

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

Zusammenspiel zwischen intravaskulärer Koagulation und Immunzellrekrutierung in der systemischen bakteriellen Infektion

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

vorgelegt von
Tonina Theres Müller
aus Frankfurt am Main

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bernd Engelmann

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Patrick Möhnle
PD Dr. med. Johannes Tschöp
PD Dr. med. Christian Schneider

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2022

Für meine Familie

1. Einleitung	1
1.1 Hämostase und Thrombose	1
1.1.1 Plasmatische Gerinnung	1
1.1.2 Fibrinbildung	3
1.1.3 Regulation der Fibrinolyse	4
1.1.4 Zelluläre Gerinnung.....	5
1.2 Systemische bakterielle Infektion und Sepsis	7
1.3 Zelluläre Immunantwort auf systemische Infektionen in der Mikrozirkulation der Leber ...	7
1.3.1 Zellen des angeborenen Immunsystems	8
1.3.2 Zellen des erworbenen Immunsystems	10
1.4 Immuno-thrombose als Schnittstelle zwischen Koagulation und Immunsystem.....	12
1.5 HIF-1 α	14
2. Fragestellung	15
3. Material	16
3.1 Verbrauchsmaterialien.....	16
3.2 Antikörper	16
3.3 Geräte.....	18
3.4 Puffer.....	19
3.5 Chemikalien.....	20
4. Methoden	21
4.1 Bakterien	21
4.2 Tierversuche.....	21
4.2.1 Vorbehandlung der Tiere	22
4.2.2 Isolation und Injektion muriner Zellen	23
4.2.3 Durchführung der Tierversuche.....	24
4.2.3 Bestimmung der CFUs.....	24
4.3 Blutentnahme bei gesunden Probanden	24
4.4 Gewinnung von plättchenarmen Plasma.....	25
4.5 Analyse der Blutproben	25
4.6 Immunhistochemie	26
4.7 Auswertung	27
4.8 In Vitro Experimente	29
4.8.1 Wirkung von Fibrinogenspaltprodukten auf das Bakterienüberleben	29
4.8.2 Effekte der Peptide GPRP und GHRP auf die Fibrinbildung	30

4.8.3 Rotationstromboelastometrie	30
4.9 Statistische Auswertung.....	31
5. Ergebnisse.....	32
5.1 Charakterisierung von Immunzell-Assoziationen mit Mikrothrombosen	32
5.2 Regulation der Fibrinolyse durch T-Helferzellen	32
5.2.1 Depletion der T-Helfer durch α CD4-Antikörper-Injektion.....	34
5.2.2 Effekt eines IL23R-defizienten Mausmodells.....	39
5.2.3 Mikrovaskuläre Fibrinbildung in einem IL17A-defizienten Mausmodell.....	40
5.3 B-Zellen beeinflussen Bakterienüberleben ohne Veränderung der Koagulationsantwort .	42
5.4 NETs verstärken die Koagulation und Killing von Bakterien	43
5.5 Einfluss von <i>Nr4a1</i> auf die akute systemische bakterielle Infektion	44
5.6 Wirkung der Faktor Xa-Hemmung auf die bakterielle Infektion	47
5.6.1 Einfluss von Rivaroxaban auf Bakterienüberleben und Fibrinbildung	47
5.6.2 Einfluss von Rivaroxaban auf die Immunzellrekrutierung in der Mikrozirkulation	48
5.7 Zusammenspiel zwischen Faktor XII und der Immunantwort	49
5.7.1 Fibrinbildung und Immunzellrekrutierung in Faktor XII defizienten Mäusen	49
5.7.2 Lokalisation von Faktor XII	52
5.7.3 Assoziation von Faktor XII mit <i>E.Coli</i>	54
5.8 Einfluss der Fibrinbildung auf den T-Helferzellphänotyp	54
5.9 Einfluss der Fibrinbildung auf die HIF-1 α Expression	55
5.10 Clusterbildung von CD4 ⁺ T-Zellen	57
5.10.1 Clusterbildung in Wildtypmäusen.....	57
5.10.2 Assoziation der T-Helferzellen mit Fibrin und Thrombozyten.....	59
5.10.3 Einfluss von Fibrin auf die Clusterbildung.....	60
5.10.4 Expression von Regulatoren der Koagulation in Clustern	62
5.10.5 Einfluss von PAI-1 auf die Clusterbildung	63
5.10.6 Proliferation innerhalb der Cluster	64
5.10.7 Fibrin-abhängige IL-2 Assoziation der aggregierten T-Helferzellen.....	65
6. Diskussion	66
6.1 Diskussion des Tiermodells	66
6.2 Diskussion der verwendeten Methoden.....	66
6.3 Diskussion der Ergebnisse	67
6.3.1 Bidirektionaler Einfluss von Blutgerinnung und Immunzellrekrutierung in der Mikrozirkulation	67

6.3.2 Faktor XII beeinflusst die Immunreaktion bei systemischen bakteriellen Infektionen ..	69
6.3.3 Ausbildung intravasaler thrombolymphoider Strukturen	70
7. Zusammenfassung.....	72
Abstract	74
Danksagung.....	76
Abbildungsverzeichnis	78
Literaturverzeichnis	80
Abkürzungen	93
Anhang.....	95
Affidavit	98

1. Einleitung

1.1 Hämostase und Thrombose

Die Hämostase ist ein essenzieller Mechanismus, um Blutverluste bei Verletzungen zu verhindern. Die Grundlagen dafür bilden die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten sowie die zelluläre und plasmatische Koagulation. Am Beginn der Hämostase steht die Verletzung des intakten Endothels. Hierdurch kommt es zu einer Freisetzung von von-Willebrand-Faktor (vWF) und Integrinen, sowie zur endothelialen Expression von Rezeptoren, die der Interaktion mit Thrombozyten dienen. Gleichzeitig wird die Sekretion antikoagulatorischer Substanzen, wie TFPI und Thrombomodulin, und thrombozytenaggregationshemmender Substanzen, u.a. NO und Prostaglandin I₂ reduziert¹⁻⁴. Die Aktivierung der Koagulation erfolgt sowohl über den intrinsischen (Kontaktaktivierung) als auch den extrinsischen Aktivierungsweg (Tissue Faktor(TF)-abhängig)⁵. Beide Aktivierungsmöglichkeiten resultieren in der Bildung eines Fibringerinnsels⁶ (Abb. 1).

Bei pathologischen Veränderungen der Hämostase kann es zu einer dysregulierten Gerinnung und infolgedessen zur Bildung von Thromben innerhalb von venösen Gefäßen kommen, welche wiederum embolische Ereignisse auslösen können. Thromboembolien gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit. In 2010 konnten etwa 25% aller Todesfälle auf eine thromboembolische Ursache zurückgeführt werden⁷.

1.1.1 Plasmatische Gerinnung

Die beteiligten Gerinnungsfaktoren der plasmatischen Gerinnung werden in den Hepatozyten synthetisiert und anschließend als Zymogene in das Blut sezerniert.

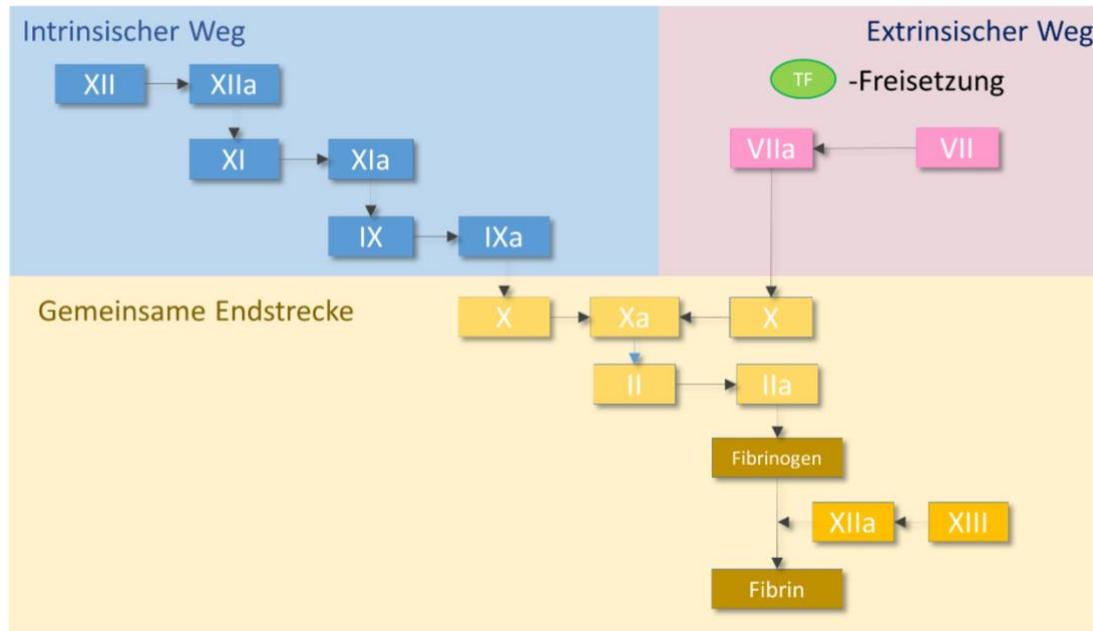


Abbildung 1: Ablauf der Gerinnungskaskade

Man unterscheidet zwischen der intrinsischen und extrinsischen Gerinnungsaktivierung (Abb.1). Der zentrale Startpunkt des extrinsischen Aktivierungsweg bildet Tissue Faktor (TF) und dessen Komplexbildung mit Faktor VIIa. TF dient dabei als essenzieller Co-Faktor von Faktor VIIa und gilt als wichtigster Initiator der physiologischen und pathologischen Koagulation. TF wird u.a. von adventitiellen Zellen und in arteriosklerotischen Plaques exprimiert⁸, kann aber auch von intravaskulären Zellen synthetisiert werden (u.a. Monozyten⁹). Als Gegenspieler des TF-FVIIa-Komplexes dient Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)^{10,11}. Die beiden Isoformen TFPI α und TFPI β besitzen jeweils identische K1 und K2 Domänen. Die Inhibierung der Koagulation erfolgt durch Bindung der K2 Domäne an FXa und die Ausbildung von TFPI-FXa-TF-FVIIa-Komplexen^{12,13}.

Faktor XII ist der Startpunkt der intrinsischen Koagulation bzw. des Kontaktaktivierungssystems. Die Aktivierung zu Faktor XIIa wird entweder durch die Bindung an negativ geladene Oberflächen, wie zum Beispiel Polyphosphat (PolyP) auf der Oberfläche von aktivierten Blutplättchen¹⁴ oder über Plasmakallikrein vermittelt¹⁵ (Abb. 2).

In FXII defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Thrombosen eingeschränkt ist und keine Okklusion erreicht wird^{16,17}. Dieser Effekt konnte im menschlichen Organismus noch nicht bestätigt werden. Bei Patienten mit einer FXII Defizienz liegt keine Blutungsneigung vor, allerdings konnte bislang auch keine protektive Wirkung der Faktor XII Defizienz gegenüber Thrombosen bewiesen werden¹⁸.

Faktor XIIa führt zu einer Bildung von Bradykinin, wodurch es zu einer Erhöhung der Permeabilität von Gefäßen, einer verstärkten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten^{19,20} und Aktivierung des Komplementsystems kommt^{21,22}.

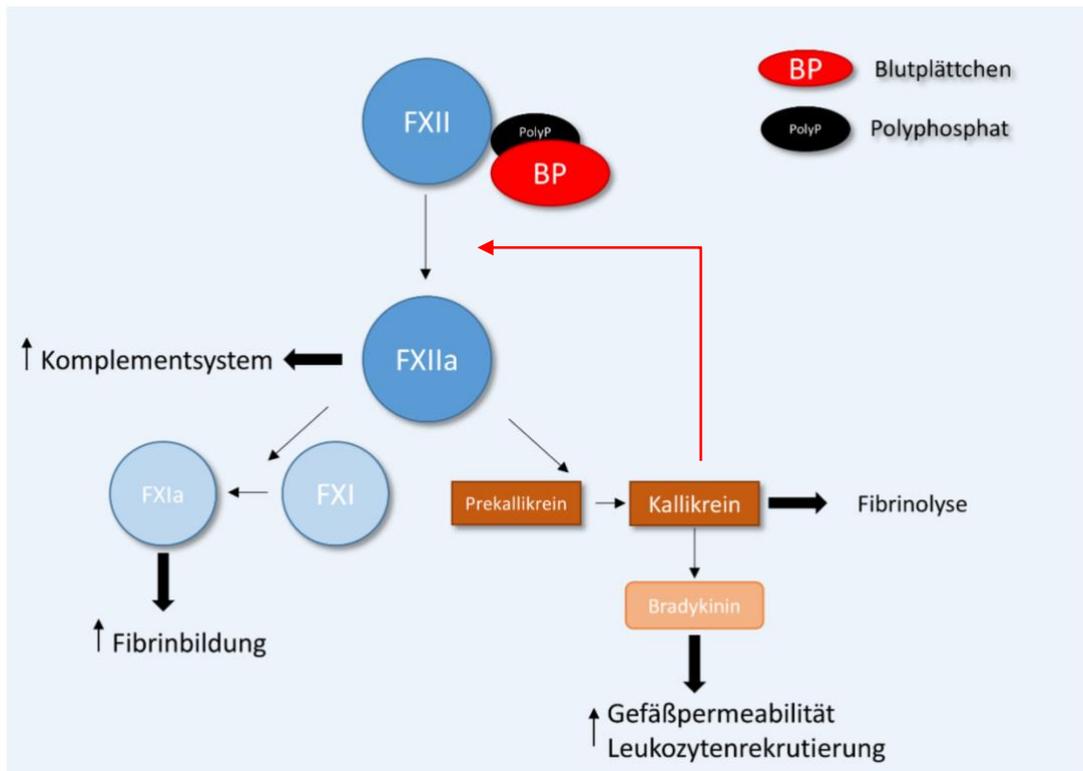


Abbildung 2: Die Rolle von FXII in der Koagulation nach Aktivierung durch Thrombozyten

Faktor X bildet den Start der gemeinsamen Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Weges^{23,24}. Er gehört neben Faktor II, VII und IX zu den Vitamin K abhängigen Gerinnungsfaktoren²⁵. FXa führt zu einer enzymatischen Spaltung des Prothrombins zu Thrombin (FIIa).

Neben seiner Beteiligung an der Blutgerinnung zeigt Faktor Xa auch pro-inflammatorische Eigenschaften. So konnte eine vermehrte Faktor Xa-abhängige Ausschüttung der Zytokine IL-6, IL-8 und MCP-1 gezeigt werden²⁶.

1.1.2 Fibrinbildung

Fibrin bildet das Endprodukt der Gerinnungskaskade. Fibrin entsteht aus Fibrinogen, einem im Blut gelösten Glykoprotein, welches in den Hepatozyten synthetisiert wird²⁷. Es besteht aus je 2 α -, β - und γ - Ketten, verbunden über Disulfidbrücken²⁸. Die zentrale E-Region enthält die N-Termini aller 6 Ketten, während die C-Termini der β - und γ -Ketten als D-Region bezeichnet

werden²⁹ (Abb. 3). Während ein Großteil des Fibrinogens im Blutplasma zirkuliert, finden sich weitere Anteile in Thrombozyten, Lymphe und interstitieller Flüssigkeit³⁰. Zur Bildung des unlöslichen Fibrins werden die Fragmente Fibrinopeptid (Fp) A und B durch Thrombin (Faktor IIa) abgespalten (Abb. 3). Durch die nun freiliegenden C-Termini kommt es zu einer Vernetzung der Fibrinmonomere³¹. Anschließend folgt die Quervernetzung innerhalb des Fibringerinnsels durch Faktor XIIIa um die Stabilität zu erhöhen³². Die wichtigsten Regulatoren der Fibrinbildung sind aktiviertes Protein C und TF sowie Antithrombin (AT) als Hemmer der Fibrinbildung³³. Neben der Bildung des Fibrins ist Fibrinogen auch wichtig für die Aggregation von Thrombozyten über Bindung an den GPIIb-IIIa-Rezeptor³⁴.

Fibrinogen zählt zu den Akute-Phase-Proteinen. Während einer akuten Entzündungsreaktion kommt es zu einem bis zu 10-fachen Anstieg der Fibrinogenkonzentration im Blut³⁵. Ein wichtiger Aktivator der erhöhten Fibrinogenausschüttung ist dabei IL-6³⁶.

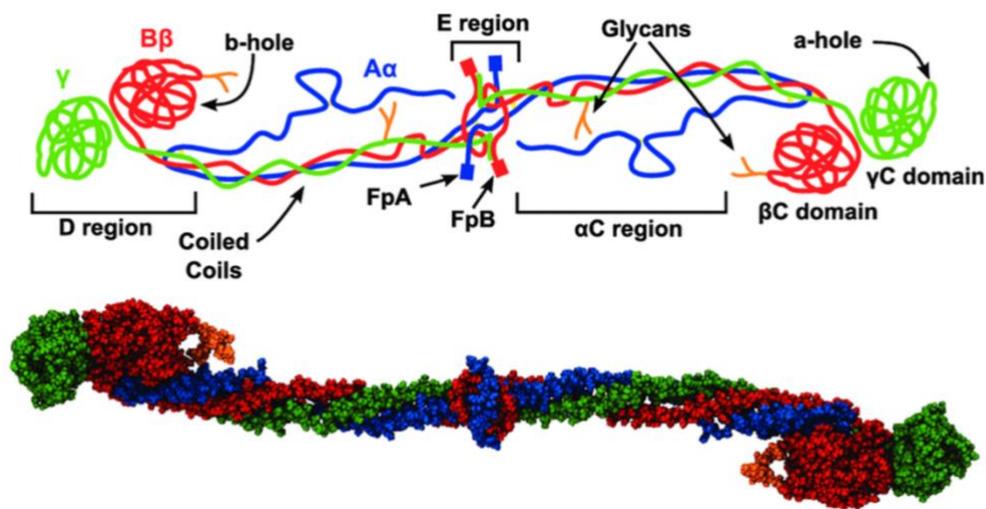


Abbildung 3: Struktur des Fibrinogens

Modifiziert nach Köhler S, Schmid F, Settanni G (2015) The Internal Dynamics of Fibrinogen and Its Implications for Coagulation and Adsorption. *PLoS Comput Biol* 11(9): e1004346. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004346>³⁷

1.1.3 Regulation der Fibrinolyse

Um eine übermäßige Fibrinbildung zu verhindern und die Gerinnungsaktivierung zu beenden, wird Fibrin über das Plasminsystem abgebaut (Fibrinolyse) (Abb.4). Während der Fibrinolyse wird das Zymogen Plasminogen durch Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) bzw. Gewebespezifischer Plasminogen Aktivator (tPA) in seine aktive Form Plasmin konvertiert³⁸. Plasmin baut Fibrin in lösliche Abbauprodukte, sogenannte Fibrindegredierungsprodukte (FDPs), ab. Diese wiederum hemmen Thrombin und damit eine weitere Bildung von Fibrin aus Fibrinogen³⁹.

Die Fibrinolyse kann durch die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren-1 bis -4 (PAI-1 bis PAI-4) gehemmt werden. Wichtigster Vertreter dieser Serpine (Serin Protease Inhibitoren) ist PAI-1⁴⁰. Es inhibiert die Fibrinolyse über die Bindung von uPA und tPA⁴¹. PAI-1 wird in Thrombozyten gespeichert und kann nach Thrombozytenaktivierung freigesetzt werden⁴².

Ein weiterer Regulator der Fibrinolyse ist Thrombin-aktivierter-Fibrinolyse-Inhibitor (TAFI)⁴³. Nach Aktivierung von Thrombin spaltet TAFI Lysinreste von partiell abgebautem Fibrin ab, die für die Bindung von Plasminogen an Fibrin wichtig sind. TAFI weist auch anti-inflammatorische Eigenschaften auf, u.a. über die Inhibition der Komplementfaktoren C3a und C5a^{44,45}.

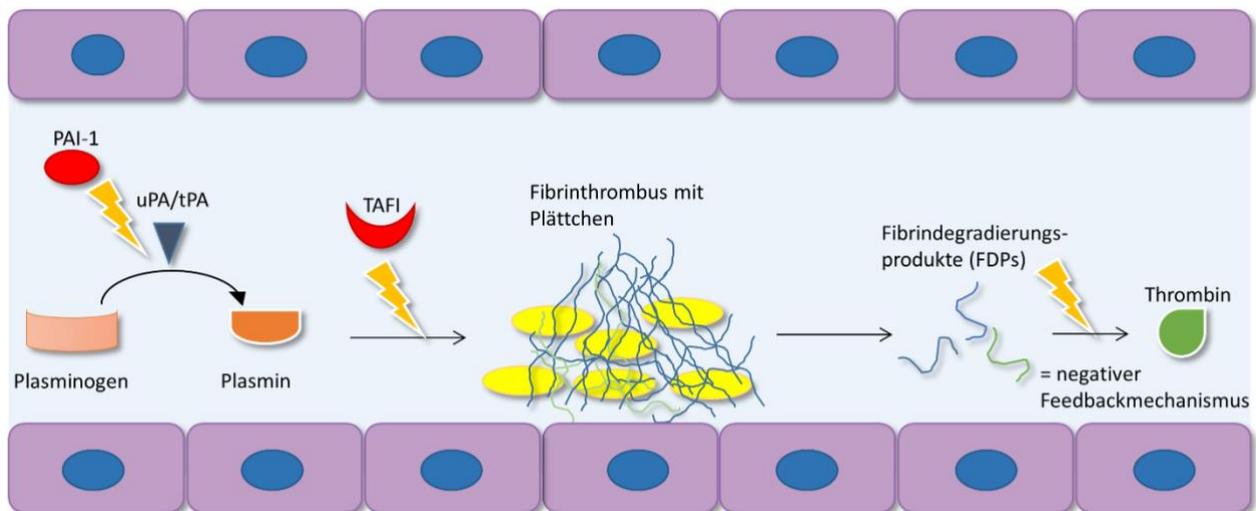


Abbildung 4: Regulation der Fibrinolyse durch das Plasmin-System, PAI-1 und TAFI

1.1.4 Zelluläre Gerinnung

Die zelluläre Hämostase wird u.a. durch Thrombozyten vermittelt. Unter physiologischen Umständen sezernieren die Endothelzellen Prostacyclin und NO und verhindern damit eine Aktivierung der Blutplättchen⁴⁶. Bei Verletzungen der Gefäßwand kommt es zur Freilegung kollagener Fasern subendothelialer Strukturen. Diese interagieren mit dem Glykoprotein Ia/IIa und Glykoprotein VI auf der Oberfläche der Thrombozyten⁴⁷. Zudem kommt es zur Freisetzung des von-Willebrand-Faktors, welcher an den Glykoprotein-Ib/V/IX-Komplex auf den Plättchen bindet⁴⁸. Dies führt zur Aktivierung der Thrombozyten und einer damit verbundenen Konformationsänderung sowie der Freisetzung von über 300 verschiedenen Proteinen aus den alpha-Granula und dichten Granula⁴⁹. Diese führen unter anderem zu einer Vasokonstriktion und weiteren Aggregation von

Thrombozyten⁵⁰. GPIIb/IIIa spielt außerdem eine wichtige Rolle für die durch Fibrinogen vermittelte Quervernetzung und Thrombozytenaggregation⁵¹.

Neben ihrer Bedeutung für die Blutstillung spielen Blutplättchen auch eine zentrale Rolle in der Immunantwort bei akuten Entzündungsreaktionen⁵². Dazu ist eine direkte oder indirekte Interaktion der Thrombozyten mit Bakterien möglich⁵³. Anschließend kommt es zu Plättchen-Plättchen- und Plättchen-Leukozyten Interaktionen sowie zur Freisetzung antimikrobieller Peptide und Chemokine, um weitere Immunzellen zu rekrutieren⁵⁴.

1.2 Systemische bakterielle Infektion und Sepsis

Infektionskrankheiten sind weltweit betrachtet eine der häufigsten Todesursachen, insbesondere in Entwicklungsländern. *Escherichia Coli* (*E.Coli*) ist ein wichtiger bakterieller Erreger der Sepsis, neben *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* und *Klebsiella pneumoniae*⁵⁵. Dabei handelt es sich um gram-negative Stäbchen, welche physiologisch im menschlichen Darm zu finden sind. Infektionen mit *E.Coli*, unter anderem des Urogenitaltrakts und bei der Neugeborenen-sepsis, stellen einen häufigen Hospitalisationsgrund dar⁵⁶.

Im Rahmen von bakteriellen Infektionen kommt es zu einer Erkennung der Erreger über Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs) durch verschiedene Rezeptoren (Pattern recognition receptors, PRRs) auf Leukozyten sowie Endothel- und Epithelzellen⁵⁷. Daraufhin werden Chemokine und Zytokine freigesetzt, um eine adäquate Immunantwort zu ermöglichen. Diese pro-inflammatorischen Abläufe beinhalten ebenfalls eine Aktivierung des Komplementsystems sowie der Koagulation. Gleichzeitig findet eine anti-inflammatorische Gegenregulierung des Organismus statt. Es kommt zur Apoptose von Leukozyten, verminderten Ausschüttung zytotoxischer Substanzen und Wiederherstellung der Homöostase.

Bei Verlust dieses Gleichgewichts zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mechanismen kommt es zur Sepsis, einer lebensbedrohlichen übermäßigen Reaktion des Körpers auf einen Erreger⁵⁸. Dies führt zu einer Kreislaufdysregulation und Beeinträchtigung der Organfunktionen nach hämatogener Streuung der Pathogene im Organismus⁵⁹. Die vermehrte Freisetzung von Defekt-assoziierten molekularen Strukturen (DAMPs) durch geschädigte Zellen führt zu einer weiteren Aktivierung pro-inflammatorischer Abläufe^{60,61}.

Die Sterblichkeit der Sepsis liegt auch bei optimaler Behandlung bei rund 20%⁶². Bis heute besteht keine ursächlich wirksame Handlungsstrategie. Neben einer frühzeitigen antimikrobiellen Therapie steht in der Behandlung der Sepsis die supportive Therapie zur Kreislaufstabilisierung mittels Volumengabe und Katecholaminen im Vordergrund⁶³.

1.3 Zelluläre Immunantwort auf systemische Infektionen in der Mikrozirkulation der Leber

Das Immunsystem ist ein Zusammenspiel zellulärer und humoraler Strukturen sowie lymphatischer Organe zur Abwehr in den Organismus eindringender Pathogene. Es lässt sich in ein angeborenes und erworbenes Immunsystem unterteilen⁶⁴. Während das angeborene Immunsystem eine

schnelle Immunantwort garantiert, zeigt das erworbene Immunsystem eine spezifischere Pathogenabwehr nach zeitlicher Latenz⁶⁵.

1.3.1 Zellen des angeborenen Immunsystems

Monozyten

Monozyten entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark nach Stimulation durch Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (M-CSF)⁶⁶. Nach ihrer Proliferation werden sie in die Blutbahn entlassen⁶⁷. Dort agieren sie als Phagozyten und können Antigene präsentieren. In der Maus unterscheidet man zwischen 2 Subtypen: Klassische Monozyten (inflammatorische Monozyten) und nicht-klassische Monozyten (patrouillierende Monozyten)⁶⁸. Im humanen System konnte zudem ein dritter Subtyp, die sogenannten intermediären Monozyten nachgewiesen werden⁶⁹.

Klassische Monozyten werden im Rahmen von Infektionen, getriggert durch CCL2, vermehrt aus dem Knochenmark in die Blutbahn entlassen⁷⁰. Sie sind in der Maus Ly6C positiv. Klassische Monozyten können zu nicht-klassischen Monozyten und dendritischen Zellen differenzieren. Zudem führen sie zu einem Anstieg der Rekrutierung von Makrophagen und dendritischen Zellen⁶⁶. Nicht-klassische Monozyten sind positiv für CX3CR1. Ihre Proliferation wird durch den Transkriptionsfaktor *Nr4a1* kontrolliert⁷¹. Nicht-klassische Monozyten wandern entlang der Gefäßwände im nicht infizierten Organismus, getriggert durch LFA-1 und Mac-1. Am Ort der Infektion kommt es zu einer Verlangsamung des Patrouillierungsvorgangs und zur Adhäsion der nicht-klassischen Monozyten, induziert u.a. durch TNF- α ⁷². Ein möglicher anti-inflammatorischer Effekt nicht-klassischer Monozyten, u.a. über die Sekretion von IL-10 wird diskutiert⁷³.

Kupffer-Zellen

Kupffer-Zellen sind spezialisierte Makrophagen des Lebergewebes. Sie sind Teil des mononukleären phagozytären Systems⁷⁴. Kupffer-Zellen entstehen zum Großteil aus erythromyeloiden Vorläuferzellen aus dem Dottersack⁷⁵ sowie zu einem geringeren Teil aus differenzierten Monozyten. Monozyten wandern anschließend mit dem Blut in die Leber ein, wo sie dann zu organspezifischen Makrophagen differenzieren. Wichtiger Faktor zur Differenzierung und Proliferation der Kupffer-Zellen ist M-CSF⁷⁶. Im histologischen Bild erkennt man Kupffer-Zellen an ihren zahlreichen Zytoplasmafortsätzen, die in den Disse-Raum zwischen Hepatozyten und Endothelzellen hineinragen. Ihre strategische Positionierung in der Leber ermöglicht eine effiziente Phagozytose von im Blut zirkulierenden Pathogenen, insbesondere Pathogenen aus dem Gastrointestinaltrakt⁷⁷. Diese immunologische Funktion der Kupffer-Zellen ist essenziell, um die Leber vor Zell- und Organschäden zu schützen. Die Aktivierung der Kupffer-Zellen kann einerseits

durch das Komplementsystem über spezielle Rezeptoren für C3a und C5a vermittelt werden. Andererseits, erfolgt eine Aktivierung über unterschiedliche PAMP-Rezeptoren, wie TLR4, welcher als Rezeptor für LPS fungiert, einer spezifischen Komponente der Membran gram-negativer Bakterien. Anschließend schütten die Kupffer-Zellen Entzündungsmediatoren, wie Zytokine, Chemokine, lysosomale und proteolytische Enzyme, sowie Sauerstoffradikale aus⁷⁸. Kupffer-Zellen dienen zudem als Antigen-präsentierende-Zellen für B- und T-Lymphozyten⁷⁹.

Neutrophile

Neutrophile stellen die quantitativ wichtigste angeborene Immunzelle dar, die insbesondere für die Immunantwort im Rahmen akuter entzündlicher Reaktionen verantwortlich sind⁸⁰. Neutrophile differenzieren aus myeloischen Vorläuferzellen, stimuliert durch Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF)⁸¹. Die genaue Verteilung der Neutrophilen im Organismus ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird aber angenommen, dass neben der im Blut zirkulierenden Population ein weiteres Reservoir in verschiedenen Organen vorhanden ist, u.a. in Leber, Milz, Knochenmark und Lunge⁸². Die Elimination seneszenter Neutrophiler erfolgt in der Leber durch Kupffer-Zellen, vermittelt über IL-17A und G-CSF^{83,84}. Im Rahmen einer Infektion erfolgt die Rekrutierung der Neutrophilen über die Erkennung von PAMPs sowie anderer bakterieller bzw. viraler Produkte. Anschließend findet zunächst ein Entlangrollen der Neutrophilen an der Gefäßwand mit Hilfe von Selektinen statt. Danach folgt die Adhäsion der Neutrophilen mit Hilfe von Integrinen und Chemokinen. Der Chemokingradient entlang des Endothels dirigiert dabei die Zelle zum Ort der Transmigration. Die Extravasation der Neutrophilen erfolgt entweder parazellulär oder transzellulär^{80,85}.

Aktiviert Neutrophile können am Ort der Infektion sog. NETs (neutrophile extrazelluläre Traps) bilden, stimuliert durch IL-8, LPS, opsonierte Bakterien und Blutplättchen⁸⁶. NETs bestehen aus einem Netz aus extrazellulärer DNA, Histonen sowie antibakteriellen Proteinen und Peptiden⁸⁷. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Einfangen («trapping») intravasaler Bakterien⁸⁸. Durch eine vermehrte Rekrutierung von Blutplättchen und Aktivierung von Fibrinbildung haben NETs einen pro-thrombotischen Effekt^{89,90}. Die Ausbildung von NETs kann im Rahmen der Sepsis zu Organschädigungen führen und wurde in mehreren klinischen Studien als Prädiktor für eine erhöhte Mortalität gesehen werden⁹¹⁻⁹³.

1.2.2 Zellen des erworbenen Immunsystems

T-Zellen

T-Zellen sind Teil des adaptiven Immunsystems, gekennzeichnet durch die Expression von CD3 und des T-Zellrezeptors (TCR). Sie entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen und migrieren anschließend als unreife Vorläuferzellen in den Thymus⁹⁴. Hier erfolgt die Differenzierung zu CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ T-Killerzellen⁹⁵. Zudem unterlaufen die T-Zellen im Thymus eine negative Selektion, die der immunologischen Selbsttoleranz dient⁹⁶. Neben den klassischen T-Zellsubtypen der T-Helferzellen, T-Killerzellen und T-Gedächtniszellen des adaptiven Immunsystems, spielen innate-like T-Zellen, u.a. Natural-killer T-Zellen (NKT) und $\gamma\delta$ T-Zellen eine wichtige Rolle in der Frühphase der Infektion⁹⁷.

T-Helferzellen

T-Helferzellen werden klassischerweise neben der Expression von CD3 durch das Glykoprotein CD4 auf der Zellmembranoberfläche charakterisiert. Die Funktion der CD4⁺ Zellen ist sehr vielfältig und kommt durch die unterschiedliche Differenzierung der naiven T-Zellen zustande. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Immunreaktion durch die Aktivierung von Makrophagen und B-Zellen und die damit verbundene Stimulation der Antikörperproduktion⁹⁸, sowie Rekrutierung eosinophiler, basophiler und neutrophiler Granulozyten⁹⁹.

CD4⁺ Lymphozyten lassen sich anhand der Produktion jeweils charakteristischer Zytokine und Chemokine in unterschiedliche Subtypen einteilen, welche durch die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren determiniert sind (Abb. 5)¹⁰⁰. Ihre Differenzierung wird über Proteine der STAT Familie (signal transducer and activator of transcription) gesteuert¹⁰¹. Ein Merkmal der T-Zellen ist ein positiver Feedbackmechanismus, der über die Zytokin-Produktion der jeweiligen Subtypen vermittelt wird und zu einer weiteren Differenzierung von naiven T-Zellen führt¹⁰². Die Interaktion des T-Zellrezeptors (TCR) mit MHC-II-Antigen-Komplexen auf Antigen-präsentierenden Zellen ist essentiell für die Aktivierung der CD4⁺ T Zellen¹⁰³.

Th1 und Th2 Zellen waren die ersten beschriebenen Subtypen der T-Helferzellen¹⁰⁴. Die Differenzierung von Th1 Zellen wird durch IL-12 angeregt¹⁰⁵. Sie exprimieren T-bet und sind primär an der Abwehr intrazellulärer Pathogene und der Entstehung von Autoimmunkrankheiten beteiligt¹⁰⁶. Th2 Zellen hingegen sind durch die Expression von GATA-3 gekennzeichnet und spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von extrazellulären Pathogenen, insbesondere im Rahmen von parasitären Infektionen¹⁰⁷.

Th9 Zellen hingegen, benannt nach ihrer Sekretion von IL-9 spielen eine wichtige Rolle im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, u.a. der Multiplen Sklerose, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und der rheumatoiden Arthritis^{108,109}, sowie bei Tumorerkrankungen¹¹⁰.

Die Th17-Zellen entstehen aus naiven T-Zellen, insbesondere im Rahmen von bakteriellen Infektionen, Pilzinfektionen sowie Autoimmunerkrankungen. Ihre Differenzierung wird durch TGFβ, IL-6, IL-21 und IL-23 angeregt. Th17 Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor RORγt. Sie sind gekennzeichnet durch die Produktion von IL-21, IL-17A, IL-17F und IL-22^{111,112}.

Th22 wurden zuerst 2009 von *Duhen et. al.* in der Haut nachgewiesen. Sie unterscheiden sich in ihrer Zytokinproduktion durch die fehlende Sekretion von IL-17 von Th17 Zellen¹¹³.

Regulatorische T-Zellen (Tregs), welche durch den Transkriptionsfaktor foxp3 charakterisiert sind, spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort. Man unterscheidet zwischen Tregs aus dem Thymus, welche die immunologische Selbsttoleranz unterstützen¹¹⁴ und peripheren Tregs welche im Rahmen einer Infektion aus naiven T-Zellen differenzieren und die T-Zellantwort regulieren und bremsen^{115,116}. Mutationen im *Foxp3* Gen führen zur Ausbildung defekter Tregs und zu einer verstärkten Entwicklung von Autoimmunerkrankungen¹¹⁷.

Follikuläre T-Helferzellen sind durch den Transkriptionsfaktor Bcl-6 gekennzeichnet¹¹⁸. Sie befinden sich in den Keimzentren von Lymphknoten und der Milz und spielen eine essentielle Rolle in der Proliferation von B-Zellen¹¹⁹.

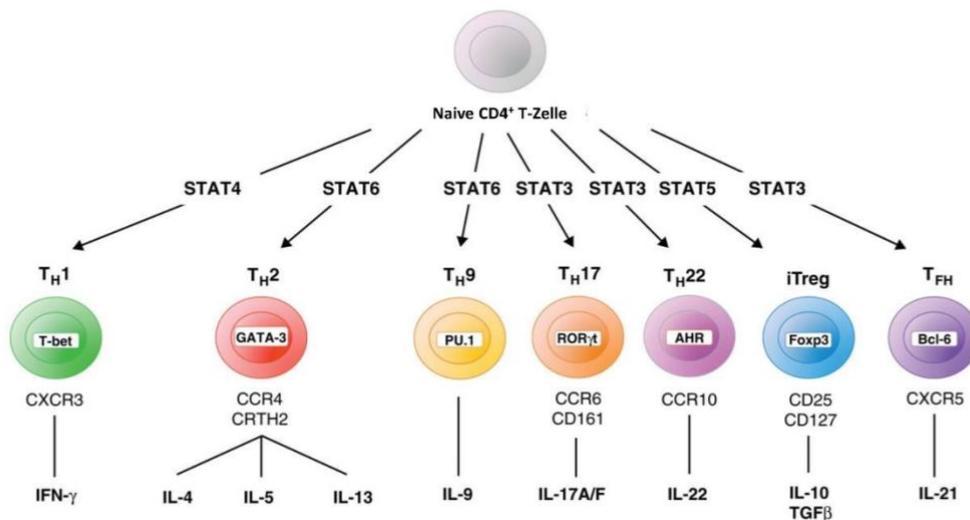


Abbildung 5 Subtypen der CD4⁺ T-Zellen im Rahmen systemischer bakterieller Infektionen

Modifiziert nach Wambre E et. al.¹²⁰

B- Zellen

B-Zellen stellend die Antikörper-produzierenden Zellen dar. Die B-Zellentwicklung findet im Knochenmark statt¹²¹. Nach erfolgter negativer Selektion zur immunologischen Selbsttoleranz zirkulieren die naiven B-Zellen im Blut¹²². Bei Kontakt mit einem Antigen, welches an den B-Zell Rezeptor bindet, kommt es zu einer Aktivierung der B-Zelle und anschließender Differenzierung zur Plasmazelle, welche Immunglobuline (Ig) sezerniert. Für diese Proliferation ist ein co-stimulatorisches Signal von folliculären T-Helferzellen erforderlich. Neben der Sezernierung von Antikörpern können B-Zellen auch Zytokine wie IL-10 sezernieren¹²³.

Bei B1a-Zellen handelt es sich um einen Subtyp der B-Lymphozyten. Sie sind beteiligt an der Abwehr von Pathogenen und der Beseitigung von apoptotischen Abbauprodukten. B1a Zellen sind insbesondere an der frühen humoralen Abwehrreaktion beteiligt und gelten als wichtige Antikörperproduzenten¹²⁴. B1a-Zellen sind vor allem in der Pleura- und Peritonealhöhle sowie in der Milz vorhanden¹²⁵. Sie sezernieren Immunglobuline der Klasse M und dienen als verknüpfendes Glied zwischen erworbener und angeborener Immunität ¹²⁶.

B1a-Zellen spielen eine wichtige Rolle für die immunologische Selbsttoleranz und Autoimmunität. Sie zeigen in der Frühreaktion im Rahmen einer Sepsis eine anti-inflammatorische Wirkung über die Sekretion von IL-10 und schützen dadurch den Körper^{127,128}. Ihre Bildung ist abhängig von den Transkriptionsfaktoren Bhlhe40 und Bhlhe41^{129,130}.

1.4 Immunothrombose als Schnittstelle zwischen Koagulation und Immunsystem

Ein wichtiger Bestandteil der Pathophysiologie der Sepsis ist die enge Verknüpfung zwischen Immunsystem und Koagulation. Nach Erkennen eines Pathogens über PAMPs kommt es zu einer Aktivierung von Leukozyten, Blutplättchen und Endothelzellen, welche wiederum zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade führen⁵⁷, unter anderem durch eine verstärkte Expression von leukozytärem TF auf den Zellen^{131,132}.

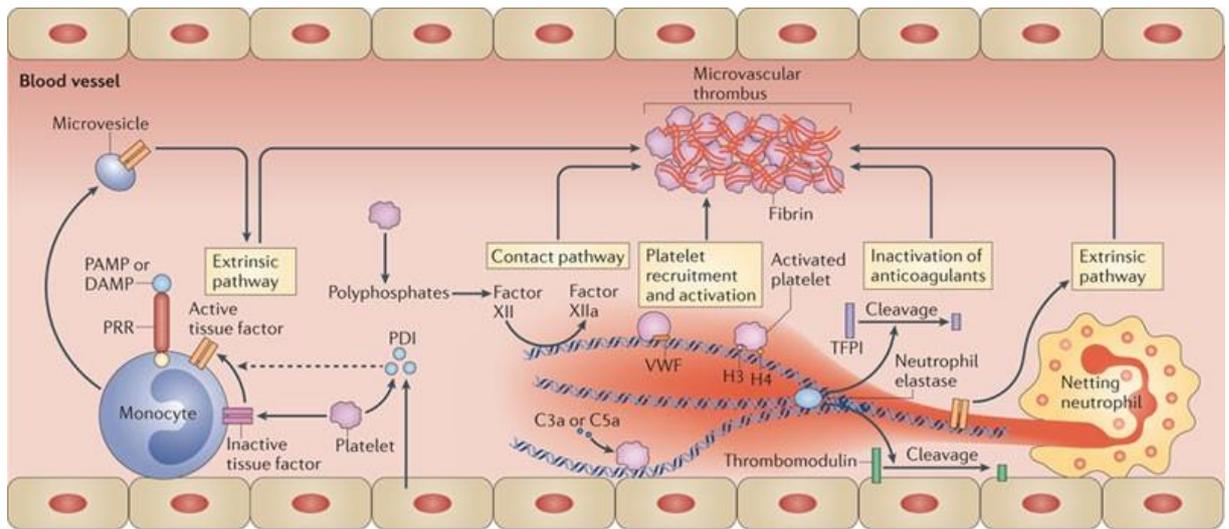
Zusätzlich können Thrombozyten durch eine direkte Bindung der Bakterien an verschiedene Rezeptoren aktiviert werden⁵³. In Folge der Entzündungsreaktion kommt es zu einer Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-17 und IL-18¹³³. Dies führt zu einer vermehrten Expression bzw. Aktivierung von TF in Monozyten und Makophagen und damit zu einer Aktivierung der intravasalen Gerinnung¹³⁴. Gleichzeitig kommt es durch die vermehrte Freisetzung von tPA durch Endothelzellen zu einer Aktivierung der Fibrinolyse^{135,136}, welche wiederum durch die Freisetzung von PAI-1 aus aktivierten Thrombozyten inhibiert wird. Des Weiteren führt die Freisetzung von

NETs durch neutrophile Granulozyten zu einer Verstärkung der pro-koagulatorischen Abläufe^{137,138}. Die Maximalform dieser gesteigerten Aktivierung der Gerinnung wird dabei als disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) bezeichnet. Dabei kommt es zur massiven Ausbildung von Mikrothrombosen, insbesondere in den kleinen und mittelgroßen Gefäßen mit deletären Folgen^{134,139}.

Die Aktivierung des Komplementsystems ist eine weitere Folge intravasaler Pathogene. Die aktivierten Komplementfaktoren C3a und C5a spielen eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Lymphozyten^{140,141} und führen zu einer Aktivierung des *Membrane-Attack-Complex* (MAC). Dieser kann durch die Bildung von Poren in der Zellmembran zu einer Lyse führen^{142,143}. Die Aktivierung des Komplementsystems geschieht über drei Mechanismen: (1) den klassischen Weg, wobei Komplementfaktor C1 über seine C1q Domäne an IgG oder IgM Antikörper bindet¹⁴⁴, (2) den Lektinweg, welcher Mannose-bindende Lektine zur Antikörper-unabhängigen Erkennung der Strukturen von Mikroorganismen nutzt, und (3) den alternativen Weg, welcher den ständigen spontanen Zerfall von C3 in C3a und C3b beschreibt¹⁴⁵. Bei fehlender Bindung an ein Pathogen kommt es anschließend zum raschen Abbau von C3a und C3b im Blut.

Aktivierter Komplementfaktor C3 setzt einerseits die Komplementkaskade in Gang und spielt andererseits eine wichtige Rolle in der Infektabwehr während der Frühphase der Infektion, unter anderem durch die Oponierung von Pathogenen^{146,147}. Dies unterstützt die Aktivierung von Neutrophilen und fördert die Ausbildung von NETs¹⁴⁸. Hingegen kann zu späteren Zeitpunkten eine überschießende Aktivierung des Komplementsystems ein Multiorganversagen fördern und zu einem schwereren Krankheitsverlauf führen^{149,150}.

Unter physiologischen Bedingungen dient die beschriebene Gerinnungsaktivierung im Rahmen bakterieller Infektionen als Abwehrmechanismus und wird als Immunothrombose bezeichnet (Abb. 6). Es handelt sich dabei um eine benefizielle Form der Thrombose, welche eine Invasion der Bakterien in das Gewebe und damit eine Ausbreitung der Infektion verhindern soll^{151,152}. Die Mikrothrombosen können allerdings durch Gefäßokklusion zu Durchblutungsstörungen führen und damit ein Organversagen induzieren. Gleichzeitig kommt es durch den Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und durch Thrombozytopenien zu einem erhöhten Blutungsrisiko (Verbrauchskoagulopathie). Eine Thrombozytopenie ist darüber hinaus mit einem schwereren Verlauf der Sepsis verbunden¹⁵³. Die komplexe Verbindung von überschießender Gerinnungsantwort und erhöhtem Blutungsrisiko im Rahmen einer Verbrauchskoagulopathie erschwert die Antikoagulationstherapie in der Sepsis erheblich¹⁵⁴⁻¹⁵⁸.



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 6 Ablauf der Immunothrombose

Modifiziert nach Engelmann, B. & Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* ¹⁵¹

1.5 HIF-1 α

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α dient zur schnellen Anpassung des Organismus an hypoxische Bedingungen. HIF-1 α wird kontinuierlich synthetisiert, so dass bei Hypoxie nur ein verminderter Abbau erfolgen muss¹⁵⁹. Gleichzeitig spielt HIF-1 α eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Makrophagen und der T-Zell-Differenzierung. Dabei erfolgt eine frühzeitige Aktivierung bereits über LPS, bevor es zu einer Hypoxie kommen kann^{160,161}. Zudem ermöglicht HIF-1 α ein verlängertes Überleben der neutrophilen Granulozyten unter hypoxischen Bedingungen¹⁶².

2. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Mechanismen des Immunothrombose-Prozesses im Rahmen systemischer bakterieller Infektionen. Im Fokus stehen dabei die wechselseitige Beeinflussung von Koagulation und Immunzellrekrutierung und ihre Auswirkungen auf Bakterienüberleben, Entzündungsreaktion und Organschädigungen des Organismus. Dabei sollen die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Welche Rolle spielen die T-Helferzellen in der Immunothrombose?

Ein wichtiger Aspekt ist dabei der Einfluss der Fibrinbildung auf die Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen, sowie der Einfluss der T-Helferzellen auf die Koagulationsregulation.

2. Bildung und Funktion von T-Helfer-Zellclustern in der Mikrozirkulation

In einem weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, inwieweit es zur Aggregatsbildung von T-Helferzellen, s.g. Clustern, innerhalb der Blutgefäße kommt.

3. Welche Auswirkungen hat eine Gerinnungshemmung auf die Immunantwort?

Für diese Fragestellung soll mittels Faktor Xa Hemmung und einem Faktor XII-defizienten Mausmodell der Einfluss der Gerinnung auf Bakterienüberleben und Immunzellrekrutierung untersucht werden.

4. Welche Rolle spielt Faktor XII in der Immunzellrekrutierung und Ausbildung von Immunothrombosen?

5. Einfluss der Transkriptionsfaktoren Nr4a1 und Bhlhe40/Bhlhe41 auf die Immunzellrekrutierung und Gerinnungsaktivierung in der systemischen bakteriellen Infektion

Nr4a1 spielt eine entscheidende Rolle für die Bildung von nicht-klassischen Monozyten, während Bhlhe40/Bhlhe41 die Bildung von B1a-Zellen vermittelt. In Nr4a1^{-/-} und Bhlhe40^{-/-} /Bhlhe41^{-/-} Mausmodellen soll die Bedeutung der genannten Immunzellen für die Immunantwort auf systemische bakterielle Infektionen erfasst werden.

3. Material

3.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
96 well μ -Plate	Ibidi GmbH, München, D
Ausplattierspatel	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Bio-Plex Pro, Mouse Zytokin Standard 23-plex	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
Einmalspritzen 2ml, 5ml, 10ml, 20ml	Becton Dickson S.A., Franklin Lakes, USA
Glasperlen (\varnothing 4mm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Küvetten, PE	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Menzel Deckgläser	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Objektträger Superfrost Plus	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Petrischale PS leicht m. Nocken	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipetman® Diamond Spitzen D10, D200, D1000	Gilson Inc., Middleton, USA
Reagiergefäß 1,5ml Easy-Cap	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Zeba Spin Entsalzungssäule	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Zentrifugenröhrchen konisch, 15ml, 50ml	Corning Science México S.A. de C.V., Tamaulipas, Mexiko

3.2 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Primäre Antikörper

Antikörper	Konzentration	Spezies	Hersteller
CC3	5 μ g/ml	Hase	Cell Signaling
CD4 (Ultra-LEAF anti-mouse)	7 μ g/ml	Ratte	Biologend
CD4	1 μ g/ml	Ratte	Biorbyt
CD4 (APC-primär gelabelt)	2 μ g/ml	Ratte	Biologend
CD4 (α human, A488-primär gelabelt)	10 μ g/ml	Hase	Abcam

CD5	2,5µg/ml	Ratte	Invitrogen
CD19 (FITC-primär gelabelt)	2,5µg/ml	Ratte	SouthernBiotech
CD20	1,5µg/ml	Hase	Abcam
CD21/35	5µg/ml	Ratte	BioLegend
CD31 (PECAM-1)	0,52µg/ml	Hase	Abcam
CD41	10µg/ml	Ratte	Abcam
CD42b	6,6µg/ml	Hase	ProteinTech
CD208 (LAMP3)	10µg/ml	Hase	Invitrogen
CX3CR1	10µg/ml	Hase	Novus
Dapi (Nukleusfärbung)	1µg/ml	-	Sigma
Draq5 (Nukleusfärbung)	5µM	-	ThermoFisher
Faktor XII	1,25µg/ml	Ziege	Zytomed
F4/80	1,25µg/ml	Ratte	Biolegend
Fibrin	5µg/ml	Maus	WAK-Chemie
HIF-1α	8µg/ml	Hase	Novus
Ki67	15µg/ml	Hase	Abcam
Ly6C	0,5µg/ml	Ratte	ThermoFisher
Ly6G	4µg/ml	Ratte	ThermoFisher
PAI-1	8,5µg/ml	Hase	Abcam
RORγT	5µg/ml	Hase	Biorbyt
Stabilin-2	10µg/ml	Maus	Kai Schledzewski
T-bet	2µg/ml	Hase	Antibodies-online
uPA	5µg/ml	Hase	R&D Systems
uPAR	0,5µg/ml	Hase	Proteintech

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Konjugation	Spezies	Hersteller
Alexa Fluor anti-Goat	A488, A594	Affe	Life Technologies
Alexa-Fluor Anti-Mouse	A559, A594	Ziege	Life Technologies

Alexa-Fluor Anti-Mouse	A488	Affe	Life Technologies
Alexa-Fluor Anti-Rat	A488, A594	Ziege	Life Technologies
Alexa-Fluor Anti-Rab	A488, A546, A594	Ziege	Life Technologies

3.3 Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklave	Integra Biosciences, Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald, D
Balance MC1 LC 620 S	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.KG, Göttingen, D
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, D
Bio-plex Pro II Waschstation	BioRad Laboratories Inc, Hercules, USA
Bio-plex 200 Reader	BioRad Laboratories Inc, Hercules, USA
Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg, D
Cryostat CM1950	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, D
Gefrierschrank -20 °C Liebherr Profi-line	Liebherr-International Deutschland GmbH, Bieberach an der Riß, D
Gefrierschrank -80 °C HERA freeze	Kendro laboratory Products, Hanau, D
Kühlschrank 4 °C Liebherr Profi-line	Liebherr-International Deutschland GmbH, Bieberach an der Riß, D
Hettich Mikro 22R centrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
Hettich Rotina 35R centrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
Hettich Universal 32 centrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
IKA MAG® RCT magnetic stirrer	IKA-Labortechnik, Staufen, Germany
IKA MS3 Digital Schüttler	IKA-Labortechnik, Staufen, Germany
Invertiertes SP8X WLL Konfokales Mikroskop	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, D
KS 250 basic shaker	IKA-Labortechnik, Staufen, Germany
LA 214i Waage	VWR International GmbH, Darmstadt, D

LSM 510 Meta	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
Micropipetten (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, D
MSC-Advantage Type 1.2 Arbeitsbank	Thermo Scientific, Braunschweig, D
pH-Meter HI 221	HANNA instruments HI 221
Thrombelastograph	RoTEG Dynabyte
Unihood 650 Abzug	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg, D
Vortex Genie	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge 3200	Eppendorf, Hamburg, D

3.4 Puffer

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Medien

LB-Medium	10g Bacto-Trypton 5g Hefeextrakt 5g NaCl In 1l destilliertem Wasser pH 7,5
LB-Platten	250ml LB-Medium 4g Bacto-Agar 100µg/ml Ampicillin
Saponin-Lösung	0,2% Fisch Haut Gelatine 0,5% BSA 0,1% Saponin In PBS
PBS	8g NaCl 0,24g KH ₂ PO ₄ 1,42g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 0,2g KCl In 1l destilliertem Wasser auflösen, pH 7,4
Blocklösung	1,5% BSA 0,1% TritonX In PBS
MACS Puffer	2mM EDTA 0,5% BSA In PBS
RBC Lyse Puffer	82,6g NH ₄ Cl 11,9g NaHCO ₃

	2ml 0,5M EDTA In 1l destilliertem Wasser auflösen, pH 7,3
Tris-EDTA Puffer	10mM Tris 1mM EDTA 0.05% Tween 20 In destilliertem Wasser, pH 9.0

3.5 Chemikalien

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DAKO Pen	Dako, Glostrup, DK
Desirudin	Inresa
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
EDTA	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, D
Glycerin	Calbiochem, Darmstadt, D
Gly-Pro-Arg-Pro	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Gly-His-Arg-Pro	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, D Delta
Isofluran Delta Select	Select GmbH, Deieich, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, D
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O)	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, D
NH ₄ Cl	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, D
Rivaroxaban	Santa Cruz
Saccharose	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, D
Tissue Tek	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Triton X	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypsin/EDTA	Hartenstein, Würzburg, D

4. Methoden

4.1 Bakterien

Bei den verwendeten Bakterien handelt es sich um Ampicillin-resistente, GFP-gelabelte *E.Coli* des Stammes BL-21. Diese werden für 10 Stunden bei 37°C in einem Schüttelinkubator in LB-Medium inkubiert. Durch Zugabe von Ampicillin in das Medium wird eine Kontamination vermieden. Anschließend wird das Medium bei 1000g für 10min zentrifugiert, um ein Bakterienpellet zu erhalten, welches danach in PBS resuspendiert wird. Zur Erhöhung der Reinheit wird dieser Schritt zweimalig wiederholt. Zur Bestimmung der Anzahl der Bakterien in der Lösung wird die OD600 bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine Dichtemessung durch Messung der Absorption in einem Spektrophotometer. Daraus kann die Anzahl der enthaltenen Bakterien berechnet werden. Anschließend wird die gewünschte Bakterienzahl entnommen und in 100µl PBS verdünnt.

4.2 Tierversuche

Zur Untersuchung des Ablaufs der Immunothrombose wurden verschiedene Tiermodelle genutzt. Wildtyp-Mäuse *C57BL/6J* wurden von Charles River bezogen. Das Alter der Tiere lag bei Versuchsbeginn bei 8 – 14 Wochen. Die Tiere wurden nach gesetzlichen Vorschriften artgerecht in der Versuchstiereinrichtung des Walter-Brendel-Zentrums, in der Zentralen Versuchstierhaltung des Klinikums der Universität oder in der Versuchstierhaltung der Psychiatrischen Klinik der Universität München gehalten. Die Tierhaltung erfolgte unter spezifisch-pathogenfreien Konditionen in Käfigen mit 2 bis 4 Tieren. Das Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen ROB-55.2-2532.Vet_02-15-42, ROB-55-2-2532.Vet_02-20-133).

Tabelle 7: verwendete Tiermodelle

Tiermodell	Besonderheit
<i>C57BL/6J</i>	Wildtyp
<i>IL23R^{-/-}</i>	Defizienz der IL23R positiven Zellen
<i>f12^{-/-}</i>	Defizienz von Faktor XII
<i>Bhlhe40^{-/-} Bhlhe41^{-/-}</i>	Defizienz der B1a-Zellen
<i>Nr4a1^{-/-}</i>	Defizienz der nicht-klassischen Monozyten
<i>IL17A^{-/-}</i>	IL17A-Defizienz
<i>Plg^{-/-}</i>	Plasminogen-Defizienz

4.2.1 Vorbehandlung der Tiere

Depletion der CD4⁺ T-Helferzellen

Zur Untersuchung des Einflusses der T-Helferzellen im beschriebenen Infektionsmodell erfolgt eine Depletion mittels 500µg αCD4-Antikörper (GK1.5, Biolegend). Dieser wurde 24 Std. vor Induktion einer Infektion in die Peritonealhöhle appliziert. Anschließend erfolgte die Infektion mit *E.Coli* durch Einbringen in die Schwanzvene. Der Kontrollgruppe wurde eine identische Menge Isotyp-IgG-Antikörper (Rat IgG2b, κ, Biolegend) in die Schwanzvene injiziert.

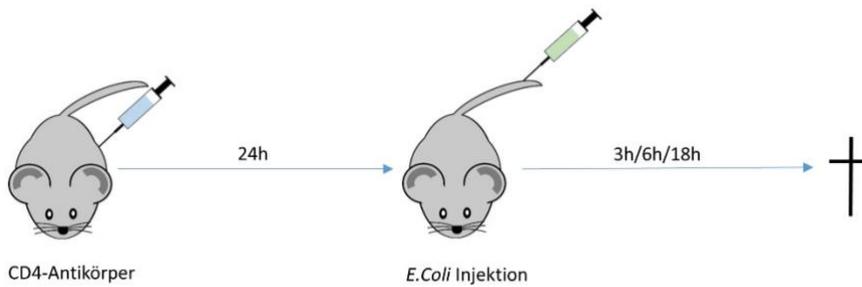


Abbildung 7: Injektionsschema der Behandlung mit anti-CD4 Antikörper vor Beginn der Infektion

Faktor Xa Hemmung

Zur Hemmung des Gerinnungsfaktor Xa wurden die Tiere mit Rivaroxaban (366789-02-8, Santa Cruz) behandelt. Dieses wurde zuvor in DMSO gelöst und anschließend in einer Menge von 3mg/kg Körpergewicht in einem Volumen von 100µl PBS in die Maus 4 Std. vor Induktion der Infektion mit *E.Coli* in die Schwanzvene der Maus injiziert. Der Kontrollgruppe wurden 100µl in PBS gelöstem DMSO injiziert.

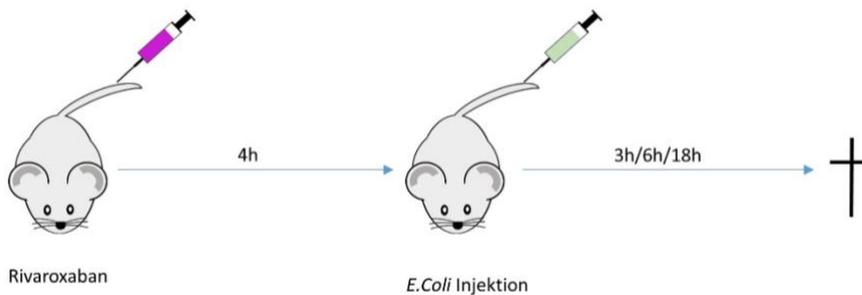


Abbildung 8: Injektionsschema der Faktor Xa Hemmung mit Rivaroxaban vor Beginn der Infektion

Hemmung der NETs

Zur Hemmung der Bildung der NETs wurden die Tiere mit Desoxyribonuklease1 (DNase1, AMP-D1, Sigma) vorbehandelt. Dafür wurden 100U DNase1 in 100 μ l PBS gelöst und 4 Std. vor der *E.Coli* Injektion in die Schwanzvene injiziert. Der Kontrollgruppe wurde eine identische Menge PBS injiziert.

Depletion der Thrombozyten

Thrombozyten wurden mittels anti-GPIIb α -Antikörper (2mg/kg KG; #300, Emfret Analytics) in den Mäusen depletiert. Die Injektion erfolgt 24 Std. vor Induktion einer Infektion mit *E.Coli* in die Schwanzvene der Tiere.

Neutralisierung verschiedener Proteine

Für die Neutralisation von PAI-1 und TAFI wurden 5mg/kg KG eines α PAI-1-Antikörper (MA-33H1F7) bzw. α TAFI-Antikörper (MA-RT36A3F5, beide zur Verfügung gestellt von Paul Declerck) 5 min vor Infektion in die Schwanzvene der Tiere injiziert. In allen Fällen wurde ein passender IgG-Antikörper zu gleichen Bedingungen injiziert.

4.2.2 Isolation und Injektion muriner Zellen

CD4⁺ Lymphozyten wurden aus der Milz nicht-infizierter Tiere isoliert. Hierfür wurde die Milz nach Entnahme zunächst durch ein Mikrosieb (70 μ m) gepresst und anschließend in MACS Puffer homogenisiert und mittels Zentrifugation pelletiert (450g, 5 Min., RT). Anschließend erfolgte die Re-Suspension und Inkubation des Zellpellets in RBC Lyse Puffer für 5 Min., gefolgt von 3 Waschschritten mittels Zentrifugation und MACS Puffer, bevor die Zellen erneut zu einem Pellet zentrifugiert (450g, 5 Min., RT) und durch ein Mikrosieb (70 μ m) zur Entfernung von Zellaggregaten gespült werden. Zur Zellseparation wurden die Zellen erneut in MACS Puffer re-suspendiert und mittels magnetischer Zellseparation CD4⁺ T-Zellen isoliert (CD4⁺ T Zell Isolierungs-Kit, 130-104-454, Milteny Biotec). Hierzu erfolgt die Inkubation mit Biotin-konjugierten Antikörpern gegen CD8a, CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, Anti-MHC-Klasse II, Ter-119 und TCR γ / δ . Anschließend erfolgt die Zugabe magnetischer anti-Biotin Microbeads zur Separation der gelabelten nicht-CD4-positiven Zellen in einer MACS Säule. Anschließend erfolgte die Injektion der Zellen in PBS-gelöst in die Schwanzvene der Maus 5 Min. vor Infektion mit *E.Coli*.

Nicht-klassische Monozyten wurden aus dem Knochenmark und Milz der Tiere isoliert. Die Knochen wurden entnommen und von Weichgewebe gereinigt. Anschließend wird das Knochenmark mit PBS und FPS ausgespült und anschließend durch ein Mikrosieb (40 μ m) gespült.

Es erfolgt die Zentrifugation (400g, 7 Min., 4°C) und Zugabe von RBC Lyse Puffer. Nach erneutem Waschen und Zentrifugation erfolgt die Separation nach CD115b mittels MACS Isolierung (Millteny Biotec). Anschließend werden die Zellen mit α CX3CR1- und α Ly6C-Antikörper für 20min bei 4°C inkubiert und mittels FACS Sorting nach einzelnen, lebenden CX3CR1⁺ Ly6C^{-/low} Zellen sortiert.

4.2.3 Durchführung der Tierversuche

Injektionen

Die Injektionen erfolgten bei den Mäusen in die Schwanzvene. Dafür wurde die Maus in eine Haltevorrichtung gesetzt und darin fixiert. Anschließend wurden Bakterien, Antikörper, Zellen oder Medikamente in 50-100 μ l PBS gelöst in die *V. cocczygea lateralis* injiziert. Nach Injektion erfolgte die Markierung der Tiere, bevor sie zurück in den Käfig gebracht wurden.

Euthanasie und Organentnahme

Die Euthanasie wurde 1, 3, 6 oder 18 Std. nach Injektion von *E. Coli* durchgeführt. Nach erfolgreicher Anästhesie mittels Isofluran oder CO₂ erfolgte die Blutentnahme kardial aus dem zuvor freigelegten Herzbeutel und anschließende Tötung mittels zervikaler Dislokation. Leber, Niere, Milz, Lunge, Herz und Gehirn wurden entnommen und sofort gekühlt gelagert. Die Organe wurden zunächst 2 Std. in 4% PFA fixiert, danach 24 Std. bei 4°C in 30% Saccharose Lösung, bevor sie bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden konnten.

4.2.3 Bestimmung der CFUs

Zur Bestimmung der Anzahl der lebenden Bakterien in den entnommenen Organen wurden die Kolonie bildenden Einheiten (CFUs) bestimmt. Hierfür wurde jeweils ein Teil des betreffenden Organs entnommen und gewogen. Das Organstück wurden mit Hilfe eines Skalpell zerkleinert und in PBS gelöst. Die Suspension wurde anschließend in ein Reagenzgefäß mit 10 Glaskugeln gegeben und für mindestens 5 Min. auf einem Vortex Gerät geschüttelt. Von der entstandenen homogenen Mischung wurden Verdünnungen von 1:10¹ – 1:10⁴ erstellt. Die gewonnenen Verdünnungen wurden auf Agar Platten aufgetragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von Ampicillin in die Agar Platten wurde eine Kontamination vermieden. Am nächsten Morgen wurden die CFUs gezählt werden und als CFUs/g für die jeweiligen Organe angegeben.

4.3 Blutentnahme bei gesunden Probanden

Die Blutabnahme fand bei gesunden, freiwilligen Probanden im Alter zwischen 20 und 40 Jahren statt. Die Probanden nahmen keine gerinnungshemmenden Medikamente (z.B. Phenprocoumon, Heparin, ASS) in den 14 Tagen vor Blutentnahme ein. Das Blut wurde nach Hautdesinfektion mit einer Butterfly-Nadel in der Ellenbeuge entnommen und mit TNC (12,5mM) 1:10 und Hirudin

(2µg/ml) versetzt, um die Gerinnung zu verhindern. Das Blut wurde anschließend auf Eis gekühlt gelagert und sofort weiterverarbeitet.

4.4 Gewinnung von plättchenarmen Plasma

Zur weiteren Analyse der humanen und murinen Blutproben wurde Plättchen-armes Plasma (PPP) genutzt. Dafür wurden die gewonnenen Blutproben für 15 Min. bei 260g ohne Bremse zentrifugiert. Das dabei entstehende Plättchen-reiche Plasma wurde in ein neues Reagenzglas pipettiert und für 20 Min bei 2500g ohne Bremse zentrifugiert. Das PPP wurde nach diesem Schritt abpipettiert und erneut für 20min bei gleichen Einstellungen zentrifugiert, um die Reinheit zu erhöhen.

4.5 Analyse der Blutproben

In den gewonnenen Plasmaproben wurde anschließend mittels Multiplex Assay die Zytokin-Konzentrationen bestimmt. Dafür wurden die Proben zunächst im Verhältnis 1:4 mit dem Probenverdünnungsmittel versetzt. Die Plasmaproben und Proben der Standardkurven wurden in die mit Beads vorbereitete 96-well Platte gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurden nach 3x Waschen die Antikörper zur Detektion zu den Proben gegeben und erneut für 30 Min. inkubiert (Abb. 9). Es folgte ein weiterer Waschschriff und anschließend die Zugabe von Streptavidin-PE als Farbstoff. Anschließend wurde die Zytokin-spezifische Fluoreszenz gemessen und daraus die Zytokinkonzentration ermittelt.

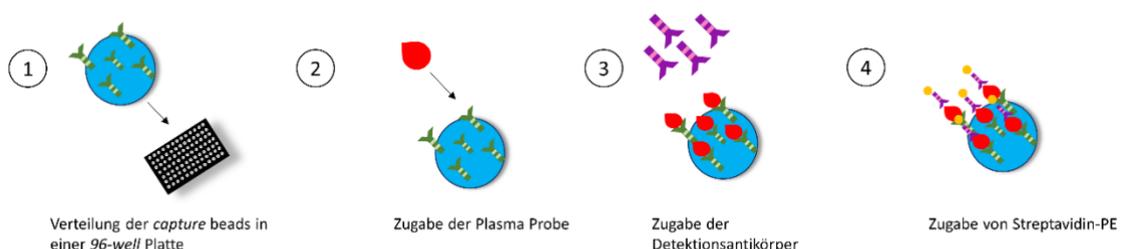


Abbildung 9: Funktionsweise des Multiplex Assay

Inkubation der Plasmaproben mit den Beads (1+2), anschließend Zugabe der Antikörper (3) und Fluoreszenzfarbstoffe (4) zur anschließenden Bestimmung der Zytokin-Konzentration

Des Weiteren wurden mittels laborchemischer Untersuchungen spezifische Parameter zur Bestimmung der Organschädigung bestimmt. GOT, GPT, Cholinesterase und GLDH dienten als Marker für eine Leberschädigung, Harnstoff zur Bestimmung der Nierenfunktion, sowie Laktat als Marker des anaeroben Stoffwechsels unter Sauerstoffmangel.

4.6 Immunhistochemie

Anfertigung der Organschnitte

Für die Mikroskopie der Gewebe wurden mit Hilfe eines Cryotoms Schnitte von 10µm Dicke angefertigt. Dazu wurden die gefrorenen Organe in Tissue-Tek Medium eingebettet und nach Aushärtung des Mediums bei -20°C im vorgekühlten Cryotom geschnitten. Die angefertigten Schnitte wurden auf Objektträgern aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Immunhistochemie

Die Gewebeschnitte wurden zunächst mit 4% PFA 10 Min. fixiert und anschließend mit BSA-Lösung 1,5% für 35 Min. oder 10% Ziegen Serum für 1 Std. geblockt. Zur Darstellung intrazellulärer Marker wurde 0,1% TritonX zur Permeabilisierung genutzt. Zwischen jedem Schritt wurde das Gewebe dreimalig mit PBS für jeweils 3 min gewaschen.

Humane Proben wurden zunächst mittels Xylene und Ethanol entparaffiniert und anschließend mittels Hitze-induzierter Antigen-Freilegung (Tris-EDTA Puffer) im Dampfkochtopf für die Immunhistochemie vorbereitet.

Zunächst wurde der gewünschte primäre Antikörper aufgetragen und über Nacht bei 4°C im Färbekasten inkubiert. Im nächsten Schritt wurde ein sekundärer Antikörper aufgetragen, welcher mit einem Fluorophor gekoppelt war. Der markierte sekundäre Antikörper bindet an den primären Antikörper und ermöglicht dadurch eine Detektion in der Fluoreszenzmikroskopie. Die Inkubationszeit betrug im Allgemeinen 60 Min.

Bei Verwendung eines primären Antikörpers der Spezies Maus wurde zudem eine Kontrolle mit dem sekundären Antikörper allein durchgeführt, um eine unspezifische Bindung an das Gewebe auszuschließen.

Zur Färbung der Nuklei wurde Draq5 genutzt, welches entweder für 60 Min. gemeinsam mit dem sekundären Antikörper oder allein für 30 Minuten auf das Gewebe aufgebracht wurde. Alternativ wurde DAPI als Nukleusfärbung eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug hierbei 2 Min. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 3 Min. wird ein Tropfen Glycerol auf die Gewebeschnitte gegeben und diese mit einem Deckplättchen abgedeckt.

