisher least significant difference (LSD) bestimmt. Hierbei handelt es sich prinzipiell um mehrere T-Tests. Eine Adjustierung für multiples Testen fand nicht statt.

Zudem fand eine Korrelation zwischen Antikörperkonzentration und Thrombozytenaktivität Anwendung. Zuvor musste die Normalverteilung der Daten mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft werden. Mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2010 wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) bestimmt. R kann Werte zwischen 1 und -1 annehmen. 1 deutet dabei auf eine starke positive Korrelation hin, -1 auf eine starke negative Korrelation. Das Bestimmtheitsmaß R^2 errechnet sich aus dessen Quadrierung.

V. Ergebnisse

1. Thrombogene Effekte von Antikörpern in der venösen Thrombose

Das Ligaturmodell der Vena cava inferior ermöglicht die Induktion venöser Thrombosen unter sehr standardisierten Bedingungen. Wie in vorherigen Versuchsreihen konnte eine Inzidenz von etwa 60% in C57Bl/6J-Tieren beobachtet werden [5]. Die Thrombusentstehung konnte sicher auf die intravasale Flussreduktion in Folge der operationsbedingten Stenose zurückgeführt werden, da eine Shamoperation durch Fadenanlage ohne Stenosierung zu keiner Thrombusbildung führte. Das Operationstrauma allein ist somit nicht ausreichend, um die Bildung von Thromben auszulösen.

Mit Hilfe dieses Modells konnten nun Vergleiche zu anderen Mauslinien gezogen werden. Die Rolle von Antikörpern in der Entstehung der venösen Thrombose wurde mit Hilfe von $\text{slgM}^{-/-}\text{AID}^{-/-}$ Mäuse untersucht. Sie zeichnen sich durch einen absoluten Mangel an Antikörpern aus. In dieser Mauslinie zeigte sich eine Thrombusinzidenz von 12,5% [351]. Dies war ein deutlicher Unterschied zu der C57Bl/6J Kontrollgruppe, in der eine Inzidenz von 62,5% beobachtet werden konnte [351]. Folglich spielen Antikörper eine zentrale Rolle in der Entstehung venöser Thrombosen. Vergleicht man nun die Inzidenz dieser beiden Gruppen mit dem löslicher IgM-defizienter Einzelknockouts ($\text{slgM}^{-/-}$) (Inzidenz: 37,5%), so erhält man eine Zahl, die in etwa dem Mittelwert aus C57Bl/6J und $\text{slgM}^{-/-}\text{AID}^{-/-}$ entspricht [351]. IgM trägt somit zur Thrombusbildung bei, ist jedoch nicht allein verantwortlich für die hohe Erkrankungsrate in Wildtyptieren. Ersetzt man nun polyklonales IgG in antikörperdefizienten Mäusen, so erhält man eine Inzidenz von 50% [351]. Der Mangel an IgM in IgG-substituierten $\text{slgM}^{-/-}\text{AID}^{-/-}$ Mäusen wirkt sich somit kaum auf die Thrombusbildung aus. IgG ist also ein zentrales Protein in der Entstehung von venösen Thromben.

Um besser eingrenzen zu können, was für Bindungseigenschaften Antikörper in diesem Prozess besitzen, untersuchten wir die Spezifität der in dem thrombotischen Prozess involvierten Immunglobuline näher. Die Mauslinie KL25 synthetisiert ausschließlich Antikörper, welche gegen Lymphocytic choriomeningitis Virus (LCMV) gerichtet sind. Ein solches Antigen ist in den Mäusen nicht vorhanden. Entsprechend kann hier nicht mit einer spezifischen Bindung gerechnet werden. Um einen Vergleich mit der Wildtyplinie zu ermöglichen, wurden die Antikörperkonzentrationen der Mäuse gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass diese in KL25-Tieren etwa 30% unter dem Durchschnitt des Wildtypstammes liegen (siehe Abbildung 5). Um diese Ungleichheit zu korrigieren, wurde Serum einer KL25 Maus in ein Geschwistertier per Schwanzveneninjektion überführt. Auf diese Weise konnte das Antikörperniveau auf das von C67Bl/6J angehoben werden. Ergebnis dieses Versuches war eine vergleichbare

Thromboseinzidenz und -Gewicht im Vergleich zum Wildtyp. Voraussetzung hierfür war die vorherige Supplementation des Mäuseserums. Ohne diese Supplementation lag das durchschnittliche Thrombusgewicht unter dem Niveau des Wildtyps. Somit wirken Antikörper der Klasse IgG fördernd auf die Entstehung venöser Thromben unabhängig von dem Antigen, gegen das sie gerichtet sind. Vorversuche mit Injektion von anti-Influenza Nukleoprotein IgG2a oder anti-HIV gp120 IgG1 (irrelevante Antigene) in $slgM^{-/-}AID^{-/-}$ Mäuse bestätigen diese Annahme [351]. Zudem kann auf der Grundlage der Versuche mit KL25 Mäusen, eine konzentrationsabhängige Wirkung dieser Antikörper geschlossen werden.

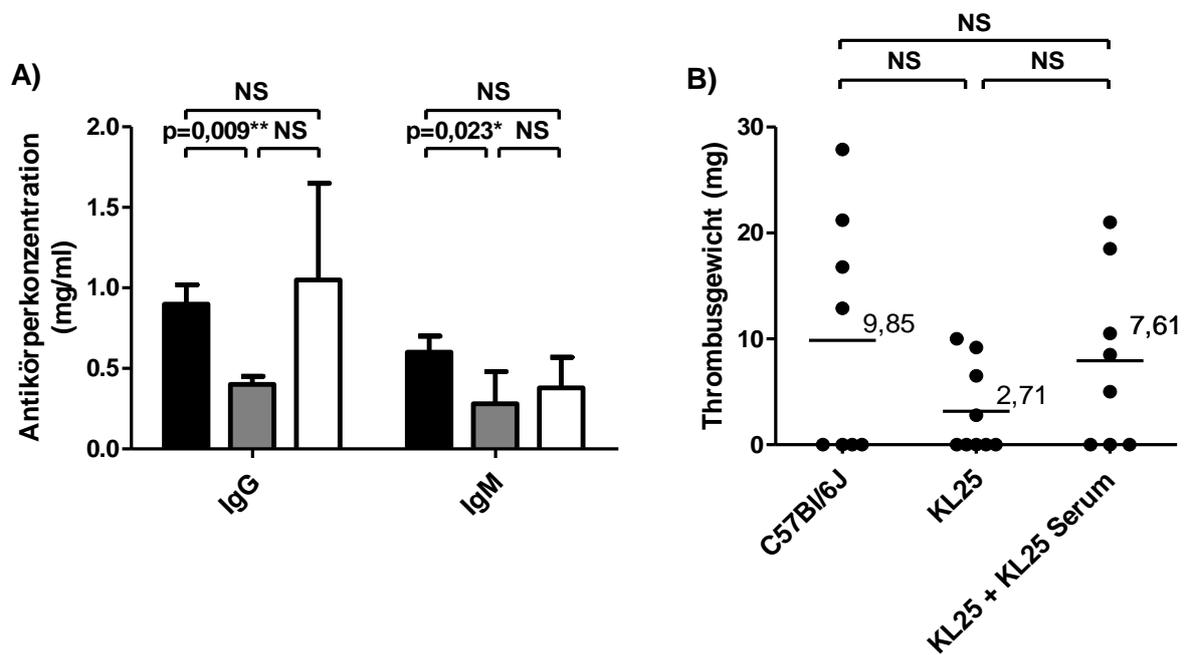


Abbildung 5: KL25 Mäuse mit Produktion von Antikörpern gegen ein irrelevantes Antigen haben ein vergleichbares Risiko zum Wildtypstamm eine venöse Thrombose zu entwickeln

- A) Antikörperkonzentration im Serum von C57Bl/6J (schwarz), KL25 (grau) und KL25 nach KL25-Serum-Supplementierung (weiß).
 * = Signifikantes Ergebnis nach Fisher LSD mit $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. NS = nicht signifikant. C57Bl/6J n=8, KL25 n=8, KL25 nach KL25 Serum-Supplementierung n=8.
- B) Thrombusgewicht nach Stenosierung der Vena cava inferior in C57Bl/6J, KL25 und KL25 nach Serum-Supplementierung
 * = Signifikantes Ergebnis nach Fisher LSD mit $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. NS = nicht signifikant. C57Bl/6J n=8, KL25 n=9, KL25 nach KL25 Serum-Supplementierung n=8.

2. Interaktion von Antikörpern mit Thrombozyten in der venösen Thrombose

2.1. Antikörper kolokalisieren mit Thrombozyten während der Entstehung der venösen Thrombose

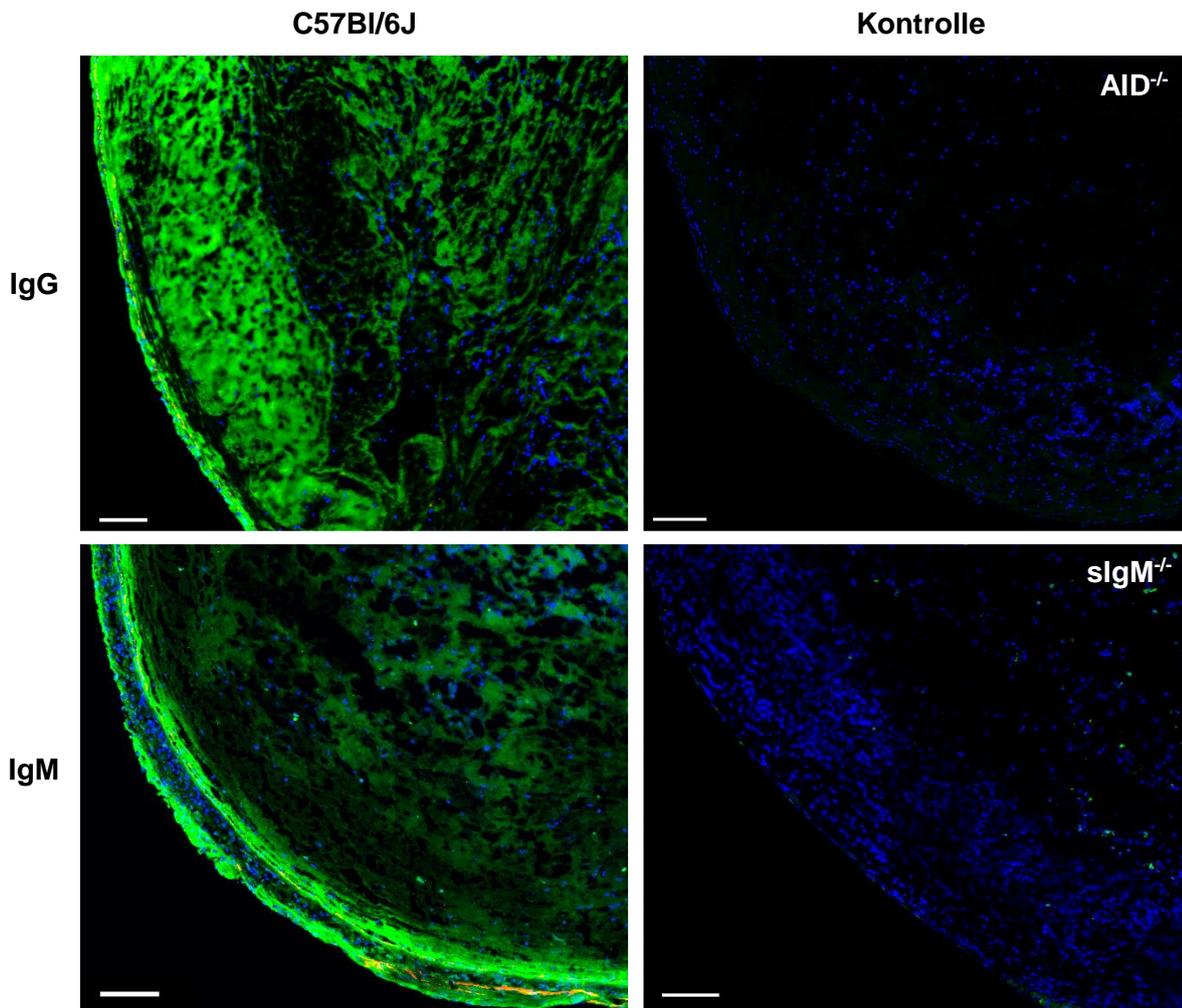


Abbildung 6: Antikörperablagerung in murinen Thromben

Transversalschnitt durch einen staseinduzierten Thrombus der Vena cava inferior und immunhistologischer Färbung. Maßstab = 100µm

Oben Links: Anreicherung von Antikörpern der Klasse IgG (grün) im Inneren des Thrombus. Rot= Endothel, blau= Zellkerne.

Rechts: IgG Antikörperfärbung in Thromben von AID^{-/-} Mäusen zeigt keine spezifische Färbung.

Unten Links: Antikörper der Klasse IgM (grün) reichern sich entlang des Endothels (rot) an. blau = Zellkerne

Rechts: IgM Antikörperfärbung in Thromben von slgM^{-/-} Mäusen zeigt keine spezifische Färbung.

Auf der Grundlage obenstehender Ergebnisse spielen Antikörper somit eine zentrale Rolle in der Thrombusentstehung. Die Frage ist nun, durch was dieser Effekt vermittelt wird. Um mögliche Bindungspartner der Antikörper identifizieren zu können, wurden histologische Färbungen angefertigt. Hierbei konzentrierten wir uns auf die beiden großen Antikörperklassen IgM und IgG. Um möglichst unverfälschte Ergebnisse zu erlangen, setzten wir primärmarkierte F(ab)₂ Fragmente ein. Die Spezifität der Färbung testeten wir anhand von Thromben aus *slgM^{-/-}* und *AID^{-/-}* Mäusen, die kein IgG, bzw. kein IgM aufweisen. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, kann abgesehen von membrangebundenen B-Zellrezeptoren in *slgM^{-/-}* kein spezifisches Signal gesehen werden. Die Färbung der Wildtypthromben hebt sich jedoch deutlich hiervon ab. Zu sehen ist eine Assoziation von IgM zu dem Endothel der Venenwand. Darüber hinaus ist jedoch auch eine diffuse wolkenartige Färbung im Inneren der Thromben zu sehen. Betroffen hiervon sind sowohl die Antikörperklassen IgG als auch IgM. Dies weist somit auf weitere Antikörperbindungen im Thrombusinneren hin.

Um die bedeutende Thrombogenität der Antikörper erklären zu können, wurden zunächst die relevanten thrombosefördernden zellulären Bestandteile des Blutes untersucht. Hierzu zählen vor allem neutrophile Granulozyten und Monozyten. Neutrophile Granulozyten sind sehr zahlreich in den venösen Thromben vorhanden (siehe Abbildung 39-42). Sie sind bekannt für die Bildung von NETs. Diese wirken über verschiedene Mechanismen gerinnungsfördernd und tragen so zur Thrombusbildung bei [5]. Neutrophile Granulozyten speichern Myeloperoxidase (MPO) in intrazellulären Vesikeln [385]. Nach Aktivierung der Zelle haftet es ebenfalls an den NETs und kann somit als Marker verwendet werden. Eine histologische Doppelfärbung mit MPO und IgG/IgM zeigt jedoch weder eine eindeutige Übereinstimmung mit neutrophilen Granulozyten noch mit NETs. Somit ist ein Zusammenhang eher unwahrscheinlich.

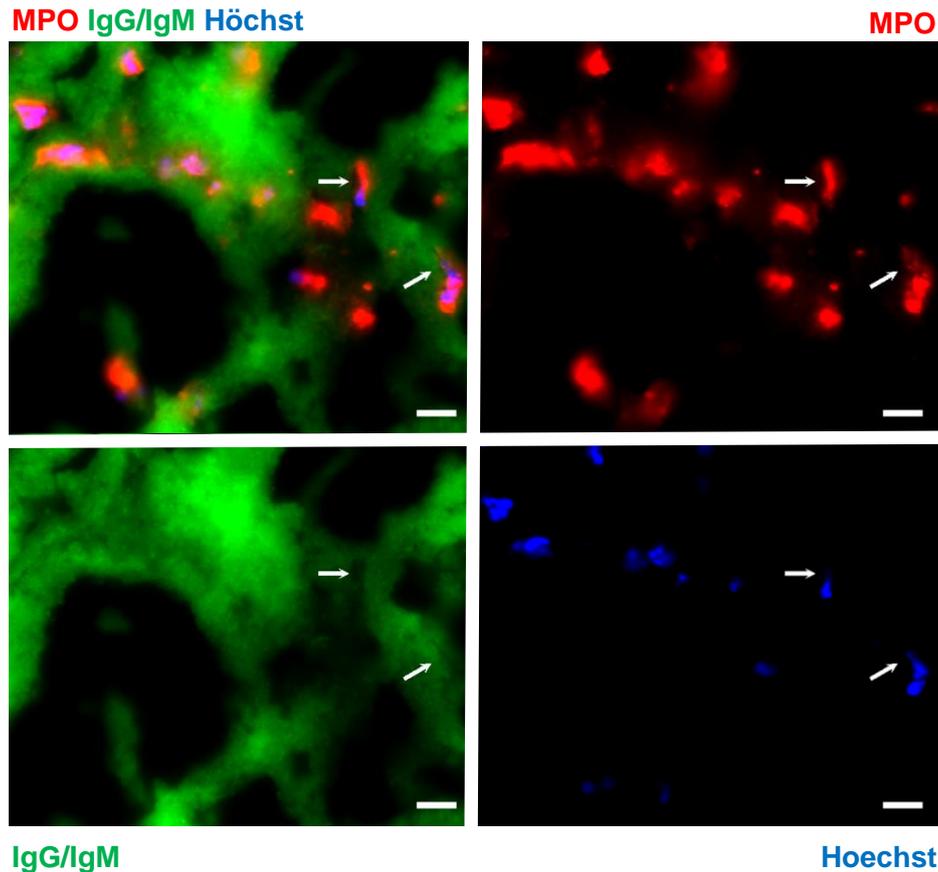


Abbildung 7: Neutrophile Granulozyten interagieren nicht mit Antikörpern im Thrombus von C57Bl/6J Mäusen

Immunhistologisches Bild eines Thrombus der Vena cava inferior 48h nach Flussreduktion. MPO in Rot (rechts oben), IgG und IgM in Grün (links unten), Hoechst in Blau (rechts unten) und die Fusion der Drei links oben. Pfeile deuten auf NET-Formationen. Maßstab = 10µm.

Aufgrund des eher flächenhaften Verteilungsmusters blieben weitere kernhaltige Zellen als primäre Bindungspartner der Antikörper zunächst außen vor. Darum fokussierten wir uns auf Fibrin und Thrombozyten. Beide sind in großer Menge im Thrombus vorhanden und sind direkt involviert in das Gerinnungsgeschehen. Tatsächlich zeigt sich in der Histologie eine große Übereinstimmung. Bei genauerem Betrachten sind es vor allem die Thrombozytenfelder, welche in Form und Ausdehnung in großem Ausmaß der Antikörperfärbung ähneln. Zwischen den Thrombozytenfeldern spannt sich ein Fibrinnetzwerk auf, das nur wenig antikörperbehaftet ist.

Dieser Eindruck konnte mit Hilfe einer digitalen Auswertetechnik, die ähnlich einer automatisch erstellten Schablone das Bild in antikörperpositive und antikörpernegative Areale unterteilt, bestätigt werden. Vergleicht man die mittlere Fluoreszenzintensität dieser beiden Bildabschnitte, so erkennt man eine deutlich größere Assoziation von IgG zu Thrombozyten (~2,5) als zu Fibrin (~1,5).

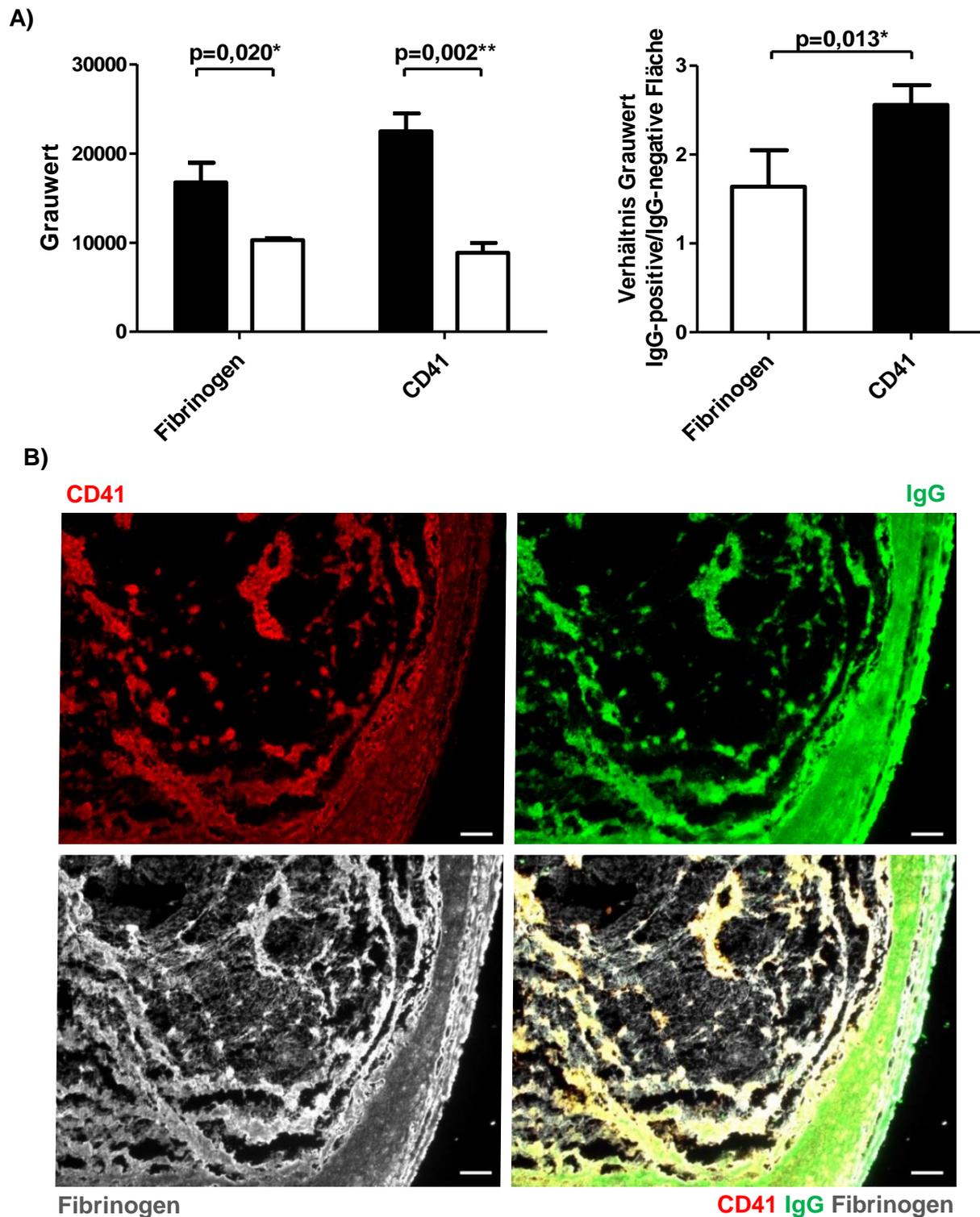


Abbildung 8: Antikörper der Klasse IgG und Thrombozyten interagieren in der venösen Thrombose muriner Präparate

A) Links: Grauwertberechnung der CD41- und Fibrinogenfärbung in Abhängigkeit von IgG (schwarzer Balken = IgG-positive Fläche; weißer Balken = IgG-negative Fläche)
Rechts: Verhältnis der Grauwerte aus 1. CD41-positive Fläche mit deutlich stärkerer Antikörperassoziation im Vergleich zu Fibrinogen.

* = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant. Jeweils $n=3$.

B) Immunhistologische Dreifachfärbung eines Thrombus mit CD41 in Rot (links oben), IgG in Grün (rechts oben), Fibrinogen in Weiß (links unten) und der Fusion aller drei (rechts unten). Maßstab = $50\mu\text{m}$.

Ein ähnliches Bild ergibt sich ebenfalls bei Analyse humaner Thromben. Auch in Lungenemboliepräparaten scheinen Thrombozyten von IgG ummauert zu werden. Selbst mit hochauflösender konfokaler Mikroskopie kann eine Übereinstimmung festgestellt werden. Die Resultate sprechen somit für ein hohes Maß an Analogie zwischen venösen Thromben aus Mensch und Maus. Ein ähnlicher Mechanismus der Thrombusentstehung kann angenommen werden.

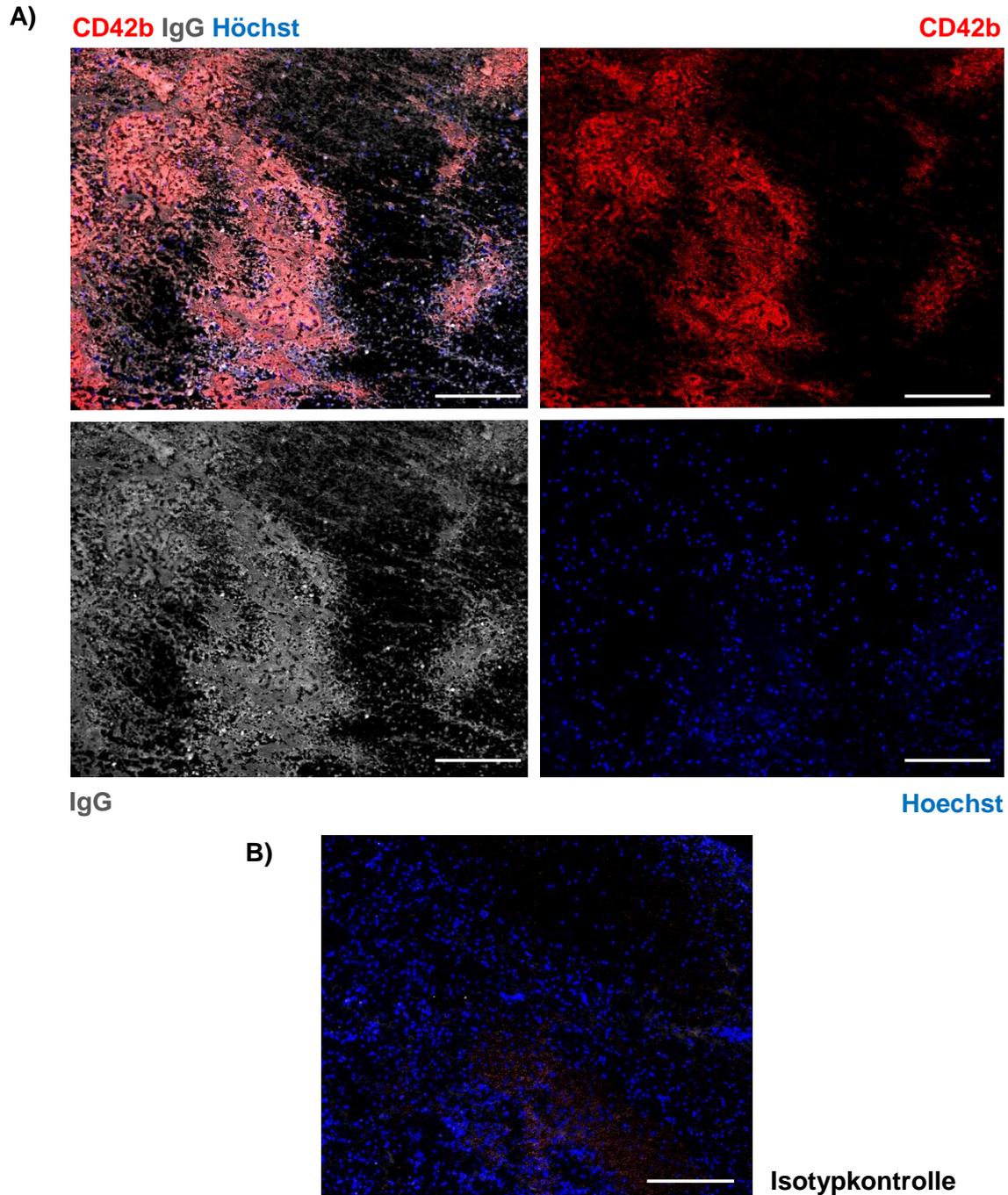


Abbildung 9: Hohe Übereinstimmung zwischen Antikörpern der Klasse IgG und Thrombozyten in humanen Lungenemboliepräparaten

- A) Immunhistologische Dreifachfärbung eines Thrombus mit CD42b in Rot (rechts oben), IgG in Weiß (links unten), Hoechst in Blau (rechts unten) und der Fusion aller drei (links oben). Maßstab: 200µm.
- B) Isotypkontrolle zu A) Maßstab: 200µm.

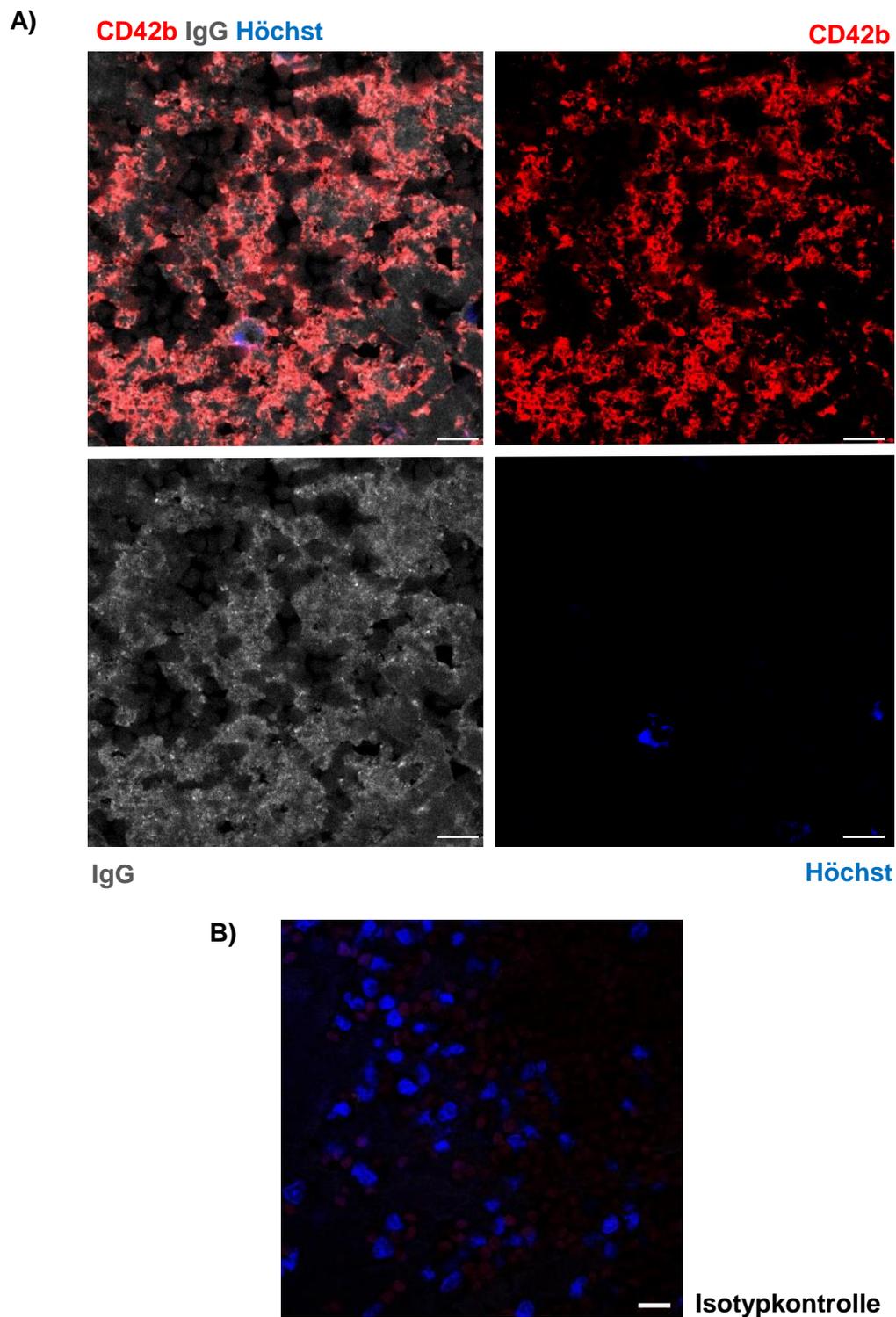
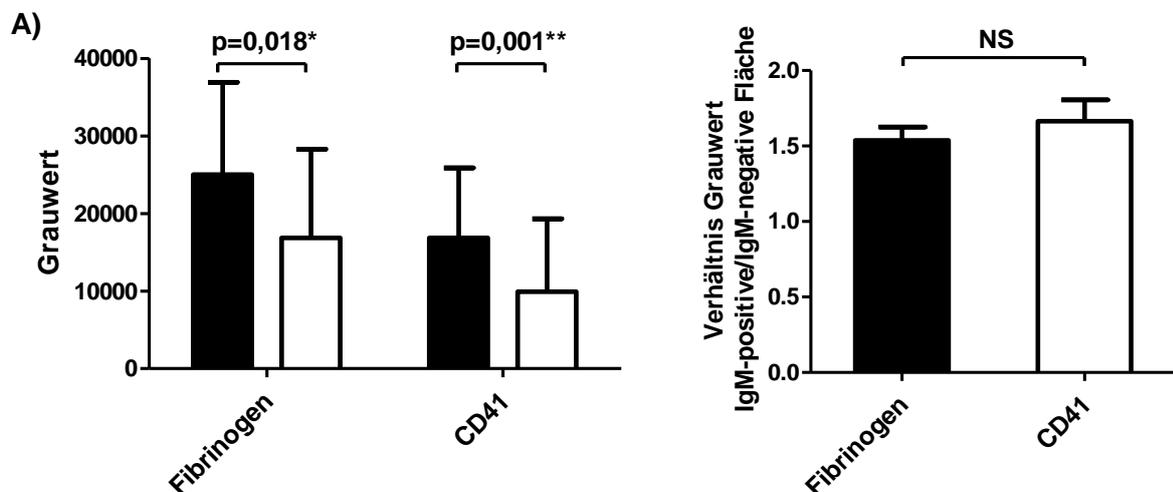


Abbildung 10: Antikörper der Klasse IgG und Thrombozyten interagieren in humanen Lungenemboliepräparaten

- A) Immunhistologische Färbung in konfokaler Technik mit CD42b in Rot (rechts oben), IgG in Weiß (links unten), Hoechst in Blau (rechts unten) und der Fusion aller drei (links oben). Maßstab: 10µm.
- B) Isotypkontrolle zu A) Maßstab: 10µm.

Betrachtet man die Verteilung von IgM im Thrombus von Menschen bzw. Mäusen, so ergibt sich ein ähnlicher Eindruck wie zuvor bei IgG. Auch in diesem Fall scheinen die Thrombozytenfelder angereichert zu sein mit IgM, während die Fibrinfäden außerhalb dieser Areale weitestgehend frei von Antikörpern sind. Auffällig ist jedoch eine allgemein niedrigere Signalstärke der IgM-Färbung im Thrombusinneren im Vergleich zu IgG. Entsprechend ergab die digitale Auswertung dieser Bilder eine deutlich reduzierte Assoziation von IgM zu Thrombozyten ($\sim 1,7$), bei gleichbleibend niedrigen Werten für Fibrin ($\sim 1,5$). Der histologischen Auswertung zufolge ist es somit vor allem das IgG, welches im Thrombus mit Thrombozyten kolokalisiert.



B)

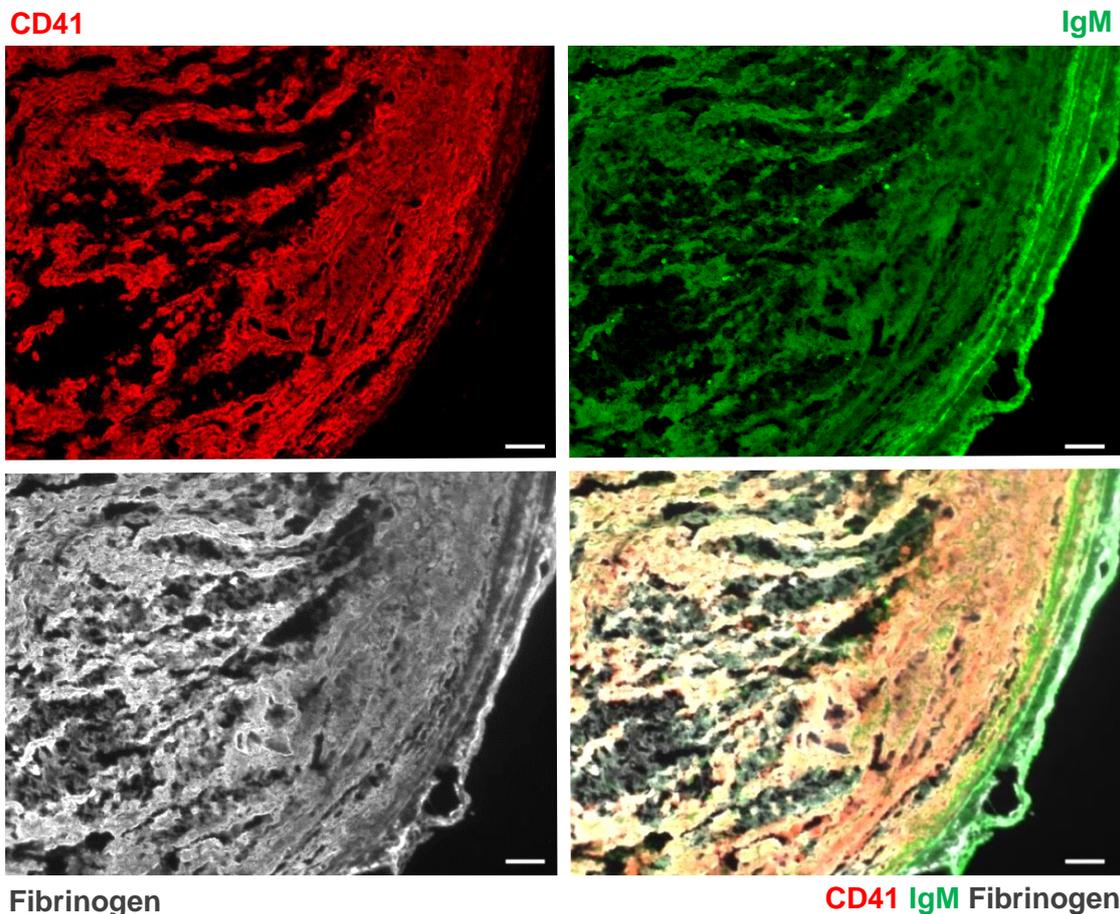
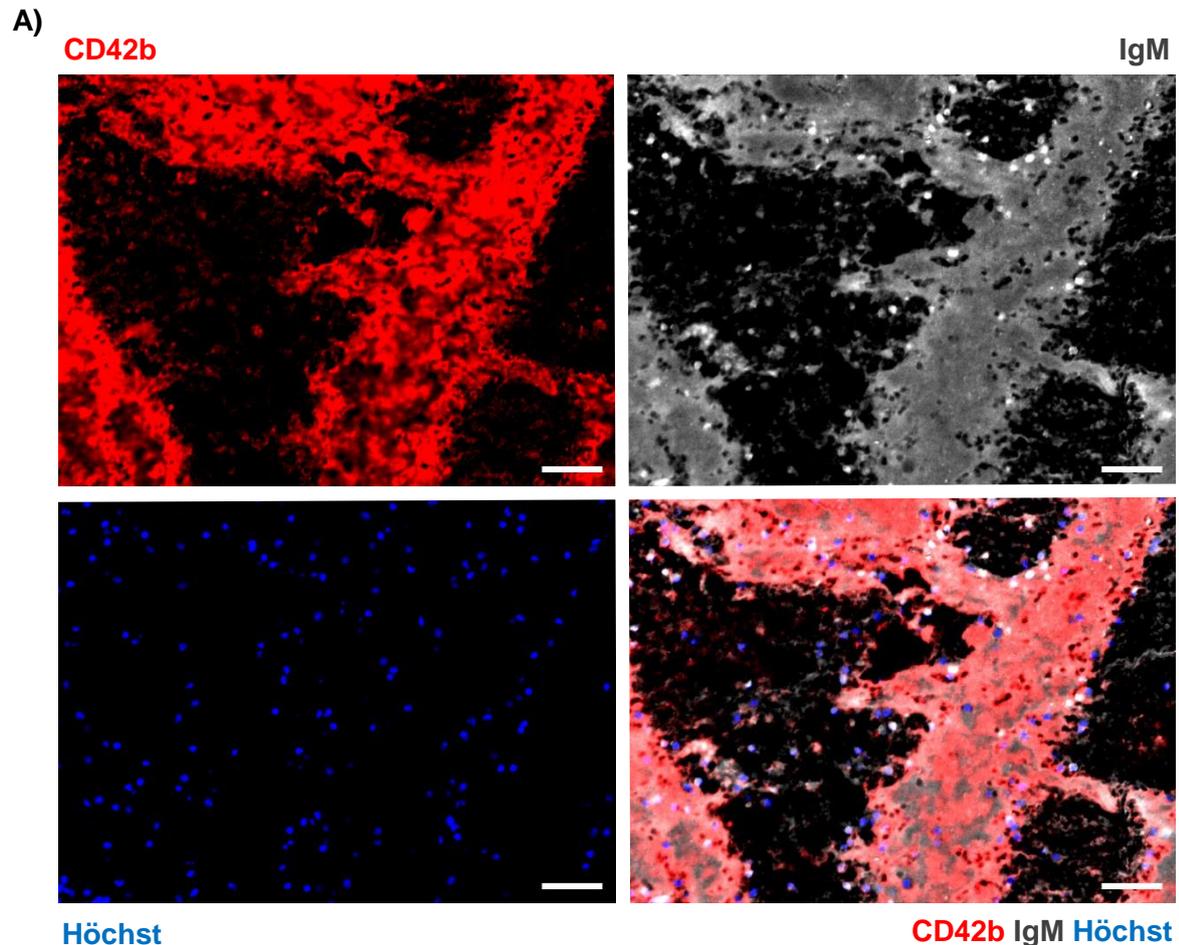


Abbildung 11: Antikörper der Klasse IgM interagieren in der venösen Thrombose mit Thrombozyten und dem Endothel

- A) Links: Graumittelwertberechnung der CD41 und Fibrinogenfärbung in Abhängigkeit von IgM (schwarzer Balken = IgM-positive Fläche; weißer Balken = IgM-negative Fläche)
 Rechts: Verhältnis der Graumittelwerte aus 1. CD41-positive Fläche mit deutlich stärkerer Antikörperassoziation im Vergleich zu Fibrinogen.
 * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant. Jeweils $n=4$.
- B) Immunhistologische Dreifachfärbung eines murinen Thrombus mit CD41 in Rot (links oben), IgM in Grün (rechts oben), Fibrinogen in Weiß (links unten) und der Fusion aller drei (rechts unten). Maßstab = $50\mu\text{m}$.

Auch in Bezug auf IgM herrscht hohe Analogie zwischen humaner und muriner Thrombuspräparate. IgM zeigt eine hohe Assoziation zu Thrombozyten. Da es sich um Thrombendarteriektomiepräparate handelt, ist die Interaktion mit dem Endothel nicht beurteilbar.



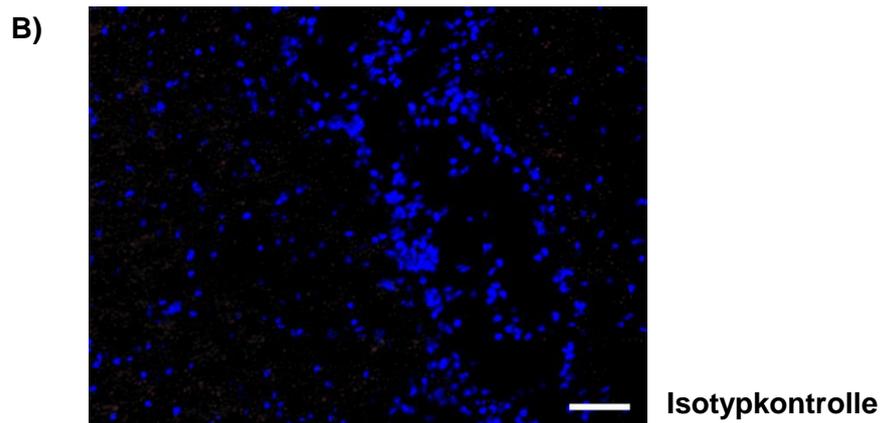
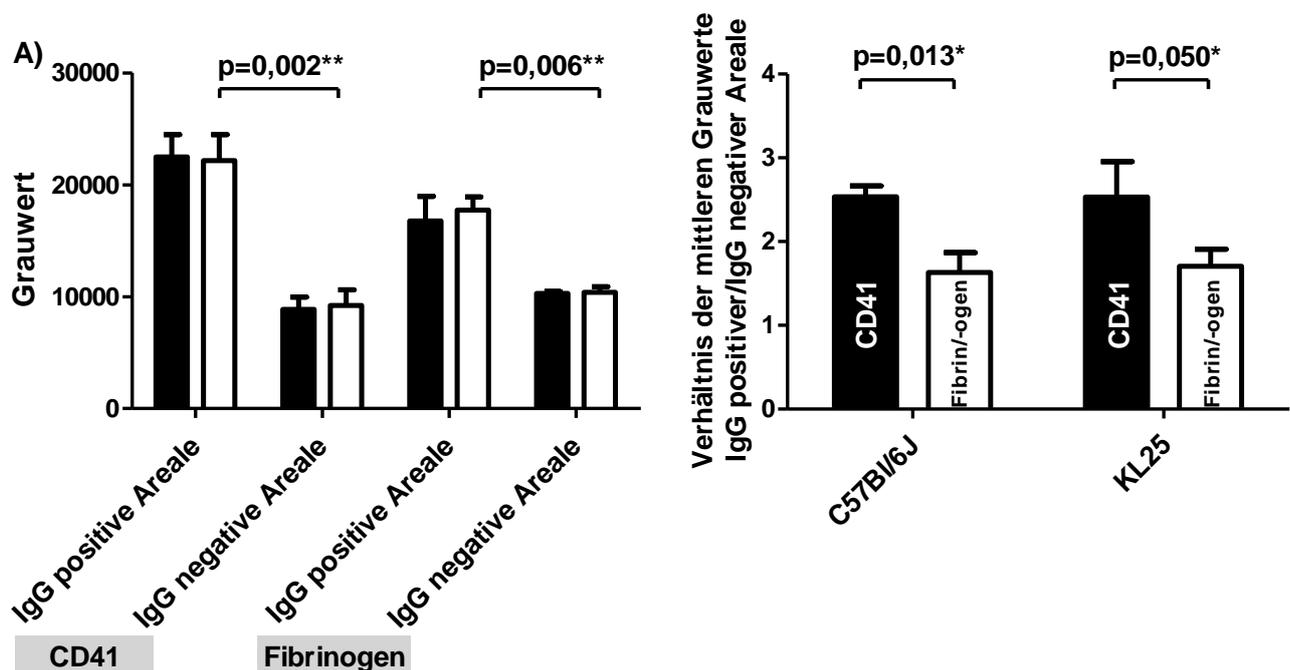
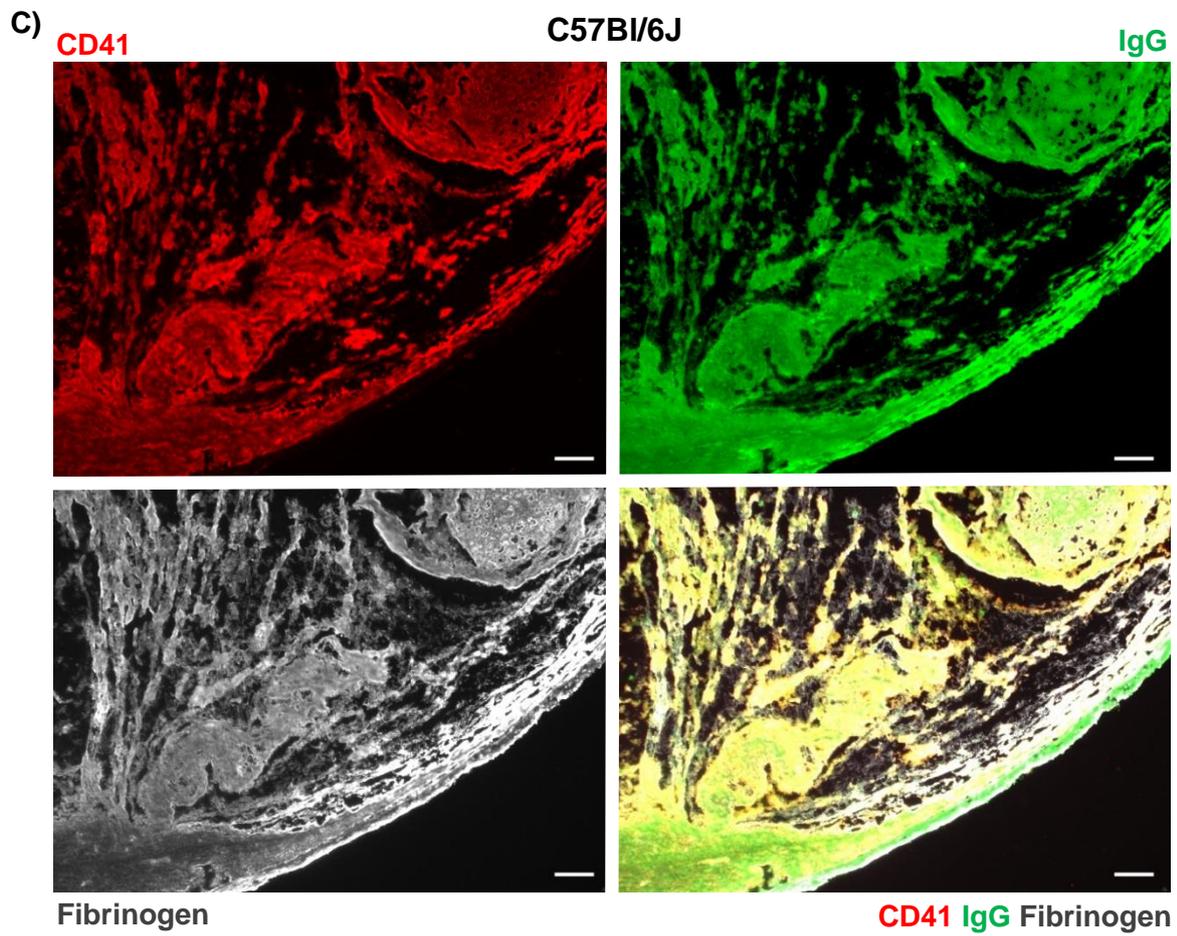
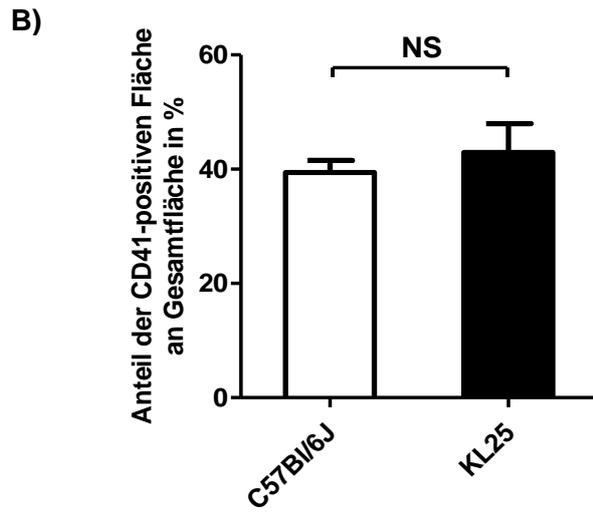


Abbildung 12: Antikörper der Klasse IgM interagieren mit Thrombozyten in humanen Lungenemboliepräparaten

- A) Immunhistologische Dreifachfärbung: Oben links: CD42b (rot), oben rechts: IgM (weiß) unten links: Hoechst (blau); unten rechts Fusionsbild. Maßstab: 50µm.
 B) Isotypkontrolle zu A) Maßstab: 50µm.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob Antikörper, die gegen ein irrelevantes Antigen gerichtet sind, ein ähnliches Verteilungsmuster wie Wildtypantikörper aufweisen. Dies konnte anhand der Thromben aus KL25 Mäusen analysiert werden. Dabei gingen wir ähnlich wie bei den C57Bl/6J Thromben vor. Die Grauwertanalyse der IgG-CD41-Fibrinogen-Dreifachfärbung zeigte keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Ebenfalls annähernd identisch ist der Anteil der CD41 positiven Fläche an der gesamten Thrombusfläche. Dies setzt eine ähnliche Verteilung mit einer vergleichbaren Anzahl an Thrombozyten im Thrombus voraus. Ein Zusammenhang zwischen Thrombozytenakkumulation und deren Interaktion mit Antikörpern ist somit sehr wahrscheinlich. Das Antigen, gegen das die Antikörper gerichtet sind, scheint hierbei keine Rolle zu spielen.





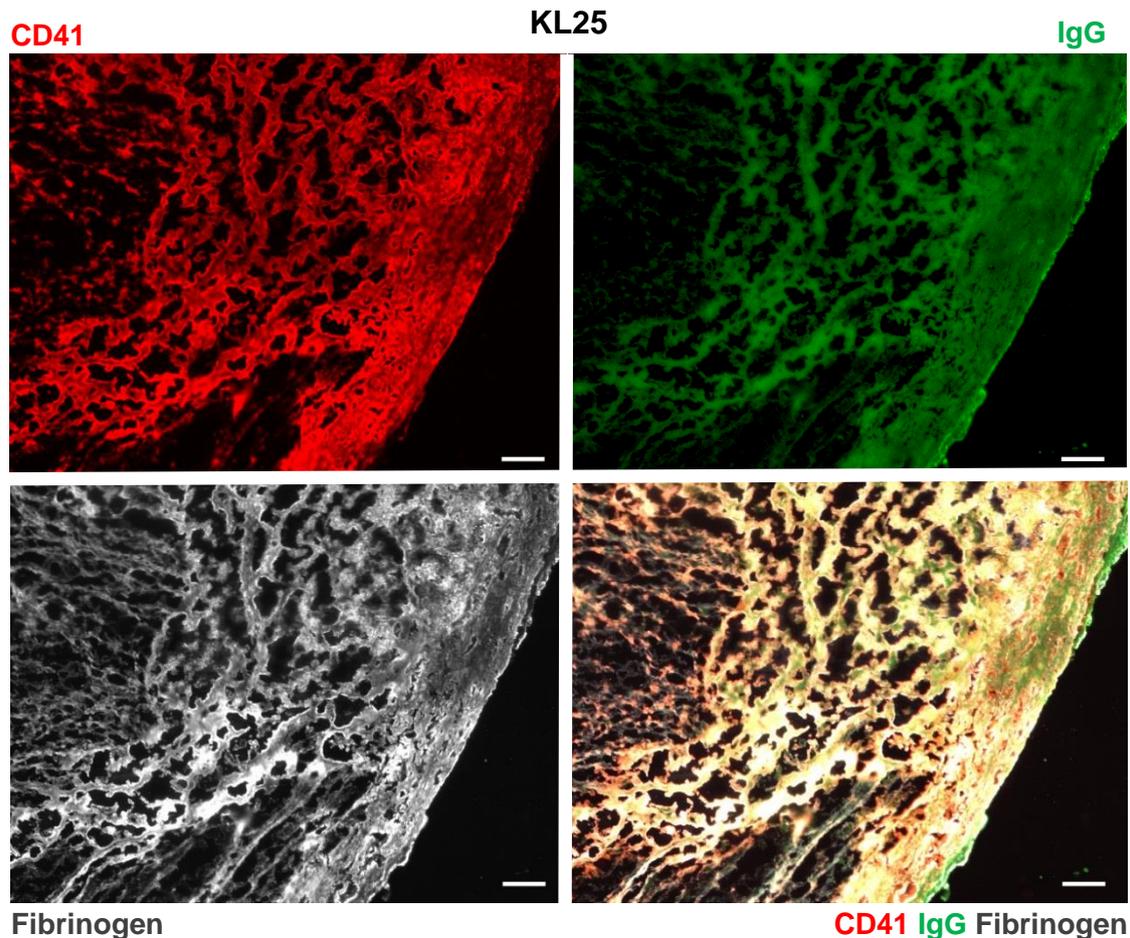


Abbildung 13: Antikörper aus KL25 Mäusen, gerichtet gegen ein irrelevantes Antigen, binden Thrombozyten in der venösen Thrombose

- A) Links: Graumittelwertberechnung der CD41 und Fibrinogenfärbung in Abhängigkeit von IgG (Schwarz = C57Bl/6J, Weiß = KL25).
 * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant. C57Bl/6J $n=3$, KL25 $n=4$.
 Rechts: Verhältnis der Graumittelwerte IgG-positiver Areale/IgG-negativer Areale (Schwarz = CD41, Weiß = Fibrinogen).
 * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant. C57Bl/6J $n=3$, KL25 $n=4$.
- B) Prozentualer Anteil der CD41-positiven Fläche an der Gesamtfläche des Thrombus.
- C) Repräsentative immunhistologische Bilder CD41 = Rot, IgG = Grün, Fibrinogen = Weiß, C57Bl/6J = oben, KL25 = unten, Maßstab = 50 μ m.

Thrombozyten sind Zellen, die sowohl zu Beginn der Thrombusentstehung, als auch bei dessen Fortentwicklung eine große Rolle spielen. Entsprechend ist es wichtig zu wissen, in welchem Stadium die Interaktion mit Antikörpern stattfindet. Um hier mehr Erkenntnisse zu erhalten, wurden frühe Thrombusstadien immunhistologisch untersucht. Bereits eine Stunde nach Ligatur konnte entlang des Endothels ein Antikörpersaum bestehend aus IgM identifiziert werden. IgG zeigt keine eindeutige Assoziation zum luminalen Teil der Gefäßwand. In späteren Stadien (12 Stunden nach Ligatur) verteilen sich Antikörper beider Klassen ähnlich wie nach 48 Stunden wolkenartig über den gesamten Thrombus. Immunglobuline greifen somit früh in die Thrombusentstehung ein. Es scheint ein sehr dynamischer Prozess zu sein.

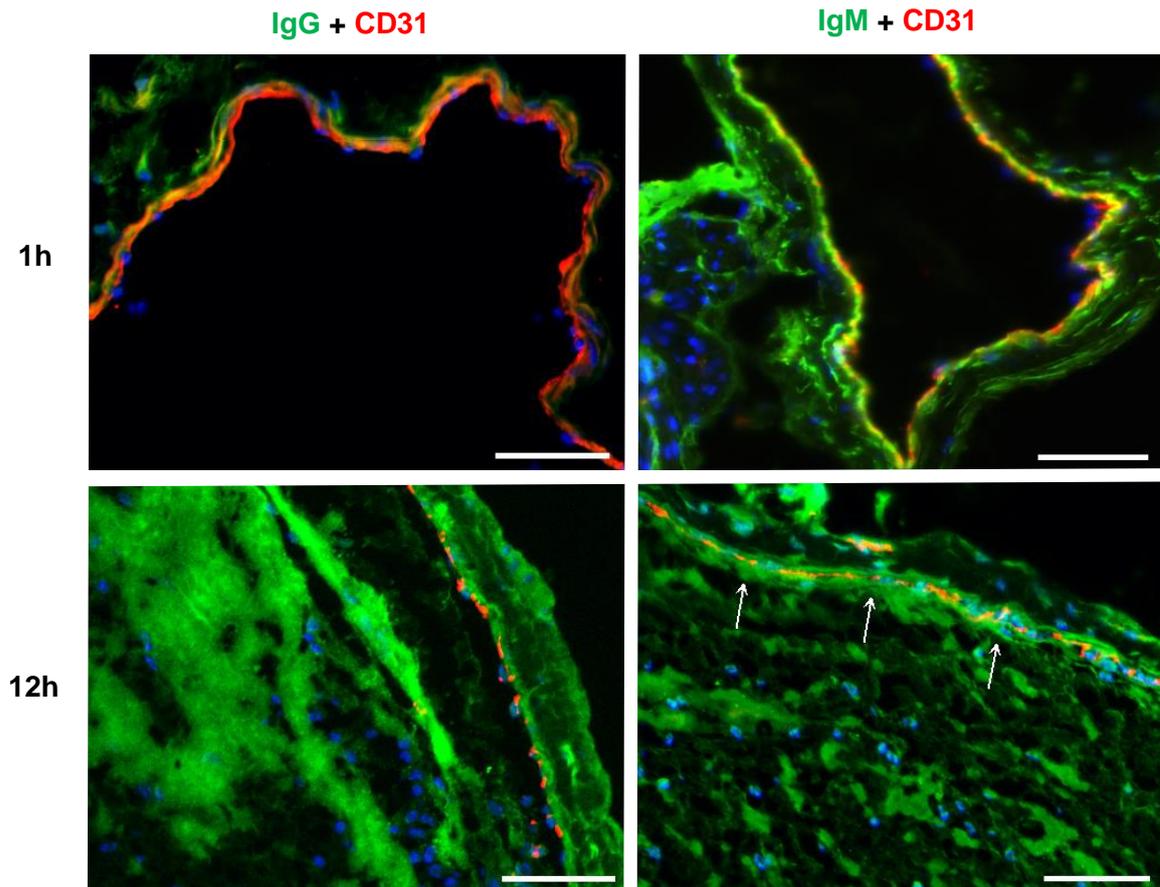


Abbildung 14: Frühe Assoziation von Antikörpern mit Thrombusmaterial (IgG) bzw. mit dem Endothel (IgM)

Immunhistologische Dreifachfärbung mit CD31 (rot), IgM/IgG (grün) und Hoechst (blau); Maßstab = 50µm.

Links oben: Eine Stunde nach Ligatur ist noch keine Assoziation von IgG zum Endothel zu sehen.

Links unten: 12 Stunden nach Ligatur reichert sich IgG fleckenförmig im Thrombusinneren an.

Rechts oben: Bereits nach einer Stunde deutlich sichtbarer IgM-Saum entlang des Endothels

Rechts unten: Assoziation von IgM mit dem Endothel (Pfeile von luminal) und dem Thrombusmaterial 12 Stunden nach Ligatur.

2.2. Thrombozyten-Antikörperinteraktion *in vitro*

Die genaue Analyse der histologischen Bilder ergab bereits einen guten Eindruck über die Verteilung der Antikörper im Thrombus. Der Aufbau von Thromben ist jedoch sehr komplex. Der Entstehungsprozess beinhaltet das Zusammenspiel verschiedener Plasmabestandteile ebenso wie Leukozyten und Thrombozyten. Diese interagieren auf verschiedenste Weise. Viele Kaskaden laufen parallel zueinander ab. Entsprechend schwer sind diese Interaktionen *in vivo* voneinander zu trennen. *In-vitro*-Versuche haben den Vorteil, einzelne Strukturen isoliert betrachten zu können. Mit Hilfe von ELISA war es möglich, das Bindungsverhalten von fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegenüber verschiedenen Oberflächen objektiv zu

analysieren. Aufgrund der zuvor beschriebenen Erkenntnisse von KL25 Mäusen wurde das Verhalten eines unspezifischen FITC-markierten IgG Isotyp Antikörpers in der Lösung untersucht. Fibrin/Fibrinogen-beschichtungen imitierten den Einfluss der plasmatischen Gerinnung vor und nach Aktivierung der Kaskade. Auch der Einfluss von Thrombozyten konnte durch dessen Zusatz untersucht werden. Als Lösungsmittel wurde Plasma verwendet um ein möglichst physiologisches Milieu herzustellen.

Wie die Histologie der Thromben bereits erahnen ließ, bindet IgG nur geringfügig an Gerinnungsbestandteile. Auch der Einfluss von Thrombin erbrachte kaum einen Unterschied. Erst der Zusatz von Thrombozyten ließ die Menge an gebundenen Antikörpern auf der Versuchsoberfläche signifikant steigen. Interessant hierbei war, dass nur Thrombozyten zusammen mit Fibrin eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität in dem Präparat erbrachte. Die Antikörperbindung an Thrombozyten mit Fibrinogenbeschichtung blieb unverändert im Vergleich zu den übrigen Gruppen. Diese Konstellation verdeutlicht nochmals, dass die Thrombozyten die entscheidenden Bindungspartner für Antikörper im Thrombus darstellen. Zu bemerken ist jedoch, dass Thrombozyten dieser Rolle nur unter bestimmten Bedingungen (hier Fibrininteraktion) gerecht werden. Ein möglicher Einflussfaktor kann der Aktivitätszustand der Zelle sein. Gerinnungsfaktoren wie Thrombin nehmen hierauf einen bedeutenden Einfluss [391].

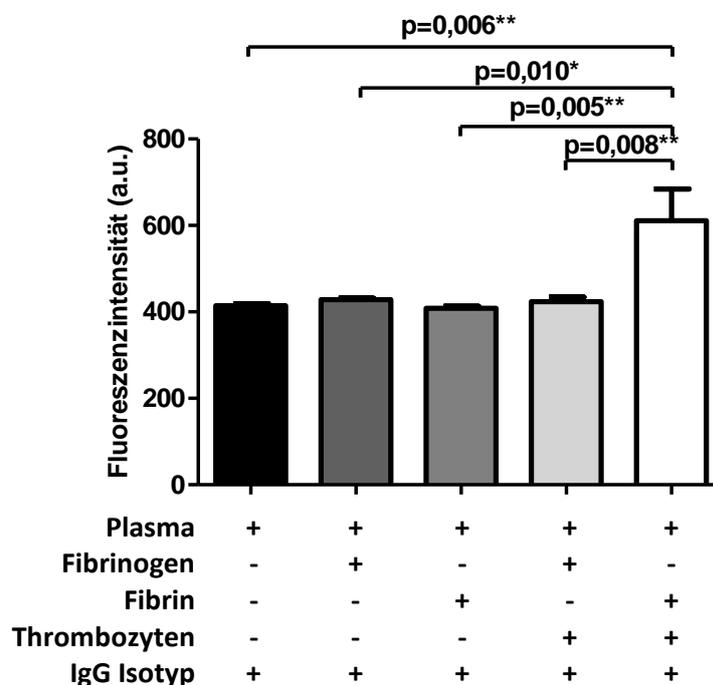


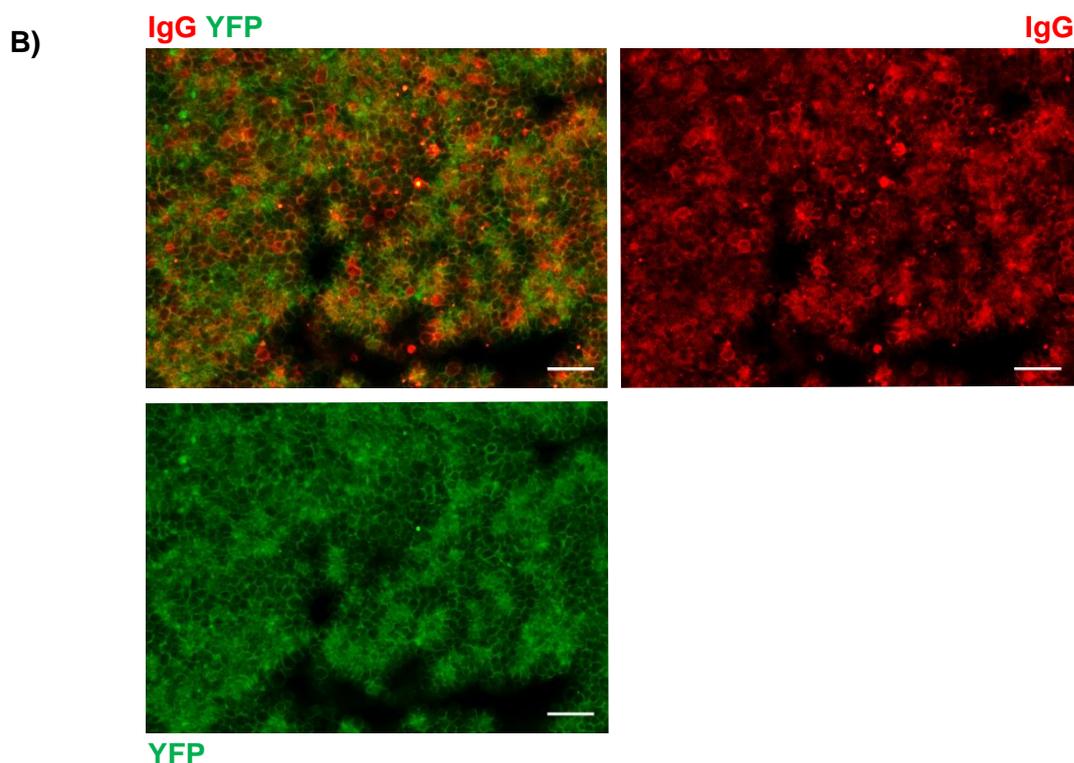
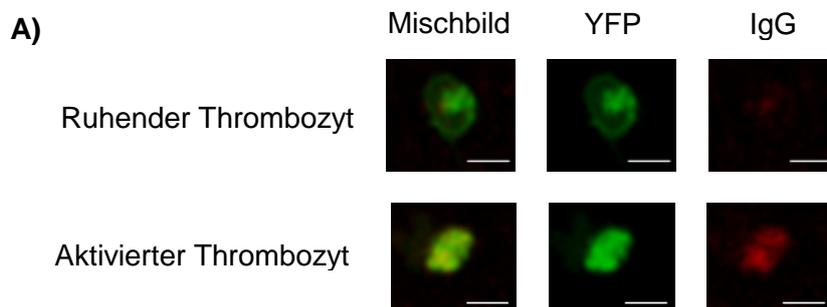
Abbildung 15: Aktivierte Thrombozyten sind das entscheidende Element, welches zur Akkumulation von IgG im Thrombus führt

Quantifizierung der IgG Isotypantikörperablagerung auf Fibrin-, Fibrinogen- oder Thrombozytenbeschichtungen, sowie deren Kombination, mittels ELISA.

A.u.= Arbitrary units; * = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 5 Gruppen mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant. Jeweils $n=3$.

2.3. Antikörperbindung in Abhängigkeit von der Aktivität der Thrombozyten

Um eine Interaktion von Antikörpern mit Thrombozyten möglichst eindeutig zu bestätigen, wurden isolierte Thrombozyten im Ruhezustand sowie nach Aktivierung mikroskopisch untersucht. Bereits bei geringer Vergrößerung war eine klare Assoziation von Antikörpern zu Aggregaten zu erkennen. Die Aggregate konnten in Folgeexperimenten mit Hilfe von Blut aus PF4Cre-ROSA26YFP Mäusen zweifelsfrei als Thrombozyten identifiziert werden. Gleichzeitig ermöglichten uns diese Mäuse die Thrombozyten mit hochauflösender konfokaler Technik betrachten zu können. Innerhalb der Aggregate ist deutlich die Antikörperakkumulation zwischen den einzelnen Thrombozyten zu sehen, welches den Anschein einer wabenartigen Anordnung hinterlässt. Auch einzelne aktivierte Thrombozyten sind mit Antikörpern bedeckt. Hier ist die höchste Antikörperkonzentration im Bereich des Pseudonukleus, der Ort mit der größten Zelldicke, zu vermuten [392]. Auf ruhenden Thrombozyten konnte nahezu kein IgG nachgewiesen werden. Die Bindung von Antikörpern ist somit spezifisch für aktivierte Thrombozyten. Dank hochauflösender Konfokaltechnik konnten wir mit hoher Wahrscheinlichkeit die Lokalisation von IgG auf die Oberfläche der Zelle beschränken.



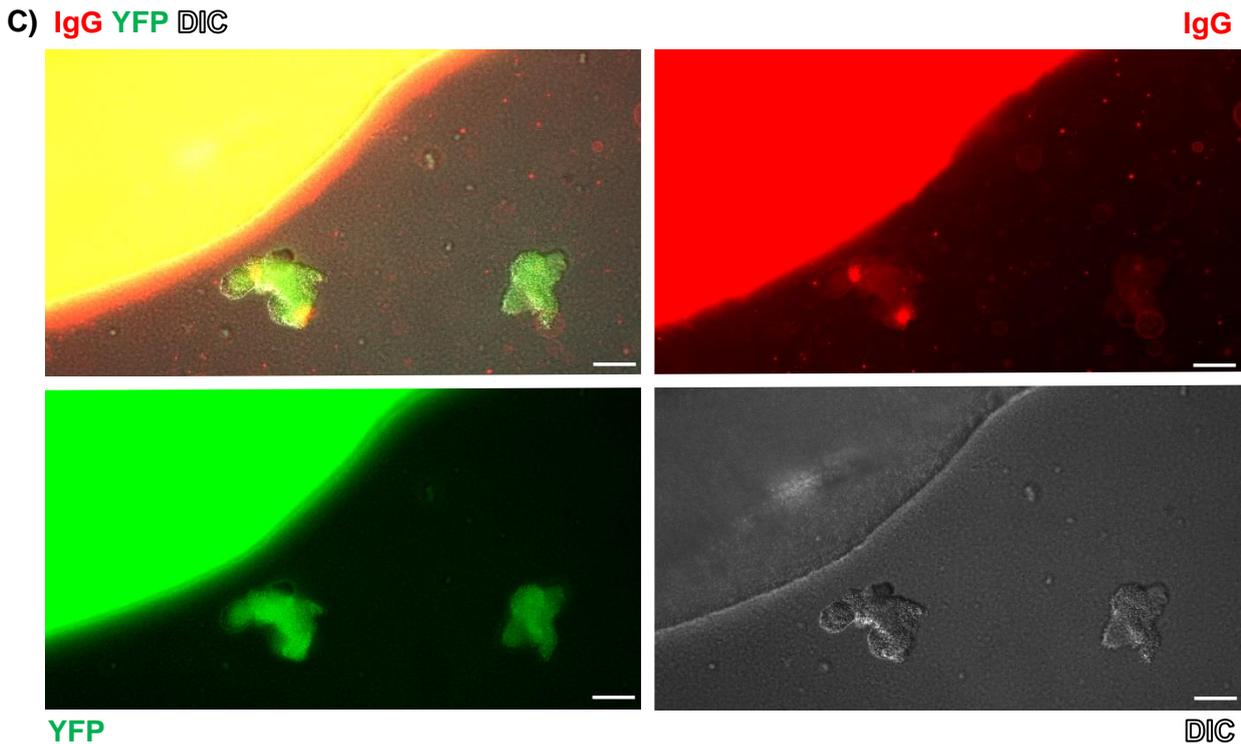


Abbildung 16: Thrombozyten interagieren nach Aktivierung mit Isotypantikörpern der Klasse IgG

- A) Konfokale Mikroskopie einzelner ruhender Thrombozyten (oben) und aktivierter Thrombozyten (unten). Grün = YFP-Signal von PF4Cre-ROSA26YFP-Maus; Rot = PE-markierter IgG1 Isotypantikörper. Maßstab = 2µm.
- B) Konfokale Mikroskopie von Thrombozytenaggregaten nach Aktivierung. Grün = YFP-Signal von PF4Cre-ROSA26YFP-Maus; Rot = PE-markierter IgG1 Isotypantikörper. Maßstab = 10µm.
- C) Mittlere und große Thrombozytenaggregate in der Übersicht. Grün = YFP-Signal von PF4Cre-ROSA26YFP-Maus; Rot = PE-markierter IgG1 Isotypantikörper, DIC = Differential interference contrast. Maßstab = 50µm.

Um die Bindung von Antikörpern an Thrombozyten objektivieren zu können, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen mit gewaschenen Thrombozyten durchgeführt. Dies ermöglicht nicht nur die Analyse einzelner Zellen, auch die Größe der Aggregate konnte über die Streubreite des Lasers (Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht) überwacht werden. Untersucht wurde wieder das Verhalten von FITC-markierten IgG1 Isotypantikörpern. In einem ersten Ansatz verglichen wir die Fluoreszenzintensität ruhender Thrombozyten mit aktivierten Thrombozytenaggregaten. Hier zeigte sich ein statistisch hochsignifikanter Unterschied. Auf Grundlage der zuvor gesehenen analytischen Auswertung histologischer Färbungen besteht der Verdacht, dass auch Antikörper der Klasse IgM an Thrombozyten binden können. Dies konnte in durchflusszytometrischen Untersuchungen bestätigt werden. Überraschenderweise ist die Assoziation von FITC IgM Isotypkontrollantikörpern in Vergleich zu IgG zu aktivierten Thrombozyten sogar leicht erhöht (siehe Abbildung 17 B). Die Assoziation von Antikörpern mit Thrombozyten ist somit nicht spezifisch für eine einzelne Antikörperklasse. Dies führte uns zu

der Frage, ob die Interaktion mit Thrombozyten spezifisch für Antikörper ist oder ob auch andere Plasmapbestandteile an dessen Oberfläche binden können. Um dies herauszufinden ersetzten wir die Antikörper durch fluoreszenzmarkiertes Albumin. Auch hier konnte eine deutliche Assoziation zu aktivierten Thrombozyten festgestellt werden. Dies verdeutlicht, dass es sich hier um einen unspezifischen Adhäsionsprozess für vielerlei Plasmapbestandteile handelt.

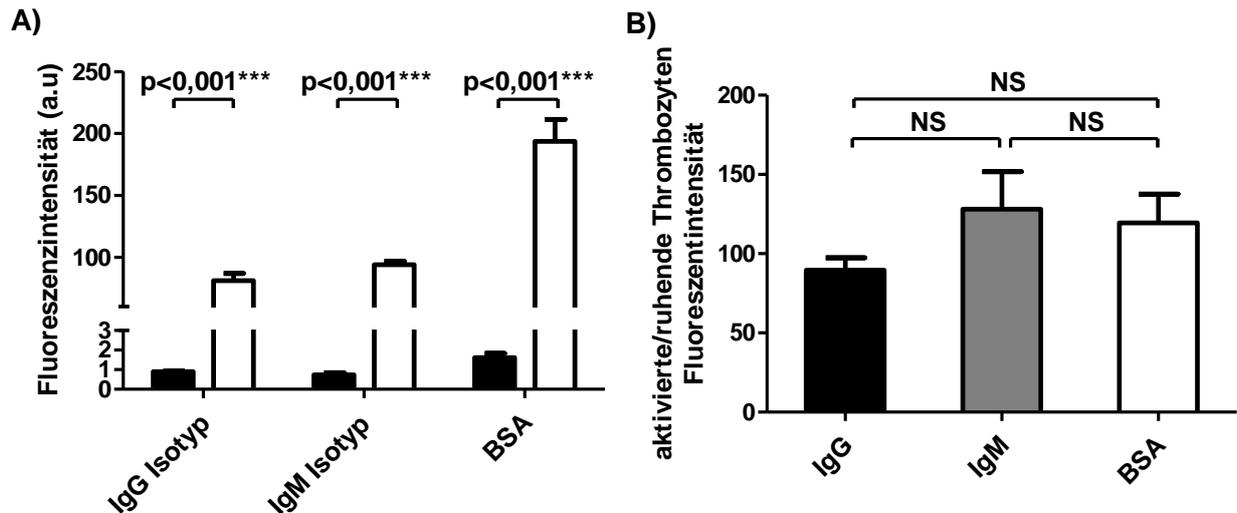
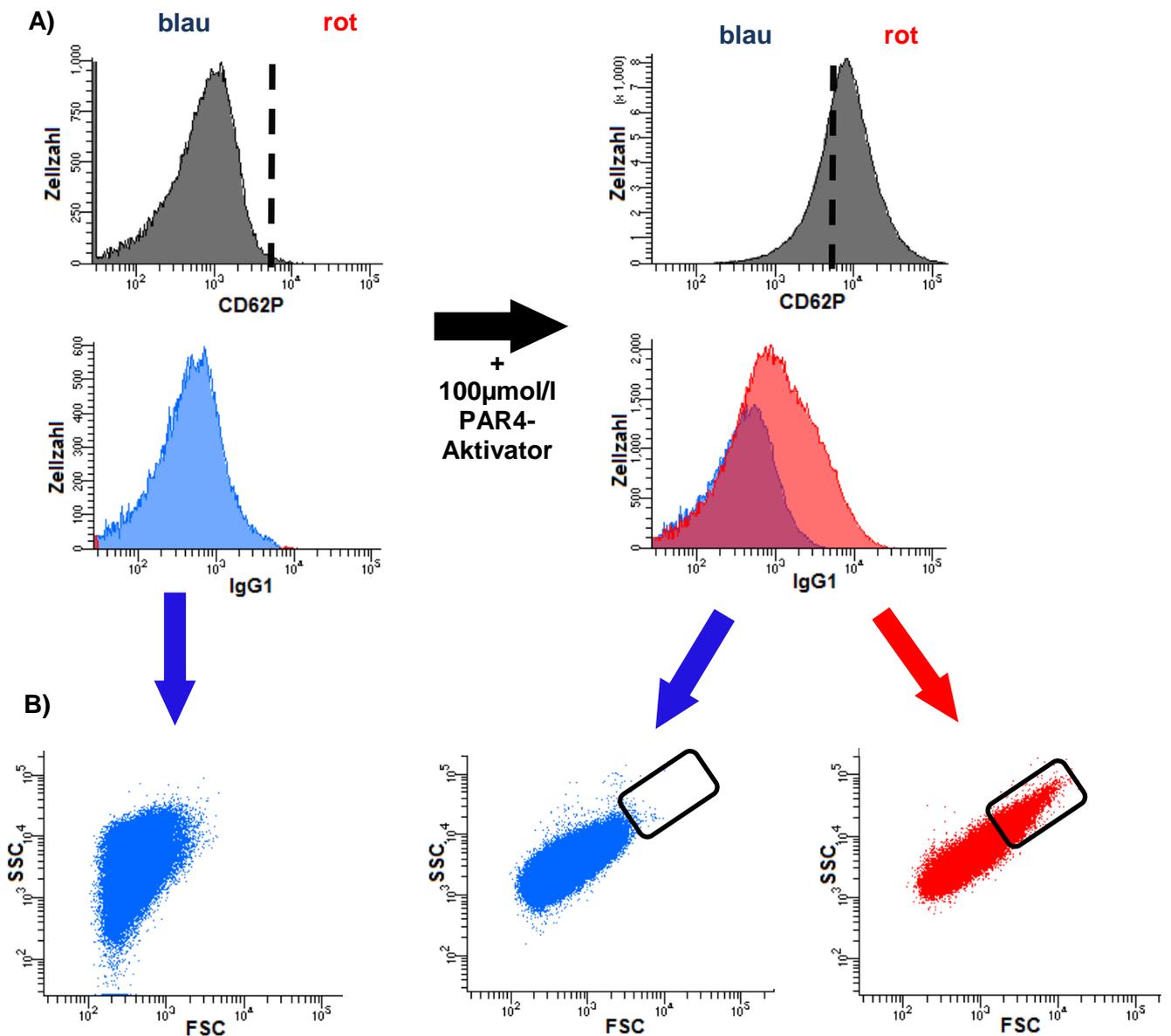


Abbildung 17: Antikörper der Klasse IgG und IgM sowie Albumin lagern sich auf aktivierten Thrombozyten ab

- A) Fluoreszenzabsolutwerte in durchflusszytometrischen Untersuchungen.
A.u.= Arbitrary units, * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant. Jeweils $n=3$.
- B) Verhältnis der Fluoreszenzintensität aktivierter Thrombozyten zu ruhender Thrombozyten.
* = Signifikantes Ergebnis nach Fisher LSD * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant. Jeweils $n=3$.

In den bisher gesehenen Resultaten wurden vor allem einzelne Thrombozyten mit Aggregaten verglichen. Um differenzierter den Aktivitätszustand der Thrombozyten untersuchen zu können wurde zusätzlich die Exposition von P-Selektin durchflusszytometrisch aufgezeichnet. Das P-Selektin-Signal steigt deutlich an nach Zugabe eines protease-activated receptor 4-bindenden Peptids (PAR4). PAR4 gehört zu der Familie der Thrombin-Rezeptor-aktivierenden-Peptide (TRAP). Mit Hilfe der P-Selektinmarkierung konnten aktivierte Thrombozyten von nicht aktivierten Thrombozyten unterschieden und isoliert untersucht werden. Auch hier war ein deutlicher Zuwachs der IgG Isotypantikörperablagerung an P-Selektin-positiven Thrombozyten zu sehen. Dies galt sowohl für murine (Abbildung 18) als auch für humane Thrombozyten. Betrachtet man nun das Aggregationsverhalten der P-selektin-positiven Thrombozyten, welche auch IgG-positiv sind, so sieht man, dass diese Gruppe sowohl aus

Aggregaten, als auch aus einzelnen Thrombozyten besteht. Das Verhalten der P-Selektin-negativen Thrombozyten unterschied sich durch das Fehlen von Aggregaten hiervon deutlich. Folglich ist die Antikörperbindung an Thrombozyten nicht ausschließlich durch deren Aggregation und dem damit verbundenen passiven Verfangen von Plasmabestandteilen zwischen den Zellen zu erklären. Vielmehr ist die Verursachung für dieses Phänomen auf der Oberfläche der einzelnen Thrombozyten zu suchen.



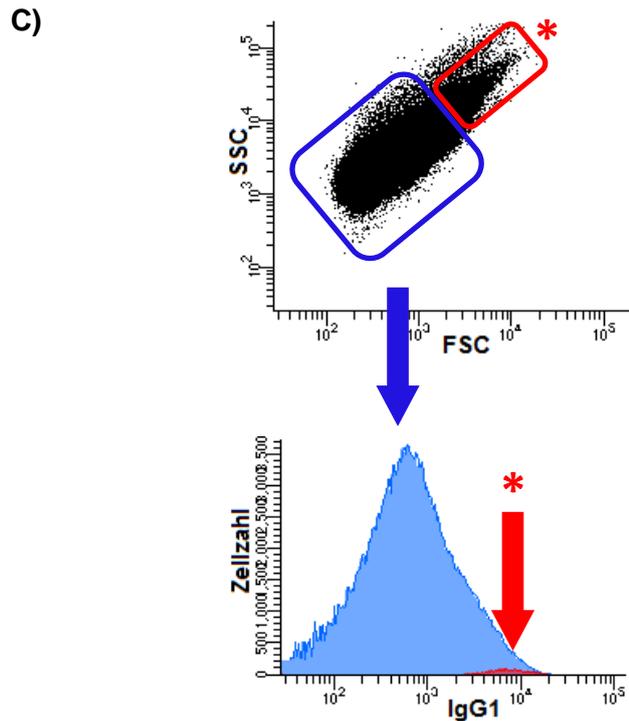


Abbildung 18: Die Ablagerung von IgG auf aktivierte Thrombozyten ist unabhängig von dem Aggregationsausmaß der Zellen

Durchflusszytometrische Untersuchung

- A) Oben: CD62P-Messung mit und ohne PAR4-Aktivator (protease-activated receptor 4) an gewaschenen Thrombozyten.
 Unten: Darstellung der IgG1 Isotypantikörpermenge auf CD62P-negativen (blau) und CD62P-positiven (rot) Thrombozyten.
- B) Darstellung der Aggregatgrößen mittels Vorwärtsstreulicht (forward scatter = FSC) und Seitwärtsstreulicht (side scatter = SSC) in Abhängigkeit des Aktivitätszustandes gemessen durch CD62P. (CD62P-negativ = blau, CD62P-positiv = rot).
- C) Bindungsverhalten von IgG1 Isotypantikörpern an Aggregate (rot) und Einzelzellen (blau). Vorwärtsstreulicht (forward scatter = FSC), Seitwärtsstreulicht (side scatter = SSC).

3. Funktionelle Aspekte der Antikörperbindung

Angesichts der deutlichen Assoziation von Antikörpern mit aktivierten Thrombozyten war es wichtig herauszufinden ob die oben gesehene Interaktion die Funktion der Thrombozyten soweit beeinflussen kann, dass es die Thrombogenität von Antikörpern ausreichend erklärt. Um diese Fragestellung zu adressieren wurden Aggregometrierversuche durchgeführt. Dabei wurde zunächst ein vollständiges Fehlen von Antikörpern getestet. Die hier verwendete *slgM^{-/-}AID^{-/-}* Mauslinie wurde bereits in Vorarbeiten am *in vivo* Modell der venösen Thrombose untersucht. Sie fielen durch fehlende Thrombusbildung trotz adäquater Blutflussreduktion auf [351]. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, konnte ein signifikant reduziertes Aggregationsausmaß in Abwesenheit von Antikörpern im Plasma beobachtet werden. Dieser

Effekt konnte auch in Bezug auf ATP-Freisetzung der Thrombozyten gemessen werden. Um zu beweisen, dass es sich bei dem Phänomen um einen spezifischen Effekt der Antikörper handelt, wurden Wildtypthrombozyten in Plasma aus $slgM^{-/-}AID^{-/-}$ aufgelöst und umgekehrt. Hierbei konnte ebenfalls ein signifikantes Ergebnis erzielt werden.

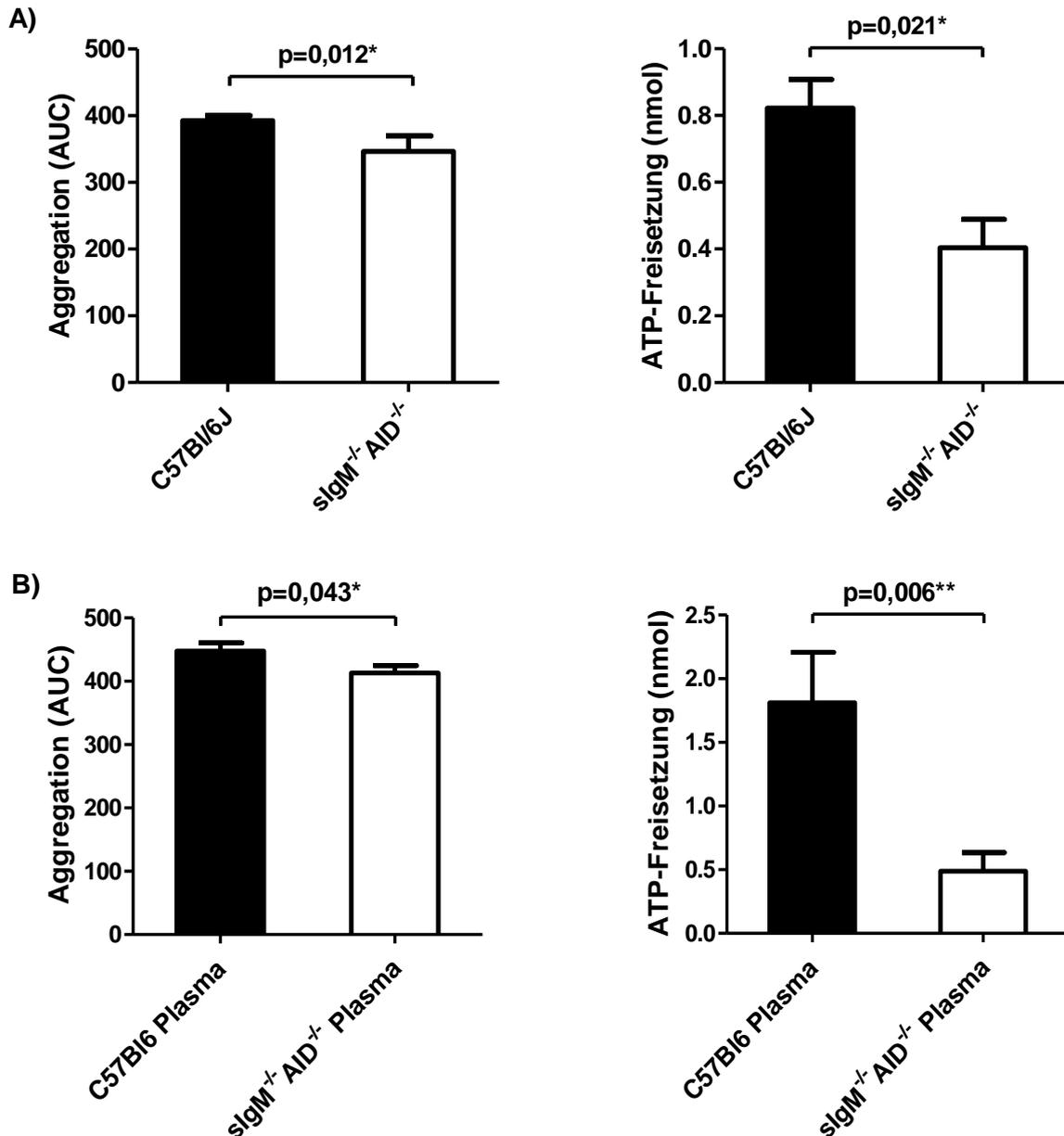


Abbildung 19: Antikörpermangel in $slgM^{-/-}AID^{-/-}$ Mäuseserum führt zu reduzierter Aggregation und ATP-Ausstoß von Thrombozyten

A) Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma aus C57Bl/6J (n=10) und $slgM^{-/-}AID^{-/-}$ (n=3) Mäusen. Links: Optische Aggregometrie; Rechts: ATP-Freisetzung der Thrombozyten gemessen durch Lumineszenz.

AUC = area under the curve, nmol = nanomol, * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant.

B) Aggregometrie mit gewaschenen C57Bl/6 Thrombozyten gelöst in $slgM^{-/-}AID^{-/-}$ Plasma (n=5) und vice versa (n=4), Links: Optische Aggregometrie; Rechts: ATP-Freisetzung der Thrombozyten gemessen durch Lumineszenz.

AUC = area under the curve, nmol = nanomol, * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant.

Da IgG und IgM gleichermaßen an aktivierte Thrombozyten binden war es nun wichtig zu differenzieren, welche der beiden Antikörperklassen vorrangig den zuvor gesehenen stimulierenden Effekt auf die Aggregation der Zellen ausübt. Dies konnte anhand der $AID^{-/-}$ und $slgM^{-/-}$ Mäuse untersucht werden. Hierbei ergab sich bei $AID^{-/-}$ Mäusen eine signifikant niedrigere Aggregation ($p=0,016$), sowie ATP-Freisetzung ($p=0,012$). In Abwesenheit von löslichen IgM-Antikörpern ($slgM^{-/-}$) war dieser Effekt deutlich schwächer ausgeprägt. Folglich geht der Thrombozyten stimulierende Effekt vor allem von der Klasse IgG aus. Diese reagieren nicht nur mit ausgeprägter Aggregation, auch eine vermehrte Vesikelausschüttung gemessen an der extrazelluläre ATP-Konzentration ist die Folge.

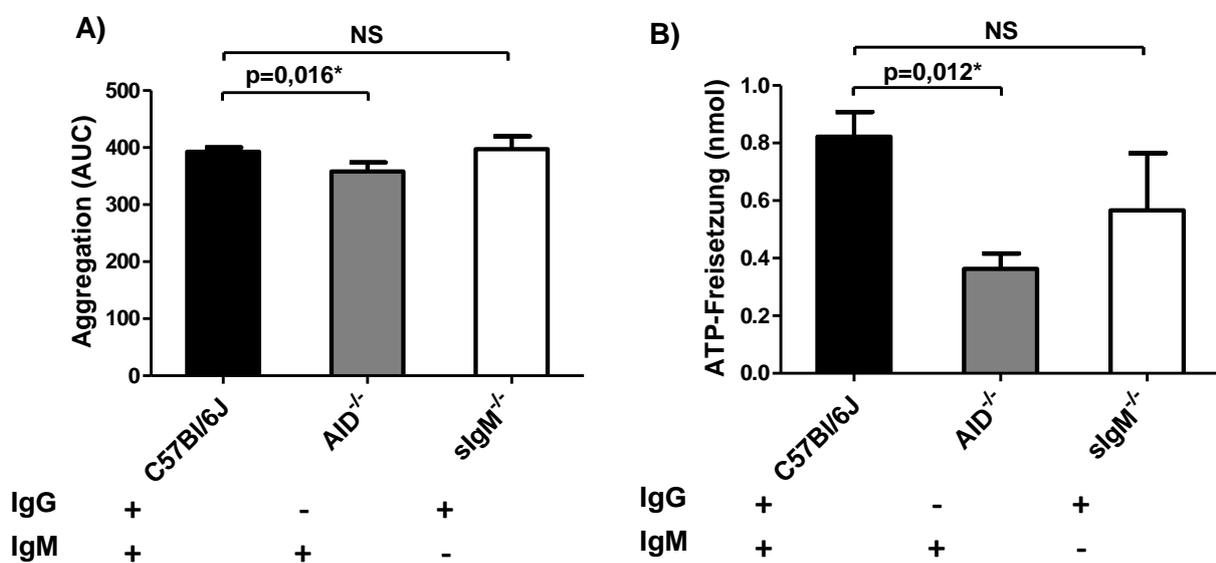


Abbildung 20: IgG, jedoch nicht IgM, führt zu verstärkter thrombinvermittelter Thrombozytenaggregation und -Sekretion

A) Optische Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma aus C57Bl/6J (n=20), $slgM^{-/-}$ (n=3) und $AID^{-/-}$ (n=5) Mäusen.

AUC = area under the curve, * = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 8 Gruppen mit * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. NS = nicht signifikant.

B) ATP-Freisetzung gemessen durch Lumineszenz in plättchenreichem Plasma aus C57Bl/6J (n=10), $slgM^{-/-}$ (n=3) und $AID^{-/-}$ (n=5).

Nmol = nanomol, * = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 8 Gruppen mit * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. NS = nicht signifikant.

Wie bereits in den Versuchen mit KL25 Mäusen gesehen, ist nicht nur das vollständige Fehlen der Antikörper von Interesse, auch ein möglicher konzentrationsabhängiger Effekt kann von Bedeutung sein. ELISA Messungen haben bereits in Vorversuchen ergeben, dass die tatsächlichen Antikörperkonzentrationen in den zuvor verwendeten Knockout-Tieren teilweise von den erwarteten Werten abweichen. Dies ist auf eine geringe Restproduktion einer Antikörperklasse bzw. einer vermutlich kompensatorischen Überproduktion der jeweils anderen Antikörperklasse zurückzuführen [351]. Auf diese Weise kann für beide

Antikörperklassen ein Konzentrationsgradient erstellt werden, der mit den Aggregometrieergebnissen verglichen werden kann. Hier zeigt sich für IgG eine starke Korrelation sowohl für die optischen Aggregationsdaten (Bestimmtheitsmaß $R^2=0,935$) als auch für die ATP-Ausschüttung (Bestimmtheitsmaß $R^2=0,462$). Für IgM kann hingegen keine derartige Tendenz festgestellt werden. Hier kann ein Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,001$ für die Aggregation und $R^2=0,014$ für die ATP-Freisetzung berechnet werden. Dem zufolge scheinen Antikörper der Klasse IgG konzentrationsabhängig die Aktivierung der Thrombozyten zu verstärken. IgM scheint hierbei nur ein Begleitprotein zu sein.

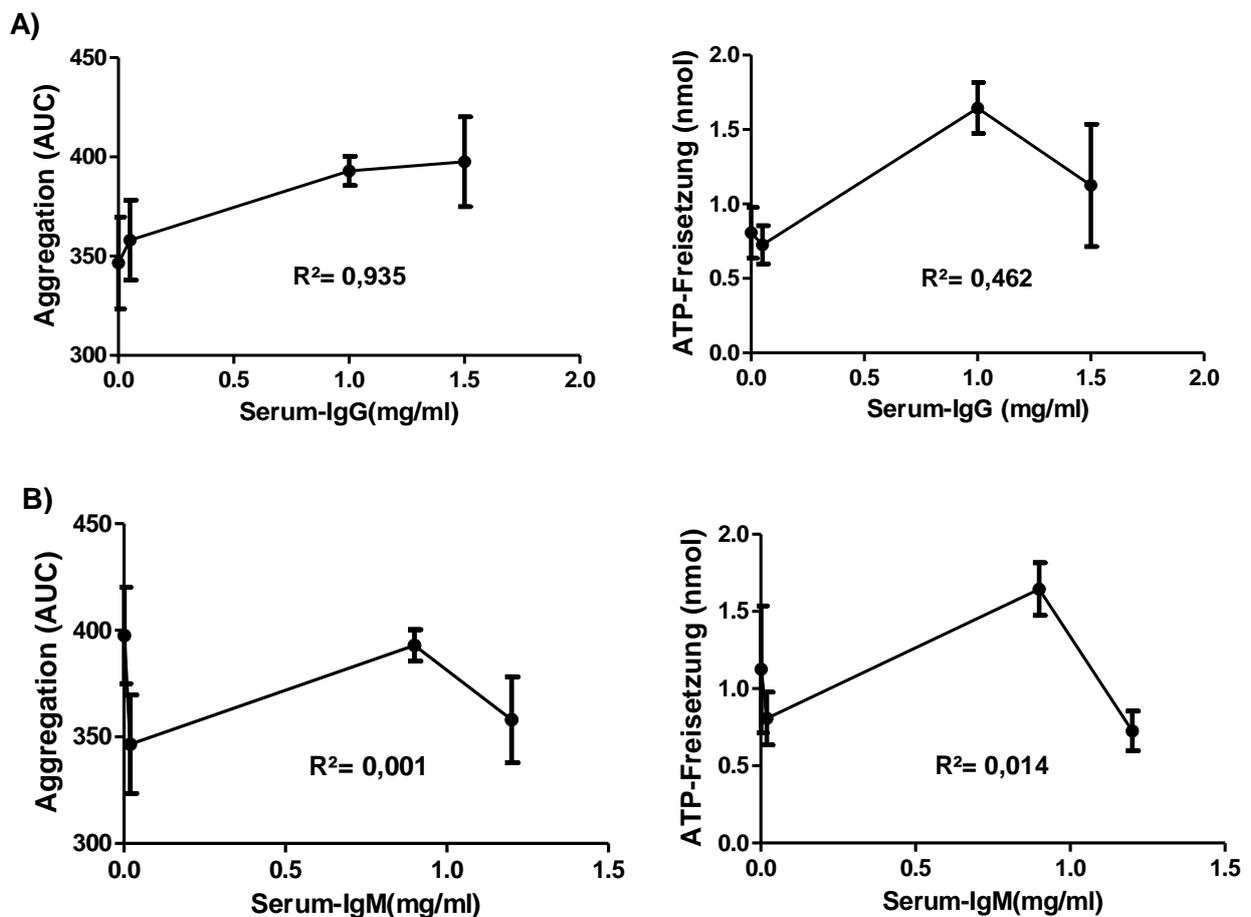


Abbildung 21: Das Ausmaß der Thrombozytenaggregation und ATP-Freisetzung korreliert mit der IgG-, jedoch nicht mit der IgM-Konzentration im Plasma von Antikörper-knockout Mäusen

- A) Aggregationsausmaß (links) und ATP-Freisetzung (rechts) in Abhängigkeit der IgG-Konzentration in $slgM^{-/-}$ (n=3), $AID^{-/-}$ (n=5), $slgM^{-/-}AID^{-/-}$ (n=3) und C57Bl/6J (n=20) Mäusen. AUC = area under the curve, nmol = nanomol, R^2 = Bestimmtheitsmaß nach Pearson.
- B) Aggregationsausmaß (links) und ATP-Freisetzung (rechts) in Abhängigkeit der IgM-Konzentration in $slgM^{-/-}$ (n=3), $AID^{-/-}$ (n=5), $slgM^{-/-}AID^{-/-}$ (n=3) und C57Bl/6J (n=20) Mäusen. AUC = area under the curve, nmol = nanomol, R^2 = Bestimmtheitsmaß nach Pearson.

Mit diesen Erkenntnissen gelingt es nun die Rolle der beiden Antikörperklassen grob einzuteilen. Um einen besseren Eindruck von der Kinetik der Thrombozytenaggregation, sowie

der ATP-Freisetzung zu bekommen, untersuchten wir den Kurvenverlauf der Aggregometriemessungen genauer. Hierbei trat der Einfluss von Antikörpern der Klasse IgG nochmals besonders zum Vorschein. Mäuse, die in der Lage sind IgG zu produzieren (C57Bl/6J und $slgM^{-/-}$), weisen nach Aktivierung eine signifikant frühere Aggregation der Thrombozyten auf. Auch die Geschwindigkeit der Aggregation, gemessen an der maximalen Steigung der Kurve, hebt sich statistisch deutlich von den Mauslinien $slgM^{-/-}$ $AID^{-/-}$ und $AID^{-/-}$ ab. IgG führt somit zu einer früheren, schnelleren und stärkeren Aggregation der Thrombozyten, welches sehr wahrscheinlich die starke Thrombogenität von IgG erklären kann. Hinsichtlich ATP kann trotz insgesamt signifikant reduzierter ausgeschütteter Menge in Abwesenheit von IgG (siehe Abbildung 11 und 12) kein vergleichbares Muster wie in der Aggregationskurve gesehen werden. Besonders auffallend ist jedoch die deutlich verspätete ATP-Ausschüttung in $AID^{-/-}$ Mäusen.

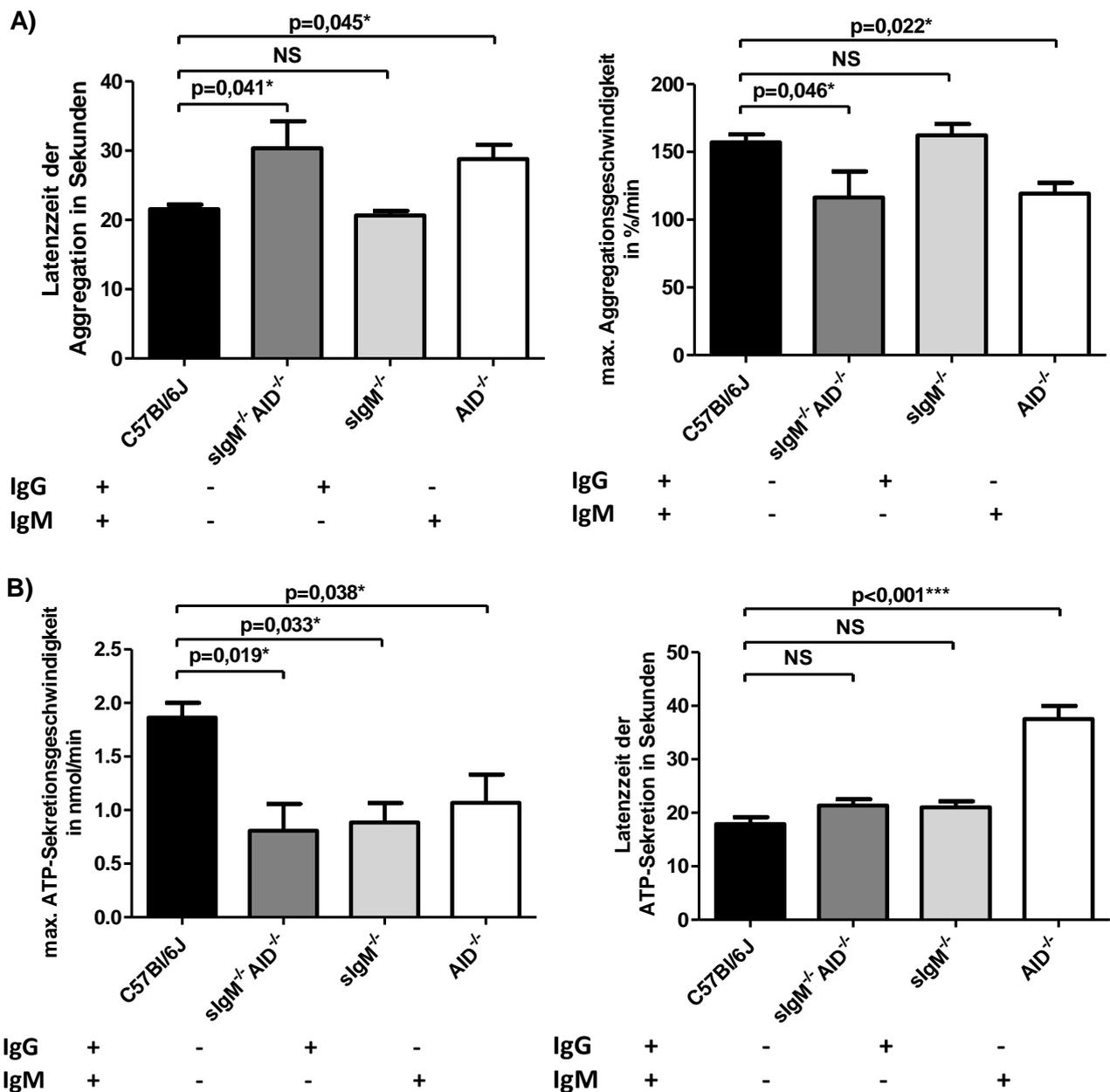


Abbildung 22: IgG fördert schnelle und frühe Aggregation von Thrombozyten; IgM verzögert ATP-Ausschüttung

- A) Links: Zeitdifferenz zwischen Aktivierung und maximaler Aggregation der Thrombozyten in optischer Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma aus C57Bl/6J (n=9), $slgM^{-/-}AID^{-/-}$ (n=3), $slgM^{-/-}$ (n=3) und $AID^{-/-}$ (n=4) Mäusen.
Rechts: Maximal erreichte Geschwindigkeit der Thrombozytenaggregation gemessen anhand der Steigung der Kurve.
* = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 7 Gruppen mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant.
- B) Links: Zeitdifferenz zwischen Aktivierung und maximaler ATP-Ausschüttung der Thrombozyten in Lumineszenzaggrometrie mit plättchenreichem Plasma von Antikörper-knockout Mäusen (s.o.).
Rechts: Maximal erreichte Steigung der ATP-Ausschüttung von Thrombozyten in Lumineszenzaggrometrie.
* = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 7 Gruppen mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant.

Wie wir sehen konnten haben Antikörper der Klasse IgG einen bedeutenden Einfluss auf die Funktion von Thrombozyten. Wie dieser Effekt vermittelt wird, ist bisher noch nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten Rezeptoren auf der Oberfläche von Thrombozyten bieten. Dessen Einfluss auf Zellen kann sehr heterogen sein. Ob es passende Kandidaten gibt, ist jedoch unklar. Das Vorhandensein von Fc γ -Rezeptoren auf murinen Thrombozyten wurde in Publikationen bereits mehrfach ausgeschlossen [253]. Toso ist ein IgM-spezifischer Fc-Rezeptor, dessen Vorkommen auf murinen Thrombozyten noch nicht untersucht wurde. Funktionell konnte ein möglicher Einfluss am sichersten mit Hilfe von Toso $^{-/-}$ Mäusen analysiert werden. Hierbei ergab sich statistisch weder in Bezug auf das Aggregationsausmaß, noch auf die ATP-Freisetzung ein Unterschied zu dem Wildtypstamm. Somit scheint es keinen direkten Einfluss von Antikörperrezeptoren auf murine Thrombozyten zu geben.

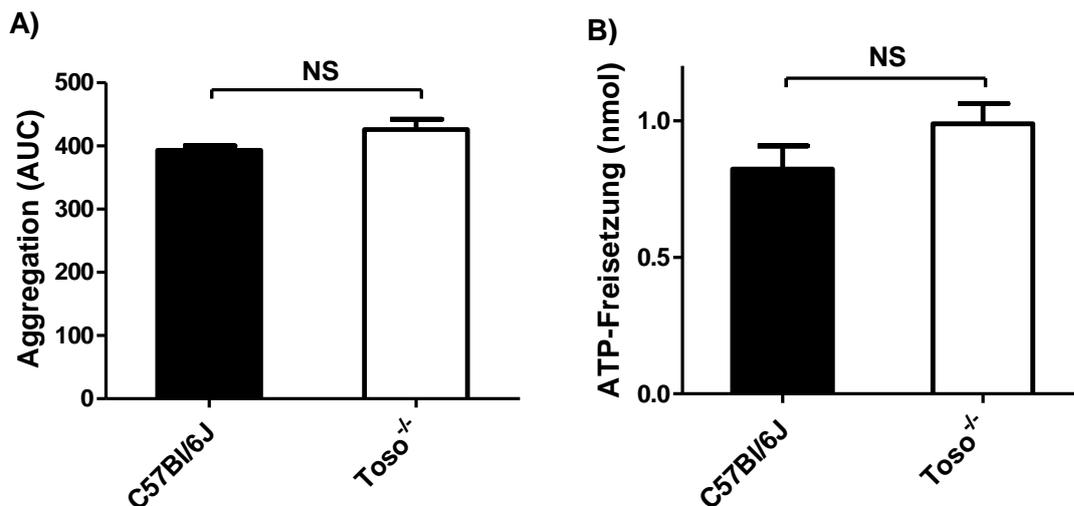


Abbildung 23: Toso-Rezeptoren nehmen keinen Einfluss auf Thrombozytenaggregation und -Sekretion

- A) Optische Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma aus C57Bl/6J (n=20) und Toso^{-/-} (n=3).
 AUC = area under the curve, * = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 8 Gruppen mit * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.
- B) ATP-Freisetzung gemessen durch Lumineszenz der unter A genannten Mäuse aus C57Bl/6J (n=10) und Toso^{-/-} (n=3).
 Nmol = nanomol, * = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 8 Gruppen mit * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.

Nachdem Fc-Rezeptoren als Auslöser für die antikörpervermittelte Thrombozytenaktivierung ausgeschlossen werden konnten, gilt es genauer herauszufinden welche Art von Antikörper Aggregation und Sekretion beeinflussen. Trotz ähnlich ausgeprägter Bindung von IgG und IgM auf Thrombozyten, scheint es funktionell große Unterschiede in Bezug auf diese Zellen zu geben. Aufgrund dieser Diskrepanz muss der Zusammenhang zwischen den histologischen/durchflusszytometrischen Ergebnissen und den Resultaten in der Aggregometrie erneut geprüft werden. Die bereits erwähnten KL25 Mäuse eigneten sich zur Bestätigung bzw. Widerlegung dieser Hypothese. Sollten die histologisch gesichteten gegen LCMV gerichteten Antikörper auch für die vermehrte Aggregation und Sekretion verantwortlich sein, so sollte statistisch kein Unterschied im Vergleich zum Wildtyp entstehen. Die hierzu verwendeten Tiere wurden serums substituiert, sodass eine vergleichbare Antikörperkonzentration vorherrschte. Tatsächlich glichen die Messungen der KL25 Mäuse sehr stark der Kontrollgruppe. Folglich haben die gegen LCMV gerichteten Antikörper eine ähnliche Auswirkung auf die Funktion der Thrombozyten. In Zusammenschau mit den zuvor gesehenen Ergebnissen kann man sagen, dass Antikörper der Klasse IgG unabhängig von ihrer Antigen-spezifität die Thrombozytenaggregation und -Sekretion stimulieren.

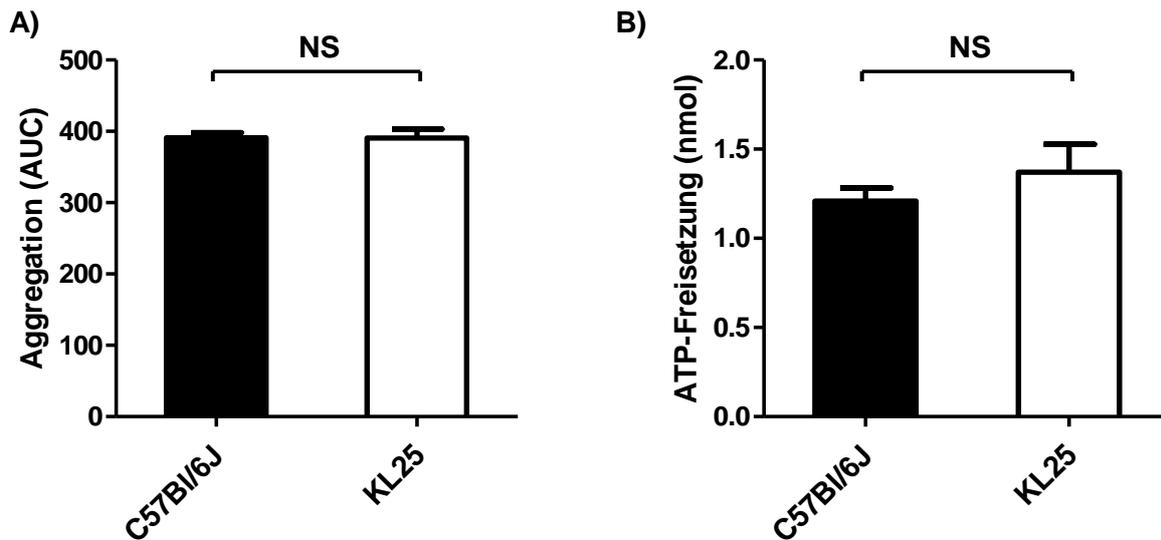


Abbildung 24: KL25 Antikörper, gerichtet gegen ein irrelevantes Antigen (LCMV), fördern Aggregation und ATP-Freisetzung von Thrombozyten nach Aktivierung

- A) Optisch gemessenes Aggregationsausmaß mit plättchenreichem Plasma aus C57Bl/6J (n=3) und serums substituierten KL25 Mäusen (n=4).
 AUC = area under the curve, * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.
- B) ATP-Freisetzung der Thrombozyten gemessen durch Lumineszenz in Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma aus den oben genannten Tieren.
 Nmol = nanomol, * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.

Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass die zusätzliche Aktivierung der Thrombozyten durch Antikörper nicht durch eine gerichtete Bindung erklärt werden kann. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das gesehene unspezifische Adhäsionsverhalten von Antikörpern nur vorgetäuscht wird, beispielsweise durch Polyreaktivität. Eine Gruppe von Antikörpern, die ein solches Verhalten vorweisen sind die sogenannten natürlichen Antikörper. Ihr Einfluss kann anhand von CR2^{-/-} Mäusen untersucht werden. Sie zeichnen sich durch ein reduziertes Repertoire an natürlichen, polyreaktiven Antikörpern aus. Sollten sie in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, so würde sich dies besonders in der Funktion der Thrombozyten widerspiegeln. Darum wurde plättchenreiches Plasma aus CR2^{-/-} Mäusen in der Aggregometrie untersucht. Das veränderte Antikörperrepertoire spiegelte sich jedoch nicht wesentlich in einem veränderten Aggregationsverhalten wider. Auch die ATP-Freisetzung war nahezu unverändert. Ein bedeutender Einfluss natürlicher Antikörper ist somit sehr unwahrscheinlich.

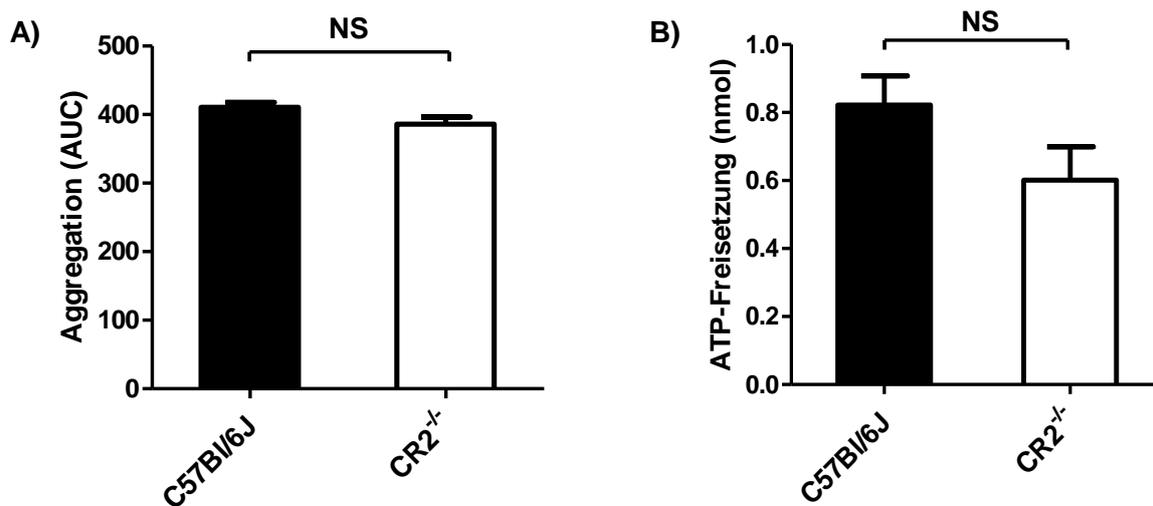


Abbildung 25: Natürliche Antikörper tragen nicht zur vermehrten Aktivierung von Thrombozyten bei

- A) Optische Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma aus C57Bl/6J (n=20) und CR2^{-/-} (n=8) Mäusen.
AUC = area under the curve, * = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 8 Gruppen mit * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.
- B) ATP-Freisetzung der Thrombozyten gemessen durch Lumineszenz in Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma aus C57Bl/6J (n=10) und CR2^{-/-} (n=8) Mäusen.
Nmol = nanomol, * = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 8 Gruppen mit * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.

4. Mechanismen der Antikörperbindung

Anhand der durchgeführten Versuche kann bisher noch keinerlei Aussage getroffen werden, wie genau die Antikörper auf der aktivierten Thrombozytenoberfläche haften bleiben oder wie die funktionelle Auswirkung auf die Thrombozyten zu erklären ist. Klar ist nur, dass es sich hierbei nicht um eine klassische Antikörper-Antigenbindung handelt. Vielmehr ergibt sich das Bild einer unspezifischen Proteinablagerung, ähnlich einer Biomaterialoberfläche [393]. Entgegen der Vorstellung einer rein passiven Proteinablagerung tritt dies jedoch nur im aktivierten Zustand der Thrombozyten auf. Es stellt sich somit die Frage durch was die Anhaftung von Antikörpern getriggert wird und wie sie zu beeinflussen ist. Hierfür gibt es diverse denkbare Möglichkeiten.

Für die Bindung von Antikörpern an ihr Antigen spielen Ladungsunterschiede eine zentrale Rolle. Auch in Bezug auf Thrombozyten könnte dies ein möglicher treibender Faktor sein. Bei Aktivierung wechselt die Zelle ihre äußere Ladung von neutral zu negativ. Dies ist durch den Konzentrationsunterschied von Phosphatidylserin in der Zellmembran zu erklären [394]. Phosphatidylserin befindet sich im Ruhezustand in intrazellulären Vesikeln. Nach Aktivierung

wird es in die Zellmembran integriert [394]. Es ist also naheliegend, dass elektrische Potentialunterschiede in der Bindung von aktivierten Thrombozyten eine Rolle spielen. Um diese Fragestellung zu adressieren konjugierten wir anti-Influenza Antikörper der Klasse IgG, mit einem Succinyl-Rest. Dieser verleiht den Antikörpern eine negative Ladung und sollte somit eine abstoßende Wirkung auf Phosphatidylserin haben. Entgegen unserer Erwartung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der geladenen und ungeladenen Versuchsgruppe festgestellt werden. Somit ist eine bedeutende elektrostatische Interaktion zwischen Thrombozyten und Antikörpern unwahrscheinlich.

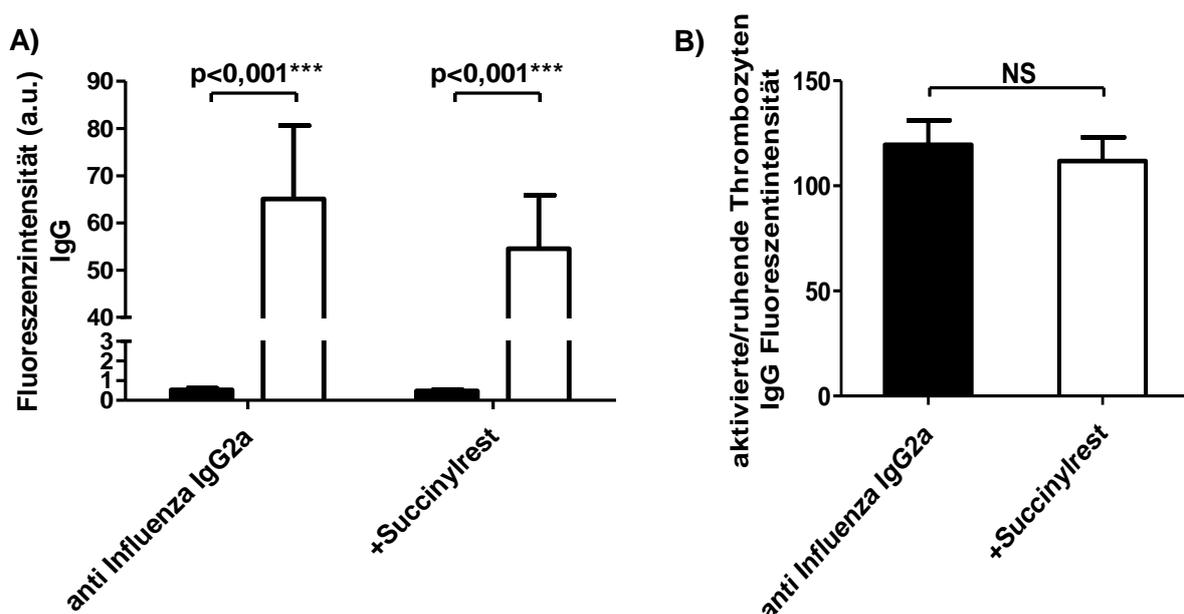


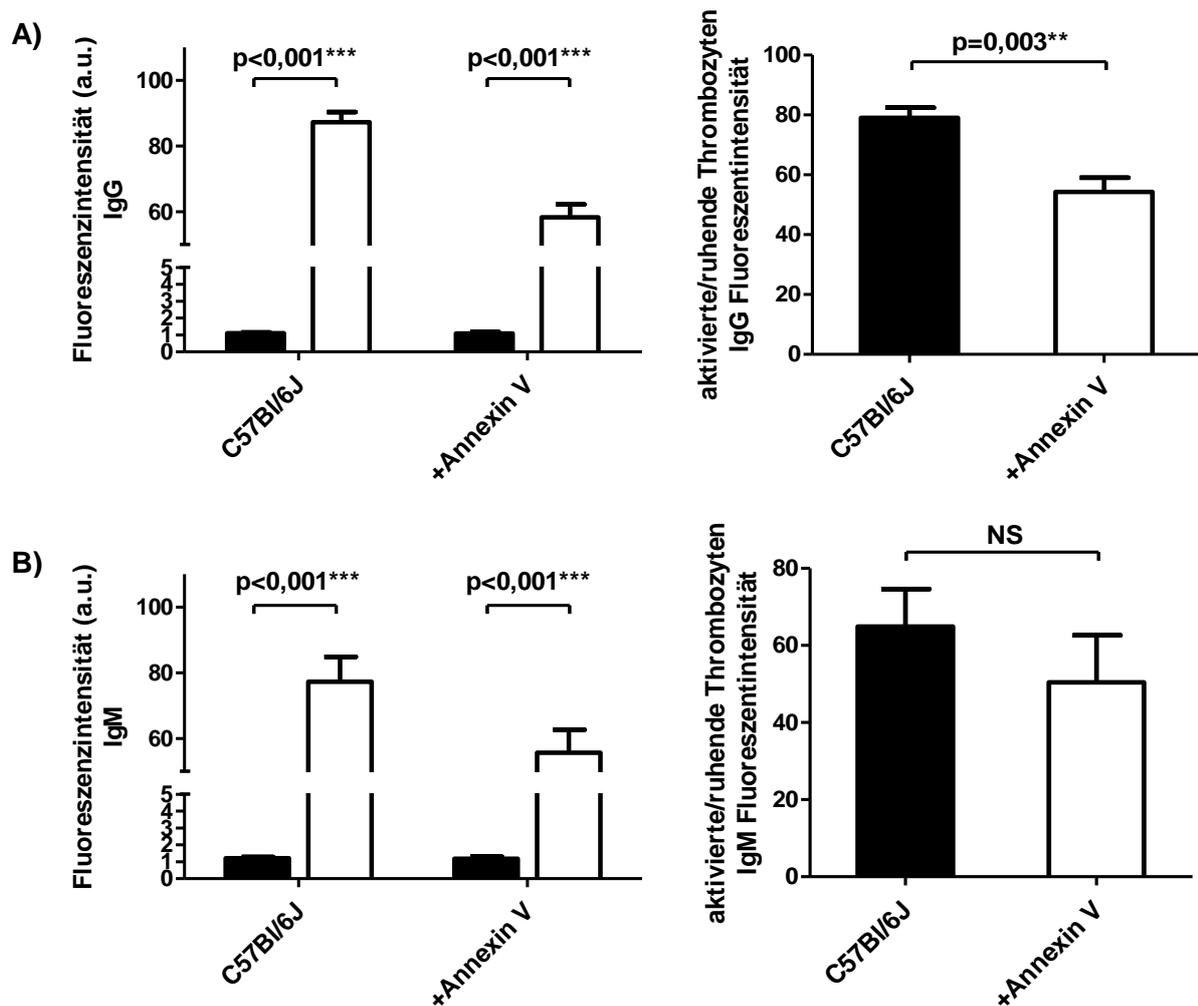
Abbildung 26: Die Bindung von Antikörpern an aktivierte Thrombozyten ist unabhängig von dessen Ladung

- A) Fluoreszenzabsolutwerte von succinylierten und nicht-succinylierten Antikörpern an gewaschenen Thrombozyten aus C57Bl/6J Mäusen (jeweils $n=5$) in Durchflusszytometrie. Schwarzer Balken: nicht aktivierte Thrombozyten; Weißer Balken aktivierte Thrombozyten. A.u.= Arbitrary units, * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant.
- B) Verhältnis der Fluoreszenzintensität aus A) aktivierter Thrombozyten zu nicht aktivierter Thrombozyten.
* = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant.

Da Antikörper selbst nicht elektrostatisch mit Thrombozyten interagieren, konzentrierten wir uns auf ein Plasmaprotein, welches bekannt ist für seine hohe Affinität zu negativer Ladung. Fluoreszenzmarkiertes Annexin V wird dank seiner starken Bindung an Phosphatidylserin häufig in durchflusszytometrischen Untersuchungen zur Detektion apoptotischer Zellen verwendet [395]. Ebenso wie an apoptotischen Zellen kann es auch an aktivierte Thrombozyten binden [396]. Durch Neutralisierung der negativen Ladung wurde bereits bekannt, dass Annexin die thrombozytengetriggerte Gerinnungsaktivierung wirksam hemmt

[396]. Dies führt zu einer signifikanten Reduktion der Thrombusmasse im Modell der arteriellen Thrombose [396, 397]. Eine zusätzliche Beeinflussung der Antikörperbindung auf Thrombozyten ist somit denkbar. Um dies zu analysieren führten wir durchflusszytometrische Untersuchungen mit künstlich erhöhter Annexinkonzentration durch. Unter diesen Bedingungen konnte eine signifikante Reduktion der IgG Bindung auf Thrombozyten gemessen werden. Für IgM ebenso wie für Albumin konnte statistisch kein Effekt nachgewiesen werden. Eine IgG spezifische Interaktion ist somit wahrscheinlich.

In einem zweiten Schritt untersuchten wir, welche Auswirkung Annexin auf die Funktion der Thrombozyten hat. Unter vergleichbaren Bedingungen zeigte sich ein signifikant reduziertes Aggregationsausmaß, ebenso wie eine signifikante Reduktion der ATP-Ausschüttung. Zusätzlich zu der bereits bekannten gerinnungshemmenden Wirkung [19, 396] kann Annexin somit auch eine dämpfende Wirkung auf Thrombozyten selbst zugesprochen werden. Wie die Bindung von Antikörpern an Thrombozyten zustande kommt, kann hierdurch jedoch noch nicht erklärt werden.



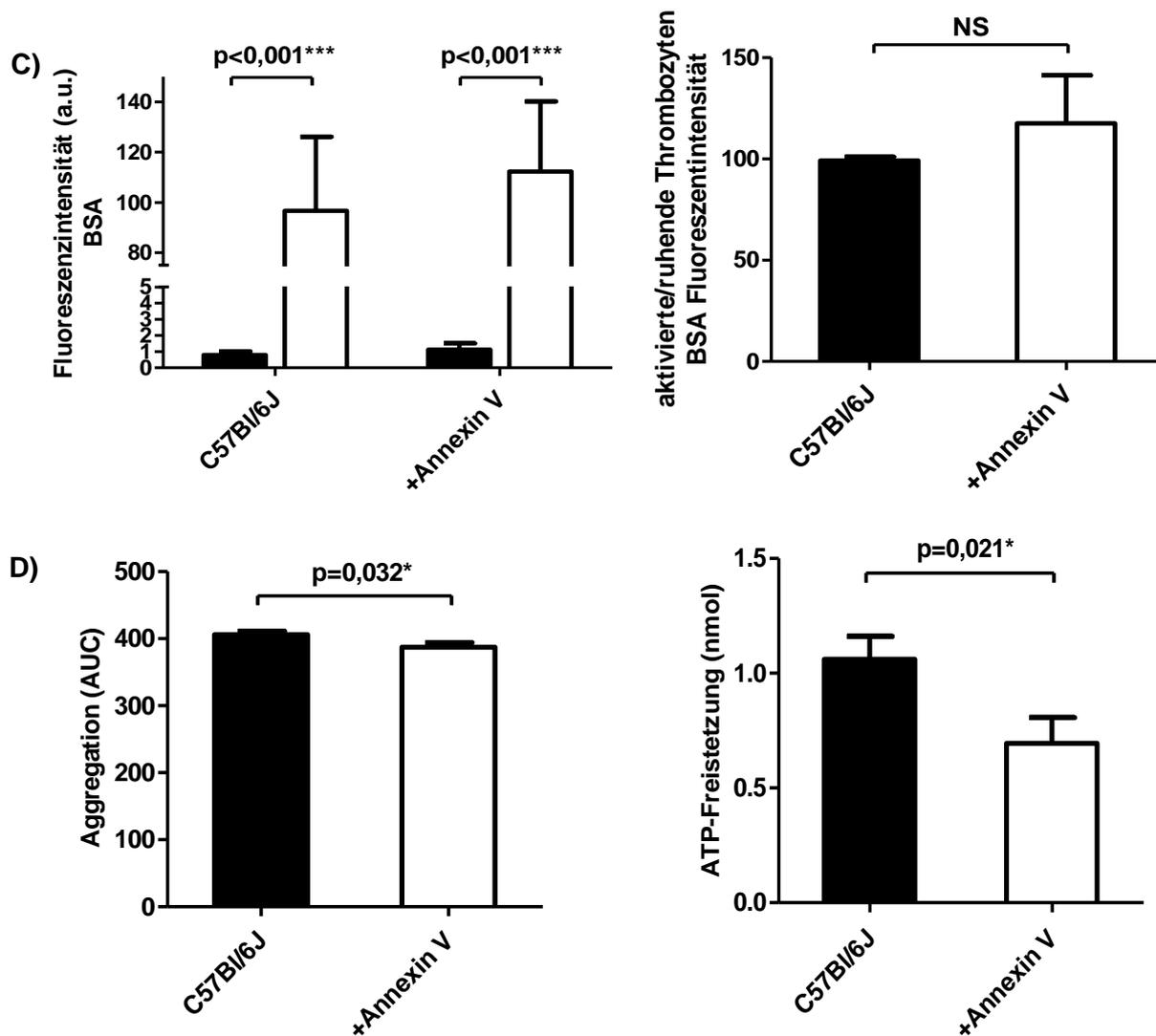


Abbildung 27: Annexin V interferiert mit der Bindung von IgG an Thrombozyten und führt so zu einer reduzierten Aggregation und ATP-Ausschüttung

A) Durchflusszytometrische Untersuchungen mit IgG.

Links: Fluoreszenzabsolutwerte mit gewaschenen Thrombozyten aus C57Bl/6J (jeweils n=4) mit und ohne Zusatz von Annexin V. Schwarzer Balken = nicht aktivierte Thrombozyten; weißer Balken = aktivierte Thrombozyten.

Rechts: Verhältnis aus der Fluoreszenzintensität aktivierter Thrombozyten zu nicht aktivierter Thrombozyten. Schwarzer Balken = ohne Annexin V-Zusatz; weißer Balken = mit Annexin V-Zusatz.

A.u.= Arbitrary units, * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.

B) Durchflusszytometrische Untersuchungen mit IgM.

Links: Fluoreszenzabsolutwerte mit gewaschenen Thrombozyten aus C57Bl/6J (jeweils n=4) mit und ohne Zusatz von Annexin V. Schwarzer Balken = nicht aktivierte Thrombozyten; weißer Balken = aktivierte Thrombozyten.

Rechts: Verhältnis aus der Fluoreszenzintensität aktivierter Thrombozyten zu nicht aktivierter Thrombozyten. Schwarzer Balken: ohne Annexin V-Zusatz; weißer Balken = mit Annexin V-Zusatz.

A.u.= Arbitrary units, * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.

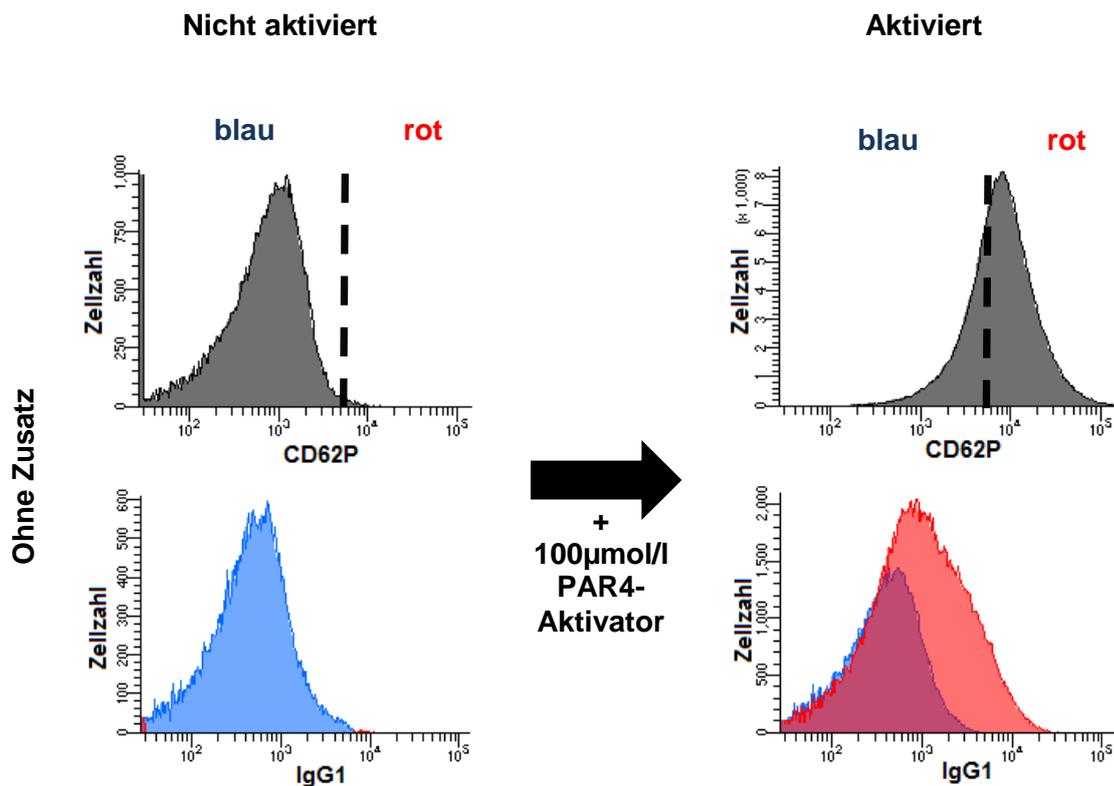
- C) Durchflusszytometrische Untersuchungen mit Albumin (BSA).
Links: Fluoreszenzabsolutwerte mit gewaschenen Thrombozyten aus C57Bl/6J (jeweils n=4) mit und ohne Zusatz von Annexin V. Schwarzer Balken = nicht aktivierte Thrombozyten; weißer Balken = aktivierte Thrombozyten.
Rechts: Verhältnis aus der Fluoreszenzintensität aktivierter Thrombozyten zu nicht aktivierter Thrombozyten. Schwarzer Balken = ohne Annexin V-Zusatz; weißer Balken = mit Annexin V-Zusatz.
A.u.= Arbitrary units, * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.
- D) Links: Optische Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma aus C57Bl/6J (jeweils n=4) mit und ohne Annexin V-Zusatz.
AUC = area under the curve.
- E) Rechts: ATP-Freisetzung der Thrombozyten gemessen durch Lumineszenz in Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma mit und ohne Annexin V-Zusatz.
Nmol = nanomol, * = Statistisch signifikantes Ergebnis nach T-Test * p<0.05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.

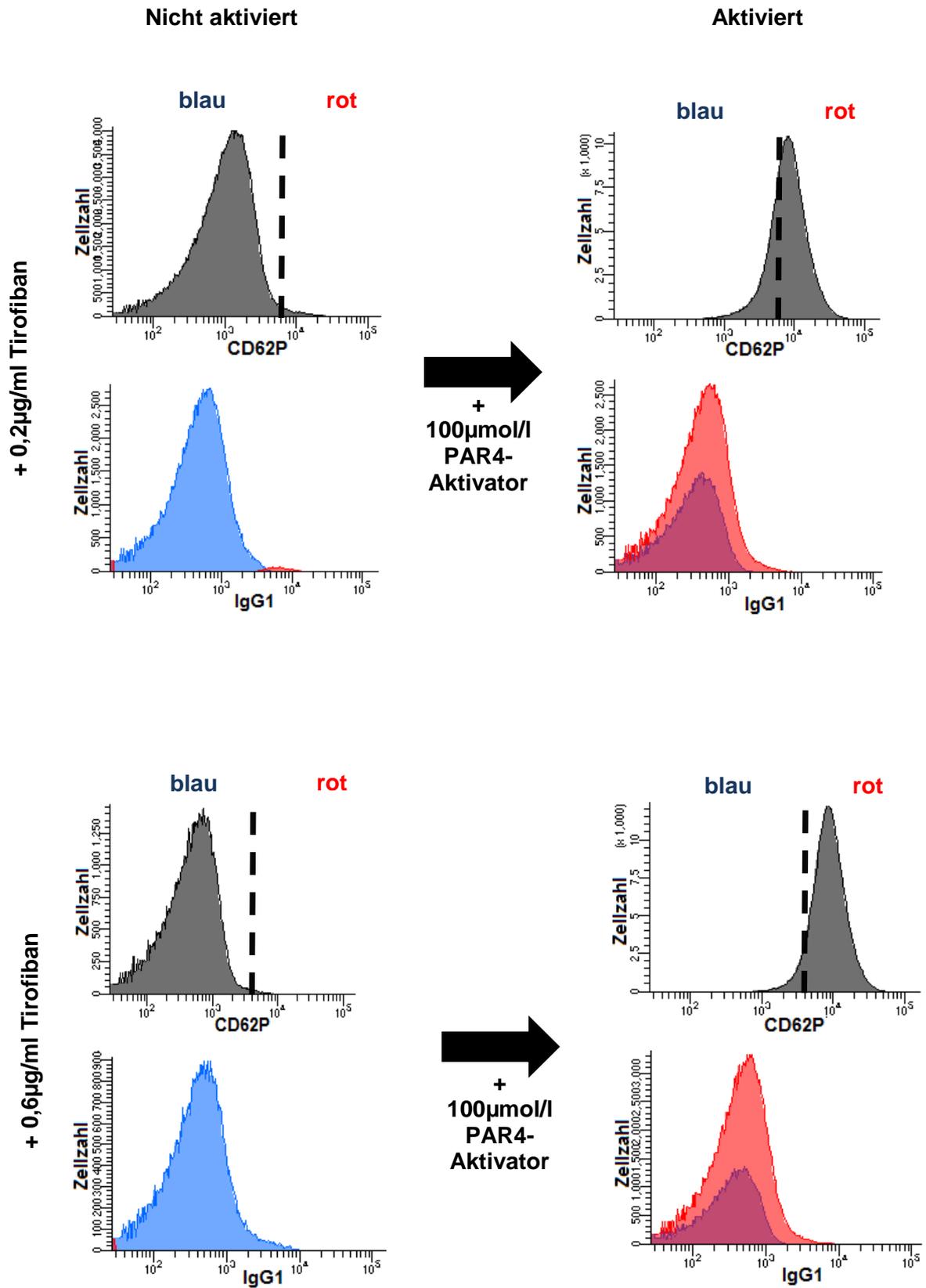
Da Annexin sowohl Einfluss auf die Antikörperbindung, als auch auf die intrinsische Gerinnungskaskade auf der Oberfläche der Thrombozyten nimmt, untersuchten wir die Oberfläche von Thrombozyten in Bezug auf Fibrinogen/Fibrin näher. Fibrinogen wird größtenteils GPIIb/IIIa-vermittelt von Thrombozyten gebunden [398]. GPIIb/IIIa ist Teil der $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrin-Familie. Dieser geht nach Stimulation der Zelle durch „inside-out signalling“ von einer niedrigaffinen in eine hochaffine Konformation über [399]. Hierfür braucht es einen exogenen Stimulator, wie beispielsweise Thrombin oder ADP [398]. Durch die genannte Strukturänderung entspricht die Kinetik dieses Rezeptors sehr stark dem Bindungsausmaß der Antikörper auf aktivierten Thrombozyten.

GPIIb/IIIa spielt eine große Rolle in der Aggregation der Thrombozyten. Fibrinogen fungiert hier als Brücke zwischen zwei Rezeptoren benachbarter Zellen, welches eine dreidimensionale Anordnung als Thrombus ermöglicht [398]. Dies macht man sich pharmakologisch zunutze durch Applikation synthetischer fibrinogenähnlicher Peptide und nicht-Peptide, welche die Fibrinogenbindungsstelle Arg-Gly-Asp (RGD) binden und blockieren [400, 401]. In der Folge werden selbst bestehende Thrombozytenaggregate teilweise aufgelöst [398]. Anwendung findet dies bereits heute in der Kardiologie zur Senkung der Thrombuslast bei Herzinfarktpatienten. Die Aktivierung der Zelle, beispielsweise durch Thrombin oder ADP, ist trotz GPIIb/IIIa-Blockierung jedoch weiterhin möglich [402, 403]. Darum untersuchten wir die Rolle von GPIIb/IIIa mit Hilfe eines solchen synthetischen nicht-Peptids (Tirofiban) [401].

Entsprechend der Erwartungen reichen bereits geringe Mengen Tirofiban aus um die Aggregation der Thrombozyten vollständig zu unterbinden. Um den Aktivitätszustand der Zellen besser überwachen zu können, wurde P-Selektin mit Hilfe eines Antikörpers markiert. Erneut diente ein FITC IgG1 Isotypantikörper zur Analyse der Antikörperbindungseigenschaft.

Mit Hilfe von P-Selektin gelang es aktivierte von nicht-aktivierten Thrombozyten zu unterscheiden. Ohne Applikation von Tirofiban konnten aktivierten Thrombozyten signifikant mehr Antikörperbindung zugeschrieben werden als nicht aktivierten Thrombozyten. Dieses Bild änderte sich unter Einwirkung des GPIIb/IIIa-hemmenden Peptids. Die Zugabe von Tirofiban führte zu einer signifikanten Reduktion der gebundenen Antikörpermenge an aktivierte Thrombozyten. Folglich trägt Fibrin(ogen) zu der Bindung von Antikörpern auf der Thrombozytenoberfläche bei. Dennoch kann dieses Phänomen hierdurch noch nicht im vollen Ausmaß erklärt werden. Sowohl die Auswertung histologischen Bilder, wie auch die *in-vitro*-Versuche mittels ELISA deuten auf ein deutlich höheres Bindungsniveau von Thrombozyten im Vergleich zu Gerinnungsbestandteilen hin.





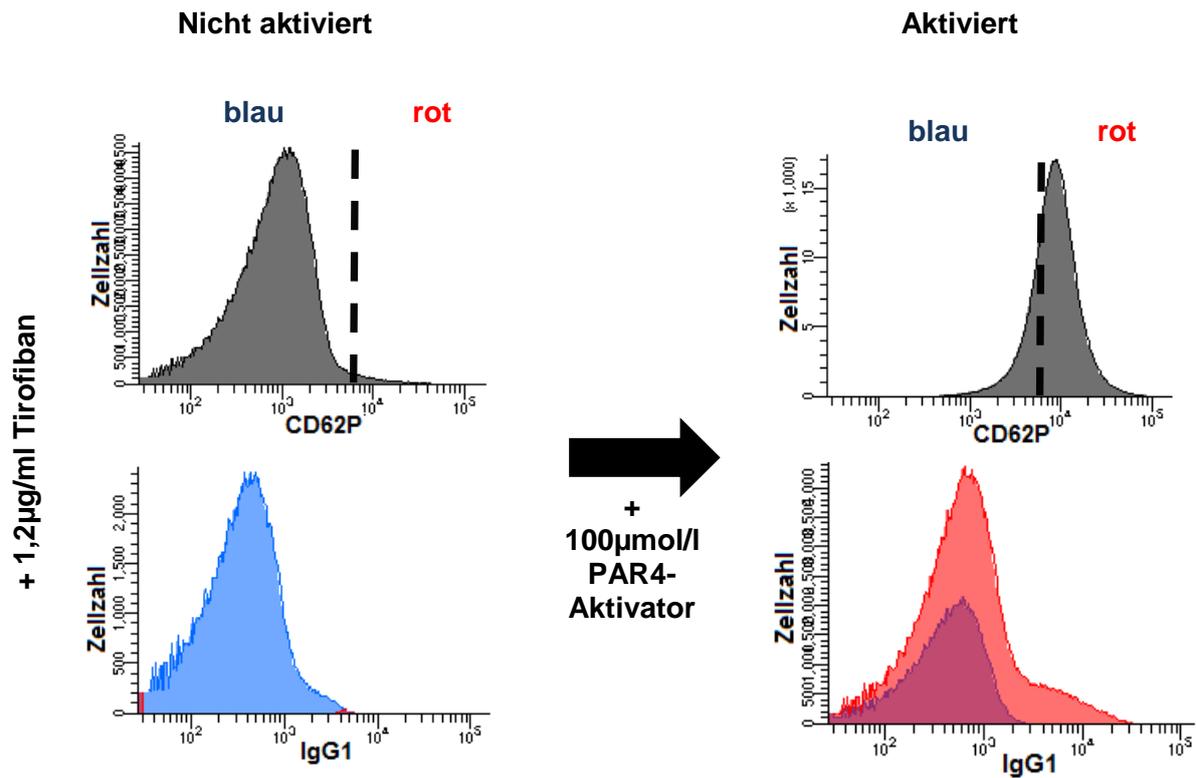


Abbildung 28: Das Blockieren von GPIIb/IIIa durch Tirofiban hemmt die Bindung von Antikörpern an aktivierte murine Thrombozyten

Durchflusszytometrische Untersuchung.

Links: nicht aktivierte Thrombozyten gemessen an CD62P-Expression (oben). Unten: Fluoreszenzsignal von FITC IgG1 Isotypantikörper CD62P-positiver (rot) und CD62P-negativer Thrombozyten (blau).

Rechts: PAR4 aktivierte Thrombozyten gemessen an CD62P-Expression (oben). Unten: Fluoreszenzsignal von FITC IgG1 Isotypantikörper CD62P-positiver (rot) und CD62P-negativer Thrombozyten (blau).

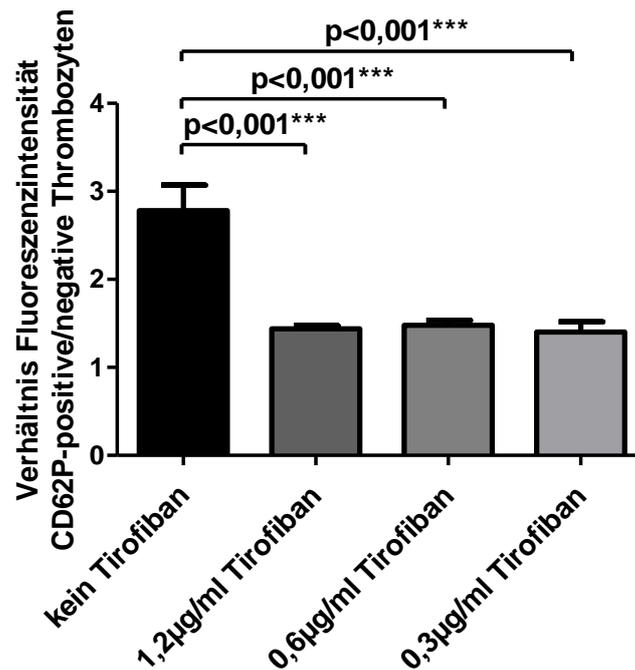


Abbildung 29: GPIIb/IIIa-blockierende Nicht-Peptide (hier Tirofiban) reduzieren die Bindung von Antikörpern der Klasse IgG an aktivierte humane Thrombozyten

Verhältnis der FITC IgG1 Isotypantikörper Fluoreszenzintensität aus durchflusszytometrischen Untersuchungen aktivierter (CD62P-positiver) zu nicht aktivierter (CD62P-negative) Thrombozyten nach Zusatz von 1,2µg/ml, 0,6µg/ml, 0,3µg/ml oder keinem Tirofiban. (Thrombozyten aus n=8 klinisch gesunden Menschen). Datenerhebung ähnlich Abbildung 28. * = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 4 Gruppen mit * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.

Um die gute Antikörperbindungseigenschaft von aktivierten Thrombozyten besser erklären zu können, untersuchten wir weiter die Oberfläche dieser Zellen. Speziell suchten wir nach einem Element, welches ähnlich wie GPIIb/IIIa nur bei aktivierten Thrombozyten zum Tragen kommt. Hierbei fokussierten wir uns erneut auf den Inhalt der Granula. Wie bereits erwähnt, gelangen sie nach Aktivierung der Zelle per Exozytose an die Oberfläche [404]. Der Inhalt ergießt sich nun in den Extrazellulärraum, die Phospholipidhülle der Vesikeln wird in die Plasmamembran der Zelle eingebaut [394, 404]. Dies verändert die Zusammensetzung dieser Membran bedeutend. Dazu gehört auch die Glykosaminoglykanoberfläche der Zelle. Auch Chondroitinsulfat gelangt über den zuvor beschriebenen Prozess an die Oberfläche der Thrombozyten [329]. Dort stellt es den größten Anteil der Glykosaminoglykanen dar [328, 329, 333]. Dessen Untersuchung ist vielversprechend, da die Bindung verschiedener Plasmaproteine darunter das Komplementsystem und Autoantikörper in unterschiedlichen Zusammenhängen bereits diskutiert wurde [279, 338, 345] (siehe auch Abschnitt I. 6.12.). Um den Einfluss von Chondroitinsulfat in Bezug auf Thrombozyten zu untersuchen, verwendeten wir Chondroitinase ABC, welche das Chondroitinsulfat an den Stellen (1→4)-β-D-hexosaminyll, (1→3)-β-D-glucuronosyl und (1→3)-α-L-iduronosyl spaltet. Tatsächlich führte die

enzymatische Verdauung zu einer signifikanten Reduktion der Antikörperablagerung auf aktivierten Thrombozyten. Im Gegensatz dazu führte die Einwirkung von Neuraminidase, ein Enzym, das in Thrombozyten physiologischerweise vorkommt und Sialsäure auf der Thrombozytenoberfläche verdaut [405], zu keinem signifikanten Ergebnis. Chondroitinsulfat scheint somit für die Interaktion mit Antikörpern ebenfalls eine zentrale Rolle zu spielen.

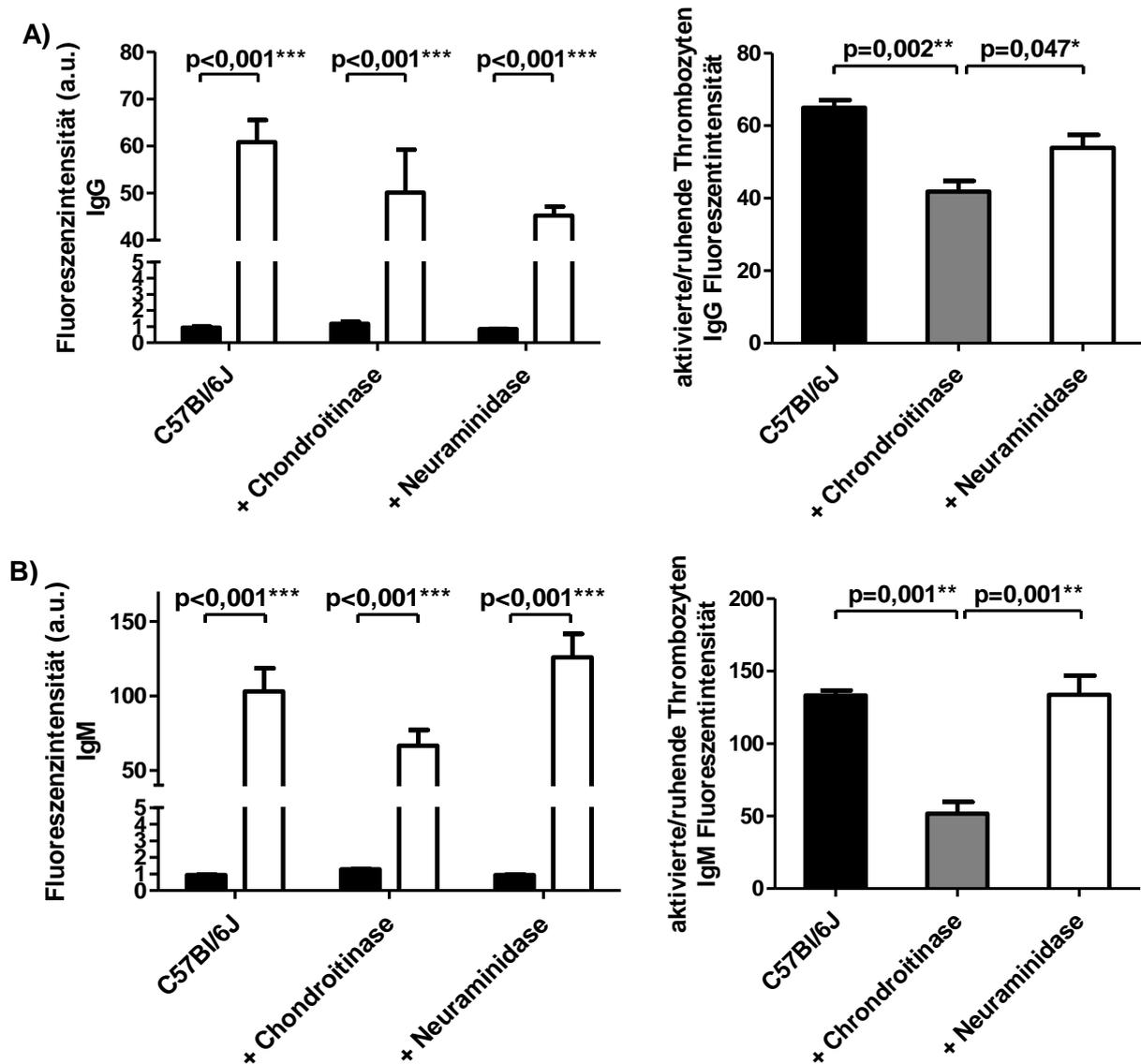


Abbildung 30: Enzymatische Verdauung von Chondroitinsulfat verringert die Bindung von IgG an aktivierte Thrombozyten

A) Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Analyse der Bindung von IgG an Thrombozyten aus C57Bl/6J Mäusen (n=3); Links: Fluoreszenzabsolutwerte, schwarzer Balken: nicht aktivierte Thrombozyten; weißer Balken aktivierte Thrombozyten.

A.u.= Arbitrary units, * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant.

Rechts: Verhältnis der Fluoreszenzintensität aktivierter Thrombozyten zu nicht aktivierter Thrombozyten.

* = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 3 Gruppen mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant.

- B) Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Analyse der Bindung von IgM an Thrombozyten aus C57Bl/6J Mäusen (n=3);
Links: Fluoreszenzabsolutwerte, schwarzer Balken: nicht aktivierte Thrombozyten; weißer Balken aktivierte Thrombozyten.
A.u.= Arbitrary units, * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant.
Rechts: Verhältnis der Fluoreszenzintensität aktivierter Thrombozyten zu nicht aktivierter Thrombozyten.
* = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 3 Gruppen mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant.

Da Chondroitinsulfat wie auch Fibrin sehr adhäsionsfreudige Stoffe sind, ist es wichtig auch andere Plasmabestandteile in die weiteren Überlegungen mit einzubeziehen. Albumin verkörpert mit etwa 40% den größten Anteil der im Plasma vorhandenen Proteine.

Albumin ist bekannt für seine gute Bindungseigenschaft gegenüber kleinmolekularen Stoffen wie Ionen, Stoffwechselprodukte, Hormone und Medikamente. Sie werden überwiegend auf diese Weise im Plasma transportiert [406]. Entscheidend für das gute Bindungsverhalten von Albumin ist dessen ampholytische Eigenschaft. Über mehrere Bindungstaschen kann auf diese Weise ein breites Substratspektrum adhären werden [407-409]. Bindungen an körpereigene Zellen sind bisher jedoch nicht bekannt.

Wie wir in der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigen konnten, gibt es, ähnlich wie mit Antikörpern, eine hohe Assoziation zwischen aktivierten Thrombozyten und Albumin (siehe Abbildung 17). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Bindung über Chondroitinsulfat vermittelt wird, da eine Assoziation *in vitro* bereits nachgewiesen wurde [279]. Zusätzlich muss jedoch auch an eine mögliche Interaktion von Albumin mit IgG und IgM gedacht werden. Mit Hilfe der Albumin^{-/-} Mäuse gelang es uns die Beziehung zwischen Thrombozyten und Antikörpern erneut unter Ausschluss möglicher Einflüsse von Albumin zu untersuchen. Hierbei zeigte sich statistisch kein Unterschied zum Wildtyp. Somit ist eine direkte Assoziation von Antikörpern zu aktivierten Thrombozyten anzunehmen. Albumin beeinflusst diese Bindung nicht.

Wie sich dies *in vivo* auf die Thrombusbildung auswirkt, wurde anhand des Vena-cava-Ligaturmodells analysiert. Auch hier zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zum Wildtypstamm. Folglich nimmt Albumin keinen bedeutenden Einfluss, weder auf die Bindung von Antikörpern an Thrombozyten, noch auf die Thrombusbildung als Ganzes. Zudem zeigt dies, dass die IgG-vermittelte verstärkte Thrombozytenaggregation und -Sekretion ein spezifischer Effekt der Antikörper ist, da die Ergebnisse durch den Mangel eines anderen Proteins wie Albumin nicht reproduziert werden konnten. Zusätzlich können weitere Schlüsse über die Rolle des kolloidosmotischen Druckes in der venösen Thrombose gezogen werden. Dieser wird zu einem großen Teil durch Albumin aufrechterhalten, jedoch auch Antikörper

tragen dazu bei. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass der verminderte kolloidosmotische Druck des Blutes in Antikörper-defizienten Tieren die Thrombozytenaggregation negativ beeinflusst und so zu falschen Annahmen verleitet.

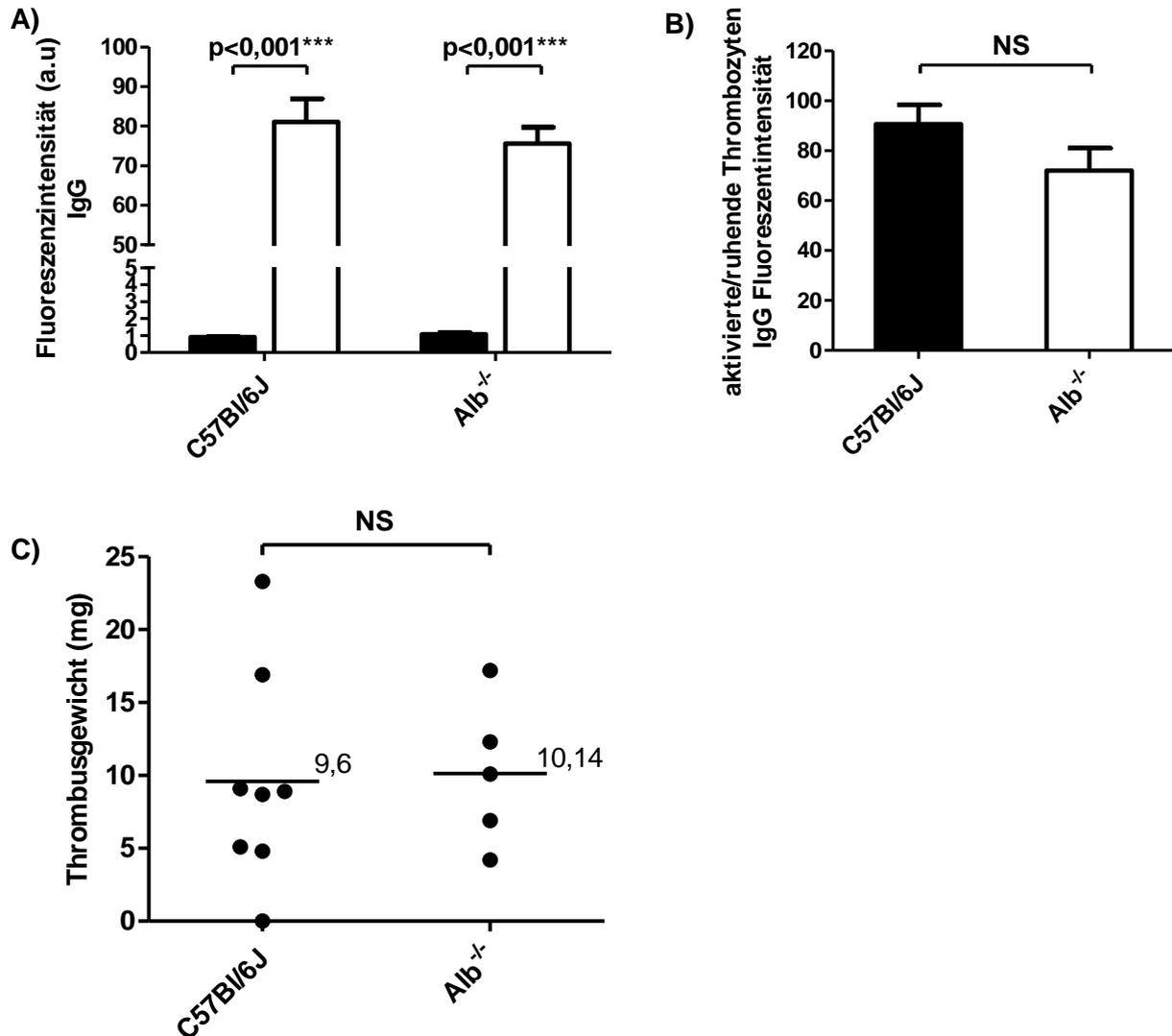


Abbildung 31: Albumin beeinflusst weder die Bindung von Antikörper an aktivierte Thrombozyten noch die Thromboseneigung *in vivo*

- A) Durchflusszytometrische Fluoreszenzabsolutwerte der IgG-Isotypantikörper mit gewaschenen Thrombozyten aus C57Bl/6J (n=6) und Albumin^{-/-} (Alb) (n=3) Mäusen. Schwarzer Balken: nicht aktivierte Thrombozyten; Weißer Balken aktivierte Thrombozyten. A.u.= Arbitrary units, * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.
- B) Verhältnis aus A der Fluoreszenzintensität aktivierter Thrombozyten zu nicht aktivierter Thrombozyten. * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.
- C) Inzidenz und Gewicht der Thromben nach Ligatur der unteren Vena cava am Mausmodell. C57Bl/6J n=4, Albumin^{-/-} n=3. * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.

Die Bindung von Antikörpern durch Thrombozyten ist somit nicht nur durch ein einzelnes Oberflächenprotein zu erklären. Sowohl Chondroitinsulfat als auch Fibrin/Fibrinogen scheinen hier eine Rolle zu spielen. Andere Moleküle wie zum Beispiel Albumin binden an der Oberfläche aber ändern nichts an der Antikörperbindungseigenschaft der Zelle. Um dies besser zu untersuchen, testeten wir Beschichtungen bestehend aus Chondroitinsulfat, Fibrinogen, Fibrin (Fibrinogen + Thrombin) und Albumin. Zusätzlich stellten wir Mischungen aus verschiedenen Komponenten her, welches die Situation auf Thrombozyten am ehesten widerspiegeln soll. Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität eines murinen FITC IgG1 Isotypantikörpers mit Hilfe eines ELISA Microplate readers. Wie Abbildung 32 zu entnehmen ist, hebt sich sowohl die Kombination aus Chondroitinsulfat und Fibrinogen, als auch Chondroitinsulfat und Fibrin signifikant von der alleinigen Fibrinogen Beschichtung ab. Dies entspricht am ehesten der Situation auf aktivierten Thrombozyten bei der Thrombusbildung. In der Kombination mit Chondroitinsulfat ist zusätzlich eine deutliche Steigerung des Signifikanzniveaus bei Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin zu erkennen. Folglich spielt auch die Gerinnungskaskade als Quelle von Thrombin in Bezug auf die Bindung von Antikörpern auf Thrombozyten eine wichtige Rolle. Chondroitinsulfat beziehungsweise Fibrin weisen einzeln jeweils ähnliche Bindungseigenschaften auf, die jedoch deutlich unter dem Niveau ihrer Kombination lag.

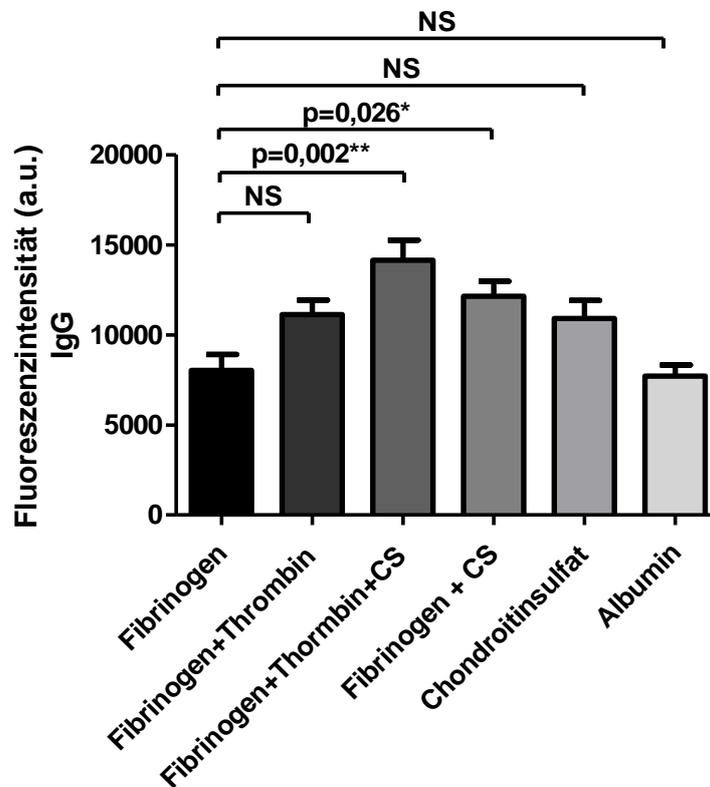


Abbildung 32: Die gute Haftung von Antikörpern an aktivierte Thrombozyten ist auf Chondroitinsulfat und Fibrin zurückzuführen

ELISA mit FITC IgG1 Isotypantikörper auf Fibrinogen-, Fibrin-, Chondroitinsulfat- und Albuminbeschichtung. Jeweils n=3.

A.u.= Arbitrary units, CS = Chondroitinsulfat. * = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 6 Gruppen mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant.

5. Einfluss von Chondroitinsulfat auf die Funktion der Thrombozyten

Wie wir sehen konnten ist die Bindung von Antikörpern auf Thrombozyten abhängig von Chondroitinsulfat und Fibrin. Durch enzymatische Verdauung bzw. Blockierung des Rezeptors GPIIb/IIIa kann die Zusammensetzung dieser Oberfläche gestört werden, welches zu einer signifikanten Reduktion der gebundenen Antikörper führt. Um zu testen welche Konsequenzen dies für die Funktion der Zellen hat wurden Aggregometrieversuche unter Chondroitinaseeinfluss durchgeführt. Aufgrund mangelnder Aggregation konnten entsprechende Versuche mit dem GPIIb/IIIa-Inhibitor Tirofiban nicht durchgeführt werden. Als Referenzsubstanz zu den Enzymen diente auch hier die Neuraminidase. Beide Gruppen unterschieden sich deutlich sowohl in Bezug auf das Aggregationsausmaß, als auch im Hinblick auf ATP-Freisetzung (siehe Abbildung 33). Dies deutet darauf hin, dass von Chondroitinsulfat ein deutlicher Beitrag zur Thrombozytenaktivierung und -sekretion ausgeht.

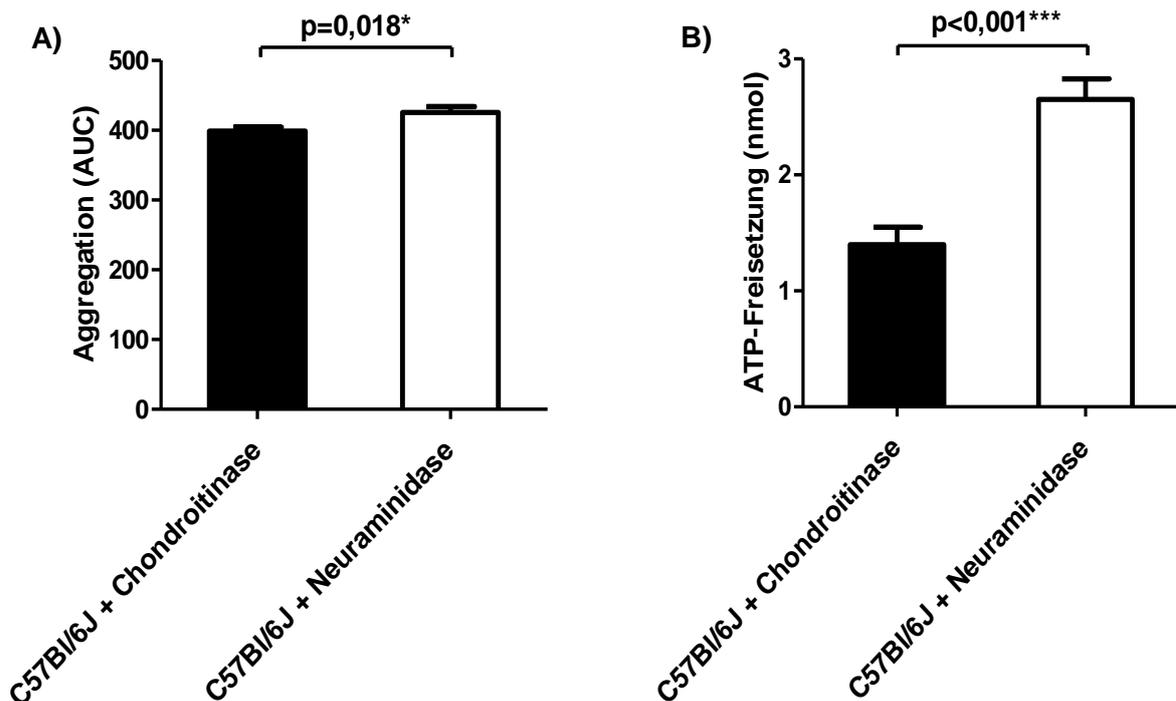


Abbildung 33: Die enzymatische Zersetzung von Chondroitinsulfat führt zu einer signifikanten Reduktion der Thrombozytenaggregation und -Sekretion

- A) Optische Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma aus C57Bl/6J (jeweils $n=10$) mit Zusatz von Chondroitinase und Neuraminidase.
AUC = area under the curve, * Signifikantes Ergebnis nach T-Test mit $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. NS = nicht signifikant.
- B) ATP-Sekretion gemessen durch Lumineszenz in plättchenreichem Plasma aus C57Bl/6J (jeweils $n=8$) mit Zusatz von Chondroitinase und Neuraminidase.
Nmol = nanomol, * Signifikantes Ergebnis nach T-Test mit $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. NS = nicht signifikant.

6. Komplementsystem und die venöse Thrombose

Das Komplementsystem ist eng verknüpft mit der Aktivität von Antikörpern. Zudem ist aus verschiedenen Erkrankungen, wie der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie bekannt, dass es auf die Thrombozytenfunktion Einfluss nehmen kann [410, 411]. Darum ist es wichtig die Rolle des Komplementsystems im Zusammenhang mit der venösen Thrombose zu untersuchen.

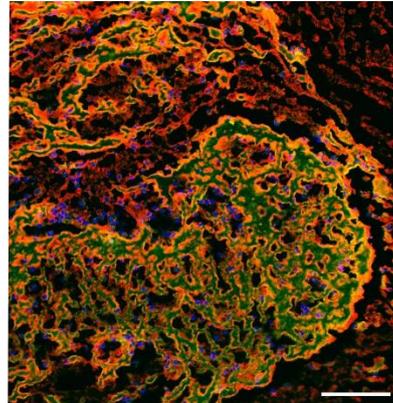
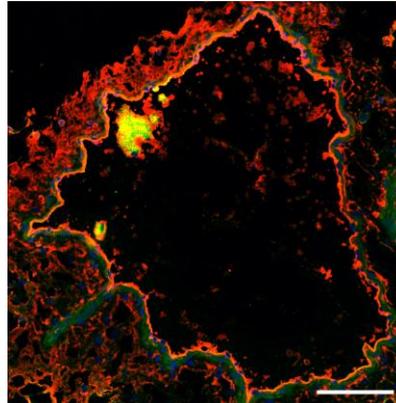
Um mehr Evidenz über die direkte Interaktion zwischen Komplementproteinen und Thrombozyten zu erhalten, wurden erneut histologische Färbungen von murinen Wildtypthromben angefertigt. Sollte eine solche Interaktion vorhanden sein, so ist es wiederum wichtig zu wissen, ab welchem Zeitpunkt dies eine Rolle spielt. Darum wurden bevorzugt frühe Thrombusstadien (1h, 6h und 12h nach Flussreduktion) untersucht. Wie in Abbildung 34 und 35 zu erkennen ist, ist die Übereinstimmung von C1q und C4 mit den Thrombozytenfeldern sehr groß. Eine Interaktion zwischen den beiden Partnern ist somit sehr wahrscheinlich. Den Bildern zufolge findet bereits eine Stunde nach Ligatur der Vena cava inferior eine Akkumulation von Komplementbestandteilen statt. Es handelt sich somit um einen ähnlich dynamischen Prozess wie bei den Antikörpern. Nebenbefundlich kann auch eine Assoziation von C1q und C4 zu dem Endothel gesehen werden. C1q und C4 sind beides Bestandteile der klassischen Komplementkaskade, welche antikörpervermittelt aktiviert werden. Ein Zusammenhang zu den zuvor gesehenen Antikörpern IgG und IgM ist somit wahrscheinlich.

A)

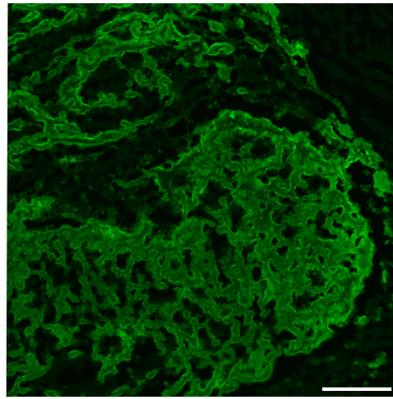
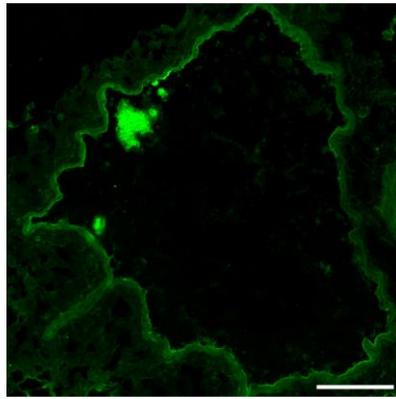
1h

6h

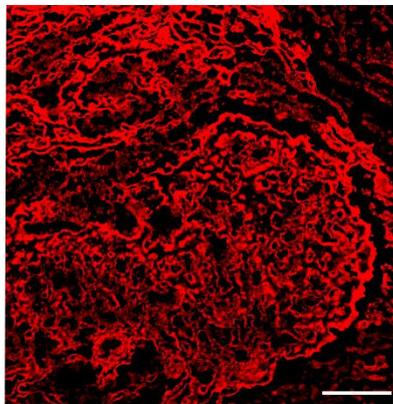
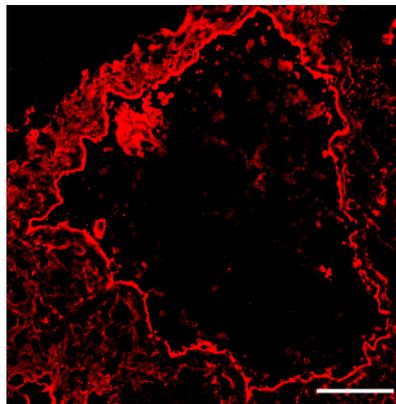
C1q
CD42b
Hoechst



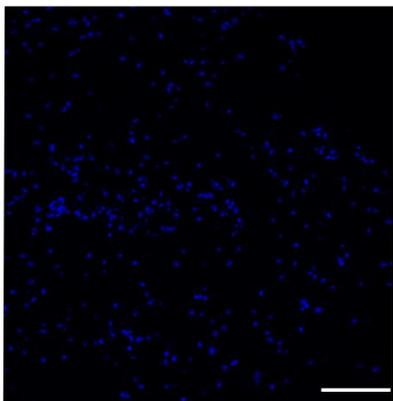
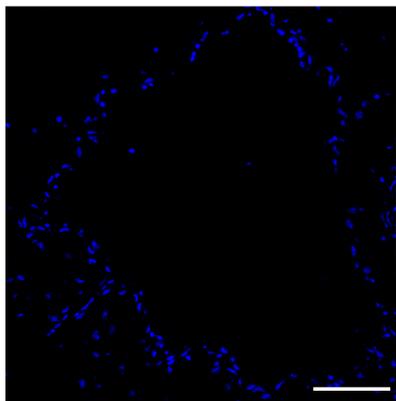
CD42b



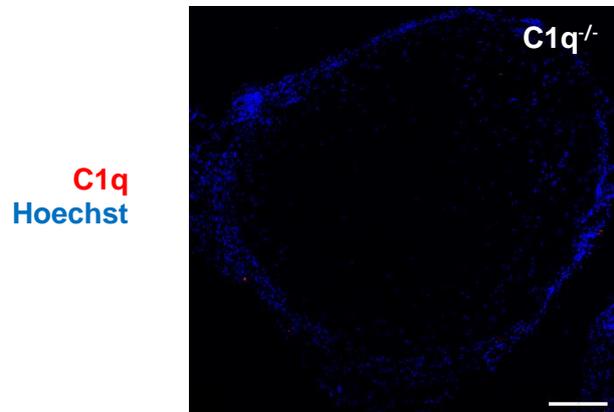
C1q



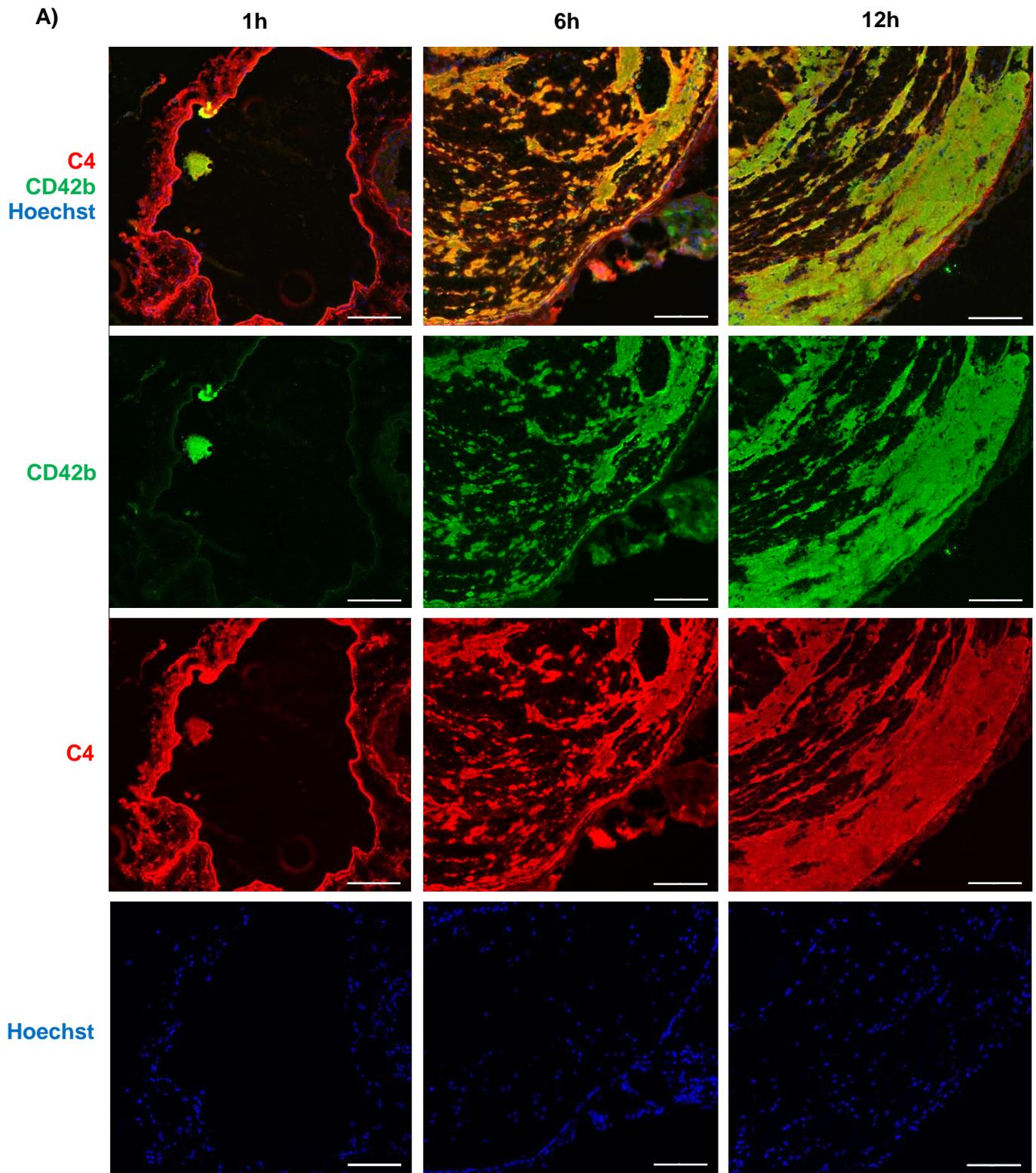
Hoechst



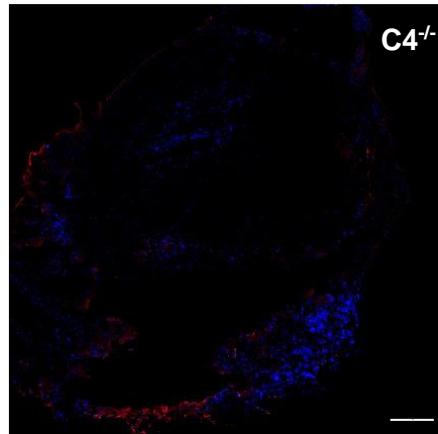
B)

**Abbildung 34: Frühe Assoziation von Thrombozyten mit C1q in der venösen Thrombose**

- A) Transversalschnitt eines C57Bl/6J-Thrombus eine Stunde und sechs Stunden nach Flussreduktion immunhistologisch gefärbt auf C1q (rot), CD42b (grün) und Hoechst (blau). Maßstab=100µm.
- B) Transversalschnitt eines C1q^{-/-}-Thrombus 48h nach Flussreduktion immunhistologisch gefärbt auf C1q (rot) und Hoechst (blau); Kontrolle für A). Maßstab=100µm.



B)

C4
Hoechst**Abbildung 35: Frühe Assoziation von Thrombozyten mit C4 in der venösen Thrombose**

- A) Transversalschnitt eines C57Bl/6J-Thrombus 1h, 6h und 12h nach Flussreduktion immunhistologisch gefärbt auf C4 (rot), CD42b (grün) und Hoechst (blau). Maßstab=100µm.
- B) Transversalschnitt eines C4^{-/-}-Thrombus 48h nach Flussreduktion immunhistologisch gefärbt auf C4 (rot) und Hoechst (blau); Kontrolle für A). Maßstab=100µm.

Im Folgenden widmeten wir uns der Frage, in welchem Umfang und auf welche Art das Komplementsystem Einfluss auf die Thrombozytenfunktion nimmt. Um möglichst selektiv die Rolle der einzelnen Komplementfaktoren untersuchen zu können, verwendeten wir Komplement-knockout-Mauslinien. Mit den Mauslinien C1q^{-/-} und C4^{-/-} ist es möglich die klassische Komplementkaskade zu untersuchen. Mit C3^{-/-} ist ein Protein der klassischen und alternativen Komplementkaskade betroffen. In der Aggregometrie zeigten sich ähnliche Resultate wie zuvor in IgG-defizienten Mäusen. In Abwesenheit von C1q und C3 wurde eine signifikante Reduktion der ATP-Freisetzung bei eindeutiger Neigung zu reduzierter Aggregation gemessen. In C4^{-/-} Mäusen war eine Tendenz zu niedrigerer ATP-Freisetzung zu sehen. Somit scheinen vor allem die Komplementproteine zu Beginn der klassischen und alternativen Komplementkaskade von Bedeutung zu sein. Auffallend viel Zeit verging bis nach Stimulation ein erster Anstieg der Kurve zu sehen war (Lag-time) und auffallend flach war der anschließende Kurvenverlauf, besonders in Abwesenheit von C1q und C3. Ein ähnliches Phänomen konnte auch in Abwesenheit von IgG beobachtet werden. Ein Zusammenhang mit IgG-Antikörpern ist somit wahrscheinlich.

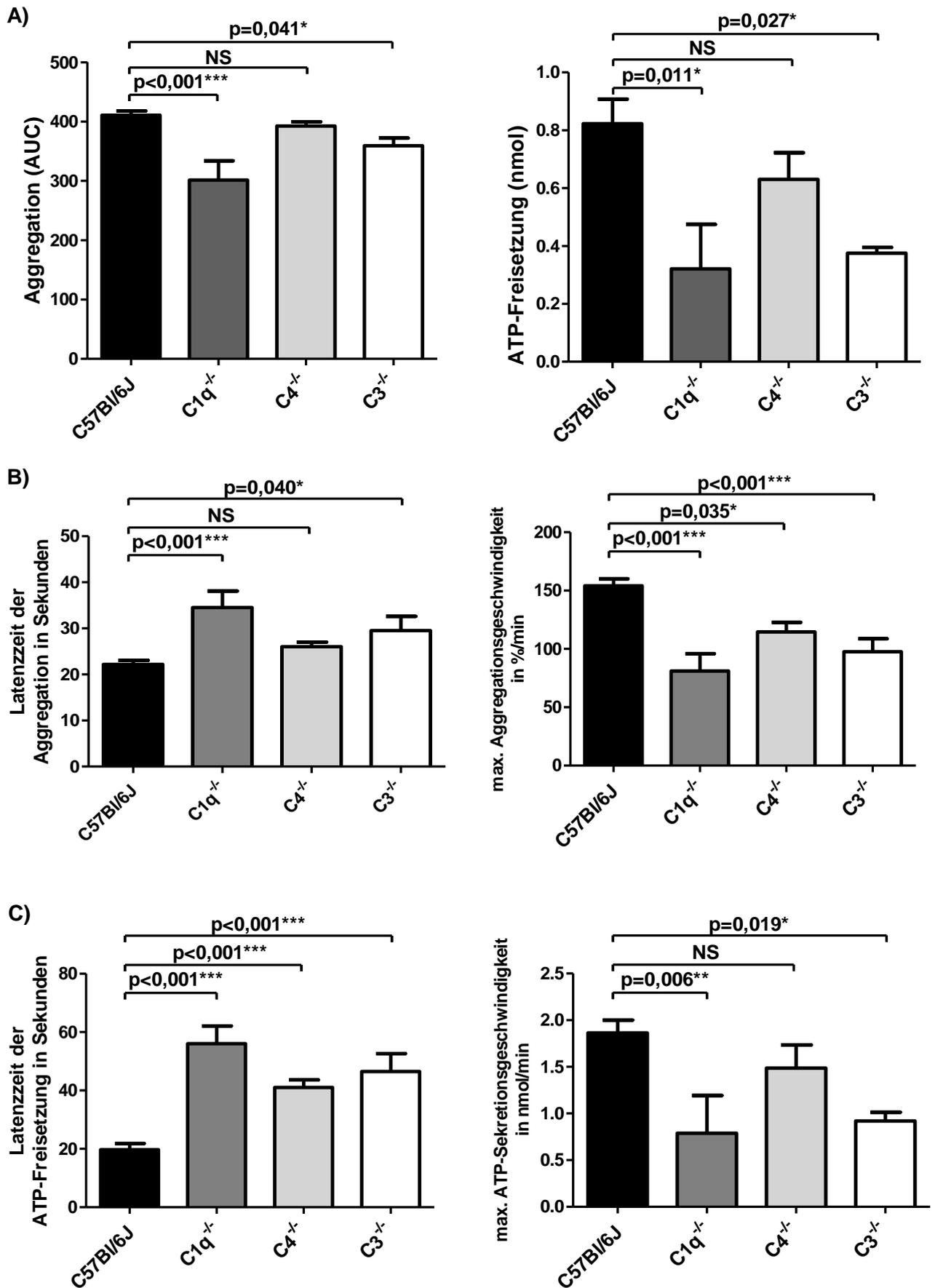


Abbildung 36: Komplementfaktoren C1q und C3 tragen signifikant zu Thrombozytenaggregation und -Sekretion bei

- A) Links: Optische Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma aus C57Bl/6J, C1q^{-/-}, C3^{-/-} und C4^{-/-} Mäusen in C57Bl/6J (n=20), C1q^{-/-}(n=4), C3^{-/-} (n=4) und C4^{-/-} (n=3) Mäusen.
AUC = area under the curve.
Rechts: ATP-Freisetzung gemessen durch Lumineszenz in C57Bl/6J (n=10), C1q^{-/-}(n=4), C3^{-/-} (n=4) und C4^{-/-} (n=3) Mäusen.
Nmol = nanomol, * = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 8 Gruppen mit * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.
- B) Links: Zeitdifferenz zwischen Aktivierung und maximaler Aggregation der Thrombozyten in optischer Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma der unter A genannten Mäusen.
Rechts: Maximal erreichte Geschwindigkeit der Thrombozytenaggregation gemessen durch die Steigung der Kurve.
* = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 7 Gruppen mit * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.
- C) Links: Zeitdifferenz zwischen Aktivierung und maximaler ATP-Ausschüttung der Thrombozyten in Lumineszenzaggrometrie mit plättchenreichem Plasma der unter A genannten Mäuse.
Rechts: Maximal erreichte Steigung der ATP-Ausschüttung von Thrombozyten in Lumineszenzaggrometrie.
* = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 7 Gruppen mit * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.

7. Molekulare Mechanismen in der Interaktion von Antikörpern und Komplement mit Chondroitinsulfat und Fibrin

Um die bisher gesehenen Ergebnisse besser erklären zu können ist es wichtig die Zusammenhänge zwischen Antikörperablagerung und Komplementaktivierung zu verstehen. Denkbar wäre eine Aktivierung des Komplementsystems durch die auf Thrombozyten gebundenen Antikörper. Umgekehrt könnten auch Komplementproteine für die Bindung von Antikörpern auf Thrombozyten verantwortlich sein. Dies setzt voraus, dass Antikörper durch eine unspezifische Antigenbindung an das Fab-Fragment ihre Fc-Bindungs tasche freigeben, über die sie dann zu wandständigem C1q auf Thrombozyten Kontakt aufnehmen. Um mögliche Interaktionen besser untersuchen zu können, fanden Antikörper gegen ein irrelevantes Antigen (anti-FITC) mit einem modifizierten Fc-Teil (Fc-silent™) Anwendung. Diese Modifikation führt dazu, dass sie weder C1q noch Fc-Rezeptoren binden können. Die Bindung an aktivierte Thrombozyten wurde zunächst durchflusszytometrisch untersucht. Im Vergleich zu den Wildtypantikörpern konnten hier signifikant mehr Fc-silent™ Antikörper auf Thrombozyten detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass weder das Komplementsystem, noch Fc-Rezeptoren an der unspezifischen Antikörperadhäsion auf aktivierten Thrombozyten beteiligt sind.

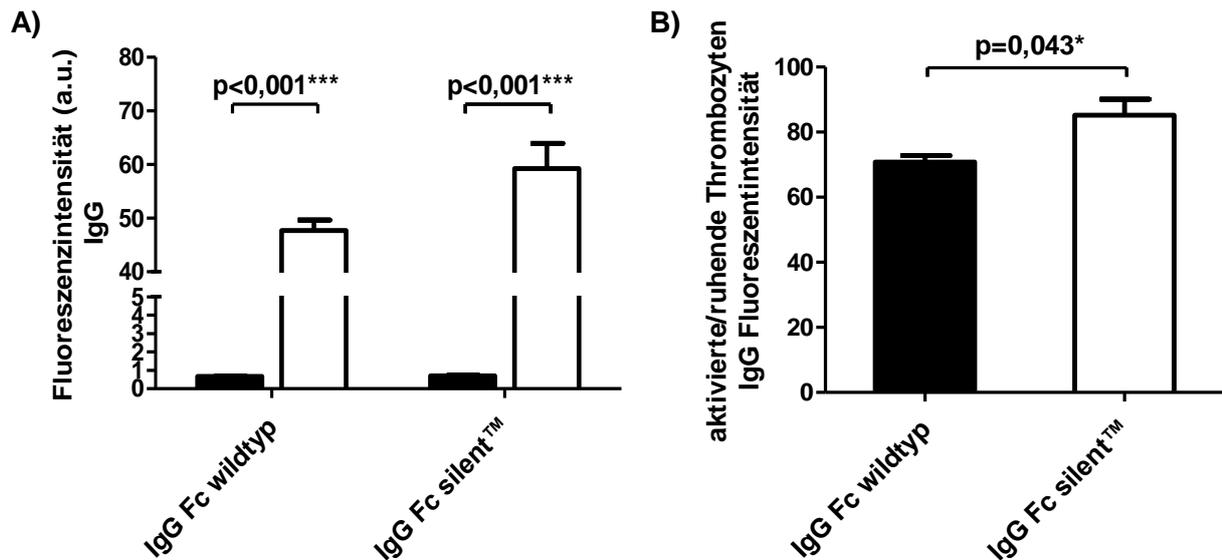


Abbildung 37: Das Antikörper-Fc-Ende trägt nicht zur Ablagerung von IgG auf aktivierten Thrombozyten bei

- A) Fluoreszenzabsolutwerte in durchflusszytometrischen Untersuchungen.
 Schwarzer Balken: Thrombozyten nicht aktiviert; weißer Balken: Thrombozyten aktiviert.
 Ursprung: C57Bl/6J, jeweils n=3.
 A.u.= Arbitrary units, * = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.
- B) Verhältnis der Fluoreszenzintensität aktivierte Thrombozyten zu nicht aktivierten Thrombozyten aus A). Ursprung: C57Bl/6J, jeweils n=3,
 * = Statistisch signifikantes Ergebnis nach T-Test *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. NS = nicht signifikant.

In einem weiteren Schritt war es wichtig die Abhängigkeit der Komplementaktivierung von Antikörpern zu untersuchen. Wie bereits gesehen hat sowohl die Defizienz von Antikörpern der Klasse IgG als auch der Komplementproteine C1q und C3 eine große Auswirkung auf die Funktion der Thrombozyten. Sollte dem eine antikörperabhängige Komplementaktivierung zugrunde liegen, so würde eine Mutation im Fc-Ende der Antikörper deren thrombogene Wirkung aufheben. Darum untersuchten wir die Aggregation von Thrombozyten in $slgM^{-/-} AID^{-/-}$ Plasma nach Substitution von anti-FITC Antikörpern. Im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypantikörpern, lag bei Fc silent™-Mutation eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation und ATP-Freisetzung vor. Die Aktivierung des Komplementsystems auf Thrombozyten durch Antikörper spielt somit funktionell eine wichtige Rolle. Zur besseren Differenzierung zwischen Komplementaktivierung durch IgG und IgM wurden die Aggregationsversuche mit Blut der Mauslinie $C\mu 13$ wiederholt. $C\mu 13$ Mäuse produzieren Antikörper der Klasse IgM, dessen Fc-vermittelte C1q-Aktivierung durch eine Mutation unterbunden wurde und somit den klassischen Weg der Komplementkaskade nicht aktivieren kann. Hier zeigte sich kein statistischer Unterschied zum Wildtyp. Somit ist es

hauptsächlich IgG und nicht IgM, welches verantwortlich ist für die Aktivierung von Komplementfaktoren auf Thrombozyten.

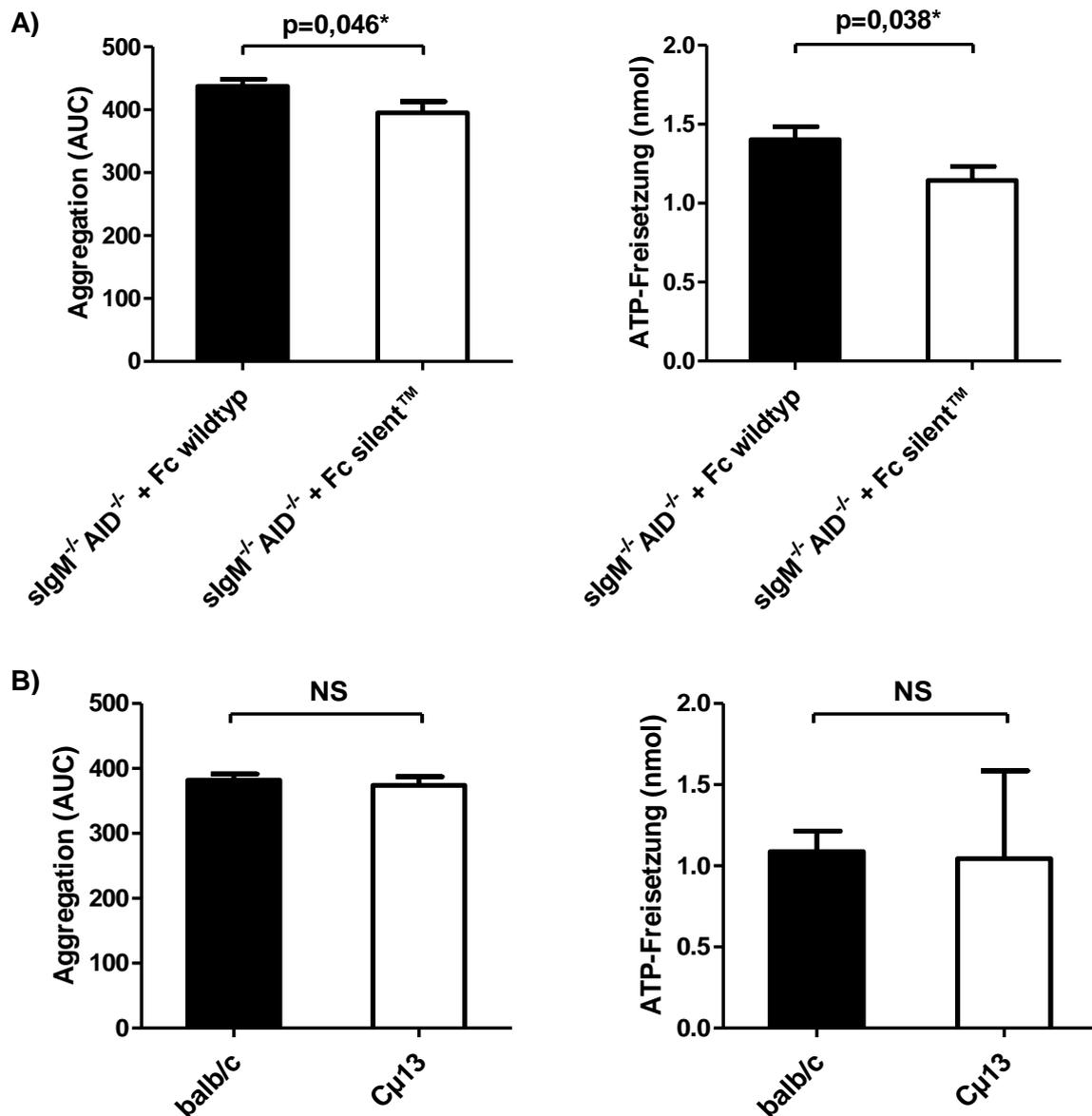


Abbildung 38: IgG-vermittelte Thrombozytenaggregation und -Sekretion

- A) Links: Optische Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma aus slgM^{-/-}AID^{-/-} Mäusen substituiert mit anti-FITC Wildtypantikörpern oder korrespondierenden Fc silent™-Antikörpern der Klasse IgG1 (jeweils n=4), AUC = area under the curve. Rechts: ATP-Freisetzung gemessen durch Lumineszenz in slgM^{-/-}AID^{-/-} Mäusen substituiert mit anti-FITC Wildtypantikörpern oder korrespondierenden Fc silent™-Antikörpern der Klasse IgG1 (jeweils n=4). Nmol = nanomol, * = Statistisch signifikantes Ergebnis nach T-Test * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.
- B) Links: Optische Aggregometrie mit plättchenreichem Plasma aus balb/c (n=6) und C57BL/6 Mäusen (n=3). AUC = area under the curve. Rechts: ATP-Freisetzung gemessen durch Lumineszenz in balb/c (n=6) und C57BL/6 Mäusen (n=3). Nmol = nanomol, * = Statistisch signifikantes Ergebnis nach T-Test * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.

8. Einfluss auf die Zusammensetzung des Thrombus

In den immunhistologischen Untersuchungen zu Beginn dieser Arbeit, konnte eine Assoziation von Antikörpern zu Thrombozyten gesehen werden. Leukozyten zeigten augenscheinlich keine Bindung von Antikörpern. In inflammatorischen Zuständen sind Interaktionen zwischen den beiden Partnern jedoch bekannt. Hier nehmen Antikörper Einfluss auf Leukozytenrekrutierung und -Aktivierung. Dies geschieht teilweise über Fc-Rezeptoren, teilweise indirekt und auf Distanz über das Komplementsystem [282, 412]. Die zuvor gesehenen Resultate schließen eine gegenseitige Beeinflussung somit nicht aus. Um dies zu untersuchen fertigten wir erneut immunhistologische Bilder an. Im Gegensatz zu zuvor, analysierten wir nicht die direkte Bindung der Antikörper, sondern nur deren Einfluss auf die Leukozytenakkumulation im Thrombus. Die Rolle der klassischen Antikörper-Leukozyteninteraktion über Fc-Rezeptoren testeten wir anhand von FcγR- und Toso-defizienten Mäusen. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der Neutrophilen- und Monozytenzahl sowohl in Abwesenheit des IgG-spezifischen Fcγ-Rezeptors, als auch des IgM-spezifischen Toso-Rezeptors. Als Maß für die Neutrophilenaktivierung konnte die Zahl der NETs gemessen werden, deren Oberfläche durch Gerinnungsaktivierung ebenfalls zur Thrombusentstehung beiträgt. Auch hier zeigte sich eine signifikante Reduktion im Vergleich zum Wildtyp.

Um zu überprüfen, ob sich ein entsprechender Effekt auch durch Abwesenheit einzelner Antikörperklassen reproduzieren lässt, wurden Thromben aus sIgM^{-/-} und AID^{-/-} Mäusen analysiert. Hier zeigte sich in Abwesenheit von IgG eine signifikante Reduktion der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zum Wildtyp. IgM hingegen zeigt wenig Wirkung weder auf Neutrophilen- noch auf die Monozytenakkumulation. Die Funktion von Leukozyten, wie auch von Thrombozyten scheint somit vor allem von Antikörpern der Klasse IgG beeinflusst zu werden.

Da sich ein Großteil der IgG-Antikörper im Thrombus auf der Oberfläche von Thrombozyten befindet und dort zur Komplementaktivierung beiträgt, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Interaktion auch für die gesteigerte Neutrophilenrekrutierung verantwortlich ist. Um zu untersuchen wie sich Komplementfaktoren auf die Leukozytenakkumulation auswirken, wurden Thromben aus entsprechenden Knockout-Tieren analysiert. Hierbei konzentrierten wir uns auf die Proteine zu Beginn der klassischen und alternativen Komplementkaskade: C1q, C4, C3 und C5. Mit Ausnahme von C5 kam es in Abwesenheit dieser Komplementbestandteile tatsächlich zu einer signifikanten Reduktion der Neutrophilenzahl, sowie der NETs im Thrombus. Deutlich schwächer ausgeprägt war jedoch der Effekt auf die Monozytenrekrutierung. Dieser stellte sich als nicht signifikant dar. Das Komplementsystem

scheint somit vor allem bei der antikörperabhängigen Neutrophilenrekrutierung eine Rolle zu spielen.

Da nun der Einfluss der Antikörper auf die Leukozytenrekrutierung bewiesen ist, versuchten wir erneut die Brücke zu den histologischen Ergebnissen zu Beginn dieser Arbeit zu schlagen. Die meiste Antikörperbindung konnte hier in Assoziation zu Thrombozyten gesehen werden. Hierfür waren keine spezifischen Bindungen notwendig, weshalb auch KL25-Antikörper auf Thrombozyten zu finden sind. Nun untersuchten wir die Auswirkung dieser KL25-Antikörperakkumulation auf die Leukozytenrekrutierung. Erstaunlicherweise zeigten sich keine großen Unterschiede zum Wildtyp sowohl in Bezug auf neutrophile Granulozyten, als auch auf Monozyten. Folglich nehmen Antikörper, unabhängig von der Bindung an ein spezifisches Antigen, nicht nur direkten Einfluss auf die Thrombozytenfunktion, auch Leukozyten werden durch Sie rekrutiert. Diese fördern die Entstehung eines inflammatorischen Umfeldes und tragen so zusätzlich zu der Thrombusentstehung bei.

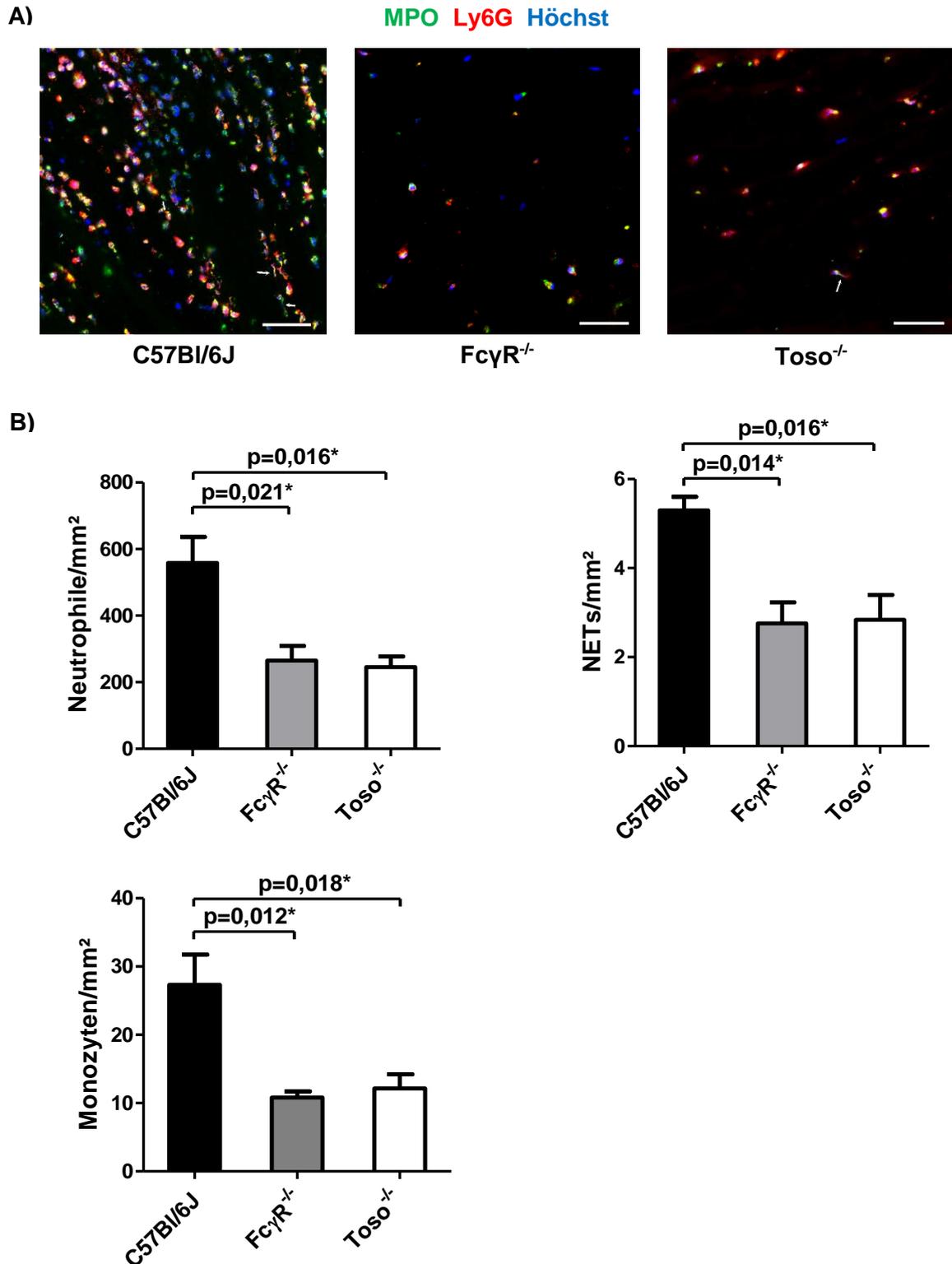


Abbildung 39: Fc γ - und Toso-Rezeptoren tragen zur antikörperabhängigen neutrophilen Granulozyten- und Monozytenakkumulation im Thrombus bei

A) Repräsentative Abbildungen der histologischen Färbungen.

Ly6G-(rot) MPO-(grün) Höchst (blau). Maßstab: 50 μ m.

B) Grafische Darstellung der Ergebnisse. Oben links: Anzahl der Neutrophilen/mm². Oben rechts: Anzahl der NETs/mm². Unten: Anzahl der Monozyten/mm². C57Bl/6J n=4, Fc γ R^{-/-} n=3, Toso^{-/-} n=3.

* = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 3 Gruppen mit * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.

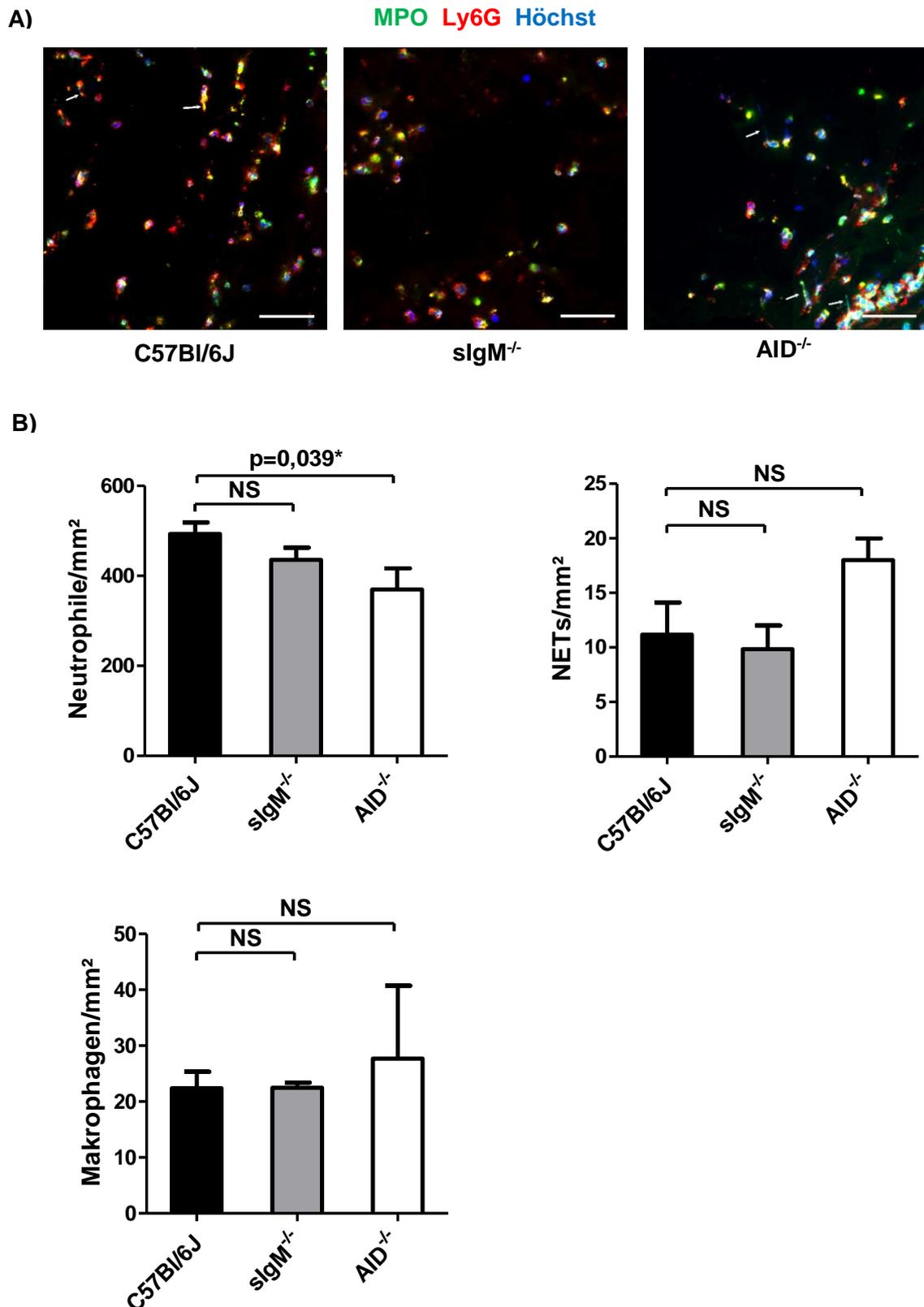
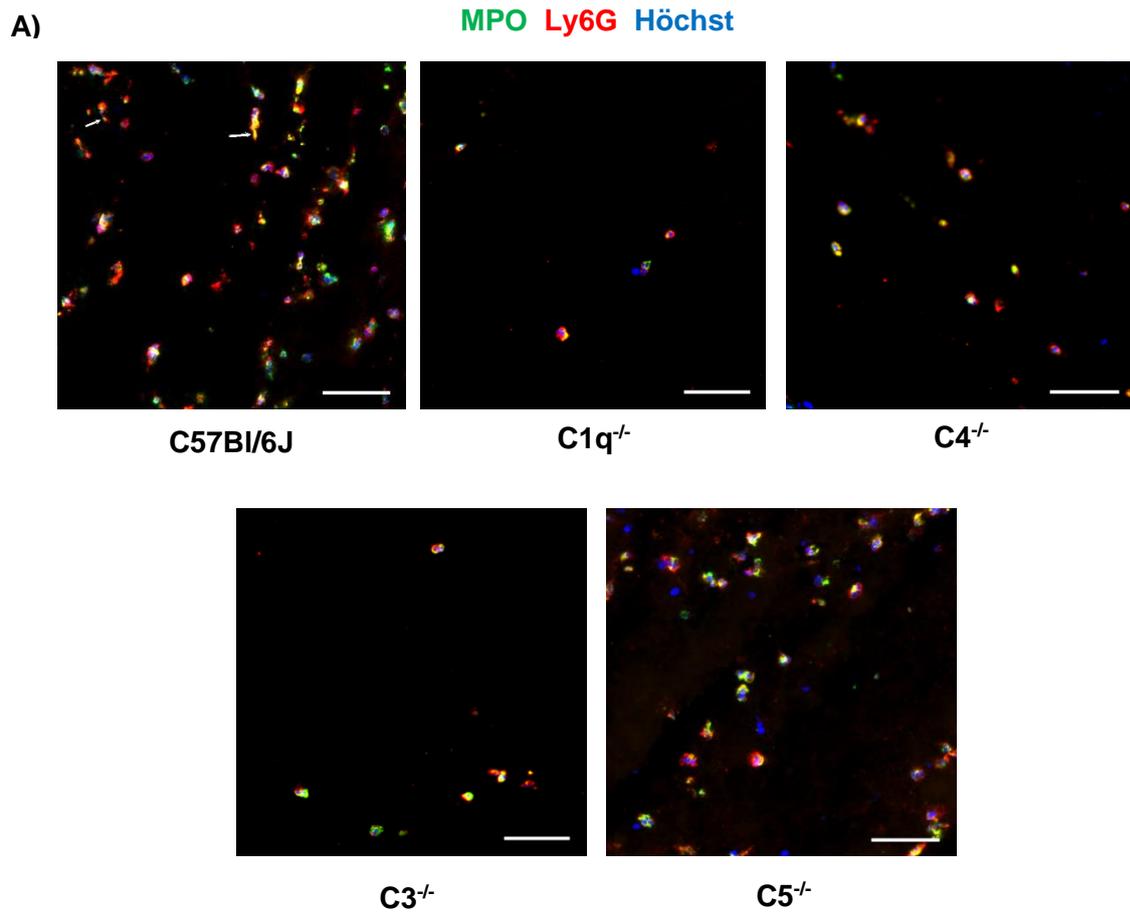
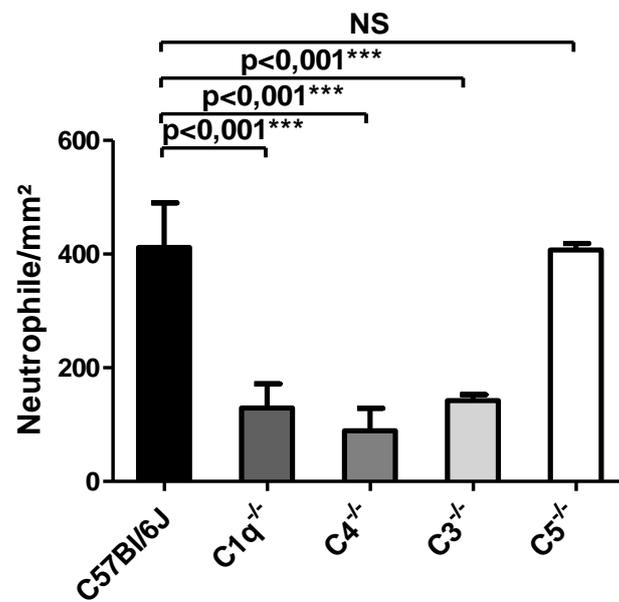


Abbildung 40: IgG fördert die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten

- A) Repräsentative Abbildungen der histologischen Färbungen. Ly6G (rot), MPO (grün), Höchst (blau), Pfeil = NET-Formation. Maßstab: 50 μ m.
- B) Grafische Darstellung der Ergebnisse. Oben links: Anzahl der Neutrophilen/mm². Oben rechts: Anzahl der NETs/mm². Unten: Anzahl der Monozyten/mm². C57Bl/6J n=6, slgM^{-/-} n=3, AID^{-/-} n=3
 * = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 8 Gruppen mit * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.



B)



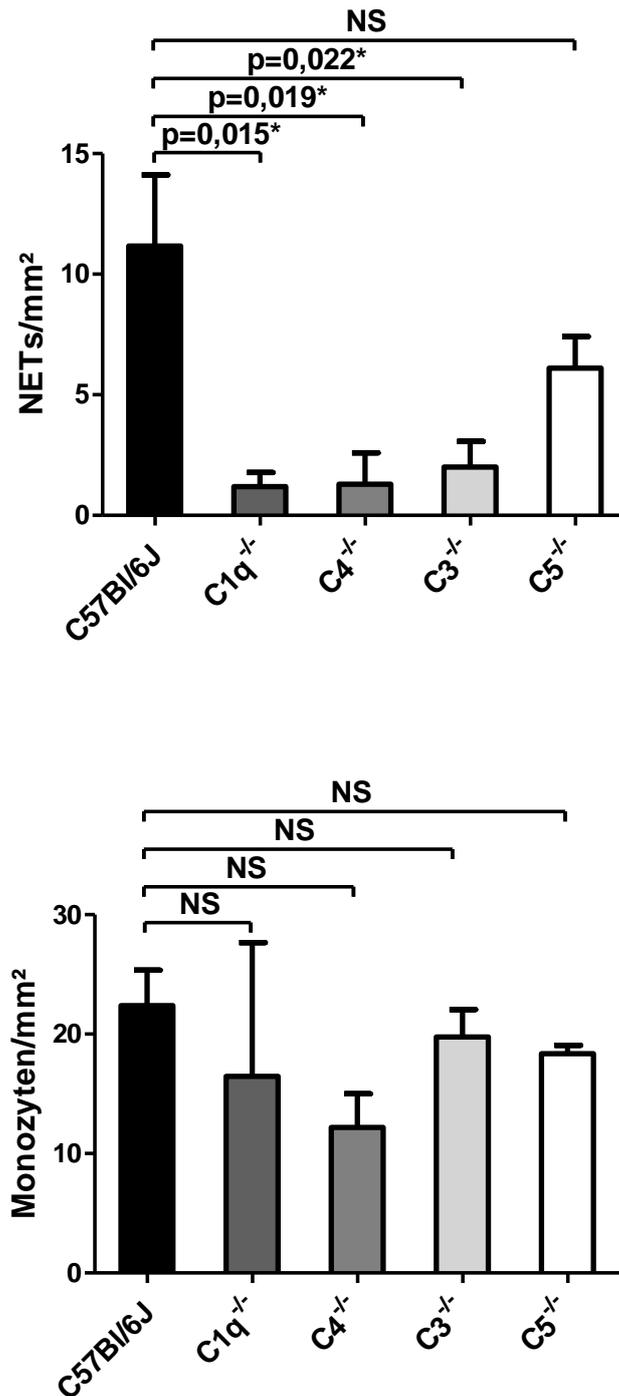


Abbildung 41: Komplementproteine C1q, C4 und C3 fördern die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in der venösen Thrombose

- A) Repräsentative Abbildungen der histologischen Färbungen. Ly6G-(rot), MPO-(grün), Höchst (blau), Pfeil = NET-Formation. Maßstab: 50µm.
- B) Grafische Darstellung der Ergebnisse. Oben: Anzahl der Neutrophilen/mm². Mitte: Anzahl der NETs/mm². Unten: Anzahl der Monozyten/mm². C57Bl/6J n=3, C1q^{-/-} n=3, C4^{-/-} n=3, C3^{-/-} n=3, C5^{-/-} n=3.

* = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 8 Gruppen mit * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. NS = nicht signifikant.

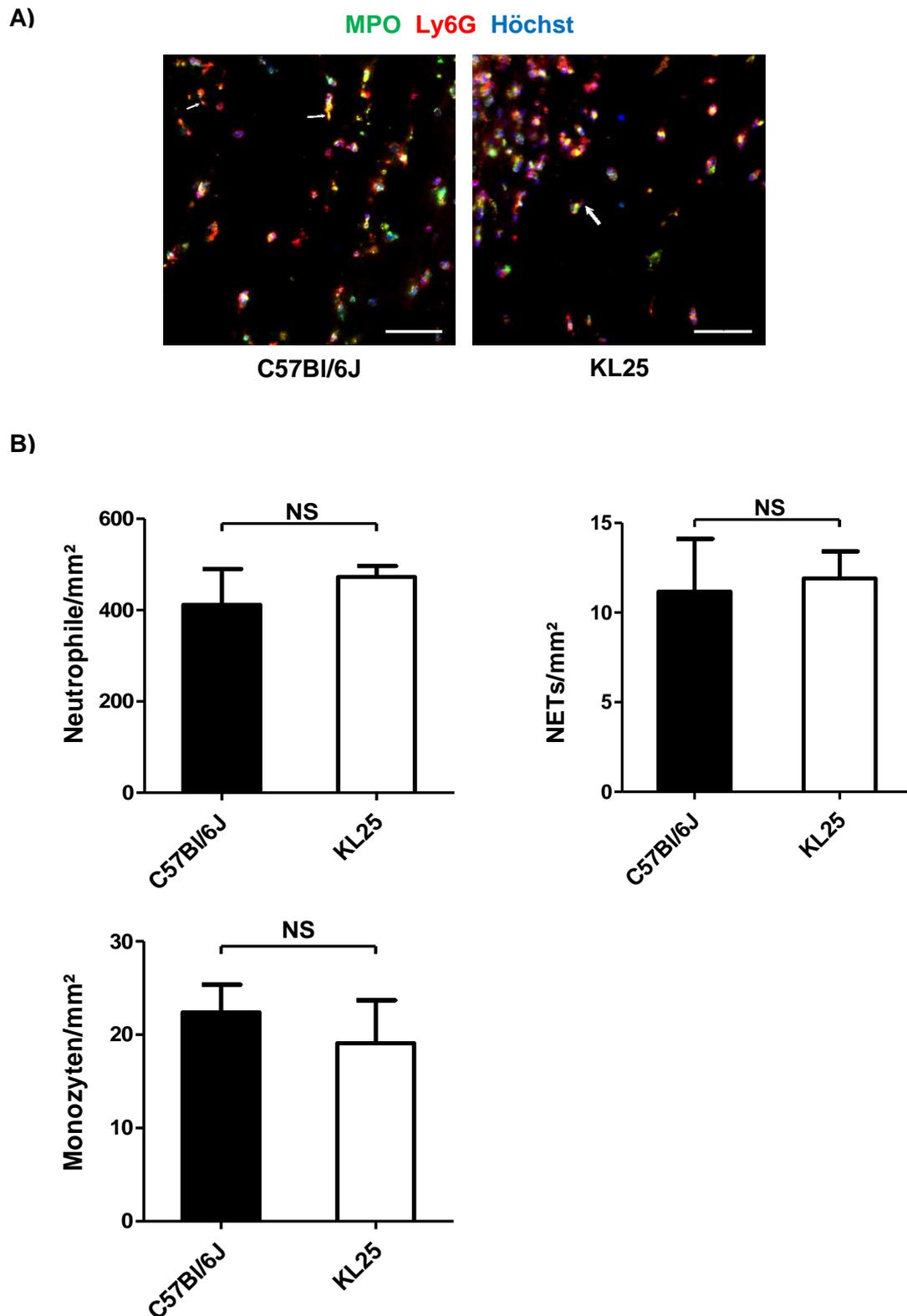


Abbildung 42: Leukozytenrekrutierung in der venösen Thrombose wird durch unspezifische Antikörperinteraktionen getriggert

A) Repräsentative Abbildungen der histologischen Färbungen. Ly6G-(rot), MPO-(grün), Höchst (blau). Pfeile = NET-Formationen. Maßstab: 50 μ m.

B) Grafische Darstellung der Ergebnisse. Oben links: Anzahl der Neutrophilen/mm². Oben rechts: Anzahl der NETs/mm². Unten: Anzahl der Monozyten/mm².

* = Signifikantes Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nach Dunnett für 8 Gruppen mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant.

C57Bl/6J n=3, KL25 nach Serumsupplementierung n=3.

9. Übertragbarkeit auf den Menschen

Aufgrund der größeren Stückzahl und erweiterter Möglichkeiten mit Knockout-Linien und Laborprodukten wurden die meisten obenstehenden Forschungsergebnisse an Mäusepräparaten gewonnen. Trotzdem sind sie vor allem für den Menschen im Hinblick auf zukünftige therapeutische Anwendung von Relevanz. Die Übertragbarkeit der Resultate war somit stets ein wichtiger Bestandteil unserer Forschungsarbeit. Dies wurde, wann immer möglich, durch Versuche an humanen Proben überprüft.

Eine zentrale Entdeckung in diesem Projekt war die Bindung der Antikörper an Thrombozyten. Um nachzuweisen, dass ein solcher Mechanismus nicht nur in Mäusen, sondern auch im Menschen stattfindet, wurden humane Lungenemboliethromben immunhistologisch untersucht. In den Abbildungen 9 und 11 konnte ebenso eindrucksvoll wie in den murinen Präparaten die Überlappung von IgG- bzw. IgM-Signal mit Thrombozyten bewiesen werden. Zur Verifizierung unserer *in-vitro*-Ergebnisse führten wir durchflusszytometrische Versuche durch. Auch hier zeigte sich eine starke Assoziation der humanen FITC-markierten Isotypantikörper zu aktivierten Thrombozyten (Abbildung 43). Dies bestätigt, dass auch im Menschen unspezifische Antikörperadhäsionen in der venösen Thrombose eine herausragende Rolle spielen. Von einer Übertragbarkeit der Ergebnisse kann somit ausgegangen werden. Dies hat weitreichende Folgen für die zukünftige Therapie und Einschätzung von potentiell gefährdeten Patientengruppen.

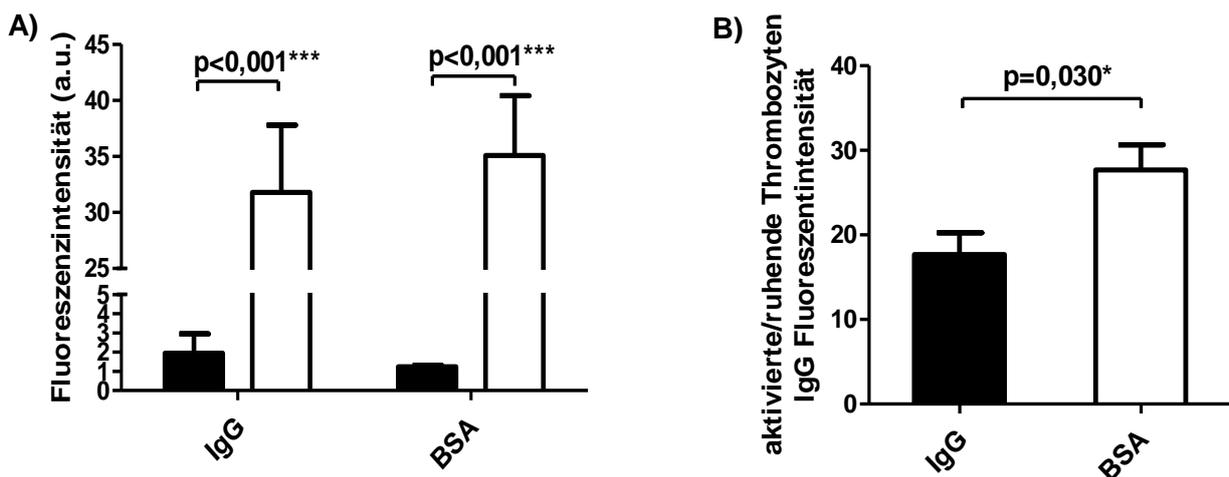


Abbildung 43: Antikörper der Klasse IgG akkumulieren unabhängig von ihrer Antigenspezifität auf aktivierten humanen Thrombozyten

Durchflusszytometrische Untersuchung:

A) Fluoreszenzabsolutwerte von humanen IgG1-Isotypantikörpern und FITC-markiertem Rinderalbumin (BSA).

* = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant. Jeweils $n = 3$.

B) Verhältnis der Fluoreszenzintensität aktivierter zu ruhender Thrombozyten.

* = Signifikantes Ergebnis nach T-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS = nicht signifikant. Jeweils $n = 3$.

VI. Diskussion

1. Aktivierung von Thrombozyten durch Interaktion mit Antikörpern

Die Entstehung der venösen Thrombose verkörpert ein komplexes Zusammenspiel zwischen Hämostase und Inflammation, dessen Zusammenhänge nur langsam verstanden werden. Ein grundlegendes Verständnis dieses Systems ist jedoch notwendig um diese häufige und gefährliche Erkrankung effektiv und möglichst kausal behandeln zu können. Die aktuellen Therapieansätze greifen unspezifisch in die Gerinnung des Patienten ein. Dabei müssen relevante Risiken und Nebenwirkungen wie Blutungsneigung in Kauf genommen werden. Um die Inflammation mit in therapeutische Überlegungen einbeziehen zu können, braucht es selektive Angriffspunkte um bedeutende Risiken beispielsweise durch Immunsuppression zu vermeiden. In dieser Arbeit konnten wir die Rolle von Antikörpern in diesem Entstehungsprozess näher beleuchten und bieten damit neue therapeutische Möglichkeiten ohne Beeinträchtigung der Gerinnungsfunktion.

Antikörper-Thrombozyteninteraktion wurden bereits in verschiedenen pathologischen Zuständen wie Heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT), Idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP), Antiphospholipid Syndrom und Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) beschrieben [10, 346, 413, 414]. Meist gehen Sie mit verstärkter Thrombozytenaggregation und erhöhter Thromboseneigung einher. Auch über die Interaktion zwischen Antikörpern und Thrombozyten als immunologische Zelle gibt es Erkenntnisse [352]. Wie jedoch die Bindung der Antikörper zu Thrombozyten von statten geht, ist bisher nur teilweise bekannt. Lösungsansätze wie Fc-Rezeptoren auf humanen Zellen in Immunologie und HIT [258] oder GPIIb/IIIa und Apolipoprotein-E-Rezeptor 2 als Zielproteine für antiphospholipid-Antikörper [415-417] können die Bindungen bisher nur teilweise erklären und sind hauptsächlich relevant für das jeweilige Krankheitsbild. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass ein Großteil der Antikörperassoziation zu Thrombozyten nicht auf einer spezifischen Antigenbindung beruht. Hiervon betroffen ist somit nicht nur ein schmales Patientenkollektiv, sondern die breite Bevölkerungsmasse mit weitreichenden Folgen für Gesundheit und Therapie. Aktivierte Thrombozyten wirken somit wie ein Magnet auf Immunglobuline und andere Plasmabestandteile. Der so entstehende Antikörperpool ist für die Thrombozytenfunktion, sowie die Leukozytenrekrutierung von großer Relevanz. Darauf deuten bereits die *in vivo* Daten von Busse hin. Sie beobachtete eine signifikant geringere Thrombozytenakkumulation in antikörperdefizienten $slgM^{-/-}AID^{-/-}$ Mäusen ab vier Stunden post-Ligatur [351]. Somit scheint es einen direkten Zusammenhang zu geben, den wir in *in vitro* Versuchen reproduzieren konnten. Die Aggregometrie von $slgM^{-/-}AID^{-/-}$ Mäuseblut zeigte

einen signifikant reduzierten ATP-Ausstoß, sowie Aggregationsausmaß. Da ein vergleichbarer Effekt nur bei Thrombozyten aus AID^{-/-} nicht jedoch bei sIgM^{-/-} Tieren zu sehen war, konnten wir diesen Effekt vor allem IgG zuschreiben.

Wie entsteht jedoch eine solche antikörpervermittelte Thrombozytenstimulierung? Eine alleinige Aktivierung durch Immunglobuline konnte auch bei hohen Konzentrationen nicht beobachtet werden. Darum ist ein relevanter Beitrag durch den Fcγ-Rezeptor IIA im Menschen unwahrscheinlich und kann aufgrund fehlender Rezeptoren im murinen Modell ausgeschlossen werden [19, 253, 352]. Folglich galt unser besonderes Interesse dem Komplementsystem. Es ist bekannt als ein wichtiger Effektorarm von Antikörpern. Voruntersuchungen haben bereits bestätigt, dass das Komplementsystem einen erheblichen Beitrag zu der Entstehung der venösen Thrombose leistet [119, 312]. Komplementproteine wirken sowohl einzeln (C3), wie auch durch Bildung des MAC, stimulierend auf Thrombozyten [119, 302, 303]. Aktivierung von Komplementproteinen auf der Oberfläche von Thrombozyten, hier vor allem auch der klassischen Komplementkaskade, wurde bereits mehrfach beschrieben [277, 278, 319]. Wie jedoch eine solche Bindung bzw. Aktivierung funktioniert, konnte bisher nicht ausreichend entschlüsselt werden. Die identifizierten Komplementrezeptoren, wie gC1qR/p33 bieten alleine keine hinreichende Erklärung für dieses Phänomen [277]. Neben Rezeptoren sind auch Antikörper vor allem der Klasse IgG und IgM bekannt für die Aktivierung der Komplementkaskade. Ein Schlüsselprotein ist hier das C1q, welches die Schnittstelle zwischen Immunglobulinen und der klassischen Komplementkaskade darstellt. Im Gegensatz zu C3 wirkt C1q alleine hemmend auf die Aktivierung von Thrombozyten [418]. Nur durch die Aktivierung der klassischen Gerinnungskaskade kann hieraus ein Aktivierungsreiz resultieren [277]. Dies konnten wir mit Hilfe von Aggregometrie bestätigen. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion des Aggregationsausmaßes sowohl in C1q^{-/-}, wie auch in C3-defizienten Mäusen. C4^{-/-} nimmt hier eine Sonderrolle ein, da sich dessen Messerwerte nur wenig vom Wildtyp unterscheiden. Fiola untersuchte in ihrer Arbeit die Rekrutierung von Thrombozyten in der venösen Thrombose. Überraschenderweise waren diese in Abwesenheit von C4 sogar leicht erhöht [312]. Möglicherweise ist dies Folge einer Eigenart der Spezies Maus. ROGER et al. stellte fest, dass murines C4 im Vergleich zu anderen Säugetieren (Mensch, Schwein,...) deutlich weniger C5-Konvertase-Aktivität aufweist [419]. Zudem ist die Konzentration von C4 im Mäuseserum auffällig niedrig [419]. Trotz der hier genannten Besonderheiten ist derzeit auch in der Maus nicht von einer funktionellen Beeinträchtigung der klassischen Komplementkaskade auszugehen.

In dieser Arbeit kristallisiert sich die klassische Komplementkaskade als ein zentrales Element in der Aktivierung der Thrombozyten heraus und verfestigt damit dessen Rolle in der

Entstehung der venösen Thrombose. Dabei konnten wir dessen Aktivierung eindeutig auf die Bindung oben genannter Antikörper zurückführen. Der Beweis gelang uns mit Hilfe von Fc-Silent™-Antikörpern. Aufgrund der hier vorliegenden Mutation im C1q-aktivierenden Fc-Ende fand im Gegensatz zu den Wildtypantikörpern keine Normalisierung der Thrombozytenaggregation und Sekretion statt. Folglich kann die stimulierende Wirkung von Antikörpern auf die Aktivierung des Komplementsystems zurückgeführt werden.

Es bleibt somit die Frage durch welches Antigen/Substanz die Antikörper auf der Oberfläche der Thrombozyten gebunden werden. Einige grundsätzliche Kenntnisse zu der Antikörperbindung ließen sich bereits durch die Interpretation der durchflusszytometrischen Versuche gewinnen. Die Tatsache, dass es sich auf Thrombozyten nicht um eine spezifische Antikörperbindung handelte, ermöglichte es für die weitere Untersuchung der Assoziation von Thrombozyten zu Immunglobulinen Isotypantikörper zu verwenden. Unser erstes Augenmerk war auf das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Antikörperbindung gerichtet. Bereits wenige Minuten nach Aktivierung konnte eine hohe Assoziation der Antikörper zu der aktivierten Thrombozytenoberfläche festgestellt werden. Daraus konnten wir zwei Dinge schließen. 1. Die Bindung von Antikörpern ist stark abhängig von dem Aktivierungsgrad der Thrombozyten. Dies erklärt, dass der antikörpervermittelte stimulierende Effekt nur nach einem initialen Aktivierungsreiz zu sehen ist, von Antikörpern alleine jedoch keine Aktivierung ausgeht. 2. Es handelt sich um einen schnellen Bindungsprozess, welcher die vermehrte Aktivierung von Thrombozyten in Anwesenheit von Antikörpern und dem Komplementsystem erklären kann. Der Kinetik der Antikörperbindung zufolge handelt es sich um eine zellvermittelte Bindung, die nur bei Aktivierung vorliegt. Ein passives Verfangen von Antikörpern in den Interzellularräumen von Thrombozytenaggregaten kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da keine Assoziation zwischen der Aggregatgröße und der Menge der Antikörper zu erkennen war. Die Bindung geht somit von der Oberfläche der einzelnen Zellen aus.

Für die Vermittlung der Antikörperbindung zu aktivierten Thrombozyten kamen verschiedene Mechanismen infrage. Eine davon war die Oberflächenladung. In Ruhe halten Thrombozyten in einem einwärtsgerichteten ATP-abhängigen Transportprozess von Phosphatidylserin eine positive Ladung zur Zelloberfläche aufrecht [420]. Dieses Gleichgewicht wird gestört durch die Integration von intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran nach Aktivierung der Zelle [421]. Sowohl die Bindung von Antikörpern, wie auch verschiedener Plasmabestandteile werden größtenteils durch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt [422]. Annexin V ist ein Plasmaprotein, das sehr stark durch negative Ladung angezogen wird [423]. Entsprechend ist die Assoziation zu aktivierten Thrombozyten hoch [396]. Entgegen der bisherigen Vorstellung als IgM-bindendes Protein im Rahmen von Ischämie-Reperfusion [238], konnte in Anwesenheit von Annexin V eine Reduktion vor allem der IgG-Fraktion auf der

Thrombozytenoberfläche beobachtet werden. Annexin V ist bereits bekannt für seine protektiven Eigenschaften in der Entstehung arterieller Thrombosen. Zurückgeführt wird dies auf die gerinnungshemmende Wirkung, welche durch die Neutralisation der negativ-geladenen Oberfläche von aktivierten Thrombozyten zustande kommt [19, 396]. Dieser Ladungsausgleich entzieht der intrinsischen Gerinnungskaskade den Aktivierungsreiz. Eine direkte Beeinflussung der Thrombozytenfunktion durch Annexin ist bisher nicht bekannt. Tatsächlich konnten wir in Anwesenheit dieses Proteins eine signifikante Reduktion der ATP-Ausschüttung und Aggregation beobachten. Diesen Effekt können wir der reduzierten IgG-Bindung in Folge der gerinnungshemmenden Wirkung von Annexin V zuschreiben. Eine direkte Hemmung der Antikörperinteraktion mit Thrombozyten durch Neutralisation von Ladungen ist jedoch unwahrscheinlich, da das Anhängen negativer Succinylreste an entsprechende Antikörper zu keiner Änderung des Bindungsverhaltens führte.

2. Chondroitinsulfat und Fibrin als Interaktionspartner der Antikörper auf Thrombozyten

Um eine Erklärung für die annexinvermittelte Reduktion der Antikörperbindung an der Thrombozytenoberfläche finden zu können, beschäftigten wir uns näher mit der Rolle von Fibrin und Fibrinogen. GPIIb/IIIa ist ein wichtiger Rezeptor um die Funktion von Fibrinogen in Bezug auf Thrombozyten verstehen zu können. Seine Aufgabe in der Entstehung der Thrombose wurde bisher vor allem im arteriellen System untersucht [424, 425]. Er ist jedoch auch in der venösen Thrombose von Bedeutung, wie mehrere Arbeitsgruppen bereits bestätigt haben [426, 427]. Im Thrombus ermöglicht GPIIb/IIIa den Thrombozyten über Fibrinogen untereinander zu interagieren und auf diese Weise ein dreidimensionales Aggregat zu bilden. GPIIb/IIIa ist somit ein wichtiger strukturbildender Rezeptor in der Thrombusentstehung [398]. Gleichzeitig führt er die Bestandteile der Gerinnungskaskade zusammen [398]. Fibrinogen, das Substrat der Gerinnungskaskade, wird entweder aus dem Blutplasma aufgenommen, teilweise wird GPIIb/IIIa auch fertig konjugiert aus der intrazellulären α -Granula freigesetzt und auf der Oberfläche der Thrombozyten fixiert [428, 429]. Durch die negativ geladene Phosphatidylserinoberfläche der aktivierten Thrombozyten trifft dort ein Aktivator der intrinsischen Gerinnungskaskade auf das Substrat Fibrinogen. Dies führt zur Bildung von Fibrin, welches maßgeblich zur weiteren Thrombusbildung und Gerinnselfretraktion beiträgt. Dieser Schritt hat jedoch auch noch weitere Auswirkungen auf die Zelle. Wie wir zeigen konnten, stellt Fibrin auf Thrombozyten ein wichtiges Adhäsionsprotein für Antikörper dar. Die Interaktion von IgG mit Fibrinogenoberflächen wurde bereits von Boehm et al. untersucht. Tatsächlich konnte hier eine spezifische Adhäsion dieser Antikörper an Fibrinogen vom Typ I identifiziert werden [430]. In Bezug auf Bakterien ergab sich hieraus eine verstärkte

phagozytische Leistung [430, 431]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auch hier Antikörper in einem aktivierten Zustand vorlagen. Da im Unterschied zu Bakterien das Fibrinogen/Fibrin auf Thrombozyten vor allem rezeptorgebunden vorliegt, gelang es uns die Menge an IgG auf diesen Zellen durch Blockierung von GPIIb/IIIa deutlich zu reduzieren. Zudem haben unsere *in-vitro*-Versuche ergeben, dass die IgG-Bindungseigenschaft von Fibrin leicht über dem von Fibrinogen liegt. Hierfür ist bekannterweise die Einwirkung von Thrombin notwendig. In diesem Zusammenhang ist höchstwahrscheinlich auch die IgG-reduzierende Eigenschaft von Annexin V auf der Thrombozytenoberfläche zu betrachten. Die Bildung von Thrombin über die intrinsische Gerinnungskaskade wird von Annexin V gehemmt. Im Einklang mit den Ergebnissen von Boehm et al., waren hiervon isoliert Antikörper der Klasse IgG betroffen, nicht jedoch IgM oder Albumin [430, 431]. In Aggregationsversuchen konnten wir zeigen, dass der Einfluss von Annexin V deutliche Auswirkungen auf die Aktivität der Thrombozyten hat und somit funktionell von Relevanz ist.

Nun ist Fibrin kein Protein, welches sich auf die Oberfläche der Thrombozyten beschränkt. Es breitet sich teilweise weit über die Thrombozytengrenzen hinaus aus. In der Histologie konnte die Assoziation von Antikörpern zu Fibrin(ogen) im Thrombus gemessen werden. Diese lag deutlich unter dem Antikörperriveau auf Thrombozyten. Folglich muss es noch ein zweites Element geben, welches seinen Beitrag leistet. Mittels hochauflösender konfokaler Mikroskopie konnte der Bindungsort der Antikörper mit großer Sicherheit auf die Oberfläche der Thrombozyten eingegrenzt werden. Dennoch ist die Lösung für dieses Rätsel in den intrazellulären Vesikeln zu finden. Hierdurch kann sowohl die Abwesenheit der Antikörperbindung in ruhenden Zellen, als auch die rasche Kinetik nach Aktivierung erklärt werden. Chondroitinsulfat ist das am meisten vertretene Glykosaminoglykan in der Membran von Thrombozyten [328, 329]. Im Ruhezustand befindet es sich in der α -Granula. Die Freisetzungskinetik entspricht somit der von P-Selektin [332, 432]. Der Vergleich zeigt große Übereinstimmung mit der Antikörperassoziation zu Thrombozyten in dieser Arbeit. In der Literatur ist Chondroitinsulfat bereits bekannt für die Aktivierung der klassischen Komplementkaskade auf Thrombozyten [279, 336]. Auf diese Weise nimmt es Einfluss auf die Funktion dieser Zellen [334]. Dies wiederum führt zu einer gestörten arteriellen Thrombusbildung in *Serglycin*^{-/-} Mäusen [334]. In massenspektrometrischen Untersuchungen, sowie Western-Blot konnte Chondroitinsulfat als ein unspezifischer Proteinbindner identifiziert werden [279]. Neben Komplementproteinen wurden auch Antikörper der Klasse IgG und IgM auf dessen Oberfläche identifiziert [279]. Wir konnten zeigen, dass die Bindung von Antikörpern auf aktivierten Thrombozyten durch die enzymatische Zersetzung von Chondroitinsulfat signifikant sinkt. Demzufolge kam es zu einer deutlichen Reduktion der ATP-Freisetzung und des Aggregationsausmaßes. Dies wiederum lässt auf eine reduzierte antikörpervermittelte Komplementaktivierung schließen.

Die Anlagerung von Antikörpern an aktivierte Thrombozyten ist somit ein Resultat aus verschiedenen Proteinen auf deren Oberfläche. Die antigenunabhängige Assoziation von Antikörpern mit einer Plasmaproteinschicht erinnert sehr an die Gegebenheiten auf Biomaterialoberflächen. Von Untersuchungen derartiger Strukturen wissen wir bereits, dass eine solche unspezifische Adhäsion ausreicht um Antikörper zu aktivieren und so das C1q-bindende Fc-Ende für Komplementaktivierung empfänglich zu machen [393]. Auf Thrombozyten ist hierfür eine Mischung aus Chondroitinsulfat und Fibrin verantwortlich. Nur die Kombination beider Partner vermag es das volle Ausmaß der Antikörperbindung auf aktivierten Thrombozyten zu erklären.

Nebenbei ist auch Albumin Bestandteil dieser Proteinschicht. Es beeinflusst jedoch weder die Bindung von Antikörpern, noch die Bildung venöser Thromben. Dennoch ist es in Bezug auf die Thrombozytenfunktion von besonderem Interesse. Ein Fehlen dieses Proteins versetzt die Zellen in eine reduzierte kolloidosmotische Umgebung, wie sie auch in Abwesenheit von Antikörpern entstehen kann. Folglich können Funktionseinschränkungen von Thrombozyten durch Proteinmangel ausgeschlossen werden.

3. Differentielle Wirkung verschiedener Antikörper-Klassen auf Thrombozyten

Antikörper befinden sich in hoher Zahl im Serum des Menschen. Sie unterscheiden sich in ihrem Aufbau (Klassifikation) und in ihrer Spezifität. So muss auch im Fall der Thrombozyten unterschieden werden zwischen thrombozytenoberflächenspezifischen Antikörpern und thrombozytenfremden (anderweitig gerichteten) Antikörpern. Als dritte Entität können die immunkomplexvermittelten Entzündungsreaktionen betrachtet werden. Antiphospholipidantikörper, welche im Rahmen des gleichnamigen Syndroms, sowie dem Lupus erythematodes vorkommen, neigen zu Komplexbildungen mit dem löslichen β 2GPI [8, 269]. Ähnlich wie bei der idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (hier meist Autoantikörper gegen thrombozytenspezifisches GPIIb-IIIa oder GPIb-IX) kommt es im Rahmen dieser Erkrankung zu Komplementaktivierung auf Thrombozyten. Das Komplementsystem wiederum ist ein bekannter Stimulator dieser Zellen, welches die starke Thrombogenität dieser speziellen Autoimmunantikörper erklären kann [9, 321, 414, 433, 434]. Erstaunlich und bisher nicht suffizient erklärbar war die Tatsache, dass auch auf stimulierten Thrombozyten gesunder Individuen Komplementaktivierung stattfindet [277, 278]. Dies wirft die Frage nach natürlicherweise vorkommenden, teilweise autoreaktiven Antikörpern im Rahmen der normalen Immunfunktion auf.

In diesem Zusammenhang rücken die natürlichen Antikörper in den Fokus. Diese Gruppe von Immunglobulinen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit der Bildung spezifischer Bindungen mit konservierten Strukturen auf Eigen- und Fremdoberflächen aus. Eine mit dem Alter steigende Kreuzreaktion mit Chondroitinsulfat auf Thrombozyten wurde bereits bestätigt [338, 435]. Einen relevanten Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung konnte jedoch in unserem Modell ausgeschlossen werden. Sowohl die Mauslinien KL25, wie auch CR2^{-/-} wiesen eine nahezu unveränderte Thrombozytenfunktion auf. Auch ein Mangel der bevorzugten Klasse natürlicher Antikörper IgM in slgM^{-/-} erbrachte keinen relevanten Unterschied [436].

Es bleibt somit nach zuvor erwähntem Schema die Gruppe der antigenunabhängigen Antikörperassoziation. Natürlicherweise ist ein Großteil der Antikörper im Serum gegen Fremdantigene, welche nicht auf Thrombozyten vorhanden sind, gerichtet [181, 187]. In Bezug auf die Thrombozyten handelt es sich somit definitionsgemäß um unspezifische Antikörper. Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erste Arbeit, die die Rolle eines solchen Interaktionsmechanismus genauer untersucht. Da es sich um einen antigenunabhängigen Prozess handelt, erweitert sich das Spektrum der involvierten Antikörper drastisch und schließt die Immunglobuline klinisch gesunder Individuen mit ein. Die zuvor erwähnte Komplementaktivierung auf Thrombozyten kann auf diese Weise erklärt werden. Wie wir zeigen konnten, handelt es sich um einen konzentrationsabhängigen Prozess. Dies erklärt die stark erhöhte Inzidenz venöser und arterieller Thrombosen im Rahmen von Erkrankungen mit gesteigerter Produktion ungerichteter Antikörper, wie beispielsweise der Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz. Hier ergeben sich jedoch deutliche Unterschiede in Bezug auf die Antikörperklassen. Der thrombotische Effekt geht hauptsächlich von IgG und IgA aus [10, 347]. Im Gegensatz dazu führt eine vermehrte Produktion ungerichteter IgM-Antikörper zu keiner vermehrten Thromboseneigung [347]. Diese Erkenntnis konnten wir mit unseren Resultaten bestätigen, da die Thrombozytenfunktion nahezu ausschließlich von der IgG-Konzentration im Serum abhängt. Unabhängig davon bindet jedoch auch IgM an der Thrombozytenoberfläche. Wieso dies im Gegensatz zu IgG zu keiner Thromboseneigung führt ist unklar. Ein Grund ist möglicherweise das Verhalten von IgG nach Aktivierung. So wurde bereits bekannt, dass IgG Hexamere bilden kann [437]. Dies steigert die Effizienz, mit der es die klassische Komplementkaskade aktiviert [437]. Neben IgG und IgA geht auch von IgE eine vermehrte Thrombozytenaktivierung aus [438]. IgA und IgE sind jedoch im Normalzustand im Serum in relativ geringen Konzentrationen vorhanden, sodass eine relevante Auswirkung auf die Entstehung der Thrombose im gesunden Menschen unwahrscheinlich ist.

Die Aktivierung des Komplementsystems hat wiederum nicht nur Folgen für die Thrombozyten selbst, sondern auch auf Leukozyten. Über C3(H₂O) können Leukozyten-Thrombozyten-

komplexe gebildet werden [311, 439]. Zudem werden myeloide Leukozyten über den humoralen Weg (C5a) rekrutiert und aktiviert [85]. Dies wiederum schafft über TF-Expression die Grundlage für die exzessive Aktivierung der Gerinnungskaskade während der Thrombusbildung [5, 85, 351, 440]. Ein derartiger Zusammenhang zwischen Antikörpern, Komplementaktivierung und neutrophiler Granulozyten-vermittelter TF-Expression ist bereits bekannt aus Antiphospholipid Syndrom [77]. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass auch in klinisch gesunden Individuen Antikörper über das Komplementsystem Einfluss auf Neutrophile nehmen. Neben Leukozyten werden auch Endothelzellen durch Komplementproteine aktiviert. Anschließend exprimieren sie Selektine, von Willebrand Faktor und Proteindisulfidisomerase, die den inflammatorischen Prozess unterhalten und Gerinnung fördern [5]. Von Antiphospholipid Syndrom wissen wir, dass die Aktivierung von Endothelzellen durch Antikörper-Thrombozyteninteraktion getriggert werden kann [413]. Inwieweit dies auch für die tiefe Venenthrombose gesunder Individuen gilt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Es zeigt jedoch, dass die antikörpervermittelte Komplementaktivierung auf dem Boden aktivierter Thrombozyten über viele verschiedene Prozesse gerinnungsanstoßend wirken kann. Dies erklärt die Schlüsselrolle von Antikörpern in der Entstehung venöser Thromben [351].

Welche Folgen hat dies für die Therapie? Die hier erlangten Erkenntnisse sind nicht nur für die Behandlung der oben erwähnten Erkrankungen von Bedeutung. Pharmakologisch werden zunehmend Antikörper, hier besonders der Klasse IgG, eingesetzt. Sie bieten den Vorteil eines sehr selektiven Therapieansatzes. Eine wichtige und schwerwiegende Nebenwirkung sind entstehende venöse und arterielle Thrombembolien [14, 19, 441]. Meist entstehen sie bereits während der Antikörper-Infusion, können jedoch auch bis acht Tage danach auftreten [14]. Zudem kann eine Dosisabhängigkeit festgestellt werden [19]. Pathophysiologisch spielt auch hier die Komplementaktivierung auf Thrombozyten eine zentrale Rolle [19]. Ein Beitrag von Fc-Rezeptoren konnte ausgeschlossen werden [19]. So ist es sehr wahrscheinlich, dass auch in diesem Fall eine Chondroitinsulfat-Fibrin-abhängige Antikörperbindung auf Thrombozyten stattfindet, welche die schwerwiegenden Nebenwirkungen erklären kann. Diese Erkenntnis bietet nun einen neuen therapeutischen Ansatz zur Behandlung und Prävention der venösen Thrombose. Eine pharmakologische Blockierung der Chondroitinsulfatoberfläche ist bisher noch nicht bekannt. Bereits in Anwendung sind jedoch entsprechende GPIIb/IIIa-blockierende Peptide und nicht-Peptide [401]. Mit der starken aggregationshemmenden Wirkung ist man bereits vertraut. Die bisherige Therapie zielte vor allem darauf ab die interzellulären Fibrinbrücken zu stören [398]. Nebenwirkungen wie Blutungsneigung, paradoxe Fibrinogenbindung und Thrombozytopenie führte zu Anwendungseinschränkungen auf Herzinfarktpatienten mit hoher Thrombuslast [442]. Neuere Entwicklungen wie GPIIb-selektive Rezeptorblocker sind jedoch vielversprechend [443]. Der Nutzen solcher Peptide und nicht-

Peptide in der venösen Thrombose wurde bereits bewiesen [427]. Eine niedrigdosierte Anwendung bei Hochrisikopatienten ist somit denkbar [442].

Ein weiterer vielversprechender Therapie- und Präventionsansatz ist die selektive Hemmung des Komplementsystems. In der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie konnten auf diese Weise bereits gute Erfolge erzielt werden [444, 445]. In der venösen Thrombose wäre ein C3-spezifischer Therapieansatz denkbar. Die Durchführbarkeit muss in zukünftigen Forschungsprojekten evaluiert werden.

Darüber hinaus konnten wir eine protektive Wirkung von Annexin V gegenüber der antikörpervermittelten Thrombozytenaktivierung erarbeiten. Eine Anwendung in der Therapie der venösen Thrombose muss ebenfalls in Studien getestet werden.

VII. Zusammenfassung

Die Entstehung der tiefen Venenthrombose ist ein komplexer Vorgang, der im Kern durch eine sterile Entzündung hervorgerufen wird. In dieser Arbeit konnten wir Antikörper-Thrombozyteninteraktionen als einen zentralen prothrombotischen Prozess in der Entwicklung venöser Thrombosen identifizieren. Getriggert durch die extrazelluläre Exposition von Chondroitinsulfat und Fibrin auf aktivierten Thrombozyten kommt es zur Ablagerung von Plasmabestandteilen auf der Zelloberfläche darunter auch IgG. Die unspezifische Interaktion mit den umliegenden Proteinen führt zur Konformationsänderung von IgG, das Fc-Ende wird freigegeben und die klassische Komplementkaskade kann ablaufen. Aktivierte Komplementkomponenten interagieren mit der Thrombozytenoberfläche und stellen dort einen zusätzlichen Aktivierungsreiz für die Zellen dar. Dies führt zu vermehrter Aggregation und ATP-Ausschüttung aus der intrazellulären Granula. ATP wiederum ist ein starker Aktivator von Thrombozyten. So entsteht ein Teufelskreis, der nur schwer durchbrochen werden kann. Die Komplementaktivierung auf Thrombozyten hat jedoch nicht nur Auswirkungen auf die Zellen selbst, auch Leukozyten werden hierdurch komplementvermittelt rekrutiert.

Diese Erkenntnis hat weitreichende Folgen für die zukünftige Therapie und Prävention der venösen Thrombose. Ein zentraler Mechanismus in der Thrombusentstehung ist die antikörpervermittelte Komplementaktivierung auf Thrombozyten. Neben dem natürlichen Vorkommen im Menschen werden Immunglobuline auch zunehmend therapeutisch beispielsweise zur Immunsuppression eingesetzt. Häufig wird hierbei die Aktivierung des Komplementsystems als Zusatzfunktion der Antikörper nicht benötigt. In diesen Fällen ist es ratsam, genetisch modifizierte Immunglobuline einzusetzen, durch die, ähnlich Fc-silent™, eine Komplementaktivierung nicht mehr stattfinden kann. Auf diese Weise kann die antikörpervermittelte Komplementaktivierung auf Thrombozyten vermieden werden. Dies wiederum wirkt sich positiv auf die Thromboserate aus. Plasmozytom- bzw. MGUS-Patienten, bei denen die körpereigene Antikörperproduktion gestört ist, könnte zukünftig über eine gezielte Hemmung des Komplementsystems (beispielsweise C3) geholfen werden. In besonders ausgeprägten Fällen der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie findet eine solche Therapie in ähnlicher Form bereits heute Anwendung. Die Möglichkeit einer noch selektiveren Hemmung, beispielsweise auf Höhe der Bindung von Antikörpern an Chondroitinsulfat, muss zukünftig evaluiert werden.

VIII. Summary

The development of venous thrombosis is a complex procedure involving sterile inflammation. This study is the first to show that antibody platelet interaction plays a central role in deep vein thrombus formation. A mixture of chondroitin sulfate and fibrin is responsible for adhesion of different plasma proteins including IgG on the surface of activated platelets. The unspecific interaction with surrounding proteins results in conformational change of IgG. This leads to activation of the complement cascade, which further stimulates platelet aggregation and ATP-secretion. ATP in turn is a strong activator of platelets leading to a vicious cycle. The activation of the complement cascade not only influences the function of platelets, it also leads to leucocyte recruitment. Leucocytes are already known to foster inflammation and thrombus formation.

This knowledge has far-reaching implications for future therapy and prevention of deep vein thrombosis. Antibody derived complement activation on platelets is a central mechanism in this process. Besides the natural existence of immunoglobulins, antibodies are increasingly used for therapeutic purposes, for example for immunosuppression. Frequently, the activation of the complement system as an additional feature of antibodies is not needed. In these cases, it is recommendable to use genetically modified antibodies similar to Fc-silent™, where the ability to activate the complement system is disrupted. In this way the antibody-mediated complement activation on the platelet surface can be avoided. This in turn has a positive effect on the thrombus rate. Patients suffering from plasmacytoma or MGUS produce high amounts of antibodies. In the future, inhibition of the complement system (for example C3) would be a selective tool to prevent thrombosis. Similar forms of treatment are already being applied for severe cases of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. The inhibition of antibody interaction with chondroitin sulfate on platelets would be an even more selective point of attack to cure and prevent deep vein thrombosis formation. This has to be evaluated in future studies.

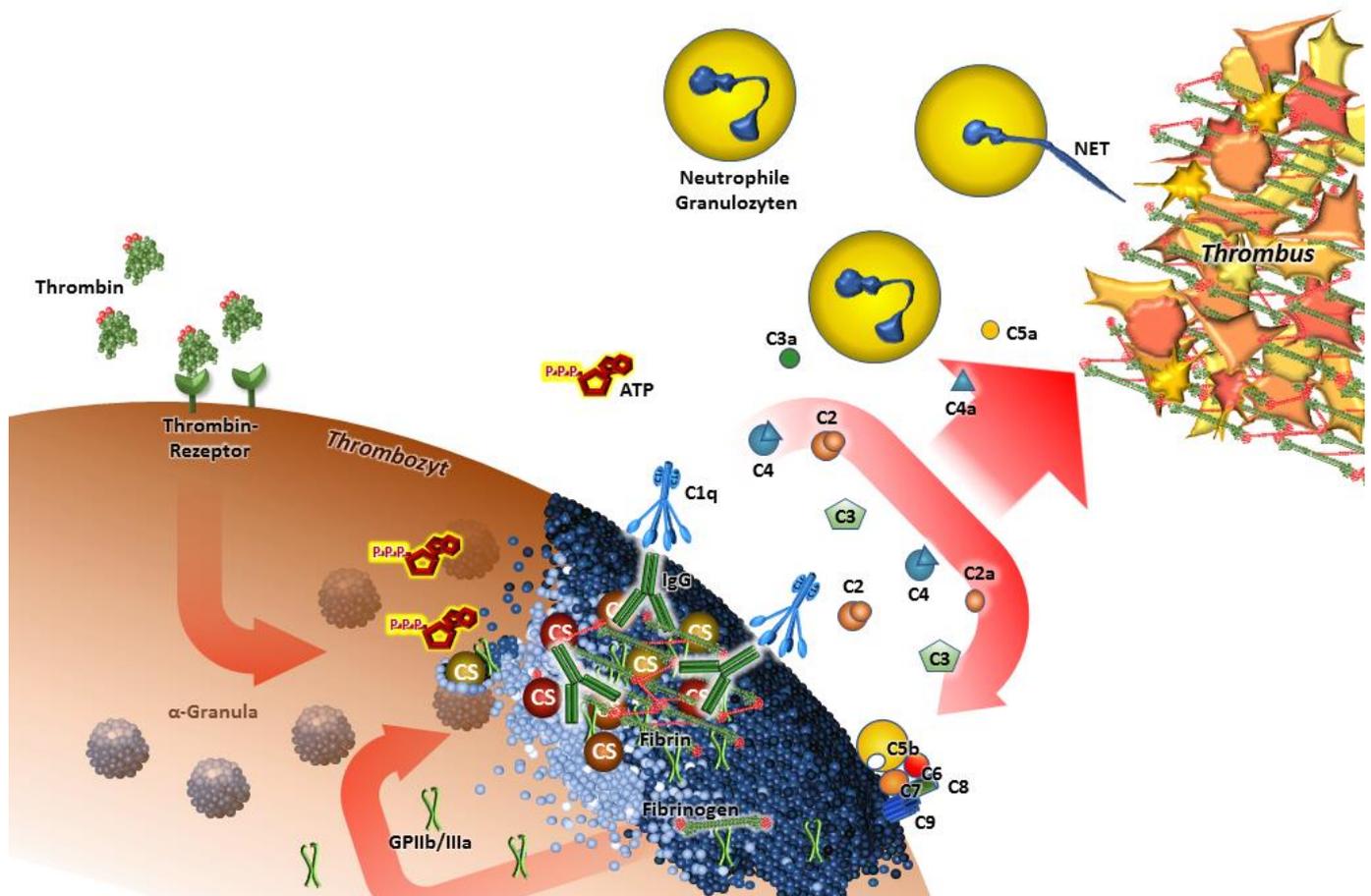


Abbildung 44: Zusammenfassung der Antikörper-Thrombozyten-Interaktion in der Entstehung der tiefen Venenthrombose

Nach initialer Aktivierung der Thrombozyten, beispielsweise durch Thrombin (links oben), kommt es zur Entleerung der α - und dichte Granula in den Extrazellularraum. Zusätzlich wird deren Phospholipidhülle in die Zellmembran eingebaut (blaue Kügelchen). Dadurch gelangt Chondroitinsulfat (CS) und Phosphatidylserin an die Thrombozytenoberfläche (mitte). Fibrinogen wird von GPIIb/IIIa gebunden. Die negative Ladung von Phosphatidylserin führt zur Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade. In der Folge entsteht Fibrin. Die Kombination aus Fibrin und Chondroitinsulfat stellt ein optimales Medium zur Adhäsion von Antikörpern dar. IgG vermittelt die Aktivierung der klassischen Komplementkaskade (mitte). Über sublytische MAC-Konzentrationen kommt es zu zusätzlicher Aktivierung der Thrombozyten (rechts unten). ATP/ADP aus der dichten Granula stimuliert nicht nur die Zelle selbst, sondern auch benachbarte Thrombozyten. Das Komplementsystem rekrutiert zusätzlich Leukozyten, welche gerinnungsfördernd wirken (oben mitte). In der Folge entsteht ein stabiler gefäßokkludierender Thrombus (ober rechts).

IX. Literaturverzeichnis

1. Kahn, S.R., et al., *Determinants of health-related quality of life during the 2 years following deep vein thrombosis*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(7): p. 1105-12.
2. Heit, J.A., *Epidemiology of venous thromboembolism*. Nat Rev Cardiol, 2015. **12**(8): p. 464-74.
3. Cohen, A.T., et al., *Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality*. Thromb Haemost, 2007. **98**(4): p. 756-64.
4. Heit, J.A., et al., *The epidemiology of venous thromboembolism in the community*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 452-63.
5. von Bruhl, M.L., et al., *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*. J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 819-35.
6. Schulz, C., B. Engelmann, and S. Massberg, *Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis*. J Thromb Haemost, 2013. **11 Suppl 1**: p. 233-41.
7. Chung, W.S., et al., *Systemic lupus erythematosus increases the risks of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a nationwide cohort study*. J Thromb Haemost, 2014. **12**(4): p. 452-8.
8. Willis, R. and S.S. Pierangeli, *Pathophysiology of the antiphospholipid antibody syndrome*. Auto Immun Highlights, 2011. **2**(2): p. 35-52.
9. Lood, C., et al., *Platelet activation and anti-phospholipid antibodies collaborate in the activation of the complement system on platelets in systemic lupus erythematosus*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99386.
10. Kristinsson, S.Y., et al., *Deep vein thrombosis after monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma*. Blood, 2008. **112**(9): p. 3582-6.
11. Kristinsson, S.Y., et al., *Arterial and venous thrombosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma: a population-based study*. Blood, 2010. **115**(24): p. 4991-8.
12. Cohen, A.L. and R. Sarid, *The relationship between monoclonal gammopathy of undetermined significance and venous thromboembolic disease*. Thromb Res, 2010. **125**(3): p. 216-9.
13. Sallah, S., et al., *The risk of venous thromboembolic disease in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance*. Ann Oncol, 2004. **15**(10): p. 1490-4.
14. Marie, I., et al., *Intravenous immunoglobulin-associated arterial and venous thrombosis; report of a series and review of the literature*. Br J Dermatol, 2006. **155**(4): p. 714-21.
15. Shimoni, Z., S. Bulvik, and M. Niveni, *Current clinical uses of intravenous immunoglobulin*. Clin Med (Lond), 2006. **6**(6): p. 621; author reply 621-2.
16. Hull, J.Z. and J.H. Hull, *Current clinical uses of intravenous immunoglobulin*. Clin Med (Lond), 2006. **6**(5): p. 507; author reply 507-8.
17. El-Shanawany, T., et al., *Current clinical uses of intravenous immunoglobulin*. Clin Med (Lond), 2006. **6**(4): p. 356-9.
18. Jolles, S., W.A. Sewell, and S.A. Misbah, *Clinical uses of intravenous immunoglobulin*. Clin Exp Immunol, 2005. **142**(1): p. 1-11.
19. Cumpelik, A., et al., *Mechanism of Platelet Activation and Hypercoagulability by Antithymocyte Globulins (ATG)*. Am J Transplant, 2015. **15**(10): p. 2588-601.
20. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 34-45.
21. Hughes, R.J., et al., *Frequency of venous thromboembolism in low to moderate risk long distance air travellers: the New Zealand Air Traveller's Thrombosis (NZATT) study*. Lancet, 2003. **362**(9401): p. 2039-44.
22. Wright, H.P., S.B. Osborn, and D.G. Edmonds, *Effect of postoperative bed rest and early ambulation on the rate of venous blood-flow*. Lancet, 1951. **1**(6645): p. 22-5.

23. Kahn, S.R., et al., *The postthrombotic syndrome: evidence-based prevention, diagnosis, and treatment strategies: a scientific statement from the American Heart Association*. *Circulation*, 2014. **130**(18): p. 1636-61.
24. E. Rabe, F.P.-F., K. Broman, K. Schuldt, A. Stang, Ch. Poncar, and E.B. M. Wittenhorst, S. Weber, K.-H. Jöckel, *Bonner Venenstudie der Deutschen Gesellschaft für Phlebologie. Epidemiologische Untersuchung zur Frage der Häufigkeit und Ausprägung von chronischen Venenkrankheiten in der städtischen und ländlichen Wohnbevölkerung*. *Phlebologie*, 2003(2003 (Vol. 32): Issue 1 2003 (1-28)): p. 1-14.
25. Rabinovich, A., J.M. Cohen, and S.R. Kahn, *Predictive value of markers of inflammation in the postthrombotic syndrome: a systematic review: inflammatory biomarkers and PTS*. *Thromb Res*, 2015. **136**(2): p. 289-97.
26. Pikovsky, O. and A. Rabinovich, *Prevention and treatment of the post-thrombotic syndrome*. *Thromb Res*, 2017.
27. Strandness, D.E., Jr., et al., *Long-term sequelae of acute venous thrombosis*. *JAMA*, 1983. **250**(10): p. 1289-92.
28. Eichlisberger R, W.M., Frauchiger B Widmer LK, Jäger K, *Zur Häufigkeit des postthrombotischen Syndroms*. *Wien Med Wschr*, 1994: p. 144: 192-195
29. Naess, I.A., et al., *Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(4): p. 692-9.
30. White, R.H., *The epidemiology of venous thromboembolism*. *Circulation*, 2003. **107**(23 Suppl 1): p. I4-8.
31. Heit, J.A., et al., *Predictors of survival after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based, cohort study*. *Arch Intern Med*, 1999. **159**(5): p. 445-53.
32. Pineda, L.A., V.S. Hathwar, and B.J. Grant, *Clinical suspicion of fatal pulmonary embolism*. *Chest*, 2001. **120**(3): p. 791-5.
33. Boc, A., et al., *Impact of Asymptomatic Pulmonary Embolism on the Long-Term Prognosis of Patients with Deep Venous Thrombosis*. *Semin Thromb Hemost*, 2017. **43**(1): p. 24-29.
34. Diehm, C., F. Stammeler, and K. Amendt, *Die tiefe Venenthrombose: Diagnostik und Therapie*. *Dtsch Arztebl International*, 1997. **94**(6): p. 301-.
35. *Prophylaxe der venösen Thromboembolie (VTE)*. *Vasa*, 2016. **45 Suppl 92**: p. 1-88.
36. Harris, W.H., et al., *Comparison of 125I fibrinogen count scanning with phlebography for detection of venous thrombi after elective hip surgery*. *N Engl J Med*, 1975. **292**(13): p. 665-7.
37. Hull, R., et al., *Clinical validity of a negative venogram in patients with clinically suspected venous thrombosis*. *Circulation*, 1981. **64**(3): p. 622-5.
38. Hirsh DR, I.E., Goldhaber SZ, *Prevalence of deep-vein thrombosis among patients in medical intensiv care*. *JAMA* 1995: p. 274: 335-337.
39. Huisman MV, B.H., ten Cate JW, Heijermans HS, van der Laan J, van Maanen DJ, *Management of clinical suspected acute venous thrombosis in outpatients with clinically suspected deep-vein thrombosis: clinical validity of negative findings*. *Ann Intern Med*, 1989: p. 149: 511-513
40. Andree, C., *Rudolf Virchow: Leben und Ethos eines grossen Arztes*. 2002: Langen Müller.
41. Doggen, C.J., F.R. Rosendaal, and J.C. Meijers, *Levels of intrinsic coagulation factors and the risk of myocardial infarction among men: Opposite and synergistic effects of factors XI and XII*. *Blood*, 2006. **108**(13): p. 4045-51.
42. Koster, T., et al., *Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis*. *Lancet*, 1995. **345**(8943): p. 152-5.
43. Rees, D.C., M. Cox, and J.B. Clegg, *World distribution of factor V Leiden*. *Lancet*, 1995. **346**(8983): p. 1133-4.
44. Rosendaal, F.R., et al., *Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant*. *Thromb Haemost*, 1998. **79**(4): p. 706-8.
45. Tait, R.C., et al., *Prevalence of protein C deficiency in the healthy population*. *Thromb Haemost*, 1995. **73**(1): p. 87-93.

46. Dykes, A.C., et al., *A study of Protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state*. Br J Haematol, 2001. **113**(3): p. 636-41.
47. Dalen, J.E., *Pulmonary embolism: what have we learned since Virchow? Natural history, pathophysiology, and diagnosis*. Chest, 2002. **122**(4): p. 1440-56.
48. Blom, J.W., et al., *Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(3): p. 529-35.
49. Thodiyil, P.A. and A.K. Kakkar, *Variation in relative risk of venous thromboembolism in different cancers*. Thromb Haemost, 2002. **87**(6): p. 1076-7.
50. Sallah, S., J.Y. Wan, and N.P. Nguyen, *Venous thrombosis in patients with solid tumors: determination of frequency and characteristics*. Thromb Haemost, 2002. **87**(4): p. 575-9.
51. Stein, P.D., et al., *Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer*. Am J Med, 2006. **119**(1): p. 60-8.
52. Levitan, N., et al., *Rates of initial and recurrent thromboembolic disease among patients with malignancy versus those without malignancy. Risk analysis using Medicare claims data*. Medicine (Baltimore), 1999. **78**(5): p. 285-91.
53. Smith, J.A., Jr., *Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis*. J Urol, 2005. **174**(4 Pt 1): p. 1300.
54. Khorana, A.A., *The NCCN Clinical Practice Guidelines on Venous Thromboembolic Disease: strategies for improving VTE prophylaxis in hospitalized cancer patients*. Oncologist, 2007. **12**(11): p. 1361-70.
55. Kemkes-Matthes, B., *Thrombose- und Thromboserezidiv-Prophylaxe bei Tumorpatienten*. vascular care, 2006. **10**: p. 14-18.
56. Roberts, D.E., A. McNicol, and R. Bose, *Mechanism of collagen activation in human platelets*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 19421-30.
57. Yin, Z., et al., *Ambient fine particles (PM2.5) attenuate collagen-induced platelet activation through interference of the PLCgamma2/Akt/GSK3beta signaling pathway*. Environ Toxicol, 2017. **32**(2): p. 530-540.
58. Wilcox, J.N., et al., *Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2839-43.
59. Chaudhry, R. and H.M. Babiker, *Physiology, Coagulation Pathways*, in *StatPearls*. 2018: Treasure Island (FL).
60. Schwartz, S.M., et al., *Plaque rupture in humans and mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(4): p. 705-13.
61. Davies, M.J., *Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995*. Circulation, 1996. **94**(8): p. 2013-20.
62. Kuipers, S., et al., *Travel and venous thrombosis: a systematic review*. J Intern Med, 2007. **262**(6): p. 615-34.
63. Stein, P.D., A. Beemath, and R.E. Olson, *Trends in the incidence of pulmonary embolism and deep venous thrombosis in hospitalized patients*. Am J Cardiol, 2005. **95**(12): p. 1525-6.
64. Samama, C.M., et al., *Venous thromboembolism prevention in surgery and obstetrics: clinical practice guidelines*. Eur J Anaesthesiol, 2006. **23**(2): p. 95-116.
65. Sevitt, S., *The structure and growth of valve-pocket thrombi in femoral veins*. J Clin Pathol, 1974. **27**(7): p. 517-28.
66. Aleman, M.M., et al., *Factor XIII activity mediates red blood cell retention in venous thrombi*. J Clin Invest, 2014. **124**(8): p. 3590-600.
67. Wakefield, T.W., et al., *Venous thrombosis-associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(2): p. 258-68.
68. Palta, S., R. Saroa, and A. Palta, *Overview of the coagulation system*. Indian J Anaesth, 2014. **58**(5): p. 515-23.
69. Rawlings, N.D., *Peptidase inhibitors in the MEROPS database*. Biochimie, 2010. **92**(11): p. 1463-83.

70. Rawlings, N.D., et al., *MEROPS: the peptidase database*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D320-5.
71. Oikonomopoulou, K., et al., *Interactions between coagulation and complement--their role in inflammation*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(1): p. 151-65.
72. Stark, K., et al., *Distinct Pathogenesis of Pancreatic Cancer Microvesicle-Associated Venous Thrombosis Identifies New Antithrombotic Targets In Vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018. **38**(4): p. 772-786.
73. Martin, D.M., C.W. Boys, and W. Ruf, *Tissue factor: molecular recognition and cofactor function*. FASEB J, 1995. **9**(10): p. 852-9.
74. Wolberg, A.S., et al., *Tissue factor de-encryption: ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1999. **10**(4): p. 201-10.
75. Mandal, S.K., et al., *Acute cholesterol depletion impairs functional expression of tissue factor in fibroblasts: modulation of tissue factor activity by membrane cholesterol*. Blood, 2005. **105**(1): p. 153-60.
76. Popescu, N.I., C. Lupu, and F. Lupu, *Role of PDI in regulating tissue factor: FVIIa activity*. Thromb Res, 2010. **125 Suppl 1**: p. S38-41.
77. Mackman, N., R.E. Tilley, and N.S. Key, *Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(8): p. 1687-93.
78. Bode, M. and N. Mackman, *Regulation of tissue factor gene expression in monocytes and endothelial cells: Thromboxane A2 as a new player*. Vascul Pharmacol, 2014. **62**(2): p. 57-62.
79. Mackman, N., *Regulation of tissue factor gene expression in human monocytic and endothelial cells*. Haemostasis, 1996. **26 Suppl 1**: p. 17-9.
80. Drake, T.A., et al., *Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal Escherichia coli sepsis*. Am J Pathol, 1993. **142**(5): p. 1458-70.
81. Mackman, N., *Regulation of the tissue factor gene*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 747-54.
82. Kornberg, A., et al., *Induction of tissue factor-like activity in monocytes by anti-cardiolipin antibodies*. J Immunol, 1994. **153**(3): p. 1328-32.
83. Hasselaar, P., et al., *Synergistic effect of low doses of tumor necrosis factor and sera from patients with systemic lupus erythematosus on the expression of procoagulant activity by cultured endothelial cells*. Thromb Haemost, 1989. **62**(2): p. 654-60.
84. Fei, H., et al., *Regulation of endothelial cell tissue factor expression by minimally oxidized LDL and lipopolysaccharide*. Arterioscler Thromb, 1993. **13**(11): p. 1711-7.
85. Ritis, K., et al., *A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4794-802.
86. Mezzano, D., et al., *Tissue factor storage, synthesis and function in normal and activated human platelets*. Thromb Res, 2008. **122 Suppl 1**: p. S31-6.
87. Camera, M., et al., *Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(9): p. 1690-6.
88. Panes, O., et al., *Human platelets synthesize and express functional tissue factor*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5242-50.
89. Wu, Y., *Contact pathway of coagulation and inflammation*. Thromb J, 2015. **13**: p. 17.
90. Mitropoulos, K.A., *The levels of factor XIIIa generated in human plasma on an electronegative surface are insensitive to wide variation in the concentration of FXII, prekallikrein, high molecular weight kininogen or FXI*. Thromb Haemost, 1999. **82**(3): p. 1033-40.
91. Colman, R.W. and A.H. Schmaier, *Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes*. Blood, 1997. **90**(10): p. 3819-43.
92. Vogler, E.A. and C.A. Siedlecki, *Contact activation of blood-plasma coagulation*. Biomaterials, 2009. **30**(10): p. 1857-69.
93. Masys, D.R., S.P. Bajaj, and S.I. Rapaport, *Activation of human factor VII by activated factors IX and X*. Blood, 1982. **60**(5): p. 1143-50.

94. Mitropoulos, K.A., et al., *The relationship between factor VII coagulant activity and factor XII activation induced in plasma by endogenous or exogenously added contact surface*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1993. **4**(2): p. 223-34.
95. Jagadeeswaran, P., et al., *Animal Models of Thrombosis From Zebrafish to Nonhuman Primates: Use in the Elucidation of New Pathologic Pathways and the Development of Antithrombotic Drugs*. Circ Res, 2016. **118**(9): p. 1363-79.
96. Ratnoff, O.D. and J.E. Colopy, *A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma*. J Clin Invest, 1955. **34**(4): p. 602-13.
97. Clausen, N., et al., *Similar bleeding phenotype in young children with haemophilia A or B: a cohort study*. Haemophilia, 2014. **20**(6): p. 747-55.
98. Buller, H.R., et al., *Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis*. N Engl J Med, 2015. **372**(3): p. 232-40.
99. Cheng, Q., et al., *A role for factor XIIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo*. Blood, 2010. **116**(19): p. 3981-9.
100. Kleinschnitz, C., et al., *Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 513-8.
101. Salomon, O., et al., *Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4113-7.
102. Konings, J., et al., *Factor XIIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin*. Blood, 2011. **118**(14): p. 3942-51.
103. Lord, S.T., *Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis*. Curr Opin Hematol, 2007. **14**(3): p. 236-41.
104. Thorelli, E., R.J. Kaufman, and B. Dahlback, *Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and the expression of anticoagulant activity of factor V*. Blood, 1999. **93**(8): p. 2552-8.
105. Jesty, J., et al., *Initiation of the tissue factor pathway of coagulation in the presence of heparin: control by antithrombin III and tissue factor pathway inhibitor*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2301-7.
106. Crawley, J.T. and D.A. Lane, *The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(2): p. 233-42.
107. Ahamed, J., M. Belting, and W. Ruf, *Regulation of tissue factor-induced signaling by endogenous and recombinant tissue factor pathway inhibitor 1*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2384-91.
108. van Boven, H.H. and D.A. Lane, *Antithrombin and its inherited deficiency states*. Semin Hematol, 1997. **34**(3): p. 188-204.
109. Machlus, K.R. and J.E. Italiano, Jr., *The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation*. J Cell Biol, 2013. **201**(6): p. 785-96.
110. Kaushansky, K., *Lineage-specific hematopoietic growth factors*. N Engl J Med, 2006. **354**(19): p. 2034-45.
111. Rowley, J.W., H. Schwertz, and A.S. Weyrich, *Platelet mRNA: the meaning behind the message*. Curr Opin Hematol, 2012. **19**(5): p. 385-91.
112. Denis, M.M., et al., *Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets*. Cell, 2005. **122**(3): p. 379-91.
113. Semple, J.W., J.E. Italiano, Jr., and J. Freedman, *Platelets and the immune continuum*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 264-74.
114. Whiteheart, S.W., *Platelet granules: surprise packages*. Blood, 2011. **118**(5): p. 1190-1.
115. White, J.G., *Platelet secretory granules and associated proteins*. Lab Invest, 1993. **68**(5): p. 497-8.
116. Ciferri, S., et al., *Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation*. Thromb Haemost, 2000. **83**(1): p. 157-64.
117. Thomas, M.R. and R.F. Storey, *The role of platelets in inflammation*. Thromb Haemost, 2015. **114**(3): p. 449-58.

118. Schwertz, H., et al., *Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets*. J Exp Med, 2006. **203**(11): p. 2433-40.
119. Subramaniam, S., et al., *Distinct contributions of complement factors to platelet activation and fibrin formation in venous thrombus development*. Blood, 2017.
120. Schulz, C. and S. Massberg, *Platelets in atherosclerosis and thrombosis*. Handb Exp Pharmacol, 2012(210): p. 111-33.
121. Lievens, D. and P. von Hundelshausen, *Platelets in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2011. **106**(5): p. 827-38.
122. Huo, Y. and K.F. Ley, *Role of platelets in the development of atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med, 2004. **14**(1): p. 18-22.
123. Watson, H.G. and Y.L. Chee, *Aspirin and other antiplatelet drugs in the prevention of venous thromboembolism*. Blood Rev, 2008. **22**(2): p. 107-16.
124. Undas, A., K. Brummel-Ziedins, and K.G. Mann, *Why does aspirin decrease the risk of venous thromboembolism? On old and novel antithrombotic effects of acetyl salicylic acid*. J Thromb Haemost, 2014. **12**(11): p. 1776-87.
125. Mekaj, Y.H., F.T. Daci, and A.Y. Mekaj, *New insights into the mechanisms of action of aspirin and its use in the prevention and treatment of arterial and venous thromboembolism*. Ther Clin Risk Manag, 2015. **11**: p. 1449-56.
126. Geerts, W.H., et al., *Prevention of venous thromboembolism: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)*. Chest, 2008. **133**(6 Suppl): p. 381S-453S.
127. Brighton, T.A., et al., *Low-dose aspirin for preventing recurrent venous thromboembolism*. N Engl J Med, 2012. **367**(21): p. 1979-87.
128. Falck-Ytter, Y., et al., *Prevention of VTE in orthopedic surgery patients: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*. Chest, 2012. **141**(2 Suppl): p. e278S-325S.
129. Gould, M.K., et al., *Prevention of VTE in nonorthopedic surgical patients: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*. Chest, 2012. **141**(2 Suppl): p. e227S-77S.
130. Kahn, S.R., et al., *Prevention of VTE in nonsurgical patients: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*. Chest, 2012. **141**(2 Suppl): p. e195S-226S.
131. Brill, A., et al., *von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models*. Blood, 2011. **117**(4): p. 1400-7.
132. Simon, D.I., et al., *Platelet glycoprotein Ibalpha is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 193-204.
133. Wang, Y., et al., *Leukocyte engagement of platelet glycoprotein Ibalpha via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury*. Circulation, 2005. **112**(19): p. 2993-3000.
134. Ott, I., et al., *Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina*. Circulation, 1996. **94**(6): p. 1239-46.
135. Furman, M.I., et al., *Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(2): p. 352-8.
136. Wang, Y., et al., *Leukocyte integrin Mac-1 regulates thrombosis via interaction with platelet GPIbalpha*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15559.
137. Zuchriegel, G., et al., *Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation*. PLoS Biol, 2016. **14**(5): p. e1002459.
138. Ostrovsky, L., et al., *A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process*. Blood, 1998. **91**(8): p. 3028-36.
139. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.

140. Urban, C.F., et al., *Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms*. Cell Microbiol, 2006. **8**(4): p. 668-76.
141. Reinhardt, C., et al., *Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 1110-22.
142. Hoffmann, J.A., *The immune response of Drosophila*. Nature, 2003. **426**(6962): p. 33-8.
143. Tzou, P., E. De Gregorio, and B. Lemaitre, *How Drosophila combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions*. Curr Opin Microbiol, 2002. **5**(1): p. 102-10.
144. Iwanaga, S., *The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(1): p. 87-95.
145. Muta, T. and S. Iwanaga, *The role of hemolymph coagulation in innate immunity*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(1): p. 41-7.
146. McEver, R.P., et al., *GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies*. J Clin Invest, 1989. **84**(1): p. 92-9.
147. Hamer, J.D., P.C. Malone, and I.A. Silver, *The PO2 in venous valve pockets: its possible bearing on thrombogenesis*. Br J Surg, 1981. **68**(3): p. 166-70.
148. Maynard, J.R., et al., *Association of tissue factor activity with the surface of cultured cells*. J Clin Invest, 1975. **55**(4): p. 814-24.
149. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
150. Furie, B. and B.C. Furie, *In vivo thrombus formation*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: p. 12-7.
151. Manly, D.A., J. Boles, and N. Mackman, *Role of tissue factor in venous thrombosis*. Annu Rev Physiol, 2011. **73**: p. 515-25.
152. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
153. Glaser, C.B., et al., *Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity. A potential rapid mechanism for modulation of coagulation*. J Clin Invest, 1992. **90**(6): p. 2565-73.
154. Massberg, S., et al., *Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases*. Nat Med, 2010. **16**(8): p. 887-96.
155. Bennett, T.A., et al., *Sulfhydryl regulation of L-selectin shedding: phenylarsine oxide promotes activation-independent L-selectin shedding from leukocytes*. J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4120-9.
156. Wan, S.W., et al., *Endothelial cell surface expression of protein disulfide isomerase activates beta1 and beta3 integrins and facilitates dengue virus infection*. J Cell Biochem, 2012. **113**(5): p. 1681-91.
157. Fuchs, T.A., A.A. Bhandari, and D.D. Wagner, *Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice*. Blood, 2011. **118**(13): p. 3708-14.
158. Burns, C.A., J.L. Ebersole, and M.R. Allansmith, *Immunoglobulin A antibody levels in human tears, saliva, and serum*. Infect Immun, 1982. **36**(3): p. 1019-22.
159. Brandtzaeg, P., *Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity?* Ann N Y Acad Sci, 2007. **1098**: p. 288-311.
160. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
161. Elgert, K.D., *Immunology: Understanding The Immune System*. 2009: Wiley.
162. Treanor, B., *B-cell receptor: from resting state to activate*. Immunology, 2012. **136**(1): p. 21-7.
163. Arata, Y., *[Structure and function of immunoglobulins]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1986. **31**(9 Suppl): p. 782-97.
164. Foote, J. and G. Winter, *Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops*. J Mol Biol, 1992. **224**(2): p. 487-99.

165. Rudin, C.M. and C.B. Thompson, *B-cell development and maturation*. Semin Oncol, 1998. **25**(4): p. 435-46.
166. Aiba, Y., et al., *Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12192-7.
167. Gellert, M., *V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 101-32.
168. Papavasiliou, F., et al., *V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses*. Science, 1997. **278**(5336): p. 298-301.
169. Hozumi, N. and S. Tonegawa, *Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(10): p. 3628-32.
170. Stavnezer, J., J.E. Guikema, and C.E. Schrader, *Mechanism and regulation of class switch recombination*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 261-92.
171. Eisen, H.N., *Affinity enhancement of antibodies: how low-affinity antibodies produced early in immune responses are followed by high-affinity antibodies later and in memory B-cell responses*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(5): p. 381-92.
172. Peled, J.U., et al., *The biochemistry of somatic hypermutation*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 481-511.
173. Tiller, K.E., et al., *Arginine mutations in antibody complementarity-determining regions display context-dependent affinity/specificity trade-offs*. J Biol Chem, 2017. **292**(40): p. 16638-16652.
174. Reverberi, R. and L. Reverberi, *Factors affecting the antigen-antibody reaction*. Blood Transfus, 2007. **5**(4): p. 227-40.
175. Murphy, K.M., Travers, Paul, Walport, Mark *Janeway Immunologie*. Springer Spektrum, 2009.
176. Rink, L., et al., *Immunologie für Einsteiger*. 2015: Springer Berlin Heidelberg.
177. Brown, J.C. and M.E. Koshland, *Activation of antibody Fc function by antigen-induced conformational changes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(12): p. 5111-5.
178. Sagawa, T., et al., *Conformational changes in the antibody constant domains upon hapten-binding*. Mol Immunol, 2005. **42**(1): p. 9-18.
179. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fc-receptors as regulators of immunity*. Adv Immunol, 2007. **96**: p. 179-204.
180. Wines, B.D., et al., *The IgG Fc contains distinct Fc receptor (FcR) binding sites: the leukocyte receptors Fc gamma RI and Fc gamma RIIa bind to a region in the Fc distinct from that recognized by neonatal FcR and protein A*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 5313-8.
181. Alberts B, J.A., Lewis J, *B Cells and Antibodies*. Molecular Biology of the Cell. 4th edition., 2002.
182. Janeway CA Jr, T.P., Walport M, et al., *The distribution and functions of immunoglobulin isotypes*. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition., 2001.
183. Mankarious, S., et al., *The half-lives of IgG subclasses and specific antibodies in patients with primary immunodeficiency who are receiving intravenously administered immunoglobulin*. J Lab Clin Med, 1988. **112**(5): p. 634-40.
184. Nagelkerke, S.Q. and T.W. Kuijpers, *Immunomodulation by IVIg and the Role of Fc-Gamma Receptors: Classic Mechanisms of Action after all?* Front Immunol, 2014. **5**: p. 674.
185. Sewell, W.A. and S. Jolles, *Immunomodulatory action of intravenous immunoglobulin*. Immunology, 2002. **107**(4): p. 387-93.
186. Galli, S.J. and M. Tsai, *IgE and mast cells in allergic disease*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 693-704.
187. LeBien, T.W. and T.F. Tedder, *B lymphocytes: how they develop and function*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1570-80.
188. Goodnow, C.C., S. Adelstein, and A. Basten, *The need for central and peripheral tolerance in the B cell repertoire*. Science, 1990. **248**(4961): p. 1373-9.
189. Loder, F., et al., *B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals*. J Exp Med, 1999. **190**(1): p. 75-89.

190. McHeyzer-Williams, L.J. and M.G. McHeyzer-Williams, *Antigen-specific memory B cell development*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 487-513.
191. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 741-50.
192. Rothstein, T.L., et al., *B-1 Cell Development and Function*. *Ann N Y Acad Sci*, 2015. **1362**: p. v-vi.
193. Cerutti, A., M. Cols, and I. Puga, *Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(2): p. 118-32.
194. Zouali, M. and Y. Richard, *Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity*. *Front Immunol*, 2011. **2**: p. 63.
195. Kretschmer, K., et al., *The selection of marginal zone B cells differs from that of B-1a cells*. *J Immunol*, 2003. **171**(12): p. 6495-501.
196. Baumgarth, N., *B-1 Cell Heterogeneity and the Regulation of Natural and Antigen-Induced IgM Production*. *Front Immunol*, 2016. **7**: p. 324.
197. Rothstein, T.L., et al., *Human B-1 cells take the stage*. *Ann N Y Acad Sci*, 2013. **1285**: p. 97-114.
198. Ehrenstein, M.R. and C.A. Notley, *The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(11): p. 778-86.
199. Holodick, N.E., N. Rodriguez-Zhurbenko, and A.M. Hernandez, *Defining Natural Antibodies*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 872.
200. Hardy, R.R., *B-1 B cell development*. *J Immunol*, 2006. **177**(5): p. 2749-54.
201. Haas, K.M., et al., *B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to S. pneumoniae*. *Immunity*, 2005. **23**(1): p. 7-18.
202. Reid, R.R., et al., *Functional activity of natural antibody is altered in Cr2-deficient mice*. *J Immunol*, 2002. **169**(10): p. 5433-40.
203. Baumgarth, N., J.W. Tung, and L.A. Herzenberg, *Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion*. *Springer Semin Immunopathol*, 2005. **26**(4): p. 347-62.
204. Lopes-Carvalho, T. and J.F. Kearney, *Development and selection of marginal zone B cells*. *Immunol Rev*, 2004. **197**: p. 192-205.
205. Martin, F. and J.F. Kearney, *B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory"*. *Immunol Rev*, 2000. **175**: p. 70-9.
206. Martin, F., A.M. Oliver, and J.F. Kearney, *Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens*. *Immunity*, 2001. **14**(5): p. 617-29.
207. Martin, F. and J.F. Kearney, *Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk*. *Immunity*, 2000. **12**(1): p. 39-49.
208. Baumgarth, N., et al., *Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5): p. 2250-5.
209. Gronwall, C., J. Vas, and G.J. Silverman, *Protective Roles of Natural IgM Antibodies*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 66.
210. Haury, M., et al., *The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(6): p. 1557-63.
211. Hashimoto, K., et al., *Germfree mice reared on an "antigen-free" diet*. *Lab Anim Sci*, 1978. **28**(1): p. 38-45.
212. Reynes, M., et al., *Human follicular dendritic cells express CR1, CR2, and CR3 complement receptor antigens*. *J Immunol*, 1985. **135**(4): p. 2687-94.
213. Lyubchenko, T., et al., *Coligation of the B cell receptor with complement receptor type 2 (CR2/CD21) using its natural ligand C3dg: activation without engagement of an inhibitory signaling pathway*. *J Immunol*, 2005. **174**(6): p. 3264-72.

214. Dempsey, P.W., et al., *C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity*. Science, 1996. **271**(5247): p. 348-50.
215. Botto, M. and M.J. Walport, *C1q, autoimmunity and apoptosis*. Immunobiology, 2002. **205**(4-5): p. 395-406.
216. Holers, V.M., *Complement receptors and the shaping of the natural antibody repertoire*. Springer Semin Immunopathol, 2005. **26**(4): p. 405-23.
217. Molina, H., et al., *Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3357-61.
218. Haas, K.M., et al., *Complement receptors CD21/35 link innate and protective immunity during Streptococcus pneumoniae infection by regulating IgG3 antibody responses*. Immunity, 2002. **17**(6): p. 713-23.
219. Ahearn, J.M., et al., *Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 251-62.
220. Rickert, R.C., *Regulation of B lymphocyte activation by complement C3 and the B cell coreceptor complex*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 237-43.
221. Carey, J.B., et al., *Repertoire-based selection into the marginal zone compartment during B cell development*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 2043-52.
222. Briles, D.E., et al., *Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 streptococcus pneumoniae*. J Exp Med, 1981. **153**(3): p. 694-705.
223. Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel, *B-cell biology and development*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(4): p. 959-71.
224. Lu, L.L., et al., *Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(1): p. 46-61.
225. Kim, S.J., et al., *I-PLA(2) activation during apoptosis promotes the exposure of membrane lysophosphatidylcholine leading to binding by natural immunoglobulin M antibodies and complement activation*. J Exp Med, 2002. **196**(5): p. 655-65.
226. Chen, Y., et al., *IgM antibodies to apoptosis-associated determinants recruit C1q and enhance dendritic cell phagocytosis of apoptotic cells*. J Immunol, 2009. **182**(10): p. 6031-43.
227. Cox, K.O. and S.J. Hardy, *Autoantibodies against mouse bromelain-modified RBC are specifically inhibited by a common membrane phospholipid, phosphatidylcholine*. Immunology, 1985. **55**(2): p. 263-9.
228. Hardy, R.R. and K. Hayakawa, *Development of B cells producing natural autoantibodies to thymocytes and senescent erythrocytes*. Springer Semin Immunopathol, 2005. **26**(4): p. 363-75.
229. Peng, Y., et al., *The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells*. Mol Immunol, 2005. **42**(7): p. 781-7.
230. Chou, M.Y., et al., *Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans*. J Clin Invest, 2009. **119**(5): p. 1335-49.
231. Quartier, P., et al., *Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro*. Eur J Immunol, 2005. **35**(1): p. 252-60.
232. Ehrenstein, M.R., H.T. Cook, and M.S. Neuberger, *Deficiency in serum immunoglobulin (Ig)M predisposes to development of IgG autoantibodies*. J Exp Med, 2000. **191**(7): p. 1253-8.
233. Boes, M., et al., *Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1184-9.
234. Senaldi, G., et al., *IgM reduction in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(9): p. 1213.
235. Fleming, S.D., et al., *Mice deficient in complement receptors 1 and 2 lack a tissue injury-inducing subset of the natural antibody repertoire*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 2126-33.
236. Zhang, M., et al., *Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(11): p. 3886-91.

237. Zhang, M., et al., *Identification of the target self-antigens in reperfusion injury*. J Exp Med, 2006. **203**(1): p. 141-52.
238. Kulik, L., et al., *Pathogenic natural antibodies recognizing annexin IV are required to develop intestinal ischemia-reperfusion injury*. J Immunol, 2009. **182**(9): p. 5363-73.
239. Gorsuch, W.B., et al., *The complement system in ischemia-reperfusion injuries*. Immunobiology, 2012. **217**(11): p. 1026-33.
240. Yasuda, M., et al., *The complement system in ischemic heart disease*. Circulation, 1990. **81**(1): p. 156-63.
241. Arumugam, T.V., et al., *The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury*. Shock, 2004. **21**(5): p. 401-9.
242. Weiser, M.R., et al., *Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement*. J Exp Med, 1996. **183**(5): p. 2343-8.
243. Ogawa, S., et al., *Hypoxia induces endothelial cell synthesis of membrane-associated proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9897-901.
244. Pope, M.R., et al., *Small beta2-glycoprotein I peptides protect from intestinal ischemia reperfusion injury*. J Immunol, 2012. **189**(10): p. 5047-56.
245. Elvington, A., et al., *Pathogenic natural antibodies propagate cerebral injury following ischemic stroke in mice*. J Immunol, 2012. **188**(3): p. 1460-8.
246. Atkinson, C., et al., *Targeting pathogenic postischemic self-recognition by natural IgM to protect against posttransplantation cardiac reperfusion injury*. Circulation, 2015. **131**(13): p. 1171-80.
247. Haas, M.S., et al., *Blockade of self-reactive IgM significantly reduces injury in a murine model of acute myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(4): p. 618-27.
248. Weyrich, A.S., S. Lindemann, and G.A. Zimmerman, *The evolving role of platelets in inflammation*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(9): p. 1897-905.
249. Lindmark, E., T. Tenno, and A. Siegbahn, *Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocyte tissue factor expression*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(10): p. 2322-8.
250. Takeya, H., et al., *Synergistic effect of sphingosine 1-phosphate on thrombin-induced tissue factor expression in endothelial cells*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1693-700.
251. Lefebvre, J.S., et al., *Toll-like receptor ligands induce polymorphonuclear leukocyte migration: key roles for leukotriene B4 and platelet-activating factor*. FASEB J, 2010. **24**(2): p. 637-47.
252. Rosenfeld, S.I., et al., *Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G. Identification as a 40,000-molecular-weight membrane protein shared by monocytes*. J Clin Invest, 1985. **76**(6): p. 2317-22.
253. Arman, M. and K. Krauel, *Human platelet IgG Fc receptor FcgammaRIIA in immunity and thrombosis*. J Thromb Haemost, 2015. **13**(6): p. 893-908.
254. Kang, J., et al., *Membrane glycoproteins and platelet cytoskeleton in immune complex-induced platelet activation*. Blood, 1993. **81**(6): p. 1505-12.
255. Antczak, A.J., et al., *IgG-complex stimulated platelets: a source of sCD40L and RANTES in initiation of inflammatory cascade*. Cell Immunol, 2010. **263**(1): p. 129-33.
256. Boilard, E., et al., *Influenza virus H1N1 activates platelets through FcgammaRIIA signaling and thrombin generation*. Blood, 2014. **123**(18): p. 2854-63.
257. Pfueller, S.L. and L.J. Cosgrove, *Activation of human platelets in PRP via their Fc-receptor by antigen-antibody complexes or immunoglobulin G: requirement for particle-bound fibrinogen*. Thromb Res, 1980. **20**(1): p. 97-108.
258. Rollin, J., C. Pouplard, and Y. Gruel, *Risk factors for heparin-induced thrombocytopenia: Focus on Fcgamma receptors*. Thromb Haemost, 2016. **116**(5): p. 799-805.
259. Prechel, M.M. and J.M. Walenga, *Emphasis on the Role of PF4 in the Incidence, Pathophysiology and Treatment of Heparin Induced Thrombocytopenia*. Thromb J, 2013. **11**(1): p. 7.
260. Linkins, L.A., et al., *Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest*

- Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*. Chest, 2012. **141**(2 Suppl): p. e495S-e530S.
261. Watson, H., et al., *Guidelines on the diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia: second edition*. Br J Haematol, 2012. **159**(5): p. 528-40.
262. Arnold, D.M., et al., *Approach to the diagnosis and management of drug-induced immune thrombocytopenia*. Transfus Med Rev, 2013. **27**(3): p. 137-45.
263. Sakr, Y., *Heparin-induced thrombocytopenia in the ICU: an overview*. Crit Care, 2011. **15**(2): p. 211.
264. Zinkovskiy, D.A. and M.S. Antonopoulos, *Heparin-induced thrombocytopenia: overview and treatment*. P T, 2008. **33**(11): p. 642-51.
265. Lee, G.M. and G.M. Arepally, *Heparin-induced thrombocytopenia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2013. **2013**: p. 668-74.
266. Bakchoul, T., *An update on heparin-induced thrombocytopenia: diagnosis and management*. Expert Opin Drug Saf, 2016. **15**(6): p. 787-97.
267. De Reys, S., et al., *Human platelet aggregation by murine monoclonal antiplatelet antibodies is subtype-dependent*. Blood, 1993. **81**(7): p. 1792-800.
268. Tomiyama, Y., et al., *Response of human platelets to activating monoclonal antibodies: importance of Fc gamma RII (CD32) phenotype and level of expression*. Blood, 1992. **80**(9): p. 2261-8.
269. Bazzan, M., A. Vaccarino, and F. Marletto, *Systemic lupus erythematosus and thrombosis*. Thromb J, 2015. **13**: p. 16.
270. Avina-Zubieta, J.A., et al., *The risk of pulmonary embolism and deep venous thrombosis in systemic lupus erythematosus: A general population-based study*. Semin Arthritis Rheum, 2015. **45**(2): p. 195-201.
271. Betts, N.A., K.D. Ahuja, and M.J. Adams, *Anti-beta2GP1 antibodies have variable effects on platelet aggregation*. Pathology, 2013. **45**(2): p. 155-61.
272. Wiener, H.M., N. Vardinon, and I. Yust, *Platelet antibody binding and spontaneous aggregation in 21 lupus anticoagulant patients*. Vox Sang, 1991. **61**(2): p. 111-21.
273. Lin, Y.L. and C.T. Wang, *Activation of human platelets by the rabbit anticardiolipin antibodies*. Blood, 1992. **80**(12): p. 3135-43.
274. Wang, L., et al., *Enhancement of human platelet activation by the combination of low concentrations of collagen and rabbit anticardiolipin antibodies*. Br J Haematol, 2002. **118**(4): p. 1152-62.
275. Vega-Ostertag, M., E.N. Harris, and S.S. Pierangeli, *Intracellular events in platelet activation induced by antiphospholipid antibodies in the presence of low doses of thrombin*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(9): p. 2911-9.
276. Jonsson, G., et al., *Rheumatological manifestations, organ damage and autoimmunity in hereditary C2 deficiency*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(7): p. 1133-9.
277. Peerschke, E.I., et al., *Blood platelets activate the classical pathway of human complement*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(9): p. 2035-42.
278. Del Conde, I., et al., *Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system*. J Exp Med, 2005. **201**(6): p. 871-9.
279. Hamad, O.A., et al., *Contribution of chondroitin sulfate A to the binding of complement proteins to activated platelets*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12889.
280. Kolev, M., G. Le Friec, and C. Kemper, *Complement--tapping into new sites and effector systems*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(12): p. 811-20.
281. Brodsky, R.A., *Complement in health and disease*. Hematol Oncol Clin North Am, 2015. **29**(3): p. xi.
282. Ricklin, D., et al., *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis*. Nat Immunol, 2010. **11**(9): p. 785-97.
283. Tegla, C.A., et al., *Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes*. Immunol Res, 2011. **51**(1): p. 45-60.

284. Carroll, M.V. and R.B. Sim, *Complement in health and disease*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(12): p. 965-75.
285. Cooper, N.R., *The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component*. Adv Immunol, 1985. **37**: p. 151-216.
286. Gal, P. and G. Ambrus, *Structure and function of complement activating enzyme complexes: C1 and MBL-MASPs*. Curr Protein Pept Sci, 2001. **2**(1): p. 43-59.
287. Hughes-Jones, N.C. and B. Gardner, *Reaction between the isolated globular sub-units of the complement component C1q and IgG-complexes*. Mol Immunol, 1979. **16**(9): p. 697-701.
288. Sim, R.B. and R. Malhotra, *Interactions of carbohydrates and lectins with complement*. Biochem Soc Trans, 1994. **22**(1): p. 106-11.
289. Kang, Y.H., et al., *Target pattern recognition by complement proteins of the classical and alternative pathways*. Adv Exp Med Biol, 2009. **653**: p. 117-28.
290. Nauta, A.J., et al., *Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells*. Eur J Immunol, 2003. **33**(10): p. 2853-63.
291. Ramm, L.E., M.B. Whitlow, and M.M. Mayer, *Size of the transmembrane channels produced by complement proteins C5b-8*. J Immunol, 1982. **129**(3): p. 1143-6.
292. Papadimitriou, J.C., et al., *Quantitative analysis of adenine nucleotides during the prelytic phase of cell death mediated by C5b-9*. J Immunol, 1991. **147**(1): p. 212-7.
293. Triantafilou, K., et al., *The complement membrane attack complex triggers intracellular Ca²⁺ fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 13): p. 2903-13.
294. Ohanian, S.H. and S.I. Schlager, *Humoral immune killing of nucleated cells: mechanisms of complement-mediated attack and target cell defense*. Crit Rev Immunol, 1981. **1**(3): p. 165-209.
295. Ramm, L.E., et al., *Elimination of complement channels from the plasma membranes of U937, a nucleated mammalian cell line: temperature dependence of the elimination rate*. J Immunol, 1983. **131**(3): p. 1411-5.
296. Koski, C.L., et al., *Cytolysis of nucleated cells by complement: cell death displays multi-hit characteristics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(12): p. 3816-20.
297. Zipfel, P.F. and C. Skerka, *Complement regulators and inhibitory proteins*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 729-40.
298. Flierman, R. and M.R. Daha, *The clearance of apoptotic cells by complement*. Immunobiology, 2007. **212**(4-5): p. 363-70.
299. Hugli, T.E., *Biochemistry and biology of anaphylatoxins*. Complement, 1986. **3**(3): p. 111-27.
300. Roozendaal, R. and M.C. Carroll, *Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity*. Immunol Rev, 2007. **219**: p. 157-66.
301. Carroll, M.C., *Complement and humoral immunity*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 8**: p. I28-33.
302. Gushiken, F.C., et al., *Abnormal platelet function in C3-deficient mice*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(5): p. 865-70.
303. Sims, P.J. and T. Wiedmer, *The response of human platelets to activated components of the complement system*. Immunol Today, 1991. **12**(9): p. 338-42.
304. Ando, B., et al., *Complement proteins C5b-9 initiate secretion of platelet storage granules without increased binding of fibrinogen or von Willebrand factor to newly expressed cell surface GPIIb-IIIa*. J Biol Chem, 1988. **263**(24): p. 11907-14.
305. Wiedmer, T., C.T. Esmon, and P.J. Sims, *Complement proteins C5b-9 stimulate procoagulant activity through platelet prothrombinase*. Blood, 1986. **68**(4): p. 875-80.
306. Wiedmer, T., C.T. Esmon, and P.J. Sims, *On the mechanism by which complement proteins C5b-9 increase platelet prothrombinase activity*. J Biol Chem, 1986. **261**(31): p. 14587-92.
307. Gralnick, H.R., et al., *Activated platelets in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria*. Br J Haematol, 1995. **91**(3): p. 697-702.
308. Medof, M.E., et al., *Relationship between decay accelerating factor deficiency, diminished acetylcholinesterase activity, and defective terminal complement pathway restriction in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes*. J Clin Invest, 1987. **80**(1): p. 165-74.

309. Risitano, A.M., *Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and other complement-mediated hematological disorders*. Immunobiology, 2012. **217**(11): p. 1080-7.
310. Hill, A., R.J. Kelly, and P. Hillmen, *Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*. Blood, 2013. **121**(25): p. 4985-96; quiz 5105.
311. Hamad, O.A., et al., *Complement component C3 binds to activated normal platelets without preceding proteolytic activation and promotes binding to complement receptor 1*. J Immunol, 2010. **184**(5): p. 2686-92.
312. Fiola, *Die Rolle des Komplementsystems bei der Entstehung der venösen Thrombose*. dissertation.
313. Peerschke, E.I. and B. Ghebrehiwet, *Human blood platelets possess specific binding sites for C1q*. J Immunol, 1987. **138**(5): p. 1537-41.
314. Peerschke, E.I., K.B. Reid, and B. Ghebrehiwet, *Platelet activation by C1q results in the induction of alpha IIb/beta 3 integrins (GPIIb-IIIa) and the expression of P-selectin and procoagulant activity*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 579-87.
315. Ghebrehiwet, B., et al., *Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q*. J Exp Med, 1994. **179**(6): p. 1809-21.
316. Peerschke, E.I. and B. Ghebrehiwet, *Human blood platelet gC1qR/p33*. Immunol Rev, 2001. **180**: p. 56-64.
317. Wautier, J.L., et al., *Studies on the mode of reaction of the first component of complement with platelets: interaction between the collagen-like portion of C1q and platelets*. Immunochemistry, 1977. **14**(11-12): p. 763-6.
318. Peerschke, E.I. and B. Ghebrehiwet, *C1q augments platelet activation in response to aggregated Ig*. J Immunol, 1997. **159**(11): p. 5594-8.
319. Peerschke, E.I., W. Yin, and B. Ghebrehiwet, *Platelet mediated complement activation*. Adv Exp Med Biol, 2008. **632**: p. 81-91.
320. Horstman, L.L., et al., *Role of platelets in neuroinflammation: a wide-angle perspective*. J Neuroinflammation, 2010. **7**: p. 10.
321. Peerschke, E.I., W. Yin, and B. Ghebrehiwet, *Complement activation on platelets: implications for vascular inflammation and thrombosis*. Mol Immunol, 2010. **47**(13): p. 2170-5.
322. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
323. Amara, U., et al., *Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems*. J Immunol, 2010. **185**(9): p. 5628-36.
324. Ghebrehiwet, B., et al., *Mechanisms of activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment*. J Clin Invest, 1983. **71**(5): p. 1450-6.
325. Ghebrehiwet, B., M. Silverberg, and A.P. Kaplan, *Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment*. J Exp Med, 1981. **153**(3): p. 665-76.
326. Sherman, L.S. and S.A. Back, *A 'GAG' reflex prevents repair of the damaged CNS*. Trends Neurosci, 2008. **31**(1): p. 44-52.
327. Levitt, D., *Naturally occurring mouse antibodies against T-cell-secreted chondroitin sulphate proteoglycan*. Immunology, 1988. **64**(4): p. 587-92.
328. Okayama, M., et al., *Purification and characterization of human platelet proteoglycan*. Biochem J, 1986. **233**(1): p. 73-81.
329. Ward, J.V. and M.A. Packham, *Characterization of the sulfated glycosaminoglycan on the surface and in the storage granules of rabbit platelets*. Biochim Biophys Acta, 1979. **583**(2): p. 196-207.
330. Hart, G.W., *Biosynthesis of glycosaminoglycans by thymic lymphocytes. Effects of mitogenic activation*. Biochemistry, 1982. **21**(24): p. 6088-96.
331. Levitt, D., R. Porter, and L. Wagner-Weiner, *Potential of human polymorphonuclear leukocytes to synthesize and secrete sulfated proteoglycans*. Mol Immunol, 1986. **23**(10): p. 1125-32.

332. Donato, J.L., et al., *The kinetics of chondroitin 4-sulfate release from stimulated platelets and its relation to thromboxane A2 formation and granule secretion*. Braz J Med Biol Res, 1994. **27**(9): p. 2163-7.
333. MacPherson, G.G., *Synthesis and localization of sulphated mucopolysaccharide in megakaryocytes and platelets of the rat, an analysis by electron-microscope autoradiography*. J Cell Sci, 1972. **10**(3): p. 705-17.
334. Woulfe, D.S., et al., *Serglycin proteoglycan deletion induces defects in platelet aggregation and thrombus formation in mice*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3458-67.
335. Olsson, I., *Chondroitin sulfate proteoglycan of human leukocytes*. Biochim Biophys Acta, 1969. **177**(2): p. 241-9.
336. Hamad, O.A., et al., *Complement activation triggered by chondroitin sulfate released by thrombin receptor-activated platelets*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(8): p. 1413-21.
337. Kishimoto, T.K., et al., *Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system*. N Engl J Med, 2008. **358**(23): p. 2457-67.
338. Gyorgy, B., et al., *Natural autoantibodies reactive with glycosaminoglycans in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(5): p. R110.
339. Weiser, P., et al., *Activated contact system and abnormal glycosaminoglycans in lupus and other auto- and non-autoimmune diseases*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2010. **93**: p. 443-72.
340. Sciascia, S., et al., *Expanding the therapeutic options for renal involvement in lupus: eculizumab, available evidence*. Rheumatol Int, 2017. **37**(8): p. 1249-1255.
341. Jung, J.H., et al., *Thrombocytopenia in Systemic Lupus Erythematosus: Clinical Manifestations, Treatment, and Prognosis in 230 Patients*. Medicine (Baltimore), 2016. **95**(6): p. e2818.
342. Vidal, F., R. Fontova, and C. Richart, *Severe neutropenia and thrombocytopenia associated with infliximab*. Ann Intern Med, 2003. **139**(3): p. W-W63.
343. Coblyn, J.S., et al., *Gold-induced thrombocytopenia. A clinical and immunogenetic study of twenty-three patients*. Ann Intern Med, 1981. **95**(2): p. 178-81.
344. Franck, H., R. Rau, and G. Herborn, *Thrombocytopenia in patients with rheumatoid arthritis on long-term treatment with low dose methotrexate*. Clin Rheumatol, 1996. **15**(3): p. 266-70.
345. Padmanabhan, A., et al., *Heparin-independent, PF4-dependent binding of HIT antibodies to platelets: implications for HIT pathogenesis*. Blood, 2015. **125**(1): p. 155-61.
346. Prechel, M.M., et al., *Activation of platelets by heparin-induced thrombocytopenia antibodies in the serotonin release assay is not dependent on the presence of heparin*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(10): p. 2168-75.
347. Cesarman-Maus, G., E. Braggio, and R. Fonseca, *Thrombosis in multiple myeloma (MM)*. Hematology, 2012. **17 Suppl 1**: p. S177-80.
348. Kristinsson, S.Y., et al., *Thrombosis is associated with inferior survival in multiple myeloma*. Haematologica, 2012. **97**(10): p. 1603-7.
349. Islam, M.A., et al., *Antiphospholipid Antibody-Mediated Thrombotic Mechanisms in Antiphospholipid syndrome: Towards Pathophysiology-Based Treatment*. Curr Pharm Des, 2016.
350. Farmer-Boatwright, M.K. and R.A. Roubey, *Venous thrombosis in the antiphospholipid syndrome*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(3): p. 321-5.
351. Busse, J., *Antikörper als neue Faktoren im immunologischen Prozess der venösen Thrombose*. 2015.
352. Qiao, J., et al., *The platelet Fc receptor, Fcγ3R1a*. Immunol Rev, 2015. **268**(1): p. 241-52.
353. Noris, M. and G. Remuzzi, *Overview of complement activation and regulation*. Semin Nephrol, 2013. **33**(6): p. 479-92.
354. Day, S.M., et al., *Murine thrombosis models*. Thromb Haemost, 2004. **92**(3): p. 486-94.
355. Boes, M., et al., *Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4776-87.
356. Muramatsu, M., et al., *Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme*. Cell, 2000. **102**(5): p. 553-63.

357. Kumazaki, K., et al., *AID-/-mus-/- mice are agammaglobulinemic and fail to maintain B220-CD138+ plasma cells*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2192-203.
358. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. Cell, 1992. **68**(5): p. 869-77.
359. Hangartner, L., et al., *Antiviral immune responses in gene-targeted mice expressing the immunoglobulin heavy chain of virus-neutralizing antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12883-8.
360. Lang, K.S., et al., *Involvement of Toso in activation of monocytes, macrophages, and granulocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(7): p. 2593-8.
361. Nguyen, T.T., et al., *The IgM receptor FcμR limits tonic BCR signaling by regulating expression of the IgM BCR*. Nat Immunol, 2017. **18**(3): p. 321-333.
362. Rutemark, C., et al., *Requirement for complement in antibody responses is not explained by the classic pathway activator IgM*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(43): p. E934-42.
363. Roopenian, D.C., et al., *Albumin-deficient mouse models for studying metabolism of human albumin and pharmacokinetics of albumin-based drugs*. MAbs, 2015. **7**(2): p. 344-51.
364. Peters, T., Jr. and A.J. Stewart, *Albumin research in the 21st century*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(12): p. 5351-3.
365. Fanali, G., et al., *Human serum albumin: from bench to bedside*. Mol Aspects Med, 2012. **33**(3): p. 209-90.
366. Peters, T., Jr., *Serum albumin*. Adv Protein Chem, 1985. **37**: p. 161-245.
367. O'Donnell, C.J. and R. Elosua, *[Cardiovascular risk factors. Insights from Framingham Heart Study]*. Rev Esp Cardiol, 2008. **61**(3): p. 299-310.
368. Tiedt, R., et al., *Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1503-6.
369. Botto, M., et al., *Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies*. Nat Genet, 1998. **19**(1): p. 56-9.
370. Yammani, R.D., et al., *C4 Deficiency is a predisposing factor for Streptococcus pneumoniae-induced autoantibody production*. J Immunol, 2014. **193**(11): p. 5434-43.
371. Lee, K.F., et al., *Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system*. Cell, 1992. **69**(5): p. 737-49.
372. Nilsson, U.R. and H.J. Muller-Eberhard, *Deficiency of the fifth component of complement in mice with an inherited complement defect*. J Exp Med, 1967. **125**(1): p. 1-16.
373. Wetsel, R.A., D.T. Fleischer, and D.L. Haviland, *Deficiency of the murine fifth complement component (C5). A 2-base pair gene deletion in a 5'-exon*. J Biol Chem, 1990. **265**(5): p. 2435-40.
374. Wheat, W.H., et al., *The fifth component of complement (C5) in the mouse. Analysis of the molecular basis for deficiency*. J Exp Med, 1987. **165**(5): p. 1442-7.
375. Erickson, R.P., et al., *A Single Gene Controlling Hemolytic Complement and a Serum Antigen in the Mouse*. J Immunol, 1964. **92**: p. 611-5.
376. Cinader, B., S. Dubiski, and A.C. Wardlaw, *Distribution, Inheritance, and Properties of an Antigen, Mub1, and Its Relation to Hemolytic Complement*. J Exp Med, 1964. **120**: p. 897-924.
377. Rosenberg, L.T. and D.K. Tachibana, *Activity of mouse complement*. J Immunol, 1962. **89**: p. 861-7.
378. Rosenfeld, S.I., et al., *Hereditary deficiency of the fifth component of complement in man. II. Biological properties of C5-deficient human serum*. J Clin Invest, 1976. **57**(6): p. 1635-43.
379. Cesbron, J.Y., et al., *[Homozygotic C5 deficiency disclosed by purulent Neisseria meningitidis meningitis]*. Presse Med, 1985. **14**(45): p. 2287-9.
380. Haeney, M.R., A.P. Ball, and R.A. Thompson, *Recurrent bacterial meningitis due to genetic deficiencies of terminal complement components (C5 and C6)*. Immunobiology, 1980. **158**(1-2): p. 101-6.

381. Ross, S.C. and P. Densen, *Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency*. Medicine (Baltimore), 1984. **63**(5): p. 243-73.
382. Peter, G., et al., *Meningococcal meningitis in familial deficiency of the fifth component of complement*. Pediatrics, 1981. **67**(6): p. 882-6.
383. Snyderman, R., et al., *Deficiency of the fifth component of complement in human subjects. Clinical, genetic and immunologic studies in a large kindred*. Am J Med, 1979. **67**(4): p. 638-45.
384. Dos Anjos Cassado, A., *F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen*. Results Probl Cell Differ, 2017. **62**: p. 161-179.
385. Tavora, F.R., et al., *Monocytes and neutrophils expressing myeloperoxidase occur in fibrous caps and thrombi in unstable coronary plaques*. BMC Cardiovasc Disord, 2009. **9**: p. 27.
386. Fleming, T.J., M.L. Fleming, and T.R. Malek, *Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family*. J Immunol, 1993. **151**(5): p. 2399-408.
387. Hestdal, K., et al., *Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells*. J Immunol, 1991. **147**(1): p. 22-8.
388. Xu, W.F., et al., *Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6642-6.
389. Kahn, M.L., et al., *A dual thrombin receptor system for platelet activation*. Nature, 1998. **394**(6694): p. 690-4.
390. Dellian, M., et al., *Vascular permeability in a human tumour xenograft: molecular charge dependence*. Br J Cancer, 2000. **82**(9): p. 1513-8.
391. Lisman, T., C. Weeterings, and P.G. de Groot, *Platelet aggregation: involvement of thrombin and fibrin(ogen)*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 2504-17.
392. Radmacher, M., et al., *Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope*. Biophys J, 1996. **70**(1): p. 556-67.
393. Nilsson, B., et al., *The role of complement in biomaterial-induced inflammation*. Mol Immunol, 2007. **44**(1-3): p. 82-94.
394. Lentz, B.R., *Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation*. Prog Lipid Res, 2003. **42**(5): p. 423-38.
395. Janko, C., et al., *Cooperative binding of Annexin A5 to phosphatidylserine on apoptotic cell membranes*. Phys Biol, 2013. **10**(6): p. 065006.
396. Rand, M.L., et al., *Diannexin, an annexin A5 homodimer, binds phosphatidylserine with high affinity and is a potent inhibitor of platelet-mediated events during thrombus formation*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(6): p. 1109-19.
397. Thiagarajan, P. and C.R. Benedict, *Inhibition of arterial thrombosis by recombinant annexin V in a rabbit carotid artery injury model*. Circulation, 1997. **96**(7): p. 2339-47.
398. Fullard, J.F., *The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(14): p. 1567-76.
399. Travis, M.A., J.D. Humphries, and M.J. Humphries, *An unraveling tale of how integrins are activated from within*. Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(4): p. 192-7.
400. Basani, R.B., et al., *RGD-containing peptides inhibit fibrinogen binding to platelet alpha(IIb)beta3 by inducing an allosteric change in the amino-terminal portion of alpha(IIb)*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 13975-81.
401. Casserly, I.P. and D.J. Moliterno, *Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists*. Expert Opin Pharmacother, 2000. **1**(3): p. 419-33.
402. Bassler, N., et al., *A mechanistic model for paradoxical platelet activation by ligand-mimetic alphaIIb beta3 (GPIIb/IIIa) antagonists*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(3): p. e9-15.
403. Hu, H., W. Zhang, and N. Li, *Glycoprotein IIb/IIIa inhibition attenuates platelet-activating factor-induced platelet activation by reducing protein kinase C activity*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(8): p. 1805-12.

404. Reed, G.L., M.L. Fitzgerald, and J. Polgar, *Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes*. *Blood*, 2000. **96**(10): p. 3334-42.
405. Li, J., et al., *Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 7737.
406. Doweiko, J.P. and D.J. Nompleggi, *Role of albumin in human physiology and pathophysiology*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1991. **15**(2): p. 207-11.
407. Bal, W., et al., *Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1830**(12): p. 5444-55.
408. Jacobsen, J. and R. Brodersen, *Albumin-bilirubin binding mechanism*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(10): p. 6319-26.
409. Fasano, M., et al., *The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin*. *IUBMB Life*, 2005. **57**(12): p. 787-96.
410. Devine, D.V., R.S. Siegel, and W.F. Rosse, *Interactions of the platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with complement. Relationship to defects in the regulation of complement and to platelet survival in vivo*. *J Clin Invest*, 1987. **79**(1): p. 131-7.
411. Fu, R., et al., *The dysfunction of platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*. *Thromb Res*, 2016. **148**: p. 50-55.
412. Kew, R.R., et al., *Human neutrophil Fc gamma RIIB and formyl peptide receptors are functionally linked during formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced chemotaxis*. *J Immunol*, 1992. **149**(3): p. 989-97.
413. Proulle, V., et al., *Platelets are required for enhanced activation of the endothelium and fibrinogen in a mouse thrombosis model of APS*. *Blood*, 2014. **124**(4): p. 611-22.
414. Kurata, Y., et al., *Platelet-associated complement in chronic ITP*. *Br J Haematol*, 1985. **60**(4): p. 723-33.
415. Shi, T., et al., *Anti-beta2-glycoprotein I antibodies in complex with beta2-glycoprotein I can activate platelets in a dysregulated manner via glycoprotein Ib-IX-V*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(8): p. 2558-67.
416. Pennings, M.T., et al., *Platelet adhesion to dimeric beta-glycoprotein I under conditions of flow is mediated by at least two receptors: glycoprotein Ibalpha and apolipoprotein E receptor 2¹*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(2): p. 369-77.
417. Lutters, B.C., et al., *Dimers of beta 2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2¹*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(36): p. 33831-8.
418. Skoglund, C., et al., *C-reactive protein and C1q regulate platelet adhesion and activation on adsorbed immunoglobulin G and albumin*. *Immunol Cell Biol*, 2008. **86**(5): p. 466-74.
419. Ebanks, R.O. and D.E. Isenman, *Mouse complement component C4 is devoid of classical pathway C5 convertase subunit activity*. *Mol Immunol*, 1996. **33**(3): p. 297-309.
420. Devaux, P.F., *Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes*. *Biochemistry*, 1991. **30**(5): p. 1163-73.
421. Comfurius, P., et al., *Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase*. *Biochim Biophys Acta*, 1990. **1026**(2): p. 153-60.
422. Yeung, T., et al., *Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization*. *Science*, 2008. **319**(5860): p. 210-3.
423. Gerke, V. and S.E. Moss, *Annexins: from structure to function*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(2): p. 331-71.
424. Simoons, M.L. and G.I.-A. Investigators, *Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blocker abciximab on outcome in patients with acute coronary syndromes without early coronary revascularisation: the GUSTO IV-ACS randomised trial*. *Lancet*, 2001. **357**(9272): p. 1915-24.
425. Gurbel, P.A. and V.L. Serebruany, *Oral platelet IIb/IIIa inhibitors: from attractive theory to clinical failures*. *J Thromb Thrombolysis*, 2000. **10**(3): p. 217-20.

426. Mousa, S.A., et al., *Novel technetium-99m-labeled platelet GPIIb/IIIa receptor antagonists as potential imaging agents for venous and arterial thrombosis*. *Coron Artery Dis*, 1998. **9**(2-3): p. 131-41.
427. Wu, J., et al., *IQCA-TAVV: To explore the effect of P-selectin, GPIIb/IIIa, IL-2, IL-6 and IL-8 on deep venous thrombosis*. *Oncotarget*, 2017. **8**(53): p. 91391-91401.
428. Gralnick, H.R., et al., *Endogenous platelet fibrinogen surface expression on activated platelets*. *J Lab Clin Med*, 1991. **118**(6): p. 604-13.
429. Nurden, A.T., *Association of fibrinogen-bound glycoprotein IIb-IIIa complexes on the activated platelet surface*. *J Lab Clin Med*, 1996. **128**(1): p. 7-8.
430. Boehm, T.K., H. Sojar, and E. Denardin, *Concentration-dependent effect of fibrinogen on IgG-specific antigen binding and phagocytosis*. *Cell Immunol*, 2010. **263**(1): p. 41-8.
431. Boehm, T.K. and E. DeNardin, *Fibrinogen binds IgG antibody and enhances IgG-mediated phagocytosis*. *Hum Antibodies*, 2008. **17**(3-4): p. 45-56.
432. Theoret, J.F., et al., *Recombinant P-selectin glycoprotein-ligand-1 delays thrombin-induced platelet aggregation: a new role for P-selectin in early aggregation*. *Br J Pharmacol*, 2006. **148**(3): p. 299-305.
433. Pierangeli, S.S., et al., *Complement activation: a novel pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1051**: p. 413-20.
434. Chan, H., et al., *The IgG subclasses of platelet-associated autoantibodies directed against platelet glycoproteins IIb/IIIa in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura*. *Br J Haematol*, 2003. **122**(5): p. 818-24.
435. Pal, Z., et al., *Immunosuppressants increase the levels of natural autoantibodies reactive with glycosaminoglycans in myasthenia gravis*. *J Neuroimmunol*, 2014. **276**(1-2): p. 224-8.
436. Nguyen, T.T. and N. Baumgarth, *Natural IgM and the Development of B Cell-Mediated Autoimmune Diseases*. *Crit Rev Immunol*, 2016. **36**(2): p. 163-177.
437. Diebold, C.A., et al., *Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface*. *Science*, 2014. **343**(6176): p. 1260-3.
438. Undas, A., et al., *Association between atopic diseases and venous thromboembolism: a case-control study in patients aged 45 years or less*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(4): p. 870-3.
439. Hamad, O.A., et al., *Contact activation of C3 enables tethering between activated platelets and polymorphonuclear leukocytes via CD11b/CD18*. *Thromb Haemost*, 2015. **114**(6): p. 1207-17.
440. Langer, F., et al., *Rapid activation of monocyte tissue factor by antithymocyte globulin is dependent on complement and protein disulfide isomerase*. *Blood*, 2013. **121**(12): p. 2324-35.
441. Ammann, E.M., et al., *Intravenous immune globulin and thromboembolic adverse events in patients with hematologic malignancy*. *Blood*, 2016. **127**(2): p. 200-7.
442. Armstrong, P.C. and K. Peter, *GPIIb/IIIa inhibitors: from bench to bedside and back to bench again*. *Thromb Haemost*, 2012. **107**(5): p. 808-14.
443. Zhu, J., et al., *Closed headpiece of integrin α IIb β 3 and its complex with an α IIb β 3-specific antagonist that does not induce opening*. *Blood*, 2010. **116**(23): p. 5050-9.
444. Griffin, M. and T. Munir, *Management of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a clinician's guide*. *Ther Adv Hematol*, 2017. **8**(3): p. 119-126.
445. Van Bijnen, S.T., W.L. Van Heerde, and P. Muus, *Mechanisms and clinical implications of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*. *J Thromb Haemost*, 2012. **10**(1): p. 1-10.

X. Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acid-Citrat-Dextrose
ADP	Adenosintriphosphat
AID	activation-induced cytidine deaminase
Ak	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve
Ala	Alanin
akt.	aktiviert
B, Bb	Faktor B und dessen Spaltprodukt
BSA	Bovine serum albumin
bzw	beziehungsweise
β2GPI	β2 Glycoprotein I
cm	Zentimeter
C1q	Complement component 1q
C2	Complement component 2
C2a, C2b	Spaltprodukte von C2
C3	Complement component 3
C3(H ₂ O)	hydrolysierte Form von C3
C4	Complement component 4
C4Ss	C4 serum substance
C4b, C4b	Spaltprodukte von C4
C5	Complement component 5
C6	Complement component 6
C7	Complement component 7
C8	Complement component 8
C9	Complement component 9
CD 31	Cluster of differentiation 31
CD 41	Cluster of differentiation 41
CD 42b	Cluster of differentiation 42b
CD40	Cluster of differentiation 40
CD40L	Ligand von CD40
CDR	complementary-determining regions
CR1/2	Complement receptor 1/2
CR2	Complementrezeptor 2

CS	Chondroitinsulfat
Ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
DC	dendritischen Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward scatter
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
FcγR	Fragment crystallizable γ Rezeptor
G	Gravitationskonstante
g	Gramm
GPIIb/IIIa	Glycoprotein IIb/IIIa
GPIbα	Glycoprotein Iba
Gly	Glycin
H	Stunde
H ₂ O	Wasser
HIT	Heparininduzierte Thrombozytopenie
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HMWK	High-molecular-weight kininogen
HRP	Horseradish Peroxidase
ICAM-1 / -2	Intercellular adhesion molecule 1 / 2
I	Gerinnungsfaktor I (Fibrinogen)
II	Gerinnungsfaktor II (Prothrombin)
Ila	aktivierte Form von Gerinnungsfaktor II (Thrombin)
ITP	Immunthrombozytopenie
IX, IXa	Gerinnungsfaktor IX und seine aktivierte Form
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgG1	Immunglobulin G der Klasse 1
IgM	Immunglobulin M
JAM-A	junctional adhesion molecule A
L-Selectin	lymphocyte selectin
LCMV	Lymphocytic chorionmeningitis Virus

LMCV	Lymphozytic chorionmeningitis Virus
Lys	Lysin
MAC	Membrane attack complex
MASP 2	Mannan-binding lectin serine protease 2
MBL	Mannose-binding lectin
MGUS	Monoklonale Gammopathie Unklarer Signifikanz
Mac1	Macrophage-1 integrin
Mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NET	Neutrophil extracellular trap
NH ₂	Aminogruppe
NS	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
p	p-Wert im T-Test
P	Properdin
P-Selectin	Platelet selectin
PAR-4	Protease-aktivierender-Rezeptor-4-Agonist
PDI	Protein disulfid isomerase
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PF 4	Platelet factor 4
PPP	Platelet poor plasma
PPi	Diphosphat,
PRP	Platelet rich plasma
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
RAG	recombination activating gene
SSC	Side scatter
slgM	sezerniertes IgM
TALEN-mRNA	Transcription activator-like effector nuclease)
TF	Tissue factor
TMB	3,3',5,5-Tetramethylbenzidin-Chromogenlösung ()
TRAP	Thrombin receptor-activating peptides
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem

vWF	Von-Willebrand-Faktor
vol.%	Volumen-Prozent
V, Va	Gerinnungsfaktor V und seine aktivierte Form
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VII, VIIa	Gerinnungsfaktor VII und seine aktivierte Form
X, Xa	Gerinnungsfaktor X und seine aktivierte Form
XI, XIa	Gerinnungsfaktor XI und seine aktivierte Form
XII, XIIa	Gerinnungsfaktor XII und seine aktivierte Form
aPL	Antiphospholipid antibody
g	Gramm
gp120	Glykoprotein 120
i.d.R.	in der Regel
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmol	Millimol
n	Anzahl
nm	nanometer
nmol	Nanomol
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter

XI. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der extrinsischen und intrinsischen Gerinnungskaskade modifiziert nach [71]	7
Abbildung 2: Schema des Komplementsystems eingeteilt in klassische Komplementkaskade (oben), Lektin-Weg (mitte) und alternative Komplementkaskade (unten) modifiziert nach [280].....	22
Abbildung 3: Operationsablauf Stenosierung der Vena cava inferior	40
Abbildung 4: Digitale Auswertung der Assoziation von Antikörpern zu Thrombozyten und Fibrinogen im histologischen Bild.....	52
Abbildung 5: KL25 Mäuse mit Produktion von Antikörper gegen ein irrelevantes Antigen haben ein vergleichbares Risiko zum Wildtypstamm eine venöse Thrombose zu entwickeln.....	61
Abbildung 6: Antikörperablagerung in murinen Thromben	62
Abbildung 7: Neutrophile Granulozyten und Monozyten interagieren nicht mit Antikörpern im Thrombus von C57Bl/6J Mäusen.....	64
Abbildung 8: Antikörper der Klasse IgG und Thrombozyten interagieren in der venösen Thrombose muriner Präparate.....	65
Abbildung 9: Hohe Übereinstimmung zwischen Antikörpern der Klasse IgG und Thrombozyten in humanen Lungenemboliepräparaten	66
Abbildung 10: Antikörper der Klasse IgG und Thrombozyten interagieren in humanen Lungenemboliepräparaten	67
Abbildung 11: Antikörper der Klasse IgM interagieren in der venösen Thrombose mit Thrombozyten und dem Endothel	68
Abbildung 12: Antikörper der Klasse IgM interagieren mit Thrombozyten in humanen Lungenembolispräparaten	70
Abbildung 13: Antikörper aus KL25 Mäusen, gerichtet gegen ein irrelevantes Antigen, binden Thrombozyten in der venösen Thrombose.....	72
Abbildung 14: Frühe Assoziation von Antikörpern mit Thrombusmaterial (IgG) bzw. mit dem Endothel (IgM)	73
Abbildung 15: Aktivierte Thrombozyten sind das entscheidende Element, welches zur Akkumulation von IgG im Thrombus führt	74

Abbildung 16: Thrombozyten interagieren nach Aktivierung mit Isotypantikörpern der Klasse IgG	76
Abbildung 17: Antikörper der Klasse IgG und IgM sowie Albumin lagern sich auf aktivierten Thrombozyten ab.....	77
Abbildung 18: Die Ablagerung von IgG auf aktivierte Thrombozyten ist unabhängig von dem Aggregationsausmaß der Zellen	79
Abbildung 19: Antikörpermangel in $slgM^{-/-}AID^{-/-}$ Mäuseserum führt zu reduzierter Aggregation und ATP-Ausstoß von Thrombozyten	80
Abbildung 20: IgG, jedoch nicht IgM, führt zu verstärkter thrombinvermittelter Thrombozytenaggregation und -Sekretion	81
Abbildung 21: Das Ausmaß der Thrombozytenaggregation und ATP-Freisetzung korreliert mit der IgG-, jedoch nicht mit der IgM-Konzentration im Plasma von Antikörperknockout Mäusen	82
Abbildung 22: IgG fördert schnelle und frühe Aggregation von Thrombozyten; IgM verzögert ATP-Ausschüttung.....	83
Abbildung 23: Toso-Rezeptoren nehmen keinen Einfluss auf Thrombozytenaggregation und -Sekretion	85
Abbildung 24: KL25 Antikörper, gerichtet gegen ein irrelevantes Antigen (LCMV), fördern Aggregation und ATP-Freisetzung von Thrombozyten nach Aktivierung.....	86
Abbildung 25: Natürliche Antikörper tragen nicht zur vermehrten Aktivierung von Thrombozyten bei.....	87
Abbildung 26: Die Bindung von Antikörpern an aktivierte Thrombozyten ist unabhängig von dessen Ladung.....	88
Abbildung 27: Annexin V interferiert mit der Bindung von IgG an Thrombozyten und führt so zu einer reduzierten Aggregation und ATP-Ausschüttung.....	90
Abbildung 28: Die Blockierung von GPIIb/IIIa durch Tirofiban hemmt die Bindung von Antikörpern an aktivierte murine Thrombozyten.....	94
Abbildung 29: GPIIb/IIIa-blockierende Nicht-Peptide (hier Tirofiban) reduzieren signifikant die Bindung von Antikörpern an aktivierte humane Thrombozyten	95
Abbildung 30: Enzymatische Verdauung von Chondroitinsulfat verringert signifikant die Bindung von IgG an aktivierte Thrombozyten	96

Abbildung 31: Albumin beeinflusst weder die Bindung von Antikörper an aktivierte Thrombozyten noch die Thromboseneigung <i>in vivo</i>	98
Abbildung 32: Die gute Haftung von Antikörpern an aktivierte Thrombozyten ist auf Chondroitinsulfat und Fibrin zurückzuführen	99
Abbildung 33: Die enzymatische Zersetzung von Chondroitinsulfat führt zu einer signifikanten Reduktion der Thrombozytenaggregation und -Sekretion	100
Abbildung 34: Frühe Assoziation von Thrombozyten mit C1q in der venösen Thrombose	103
Abbildung 35: Frühe Assoziation von Thrombozyten mit C4 in der venösen Thrombose	105
Abbildung 36: Komplementfaktoren C1q und C3 tragen signifikant zu Thrombozytenaggregation und -Sekretion bei	106
Abbildung 37: Das Antikörper-Fc-Ende trägt nicht zur Ablagerung von IgG auf aktivierten Thrombozyten bei	108
Abbildung 38: IgG-vermittelte Komplementaktivierung fördert Thrombozytenaggregation und -Sekretion	109
Abbildung 39: Fc γ - und Toso-Rezeptoren tragen zur antikörperabhängigen neutrophilen Granulozyten- und Monozytenakkumulation im Thrombus bei	112
Abbildung 40: IgG fördert die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten	113
Abbildung 41: Komplementproteine C1q, C4 und C3 fördern die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in der venösen Thrombose	115
Abbildung 42: Leukozytenrekrutierung in der venösen Thrombose wird durch unspezifische Antikörper getriggert	116
Abbildung 43: Antikörper der Klasse IgG akkumulieren unabhängig von ihrer Antigen-spezifität auf aktivierten humanen Thrombozyten	117
Abbildung 44: Zusammenfassung der Antikörper-Thrombozyten-Interaktion in der Entstehung der tiefen Venenthrombose	129

XII. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Vorkommen und Interaktionsvermögen von Fc-Rezeptoren mit verschiedenen Antikörperklassen im Menschen, modifiziert nach [160, 163, 176].....	17
Tabelle 2:	Antikörper für immunhistologische Färbungen an murinen Präparaten.....	50
Tabelle 3:	Antikörper für immunhistologische Färbungen an humanen Präparaten.....	50
Tabelle 4:	Sekundärantikörper zur Anwendung an Primärantikörpern aus Tabelle 2 und 3.....	50
Tabelle 5:	Reagenzien zur Anwendung in durchflusszytometrischen Untersuchungen.....	58
Tabelle 6:	Enzyme zur Anwendung in <i>in-vitro</i> -Versuchen.....	58

XIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Steffen Massberg bedanken. Er gab mir die Möglichkeit an diesem Projekt in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten. Seine Ideen und Anregungen waren wegweisend für dieses Projekt.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. Konstantin Stark für die herausragende Betreuung während der Promotionsarbeit danken. Er half das Projekt aufzubauen. Seine Inspiration war richtungsweisend für die Forschungsarbeiten und er war immer ansprechbar bei Problemen.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Badr Kilani, Frau Lena Pfaff und Frau Dr. med. vet. Johanna Busse für die gute und enge Zusammenarbeit an diesem Projekt danken. Sie gaben Hilfestellung unter anderem in Bezug auf das Mausmodell.

Ein herzlicher Dank geht an Frau Dr. med. vet. Sue Chandraratne. Sie war vor allem während der Einarbeitungsphase eine wichtige Ansprechpartnerin.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. nat. Michael Lorenz, Frau Anna Titova, Frau Zeljka Sisic, Frau Dr. med. vet. Susanne Sauer, Herrn Dr. med. Tobias Petzold und Herrn Dr. med. Florian Gärtner. Von ihnen bekam ich große Unterstützung in Bezug auf Methoden. Zudem brachten sie auch neue Ideen in das Projekt mit ein.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch für die kollegiale Zusammenarbeit aller Labormitglieder der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Massberg bedanken. Besonders erwähnen möchte ich Frau Dr. med. vet. Gerhild Rosenberger, Frau Dr. med. vet. Meike Miller, Frau Dr. med. vet. Vanessa Philippi, Frau Dr. med. vet. Irene Schubert, Frau Dr. med. vet. Charlotte Marx, Herrn Andreas Ehrlich und Herrn Sebastian Helmer. Ein großer Dank auch an Frau Nicole Blount und die Tierpfleger des Walter-Brendel-Zentrums für die Betreuung der Versuchstiere.

Abschließend möchte ich die Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern würdigen.

- Herr Prof. Dr. Admar Verschoor vom Universitätsklinikum Schleswig-Holstein für das einbringen frischer Ideen besonders in Bezug auf das Komplementsystem. Er und seine Arbeitsgruppe stellte uns Knockout-Tiere zu Verfügung. Zudem versorgte er uns mit einem anti-C1q-Antikörper gemeinsam mit wichtigen Informationen bezüglich der Anwendung.
- Herr Prof. de Boer vom Department of Pathology, Academic Medical Center, Amsterdam für die freundliche Bereitstellung der Lungenemboliepräparate
- Herr PD. Dr. Markus Moser vom Max-Planck-Institut für Biochemie für das Zurverfügungstellen von succinylierten Antikörpern

Eidesstattliche Versicherung

Ich, **Sven Maximilian Stockhausen**, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Die Antikörper- Thrombozyteninteraktion als zentraler Mechanismus in der
Entstehung der venösen Thrombose**

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 den 07.12.2018

Sven Maximilian Stockhausen

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand