

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Daniel Teupser

Die Initialisierung der Immunothrombose und deren antimikrobielle Funktionen

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

vorgelegt von

Sarah Meister

aus München

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Engelmann
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Simon Schäfer
Prof. Dr. Michael Spannagl
Prof. Dr. Markus Wörnle

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

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2020

*Meiner Familie, insbesondere meinem
Opa Misch und Manuel*

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

„Die Initialisierung der Immunothrombose und deren antimikrobielle Funktionen“

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 11.11.2019

Ort, Datum

Sarah Meister

Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

I.	Systemische Infektion und Sepsis	4
	1. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) als wichtiger Trigger von systemischen Infektionen	4
	1.1. Zellwandzusammensetzung des <i>E. coli</i>	5
	2. Das Gerinnungssystem	5
	2.1. TF als entscheidender Initiator der extrinsischen Blutgerinnung	6
	2.2. Die Entstehung von Fibrin aus Fibrinogen	6
	3. Das intravaskuläre Immunsystem.....	7
	3.1. Die Leber als Immunorgan	7
	3.1.1. Kupfferzellen	7
	3.1.2. Dendritische Zellen.....	8
	3.1.3. Lymphozyten	8
	3.1.4. B-Zellen	8
	3.1.5. CD4 und CD8 positive T-Zellen.....	8
	3.1.6. NKT-Zellen	8
	3.1.6.a. Rolle der NKT-Zellen in bakteriellen Erkrankungen	10
	3.1.6.b. Aktivierung der NKT-Zellen	10
	3.2. Angeborenes Immunsystem bei systemischen Infektionen.....	11
	3.2.1. Das Komplementsystem	11
	3.2.2. Zellen der angeborenen Immunantwort	11
	3.2.2.a. Monozyten und Makrophagen.....	12
	3.2.2.b. Neutrophile Granulozyten.....	14
	4. Zusammenhänge zwischen der angeborenen Immunantwort und dem Gerinnungssystem	16
	4.1. Komplementsystem und Gerinnung	16
	4.2. Thrombozyten und Gerinnung.....	16
	4.3. Monozyten und neutrophile Granulozyten als Verbindung zwischen Immunsystem und Koagulation	17
	4.3.1. Monozyten und Koagulation.....	17
	4.3.2. Neutrophile Granulozyten und Koagulation.....	17
	4.4. Immunothrombose – Eine Hypothese	17
	4.5. Die Rolle des Fibrin im Kampf gegen Bakterien.....	18
II.	Zielsetzung.....	18
	1. Identifikation der Immunzellen, welche die intravaskuläre Fibrinbildung und mikrovaskuläre Thrombosen während der systemischen Infektion mit <i>E. coli</i> initiieren.....	18
	2. Charakterisierung der zeitabhängigen Rekrutierung von Immunzellen.....	19
	3. Interaktionen zwischen Bakterien, Fibrin-Bildung und rekrutierten Immunzellen bei der Bildung mikrovaskulärer Thrombosen	19
	4. Mechanismen der fibrin-induzierten Elimination von Bakterien <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	19
III.	Material	20
	1. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	20
	2. Chemikalien	21
	3. Antikörper	22
	4. Puffer	23
IV.	Methoden	24

1. Mikrobiologische Methoden	24
1.1. Verwendete Bakterien	24
1.2. Kultivierung der Bakterien	24
1.3. Vorbereitung der Bakterien für weitere Experimente	24
1.3.1. Lösung der Bakterien in PBS	24
1.3.2. Keimzählermittlung	24
2. Experimente mit Plasma	24
2.1. Blutentnahme	24
2.2. Gewinnung von Plättchen freiem Plasma (PPP)	25
2.3. <i>In vitro</i> Fibrinbildung	25
3. <i>In vivo</i> Experimente	27
3.1. Tierstämme	27
3.2. Haltung der Tiere	27
3.3. Bakterien-Injektionsmodelle	27
3.4.1. Jugularvenen-Injektion	27
3.4.2. Schwanzveneninjektion	28
3.4. Vorbehandlungen der Tiere	28
3.4.1. Rivaroxaban-Behandlung	28
3.4.2. Dabigatran-Behandlung	28
3.4.3. Zelldepletion	28
3.4.3.a. Depletion neutrophiler Granulozyten	28
3.4.3.b. Depletion inflammatorischer Monozyten	29
3.4.3.c. Depletion von Thrombozyten	29
3.4.4. TF-Inhibition	29
3.5. Gewinnung der Organe	29
3.6. Durchführung der KBE Analyse im Gewebe	29
4. Zellanalysen mit Hilfe von Durchflusszytometrie und funktionellen Tests ..	30
4.1. Lymphozytenisolation	30
4.2. NKT-Zellfärbung	30
4.3. Durchflusszytometrie	30
4.3.1. FACS-Analyse	30
4.3.2. FACS-Zellsortierung	31
4.4. Funktionelle Tests	32
4.4.1. TEG – Thrombelastometrie	32
4.4.2. Faktor Xa-Bildung	33
4.4.3. Visuelle Darstellung eines PPP-Thrombus nach der Zugabe von NKT- Zellen	33
5. Immunhistochemie	34
5.1. Herstellung der Schnitte	34
5.2. Immunfluoreszenzfärbung	34
5.2.1. Inkubation der Gewebeschnitte mit Antikörpern	34
5.2.2. Anwendung der Antikörper	35
5.2.3. NKT-Zellfärbung	35
5.2.4. FISH-Färbung	36
6. Fluoreszenzmikroskopie	37
7. Konfokale Laser-Mikroskopie	38
8. Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen	38
9. Statistik	39
IV. Ergebnisse	40
1. Zusammenspiel unterschiedlicher Immunzellen im Verlauf der Immunothrombose	40

2. Kolokalisation rekrutierter Immunzellen mit Fibrin	44
3. Fibrinbildung in Immunzell-depletierten Tieren	45
4. Mikrovaskuläre Fibrinbildung in der Lunge	47
5. TF-Abhängigkeit von mikrovaskulären Thrombosen und Bakterieneliminierung	48
5.1. Darstellung der Immunzellen und von Fibrin in Tieren mit TF-Inhibition 48	
5.1.1. Effekt des anti-TF-Antikörpers auf das Überleben der Bakterien ...	49
6. Beteiligung der einzelnen Komponenten der Immunothrombose an der Bakterieneliminierung	49
6.1. Lokalisation von <i>E. coli</i> und Immunzellen	49
6.2. Differenzierung zwischen lebenden und toten Bakterien.....	51
6.2.1. Kontrollexperiment zur FISH-Färbung	51
6.2.2. FISH-Färbung	52
6.3. Bakterienüberleben in zelldepletierten Tieren	54
6.3.1. Depletion inflammatorischer Monozyten	54
6.3.2. Depletion neutrophiler Granulozyten	55
6.3.3. Depletion der Thrombozyten	55
6.4. Bakterienüberleben nach Thrombin- bzw. Faktor Xa-Inhibition.....	56
6.4.1. Dabigatran-behandelte Tiere	56
6.4.2. Rivaroxaban-behandelte Tiere	56
6.5 <i>In vitro</i> Experimente zum Bakterienüberleben nach Thrombus-Bildung...	58
6.6. Bakterienüberleben in C5-defizienten Mäusen.....	62
7. NKT-Zellen als Träger von TF und Initiatoren der intravaskulären Fibrinbildung	63
7.1. <i>In vitro</i> Experimente mit NKT-Zellen	66
7.1.1. Visualisierung der NKT-Zellen in einer T-Zell-Misch-Population und Nachweis von TF	66
7.1.2. Funktionelle Tests mit isolierten NKT-Zellen	67
7.2. Effekte der NKT-Zellen auf den Mechanismus der Immunothrombose <i>in</i> <i>vivo</i>	69
V. Diskussion.....	71
1. Begründung der Wahl des Mikroorganismus - <i>Escherichia coli</i>	71
2. Begründung der Verwendung von Mäusen als Tiermodell.....	71
3. Diskussion der Ergebnisse	71
3.1. Zelluläre Initiatoren der Immunothrombose	71
3.2. Zeitabhängige Rekrutierung der Immunzellen nach bakterieller Invasion.....	73
3.3. Interaktion zwischen Bakterien, Fibrinbildung und rekrutierten Immunzellen.....	74
3.4. Mechanismus der Fibrin-induzierten Elimination von Bakterien <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	75
VI. Zusammenfassung.....	78
VII. Literaturverzeichnis	80
VII. Abbildungsverzeichnis	93
VIII. Tabellenverzeichnis	95
IX. Abkürzungsverzeichnis	96
X. Danksagung	99

I. Systemische Infektion und Sepsis

Weltweit stellt der Symptomkomplex der Sepsis die führende Todesursache bei Intensivpatienten dar (Russell, 2006). In Deutschland sterben jährlich 60.000 Menschen an den Folgen einer Sepsis und die steigende Inzidenz und hohe Mortalität (Angus & Wax, 2001) der Erkrankung macht sie zu einer besonderen Herausforderung in der Diagnostik und Therapie. Im Rahmen einer systemischen Infektion reagiert der Organismus mit einer dysregulierten Immunantwort auf die vorhandene Pathogen-Belastung. Bei dem Großteil der Patienten besteht dabei eine gesteigerte Gerinnungsaktivierung, die bis hin zur disseminierten intravasalen Gerinnung (DIG) führen kann. Letztere zieht wiederum eine hohe Letalität der Patienten nach sich (Carlie et al., 2015). Diese resultiert vor allem aus der Entstehung von Mikrothrombosen und dem damit einhergehenden Multiorganversagen (Hoppensteadt et al., 2014). Beim Auftreten einer DIG konnte daher in der Tat eine Verdoppelung der Mortalität beobachtet werden (Saracco et al., 2011). In den letzten Jahren ergaben sich Hinweise, dass die DIG die Dysregulation eines physiologischen Prozesses, der sogenannten Immunothrombose ist, und hierbei ein Ungleichgewicht zwischen Gerinnung und Gerinnungshemmung entsteht (Hoppensteadt et al., 2014). Die sogenannte Immunothrombose kann als neues Element der intravasalen Immunantwort betrachtet werden (Engelmann & Massberg, 2013). Sie ist in der Lage die Ausbreitung der Pathogene im Organismus zu verhindern. Dies geschieht durch die Bildung von Thromben in Mikrogefäßen und wird durch die Rekrutierung von Immunzellen der angeborenen Immunantwort gewährleistet. Der Ablauf des Prozesses der Immunothrombose ist jedoch bislang nur unzureichend erforscht.

1. *Escherichia coli* (*E. coli*) als wichtiger Trigger von systemischen Infektionen

Escherichia coli ist ein gramnegatives, Sporen bildendes, fakultativ anaerobes Stäbchen-Bakterium, das zu den Enterobacteriaceae gehört. Durch seine Begeißelung ist es beweglich. Es gilt zwischen drei Gruppen zu unterscheiden: den fakultativ pathogenen *E. coli*, welche Bestandteil der Mikrobiota sind, den enterovirulenten, die eine gastrointestinale Infektion verursachen können, und den extraintestinal pathogenen Erregern (Nataro & Kaper, 1998; Sannes et al., 2004). Als Bestandteil der Darmflora des Menschen stellt *E. coli* vor allem einen Benefit für das Immunsystem dar, da es gefährlichere Bakterien verdrängt und in der Entwicklung der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle spielt (Cebra, 1999). Jedoch sind fakultativ pathogene *E. coli* in der Lage Infektionen hervorzurufen, v.a. systemische Infektionen, Harnwegsinfektionen, Peritonitiden und Meningitiden (Nataro et al., 1998; Ozgurhan et al., 2016; Simonsen et al., 2014). *E. coli* ist der häufigste Erreger gramnegativ erworbener, systemischer Infektionen und Harnwegsinfekten (Vila et al., 2016). Pathogene *E. coli* besitzen eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, wie die Bildung von Toxinen, eine

Polysaccharid-Kapsel und die Nutzung des Eisenaufnahme-Systems, welche in symbiotischen Bakterienstämmen fehlen (Sannes et al., 2004).

1.1 Zellwandzusammensetzung des *E. coli*

Als gramnegatives Bakterium besitzt *E. coli* eine innere und eine äußere Membran (Abb. 1). Die innere Membran besteht aus einer Doppelschicht aus Phospholipiden, wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Cardiolipin, sowie Proteinen (Ruiz et al., 2006). Die äußere Membran, welche aus Lipopolysacchariden (LPS) und Phospholipiden besteht, stellt eine ungewöhnliche Art der Membran dar. Im Vergleich zur inneren Membran ist sie stärker mit Phosphatidylethanolamin angereichert (Lugtenberg & Peters, 1976). LPS, welches häufig zur Simulation systemischer Infektionen oder Sepsis im Mausmodell verwendet wird, besteht aus einem Kern-Oligosaccharid, Lipid A und einem O-antigen Polysaccharid (Ruiz et al., 2006). LPS kann durch Oberflächenrezeptoren bestimmter Immunzellen gebunden werden und für sich allein eine Sepsis hervorrufen (Maitre et al., 2015).

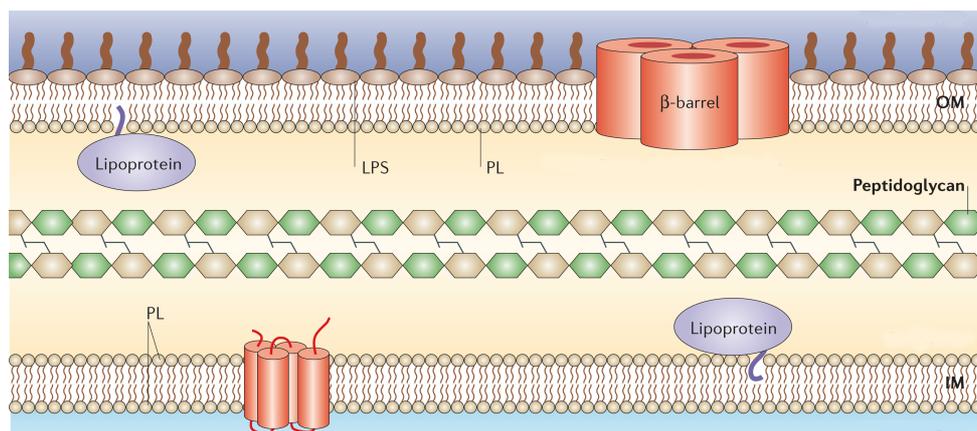


Abbildung 1: Membranstruktur *E. coli*; modifiziert aus Ruiz et al. 2006 : LPS: Lipopolisaccharid, PL: Phospholipid, OM: Außenmembran, IM: Innenmembran

2. Das Gerinnungssystem

Das Gerinnungssystem lässt sich in zwei unterschiedliche Gerinnungswege gliedern, die intrinsische und extrinsische Gerinnung, die in der Entstehung von Fibrin aus Fibrinogen in einem gemeinsamen Weg enden. Zur Generierung eines Fibrin-Koagulats sind unterschiedliche Gerinnungsfaktoren notwendig. Diese werden, ebenso wie Fibrinogen, in der Leber produziert (Zhou et al., 2016). Durch sequentielle proteolytische Reaktionen kommt es schließlich zur Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin, das letztendlich zur Entstehung des unlöslichen Fibrins führt (Ito et al., 2014). Dieses wird durch Faktor XIII polymerisiert. Das intrinsische Gerinnungsmodell wird vor allem zur Erhebung von Gerinnungsmesswerten verwendet. Das extrinsische System hingegen beschreibt den physiologischen Ablauf der Gerinnung in einem biologischen Organismus und somit auch im Menschen. Bei der Entstehung eines Gefäßdefekts kann Tissue Factor (TF), der subendothelial exprimiert wird,

mit Faktor VII aus dem Plasma einen Komplex bilden, der die Initiierung der Fibrinbildung bewirkt (Rettig et al., 2015). Ziel dabei ist, den Blutverlust während einer Gewebsschädigung möglichst gering zu halten und diesen letztlich zu stoppen (Cimmino et al. 2015).

2.1. TF als entscheidender Initiator der extrinsischen Blutgerinnung

TF stellt den bestimmenden Initiator der physiologischen Blutgerinnung dar. Das Protein gehört zu den Klasse II Zytokinrezeptoren und besteht aus drei Domänen: der extrazellulären, Membran-spannenden und zytoplasmatischen Domäne. Die extrazelluläre Domäne, welche Faktor VIIa bindet, besteht aus zwei Fibronectin Typ III Domänen (Nuzzio et al., 2016). Zusammen mit Faktor VII aktiviert TF Faktor X proteolytisch zu Faktor Xa (Mackman et al., 2004; Nuzzio et al., 2016). Faktor Xa bildet mit Faktor V und Calcium-Ionen den sogenannten Prothrombinasekomplex, der Prothrombin in Thrombin spaltet. Fibrinogen wird durch Thrombin zu Fibrin konvertiert (Mackman et al., 2004).

Generell wird TF v.a. in bestimmten Gewebezellen exprimiert. z.B. in glatten Gefäß-muskelzellen und Fibroblasten, in Kardiomyozyten, sowie in intestinalen, bronchiolären und alveolären Epithelzellen der Lunge (Luther et al., 2000; Mackman et al., 2004; Thaler et al., 2013).

Des Weiteren wurde auch das intravaskuläre Vorkommen von TF beschrieben. So bewirkt eine Stimulation inflammatorischer Monozyten durch LPS eine erhöhte Produktion von TF (Mackman, 1997). Dieses wird an die Zelloberfläche transportiert und durch Decryptierung aktiv (Engelmann & Massberg, 2013; Monroe & Key, 2007). Zudem ist bekannt, dass Krebszellen Mikropartikel freisetzen, die ebenfalls TF enthalten. In Thrombozyten wurde es in physiologischer Form detektiert (Nuzzio et al., 2016;).

TF tritt außerdem in einer frei im Plasma löslichen Form auf, die durch alternatives Splicing entsteht und welchem eine transmembrane Domäne fehlt (Bogdanov et al., 2006).

Zusätzlich zur Auslösung der Koagulationskaskade kann TF eine Rolle bei gewissen Signaltransduktionswegen spielen, z.B. bei der Metastasierung von Krebszellen, der Angiogenese während eines karzinogenen Prozess und generell bei inflammatorischen Prozessen (Belting et al., 2005; Monroe & Key, 2007).

2.2. Die Entstehung von Fibrin aus Fibrinogen

Fibrinogen spielt als eines der häufigsten im Blut vorkommenden Proteine eine wichtige Rolle in zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen, beispielsweise bei der Blutgerinnung oder bei Entzündungen und Verletzungen der Gefäßwand (Rettig et al., 2015). Fibrinogen ist ein 349 kDa großes Protein, das eine sehr komplexe Struktur besitzt. Es besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die jeweils aus drei verschiedenen Ketten bestehen: der α -, β - und γ -Kette (Medved et al., 2009). Fibrinogen weist mehrere Bindungsstellen auf, die nach der Polymerisierung von Fibrinogen zu Fibrin exponiert werden (Riedel et al., 2011). Die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin geschieht mit Hilfe von

Thrombin, das an der zentralen Region des Fibrinogen bindet und die Abspaltung zweier kurzer Peptide, Peptid A und Peptid B (Zhou et al., 2016), die jeweils an den Enden der α - und β -Kette lokalisiert sind, katalysiert (Blombäck, 1996). Während des Vorgangs wird zunächst Fibrinopeptid A abgespalten und im Anschluss Fibrinopeptid B, welches die Polymerisierung beschleunigt (Weisel et al. 1993). Nach Abspaltung der Fibrinopeptide erfolgt die Bildung von 2-Strang-Fibrin-Oligomeren, die sich durch lipophile Interaktionen zu Protofibrillen formen. Diese werden zu Fasern verpackt, die letztlich durch Verzweigung zu einem stabilen Fibrinnetzwerk werden. Hierbei spielen Kalzium und Faktor XIIIa als Transglutaminase eine wichtige Rolle (Weisel et al., 2013).

3. Das intravaskuläre Immunsystem

3.1. Die Leber als Immunorgan

Die Leber ist die größte Drüse des Körpers und besteht zu 70 bis 85 % aus Hepatozyten (Zhou et al., 2016). Des Weiteren nehmen Endothelzellen mit 50 %, Kupfferzellen mit 20 %, Lymphozyten mit 25 % und Gallenepithelzellen den größten Teil der restlichen Zellen ein (Racanelli et al., 2006). Somit stellen ein erheblichen Teil der Nicht-Hepatozyten Immunzellen dar. Zusätzlich ist die Leber mit ihrem großen Netzwerk aus Lebersinusoiden ein besonders gut durchblutetes Organ, das über zwei Kreisläufe – das Portal-Venen-System, das der Leber venöses Blut aus dem Gastro-Intestinaltrakt zuführt, und das arterielle System über die Bauchaorta – versorgt wird. Über die Zentralvenen wird das Blut nach der Passage durch die Sinusoide abtransportiert (Racanelli et al., 2006). 30 % des gesamten Blutvolumens fließen pro Minute durch die Leber (Sheth et al., 2001). Auf Grund der anatomischen Struktur der Sinusoide wird durch eine geringere Flussgeschwindigkeit die Adhärenz der Immunzellen erleichtert (Geissmann et al., 2005; Racanelli et al., 2006). Die Leber vermittelt sowohl angeborene, als auch adaptive Immunantworten. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Immunzellen, welche wichtig für die Immunantwort auf systemische Infektionen in der Leber und im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sind.

3.1.1. Kupfferzellen

Kupfferzellen stellen die größte Population an organständigen Makrophagen im gesamten Körper dar (Mackay, 2002). Durch bakterielle Stimulation, beispielsweise über LPS, sezernieren sie IL-10 (Interleukin 10), welches die Aktivität von T-Zellen hemmen kann und somit eine gewisse Immuntoleranz gegenüber Mikroorganismen, vor allem aus dem intestinalen System, bewirkt (Knoll et al., 1995). Jedoch können Kupfferzellen auch durch die Produktion von IL-18 und IL-12 die Differenzierung von Natürliche Killer Zellen (NK- Zellen) (Zhou et al., 2016) und die Aktivierung von Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen) (Brennan et al., 2013) vermitteln. Zusätzlich erhöhen die von ihnen produzierten Zytokine wie IL-1, IL-

6, TNF- α (Tumornekrose Faktor- α) und Leukotriene die antimikrobielle Aktivität von neutrophilen Granulozyten. Letztere sind in der Lage extrazelluläre Bakterien, die an Kupferzellen gebunden haben, zu töten und selbst Zytokine, die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aktivieren, zu produzieren (Gregory et al., 1998). Somit stellen Kupferzellen insbesondere im angeborenen Immunsystem der Leber eine besonders wichtige Komponente dar.

3.1.2. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen kommen in der Leber, zumeist als unreife Zellen vor (Lau et al., 2003) und entspringen aus dem Knochenmark (Valdivia et al., 1993). Sie sind häufig um die Zentralvene lokalisiert (Prickett et al., 1988) und dafür verantwortlich, Antigene aufzufangen und weiter zu verarbeiten (Racanelli et al., 2006). Sie transportieren die Antigene in das lymphatische Gewebe wie den Lymphknoten. Hier können sie Antigen-spezifische naive Lymphozyten aktivieren, die dann in den Blutkreislauf eintreten.

3.1.3. Lymphozyten

Einen Großteil der in der Leber ständigen Lymphozyten sind T-Lymphozyten. Diese unterteilen sich in konventionelle, wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, und unkonventionelle T-Lymphozyten, beispielsweise NKT-Zellen und andere T-Zellen. NK-Zellen und B-Zellen stellen einen geringeren Anteil der Lymphozyten in der Leber dar (Racanelli et al., 2006).

3.1.4. B-Zellen

Über die Funktion der B-Zellen in der Leber ist aktuell noch relativ wenig bekannt. B-Zellen werden hauptsächlich in Lymphknoten, der Milz, den Tonsillen und Mucosa-assoziiertem Gewebe differenziert und aktiviert (Burrows et al., 1997). Jedoch können sie ebenfalls in sogenannten ektopen Zentren, wie der Lunge oder dem Thymus, aktiviert werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Leber beispielsweise während einer Infektion mit dem Hepatitis C Virus (HCV) ebenfalls ein derartiges Zentrum bilden kann und die B-Zellen dadurch stimuliert werden, Antikörper zu produzieren (Racanelli et al., 2006).

3.1.5. CD4 und CD8 positive T-Zellen

Die konventionellen T-Zellpopulationen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen besitzen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptoren, die von MHC-Molekülen der Klasse I und II präsentierte Antigene erkennen und binden. In der Leber sind dabei mehr CD8⁺ als CD4⁺ Zellen zu finden. Diese sind als Effektorzellen von wichtiger Bedeutung für die Immunabwehr von Viren und Bakterien.

3.1.6. NKT-Zellen

Die NKT-Zellen stellen eine spezialisierte Subpopulation der T-Lymphozyten dar. In ihnen sind sowohl angeborene als auch adaptive Mechanismen der Immunantwort kombiniert (Brennan et al., 2013). Man geht davon aus, dass sie insbesondere durch angeborene Mechanismen aktiviert werden und als Effektor der adaptiven Immunantwort fungieren können (Cohen et al., 2013). NKT-Zellen benutzen ihren T-Zell-Rezeptor zur Erkennung von,

durch CD1d präsentierten, Antigenen (Bendelac et al., 1995; Brennan et al., 2013; Carnaud et al., 1999). Sie exprimieren sowohl $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptoren als auch NK-Zell-Rezeptoren (Natürliche Killer-Zell-Rezeptoren) (Godfrey & Kronenberg, 2004; Kronenberg, 2005). NKT-Zellen werden als Zellen definiert, die fast immer eine unveränderte Va14-Ja18 α -Ketten-Konstellation des TCR (T-Zell-Rezeptor) und eine hohe Reaktivität auf das Glykosphingolipid α -Galaktosylceramid besitzen (Kronenberg, 2005). Bisher konnte gezeigt werden, dass sie sowohl protektive als auch schädliche Einflüsse in unterschiedlichen Erkrankungen nehmen können und eine wichtige Rolle in der Modulation und Regulation der Immunantwort spielen. Sie vermitteln Antworten auf mikrobielle (Brigl et al., 2010; Tupin et al., 2007) und virale Infektionen (Paget et al., 2011). Außerdem können sie Autoimmunerkrankungen (Novak & Lehen, 2011), Allergien (Brennan et al., 2013) und onkologische Erkrankungen (Vivier et al., 2012) induzieren.

NKT-Zellen sind bislang vor allem in der Maus erforscht worden, da sie im Menschen lediglich 0,1-0,2 % der gesamten T-Lymphozyten im Blut ausmachen und daher schwer zu isolieren und identifizieren sind (Montoya et al., 2007). In Mäusen finden sich NKT-Zellen in der Leber (20 bis 30 % aller Lymphozyten) und Milz (1 bis 2% aller Lymphozyten) sowie der Haut, dem Knochenmark und dem Gastrointestinaltrakt (Benlagha et al., 2000; Doisne et al., 2009; Matsuda et al., 2000). Im Vergleich zu Mäusen konnte beim Menschen keine erhöhte Akkumulation der NKT-Zellen in der Leber gefunden werden (Kenna et al., 2003; Kita et al., 2002), dafür jedoch im Omentum, wo sie 10 % der gesamten T-Zellen ausmachen (Lynch et al., 2009). Außerdem wurde eine erniedrigte Anzahl der Zellen im Blut von Autoimmun- und Krebs-Patienten festgestellt (Berzins et al., 2011).

NKT-Zellen reifen im Thymus heran. Hier entstehen sie aus dem gleichen Pool an Vorläuferzellen wie die T-Zellen (Godfrey et al., 2007). Die Entstehung wie auch das Überleben der NKT-Zellen ist durch positive Selektion geregelt. Doppelt positive T-Zellen produzieren körpereigene Lipid-Antigene, die von den NKT-Zellen erkannt werden und diese stimulieren (Bendelac, 1995). Dieser Prozess ist jedoch nur durch die Expression von TCR möglich, welcher die Lipide erkennt. Zudem ist dieser Rezeptor für die Freisetzung von Wachstumsfaktoren (Erg1 und Erg2) notwendig, die letztendlich zur Bildung von PLZF (*promyelocytic leukaemia zinc finger protein*) führen – einem Transkriptionsfaktor, der als „master-Regulator“ für die Effektor-Funktion der NKTs gilt (Kovalovsky et al., 2008; Seiler et al., 2012).

Im Thymus entstehen drei unterschiedliche Subpopulationen der NKT-Zellen. Die T_H1 -artigen NKT-Zellen, die hauptsächlich in der Leber und Milz vorkommen, die T_H2 -artigen NKT-Zellen, die insbesondere in der Lunge sowie im Intestinaltrakt zu finden sind, und die T_H17 -artigen NKT-Zellen (Brennan et al., 2013). Die einzelnen Zellpopulationen zeichnen sich durch Unterschiede in ihrer Funktion aus.

3.1.6.a Rolle der NKT-Zellen in bakteriellen Erkrankungen

Es wurde bereits gezeigt, dass NKT-Zellen in diversen bakteriellen Infektionen eine wichtige Rolle spielen (Brigl et al., 2011; Kinjo et al., 2011). Unter anderem nehmen sie eine entscheidende Bedeutung bei Infektionen der Lunge von Mäusen mit *Streptococcus pneumoniae* ein. Das Überleben NKT-defizienter Tiere, welche mit diesen Bakterien infiziert worden waren, war deutlich herabgesetzt und die durch die KBE-Analyse bestimmte Bakterienlast erhöht (Kawakami et al., 2003). Daraus lässt sich ableiten, dass die Zellen einen wichtigen Einfluss auf die Abwehr von grampositiven Bakterien ausüben. NKT-Zellen können des Weiteren durch mycobakterielle Antigene aktiviert werden (Fischer et al., 2004). Außerdem zeigte sich, dass die Infektion mit *Borrelia burgdorferi* (Kinjo et al., 2006) und *Sphingomonas* (Kinjo et al., 2005) eine Aktivierung von NKT-Zellen bewirkt und die Clearance beider Bakterien aus der Leber bei NKT-Defizienz verringert ist (Kuma et al., 2000). Somit nehmen NKT-Zellen in der Abwehr gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Bakterien einen hohen Stellenwert ein - und das ganz unabhängig von ihrer Membranzusammensetzung.

3.1.6.b Aktivierung der NKT-Zellen

NKT-Zellen erkennen mit Hilfe von CD1d (Bendelac et al., 1995; Carnaud et al., 1999; Kronenberg, 2005) präsentierte, nicht-peptidische Moleküle wie Glykolipide und Phospholipide. CD1d ist ein Mitglied der MHC-Klasse-I-Moleküle (Brennan et al., 2013). Es wurden bereits zahlreiche Antigene ermittelt, die an CD1d binden und NKT-Zellen stimulieren. Dazu gehören die Sphingolipide, das α -Galactosylceramid, das α -Galacturonosylceramid (von *Sphingomonas spp.*) (Wu et al., 2006), körpereigene Antigene, wie Isoglobotrihexosylceramid (Kawano et al., 1997) und 3-O-Sulfogalactosylceramid (Zajonc et al., 2005), die Glycerolipide BbGL2c und BbGL2f (*Borellia Burgdorferi*) (Wang et al., 2010) sowie Cardiolipin (Dieudé et al., 2011).

Die NKT-Aktivierung erfolgt durch Antigen präsentierte Zellen, beispielsweise Kupfferzellen oder dendritische Zellen, welche CD1d exprimieren. Die präsentierten Antigene binden an den TCR der NKT-Zellen. Zusätzlich wirken die Zytokine, vor allem IL-12 stimulierend auf die NKT-Zelle. In aktivierter Form sind NKT-Zellen in der Lage durch die Ausschüttung einer großen Menge an IL-4 oder Interferon- γ (INF- γ) (Bendelac et al., 1997; Exley et al., 1998) entweder die proinflammatorische (INF- γ und TNF- α) oder die antiinflammatorische (IL-4, IL-10 und IL-13) Achse der adaptiven Immunantwort zu aktivieren (Racanelli & Rehermann, 2006). Des Weiteren sind NKT-Zellen in der Lage neutrophile Granulozyten zu rekrutieren (Kawakami et al., 2003; Nieuwenhuis et al., 2002) und die Aktivierung und Regulation der M1 bzw. der M2 Polarisation von Makrophagen zu steuern (Kim et al., 2008).

3.2. Angeborenes Immunsystem bei systemischen Infektionen

Das angeborene Immunsystem spielt eine wichtige Rolle bei der frühen Abwehr gegen Pathogene. Hierzu gehören u.a. das Komplementsystem, sowie verschiedene von myeloiden Immunzellen vermittelte Immunantwort. (Engelmann & Massberg, 2013; Gao et al., 2008; Massberg et al., 2010).

3.2.1. Das Komplementsystem

Das Komplementsystem vermittelt die direkte Lyse von Pathogenen sowie die Rekrutierung von Immunzellen, zum Beispiel von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Das Komplementsystem kann durch drei unterschiedliche, miteinander in Zusammenhang stehende, Mechanismen aktiv werden (Rettig et al., 2015): den klassischen, den alternativen und den Lektin-Weg, die alle drei in der Bildung der C3b-Konvertase (Komplementfaktor-3b-Konvertase) enden (Atkinson, 2015). Die C3b-Konvertase kann C5 (Komplementfaktor 5) in C5a und C5b spalten (Ricklin et al., 2010). Der klassische Weg ist Antikörper-abhängig. Die Untereinheit C1q bindet an einen Antigen gebundenen Antikörper (Beutler, 2004), darauf folgt die proteolytische Aktivierung der Komplementproteine C2-C5. Das aktivierte C5b-Fragment bildet mit C6-C9 den sogenannten *Membrane Attack Complex* (MAC), der eine Lyse der Mikroorganismen durch Bildung von Poren hervorruft (Ricklin et al., 2010). Der alternative Weg hingegen ist Antikörper-unabhängig und startet mit der kovalenten Bindung von C3b an ein Pathogen. Diese Bindung kann sowohl die Porenbildung, durch die Rekrutierung von C5 und des MAC, als auch die Phagozytose, über die Bindung des CR1 (Komplementrezeptor 1) an Makrophagen, auslösen. Durch die Bindung an mannosereiche bakterielle Polysaccharide ist der Lektin-Weg in der Lage, den klassischen Weg anstelle von C1q zu aktivieren (Smith et al., 1999).

3.2.2. Zellen der angeborenen Immunantwort

Die Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems geschieht im Falle einer Infektion durch die Erkennung bestimmter molekularer Strukturen, der sog. Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMP). Zu diesen gehören beispielsweise Proteoglykane (PG) und Lipopolysaccharide (LPS), Lipoteichonsäuren (LTA) und Mannane, Glykane, bakterielle DNA sowie doppelsträngige RNA (Medzhitov et al., 2000). Zellen wie Monozyten und Makrophagen, dendritische Zellen und Neutrophile besitzen sogenannte Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR), welche PAMPs erkennen können (Medzhitov et al., 1997a). Zu den PRRs zählt auch die Familie der Toll-artigen Rezeptoren (TLR) wie der TLR4, die insbesondere in der Erkennung von LPS, das hauptsächlich in gramnegativen Bakterien zu finden ist, eine wichtige Rolle spielen. Die Erkennung geschieht jedoch durch eine indirekte Bindung über CD14, unter Vermittlung von MD-2 (Guha et al., 2001; Medzhitov et al., 2000). Nach Bindung der Pathogene an die PRRs reagieren die Zellen mit einer Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen sowie von anti-mikrobiellen Peptiden (Medzhitov et al., 1997b)

und aktivieren damit den Kampf gegen die Pathogene über die Rekrutierung und Aktivierung angeborener und adaptiver Immunzellen.

3.2.2.a. Monozyten und Makrophagen

Monozyten und Makrophagen gehören zu den mononukleären Phagozyten (Adams, 1976). Als Teil der angeborenen Immunantwort nehmen sie eine entscheidende Rolle in der Abwehr gegen mikrobielle Infektionen ein (Saha et al., 2011; Serbina et al., 2008). Ihr Ursprung liegt in der gemeinsamen Vorläuferzelle der myelozytären und monozytären Reihe im Knochenmark (Imhof et al., 2004; van Furth et al., 1968). Nach dem Durchlaufen der dortigen Entwicklungsreihe werden die Monozyten in den Blutkreislauf freigesetzt, wo sie beim Menschen ca. 10 % der gesamten Leukozyten ausmachen (Auffray et al., 2009). Bei der Maus hingegen sind es 4 % (Swirski et al., 2009).

Monozyten können nach ihrer Morphologie und Funktion in unterschiedliche Subgruppen unterteilt werden (Auffray et al., 2009). Beim Menschen ist die Einteilung abhängig von der Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD16 (Passlick et al., 1989). Sie lassen sich in die klassischen (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediären (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht klassischen Monozyten (CD14⁺CD16⁺⁺) einteilen (Ziegler-Heitbrock, 2007; Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Bei der Maus gibt es lediglich zwei Subpopulationen: die inflammatorischen und die patrouillierenden Monozyten. Diese Einteilung ist ebenfalls abhängig von der Expression bestimmter Oberflächenmarker. Inflammatorische Monozyten exprimieren CD11b, Ly6C und CCR2 in hoher Menge, CX3CR1 dagegen nur in geringer Menge (Geissmann et al., 2003). Sie werden insbesondere bei entzündlichen Prozessen schnell rekrutiert (Serbina et al., 2008), wobei ihre Halbwertszeit im Blut lediglich 20 Stunden beträgt (van Furth & Cohn, 1968). Aus ihnen können die patrouillierenden Monozyten entstehen, die sich durch die hohe Expression von CD11b und CX3CR1 und die niedrige Expression von Ly6C und CCR2 auszeichnen (Abb. 2) (Geissmann et al., 2003). Ihre Halbwertszeit im Blut beträgt 5 Tage (Ginhoux et al., 2014). Die patrouillierenden Monozyten sind sowohl am Prozess der Angiogenese (Carlin et al., 2013) als auch bei Autoimmunerkrankungen beteiligt (Santiago-Raber et al., 2009).

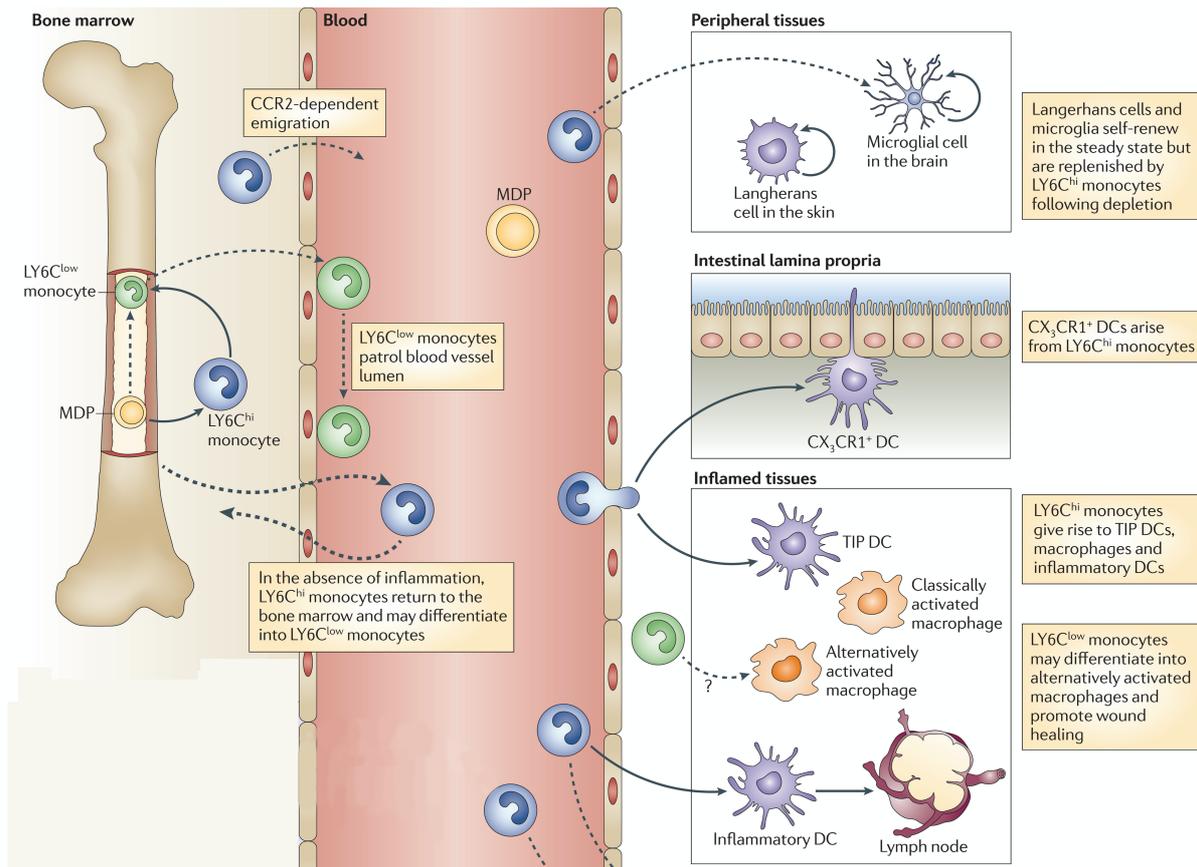


Abbildung 2: Mögliche Transformation von inflammatorischen und patrouillierenden Monozyten • MDP: Monozyten-Dendriten-Precursor; TIP DC: TIP-Dendritische-Zellen, DC: dendritische Zellen; modifiziert nach Shi et al., 2011

Trotz der Tatsache, dass sich die Oberflächenmarker zwischen menschlichen und murinen Zellen unterscheiden, stimmen ihre Funktionen in großen Teilen überein. Die klassische Monozytenpopulation des Menschen ähneln den inflammatorischen Monozyten der Maus und die murinen, patrouillierenden Monozyten ähneln den nicht-klassischen Monozyten des Menschen. Inflammatorische Monozyten extravasieren in infiziertes Gewebe und differenzieren zu Makrophagen oder dendritischen Zellen (Adams, 1976; Ginhoux et al., 2014; Imhof et al., 2004; Saha et al. 2011). Makrophagen sind in der Lage, Zellwandbestandteile von Mikroorganismen mit Hilfe eines endozytotischen Mustererkennungsrezeptors z.B. des Makrophagen-Mannose-Rezeptors, zu binden. Durch die Fusion mit Lysosomen werden die Mikroorganismen innerhalb der Zelle zerstört (Adams, 1976) und zu Antigenen prozessiert, die über das Endoplasmatische Retikulum (ER) an die Zelloberfläche transportiert werden und hier über MHC-Moleküle der Klasse II an andere Immunzellen wie T-Lymphozyten präsentiert werden (Medzhitov et al., 2000). An dieser Stelle beginnt die Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

Monozyten erkennen zudem Pathogene über den PRR, welche PAMPs binden. Darauf folgend werden Proteine, beispielsweise LAF (Lymphozyten aktivierender Faktor) und IL-1 (Nelson, 1981), die unter anderem Lymphozyten aktivieren können, antimikrobielle

Peptide oder Zyto- und Chemokine wie z.B. IL-1, IL-6 und IL-12 (Medzhitov et al., 2000) sezerniert.

3.2.2.b. Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stammen von der myelozytären Vorläuferzell-Reihe ab. Sie entstehen und differenzieren im Knochenmark zu neutrophilen Granulozyten und werden anschließend ins Blut freigesetzt. Dort bilden sie beim Menschen 50-70% der Leukozyten (Pillay et al., 2010), bei der Maus jedoch lediglich 10-20 % der Leukozyten (Galli et al., 2011). Neutrophile Granulozyten werden bei Infektionen eher schnell rekrutiert und adhären nach langsamem Rollen an das Endothel von Venolen und Sinusoiden. Dies geschieht über die Interaktion der E- und P-Selektin-Liganden der neutrophilen Granulozyten und der Endothelzellen (McEver, 2002; Vestweber et al., 1999), die zuvor durch inflammatorische Prozesse aktiviert werden (Ley et al., 2007). Die feste Adhäsion der Zellen an der Gefäßwand wird durch leukozytäres β 2-Integrin und durch sogenanntes *intercellular adhesion molecule* ICAM-1 und -2 und VCAM-1 vermittelt (Ley et al., 2007). Nach der Adhäsion können neutrophile Granulozyten über PECAM-1 und MAC-1 in das Gewebe extravasieren (Ley et al., 2007) und hier über Phagozytose opsonierte Fremdkörper aufnehmen (Lee et al., 2003). Außerdem sind sie in der Lage, Pathogene durch Degranulation und die Bildung sog. *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) direkt zu eliminieren (Van Kessel et al., 2014).

Neutrophile Granulozyten besitzen zwei Typen von Granula, die Lysozyme enthalten: die Peroxidase-positiven Granula, welche Myeloperoxidase, Elastase und Defensine enthalten und die Peroxidase-negativen Granula, welche Gelatinase und Lactoferrin aufweisen (Abb. 3) (Borregaard et al., 1997; Häger et al., 2010). Besonders die Peroxidase-positiven Granula zeichnen sich durch ihren mikrobiziden Effekt aus.

Des Weiteren sind im Zusammenhang des primären, antimikrobiellen Effekts der neutrophilen Granulozyten, die NETs zu erwähnen, die u.a. durch Interaktion der neutrophilen Granulozyten mit LPS-aktivierten Thrombozyten entstehen (Hickey et al., 2009).

NETs bestehen aus Chromatin und diversen Proteinen, die aus Peroxidase-positiven und Peroxidase-negativen Granula stammen, wie Defensine, Myeloperoxidase, Cathepsin G und Lactoferrin. Sie enthalten jedoch kein Aktin, Tubulin, Annexin I oder andere Proteine aus dem Zytoplasma (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2007). Außerdem wurde gezeigt, dass NETs eine hohe Menge an DNA enthalten. Durch Behandlung mit DNase und Histon-Antikörpern kann eine Desintegration der NETs erzielt werden (Brinkmann et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass NETs Bakterien einfangen und diese nicht nur durch die in den NETs sezernierten antimikrobiellen Proteine sondern auch über ihre fibröse Struktur töten können (Brinkmann et al., 2004).

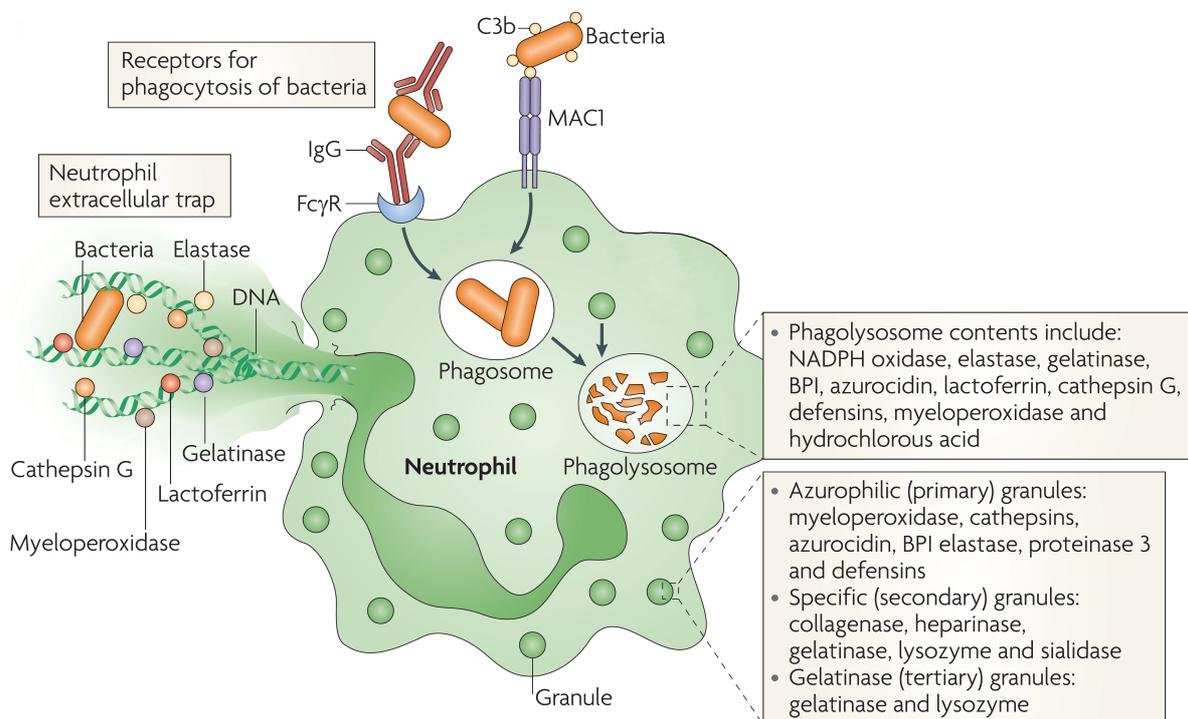


Abbildung 3: Antibakterielle "Waffen" der neutrophilen Granulozyten • BPI elastase: permeability-increasing protein elastase, C3b: Komplementfaktor 3b, IgG: Immunglobulin, FcγR: Fc-Gamma-Rezeptor, MAC1: Makrophagen-1-Antigen, NADPH: Nicotinamadenindinukleotidphosphat; modifiziert aus Hickey et al., 2009

4. Zusammenhänge zwischen der angeborenen Immunantwort und dem Gerinnungssystem

Eine Reihe von Beobachtungen zeigten, dass Inflammation und Koagulation miteinander verbunden sind. Es ist bekannt, dass beispielsweise während einer viralen Infektion die Konzentration der Gerinnungsfaktoren im Blut ansteigt (Lee et al., 2003). Zudem konnte eine *de Novo*-Synthese von TF in Leukozyten beobachtet werden, wenn diese durch inflammatorische Zytogene oder LPS aktiviert worden waren (Darbousset et al., 2012; Rivers et al., 1975). Auch kann eine Aktivierung des Komplementsystems vermehrt zur Expression negativ geladener Phospholipide in der Plasmamembran führen, die eine erhöhte Aktivierung der Gerinnungskaskade bewirkt (Bever et al., 1997; Sim et al., 1989).

Auch Thrombozyten, deren Funktion bislang vorwiegend während der Blutstillung erforscht wurde, spielen eine wichtige Rolle bei Infektionen (Hickey et al., 2009).

Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen zu einem erhöhten Bakteriensterben führt (Prasad et al., 2015).

4.1. Komplementsystem und Gerinnung

Das Komplementsystem wurde als wichtiger Aktivator der Blutgerinnung während der systemischen Infektion und Sepsis identifiziert (Zhao et al. 2015). Während der Zirkulation der Pathogene im Blut stellt es einen bedeutenden Stimulator der Fibrinbildung und der damit verbundenen Verhinderung der weiteren Ausbreitung von Pathogenen dar (Markiewski et al., 2007). Der Komplementfaktor C5a ist in der Lage, die prokoagulatorische Aktivität zu stimulieren und die Fibrinolyse zu hemmen, da durch ihn die Expression von TF und Plasminogenaktivatorinhibitor 1 (PAI-1) vermittelt wird (Ritis et al., 2006). Dies geschieht durch die Bindung von C5a an C5a-Rezeptoren, die auf Leukozyten wie neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert sind. Diese können über C5aR, sofern C5a als Chemokin wirkt, angelockt werden oder zur Produktion von TF stimuliert werden (Ritis et al., 2006). Des Weiteren ist die Mannose-bindende-Lektin-assoziierte Serinprotease-2 in der Lage, die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin zu erleichtern und damit die Gerinnungsaktivität zu stimulieren (Krarup et al., 2007). Zusätzlich erhöhen Gerinnungsfaktoren die Produktion von C5a, welcher wiederum die Gerinnungsaktivität erhöht (Ghebrehiwet et al., 1981; Huber-Lang et al., 2006, Subramaniam et al., 2017).

4.2. Thrombozyten und Gerinnung

Thrombozyten sind ebenfalls an der Verbindung zwischen Immunsystem und Koagulation beteiligt. Zusätzlich zur Aktivierung des extrinsischen Gerinnungswegs über Faktor XII, die durch die Ausschüttung von Polyphosphaten aus Thrombozyten aktiviert wird, spielen sie eine wichtige Rolle in der Aktivierung von TF durch die Freisetzung von Proteindisulfid-Isomerase (Reinhardt, 2008). Während der Inflammation werden Zytokine wie IL-6 freigesetzt, die nicht nur die Produktion von Thrombozyten erhöhen, sondern auch die

prothrombotische Potenz der Thrombozyten (Burstein, 1997). Thrombozyten selbst sind in der Lage, bakterielle Wandstrukturen beziehungsweise PAMP mit Hilfe ihrer TLRs zu erkennen, wodurch sie unter anderem aktiviert werden (Aslam et al., 2006; Shiraki et al., 2004). Durch die Produktion von Interleukinen und Chemokinen (Yeaman, 2010) melden sie dem Immunsystem die Gefahr einer Infektion und aktivieren und rekrutieren Leukozyten (Buttrum et al., 1993; McEver, 2001). Außerdem sind sie in der Lage, die Bildung von NETs zu stimulieren. Sie können selbst antimikrobielle Peptide freisetzen und das Komplementsystem aktivieren (Engelmann & Massberg, 2013; Gando et al., 2015). Aufgrund dieser Mechanismen wird während einer Infektion auf unterschiedliche Art und Weise die Entstehung von Thrombosen stimuliert. Dies kann bis zur Entgleisung des Gleichgewichts zwischen Gerinnung und Fibrinolyse und somit zur DIG führen.

4.3. Monozyten und neutrophile Granulozyten als Verbindung zwischen Immunsystem und Koagulation

4.3.1. Monozyten und Koagulation

Monozyten werden während einer Infektion zusammen mit neutrophilen Granulozyten besonders schnell rekrutiert und stellen daher eine wichtige Komponente der Immunantwort dar. Monozyten besitzen die Fähigkeit, TF zu synthetisieren und auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren (Giesen, 1999; Müller et al., 2003; Rivers et al., 1975).

4.3.2. Neutrophile Granulozyten und Koagulation

Die in den NETs enthaltene, neutrophile Elastase ist in der Lage, die Gerinnungskaskade durch die Spaltung von TFPI zu aktivieren. Die proteolytische Aktivität der neutrophilen Elastase wird durch die extrazellulären Nukleosomen in den NETs erhöht (Massberg et al., 2010). Darüberhinaus wurde gezeigt, dass NETs auch die Bildung von Faktor XIIa stimulieren (Brühl et al., 2012). Somit sind Neutrophile von besonderer Bedeutung für die Propagation von Thrombosen (Pfeiler et al., 2017).

4.4. Immunothrombose – Eine Hypothese

Der Mechanismus der Immunothrombose vermittelt eine Verbindung zwischen der Immunantwort und der intravaskulären Bildung von Fibrin. Die Aktivierung von myeloiden Immunzellen und des Komplementsystems, die unter anderem durch die Bindung von PAMPs und DAMPs geschieht (Ito, 2014), kann eine Stimulation der Gerinnungskaskade initiieren, die letztendlich zur Bildung von Fibrin führen kann.

Erste Erkenntnisse, auf die sich die Hypothese stützt, zeigen, dass inflammatorische Monozyten TF exprimieren können und so prokoagulatorisch wirksam sind. Die Wichtigkeit neutrophiler Granulozyten und ihrer NETs während der systemischen Infektion mit *E. coli* ist ebenfalls gezeigt worden (Abb.4).

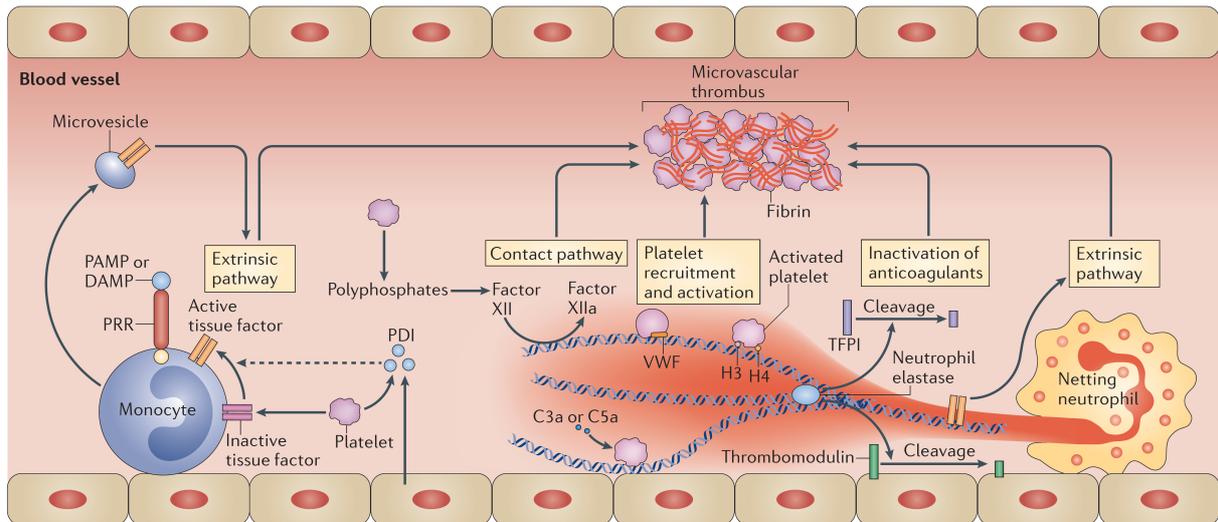


Abbildung 4: Hypothese über den Ablauf der Immunthrombose; Engelmann & Massberg, 2013

4.5. Die Rolle des Fibrin im Kampf gegen Bakterien

Es gibt bereits einige Hinweise auf einen protektiven Effekt von Fibrin in Organismen bei systemischen Infektionen (Palankar et al., 2019). Es zeigte sich beispielsweise, dass die Ausbreitung und Extravasation von Pathogenen durch die Bildung von Fibrin verhindert wird (Engelmann & Massberg, 2013; Massberg et al., 2010). Außerdem erkrankten Fibrinogen-defiziente Tiere bereits vor der Geburt an Infektionen (Johnson et al., 2003) und es gibt Hinweise, dass Fibrin als Aktivator von Immunzellen fungieren kann (Flick et al., 2004; Szaba & Smiley, 2002).

II. Zielsetzung

Der Ablauf der Bildung mikrovaskulärer Thrombosen wurde bisher nur unzureichend erforscht. In der vorliegenden Arbeit soll die Kinetik der Immunthrombose während systemischer Infektionen mit *E. coli* detailliert analysiert werden. Hierbei wird insbesondere auf den initialen Prozess des Mechanismus eingegangen und werden potentielle antimikrobielle Mechanismen der Fibrinbildung untersucht.

1. Identifikation der Immunzellen, welche die intravaskuläre Fibrinbildung und mikrovaskuläre Thrombosen während der systemischen Infektion mit *E. coli* initiieren

Hierbei sollen die Zellen, welche die Bildung des Fibrins initiieren, identifiziert werden und der Einfluss des Komplementsystems auf die Zellrekrutierung zum frühen Zeitpunkt der systemischen Infektion analysiert werden.

2. Charakterisierung der zeitabhängigen Rekrutierung von Immunzellen

Hierbei soll eine Übersicht über die Kinetik der am Mechanismus der Mikrothrombose beteiligten Immunzellen gewonnen werden.

3. Interaktionen zwischen Bakterien, Fibrin-Bildung und rekrutierten Immunzellen bei der Bildung mikrovaskulärer Thrombosen

Um weitere Hinweise über den Vorgang der Bildung mikrovaskulärer Thrombosen zu erhalten sollen die Interaktionen zwischen Immunzellen, Fibrin und Bakterien untersucht werden.

4. Mechanismen der fibrin-induzierten Elimination von Bakterien *in vivo* und *in vitro*

Desweiteren sollen die Wirkungen von Fibrin auf das Bakterienüberleben *in vivo* und *in vitro* während des Prozesses der Immunothrombose getestet werden.

III. Material

1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

96-Well Platte flacher Boden	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Bakterienschüttler Certomat R HK	Braun (Melsungen, D)
Basic orbital shaker 250	IKA®-Werke GmbH & CO. KG (Staufen, D)
BD Facsaria III	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Cup & Pin pro	Tem Innovations GmbH, München
Einbettkassette für Histologie, Unityp	Kartell Labware (Mailand, I)
Einmalspritzen 2ml, 5ml, 10ml, 20ml	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
ELISA Reader Dynatech MR7000	Dynatech Laboratories (Alexandria, USA)
HettCube 200 Inkubator	Hettich (Tuttlingen, D)
Impföse hart	VWR-International (München, D)
Kryoeinbettkassette	Thermo Scientific Heraeus (Hanau, D)
Kryostat Leica CM 1850	Leica Biosystems (Wetzlar, D)
Küvetten Rotem	Tem Innovations GmbH (München, D)
Lichtmikroskop Axiovert 100	Zeiss (Jena, D)
LSM 510 Meta	Zeiss (Jena, D)
Menzel Deckgläser 24x50 mm	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Menzel-Gläser Superfrost	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Microlance™ Kanüle 30 G 1/2 0,29x13 mm	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Perfusor-Spritzen	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Petrischale PS leicht m. Nocken 94x16mm	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Ö)
pH-Meter HI 221	Hanna Instruments (Kehl a. Rhein, D)
Photometer	Spectra Rainbow TECAN (Crailsheim, D)
Reagiergefäß 1,5 ml Easy Cap, 2 ml Easy Cap	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Rührer MR 2002	Heidolph (Schwabach, D)
Safety-Multifly Kanüle	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Sterilbank HLB 2472	Thermo Scientific Heraeus (Hanau, D)
Thrombelastograph D (Roteg)	Pentapharm GmbH (München, D)
Trockenschrank T6530	Thermo Scientific Heraeus (Hanau, D)
Unihood Inkubationshaube 650	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH (Planegg, D)
Vortex-Genie 2	Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Waage MC1 LC 620 S	Sartorius (Göttingen, D)
Zählkammer Neubauer Improved	Brand (Wertheim, D)
Zentrifuge 5415	Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifugen: Rotina 35R, Universal 32, Mikro 22R	Hettich (Tuttlingen, D)
Zentrifugenröhrchen, konisch aus Polypropylen, 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson (Heidelberg, D)

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

2. Chemikalien

α-GalCer Loaded Recombinant CD1d Tetramer	Proimmune (Oxford, UK)
Albumin Bovine Fraction V	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Bacto Agar	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Beriplex P/N 500	CSL Behring (Hattersheim am Main, D)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Roth (Karlsruhe, D)
Calciumchlorid	Sigma (Deisenhofen, D)
Dabigatranexilat	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Ingelheim am Rhein, D)
Dade® Innovin®	Siemens AG (München, D)
Deshirudin	Canyon Pharmaceuticals AG (Basel CH)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
E. coli probe, ATTO	Miacom diagnostics (Düsseldorf, D)
EBSS-Medium Gibco™	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, D)
Fentanyl	Rotexmedica GmbH (Trittau, D)
Fetal Bovine Serum	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Fibrinogen human	Acris Antibodies (Herford, D)
Formaldehyd	Roth (Karlsruhe, D)
Gelatine from cool water fish	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Glass Beads, acid-washed	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
H-D-Pro-Phe-Arg-chloromethylketone	Bachem (Bubendorf, CHE)
Hepes	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, D)
LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Lysis Puffer	Miacom diagnostics (Düsseldorf, D)
Medetomidin	Pfizer GmbH (Karlsruhe, D)
Methanol	Roth (Karlsruhe, D)
Midazolam	Hameln Pharmaceuticals GmbH (Hameln, D)
Mounting Medium	Miacom diagnostics (Düsseldorf, D)
Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories (Eching, D)
Mowiol	Calbiochem (Darmstadt, D)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, D)
Negative Control Recombinant CD1d Tetramer	Proimmune (Oxford, UK)
Paraformaldehyd	Roth (Karlsruhe, D)
Rivaroxaban	Santa Cruz (Heidelberg, D)
RPMI-Medium 1640 Gibco™	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
S-2222	Haemochrom Diagnostica (Essen, D)
Saccharose	Sigma (Deisenhofen, D)
Saponin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Star-tem	Tem International GmbH (München, D)
Stop solution	Miacom diagnostics (Düsseldorf, D)
Thromboplastin	Siemens Healthcare (Marburg, D)
Thromborel S	Hartenstein (Würzburg, D)
Tissue Plasminogen Aktivator human	Sigma (Deisenhofen, D)
Tranexamsäure	Sigma (Deisenhofen, D)
Tri-Natriumcitrat Dihydrat (TNC)	Roth (Karlsruhe, D)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)

Tabelle 2: Chemikalien

3. Antikörper

Alexa Fluor Antikörper Labeling Kits, Alexa 488, Alexa 550	Life Technologies (Regensburg, D)
Anti Pecam-1-Antikörper (mouse monoclonal)	Stanta Cruz (Heidelberg, D)
Anti-B-Phycoerythrin Antikörper (rabbit polyclonal)	Novus Biologicals (Cambridge, UK)
Anti-CCR2-Antikörper MC-21 (mouse monoclonal)	Prof. Dr. rer. nat. Matthias Mack, Institute for Technical Microbiology (Mannheim, D)
Anti-CD127-Antikörper (rabbit anti mouse)	eBioscience (Frankfurt am Main, D)
Anti-CD41-Antikörper (rat anti mouse)	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-CD42b-Depletionsantikörper (rat monoclonal)	Emfret Analytics (Würzburg, D)
Anti-CD90.2-Antikörper (rabbit anti mouse)	Novus Biologicals (Cambridge, UK)
Anti-Faktor-XII-AK (rabbit monoclonal)	Novus Biologicals (Cambridge, UK)
Anti-Fibrin II β Chain-Antikörper (mouse monoclonal)	WAK-Chemie Medical GmbH (Steinbach, D)
Anti-GFP-Antikörper Alexa Flour 488 (rabbit polyclonal)	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Ly6C-Antikörper (monoclonal rat anti mouse)	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Ly6G-Antikörper (rat anti mouse)	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Mouse-Ly6G-Depletionsantikörper (rat anti mouse, Kon 1A8)	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Anti-Mouse-TCR β Chain (Clone H57-597 (RUO))	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Anti-Stabilin-2-Antikörper (mouse monoclonal)	Novus Biologicals (Cambridge, UK)
Anti-TF-Antikörper (1H1) (monoclonal rabbit anti mouse)	Gentech-Roche (Rotkreuz, CH)
Goat-anti-Mouse-Antikörper Alexa 488, Alexa 594, 550	Life Technologies (Regensburg, D)
Goat-anti-Rabbit-Antikörper Alexa 488, Alexa 594, Alexa 550	Life Technologies (Regensburg, D)
Goat-anti-Rat-Antikörper Alexa 488, Alexa 594, Alexa 550	Life Technologies (Regensburg, D)
Mouse IgG1 κ Isotype Control	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Rat IgG2a κ Isotype Control	Becton Dickinson (Heidelberg, D)

Tabelle 3: Antikörper

4. Puffer

CaCl₂	225 mg CaCl ₂ x 2H ₂ O in 50 ml bidest. H ₂ O
Ca/Hepes	10 mM Hepes 100 mM CaCl ₂ in bidest. H ₂ O pH 7,4
PBS	137 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ in bidest. H ₂ O pH 7,4
LB-Agar	LB-Medium + Agar
LB-Medium	NaCl Hefeextrakt Trypton
Rhesus-Puffer	138 mM NaCl 2,7 mM KCl 12 mM NaHCO ₃ 0,4 mM NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O 1 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O 5 mM D(+)-Glucose 5 mM Hepes pH 7,35
Saponin-Permeabilisierungs-/Block-Puffer	0.2 % Gelatine from cold water fish 0.5 % BSA 0.1 % Saponin
TNC	125 mM TNC in bidest. H ₂ O
TritonX-Permeabilisierungs-/Block-Puffer	2,5 % BSA 0,5 % Triton

Tabelle 4: Puffer

IV. Methoden

1. Mikrobiologische Methoden

1.1. Verwendete Bakterien

Für die Induktion der systemischen Infektion wurden *E. coli* Bakterien des Stamms BL21 verwendet. Diese waren bereits mit einem GFP enthaltenden Plasmid transfiziert.

1.2. Kultivierung der Bakterien

Zur Kultivierung der *E.coli* wurde eine Bakterienlösung in 20% Glycerol angelegt und bei -80°C gelagert. Diese wurde zur Inokulation der Bakterien in flüssigem LB-Nährmedium verwendet. Dabei wurde ein Teil der Lösung in 10 ml Flüssigmedium gelöst und anschließend bei 37°C für 12 Std. im Rüttler bei 200 Umdrehungen pro Min. inkubiert.

1.3. Vorbereitung der Bakterien für weitere Experimente

1.3.1. Lösung der Bakterien in PBS

Die nach der Inokulation erhaltene *E. coli* Kultur wurde bei 1000 x g für 10 Min. zentrifugiert, um ein Bakterien-Pellet zu erhalten. Nach Entfernung des Überstands wurden die Bakterien in 10 ml PBS resuspendiert. Diese Arbeitsschritte wurden anschließend zweimal wiederholt, um eine, von LB-Nährmedium freie, Bakterienlösung zu erhalten.

1.3.2. Keimzahlermittlung

Zur Ermittlung der Keimzahl in der *E. coli* Lösung wurde die optische Dichte (OD) gemessen. Dies wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers realisiert. Bei der Belichtung einer Probe aus der *E. coli* Lösung mit einer Wellenlänge von 600 nm entspricht die gemessene Absorption, im Vergleich zum Leerwert des reinen Mediums (PBS), der OD. Die OD der *E. coli* Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase liegt in einem Bereich von 0,2 bis 0,7. Dies entspricht definitionsgemäß nach standardisierten Messungen einer Menge von ca.1-2,5 x 10⁸ KBE/ml.

2. Experimente mit Plasma

2.1. Blutentnahme

Die Blutentnahme wurde bei gesunden Probanden wie auch bei Mäusen durchgeführt. Zur Hemmung der Blutgerinnung wurden die Abnahmespritzen mit 12,5 mM Trinatriumcitrat versetzt. Humane Blutproben wurden von gesunden Blutspendern, die keine gerinnungsbeeinflussenden Medikamente eingenommen hatten, gewonnen. Die Abnahme mittels Butterflykatheter erfolgte, nach vorausgehender Hautdesinfektion, in der Armbeuge.

Murine Blutproben wurden durch eine kardiale Blutentnahme an der narkotisierten Maus gewonnen. Die Abnahme erfolgte in 2 bis 20 ml fassende Spritzen.

2.2. Gewinnung von Plättchen freiem Plasma (PPP)

Nach der Blutentnahme wurde sowohl humanes als auch murines Vollblut bei 190 x g für 15 Min. bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert, um zellfreies, plättchenreiches Plasma zu erhalten. Nach Absaugen des plättchenreichen Plasmas (PRPs) wurde die Probe für 20 Min. bei Raumtemperatur mit 635 x g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands, des PPP, wurde der Vorgang noch einmal wiederholt.

2.3. *In vitro* Fibrinbildung

Um festzustellen, ob die Bildung von Fibrin einen bakteriziden Effekt auf die Bakterien besitzt und welche Mechanismen daran beteiligt sind, wurden zwei Modelle eingesetzt. Dabei sollten möglichst alle weiteren, im Blut enthaltenen Einflussfaktoren auf die Bakterien ausgeschlossen werden. In Modell 1, wurden ausschließlich Fibrinogen und Thrombin zur Generierung eines Fibrinthrombus verwendet. In Modell 2 wurden sowohl murines als auch humanes, plättchenfreies Plasma verwendet und mit TF stimuliert. Für einen Vergleich wurde in beiden Modellen zur Hemmung der Fibrinbildung Hirudin in einer Konzentration von 100µg/ml als Antikoagulantium zugefügt und vor der Hinzugabe der Bakterien dem Fibrinogen oder Plasma zugesetzt.

Um den Effekt der Fibrinolyse charakterisieren zu können, wurden direkt nach den Bakterien 150 µM Tranexamsäure, welche durch die Verhinderung der Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin, die Fibrinolyse hemmt, hinzugefügt. Des Weiteren wurden nach fünf- bis achtminütiger Generierung des Thrombus, zur Verstärkung der Fibrinolyse, 10nM tPA bzw. 20 µM Plasminogen hinzugegeben. Als Kontrollexperimente wurden die Koagulate mit den entsprechenden Vehikellösungen inkubiert.

Der Versuchsaufbau gestaltete sich wie folgt:

Modell 1: 40µl Fibrinogen (1µg/µl) + $6,4 \times 10^8$ KBE (in 200µl PBS) + 40 µl Thrombin (100U/µl) + 40µ Ca (30mM)

Modell 2 – human: 20µl PPP + $6,4 \times 10^8$ KBE (in 200µl PBS) + 40µ Ca (30mM) + 20µl Innovin (1mg/ml)

Modell 2 – murin: 20µl PPP + Hirudin/Kontrolllösung + $3,2 \times 10^8$ KBE (in 100µl PBS) + 40µ Ca (30mM) + 20µl Innovin (1mg/ml)

Ausgangssubstanz	<i>E. coli</i> Menge	Aktivierung			Inkubationszeit
		Innovin [C]	CaCl [C]	Thrombin [C]	
Fibrinogen	6,4 x10 ⁸	-	-	1420 U/ml	30 min, 90 min
PPP human	6,4 x10 ⁸	70 µg/ml	34,5 µg/ml	-	30 min, 90 min
PPP murin	3,2 x10 ⁸	70 µg/ml	34,5 µg/ml	-	30 min, 90 min

Tabelle 5: *In vitro* Fibrinbildung

Innerhalb einer Inkubationszeit von 30 bzw. 90 Min., bildet sich im Inkubator bei 37 °C, bei 100 U/Min ein fester Fibrinthrombus. Dieses wurde mit Hilfe von 15 Glaskügelchen in einem 15 ml Röhrchen auf einem Reagenzglasschüttler bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Min. geschüttelt und damit vollständig homogenisiert. Aus dem homogenisierten Koagel wurde eine Verdünnungsreihe (10⁻¹ bis 10⁻⁷) angefertigt. Davon wurden jeweils 100 µl auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden die KBE aus dem homogenisierten Thrombus bestimmt.

Zusätzlich erfolgte die visuelle Darstellung der Entstehung des Thrombus, um weitere Aufschlüsse über das bakterielle Überleben während der Fibrinbildung zu gewinnen. Die Generierung des Koagels erfolgte jedoch hierbei nicht in Reagenzgefäßen, sondern in einer 96-Well-Platte und mit teilweise Fluoreszenz markiertem Fibrinogen.

Versuchsaufbau: 40µl Fibrinogen (1µg/µl) + 40µl Fibrinogen Alexa Flour 550 (1µg/µl) + 6,4 x10⁸ KBE (in 200µl PBS) + 40 µl Thrombin (100U/µl) + 40µ Ca (30mM)

Das markierte Fibrinogen ermöglicht die Darstellung der Fibrinfäden innerhalb des Thrombus. Um festzustellen, ob die Bakterien im Experiment lebten oder bereits tot waren, wurde das Live/Dead-Staining Kit von ThermoFischer verwendet. Der Farbstoff SYTO® 9 färbt alle Bakterien an – unabhängig der Vitalität, trotz intakter Membran. Propidiumiodid hingegen färbt ausschließlich tote Bakterien an, da diese Nukleinsäure-Färbung nur perforierte Zellmembranen überschreitet. Es wurden unterschiedliche Inkubationszeiten gewählt, um den Ablauf der Fibrinbildung beobachten zu können.

3. *In vivo* Experimente

3.1. Tierstämme

Die folgenden Tierstämme wurden im Experiment zur systemischen Infektion eingesetzt.

Tierstamm	Charakteristik
C5-defiziente Mäuse (B10.D2-Hc0 H2d H2-T18c/oSnJ)	Defizienz des Komplementfaktors C5
C57BL/6J	Wildtyp-Stamm
C57BL/10J	Wildtyp-Stamm
CX3CR1eGFP/+ (B6.129P-Cx3cr1tm1Litt/J)	Einfügen eines GFP-Exons in CX3CR1-Protein → Darstellung der patrouillierenden Monozyten mit grün fluoreszierendem Farbstoff
Jα18-defiziente Mäuse	Defizienz in NKT-Zellen: Fehlen der Alpha-Kette des TCR-β
Vα14-Jα281 transgenetische Mäuse	Erhöhte NKT-Zell-Zahl: vermehrte Expression der Alpha-Kette des TCR-β

Tabelle 6: Tierstämme

3.2. Haltung der Tiere

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Durchführung der *in vivo*-Experimente die Maus als Versuchstier gewählt. Nach Bestätigung der Keimfreiheit und Gesundheit der Tiere wurden sie in die Tierhaltung des Walter Brendel Zentrums eingebracht. Dort erfolgte die Haltung unter SPF-Bedingungen (spezifisch-pathogen-frei).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden entsprechend des Tierschutzgesetzes (TierSchG in der Fassung vom 18. Mai 2006) genehmigt (Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-42-2015).

3.3. Bakterien-Injektionsmodelle

Die bakteriellen Infektionen mit *E. coli* wurden wie folgt durchgeführt:

3.4.1. Jugularvenen-Injektion

Bei der Jugularvenen-Injektion erfolgte die Injektion der Bakterien mit Hilfe eines Schlauch-Katheters in die *V. jugularis*. Die Narkose bestand aus einer Einleitung mit inhalativem Isofluran (1-2%iges Isofluran-Sauerstoffgemisch) und einer Lösung aus Fentanyl, (0,05 mg/kg KG), Midazolam (5,0 mg/kg KG) und Medetomidin (0,5 mg/kg KG), welche i.p. injiziert wurde. Nach Präparation der *V. jugularis* wurde mit Hilfe eines Schlauch-Katheters die Bakterienlösung injiziert. Dabei wurden $3,2 \times 10^8$ KBE, gelöst in 100 µl PBS, in die Vene appliziert. Anschließend wurde den Tieren nach 30 und 60 Minuten sowie nach 3 und 6 Std.

durch kardiale Punktion Blut entnommen. Daraufhin erfolgte die Euthanasie durch zervikale Dislokation.

3.4.2. Schwanzveneninjektion

Für die Schwanzveneninjektion wurden die Tiere in einem Retrainer positioniert und nicht narkotisiert. Nach Punktion der *V. coccygea lateralis* wurden dem Tier 5×10^7 oder $3,2 \times 10^8$ KBE, gelöst in 100 µl PBS, injiziert. Nach 60 Min. sowie 3, 6, 24 und 48 Std. wurden die Tiere zur kardialen Blutentnahme mit der oben erläuterten Narkoselösung narkotisiert. Im Anschluss wurden sie durch zervikale Dislokation euthanasiert.

3.4. Vorbehandlungen der Tiere

Um den Hergang und Ablauf der Immunothrombose *in vivo* skizzieren zu können, wurden unterschiedliche Proteine inhibiert sowie Zellen depletiert. Des Weiteren wurden bestimmte Antikoagulantien eingesetzt, um den Einfluss der Fibrinbildung auf die Bakterienlast und die Zellrekrutierung zu charakterisieren. Hierfür wurden die Tiere unterschiedlichen Behandlungen vor der Infektion mit *E. coli* unterzogen.

3.4.1. Rivaroxaban-Behandlung

Rivaroxaban, ein Faktor Xa Inhibitor, wird in der Humanmedizin als orales Antikoagulantium zur Prophylaxe und Therapie von Thrombosen verwendet. Rivaroxaban wurde den Tieren 4 Std. vor Infektion verabreicht. Gelöst in PBS wurde die Substanz in einer Menge von 3 mg/kg KG über die Schwanzvene injiziert. Währenddessen befanden sich die Mäuse in einem Retrainer. Die Kontrollgruppe erhielt eine Injektion des gleichen Volumens von PBS.

3.4.2. Dabigatran-Behandlung

Dabigatran ist ein Thrombin-Inhibitor, der ebenfalls zur Prophylaxe von thromboembolischen Ereignissen und Thrombosen verwendet wird. Die Dabigatran-Behandlung der Tiere erfolgte oral. Über eine Magensonde aus Metall wurde den Tieren eine Menge von 120 mg/kg KG 4 Std. vor Infektion verabreicht. Als Vehikellösung diente hierbei H₂O.

3.4.3. Zelldepletion

Die Entfernung von Zellen aus einem Organismus mit Hilfe von Antikörpern wird als Depletion bezeichnet. Um den Einfluss der unterschiedlichen Zelltypen auf die Generierung von Fibrin und das Überleben der Bakterien während der Immunothrombose zu charakterisieren, wurden unterschiedliche Zelltypen vor der *E. coli* Injektion depletiert.

3.4.3.a. Depletion neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden mit einem Rat anti-Mouse Ly6G Antikörper (Clone 1A8) depletiert. Der Antikörper wurde 12 Std. vor der Pathogeninjektion in einer Menge von 5 mg/kg KG über die Schwanzvene i.v. appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt zum gleichen Zeitpunkt eine Injektion des entsprechenden Isotyp-Antikörpers (rat IgG2b κ Isotyp).

3.4.3.b. Depletion inflammatorischer Monozyten

Zur Depletion von inflammatorischen Monozyten wurde ein monoklonaler CCR2 Antikörper (MC-21) verwendet. Dieser wurde 24 Std. vor Pathogen-Applikation in einer Menge von 20 µg/kg KG, i.p. injiziert. Als Isotypkontrolle wurde der entsprechende Antikörper (Mouse IgG1 κ Isotyp) verwendet.

3.4.3.c. Depletion von Thrombozyten

Zur Depletion der Thrombozyten wurde ein Rat anti-Mouse GPIb (CD42b) Antikörper i.v. über die Schwanzvene 12 Std. vor Pathogeninjektion appliziert. Die Menge des Antikörpers betrug 2 mg/kg KG. Als Kontrolle wurde der entsprechende Isotyp (rat IgG2b κ Isotyp) in gleicher Art und Menge verwendet.

3.4.4. TF-Inhibition

Zur Hemmung der TF-Aktivität wurde ein monoklonaler anti-TF-Antikörper verwendet (Clone 1H1). Dieser wurde 30 Min. vor der *E. coli* Injektion i.v. über die Schwanzvene in einer Menge von 25 mg/kg KG verabreicht. Der Kontrollgruppe wurde der entsprechende Isotyp-Antikörper (Mouse IgG1 κ Isotyp) injiziert.

3.5. Gewinnung der Organe

Nach erfolgter Euthanasie wurden die Tiere sezziert und Herz, Lunge, Leber, Nieren, Milz und Hirn entnommen. Dabei wurden jeweils ca. 90% des Organs direkt in 4% PFA gelegt und 1 Std. bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden sie für 12 Std. in 30% Saccharose bei 4°C gelagert. Zuletzt wurden die Organe, nach Abstreifen der Saccharose, in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die restlichen 10% wurden für die Bestimmung der Bakterienlast verwendet.

3.6. Durchführung der KBE Analyse im Gewebe

Um eine Aussage über die bestehende Bakterienlast in den Organen der Tiere nach Infektion treffen zu können wurden KBE-Analysen durchgeführt.

Vor Gewinnung der Organe wurden bereits vorbeschriftete Eppendorfgefäße gewogen. Darin wurden die repräsentativen Organstückchen auf Eis gelagert und anschließend das gesamte Eppendorfgefäß inklusive Organinhalt gewogen. Das Gewicht des Organstücks wurde durch Subtraktion der reinen Eppendorfmasse bestimmt.

Die anschließende Zerteilung des Organs erfolgte unter dem Abzug, zunächst mit einem Skalpell in einer Petrischale. Zur weiteren Homogenisierung wurden die Organstückchen in einem 15-ml-Röhrchen mit 500 µl H₂O und 15 Glaskügelchen auf einem Reagenzglasschüttler bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Min. geschüttelt und homogenisiert. Von der anschließend erstellten Verdünnungsreihe (10⁻¹ bis 10⁻⁷) wurden jeweils 100 µl auf LB-Agarplatten ausplattiert. Die beimpften Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag erfolgte die Auszählung der gewachsenen

KBE. Diese wurden auf das Gewicht des Organstückchens heruntergerechnet und in KBE/ μ g angegeben.

4. Zellanalysen mit Hilfe von Durchflusszytometrie und funktionellen Tests

4.1. Lymphozytenisolation

Um die Lymphozyten aus der Leber der Versuchstiere zu isolieren, wurde diese zunächst am bereits euthanasierten Tier mit EBSS-Puffer perfundiert. Hierfür wurde ein Katheter in die Pfortader der Tiere gelegt und fixiert. Danach erfolgte die Perfusion mit 50 ml des Puffers mit Hilfe einer Perfusor-Spritze. Anschließend wurde die Leber durch ein 100 μ m-Zellsieb gepresst. Die Zellen wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen und mit 5 ml EBSS-Puffer aufgefüllt. Nach dem ersten Waschschrift mit EBSS-Puffer, bei dem die Zellen mit 1400 RPM für 10 Min. zentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes in 5 ml Puffer resuspendiert wurden, erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS bei gleicher Zentrifugationsgeschwindigkeit für 5 Min.. Anschließend wurde der Überstand erneut entfernt und das Zellpellet in 6 ml einer 40 %ige Ficoll-Lösung resuspendiert. Nach dem vorsichtigen Auftragen der Zellsuspension auf eine 80 %ige Ficoll-Lösung-Schicht (4 ml) mit Hilfe von Einmalpipetten wurde die Mischung bei 2200 RPM für 20 Min. ohne Bremse zentrifugiert. Danach ließ sich die mittlere, klare Phase mit einer Einmalpipette vorsichtig absaugen. Daraufhin folgte ein Waschschrift mit 30 ml RPMI-Medium, das zu 5 % mit FBS versetzt wurde. Dies geschah bei 1400 RPM für 10 Min. Abschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und in einer Zellkammer ausgezählt.

4.2. NKT-Zellfärbung

Zur Identifikation der NKT-Zellen in der isolierten Lymphozytensuspension wurden die Zellen mit Fluoreszenz-markierten CD1d/ α GalCer-Tetrameren, welche spezifisch an NKT-Zellen binden in einer Konzentration von 1/1000 in einer Zellkammer für eine Std. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Als zweiten Schritt wurde nach gleichem Vorgehen ein Fluoreszenz-markierter anti-TF-Antikörper (1/600) benutzt. Im Anschluss erfolgte die Visualisierung mittels konfokalem Mikroskop.

4.3. Durchflusszytometrie

Die Methodik der Durchflusszytometrie ermöglicht sowohl eine Analyse der Zellen, als auch ihre Isolierung.

4.3.1. FACS-Analyse

Das Prinzip der FACS-Analyse beruht auf der Detektion von emittiertem Licht, das von der Zelle ausgeht. Die Zellen werden einzeln durch eine Glasküvette geleitet und können auf diese Weise auch einzeln von dem, von der Laser-Quelle des FACS-Geräts, ausgesendeten Lichtstrahl erfasst werden. Das FACS-Gerät besitzt unterschiedliche Detektoren, welche die

Größe der Zellen durch die Erfassung der Lichtbeugung im flachen Winkel messen (Vorwärtsstreulicht), sowie die Brechung des Lichts im rechten Winkel (Seitwärtsstreulicht) bestimmen, die durch die Granularität des Zellkerns bestimmt wird. Des Weiteren messen die Detektoren die Emissionen von Fluorophoren, die an die Zellen gebunden sind. Diese Emission, die bei bestimmten Wellenlängen ein Maximum aufweist, wird durch die vorangegangene Färbung der Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern, die sich gegen bestimmte Oberflächenmarker oder Proteine der Zellen richten, erzielt. Dabei erfolgt die Anregung mit einer für den jeweiligen Fluorophor charakteristischen Wellenlänge.

Die FACS-Analyse erfolgte an den aus der Leber gewonnenen Lymphozyten. Zur Detektion der NKT-Zellen innerhalb der gesamten Lymphozytenpopulation wurden CD1d/ α GalCer-Tetramere, mit PE-Markierung, verwendet. Die genannten Tetramere binden spezifisch an NKT-Zellen. Zusätzlich wurde ein anti-TF-Antikörper eingesetzt, um die TF-Expression der Zellen charakterisieren zu können. Dafür wurden die Lymphozyten nach der Isolation zunächst mit 400 x g für 7 Min. ohne Bremse zentrifugiert und der Überstand entfernt. Darauf folgend wurden die Tetramere in einer Verdünnung von 1/1000 und der anti-TF-Antikörper in einer Konzentration von 1/600 zu der Zellsuspension gegeben. Danach wurde die Suspension 30 Min. bei 4°C gelagert. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS und der Zentrifugation mit 400 x g für 7 Min. wurde die Prozedur mit einem markierten sekundären Antikörper, der gegen den anti-TF-Antikörper gerichtet war, wiederholt. Nach einem weiteren Waschschriff wurde die FACS-Analyse durchgeführt. Es erfolgten sowohl Einzelfärbungen der Zellen, jeweils nur mit den Tetrameren oder nur mit dem anti-TF-Antikörper, sowie die Färbung der Zellen mit beiden Bindungsmolekülen.

4.3.2. FACS-Zellsortierung

Ziel der Zellsortierung ist es, definierte Zellen aus einer Mischsuspension zu isolieren. Um Zellen voneinander zu trennen, können prinzipiell unterschiedliche Eigenschaften wie Zellgröße, Granulation, DNA-Gehalt oder die Expression bestimmter Enzyme sowie von Oberflächenproteinen genutzt werden. Zum Zwecke dieser Arbeit wurde die Expression von TCR- β und die spezifische Bindung von α -GalCer-Tetrameren genutzt, um die NKT-Zellen direkt zu identifizieren und zu isolieren. Zudem wurde eine Lebend-Tot-Färbung angewendet, um ausschließlich die lebenden Zellen zu gewinnen.

Im ersten Schritt erfolgte die Färbung der Zellsuspension. Hierfür wurden ein mit einem Fluorophor markierter anti-TCR- β -Antikörper, PE-markierte Cd1d/ α -GalCer-Tetramere und das Lebend-Tot-Färbungskit (LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit) verwendet. Um eine spezifische Zellsortierung zu erreichen und unspezifische Signale möglichst auszuschalten, wurden Einzelfärbungen durchgeführt. Dabei wurde ein gewisser Teil der Zellen einzeln mit den entsprechenden Antikörpern und Tetrameren für 30 Min. gefärbt. Diese Einzelfärbungen wurden als Referenz für das Durchflusszytometer verwendet. Die restlichen Zellen wurden

zunächst mit dem Lebend-Tot-Färbungskit für 30 Min. inkubiert, danach erfolgten eine Zentrifugation der Zellen sowie drei Waschschrte mit FACS-Puffer. Im Anschluss wurde eine Färbung mit dem Mastermix aus den, die NKT-Zellen eindeutig identifizierenden (anti-TCR- β -Antikörper, PE-markierte Cd1d/ α -GalCer-Tetramere), Stoffen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 30 Min.. Nach dem anschließenden Waschschrte wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und in das Durchflusszytometer überführt. Hier passierten die Zellen nun einen Laserstrahl der, wie oben bei der FACS-Analyse beschrieben (Gliederungspunkt 4.3.1), die fluoreszenzmarkierten Antikörper anregt und die Größe und Granularität der Zellen bestimmen kann. Durch die Detektion der emittierten Signale und die Streuung bzw. Absorption des Lichts wurden die NKT-Zellen identifiziert und in ein separates Gefäß sortieren.

4.4. Funktionelle Tests

Zur Erhebung des Einflusses der isolierten NKT-Zellen auf die Blutgerinnung wurden verschiedene funktionelle Tests durchgeführt. In einem Teil des Experiments wurden die NKT-Zellen mit einem Anti-TF-Antikörper inkubiert (1,5 μ g / 1000 Zellen) und ein weiterer Teil der Zellen mit dem entsprechenden Isotyp IgG in der gleichen Konzentration behandelt. Diese Schritte erfolgten zur Überprüfung der TF-spezifischen Gerinnungsaktivität der Zellen.

4.4.1. TEG – Thrombelastometrie

Die Thrombelastometrie ist eine Methode zur Messung der Gerinnungseigenschaften von Vollblut. Mit diesem Messverfahren kann sowohl die Zeit bis zum Eintritt der Gerinnung erhoben werden, als auch die Dichte und Festigkeit des Thrombus und dessen Lyseverhalten analysiert werden. Die Messung erfolgte an einem vorgewärmten Rotationsthrombelastographie-Messgerät. Es wurde durch kardialen Blutentzug gewonnenes Mausblut verwendet, das mit 12,5 mM Trinatriumcitrat antikoaguliert in eine 1-ml-Spritze abgenommen wurde. Von diesem Blut wurden 300 μ l in die vom Hersteller bezogene Küvette blasenfrei pipettiert. Im Anschluss wurde das Blut rekalkifiziert und mit in 20 μ l PBS gelösten Zellen (30.000 Zellen) versetzt. Zuvor wurde die Einmal-Küvette in den Küvettenhalter eingesetzt und der in ihr befindliche Sensor-Stempel auf die Stahlachse des Messgeräts geschoben. Mit Hilfe der magnetischen Küvettenhalters wurde die Küvette nach Präparation möglichst zügig um den Stempel positioniert. Anschließend wurde die Messung mit der mit dem Gerät verbundenen Computer-Messeinheit gestartet. Bei diesem Vorgang beginnt die Stahlachse abwechselnd nach links und rechts zu rotieren. Dies geschieht zunächst ungehindert. Durch die Bildung von Fibrinfäden wird die Rotation jedoch schließlich eingeschränkt. Diese Einschränkung der Rotation wird mit Hilfe eines Spiegels und einer Lichtquelle erfasst und in Messwerte umgewandelt (Abb. 5). Dabei werden diverse Messgrößen erfasst: darunter die CT (*coagulation time* in Sek.), die die Zeit bis zum Einsetzen der Thrombus-Bildung, sowie die

CFT (*clot formation time* in Sek.), die die Geschwindigkeit des Wachstums der Thrombus-Bildung ermittelt.

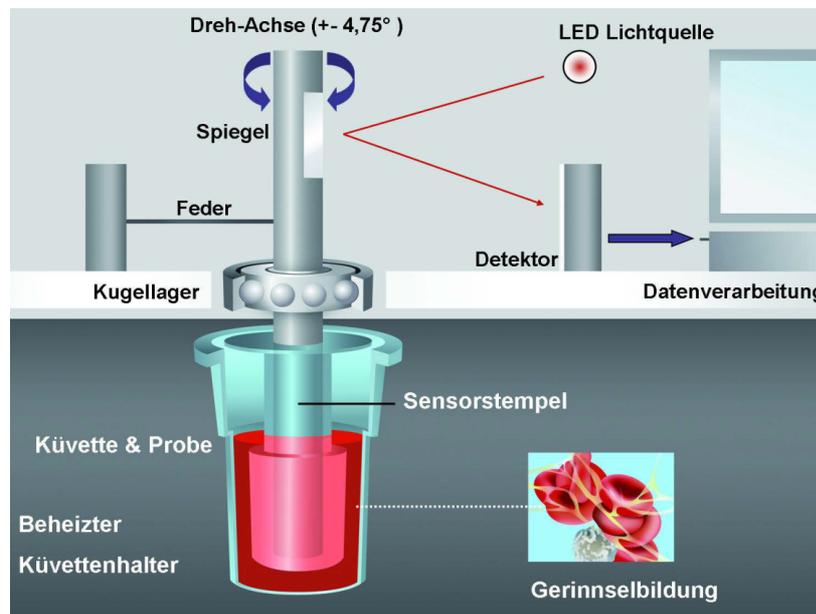


Abbildung 5: Aufbau des Thrombelastometers; © Tem International GmbH

4.4.2. Faktor Xa-Bildung

Der photometrische Faktor Xa Assay misst die prokoagulatorische Wirkung einer bestimmten Lösung mit Hilfe eines chromogenen Substrats. Sobald Faktor Xa gebildet wird, wird das chromogene Substrat (S-2222) gespalten, wodurch ein Farbumschlag entsteht und Licht emittiert wird. Der Farbumschlag kann mit Hilfe eines ELISA-Lesegeräts detektiert und gemessen werden. Dafür wird eine Referenzkurve benötigt, die bei jeder Messung erstellt wurde. Die benötigten Reagenzien (50 µl einer 30 mM CaCl-Lösung, 50 µl Rhesus-Puffer) wurden mit jeweils 300.000 Zellen der unterschiedlichen Zellgruppen zusammengeführt, bevor die Reaktion mit dem Substratpuffer, welcher Beriplex (u.a. Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X), Rhesus-Puffer sowie das chromogene Substrat S-2222 enthielt, gestartet wurde. Anschließend wurde die Absorption des Lichts (Wellenlänge 405 nm) nach unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen, welches mit der Bildung des aktiven Faktor Xa korreliert.

4.4.3. Visuelle Darstellung eines PPP-Thrombus nach der Zugabe von NKT-Zellen

Zur Visualisierung des prokoagulatorischen Effekts der NKT-Zellen erfolgte eine Abwandlung des Koagulat-Versuchs, bei dem keine *E. coli* Bakterien, sondern isolierte, in PBS gelöste NKT-Zellen zu 20 µl murinem PPP und 20 µl fluoreszenzmarkiertem Fibrinogen hinzugegeben wurden. Nach der Zugabe von 60 µl einer 30 mM CaHepes-Lösung wurde der entstandene Thrombus mit Hilfe des konfokalen Mikroskops analysiert.

5. Immunhistochemie

5.1. Herstellung der Schnitte

Um immunhistochemische Färbungen in den gewonnenen Organen durchzuführen, wurden die Organe zunächst in das Medium *Tissue Tek* eingebettet. Für dieses Prozedere wurden Kryoeinbettkassetten verwendet. Anschließend wurden 10 µm dicke Schnitte mit Hilfe eines Kryotoms angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgetragen und bei -20 °C in entsprechenden Aufbewahrungskästen gelagert.

5.2. Immunfluoreszenzfärbung

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die indirekte, als auch die direkte Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion bestimmter Immunzellen bzw. Proteine angewendet. Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz ist in Abb. 6 dargestellt. Der spezifische Antikörper bindet das im Gewebe zu analysierende Protein (bspw. den Oberflächenmarker einer Zelle). Um das betreffende Protein zu detektieren, wird ein sekundärer Antikörper verwendet, der mit einem Fluorophor markiert ist, der an den primären Antikörper bindet.

Der Unterschied zur direkten Immunfluoreszenz lässt sich ebenfalls aus Abb. 6 entnehmen. Hier ist der primäre Antikörper bereits mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Dieser kann direkt detektiert werden.

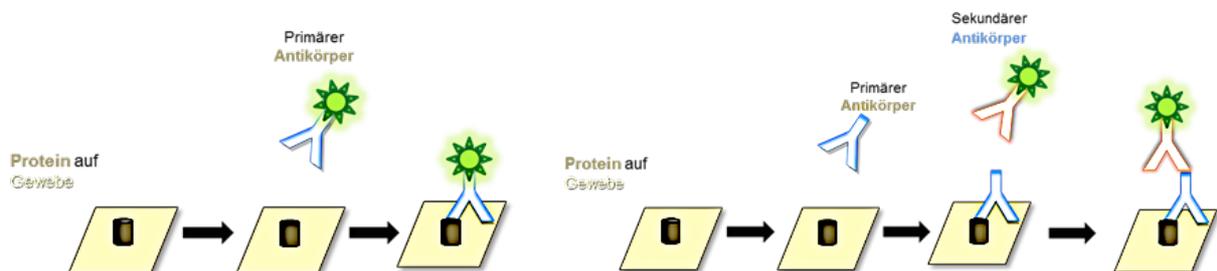


Abbildung 6: Direkte (links) und indirekte (rechts) Immunfluoreszenz

5.2.1. Inkubation der Gewebeschnitte mit Antikörpern

Zunächst erfolgte die Fixierung der Schnitte. Dabei mussten je nach Fixierungssubstanz unterschiedliche Inkubationszeiten und Temperaturen eingehalten werden. Nach 3-maligem Waschen für jeweils 3 Min. mit PBS, wurden unspezifische Bindungsstellen im Gewebe blockiert. Hierfür wurde der Schnitt meist für eine Stunde in der entsprechenden Blocklösung gelagert (Tab. 7). Darauf folgte ein weiterer Waschschrift. Nach diesem wurde der primäre Antikörper auf das Gewebe gegeben. Dabei wurde ein DAKO-Pen zu Hilfe genommen, der die Flüssigkeit auf dem Organschnitt bündelte. Die Inkubation erfolgte stets über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde dann ein weiterer Waschschrift durchgeführt und der sekundäre Antikörper verwendet, sofern der primäre Antikörper selbst nicht fluoreszenzmarkiert war. Der sekundäre Antikörper wurde stets in einer Konzentration von 2 µg/ml für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurde kurz mit destilliertem Wasser gewaschen. Zuletzt erfolgte das *Mounting*

mit *Vectashield*, das mit DAPI versetzt war und daher die Zellkerne anfärbte. Die Deckelung des Schnitts mit einem Glasplättchen stellte den letzten Arbeitsschritt der Färbung dar. In dieser Form konnten die Schnitte für mindestens 4 Monate bei 4°C gelagert werden.

5.2.2. Anwendung der Antikörper

Antikörper	Konzentration	Fixierung	Block
Anti- B-Phycoerythrin Antikörper	17 µg/ml	Methanol/Eisessig 90 s	5% BSA 1Std.
Anti- CD41 -Antikörper	10 µg/ml	Methanol/Eisessig 90 s	Triton-X-Lösung 1Std.
Anti- CD90.2 -Antikörper FITC	10 µg/ml	Methanol/Eisessig 90 s	Saponin Lösung 1Std.
Anti- CD127 -Antikörper	5 µg/ml	Methanol/Eisessig 90 s	Saponin Lösung 1Std.
Anti- Fibrin II β Chain - Antikörper	5 µg/ml	Methanol/Eisessig 90 s	Saponin Lösung 1Std.
Anti- Faktor-XII -AK	1/100 (unpurified)	Methanol/Eisessig 90 s	Saponin Lösung 1Std.
Anti- GFP -Antikörper Alexa Flour 488	5 µg/ml	Methanol/Eisessig 90 s	Saponin Lösung 1Std.
Anti- Stabilin -Antikörper	5 µg/ml	Methanol/Eisessig 90 s	Saponin Lösung 1Std.
Anti Pecam -Antikörper	4 µg/ml	Methanol/Eisessig 90 s	Saponin Lösung 1Std.
Anti- Ly6C -Antikörper	4 µg/ml	PFA 4% 10 min	Saponin Lösung 1Std.
Anti- Ly6G -Antikörper	15 µg/ml	PFA 4% 10 min	Saponin Lösung 1Std.
Anti- TF -Antikörper (1H1)	12 µg/ml	Methanol/Eisessig 90 s	5% BSA 1Std.

Tabelle 7: Fixierungsmethoden und verwendete primäre Antikörper in Immunhistochemischen Experimenten

Als sekundäre Antikörper wurden eingesetzt (In Klammern sind die Fluorophore aufgeführt mit welchen die sekundären Antikörper markiert waren):

Goat-**anti-Mouse**-Antikörper (Alexa 488, 594, 550)

Goat-**anti-Rabbit**-Antikörper (Alexa 488, 594, 550)

Goat-**anti-Rat**-Antikörper (Alexa 488, 594, 550)

5.2.3. NKT-Zellfärbung

Zur Färbung von NKT-Zellen konnte die übliche Methodik der Immunfluoreszenz-

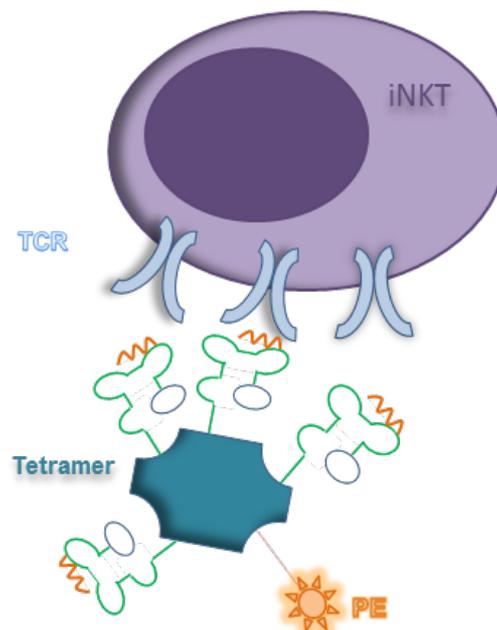


Abbildung 7: Tetrimer-Bindung an eine NKT-Zelle
iNKT: Invariant Natural Killer T-Cell TCR : T-Cell-Receptor

färbung nicht angewendet werden, da deren spezifische Färbung nur mit CD1d/ α -GalCer-Tetrameren möglich ist. Die Bindung der Tetramere an die Zellen kann lediglich an lebenden Zellen vorgenommen werden (Abb. 7). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Färbung in Leber, Milz und Thymus der Tiere.

Zunächst wurde ein etwa 5 x 5 x 2 mm (Länge x Breite x Höhe) großes, quaderförmiges Organstück gewonnen. Dieses wurde in einem Well einer 96-Well-Platte positioniert, welches mit 50 μ l Tetramer-Lösung versetzt wurde. Die Lösung bestand aus 44 μ l PBS, 1 μ l FBS und 5 μ l der Tetramere (Stock-Konzentration 1 μ g/ml). Die Organe wurden in der Lösung über Nacht bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Organstücke in neue Wells transferiert, in welchen sich 200 μ l PBS befanden. Die Organe wurden 3 x für 5 Min. gewaschen, während sich die Platte auf Eis befand. Anschließend wurden sie für eine Stunde in 1ml einer 4%igen PFA-Lösung auf Eis fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3 x für 5 Min. in 200 μ l PBS auf Eis) wurden die Organe in 1 ml einer 30 %igen Sucrose-Lösung auf Eis für 1-3 Std. gelagert. Dieser Schritt wurde zur Erhaltung des PE-Signals der Tetramere durchgeführt. Zuletzt wurden die Organstücke in *Tissue Tek* eingebettet und bei -80 °C gelagert. Um die NKT-Zellen im Gewebe detektieren zu können, wurden Schnitte erstellt und eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Anti-PE-Antikörper durchgeführt, wie in Punkt 4.2.1 beschrieben.

5.2.4. FISH-Färbung

Die FISH-Färbung (Fluoreszenz in situ hybridisierung) ermöglicht es, Nukleinsäuresequenzen direkt im biologischen Präparat, das heißt in Geweben, Zellen und auf Chromosomen, darzustellen. Dies ist auch mit Bakterien möglich. Das Prinzip der FISH von Bakterien beruht auf der spezifischen Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden an ihre Zielsequenz. Diese stellt meist ribosomale RNA im morphologisch intakten Mikroorganismus dar. In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Sonden, die für gramnegative *E. coli* erstellt worden waren, verwendet.

Die FISH-Methode wird üblicherweise für frische Blut- bzw. Sputumproben verwendet. Die Anwendung in der Immunhistologie bei *E. coli* Bakterien wurde bisher noch nicht durchgeführt. Daher wurde die Methodik in dieser Arbeit neu etabliert. Ziel dabei war, eine Differenzierung lebender und toter Bakterien im Gewebe zu ermöglichen. Als lebend wurden GFP-markierte Bakterien, welche innerhalb des Zellplasmas rRNA aufwiesen eingestuft. Tote Bakterien enthielten keinerlei rRNA-Signal. (Frickmann et al., 2017).

Abbildung 7 zeigt den Ablauf der FISH-Färbung im Falle eines lebenden Bakteriums.

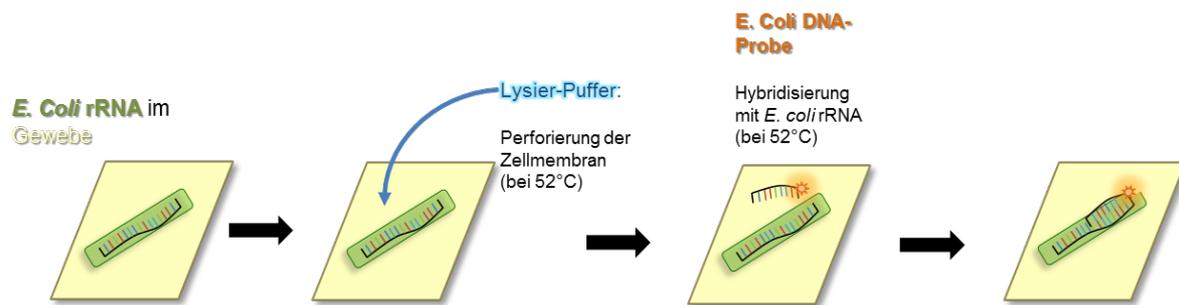


Abbildung 8: FISH-rRNA Färbung der *E. coli* Bakterien im Gewebe

Zur Etablierung dieses Protokolls wurde die übliche Immunfluoreszenz-Methodik mit der FISH-Färbung kombiniert. Zunächst wurden die Schnitte mit Methanol/Eisessig für 90 Sek. fixiert. Daraufhin folgte ein Waschschrift mit H₂O für 3 x 3 Min. und die Perforation der Zellmembran der Bakterien, um ein Vordringen der DNA-Sonde zur Ziel-rRNA zu ermöglichen. Dies geschah mit einem Lysepuffer, der für 5 Min. bei 52 °C auf dem Gewebe inkubiert wurde. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Min. mit 99 % Ethanol gewaschen. Danach wurde die *E. coli* DNA-Probe auf den Schnitt geträufelt und für 20 Min. bei 52 °C inkubiert. Während dieser Schritte erfolgte die Hybridisierung der spezifischen DNA-*E. coli*-Sonde, mit der entsprechenden bakteriellen rRNA-Sequenz. Darauf folgte ein Waschschrift von 1 Min. in 99% Ethanol. Danach wurden die Schnitte 2 x für 3 Min. mit PBS gewaschen und anschließend für 30 Min. mit Saponin-Lösung geblockt. Im nächsten Schritt folgte die Inkubation mit einem gegen GFP gerichteten primären Antikörper. Es wurde eine Konzentration von 10 µg/ml verwendet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3 x 3 Min. PBS) am folgenden Tag wurde der sekundäre Antikörper aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 4°C Die Färbung wurde mit einem weiteren Waschschrift (3 x 3 Min. PBS und 1 x 3 Min. H₂O) und der Eindeckelung abgeschlossen.

6. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie basiert auf dem Prinzip der Absorption und Emission von Licht. Ein Fluorophor absorbiert Licht einer bestimmten Wellenlänge, wodurch die Elektronen im Fluorophor angeregt werden und deren Energieniveau verändert wird. Beim Zurückspringen der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau wird Energie in Form von Licht einer definierten Wellenlänge frei. Die emittierte Strahlung wird beim Blick durch das Mikroskop wahrgenommen. Mit dieser Methodik können bestimmte Proteine oder Zellen visualisiert werden, wenn diese wie oben beschrieben mit Immunfluoreszenz angefärbt werden.

7. Konfokale Laser-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Mikroskopie basiert auf dem Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie. Im Unterschied zu dieser fungiert bei der konfokalen Laser-Mikroskopie jedoch ein Laser als Lichtquelle. Dieser tastet das zu mikroskopierende Objekt Punkt für Punkt ab und erstellt auf diese Weise einen Entwurf des Abbilds des Objekts. Dabei kann jedoch kein Gesamtbild des Objekts erstellt werden. Dieses wird durch den Computer mit Hilfe einer Intensitätsmessung rekonstruiert. Eine innerhalb des Strahlengangs befindliche Lochblende (*Pinhole*) sorgt für eine höhere Auflösung in der Z-Achse, da reflektierende Stellen außerhalb der Fokusebene des Objekts ausgeblendet werden können. Die Detektion der vom Objekt emittierten Strahlung erfolgt über den Multiplier.

Das hier verwendete konfokale Laserscanmikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) basiert auf einem Axiovert 200MOT. Es besitzt einen Argonlaser für niedrigere Wellenlängen (458, 477, 488, 514 nm; 30 mW) und drei verschiedene HeNe-Laser für höhere Wellenlängen (543 nm, 1 mW; 594 nm, 2 mW; 633 nm, 5 mW). Zur Detektion der unterschiedlichen Fluorophore wurden die entsprechenden Laser- und Filtereinstellungen gewählt.

8. Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen

Alle Bilder wurden entweder mit einem Fluoreszenzmikroskop oder einem konfokalem Laser-mikroskop erzeugt. Ein Blickfeld misst im Allgemeinen $4 \times 10^4 \text{ nm}^2$ bzw. $36 \times 10^4 \text{ nm}^2$. Alle Schnitte wurden verblindet ausgewertet. Die Auswertung der mit Fibrin bedeckten Fläche wurde mit Hilfe der Mikroskopie- und Imagingsoftware ZEN (Carl Zeiss) durchgeführt. Hierbei wurde der Anteil der mit Fibrin bedeckten, vaskulären Fläche dadurch ermittelt, dass erst alle, in einem Gesichtsfeld sichtbaren Sinusoide, welche mit Hilfe eines Anti-Stabilin-2-Antikörpers (Stab-2) (Falkowski et al., 2003) angefärbt wurden und anschließend das intravaskuläre Fibrin umrandet wurden.

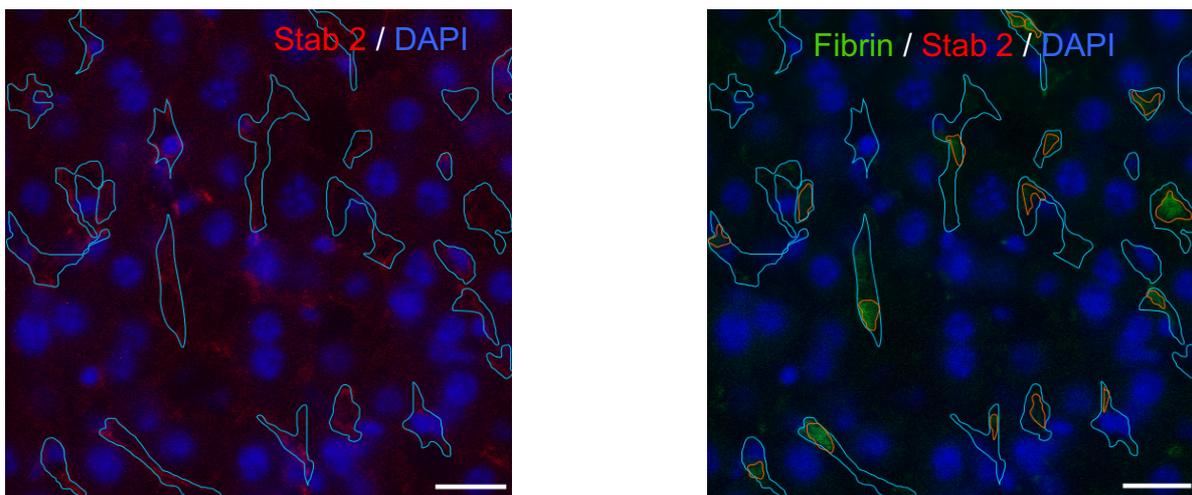


Abbildung 9: Fibrinauswertung • hellblaue Kontur: Umrandung der mit Stab 2 markierten Gefäße in der Leber; orangene Kontur: Umrandung des intravaskulären Fibrin (Maßstab 20µm)

Das Programm errechnete die jeweils umrandete Fläche. Anschließend wurde der Quotient aus der mit Fibrin bedeckten Fläche und der gesamten, intravaskulären Fläche gebildet. Dies wurde in 10 Gesichtsfeldern pro Tier durchgeführt. Um die Zellzahl der rekrutierten Zellen zu bestimmen, wurden ebenfalls 10 Gesichtsfelder pro Tier ausgezählt. Die selbe Technik wurde zur Bestimmung der Bakterienzahl durchgeführt.

Die Kolokalisation zwischen unterschiedlichen Immunzellen, Immunzellen mit Bakterien und Bakterien mit Fibrin wurde durch einen maximalen Abstand zwischen den Strukturen von 1µm definiert.

Zur Messung des Bakterienüberlebens wurde der Sterbefaktor eingeführt. Dieser setzt sich aus dem Quotient toter Bakterien und nicht toter Bakterien zusammen und wird in % angegeben.

9. Statistik

Die Statistische Auswertung erfolgte mit der Software „GraphPad Prism“.

Alle Werte wurden als Mittelwerte +/- SEM. angegeben. Zur Signifikanzberechnung beim Vergleich zwischen lediglich Kontroll- und einer Versuchsgruppe wurde zur Auswertung der unpaired two-tailed Student's t-Test verwendet. Beim Vergleich mehrerer Gruppen zum gleichen Zeitpunkt wurde der One-Way-Anova-Test zur statistischen Auswertung herangezogen. Zur Signifikanzberechnung wurde der Fehler erster Art auf $\alpha < 0,05$ definiert. Die Gruppengröße variierte zwischen $n = 1-5$ pro Gruppe.

IV. Ergebnisse

1. Zusammenspiel unterschiedlicher Immunzellen im Verlauf der Immuno-thrombose

Um einen Überblick über den Ablauf der Immuno-thrombose zu erhalten, wurden zunächst Langzeitversuche über einen Zeitraum von bis zu 48 Std. durchgeführt. Die Tiere wurden über die Schwanzvene mit Bakterien infiziert. Nach erfolgter Euthanasie und Organentnahme wurden Immunfluoreszenzfärbungen der Leber durchgeführt. Aufgrund bereits bekannter, vor allem *in vitro* gewonnener Hinweise über den Ablauf der Immuno-thrombose wurden Zellen des angeborenen Immunsystems, Fibrin und auch die injizierten Bakterien angefärbt.

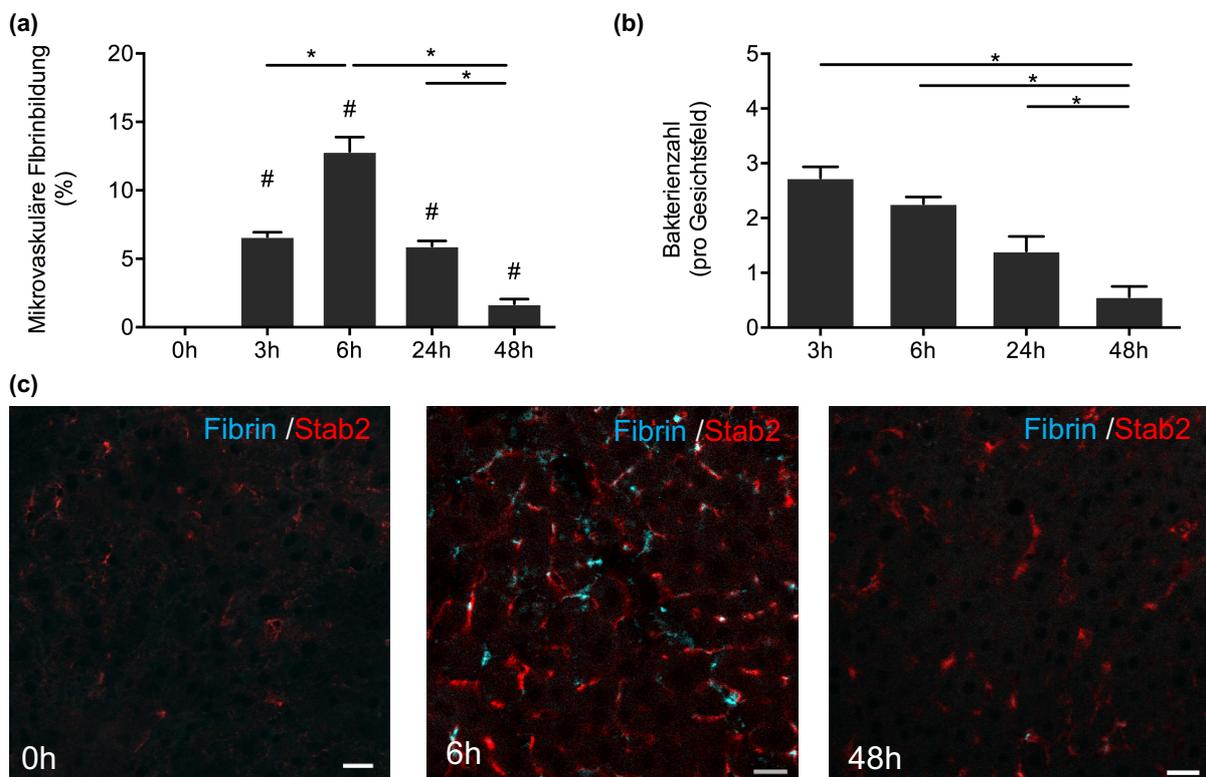


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Fibrinbildung und der Bakterienzahl während der Immuno-thrombose in der Mikro-zirkulation der Leber• (a) Fibrinbildung (b) Bakterienzahl (c) repräsentative Bilder der intravaskulären Fibrinbildung (Maßstab, 20 µm); Mittelwerte ± SEM, n = 3-6, * p<0,05, # vs. 0h p <0,05.

Bei der Untersuchung der mit Fibrin bedeckten, vaskulären Fläche zeigte sich nach 3 Std. ein signifikanter Anstieg, im Vergleich zum unbehandelten 0-Std.-Tier. Nach 6 Std. konnte ein Maximum der Fibrinforma-tion beobachtet werden (Abb. 10 a und c). Nach 48 Std. nahm die Menge an detektiertem Fibrin schließlich wieder stark ab. Bei der Auszählung der Bakterien wurde ein stetiger Abfall der Bakterienzahl beobachtet (Abb. 10 b).

Bei der Auszählung der inflammatorischen Monozyten konnte ein ähnlicher Verlauf wie bei der Fibrinbildung beobachtet werden. Im Anschluss an einen signifikanten Anstieg nach 3 Std., im Vergleich zum unbehandelten Tier, beobachteten wir nach 6 Std. ein Maximum der Monozytenzahl (Abb. 11 a). Danach nahm die Anzahl stetig ab. Im Vergleich dazu ließ sich bei den patrouillierenden Monozyten erst nach 24 Std. ein signifikanter Anstieg der Zellzahl im Vgl. zum 0-Std.-Tier nachweisen (Abb. 11 b und c)

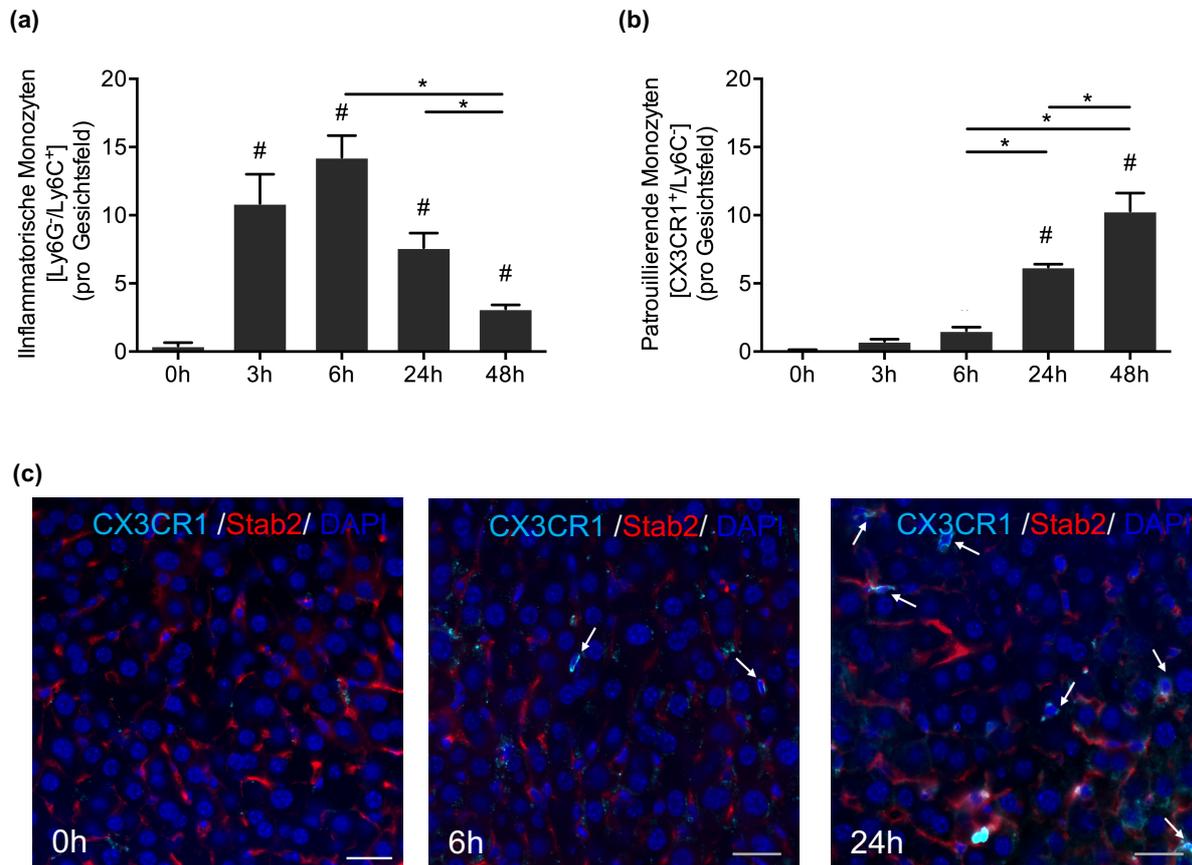


Abbildung 11: Kinetik der Rekrutierung inflammatorischer und patrouillierender Monozyten in der Mikrozirkulation • (a) Inflammatorische Monozyten (b) Patrouillierende Monozyten (c) Repräsentative Bilder: Kinetik der patrouillierenden Monozyten intravaskulär → (Maßstab, 50 µm); Mittelwerte ± SEM, n = 3-6, * p<0,05, # vs. 0h p <0,05.

Die Auszählung der neutrophilen Granulozyten zeigte gegenüber dem 0-Std.-Tier, einen signifikanten Anstieg der Zellzahl nach 3 Std. auf $7,5 \pm 0,3$ Zellen / Gesichtsfeld. Nach dem erreichten Maximum nach 6 Std. fiel die Anzahl der neutrophilen Granulozyten wieder ab (Abb. 12 a).

Die Anzahl der Thrombozyten stieg bei den behandelten Tieren im Vgl. zum 0-Std.-Tier signifikant nach 3 Std. an und blieb bis zum 48-Std.-Zeitpunkt auf einem erhöhten Level (Abb. 12 b).

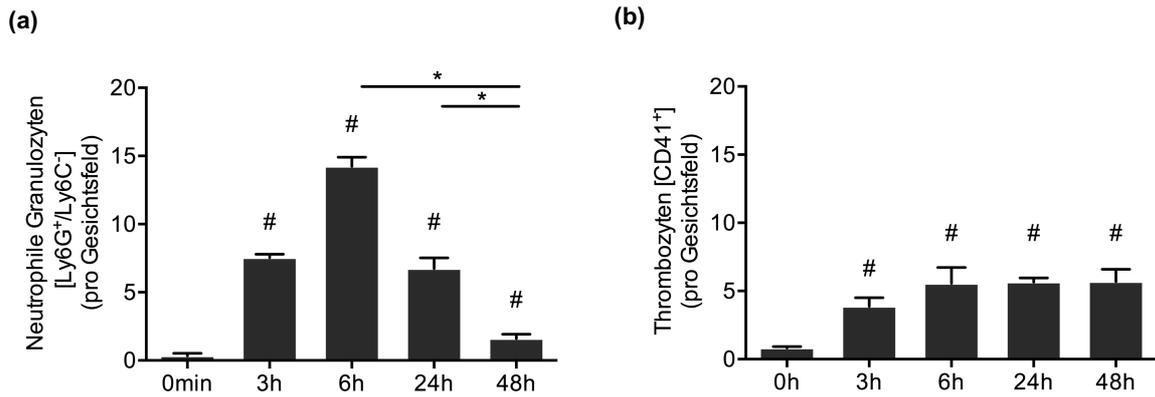


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Thrombozyten: (a) Kinetik der neutrophilen Granulozyten (b) Kinetik der Thrombozyten; Mittelwerte \pm SEM, n = 3-6, * p<0,05, # vs. 0h p <0,05.

Um die Initiierung der Fibrinbildung zu charakterisieren, wurden die Experimente um einen 30-Min.- und einen 1-Std.-Zeitpunkt ergänzt. Dabei wurde eine höhere Bakterienkonzentration eingesetzt ($3,2 \times 10^8$ KBE). Bereits nach 30 Min. konnte gegenüber dem 0-Std.-Wert ein signifikanter Anstieg der Fibrinbildung beobachtet werden (Abb. 13 a und b). Der Anteil der mit Fibrin bedeckten vaskulären Fläche erreichte einen Peak nach 3 Std..

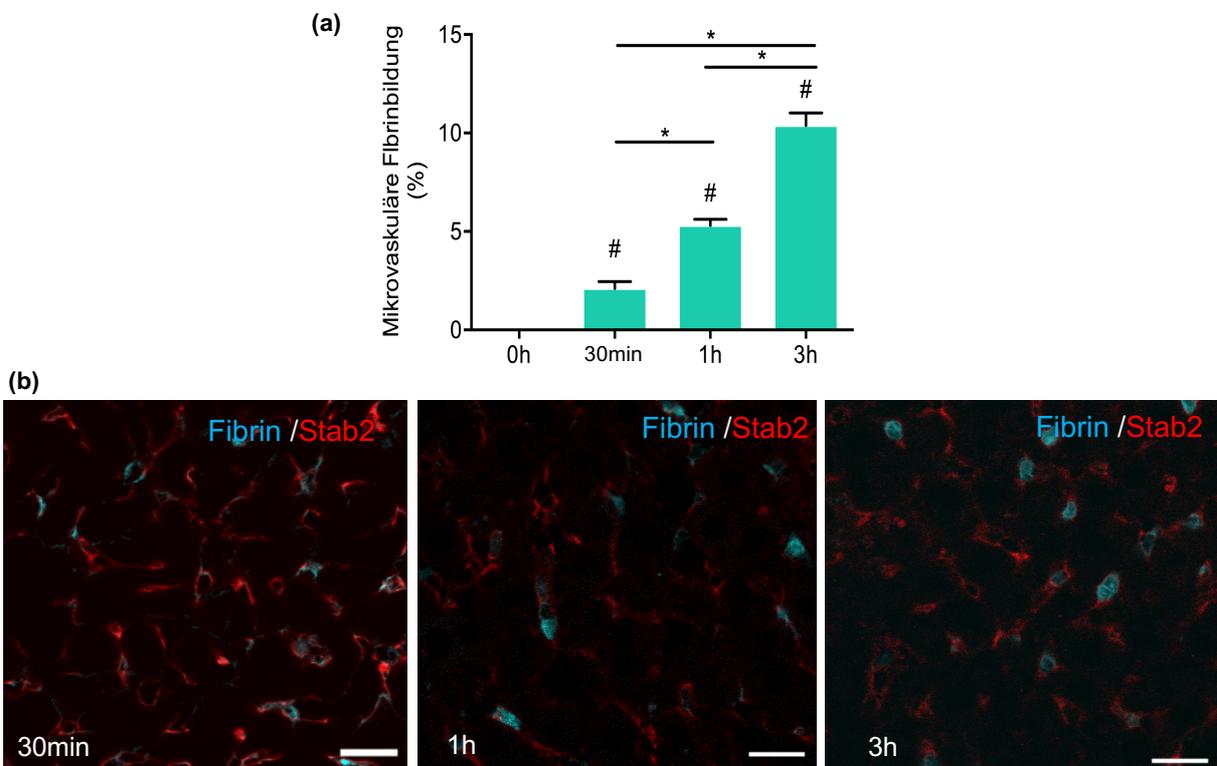


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der frühen Fibrinbildung in der Mikrozirkulation • (a) Kinetik der Fibrinbildung (b) Repräsentative Bilder: Verlauf der Fibrinbildung (Maßstab, 20 µm); Mittelwerte \pm SEM, n = 3-6, * p<0,05, # vs. 0h p <0,05.

Unter denselben Bedingungen wurde wiederum die Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten in der Leber analysiert (Abb. 14 und 15).

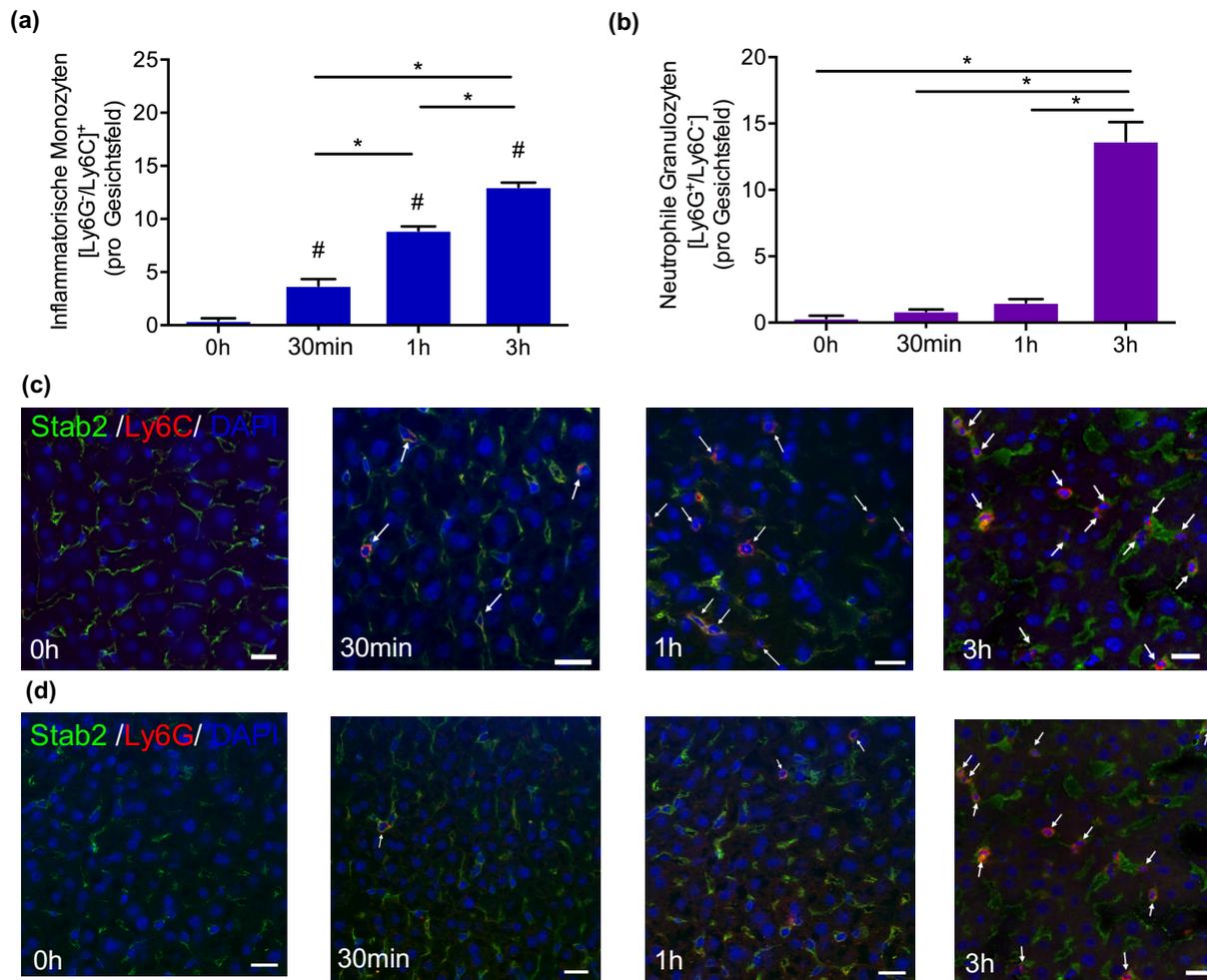


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Rekrutierung inflammatorischer Monozyten und neutrophiler Granulozyten in der frühen Phase der Immunthrombose • (a) Inflammatorische Monozyten (b) Neutrophile Granulozyten (c) Repräsentative Bilder: Verlauf der Kinetik der inflammatorischen Monozyten (Maßstab, 20 µm) (d) Repräsentative Bilder: Verlauf der Kinetik der neutrophilen Granulozyten (Maßstab, 20 µm); Mittelwerte ± SEM, n = 3-6, * p<0,05, # vs. 0h p <0,05.

Bei den inflammatorischen Monozyten konnte ein stetiger Anstieg der Zellzahl zwischen 0 und 3 Std. festgestellt werden (Abb. 14 a, c). Auffällig dabei war der signifikante Anstieg bereits nach 30 Min.. Die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten hingegen war erst nach 3 Std. (gegenüber 1 Std.) erhöht (Abb. 14 b, d).

Um die Zusammenhänge zwischen der Rekrutierung der Thrombozyten und der anderen Immunzellen zu klären, wurden auch Thrombozyten visualisiert (Abb. 15). Nach einer Std. wurde eine Erhöhung der Thrombozytenzahl pro Gesichtsfeld beobachtet. Im weiteren Verlauf bis zu 3 Std. war keine Veränderung der mikrovaskulären Adhäsion von Thrombozyten festzustellen.

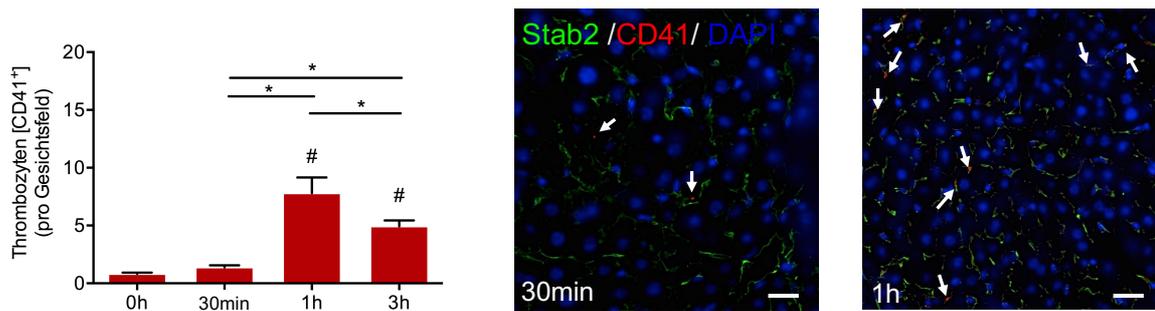


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Rekrutierung von Thrombozyten • Kinetik der Thrombozyten-Rekrutierung mit repräsentativen Bildern (Maßstab, 20 μ m); Mittelwerte \pm SEM, n = 3-6, * p<0,05, # vs. 0h p <0,05.

2. Kolokalisation rekrutierter Immunzellen mit Fibrin

Um die Rolle der Immunzellen während der Initiierung und Aufrechterhaltung der Fibrinbildung zu charakterisieren, wurde die Kolokalisation von inflammatorischen Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten mit Fibrin in der Leber der infizierten Tiere ermittelt. Zunächst wurden alle Zellen einer Population in einem Gesichtsfeld ausgezählt, anschließend nur die mit Fibrin kolokalisierten Zellen. Aus diesen beiden Werten wurde der Prozentsatz an fibrinassoziierten Immunzellen errechnet.

Nach 30 Min. waren $19,6 \pm 0,8$ % der inflammatorischen Monozyten mit Fibrin assoziiert (Abb. 16 a). Zu dem selben Zeitpunkt kolokalisierten $10,1 \pm 0,1$ % der neutrophilen Granulozyten mit Fibrin. Auch nach 6 Std. kam es zu einer deutlichen Assoziation der neutrophilen Granulozyten mit Fibrin (Abb. 16 b). Inflammatorische Monozyten hingegen waren nach 6 Std. nur noch zu $11,5 \pm 4,9$ % mit Fibrin kolokalisiert. Thrombozyten kolokalisierten bereits nach 30 Min. zu $13,6 \pm 4,3$ % mit Fibrin. Dieser Prozentsatz blieb bis zum 6-Std.-Zeitpunkt unverändert (Abb. 16 c).

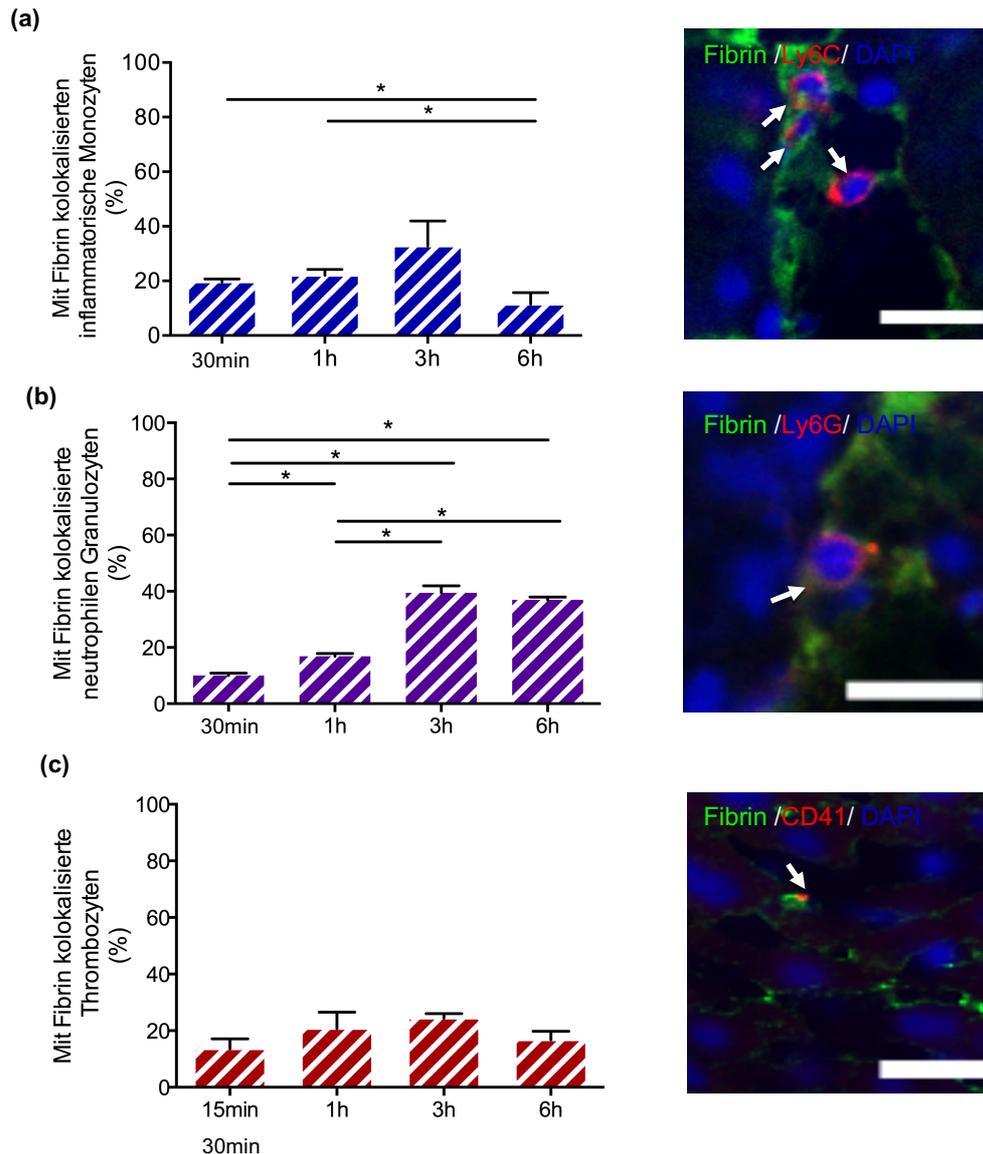


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Kolokalisation von Immunzellen mit Fibrin •(a) Inflammatorische Monozyten, (b) Neutrophile Granulozyten (c) Thrombozyten; Prozentualer Anteil der mit Fibrin kolokalisierten Zellen an der Gesamtzellzahl; (Maßstab, 20µm); Mittelwerte \pm SEM, n = 3-6, * p<0,05.

3. Fibrinbildung in Immunzell-depletierten Tieren

Als nächstes wurde getestet, ob die rekrutierten Zellpopulationen für die Fibrinbildung notwendig sind. Dazu wurden die Tiere vor der *E. coli*-Infektion mit spezifischen Antikörpern behandelt, die zur Depletion einzelner Zellpopulationen im Maus-Organismus führten.

Zunächst erfolgte die Depletion inflammatorischer Monozyten mit Hilfe eines Anti-CCR2-Antikörpers. Die Depletion inflammatorischer Monozyten reduzierte die intravaskuläre Fibrinbildung nach 1 Std. um 36% (Abb. 17 a) im Vergleich zur Kontrolle.

Die Fibrinbildung in den mit einem Anti-Ly6G-Antikörper (Clone 1A8) behandelten Tiere, deren neutrophile Granulozyten depletiert waren, reduzierte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe erheblich: von $7,7 \pm 0,5$ % auf $2,7 \pm 0,3$ % (nach 3 Std.; Abb. 17 b). Anschließend wurde mit Hilfe des Anti-GpIb-Antikörpers eine Thrombozytendepletion

durchgeführt. Hierbei war die mikrovaskuläre Fibrinbildung gegenüber der Kontrolle um circa 60% reduziert (Abb. 17 c).

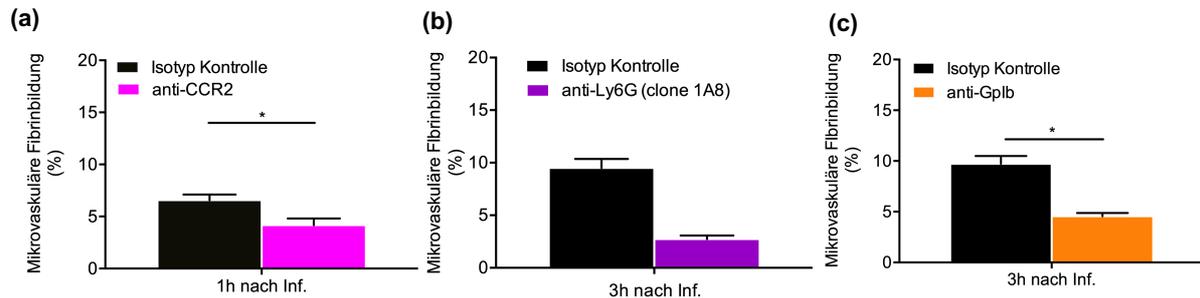


Abbildung 17: Fibrinbildung in zelldepletierten Tieren im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe • (a) anti-CCR2-Behandlung (b) anti-Ly6G-Behandlung (c) anti-Gplb-Behandlung; Mittelwerte \pm SEM, n = 3-5, * $p < 0,05$.

Interessanterweise kam es nach Depletion der einzelnen Immunzellpopulationen zu Veränderungen der Rekrutierung der jeweils anderen Blutzellen. Nach Depletion der inflammatorischen Monozyten beobachteten wir eine deutlich erhöhte Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten (Abb. 18) Gleichzeitig war die Adhäsion der Thrombozyten tendenziell vermindert.

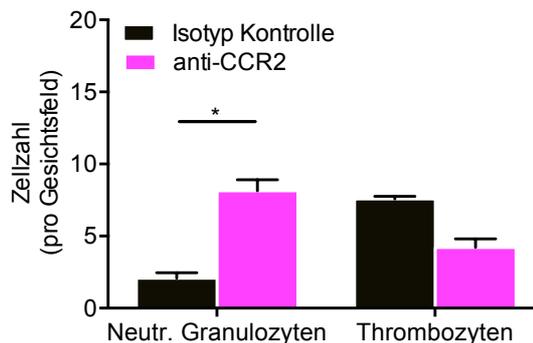


Abbildung 18: Zellrekrutierung in mit Anti-CCR2-Antikörper behandelten Tieren • Neutrophile Granulozyten und Thrombozyten im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe; Mittelwerte \pm SEM, n = 3-5, * $p < 0,05$.

Als Folge der Neutrophilendepletion wurde eine geringere Anzahl an inflammatorischen Monozyten festgestellt (Abb. 19). Die Thrombozytenzahl änderte sich jedoch nicht (nicht gezeigt).

Des Weiteren führte die Depletion der Thrombozyten zu einer Reduktion der neutrophilen Granulozyten (nach 3 Std.) sowie der inflammatorischen Monozyten (nach 1 Std.; Abb. 20)

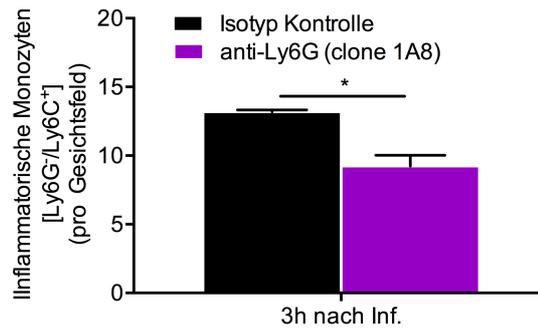


Abbildung 19: Zellrekrutierung in mit Anti-Ly6G-Antikörper behandelten Tieren • Inflammatorische Monozyten im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe; Mittelwerte \pm SEM, n = 3-5, * p<0,05.

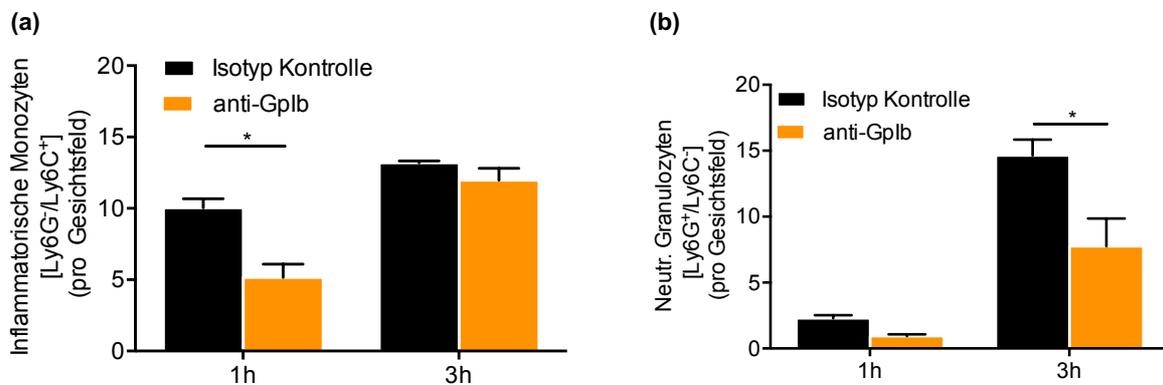


Abbildung 20: Zellrekrutierung in mit Anti-Gplb-Antikörper behandelten Tieren • (a) Inflammatorische Monozyten (b) Neutrophile Granulozyten; Mittelwerte \pm SEM, n = 3-5, * p<0,05.

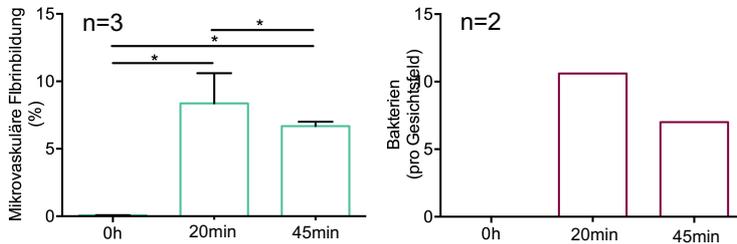
4. Mikrovaskuläre Fibrinbildung in der Lunge

Um festzustellen, ob es auch in anderen Organen als der Leber nach systemischer Infektion zu einer mikrovaskulären Fibrinbildung kommt, wurde Lungengewebe analysiert. Es wurden Fibrin, *E. coli* und neutrophile Granulozyten in der Mikrozirkulation der Lunge visualisiert.

Die Fibrinbildung schien bei 20 Min. einen Maximalwert zu erreichen (Abb. 21 a). Darüber hinaus konnte eine Abnahme der Bakterienzahl pro Gesichtsfeld beobachtet werden (Abb. 21 a).

Im Zeitverlauf ließ sich eine Extravasation der neutrophilen Granulozyten erkennen (Abb. 22).

(a)



(b)

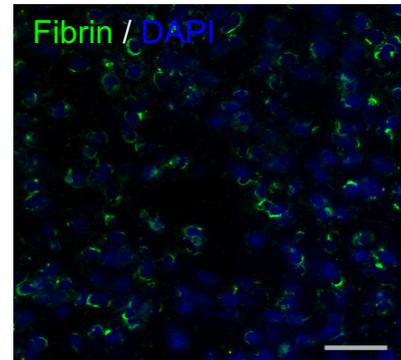


Abbildung 21: Fibrinbildung und Bakterienzahl in der Mikrozirkulation der Lunge • (a) mikrovaskuläre Fibrinbildung (b) intravaskuläre Bakterienzahl, (Maßstab, 20 µm); Mittelwerte ± SEM, * p<0,05.

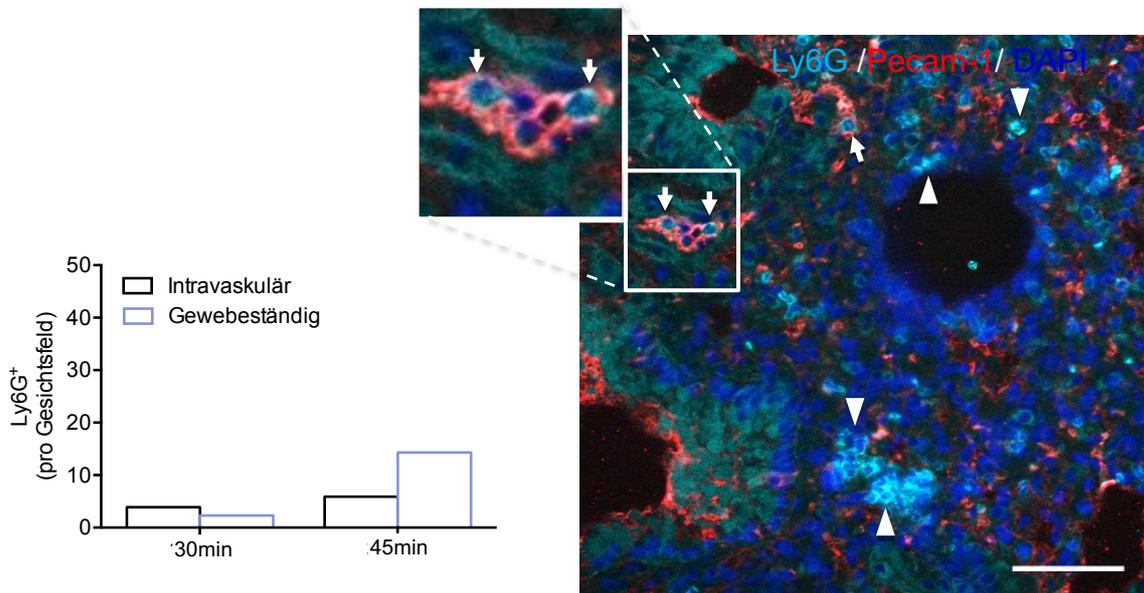


Abbildung 22: Extravasation neutrophiler Granulozyten 45 Min. nach bakterieller Infektion in der Lunge, n=2; → Neutrophile Granulozyten intravaskulär ► Neutrophile Granulozyten im Gewebe; (Maßstab, 20 µm).

5. TF-Abhängigkeit von mikrovaskulären Thrombosen und Bakterieneliminierung

5.1 Darstellung der Immunzellen und von Fibrin in Tieren mit TF-Inhibition

Um die Rolle von TF, welcher als Initiatorprotein der physiologischen Blutgerinnung fungiert, zu charakterisieren, wurden Tiere mit einem für Maus-TF spezifischen Antikörper behandelt (1H1). Im Anschluss daran wurden die Organe der Tiere entnommen, die Bakterienlast mit Hilfe der KBE-Analyse bestimmt und die Fibrinbildung sowie die Rekrutierung unterschiedlicher Immunzellen in die Leber immunhistochemisch ausgewertet.

5.1.1. Effekt des anti-TF-Antikörpers auf das Überleben der Bakterien

Den Tieren wurde vor der *E. coli*-Injektion ein spezifischer anti-TF-Antikörper injiziert. 30 Min. nach der Injektion erfolgte die Organentnahme. Bei der Bestimmung der Bakterienlast in Leber, Milz und Lunge konnte ein signifikanter Unterschied bei der Anzahl an lebenden Bakterien sowohl in der Leber als auch in der Milz der Tiere festgestellt werden, da in der mit anti-TF-Antikörper behandelten Gruppe die Bakterienzahl gegenüber der mit dem Isotyp behandelten Gruppe zunahm (Abb. 23 a).

In der mit anti-TF behandelten Gruppe wurde außerdem ein signifikant erniedrigter Sterbefaktor errechnet (Abb. 23 b). Dadurch konnte ein geringeres Überleben der Bakterien in dieser Gruppe gezeigt werden.

Die Fibrinanalyse zeigte nur eine geringe Menge an Fibrin nach Applikation des anti-TF-Antikörpers. Diese betrug 30 Min. nach Infektion in der mit 1H1 behandelten Gruppe $0,005 \pm 0,0$ % im Vergleich zu $2,11 \pm 0,5$ % in der Isotyp-Kontrolle (Abb. 24 a).

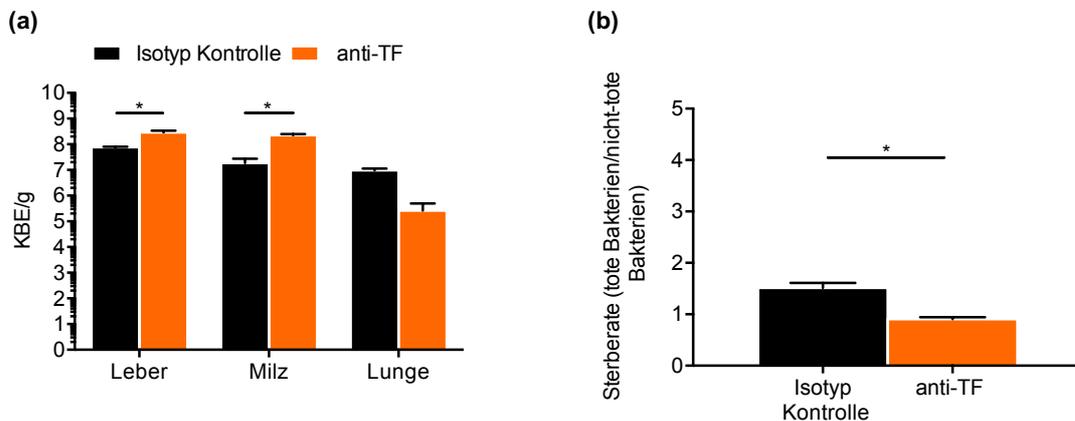


Abbildung 23: Bakterienlast und Sterberate in mit anti-TF-Antikörper behandelten Tieren (30 Min. nach Infektion) • (a) KBE/g in Leber, Milz und Lunge in anti TF-behandelten Tieren im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe (b) Sterberate in anti-TF-behandelten Tieren; Mittelwerte \pm SEM, n = 3-4, * p<0,05.

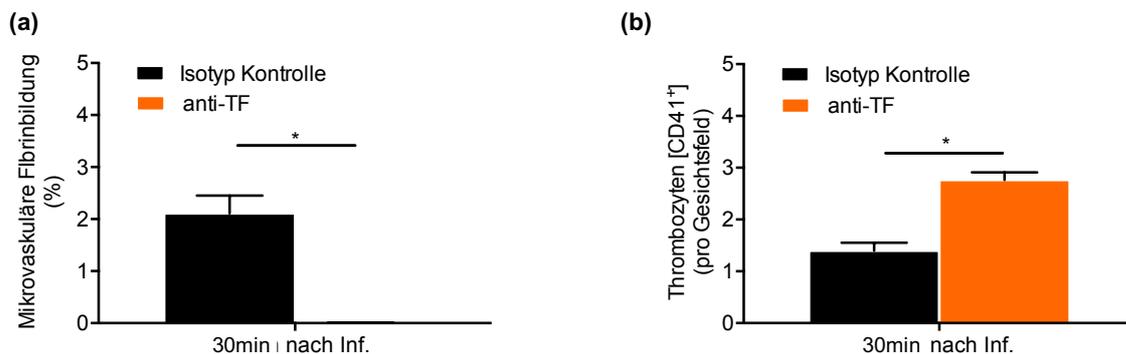


Abbildung 24: Fibrinbildung (a) und Thrombozytenrekretierung (b) in anti-TF-Antikörper behandelten Tieren • 30 Min. nach Pathogen-Injektion; Mittelwerte \pm SEM, n = 3-4, * p<0,05.

6. Beteiligung der einzelnen Komponenten der Immunthrombose an der Bakterieneliminierung

6.1. Lokalisation von *E. coli* und Immunzellen

Um einen Eindruck von der Lokalisation der Bakterien im Gewebe zu erhalten und um zu prüfen, inwiefern die Bakterien mit den an der Immunthrombose beteiligten Immunzellen in Zusammenhang stehen, wurden parallel Bakterien und Immunzellen visualisiert.

Zunächst wurde das Endothel der Lebersinusoiden sowie die Bakterien markiert. Hierbei wurde beobachtet, dass der Großteil der Bakterien über den gesamten Zeitraum zwischen 30 Min. bis 6 Std. mit dem Endothel in Kontakt steht und nicht ins Gewebe extravasiiert (Abb. 25).

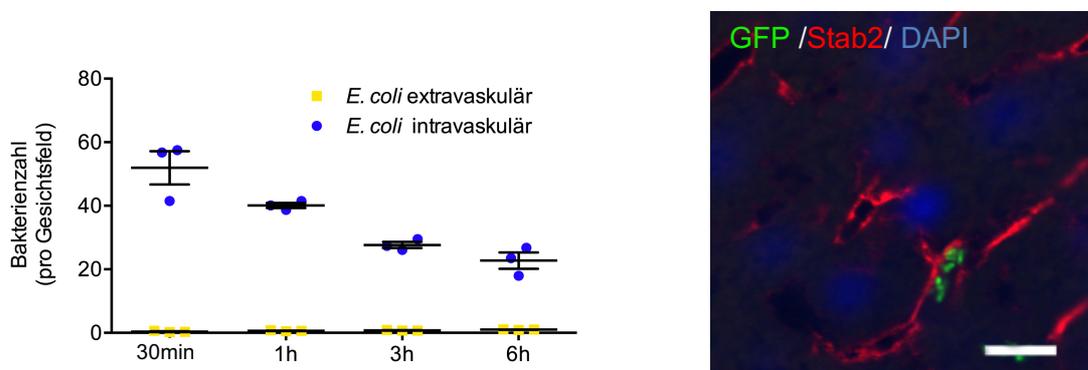
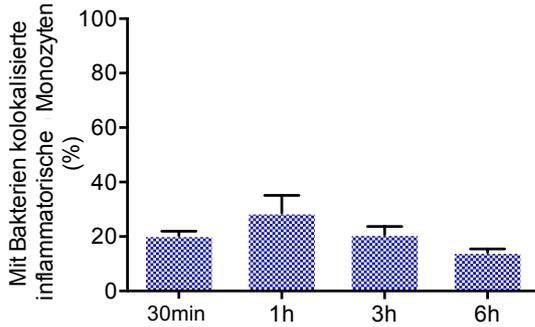


Abbildung 25: Bakterienlokalisierung in der Mikrozirkulation der Leber • Bakterienlokalisierung im Zeitverlauf mit repräsentativem Bildausschnitt bei 6 Std., (Maßstab, 10 µm); Mittelwerte ± SEM, n = 3-4.

Bei der Visualisierung von Bakterien und inflammatorischen Monozyten wurde nach 1 Std. ein Maximum der mit Bakterien kolokalisierten Immunzellen festgestellt. Der höchste Anteil an mit Bakterien kolokalisierten neutrophilen Granulozyten ließ sich hingegen nach 6 Std. beobachten (Abb. 26).

(a)



(b)

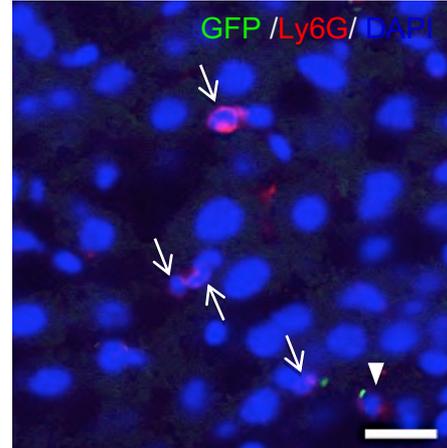
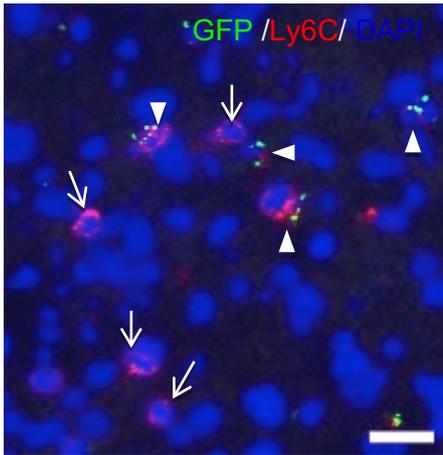
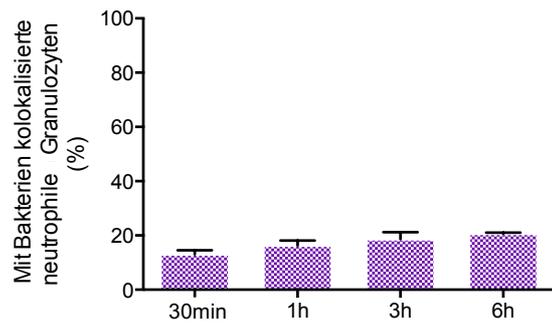


Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Kolokalisation von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten mit Bakterien: (a) Inflammatorische Monozyten mit repräsentativem Bild (b) Neutrophile Granulozyten mit repräsentativem Bild; Mittelwerte \pm SEM, $n = 3-4$, * $p < 0,05$; Bilder: \rightarrow Zellen ohne Bakterien, \blacktriangleright Zellen kolokalisiert mit Bakterien; (Maßstab, 10 μ m).

6.2. Differenzierung zwischen lebenden und toten Bakterien

Zum Verständnis des Vorgangs der Bakterieneliminierung ist es von erheblichem Interesse zwischen lebenden und toten Bakterien zu unterscheiden. In toten, nicht aber in lebenden Bakterien werden verschiedene RNA-Spezies schnell abgebaut (Kim et al., 2017). Daher wurde mit Hilfe eines *E. coli* spezifischen DNA-Oligonukleotids, an das ein Fluorophor gebunden war, bakterielle rRNA detektiert. Zusätzlich wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der mit GFP markierten *E. coli* mit Hilfe eines Anti-GFP-Antikörpers durchgeführt.

6.2.1. Kontrollexperiment zur FISH-Färbung

Zunächst wurde eine Kontrollfärbung durchgeführt, um zu überprüfen, ob mittels des für *E. coli* rRNA-spezifischen Oligonukleotids tatsächlich lebende von toten Bakterien unterschieden werden können.

Hierfür wurde auf einem Gewebe-Schnitt, der aus der Leber eines nicht infizierten Tieres gewonnen wurde, jeweils ein Tropfen in PBS gelöster lebender bzw. getöteter Bakterien (Erhitzung auf 70°C) gegeben. Nach einer kurzen Trocknung unter dem Abzug wurde die

Färbung des Schnittes entsprechend dem Protokoll der FISH-Methode durchgeführt (vgl. III. 5.2.4). Das Ergebnis ist in Abb. 27 zu sehen. Die lebenden Bakterien waren zu mehr als 95 % rRNA-positiv. Sämtliche tote Bakterien waren hingegen rRNA-negativ.

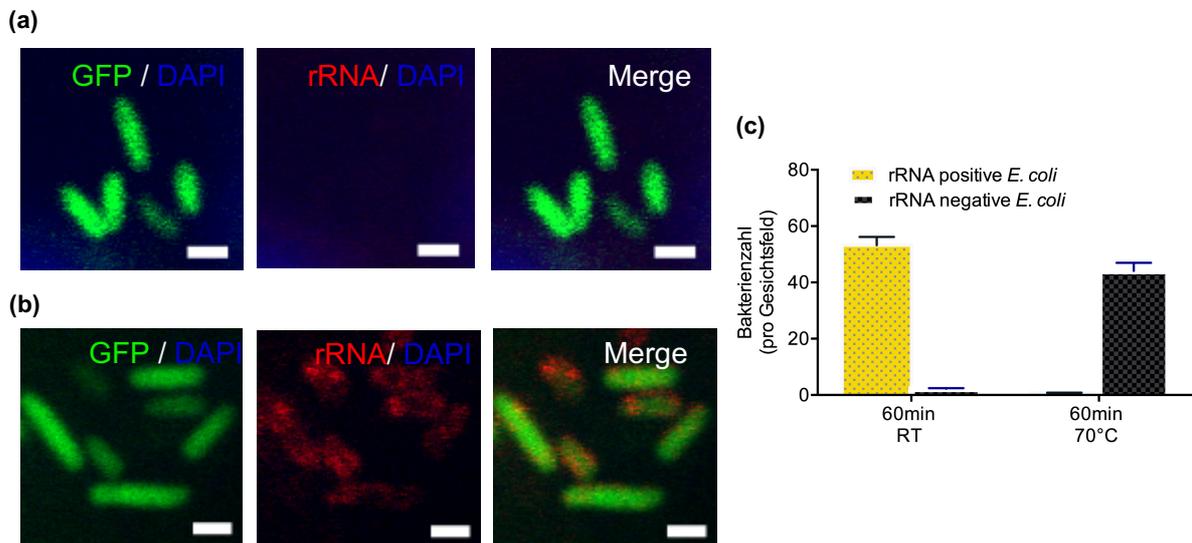


Abbildung 27: Ergebnis des FISH-Kontrollexperiment • (a) Bakterienprobe für 60 Min. auf 70°C erhitzt (b) Bakterienprobe für 60 Min. bei RT (Raumtemperatur); (Maßstab, 5 µm); Mittelwerte ± SEM, n = 10, * p<0,05.

6.2.2. FISH-Färbung

In einem nächsten Schritt wurden rRNA positive bzw. negative *E. coli* in Schnitten der Leber von *E. coli*-infizierten Tieren visualisiert (Abb. 28 a-c). Zwischen 1 und 3 Std. kam es zu einer deutlichen Reduktion der Gesamt-Bakterienzahl. Zwischen 3 und 6 Std. wurde die Gesamtbakterienzahl nur mäßig reduziert. Die rRNA-negativen Bakterien nahmen zwischen 1 und 3 Std. um 42% ab, die rRNA-positiven Bakterien um 41%. Zwischen 3 und 6 Std. stieg die Zahl der rRNA negativen Bakterien sogar leicht an, während die rRNA-positiven Bakterien weiter abnahmen. Insgesamt war die Zahl der rRNA negativen Bakterien nach 6 Std. deutlich höher als diejenige der rRNA positiven Bakterien.

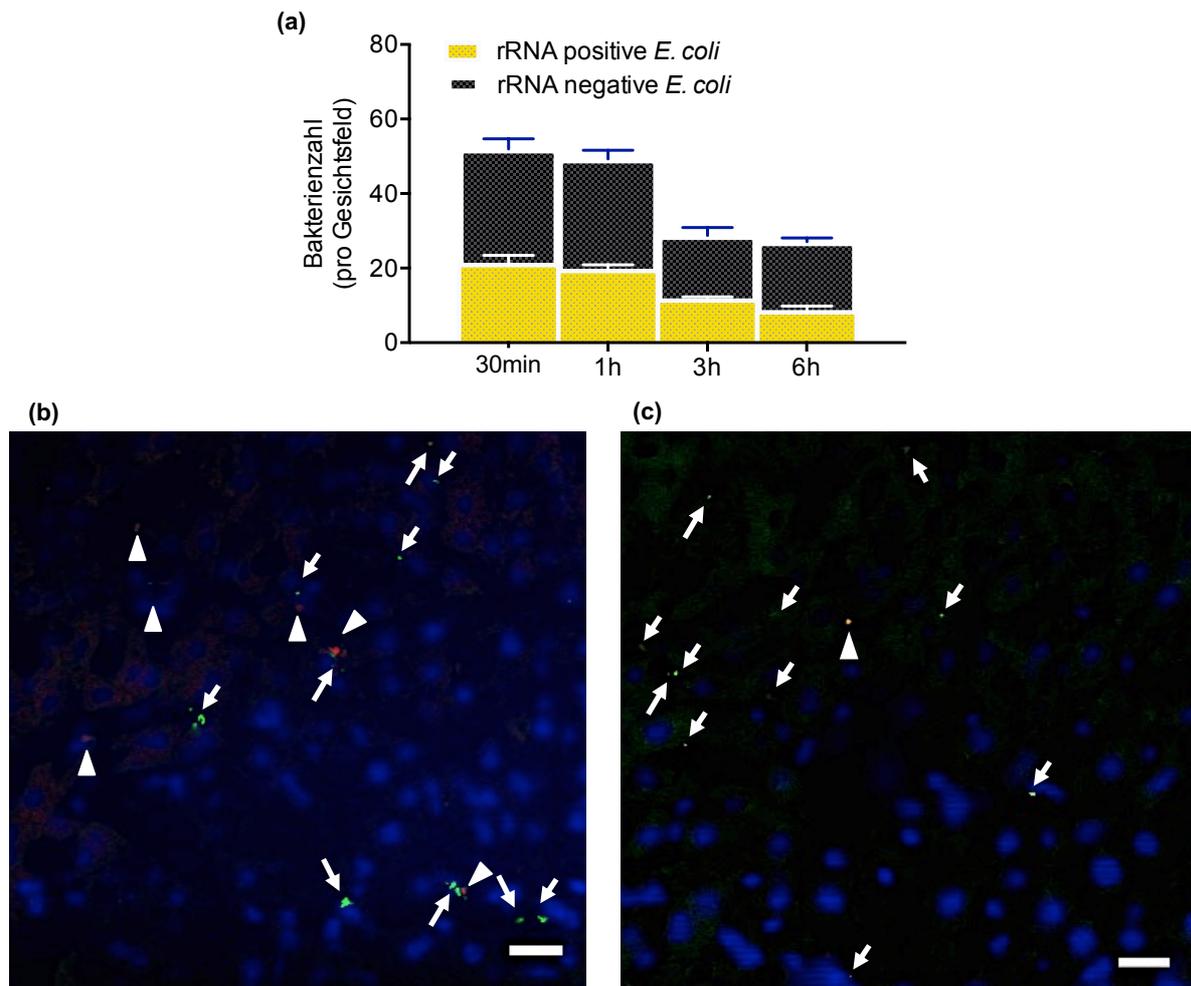


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der Anzahl an rRNA negativen und rRNA positiven Bakterien • (a) zeitlicher Verlauf der Bakterienzahl, Mittelwerte \pm SEM, $n = 3$, * $p < 0,05$; Repräsentative Bilder nach 3 Std. (b) und 6 Std. (c), (b)+(c) \rightarrow rRNA neg. *E. coli*, \blacktriangleright rRNA-pos. *E. coli* (Maßstab, 20 μm).

Um einen Hinweis auf den Einfluss der Fibrinbildung und der rekrutierten Immunzellen auf das Bakterienüberleben zu erhalten, wurde die FISH-Färbung mit den entsprechenden Immunfluoreszenzfärbungen ergänzt. Zunächst wurde die Lebend-Tot-Färbung der Bakterien mit der Fibrinfärbung kombiniert. Hierbei zeigte sich, dass nur nach 30 Min., nicht aber zu späteren Zeitpunkten, eine nennenswerte Kolo-kalisation der rRNA-positiven Bakterien mit Fibrin vorhanden war. In der Tat nahm die Anzahl der mit Fibrin kolokalisierten, rRNA positiven Bakterien mit zunehmender Infektionsdauer ab. Interessanterweise wurde eine deutliche Kolo-kalisation der rRNA negativen Bakterien mit Fibrin beobachtet; dies galt für alle unterschiedlichen Zeitpunkte (Abb. 29 a und b).

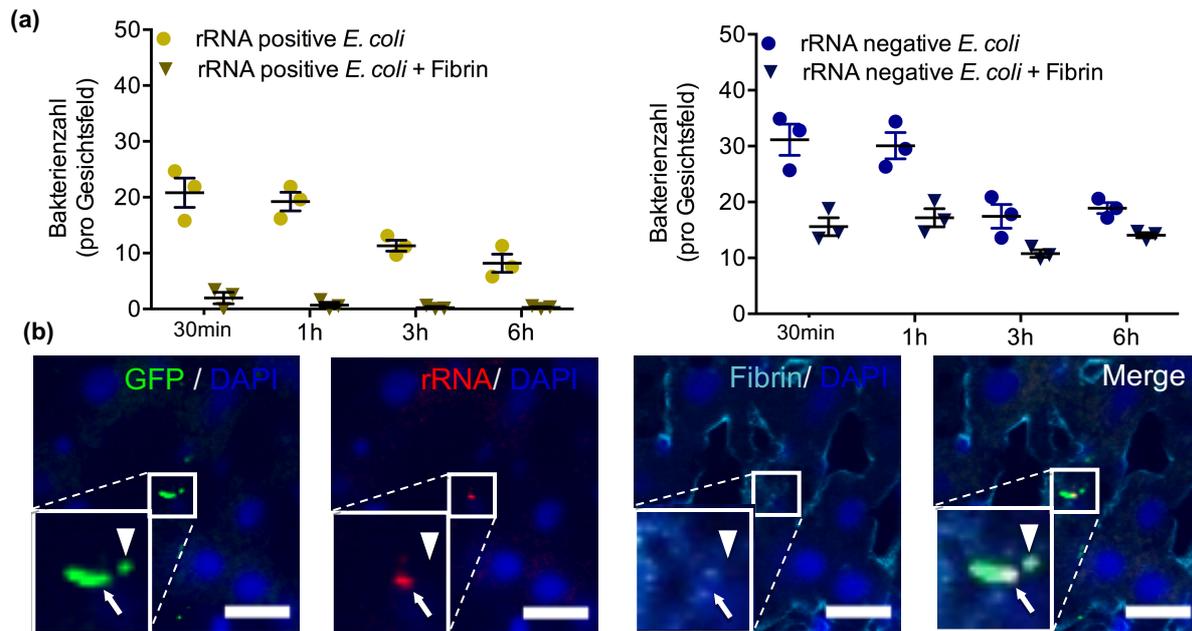


Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Kolokalisation rRNA positiver und rRNA negativer Bakterien mit Fibrin • (a) rRNA positive Bakterien: Gesamtzahl und mit Fibrin kolokalisiert; rRNA negative Bakterien: Gesamtzahl und mit Fibrin kolokalisiert; Mittelwerte \pm SEM, $n = 3$, * $p < 0,05$ (b) Bild 30 Min. nach bakterieller Infektion: \rightarrow rRNA positives Bakterium mit Fibrin, \blacktriangleright rRNA neg. Bakterium mit Fibrin (Maßstab, 10 μ m).

6.3 Bakterienüberleben in zelldepletierten Tieren

Um den Einfluss der einzelnen Zellpopulationen auf das Überleben der Bakterien zu charakterisieren, wurden die KBEs in den Organen der zelldepletierten Tiere bestimmt. Des Weiteren wurde die FISH-Färbung in der Leber der zelldepletierten Tiere durchgeführt, mit Hilfe deren lebende und tote Bakterien und deren Lokalisation erfasst werden konnten. Außerdem wurde der Sterbefaktor bestimmt, der sich aus dem Quotienten der Anzahl der rRNA negativen und rRNA positiven Bakterien zusammensetzt.

6.3.1. Depletion inflammatorischer Monozyten

Nach Depletion der inflammatorischen Monozyten mittels anti-CCR2-Antikörper war die Bakterienlast in der Leber im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abb. 30 a). In Milz und Lunge ließ sich kein signifikanter Effekt der Depletion beobachten. Die Lebend-Tot-Färbung ergab einen signifikanten Anstieg an rRNA-positiven und rRNA-negativen Bakterien in den depletierten Tieren (Abb. 30 b). Der Sterbefaktor tendierte zu leicht niedrigeren Werten nach Entfernung der inflammatorischen Monozyten (Abb. 30 c).

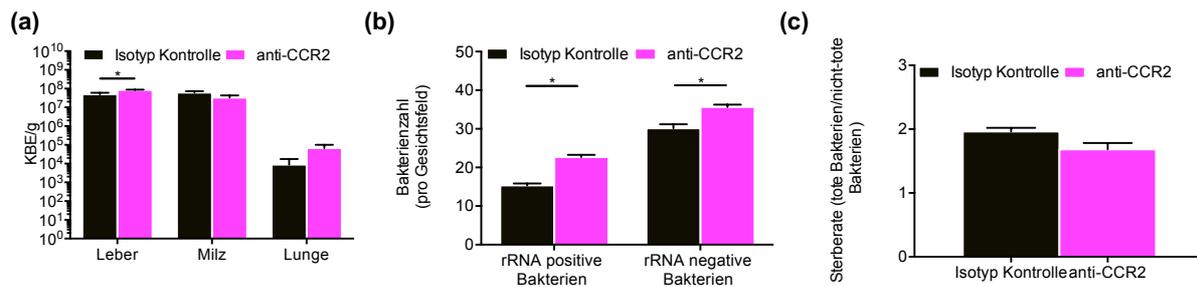


Abbildung 30: Bakterienlast in anti-CCR2 behandelten Tieren • 1 Std. nach Infektionsbeginn (a) KBE/g in Leber, Milz und Lunge (b) FISH-Lebend-Tot-Färbung in der Leber (c) Sterberate; Mittelwerte \pm SEM, n = 3, * p<0,05.

6.3.2. Depletion neutrophiler Granulozyten

Die Anzahl der Bakterienkolonien in Leber, Milz und Lunge war in den Tieren, welche vor *E. coli*-Injektion mit einem anti-Ly6G-Antikörper behandelt wurden und somit stark reduzierte neutrophile Granulozyten aufwiesen, erhöht (Abb 31 a). Des Weiteren konnte bei der FISH-Färbung der Bakterien in den depletierten Tieren, im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren, eine signifikant erhöhte Anzahl an rRNA-positiven Bakterien festgestellt werden (Abb. 31 b). Zudem war der Sterbefaktor erniedrigt (Abb. 31 c).

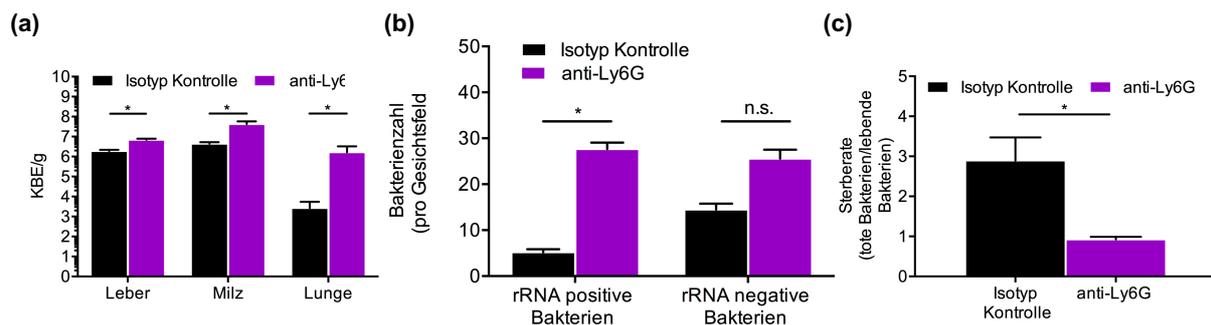


Abbildung 31: Bakterienlast in mit anti-Ly6G-Antikörper behandelten Tieren • 3 Std. nach Infektion (a) KBE/g in Leber, Milz und Lunge (b) FISH-Lebend-Tot-Färbung in der Leber (c) Sterberate; Mittelwerte \pm SEM, n = 3, * p<0,05.

6.3.3. Depletion der Thrombozyten

Nach Depletion der Thrombozyten war in Leber, Milz und Lunge das bakterielle Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert (Abb. 32 a).

Die Lebend-Tot-Färbung zeigt ebenfalls einen deutlichen Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die Anzahl der rRNA-positiven Bakterien pro Gesichtsfeld war in der behandelten Gruppe klar erhöht. Auch die rRNA-negativen Bakterien waren erhöht, allerdings weniger deutlich (Abb. 32 b).

Der ermittelte Sterbefaktor ließ ebenso wie die KBE-Werte auf ein erhöhtes Überleben der Bakterien in den zelldepletierten Tieren schließen.

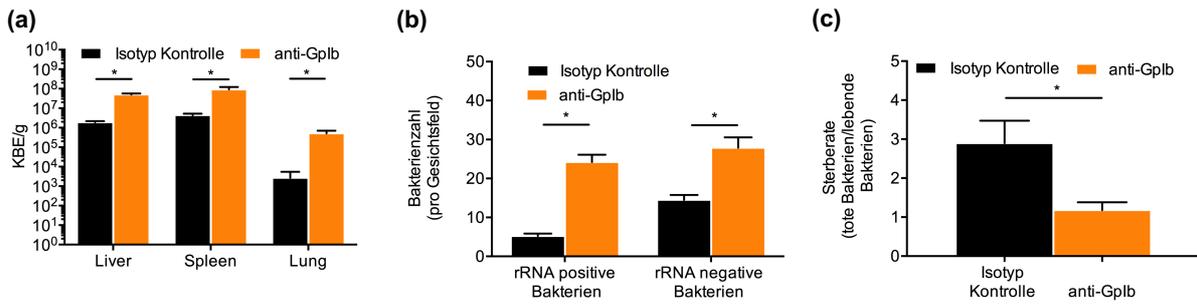


Abbildung 32: Bakterienlast in Anti-Gplb-Antikörper behandelten Tieren • 3 Std. nach Infektion (a) KBE/g in Leber, Milz und Lunge (b) FISH-Lebend-Tot-Färbung (c) Sterberate; Mittelwerte \pm SEM, n = 3, * p<0,05.

6.4. Bakterienüberleben nach Thrombin- bzw. Faktor Xa-Inhibition

6.4.1. Dabigatran-behandelte Tiere

Nach Zugabe des Thrombin-Inhibitors Dabigatran war die Fibrinbildung in der Mikrozirkulation der Leber, im Vergleich zur Kontrolle, von $9,6 \pm 0,36$ % auf $2,7 \pm 0,24$ reduziert (Mittelwert \pm SEM, n = 3, * p < 0,05). Die KBE-Auswertung in Leber und Milz ergab eine beträchtliche Erhöhung der Bakterienzahl in den mit Dabigatran behandelten Tieren (Abb. 33 a).

Bei der Färbung der rRNA-positiven und rRNA-negativen Bakterien stellten wir in der mit Dabigatran behandelten Gruppe eine Zunahme beider Bakterienzahlen fest. Die Sterberate war im Vergleich zur Kontrolle deutlich vermindert (Abb. 33 a und b).

Darüber hinaus wurde die Zahl der rekrutierten neutrophilen Granulozyten, inflammatorischen Monozyten, Thrombozyten und T-Zellen bestimmt (Daten nicht gezeigt). Lediglich bei den inflammatorischen Monozyten konnte ein Unterschied in der Zellrekrutierung festgestellt werden. Diese erhöhte sich in der mit Dabigatran behandelten Gruppe von $13,1 \pm 1,8$ Zellen pro Gesichtsfeld (Kontrolle) auf $23,0 \pm 0,3$ Zellen pro Gesichtsfeld (Dabigatran) (Mittelwert \pm SEM, n = 3, * p < 0,05).

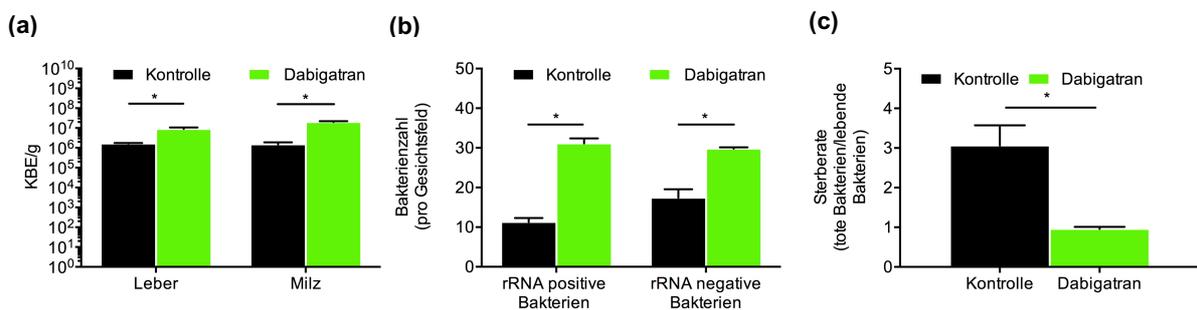


Abbildung 33: Bakterienlast in mit Dabigatran behandelten Tieren • 3 Std. nach Infektion (a) KBE/g in Leber, Milz und Lunge (b) FISH-Lebend-Tot-Färbung in der Leber (c) Sterberate; Mittelwerte \pm SEM, n = 3, * p<0,05.

6.4.2. Rivaroxaban-behandelte Tiere

Die Infusion des Faktor Xa-Inhibitors Rivaroxaban reduzierte die mikrovaskuläre Fibrinbildung in der Leber von $9,6 \pm 0,3$ % (Kontrolle) auf $1,7 \pm 0,1$ % (Rivaroxaban)

(Mittelwert \pm SEM, $n = 3$ * $p < 0,05$). Bei der KBE-Analyse konnte in Leber, Milz und Lunge eine erhöhte Bakterienzahl nach Antikoagulation mit Rivaroxaban ermittelt werden (Abb. 34 a). Außerdem steigerte Rivaroxaban die Zahl der rRNA-positiven Bakterien in der Leber (Abb. 34 b, Abb. 35). Der Sterbefaktor ließ ebenfalls auf ein erhöhtes Überleben der Bakterien in der mit Rivaroxaban behandelten Gruppe schließen (Abb. 34 c).

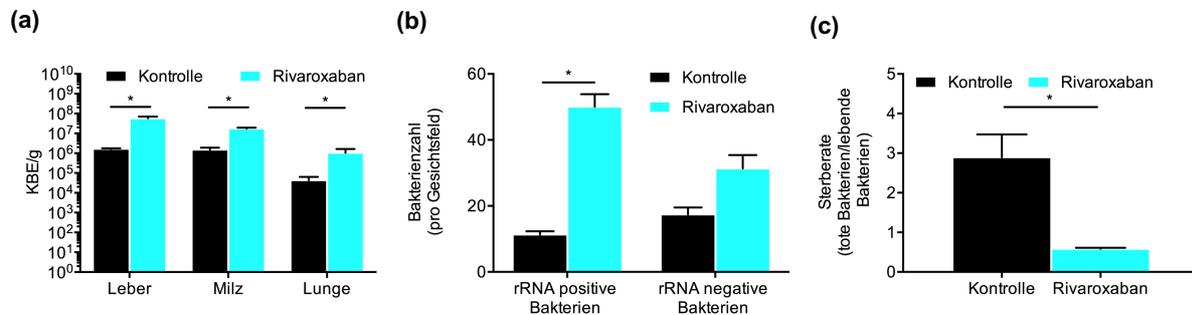


Abbildung 34: Bakterienlast in Rivaroxaban-behandelten Tieren • 3 Std. nach Infektion (a) KBE/g in Leber, Milz und Lunge (b) FISH-Lebend-Tot-Färbung (c) Sterberate; Mittelwerte \pm SEM, $n = 3$, * $p < 0,05$.

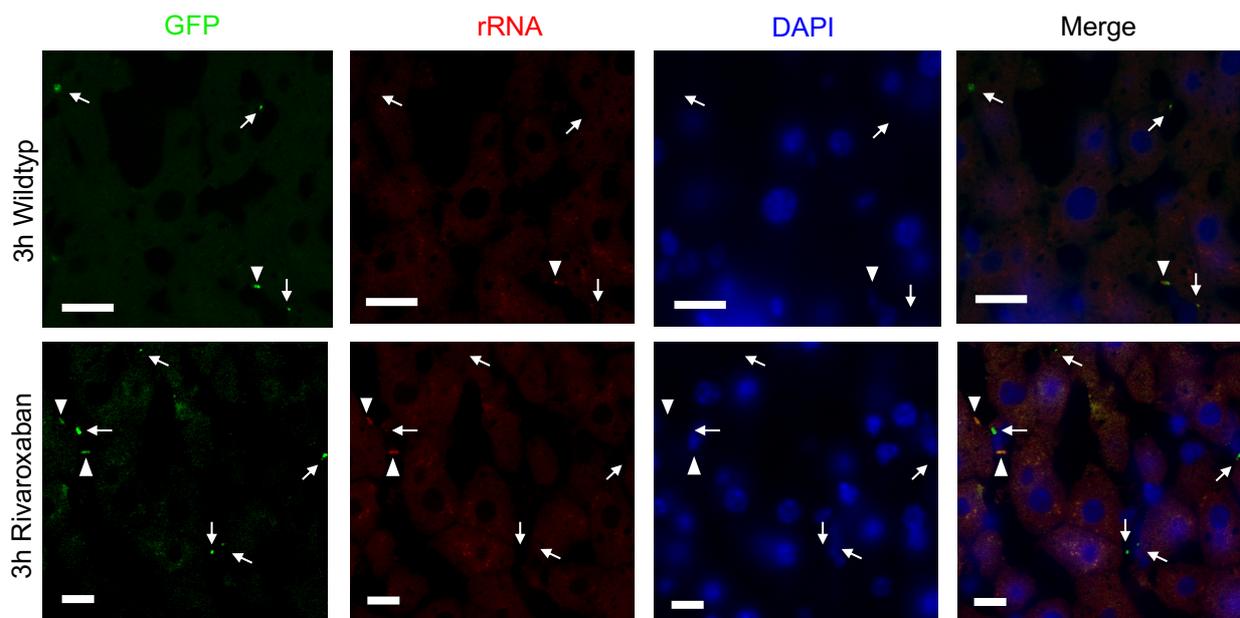


Abbildung 35: Vergleich rRNA positiver und negativer Bakterien in Kontrolltieren und Rivaroxaban behandelten Tieren (3 Std. nach Infektion) \rightarrow rRNA negative Bakterien \blacktriangleright rRNA positive Bakterien; (Maßstab, 20, μ m).

Bei der Analyse der Immunzellrekrutierung konnte eine signifikant erhöhte Rekrutierung der inflammatorischen Monozyten in der Leber der mit Rivaroxaban behandelten Tiere festgestellt werden. Diese stieg von $13,1 \pm 0,3$ pro Gesichtsfeld (Kontrolle) auf $21,0 \pm 1,7$ pro Gesichtsfeld (Rivaroxaban) an (Mittelwert \pm SEM, $n = 3$, * $p < 0,05$). Die Rekrutierung der anderen untersuchten Zellen war unverändert (Daten nicht gezeigt).

6.5. *In vitro* Experimente zum Bakterienüberleben nach Thrombus-Bildung

Um den Einfluss der Fibrinbildung auf das Überleben der Bakterien *in vitro* zu charakterisieren, wurde Fibrinogen mittels Thrombin in Fibrin umgewandelt. In getrennten Ansätzen wurde die Fibrinbildung mit dem Thrombininhibitor Hirudin gehemmt. Die Messung der Bakterienlast (KBE/ μ l) erfolgte 30 und 90 Min. nach Start der Thrombus-Bildung.

Nach Ausplattierung der aus den Thromben erstellten Verdünnungsreihen konnte durch die Errechnung der KBE-Werte gezeigt werden, dass in den mit Hirudin versetzten Proben eine signifikant höhere Bakterienzahl vorhanden war (Abb. 36 a und b).

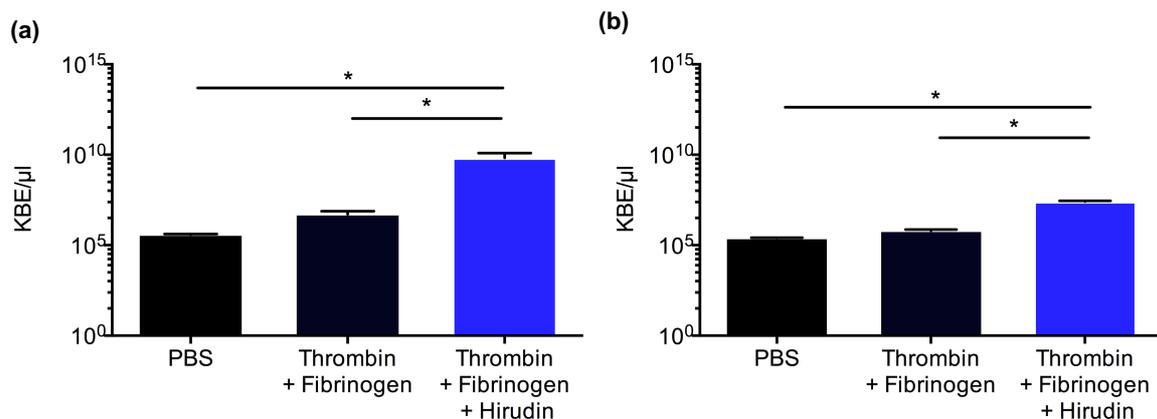


Abbildung 36: Bakteriellcs Überleben in Fibrinthromben *in vitro* • Vergleich der Bakterienzahl nach Thrombus-Bildung und bei Inhibition der Fibrinbildung mit Hirudin 30 Min. (a) und 90 Min. (b) nach Start der Gerinnung; Mittelwerte \pm SEM, n = 6-8, * p<0,05.

Als nächstes wurde die Wirkung von Hirudin auf das bakterielle Überleben in PPP getestet, wobei in diesem Fall die Fibrinthromben mit TF getriggert wurden. Sowohl nach 30 Min., als auch nach 90 Min.-Inkubation wurde die Bakterienzahl durch den Thrombininhibitor ausgeprägt erhöht (Abb. 37 a und b).

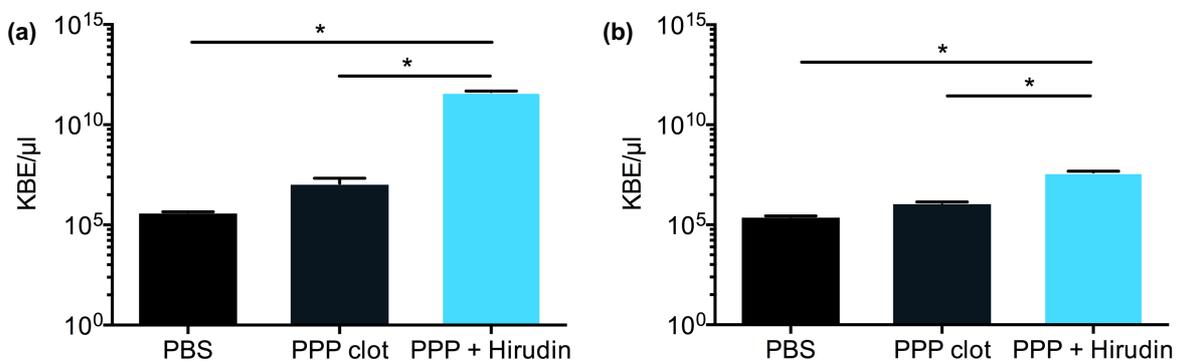
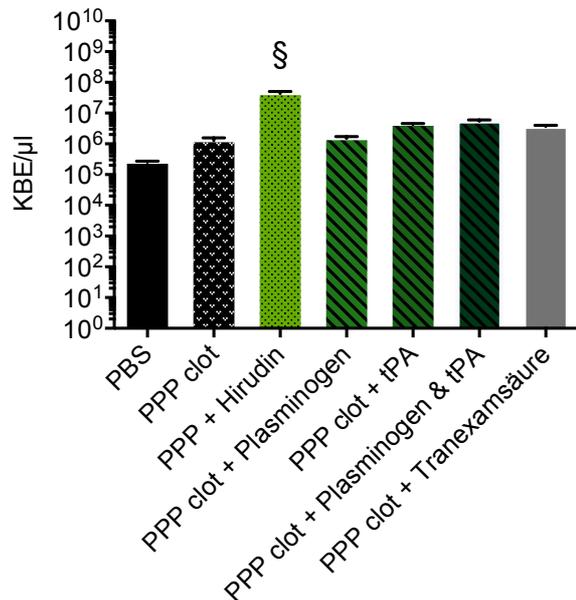


Abbildung 37: Bakterienüberleben in Fibrinthromben *in vitro* mit PPP und TF • Vergleich der Bakterienzahl nach Thrombus-Bildung und bei Inhibition der Fibrinbildung mit Hirudin 30 Min. (a) und 90 Min. (b) nach Start der Gerinnung; Mittelwerte \pm SEM, n = 6-8, * p < 0,05.

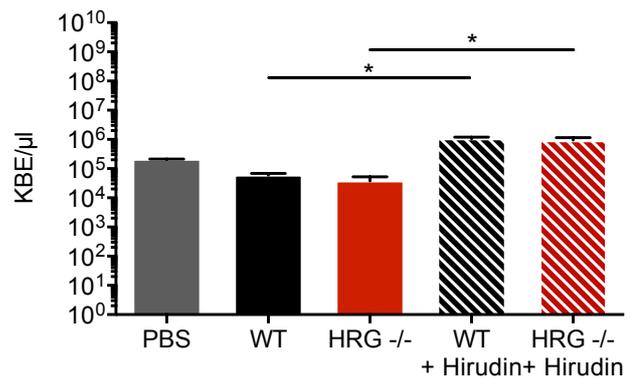
Abbildung 38: Einfluss fibrinolytischer Proteine auf das Bakterienüberleben • Thrombus-Bildung durch humanes PPP und Thrombin mit Zugabe von Hirudin, Plasminogen, tPA sowie Plasminogen und tPA, Tranexamsäure; Mittelwerte \pm SEM, n = 8-10, § p<0,05 vs. alle Gruppen.



Um den Einfluss der Fibrinolyse und fibrinolytischer Proteine auf das Bakterienüberleben zu charakterisieren, wurde der Versuch mit PPP sowohl mit gesteigerter Fibrinolyse als auch gehemmter Fibrinolyse durchgeführt. Vergleichend dazu wurde die Thrombin-Inhibition mit Hirudin analysiert. Es zeigte sich, dass das Bakterienüberleben lediglich nach Thrombin-Inhibition gesteigert wurde, sonst ergaben sich keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrolle (Abb. 38).

Danach wurden Experimente mit PPP von Histidine-rich-Glycoprotein-defizienten Mäusen (HRG-defizient) durchgeführt (Abb. 38). Diesen Tieren fehlte das Gen HRG, das diverse Rollen im Immun- und Gerinnungssystem spielen kann. Fibrinthromben aus dem PPP von HRG-defizienten Mäusen zeigten denselben Effekt auf das bakterielle Überleben wie Fibrinthromben die in PPP aus Kontrolltieren gebildet wurden (Abb. 39). In beiden Mäusepopulationen steigerte die Thrombininhibition das Bakterienüberleben (Abb. 39).

Abbildung 39: Wirkung von HRG auf das Bakterienüberleben in Fibrinthromben • Thrombus-Bildung durch Thrombin und PPP aus Wildtypen und HRG-Knock-Out-Tieren sowie jeweils der Zugabe von Hirudin zur Hemmung der Gerinnung, Mittelwerte \pm SEM, n = 4, * p<0,05.



Um weitere Hinweise auf die Ursache des Bakteriensterbens während der Fibrinbildung zu erhalten, wurden die Thromben im konfokalen Mikroskop visuell dargestellt. Hierbei wurde Fibrinogen eingesetzt, an welches ein Fluorophor gebunden war. Lebende Bakterien wurden von toten Bakterien mit Hilfe des in III. 2.3 beschriebenen Färbungskits unterschieden (Abb. 40).

Nach 15 Min. Inkubationszeit wurden repräsentative Bilder der Thromben mit Hilfe des konfokalen Mikroskops erstellt. Nach 60 Min. stellten wir eine Zunahme der toten Bakterien, die sich durch eine Positivität in Grün und Rot auszeichneten, sowie eine Zunahme der Fibrinfäden und von deren Dichte fest. Weiterhin fiel eine zeitabhängige Verformung der Bakterien auf. Während diese zu früheren Zeitpunkten eine typische Stäbchenform besaßen, verloren sie letztere meist nach 60 Min. und stellten sich dann eher rund dar (Abb. 40). Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Bakterien eher in den Maschen des Fibrinnetzwerkes lokalisiert waren.

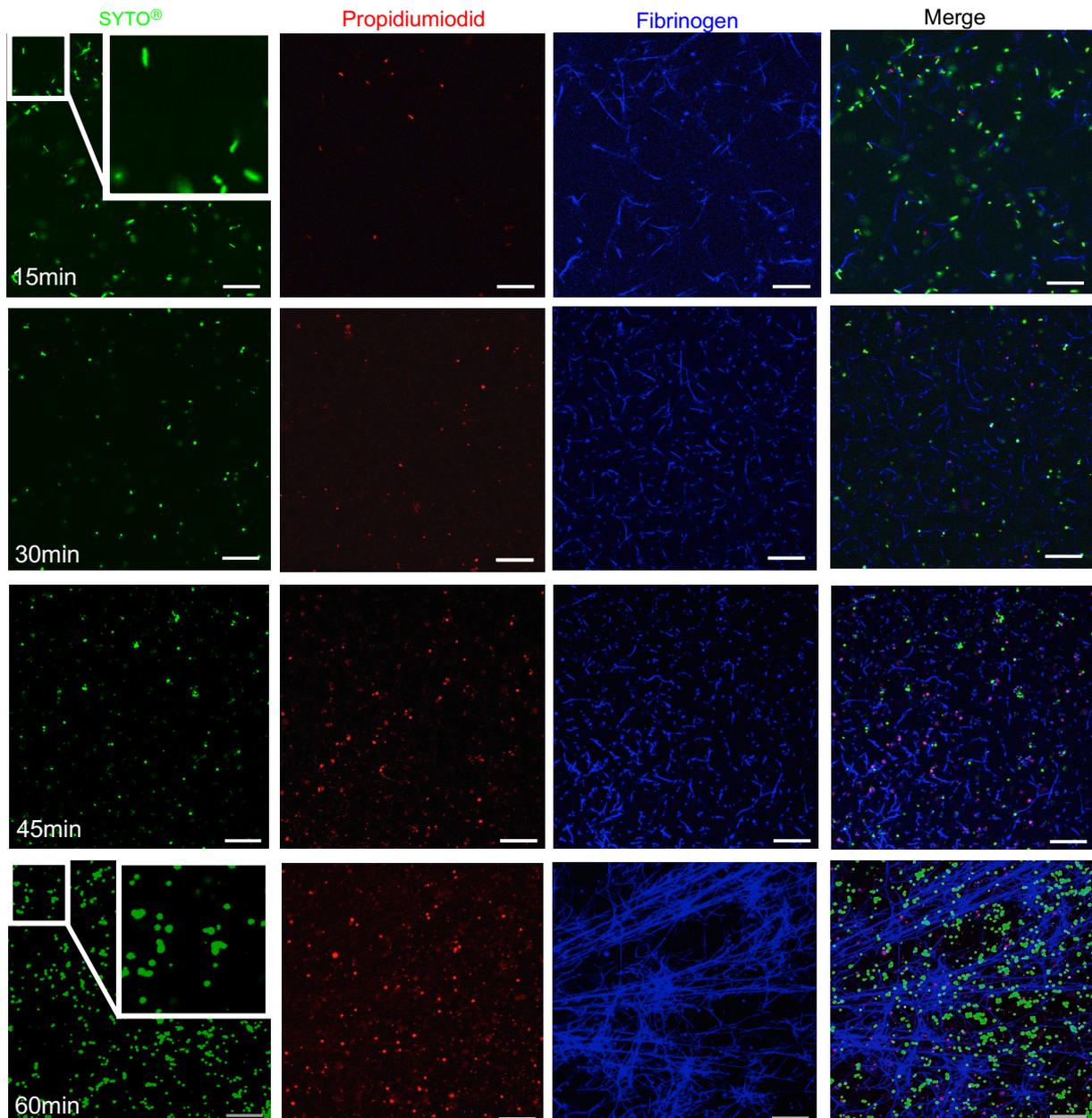


Abbildung 40: Visualisierung von *E. coli* während der Bildung eines Fibrinthrombus (aus Fibrinogen und TF); SYTO = Nukleinsäure-Färbung von lebenden und toten Organismen, Propidiumiodid = selektive Färbung toter Bakterien; Inset: Verformung der Bakterien nach 60 Min. im Vgl. zu 15 Min. nach Thrombus Bildung, (Maßstab 10 µm).

6.5.1. Bakterienüberleben in C5-defizienten Mäusen

Um die Rolle des Komplementsystems während der Immunthrombose zu charakterisieren, wurden *E. coli*-Infektionen an C5-defizienten Mäusen durchgeführt. Hierbei war von besonderem Interesse, welchen Einfluss C5 (eine zentrale Komponente des Komplementsystems) auf die Fibrinbildung und auf das Bakterienüberleben aufweist. Daher wurden Immunfluoreszenzfärbungen für Fibrin und verschiedene Immunzellen sowie Lebend-Tot-Färbungen der Bakterien durchgeführt. Weiterführend wurden KBE-Analysen in Milz und Leber vorgenommen.

In der Milz der C5-defizienten Mäusen war die Bakterienlast 1 bzw. 3 Std. nach Infektionsbeginn gegenüber den Kontrolltieren erhöht, während in der Leber kein Unterschied nachweisbar war (Abb. 41 a und b). Die Zahl der leberassoziierten rRNA positiven Bakterien sowie der rRNA-negativen Bakterien war in den beiden Mäusespezies vergleichbar (Abb. 41 b und c). Der Sterbefaktor war jedoch in den C5-defizienten Tieren gegenüber den Kontrollmäusen erhöht (Abb. 41 d).

Des Weiteren konnte eine signifikant erhöhte Anzahl an inflammatorischen Monozyten in der Leber der C5-defizienten Tiere festgestellt werden (Abb. 42 b). Auch die Thrombozytenzahl

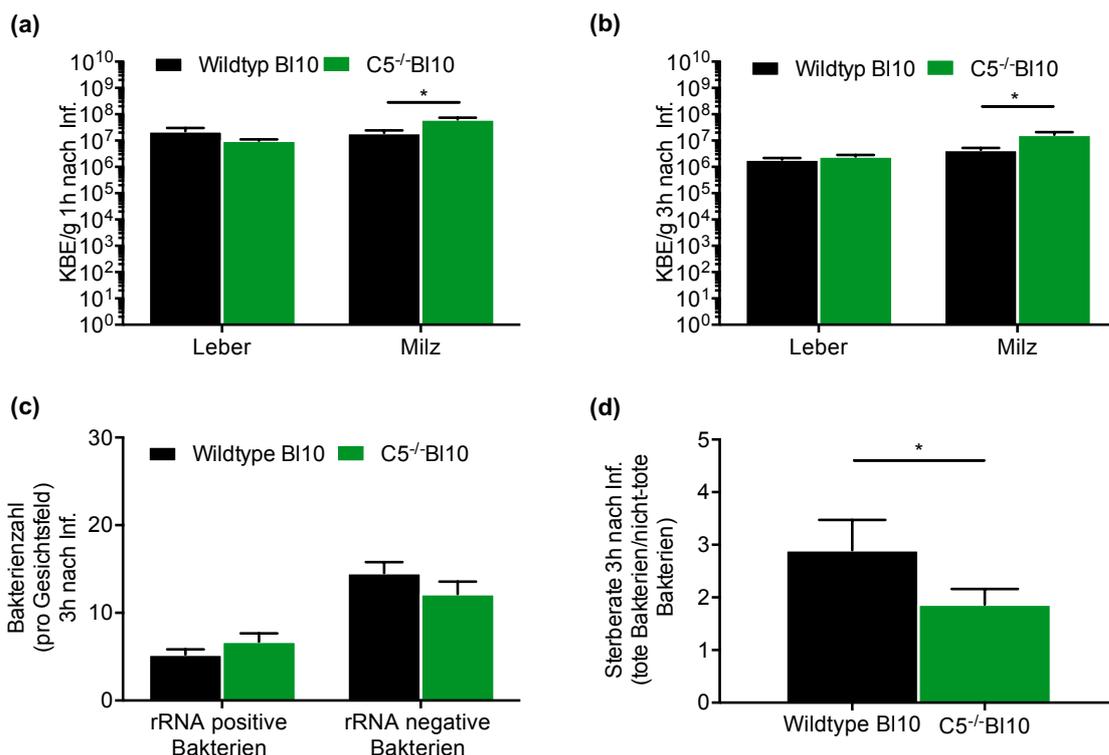


Abbildung 41: Lebende und tote Bakterien in C5-defizienten Tieren • (a) KBE/g in Leber und Milz 1 Std. nach Infektion, (b) KBE/g in Leber und Milz 3 Std. nach Infektion, (c) FISH-Lebend-Tot-Färbung 3 Std. nach Infektion (d) Sterbefaktor 3 Std. nach Infektion; Mittelwerte \pm SEM, n = 3-4, * p<0,05.

war nach drei Stunden von $2,1 \pm 0,1$ Zellen pro Gesichtsfeld in der Kontrollgruppe auf $3,4 \pm 0,6$ Zellen pro Gesichtsfeld (Mittelwert \pm SEM, n = 3-4 * p < 0,05) gestiegen. Die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten unterschied sich zwischen den C5-defizienten Mäusen und den Kontrolltieren nicht (Abb. 42 b).

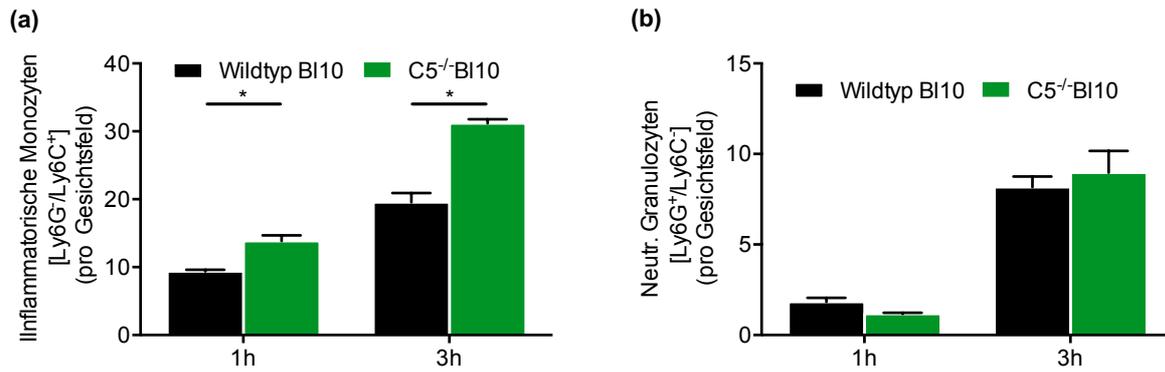


Abbildung 42: Zellrekretierung in C5-defizienten Tieren • Inflammatorische Monozyten (a) und neutrophile Granulozyten (b) 1 Std. bzw. 3 Std. nach Infektion mit *E. coli*; Mittelwerte \pm SEM, n = 3-4, * p<0,05.

Bezüglich der Fibrinbildung ließ sich zwischen den C5-defizienten Tieren und der Kontrollmäusen kein signifikanter Unterschied beobachten (Daten nicht gezeigt).

7. NKT-Zellen als Träger von TF und Initiatoren der intravaskulären Fibrinbildung

Bei der Analyse der mikrovaskulären Fibrinbildung fiel eine Zellspezies auf, die besonders häufig mit Fibrin assoziiert war, aber keine Merkmale myeloider Zellen aufwies.

Zur Identifizierung dieser Zellspezies wurden zunächst die Leberschnitte mit einem Pan-T-Zell-Marker angefärbt. Hierbei wurde ein Antikörper gegen CD90 (THY1) verwendet und, wie in Tabelle 6 beschrieben, eingesetzt. Da bereits nach kurzer Zeit THY-1-positive Zellen rekrutiert worden waren, vermuteten wir, dass es sich um eine Population der angeborenen T-Zellen handeln könnte und setzten CD127 als Marker ein. Alle angefärbten THY-1-positiven Zellen waren für CD127 ebenfalls positiv.

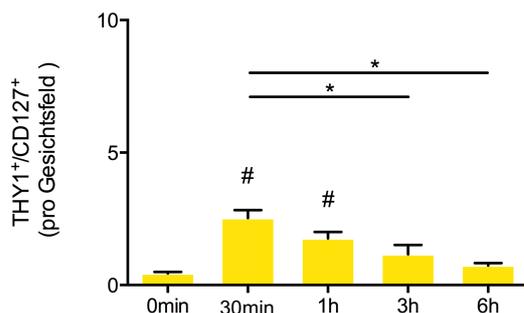
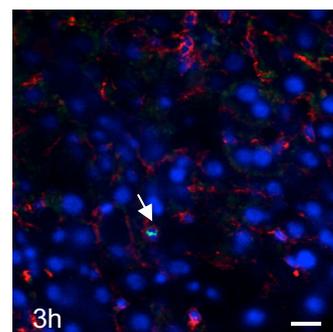
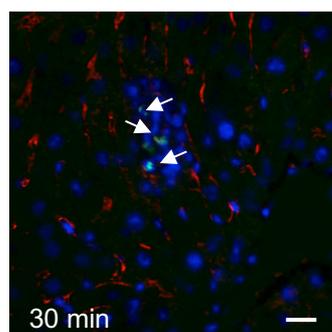
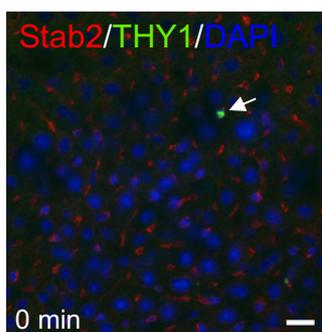


Abbildung 43: Zeitlicher Verlauf der Rekrutierung der THY1⁺/CD127⁺ Zellen in der Mikrozirkulation der Leber • oben: Mittelwerte \pm SEM, n = 3-4. * p<0,05., # vs. 0 min. unten: repräsentative Bilder \rightarrow intravaskuläre innate T-Zellen; (Maßstab 5 μ m).



Es zeigte sich eine schnelle Rekrutierung von THY1- und CD127-positiven Zellen im Verhältnis zur nicht infizierten Kontrolle (Abb. 43). Zwischen 30 Min. und 6 Std. fiel die Zahl der rekrutierten Zellen wieder ab. Die THY1⁺/CD127⁺ Zellen zeigten eine deutliche Kolokalisation mit Fibrin (Abb 44 a).

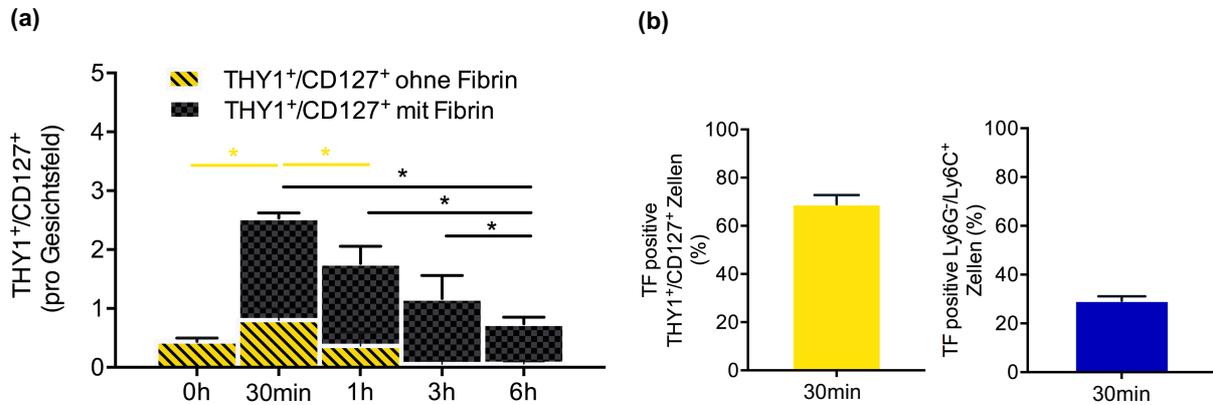


Abbildung 44: (a) Zeitlicher Verlauf der mit Fibrin kolokalisierten THY1⁺/CD127⁺ Zellen (b) Prozentualer Anteil der TF-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl: TF-positiv THY1⁺/CD127⁺ Zellen und TF-positiv inflammatorische Monozyten; Mittelwerte ± SEM, n = 3-4, * p < 0,05.

Im Anschluss wurde die TF-Expression der T-Zellen analysiert. Überraschenderweise waren fast 70% der Zellen TF-positiv (Abb. 44 b). Hingegen waren nur etwas mehr als 20% der inflammatorischen Monozyten zu demselben Zeitpunkt TF-positiv (Abb. 44 b)

Zur genaueren Identifizierung der T-Zell-Population erfolgte eine Färbung der Schnitte mit verschiedenen T-Zell-Subpopulationsmarkern, die jedoch alle bis auf eine Ausnahme nicht nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Diese Ausnahme betraf den Natural-Killer-T-Zell-Marker (NKT-Zellmarker) CD1d (Abb. 45). Wie in Abbildung 45 gezeigt, waren nahezu alle THY1-positiven Zellen CD1d-positiv und somit NKT-Zellen. Diese waren zu 99 % TF-positiv.

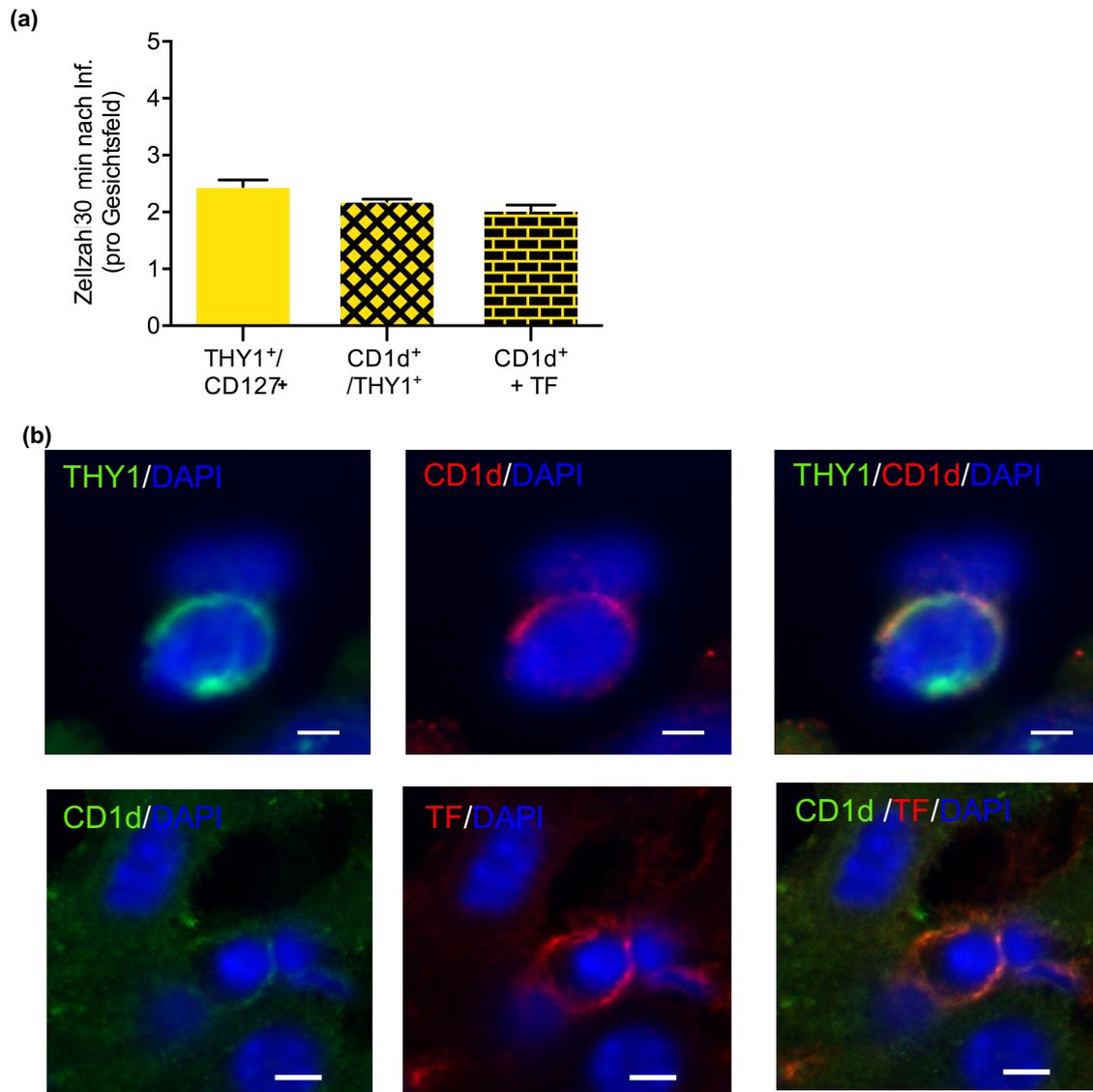


Abbildung 45: NKT-Zellen in der Mikrozyklulation der Leber 30 Min. nach Infektion • (a) Anzahl Thy1⁺/CD127⁺-Zellen, CD1d⁺-Zellen und CD1d⁺/TF⁺-Zellen, Mittelwerte ± SEM, n = 3-4, * p<0,05. (b) Repräsentative Bilder der Daten von (a), (Maßstab 5 µm).

7.1. *In vitro* Experimente mit NKT-Zellen

Um die TF-Expression der NKT-Zellen *in vitro* zu überprüfen, wurden NKT-Zellen aus der Leber von Wildtyp-Mäusen bzw. infizierten Tieren isoliert. Zunächst wurden die gesamten Lymphozyten aus der Leber isoliert und daraufhin die NKT-Zellen mittels FACS gesortet.

7.1.1. Visualisierung der NKT-Zellen in einer T-Zell-Misch-Population und Nachweis von TF

In der Zellsuspension wurden NKT-Zellen und TF-positive Zellen markiert. Die Zellsuspension wurde auf einen Objektträger aufgetragen und mit dem konfokalen Mikroskop analysiert. Hierbei konnten in den, aus den Kontrolltieren isolierten Lymphozyten 9,8 % mit Hilfe der Tetramerverfärbung (Vgl. 5.2.3) als NKT-Zellen identifiziert (Abb. 46 a), im Vergleich zur infizierten Gruppe, hier waren es 19,8 %. Eine TF-Expression konnte in beiden Gruppen mittels Anti-TF-Antikörper visualisiert werden (Abb. 46 b).

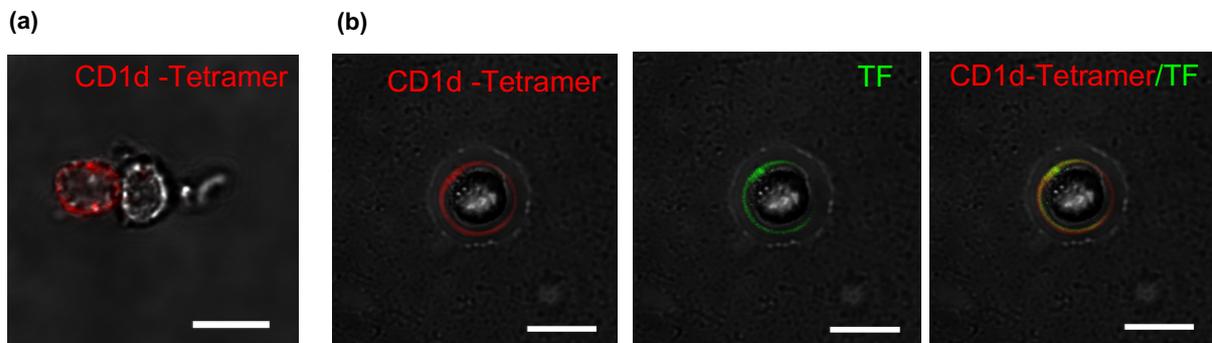


Abbildung 46: Analyse der *ex vivo* isolierten NKT-Zellen bezüglich der Expression von TF • (a) Tetramer positiver Lymphozyt (b) repräsentatives Bild einer TF positiven NKT-Zelle; (a)+(b) n= 3, (Maßstab 10 µm).

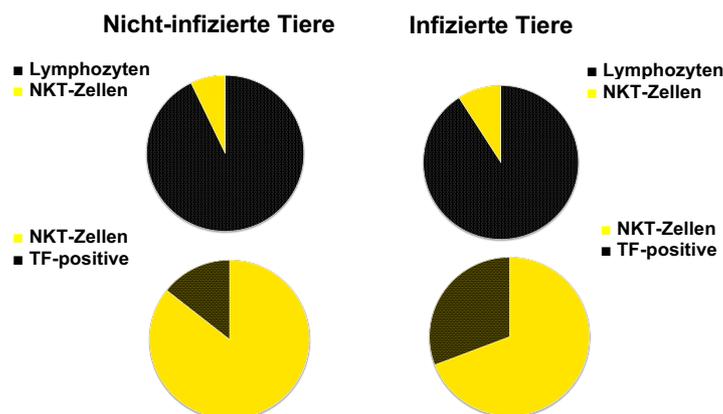


Abbildung 47 : FACS- Analyse von *ex vivo* isolierten NKT-Zellen bezüglich der Expression von TF • TF-positive NKT-Zellen in nicht infizierten Tieren und infizierten Tieren, markiert durch PE-positive CD1d-Tetramere und FITC markierten anti- TF-Antikörper, n=1.

Als nächstes wurde die TF-Expression der NKT-Zellen (CD1d Tetramer positive Zellen) mit Hilfe des FACS analysiert. Hierbei zeigten sich ähnliche Ergebnisse (Abb. 47).

7.1.2. Funktionelle Tests mit isolierten NKT-Zellen

Zur Überprüfung der prokoagulatorischen Aktivität der NKT-Zellen wurden funktionelle Tests mit den *ex vivo* isolierten NKT-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mittels Zellsortierung aus infizierten und nicht infizierten transgenetisch veränderten Mäusen (Va14-Ja281), die eine erhöhte Anzahl an NKT-Zellen aufweisen, isoliert. Zunächst wurde die Faktor Xa-Bildung analysiert. Anschließend wurde mit Hilfe der Thrombelastographie (TEG) überprüft, ob sich die Gerinnungszeit durch die Zugabe unterschiedlicher Zellproben in das murine Vollblut verändert. Des Weiteren wurde ein Thrombus mit Mausblut erstellt, wobei die Zellen nach der Rekalzifizierung zu PPP hinzugegeben wurden.

Sowohl in den aus Wildtypen gewonnenen NKT-Zellen als auch in den aus mit *E. coli* infizierten Tieren gewonnenen NKT-Zellen war die Faktor Xa-Bildung vollständig durch den anti-TF-Antikörper hemmbar (Abb. 48).

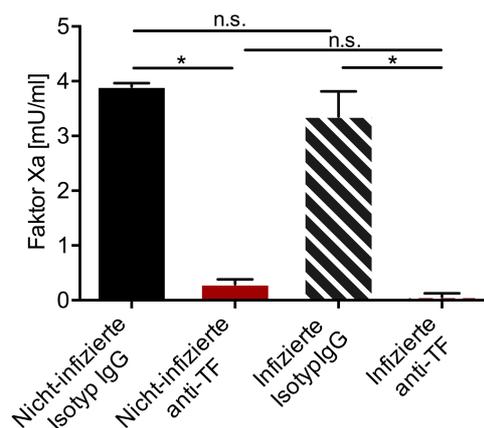


Abbildung 48: Faktor Xa-Bildung durch *ex vivo* isolierte NKT-Zellen (Die Zellen wurden mittels Zellsortierung aus infizierten und nicht infizierten transgenetisch veränderten Mäusen mit erhöhte NKT-Zell-Expression isoliert)
 • Mittelwerte \pm SEM, n = 3-4, * p<0,05.

Im TEG induzierten die Zellen, die aus den mit *E. coli* infizierten Tieren gewonnen worden waren eine Verminderung der Gerinnungszeit, gleichbedeutend mit einer deutlichen Steigerung der Fibrinbildung (Abb. 49). Dieser Effekt war durch den anti-TF-Antikörper vollständig hemmbar.

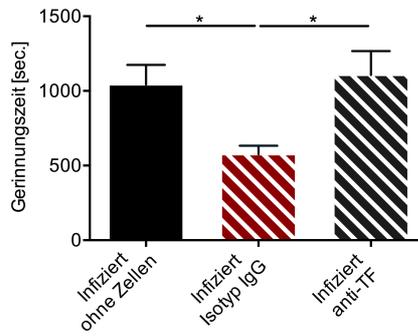


Abbildung 49: TEG-Analyse der *ex vivo* isolierten NKT-Zellen bezüglich ihrer prokoagulatorischen Potenz im Vollblut der Maus • Mittelwerte \pm SEM, n = 3-4, * p<0,05.

Außerdem steigerten die aus den infizierten Mäusen isolierten NKT-Zellen die Dichte eines perizellulären Koagulats gegenüber der Wirkung von aus nicht-infizierten Mäusen gewonnenen NKT-Zellen (Abb. 50).

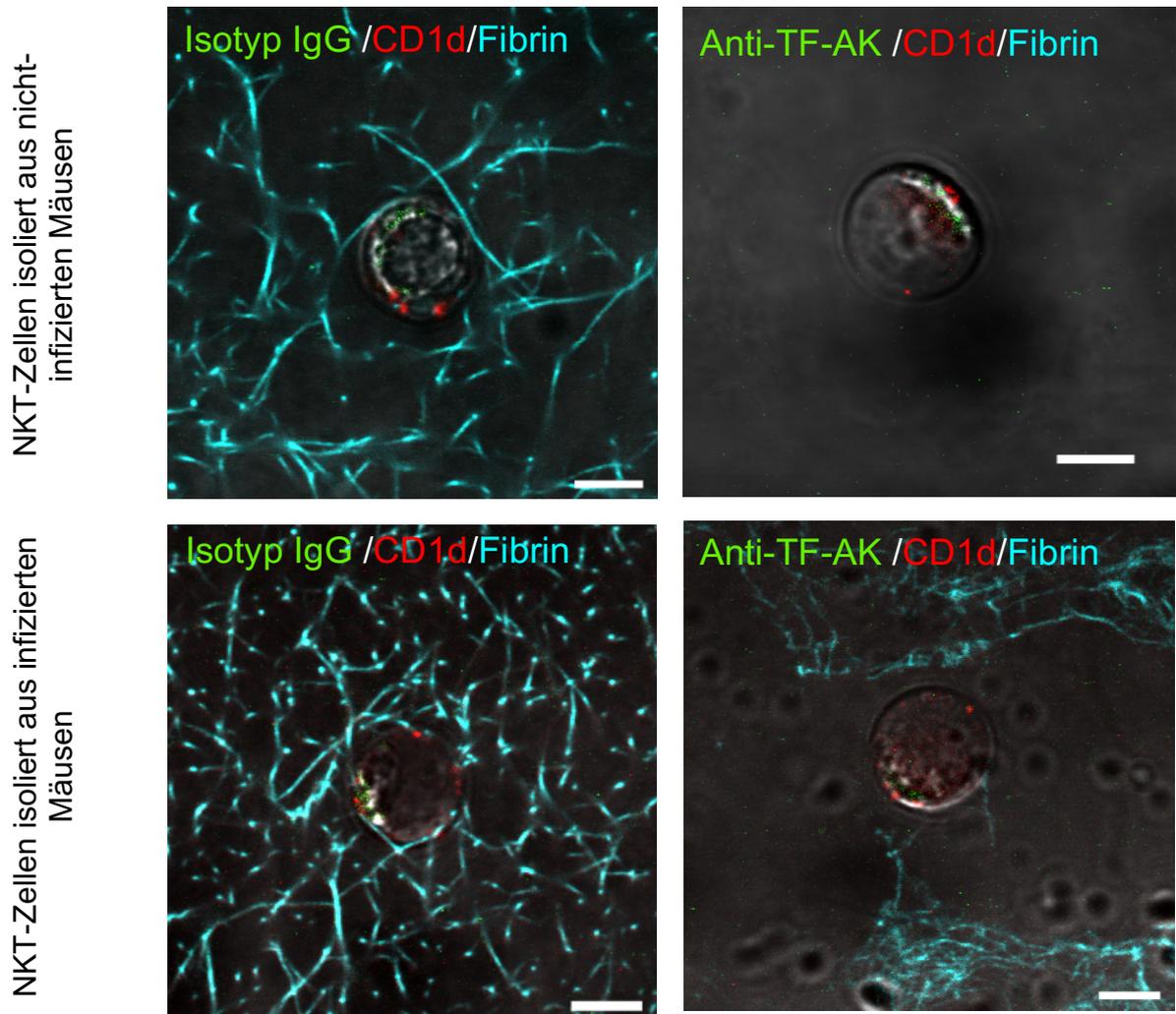


Abbildung 50: Perizelluläre Fibrinbildung durch isolierte NKT-Zellen. *In vitro*-Koagulat-Experiment mit *ex vivo* isolierten NKT-Zellen und murinem PPP • Effekt von anti-TF-Antikörper bzw. Isotyp IgG-Kontroll-Antikörper, Repräsentatives von insgesamt n= 4, (Maßstab 10 μ m).

7.2. Effekte der NKT-Zellen auf den Mechanismus der Immuno-thrombose *in vivo*

In der vorliegenden Arbeit wurden NKT-Zellen als prokoagulatorische Zellen identifiziert, die TF exprimieren und in der frühen Phase systemischer Infektionen in die Mikrozirkulation der Leber rekrutiert werden. Um die Funktion der NKT-Zellen während der Immuno-thrombose zu charakterisieren, wurden genmodifizierte Tiermodelle verwendet. Ein Modell, in welchem durch eine Defizienz des JaVa18 Rezeptors alle NKT-Zellen fehlen (JaVa18-KO-Mäuse), sowie ein weiteres in dem durch eine Überexpression des JaVa18 Rezeptors eine Vervielfältigung der NKT-Zellzahl bewirkt wird (Va14-Ja281 high Mäuse).

In den JaVa18-KO-Mäusen beobachteten wir im Vergleich zu den WT-Mäusen eine signifikant erhöhte Bakterienzahl in der Leber und Milz (Abb. 51 a). Zudem konnte eine signifikant erhöhte Anzahl an rRNA positiven Bakterien ermittelt werden und sich daraus ergebend auch ein signifikant erniedrigter Sterbefaktor in den JaVa18-KO-Tieren (Abb. 51 b, c)

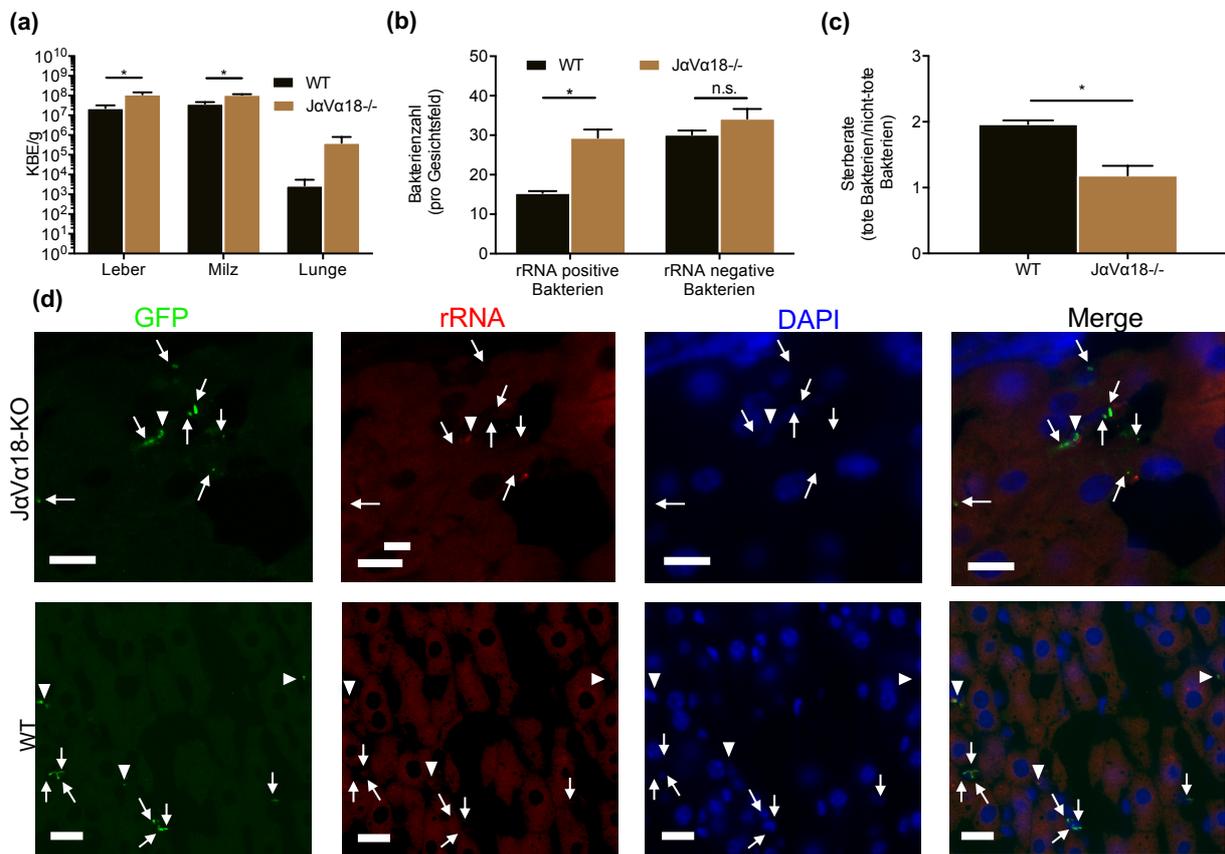


Abbildung 51: Bakterienlast in JaVa18-KO-Tieren 1 Std. nach Infektion • (a) KBE/g in Leber, Milz und Lunge, (b) FISH-Lebende-Tod-Färbung (c) Sterbefaktor (d) repräsentatives Bild der FISH-Lebende-Tod-Färbung → rRNA negative Bakterien ▶ rRNA positive Bakterien, Mittelwerte ± SEM, n = 3-4 * p<0,05; Maßstab 20 μm.

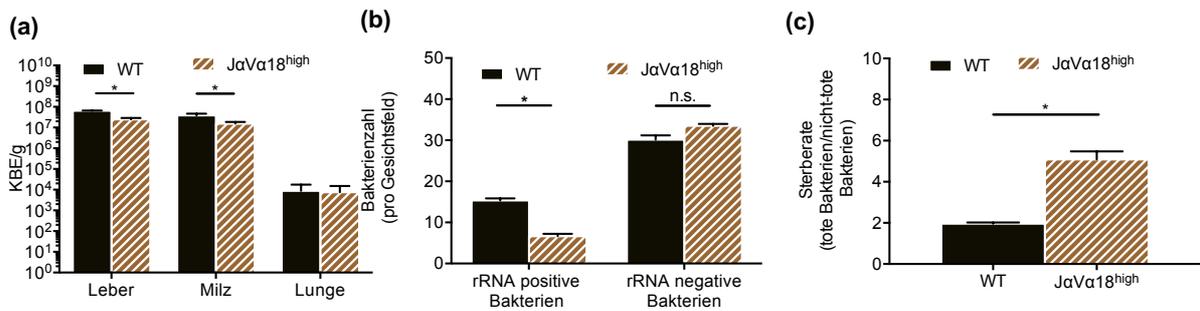


Abbildung 52: Bakterienlast in JaVa18^{high} Tieren 1 Std. nach Infektion •(a) KBE/g in Leber, Milz und Lunge (b) FISH-Lebend-Tot-Färbung (c) Sterberate, Mittelwerte ± SEM, n = 3-4, * p<0,05.

In den JaVa18^{high}-Mäusen, konnte in Leber und Milz eine signifikant erniedrigte Bakterienzahl festgestellt werden (Abb. 52 a). Die Anzahl an rRNA positiven Bakterien war in den JaVa18^{high}-Tieren signifikant erniedrigt, sowie der Sterbefaktor erhöht (Abb. 52 b, c). Weiterführend wurde in der Mikrozirkulation der Leber in den JaVa18-KO-Mäusen eine verminderte Fibrinbildung im Vgl. zum Wildtyp festgestellt (Abb. 53 a) im Gegensatz zur mikrovaskulären Fibrinbildung in JaVa18^{high}-Tieren, die im Vgl. zum Wildtyp deutlich gesteigert war.

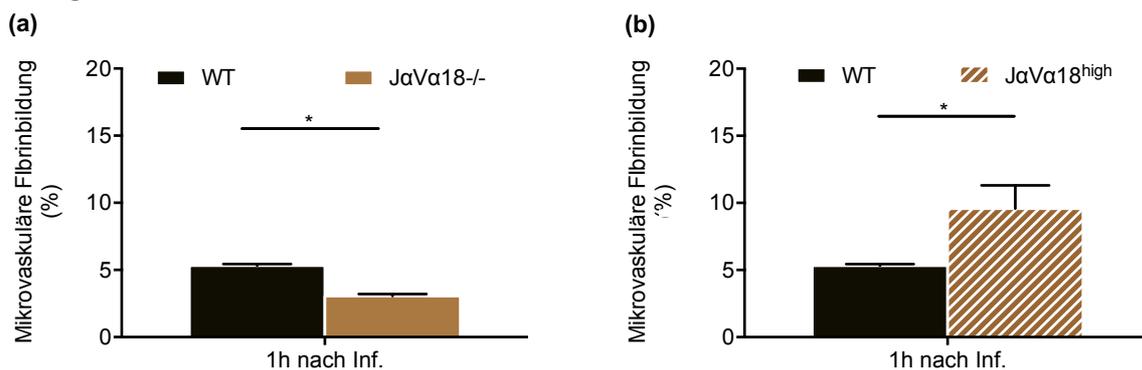


Abbildung 53: Fibrinbildung in JaVa18^{-/-} Tieren und JaVa18^{high} Tieren • Mittelwerte ± SEM, n = 3-4, * p<0,05.

Bezüglich der Rekrutierung anderer Immunzellen ließ sich bei der Auszählung der unterschiedlichen Immunzellen und Thrombozyten keinerlei Unterschied zwischen JaVa18-KO-, JaVa18^{high}- Mäusen und Wildtypen ableiten. Lediglich die erhöhte Expression von TF der inflammatorischen Monozyten fiel in den KO-Tieren auf (Daten nicht gezeigt).

V. Diskussion

1. Begründung der Wahl des Mikroorganismus - *Escherichia coli*

E. coli wurde zur Induktion einer bakteriellen Infektion in der Maus wegen der wichtigen Bedeutung des Bakteriums bei systemischen Infektionen gewählt. In der Tat stellt *E. coli* unter den gram-negativen Bakterien einen der Haupterreger von systemischen Infektionen beim Menschen dar (Vila et al., 2016).

Dabei wurde der Laboratoriums-Stamm BL-12 verwendet, dessen Kultivierung und Sicherheitseinstufung unproblematisch sind. Es kam ein mit einem GFP-Plasmid transfizierter BL-12-Stamm zum Einsatz, der das Zytoplasma der Bakterien bei einer Bestrahlung mit blauem Fluoreszenzlicht grün leuchten lässt. Dies diente sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zur Darstellung der Bakterien in der Immunfluoreszenz.

2. Begründung der Verwendung von Mäusen als Tiermodell

Zur Analyse der zellulären Mechanismen der Immunothrombose wurde ein Tiermodell gewählt, da die Modellierung sowohl einer systemischen Infektion als auch des Zusammenspiels zwischen Gerinnungssystem und Immunantwort *in vitro* sehr schwierig ist. Die Maus wurde aufgrund der leichten Haltung, der schnellen Reproduktion und meist problemlosen Aufzucht als Versuchstier gewählt. Darüber hinaus existieren einige Übereinstimmungen in der Funktion der Immunzellen zwischen Maus und Mensch, was die Übertragung der erhaltenen Erkenntnisse auf den Menschen erleichtert.

3. Diskussion der Ergebnisse

Die Wichtigkeit der Erforschung des Mechanismus der Immunothrombose leitet sich insbesondere von der postulierten physiologischen Bedeutung der Generation von Mikrothrombosen als Antwort auf das Eindringen von Pathogenen in den Blutkreislauf und der Bedeutung ihrer Dysregulation während der disseminierten intravasalen Gerinnung im Rahmen der Sepsis ab. (Engelmann & Massberg, 2013; Hoppensteadt et al., 2014).

3.1. Zelluläre Initiatoren der Immunothrombose

Es gibt bereits Hinweise darauf, dass Zellen des angeborenen Immunsystems, wie neutrophile Granulozyten zusammen mit Thrombozyten während des Prozess der Immunothrombose miteinander interagieren und dass bei systemischen Infektionen TF-abhängig Mikrothrombosen entstehen (Massberg et al., 2010). Jedoch ist insbesondere über den zeitlichen Ablauf, die Interaktion zwischen den beteiligten Immunzellen und deren Funktion sowie die Initiatoren dieses Prozesses wenig bekannt. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass inflammatorische Monozyten in einem frühen Stadium der bakteriellen Infektion in die Mikrozirkulation rekrutiert werden. Zusätzlich wurde ein weiterer Zelltyp rekrutiert, der sogar noch früher als die inflammatorischen Monozyten an das Endothel der Mikrozirkulation der Leber adhärierte und deutlich mit Fibrin kolokalisierte.

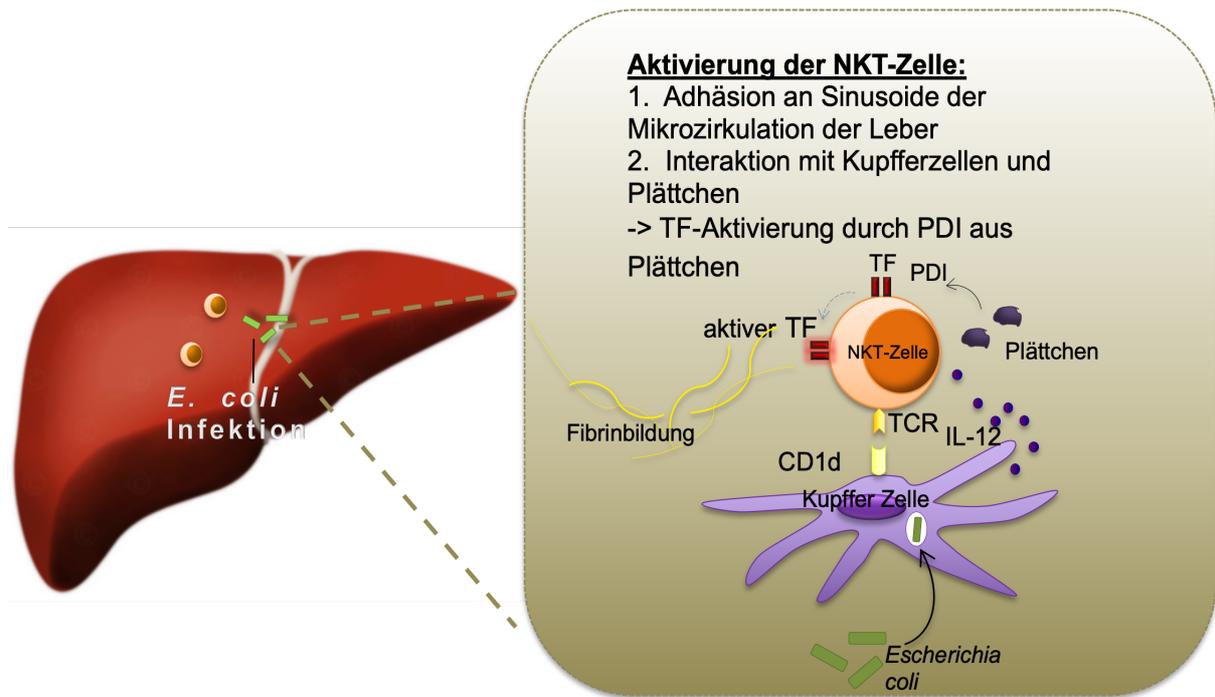


Abbildung 54: Graphische Darstellung zur Hypothese der Aktivierung von TF in NKT-Zellen während der frühen Phase der Immunthrombose

Mit Hilfe verschiedener Marker (THY1, CD127, CD1d) wurden die früh rekrutierten Zellen als NKT-Zellen identifiziert.

Interessanterweise zeigte sich in der Immunfluoreszenzfärbung eine hohe Expression von TF auf den NKT-Zellen gegenüber den nicht-infizierten Kontrolltieren. Unter *in vivo*-Bedingungen beobachteten wir in mit *E. coli* infizierten Tieren eine erhöhte Rekrutierung von NKT-Zellen, sowie eine gesteigerte TF-Expression. Des Weiteren wurde in JaVa18-defizienten Tieren, bei denen die NKT-Zellspiegel deutlich reduziert waren, eine Reduktion der Fibrinmenge beobachtet. Der prokoagulatorische Effekt der NKT-Zellen war höher als derjenige der inflammatorischen Monozyten (vgl. Fibrinbildung in NKT-Zell-depletierten und Monozyten-depletierten Tieren (Abb. 17 a und Abb. 53 a). Zudem wurde eine gesteigerte Fibrinbildung in den JaVa18^{high}-Tieren mit konstitutiv erhöhten NKT-Zellen beobachtet.

Um weiter zu prüfen, ob NKT-Zellen TF-abhängig das extrinsische Gerinnungssystem aktivieren, wurden NKT-Zellen aus der Leber von infizierten und nicht infizierten Tieren mit Hilfe des FACS isoliert. Anschließend wurden funktionelle Tests durchgeführt, die die prokoagulatorische Aktivität bestimmten. Hierbei konnte eine TF-abhängige Gerinnungsaktivität der Zellen festgestellt werden, die in den *E. coli* infizierten Tieren gesteigert war. Dies konnte sowohl in der visuellen Darstellung des perizellulär von den NKT-Zellen ausgehenden Fibrins als auch in Vollblutmessungen gezeigt werden.

Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die NKT-Zellen bereits unter physiologischen Bedingungen TF exprimieren. Während der bakteriellen systemischen Infektion war die TF-Expression gesteigert. Insgesamt ist daher von einer sehr schnellen Zelloberflächen-

Präsentation und Aktivierung von TF auszugehen, in Übereinstimmung mit der Klassifizierung von TF als ein *immediate early gene*.

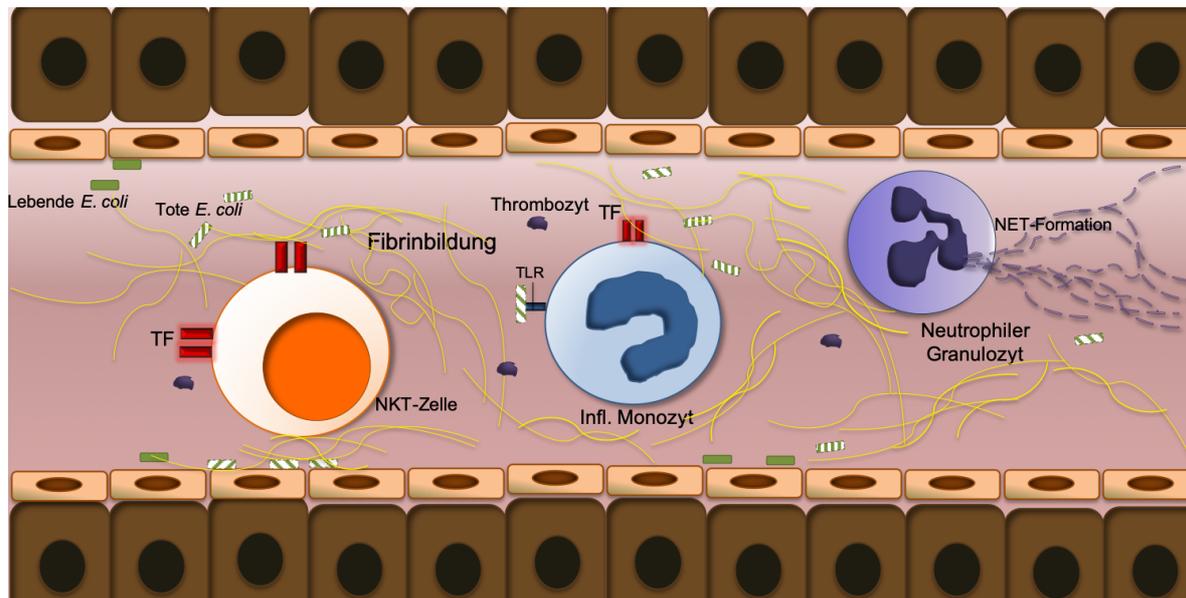


Abbildung 55: Graphische Darstellung der Initiierung der Immunthrombose: tote Bakterien schraffiert dargestellt, Fibrinbildung mittels gelben Linien dargestellt

Zusammengenommen lassen unsere Betrachtungen vermuten, dass NKT-Zellen Initiatoren der Immunthrombose darstellen. Die Aktivierung von TF in NKT-Zellen könnte durch thrombozytäres PDI vermittelt werden (Reinhardt et al, 2008) (Abb. 54). Für die Aktivierung der NKT-Zellen ist zudem die Ausschüttung von IL-12 notwendig, das durch Kupferzellen im Rahmen von systemischen Infektionen sezerniert wird (Zhou et al., 2016).

Neben den NKT-Zellen agieren die rekrutierten inflammatorischen Monozyten als Initiatoren der Immunthrombose, die selbst *E. coli* z.B. über TLR4 binden können und dadurch aktiviert werden, TF zu synthetisieren (Abb. 55). Darüber hinaus wirken nach Eintreffen der Thrombozyten diese stimulierend auf die weitere Gerinnungsaktivierung durch die Rekrutierung von weiteren inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Die neutrophilen Granulozyten werden zu einem späteren Zeitpunkt wichtig für die Generation von Fibrin durch die Bildung von NETs, die ebenfalls durch die Thrombozyten gefördert wird (Engelmann & Massberg, 2013; Pfeiler et al., 2017).

3.2. Zeitabhängige Rekrutierung der Immunzellen nach bakterieller Invasion

Über den zeitlichen Ablauf und die Interaktion der verschiedenen Immunzellen während systemischer Infektionen, sowie ihre Bedeutung für die mikrovaskuläre Fibrinbildung liegen nur unzureichende Informationen vor (Engelmann & Massberg, 2013). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Prozess der Immunthrombose bereits nach sehr kurzer Zeit einsetzt. So war bereits nach 30 Min. eine deutliche mikrovaskuläre Fibrinbildung festzustellen. Interessanterweise war nach nur 48 Std. die mikrovaskuläre Fibrinbildung

nahezu vollständig beendet. Zu demselben Zeitpunkt waren in der Tat kaum noch intravasale Bakterien nachweisbar. Während der gesamten Dauer der Infektion war keine Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes der Tiere festzustellen. Zusammengefasst bedeutet das, dass es während der Immuno-thrombose zu einer vollständigen Eliminierung der Bakterien kommt ohne, dass hierdurch der Allgemeinzustand der Organismen verändert ist.

Im Gegensatz zu den inflammatorischen Monozyten wurden patrouillierende Monozyten erst zu einem späten Zeitpunkt rekrutiert. Gleichzeitig war zu diesem Zeitpunkt bereits eine Reduktion der Fibrinbildung festzustellen, sodass diese Zellpopulation möglicherweise eine Rolle beim Abbau von Fibrin spielen könnte.

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten erfolgte 3 Std. nach Infektion. Die Immunzellen zeigten zu diesem Zeitpunkt eine Kolokalisation mit Fibrin, welche auch zu späteren Zeitpunkten konstant blieb. Dies ist eine Übereinstimmung mit der Hypothese, dass neutrophile Granulozyten für den Erhalt der Fibrinbildung wichtig sind (Massberg et al., 2010; Pfeiler et al., 2017).

Die Analysen der Rekrutierung von Thrombozyten zeigten eine frühe Thrombozytenadhäsion im Bereich der Mikrozirkulation der Leber und eine konstante Präsenz, die über längere Zeit erhalten blieb. Nach Thrombozytendepletion wurde eine verminderte Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten beobachtet. Dies weist darauf hin, dass die Thrombozyten die Rekrutierung von Zellen der angeborenen Immunität steigern. Die Thrombozyten könnten somit u.a. über die Vermittlung der Adhäsion der erwähnten Leukozyten die mikrovaskuläre Fibrinbildung steigern.

3.3. Interaktion zwischen Bakterien, Fibrinbildung und rekrutierten Immunzellen

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse an transgenen und Antikörper-Immunzelldepletierten Mäusen, dass NKT-Zellen und inflammatorische Monozyten die Immuno-thrombose initiieren während neutrophile Granulozyten die mikrovaskuläre Fibrinbildung zeitverzögert verstärken.

Die Fibrin-stimulierende Rolle der Thrombozyten könnte wie erwähnt durch die Förderung der Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten, sowie durch die stimulierende Wirkung der Thrombozyten auf die Bildung von NETs (Massberg et al., 2010) bedingt sein. Die Hypothese, dass Thrombozyten selbst TF exprimieren (Nuzzio et al., 2016) und dadurch Fibrin bilden, konnte hierbei weder widerlegt noch bestätigt werden.

Aufgrund bestehender Hinweise auf eine Regulation der Fibrinbildung durch das Komplementsystem in unterschiedlichen inflammatorischen Prozessen (Markiewski et al., 2007; Zhao et al., 2015) war anzunehmen, dass das Komplementsystem während der Immuno-thrombose eine bedeutende Rolle spielt. Dies konnte unter den hier analysierten

Bedingungen nicht bestätigt werden, da nur eine Tendenz zur Verminderung der intravasalen Koagulation in C5a-defizienten Mäusen festzustellen war. Gleichzeitig wurde in diesen Mäusen eine erheblich gesteigerte Rekrutierung inflammatorischer Monozyten detektiert. Dies kann als Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Gerinnungsaktivierung interpretiert werden.

Dass TF eine Rolle in der Abwehr bestimmter Pathogene spielt, konnte bereits im Kontext einer Infektion mit Yersinien gezeigt werden (Luo et al., 2011). Zur genaueren Charakterisierung der TF-Abhängigkeit des Prozess der mikrovaskulären Fibrinbildung in mit *E. coli* infizierten Mäusen wurde die Inhibition mit einem Anti-TF-Antikörper durchgeführt. 30 Min. nach Infektion konnte eine erhöhte Bakterienlast in Leber und Milz der Tiere mit inhibiertem TF festgestellt werden. Zudem war die Sterberate erniedrigt, was vermuten lässt, dass TF bereits sehr früh an der Eliminierung der Bakterien beteiligt ist. Gleichzeitig wurde keine Thrombosierung in der Mikrozirkulation der Leber der Tiere festgestellt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Mechanismus der Immunothrombose TF-abhängig stattfindet.

3.4. Mechanismus der Fibrin-induzierten Elimination von Bakterien *in vivo* und *in vitro*

Eine wichtige Fragestellung der vorliegenden Arbeit lag darin zu prüfen, inwiefern das Bakterienüberleben durch die Bildung von Fibrin beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurde eine Färbemethode etabliert, welche die Vitalität der Bakterien während ihrer Anwesenheit in der Mikrozirkulation bestimmt. Hierbei wurde bakterielle rRNA (*E. coli* rRNA) im Lebergewebe dargestellt, was durch einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung visualisiert wurde. Dieses Verfahren beruht auf dem Nachweis, dass rRNA-negative Bakterien tote Bakterien darstellen, während rRNA-positive Bakterien als lebende Mikroorganismen angesehen werden können (Blander & Sanders , 2012).

Wir beobachteten, dass die Eliminierung der Bakterien zwischen 1 und 3 Std. nach Infektionsbeginn am effizientesten war, da in dieser Zeitspanne der Anteil an rRNA-positiven Bakterien am stärksten abfiel. Diese Abnahme an rRNA-positiven *E. coli* korrelierte mit der im gleichen Zeitraum beobachteten Reduktion der KBE-Werte. Des Weiteren wurde in dieser Phase aber auch eine deutliche Abnahme der rRNA-negativen Bakterien beobachtet. Dies deutet auf eine schnelle Degradierung toter Bakterien hin.

Um die Assoziation toter und lebender Bakterien mit Fibrin zu ermitteln, wurde die Kolo-kalisation der Bakterien mit ihrer rRNA und Fibrin analysiert. Dabei beobachteten wir überraschenderweise, dass der Anteil der mit Fibrin kolo-kalisierten toten Bakterien im Verlauf der Zeit zunahm. Im Gegensatz dazu waren die rRNA-positiven Bakterien lediglich in

einer frühen Phase der Infektion mit Fibrin assoziiert. Diese Erkenntnisse sind im Einklang mit der Hypothese, dass Bakterien, die in Kontakt mit Fibrin kommen, nicht lange überleben und Fibrin somit einen bakteriziden Effekt auf die Bakterien ausübt.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde das Bakterienüberleben auch in Tieren untersucht, die mit Dabigatran, einem Thrombin-Inhibitor, und mit Rivaroxaban, einem Faktor-Xa-Inhibitor, behandelt wurden. In beiden Gruppen überlebten erheblich mehr Bakterien in der Leber und Milz der Tiere als in den entsprechenden Kontrolltieren. Dies wurde anhand der Bestimmung der Bakterienlast und durch die Ermittlung des Sterbefaktors gezeigt. In der Tat konnte in den mit Rivaroxaban behandelten Tieren eine Vervierfachung der rRNA-positiven Bakterien beobachtet werden. Gleichzeitig induzierte Rivaroxaban eine starke Hemmung der mikrovaskulären Fibrinbildung, die deutlich ausgeprägter war als diejenige, die durch Dabigatran induziert wurde.

Insgesamt zeigte sich, dass die Hemmung der Fibrinbildung das Bakterienüberleben deutlich förderte. Dies unterstreicht die Annahme eines bakteriziden Effekts von Fibrin. Hinweise hierauf existierten bereits, beispielsweise durch die erniedrigte Bakterien Clearance in mit *Yersinia* infizierten Tieren mit reduzierter Fibrinbildung (Luo et al., 2011). Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass während der durch *Staphylococcus aureus* induzierten Peritonitis in Tieren, die nicht in der Lage waren, Fibrin aus Fibrinogen über die Abspaltung von Fibrinopeptid A zu generieren eine zehnfach erhöhte Bakterienlast im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar war (Prasad et al., 2015).

Nachdem der Einfluss der Fibrinbildung auf das Bakterienüberleben *in vivo* charakterisiert worden war, untersuchten wir *in vitro*, ob Fibrin direkt das bakterielle Überleben verändert. Fibrinogen wurde mit Hilfe von Thrombin zu Fibrin konvertiert und das Bakterienüberleben anhand der KBE-Analyse gemessen. Unter allen experimentellen Bedingungen kam es während der Fibrinbildung zu einem Abtöten der *E.coli*-Bakterien. Der Effekt von Fibrin wurde durch den Thrombininhibitor Hirudin antagonisiert, da Hirudin die Bakterienlast erhöhte.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Fibrin nicht nur durch das Verhindern einer Ausbreitung zirkulierender Bakterien einen protektiven Effekt auf den infizierten Organismus ausübt, sondern auch direkt Bakterien töten kann. Ergebnisse mit an *Streptococcus pyogenes* infizierten Mäusen könnten in ähnlicher Weise interpretiert werden (Loof et al., 2011).

Um die Mechanismen zu ermitteln, die dem bakteriziden Effekt von Fibrin unter den genannten Bedingungen zugrunde liegen, wurden weitere Experimente zur Beteiligung des Histidin-Rich-Glykoprotein (HRG), der Fibrinolyse und mechanischer Einflüsse durchgeführt. Dabei konnten wir sowohl einen Beitrag einer gesteigerten bzw. gehemmten Fibrinolyse als auch die Beteiligung des HRG ausschließen. Eine mechanische Einwirkung des Fibrinnetzes

und eine damit verbundene Zerstörung der Bakterien wurde als nächste Möglichkeit des bakteriziden Effekts in Erwägung gezogen. In der Tat ergaben sich Hinweise darauf, dass die Bakterien durch die Bildung der Fibrinnetze verdrängt und verformt werden. Zusätzlich könnten die während der Fibrinbildung aus Fibrinogen abgespaltenen Fibrinopeptide A oder B an der Bakterieneliminierung beteiligt sein (Prasad et al., 2015).

VI. Zusammenfassung

Thrombosen stellen zumeist einen pathologischen Vorgang dar, der u.a. für Mortalität und Morbidität von Myokardinfarkt, Schlaganfall und Sepsis entscheidend ist. Jedoch können Thrombosen unter bestimmten Bedingungen auch protektive Wirkungen haben. In der Tat ist vorgeschlagen worden, dass die Bildung mikrovaskulärer Thrombosen, die sog. Immunothrombosen, einen physiologischen Abwehrmechanismus des Körpers gegen im Blut zirkulierende Pathogene darstellt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Immunothrombosen nahezu unmittelbar nach Beginn einer systemischen Infektion mit *E. coli* in der Mikrozirkulation der Leber entstehen und dass sie auch in anderen Organen wie beispielsweise der Lunge gebildet werden. Die besondere Bedeutung des Fibrins vor allem in der frühen Phase der Bildung mikrovaskulärer Thrombosen konnte anhand unterschiedlicher *in vivo* und *in vitro* Versuche gezeigt werden. Die erhöhte Bakterienlast in antikoagulierten Tieren und der erstmalige Nachweis der Akkumulation toter Bakterien im Bereich der mikrovaskulären Fibrinbildung zeigt, dass Fibrin auch *in vivo* lokal zur Elimination der Bakterien beiträgt. Gleichzeitig war die Assoziation von lebenden Bakterien mit Fibrin mit Ausnahme der frühen Phase der systemischen Infektion geringfügig. Die Ergebnisse lassen zusammengenommen vermuten, dass die intravasale Bildung von Fibrin innerhalb der Mikrozirkulation während der frühen Phase der systemischen Infektion (1 – 3 Std.) einen direkten antimikrobiellen Effekt auf die Bakterien ausübt.

Dagegen konnte nur ein limitierter bzw. kein Einfluss des Komplementsystems, zumindest am Modell der Komplementfaktor 5-defizienten Mäuse, auf die Elimination von Bakterien während der Immunothrombose und die intravaskuläre Fibrinbildung in der Mikrozirkulation der Leber nachgewiesen werden.

Als zelluläre Initiatoren der Immunothrombose wurden patrouillierende NKT-Zellen identifiziert. Die NKT-Zellen weisen eine hohe prokoagulatorische Aktivität auf, die durch Expression von TF und die dadurch vermittelte Aktivierung des extrinsischen Arms des Gerinnungssystem bedingt wird. Eine intravasale Rekrutierung der Zellen konnte bereits unmittelbar nach Infektion festgestellt werden. Die frühe Aktivierung der NKT-Zellen erfolgt wahrscheinlich unabhängig von Thrombozyten, ist jedoch möglicherweise abhängig von Kupferzellen. Neben der Bedeutung der NKT-Zellen wurde gezeigt, dass inflammatorische Monozyten ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Immunothrombose spielen. Zudem konnte die Bedeutung der neutrophilen Granulozyten für die Propagation der intravasalen Fibrinbildung bestätigt werden. Des Weiteren zeigte sich die wichtige Bedeutung der Thrombozyten für die Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems.

Durch das neu gewonnene Wissen über den antimikrobiellen Effekt der Fibrinbildung *in vivo* sollte der Einsatz antikoagulatorischer Substanzen bei Patienten mit systemischen

Infektionen kritischer als bisher geprüft werden. Dies gilt v.a. für die frühe Phase systemischer Infektionen, in der nach der vorliegenden Arbeit die koagulationsinduzierte Bakterieneliminierung vorwiegend stattfindet.

VII. Literaturverzeichnis

- Adams, D. (1976). The granulomatous inflammatory response. A review. *The American journal of pathology*, 84(1), 164.
- Angus, D. C., & Wax, R. S. (2001). Epidemiology of sepsis: an update. *Critical care medicine*, 29(7), S109-S116.
- Aslam, R., Speck, E. R., Kim, M., Crow, A. R., Bang, K. A., Nestel, F. P., Semple, J. W. (2006). Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor- α production in vivo. *Blood*, 107(2), 637-641.
- Auffray, C., Sieweke, M. H., & Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology*, 27, 669-692.
- Bandyopadhyay, K., Marrero, I., & Kumar, V. (2016). NKT cell subsets as key participants in liver physiology and pathology. *Cellular & molecular immunology*, 13(3), 337-346.
- Blander, J. M., & Sander, L. E. (2012). Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nature Reviews Immunology*, 12(3), 215.
- Belting, M., Ahamed, J., & Ruf, W. (2005). Signaling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 25(8), 1545-1550.
- Bendelac, A. (1995). Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *The Journal of experimental medicine*, 182(6), 2091-2096.
- Bendelac, A., Lantz, O., Quimby, M. E., & Yewdell, J. W. (1995). CD1 recognition by mouse NK1positive T lymphocytes. *science*, 268(5212), 863.
- Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S.-H., & Roark, J. H. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annual review of immunology*, 15(1), 535-562.
- Benlagha, K., Weiss, A., Beavis, A., Teyton, L., & Bendelac, A. (2000). In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *The Journal of experimental medicine*, 191(11), 1895-1904.
- Berzins, S. P., Smyth, M. J., & Baxter, A. G. (2011). Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 131-142.
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845-859.
- Bevers, E., Comfurius, P., Dekkers, D., Harmsma, M., & Zwaal, R. (1997). Transmembrane phospholipid distribution in blood cells: control mechanisms and pathophysiological significance. *Biological chemistry*, 379(8-9), 973-986.

- Blombäck, B. (1996). Fibrinogen and fibrin-proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thrombosis research*, 83(1), 1-75.
- Bogdanov, V., Kirk, R., Miller, C., Hathcock, J., Vele, S., Gazdoui, M., Taubman, M. (2006). Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(1), 158-167.
- Borregaard, N., & Cowland, J. B. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89(10), 3503-3521.
- Brennan, P. J., Brigl, M., & Brenner, M. B. (2013). Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nature Reviews Immunology*, 13(2), 101-117.
- Brigl, M., & Brenner, M. B. (2010). *How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens*. Paper presented at the Seminars in immunology.
- Brigl, M., Tatituri, R. V., Watts, G. F., Bhowruth, V., Leadbetter, E. A., Barton, N., . . . Brenner, M. B. (2011). Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *The Journal of experimental medicine*, 208(6), 1163-1177.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., . . . Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *science*, 303(5663), 1532-1535.
- Burrows, P. D., & Cooper, M. D. (1997). B cell development and differentiation. *Current opinion in immunology*, 9(2), 239-244.
- Burstein, S. (1997). Cytokines, platelet production and hemostasis. *Platelets*, 8(2-3), 93-104.
- Buttrum, S. M., Hatton, R., & Nash, G. (1993). Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood*, 82(4), 1165-1174.
- Carlier, L., Hunault, G., Lerolle, N., & Macchi, L. (2015). Ex vivo thrombin generation patterns in septic patients with and without disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis Research*, 135(1), 192-197.
- Carlin, L. M., Stamatiades, E. G., Auffray, C., Hanna, R. N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., Geissmann, F. (2013). Nr4a1-dependent Ly6C low monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*, 153(2), 362-375.
- Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S.-H., Beavis, A., Koezuka, Y., & Bendelac, A. (1999). Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *The Journal of Immunology*, 163(9), 4647-4650.
- Cebra, J. J. (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *The American journal of clinical nutrition*, 69(5), 1046-1051.

- Cimmino, G., Ciccarelli, G., & Golino, P. (2015). Role of tissue factor in the coagulation network. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 41(7), 708-717.
- Cohen, N. R., Brennan, P. J., Shay, T., Watts, G. F., Brigl, M., Kang, J., Consortium, I. P. (2013). Shared and distinct transcriptional programs underlie the hybrid nature of iNKT cells. *Nature immunology*, 14(1), 90-99.
- Darbousset, R., Thomas, G. M., Mezouar, S., Frere, C., Bonier, R., Mackman, N., Panicot-Dubois, L. (2012). Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood*, 120(10), 2133-2143.
- Dieudé, M., Striegl, H., Tyznik, A. J., Wang, J., Behar, S. M., Piccirillo, C. A., Rauch, J. (2011). Cardiolipin binds to CD1d and stimulates CD1d-restricted $\gamma\delta$ T cells in the normal murine repertoire. *The Journal of Immunology*, 186(8), 4771-4781.
- Doisne, J.-M., Becourt, C., Amniai, L., Duarte, N., Le Luduec, J.-B., Eberl, G., & Benlagha, K. (2009). Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t⁺ and respond preferentially under inflammatory conditions. *The Journal of Immunology*, 183(3), 2142-2149.
- Engel, C., Brunkhorst, F. M., Bone, H. G., Brunkhorst, R., Gerlach, H., Grond, S., Reinhart, K. (2007). Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33(4), 606-618.
- Engelmann, B., Luther, T., & Muller, I. (2003). Intravascular tissue factor pathway-a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *Trombosis and Haemostasis-Stuttgart*, 89(1), 3-8.
- Engelmann, B., & Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 13(1), 34-45.
- Exley, M., Porcelli, S., Furman, M., Garcia, J., & Balk, S. (1998). CD161 (NKR-P1A) costimulation of CD1d-dependent activation of human T cells expressing invariant V α 24J α Q T cell receptor α chains. *The Journal of experimental medicine*, 188(5), 867-876.
- Falkowski, M., Schledzewski, K., Hansen, B., & Goerdts, S. (2003). Expression of stabilin-2, a novel fasciclin-like hyaluronan receptor protein, in murine sinusoidal endothelia, avascular tissues, and at solid/liquid interfaces. *Histochemistry and cell biology*, 120(5), 361-369.
- Faulk, W. P., Labarrere, C. A., & Carson, S. D. (1990). Tissue factor: identification and characterization of cell types in human placentae. *Blood*, 76(1), 86-96.
- Fischer, K., Scotet, E., Niemeyer, M., Koebernick, H., Zerrahn, J., Maillet, S., Kaufmann, S. H. (2004). Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), 10685-10690.

- Flick, M. J., Du, X., Witte, D. P., Jiroušková, M., Soloviev, D. A., Busuttill, S. J., Degen, J. L. (2004). Leukocyte engagement of fibrin (ogen) via the integrin receptor α M β 2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo. *The Journal of clinical investigation*, 113(11), 1596-1606.
- Frickmann, H., Zautner, A. E., Moter, A., Kikhney, J., Hagen, R. M., Stender, H., & Poppert, S. (2017). Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. *Critical reviews in microbiology*, 43(3), 263-293.
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*, 176(2), 231-241.
- Gaertner, F., & Massberg, S. (2016). Blood coagulation in immunothrombosis—At the frontline of intravascular immunity. *Seminars in immunology*, 28(6), 561-569.
- Galli, S. J., Borregaard, N., & Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature immunology*, 12(11), 1035-1044.
- Gando, S., & Otomo, Y. (2015). Local hemostasis, immunothrombosis, and systemic disseminated intravascular coagulation in trauma and traumatic shock. *Crit Care*, 19, 72.
- Gao, B., Jeong, W. I., & Tian, Z. (2008). Liver: an organ with predominant innate immunity. *Hepatology*, 47(2), 729-736.
- Geissmann, F., Cameron, T. O., Sidobre, S., Manlongat, N., Kronenberg, M., Briskin, M. J., Littman, D. R. (2005). Intravascular immune surveillance by CXCR6⁺ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol*, 3(4), e113.
- Geissmann, F., Jung, S., & Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19(1), 71-82.
- Ghebrehiwet, B., Silverberg, M., & Kaplan, A. P. (1981). Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *The Journal of experimental medicine*, 153(3), 665-676.
- Giesen, P. L. A. (1999). Blood-borne tissue factor: Another view of thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5), 2311-2315.
- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 392-404.
- Godfrey, D. I., & Berzins, S. P. (2007). Control points in NKT-cell development. *Nature Reviews Immunology*, 7(7), 505-518.
- Godfrey, D. I., & Kronenberg, M. (2004). Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *The Journal of clinical investigation*, 114(10), 1379-1388.

- Gregory, S. H., & Wing, E. J. (1998). Neutrophil–Kupffer-cell interaction in host defenses to systemic infections. *Immunology today*, 19(11), 507-510.
- Guha, M., & Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signalling*, 13(2), 85-94.
- Häger, M., Cowland, J., & Borregaard, N. (2010). Neutrophil granules in health and disease. *Journal of internal medicine*, 268(1), 25-34.
- Hamad, O. A., Bäck, J., Nilsson, P. H., Nilsson, B., & Ekdahl, K. N. (2012). Platelets, complement, and contact activation: partners in inflammation and thrombosis *Current Topics in Innate Immunity II*, Springer NY, 185-205.
- Hickey, M. J., & Kubes, P. (2009). Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat Rev Immunol*, 9(5), 364-375.
- Hoppensteadt, D., Tsuruta, K., Cunanan, J., Hirman, J., Kaul, I., Osawa, Y., & Fareed, J. (2014). Thrombin generation mediators and markers in sepsis-associated coagulopathy and their modulation by recombinant thrombomodulin. *Clin Appl Thromb Hemost*, 20(2), 129-135.
- Huber-Lang, M., Sarma, J. V., Zetoune, F. S., Rittirsch, D., Neff, T. A., McGuire, S. R., Hoesel, L. M. (2006). Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nature medicine*, 12(6), 682-687.
- Imhof, B. A., & Aurrand-Lions, M. (2004). Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature Reviews Immunology*, 4(6), 432-444.
- Ito, T. (2014). PAMPs and DAMPs as triggers for DIC. *J Intensive Care*, 2(1), 67.
- Itoh, A. M., K. Nishioji, H. Fujii, H. Nakamura, T. Kirishima, T. Toyama, N. Yamauchi, Y. Nagao, S. Narumi, T. Okanou, Y. (2001). Time course profile and cell-type-specific production of monokine induced by interferon- γ in concanavalin A-induced hepatic injury in mice: comparative study with interferon-inducible protein-10. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 36(12), 1344-1351.
- Johnson, L. L., Berggren, K. N., Szaba, F. M., Chen, W., & Smiley, S. T. (2003). Fibrin-mediated protection against infection-stimulated immunopathology. *The Journal of experimental medicine*, 197(6), 801-806.
- Kawakami, K., Yamamoto, N., Kinjo, Y., Miyagi, K., Nakasone, C., Uezu, K., . . . Saito, A. (2003). Critical role of V α 14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *European journal of immunology*, 33(12), 3322-3330.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Kondo, E. (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V α 14 NKT cells by glycosylceramides. *science*, 278(5343), 1626-1629.

- Kenna, T., Mason, L. G., Porcelli, S. A., Koezuka, Y., Hegarty, J. E., O'Farrelly, C., & Doherty, D. G. (2003). NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells. *The Journal of Immunology*, 171(4), 1775-1779.
- Kim, E. Y., Battaile, J. T., Patel, A. C., You, Y., Agapov, E., Grayson, M. H., Tucker, J. (2008). Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nature medicine*, 14(6), 633-640.
- Kim, J. Y., Kim, Y., Cha, H. K., Lim, H. Y., Kim, H., Chung, S., & Son, G. H. (2017). Cell Death-Associated Ribosomal RNA Cleavage in Postmortem Tissues and Its Forensic Applications. *Molecules and cells*, 40(6), 410.
- Kimball, A. S., Obi, A. T., Diaz, J. A., & Henke, P. K. (2016). The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. *Frontiers in immunology*, 7, 236.
- Kinjo, Y., Illarionov, P., Vela, J. L., Pei, B., Girardi, E., Li, X., Okawara, A. (2011). Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nature immunology*, 12(10), 966-974.
- Kinjo, Y., Tupin, E., Wu, D., Fujio, M., Garcia-Navarro, R., Benhnia, M. R.-E.-I., . . . Painter, G. F. (2006). Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nature immunology*, 7(9), 978-986.
- Kinjo, Y., Wu, D., Kim, G., Xing, G.-W., Poles, M. A., Ho, D. D., . . . Kronenberg, M. (2005). Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature*, 434(7032), 520-525.
- Kita, H., Naidenko, O. V., Kronenberg, M., Ansari, A. A., Rogers, P., He, X. S., . . . Coppel, R. L. (2002). Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology*, 123(4), 1031-1043.
- Knoll, P., Schlaak, J., Uhrig, A., Kempf, P., zum Büschenfelde, K.-H. M., & Gerken, G. (1995). Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *Journal of hepatology*, 22(2), 226-229.
- Kovalovsky, D., Uche, O. U., Eladad, S., Hobbs, R. M., Yi, W., Alonzo, E., . . . Im, J. S. (2008). The BTB–zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nature immunology*, 9(9), 1055-1064.
- Krarp, A., Wallis, R., Presanis, J. S., Gál, P., & Sim, R. B. (2007). Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PLoS One*, 2(7), 623.
- Kronenberg, M. (2005). Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annual Review of Immunology*, 26, 877-900.

- Kumar, H., Belperron, A., Barthold, S. W., & Bockenstedt, L. K. (2000). Cutting edge: CD1d deficiency impairs murine host defense against the spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Immunology*, *165*(9), 4797-4801.
- Lau, A., & Thomson, A. (2003). Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut*, *52*(2), 307-314.
- Lee, N., Hui, D., Wu, A., Chan, P., Cameron, P., Joynt, G. M., . . . To, K. (2003). A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *New England Journal of Medicine*, *348*(20), 1986-1994.
- Lee, W. L., Harrison, R. E., & Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, *5*(14), 1299-1306.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, *7*(9), 678-689.
- Loof, T. G., Mörgelin, M., Johansson, L., Oehmcke, S., Olin, A. I., Dickneite, G., . . . Herwald, H. (2011). Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense. *Blood*, *118*(9), 2589-2598.
- Lugtenberg, E., & Peters, R. (1976). Distribution of lipids in cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* K12. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, *441*(1), 38-47.
- Luo, D., Szaba, F. M., Kummer, L. W., Plow, E. F., Mackman, N., Gailani, D., & Smiley, S. T. (2011). Protective roles for fibrin, tissue factor, plasminogen activator inhibitor-1, and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, but not factor XI, during defense against the gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. *The Journal of Immunology*, *187*(4), 1866-1876.
- Luther, T., Dittert, D.-D., Kotzsch, M., Erlich, J., Albrecht, S., Mackman, N., & Müller, M. (2000). Functional implications of tissue factor localization to cell-cell contacts in myocardium. *The Journal of Pathology*, *192*(1), 121-130.
- Lynch, L., O'Shea, D., Winter, D. C., Geoghegan, J., Doherty, D. G., & O'Farrelly, C. (2009). Invariant NKT cells and CD1d+ cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *European journal of immunology*, *39*(7), 1893-1901.
- M, K. L., & Atkinson, J. P. (2015). Complement regulators in human disease: lessons from modern genetics. *Journal of Intern Medicine*, *277*(3),
- Mackay, I. R. (2002). Hepatoimmunology: a perspective. *Immunology and Cell Biology*, *80*(1), 36-44.
- Mackman, N. (1997). Regulation of the tissue factor gene. *Thrombosis and haemostasis*, *78*(1), 747-754.

- Mackman, N. (2004). Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 24(6), 1015-1022.
- Maître, B., Magnenat, S., Heim, V., Ravanat, C., Evans, R. J., de la Salle, H., . . . Hechler, B. (2015). The P2X1 receptor is required for neutrophil extravasation during lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia in mice. *The Journal of Immunology*, 194(2), 739-749.
- Markiewski, M. M., Nilsson, B., Ekdahl, K. N., Mollnes, T. E., & Lambris, J. D. (2007). Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends in Immunology*, 28(4), 184-192.
- Massberg, S., Grahl, L., von Bruehl, M. L., Manukyan, D., Pfeiler, S., Goosmann, C., . . . Engelmann, B. (2010). Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nature Medicine*, 16(8), 887-896.
- Matsuda, J. L., Naidenko, O. V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, C.-R., . . . Kronenberg, M. (2000). Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(5), 741-754.
- McEver, R. P. (2001). Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thrombosis and Haemostasis*, 86(3), 746-756.
- McEver, R. P. (2002). Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Current opinion in Cell Biology*, 14(5), 581-586.
- Medved, L., & Weisel, J. (2009). Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(2), 355-359.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1997a). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*, 9(1), 4-9.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1997b). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91(3), 295-298.
- Medzhitov, R., & Janeway Jr, C. (2000). Innate immunity. *New England Journal of Medicine*, 343(5), 338-344.
- Monroe, D. M., & Key, N. S. (2007). The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(6), 1097-1105.
- Montoya, C. J., Pollard, D., Martinson, J., Kumari, K., Wasserfall, C., Mulder, C. B., . . . Wilson, S. B. (2007). Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology*, 122(1),

- Müller, I., Klocke, A., Alex, M., Kotsch, M., Luther, T., Morgenstern, E., . . . Engelmann, B. (2003). Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *The FASEB Journal*, *17*(3), 476-478.
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(1), 142-201.
- Nelson, D. (1981). Macrophages: progress and problems. *Clinical and Experimental Immunology*, *45*(2), 225.
- Nieuwenhuis, E. E., Matsumoto, T., Exley, M., Schleipman, R. A., Glickman, J., Bailey, D. T., . . . Blumberg, R. S. (2002). CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nature Medicine*, *8*(6), 588-593.
- Novak, J., & Lehen, A. (2011). Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells. *Cytokine*, *53*(3), 263-270.
- Nuzzio, K. M., Watt, E. D., Boettcher, J. M., Gajsiewicz, J. M., Morrissey, J. H., & Rienstra, C. M. (2016). High-Resolution NMR Studies of Human Tissue Factor. *PLoS One*, *11*(9), e0163206.
- Ozgurhan, G., Vermezoglu, O., Ocal Topcu, D., Karbuç, A., Vehapoglu, A., & Hacıhamdioglu, B. (2016). *Escherichia coli* Meningitis after Rotavirus Gastroenteritis in an Infant. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2016.
- Paget, C., Ivanov, S., Fontaine, J., Blanc, F., Pichavant, M., Renneson, J., . . . Barba-Speath, G. (2011). Potential role of invariant NKT cells in the control of pulmonary inflammation and CD8+ T cell response during acute influenza A virus H3N2 pneumonia. *The Journal of Immunology*, *186*(10), 5590-5602.
- Passlick, B., Flieger, D., & Ziegler-Heitbrock, H. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, *74*(7), 2527-2534.
- Pfeiler, ., Stark, K., Massberg, S., Engelmann, B. (2017). Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks, *Haematologica*, *102* (2), 206-213
- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., de Boer, R. J., Borghans, J. A., . . . Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with 2H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, *116*(4), 625-627.
- Palankar, R., Greinacher, A., (2019). Challenging the concept of immunothrombosis. *Blood*, *133*(6), 508-509.
- Prasad, J. M., Gorkun, O. V., Raghu, H., Thornton, S., Mullins, E. S., Palumbo, J. S., . . . Coughlin, S. R. (2015). Mice expressing a mutant form of fibrinogen that cannot support fibrin formation exhibit compromised antimicrobial host defense. *Blood*, *126*(17), 2047-2058.
- Prickett, T., McKenzie, J., & Hart, D. (1988). Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation*, *46*(5), 754-761.

- Racanelli, V., & Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology*, 43(S1).
- Reinhardt, C. (2007) New locations of intravascular tissue factor. *Hämostaseologie*, 27(01), 55-58.
- Rettig, T. A., Harbin, J. N., Harrington, A., Dohmen, L., & Fleming, S. D. (2015). Evasion and interactions of the humoral innate immune response in pathogen invasion, autoimmune disease, and cancer. *Clin Immunol*, 160(2), 244-254.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*, 11(9), 785-797.
- Riedel, T., Suttner, J., Brynda, E., Houska, M., Medved, L., & Dyr, J. E. (2011). Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation. *Blood*, 117(5), 1700-1706.
- Riise, R. E., Bernson, E., Aurelius, J., Martner, A., Pesce, S., Della Chiesa, M., . . . Moretta, L. (2015). TLR-stimulated neutrophils instruct NK cells to trigger dendritic cell maturation and promote adaptive T cell responses. *The Journal of Immunology*, 195(3), 1121-1128.
- Ritis, K., Doumas, M., Mastellos, D., Micheli, A., Giaglis, S., Magotti, P., . . . Lambris, J. D. (2006). A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *The Journal of Immunology*, 177(7), 4794-4802.
- Rivers, R., Hathaway, W., & Weston, W. (1975). The Endotoxin-induced Coagulant Activity of Human Monocytes. *British Journal of Haematology*, 30(3), 311-316.
- Ruiz, N., Kahne, D., & Silhavy, T. J. (2006). Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 4(1), 57-66.
- Russell, J. A. (2006). Management of sepsis. *New England Journal of Medicine*, 355(16), 1699-1713.
- Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, 5(5), 449-456.
- Saha, P., & Geissmann, F. (2011). Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunology and Cell Biology*, 89(1), 2-4.
- Sannes, M. R., Kuskowski, M. A., Owens, K., Gajewski, A., & Johnson, J. R. (2004). Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *Journal of Infectious Diseases*, 190(12), 2121-2128.
- Santiago Raber, M. L., Amano, H., Amano, E., Baudino, L., Otani, M., Lin, Q., . . . Takasaki, Y. (2009). Fcγ receptor-dependent expansion of a hyperactive monocyte subset in lupus-prone mice. *Arthritis & Rheumatism*, 60(8), 2408-2417.

- Saracco, P., Vitale, P., Scolfaro, C., Pollio, B., Pagliarino, M., & Timeus, F. (2011). The coagulopathy in sepsis: significance and implications for treatment. *Pediatr Rep*, 3(4), e30.
- Seiler, M. P., Mathew, R., Liszewski, M. K., Spooner, C. J., Barr, K., Meng, F., . . . Bendelac, A. (2012). Elevated and sustained expression of the transcription factors Egr1 and Egr2 controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling. *Nature Immunology*, 13(3), 264-271.
- Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., & Pamer, E. G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual Review of Immunology*, 26, 421.
- Sheth, K., & Bankey, P. (2001). The liver as an immune organ. *Current Opinion in Critical Care*, 7(2), 99-104.
- Shiraki, R., Inoue, N., Kawasaki, S., Takei, A., Kadotani, M., Ohnishi, Y., . . . Kawashima, S. (2004). Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thrombosis Research*, 113(6), 379-385.
- Silasi-Mansat, R., Zhu, H., Popescu, N. I., Peer, G., Sfyroera, G., Magotti, P., . . . Taylor, F. B. (2010). Complement inhibition decreases the procoagulant response and confers organ protection in a baboon model of Escherichia coli sepsis. *Blood*, 116(6), 1002-1010.
- Simonsen, K. A., Anderson-Berry, A. L., Delair, S. F., & Davies, H. D. (2014). Early-onset neonatal sepsis. *Clinical microbiology reviews*, 27(1), 21-47.
- Sims, P. J., Wiedmer, T., Esmon, C. T., Weiss, H. J., & Shattil, S. (1989). Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *Journal of Biological Chemistry*, 264(29), 17049-17057.
- Smith, L. C., Azumi, K., & Nonaka, M. (1999). Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways. *Immunopharmacology*, 42(1), 107-120.
- Subramaniam, S., Jurk, K., Hobohm, L., Jäckel, S., Saffarzadeh, M., Schwierczek, K., Wenzel, P., Langer, F., Reinhardt, C., Ruf, W. (2017). Distinct contributions of complement factors to platelet activation and fibrin formation in venous thrombus development. *Blood*, 129(16), 2291-2302.
- Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., . . . Waterman, P. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *science*, 325(5940), 612-616.
- Szaba, F. M., & Smiley, S. T. (2002). Roles for thrombin and fibrin (ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood*, 99(3), 1053-1059.

- Tan, X., Fujiu, K., Manabe, I., Nishida, J., Yamagishi, R., Nagai, R., & Yanagi, Y. (2015). Choroidal neovascularization is inhibited via an intraocular decrease of inflammatory cells in mice lacking complement component C3. *Scientific Reports*, 5.
- Thaler, J., Ay, C., Mackman, N., Metz-Schimmerl, S., Stift, J., Kaider, A., . . . Pabinger, I. (2013). Microparticle-associated tissue factor activity in patients with pancreatic cancer: correlation with clinicopathological features. *Eur J Clin Invest*, 43(3), 277-285.
- Thomas, C. J., & Schroder, K. (2013). Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends in Immunology*, 34(7), 317-328.
- Tupin, E., Kinjo, Y., & Kronenberg, M. (2007). The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 5(6), 405-417.
- Valdivia, L. A., Demetris, A. J., Langer, A. M., Celli, S., Fung, J. J., & Starzl, T. E. (1993). Dendritic cell replacement in long-surviving liver and cardiac xenografts. *Transplantation*, 56(2), 482.
- van Furth, R., & Cohn, Z. A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 128(3), 415-435.
- Van Kaer, L., Parekh, V. V., & Wu, L. (2015). The response of CD1d-restricted invariant NKT cells to microbial pathogens and their products. *Frontiers in Immunology*, 6, 226.
- Van Kessel, K. P., Bestebroer, J., & Van Strijp, J. A. (2014). Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Immunology*, 5, 467.
- Venkatesh, M., Flores, A., Luna, R. A., & Versalovic, J. (2010). Molecular microbiological methods in the diagnosis of neonatal sepsis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8(9), 1037-1048.
- Vestweber, D., & Blanks, J. E. (1999). Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiological Reviews*, 79(1), 181-213.
- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., . . . Martínez-Medina, M. (2016). *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 437-463.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., & Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology*, 12(4), 239-252.
- Wang, J., Li, Y., Kinjo, Y., Mac, T.-T., Gibson, D., Painter, G. F., . . . Zajonc, D. M. (2010). Lipid binding orientation within CD1d affects recognition of *Borrelia burgdorferi* antigens by NKT cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), 1535-1540.
- Weisel, J. W., & Litvinov, R. I. (2013). Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*, 121(10), 1712-1719.

- Weisel, J. W., Veklich, Y., & Gorkun, O. (1993). The sequence of cleavage of fibrinopeptides from fibrinogen is important for protofibril formation and enhancement of lateral aggregation in fibrin clots. *Journal of Molecular Biology*, 232(1), 285-297.
- Wu, D., Zajonc, D. M., Fujio, M., Sullivan, B. A., Kinjo, Y., Kronenberg, M., . . . Wong, C.-H. (2006). Design of natural killer T cell activators: structure and function of a microbial glycosphingolipid bound to mouse CD1d. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), 3972-3977.
- Yeaman, M. R. (2010). Platelets in defense against bacterial pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(4), 525-544.
- Young, J. S., Monaghan, S. F., Chung, C. S., Cioffi, W. G., Ayala, A., & Heffernan, D. S. (2015). Divergent invariant natural killer T-cell response to sepsis of abdominal vs. non-abdominal origin in human beings. *Surgical Infections*, 16(1), 29-35.
- Zajonc, D. M., Maricic, I., Wu, D., Halder, R., Roy, K., Wong, C.-H., . . . Wilson, I. A. (2005). Structural basis for CD1d presentation of a sulfatide derived from myelin and its implications for autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(11), 1517-1526.
- Zhao, X., Chen, Y. X., & Li, C. S. (2015). Predictive value of the complement system for sepsis-induced disseminated intravascular coagulation in septic patients in emergency department. *Journal of Critical Care*, 30(2), 290-295.
- Zhou, Z., Xu, M.-J., & Gao, B. (2016). Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, 13(3), 301-315.
- Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(3), 584-592.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., . . . Randolph, G. J. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116(16), e74-e80.
- Zillmann, C. (2012). Eosinophile Granulozyten als Träger von intravaskulärem tissue factor (TF).

VII. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Membranstruktur <i>E. coli</i> ; modifiziert aus Ruiz et al. 2006	6
Abbildung 2: Mögliche Transformation von inflammatorischen und patrouillierenden Monozyten; modifiziert nach Shi et al., 2011	14
Abbildung 3: antibakterielle "Waffen" der neutrophilen Granulozyten; modifiziert aus Hickey et al., 2009	16
Abbildung 4: Hypothese über den Ablauf der Immunthrombose; Engelmann und Massberg, 2013	19
Abbildung 5: Aufbau des Thrombelastometers; © Tem International GmbH	34
Abbildung 6: Direkte (links) und indirekte (rechts) Immunfluoreszenz	346
Abbildung 7: Tetramer-Bindung an eine NKT-Zelle	37
Abbildung 8: FISH-rRNA Färbung der <i>E. coli</i> Bakterien im Gewebe	39
Abbildung 9: Fibrinauswertung.....	40
Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Fibrinbildung und der Bakterienzahl während der Immunothrombose	40
Abbildung 11: Kinetik der Rekrutierung inflammatorischer und patrouillierender Monozyten in der Mikrozirkulation	43
Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Thrombozyten	44
Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der frühen Fibrinbildung in der Mikrozirkulation.....	44
Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Rekrutierung inflammatorischer Monozyten und neutrophiler Granulozyten in der frühen Phase der Immunothrombose	45
Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Rekrutierung von Thrombozyten in der frühen Phase der Immunothrombose	46
Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Kolokalisation von Immunzellen mit Fibrin	47
Abbildung 17: Fibrinbildung in zelldepletierten Tieren jeweils im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe	48
Abbildung 18: Zellrekrutierung in mit Anti-CCR2-Antikörper behandelten Tieren.....	48
Abbildung 19: Zellrekrutierung in mit Anit-Ly6G-Antikörper behandelten Tieren	479
Abbildung 20: Zellrekrutierung in mit Anti-Gplb-Antikörper behandelten Tieren.....	49
Abbildung 21: Fibrinbildung und Bakterienzahl in der Mikrozirkulation der Lunge.....	50
Abbildung 22: Extravasation neutrophiler Granulozyten 30 Min. nach bakterieller Infektion in der Lunge	50
Abbildung 23.: Bakterienlast und Sterberate in mit Anti-TF-Antikörper behandelten Tieren.... (15 Min. nach Infektion).....	51

Abbildung 24: Fibrinbildung in mit Anti-TF-Antikörper behandelten Tieren (15 Min. nach Infektion)	51
Abbildung 25: Bakterienlokalisierung in der Mikrozirkulation der Leber	52
Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Kolo-kalisation von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten mit Bakterien	53
Abbildung 27: Ergebnis des FISH-Kontroll-experiment	54
Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der Anzahl an rRNA negativen und rRNA positiven Bakterien	55
Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Kolo-kalisation rRNA positiver und rRNA negativer Bakterien mit Fibrin	56
Abbildung 30: Bakterienlast in mit Anti-CCR2-Antikörper behandelten Tieren	557
Abbildung 31: Bakterienlast in mit Anti-Ly6G-Antikörper behandelten Tieren	57
Abbildung 32: Bakterienlast in mit Anti-GpIb-Antikörper behandelten Tieren	58
Abbildung 33: Bakterienlast in mit Dabigatran behandelten Tieren	58
Abbildung 34: Bakterienlast in Rivaroxaban-behandelten Tieren	579
Abbildung 35: Vergleich rRNA positiver und negativer Bakterien in Kontrolltieren und in Rivaroxaban-behandelten Tieren	58
Abbildung 36: Bakteriell-es Überleben in Fibrinthromben <i>in vitro</i>	60
Abbildung 37: Bakterienüberleben in Fibrinthromben <i>in vitro</i> mit PPP und TF	60
Abbildung 38: Einfluss fibrinolytischer Proteine auf das Bakterienüberleben	61
Abbildung 39: Wirkung von HRG auf das Bakterienüberleben in Fibrinthromben	61
Abbildung 40: Visualisierung von <i>E. coli</i> während der Bildung eines Fibrinthrombus (aus Fibrinogen und TF)	62
Abbildung 41: Lebende und tote Bakterien in C5-defizienten Tieren	63
Abbildung 42: Zellrekrutierung in C5-defizienten Tieren	6463
Abbildung 43: Zeitlicher Verlauf der Rekrutierung der THY1 ⁺ /CD127 ⁺ Zellen in der Mikrozirkulation der Leber	64
Abbildung 44: (a) Zeitlicher Verlauf der mit Fibrin kolo-kalisierten THY1 ⁺ /CD127 ⁺ Zellen, (b) Prozentualer Anteil der mit Fibrin kolo-kalisierten Zellen an der Gesamtzellzahl	65
Abbildung 45: NKT-Zellen in der Mikrozirkulation der Leber 15 Min. nach Infektion:	66
Abbildung 46: Analyse der <i>ex vivo</i> isolierten NKT Zellen bezüglich der Expression von TF	67
Abbildung 47: FACS-Analyse von <i>ex vivo</i> isolierten NKT Zellen bezüglich der Expression von TF	68
Abbildung 48: Faktor Xa-Bildung durch <i>ex vivo</i> isolierte NKT-Zellen	69

Abbildung 49: TEG-Analyse <i>ex vivo</i> isolierter NKT-Zellen bezüglich ihrer prokoagulatorischen Potenz.....	70
Abbildung 50: <i>In vitro</i> -Koagulat-Experiment mit <i>ex vivo</i> isolierten NKT-Zellen und murinem PPP	70
Abbildung 51: Bakterienlast in JαVα18-KO-Tieren	71
Abbildung 52: Bakterienlast in JαVα18 ^{high} Tieren.....	702
Abbildung 53: Fibrinbildung in JαVα18 ^{-/-} Tieren und JαVα18 ^{high} Tieren:	702
Abbildung 54: Graphische Darstellung der Hypothese der Aktivierung von TF in NKT-Zellen	74
Abbildung 55: Graphische Darstellung der Initiierung der Immunothrombose.....	75

VIII. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 2: Chemikalien	22
Tabelle 3: Antikörper	23
Tabelle 4: Puffer	24
Tabelle 5 <i>In vitro</i> Fibrinbildung.....	26
Tabelle 6: Tierstämme	28
Tabelle 7: Fixierungsmethoden und verwendete Primäre Antikörper in immunhistochemischen Experimenten.....	37

IX. Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
BPI elastase	permeability-increasing protein elastase
bzw.	beziehungsweise
C	Konzentration
C3b- Konvertase	Komplementfaktor-3b-Konvertase
C5	Komplementfaktor 5
Ca	Kalzium
CFT	Clot formation time
CFU	Colony forming unit
Cl	Chlorid
CR 1	Komplementrezeptor 1
CT	Clotting time
DC	dendritische Zellen
DIG	Disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
ER	Endoplasmatische Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie
FBS	Fetal Bovine Serum
FcγR	Fc-Gamma-Rezeptor,
FISH	Fluoreszenz in Situ Hybridisierung
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCV	Hepatitis C Virus
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IM	Innenmembran
inf.	inflammatorisch
Inf.	Infektion
INF-γ	Interferon-γ
KBE	Kolonie bildende Einheit
kDa	Kilodalton

kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	Knock out
LAF	Lymphozyten aktivierender Faktor
LAF	Lymphozyten aktivierender Faktor
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäuren
MAC1	Makrophagen-1-Antigen
MDP	Monozyten-Dendriten-Precursor
mg	Milligramm
MHC-Moleküle	Major-Histocompatibility-Complex-Moleküle
Min	Minute
Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Na	Natrium
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
neg.	negativ
NET	Neutrophil Extracellular Trap
neut.	neutrophile
Neutr. Granulozyten	Neutrophile Granulozyten
NKT-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
NK-Zell-Rezeptoren	Natürliche Killer-Zell-Rezeptoren
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
OM	Außenmembran
PAI-1	Plaminogenaktivatorinhibitor 1
PAMPS	Pathogen-assoziierte Muster
pat.	patrouillierend
PBS	Phosphat Buffer Saline
PCK	H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethylketon
PECAM-1	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül 1
PFA	Paraformaldehyd
PG	Proteoglykane
PL	Phospholipid
PLZF	Promyelocytic leukaemia zinc finger protein
PLZF	Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger Protein
pos.	positiv
PPP	Plättchen armes Plasma
PRP	Plättchen reiches Plasma
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptoren
RNA	Ribonukleotidsäure

Rot/min	Rotationen pro Minute
RPM	Rounds per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunde
SEM	Standartfehler
SIRS	Systemisch inflammatorisches Respons-Syndrom
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor
TEG	Thrombelastographie
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TIP DC	TIP-Dendritische-Zellen
TLR	Toll Like Receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
tPA	Plasminogenaktivator
TVT	Tiefe Beinvenenthrombose
U	Unit
V. coccygea lateralis	Vena coccygea lateralis
V. jugularis.	Vena jugularis
V.a.	Verdacht auf
v.a.	vor allem
VCAM-1	Gefäßzelladhäsionsmolekül 1
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
Z.B.	Zum Beispiel

X. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer, Herr Prof. Dr. med. Bernd Engelmann, besonders danken. Besten Dank für die Ermöglichung, in Ihrem Labor zu forschen, und für die besonderen Erfahrungen und Herausforderungen, die ich dort erleben durfte, welche mich in meiner weiteren Laufbahn maßgeblich geprägt haben. Danke für alles, was ich bei Ihnen lernen durfte, für den Einblick in die Forschung und Wissenschaft und was es heißt dafür zu arbeiten. Danke für all Ihre zahlreichen Ideen und Ratschläge, die das Projekt entscheidend weitertrugen, sowie für ihre stetige Geduld und Offenheit zum Gespräch über Probleme und Schwierigkeiten während der Arbeit im Labor. Besonderer Dank gilt Ihrer ausführlichen, detaillierten und aufwendigen Korrektur.

An zweiter Stelle bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. rer. biol. hum. Susanne Pfeiler, für ihre Hilfe beim Erlernen diverser Tätigkeiten im Labor sowie für ihr menschliches Engagement und ihren Einsatz, die mir bei der Bewältigung entstandener Probleme besonders halfen. Zudem bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei der Durchführung diverser Experimente und für die Einarbeitung in die Labortätigkeit.

Vielen Dank auch an Herr Prof. Dr. med. Steffen Massberg, der dieses Projekt durch seine Kooperation, insbesondere bezüglich der Tierversuche, ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. vet. Meike Miller, ohne deren Mitarbeit der Abschluss dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sie machte die Durchführung des Großteils der Tierversuche erst möglich.

Außerdem möchte ich Frau Dr. med. vet. Irene Schubert danken, die mir bei der Ausarbeitung des Tierversuchsantrags und mit besonders zuverlässigem Einsatz die anfänglichen Tierversuche ermöglicht hat.

Ich danke meiner gesamten Arbeitsgruppe für die Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung. Manovriti Tahkur möchte ich besonders für ihre Hilfe bei der Durchführung von Tierexperimenten und FACS-Analysen danken. Ein großes Danke auch an Urjita Joshi, die mir nicht nur besonders viel zur Arbeit im Labor beigebracht hat, sondern auch mit ihrer Unterstützung als Freundin und Beraterin während meiner Arbeit zur Seite stand. Ich möchte auch Magdalena Bächtle für ihre Loyalität und ihren Witz im Labor danken.

Bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Marc Schmidt-Supprian möchte ich mich für die erfolgreiche und unkomplizierte Kooperation bedanken. Mein herzlicher Dank gilt Sabrina Bortulozzi, die mich vor allem in den abschließenden Zügen meiner Doktorarbeit sehr unterstützt hat und durch ihre Hilfe besonders zur NKT-Zellen-Analyse beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Admar Verschoor gilt mein Dank für seine äußerst hilfreichen Ratschläge und die zur Verfügung gestellten C5-KO-Tiere. Bei Herrn Prof. Dr. med. Enders bedanke ich mich für seine Hilfe und seinen stetigen Ratschlag zur Erstellung des Tierversuchsantrags.

Herrn Dr. med. vet. Mehdi Shakarami danke ich für seine tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung des Tierversuchsantrags.

Ich danke den Mitgliedern der AG Teupser für zahlreiche zur Verfügung gestellte Geräte, für eure Ratschläge und Hilfe während der Arbeit im Zentral-Labor.

Meinen Freunden danke ich für ihr Verständnis und dafür, dass sie mich immer wieder motivierten. Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Partner, die mich auf unterschiedliche Art und Weise in diesem Projekt unterstützt haben. Sie haben mir die Kraft gegeben, alle Schwierigkeiten zu überwinden. Meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung des Medizinstudiums und ihre stetige Unterstützung, ohne die ich nicht in der Lage gewesen wäre, so viel Zeit in diese Doktorarbeit zu investieren.

Manuel, Dir danke ich für Deinen fachlich kompetenten Rat als hervorragender Mediziner und Deine stetige Hilfe im Labor in scheinbar ausweglosen Situationen, die ich letztlich mit Dir doch immer meistern konnte. Ich danke Dir für deine Zuversicht, dass ich die Arbeit während dieses Projekts abschließen konnte.