Fluoreszenzmikroskopie

Anschließend wurden die angefärbten Schnitte mittels Fluoreszenzmikroskopie betrachtet. Grundlage dafür ist die Fähigkeit fluoreszenter Stoffe (Fluorochrome) Licht einer spezifischen

Wellenlänge zu absorbieren und anschließend Licht zu emittieren. Zur Filterung des Lichts einer bestimmten Wellenlänge wird ein dichroitischer Spiegel eingesetzt. Dieser reflektiert nur Licht mit einer größeren Wellenlänge als die eigene kritische Wellenlänge. Das einfallende Licht führt zu einer Anregung der Valenzelektronen, die dadurch auf das nächsthöhere Energieniveau angehoben werden. Beim Rückfall auf ihr ursprüngliches Energieniveau wird die aufgenommene Energie wieder freigesetzt und als Emissionslicht abgegeben. Die Veränderung der Wellenlänge kommt durch Energieumwandlung in weitere Energieformen zustande. Das Emissionslicht kann den Spiegel passieren, da es unterhalb der kritischen Wellenlänge liegt, und fällt auf einen Detektor und kann anschließend vom Betrachter wahrgenommen werden.

Konfokale Laserscanmikroskopie

Bei der konfokalen Laserscanmikroskopie handelt es sich um ein spezielles Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie. Hierfür wird das Objekt mit Hilfe eines Lasers abgetastet und das Bild anschließend am Computer rekonstruiert. Durch das *Pinhole* kann dabei die Betrachtungsebene des Objekts eingegrenzt werden, da umgebende Fluoreszenz ausgeblendet wird. In unserem Fall wurden ein Argonlaser für niedrigere Wellenlängen (458, 477, 488, 514 nm; 30 mW) und 3 verschiedene HeNe-Laser für höhere Wellenlängen (543 nm, 1 mW; 594 nm, 2 mW; 633 nm, 5 mW) oder ein Weißlichtlaser (470-670nm) sowie ein LED 405nm Laser genutzt.

4.7 Auswertung

Zur quantitativen Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen wurde die Software ZEN der Firma Zeiss oder LAS X (Leica) verwendet. Alle Aufnahmen wurden verblindet ausgewertet.

Die Immunzellzahl wurde mit den in Tab. 8 aufgeführten Antikörpern jeweils pro Gesichtsfeld bestimmt. Ein Gesichtsfeld ist dabei durch die Größe $142,7\mu\text{m} \times 142,7\mu\text{m}$ definiert. Da in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf der Immunantwort in der Mikrozirkulation liegt, wurden für die Auswertung nur Immunzellen in Gefäßen $\leq 30\mu\text{m}$ Durchmesser gezählt. Die Auswertung erfolgte in mindestens 5-10 Gesichtsfeldern. Neben der Anzahl der Immunzellen wurde die Assoziation mit Fibrin, Faktor XII oder die Expression von Proteinen und Rezeptoren auf der Oberfläche der Zelle analysiert. Eine Überlagerung der beiden Signale in der Auswertung wurde als Kolokalisation definiert. Ein weiterer Fokus lag auf der Kolokalisation der Immunzellen untereinander. In dieser Immunzellcluster werden definiert als mindestens 2 Immunzellen in einem Gefäß der Mikrozirkulation (Durchmesser $\leq 30\mu\text{m}$) und mit einem Abstand von $\leq 2\mu\text{m}$ aufweisen. Für die Assoziation mit Fibrin und Proteinen galten dabei die gleichen Regeln wie bereits oben beschrieben.

Zur Unterscheidung zwischen intra- und extravasalen Zellen wurde das Endothel der Gefäße angefärbt. Dafür wurde Stabilin-2 als leberspezifischer Endothelzellmarker der Lebersinusoiden genutzt. Zur Darstellung der größeren Gefäße sowie der Gefäße der Lunge wurde PECAM-1 (CD31) genutzt (Abb.10).

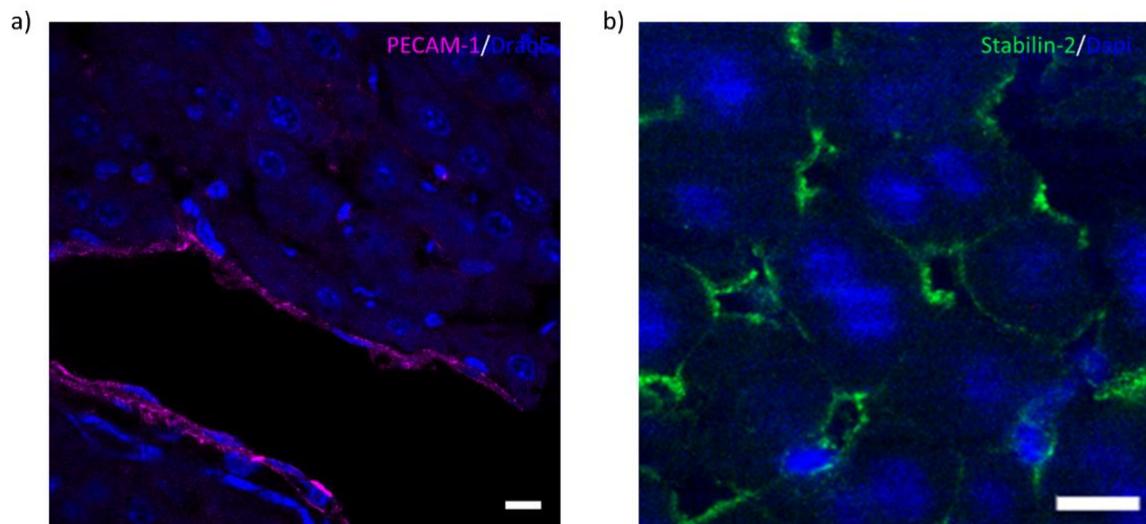


Abbildung 10: Gefäßfärbung mittels PECAM-1 und Stabilin-2 in der Leber

Wildtypmaus, 18h nach Infektion a) PECAM-1(CD31) (pink), Draq5 (blau); b) Stabilin-2 (grün) DAPI (blau); Maßstab 10µm.

Bei der Auswertung der Fibrinbildung wurde die Fibrin-bedeckte intravasale Fläche im Verhältnis zur gesamten Querschnittsfläche der Gefäße in % angegeben. Dafür werden ebenfalls nur Gefäße der Mikrozirkulation mit einem Durchmesser $\leq 30\mu\text{m}$ betrachtet. In einigen Fällen wurde die Fibrinbildung als Absolutwert der bedeckten Fläche angegeben. Sie bezieht sich dabei erneut auf ein Gesichtsfeld der Größe $142,7\mu\text{m} \times 142,7\mu\text{m}$. Die Messung der Fibrinbildung wurde in mindestens 5 Gesichtsfeldern je Versuchstier durchgeführt. Parallel dazu wurde die Okklusion der Gefäße bestimmt. Als Gefäßokklusion wurde definiert, wenn $\geq 90\%$ der Querschnittsfläche mit Fibrin alleine oder Fibrin plus Zellen ausgefüllt war (Abb.11). Bei einem Verschluss des Gefäßes von $\geq 60\%$ wurde von einer Mikrothrombose ausgegangen.

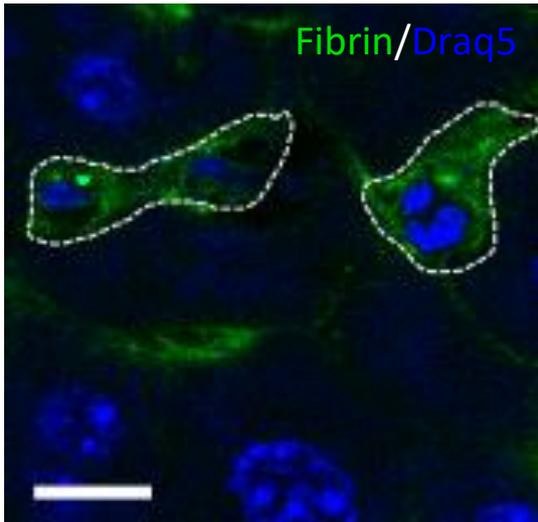


Abbildung 11: Gefäßokklusion und Mikrothrombose mit Fibrin und Nucleus

Gefäß der Mikrozirkulation der Leber (weiß umrandet), ausgefüllt mit Fibrin und einem Nucleus, 6 Std. nach Infektion in einer *Nr4a1*^{-/-} Maus, Maßstab 10µm

Die Bakterienzahl wurde in der Fluoreszenzmikroskopie ermittelt und pro Gesichtsfeld angegeben. Es wurden alle GFP⁺ Bakterien gezählt. Dabei ist keine Differenzierung zwischen lebenden und toten Bakterien möglich. Die Auszählung fand in mindestens 20 Gesichtsfeldern statt.

Tabelle 8: Spezifische Antikörper zur Detektion von Immunzellen mittels Immunhistochemie

Immunzelle	Antikörper I	Antikörper II
Th1	CD4	Tbet
Th17	CD4	RORγt
Kupffer-Zelle	F4/80	Stabillin-2
Nicht-klassischer Monozyt (ncM)	CX3CR1	Ly6C negativ
Klassischer Monozyt (cM)	Ly6C	Ly6G negativ
Neutrophiler Granulozyt	Ly6G	-
B-Zelle	CD19	-
B1a-Zelle	CD19	CD5

4.8 In Vitro Experimente

Zur Darstellung der Effekte der Fibrinbildung auf das Überleben von Bakterien wurden neben den beschriebenen *in vivo* Experimenten auch *in vitro* Versuche durchgeführt.

4.8.1 Wirkung von Fibrinogenspaltprodukten auf das Bakterienüberleben

Zur Untersuchung der Wirkung von Fibrinogenspaltprodukten auf das Bakteriensterben wurde ein Thrombus *in vitro* generiert. Hierfür wurden die beiden Peptide GPRP und GHRP einzeln sowie in Kombination mit Thrombin, Fibrinogen und Calcium zu den in PBS gelösten *E.Coli* Bakterien

gegeben. Anschließend wurden alle Ansätze für 90 Min. bei 37 Grad Celsius inkubiert. Zur Bestimmung der Zahl der noch lebenden Bakterien wurde nach Ablauf der Inkubationszeit der Ansatz durchmischt und eine Verdünnungsreihe von 1:10¹ bis 1:10⁹ erstellt. Von den gewünschten Verdünnungen werden jeweils 100 µl auf eine Agar-Platte gegeben und ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht für mindestens 18 Std. konnten die CFUs auf den Platten ausgezählt werden. Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge Bakterien in PBS gelöst, für 90min inkubiert, verdünnt und ebenfalls ausplattiert.

4.8.2 Effekte der Peptide GPRP und GHRP auf die Fibrinbildung

Um die Wirkung der Peptide GPRP und GHRP auf die Fibrinstruktur zu untersuchen, wurden der unter 4.8.1 beschriebene Versuchsaufbau mit gefärbtem Fibrinogen durchgeführt und unter dem konfokalen Mikroskop betrachtet.

Zur optischen Darstellung von Fibrinpolymeren wurde Fibrinogen zunächst markiert. Dafür wurde humanes Fibrinogen in der Konzentration 1 mg/ml in einer 0,9% NaCl-Lösung gelöst und bei Raumtemperatur für 30 Min. inkubiert. Anschließend wurde 3,5 µg/ml Fluorophor-Farbstoff Alexa-594 hinzugegeben und die Lösung über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Mit Hilfe einer zuvor gespülten Zeba Zentrifugations-Säule wurde der konjugierte Farbstoff von unkonjugiertem überschüssigen Farbstoff getrennt

4.8.3 Rotationstromboelastometrie

Die Rotationsthromboelastometrie ermöglicht die Untersuchung der Thrombusbildung und -stabilität im Vollblut unter geringem Scherstress¹⁶³. Das Blut wurde frisch entnommen und mit Citrat versetzt, um die Gerinnungsaktivierung zu verhindern. Anschließend wurde das gewünschte Reagenz oder PBS als Kontrolle dazu gegeben und das Probengefäß auf einen Stempel gesetzt. Zur Aktivierung der Gerinnung wurde Calcium (20mM) zugesetzt. Nach dem Start der Messung beginnt sich der Stempel zu drehen (Abb. 12). Damit kann die Zeit bis zur Entstehung eines Koagels (*Clotting time*, CT) gemessen werden. Dieser Wert entspricht dabei dem Start der Fibrinbildung. Als weiterer Parameter kann ebenfalls die Zeit zur vollständigen Bildung eines Koagels bestimmt werden. Dafür wird die Zeit ab Beginn der Thrombenbildung bis zum Erreichen einer Festigkeit von 20mm gemessen (*Clot formation time*, CFT).

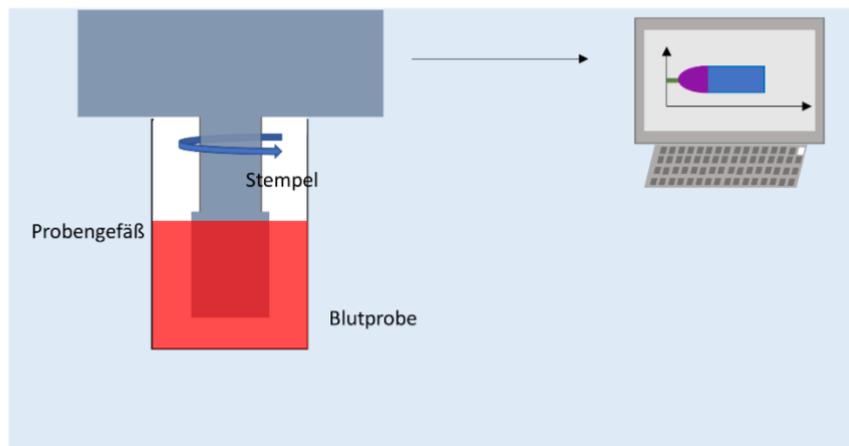


Abbildung 12: Aufbau und Funktion der Thrombelastometrie

Aktivierung der Thrombusbildung durch Zugabe von CaCl und anschließende Messung der Festigkeit des Gerinnsels durch Rotation eines Stempels im Probengefäß.

4.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Messergebnisse wurde mit GraphPad Prism 9 durchgeführt. Alle Werte sind, soweit nicht anders bezeichnet als Mittelwert \pm S.E.M. angegeben. Bei den eingesetzten statistischen Testverfahren handelt es sich um einen unpaired Student's t-Test bei 2 unabhängigen Vergleichsgruppen, bzw. um das ANOVA Testverfahren mit anschließendem post-hoc Test bei mehreren Vergleichsgruppen. Von einer Signifikanz wurde bei p-Werten $<0,05$ ausgegangen. Für die angegebenen p-Werte gilt: *p < 0.05 , **p < 0.01 , ***p < 0.001 , ****p < 0.0001 . Bei allen angegebenen n-Werten handelt es sich soweit nicht anders angegeben um biologische Replikate.

5. Ergebnisse

5.1 Charakterisierung von Immunzell-Assoziationen mit Mikrothrombosen

Um einen Überblick über die Rolle der Immunzellen in der Immunothrombose zu erhalten, wurde die Zusammensetzung von Mikrothrombosen 3 Std. nach Infektion mit *E.Coli* in der Mikrozirkulation der Leber untersucht. Demnach sind an ca. 75% aller Mikrothrombosen intravaskuläre Immunzellen beteiligt. Eine Charakterisierung der Immunzellen innerhalb der Mikrothrombosen ergab, dass CD4⁺ T-Zellen den größten Anteil bilden, neben klassischen Monozyten (Ly6C⁺ Ly6G⁻) und Neutrophilen (Ly6G⁺) (Abb. 13).

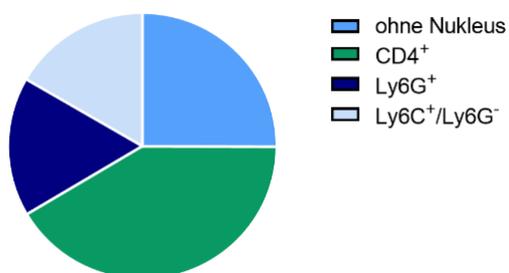


Abbildung 13 Assoziation von DAPI⁺ Zellen mit intravaskulärem Fibrin in der Mikrozirkulation der Leber

Anteil der verschiedenen Immunzellen an der Gesamtheit der Zellen in Mikrothrombosen, Die Punkte geben die Mittelwerte aus min. 5 Gesichtsfeldern (VF) in unterschiedlichen Mäusen an, Angabe als Anteil der Gesamtheit der Mikrothrombosen in 3 unterschiedlichen Mäusen.

5.2 Regulation der Fibrinolyse durch T-Helferzellen

Um die Beteiligung der T-Helferzellen an der akuten bakteriellen Infektion zu charakterisieren, wurde zunächst die Rekrutierung dieser Zellen in der Mikrozirkulation der Leber in mit *E.Coli* infizierten Wildtyp-Mäusen betrachtet (Abb. 14). Die Rekrutierung der CD4⁺ T-Zellen war bereits 1 Std. nach Infektion nachweisbar. Nach 3, 6 und 18 Std. stieg die Zahl der immobilisierten T-Helferzellen weiter an. Dabei handelte es sich zum größten Teil um RORγt⁺ Th17-Zellen (Abb.14).

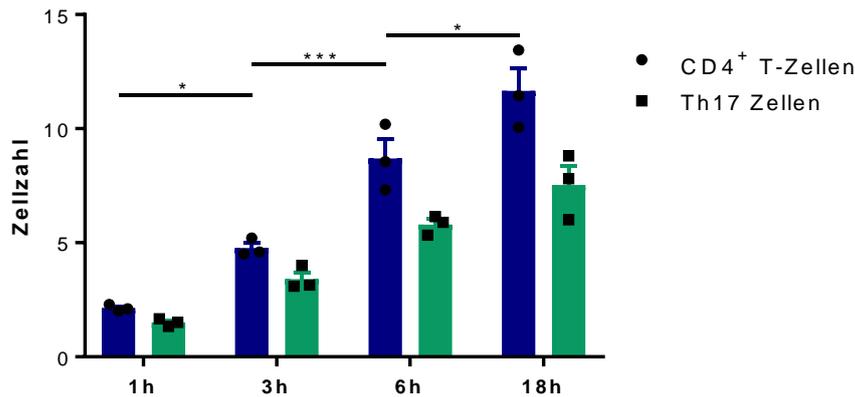


Abbildung 14 Rekrutierung der T-Helferzellen in die Mikrozirkulation der Leber während der systemischen bakteriellen Infektion

Anzahl der CD4⁺ T-Helferzellen und der CD4⁺ RORγt⁺ Th17-Zellen in der Mikrozirkulation der Leber. Bestimmung mittels Immunhistochemie, Angaben als Zellzahl pro Gesichtsfeld (VF) 1, 3, 6 und 18 Std. nach Infektion mit *E.Coli*. Die Punkte geben den Mittelwert aus je 10 VF in 3 unterschiedlichen untersuchten Mäusen je Gruppe und Zeitpunkt an. Angabe als Mittelwert ± S.E.M., * p<0,05 *** p<0,001.

Um einen möglichen Einfluss der CD4⁺ T-Zellen auf die Koagulation zu untersuchen, wurde die Assoziation der Zellen mit verschiedenen koagulationsregulierenden Proteinen bestimmt. Es bestand eine deutliche Kolo-kalisation der T-Helferzellen mit uPA und PAI-1, sowie in geringerem Rahmen mit uPAR (Abb. 15).

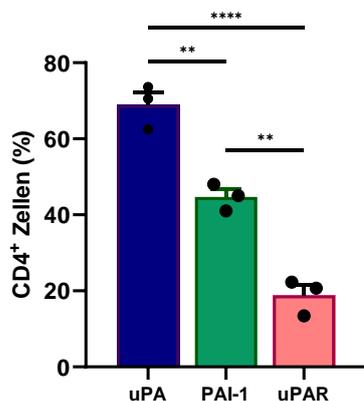


Abbildung 15 Assoziation der T-Helferzellen mit Koagulation-regulierenden Proteinen

Immunhistochemische Bestimmung der Kolo-kalisation der Koagulationsproteine mit CD4⁺ T-Zellen in der Mikrozirkulation der Leber 3 Std. nach Infektion mit *E.Coli*. Die Punkte geben den Mittelwert aus je 10 VF in unterschiedlichen Mäusen an. Angabe als Mittelwert ± S.E.M., ** p<0,01 **** p<0,0001

Neben dem Mausmodell der bakteriellen Infektion, wurde die Beteiligung der CD4⁺ T-Zellen in humanen arteriosklerotischen Thromben untersucht. Es konnten ebenfalls T-Helferzellen in den Thromben detektiert werden (Abb. 16a,d). Diese waren in großer Zahl mit uPAR assoziiert (Abb. 16b), sowie in geringerem Maße auch mit Plasminogen (Abb. 16c).

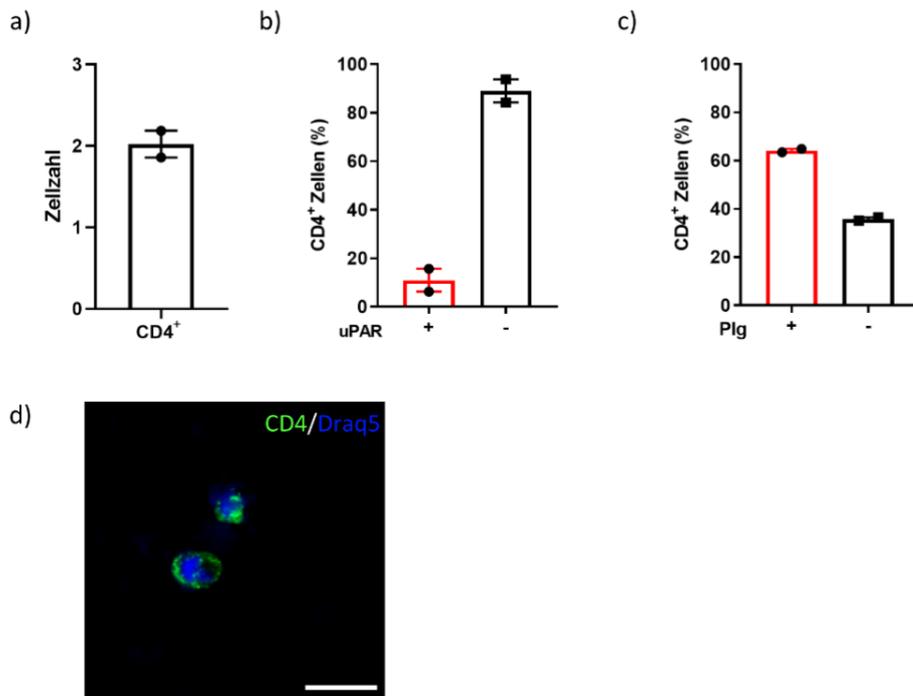


Abbildung 16 CD4⁺ T-Zellen in arteriosklerotischen Thromben

Anzahl der CD4⁺ T-Zellen in humanen arteriosklerotischen Thromben (a) sowie ihre Assoziation mit uPAR (b) und Plg (c). d) CD4⁺ T-Zellen in einem Thrombus, Maßstab 10 μm Die Punkte geben den Mittelwert aus 10 Gesichtsfeldern in verschiedenen Thromben an. Angabe als Mittelwert ± S.E.M.

5.2.1 Depletion der T-Helfer durch αCD4-Antikörper-Injektion

Im folgenden Experiment wurden CD4⁺ T-Helferzellen mittels intraperitonealer αCD4-Antikörper-Injektion in den Tieren depletiert. 24 Std. später wurde *E.Coli* injiziert. Die Kontrolltiere wurden jeweils mit der identischen Menge eines IgG-Isotyp-Antikörpers behandelt.

1 Std. nach Infektion war die Fibrinbildung in der Mikrozirkulation der Leber nach T-Helferzell-Depletion deutlich erhöht (Abb. 17a). Gleichzeitig nahm der Anteil der Gefäße mit Mikrothrombosen und Gefäßokklusionen zu (Abb. 17b,c). Dabei wurde eine Bedeckung der Querschnittsfläche durch Fibrin und intravasale Zellkerne von ≥60% als Mikrothrombose bezeichnet. Ein Gefäßverschluss von ≥90% der Querschnittsfläche wurde als Okklusion definiert.

Zu diesem Zeitpunkt konnte speziell eine Zunahme der allein durch Fibrin okkludierten und thrombosierten Gefäße festgestellt werden (Abb. 17d,e) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

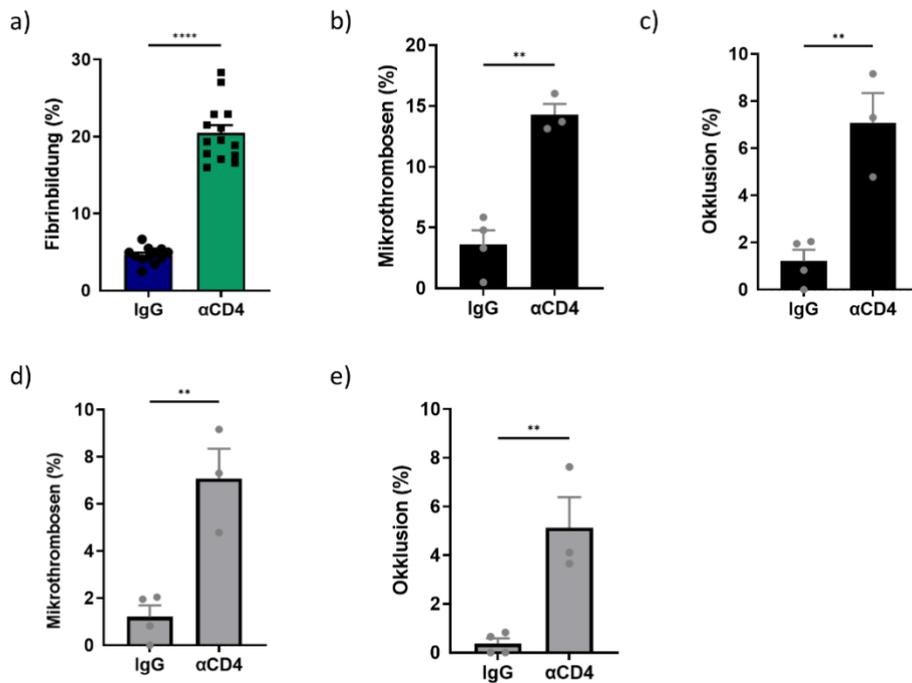


Abbildung 17 CD4-Depletion in der Frühphase der Infektion auf Fibrinbildung und die Entstehung von Mikrothrombosen

Intravasale Fibrinbildung (a), Ausbildung von Mikrothrombosen (b) und Gefäßokklusionen in CD4-depletierten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 Std. nach Infektion mit *E.Coli*. Prozentsatz der Mikrothrombosen (d) und Gefäßokklusionen (e), die allein durch Fibrin verursacht wurden (ohne Assoziation mit kernhaltigen Zellen). Die Punkte geben die Werte in den einzelnen Gesichtsfeldern (VF) (a) oder den Mittelwert aus je 5 VF (b-e) in 3 unterschiedlichen untersuchten Mäusen je Gruppe an. Angabe als Mittelwert \pm S.E.M., ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$.

3 Std. nach Infektionsbeginn wurden mittels CFUs die Zahl der lebenden Bakterien in den Organen bestimmt. Nach T-Helferzelldepletion konnte eine deutliche Abnahme der Bakterienzahl in Leber und Milz im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 18a). In Niere, Herz und Lunge zeigte sich eine nicht signifikant verminderte Bakterienzahl in den mittels α CD4-Antikörper-behandelten Tieren. Die CFUs des Gehirns zeigten in beiden Gruppen kein Bakterienwachstum (Abb. 18b).

Auch 3 Std. und 6 Std. nach Infektionsbeginn war die Fibrinbildung in den mit α CD4-Antikörper behandelten Tieren klar erhöht (Abb.18c,d).

T-Helferzell-Depletion erhöhte auch 18 Std. nach Infektion die Fibrinbildung (Daten nicht gezeigt).

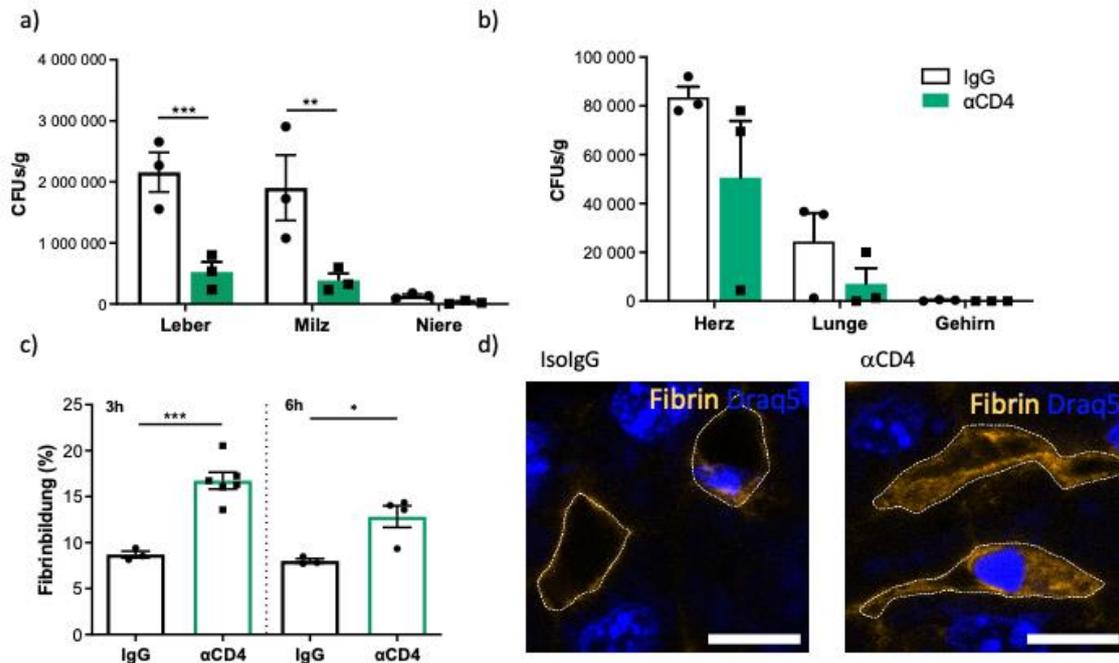


Abbildung 18: Bakterienüberleben und Fibrinbildung nach α CD4-Antikörper Injektion.

a,b) Organspezifische CFUs 3 Std. nach Infektion in den mit α CD4-Antikörper behandelten Mäusen bzw. den Kontrolltieren. **c)** Prozentsatz der intravasalen Fibrin-bedeckten Fläche im Vergleich zur Gesamtfläche der mikrovaskulären Gefäße. **d)** Darstellung der Fibrinbildung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie in der Leber, Gefäßumrandung identifiziert mittels Stabillin-2 (nicht gezeigt) Maßstab 10 μ m. Die Punkte geben die CFUs in unterschiedlichen Mäusen (**a,b**) bzw. die Fibrinbildung als Mittelwert aus je 5 Gesichtsfeldern (VF) in unabhängigen Mäusen an. Angabe als Mittelwert \pm S.E.M. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

3 Std. nach Infektionsbeginn wurde die Bildung von Mikrothrombosen bzw. Gefäßokklusionen durch Fibrin plus der assoziierten kernhaltigen Zellen bestimmt. Die Bildung der Mikrothrombosen stieg geringfügig an (Abb. 19a), während sich eine 2,7-fach erhöhte Anzahl von Gefäßokklusionen nach α CD4-Antikörper-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte (Abb.19b).

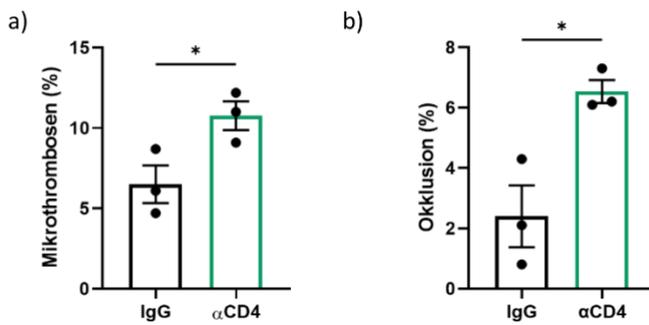


Abbildung 19 Mikrothrombosen und Okklusion in mit αCD4-Antikörpern behandelten Tiere

Quantifizierung der Bildung von Mikrothrombosen (a) und Gefäßokklusionen (b) jeweils im Verhältnis zur Gesamtzahl der Mikrogefäße 3 Std. nach Infektion, Die Punkte geben den Mittelwert von min. 5 Gesichtsfeldern in eigenständigen biologischen Replikaten an. Angabe als Mittelwert ± S.E.M. * p < 0,05.

Mittels Immunhistochemie wurden die nukleären Zellen innerhalb der Mikrothrombosen 3 Std. nach Infektion klassifiziert. Nach αCD4-Antikörper-Injektion konnten Ly6G⁺ Neutrophile vermehrt innerhalb der Mikrothrombosen detektiert werden, während der Anstieg der Ly6C⁺/Ly6G⁻ klassischen Monozyten geringer ausfiel. Zudem kam es zu einer Zunahme der Mikrothrombosen ohne Nuklei (Abb. 20).

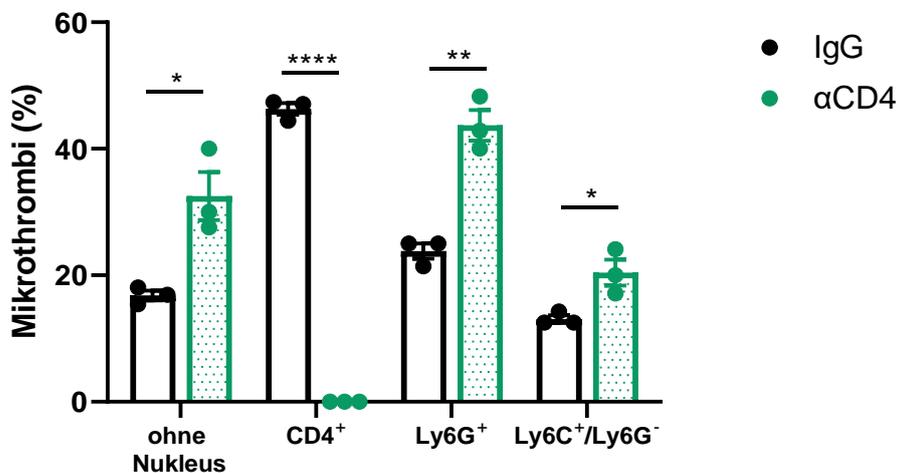


Abbildung 20 Zusammensetzung der Mikrothrombosen in der Leber nach CD4-Depletion

Bestimmung der Immunzellen mittels Immunhistochemie innerhalb der Mikrothrombosen nach αCD4-Antikörper- bzw. IgG-Injektion 3 Std. nach Infektion mit *E. Coli*. Angabe als Mittelwerte ± S.E.M. Die Punkte geben den Mittelwert von jeweils 5 Gesichtsfeldern (VF) in unterschiedlichen Mäusen an. * p < 0,05, ** p < 0,01 **** p < 0,0001.

Um einen Einblick in die Mechanismen der Koagulationsinhibition durch CD4⁺ T-Zellen zu bekommen, wurde zusätzlich zu einem αCD4-Antikörper ein αTAFI-Antikörper eingesetzt. 3 Std. nach Infektion reduzierte die Zugabe von αTAFI-Antikörper nach αCD4-Behandlung die

Fibrinbildung deutlich, sodass kein Unterschied mehr zur IgG-behandelten Kontrollgruppe bestand. Jedoch bewirkte die TAFI-Inhibition keine Veränderung in den Kontrollmäusen. (Abb. 21a). Die Gefäßokklusionen wurden durch Zugabe von α TAFI-Antikörper in CD4-depletierten Mäusen ebenfalls reduziert (Abb. 21b).

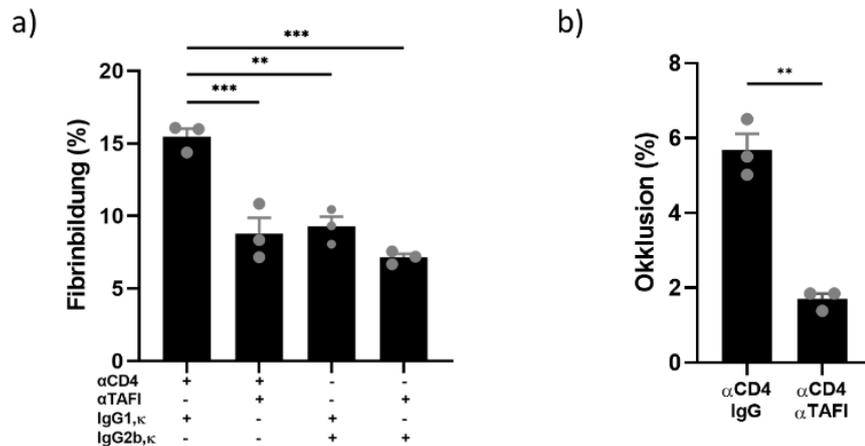


Abbildung 21 Mikrovaskuläre Fibrinbildung und Gefäßokklusionen nach Behandlung mit α CD4- plus α TAFI-Antikörper

Fibrinbildung (a) und Gefäßokklusionen (b) 3 Std. nach Infektion mit *E.Coli*. Angabe als Mittelwert \pm S.E.M. Die Punkte geben den Mittelwert aus jeweils 5 Gesichtsfeldern (VF) in unabhängigen biologischen Replikaten an. ** p<0,01 *** p<0,001.

Danach wurde in einem weiteren Infektionsmodell anstelle von *E.Coli* $1 \cdot 10^8$ *S. pneumoniae* in die Schwanzvene der Tiere injiziert. Die Euthanasie erfolgte 6 Std. nach Infektion. Anschließend wurden im Blutplasma der Tiere die Konzentrationen verschiedener Zytokine und Chemokine bestimmt (Abb. 22). Dabei konnte in den mit *S. pneumoniae* infizierten Tieren ein deutlicher Anstieg der IFN γ -Konzentration im Vergleich zu den mit *E.Coli* infizierten Tieren gemessen werden (Abb. 22a). Auch bei TNF α zeigte sich die Tendenz zu erhöhten Werten in den *S. pneumoniae* infizierten Tieren (Abb.22b). Beim Vergleich der Tiere nach α CD4-Antikörper-Injektion mit der IgG-Kontrollgruppe war zwischen den beiden Infektionsmodellen kein Unterschied festzustellen. Insbesondere für die grob als pro- oder antiinflammatorisch charakteristischen Zytokine IL-6, IL-1 β bzw. IL-10 fand sich keine signifikante Differenz (Abb.22 c-e).

In beiden Infektionsmodellen wurden außerdem 6 Std. nach Infektion verschiedene Parameter zur Organschädigung im Plasma bestimmt. Dabei waren die GOT-Spiegel in den mit *E.Coli* infizierten Tieren, welche zuvor mit einem α CD4-Antikörper behandelt wurden, vermindert im Vergleich zu den mit IgG-behandelten Tieren. Bei den mit *S. pneumoniae* infizierten Tieren bewirkte die Depletion der T-Helferzellen eine Reduktion der GPT-Level. Die Konzentrationen von Harnstoff,

Laktat, GLDH und Cholinesterase wurden durch Depletion der CD4⁺ Zellen in beiden Infektionsmodellen nicht verändert (Anhang 1).

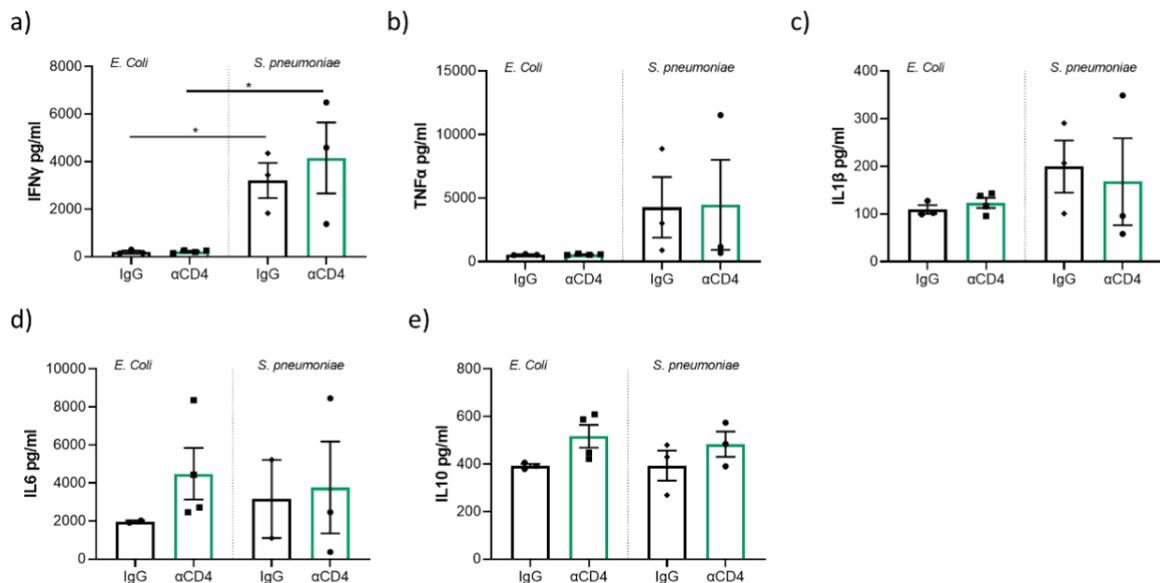


Abbildung 22: Zytokinausschüttung nach CD4-Depletion während der systemischen bakteriellen Infektion

Infektion mit *E. coli*, bzw. *S. pneumoniae*, Bestimmung der Zytokinkonzentrationen im Plasma der Tiere 6 Std. post Infektion mittels Multiplex-Assay. Die Punkte geben die jeweilige Zytokinkonzentration in unterschiedlichen Mäusen an. Angabe als Mittelwert \pm S.E.M. * $p < 0,05$.

5.2.2 Effekt eines IL23R-defizienten Mausmodells

Basierend auf diesen Ergebnissen konnten CD4⁺ T-Helferzellen als wichtige Mediatoren der negativen Regulation der Koagulation identifiziert werden. In einem nächsten Schritt untersuchten wir die Rolle der Th17 Zellen, die den hauptsächlichen Subtyp der CD4⁺ T-Zellen im Blut darstellen^{112,164}. Hierzu wurde ein IL23R-defizientes Mausmodell genutzt, indem eine signifikante Verringerung der Th17-Zellen erwartet wird¹⁶⁵. In IL23R^{-/-} Mäusen wurde 6 Std. nach Infektion eine Zunahme der Zahl der GFP⁺ Bakterien gegenüber den WT Tieren beobachtet (Abb. 23a). Gleichzeitig war die Fibrinbildung um 46% reduziert (Abb.23b).

Anschließend durchgeführte FACS Analysen zeigten, dass sich innerhalb der IL23-R⁺ Zellpopulation nur ein relativ geringer Anteil von Th17-Zellen befindet, während die meisten IL23R⁺ Zellen $\gamma\delta$ T-Zellen darstellten. Damit konnte dieses Modell nicht zur Untersuchung der Th17-Zellpopulation genutzt werden.

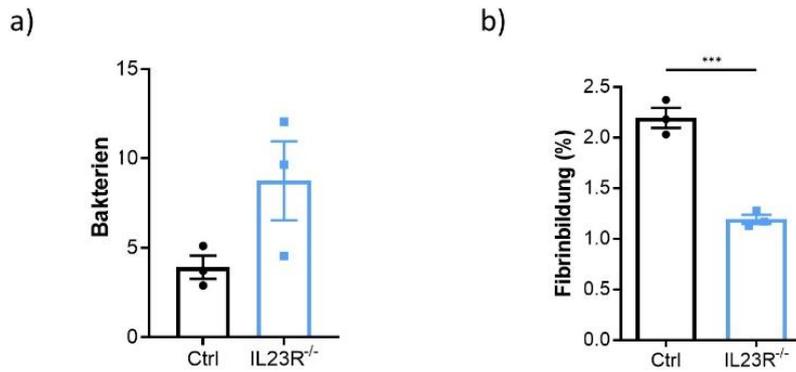


Abbildung 23: Bakterienüberleben und Fibrinbildung in der Mikrozirkulation der Leber von IL23R^{-/-} Mäusen

a) GFP⁺ Bakterien pro Gesichtsfeld (VF), **b)** Fibrinbildung als Anteil der mit Fibrin bedeckten Fläche im Verhältnis zur gesamten Querschnittsfläche der Mikrozirkulation, Die Punkte geben den Mittelwert aus 30 **(a)** bzw. min. 5 **(b)** VF in unterschiedlichen Mäusen an. Angabe als Mittelwert \pm S.E.M. *** $p < 0,001$.

5.2.3 Mikrovaskuläre Fibrinbildung in einem IL17A-defizienten Mausmodell

Als nächstes wurden IL17A^{-/-} Mäuse analysiert, bei denen ebenfalls eine Verminderung der Th17 Zellen berichtet wurde¹⁶⁶. Um einen Überblick über den Einfluss der IL17A-Defizienz zu erlangen, wurde in diesem Model die Immunzellrekrutierung in der Mikrozirkulation der Leber untersucht. Hier konnte eine signifikante Abnahme der CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 24). Die Subpopulation der Th1-Zellen zeigte hingegen keine Veränderung der Zellzahl in den IL17^{-/-} Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Rekrutierung der CD19⁺ B-Zellen zeigte sich unbeeinflusst in den defizienten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.24).

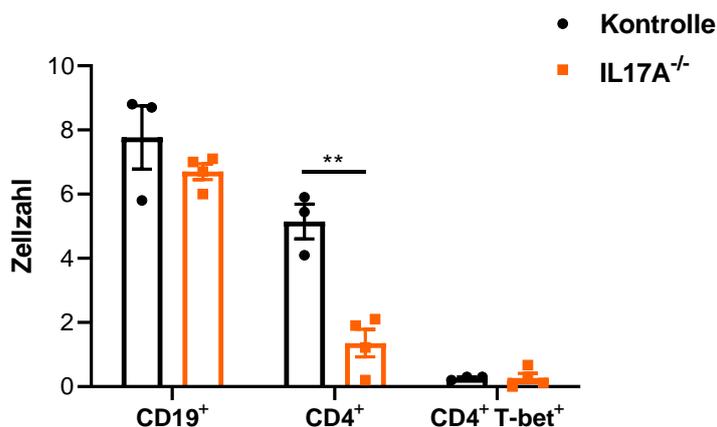


Abbildung 24 Lymphozytenrekrutierung in der Mikrozirkulation der Leber in IL17A^{-/-} Mäusen

6 Std. nach *E.Coli* Infektion. Die Punkte geben die Mittelwerte aus min. 10 Gesichtsfeldern in unterschiedlichen biologischen Replikaten an. Mittelwert \pm S.E.M. ** $< 0,001$

Die Bestimmung der CFUs in Leber, Milz, Niere und Lunge zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den IL17A^{-/-} Mäusen und den Kontrolltieren (Abb.25). Im Gehirn konnten in beiden Gruppen keine Bakterien nachgewiesen werden.

Die intravasale Fibrinbildung sowie die fibrininduzierten Gefäßokklusionen in der Mikrozirkulation der Leber zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Mausmodellen.

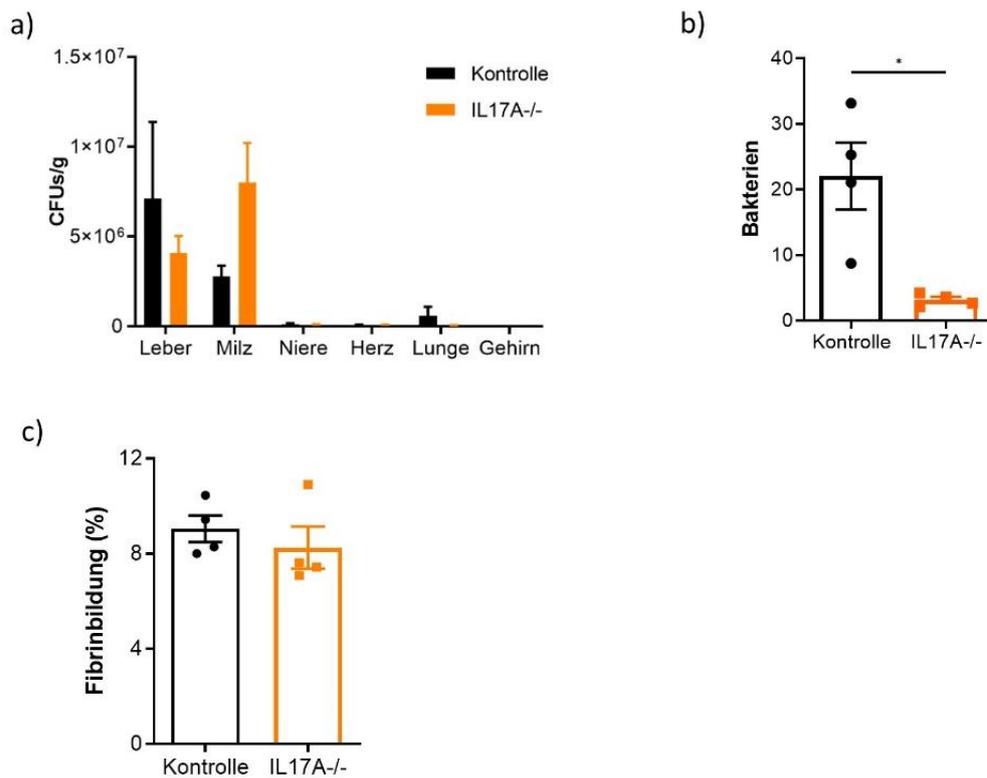


Abbildung 25 Bakterienüberleben und mikrovaskuläre Fibrinbildung in IL17A^{-/-} Mäusen

a) Bestimmung der CFUs in den angegebenen Organen. **b)** Anzahl der GFP⁺ Bakterien pro Gesichtsfeld (VF) in der Leber. **c)** Intravasale Fibrinbildung in der Mikrozirkulation der Leber. Die Punkte geben den Mittelwert aus 30 (**b**) bzw. 5 (**c**) Gesichtsfeldern in unterschiedlichen Mäusen an. Mittelwert ± S.E.M. * p<0,05.

Zur Quantifizierung der Organschädigung in den Tieren wurde die Konzentration von Harnsäure, Laktat, Cholinesterase, GLDH, GOT und GPT im Plasma bestimmt. Dabei konnte laborchemisch kein Hinweis auf eine signifikante Organschädigung gesehen werden. Die Werte für alle genannten Parameter zeigten zwischen den IL17A-defizienten Tieren und der Kontrollgruppe keinen Unterschied (Anhang 2).

5.3 B-Zellen beeinflussen Bakterienüberleben ohne Veränderung der Koagulationsantwort

In den mit *E.Coli* infizierten WT-Mäusen kam es 3 Std. nach Infektion zu einer nennenswerten Rekrutierung von B-Zellen. Dabei handelte es sich zu 57% um B1a-Zellen (Abb. 26a). In der Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass 3 Std. nach Infektion ein hoher Prozentsatz der B-Zellen mit PAI-1 und uPAR assoziiert sind (Abb. 26b).

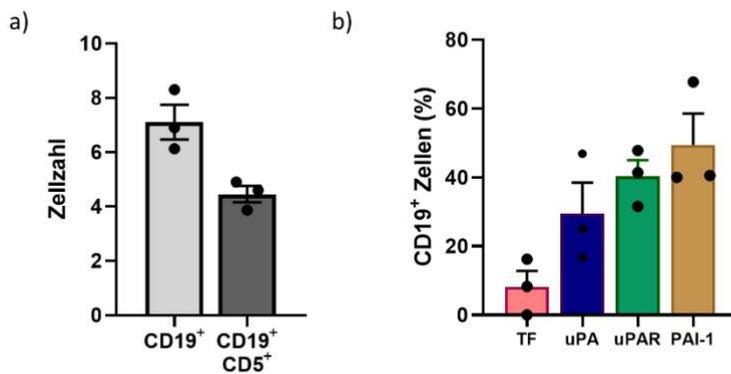


Abbildung 26: B Zell Rekrutierung und Assoziation mit Koagulation-regulierenden Proteinen

Anzahl der CD19⁺ bzw. CD19⁺/CD5⁺ Zellen (a) und die Assoziation der CD19⁺ Zellen mit Koagulationsproteinen (b) in der Mikrozirkulation der Leber 3 Std. nach Infektion mit *E.Coli*. Die Punkte geben die Mittelwerte aus 10 Gesichtsfelder in der Immunhistochemie in unterschiedlichen Mäusen an. Mittelwert ± S.E.M.

Um die Beteiligung der B1a-Zellen an der Fibrinbildung und Bakterienabwehr zu untersuchen, wurden Bhlhe40^{-/-} Bhlhe41^{-/-} Mäuse analysiert, in denen die B1a-Zelle stark vermindert sind¹²⁹.

In Leber und Milz der mit *E.Coli* infizierten Bhlhe40^{-/-} Bhlhe41^{-/-} Mäuse war 3 Std. bzw. 6 Std. nach Infektion eine erhöhte Zahl der CFUs im Vergleich zu den WT Tieren nachweisbar (Abb. 27a,b). Mittels Immunhistochemie wurde die Fibrinbildung in der Mikrozirkulation der Leber bestimmt. Die Fibrinbildung in den Bhlhe40^{-/-} Bhlhe41^{-/-} Mäusen war gegenüber der Kontrollgruppe unverändert (Abb. 27c). Die Anzahl der GFP⁺ Bakterien war in den Bhlhe40^{-/-} Bhlhe41^{-/-} Mäusen gegenüber der Kontrolle korrespondierend zu den Veränderungen der CFUs ebenfalls erhöht (Abb. 27d).

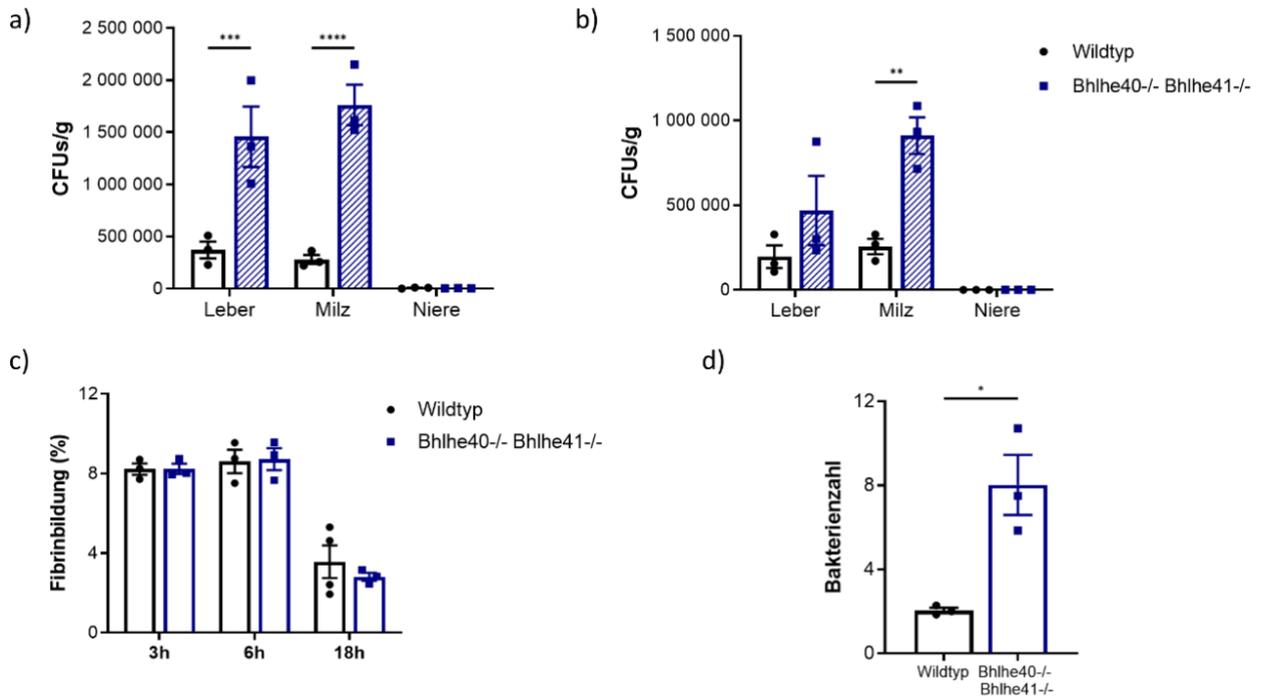


Abbildung 27: Bakterienüberleben und mikrovaskuläre Fibrinbildung in Bhlhe40^{-/-} Bhlhe41^{-/-} Mäusen

CFUs in den angegebenen Mausmodellen 3 Std. (a) und 6 Std. (b) nach Infektion. c) Zahl der GFP⁺ Bakterien pro Gesichtsfeld 3 Std. nach Infektion d) Fibrinbildung intravasal in der Leber nach 3, 6 und 18 Std post Infektion. Die Punkte geben die Mittelwerte aus 5 (c) bzw. 30 (d) Gesichtsfeldern in biologisch unabhängigen Replikaten (a-d) an. Mittelwerte \pm S.E.M. * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 **** p < 0,0001.

Anschließend wurden im Plasma der Tiere verschiedene Parameter der Organschädigung bestimmt. Hier konnte 3 Std. nach Infektion ein Abfall der Cholinesterase in den B1a-defizienten Tieren festgestellt werden. Die Konzentrationen von GOT, GPT, GLDH, Harnstoff und Laktat zeigten keinen Unterschied zwischen den Bhlhe40^{-/-} Bhlhe41^{-/-} Mäusen und der Kontrollgruppe. 6 Std. nach Infektion waren alle genannten Blutparameter unverändert (Anhang 3).

5.4 NETs verstärken die Koagulation und Killing von Bakterien

In dem hier beschriebenen Infektionsmodell konnte bereits in der ersten Stunden nach Infektion eine deutliche Rekrutierung der Neutrophilen in die Mikrozirkulation der Leber gezeigt werden. Zur Untersuchung des Einflusses der Bildung von NETs wurde deren Entstehung mittels Injektion von DNase I in den mit *E.Coli* infizierten WT Mäusen verhindert.

In der Leber waren die CFUs und die Zahl der GFP⁺ Bakterien in den mit DNase I behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Abb. 28a,b). In Milz, Niere, Herz, Lunge und Gehirn zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des bakteriellen Überlebens (Abb. 28a). Die Fibrinbildung in der Mikrozirkulation der Leber war in den mit DNase I-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert (Abb. 28c).

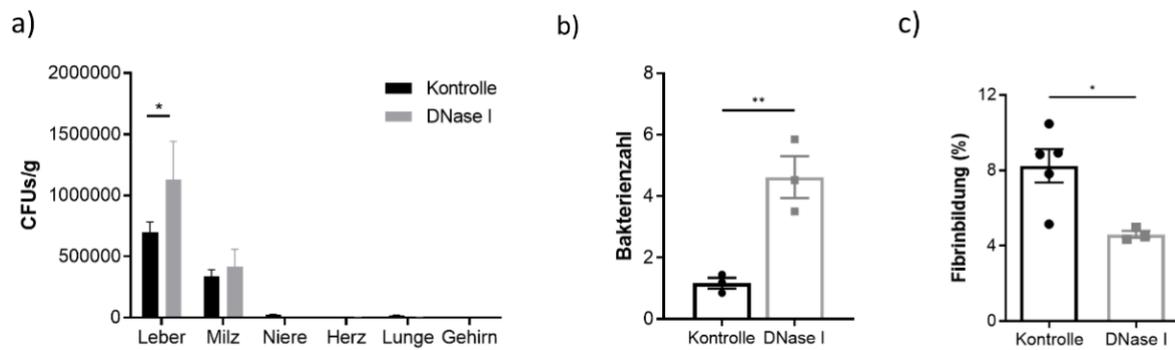


Abbildung 28: Bakterienzahl und mikrovaskuläre Fibrinbildung nach Behandlung mit DNase I

a) CFUs 3 Std. nach Infektion mit *E.Coli*. b) Zahl der GFP⁺ Bakterien pro Gesichtsfeld. c) Fibrinbildung in der Mikrozirkulation der Leber, 3 Std. nach Infektion; n=3 (biologisch unabhängige Replikate) in allen Gruppen. Die Punkte geben die Mittelwerte aus 30 (b) bzw. 5 (c) VF an. Mittelwert ± S.E.M. * <0,05 ** p<0,01.

5.5 Einfluss von *Nr4a1* auf die akute systemische bakterielle Infektion

Nicht-klassische Monozyten (CX3CR1⁺/Ly6C^{low/-}) waren im Gegensatz zu klassischen Monozyten erst 6 Std. nach Infektion in der Mikrozirkulation der Leber nachweisbar (Abb. 29). Um ihre Rolle in der Frühphase der Infektion zu untersuchen, wurden *Nr4a1*^{-/-} Mäuse genutzt, in denen die nicht-klassischen Monozyten deutlich reduziert sind⁷¹.

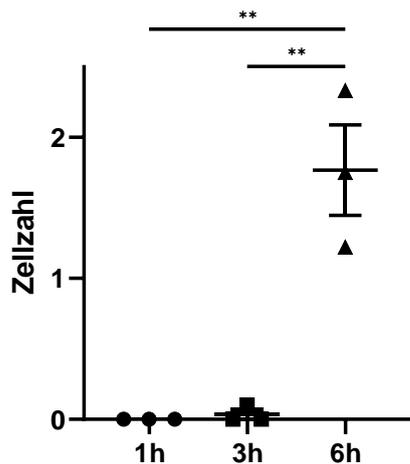


Abbildung 29 Rekrutierung der nicht-klassischen Monozyten in die Mikrozirkulation der Leber

nach Infektion mit *E. Coli*. Die Punkte geben die Mittelwerte aus 10 Gesichtsfeldern in unterschiedlichen Mäusen an. Mittelwerte \pm S.E.M. ** $p < 0,01$

Die Anzahl der GFP⁺ Bakterien in der Mikrozirkulation der Leber war in den Nr4a1^{-/-} Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abb. 30b). Die Fibrinbildung wurde ebenfalls mittels Immunhistochemie visualisiert. In den Nr4a1^{-/-} Tieren zeigte sich eine vermehrte intravaskuläre Fibrinbildung in der Mikrozirkulation der Leber im Vergleich zu den Wildtyp Tieren (Abb. 30a).

Um die Spezifität der Effekte nachweisen, wurde den Nr4a1^{-/-} Mäuse mittels FACS isolierte nicht-klassische Monozyten injiziert. 6 Std. nach Infektion war nach Infusion der nicht-klassischen Monozyten die Fibrinbildung in der Mikrozirkulation der Leber im Vergleich zu den Nr4a1^{-/-} Mäusen ohne Zelltransfer um 48% reduziert (Abb. 30a). Damit bestand kein Unterschied mehr in der Fibrinbildung zu den WT Tieren.

Anschließend wurde die Zahl der immobilisierten CD4⁺ T-Zellen in der Mikrozirkulation der Leber betrachtet. Hier konnte eine signifikante Abnahme um 56% beobachtet werden, welche nach Injektion der nicht-klassischen Monozyten in Nr4a1^{-/-} Mäusen wieder anstieg (Abb.30c).

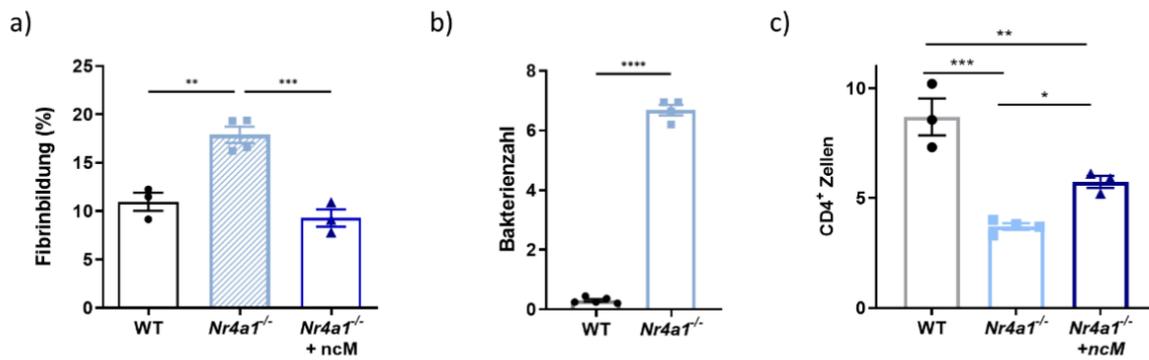


Abbildung 30: Fibrinbildung und Immunzellrekrutierung in *Nr4a1*^{-/-} Mäusen

a) Fibrinbildung in Wildtyptieren, *Nr4a1*^{-/-} Mäusen sowie *Nr4a1*^{-/-} Mäusen nach Re-Injektion von nicht-klassischen Monozyten (ncM). b) Zahl der GFP⁺ Bakterien pro Gesichtsfeld (VF). e) Anzahl der CD4⁺ T-Zellen in der Mikrozirkulation der Leber 6 Std. nach Infektion in den angegebenen Tiermodellen. Die Punkte geben die Mittelwerte aus 5 (a), 30 (b) bzw. 10 (c) VF in unterschiedlichen Mäusen an. Mittelwert ± S.E.M. * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 **** p < 0,0001.

Bei der Untersuchung der Parameter zur Organschädigung im Plasma der Tiere fiel ein verminderter Laktatwert in den *Nr4a1*^{-/-} Tieren auf (Abb. 31a). Gleichzeitig fand sich ein erhöhter Harnstoffwert (Abb. 31b). Es zeigte sich eine Tendenz zu erhöhten GLDH und GOT-Werten in den knock-out Tieren (Abb. 31c,d). Die Konzentration der Cholinesterase und GPT zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Anhang 6).

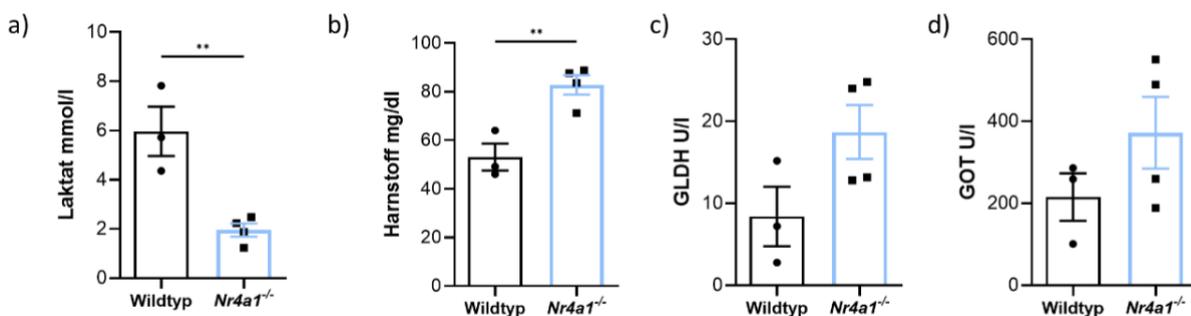


Abbildung 31: Blutparameter der Organschädigung in *Nr4a1*^{-/-} Mäusen

Blutentnahme und anschließende Bestimmung der Parameter im Plasma 6 Std. nach Infektion mit *E.Coli*. Die Punkte geben die Werte aus unterschiedlichen Mäusen an. Mittelwert ± S.E.M. ** p < 0,01

5.6 Wirkung der Faktor Xa-Hemmung auf die bakterielle Infektion

5.6.1 Einfluss von Rivaroxaban auf Bakterienüberleben und Fibrinbildung

Zur Hemmung der Fibrinbildung wurde Rivaroxaban, ein Faktor Xa-Inhibitor eingesetzt. Ziel dieses Experiments war es, den Einfluss der verminderten Fibrinbildung auf das Bakterienüberleben und die Immunzellrekrutierung zu untersuchen. Den Tieren wurde hierfür 4 Std. vor Infektion Rivaroxaban bzw. die Vehikellösung (DMSO) injiziert.

Nach Rivaroxaban-Gabe war die mikrovaskuläre Fibrinbildung in der Leber 3, 6 und 18 Std. post Infektion im Vergleich zur Kontrollgruppe stark reduziert (Abb. 32b,c). 6 Std. nach Infektion waren die CFU-Werte in der Leber erhöht (Abb. 32a).

Rivaroxaban beeinflusste ebenfalls die Ausbildung von Mikrothrombosen. Diese sind definiert als Bedeckung der Querschnittsfläche eines Mikrogefäßes zu mindestens 60% mit Fibrin und intravaskulären Nuclei. Die Gabe des Faktor-Xa-Inhibitors führte zu einer Reduktion der Ausbildung von Mikrothrombosen (Abb. 32d).

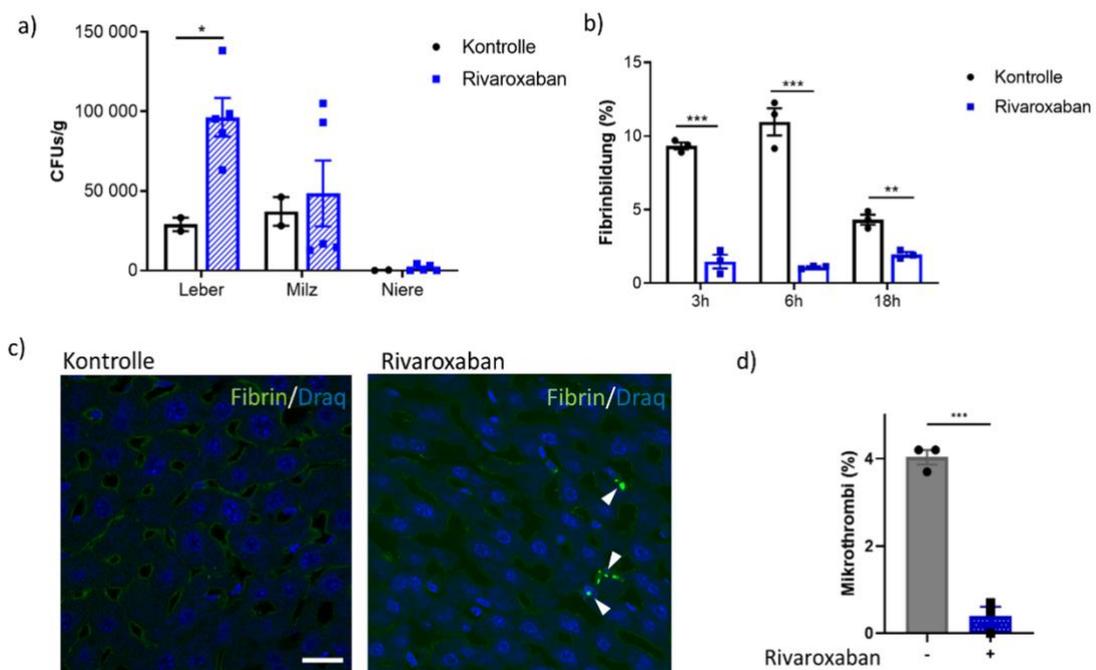


Abbildung 32: Bakterienzahl und Fibrinbildung in Rivaroxaban behandelten Mäusen

a) CFUs 3 Std. nach Infektion; **b,c)** Fibrinbildung und Ausbildung von Mikrothrombosen (**d**) in der Mikrozirkulation der Leber; Maßstab 20µm; Die Pfeile deuten auf intravaskuläre Bakterien. Die Punkte geben den Mittelwert aus 5 Gesichtsfeldern (**b,d**) in unterschiedlichen Mäusen (**a-d**) an. Mittelwert ± S.E.M. * p<0,05 *** p<0,001

5.6.2 Einfluss von Rivaroxaban auf die Immunzellrekrutierung in der Mikrozirkulation

Um die Auswirkung der reduzierten Fibrinbildung auf die Immunzellrekrutierung zu untersuchen, wurden die immobilisierten Immunzellpopulationen in der Mikrozirkulation der Leber bestimmt. Dabei konnte 3 Std. nach Infektion eine signifikante Abnahme der klassischen Monozyten in den mit Rivaroxaban behandelten Tieren beobachtet werden. Gleichzeitig zeigte sich eine signifikante Zunahme der nicht-klassischen Monozyten. Die Zahl der Neutrophilen zeigte in beiden Gruppen keinen Unterschied (Abb. 33a). Die CD4⁺ T-Helferzellen waren nach Rivaroxaban-Gabe vermindert (Abb. 33b). Dies galt auch für die Subpopulation der Th17-Zellen. Bei der Anzahl der CD19⁺ B-Zellen sowie der B1a-Zellen fand sich kein Unterschied zwischen den behandelten Tieren und der Kontrollgruppe (Abb. 33b).

6 Std. nach Infektion konnte eine Zunahme der Neutrophilen in den mit Rivaroxaban behandelten Tieren festgestellt werden. Die Zahl der klassischen und nicht-klassischen Monozyten war unverändert (Abb. 33c). Auch zu diesem Zeitpunkt konnte eine Reduktion der CD4⁺ T-Helferzellen insgesamt und der Subpopulation der Th17-Zellen festgestellt werden. Die Gesamtzahl der B-Zellen als auch die Zahl der B1a-Zellen blieb erneut unverändert (Abb. 33d).

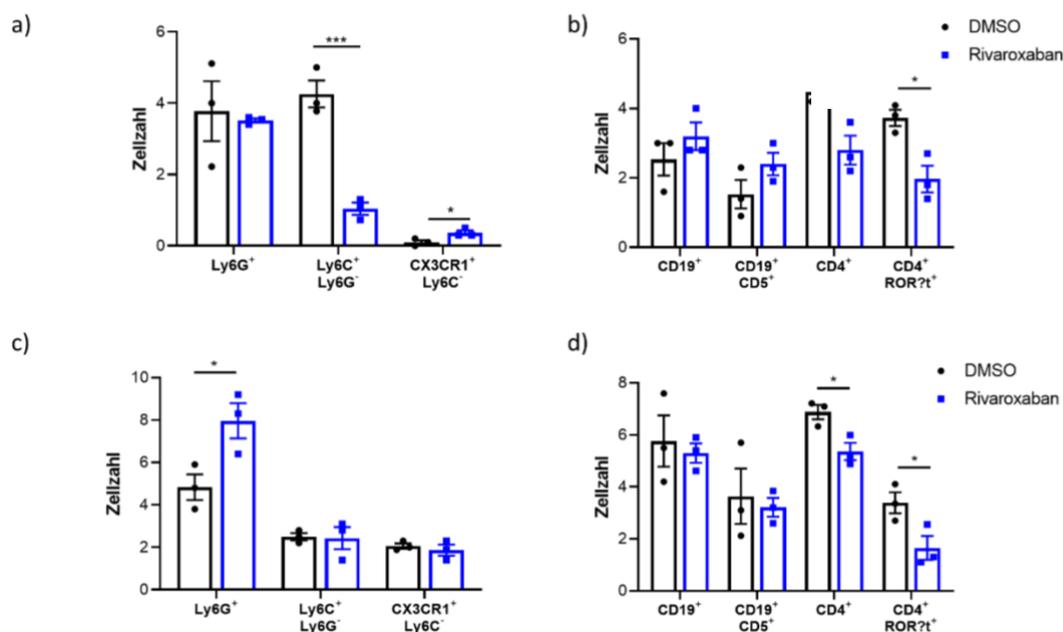


Abbildung 33: Immunzellrekrutierung in mit Rivaroxaban behandelten Mäusen

Bestimmung der Immunzellzahl pro Gesichtsfeld (VF) in der Mikrozirkulation der Leber nach 3 Std. (a,b) bzw. 6 Std. (d,e) nach Infektion. Die Punkte geben den Mittelwert aus 10 VF in unterschiedlichen Mäusen an. Mittelwert ± S.E.M. * p < 0,05 *** p < 0,001

5.7 Zusammenspiel zwischen Faktor XII und der Immunantwort

5.7.1 Fibrinbildung und Immunzellrekrutierung in Faktor XII defizienten Mäusen

Als weiteres Model der Fibrininhibierung wurden Mäuse mit Faktor XII Defizienz untersucht. Die Fibrinbildung in der Mikrozirkulation der Leber war sowohl 1, 3 als auch 6 Std. nach Infektion in den $f12^{-/-}$ Mäusen gegenüber den WT Mäusen deutlich reduziert (Abb. 34).

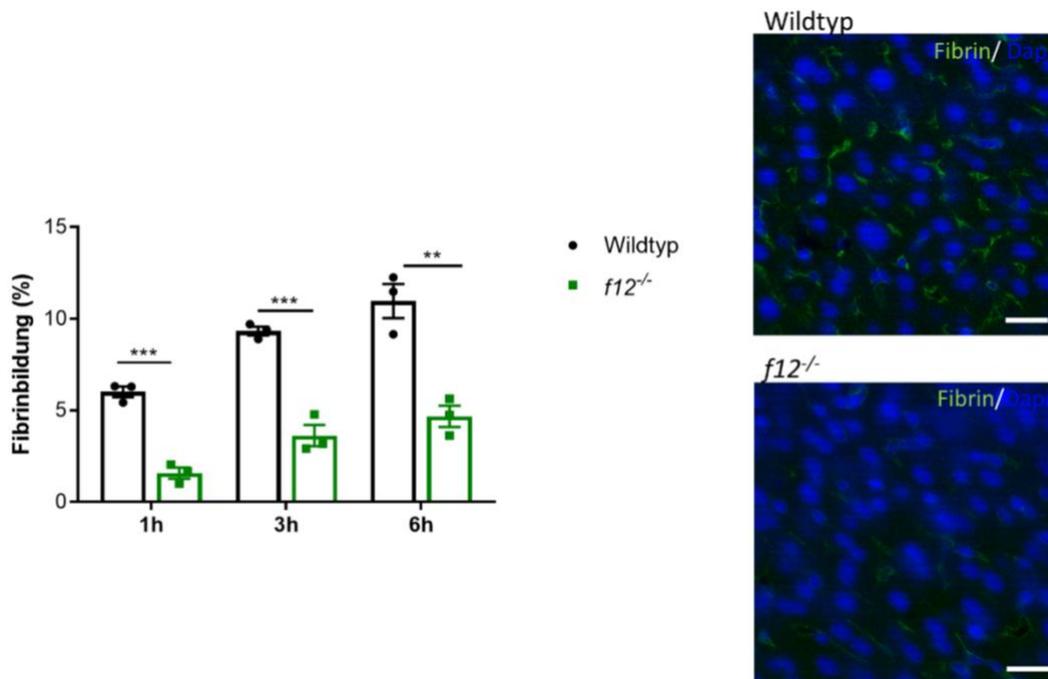


Abbildung 34: Fibrinbildung in $f12^{-/-}$ Mäusen

Fibrinbildung 1-6 Std. bzw. 3 Std. nach Infektion in der Mikrozirkulation der Leber in Wildtyp bzw. $f12^{-/-}$ Mäusen. Maßstab 20 μ m. Die Punkte geben den Mittelwert aus 5 Gesichtsfeldern in unterschiedlichen Mäusen an. Mittelwert \pm S.E.M. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,0001$.

Bei der Bestimmung der CFUs zeigte sich 1 Std. nach Infektion kein signifikanter Unterschied zwischen den $f12^{-/-}$ Mäusen und den Wildtyptieren. Allerdings konnte eine Tendenz zu einer erhöhten Bakterienzahl in den $f12^{-/-}$ Mäusen in Leber, Milz und Niere beobachtet (Abb. 35a). 3 Std. nach Infektion war das bakterielle Überleben in der Leber der $f12^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Abb. 35b).

Des Weiteren wurde die Immunzellrekrutierung in der Mikrozirkulation der Leber untersucht. Dabei wurde eine deutliche Abnahme der Zahl der Neutrophilen in den $f12^{-/-}$ Mäusen beobachtet.

Zudem zeigte sich eine Abnahme der CD4⁺ T-Zellen und ihrer Subpopulation, der Th17-Zellen. Die Zahl der nicht-klassischen Monozyten war unverändert zwischen den beiden Gruppen (Abb.35c).

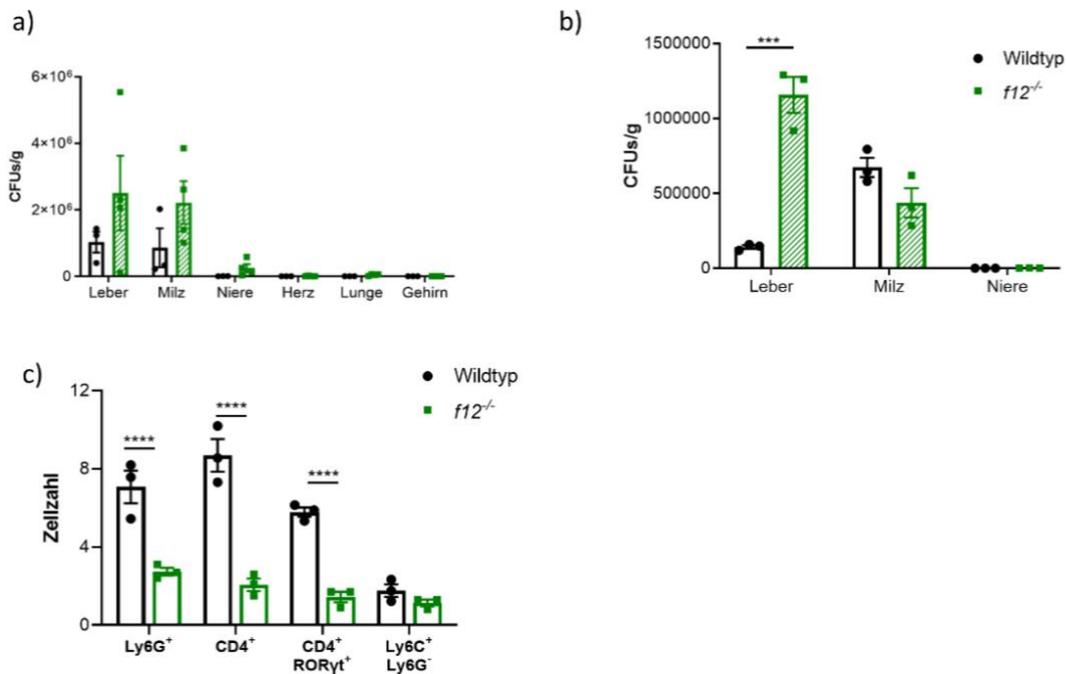


Abbildung 35: Bakterienüberleben und Immunzellrekritierung in *f12*^{-/-} Mäusen

CFUs 1 (a) und 3 Std. (b) nach Infektion mit *E.Coli*. c) Bestimmung der Immunzellzahl pro Gesichtsfeld (VF) in der Leber 3 Std. nach Infektionsstart; Die Punkte geben den Mittelwert aus 10 VF (c) in unabhängigen biologischen Replikaten (a-c) an. Mittelwert ± S.E.M. *** p<0,001 **** p<0,0001.

Um die Wirkung der verminderten Fibrinbildung und erhöhten Bakterienlast auf die Organfunktionen im Organismus zu quantifizieren, wurden verschiedene Parameter zur Detektion einer Organschädigung im Plasma bestimmt. Dabei waren die Harnstoffkonzentration sowie die Laktatlevel in den *f12*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT Tieren vermindert (Abb. 36a,d). Hingegen kam es zu einem Anstieg der GLDH und GPT bei den Faktor XII defizienten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.36b,c).

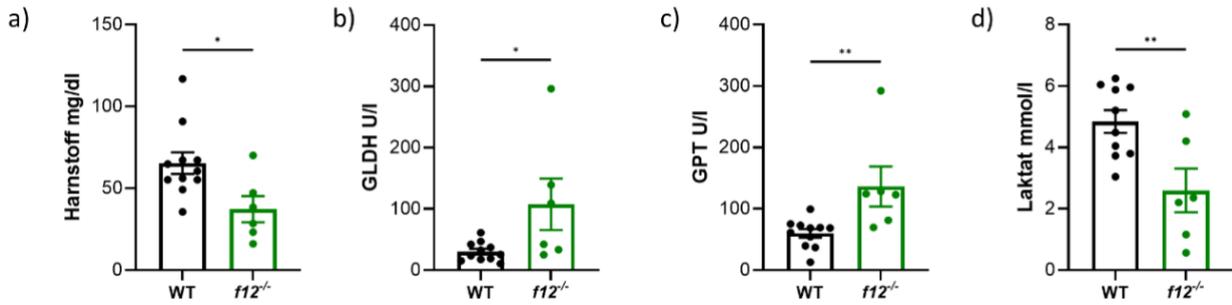


Abbildung 36: Parameter der Organschädigung in *f12*^{-/-} defizienten Mäusen

Quantifizierung der Organschädigung im Plasma, 3-6 Std. nach Infektion; Die Punkte beziehen sich auf verschiedene Mäuse. Mittelwert ± S.E.M. * p<0,05 ** p<0,01.

Zudem wurden im Blutplasma mittels Multiplex Assay die Konzentrationen verschiedener Zytokine bestimmt. Dabei wurde in den *f12*^{-/-} Mäusen Reduktionen von IFN gamma, TNF α , IL1-beta, IL2, IL3, IL13, IL9 und des Chemokin GM-CSF im Vergleich zu den Wildtypmäusen gemessen (Abb.37a-h).

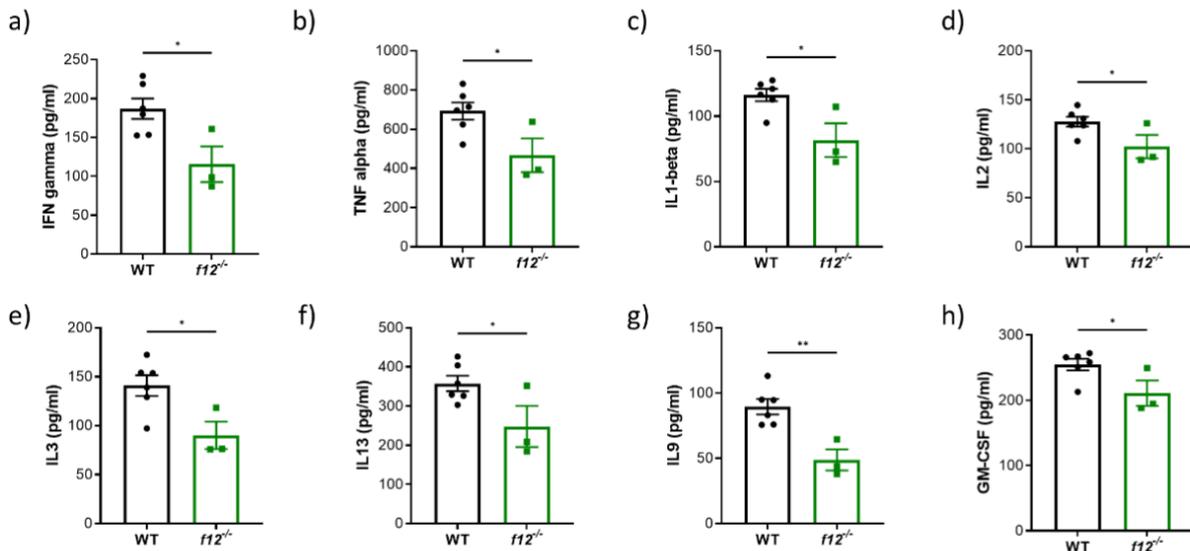


Abbildung 37: Zytokinkonzentrationen im Plasma von *f12*^{-/-} Mäusen

Bestimmung der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im Plasma mittels Multiplex Assay, 6 Std. nach Infektion; Die Punkte beziehen sich auf verschiedene Mäuse. Mittelwert ± S.E.M. * p<0,05 ** p<0,01.

5.7.2 Lokalisation von Faktor XII

Zunächst wurde die Assoziation von Faktor XII mit verschiedenen Immunzellen 6 Std. nach Infektion bestimmt. 78% der Neutrophilen Granulozyten waren Faktor XII-positiv (Abb. 38a). Bei den CD4⁺/ROR γ t⁺ Th17-Zellen lag die Assoziation mit FXII bei 84% (Abb. 38b). 57% der gesamten CD19⁺ B-Zellen Faktor XII-positiv, während 80% der B1a-Zellen mit FXII assoziiert waren. Eine deutlich geringere Kolokalisation mit FXII wurde bei Kupffer-Zellen sowie den klassischen und nicht-klassischen Monozyten beobachtet (Abb.38c).

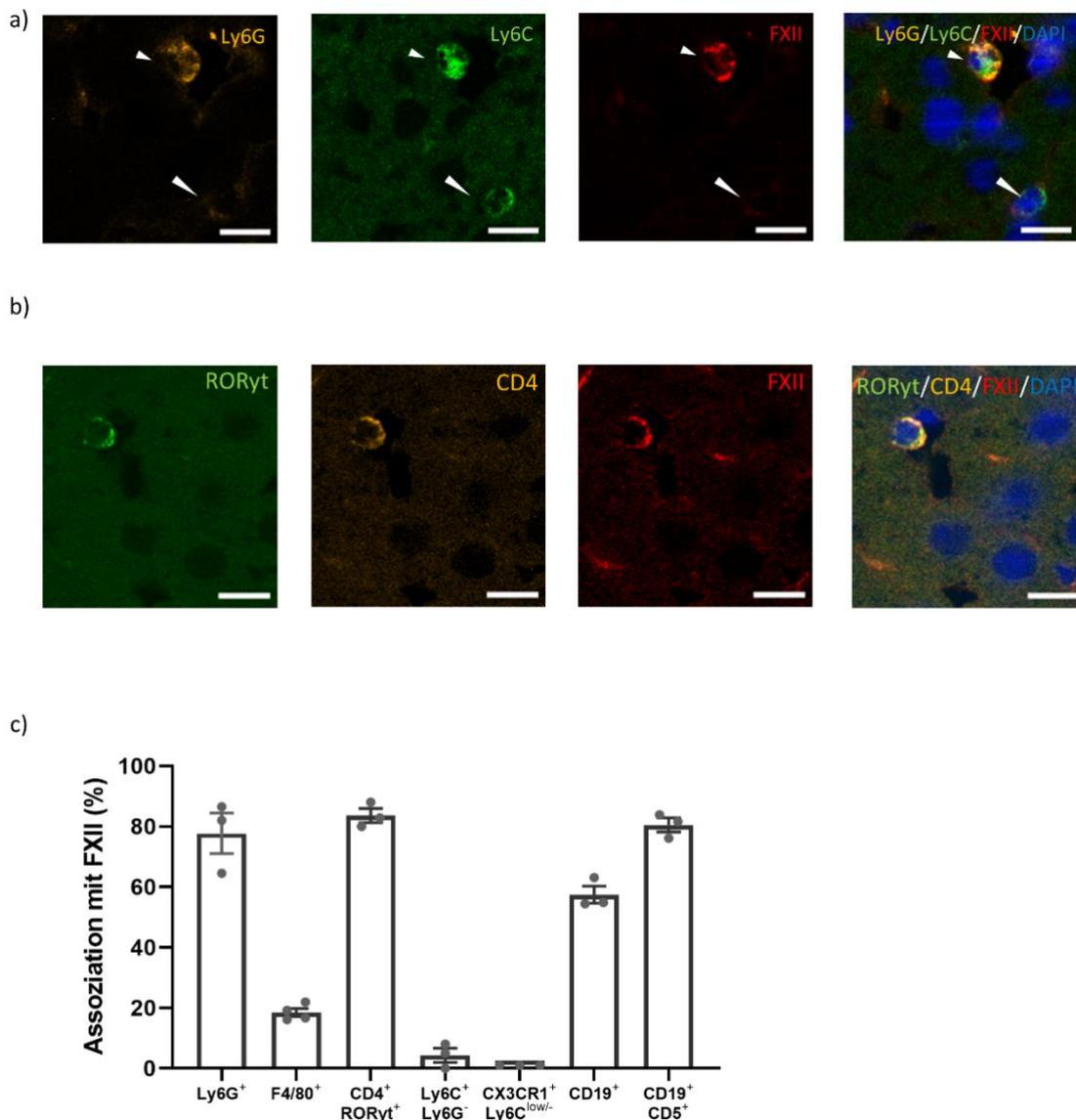


Abbildung 38: Kolokalisation der Immunzellen mit Faktor XII

a) Kolokalisation eines Ly6G⁺/Ly6C⁺ Neutrophilen mit FXII (rot) (kleiner Pfeil), fehlende Kolokalisation eines Ly6C⁺/Ly6G⁻ klassischen Monozyten (großer Pfeil) **b)** ROR γ t⁺, CD4⁺ Th17-Zelle mit FXII (rot) 3 Std. nach Infektion. Maßstab: 10 μ m. **c)** Bestimmung des Anteils der mit FXII kolokalisierten Zellen 3 Std. nach *E. Coli* Infektion. Die Punkte geben den Mittelwert aus 10 Gesichtsfeldern in unterschiedlichen Mäusen an. Mittelwert \pm S.E.M.

Zudem war eine Kolokalisation des Signals für Faktor XII mit Stabilin-2 als Endothelfärbung zu beobachten. Dabei befand sich Faktor XII stets innerhalb der Gefäße. Auch in den großen Gefäßen konnte eine Anlagerung von Faktor XII an die Innenseite des Endothels beobachtet werden (Abb. 39a,b).

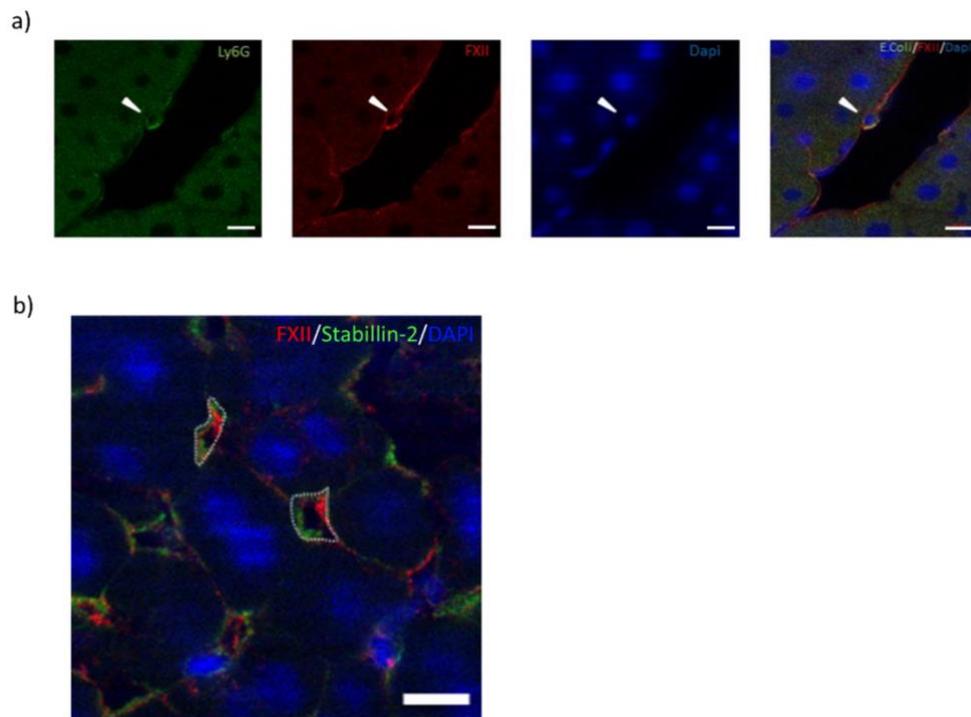


Abbildung 39: FXII Lokalisation an der luminalen Gefäßwand

- a) Faktor XII Lokalisation am sinusoidalen Endothel, 3 Std. nach Infektion Pfeil: Ly6G⁺ Neutrophiler mit FXII Kolokalisation.
b) FXII (rot) intravaskulär in den Sinusoiden der Leber (Stabilin-2 grün, weiß gestrichelt). Maßstab 10µm.

5.7.3 Assoziation von Faktor XII mit *E.Coli*

Neben der Kolokalisation von Faktor XII mit verschiedenen Immunzellen wurde auch eine Assoziation von Faktor XII mit GFP⁺ *E.Coli* beobachtet. Insgesamt fand sich 6 Std. nach Infektion bei 79% der GFP⁺ *E.Coli* eine Kolokalisation mit Faktor XII (Abb. 40).

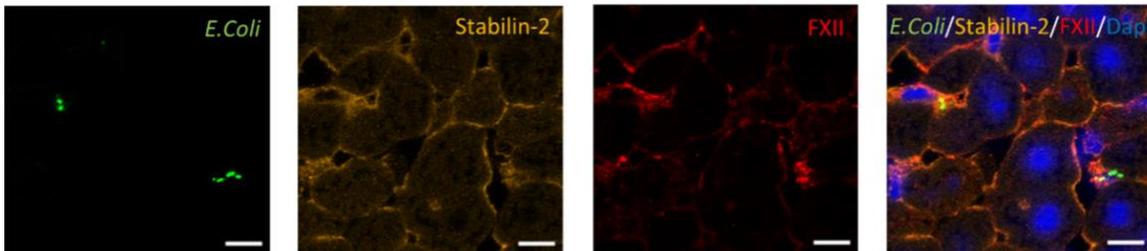


Abbildung 40: Kolokalisation von Bakterien und Faktor XII

Kolokalisation von GFP⁺ *E.Coli* (grün) und FXII (rot) in einem Mikrogefäß der Leber (Stabilin-2 gelb) 1 Std. nach Infektion, Maßstab 10µm.

5.8 Einfluss der Fibrinbildung auf den T-Helferzellphänotyp

Neben dem Einfluss der T-Helferzellen auf die Koagulation wurde interessanterweise auch ein Einfluss der Fibrinbildung auf den Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen festgestellt. 3 Std. nach Infektion zeigten Fibrin-assoziierte CD4⁺ T-Zellen eine vermehrte Expression der Aktivierungsmarker CD38 und CD69 gegenüber nicht mit Fibrin kolokalisierten T-Helferzellen (Abb. 41a,b). Zudem konnte in *f12*^{-/-} Mäusen, welche verminderte Fibrinlevel zeigten, ebenfalls eine verminderte CD69 Expression auf T-Helferzellen nachgewiesen werden (Abb. 41c). Hingegen zeigte sich 18 Std. nach Infektion eine vermehrte Expression der Exhaustionmarker GAL3 und PD1 auf den Fibrin-assoziierten T-Helferzellen im Vergleich zu Fibrin-negativen CD4⁺ Zellen (Abb. 41d,g). Zudem war nach Behandlung mit Rivaroxaban die Expression von GAL3 als auch PD1 auf T-Helferzellen vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 41e,h). In *plg*^{-/-} Mäusen wiederum war die GAL3 Expression verstärkt (Abb. 41f).

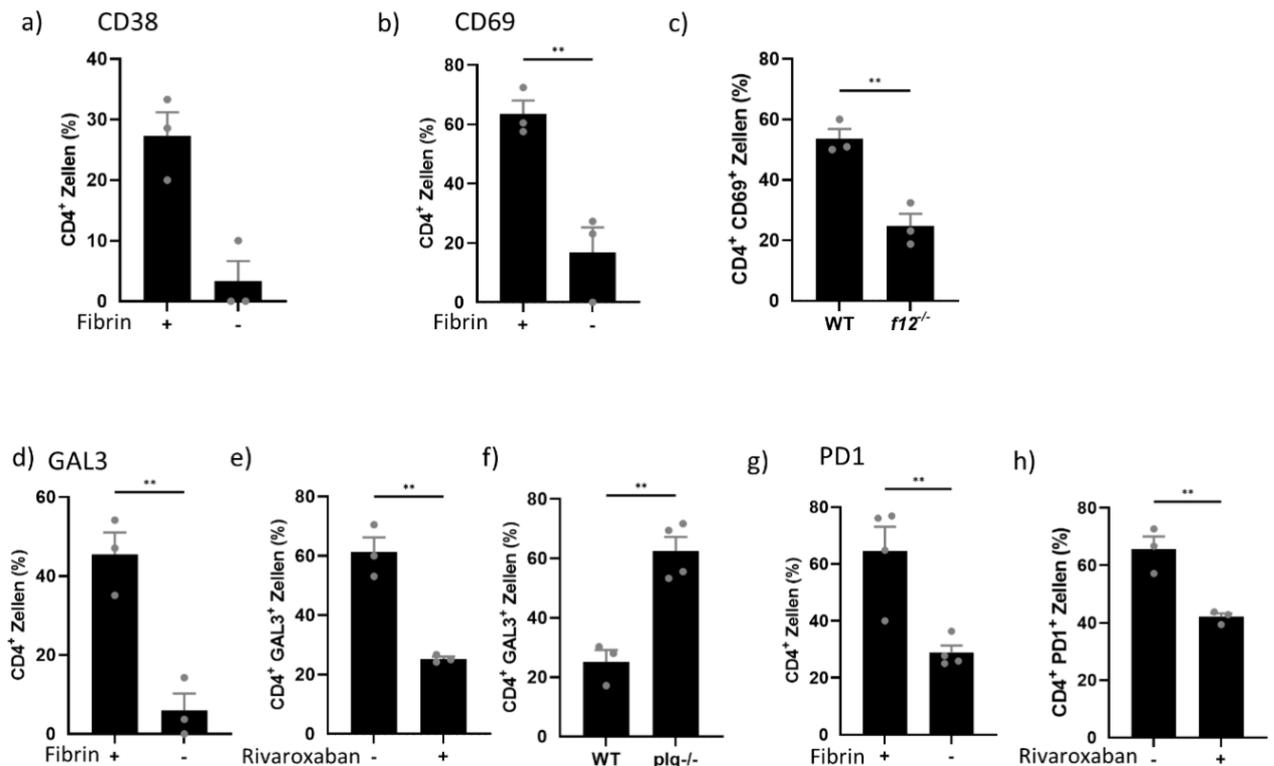


Abbildung 41: Beeinflussung der T-Zellaktivierung und T-Zellexhaustion durch Interaktion mit Fibrin

Anteil der CD38 (a) bzw. CD69 (b) positiven CD4⁺ T-Zellen mit und ohne Fibrinassoziation 3 Std. nach Infektion. c) Anteil der CD69⁺ CD4⁺ Zellen in *f12^{-/-}* Mäusen im Vergleich zum WT. T-Zell-exhaustion 18 Std. nach Infektion als Anteil GAL-3 positiver T-Helferzellen in Fibrin-assoziierten und nicht-assoziierten Zellen (d), sowie nach Behandlung mit Rivaroxaban (e) und in *plg^{-/-}* Mäusen (f). PD-1 Expression in mit Fibrin kolokalisierten und Fibrin-negativen T-Helferzellen 18 Std. nach Infektion bzw. nach Behandlung mit Rivaroxaban (h). Die Punkte geben den Mittelwert aus je 10 Gesichtsfeldern in unterschiedlichen Mäusen an. Mittelwert ± S.E.M. ** p < 0,01.

5.9 Einfluss der Fibrinbildung auf die HIF-1 α Expression

Um die Auswirkungen der mikrovaskulären Fibrinbildung auf die HIF-1 α Expression zu bestimmen, wurde die Expression des Transkriptionsfaktors im Lebergewebe bestimmt. In den Faktor XII-defizienten Tieren war im Vergleich zur Wildtypgruppe die HIF-1 α Expression reduziert (Abb. 42). In den *Nr4a1^{-/-}* Tieren hingegen wurde 6 Std. nach Infektion eine Zunahme des HIF-1 α Signals beobachtet.

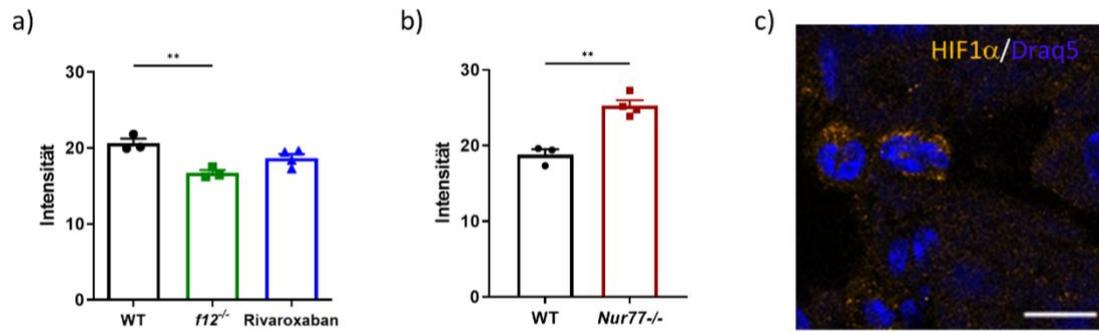


Abbildung 42: HIF-1 α Expression in *f12*^{-/-} und *Nr4a1*^{-/-} Mäusen

Durchschnittliche Intensität des HIF-1 α Signals in der Immunhistochemie der Leber, 3 Std. (a) und 6 Std (b) nach Infektion. c) Repräsentative Abbildung 2er HIF-1 α positiver Zellen in der Mikrozirkulation der Leber, Maßstab 10 μ m. Die Punkte beziehen sich auf den Mittelwert der Intensität in 30 Gesichtsfeldern in unterschiedlichen Tieren. Mittelwert \pm S.E.M. ** p<0,01

5.10 Clusterbildung von CD4⁺ T-Zellen

Bei den Analysen der Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen wurde ein Zusammenlagern mehrerer Zellen in den Mikrogefäßen der Leber beobachtet. Diese Konglomerate werden im Folgenden als Cluster oder Zellaggregate bezeichnet.

5.10.1 Clusterbildung in Wildtypmäusen

Zunächst wurde die Clusterbildung in Wildtypmäusen 1, 3, 6 und 18 Std. nach Infektion untersucht. Clusterbildung von CD4⁺ T-Zellen begann vereinzelt bereits nach 3 Std. und stieg im Verlauf bis 18 Std. nach Infektion an (Abb. 43a). Sowohl nach 6 als auch 18 Std. nach Infektion war die Mehrzahl der CD4⁺ T-Zellcluster mit Fibrin assoziiert (Abb. 43b). Neben CD4⁺ T-Zellen konnten auch CD19⁺ B-Zellen in den Clustern detektiert werden (Abb. 43c).

Neben der Assoziation mit B-Zellen wurde in den T-Helferzellclustern auch nach dendritischen Zellen gesucht. Dabei wurden keine LAMP3⁺ folliculäre dendritische Zellen gefunden. Allerdings wurden Makrophagen als weiterer zellulärer Bestandteil der T-Zellaggregate identifiziert (ohne Abbildung).

Als Nächstes wurde die Assoziation von Fibrin in den T-Zellaggregaten quantifiziert. Nach 18 Std. kam es zu einer deutlichen Verminderung der Fibrinmenge außerhalb der Cluster („non-clustered Fibrin“) im Vergleich zur Fibrinverteilung nach 6 Std., während die Fibrinassoziation mit den Clustern („clustered Fibrin“) konstant hoch blieb (Abb. 43d).

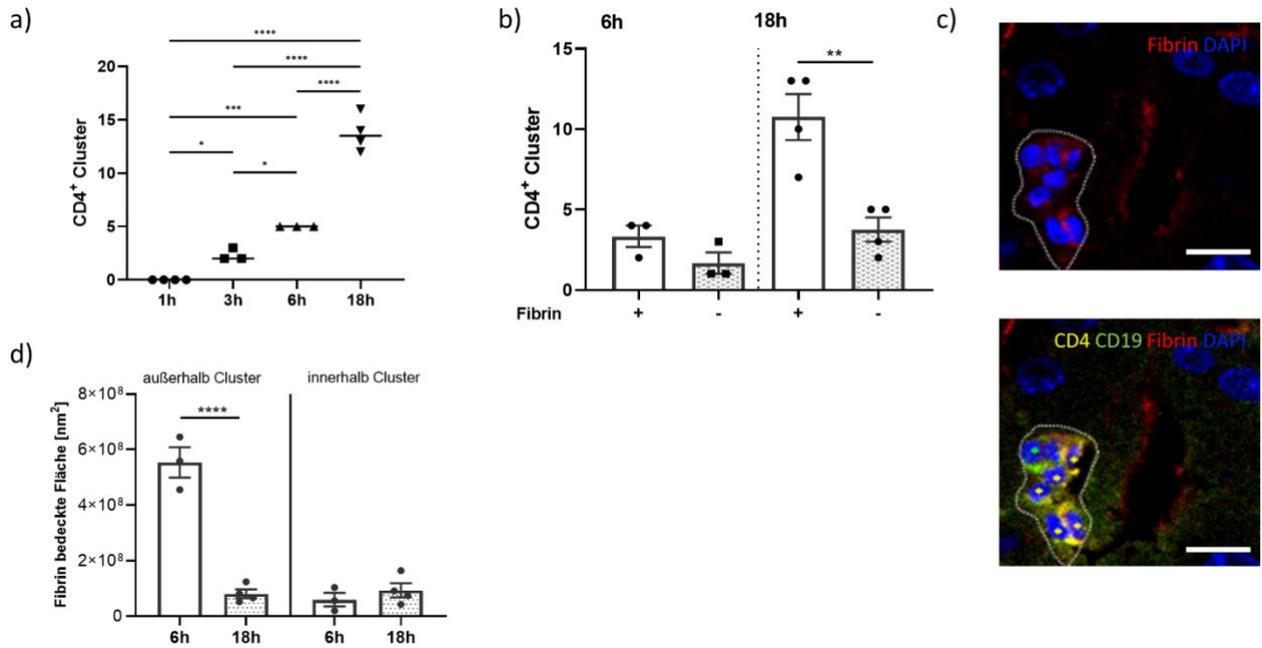


Abbildung 43: Intravasale CD4⁺ Clusterbildung in infizierten Wildtyp-Tieren

Cluster wurden definiert als mindestens 2 Zellen, die sich in einem gemeinsamen Gefäß mit einem maximalen Durchmesser $\leq 30\mu\text{m}$ befinden und deren Kerne $\leq 2\mu\text{m}$ voneinander entfernt sind. **a)** Anzahl der intravasalen CD4⁺ T-Zellcluster nach 1,3,6 und 18 Std. **b)** Assoziation der Cluster mit Fibrin nach 6 und 18 Std. **c)** Repräsentatives Bild eines Fibrin-positiven, intravasalen Clusters aus 5 CD4⁺ Zellen und einer CD19⁺ B-Zelle 18 Std. nach Infektion. Gefäßwand mittels CD31 detektiert (nicht gezeigt), Maßstab 10 μm . **d)** Summe der Fibrin-bedeckten Fläche innerhalb und außerhalb der Cluster. Die Punkte geben den Mittelwert aus 5 (**d**) bzw. die Summe aus 10 (**a,b**) Gesichtsfeldern in unterschiedlichen Tieren an. Mittelwert \pm S.E.M. * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 **** p < 0,0001.

Neben der Assoziation mit Fibrin wurden ebenfalls CD41⁺ Thrombozyten in den Clustern gefunden. In der Tat fanden sich in 86% der T-Helferzellcluster 18 Std. nach Infektion Thrombozyten. (Abb. 44a). Um die funktionelle Relevanz der Thrombozyten für die Clusterbildung zu untersuchen, wurden Thrombozyten vor Induktion der Infektion mittels $\alpha\text{GPIIb/IIIa}$ -Antikörper depletiert. Anschließend war die Anzahl der CD4⁺ Zell-Cluster 18 Std. nach Infektion stark reduziert (Abb. 44b)

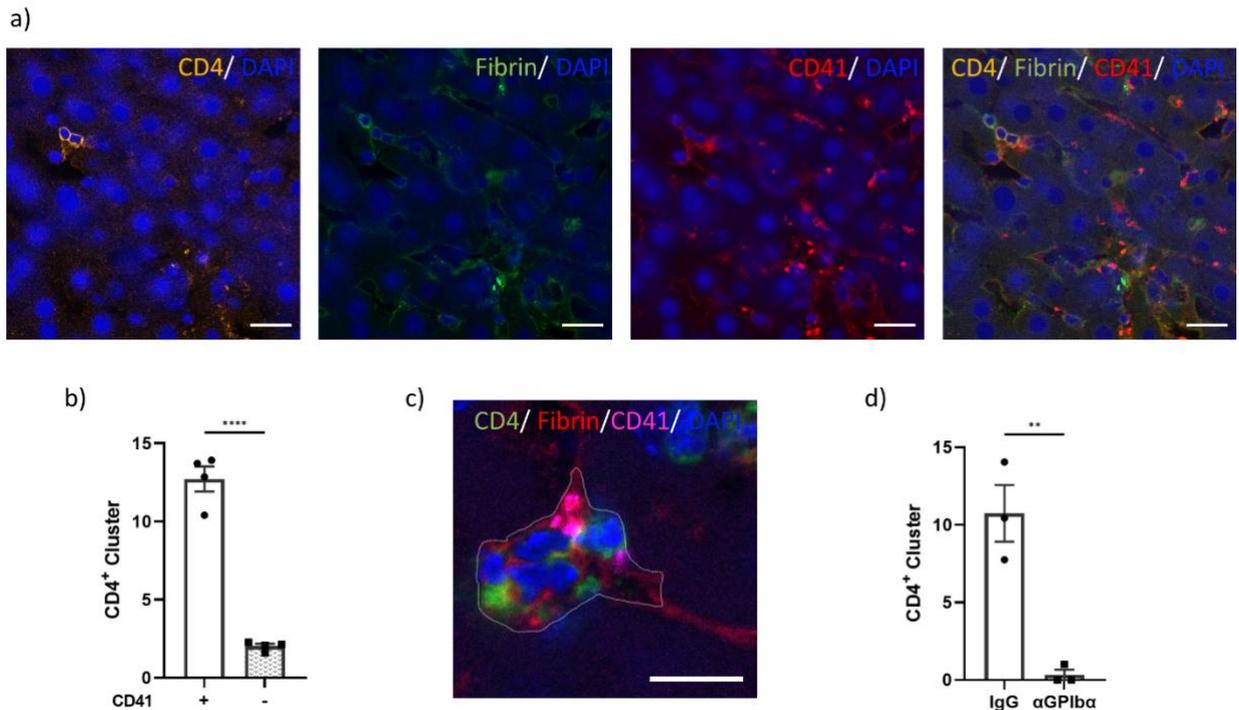


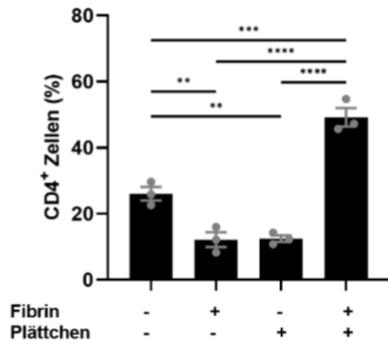
Abbildung 44: Thrombozyten in intravaskulären CD4⁺ T-Zellaggregaten

a) Fibrin- und CD41-Assoziation eines CD4⁺ Zellclusters 18 Std. nach Infektion, Maßstab 20µm; b) Anteil der CD41-assozierten CD4⁺ T-Helferzellcluster 18 Std. nach Infektion; c) Repräsentatives Bild eines CD4⁺ T-Zellclusters welches mit Fibrin und CD41⁺ Thrombozyten assoziiert ist. Maßstab 10µm. d) Ausbildung der CD4⁺ T-Zellaggregaten 18 Std. nach Infektion nach Depletion der Thrombozyten via anti-GPIIb-antikörper. Die Punkte geben die Anzahl der Cluster in 10 Gesichtsfeldern in unterschiedlichen Mäusen an. Mittelwert ± S.E.M. ** p<0,01 *** p<0,001.

5.10.2 Assoziation der T-Helferzellen mit Fibrin und Thrombozyten

Um einen Überblick über die Assoziation der T-Helferzellen mit Fibrin und Thrombozyten zu bekommen, wurde die Kolokalisation dieser Zellen mit Fibrin 18 Std. nach Infektion in Wildtypmäusen untersucht. Die Hälfte aller CD4⁺ T-Zellen zeigte sich sowohl mit Fibrin als auch Thrombozyten assoziiert, während jeweils 12% der Zellen mit einem der beiden Komponenten lokalisiert waren (Abb. 45a). Des Weiteren konnte innerhalb der Cluster („clustered“) ein signifikant größerer Anteil Fibrin-positiver CD4⁺ T-Helferzellen als außerhalb der Cluster („single“) festgestellt werden (Abb. 45b).

a)



b)

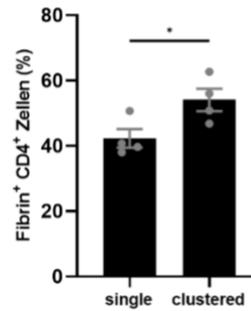


Abbildung 45: Kolo-kalisation der T-Helferzellen mit Fibrin und/oder Thrombozyten

a) Assoziation der CD4⁺ T-Zellen mit Fibrin und/oder Thrombozyten 18 Std. nach Infektion. b) Anteil der Fibrin-Assoziation der CD4⁺ T-Zellen innerhalb und außerhalb der Cluster 18 Std. nach Infektion. Die Punkte geben den Mittelwert aus je 10 Gesichtsfeldern in unterschiedlichen Mäusen an. Mittelwert \pm S.E.M. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$.

5.10.3 Einfluss von Fibrin auf die Clusterbildung

Um den Einfluss der Fibrinbildung auf die Clusterbildung der CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden *pIgf^{-/-}* Mäuse genutzt, bei denen es zu einer vermehrten Fibrinbildung kommt (Abb. 46a)¹⁶⁷. Die Clusterbildung der T-Helferzellen war nach 3 Std. in den *pIgf^{-/-}* Mäuse gegenüber den WT-Mäusen um 82% erhöht (Abb. 46b). 18 Std. nach Infektion war der Unterschied in der Anzahl der CD4⁺ T-Zellen weniger deutlich ausgeprägt (nicht gezeigt). Zur Evaluation möglicher Ursachen für den geringeren Einfluss der weiterhin erhöhten Fibrinbildung 18 Std. nach Infektion in diesem Tiermodell wurde die Fibrinverteilung untersucht. Dabei beobachten wir, dass die Menge des nicht in Clustern vorliegenden Fibrins („non-clustered“) um den Faktor 3,8 gegenüber den WT Mäusen erhöht war, während die Menge des in Clustern gebundene Fibrin („clustered“) keinen Unterschied zwischen den beiden Modellen aufwies (Abb.46c)

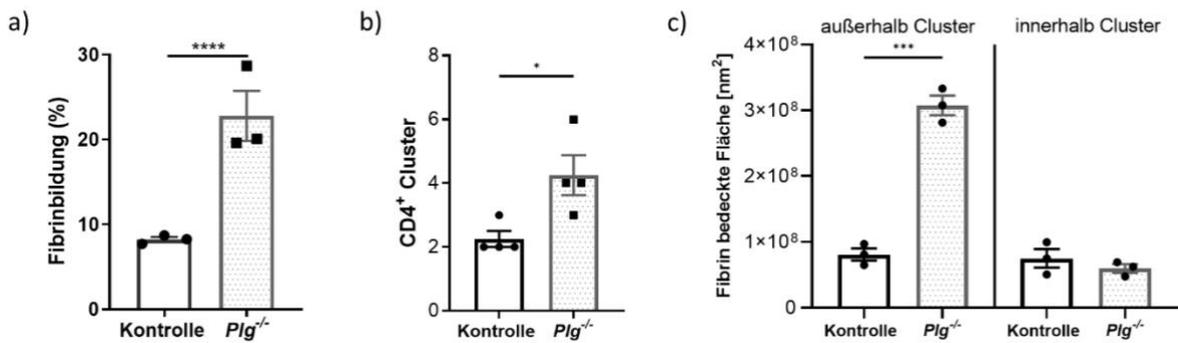


Abbildung 46: Clusterbildung in *plg*^{-/-} Mäusen

a) Intravaskuläre Fibrinbildung in *plg*^{-/-} im Vergleich zu WT Mäusen. **b)** Anzahl der CD4⁺ T-Zellcluster in *plg*^{-/-} Tieren, 3 Std. nach Infektion. **c)** Verteilung des Fibrins inner- und außerhalb der Cluster 18 Std. nach Infektion in *plg*^{-/-} Mäusen und Kontrolltieren; Die Punkte geben den Mittelwert aus 5 Gesichtsfeldern (VF) (**a**, **c**), bzw. die Summe der Cluster in 10 VF (**b**) in verschiedenen Mäusen an. Mittelwert ± S.E.M. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$.

Um die Hypothese der fibrinabhängigen Clusterbildung weiter zu untersuchen, wurde anschließend die Clusterbildung in den mit Rivaroxaban behandelten Mäusen untersucht. Rivaroxaban vermindert die Fibrinbildung stark. Gleichzeitig war die Clusterbildung deutlich reduziert. Die Zahl der T-Helferzellcluster verminderte sich 3 Std. und 6 Std. nach Infektion um 55% bzw. um 43% (Abb. 47a).

Als weiteres Modell mit einer reduzierten Fibrinbildung wurden *f12*^{-/-} Mäuse genutzt. In diesen Mäusen war nach 6 Std. die Zahl der CD4⁺ T-Helferzellcluster gegenüber den WT-Tieren um 67% vermindert (Abb. 47b).

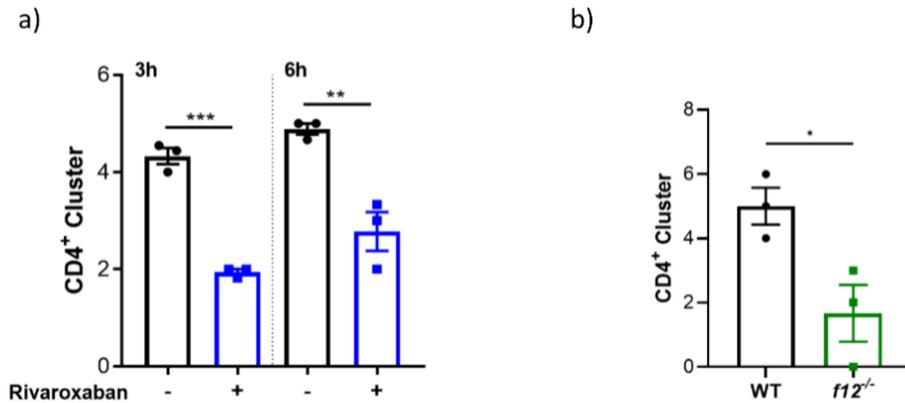


Abbildung 47: Effekt einer verminderten Fibrinbildung auf die CD4⁺ T-Zellclusterbildung

Zahl der CD4⁺ Zellcluster in Rivaroxaban-behandelten Tieren 3 und 6 Std (a) und *f12*^{-/-} Mäusen (b) 3 Std. nach Infektion. Die Punkte geben die Anzahl der Cluster in 10 Gesichtsfeldern in unterschiedlichen Tieren an. Mittelwert ± S.E.M. *p<0,05 **p<0,01 *** p<0,001.

5.10.4 Expression von Regulatoren der Koagulation in Clustern

Auf Grund der Assoziation von Fibrinolyse-Regulatoren mit CD4⁺ T-Zellen untersuchten wir als nächstes die uPAR-Expression der T-Helferzellen 18 Std. nach Infektion. CD4⁺ T-Zellen stellten mit 57% den größten Teil der uPAR⁺ Zellen dar. Dabei konnte auf 21% der CD4⁺ T-Helferzellen eine uPAR-Expression nachgewiesen werden (Abb. 48a). Bei der Differenzierung zwischen aggregierten T-Helferzellen und nicht-aggregierten T-Helferzellen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (Abb. 48b).

Die Expression des negativen Regulators der Fibrinolyse PAI-1 wurde ebenso innerhalb und außerhalb der Cluster bestimmt. 6 Std. nach Infektion war auf 18% der singulären T-Helferzellen und 62% der Zellen in Clustern PAI-1 nachweisbar (Abb. 48c). 18 Std. nach Infektion waren 32% der nicht-aggregierten T-Helferzellen und 57% der aggregierten Zellen mit PAI-1 assoziiert (Abb. 48d). Zu beiden Zeitpunkten bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression innerhalb und außerhalb der Cluster. Nach Depletion der Thrombozyten mittels anti-GPIb α -Antikörper konnte keine signifikante Reduktion der PAI-1 Assoziation mit CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden.

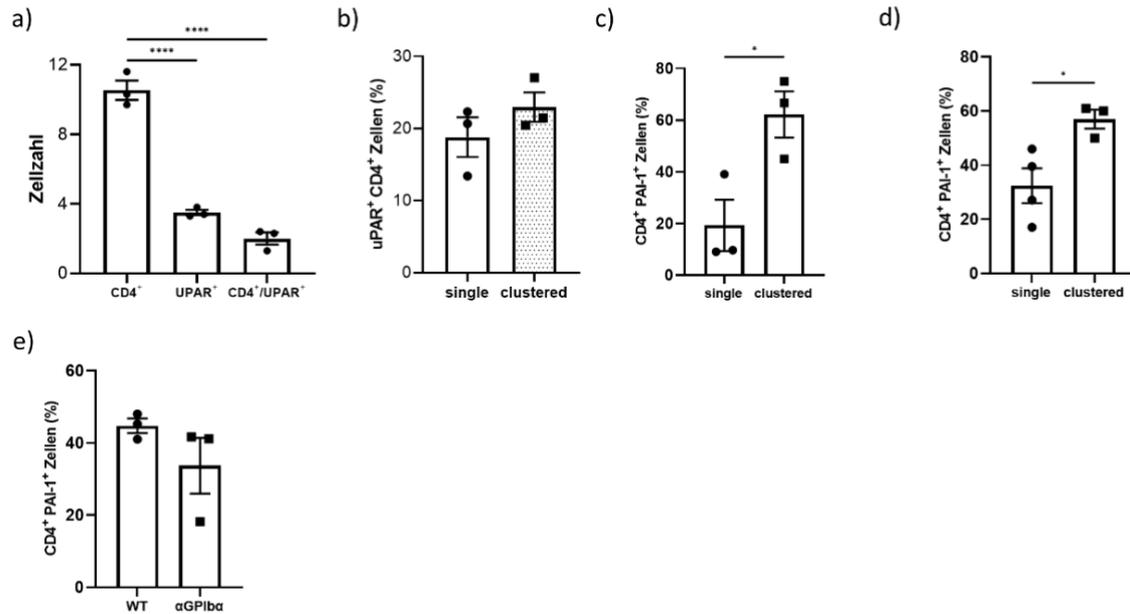


Abbildung 48: Expression von uPAR und PAI-1 auf B- und T-Zellen

a) Anzahl der Zellen welche uPAR, CD4 oder beide Proteine exprimieren, 18 Std nach Infektion; b) Anteil der uPAR⁺ Zellen an der Gesamtheit der CD4⁺ T-Helferzellen inner- und außerhalb der Cluster 18 Std. nach Infektion; Anteil der PAI-1 positiven aggregierten (clustered) und nicht-aggregierten (single) T-Helferzellen 6 Std. (c) und 18 Std. (d) nach Infektion; e) Prozentsatz der PAI-1 positiven T-Helferzellen nach Depletion der Thrombozyten, Die Punkte geben den Mittelwert aus je 10 Gesichtsfeldern in unterschiedlichen Mäusen an. Mittelwert ± S.E.M. * p<0,05 **** p<0,0001.

5.10.5 Einfluss von PAI-1 auf die Clusterbildung

Aufgrund der hohen Assoziation der aggregierten T-Helferzellen mit PAI-1 wurde die funktionelle Relevanz des Proteins für die Clusterbildung untersucht. Die Neutralisation von PAI-1 mittels αPAI-1 Antikörper beeinflusste die Zahl der rekrutierten T-Helferzellen nur geringfügig (Abb. 49a), während sie die Anzahl der CD4⁺ Cluster in der Mikrozirkulation deutlich reduzierte (Abb. 49b).

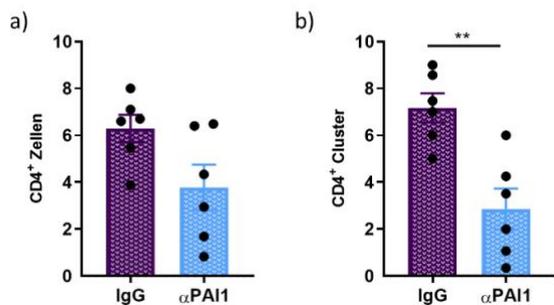


Abbildung 49 CD4⁺ Rekrutierung und Clusterbildung der CD4⁺ T-Zellen nach Neutralisation von PAI-1

Anzahl der rekrutierten T-Helferzellen (a) und der T-Helferzellcluster (b) in der Mikrozirkulation der Leber 18 Std. nach Infektion, Die Punkte geben den Mittelwert aus 10 Gesichtsfeldern (VF) (a) bzw. die Anzahl in 10 VF (b) in unterschiedlichen Mäusen an. Mittelwert ± S.E.M. ** p<0,001.

5.10.6 Proliferation innerhalb der Cluster

Um den Effekt der CD4⁺ Clusterbildung auf die Zellproliferation zu messen, wurde Ki67 als Marker der Zellproliferation genutzt, welcher während der Mitose vermehrt exprimiert wird. Bei den T-Helferzellen konnte kein Unterschied der Ki67 Expression zwischen den in Clustern vorliegenden Zellen und den nicht-clusternden Zellen beobachtet werden (Abb. 50a). Die B-Zellproliferation war hingegen in den mit CD4⁺ T-Zellen kolokalisierenden B-Zellen erhöht (Abb. 50b). Zur weiteren Differenzierung zwischen den Einflüssen einzeln vorliegender CD4⁺ Zellen und Zell-Clustern wurde die B-Zellproliferation in CD4-depletierten Mäusen (Abb. 50c) sowie in mit anti-PAI-1 Antikörper behandelten Mäusen (Abb. 50d) quantifiziert, in denen die Clusterbildung stark reduziert ist. In beiden Modellen war die B-Zellproliferation deutlich Maße reduziert verglichen mit der Kontrollgruppe.

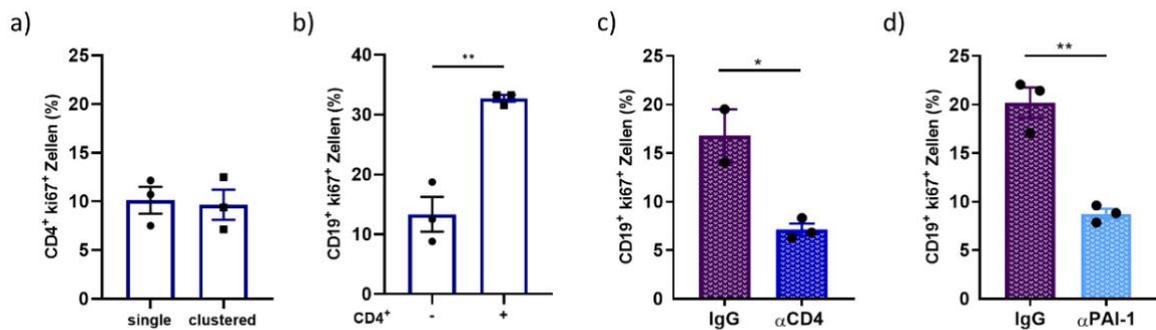


Abbildung 50: Ki67 Expression auf B- und T-Zellen

a) Ki67 exprimierende T-Helferzellen innerhalb der Cluster (clustered) und bei einzeln vorliegenden Zellen (single) **b-d)** Ki67 exprimierende CD19⁺ B-Zellen in Abhängigkeit von ihrer Assoziation mit CD4⁺ T-Zellen (**b**), nach αCD4-Antikörper Injektion (**c**) und αPAI-1 Antikörper Injektion (**d**) 18 Std. nach Infektion. Die Punkte geben den Mittelwert aus 10 Gesichtsfeldern in unterschiedlichen Mäusen an. Mittelwert ± S.E.M. * p<0,05 ** p<0,001.

5.10.7 Fibrin-abhängige IL-2 Assoziation der aggregierten T-Helferzellen

Die lokale Konzentration des T-Zell Zytokins IL-2 war innerhalb der CD4⁺ T-Zell-Cluster deutlich erhöht (Abb. 51a,c). Gleichzeitig zeigten beinahe alle IL-2 assoziierten Zellen eine Kolokalisation mit Fibrin (Abb. 51b).

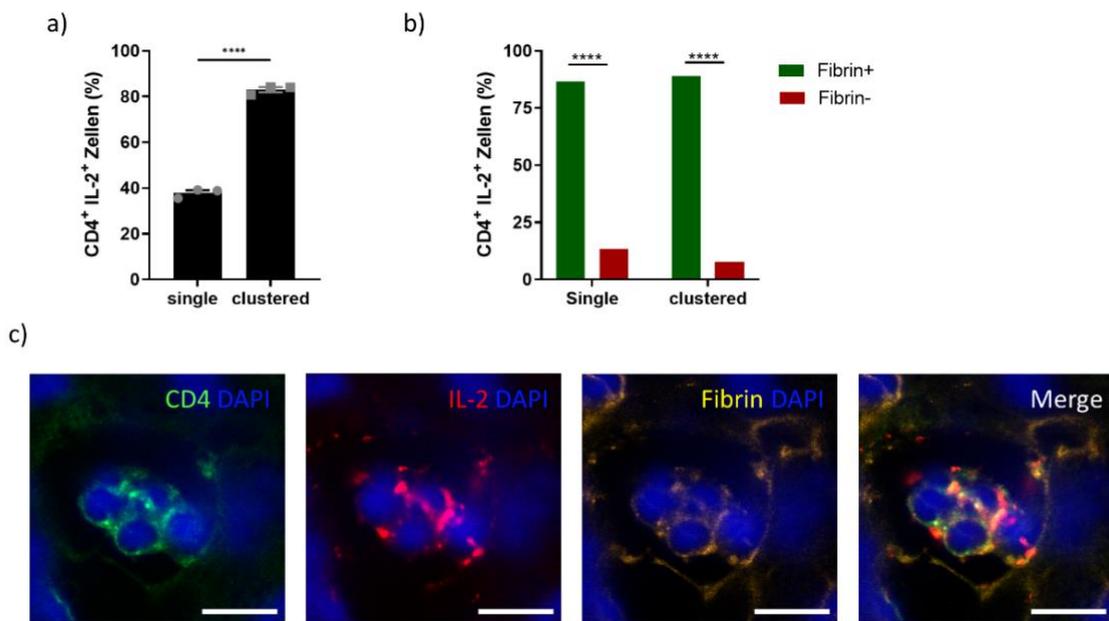


Abbildung 51: IL-2 Expression in der Umgebung von CD4⁺ T-Zellen

Anteil der IL-2-positiven Zellen an der Gesamtheit von aggregierten bzw. einzeln vorliegenden CD4⁺ Zellen (a) sowie der Anteil der Fibrin-assoziierten IL-2-positiven Zellen (b) 18 Std. nach Infektion. Repräsentatives Bild eines IL-2-positiven Fibrin-assoziierten T-Helferzellclusters in der Mikrozirkulation der Leber 18 Std. post Infektion (c). Die Punkte geben den Mittelwert aus 10 Gesichtsfeldern in unterschiedlichen Tieren an. Mittelwert ± S.E.M. **** p<0,0001.

6. Diskussion

6.1 Diskussion des Tiermodells

Zur Analyse des Zusammenspiels zwischen Immunzellrekrutierung und mikrovaskulärer Fibrinbildung in der systemischen bakteriellen Infektion wurde auf Grund der guten Verfügbarkeit das Mausmodell gewählt. Die verhältnismäßig geringe Bakterienzahl von $3,2 \cdot 10^8$ *E.Coli* je Maus verhindert einen septischen Verlauf der Entzündung mit unkontrolliert ablaufender Immunreaktion. In den ersten Stunden nach Infektion war der Allgemeinzustand der Tiere leicht beeinträchtigt. Bereits nach 6 Std. war kein Unterschied mehr im Verhalten der Tiere im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren festzustellen. Diese Beobachtungen decken sich mit den untersuchten Infektionsparametern im Plasma der Tiere. Hier konnten u.a. bei den klinisch vielfach verwendeten Parametern IL-6 und IL-10 3 Std. nach Infektion die höchsten Werte gemessen werden, gefolgt von einem Abfall der Werte 6 Std. nach Infektion. Der Höhepunkt der mikrovaskulären Fibrinbildung wurde zwischen 3 und 6 Std. beobachtet. Die Bakterienzahl in Leber und Milz nahm im gleichen Zeitraum bereits deutlich ab. Dies deutet auf eine frühzeitige mikrobizide Reaktion des Organismus hin. Außerdem wurden Harnstoff als Marker für eine Niereninsuffizienz, GOT, GPT und GLDH zur Abschätzung des Ausmaßes einer Leberschädigung, Cholinesterase zur Abschätzung der Syntheseleistung der Leber und Laktat als Marker für Hypoxie und Zelluntergang im Organismus bestimmt. Unter keiner der untersuchten Bedingungen wurde eine deutliche Veränderung dieser Parameter beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass es im vorliegenden Mausmodell zu keiner signifikanten Organschädigung kommt.

6.2 Diskussion der verwendeten Methoden

Zur Quantifizierung der Bakterienlast der einzelnen Organe wurden die CFUs in Organhomogenaten analysiert. Dies ermöglicht die organspezifische Bestimmung der Anzahl der lebenden Bakterien. In der Fluoreszenzmikroskopie wurden parallel dazu die Gesamtzahl der in der Mikrozirkulation lokalisierten GFP⁺ Bakterien quantifiziert.

Die Fibrinbildung wurde mittels Immunhistochemie bestimmt unter Verwendung einer Endothelfärbung durch α Stabillin-2-Antikörper bzw. α CD31-Antikörper, um spezifisch die mikrovaskuläre Fibrinbildung in der Leber zu analysieren.

Die Quantifizierung der Immunzellrekrutierung erfolgte durch Immunhistochemie und konfokale Mikroskopie. Der Vorteil im Gegensatz zu einer Bestimmung mittels Durchflusszytometrie ist, dass unter anderem eine Aussage zur Lokalisation der Zellen innerhalb des intra- bzw. extravaskulären Kompartments möglich ist und die Gefäßgröße ermittelt werden kann. Ebenfalls können

Interaktionen der Zellen untereinander erfasst werden. Von besonderer Bedeutung ist außerdem die Analyse der Interaktionen der Zellen mit Fibrin innerhalb der Gefäße.

6.3 Diskussion der Ergebnisse

6.3.1 Bidirektionaler Einfluss von Blutgerinnung und Immunzellrekrutierung in der Mikrozirkulation

Der negative Einfluss der Koagulation auf das Bakterienüberleben konnte bereits vielfach belegt werden^{151,168-170}. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde auch in dieser Arbeit in mit Rivaroxaban behandelten Tieren bzw. *f12^{-/-}* Mäusen beobachtet. In beiden Modellen kam es zu einer stark verminderten mikrovaskulären Fibrinbildung, die mit einer erhöhten Bakterienlast in Leber und Milz verbunden war. Dies bekräftigt die Hypothese, dass Fibrin und die Ausbildung von Mikrothrombosen die Elimination von Bakterien fördern. Bestärkt wird diese Hypothese auch durch die beobachtete Kolo-kalisation der Bakterien mit Fibrin in der immunhistochemischen Färbung. Bei der Untersuchung der Zusammensetzung der Immunothrombosen konnte gezeigt werden, dass T-Zellen neben Neutrophilen und klassischen Monozyten den Großteil der beteiligten Fibrin-assoziierten Immunzellen ausmachen. Während klassische Monozyten über ihre TF-Expression als wichtiger Initiator der Koagulation gelten^{171,172}, sind Neutrophile für ihre prothrombogenen Netze (NETs) bekannt^{137,173,174}.

Des Weiteren konnte auch in arteriosklerotischen Thromben eine große Zahl CD4⁺ T-Zellen detektiert werden. Die Anwesenheit von CD4⁺ T-Zellen wurde bislang in arteriosklerotische Plaques beschrieben^{175,176}.

CD4⁺ T-Zellen, hauptsächlich Th17-Zellen, wurden frühzeitig in die Mikrozirkulation der Leber rekrutiert, beeinflusst durch die mikrovaskuläre Fibrinbildung. Sowohl in *f12^{-/-}* Mäusen als auch in mit Rivaroxaban behandelten Mäusen kam es zu einer reduzierten Rekrutierung der CD4⁺ T-Zellen. Ein weiterer Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Fibrinbildung und T-Helferzellrekrutierung ergab sich durch den Nachweis der engen Assoziation von CD4⁺ T-Zellen mit Fibrin. Zudem konnte eine Fibrin-abhängige Veränderung des Phänotyps der T-Helferzellen beobachtet werden. In der Frühphase kam es zu einer vermehrten Aktivierung der CD4⁺ Zellen, im weiteren zeitlichen Verlauf der Infektion war die T-Zell Exhaustion in mikrothrombotischen Arealen erhöht. In mit Rivaroxaban behandelten Tieren war die T-Helferzellaktivierung vermindert, während in Plasminogen-defizienten Mäusen eine Zunahme zu beobachten war. Dies verdeutlicht

erneut den Zusammenhang zwischen Fibrinbildung und Immunmodulation wie es in der Literatur zuvor bereits u.a. für Makrophagen im Rahmen zerebraler Erkrankungen beschrieben wurde¹⁷⁷⁻¹⁸⁰.

Als nächstes wurde der Einfluss der T-Helferzellen auf die Fibrinbildung untersucht. Hierzu wurden CD4⁺ T-Zellen in Bl6-Wildtyp-Mäusen mittels α CD4-Antikörper depletiert. In den mit α CD4-Antikörper behandelten Mäusen kam es zu einer stark vermehrten Fibrinbildung sowie einer Zunahme der mikrovaskulären Gefäßokklusion. Die Zugabe von α TAFI-Antikörper führte zu einer Reduktion der Fibrinbildung in CD4-depletierten Mäusen, während kein Effekt in der Kontrollgruppe gezeigt werden konnte. Dies unterstützt die Hypothese, dass CD4⁺ T-Zellen die Fibrinbildung über eine Verstärkung der Fibrinolyse beeinflussen⁴³.

Nach Depletion der CD4⁺ Zellen kam es ebenfalls zu einer Veränderung der Zusammensetzung von Immunothrombosen. Es konnten insbesondere vermehrt Fibrinthromben ohne Immunzellen detektiert werden, neben einer Zunahme des Anteils der klassischen Monozyten und Neutrophilen innerhalb der Thromben. Dies unterstreicht die Bedeutung des Gleichgewichts zwischen CD4⁺ T-Zellen und den als pro-thrombogen bekannten Neutrophilen und klassischen Monozyten zur Regulation der Thrombenbildung^{137,181}.

Zur weiteren Differenzierung des Einflusses der T-Zellsubtypen wurden IL-23R-defiziente sowie IL17A-defiziente Mausmodelle genutzt. In beiden Modellen war kein Effekt auf die mikrovaskuläre Fibrinbildung festzustellen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass es in diesen Mausmodellen auch zu Veränderungen in anderen Immunzellpopulationen kommt, wie z.B der $\gamma\delta$ T-Zellen, Neutrophilen und Monozyten, sodass kein spezifischer Einfluss der Th17 Zellen untersucht werden kann¹⁸²⁻¹⁸⁶.

Auf Grund des großen Anteils der B1a Zellen an der Gesamtheit der rekrutierten B-Zellen sowie ihrer Assoziation mit uPAR und PAI-1 nutzten wir Bhlhe40^{-/-}/Bhlhe41^{-/-} Mäuse mit reduzierten B1a Zellzahlen¹²⁹. Hier konnte kein Unterschied in der Gerinnungsantwort auf eine bakterielle Infektion beobachtet werden. Allerdings zeigte sich nach 3 Std. eine erhöhte Bakterienbesiedelung in der Leber der B1a-defizienten Mäusen sowie nach 3 und 6 Std. auch in deren Milz. Dies steht im Einklang mit früheren Ergebnissen, welche zeigen, dass B1a-Zellen an der frühen Immunantwort gegenüber bakteriellen Infektionen beteiligt sind^{187,188}. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen aber gegen eine direkte Beeinflussung der Koagulationsantwort durch B1a-Zellen.

In Nr4a1-defizienten Mäusen wurde in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten eine stark verminderte Zahl nicht-klassischer Monozyten festgestellt¹⁸⁹. Trotz vermehrter Fibrinbildung fand sich eine verminderte Zahl CD4-positiver Zellen in der Leber. Nach Injektion nicht-klassischer

Monozyten in die Nr4a1^{-/-} Mäuse konnte sowohl bei der T-Helferzellrekrutierung als auch der Fibrinbildung kein Unterschied zum WT gesehen werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass nicht-klassische Monozyten für die T-Zellrekrutierung mitverantwortlich sind, etwa weil nicht-klassische Monozyten als intravasale Antigen-präsentierende Zellen fungieren können¹⁹⁰. Die stark vermehrte Fibrinbildung in Nr4a1^{-/-} Mäusen mag durch den fehlenden fibrinolytischen Effekt der CD4⁺ T-Zellen erklärbar sein.

Neutrophile Granulozyten und die von ihnen freigesetzten NETs aus DNA, Histonen und antimikrobiellen Proteinen haben einen pro-thrombotischen Effekt^{89,191}. Im beschriebenen Infektionsmodell konnten eine Zunahme der Bakterienzahl in der Leber sowie eine Verminderung der Fibrinbildung nach Inhibierung der NET-Bildung festgestellt werden. Diese Konstellation bestärkt die These, dass NETs Initiatoren der Immunothrombose sind¹⁹². Die Beteiligung von Neutrophilen und NETs an der Thrombosebildung wurde zudem bereits in einem Modell der tiefen Beinvenenthrombose nachgewiesen¹³⁷.

6.3.2 Faktor XII beeinflusst die Immunreaktion bei systemischen bakteriellen Infektionen

Faktor XII ist ein wichtiger Gegenstand aktueller Forschung auf Grund seiner Beeinflussung der Thrombusbildung ohne einen nennenswerten Einfluss auf das Blutungsrisikos¹⁹³.

Bei der Analyse der Immunzellrekrutierung in die Mikrozirkulation der Leber in *f12*^{-/-} Tieren zeigte sich eine stark verminderte Zahl der Neutrophilen. Dies konnte bereits für die sterile Infektion in Faktor XII defizienten Mäusen gezeigt werden²⁰. Gleichzeitig wird auch die Faktor XII Freisetzung durch Neutrophile diskutiert¹⁹⁴. Diese Hypothese kann durch die beobachtete Assoziation von Faktor XII mit Neutrophilen bekräftigt werden. Die Aktivierung von Faktor XII scheint zudem durch Freisetzung der NETs verstärkt zu werden¹⁹⁵.

Die gezeigte Assoziation von Faktor XII und *E.Coli* lässt sich durch die direkte Bindung des Gerinnungsfaktors an die bakterielle Oberfläche erklären. Für *S. pyogenes* konnte bereits eine Autoaktivierung von Faktor XII zu Faktor XIIa durch Bindung an die Oberfläche der Bakterien gezeigt werden¹⁹⁶. Auch die Anlagerung von Faktor XII an *E.Coli* und die dortige Aktivierung des Koagulationsfaktors wurden bereits beschrieben¹⁹⁷. Somit könnten auch Bakterien die Koagulation im Rahmen systemischer bakterieller Infektionen initiieren.

Die Zusammenlagerung der Th17-Zellen weist gemeinsam mit der signifikant verminderten T-Helferzellrekrutierung in den *f12*^{-/-} Mäusen auf einen Zusammenhang der zellulären Immunantwort und Faktor XII hin. Des Weiteren konnte die Bindung von Faktor XII an das

mikrovaskuläre Endothel beobachtet werden. Diese Interaktion wurde zuvor bereits für kultivierten Endothelzellen beschrieben¹⁹⁸. Die durch Faktor XII induzierten Veränderungen in der Immunzellrekrutierung gehen mit einer Veränderung der Zytokinspiegel im Plasma der Tiere einher. Es konnte im Rahmen pulmonaler Infekte in humanem Lungengewebe gezeigt werden, dass Faktor XII auch einen direkten Einfluss auf die Zytokinausschüttung nimmt¹⁹⁹. Im Rahmen von autoimmunen zerebralen Infektionen konnte ebenfalls ein Effekt durch Faktor XII auf die Zytokinausschüttung und T-Zelldifferenzierung beschrieben werden²⁰⁰.

6.3.3 Ausbildung intravasaler thrombolymphoider Strukturen

Die Aggregation von T-Zellen und die Ausbildung von tertiären lymphoiden Strukturen in Tumorgewebe wurde in der Literatur bereits beschrieben²⁰¹. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Clustering von CD4⁺ T-Zellen einen wichtigen Faktor für die Rekrutierung und T-Zell-Aktivierung darstellt. In dieser Arbeit konnte erstmals ein intravasales T-Zellclustering gezeigt werden.

Die Ausbildung der Cluster begann bereits 3 Std. nach Infektion. Im zeitlichen Verlauf nahmen sowohl nach 6 als auch 18 Std. Zahl und Größe der Cluster zu, während 48 Std. nach Infektion nur noch eine geringe Anzahl an Clustern nachgewiesen wurde. Dieser zeitliche Verlauf deutet auf eine wichtige Rolle der Clusterbildung in der Frühphase der Infektion hin.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Assoziation der intravasalen Cluster mit Fibrin und Thrombozyten vorliegt. Dabei kommt es im zeitlichen Verlauf zu einer verminderten Degradierung des Fibrins innerhalb der Cluster im Vergleich zu Fibrin, welches außerhalb der Cluster vorliegt. Diese Ergebnisse scheinen zunächst divergent zu der zuvor beschriebenen negativen Regulation der Koagulation durch T-Zellen zu sein. Als Ursache der Hemmung der Fibrinolyse innerhalb der Cluster konnte eine erhöhte PAI-1 Bindung an die T-Helferzellen während der fortgeschrittenen Infektion (18 Std.) identifiziert werden. Diese Hypothese wird durch eine verminderte Ausbildung von T-Zellclustern in Mäusen nach α PAI-1-Antikörper Injektion unterstützt.

Die Bedeutung von Fibrin für die Entstehung der Cluster wurde durch eine deutlich verminderte Anzahl der Cluster in den mit Rivaroxaban behandelten Tieren bzw. *f12^{-/-}* Mäusen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu war in Plasminogen-defizienten Mäusen, welche eine verminderte Fibrinolyse zeigen, die Anzahl der Cluster erhöht.

Die beschriebenen intravasalen T-Helferzell-Cluster, bestehend aus mindestens 2 CD4⁺ T-Zellen, Fibrin und Thrombozyten, werden als thrombolympheide Units (TLUs) bezeichnet (Abb. 52). Diese

Bezeichnung ist angelehnt an die in der Literatur bereits beschriebenen Tertiären lymphoiden Units, welche extravaskulär lokalisiert sind und aus T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen bestehen^{202,203}. Diese deutlich größeren Strukturen als die hier beschriebenen TLUs wurden insbesondere in der chronischen Infektion und in Tumoren beschrieben^{204,205}. Dahingegen konnten in unserem Modell in den TLUs keine folliculären dendritischen Zellen nachgewiesen werden.

Die funktionale Relevanz dieser Strukturen könnte u.a. durch eine lokal erhöhte Konzentration von IL-2 in den TLUs erklärt werden. IL-2 spielt eine wichtige Rolle in der T-Zelldifferenzierung und Entstehung regulatorischer T-Zellen (Tregs)^{206,207}. Des Weiteren wurde ein höherer Anteil proliferierender B-Zellen in Assoziation mit CD4⁺ T-Zellen detektiert. Hingegen war nach Inhibition der TLUs durch die Gabe von α PAI-1-Antikörper die B-Zellproliferation ähnlich reduziert wie nach CD4-Depletion. Tregs und folliculäre T-Helferzellen wurden bereits als Promotoren der B-Zellproliferation beschrieben²⁰⁸⁻²¹⁰.

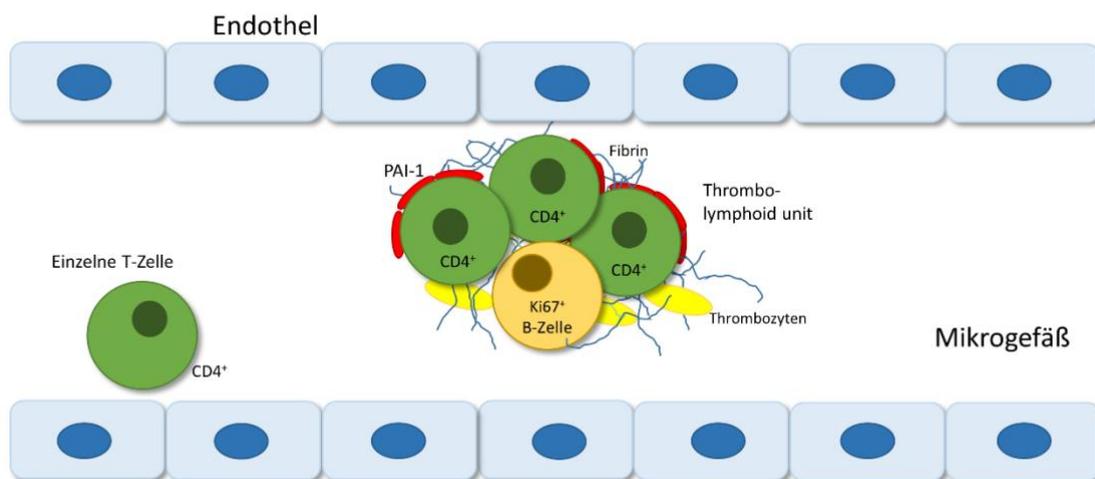


Abbildung 52: Intravasale Thrombolymphe (TLU) in einem Mikrogefäß der Leber

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Assoziation von Immunzellen mit Immunothrombosen charakterisiert. Dabei wurden T-Helferzellen, Neutrophile und klassische Monozyten als reguläre Bestandteile von Mikrothrombosen im Rahmen bakterieller Infektionen identifiziert. T-Helferzellen, zumeist ROR γ t⁺ Th17 Zellen, stellen den größten Anteil der assoziierten Zellen dar. Ihre Rekrutierung wird durch lokale Fibrindepositionen vermittelt. In der Tat zeigte sich in Modellen mit verminderter Fibrinbildung, wie z.B. nach Behandlung mit Rivaroxaban oder in *f12*^{-/-} Mäusen, eine verminderte Rekrutierung der CD4⁺ T-Zellen. Zudem konnte eine hohe Assoziation dieser Zellen mit Fibrin nachgewiesen werden. Die Assoziation mit Fibrin führt in der Frühphase der Infektion zu einer vermehrten T-Helferzellaktivierung, während es im späteren Verlauf zu einer verstärkten T-Zell-Exhaustion innerhalb der Fibrin-reichen Areale kommt.

CD4⁺ T-Zellen dienen als Negativregulatoren der Fibrinbildung in der systemischen bakteriellen Infektion. Die Depletion von CD4⁺ T-Zellen verstärkt in der Tat die mikrovaskuläre Fibrinbildung sowie die Entstehung von Mikrothrombosen. Nach T-Helferzelldepletion werden vermehrt immunzell-negative Mikrothrombosen beobachtet. Nach Zugabe eines α TAFI Antikörpers war die Fibrinbildung in den CD4-depletierten Mäusen reduziert, während in den Kontrollmäusen kein Effekt auf die Fibrinbildung messbar war.

Des Weiteren wurden erstmals thrombolymphoide Units (TLUs) beobachtet, bei denen es sich um intravasale Aggregate aus CD4⁺ T-Zellen mit Fibrin und Thrombozyten handelt. Diese Strukturen bilden sich fibrinabhängig intravaskulär in der Mikrozirkulation. Innerhalb der TLUs war die Fibrinolyse gehemmt, vermittelt über eine verstärkte Bindung von PAI-1 an die Zellmembran der T-Helferzellen.

Die Inhibierung von PAI-1 reduzierte die T-Zellclusterbildung ohne Beeinflussung der CD4⁺ T-Zellrekrutierung. Innerhalb der Cluster konnte eine lokal erhöhte IL-2 Konzentration gemessen werden. Zudem kam es zu einer verstärkten Proliferation von CD19⁺ B-Zellen bei Assoziation mit TLUs. Dieser Effekt konnte durch eine Hemmung der Clusterbildung über die Inhibierung von PAI-1 in ähnlichem Maße reduziert werden, wie durch die Depletion von CD4⁺ T-Zellen. Die Clusterbildung beeinflusst die Proliferation und Exhaustion der CD4⁺ T-Zellen hingegen nicht.

B-Zellen, welche zum größten Teil aus B1a Zellen bestehen, zeigten trotz ihrer frühen Rekrutierung und Assoziation mit koagulations-regulierenden Proteinen keinen Einfluss auf die Fibrinbildung.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch nicht-klassische Monozyten die mikrovaskuläre Fibrinbildung reduzieren können, möglicherweise vermittelt über eine verminderte Rekrutierung der T-Helferzellen. Dieser Effekt konnte durch Re-Injektion von nicht-klassischen Monozyten in Nr4a1^{-/-} Mäusen antagonisiert werden.

Zusammenfassend wurde in der Promotionsarbeit ein bidirektionaler Einfluss zwischen Immunzellen, insbesondere CD4⁺ T-Zellen, und der Koagulation während der systemischen bakteriellen Infektion gezeigt. Dieser Nachweis kann zu einem besseren Verständnis der massiven Koagulationsantwort in der Sepsis beitragen und damit laborchemische Parameter wie das Neutrophilen/Lymphozyten Ratio in ihrer Bedeutung bestärken und neue therapeutische Strategien zur Behandlung ermöglichen.

Abstract

In this thesis, T helper cells, neutrophils and classical monocytes were identified as the major immune cell components of microthrombi in systemic bacterial infection with *E.Coli*. CD4⁺ T cells, mainly consisting of ROR γ t⁺ Th17 cells, represent the largest proportion of microthrombosis-associated cells. Their recruitment to the liver microcirculation was orchestrated by local fibrin deposition. In mouse models with diminished levels of fibrin formation, e.g. rivaroxaban treated mice or *f12*^{-/-} mice, CD4⁺ T cell arrest was decreased. A large proportion of the CD4⁺ cells was associated with fibrin. This leads to higher levels of T cell activation at early timepoints and an increase in T cell exhaustion at later stages in fibrin-rich areas.

CD4⁺ T cells act as negative regulators of coagulation in systemic bacterial infection. CD4 depletion indeed leads to an increased fibrin formation and enhanced development of microthrombi, especially of microthrombi without immune cell components. The addition of an α TAFI antibody diminished fibrin formation in CD4⁺ T cell-depleted mice whereas there was no effect visible in the control group.

Furthermore, the intravascular aggregation of CD4⁺ T cells was detected in the liver microcirculation. Those clusters consist of CD4⁺ T cells, fibrin and platelets and were described as thrombolymploid units (TLUs). They developed at later stages of systemic bacterial infection in a fibrin dependent manner. Inside the TLUs PAI-1 was found abundantly at the cell surface of CD4⁺ T cells while fibrinolysis was reduced.

The inhibition of PAI-1 led to a decrease of cluster formation while T helper cell arrest was not impaired. Inside the clusters, the local concentration of IL-2 was augmented. Additionally, the proliferation of CD19⁺ B cells was promoted when associated with TLUs. The percentage of proliferating B cells was reduced after the neutralization of PAI-1. Therefore, the inhibition of cluster formation reduced B cell proliferation to the same extent as the depletion of CD4⁺ T cells. On the other hand, T cell proliferation and exhaustion were unchanged in TLUs.

B cells, mainly consisting of B1a cells, did not impact fibrin formation despite their early recruitment and association with coagulation-regulating proteins.

Moreover, non-classical monocytes seem to play an important role in coagulation regulation, acting as negative regulators, probably via their impact on T helper cells. This effect could be antagonized by the adoptive transfer of non-classical monocytes into *Nr4a1*^{-/-} mice.

In summary, this work underlines the bidirectional influence between intravascular immune cells, especially CD4⁺ T cells and coagulation in systemic bacterial infection. This can help to understand the role of neutrophil-lymphocyte ratio in different types of thrombosis and might lead to new therapeutic strategies for the treatment of septic complications.

Danksagung

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Bernd Engelmann danken. Durch Sie habe ich mein Interesse an der medizinischen Grundlagenforschung entdeckt. Vielen Dank für die spannenden Themen, die vielen inspirierenden Gespräche und den großen Spielraum, den Sie mir für eigene Ideen im Rahmen dieser Arbeit stets ließen.

Ich danke allen aktuellen und früheren Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, Mano, Lena, Raphael, Sarah, Urjita, Esra, Xiaopeng, Max, Magda-Lena, Flavio, Torben, Michael, Martina und Junfu, für die gute Zusammenarbeit und eure Hilfe, meine Forschung parallel zu Studium und Klinik fortzusetzen. Insbesondere möchte ich Mona und Pia danken, für die vielen lustigen (nächtlichen) Stunden im Labor, eure Unterstützung und gemeinsame Bewältigung (fast) aller Probleme und Frustrationen, die die Laborarbeit mit sich bringt.

Vielen Dank an Herrn Prof. Teupser für die Möglichkeit, am Institut für Laboratoriumsmedizin zu forschen, Frau Prof. Holdt, Herr Wolfgang Wilfert und Frau Britta Pauli für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Analyse der Blutproben.

Ich danke den Mitgliedern der AG Massberg, insbesondere Hellen Ishikawa-Ankerhold für die wertvolle Unterstützung, sowie Prof. Christian Schulz, der mir als Mentor stets mit wertvollem Rat zur Seite stand.

Vielen Dank an Herrn Prof. Moritz Rossner und Herrn Dr. Niels Jansen von der Psychiatrischen Klinik der LMU für die Kooperation und die Bereitstellung der Knock-out-Mäuse.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. Phillip von Hundelshausen für die Bereitstellung der *f12^{-/-}* Mäuse danken, sowie Frau Prof. Wygrecka von der Universität Giessen für ihre Expertise und die Bereitstellung des FXII-Antikörpers.

Vielen Dank an Herrn Prof. Samuel Huber vom Klinikum Hamburg-Eppendorf für die Zusammenarbeit und die Bereitstellung der *IL17A^{-/-}* Mäuse.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken für all ihre Unterstützung und Verständnis in den letzten 4,5 Jahren. Danke, dass Ihr mir ermöglicht habt, so viel Energie und Zeit in dieses Herzensprojekt zu investieren.

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen:

Microvascular immune cell recruitment regulating development of immunothrombosis in systemic bacterial infection

Mueller TT, Meister S, Thakur M, Wohlrab M, Bartoluzzi S, Schmidt-Supprian M, Massberg S, Engelmann B

Vortrag, GTH Kongress am 26.02.2021, Lausanne, Schweiz.

Gewinner "best oral communication 2021"

Concerted control of blood coagulation and T helper cells in intravascular infection

Tonina T. Mueller, Manovriti Thakur, Mona Wohlrab, Sarah Meister, Flavio Karaj, Laura Garcia Perez, Rupert Öllinger, Thomas Engleitner, Torben LangHeinrich, Michael Völkl, Xiaopeng Zhang, Claudia Versteeg, Matthias Mack, Uwe Koedel, Alexander Zigman Kohlmaier, Daniel Teupser, Philipp von Hundelshausen, Christian Weber, Christian Schulz, Sabrina Bortoluzzi, Jürgen Bernhagen, Klaus T. Preissner, Roland Rad, Marc Schmidt-Supprian, Samuel Huber, Steffen Massberg, Hellen Ishikawa-Ankerhold, Bernd Engelmann

To be submitted

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ABLAUF DER GERINNUNGSKASKADE	2
ABBILDUNG 2: DIE ROLLE VON FXII IN DER KOAGULATION NACH AKTIVIERUNG DURCH THROMBOZYTEN	3
ABBILDUNG 3: STRUKTUR DES FIBRINOGENS	4
ABBILDUNG 4: REGULATION DER FIBRINOLYSE DURCH DAS PLASMIN-SYSTEM, PAI-1 UND TAFI	5
ABBILDUNG 5 SUBTYPEN DER CD4 ⁺ T-ZELLEN IM RAHMEN SYSTEMISCHER BAKTERIELLER INFESTIONEN	11
ABBILDUNG 6 ABLAUF DER IMMUNOTHROMBOSE	14
ABBILDUNG 7: INJEKTIONSSCHEMA DER BEHANDLUNG MIT ANTI-CD4 ANTIKÖRPER VOR BEGINN DER INFESTION	22
ABBILDUNG 8: INJEKTIONSSCHEMA DER FAKTOR XA HEMMUNG MIT RIVAROXABAN VOR BEGINN DER INFESTION.....	22
ABBILDUNG 9: FUNKTIONSWEISE DES MULTIPLEX ASSAY.....	25
ABBILDUNG 10: GEFÄßFÄRBUNG MITTELS PECAM-1 UND STABILIN-2 IN DER LEBER.....	28
ABBILDUNG 11: GEFÄßOKKLUSION UND MIKROTHROMBOSE MIT FIBRIN UND NUKLEUS	29
ABBILDUNG 12: AUFBAU UND FUNKTION DER THROMBELASTOMETRIE.....	31
ABBILDUNG 13 ASSOZIATION VON DAPI ⁺ ZELLEN MIT INTRAVASKULÄREM FIBRIN IN DER MIKROZIRKULATION DER LEBER.....	32
ABBILDUNG 14 REKRUTIERUNG DER T-HELPERZELLEN IN DIE MIKROZIRKULATION DER LEBER WÄHREND DER SYSTEMISCHEN BAKTERIELLEN INFESTION	33
ABBILDUNG 15 ASSOZIATION DER T-HELPERZELLEN MIT KOAGULATION-REGULIERENDEN PROTEINEN.....	33
ABBILDUNG 16 CD4 ⁺ T-ZELLEN IN ARTERIOSKLEROTISCHEN THROMBEN	34
ABBILDUNG 17 CD4-DEPLETION IN DER FRÜHPHASE DER INFESTION AUF FIBRINBILDUNG UND DIE ENTSTEHUNG VON MIKROTHROMBOSEN	35
ABBILDUNG 18: BAKTERIENÜBERLEBEN UND FIBRINBILDUNG NACH α CD4-ANTI-KÖRPER INJEKTION.....	36
ABBILDUNG 19 MIKROTHROMBOSEN UND OKKLUSION IN MIT α CD4-ANTI-KÖRPERN BEHANDELTE TIERE.....	37
ABBILDUNG 20 ZUSAMMENSETZUNG DER MIKROTHROMBOSEN IN DER LEBER NACH CD4-DEPLETION	37
ABBILDUNG 21 MIKROVASKULÄRE FIBRINBILDUNG UND GEFÄßOKKLUSIONEN NACH BEHANDLUNG MIT α CD4- PLUS α TAFI- ANTI-KÖRPER.....	38
ABBILDUNG 22: ZYTOKINAUSSCHÜTTUNG NACH CD4-DEPLETION WÄHREND DER SYSTEMISCHEN BAKTERIELLEN INFESTION	39
ABBILDUNG 23: BAKTERIENÜBERLEBEN UND FIBRINBILDUNG IN DER MIKROZIRKULATION DER LEBER VON IL23R ^{-/-} MÄUSEN ...	40
ABBILDUNG 24 LYMPHOZYTENREKRUTIERUNG IN DER MIKROZIRKULATION DER LEBER IN IL17A ^{-/-} MÄUSEN.....	40
ABBILDUNG 25 BAKTERIENÜBERLEBEN UND MIKROVASKULÄRE FIBRINBILDUNG IN IL17A ^{-/-} MÄUSEN.....	41
ABBILDUNG 26: B ZELL REKRUTIERUNG UND ASSOZIATION MIT KOAGULATION-REGULIERENDEN PROTEINEN.....	42
ABBILDUNG 27: BAKTERIENÜBERLEBEN UND MIKROVASKULÄRE FIBRINBILDUNG IN BHLHE40 ^{-/-} BHLHE41 ^{-/-} MÄUSEN.....	43
ABBILDUNG 28: BAKTERIENZAHLE UND MIKROVASKULÄRE FIBRINBILDUNG NACH BEHANDLUNG MIT DNASE I	44
ABBILDUNG 29 REKRUTIERUNG DER NICHT-KLASSISCHEN MONOZYTEN IN DIE MIKROZIRKULATION DER LEBER	45
ABBILDUNG 30: FIBRINBILDUNG UND IMMUNZELLREKRUTIERUNG IN NR4A1 ^{-/-} MÄUSEN	46
ABBILDUNG 31: BLUTPARAMETER DER ORGANSCHÄDIGUNG IN NR4A1 ^{-/-} MÄUSEN	46
ABBILDUNG 32: BAKTERIENZAHLE UND FIBRINBILDUNG IN RIVAROXABAN BEHANDELTE MÄUSEN.....	47

ABBILDUNG 33: IMMUNZELLREKRUTIERUNG IN MIT RIVAROXABAN BEHANDELTEN MÄUSEN	48
ABBILDUNG 34: FIBRINBILDUNG IN <i>F12^{-/-}</i> MÄUSEN	49
ABBILDUNG 35: BAKTERIENÜBERLEBEN UND IMMUNZELLREKRUTIERUNG IN <i>F12^{-/-}</i> MÄUSEN	50
ABBILDUNG 36: PARAMETER DER ORGANSCHÄDIGUNG IN <i>F12^{-/-}</i> DEFIZIENTEN MÄUSEN	51
ABBILDUNG 37: ZYTOKINKONZENTRATIONEN IM PLASMA VON <i>F12^{-/-}</i> MÄUSEN	51
ABBILDUNG 38: KOLOKALISATION DER IMMUNZELLEN MIT FAKTOR XII	52
ABBILDUNG 39: FXII LOKALISATION AN DER LUMINALEN GEFÄßWAND	53
ABBILDUNG 40: KOLOKALISATION VON BAKTERIEN UND FAKTOR XII	54
ABBILDUNG 41: BEEINFLUSSUNG DER T-ZELLAKTIVIERUNG UND T-ZELLEXHAUSTION DURCH INTERAKTION MIT FIBRIN	55
ABBILDUNG 42: HIF-1 α EXPRESSION IN <i>F12^{-/-}</i> UND <i>Nr4a1^{-/-}</i> MÄUSEN	56
ABBILDUNG 43: INTRAVASALE CD4 ⁺ CLUSTERBILDUNG IN INFIZIERTEN WILDTYP-TIEREN	58
ABBILDUNG 44: THROMBOZYTEN IN INTRAVASKULÄREN CD4 ⁺ T-ZELLAGGREGATEN	59
ABBILDUNG 45: KOLOKALISATION DER T-HELPERZELLEN MIT FIBRIN UND/ODER THROMBOZYTEN.....	60
ABBILDUNG 46: CLUSTERBILDUNG IN <i>PLG^{-/-}</i> MÄUSEN	61
ABBILDUNG 47: EFFEKT EINER VERMINDERTEN FIBRINBILDUNG AUF DIE CD4 ⁺ T-ZELLCLUSTERBILDUNG	62
ABBILDUNG 48: EXPRESSION VON UPAR UND PAI-1 AUF B- UND T-ZELLEN.....	63
ABBILDUNG 49 CD4 ⁺ REKRUTIERUNG UND CLUSTERBILDUNG DER CD4 ⁺ T-ZELLEN NACH NEUTRALISATION VON PAI-1	63
ABBILDUNG 50: KI67 EXPRESSION AUF B- UND T-ZELLEN	64
ABBILDUNG 51: IL-2 EXPRESSION IN DER UMGEBUNG VON CD4 ⁺ T-ZELLEN.....	65
ABBILDUNG 52: INTRAVASALE THROMBOLYMPHOIDE UNIT (TLU) IN EINEM MIKROGEFÄß DER LEBER.....	71

Literaturverzeichnis

- 1 Esmon, C. T. & Esmon, N. L. The link between vascular features and thrombosis. *Annu Rev Physiol* **73**, 503-514, doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142300 (2011).
- 2 Bochenek, M. L. & Schäfer, K. Role of Endothelial Cells in Acute and Chronic Thrombosis. *Hamostaseologie* **39**, 128-139, doi:10.1055/s-0038-1675614 (2019).
- 3 Watson, S. P. Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis. *Curr Pharm Des* **15**, 1358-1372, doi:10.2174/138161209787846702 (2009).
- 4 Yau, J. W., Teoh, H. & Verma, S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc Disord* **15**, 130, doi:10.1186/s12872-015-0124-z (2015).
- 5 Nossel, H. L. Differential consumption of coagulation factors resulting from activation of the extrinsic (tissue thromboplastin) or the intrinsic (foreign surface contact) pathways. *Blood* **29**, 331-340 (1967).
- 6 Smith, S. A., Travers, R. J. & Morrissey, J. H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **50**, 326-336, doi:10.3109/10409238.2015.1050550 (2015).
- 7 Lozano, R. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet (London, England)* **380**, 2095-2128, doi:10.1016/s0140-6736(12)61728-0 (2012).
- 8 Grover, S. P. & Mackman, N. Tissue Factor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **38**, 709-725, doi:doi:10.1161/ATVBAHA.117.309846 (2018).
- 9 Grover, S. P. & Mackman, N. Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **38**, 709-725, doi:10.1161/atvbaha.117.309846 (2018).
- 10 Mast, A. E. Tissue Factor Pathway Inhibitor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **36**, 9-14, doi:doi:10.1161/ATVBAHA.115.305996 (2016).
- 11 Broze, G. J., Jr. & Girard, T. J. Tissue factor pathway inhibitor: structure-function. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**, 262-280, doi:10.2741/3926 (2012).
- 12 Sidonio, R. F., Jr & Zimowski, K. L. TFPI blockade: removing coagulation's brakes. *Blood* **134**, 1885-1887, doi:10.1182/blood.2019002900 (2019).
- 13 Wood, J. P. *et al.* Tissue factor pathway inhibitor-alpha inhibits prothrombinase during the initiation of blood coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 17838-17843, doi:10.1073/pnas.1310444110 (2013).
- 14 Mailer, R. K. W., Hänel, L., Allende, M. & Renné, T. Polyphosphate as a Target for Interference With Inflammation and Thrombosis. *Frontiers in Medicine* **6**, doi:10.3389/fmed.2019.00076 (2019).
- 15 Maas, C. & Renne, T. Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation. *Blood* **131**, 1903-1909, doi:10.1182/blood-2017-04-569111 (2018).
- 16 Renné, T. *et al.* Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *The Journal of Experimental Medicine* **202**, 271, doi:10.1084/jem.20050664 (2005).

- 17 Grover, S. P. & Mackman, N. Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **39**, 331-338, doi:10.1161/atvbaha.118.312130 (2019).
- 18 Key, N. S. Epidemiologic and clinical data linking factors XI and XII to thrombosis. **2014**, 66-70, doi:10.1182/asheducation-2014.1.66 (2014).
- 19 Muller, F. *et al.* Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* **139**, 1143-1156, doi:10.1016/j.cell.2009.11.001 (2009).
- 20 Stavrou, E. X. *et al.* Factor XII and uPAR upregulate neutrophil functions to influence wound healing. *The Journal of clinical investigation* **128**, 944-959, doi:10.1172/jci92880 (2018).
- 21 Ghebrehwet, B., Silverberg, M. & Kaplan, A. P. Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J Exp Med* **153**, 665-676 (1981).
- 22 Schmaier, A. H. The elusive physiologic role of Factor XII. *The Journal of clinical investigation* **118**, 3006-3009, doi:10.1172/jci36617 (2008).
- 23 Antoniou, S. Rivaroxaban for the treatment and prevention of thromboembolic disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **67**, 1119-1132, doi:10.1111/jphp.12387 (2015).
- 24 Borensztajn, K. & Spek, C. A. Blood coagulation factor Xa as an emerging drug target. *Expert opinion on therapeutic targets* **15**, 341-349, doi:10.1517/14728222.2011.553608 (2011).
- 25 Hertzberg, M. Biochemistry of factor X. *Blood Reviews* **8**, 56-62, doi:https://doi.org/10.1016/0268-960X(94)90007-8 (1994).
- 26 Ebrahimi, S. *et al.* Factor Xa Signaling Contributes to the Pathogenesis of Inflammatory Diseases. *Journal of Cellular Physiology* **232**, 1966-1970, doi:10.1002/jcp.25714 (2017).
- 27 Redman, C. M. & Xia, H. Fibrinogen biosynthesis. Assembly, intracellular degradation, and association with lipid synthesis and secretion. *Ann N Y Acad Sci* **936**, 480-495 (2001).
- 28 Veklich, Y. I., Gorkun, O. V., Medved, L. V., Nieuwenhuizen, W. & Weisel, J. W. Carboxyl-terminal portions of the alpha chains of fibrinogen and fibrin. Localization by electron microscopy and the effects of isolated alpha C fragments on polymerization. *The Journal of biological chemistry* **268**, 13577-13585 (1993).
- 29 Undas, A. & Ariens, R. A. Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**, e88-99, doi:10.1161/atvbaha.111.230631 (2011).
- 30 Takeda, Y. Studies of the metabolism and distribution of fibrinogen in healthy men with autologous 125-I-labeled fibrinogen. *The Journal of clinical investigation* **45**, 103-111, doi:10.1172/jci105314 (1966).
- 31 Riedel, T. *et al.* Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation. *Blood* **117**, 1700-1706, doi:10.1182/blood-2010-08-300301 (2011).
- 32 Standeven, K. F. *et al.* Functional analysis of fibrin {gamma}-chain cross-linking by activated factor XIII: determination of a cross-linking pattern that maximizes clot stiffness. *Blood* **110**, 902-907, doi:10.1182/blood-2007-01-066837 (2007).
- 33 Levi, M. & Poll, T. v. d. Coagulation in Patients with Severe Sepsis. *Semin Thromb Hemost* **41**, 009-015, doi:10.1055/s-0034-1398376 (2015).

- 34 Bennett, J. S. Platelet-fibrinogen interactions. *Ann N Y Acad Sci* **936**, 340-354, doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03521.x (2001).
- 35 Weisel, J. W. & Litvinov, R. I. Fibrin Formation, Structure and Properties. *Subcell Biochem* **82**, 405-456, doi:10.1007/978-3-319-49674-0_13 (2017).
- 36 Fish, R. J. & Neerman-Arbez, M. Fibrinogen gene regulation. *Thromb Haemost* **108**, 419-426, doi:10.1160/th12-04-0273 (2012).
- 37 Köhler, S., Schmid, F. & Settanni, G. The Internal Dynamics of Fibrinogen and Its Implications for Coagulation and Adsorption. *PLoS computational biology* **11**, e1004346, doi:10.1371/journal.pcbi.1004346 (2015).
- 38 Castellino, F. J. & Ploplis, V. A. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost* **93**, 647-654, doi:10.1160/th04-12-0842 (2005).
- 39 Gaffney, P. J. Fibrin degradation products. A review of structures found in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci* **936**, 594-610 (2001).
- 40 Gando, S. Role of fibrinolysis in sepsis. *Semin Thromb Hemost* **39**, 392-399, doi:10.1055/s-0033-1334140 (2013).
- 41 Dellas, C. & Loskutoff, D. J. Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost* **93**, 631-640, doi:10.1160/TH05-01-0033 (2005).
- 42 Brogren, H., Wallmark, K., Deinum, J., Karlsson, L. & Jern, S. Platelets retain high levels of active plasminogen activator inhibitor 1. *PLoS one* **6**, e26762, doi:10.1371/journal.pone.0026762 (2011).
- 43 Urano, T., Castellino, F. J. & Suzuki, Y. Regulation of plasminogen activation on cell surfaces and fibrin. *J Thromb Haemost*, doi:10.1111/jth.14157 (2018).
- 44 Leung, L. L., Nishimura, T. & Myles, T. Regulation of tissue inflammation by thrombin-activatable carboxypeptidase B (or TAFI). *Adv Exp Med Biol* **632**, 61-69 (2008).
- 45 Plug, T. & Meijers, J. C. Structure-function relationships in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost* **14**, 633-644, doi:10.1111/jth.13261 (2016).
- 46 Thomas, M. R. & Storey, R. F. The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost* **114**, 449-458, doi:10.1160/th14-12-1067 (2015).
- 47 Furie, B. & Furie, B. C. Thrombus formation in vivo. *The Journal of clinical investigation* **115**, 3355-3362, doi:10.1172/jci26987 (2005).
- 48 Andrews, R. K. & Berndt, M. C. Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis research* **114**, 447-453, doi:10.1016/j.thromres.2004.07.020 (2004).
- 49 Coppinger, J. A. *et al.* Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* **103**, 2096-2104, doi:10.1182/blood-2003-08-2804 (2004).
- 50 Blair, P. & Flaumenhaft, R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* **23**, 177-189, doi:10.1016/j.blre.2009.04.001 (2009).
- 51 Kulkarni, S. *et al.* A revised model of platelet aggregation. *The Journal of clinical investigation* **105**, 783-791, doi:10.1172/jci7569 (2000).

- 52 Jenne, C. N. & Kubes, P. Platelets in inflammation and infection. *Platelets* **26**, 286-292, doi:10.3109/09537104.2015.1010441 (2015).
- 53 Cox, D., Kerrigan, S. W. & Watson, S. P. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **9**, 1097-1107, doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04264.x (2011).
- 54 de Stoppelaar, S. F., van 't Veer, C. & van der Poll, T. The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost* **112**, 666-677, doi:10.1160/th14-02-0126 (2014).
- 55 Minasyan, H. Sepsis: mechanisms of bacterial injury to the patient. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* **27**, 19, doi:10.1186/s13049-019-0596-4 (2019).
- 56 Guiral, E., Bosch, J., Vila, J. & Soto, S. M. Prevalence of *Escherichia coli* among samples collected from the genital tract in pregnant and nonpregnant women: relationship with virulence. *FEMS Microbiol Lett* **314**, 170-173, doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02160.x (2011).
- 57 Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820, doi:10.1016/j.cell.2010.01.022 (2010).
- 58 van der Poll, T., van de Veerdonk, F. L., Scicluna, B. P. & Netea, M. G. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nature Reviews Immunology* **17**, 407, doi:10.1038/nri.2017.36 (2017).
- 59 Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* **315**, 801-810, doi:10.1001/jama.2016.0287 (2016).
- 60 Denning, N. L., Aziz, M., Gurien, S. D. & Wang, P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Frontiers in immunology* **10**, 2536, doi:10.3389/fimmu.2019.02536 (2019).
- 61 Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **13**, 862-874, doi:10.1038/nri3552 (2013).
- 62 Fleischmann, C. *et al.* Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *American journal of respiratory and critical care medicine* **193**, 259-272, doi:10.1164/rccm.201504-0781OC (2016).
- 63 Rhodes, A. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* **43**, 304-377, doi:10.1007/s00134-017-4683-6 (2017).
- 64 Parkin, J. & Cohen, B. An overview of the immune system. *The Lancet* **357**, 1777-1789, doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7 (2001).
- 65 Delves, P. J. & Roitt, I. M. The Immune System. *New England Journal of Medicine* **343**, 37-49, doi:10.1056/NEJM200007063430107 (2000).
- 66 Sunderkötter, C. *et al.* Subpopulations of Mouse Blood Monocytes Differ in Maturation Stage and Inflammatory Response. *The Journal of Immunology* **172**, 4410, doi:10.4049/jimmunol.172.7.4410 (2004).
- 67 Auffray, C., Sieweke, M. H. & Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology* **27**, 669-692, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557 (2009).
- 68 Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* **19**, 71-82, doi:10.1016/S1074-7613(03)00174-2 (2003).

- 69 Wong, K. L. *et al.* The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* **53**, 41-57, doi:10.1007/s12026-012-8297-3 (2012).
- 70 Tsou, C. L. *et al.* Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *The Journal of clinical investigation* **117**, 902-909, doi:10.1172/jci29919 (2007).
- 71 Hanna, R. N. *et al.* The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes. *Nat Immunol* **12**, 778-785, doi:10.1038/ni.2063 (2011).
- 72 Sumagin, R., Prizant, H., Lomakina, E., Waugh, R. E. & Sarelius, I. H. LFA-1 and Mac-1 Define Characteristically Different Intraluminal Crawling and Emigration Patterns for Monocytes and Neutrophils In Situ. *The Journal of Immunology* **185**, 7057, doi:10.4049/jimmunol.1001638 (2010).
- 73 Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of Experimental Medicine* **204**, 3037, doi:10.1084/jem.20070885 (2007).
- 74 Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T. & Nagy, L. E. Kupffer cells in the liver. *Comprehensive Physiology* **3**, 785-797, doi:10.1002/cphy.c120026 (2013).
- 75 Gomez Perdiguero, E. *et al.* Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* **518**, 547-551, doi:10.1038/nature13989 (2015).
- 76 Naito, M., Hasegawa, G. & Takahashi, K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microscopy research and technique* **39**, 350-364, doi:10.1002/(sici)1097-0029(19971115)39:4<350::Aid-jemt5>3.0.Co;2-I (1997).
- 77 Thomson, A. W. & Knolle, P. A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol* **10**, 753-766, doi:10.1038/nri2858 (2010).
- 78 Kolios, G., Valatas, V. & Kouroumalis, E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol* **12**, 7413-7420 (2006).
- 79 Ebrahimkhani, M. R., Mohar, I. & Crispe, I. N. Cross-presentation of antigen by diverse subsets of murine liver cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **54**, 1379-1387, doi:10.1002/hep.24508 (2011).
- 80 Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**, 159-175, doi:10.1038/nri3399 (2013).
- 81 Basu, S., Dunn, A. & Ward, A. G-CSF: function and modes of action (Review). *Int J Mol Med* **10**, 3-10 (2002).
- 82 Summers, C. *et al.* Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology* **31**, 318-324, doi:10.1016/j.it.2010.05.006 (2010).
- 83 Stark, M. A. *et al.* Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* **22**, 285-294, doi:10.1016/j.immuni.2005.01.011 (2005).
- 84 Shi, J., Fujieda, H., Kokubo, Y. & Wake, K. Apoptosis of neutrophils and their elimination by Kupffer cells in rat liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **24**, 1256-1263, doi:10.1053/jhep.1996.v24.pm0008903407 (1996).
- 85 Phillipson, M. & Kubes, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature medicine* **17**, 1381-1390, doi:10.1038/nm.2514 (2011).

- 86 Sorensen, O. E. & Borregaard, N. Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. *The Journal of clinical investigation* **126**, 1612-1620, doi:10.1172/jci84538 (2016).
- 87 Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532-1535, doi:10.1126/science.1092385 (2004).
- 88 Clark, S. R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine* **13**, 463-469, doi:10.1038/nm1565 (2007).
- 89 Fuchs, T. A. *et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 15880-15885, doi:10.1073/pnas.1005743107 (2010).
- 90 Kimball, A. S., Obi, A. T., Diaz, J. A. & Henke, P. K. The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. *Frontiers in immunology* **7**, 236, doi:10.3389/fimmu.2016.00236 (2016).
- 91 Czaikoski, P. G. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PLoS one* **11**, e0148142, doi:10.1371/journal.pone.0148142 (2016).
- 92 Xu, J. *et al.* Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature medicine* **15**, 1318-1321, doi:10.1038/nm.2053 (2009).
- 93 Maruchi, Y. *et al.* Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock. *Crit Care* **22**, 176, doi:10.1186/s13054-018-2109-7 (2018).
- 94 Zúñiga-Pflücker, J. C. T-cell development made simple. *Nature Reviews Immunology* **4**, 67-72, doi:10.1038/nri1257 (2004).
- 95 Miller, J. F. A. P. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunological Reviews* **185**, 7-14, doi:https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2002.18502.x (2002).
- 96 Gallegos, A. M. & Bevan, M. J. Central tolerance: good but imperfect. *Immunol Rev* **209**, 290-296, doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00348.x (2006).
- 97 Wencker, M. *et al.* Innate-like T cells straddle innate and adaptive immunity by altering antigen-receptor responsiveness. *Nature Immunology* **15**, 80-87, doi:10.1038/ni.2773 (2014).
- 98 Weinstein, J. S., Hernandez, S. G. & Craft, J. T cells that promote B-Cell maturation in systemic autoimmunity. *Immunol Rev* **247**, 160-171, doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01122.x (2012).
- 99 Zhu, J. & Paul, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**, 1557-1569, doi:10.1182/blood-2008-05-078154 (2008).
- 100 Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology* **28**, 445-489, doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101212 (2010).
- 101 Seif, F. *et al.* The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun Signal* **15**, 23, doi:10.1186/s12964-017-0177-y (2017).
- 102 Yamane, H. & Paul, W. E. Memory CD4+ T cells: fate determination, positive feedback and plasticity. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1577-1583, doi:10.1007/s00018-012-0966-9 (2012).
- 103 Sundberg, E. J., Deng, L. & Mariuzza, R. A. TCR recognition of peptide/MHC class II complexes and superantigens. *Seminars in immunology* **19**, 262-271, doi:10.1016/j.smim.2007.04.006 (2007).

- 104 Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* **136**, 2348-2357 (1986).
- 105 Hsieh, C. S. *et al.* Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**, 547-549 (1993).
- 106 Hirahara, K. & Nakayama, T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *International immunology* **28**, 163-171, doi:10.1093/intimm/dxw006 (2016).
- 107 Nakayama, T. *et al.* Th2 Cells in Health and Disease. *Annual review of immunology* **35**, 53-84, doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052350 (2017).
- 108 Dardalhon, V. *et al.* IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3+ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9+ IL-10+ Foxp3- effector T cells. *Nature Immunology* **9**, 1347-1355, doi:10.1038/ni.1677 (2008).
- 109 Deng, Y. *et al.* Th9 cells and IL-9 in autoimmune disorders: Pathogenesis and therapeutic potentials. *Human Immunology* **78**, 120-128, doi:https://doi.org/10.1016/j.humimm.2016.12.010 (2017).
- 110 Chen, T. *et al.* Th9 Cell Differentiation and Its Dual Effects in Tumor Development. *Frontiers in immunology* **11**, 1026, doi:10.3389/fimmu.2020.01026 (2020).
- 111 Wilson, N. J. *et al.* Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* **8**, 950-957, doi:10.1038/ni1497 (2007).
- 112 Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* **6**, 1123, doi:10.1038/ni1254
<https://www.nature.com/articles/ni1254#supplementary-information> (2005).
- 113 Duhon, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* **10**, 857-863, doi:10.1038/ni.1767 (2009).
- 114 Maloy, K. J. & Powrie, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* **2**, 816-822, doi:10.1038/ni0901-816 (2001).
- 115 Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**, 775-787, doi:10.1016/j.cell.2008.05.009 (2008).
- 116 Yadav, M., Stephan, S. & Bluestone, J. A. Peripherally induced tregs - role in immune homeostasis and autoimmunity. *Frontiers in immunology* **4**, 232-232, doi:10.3389/fimmu.2013.00232 (2013).
- 117 Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor *Foxp3*. *Science* **299**, 1057-1061, doi:10.1126/science.1079490 (2003).
- 118 Johnston, R. J. *et al.* Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science* **325**, 1006-1010, doi:10.1126/science.1175870 (2009).
- 119 Lee, S. K. *et al.* B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *Journal of Experimental Medicine* **208**, 1377-1388, doi:10.1084/jem.20102065 (2011).
- 120 Wambre, E., James, E. A. & Kwok, W. W. Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy. *Current opinion in immunology* **24**, 700-706, doi:10.1016/j.coi.2012.07.009 (2012).
- 121 Rolink, A. G. *et al.* B cell development in the mouse from early progenitors to mature B cells. *Immunology letters* **68**, 89-93 (1999).

- 122 Martin, F. & Kearney, J. F. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Current opinion in immunology* **13**, 195-201, doi:[https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00204-1](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00204-1) (2001).
- 123 Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. & Anderton, S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* **3**, 944-950, doi:10.1038/ni833 (2002).
- 124 Martin, F., Oliver, A. M. & Kearney, J. F. Marginal Zone and B1 B Cells Unite in the Early Response against T-Independent Blood-Borne Particulate Antigens. *Immunity* **14**, 617-629, doi:[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00129-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00129-7) (2001).
- 125 Martin, F. & Kearney, J. F. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Current opinion in immunology* **13**, 195-201 (2001).
- 126 Haas, K. M., Poe, J. C., Steeber, D. A. & Tedder, T. F. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* **23**, 7-18, doi:10.1016/j.immuni.2005.04.011 (2005).
- 127 Aziz, M., Holodick, N. E., Rothstein, T. L. & Wang, P. B-1a Cells Protect Mice from Sepsis: Critical Role of CREB. *The Journal of Immunology* **199**, 750, doi:10.4049/jimmunol.1602056 (2017).
- 128 O'Garra, A. *et al.* Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol* **22**, 711-717, doi:10.1002/eji.1830220314 (1992).
- 129 Kreslavsky, T. *et al.* Essential role for the transcription factor Bhlhe41 in regulating the development, self-renewal and BCR repertoire of B-1a cells. *Nat Immunol* **18**, 442-455, doi:10.1038/ni.3694 (2017).
- 130 Samten, B. Regulation of B-1a cells: another novel function of the basic helix-loop-helix transcriptional regulator BHLHE41. *Cellular & Molecular Immunology* **14**, 802-804, doi:10.1038/cmi.2017.75 (2017).
- 131 Drake, T. A., Cheng, J., Chang, A. & Taylor, F. B., Jr. Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis. *Am J Pathol* **142**, 1458-1470 (1993).
- 132 Wang, L., Bastarache, J. A. & Ware, L. B. The coagulation cascade in sepsis. *Curr Pharm Des* **14**, 1860-1869, doi:10.2174/138161208784980581 (2008).
- 133 Wiersinga, W. J., Leopold, S. J., Cranendonk, D. R. & van der Poll, T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* **5**, 36-44, doi:10.4161/viru.25436 (2014).
- 134 Gando, S., Levi, M. & Toh, C. H. Disseminated intravascular coagulation. *Nature reviews. Disease primers* **2**, 16037, doi:10.1038/nrdp.2016.37 (2016).
- 135 Semeraro, N., Ammollo, C. T., Semeraro, F. & Colucci, M. Coagulopathy of Acute Sepsis. *Semin Thromb Hemost* **41**, 650-658, doi:10.1055/s-0035-1556730 (2015).
- 136 Higure, A. *et al.* Macrophages and neutrophils infiltrating into the liver are responsible for tissue factor expression in a rabbit model of acute obstructive cholangitis. *Thromb Haemost* **75**, 791-795 (1996).
- 137 von Brühl, M.-L. *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* **209**, 819, doi:10.1084/jem.20112322 (2012).
- 138 Okamoto, K., Tamura, T. & Sawatsubashi, Y. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care* **4**, 23, doi:10.1186/s40560-016-0149-0 (2016).

- 139 Levi, M. & Ten Cate, H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* **341**, 586-592, doi:10.1056/nejm199908193410807 (1999).
- 140 Guo, R. F. & Ward, P. A. Role of C5a in inflammatory responses. *Annual review of immunology* **23**, 821-852, doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115835 (2005).
- 141 Ward, P. A. The harmful role of c5a on innate immunity in sepsis. *J Innate Immun* **2**, 439-445, doi:10.1159/000317194 (2010).
- 142 Berends, E. T., Kuipers, A., Ravesloot, M. M., Urbanus, R. T. & Rooijackers, S. H. Bacteria under stress by complement and coagulation. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 1146-1171, doi:10.1111/1574-6976.12080 (2014).
- 143 Morgan, B. P. The membrane attack complex as an inflammatory trigger. *Immunobiology* **221**, 747-751, doi:10.1016/j.imbio.2015.04.006 (2016).
- 144 Noris, M. & Remuzzi, G. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol* **33**, 479-492, doi:10.1016/j.semnephrol.2013.08.001 (2013).
- 145 Hamad, O. A., Bäck, J., Nilsson, P. H., Nilsson, B. & Ekdahl, K. N. Platelets, complement, and contact activation: partners in inflammation and thrombosis. *Adv Exp Med Biol* **946**, 185-205, doi:10.1007/978-1-4614-0106-3_11 (2012).
- 146 Lupu, F., Keshari, R. S., Lambris, J. D. & Coggshall, K. M. Crosstalk between the coagulation and complement systems in sepsis. *Thrombosis research* **133 Suppl 1**, S28-31, doi:10.1016/j.thromres.2014.03.014 (2014).
- 147 Palmer, L. J., Damgaard, C., Holmstrup, P. & Nielsen, C. H. Influence of complement on neutrophil extracellular trap release induced by bacteria. *J Periodontal Res* **51**, 70-76, doi:10.1111/jre.12284 (2016).
- 148 de Bont, C. M., Boelens, W. C. & Pruijn, G. J. M. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cellular & molecular immunology* **16**, 19-27, doi:10.1038/s41423-018-0024-0 (2019).
- 149 Hack, C. E. *et al.* Elevated plasma levels of the anaphylatoxins C3a and C4a are associated with a fatal outcome in sepsis. *Am J Med* **86**, 20-26, doi:10.1016/0002-9343(89)90224-6 (1989).
- 150 Silasi-Mansat, R. *et al.* Complement inhibition decreases the procoagulant response and confers organ protection in a baboon model of Escherichia coli sepsis. *Blood* **116**, 1002-1010, doi:10.1182/blood-2010-02-269746 (2010).
- 151 Engelmann, B. & Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 34-45, doi:10.1038/nri3345 (2013).
- 152 Stark, K. & Massberg, S. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *Nat Rev Cardiol*, 1-17, doi:10.1038/s41569-021-00552-1 (2021).
- 153 Mavrommatis, A. C. *et al.* Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Critical care medicine* **28**, 451-457 (2000).
- 154 Umemura, Y., Yamakawa, K., Ogura, H., Yuhara, H. & Fujimi, S. Efficacy and safety of anticoagulant therapy in three specific populations with sepsis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Thromb Haemost* **14**, 518-530, doi:10.1111/jth.13230 (2016).
- 155 Meziari, F., Gando, S. & Vincent, J. L. Should all patients with sepsis receive anticoagulation? Yes. *Intensive Care Med* **43**, 452-454, doi:10.1007/s00134-016-4621-z (2017).

- 156 Iba, T., Levy, J. H., Raj, A. & Warkentin, T. E. Advance in the Management of Sepsis-Induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation. *J Clin Med* **8**, doi:10.3390/jcm8050728 (2019).
- 157 Kudo, D. *et al.* The Treatment Intensity of Anticoagulant Therapy for Patients With Sepsis-Induced Disseminated Intravascular Coagulation and Outcomes: A Multicenter Cohort Study. *Clin Appl Thromb Hemost* **25**, 1076029619839154, doi:10.1177/1076029619839154 (2019).
- 158 Inata, Y. Should we treat sepsis-induced DIC with anticoagulants? *J Intensive Care* **8**, 18, doi:10.1186/s40560-020-0435-8 (2020).
- 159 Semenza, G. L. Life with Oxygen. *Science* **318**, 62-64, doi:10.1126/science.1147949 (2007).
- 160 Blouin, C. C., Pagé, E. L., Soucy, G. M. & Richard, D. E. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1 α . *Blood* **103**, 1124-1130, doi:10.1182/blood-2003-07-2427 (2004).
- 161 Dang, E. V. *et al.* Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* **146**, 772-784, doi:10.1016/j.cell.2011.07.033 (2011).
- 162 Walmsley, S. R. *et al.* Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *The Journal of Experimental Medicine* **201**, 105-115, doi:10.1084/jem.20040624 (2005).
- 163 Whiting, D. & DiNardo, J. A. TEG and ROTEM: Technology and clinical applications. *American Journal of Hematology* **89**, 228-232, doi:10.1002/ajh.23599 (2014).
- 164 Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133-1141, doi:10.1038/ni1261 (2005).
- 165 Volpe, E. *et al.* A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* **9**, 650-657, doi:10.1038/ni.1613 (2008).
- 166 Gagliani, N. *et al.* Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* **523**, 221-225, doi:10.1038/nature14452 (2015).
- 167 Ploplis, V. A. *et al.* Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice. *Circulation* **92**, 2585-2593, doi:10.1161/01.cir.92.9.2585 (1995).
- 168 Tapper, H. & Herwald, H. Modulation of hemostatic mechanisms in bacterial infectious diseases. *Blood* **96**, 2329-2337, doi:10.1182/blood.V96.7.2329 (2000).
- 169 Gaertner, F. & Massberg, S. Blood coagulation in immunothrombosis—At the frontline of intravascular immunity. *Seminars in Immunology* **28**, 561-569, doi:https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.010 (2016).
- 170 Zinsser, H. H. & Pryde, A. W. Experimental study of physical factors, including fibrin formation, influencing the spread of fluids and small particles within and from the peritoneal cavity of the dog. *Ann Surg* **136**, 818-827, doi:10.1097/00000658-195211000-00006 (1952).
- 171 Stojkovic, S. *et al.* IL-33 stimulates the release of procoagulant microvesicles from human monocytes and differentially increases tissue factor in human monocyte subsets. *Thromb Haemost* **117**, 1379-1390, doi:10.1160/th16-10-0784 (2017).
- 172 Fourrier, F. *et al.* Coagulation inhibitor substitution during sepsis. *Intensive Care Med* **21 Suppl 2**, S264-268, doi:10.1007/bf01740765 (1995).

- 173 Martinod, K. & Wagner, D. D. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood* **123**, 2768-2776, doi:10.1182/blood-2013-10-463646 (2014).
- 174 McDonald, B. *et al.* Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood* **129**, 1357-1367, doi:10.1182/blood-2016-09-741298 (2017).
- 175 Fernandez, D. M. *et al.* Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques. *Nature medicine* **25**, 1576-1588, doi:10.1038/s41591-019-0590-4 (2019).
- 176 Li, N. CD4+ T cells in atherosclerosis: regulation by platelets. *Thromb Haemost* **109**, 980-990, doi:10.1160/th12-11-0819 (2013).
- 177 Davalos, D. & Akassoglou, K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology* **34**, 43-62, doi:10.1007/s00281-011-0290-8 (2012).
- 178 Hsieh, J. Y. *et al.* Differential regulation of macrophage inflammatory activation by fibrin and fibrinogen. *Acta Biomaterialia* **47**, 14-24, doi:https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.024 (2017).
- 179 Ryu, J. K. *et al.* Blood coagulation protein fibrinogen promotes autoimmunity and demyelination via chemokine release and antigen presentation. *Nature Communications* **6**, 8164, doi:10.1038/ncomms9164 (2015).
- 180 Luyendyk, J. P., Schoenecker, J. G. & Flick, M. J. The multifaceted role of fibrinogen in tissue injury and inflammation. *Blood* **133**, 511-520, doi:10.1182/blood-2018-07-818211 (2019).
- 181 Kapoor, S., Opneja, A. & Nayak, L. The role of neutrophils in thrombosis. *Thrombosis research* **170**, 87-96, doi:10.1016/j.thromres.2018.08.005 (2018).
- 182 Shiromizu, C. M. & Jancic, C. C. $\gamma\delta$ T Lymphocytes: An Effector Cell in Autoimmunity and Infection. *Frontiers in immunology* **9**, doi:10.3389/fimmu.2018.02389 (2018).
- 183 Hamada, S. *et al.* IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver. *J Immunol* **181**, 3456-3463, doi:10.4049/jimmunol.181.5.3456 (2008).
- 184 Schulz, S. M., Kohler, G., Holscher, C., Iwakura, Y. & Alber, G. IL-17A is produced by Th17, gammadelta T cells and other CD4- lymphocytes during infection with Salmonella enterica serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. *International immunology* **20**, 1129-1138, doi:10.1093/intimm/dxn069 (2008).
- 185 Lockhart, E., Green, A. M. & Flynn, J. L. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* **177**, 4662-4669, doi:10.4049/jimmunol.177.7.4662 (2006).
- 186 Sivick, K. E., Schaller, M. A., Smith, S. N. & Mobley, H. L. T. The innate immune response to uropathogenic Escherichia coli involves IL-17A in a murine model of urinary tract infection. *J Immunol* **184**, 2065-2075, doi:10.4049/jimmunol.0902386 (2010).
- 187 Lenartić, M. *et al.* NKG2D Promotes B1a Cell Development and Protection against Bacterial Infection. *The Journal of Immunology* **198**, 1531-1542, doi:10.4049/jimmunol.1600461 (2017).
- 188 Baumgarth, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* **11**, 34-46, doi:10.1038/nri2901 (2011).
- 189 Li, L. *et al.* Impeding the interaction between Nur77 and p38 reduces LPS-induced inflammation. *Nature Chemical Biology* **11**, 339-346, doi:10.1038/nchembio.1788 (2015).

- 190 Westhorpe, C. L. V. *et al.* Effector CD4+ T cells recognize intravascular antigen presented by patrolling monocytes. *Nature Communications* **9**, 747, doi:10.1038/s41467-018-03181-4 (2018).
- 191 Pfeiler, S., Stark, K., Massberg, S. & Engelmann, B. Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks. *Haematologica* **102**, 206-213, doi:10.3324/haematol.2016.142471 (2017).
- 192 Pfeiler, S., Massberg, S. & Engelmann, B. Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis. *Thrombosis research* **133**, S35-S37, doi:https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.03.016 (2014).
- 193 Kleinschnitz, C. *et al.* Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *The Journal of Experimental Medicine* **203**, 513-518, doi:10.1084/jem.20052458 (2006).
- 194 Didiasova, M., Wujak, L., Schaefer, L. & Wygrecka, M. Factor XII in coagulation, inflammation and beyond. *Cellular Signalling* **51**, 257-265, doi:https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.08.006 (2018).
- 195 Renné, T. & Stavrou, E. X. Roles of Factor XII in Innate Immunity. *Frontiers in immunology* **10**, doi:10.3389/fimmu.2019.02011 (2019).
- 196 Loof, T. G., Deicke, C. & Medina, E. The role of coagulation/fibrinolysis during *Streptococcus pyogenes* infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**, doi:10.3389/fcimb.2014.00128 (2014).
- 197 Herwald, H. *et al.* Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces--a clue to serious complications in infectious diseases. *Nature medicine* **4**, 298-302, doi:10.1038/nm0398-298 (1998).
- 198 Mahdi, F., Madar, Z. S., Figueroa, C. D. & Schmaier, A. H. Factor XII interacts with the multiprotein assembly of urokinase plasminogen activator receptor, gC1qR, and cytokeratin 1 on endothelial cell membranes. *Blood* **99**, 3585-3596, doi:10.1182/blood.V99.10.3585 (2002).
- 199 Hess, R. *et al.* Coagulation factor XII regulates inflammatory responses in human lungs. *Thromb Haemost* **117**, 1896-1907, doi:10.1160/th16-12-0904 (2017).
- 200 Göbel, K. *et al.* Blood coagulation factor XII drives adaptive immunity during neuroinflammation via CD87-mediated modulation of dendritic cells. *Nature Communications* **7**, 11626, doi:10.1038/ncomms11626 (2016).
- 201 Yanguas, A. *et al.* ICAM-1-LFA-1 Dependent CD8+ T-Lymphocyte Aggregation in Tumor Tissue Prevents Recirculation to Draining Lymph Nodes. *Frontiers in immunology* **9**, doi:10.3389/fimmu.2018.02084 (2018).
- 202 Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J. & Fridman, W. H. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* **19**, 307-325, doi:10.1038/s41568-019-0144-6 (2019).
- 203 GeurtsvanKessel, C. H. *et al.* Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 2339-2349, doi:10.1084/jem.20090410 (2009).
- 204 Drayton, D. L., Liao, S., Mounzer, R. H. & Ruddle, N. H. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol* **7**, 344-353, doi:10.1038/ni1330 (2006).
- 205 Germain, C. *et al.* Presence of B Cells in Tertiary Lymphoid Structures Is Associated with a Protective Immunity in Patients with Lung Cancer. *American journal of respiratory and critical care medicine* **189**, 832-844, doi:10.1164/rccm.201309-1611OC (2014).

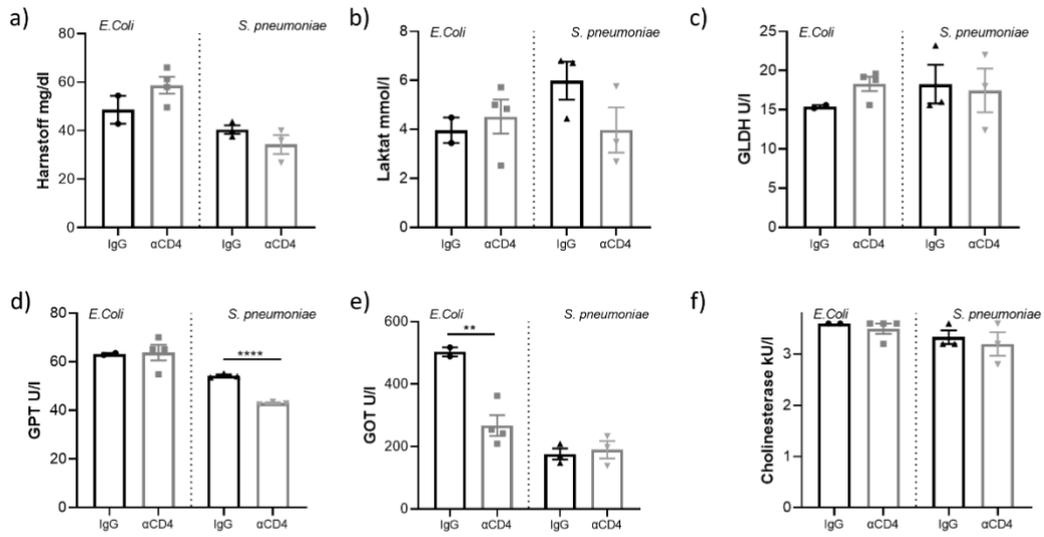
- 206 Ross, S. H. & Cantrell, D. A. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annual review of immunology* **36**, 411-433, doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053352 (2018).
- 207 Boyman, O. & Sprent, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* **12**, 180-190, doi:10.1038/nri3156 (2012).
- 208 Aloulou, M. & Fazilleau, N. Regulation of B cell responses by distinct populations of CD4 T cells. *Biomed J* **42**, 243-251, doi:10.1016/j.bj.2019.06.002 (2019).
- 209 Gao, X., Lin, L. & Yu, D. Ex Vivo Culture Assay to Measure Human Follicular Helper T (Tfh) Cell-Mediated Human B Cell Proliferation and Differentiation. *Methods Mol Biol* **1707**, 111-119, doi:10.1007/978-1-4939-7474-0_8 (2018).
- 210 Qi, H. T follicular helper cells in space-time. *Nat Rev Immunol* **16**, 612-625, doi:10.1038/nri.2016.94 (2016).

Abkürzungen

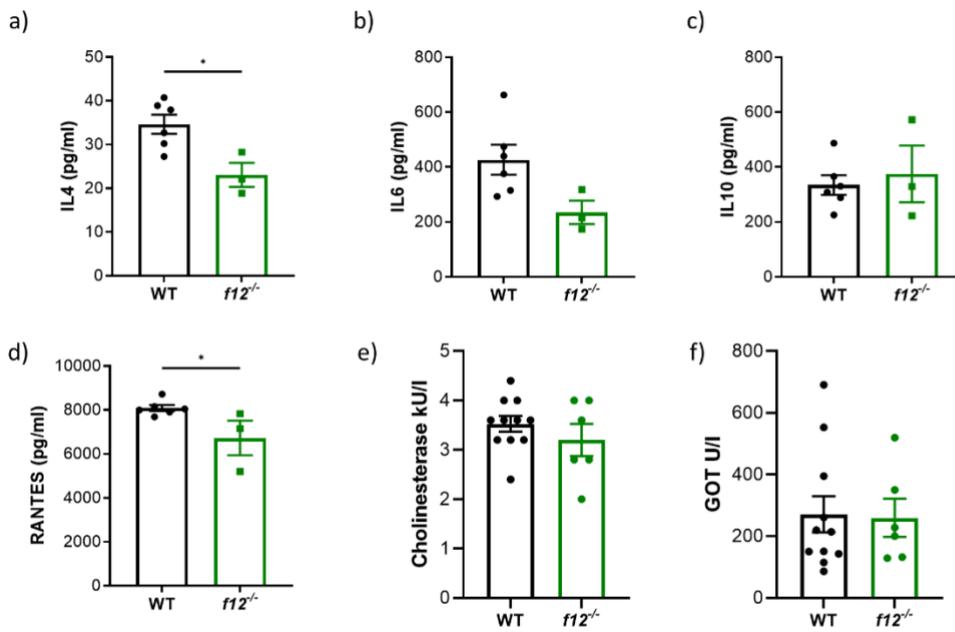
APC	Antigenpräsentierende Zellen
AK	Antikörper
AT	Antithrombin
BSA	Bovines Serum Albumin
BP	Blutplättchen
Ca ²⁺	Calcium
CC3	Cleaved Caspase 3
CCL2	CC-Chemokinligand2
CD	Cluster of Differentiation
CFT	Clot formation time
CFUs	Kolonie bildende Einheiten
cM	klassische Monozyten
CT	Clotting time
D	Deutschland
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
Def.	defizient
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
Fib	Fibrin
FXII	Faktor XII
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GHRP	Gly-His-Arg-Pro
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (ASAT)
GPRP	Gly-Pro-Arg-Pro
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
H	Std.
HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor-1
IFN γ	Interferon gamma
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IRA B-Zellen	Innate Response Activator B-Zellen
LB	Lysogeny Broth
LFA-1	Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen 1
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	Magnetische Zellsortierung
Mac-1	Makrophagen-1-Antigen
Min	Minuten
ncM	Nicht-klassische Monozyten
NETs	Neutrophile extrazelluläre Traps
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PAMPs	Pathogen assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PLG	Plasminogen

PPP	Plättchen Armes Plasma
PRRs	Pathogen erkennende Rezeptoren
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Std.	Stunden
TAFI	Thrombin aktivierbarer Fibrinolyse Inhibitor
TEG	Rotationsthrombelastogramm
TF	Tissue Factor
TFPI	Damage-associated molecular patterns
Th17	T-Helferzelle 17
TLR	Toll-like Rezeptor
TNC	Trinatriumcitrat
uPAR	Urokinase-type plasminogen activator receptor
VF	Visuelles Feld
WT	Wildtyp

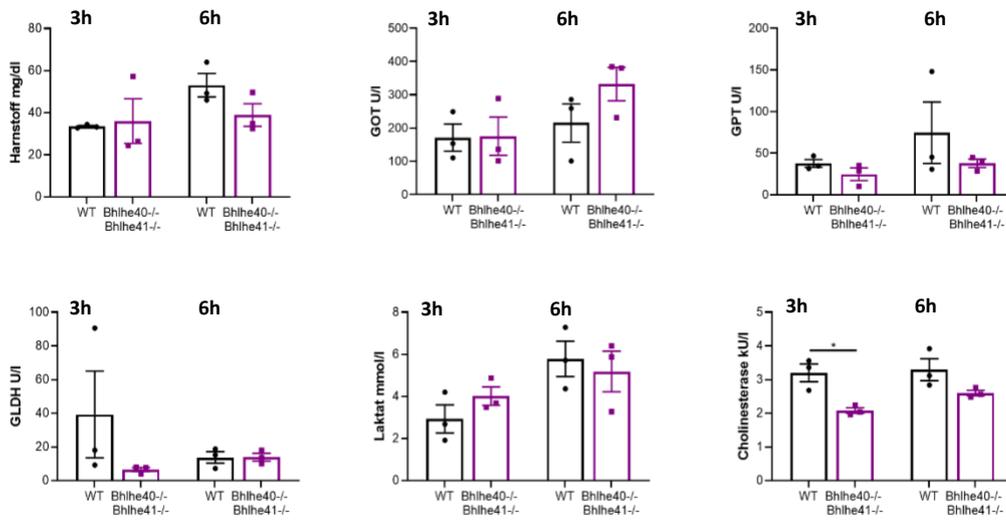
Anhang



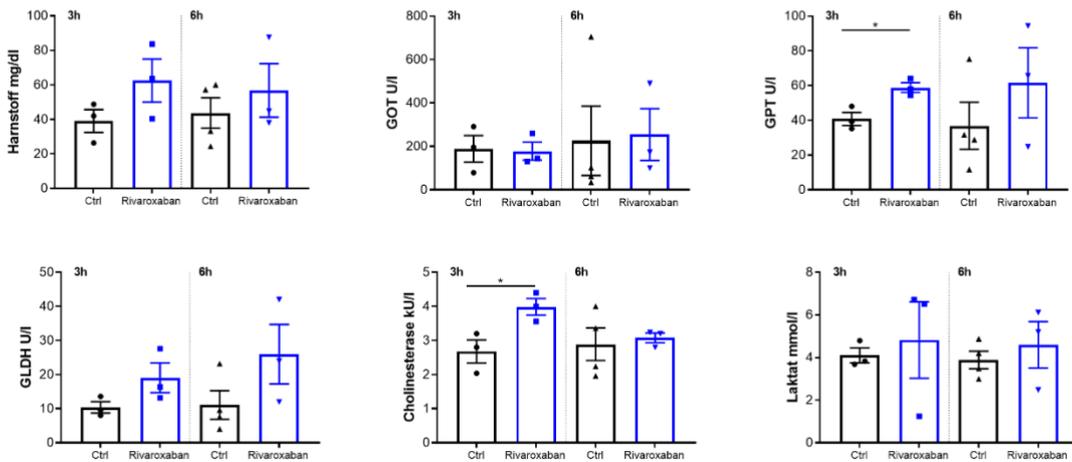
Anhang 1 Parameter der Organschädigung in Anti-CD4-behandelten 6 Std. nach Infektion



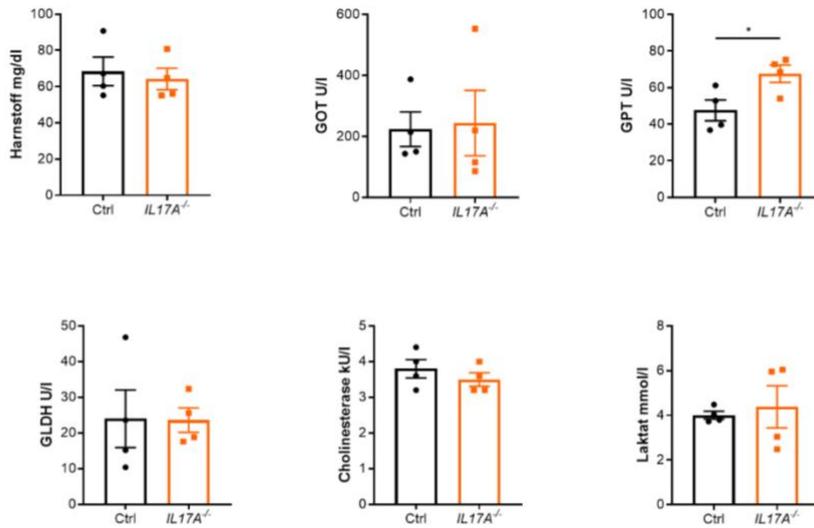
Anhang 2 Zytokinkonzentration und Parameter der Organschädigung in $f12^{-/-}$ Mäusen 3 bis 6 Std. nach Infektion



Anhang 3 Parameter der Organschädigung in Bhlhe40^{-/-} Bhlhe41^{-/-} Mäusen 3 und 6 Std. nach Infektion

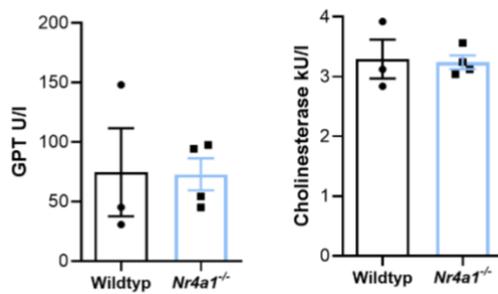


Anhang 4 Parameter der Organschädigung nach Rivaroxaban Injektion 3 und 6 Std. nach Infektion



Anhang 5: Parameter der Organschädigung in IL17A-defizienten Mäusen

Injektion von $3,2 \cdot 10^8$ *E.Coli* in die Schwanzvene der Mäuse, Euthanasie 6 Std. nach Infektion, Bestimmung der Parameter im Plasma, n=4 je Gruppe.



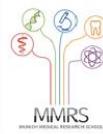
Anhang 6 Organschädigung in Nr4a1^{-/-} Mäusen

Affidavit



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Müller, Tonina Theres

Name, Vorname

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

Zusammenspiel zwischen intravaskulärer Koagulation und Immunzellrekrutierung in der systemischen bakteriellen Infektion

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, 31.03.2022

Tonina Theres Müller

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand