

Aus dem
Institut für Laboratoriumsmedizin
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München



***Die koaguloregulatorische Funktion der T Zellen während der
Pathogen- induzierten Immuno-thrombose***

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

vorgelegt von
Torben LangHeinrich
aus München

2024

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

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Bernd Engelmann

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Michael Spannagl

Dritter Gutachter: PD Dr. Leo Nicolai

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2024

INHALT

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Thrombose	8
1.2 Primäre Hämostase.....	8
1.3 Sekundäre Hämostase.....	8
1.4 Fibrinbildung	10
1.5 Fibrinolyse	10
1.5.1 Regulation der Fibrinolyse.....	11
1.6 Systemische Infektionen und Sepsis	12
1.7 Pathogen induzierte Immunothrombosen	13
1.8 Allgemeine Funktion des systemischen Immunsystems	14
1.8.1 Zellen des angeborenen Immunsystems.....	14
1.8.2 Zellen des adaptiven Immunsystems	16
1.8.3 T Zell Aktivierung.....	19
1.8.4 Migration und Adhäsion (CD11b, ICAM-1, LFA-1)	19
1.9 Einfluss des Alters auf das Immunsystem.....	20
2 Fragestellung	22
2.1 Welchen Einfluss hat die T Zellaktivierung auf die Koagulation?.....	22
2.2 Besitzt Fibrin einen Einfluss auf die Aktivierung der T-Helferzellen?.....	22
2.3 Beeinflusst LFA-1 die Fibrin-vermittelte Aktivierung und Migration der T-Helferzellen?	22
2.4 Besitzen T Zellen eine fibrinolytische Wirkung?	22
2.5 Welchen Einfluss hat das Alter auf die T Zellantwort nach systemischer Infektion.....	22
3 Material.....	23
3.1 Verbrauchsgegenstände	23
4 Methoden.....	29
4.1 In vitro CD4 ⁺ T Zell Versuche	29
4.1.1 Blutentnahme.....	29
4.1.2 Isolierung mononuklearer Zellen aus peripherem humanem Blut	29

4.1.3	CD4 ⁺ T Zellisolierung.....	30
4.1.4	CD4 ⁺ T Zellaktivierung	31
4.1.5	Neutralisierung von Oberflächenproteinen auf CD4 ⁺ T Zellen	31
4.1.6	Fibrincoating.....	31
4.1.7	Immuncytochemie.....	31
4.1.8	Adhäsion von CD4 ⁺ T Zellen auf unterschiedlichen Oberflächen	32
4.1.9	CD4 ⁺ T Zell Migration.....	32
4.1.10	Fibrinolyseassay.....	32
4.2	<i>Isolierung von Plättchen aus peripherem humanem Blut</i>	33
4.3	<i>Aktivierung von Plättchen</i>	33
4.4	<i>Tierversuche</i>	34
4.4.1	Bakterien	35
4.5	<i>Versuchsdurchführung</i>	35
4.5.1	CD4 ⁺ T Zell Depletion	35
4.5.2	Neutralisierung von TAFI	36
4.5.3	Euthanasie und Entnahme bzw. Präparation der Organe	36
4.6	<i>Immunhistochemie</i>	36
4.6.1	Gewebeschnitte	36
4.6.2	Immunhistochemische Färbung	36
4.7	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	37
4.8	<i>Konfokale Lasermikroskopie</i>	37
4.9	<i>Auswertung</i>	37
4.10	<i>FACS Versuche (AGING)</i>	39
4.10.1	FACS Analyse.....	39
4.10.2	Gating Strategie	40
4.11	<i>Statistische Tests</i>	41
5	Ergebnisse	42
5.1	<i>In vitro</i>	42
5.1.1	Zeitabhängige Aktivierung von humanen CD4 ⁺ T Zellen.....	42
5.1.2	Inhibierung der T Zell Clusterbildung	43
5.1.3	Expression profibrinolytischer und proinflammatorischer Proteine in CD4 ⁺ T Zellen	43
5.1.4	Assoziation von PAI-1 mit aktivierten CD4 ⁺ T Zellen	44
5.1.5	CD11b vermittelte T Zell Adhäsion.....	45
5.1.6	Verstärkung der CD4 ⁺ T Zellaktivierung durch Plättchen	46
5.1.7	CD4 ⁺ T Zellaktivierung auf unterschiedlichen Oberflächen	48

5.1.8	Einfluss von LFA-1 auf die Fibrin-vermittelte T Zellaktivierung	49
5.1.9	Einfluss von LFA-1 auf die T Zellmigration	50
5.1.10	Fibrinolyseaktivität von CD4 ⁺ T Zellen	52
5.1.11	Einfluss der T Zell induzierten Fibrinolyse auf die T Zellmigration	54
5.2	<i>Mausmodelle der systemischen bakteriellen Infektion</i>	54
5.2.1	Einfluss von CD4 ⁺ T Zellen auf die Fibrinbildung in der Lunge.....	54
5.2.2	Einfluss von TAFI auf die Fibrindeposition bzw. Mikrothrombose	55
5.2.3	tPA -Assoziation mit rekrutierten CD4 ⁺ T Zellen.....	56
5.2.4	T Zellrekrutierung und Mikrothrombosen in uPAR defizienten Mäusen	57
5.3	<i>Bedeutung des Alterns für die Rekrutierung von T Zellen während der Immunothrombose...</i>	58
5.3.1	FACS Analyse nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>	58
5.3.2	T Zellrekrutierung in das Lungengewebe	58
5.3.3	T Zellrekrutierung in das Lebergewebe	59
5.3.4	CD4 ⁺ T Zellrekrutierung nach 3h, 18h Infektion mit <i>E. coli</i> bei alten Mäusen	60
5.3.5	Rekrutierung von ROR _{γt} ⁺ T Zellen nach Infektion mit <i>E. coli</i> bei alten Mäusen	61
5.3.6	Rekrutierung von CD8 ⁺ T Zellen in die Mikrozirkulation alter Mäuse.....	62
6	Diskussion	63
6.1	<i>Interaktionen von T Zellen und Koagulation in vitro und in vivo</i>	63
6.2	<i>Methoden</i>	63
6.3	<i>T Zellaktivierung und dessen Effekt auf die Koagulation</i>	64
6.4	<i>Der Einfluss von Fibrin auf die T Zellaktivierung</i>	65
6.5	<i>Der Einfluss von LFA-1 auf die Aktivierung und Migration von CD4⁺ T Zellen</i>	66
6.6	<i>CD4⁺ T Zellen und ihre fibrinolytische Wirkung</i>	66
6.7	<i>Einfluss des Alters auf die T Zell Antwort nach systemischer Infektion</i>	68
7	Zusammenfassung	70
8	Abstract	71
9	Danksagung	72
10	Literaturverzeichnis	73
11	Abkürzungsverzeichnis	81
12	Eidesstattliche Erklärung	84

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade	9
Abbildung 2: Schematischer Aufbau von Fibrinogen und dessen Quervernetzung zu Fibrin [1]	10
Abbildung 3: Regulation der Fibrinolyse über PAI-1, A2AP und TAFI	12
Abbildung 4: Entstehung von T-Helferzellsubtypen aus naiven T Zellen	18
Abbildung 5: Auftrennung des peripheren Blutes mittels Ficoll-Paque nach Dichtegradient	30
Abbildung 6: Ablauf des Fibrinolyseassays	33
Abbildung 7: Injektionsschema für CD4 ⁺ T Zelldepletion	35
Abbildung 8: Kolokalisierung von CD4 ⁺ T Zellen mit Fibrin	38
Abbildung 9: Gating Strategie	41
Abbildung 10: Aktivierte CD4 ⁺ T Zellen auf Poly-l-ornithin	42
Abbildung 11: Einfluss von ICAM-1 und CD11b auf die T Zell Clusterbildung	43
Abbildung 12: Assoziation von uPA, uPAR bzw. IL-2 mit aktivierten CD4 ⁺ T Zellen	44
Abbildung 13: Assoziation von koaguloregulatorischen Proteinen mit CD4 ⁺ T Zellen	45
Abbildung 14: T Zell Adhäsion auf Fibrin	46
Abbildung 15: Plättchen steigern CD154 abhängig die T Zellaktivierung in vitro	47
Abbildung 16: T Zellaktivierung auf unterschiedlichen Oberflächen	48
Abbildung 17: Einfluss von LFA-1 auf fibrininduzierte T Zellaktivierung	49
Abbildung 18: T Zellmigration auf Poly-l-ornithin	50
Abbildung 19: T Zellmigration auf Fibrin	51
Abbildung 20: T Zell induzierte Fibrinolyseaktivität nach 3h	52
Abbildung 21: Effekt von LFA-1 auf die T Zell induzierte Fibrinolyseaktivität	53
Abbildung 22: Einfluss der T Zell vermittelten Fibrinolyse-Aktivität auf die T Zell Migration	54
Abbildung 23: Durch Infektion induzierte Fibrinbildung in der Lunge nach T- Helferzell-Depletion	55
Abbildung 24: Fibrinbildung und Entstehung von Mikrothromben nach Hemmung von TAFI	56
Abbildung 25: Assoziation von tPA mit rekrutierten CD4 ⁺ T Zellen	56
Abbildung 26: Einfluss von uPAR auf T Zellrekrutierung und Bildung von Mikrothrombosen	57
Abbildung 27: T Zellrekrutierung in die Mikrozirkulation der Lunge bei alten Mäusen (FACS)	59
Abbildung 28: T Zellrekrutierung in die Leber bei alten Mäusen (FACS)	60
Abbildung 29: Einfluss von Rivaroxaban auf die T Zellrekrutierung bei alten Mäusen	61
Abbildung 30: Rekrutierung von ROR _{γt} ⁺ Zellen	61
Abbildung 31: Rekrutierung von CD8 ⁺ T Zellen in die Mikrozirkulation der Leber in alten verglichen mit jungen Mäusen	62

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsgegenstände.....	23
Tabelle 2: Verwendete Puffer.....	24
Tabelle 3: Verwendete Geräte	25
Tabelle 4: Verwendete Antikörper	26
Tabelle 5: Chemikalien	28
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Tiermodelle innerhalb der jungen Kohorte	34
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Tiermodelle innerhalb der alten Kohorte	34

1 EINLEITUNG

1.1 Thrombose

Bei der Thrombose kommt es durch Ausbildung eines Blutgerinnsels zum teilweise-, bzw. vollständigen Gefäßverschluss. Dieser Prozess ist eng mit dem physiologischen Ablauf der Hämostase verknüpft, welche für den menschlichen Körper überlebensnotwendig ist und nach Beschädigung von Blutgefäßen vor Blutverlust schützt. Thrombotische Erkrankungen können sowohl arterielle (Myokardinfarkt, Schlaganfall), als auch venöse Blutgefäße (Tiefe Beinvenenthrombosen, Lungenembolie) betreffen und bedingen seit vielen Jahren die weltweit höchste Mortalität [2]. Somit stellen diese Art von Erkrankungen eine massive Herausforderung für die Gesellschaft sowie das Gesundheitssystem dar. Da eine effektive antithrombotische Behandlung auch immer mit einem erhöhten Blutungsrisiko einhergeht, gilt es auch in Zukunft an neuartigen Strategien zu arbeiten, um thrombotische Komplikationen zu verhindern, ohne dabei die physiologische Hämostase negativ zu beeinflussen [3].

1.2 Primäre Hämostase

Während der primären Hämostase wird nach Beschädigung des Gefäßendothels Kollagen sowie der subendotheliale von-Willebrand-Faktor (vWF) freigesetzt, an den Thrombozyten über Glykoprotein Ib alpha (GP-Ib α) binden können. Es kommt zur Aktivierung der Thrombozyten mit anschließender Konformationsänderung, wobei es zur Freisetzung prothrombotischer Proteine aus den intrazellulären Granula kommt. Zudem kommt es am Ort der Schädigung zu einer lokalen Vasokontraktion, sowie der Freisetzung verschiedener Gerinnungsmediatoren (Endothelin, Thromboxan A₂) [4].

1.3 Sekundäre Hämostase

Die sekundäre Hämostase wird klassisch in den intrinsischen und den extrinsischen Signalweg unterteilt (**Abb. 1**). Beim extrinsischen Signalweg wird nach Schädigung des Gefäßendothels subendothelialer Tissue Factor (TF) für thrombogene Plasmaproteine zugänglich [5]. TF bindet FVIIa sowie Ca²⁺, was die Umwandlung von Faktor X zu Xa bedingt [6]. TF wird auch in arteriosklerotischen Plaques von Makrophagen (Schaumzellen) sowie auf Monozyten bei septischen Patienten exprimiert [7]. Tumorzellen können Mikrovesikel freisetzen, die TF auf der Oberfläche exprimieren, was zu einer klinisch relevanten venösen Thrombose neigung bei Tumorpatienten beitragen kann [8, 9]. Als regulatorischer Gegenspieler zu TF dient Tissue Factor Pathway Inhibitor

(TFPI), von dem zwei Isoformen existieren. $TFPI_{\alpha}$ wird vor allem auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert, wohingegen $TFPI_{\beta}$ von Endothelzellen exprimiert wird und den TF-FVIIa Komplex und somit die initiale Koagulation inhibiert [10].

Der intrinsische Signalweg (**Abb. 1**) startet mit FXII, der durch negativ geladene Oberflächen (Polyphosphate) auf Thrombozyten aktiviert wird. Über die Aktivierungskaskade von FXI zu FXIa und FIX zu FIXa, wird die Bildung von FXa katalysiert, welches mit seinem Kofaktor FVa den sog. Prothrombinase-Komplex bildet, der die Bildung von Thrombin (FIIa) katalysiert. Thrombin als terminale Protease innerhalb der Gerinnungskaskade katalysiert die Fibrinbildung aus Fibrinogen [11].

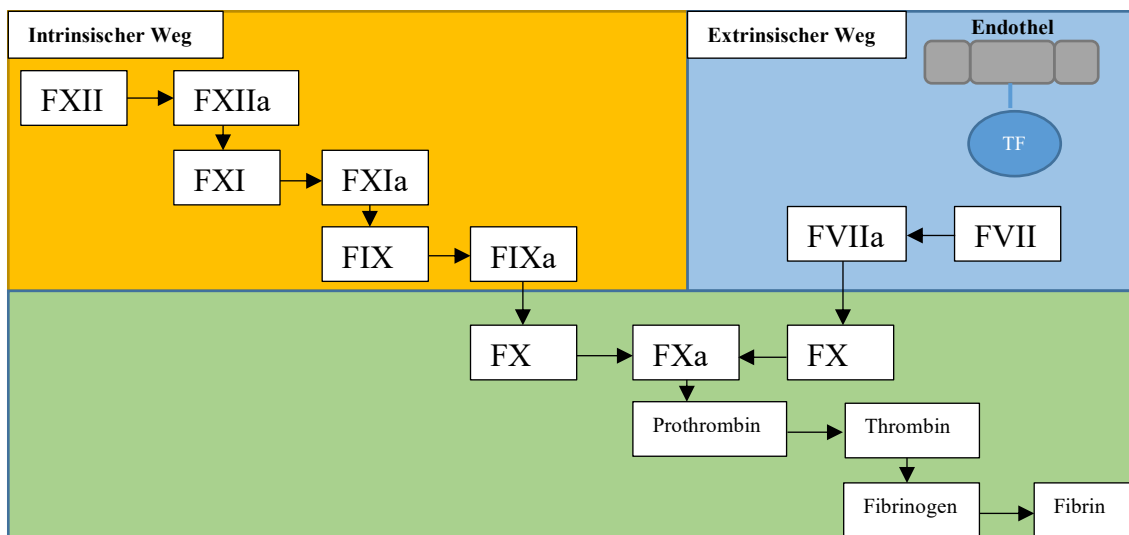


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade

Die moderne Auffassung der Koagulation geht davon aus, dass die beiden beschriebenen Signalwege nicht komplett separat voneinander betrachtet werden können, da der TF-FVIIa Komplex neben der Aktivierung von FX auch FIX aktivieren kann und somit eine Brücke zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Signalweg bildet [12]. Zudem konnte gezeigt werden, dass FXII zwar einen entscheidenden Einfluss innerhalb thrombotischer Erkrankungen besitzt, eine FXII Defizienz im Mausmodell allerdings nicht zu vermehrter Blutungsneigung führt. [13]. Somit hätte man mit FXII einen potenziell vielversprechenden Ansatzpunkt für eine antithrombotische Therapie mit möglicherweise geringer Blutungskomplikation [14].

1.4 Fibrinbildung

Als Stabilisator des Thrombus und finalem Produkt der Gerinnungskaskade wird Fibrin durch die Quervernetzung von Fibrinogen-Monomeren gebildet (**Abb. 2**). Bei Fibrinogen handelt es sich um ein lösliches Glykoprotein, bestehend aus $2A\alpha$, $2B\beta$ -Ketten sowie 2γ Ketten [1]. Die $B\beta$ -Ketten sowie γ -Ketten enthalten die C-Termini und bilden die D-Region, wohingegen die E-Region alle N-Termini der Ketten enthält [15]. Die Bildung von Fibrin wird durch die Abspaltung von Fibrinopeptid (Fp) A und B über Thrombin initiiert. FpA wird als erstes abgespalten, was zur Polymerisation und Bildung sog. Protofibrillen führt [16]. Die langsamere Abspaltung von FpB führt dann zur lateralen Aggregation und ist maßgeblich für die Dicke und Robustheit der Fibrinschicht verantwortlich [17]. Die zusätzliche Quervernetzung durch Faktor XIIIa führt zu einer höheren Flexibilität und schützt vor der Fibrinolyse [18], wobei eine FXIIIa-Defizienz klinisch mit starker Blutungsneigung einhergeht [19].

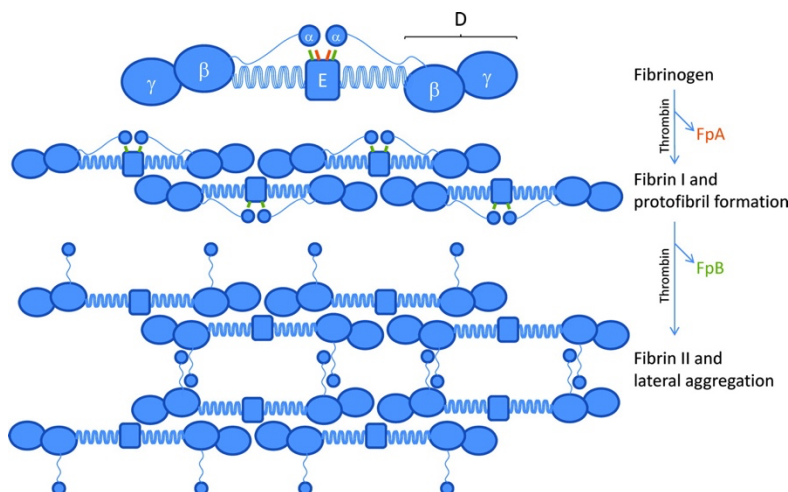


Abbildung 2: Schematischer Aufbau von Fibrinogen und dessen Quervernetzung zu Fibrin [1]

Fibrinogen zählt zu den klassischen Akut-Phase-Proteinen und kann im Zuge einer Entzündungsreaktion in der Leber verglichen zum Basalwert in 20-fach erhöhter Menge synthetisiert werden [20]. Interleukin-6 fördert unter anderem die Bildung von Fibrinogen während der Entzündung [21].

1.5 Fibrinolyse

Unter Fibrinolyse versteht man den Prozess, bei welchem Fibrin durch die Protease Plasmin abgebaut wird. Dabei wird der Prozess der Fibrinolyse unter anderem von der Struktur des Thrombus, der Menge und Art der Thrombus-assoziierten Zellen sowie der

Mikro-Umgebung beeinflusst [22]. Plasmin ist eine primär fibrinolytisch wirksame Peptidase, welche aus dem Zymogen Plasminogen über die beiden Serin-Proteasen Urokinase Typ Plasminogen Aktivator (uPA) beziehungsweise dem gewebespezifischen Plasminogen Aktivator (tPA) entsteht. uPA wird primär von Monozyten und Makrophagen freigesetzt, wohingegen tPA vermehrt von Endothelzellen exprimiert wird und eine höhere Affinität zu Plasminogen besitzt [23]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass fibrinassoziertes tPA eine bis zu 500x höhere katalytische Wirkung auf Plasminogen besitzt als freies tPA im Plasma [24]. Plasmin ist nach dessen Bildung in der Lage über einen positiven Feedback-Mechanismus die Wirkung von uPA und tPA zu verstärken [25]. Nachdem das Fibrin durch Plasmin abgebaut wird, entstehen lösliche Fibrin-Abbauprodukte (FDP). Werden die Fibrin-Polymere an der D-Region abgespalten, entstehen sog. D-Dimere, die klinisch als Marker für Erkrankungen wie der Disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC), tiefen Beinvenenthrombose oder tumorinduzierten Thrombosen verwendet werden [26-28]. Zudem zeigen FDPs auch immunmodulatorische Aktivität, wobei Fibrinopeptid B die Rekrutierung von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen begünstigt [29, 30].

1.5.1 Regulation der Fibrinolyse

Ähnlich wie die Koagulation ist auch die Fibrinolyse ein regulierter Prozess (**Abb. 3**). Neben den bereits beschriebenen prothrombotisch wirksamen Serin-Proteasen uPA und tPA wird die übermäßige Produktion an Plasmin über Serin-Protease Inhibitoren (Serpins) inhibiert. Diese binden die Zielmoleküle kovalent und entfernen sie somit aus der Blutzirkulation. Die wichtigsten Serpine sind dabei Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) sowie $\alpha 2$ -Antiplasmin (A2AP) [22]. A2AP bindet in stöchiometrischer Menge an frei vorliegendes Plasmin, wodurch beide inaktiviert werden, wohingegen Fibrin assoziiertes Plasmin unzugänglich für A2AP ist [31]. PAI-1 wird primär von Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert und ist in der Lage tPA und uPA zu inhibieren. PAI-1 kann durch verschiedene proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , IL-6) hochreguliert werden [32]. Ein zusätzlicher Regulator der Fibrinolyse ist das TAFI-System (thrombin activated fibrinolysis inhibitor). TAFI ist eine Carboxy-Peptidase, welche von Thrombomodulin-gebundenem Thrombin aktiviert wird. Es ist in der Lage C-terminale Lysin und Arginin-Reste des Fibrins abzuspalten, wodurch die Bindungsstellen des Plasminogens bzw. Plasmins verringert werden. Hierdurch wird die

fibrinolytische Aktivität des Plasmins abgeschwächt [33].

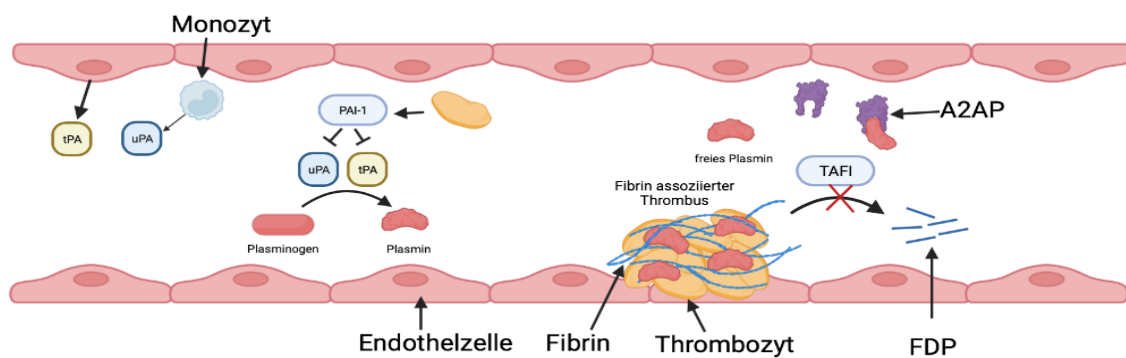


Abbildung 3: Regulation der Fibrinolyse über PAI-1, A2AP und TAFI

Abbildung generiert mit Biorender.com

1.6 Systemische Infektionen und Sepsis

Bei der Sepsis handelt es sich um eine systemische Immunantwort, welche durch eine mikrobielle Invasion in das Blutssystem hervorgerufen werden kann [34]. Die 30-Tage Mortalität nach Sepsiserkrankung liegt derzeit bei 24,4 %, wobei der septische Schock, der mit einer Hyperlactatämie sowie Hypotension einhergeht, eine Mortalität von 34,7 % aufweist [35]. Die wichtigsten bakteriellen Erreger sind neben den gram-negativen Bakterien (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*) die gram-positiven Bakterien (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) [36]. Im Zuge der bakteriellen Infektion kommt es zunächst zur Erkennung der Bakterien über sog. Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) bzw. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) durch Pattern-recognition receptors (PRRs), die auf Zellen des angeborenen Immunsystems sowie Endothelzellen exprimiert werden [37].

In der frühen Phase kommt es zu einer Immunreaktion mit Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, die unter physiologischen Verhältnissen nachfolgend eine kompensatorisch-antiinflammatorische Reaktion induziert. Gerät dieses Gleichgewicht außer Kontrolle, kann es durch die Interaktion zwischen Koagulation und Immunsystem zu einer Hypotension und zum Verlust der endothelialen Barriere kommen, wodurch letztlich ein Multi-Organversagen entstehen kann [38]. Die Therapie der Sepsis basiert auf der frühzeitigen antimikrobiellen Behandlung sowie der Gabe von Vasopressoren und der Volumensubstitution zur Behandlung der Hypotension [39].

Die disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC) ist ein meist pathogen induziertes Syndrom, bei dem es durch ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen in der Mikrozirkulation an verschiedenen Stellen des Körpers zu einer starken Gerinnungsaktivierung mit gesteigertem Verbrauch von Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren kommt. Dies führt zur Ausbildung mikrovaskulärer Thromben, was zu einer Sauerstoffunterversorgung des Gewebes und letztlich zum Multiorganversagen führen kann. Dabei spielen insbesondere die Zytokin-initiierte Aktivierung von TF sowie erhöhte Mengen an PAI-1 eine entscheidende Rolle. Die Überlebenswahrscheinlichkeit innerhalb eines Monats im Zuge einer Sepsis induzierten DIC mit einem Plasma PAI-1 Level von $> 90\text{ng/mL}$ ist dabei signifikant geringer als in der Vergleichsgruppe mit einem Plasma PAI-1 Wert von $< 30\text{ ng/mL}$ [40, 41].

1.7 Pathogen induzierte Immunthrombosen

Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Mikrothrombosen über verschiedene Mechanismen das intravasale Immunsystem verstärken kann [3]. Die Bildung dieser sog. Immunthrombosen stellt einen wichtigen Ansatz im Zuge der Bekämpfung von Pathogenen dar. Dabei werden die Pathogene durch die Bildung von Fibrin örtlich begrenzt und ein möglicher Übertritt in das Gewebe wird verhindert [42]. Durch die Ausbildung von Fibrin wird zudem die Rekrutierung von Immunzellen begünstigt [43]. An dieser physiologischen Form der Thrombose sind insbesondere Zellen des angeborenen Immunsystems (Monozyten und Neutrophile) beteiligt. Nach der Erkennung der Pathogene über deren PRR kommt es zur Aktivierung von Monozyten und Neutrophile, die beide TF exprimieren können. Zudem kommt es zur Inhibierung des negativen Regulators TFPI, was zu einer länger anhaltenden Gerinnungsaktivierung führt [3]. Auch Thrombozyten werden nach Bindung von Pathogenen aktiviert und schütten Zytokine aus, welche wiederum die Aktivierung von Monozyten und die Expression von TF verstärken können [4, 44]. Aktivierte Thrombozyten binden Neutrophile und induzieren die Bildung von sog. Neutrophil extracellular traps (NETs), die prokoagulativ wirken und unter anderem auch Faktor XII aktivieren [45-47]. Einzelne Gerinnungsfaktoren (FVII) können direkt durch das Erkennen von beschädigten Zellen bzw. Pathogenen (PAMPs) aktiviert werden [48]. Auch das Komplementsystem scheint im Zuge der Immunthrombose eine wichtige Rolle zu spielen, wobei die Aktivierung des Komplementsystems zu einer verstärkten Thrombozytenaktivierung führt und

umgekehrt Thrombozytenprodukte wie Chondroitin-Sulfat A zu einer Komplementaktivierung führen können [49-51].

Die Entstehung von Immunothrombosen dient dem Körper somit als effektives Tool gegen systemische Infektionen unterschiedlicher Art. Kommt es allerdings zu einer nicht kontrollierten Aktivierung der Gerinnung im mikrovaskulären Bereich wie es bei Sepsispatienten in vielen Fällen zu erkennen ist, entwickelt sich eine ernsthafte Bedrohung für den Patienten. Dabei ist die beschriebene DIC eng mit der Immunothrombose verknüpft und wird ähnlich wie die Immunothrombose vor allem durch TF und die Entstehung von NETs initiiert [52-54].

1.8 Allgemeine Funktion des systemischen Immunsystems

Die Strategie des Körpers sich gegen Pathogene zu schützen, lässt sich grundlegend in drei aufeinander folgende Schritte aufteilen. Mit Hilfe von anatomisch und physiologischen Barrieren (intakte Haut, mukoziliäre Clearance) wird zunächst verhindert, dass Pathogene in das Gewebe beziehungsweise den Blutkreislauf eintreten [55]. Wird diese Barriere überwunden, sind die Zellen des angeborenen Immunsystems in der Lage eine Vielzahl unterschiedlicher Pathogene zu erkennen und nach Aktivierung unschädlich zu machen. Die darauffolgende Aktivierung des adaptiven Immunsystems, dessen Zellen eine Bandbreite an unterschiedlichen Rezeptoren und Antikörpern gegenüber spezifischen Antigenen bilden können, ermöglicht eine gezielte Immunantwort sowie die Entstehung von Gedächtnisfunktionen [56].

1.8.1 Zellen des angeborenen Immunsystems

Monozyten bilden 10 % der Leukozyten im menschlichen Blut und 4 % im Mausblut. Sie werden im Knochenmark unter Einfluss von Colony stimulating factor 1 (Csf-1) gebildet, wobei Mäuse mit einer Defizienz des dazugehörigen Rezeptors (Csf-1-R) signifikant weniger Monozyten aufweisen [57-59]. Nach Aktivierung der Monozyten werden unter anderem reaktive Stickstoff und Sauerstoffspezies (RNs, ROs) sowie phagolysosomale Enzyme produziert, welche zur Bekämpfung von Pathogenen beitragen [60]. Zudem können Monozyten als Antigen präsentierende Zelle (APC) für Zellen des adaptiven Immunsystems fungieren und sich zu Gewebs-Makrophagen sowie dendritischen Zellen ausdifferenzieren [61]. Beim Menschen werden Monozyten mittels der Rezeptoren CD14 und CD16 in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. CD14^{high} CD16⁻ Monozyten (inflammatorische Monozyten) machen 80-90 % der Monozyten aus. CD14⁻ CD16^{high}

(patrullierende Monozyten) machen circa 10 % der Monozyten aus [62, 63]. CD14⁺ Monozyten exprimieren vermehrt CCR, CCR2, CXCR2 und geringe Level an CX3CR1, während CD16⁺ Monozyten hohe Level an CX3CR1 weniger CCR2 exprimieren [64, 65]. Murine Monozyten exprimieren CD115 und können eingeteilt werden in CX3CR1^{low} CCR2⁺ Ly6C⁺ (inflammatorische Monozyten) sowie CX3CR1^{high} CCR2⁻ Ly6C^{low} (patrullierende Monozyten) [66]. Inflammatorische Monozyten werden in infiziertes Gewebe rekrutiert und können die T-Zellproliferation induzieren. Patrullierende Monozyten verbleiben länger in der Blutzirkulation, wandern an der Gefäßwand entlang und kontrollieren den Zustand der Gefäßwand [67].

Makrophagen sind gewebeständige „Wächter-Zellen“, die in der Lage sind Pathogene über deren Oberflächenstruktur zu erkennen und zu phagozytieren. Zudem besitzen sie eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der Homöostase nach Gewebsverletzung und Entzündungsreaktion [68, 69]. Makrophagen sind weitgehend ausdifferenzierte Zellen, die aus Monozyten unter dem Einfluss von Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) entstehen [70]. Die leberspezifischen Kupffer Zellen sind so positioniert, dass sie Pathogene aus dem Blut effizient phagozytieren können und den Organismus somit vor Organschäden schützen können. Sie werden über das Komplementsystem oder PAMPs aktiviert und sind in der Lage Zytokine, ROs und Lysozyme auszuschütten und als APC für T Zellen zu fungieren [71].

Natürliche Killerzellen (NKC Zellen) sind Effektor-Lymphozyten, welche die Ausbreitung von mikrobiellen Infektionen beziehungsweise die Ausbreitung von Tumorzellen unterbinden. Über benachbarte Zellen und Zytokine (IL-2, IL-12, IL-18) werden NK Zellen aktiviert und können somit Zielzellen mit Hilfe verschiedener Oberflächenrezeptoren (NKG2b, TLR) erkennen und durch Produktion zytotoxischer Substanzen in Apoptose versetzen [72, 73].

Neutrophile werden im Knochenmark produziert, reifen unter dem Einfluss des granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) und stellen die am häufigsten vorkommende Zellpopulation des angeborenen Immunsystems dar [74]. Nachdem sie in den Blutkreislauf abgegeben werden, zirkulieren sie darin, bis sie auf Pathogene stoßen, die sie durch Phagozytose, Produktion antimikrobieller Serinprotease sowie durch Formation der NETs unschädlich machen. Neutrophile gelten als wichtiger Bestandteil der Homöostase der Immunantwort [75]. Im Zuge einer Infektion werden Endothelzellen aktiviert, die Adhäsionsmoleküle exprimieren (ICAM-1,-2) wodurch Neutrophile an das

Gefäßendothel adhäreren können. Neutrophile können danach vor allen in das periphere Gewebe emigrieren [76, 77].

Die Entstehung der NETs wird auch als NETosis bezeichnet und kann von unterschiedlichen Mikroorganismen hervorgerufen werden [78]. NETs können einen maßgeblichen Einfluss auf die vaskuläre Entzündungsreaktion [79], die Thrombosebildung [80] sowie auf die Bekämpfung von Tumorzellen haben [81]. NETs bestehen aus Chromatin sowie antimikrobiell wirksamen Proteinen (Neutrophile Elastase, Matrix Metalloproteinasen und Myeloperoxidasen) [75]. Die NETs werden klinisch in Verbindung gebracht mit verschiedenen pathophysiologischen Prozessen wie der Arteriosklerose sowie venösen Thrombosen [82, 83].

1.8.2 Zellen des adaptiven Immunsystems

T-Lymphozyten werden als Vorläuferzellen im Knochenmark gebildet und zeichnen sich durch ihren T Zell-Rezeptor (TCR) aus, mit dessen Hilfe Antigene erkannt werden. Sie migrieren anschließend in den Thymus, wo sie einen Reifeprozess unterlaufen und zu $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T Zellen ausdifferenzieren [84]. Die T-Lymphozyten werden daraufhin in die Peripherie abgegeben. Sog. naive T Zellen sind in der Lage auf neue Antigene zu reagieren, wohingegen sog. Memory T Zellen nach Antigenpräsentation gebildet werden und nach erneuter Infektion direkt in Effektor T Zellen umgewandelt werden können. Hiermit wird eine schnelle Immunantwort nach wiederholter Pathogenexposition ermöglicht. Regulatorische T Zellen (T_{Reg}) sind dafür verantwortlich eine überschießende Immunantwort zu verhindern [85].

$CD4^+$ T Zellen (T-Helferzellen) bilden einen enorm wichtigen und komplexen Teil des Immunsystems. Nachdem naive $CD4^+$ T Zellen ein Antigen über den sog. major-histocompatibility complex (MHC) erkannt haben, sind sie in der Lage unter Einfluss unterschiedlicher Cytokine in einen bestimmten Effektor Zelltyp auszudifferenzieren [86]. Die T Zell Differenzierung wird über den STAT (signaling transducer and activator of transcription) Signalweg gesteuert [87]. Die T-Helferzellen werden in verschiedene Subtypen unterteilt (**Abb.4**).

T_H1 sowie T_H2 Zellen wurden historisch als erstes entdeckt. T_H1 Zellen entstehen unter dem Einfluss von Interleukin 12 und der Aktivierung von STAT4 und zeichnen sich durch den Transkriptionsfaktor T-bet aus [88, 89]. Sie sind in der Lage Interferon γ ($IFN\gamma$), Interleukin 2 sowie Tumornekrosefaktor α ($TNF\alpha$) zu produzieren und sind wichtig für

die antivirale und antibakterielle Immunantwort. T_H2 Zellen produzieren Interleukin-4, -5 und -13 und werden unter anderem bei extrazellulären Parasiteninfektionen aktiv. Über Interleukin-4 wird der STAT6 Signalweg in den T_H2 Zellen aktiviert woraufhin es zur Induktion des Transkriptionsfaktors GATA-3 kommt. T_H2 spezifisches GATA-3 unterdrückt die T_H1 assoziierte Genexpression, wohingegen T-bet die T_H2 assoziierte Genexpression unterdrückt [90, 91].

Als weiterer Subtyp wurden die sog. regulatorischen T Zellen (T_{reg}) identifiziert. Sie werden unter Einfluss von Interleukin-2 über den STAT5 Signalweg gebildet und zeichnen sich durch die Expression von CD25 sowie dem Transkriptionsfaktor FOXP3 aus. Sie regulieren die Immunantwort über TGF- β und IL-10, wobei zwischen peripher und im Thymus gebildeten T_{reg} unterschieden wird. Periphere T_{reg} sind für die periphere Immuntoleranz verantwortlich, wohingegen die im Thymus gebildeten T_{reg} eine allgemeine Autoimmunität verhindern [92, 93].

T_H17 Zellen werden im Zuge von Pilzinfektionen beziehungsweise bakteriellen Infektionen über Interleukin 1 β , -6, -21, -23 sowie TGF- β gebildet und gelten als proinflammatorisch. Sie spielen auch bei Autoimmunerkrankungen eine entscheidende Rolle [94-96]. Abhängig davon, unter welchem Zytokin-Einfluss die T_H17 Zellen entstehen, lassen sich unterschiedliche Eigenschaften erkennen, wobei Interleukin 1 β einen stärker proinflammatorischen Subtyp begünstigt [97]. Zudem exprimieren T_H17 Zellen den Transkriptionsfaktor ROR γ und produzieren Interleukin 17A und 17F, 21 und 22 [98].

Die folliculären T-Helferzellen sind für die humorale Immunantwort mitverantwortlich, indem sie über die Produktion von Interleukin-21 zur B-Zellaktivierung führen. Außerdem exprimieren sie CXCR5 und PD-1 [99, 100]. Sie werden über den STAT3 Signalweg durch Interleukin-6, -21 und -23 gebildet [101].

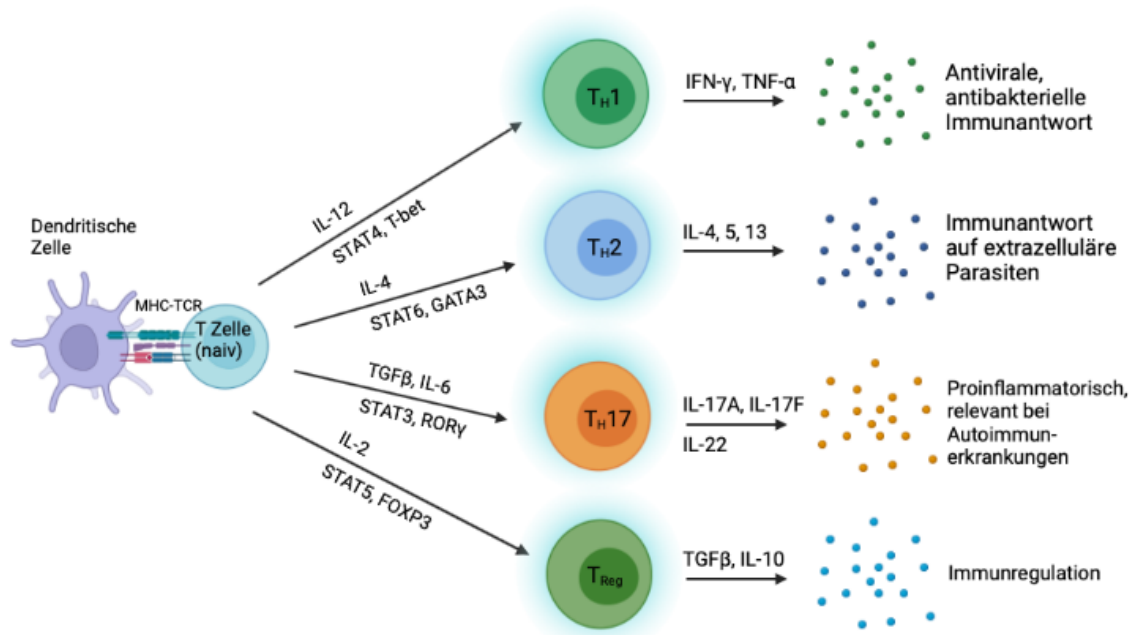


Abbildung 4: Entstehung von T-Helferzellsubtypen aus naiven T Zellen

Abbildung generiert mit Biorender.com

CD8⁺ T Zellen werden auch zytotoxische T Zellen genannt. Sie werden im Thymus generiert und besitzen ebenfalls einen TCR. Zudem besitzen sie einen Co-Rezeptor bestehend aus einer CD8 α und CD8 β Kette, worüber sie MHC Klasse I Moleküle auf infizierten Zellen bzw. APC erkennen [102]. CD8⁺ T Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr gegen intrazelluläre Pathogene und sind speziell bei der Bekämpfung von Viren und Tumorzellen von großer Bedeutung [103]. Bei chronischen Infektionen bzw. Tumorerkrankungen konnte ein Verlust der Wirkung der CD8⁺ T Zellen erkannt werden. Die Hochregulierung inhibitorischer Rezeptoren wie PD-1 und der damit einhergehenden CD8 T Zell-Exhaustion stellt dabei einen möglichen Therapieansatz innerhalb der Checkpoint-Inhibitor Behandlung bei Krebserkrankungen dar [104, 105]. Nach Erkennung eines Antigenes und anschließender Aktivierung sind CD8⁺ T Zellen in der Lage, Zytokine wie TNF- α und IFN- γ auszuschütten, die antivirale und antitumorale Eigenschaften besitzen [106]. Zudem exprimieren CD8⁺ T Zellen Perforin und Granzyme, wobei Perforin in der Zellmembran der Zielzelle Poren ausbildet, durch die Serin Proteasen (Granzyme) eintreten können und Proteine spalten, was zur Apoptose der Zielzelle führt. Dabei werden die zytotoxischen Granula nur im direkten Umfeld der Zielzelle ausgeschüttet (immunologische Synapse), um die Schädigung körpereigener Zellen zu vermeiden [107]. Zudem sind aktivierte CD8⁺ T Zellen in der Lage den Fas-

Ligand (FasL) zu exprimieren, der nach Bindung mit der Zielzelle zur Aktivierung einer Caspase-Kaskade führt, die letztlich bei der Zielzelle Apoptose induziert. Da CD8⁺ T Zellen ebenso den Fas Rezeptor auf ihrer eigenen Zelloberfläche exprimieren, besitzen sie über diesen Mechanismus eine autoregulatorische Kompetenz [108, 109].

B-Zellen werden definiert als eine Zellpopulation, die diverse Immunglobulin-Rezeptoren auf der Oberfläche exprimiert und spezifische Antigen-Epitope erkennen kann. Der funktionelle Endpunkt innerhalb der B-Zellproliferation stellt die Bildung von Antikörper produzierender Plasmazellen dar, die unter Einfluss follikulärer T Helfer Zellen gebildet werden [110]. B Zellen differenzieren im Knochenmark aus und können in unterschiedliche Subtypen eingeteilt werden. B-1a Zellen produzieren primär Antikörper und bieten einen angeborenen Schutz gegenüber bakteriellen Infektionen, wohingegen B-1b Zellen als primäre Quelle für die langfristige Immunantwort gegenüber Polysacchariden und T-Zell unabhängigen Antigenen fungieren [111]. Neben der Antikörperproduktion können B-Zellen ebenfalls Zytokine ausschütten, welche die Funktion von T Zellen und dendritischen Zellen beeinflusst. Über die Produktion von Interleukin 10 von B-1a Zellen wird im Zuge einer schweren Infektion (Sepsis) unter anderem die T Zell vermittelte Immunreaktion reguliert [112, 113].

1.8.3 T Zell Aktivierung

Nachdem externe Pathogene und deren Antigene in den Körper gelangen, werden sie von APC erkannt und in Form von MHC-Komplexen auf deren Zelloberfläche präsentiert. Naive T Zellen binden über ihren TCR unter Einfluss von CD3 und co-stimulierenden Rezeptoren wie CD28 die APC, woraufhin über die Phosphorylierung von Tyrosinkinase verschiedene intrazelluläre Signalwege (mTOR, PKC, IP₃) aktiviert werden [114, 115]. Zudem können unterschiedliche Zell-Membranproteine wie lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1), das für die Zelladhäsion und Migration verantwortlich ist, die T Zellaktivierung beeinflussen [116].

1.8.4 Migration und Adhäsion (CD11b, ICAM-1, LFA-1)

CD11b auch als macrophage-1 antigen (Mac-1) bezeichnet ist ein Heterodimer, der von verschiedenen Zellen des Immunsystems (Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen) exprimiert wird. CD11b ist bei zirkulierenden Lymphozyten im Normalfall inaktiv, kann allerdings unter dem Einfluss von Zytokinen aktiviert werden [117]. CD11b ist in der Lage, verschiedene Liganden wie unter anderem ICAM-1 sowie Fibrinogen zu binden [118].

ICAM-1 oder auch intercellular adhesion molecule-1, wird von Leukozyten und Endothelzellen exprimiert und durch verschiedene Zytokine wie TNF- α , IFN- γ und Interleukin-1 induziert. ICAM-1 bindet Mac-1, LFA-1 sowie Fibrinogen. ICAM-1 spielt eine Rolle in der T-Zell vermittelten Immunantwort während Entzündungsreaktionen, besitzt einen co-stimulierenden Effekt in Anwesenheit von APC auf T Zellen und ist beteiligt an der Migration von aktivierten Leukozyten in das entzündliche Gewebe [119]. Im Zuge von schweren Infektionen und der damit einhergehenden Aktivierung von T Zellen konnte unter anderem eine verstärkte Expression von ICAM-1 auf T Zellen festgestellt werden, was zur Bildung von Zellaggregaten (T Zellclustern) führt. Zudem konnte gezeigt werden, dass ICAM-1 defiziente CD8 T Zellen vermehrt IFN- γ und Granzym B exprimieren und eine vermeintlich höhere Zytotoxizität aufweisen [120].

LFA-1 besitzt als Integrin bestehend aus CD11a/CD18 eine Schlüsselrolle innerhalb der T Zelldifferenzierung und Migration. Die Adhäsion an den Liganden ICAM-1 führt zu einer vereinfachten Bindung an Endothelzellen, verlängerter Bindung an APC und findet unter dem Einfluss von Mg²⁺ in der sog. metal ion dependent adhesion site (MIDAS) statt [116, 121]. Zudem ist LFA-1 Teil des inneren Rings des sog. supramolekularen Adhäsionskomplex (SMAC) und somit dafür verantwortlich, dass im Zuge der Aktivierung die Bindung zwischen APC und T Zellen stabilisiert wird [122]. Die LFA-1 vermittelte Zell-Migration findet in 5 Schritten statt und wird durch Chemokine getriggert. Zunächst kommt es zum Rollen der Leukozyten an der Gefäßwand, wobei eine vorerst wenig stabile Bindung aufgebaut wird. Im nächsten Schritt findet das sog. Crawling der Zellen statt, bei denen sie sich parazellulär an dem Endothel entlang bewegen um letztlich durch die Gefäßwand zu gelangen, um zum Ort der Entzündung zu migrieren [123, 124].

1.9 Einfluss des Alters auf das Immunsystem

Einer der deutlichsten Konsequenzen des Alterungsprozesses ist die verminderte Antwort des Immunsystems auf Pathogene [125], was zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber viralen Infektionen wie z.B. Influenza führt [126], aber auch schwere Krankheitsverläufe nach bakterieller Infektion (Sepsis) begünstigt [127]. Der Grund für die verminderte Bildung der Lymphozyten im Alter ist multifaktoriell und lässt sich unter anderem auf Veränderungen der Variabilität der Stamm- beziehungsweise Vorläuferzellen, Änderungen der Umgebungsbedingungen im Thymus sowie einer verminderten Produktion an growth hormon (GH) und insulin-like growth factor 1 (IGF-1) zurückführen [128, 129]. Neben der verminderten Lymphozyten-Produktion im Alter ist

eine allgemeine Verschiebung innerhalb des Transkriptoms zu erkennen, wobei vermehrt Gene exprimiert werden, die eine verstärkte Bildung myeloischer Zellen begünstigt, was unter anderem zu den Veränderungen der Immunantwort im Alter beiträgt [130, 131]. Neben dem verminderten Level an naiven B und T Zellen kann im Alter eine erhöhte Menge an proinflammatorischen T_H17 Zellen [132] und T Gedächtniszellen festgestellt werden, die nach Antigenkontakt gebildet werden und langfristig im Blutkreislauf zirkulieren [133]. Eine häufige Antigen-Stimulierung durch beispielsweise wiederkehrende Infektionen führt dazu, dass der naive Zellpool ausgeschöpft wird, was unter anderem zur Anhäufung von CD8⁺ T Gedächtniszellen bei betagten Patienten führt [128]. Beim Menschen ist dies in vielen Fällen mit einem Verlust der Expression des CD28 Rezeptors und der dadurch verminderten T Zellaktivierung verbunden, was klinisch mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko bei über 65 jährigen Patienten zu korrelieren scheint [134, 135].

Inflammaging ist ein Zustand, bei welchem es zu einer Anhäufung von proinflammatorischen Mediatoren im Körper kommt. Dieser Prozess ist eng mit der Veränderung der zellulären Beschaffenheit des Immunsystems im Alter verbunden, wobei die Immunzellen einen Phänotyp aufweisen, der als senescence-associated secretory phenotype (SASP) beschrieben wird [136]. Dieser Phänotyp kommt insbesondere bei Zellen vor, die kontinuierliche DNA-Schäden akkumulieren, wodurch ein Arrest des Zellzyklus (Seneszenz) induziert wird und die Zellen vermehrt proinflammatorische Zytokine wie IL-2, -6 und -8 produzieren [137, 138].

2 FRAGESTELLUNG

Im Zuge dieser Arbeit soll die Rolle der T-Helferzellen innerhalb der Immunothrombose untersucht werden. Dabei wird insbesondere der wechselseitige Einfluss von T Zellen und Fibrin, sowie der Einfluss des Alters auf die T-Zellantwort nach systemischer Infektion analysiert. Die folgenden grundlegenden Fragestellungen sollen behandelt werden:

2.1 Welchen Einfluss hat die T Zellaktivierung auf die Koagulation?

Da gezeigt werden konnte, dass während systemischer Infektion aktivierte T-Helferzellen mit Mikrothrombosen assoziiert sind, sollen die potenziell koaguloregulatorischen Eigenschaften der aktivierten T-Helferzellen untersucht werden.

2.2 Besitzt Fibrin einen Einfluss auf die Aktivierung der T-Helferzellen?

Anhand eines in vitro Modells soll überprüft werden, ob Fibrin einen Effekt auf die Aktivierung der T-Helferzellen besitzt.

2.3 Beeinflusst LFA-1 die Fibrin-vermittelte Aktivierung und Migration der T-Helferzellen?

Hierfür soll durch Neutralisierung von LFA-1 der Effekt auf die T-Zell-Fibrin Interaktion untersucht werden.

2.4 Besitzen T Zellen eine fibrinolytische Wirkung?

Es soll überprüft werden, ob T Zellen einen potenziell fibrinolytischen Effekt aufweisen und wie dieser Effekt beeinflusst werden kann.

2.5 Welchen Einfluss hat das Alter auf die T Zellantwort nach systemischer Infektion

Mit Hilfe einer Kohorte an alten Mäusen soll überprüft werden, ob der Alterungsprozess einen Einfluss auf die Immunantwort der T Zellen nach Infektion mit *E. coli* bzw. *S. pneumoniae* aufweist.

3 MATERIAL

3.1 Verbrauchsgegenstände

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsgegenstände

Produkt	Hersteller
96 Well Platte mit Deckel	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Einmal-Küvetten	Sarstedt Ag & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Einmalspritzen (1 mL, 2 mL, 5 mL)	Braun, Melsungen, Deutschland
Einweg Skalpell	Braun, Melsungen, Deutschland
Eppendorf-Safe Lock 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ibiTreat μ -Slide 8 Well	Ibidi GmbH, München, Deutschland
Menzel Deckgläser	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Monovette (K3 EDTA) 9 mL	Sarstedt Ag & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten-Filterspitzen (2,5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Safety-Multifly Kanüle	Sarstedt Ag & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Sterican Kanüle Gr. 1	Braun, Melsungen, Deutschland
Stripetten (5 mL, 25 mL, 50 mL)	Corning, New York, USA
SuperFrost Plus Adhäsionsobjektträger	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 mL, 50 mL	Corning, New York, USA
μ -Plate 96 Well black	Ibidi GmbH, München, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Agar Medium	250ml LB-Medium 4g Bacto-Agar 100µg/ml Ampicillin
Antikörper Puffer	1 % BSA PBS (pH 7,4)
Blocking Lösung	2 % BSA PBS (pH 7,4)
IHC Waschpuffer	(0,025 % Triton X-100) PBS (pH 7,4)
LB-Medium	10g Bacto-Trypton 5g Hefeextrakt 5g NaCl 1 l destilliertes Wasser pH 7,4
PBMC Isolierungspuffer	2 mM EDTA in PBS (pH 7,2)
Phosphat gepufferte Salzlösung	8g NaCl 0,24g KH ₂ PO ₄ 1,42g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 0,2g KCl 1 l destilliertes Wasser (pH 7,4)
Puffer A	40 mM Tris-HCL 75 mM NaCl 0,01 % Tween 20 Destilliertes Wasser (pH 7,3)
Puffer B	Puffer A + 1 mg/mL BSA
RBC Lyse Puffer 10x	8,02 g NH ₄ CL 0,84 g NaHCO ₃ 0,37 g Na-EDTA 100 mL Millipore Wasser
RBC Lyse Puffer 1x	10 mL RBC Lyse Puffer 10x 90 mL Millipore Wasser
T Zellisolierungspuffer	0,5 % BSA PBMC Isolierungspuffer (pH 7,2)
T Zellmedium	RPMI 1640 + GlutaMAX 10 % FBS 100 U/mL Pen/Strep 2 mM HEPES

Tyrodes 1x	0,1 g Glucose 10 mL Tyrodes Puffer 10x pH (6,5 bzw. 7,2) 90 mL destilliertes Wasser
Tyrodes Puffer 10x	1l destilliertes Wasser 80 g NaCl 10,15 g NaHCO ₃ 1,95 g KCL
Verdaulösung	1 mM HEPES 5 % FBS 100 µg/mL DNase 80 µg /mL Collagenase IV 10 mL DMEM

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage LA 214i	VWR, Darmstadt, Deutschland
Autoklav	Integra, Biebertal, Deutschland
Cryostat CM1950	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C) Profi-Line	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C) Thermo HERA freeze	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Inverted DMi8 (Fluoreszenzmikroskop)	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Kühlschrank (4 °C) Profi-Line	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
LSM 510 Meta (konfokales Mikroskop)	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
LSRFortessa (Durchflusszytometer)	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Magnetrührer, Heizplatte	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Micro-Dosierpipetten (2,5 µL, 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
MSC Advantage Typ 2 Werkbank	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Neubauer Zählkammer - Improved	Optik Labor, Lancing, United Kingdom
Orbital Schüttler IKA KS250	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland

pH Meter HI 221	Hanna Instruments, Woodsocket, USA
Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetboy acu 2	Integra, Biebertal, Deutschland
Plate-Reader, SpextraMax Paradigm	Molecular Devices, San Jose, USA
TCS SP8 (konfokales Mikroskop)	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Vortex Genie Typ 2	VWR, Darmstadt, Deutschland
Waage (MC1 LC 620 S)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge MIKRO 22r	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge ROTINA 35r	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge UNIVERSAL 32	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Host	Reaktivität	Konzentration	Hersteller
CD11b	Ratte	Mensch	20 µg/mL	BDPharmingen
CD154	Maus	Mensch	20 µg/mL	Biolegend
CD28	Maus	Mensch	5 µg/mL	Biolegend
CD3	Maus	Mensch	3 µg/mL	Biolegend
CD3 (PE-Vio 770)	Mensch	Maus	1,5 µg/mL	Miltenyi
CD31	Hase	Maus	2,6 µg/mL	Abcam
CD4	Hase	Maus	3,5 µg/mL	Abcam
CD4	Ratte	Maus	10 µg/mL	Biozol
CD4 (PE Dazzle 594)	Ratte	Maus	2 µg/mL	Biolegend
CD4 (Ultra-LEAF)	Ratte	Maus	7 µg/mL	Biolegend
CD41	Ratte	Maus, Mensch	5 µg/mL	Abcam
CD45 (Vio Blue)	Mensch	Maus	1,5 µg/mL	Miltenyi
CD69	Maus	Mensch	5 µg/mL	Invitrogen

CD8a (Brilliant Violet 421)	Ratte	Maus	5 µg/mL	Biologend
DAPI	-	-	1 µg/mL	Sigma-Aldrich
Fibrin II beta Chain	Maus	Maus, Mensch	1 µg/mL	WAK-Chemie
FOXP3 (PE)	Mensch	Maus	1,5 µg/mL	Miltenyi
ICAM-1	Maus	Mensch	20 µg/mL	Invitrogen
IgG Alexa Fluor 488 (H+L)	Ziege	Maus, Ratte, Hase	1 µg/mL	ThermoFisher (Invitrogen)
IgG Alexa Fluor 546 (H+L)	Ziege	Maus, Ratte, Hase	1 µg/mL	ThermoFisher (Invitrogen)
IgG Alexa Fluor 594 (H+L)	Ziege	Maus, Ratte, Hase	1 µg/mL	ThermoFisher (Invitrogen)
IgG Alexa Fluor 647 (H+L)	Ziege	Maus, Ratte, Hase	1 µg/mL	ThermoFisher (Invitrogen)
IgG1κ	Maus	-	20 µg/mL	Invitrogen
IgG _{2bκ}	Ratte	-	20 µg/mL	Invitrogen
IgG1κ Brilliant Violet 421	Maus	-	5 µg/mL	Biologend
IL-2	Hase	Maus, Mensch	5 µg/mL	Abcam
LFA-1	Maus	Mensch	20 µg/mL	BioXCell
PAI-1	Hase	Maus, Mensch	7 µg/mL	Abcam
PAI-1	Hase	Maus, Mensch	20 µg/mL	-
RORγ (t) (APC)	Mensch	Maus	1,5 µg/mL	Miltenyi
Stabilin-2	Ratte	Maus	8 µg/mL	MBL
TAFI neutralisierend	Hase	Maus, Mensch	5 mg/kg	Paul Declerck
uPA	Ratte	Mensch	10 µg/mL	Proteintech
uPAR	Hase	Maus, Mensch	5 µg/mL	Proteintech

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CFSE Proliferation Dye	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Chromogenes Substrat (S-2251)	Diapharma Group, Inc. West Chester, USA
CMPX Proliferation Dye	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphate buffered saline	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fibrinogen (aus humanem Plasma)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fibrinogen (aus humanem Plasma) konjugiert mit Alexa Fluor 647	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Foxp3 / Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
GlutaMax 1640 RPMI Medium	Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Hirudin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Humanes Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isofluoran	Select GmbH, Deieich, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PAP Pen	Merck, Darmstadt, Deutschland

Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Plasminogen	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Poly-L-ornithin Lösung 0,01 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Prostacyclin (PGI ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rivaroxaban	Santa Cruz, Dallas, USA
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure konz. (HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Thrombin (aus humanem Plasma)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Thromboxan A ₂ (TXA ₂) – U46619	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TissueTek Compound	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TritonX	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

4 METHODEN

4.1 In vitro CD4⁺ T Zell Versuche

4.1.1 Blutentnahme

Den Probanden wurde 9 mL peripheres Blut entnommen, wobei das in den Monovetten enthaltene EDTA die Calcium-Ionen im Blut komplexiert und somit die Gerinnung unterbindet. Nach erfolgter Blutentnahme wurde das Blut umgehend verwendet. Die Auswahl der Probanden fand nach vorherigem Ausschluss möglicher Erkrankungen (grippaler Infekt, COVID-19), sowie hämatologischer Vorerkrankungen bzw. Blutgerinnungsstörungen statt. Zudem sollten die Probanden im Vorfeld keine Medikamente eingenommen haben, die Einfluss auf die Blutgerinnung (Ibuprofen, ASS) bzw. die Zellen des Immunsystems besitzen.

4.1.2 Isolierung mononuklearer Zellen aus peripherem humanem Blut

Die Isolierung fand unter einer sterilen Sicherheitswerkbank statt. Das Blut wurde mit PBMC-Isolierungs Puffer auf 35 mL verdünnt. Die Zellen wurden mittels Ficoll-Paque nach deren Dichtegradient aufgetrennt. Dafür wurden 15 mL Ficoll in einem 50 mL

Falcon Tube vorgelegt. Anschließend wurde das verdünnte Blut vorsichtig auf das Ficoll geschichtet, ohne die Phasengrenze zu zerstören. Das Falcon Tube wurde bei 400 RCF für 35 Minuten bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert, woraufhin sich vier unterschiedliche Phasen bildeten (**Abb. 5**) [139].

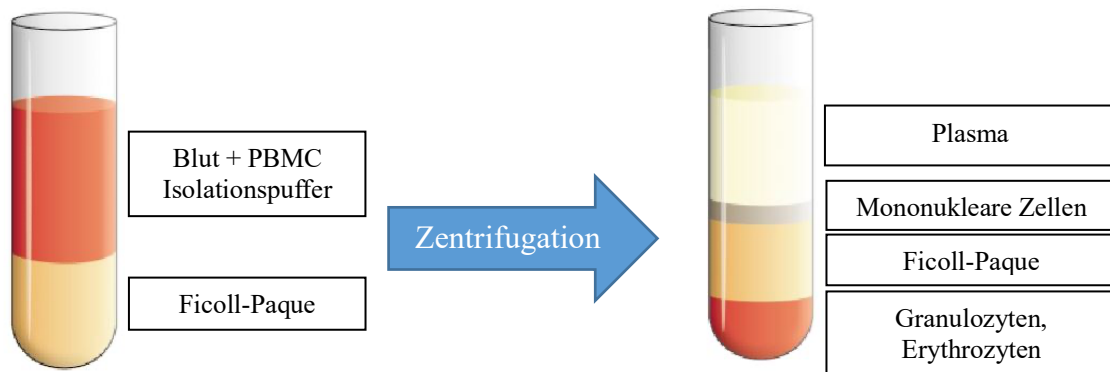


Abbildung 5: Auftrennung des peripheren Blutes mittels Ficoll-Paque nach Dichtegradient

Die Interphase mit den darin enthaltenen mononuklearen Zellen wurde vorsichtig in ein frisches 50 mL Falcon Tube transferiert, mit PBMC Puffer auf 50 mL aufgefüllt und für 10 Minuten bei 20°C und 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, um das entstandene Pellet anschließend mit frischem PBMC Puffer zu resuspendieren, auf 50 mL aufzufüllen und erneut für 12 min bei 20°C und 200 x g zu zentrifugieren [140].

4.1.3 CD4⁺ T Zellisolierung

Nachdem die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer–Improved bestimmt wurde, wurden die Zellen mit T Zell Isolierungspuffer resuspendiert (40 µL pro 10⁷ Zellen). Zu der Zellsuspension wurde 10 µL des CD4⁺ T Zell Biotin-Antikörpercocktails zugegeben und für 5 min bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 30 µL T Zell Isolierungspuffer sowie 20 µL CD4⁺ T Zell Micro-Bead Cocktail wurde die Suspension gemischt und für weitere 10 min bei 4°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde für die magnetische Zellseparation ein LS column im MACS-Separator platziert und mit 3 mL T Zell Isolierungspuffer gewaschen. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Zellsuspension auf das LS column gegeben und erneut mit 3 mL Puffer gewaschen. Die durchgelaufene Fraktion wurde aufgefangen und enthielt die aufgereinigten CD4⁺ T Zellen. Nach erneuter Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in RPMI T Zellmedium resuspendiert (10⁶ Zellen pro 1 mL) und bei 37°C und 5 % CO₂ in Kultur gehalten [141].

4.1.4 CD4⁺ T Zellaktivierung

Für die oberflächengebundene Aktivierung der CD4⁺ T Zellen wurde eine 96-Well Platte bzw. Objektträger mit 0,01 % Poly-l-ornithin Lösung bedeckt. Die Lösung wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend verworfen. Die Oberfläche wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet anschließend gewaschen und mit 3 µg/mL anti-CD3 Antikörper vollständig benetzt und für mindestens 3h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen und die Oberfläche wurde 3x mit PBS gewaschen. Die CD4⁺ T Zellen im T Zellmedium wurden mit 5 µg/mL anti-CD28 Antikörper versetzt, auf die Oberfläche pipettiert (1×10^6 Zellen/cm²) und für die gewünschte Zeit bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert [142].

4.1.5 Neutralisierung von Oberflächenproteinen auf CD4⁺ T Zellen

Für die Neutralisierung von ICAM-1, CD11b, LFA-1 und CD154 wurden jeweils blockierende Antikörper verwendet, wobei die Zellen jeweils mit einer Antikörperkonzentration von 20 µg/mL inkubiert wurden. Als Kontrollgruppe wurden jeweils die dazugehörigen Isotyp IgG-Kontrollen verwendet.

4.1.6 Fibrincoating

Das Coating wurde auf SuperFrost Plus Objektträger bzw. µ-Slides (8 Well) mit einer 3:1 Mischung aus Fibrinogen aus humanem Plasma (2,5 mg/mL) und Thrombin (4 U/mL) durchgeführt. Dafür wurden 60 µL der Mischung auf eine 1 cm² große Fläche gegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert [143]. Für die Beschichtung mit Fibrinogen wurde 2,5 mg/mL in 50 mM Tris und 0,9 % NaCl (pH 7,4) gelöst und auf der Oberfläche für 20 Stunden bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit verworfen und 3x mit PBS gewaschen [144].

4.1.7 Immuncytochemie

Die Zellen wurden für 10 Minuten mit neutral gepufferter PFA-Lösung (4 %) fixiert. Im Anschluss wurde mit 2 % BSA-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Nach 3x Waschen mit PBS wurden die Antikörper in adäquater Konzentration zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff und Zugabe des sekundären Antikörpers für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur wurden die Zellen mittels konfokalem Lasermikroskop visualisiert und ausgewertet.

4.1.8 Adhäsion von CD4⁺ T Zellen auf unterschiedlichen Oberflächen

Die CD4⁺ T Zellen ($1 \times 10^5/100 \mu\text{L}$) wurden auf verschiedene Oberflächen (1 cm^2) pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, um das Absinken der Zellen zu gewährleisten. Im Anschluss wurde je 3x vorsichtig mit PBS gewaschen, um nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Die adhärenenten Zellen wurden mit DAPI angefärbt mittels konfokaler Lasermikroskopie visualisiert und quantifiziert.

4.1.9 CD4⁺ T Zell Migration

Die Oberfläche der Ibitreat μ -Slides (Ibidi) wurde wie zuvor beschrieben mit Poly-l-ornithin beziehungsweise Fibrin beschichtet. Anschließend wurden die Oberflächen mit anti-CD3 Antikörper ($5 \mu\text{g/mL}$) beziehungsweise PBS als Kontrolle für 3h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die CD4⁺ T Zellen wurden im Anschluss in einer Konzentration von $1 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ auf die Oberfläche gegeben und für 30 Minuten im Inkubator platziert, um ein Absinken der Zellen zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen alle 5 Minuten für 3 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ visualisiert, um deren Zellbewegung in einem Gesichtsfeld von $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ nachzuverfolgen. Die Videos wurden im Anschluss mittels FIJI (Trackmate Plugin [145]) ausgewertet, wobei die zurückgelegte Strecke sowie die Geschwindigkeit analysiert wurden.

4.1.10 Fibrinolyseassay

Zunächst wurde Fibrinogen ($2,5 \text{ mg/mL}$) in Puffer A gelöst. Plasminogen (1 mg/mL) wurde im Anschluss im Verhältnis 1:80 zu der Fibrinogenlösung zugegeben. In einer 96 Well Platte mit Deckel (Corning) wurden pro Well anschließend $60 \mu\text{L}$ dieser Mischung vorgelegt. $20 \mu\text{L}$ Thrombin (4 U/mL) wurden jeweils zugegeben und gemischt [143]. Die Platte wurde für 45 Minuten bei 37°C auf einem Plate-Shaker inkubiert (100 rpm), wonach sich ein opaker, halbfester Fibrin-Clot ausbildete. In der Zwischenzeit wurden die Zellen ($1 \times 10^5/20 \mu\text{L}$) in Puffer B vorbereitet und nach Ausbildung des Clots darauf pipettiert. Die Platte wurde für die gewünschte Inkubationszeit bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die fibrinolytische Aktivität der Zellen wurde photometrisch bestimmt (**Abb. 6**). Dabei wurde kurz vor Beginn der Messung $80 \mu\text{L}$ des chromogenen Substrats (S-2251, Chromogenix) in einer Konzentration von $1,5 \text{ mM}$ je Well zugegeben. Bei der Messung wurde die Änderung der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm bei 37°C über

eine Zeitspanne von einer Stunde gemessen, wobei alle 5 Minuten eine Messung durchgeführt wurde.

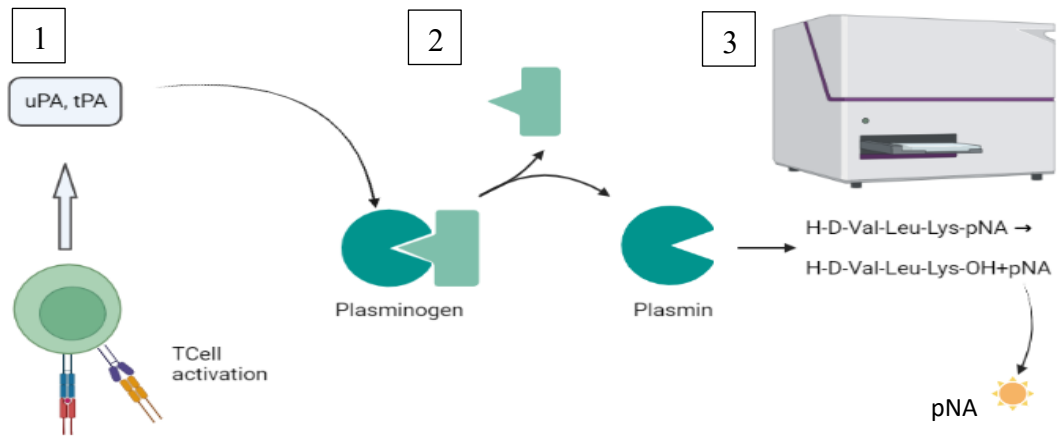


Abbildung 6: Ablauf des Fibrinolyseassays

Aktivierung der CD4⁺ T Zellen (1). Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin unter Einwirkung von uPA, tPA (2). Abspaltung von para-Nitroannilin von S-2251 durch Plasmin und Messung der Absorption bei 405 nm (3). Abbildung generiert mit BioRender.com

4.2 Isolierung von Plättchen aus peripherem humanem Blut

5 mL Blut eines gesunden Spenders wurden in eine S-Monovette (K3 EDTA) überführt. Das Blut wurde 1:1 mit 1x Tyrodes (pH 6,5) gemischt und bei 20°C und 70 x g ohne Bremse für 35 Minuten zentrifugiert. 3 mL des Überstands mit den darin enthaltenen Plättchen wurden mit 7 mL 1x Tyrodes (pH 6,5), 10 µL Prostacyclin (100 µg/mL) sowie humanem Serum Albumin (0,1 %) gemischt und bei 20°C und 1200 x g mit eingeschalteter Bremse für 10 Minuten zentrifugiert. Die Anzahl der isolierten Plättchen wurde mittels Neubauer Zählkammer – Improved bestimmt. Das Pellet wurde in 1x Tyrodes (pH 6,5) resuspendiert um eine Zellzahl von 150.000/µL zu erhalten [146]. Die Plättchen wurden wahlweise zur besseren Visualisierung mittels CFSE Proliferation Dye angefärbt.

4.3 Aktivierung von Plättchen

20 µL der Zellsuspension wurden mit 211,2 µL Tyrodes (pH 7,2), 2 µL ADP (0,5 mM), 2 µL Thromboxan A2 (0,288 mM) sowie 4,8 µL CaCl₂ (10 mM) gemischt, auf 1 cm² Oberfläche gegeben und für insgesamt 45 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert [146].

4.4 Tierversuche

Für die geplanten Experimente wurden unterschiedliche Tiermodelle verwendet. Es wurden 8-14 Wochen bzw. 20-22 Monate alte Mäuse (*C57BL/6J*) eingesetzt. Die Versuchstiere wurden artgerecht unter pathogenfreien Bedingungen in Gruppen von 2-4 Tieren pro Käfig und nach den gesetzlichen Vorschriften innerhalb der Versuchstiereinrichtung des Walter-Brendel-Instituts gehalten. Das Vorhaben wurde von der Oberbayerischen Regierung genehmigt (ROB-55-2-2532.Vet_02-20133).

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Tiermodelle innerhalb der jungen Kohorte

Behandlung	Infektion	Infektionsdauer	Anzahl
Wildtyp	<i>E. coli</i>	18h	n=3
uPAR-/-	<i>E. coli</i>	3h	n=3
uPAR+/+	<i>E. coli</i>	3h	n=3
antiCD4	<i>E. coli</i>	3h	n=3
	<i>S. pneumoniae</i>	6h	
IgG2b _k	<i>E. coli</i>	3h	n=3
	<i>S. pneumoniae</i>	6h	
antiTAFI	<i>E. coli</i>	18h	n=3
IgG1	<i>E. coli</i>	18h	n=3

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Tiermodelle innerhalb der alten Kohorte

Behandlung	Infektion	Infektionsdauer	Anzahl
Uninfiziert	-	-	n=4
DMSO	<i>E. coli</i>	3h	n=4
		18h	
	<i>S. pneumoniae</i>	6h	
RIVA	<i>E. coli</i>	3h	n=4
		18h	
	<i>S. pneumoniae</i>	6h	

4.4.1 Bakterien

Bei den eingesetzten Bakterien handelte es sich zum einen um gram-negative *Coli* des Stammes BL-21, welche eine Ampicillinresistenz besitzen und mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff GFP markiert sind. 100 μL der Bakterienstammlösung wurde mit 10 mL LB-Medium sowie 30 μL Ampicillin (50 mg/mL) gemischt und für 10 Stunden bei 37°C auf einem Plate-Shaker bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 3x mit PBS gewaschen und anschließend in 1 mL resuspendiert. Um die Bakterienzahl zu bestimmen, wurde photometrisch die optische Dichte bei 600 nm (OD600) der Bakteriensuspension gemessen, worüber im Anschluss die notwendige Verdünnung berechnet werden konnte. In dem zweiten Tiermodell wurden gram-positive Bakterien des Typs *pneumoniae serotype 2* (D39 strain) verwendet. Den jungen beziehungsweise alten Mäusen wurden jeweils 3×10^8 *E. coli* bzw. 1×10^8 *S. pneumoniae* in einem Volumen von 100 μL injiziert.

4.5 Versuchsdurchführung

4.5.1 CD4⁺ T Zell Depletion

Den Mäusen wurde 500 μg eines neutralisierenden anti-CD4 Antikörpers (GK1.5, Biolegend) bzw. äquivalente Mengen an IgG2b_k (Biolegend) 24 Stunden vor Infektion intraperitoneal injiziert. Im Anschluss erfolgte die Injektion der Bakterien über die Schwanzvene der Versuchstiere (**Abb. 7**).

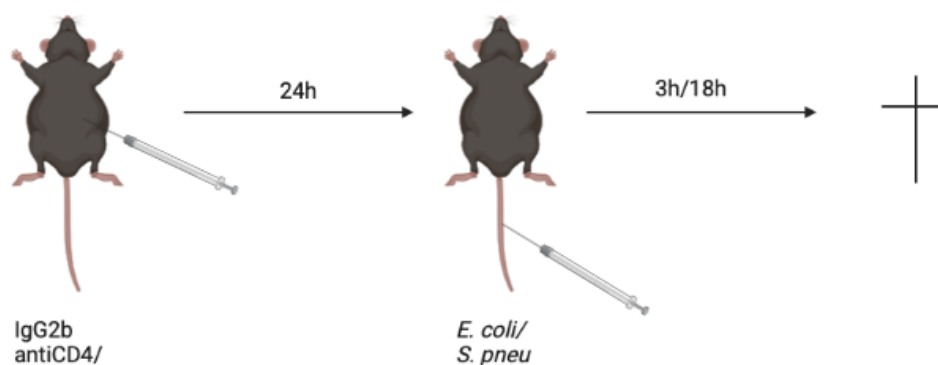


Abbildung 7: Injektionsschema für CD4⁺ T Zelldepletion

Abbildung generiert mit BioRender.com

4.5.2 Neutralisierung von TAFI

Es wurden 5 mg/kg Körpergewicht des neutralisierenden anti-TAFI Antikörpers eingesetzt (MA-RT36A3F5). Als Kontrolle wurde IgG1 (MA-31C9) verwendet. Die Antikörper wurden in 100 µL PBS gelöst und jeweils direkt vor der Infektion über die Schwanzvene injiziert. Nach 18 Stunden wurden die Versuchstiere geopfert.

4.5.3 Euthanasie und Entnahme bzw. Präparation der Organe

Nach Ablauf des Versuchszeitraums (3 Stunden, 6 Stunden beziehungsweise 18 Stunden) wurden die Versuchstiere mit Isofluran anästhesiert und anschließend durch zervikale Dislokation geopfert. Es wurden Herz, Leber, Niere, Milz und Lunge frei präpariert und für 2 Stunden in 4 % neutral gepuffertem PFA fixiert. Darauffolgend wurden die Organe zunächst für eine Stunde in 15 % Sucrose Lösung und anschließend über Nacht in 30 % Sucrose Lösung gegeben. Die Organe wurden in TissueTek Compound Medium eingebettet und bei -80°C gelagert.

4.6 Immunhistochemie

4.6.1 Gewebeschnitte

Mit Hilfe eines Cryotoms wurden aus den präparierten Organen 8-10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einem SuperPlus Adhäsions-Objektträger aufgenommen. Die Schnitte wurden bei -20 °C gelagert.

4.6.2 Immunhistochemische Färbung

Die Gewebeschnitte wurden zunächst für 5 Minuten mit PBS bei Raumtemperatur rehydriert und anschließend für 10 Minuten mit 4 % neutral gepuffertem PFA fixiert. Nach drei Waschschritten mit IHC-Waschpuffer wurde mit 2 % BSA in PBS für 35 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Nach drei weiteren Waschschritten wurde der primäre Antikörper (0,5-10 µg/mL) im Antikörper-Puffer verdünnt, auf das Gewebe gegeben und bei 4°C über Nacht in einer Färbekammer inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde ein sekundärer Antikörper (1-2 µg/mL) auf das Gewebe gegeben und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Detektion weiterer Antikörper wurde äquivalent vorgegangen. Nach Beendigung der Antikörperfärbungen wurden die Gewebeschnitte eingedeckelt. Dafür wurde ein sog. Fluoroshield Mounting Medium (Abcam) verwendet, welches DAPI enthielt, um die Zellkerne zu visualisieren. Die

Schnitte wurden behutsam mit Deckgläsern bedeckt und leicht festgedrückt. Die Kanten wurden mit Klarlack an der Objektträgeroberfläche fixiert.

4.7 Fluoreszenzmikroskopie

Im Anschluss an die immunhistochemische Färbung wurden die Gewebeschnitte beziehungsweise Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie basiert auf der Absorption von Lichtenergie einer Lichtquelle in Form von Photonen mit der darauffolgenden Emission. Die Wellenlänge des emittierten Photons ist dabei größer als die Wellenlänge des absorbierten Photons, was als Stokes shift bezeichnet wird. Das emittierte Licht gelangt durch einen Filter zum Detektor und kann betrachtet werden [147]. Bei dem verwendeten Fluoreszenzmikroskop wurde eine LED-Lichtquelle verwendet, die den Vorteil besitzt, die Probe durch die Bestrahlung kaum zu beschädigen. Zudem konnte zwischen den sechs verfügbaren Kanälen schnell und flexibel gewechselt werden. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde am Biomedizinischen Zentrum München (BMC) an einem inverted Leica DMi8 durchgeführt.

4.8 Konfokale Lasermikroskopie

Hierbei handelt es sich um eine besondere Anwendungsform der Fluoreszenzmikroskopie, wobei der Strahlengang durch einen dichroitischen Spiegel auf die Probe geleitet und abgescannt wird. Das emittierte Licht gelangt erneut über einen dichroitischen Spiegel durch das sog. Pinhole an dem das Streulicht entfernt wird [148]. Das Licht gelangt zum Detektor (Photomultiplier – PMT oder hybrid photo Detektor HyD) und kann betrachtet werden. Die konfokale Lasermikroskopie wurde ebenfalls am Biomedizinischen Zentrum München (BMC) an einem inverted Leica SP8 mit 4 verschiedenen Lasern (405, 488, 552, 638 nm) durchgeführt.

4.9 Auswertung

Für die Auswertung wurden die Bildbearbeitungsprogramme ZenBlue- Zeiss, LASX- Leica bzw. FIJI verwendet. Für die Bestimmung der T Zell Rekrutierung wurden je biologischem Replikat mindestens 10 Gesichtsfelder analysiert (145 µm x 145 µm). Da innerhalb der Arbeit der Fokus vor allem auf der Mikrozirkulation lag, wurden nur Gefäße mit einem Durchmesser von ≤ 30 µm berücksichtigt. Eine Clusterformation wurde dabei definiert als mindestens zwei Zellen, die im direkten Zell-Zellkontakt standen (vgl. **Abb.8**). Zudem wurde insbesondere die Fibrindepotion innerhalb der

Mikrozirkulation analysiert. Dafür wurden für die Analyse der Lebersinusoide mindestens 50 Gefäße pro biologisches Replikat analysiert. Zur Darstellung der Gefäßwände wurde ein anti-Stabilin-2 Antikörper verwendet, welcher die Endothelzellen innerhalb der Lebersinusoiden anfärbt. Anschließend wurde die intravasale Fibrinmenge prozentual zur Gefäßfläche berechnet. Zudem wurde die prozentuale Menge an okkludierten Gefäßen bestimmt. Als okkludiert wurde ein Gefäß bezeichnet, welches zu mindestens 90 % der Gefäßfläche mit Fibrin bzw. Fibrin und einer oder mehr Immunzellen bedeckt war. Mikrothrombosen wurden definiert als Gefäße, die mindestens 60 % mit Fibrin beziehungsweise Fibrin und assoziierten Immunzellen bedeckt war. Für die Analyse der Fibrindeposition der Lunge wurden die Gefäße mit Hilfe eines CD31 Antikörpers angefärbt. Aufgrund der Lungenmorphologie wurden die Fläche der Alveolen beziehungsweise Bronchiolen in jedem Gesichtsfeld von der Gesamtfläche abgezogen, um die einzelnen Gesichtsfelder hinsichtlich ihrer Fibrindeposition miteinander vergleichen zu können. Die Fibrinmenge wurde in diesem Fall als absolute Zahl pro Gesichtsfeld angegeben.

Zur Auswertung der *in vitro* Versuche wurden je biologischem Replikat jeweils mindestens 10 Gesichtsfelder (250µm x 250 µm) ausgewertet. Eine Clusterformation wurde definiert als eine Zellzahl von mindestens vier CD4⁺ T Zellen im direkten Kontakt zueinander.

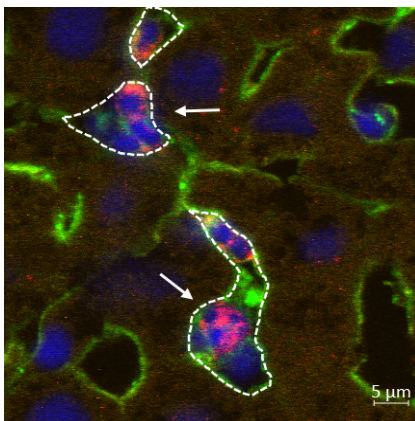


Abbildung 8: Kolokalisierung von CD4⁺ T Zellen mit Fibrin

Repräsentatives Bild einer immunhistochemischen Färbung der Leber nach 18h Infektion (*E. coli*). CD4⁺ T Zellen (rot), Fibrin (grün), CD31 (orange) und DAPI (blau). Fibrinassoziierte Clusterbildung (weiße Pfeile) und Verlauf der Gefäßwand (gestrichelte Linie). Maßstab 5 µm.

4.10 FACS Versuche (AGING)

Nachdem die Versuchstiere geopfert wurden, wurden Leber und Lunge zunächst auf makroskopische Unregelmäßigkeiten untersucht. Je 1/3 der Leber bzw. 1/2 der Lunge wurden in sterilem DMEM Medium bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Zur Isolierung der Immunzellen im Lebergewebe wurde die Leber zunächst in 10 mm große Stücke geschnitten, um diese vorsichtig durch einen Filter der Maschenweite 100 μm bzw. 70 μm zu drücken. Nach mehrmaligem Spülen mit FACS Puffer wurde für 5 Minuten bei 350 x g und 8°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem RBC Lyse Puffer 1x resuspendiert, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit der 5x Menge FACS Puffer verdünnt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in FACS Puffer aufgenommen und für 3 Minuten bei 42 x g bei 8°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 120 x g für 6 Minuten bei 8°C zentrifugiert. Nachdem das Pellet in FACS Puffer resuspendiert wurde, konnte die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer–Improved bestimmt werden.

Für die Isolierung der Immunzellen aus der Lunge wurde die Lunge in circa 10 mm große Stücke geschnitten und für 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad in Verdauung gegeben. Dabei wurde in einem Intervall von 10 Minuten für circa 30 Sekunden auf höchster Stufe gevortext. Die Suspension wurde durch ein Zellsieb (zunächst 100 μm und anschließend 70 μm) gegeben und mit FACS Puffer gespült. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 350 x g für 5 Minuten bei 8°C wurde das Pellet in RBC Lyse Puffer aufgenommen, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit der 5x Menge FACS Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde ein weiteres Mal bei 350 x g gewaschen und in FACS Puffer resuspendiert um die Zellzahl zu bestimmen.

4.10.1 FACS Analyse

In weiteren Experimenten wurde die Rekrutierung der T Zell Subpopulationen in Leber und Lunge nach Infektion alter Mäuse analysiert. Zudem wurde ein möglicher Effekt des Faktor Xa Inhibitors Rivaroxaban auf die Rekrutierung überprüft. Als Kontrolle wurde eine mit Vehikel (DMSO) behandelte sowie eine uninfizierte Kohorte analysiert (vgl. Tabelle 7). Die isolierten Zellen ($1 \times 10^6/\text{mL}$) wurden zunächst mit einem Viabilitäts-Farbstoff versetzt, für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und nach Zugabe von 2 mL FACS Puffer für 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt bevor die Oberflächenmarker angefärbt wurden [149]. Die Zellen wurden in 100 μL FACS Puffer resuspendiert und anschließend mit den

Antikörpern versetzt und für 30 Minuten bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Nach Zugabe von 1 mL FACS Puffer wurde bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert [150]. Für die Markierung der intrazellulären Proteine wurde das Pellet in 100 µL Puffer resuspendiert. 1 mL FoxP3 Fixation/Permeabilization Puffer wurde zugegeben und für 30 Minuten bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Nach Zugabe von 2 mL 1x Permeabilization Puffer wurde für 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert und mit den primär gelabelten Antikörpern für 30 Minuten bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. 2 mL Permeabilization Puffer wurde zugegeben und für 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert [151]. Das Pellet wurde in FACS Puffer resuspendiert und anschließend am Biomedizinischen Zentrum München an einem Durchflusszytometer (LSRFortessa) analysiert.

4.10.2 Gating Strategie

Zur Auftrennung der T Zell Subpopulationen wurden mittels forward bzw. sideward scatter die Einzelzellen analysiert. Anschließend wurde die Fraktion der lebenden Einzelzellen mittels Viability Dye aufgetrennt und Leukozyten durch den Oberflächenmarker CD45 identifiziert. Es folgte die Auftrennung nach dem Oberflächenmarker CD3⁺, um anschließend CD4⁺ bzw. CD8⁺ T Zellen sowie deren Subpopulationen analysieren zu können (vgl. **Abb. 9**). Zur Gating-Optimierung wurden zudem jeweils sog. FMO (Fluorescence Minus One) Kontrollen sowie Isotyp Kontrollen angefertigt.

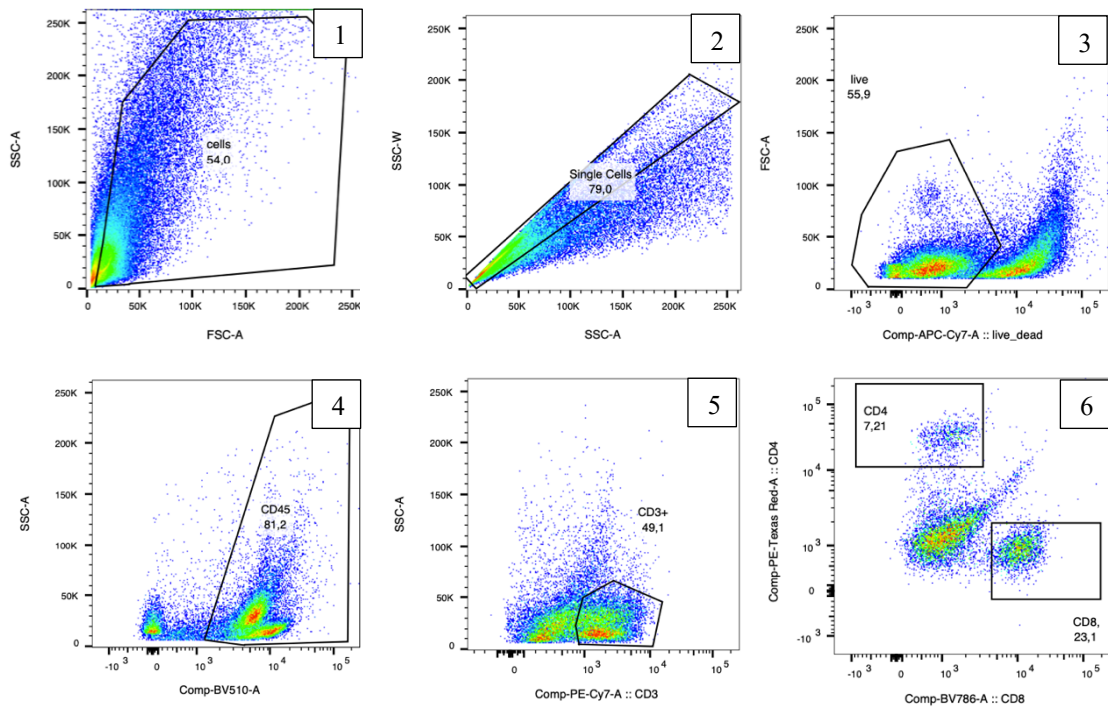


Abbildung 9: Gating Strategie

Intakte Zellen (1), Einzelzellen (2), Lebende Zellen (3), Leukozyten (4), CD3⁺ Zellpopulation (5), CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellpopulation

4.11 Statistische Tests

Für die statistische Auswertung der generierten Datensätze wurde das Programm GraphPad Prism 8 verwendet. Alle Graphen sind dabei als Mittelwert ± SEM (mittlerer Standardfehler) dargestellt. Soweit zwei voneinander unabhängige Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde der unpaired t-Test verwendet. Bei mehr als zwei Gruppen wurde ein one-way bzw. two-way ANOVA Test durchgeführt. Bei allen Replikaten handelt es sich um biologische Replikate soweit nicht anders angegeben. Folgende Signifikanzniveaus wurden definiert: $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****.

5 ERGEBNISSE

5.1 In vitro

5.1.1 Zeitabhängige Aktivierung von humanen CD4⁺ T Zellen

Um einen Überblick zu gewinnen, ab welchem Zeitpunkt nach Start der Zugabe der T-Zellaktivatoren (anti-CD3, anti-CD28 Antikörpern) die CD4⁺ T Zellen ein Aktivierungssignal (CD69⁺) zeigen, wurden die Zellen nach Isolierung auf mit Poly-l-ornithin beschichteten Objektträgern gegeben (**Abb. 10a**). Dabei zeigte sich, dass nach 24 Stunden ca. 75 % der Zellen aktiviert waren. Zudem wurde nach 18 Stunden Aktivierung eine vermehrte Zellaggregation (Clusterbildung) festgestellt (**Abb. 10b**). Insbesondere innerhalb der Clusterformationen wurde ein hoher Anteil an aktivierten CD4⁺ T Zellen beobachtet, der sich mit längerer Aktivierungsdauer signifikant steigerte (**Abb. 10c**).

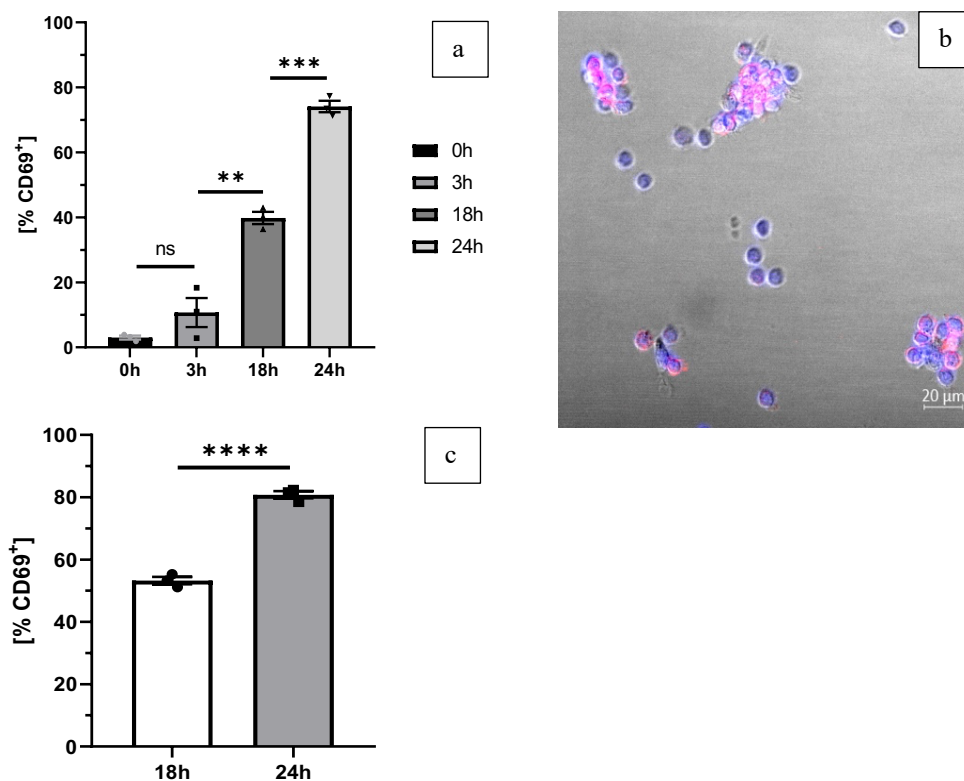


Abbildung 10: Aktivierte CD4⁺ T Zellen auf Poly-l-ornithin

Anteil von CD69⁺CD4⁺ T Zellen an der Gesamtzahl der T Zellen nach unterschiedlichen Aktivierungsintervallen (a). Repräsentatives Bild einer immunocytochemischen Färbung von aktivierten CD4⁺ T Zellen (blau), CD69⁺ (rot), Durchlicht (b). Anteil der CD69⁺CD4⁺ T Zellen in Clusterformationen nach 18h bzw. 24h (c). Je biologischem Replikat wurden jeweils mindestens 10 Gesichtsfelder (VF) ausgewertet n=3, p < 0,01 **, p < 0,001 ***, p < 0,0001 ****.

5.1.2 Inhibierung der T Zell Clusterbildung

Um den Mechanismus der T Zell Clusterbildung zu untersuchen, wurden spezifische Oberflächenproteine (ICAM-1, CD11b) inhibiert, welche für die Zell-Zell Interaktion verantwortlich sein könnten. Der Effekt wurde nach 18 Stunden Aktivierung untersucht, da ab diesem Zeitpunkt eine deutliche Clusterbildung zu erkennen war. Die Neutralisierung von ICAM-1 bzw. CD11b reduzierte die Clusterbildung nach 18 Stunden deutlich (**Abb. 11a, 11b**). Insbesondere nach Neutralisierung von ICAM-1 war die CD4⁺ T Zell Clusterbildung massiv (um > 95 %) vermindert.

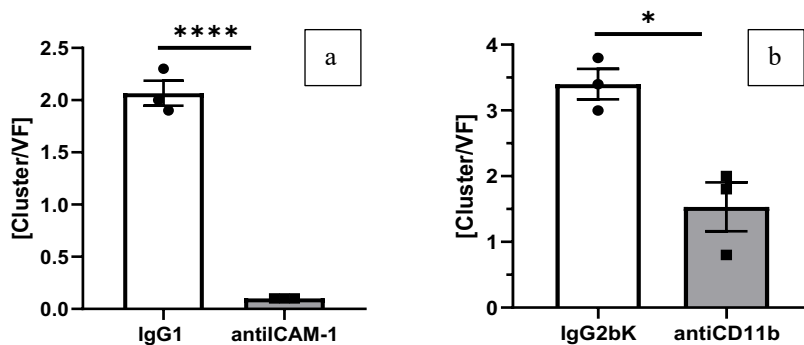


Abbildung 11: Einfluss von ICAM-1 und CD11b auf die T Zell Clusterbildung

Bildung von CD4⁺ T Zell Clustern nach Zugabe von antiICAM-1 (a) bzw. antiCD11b (b). Als Kontrollen wurden entsprechende Iso-Antikörper eingesetzt. Die Zellen wurden für 18h aktiviert. Je biologischem Replikat wurden mindestens 10 VF ausgewertet, n=3, p < 0,05 *, p < 0,0001 ****.

5.1.3 Expression profibrinolytischer und proinflammatorischer Proteine in CD4⁺ T Zellen

Bei Vorversuchen im Tiermodell ergaben sich Hinweise auf eine potenziell koagulationsinhibierende Funktion der CD4⁺ T Zellen. Aus diesem Grund wurde die Fibrinolyse-Kompetenz der humanen T Zellen in vitro überprüft. Nach 18 Stunden Aktivierung der CD4⁺ T Zellen war die uPAR Expression von in Clustern lokalisierten T Zellen deutlich erhöht im Vergleich zu einzelnen T Zellen (**Abb. 12a**). Die Assoziation von uPA mit den in Clustern lokalisierten T Zellen war gegenüber einzelnen T Zellen tendenziell erhöht (**Abb. 12b**). Zudem konnte im Vergleich zu einzelnen T Zellen innerhalb der Clusterformationen eine signifikant höhere Intensität von IL-2, einem wichtigen Zytokin, das u.a nach T-Zellrezeptor Aktivierung freigesetzt wird, beobachtet werden (**Abb. 12c, 12d**).

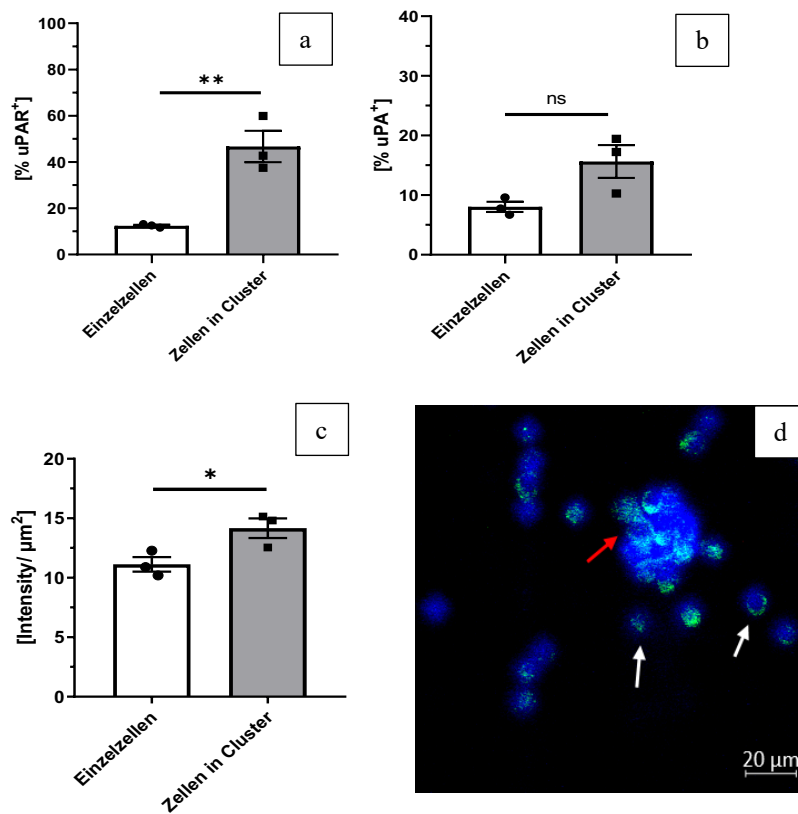


Abbildung 12: Assoziation von uPA, uPAR bzw. IL-2 mit aktivierten CD4⁺ T Zellen

Anteil an uPAR- (a), uPA- (b) bzw. IL-2 positiven (c) CD4⁺ T Zellen in Clustern bzw. Einzelzellen. Repräsentatives Bild einer immunocytochemischen Färbung von 18h aktivierten CD4⁺ T Zellen (blau), IL-2 (grün), IL-2 positives Cluster (roter Pfeil), IL-2 positive Einzelzelle (weißer Pfeil), (d). Die Zellen wurden für 18h auf Poly-l-ornithin aktiviert. Je biologischem Replikate wurden mindestens 10 VF ausgewertet, n=3, p < 0,05 *, p < 0,01 **.

5.1.4 Assoziation von PAI-1 mit aktivierten CD4⁺ T Zellen

Um zu prüfen, ob neben profibrinolytischen Proteinen auch Fibrinolyse-Inhibitoren mit den aktivierten T Zellen assoziiert waren, wurde nach PAI-1 und uPAR positiven T Zellen gefahndet (**Abb.13a**). Zusätzlich wurde der Effekt der Clusterinhibierung auf die PAI-1 Expression analysiert. Nach 18 Stunden Aktivierung war die PAI-1-Positivität der in Cluster befindlichen CD4⁺ T Zellen höher als in einzelnen T Zellen (**Abb. 13b**). Nach Inhibierung der Clusterbildung mittels neutralisierendem anti-ICAM-1 Antikörper war die Gesamtmenge an PAI-1⁺ Zellen sowie die Menge an PAI-1⁺ Einzelzellen in der Isotyp Gruppe auf einem Level (**Abb13c**).

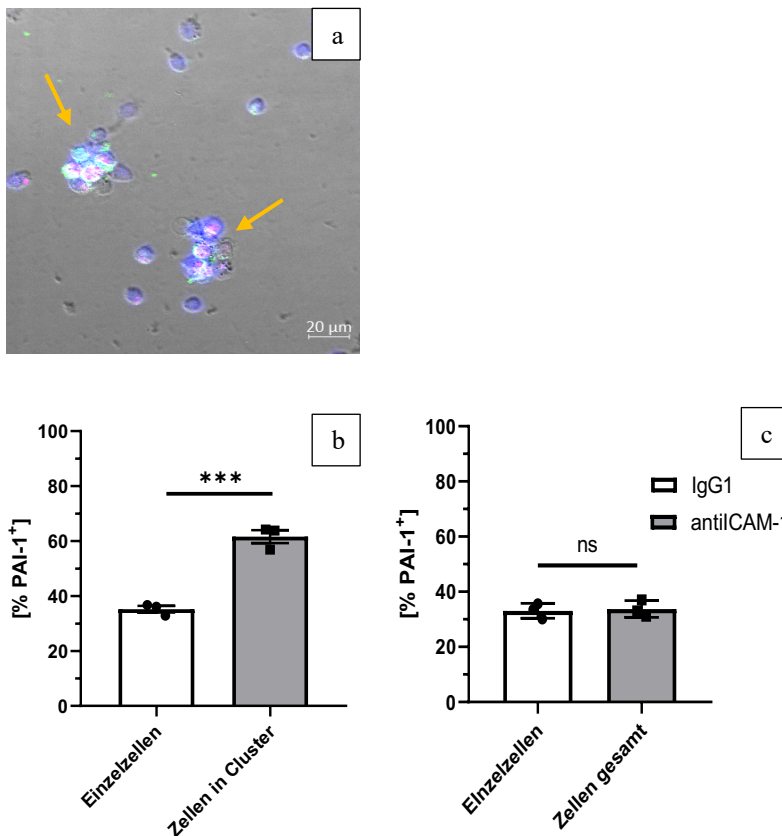


Abbildung 13: Assoziation von koaguloregulatorischen Proteinen mit CD4⁺ T Zellen

Repräsentatives Bild einer immunocytochemischen Färbung von 18h aktivierten CD4⁺ T Zellcluster (gelbe Pfeile), Zellkerne (blau), uPAR (grün) und PAI-1 (rot) aufgenommen in Transmissionslicht (a). Anteil an PAI-1⁺ T Zellen in Clustern bzw. Einzelzellen (b). Anteil an PAI-1⁺ Einzelzellen der IgG1 Kontrolle sowie Gesamtzahl der PAI-1⁺ Zellen nach Einsatz eines neutralisierenden ICAM-1 Antikörpers (c). Maßstab 20 µm. Die Zellen wurden für 18h auf Poly-l-ornithin aktiviert. Je biologischem Replikate wurden mindestens 10 VF ausgewertet, n=3. p < 0,001 ***

5.1.5 CD11b vermittelte T Zell Adhäsion

Danach wurde analysiert, inwiefern das Integrin CD11b die T-Helferzell-Adhäsion auf verschiedenen Oberflächen vermittelt. Dafür wurden die Zellen mit einem neutralisierenden anti-CD11b Antikörper bzw. der Isotyp Kontrolle behandelt und im Anschluss auf Fibrin gegeben und visualisiert (**Abb. 14a, 14b**). Auf Poly-l-ornithin beschichteten Wells war kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und der Interventionsgruppe festzustellen (**Abb. 14c**). Jedoch reduzierte die Neutralisation von CD11b die Adhäsion der aktivierten T Zellen an Fibrin signifikant (**Abb. 14d**). Die Neutralisation von CD11b zeigte bei nicht aktivierten T Zellen keinen Effekt (**Abb. 14e**).

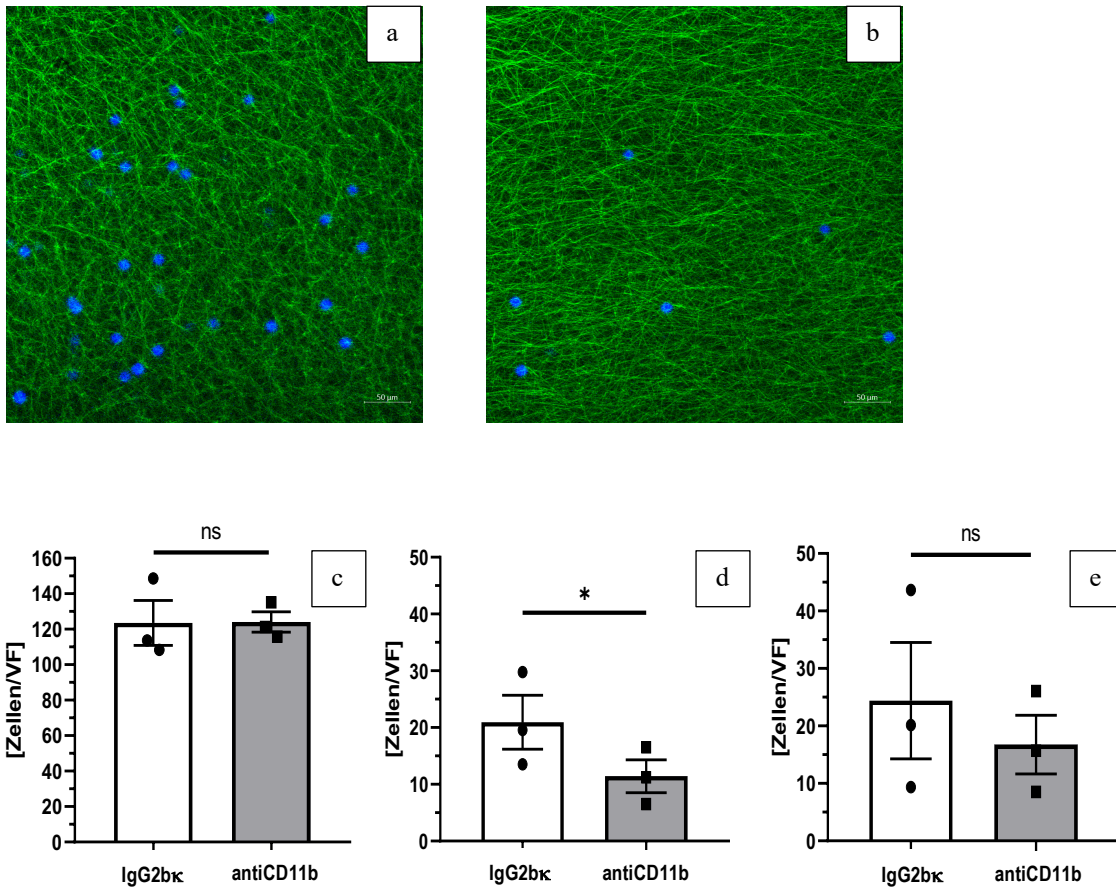


Abbildung 14: T Zell Adhäsion auf Fibrin

Repräsentatives Bild einer immunocytochemischen Färbung von CD4⁺ T Zellen (blau) auf Fibrin (grün). Die Zellen wurden mit einer Isotyp IgG Kontrolle (a) bzw. einem neutralisierenden antiCD11b Antikörper (b) behandelt. Maßstab 50 µm. Adhäsion von 18h aktivierten CD4⁺ T Zellen auf Poly-l-ornithin (c) bzw. Fibrin (d), Adhäsion von nicht-aktivierten CD4⁺ T Zellen auf Fibrin (e). Je biologischem Replikate wurden mindestens 10 VF ausgewertet, n=3, p < 0,05 *.

5.1.6 Verstärkung der CD4⁺ T Zellaktivierung durch Plättchen

Da in vivo-Experimente eine deutliche Interaktion von CD4⁺ T Zellen mit Plättchen zeigten, wurden isolierte Plättchen und CD4⁺ T Zellen unabhängig voneinander aktiviert und anschließend gemeinsam auf Poly-l-ornithin inkubiert (Abb. 15a). Dabei konnte eine signifikante Steigerung der T Zellaktivierung (CD69⁺ Signal) im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Zugabe von aktivierten Plättchen festgestellt werden (Abb. 15b). Die Plättchen-induzierte Steigerung der T-Zellaktivierung ließ sich durch Neutralisierung von CD154(CD40L) signifikant herabsetzen (Abb. 15b). Die aktivierten Plättchen in Kombination mit nicht aktivierten T Zellen sowie die aktivierten Plättchen in Kombination mit aktivierten T Zellen zeigten eine vergleichbare Clusterbildung. Innerhalb dieser Cluster zeigte sich allerdings ein signifikanter Unterschied bei den CD69⁺ Clustern (Abb. 15c).

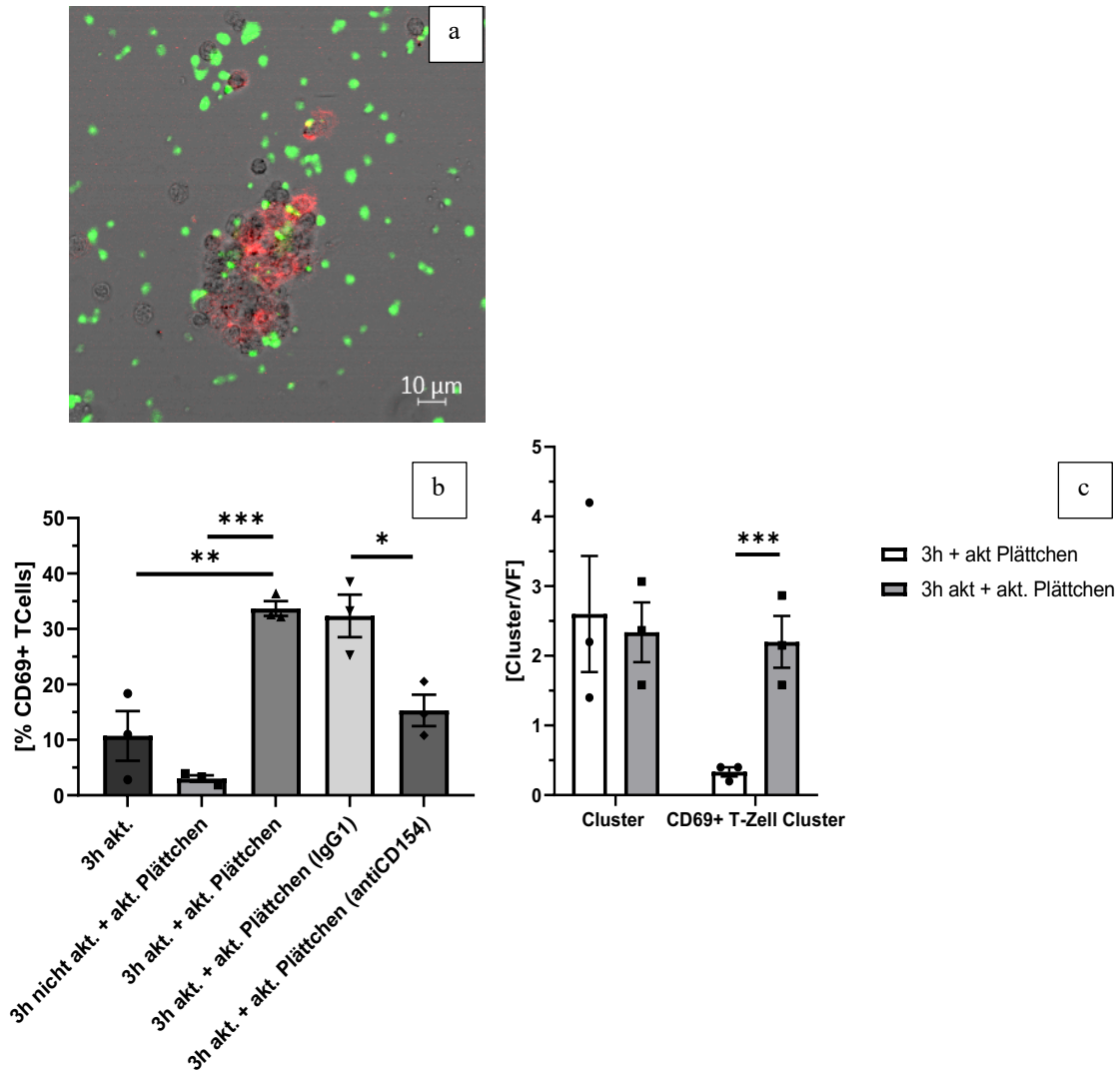


Abbildung 15: Plättchen steigern CD154 abhängig die T Zellaktivierung in vitro

Immuncytochemische Färbung von CD69⁺ (rot), CD4⁺ T Zell Clusterformation (Durchlicht) und aktivierten Plättchen (grün) nach 3h Aktivierung auf Poly-l-ornithin. Maßstab 10 µm (a). Prozentualer Anteil an CD69⁺ T Zellen auf Poly-l-ornithin (b). Clusterformation bzw. Menge an CD69⁺ T Zellclustern mit bzw. ohne T-Zellaktivierung sowie Zugabe von aktivierten Plättchen (c). Je biologischem Replikat wurden mindestens 10 VF ausgewertet, n=3, p < 0,05 *, p < 0,01 **, p < 0,001 ***.

5.1.7 CD4⁺ T Zellaktivierung auf unterschiedlichen Oberflächen

Experimente im Mausmodell (systemische Infektionen mit *E. coli*) deuteten auf eine Aktivierung der CD4⁺ T Zellen durch Fibrin hin. Daher wurde die Wirkung unterschiedlicher Oberflächen auf die Aktivierung humaner T-Helferzellen untersucht. Die T Zellen wurden auf mit Poly-l-ornithin,- Fibrinogen,- Fibrin oder Fibrin+Hirudin beschichteten Oberflächen aktiviert. Ausschließlich Fibrin steigerte die T Zellaktivierung (**Abb. 16a, b**). Nach Zugabe des direkten Thrombininhibitors Hirudin wurde die Fibrin-induzierte Zunahme der T-Zellaktivierung reduziert (allerdings auf Kosten drastischer mikroskopisch und makroskopischer Veränderung des Fibrinnetzwerks, **Abb. 16c**). Lösliches Thrombin erhöhte die T Zellaktivierung nach T-Zellrezeptor vermittelter Voraktivierung auf Poly-l-ornithin hingegen nicht (**Abb. 16d**).

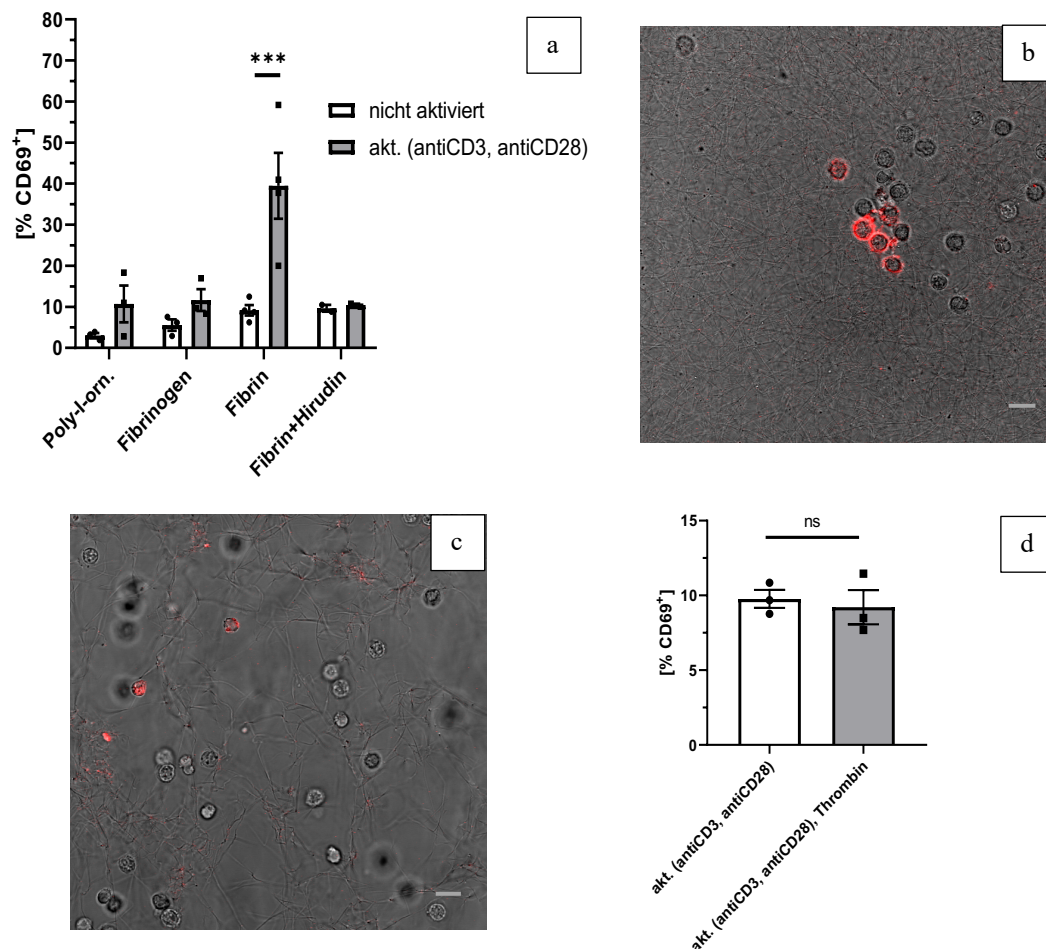


Abbildung 16: T Zellaktivierung auf unterschiedlichen Oberflächen

Prozentualer Anteil an nicht-aktivierten bzw. aktivierten T Zellen (CD69⁺) nach 3h auf verschiedenen Oberflächen (a). Repräsentatives Bild einer immunocytochemischen Färbung von für 3h aktivierten T Zellen auf Fibrin (b) bzw. nach Zugabe von Hirudin (c). Fibrin und T Zellen mittels Durchlicht dargestellt, CD69 Signal (rot). Prozentualer Anteil an CD69⁺ T Zellen nach Aktivierung und Zugabe von löslichem Thrombin auf Poly-l-ornithin nach 3h (d). Maßstab 10 µm. Je biologischem Replikat wurden mindestens 10 VF ausgewertet, n=3, p < 0,001 ***.

5.1.8 Einfluss von LFA-1 auf die Fibrin-vermittelte T Zellaktivierung

Das Integrin LFA-1 kann zur T-Zellrezeptor-vermittelten T-Zellaktivierung beitragen [116]. Um den Einfluss von LFA-1 auf die fibrininduzierte Aktivierung der T Zellen zu überprüfen, wurde ein neutralisierender LFA-1 Antikörper eingesetzt. Im Kontrolllexperiment mit Poly-l-ornithin zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Interventionsgruppe bezüglich der T-Zellaktivierung. Die fibrininduzierte T-Zellaktivierung wurden hingegen durch den antiLFA-1 Antikörper signifikant reduziert (**Abb. 17a**). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich in der IgG1 Kontrollgruppe vermehrt T-Zell Cluster ausbildeten, wohingegen die Clusterbildung in der Interventionsgruppe ausblieb (**Abb. 17b, c**). Die Menge an CD69⁺ Einzelzellen wurde durch LFA-1 Hemmung nicht beeinflusst (**Abb. 17d**).

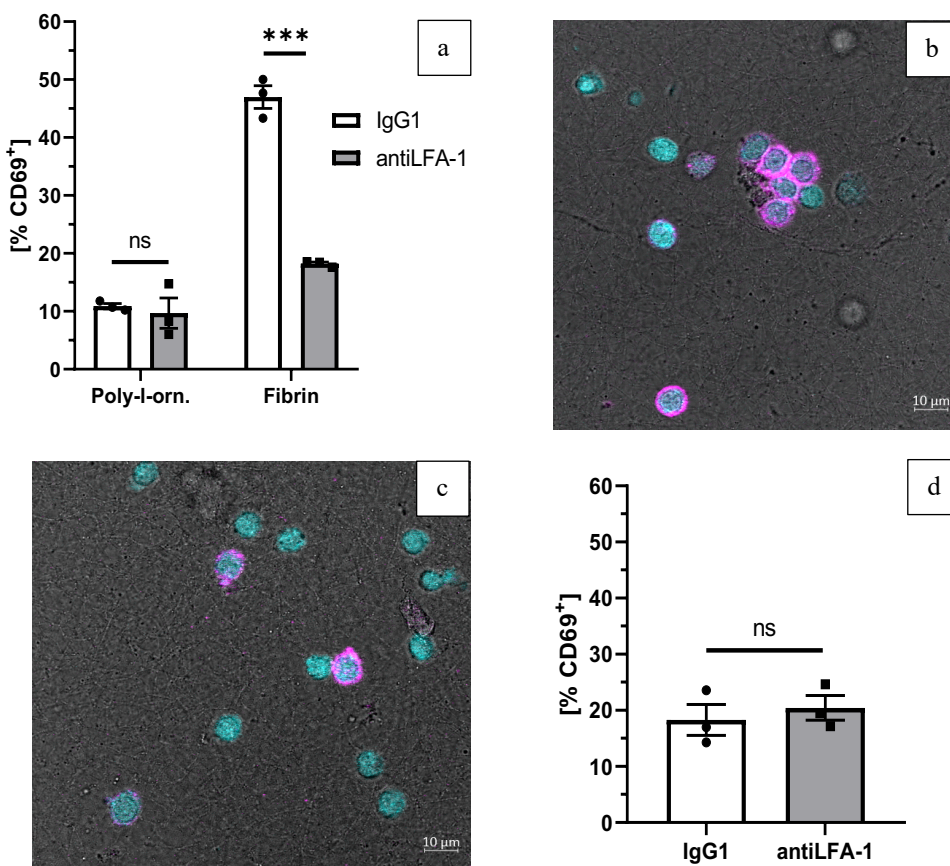


Abbildung 17: Einfluss von LFA-1 auf fibrininduzierte T Zellaktivierung

Prozentualer Anteil an CD69⁺ T Zellen auf Poly-l-ornithin bzw. Fibrin nach Einsatz von antiLFA-1 Antikörper (3h Aktivierung), (a). Repräsentatives Bild einer immunocytochemischen Färbung von CD4⁺ T Zellen (cyan) mit CD69⁺ Signal (violett) auf Fibrin, IgG1 Kontrolle (b), antiLFA-1 (c). Prozentualer Anteil an CD69⁺ Einzelzellen auf Fibrin nach Einsatz von antiLFA-1 (3h Aktivierung), (d). Maßstab 10 µm. Je biologischem Replikat wurden mindestens 10 VF ausgewertet, n=3p < 0,001 ***.

5.1.9 Einfluss von LFA-1 auf die T Zellmigration

Da LFA-1 zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion und Migration von Leukozyten spielt [116, 152] wurde überprüft, ob der Effekt von LFA-1 oberflächenabhängig ist. Daher wurden $CD4^+$ T Zellen mit antiLFA-1 versetzt und für 3 Stunden auf Poly-l-ornithin bzw. Fibrin gegeben. Anschließend wurden als Maß für die Migration die zurückgelegte Strecke sowie Geschwindigkeit (maximal, minimal und mittlere) der T Zellen bestimmt.

Die Migration der aktivierten T Zellen auf Poly-l-ornithin wurde durch antiLFA-1 nicht signifikant verändert (Abb. 18a, b, c, d)

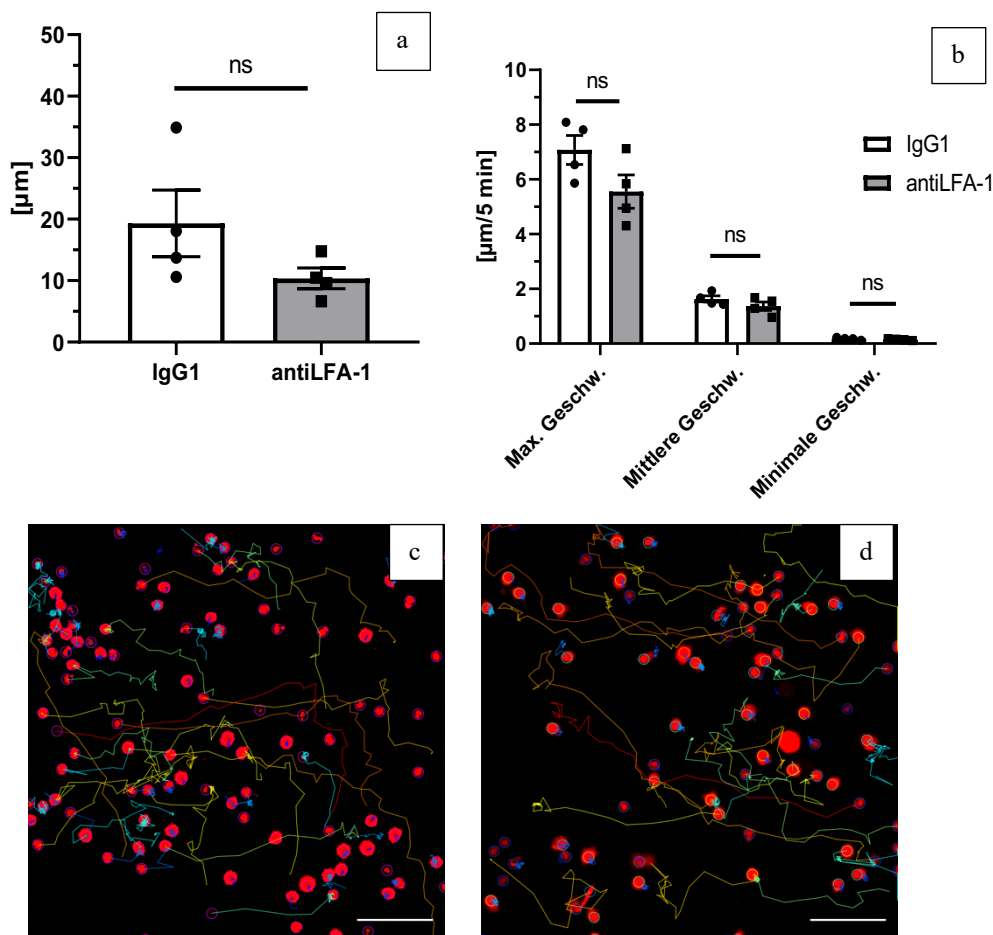


Abbildung 18: T Zellmigration auf Poly-l-ornithin

Migration von aktivierten T Zellen auf Poly-l-ornithin in Anwesenheit von antiLFA-1 (3h, in μm), (a). Geschwindigkeit der aktivierten T Zellen (maximal, mittlere, minimale in μm/5 min) in Anwesenheit von antiLFA-1 (b). Repräsentative Bilder der zurückgelegten Strecke (farbige Linien) der Zellen (rot) nach 3h Aktivierung und Behandlung mit IgG1 (c) und antiLFA-1 (d). Bildausschnitt 275 μm x 275 μm, Maßstab 50 μm. Die Parameter wurden mit Hilfe des TrackMate-Plugins (FIJI) analysiert, n=3.

Anschließend wurde die Migration nicht aktivierter T Zellen auf Fibrin untersucht. Nach antiLFA-1 Zugabe war die zurückgelegte Strecke nicht aktivierter T Zellen unverändert. Die maximale Geschwindigkeit war hingegen reduziert (Abb. 19a, b). Bei aktivierten T Zellen reduzierte der neutralisierende Antikörper die auf Fibrin zurückgelegte Strecke sowie die Geschwindigkeitsparameter deutlich (Abb. 19b, d, e, f).

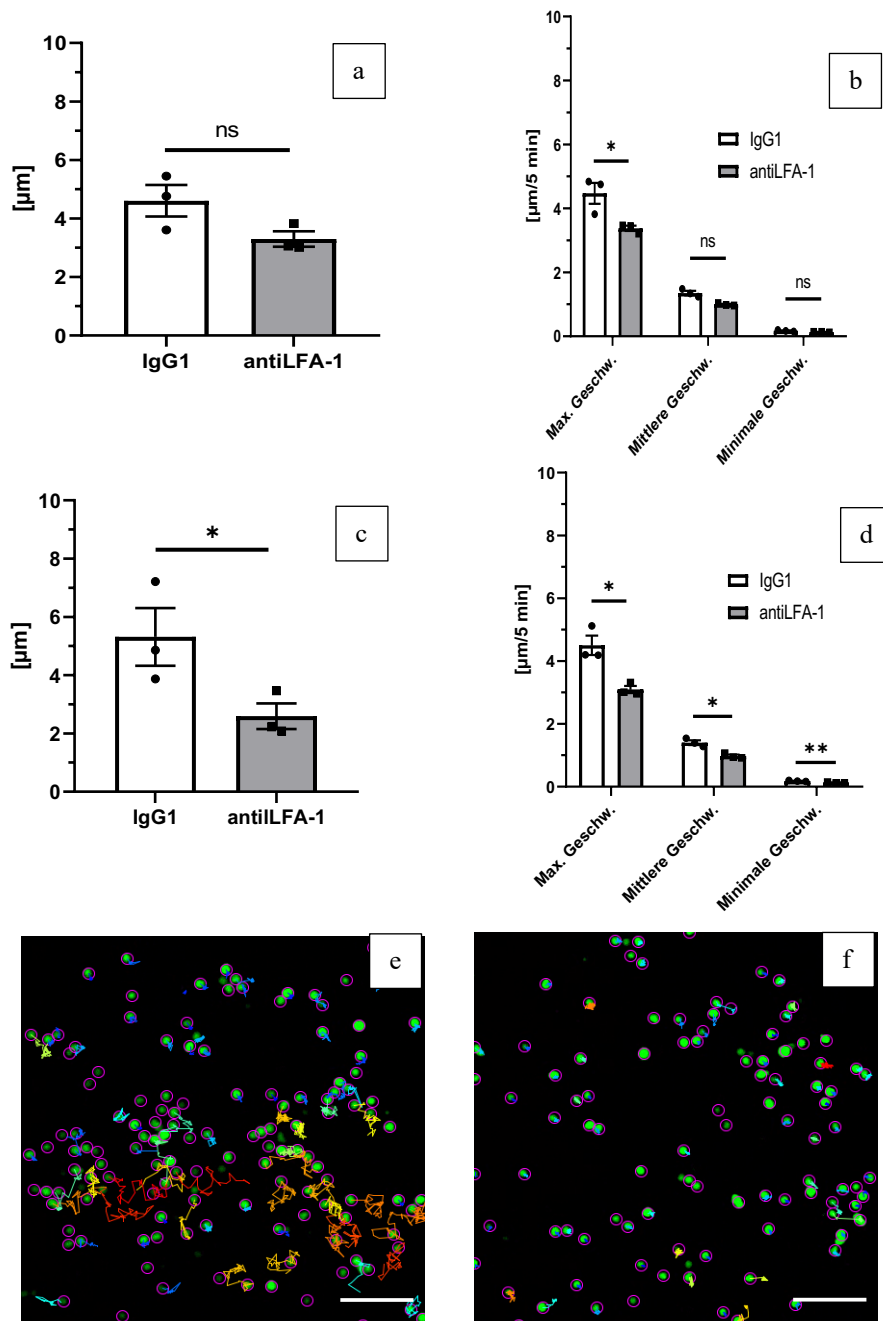


Abbildung 19: T Zellmigration auf Fibrin

Migration (a) und Geschwindigkeit (b) von nicht aktivierten T Zellen nach Behandlung mit IgG1 bzw. antiLFA-1(3h) auf Fibrin-Oberfläche. Migration (c) und Geschwindigkeit (d) von aktivierten T Zellen nach Behandlung mit IgG1 bzw. antiLFA-1(3h) auf Fibrin-Oberfläche. Repräsentative Bilder der zurückgelegten Strecke (farbige Linien) der aktivierten T Zellen (grün) in einem Zeitintervall von 3h nach Aktivierung und Behandlung mit IgG1 (e) und antiLFA-1 (f) auf Fibrin. Bildausschnitt 275 μm x 275 μm, Maßstab 50 μm. Zellen wurden mit Hilfe des TrackMate-Plugins (FIJI) analysiert, n=3 p < 0,05 *, p < 0,01 **.

5.1.10 Fibrinolyseaktivität von CD4⁺ T Zellen

Humane T Zellen wurden isoliert und für verschiedene Zeitintervalle auf einer Fibrin-Plasminogen-Mischung inkubiert. Die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin wurde photometrisch über Veränderung der Absorption (A_{405}) unter Verwendung des chromogenen Substrats S-2251 bestimmt. Nach 3 Stunden Inkubation wurde im Vergleich zur Negativkontrolle eine erhöhte Plasminbildung beobachtet (**Abb 20a**). Der Effekt wurde durch Aktivierung der Zellen massiv verstärkt. Nach 18 Stunden Inkubation war die Fibrinolyseaktivität maximal. Um die Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können wurde die AUC (Area under the curve) der einzelnen zeitabhängigen Kurven bestimmt (**Abb. 20b**). Eine immunocytochemische Untersuchung zeigte, dass in der direkten Umgebung der T Zell Clusterformationen die Strukturen des Fibrinogens (**Abb. 20c**) bzw. Fibrins (**Abb. 20d**) unterbrochen waren.

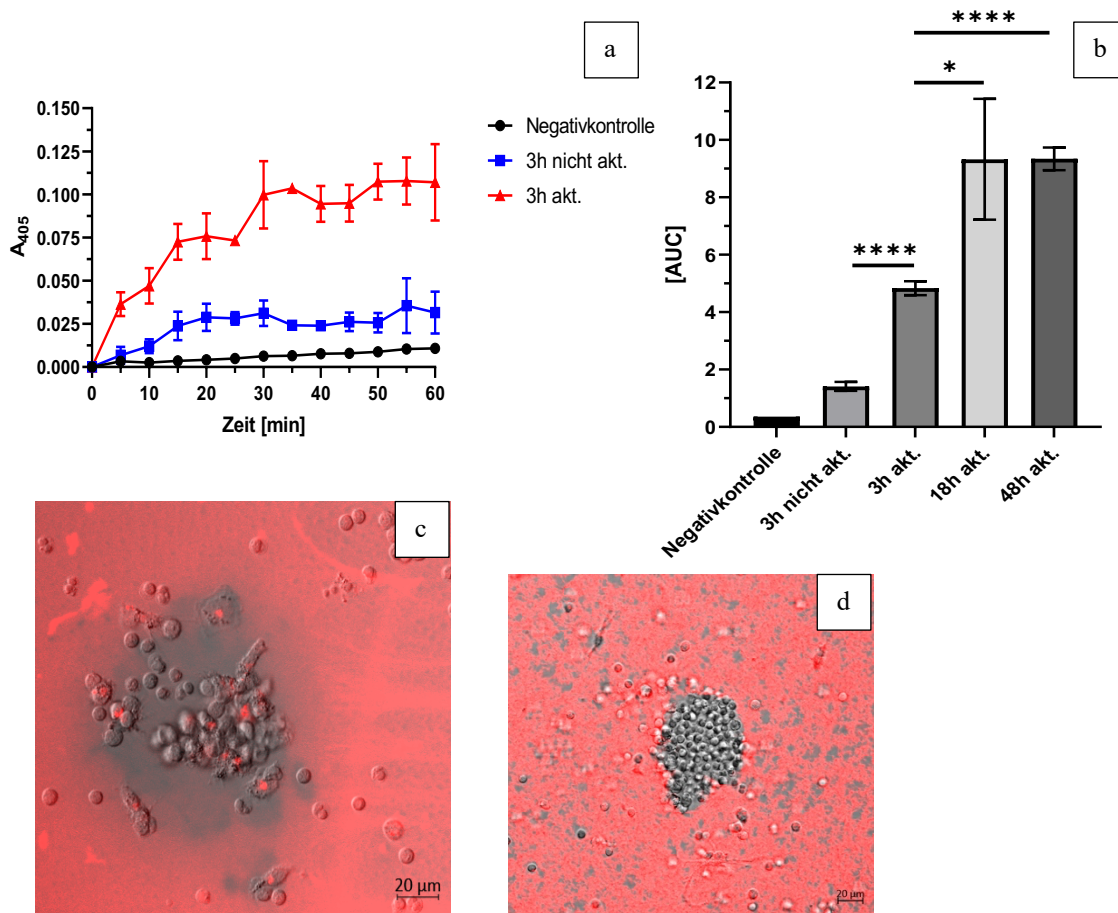


Abbildung 20: T Zell induzierte Fibrinolyseaktivität nach 3h

Kinetik der Plasminbildung durch Bestimmung der relativen Absorptionsänderung (405 nm). Negativkontrolle (schwarz), nicht aktiviert, 3h (blau), aktiviert, 3h (rot), (a). Darstellung der relativen Absorptionsänderung als Area under the curve (AUC) nach 3h, 18h und 48h, (b), n=3. Immunocytochemisches Bild von für 18h aktivierten CD4⁺ T Zellen (Transmissionslicht) auf Fibrinogen (rot), (c). Immunocytochemisches Bild von für 36h aktivierten CD4⁺ T Zellen (Transmissionslicht) auf Fibrin (rot), (d). Maßstab jeweils 20 μ m, n=3, $p < 0,05$ *, $p < 0,0001$ ****.

Da die aktivierten $CD4^+$ T Zellen einen starken fibrinolytischen Effekt zeigten und vorherige Versuche den Einfluss von LFA-1 auf die T Zellaktivierung dokumentiert hatten, wurde im Folgenden der Effekt von LFA-1 auf die T Zell induzierte Fibrinolyse überprüft. Der neutralisierende antiLFA-1 Antikörper reduzierte die Fibrinolyseaktivität der aktivierten und nicht aktivierten T Zellen deutlich (**Abb. 21a-c**).

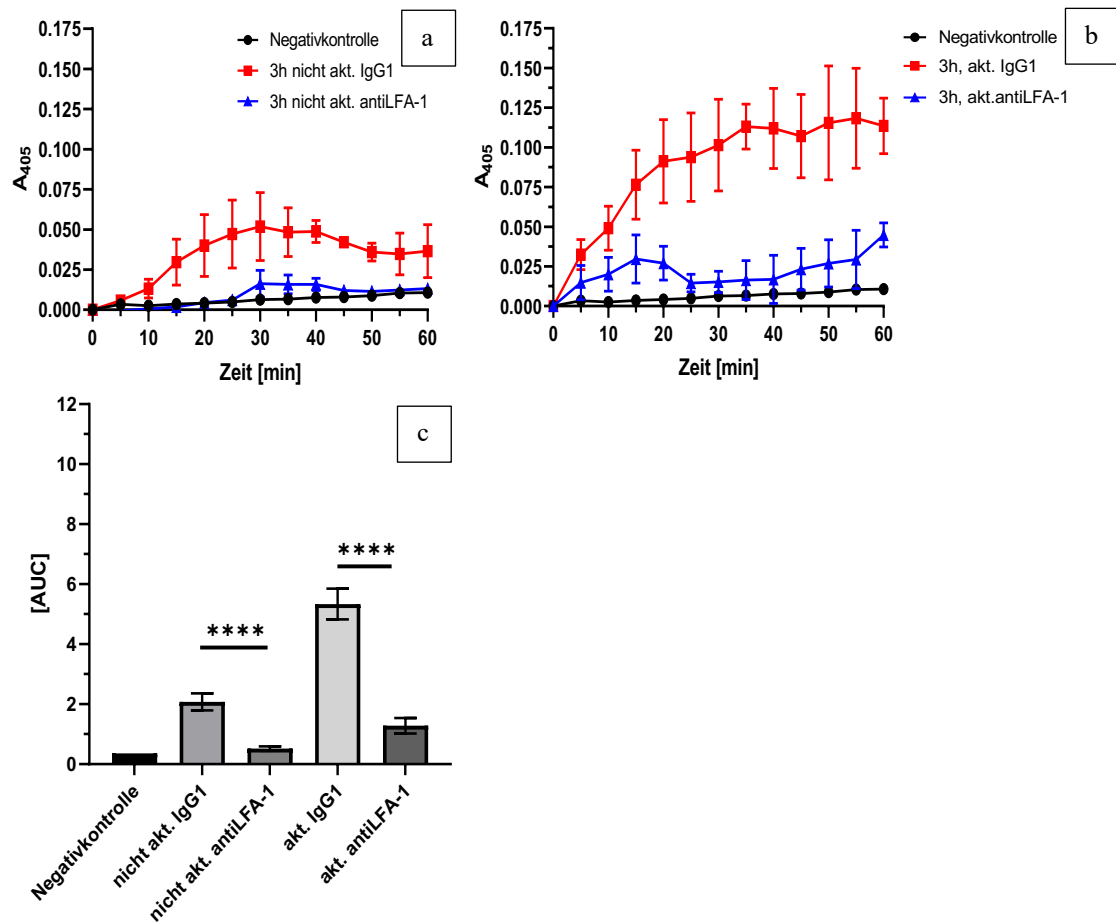


Abbildung 21: Effekt von LFA-1 auf die T Zell induzierte Fibrinolyseaktivität

Kinetik der Plasminbildung durch Bestimmung der relativen Absorptionsänderung (405 nm). Negativkontrolle (schwarz), IgG1 Kontrolle (rot), antiLFA-1 (blau). Nicht aktivierte T Zellen auf Fibrin, 3h (a), aktivierte T Zellen auf Fibrin, 3h (b). Darstellung der relativen Absorptionsänderung als AUC, 3h, (c), n=3, $p < 0,0001$ ****.

5.1.11 Einfluss der T Zell induzierten Fibrinolyse auf die T Zellmigration

Als nächstes wurde geprüft, ob die beschriebene Plasmin induzierte Fibrinolyse-Aktivität der aktivierten T Zellen einen Einfluss auf die T Zellmigration auf Fibrin hat, wobei der beschriebene Effekt für Makrophagen schon gezeigt werden konnte [153]. Dafür wurden isolierte T Zellen aktiviert, auf eine Oberfläche aus Fibrin und Plasminogen gegeben und für 3 Stunden mittels Live-Cell Imaging untersucht. Es wurde erneut die zurückgelegte Strecke sowie die Zellgeschwindigkeit (maximal, minimal und mittlere) gemessen (Abb. 22a, b). Die unter 5.1.10 gezeigte Fibrinolyse-Aktivität der aktivierten T Zellen wies keinen signifikanten Einfluss auf die T-Zellmigration auf.

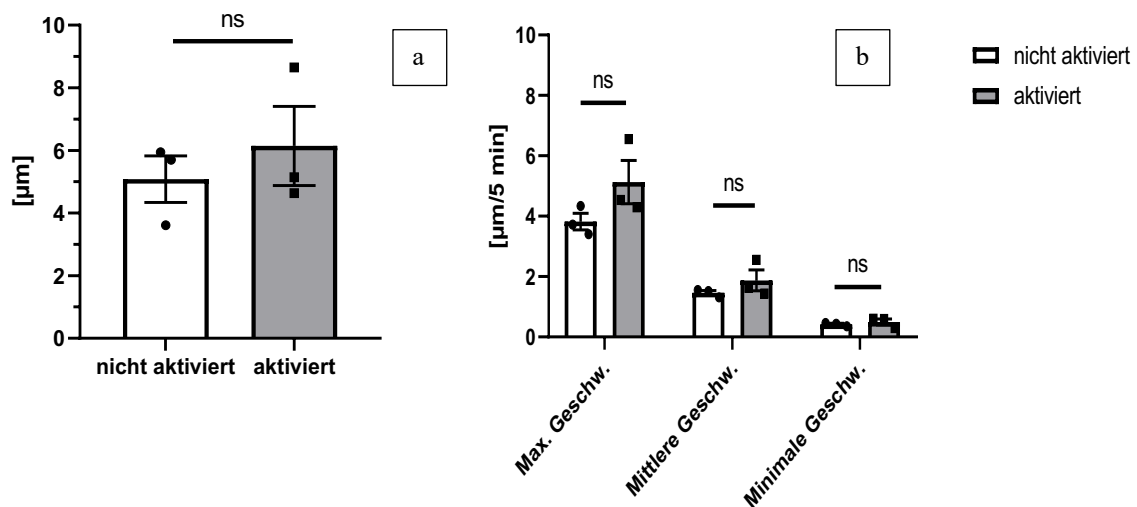


Abbildung 22: Einfluss der T Zell vermittelten Fibrinolyse-Aktivität auf die T Zell Migration

Zurückgelegte durchschnittliche Strecke von nicht-aktivierten bzw. aktivierten CD4⁺ T Zellen auf Fibrin + Plasminogen, 3h (a). Angabe der durchschnittl. Geschwindigkeit (max. min. mittlere) von nicht aktivierten bzw. aktivierten CD4⁺ T Zellen auf Fibrin, 3h (b). Zellen wurden mit Hilfe des TrackMate-Plugins (FIJI) analysiert, n=3.

5.2 Mausmodelle der systemischen bakteriellen Infektion

5.2.1 Einfluss von CD4⁺ T Zellen auf die Fibrinbildung in der Lunge

CD4⁺ T Zellen zeigten in den beschriebenen in vitro Versuchen eine deutliche fibrinolytische Wirkung. Daher sollte im Tiermodell untersucht werden, ob die Depletion der CD4⁺ T Zellen bei Infektionen mit dem gram negativen Bakterium *E. coli* bzw. dem gram positiven Bakterium *S. pneumoniae* einen Einfluss auf die Fibrinbildung im Lungengewebe der Versuchstiere aufweist. Dafür wurde das Lungengewebe mittels immunhistochemischer Färbung untersucht. Es konnte in beiden Modellen nach Depletion der CD4⁺ T Zellen eine signifikant höhere Fibrinmenge im Lungengewebe

festgestellt werden im Vergleich zu der IgG1 Kontrolle (**Abb.23 a, b**). Die T Zell-Depletion steigerte auch die Fibrinbildung in der Leber (nicht gezeigt). Demzufolge stehen die Ergebnisse im Einklang mit der bereits beschriebenen profibrinolytischen Wirkung der CD4⁺ T Zellen.

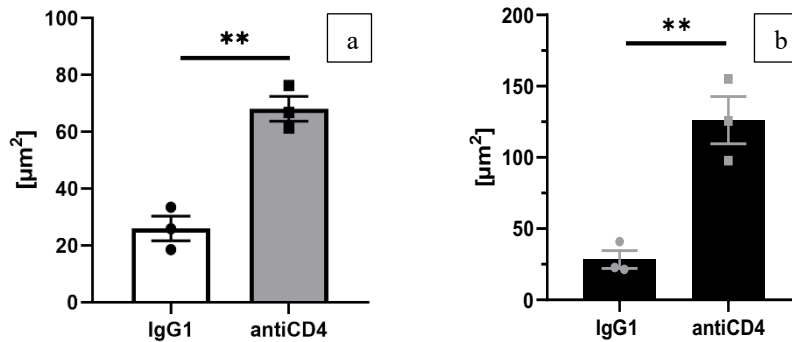


Abbildung 23: Durch Infektion induzierte Fibrinbildung in der Lunge nach T-Helferzell-Depletion

Fibrindeposition in Gefäßen der Lunge nach CD4⁺ T Zelldepletion und Infektion für 3h mit *E. coli* (a) bzw. 6h *S. pneumoniae* (b). Je biologischem Replikate wurden mindestens 5 VF ausgewertet, n=3, p < 0,01 **.

5.2.2 Einfluss von TAFI auf die Fibrindeposition bzw. Mikrothrombose

Die negative Regulation der Koagulation durch CD4⁺ T Zellen könnte durch Fibrinolyse-Inhibitoren beeinflusst werden. Daher sollte geprüft werden, ob die Neutralisierung von TAFI die infektionsinduzierte Fibrindeposition beziehungsweise Bildung von Mikrothrombosen beeinflusst. Hierfür wurde den Mäusen ein antiTAFI-Antikörper vor Infektion injiziert. Nach 18 Stunden Infektion mit *E. coli* wurden die Versuchstiere geopfert, um die Leber mittels immunhistochemischer Färbung zu analysieren. Dabei konnte nach 18 Stunden eine signifikante Reduktion der Fibrindeposition durch Inhibierung von TAFI festgestellt werden (**Abb. 24 a**). Zudem verringerte sich die Menge an Mikrothrombosen und okkludierten Gefäßen im Vergleich zur Kontrolle (**Abb. 24 b**).

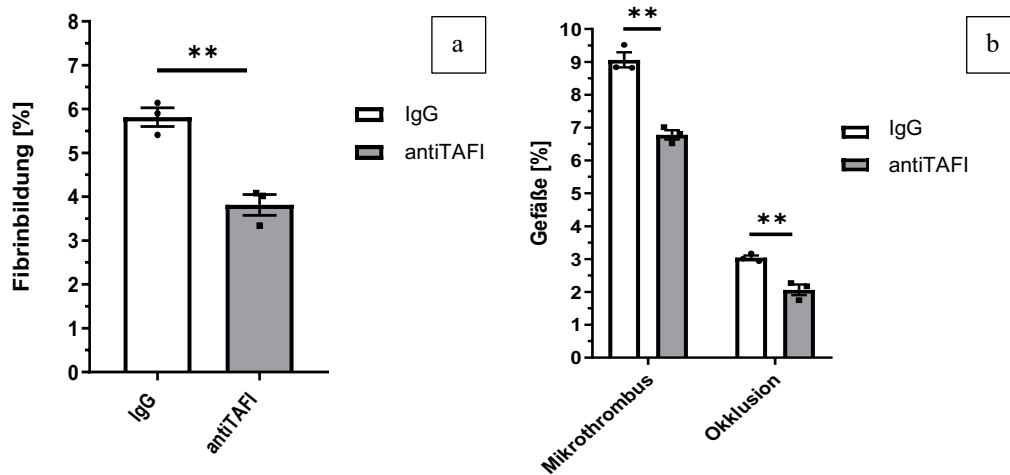


Abbildung 24: Fibrinbildung und Entstehung von Mikrothromben nach Hemmung von TAFI

Fibrin deposition in Gefäßen der Leber nach Einsatz von IgG1 bzw. antiTAFI (18h Infektion), (*E. coli*), (a). Prozentualer Anteil an Mikrothromben bzw. okkludierten Gefäßen (18h Infektion), (*E. coli*), (b). Je biologischem Replikant wurden mindestens 5 VF ausgewertet, n=3, p < 0,01 **.

5.2.3 tPA -Assoziation mit rekrutierten CD4⁺ T Zellen

Da isolierte humane CD4⁺ T Zellen die Plasminbildung begünstigten (vgl. 5.1.10), wurde analysiert, ob das profibrinolytische Protein tPA in vivo mit T-Helferzellen assoziiert ist. Insbesondere clusterassoziierte CD4⁺ T Zellen waren vermehrt mit tPA assoziiert (Abb. 25 a, b).

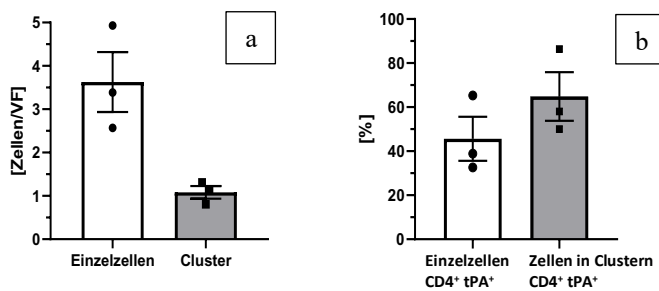


Abbildung 25: Assoziation von tPA mit rekrutierten CD4⁺ T Zellen

Rekrutierte CD4⁺ T Zellen sowie T Zellcluster in Gefäßen der Leber (18h Infektion), (*E. coli*), (a). Prozentualer Anteil an tPA⁺ Einzelzellen bzw. Zellen in Clustern (b). Je biologischem Replikant wurden mindestens 10 VF ausgewertet, n=3.

5.2.4 T Zellrekrutierung und Mikrothrombosen in uPAR defizienten Mäusen

In mit *E. coli* infizierten Mäusen, die eine Defizienz des Fibrinolyse Rezeptors uPAR aufwiesen, war die CD4⁺ T Zellrekrutierung unverändert (Abb. 26a). Hingegen zeigten die uPAR^{-/-} Tiere vermehrt mikrovaskuläre Gefäßokklusionen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 26b).

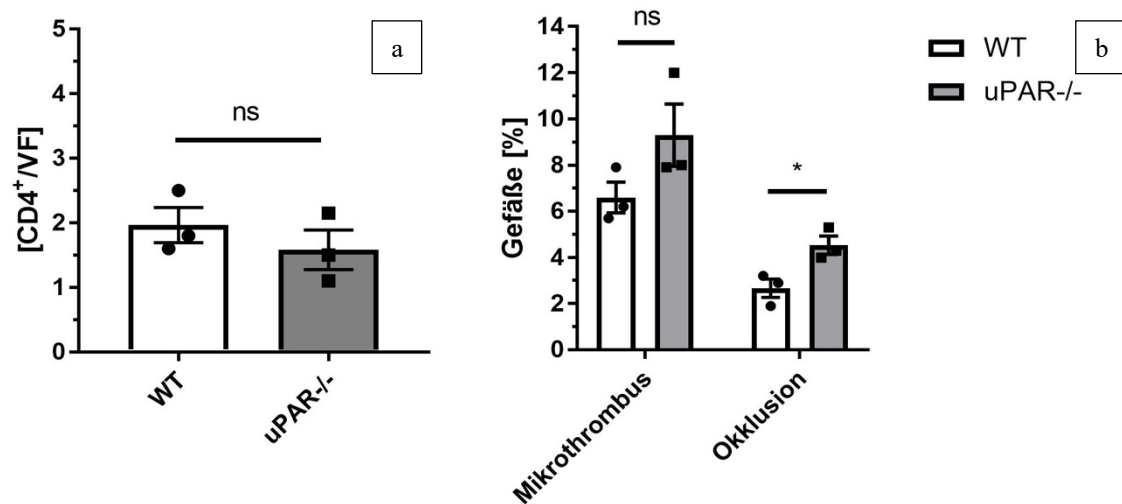


Abbildung 26: Einfluss von uPAR auf T Zellrekrutierung und Bildung von Mikrothrombosen

Rekrutierung von CD4⁺ T Zellen in das sinusoidale Lebergewebe nach 3h Infektion mit *E. coli* (a). Prozentualer Anteil an Mikrothromben bzw. okkludierten Gefäßen nach 3h Infektion mit *E. coli* (b). Je biologischem Replikat wurden mindestens 10 VF ausgewertet, n=3, p < 0,05 *.

5.3 Bedeutung des Alterns für die Rekrutierung von T Zellen während der Immuno­thrombose

Im Infektionsmodell sowie in den in vitro Versuchen zeigte sich, dass CD4⁺ T Zellen eine entscheidende Rolle, für die negative Regulation der Immuno­thrombose spielen. Da die Thromboseneigung beim Menschen mit zunehmendem Lebensalter deutlich ansteigt [154] wurde in den folgenden Versuchen der Einfluss von T Zellen auf die Pathogen-induzierte Immuno­thrombose bei alten Mäusen analysiert.

5.3.1 FACS Analyse nach Infektion mit *S. pneumoniae*

Um einen Überblick zu erhalten, welchen Einfluss die systemische bakterielle Infektion auf die Rekrutierung von T Zellen (inkl. Subtypen) in das Leber- beziehungsweise Lungengewebe aufweist, wurden die alten Mäuse mit dem gram positiven Bakterium *S. pneumoniae* infiziert. Zur Hemmung der Immuno­thrombose, wurde einer Interventionsgruppe Rivaroxaban verabreicht.

5.3.2 T Zellrekrutierung in das Lungengewebe

Für die Analyse der T Zellrekrutierung in die Lunge der alten Mäuse, wurden die Zellen aus dem Lungengewebe isoliert und anschließend mittels FACS analysiert. Nachdem die Zellen als Leukozyten identifiziert worden waren (CD45⁺), wurden sie in CD4⁺ beziehungsweise CD8⁺ T Zellfraktionen unterteilt, um darauffolgend die Subtypen (TH17, T_{reg}) zu identifizieren. Im Vergleich zu der uninfizierten Gruppe, war der prozentuale Anteil der CD4⁺ T Zellen in der Gruppe der infizierten Versuchstiere (DMSO) vermindert (**Abb. 27a**). Rivaroxaban zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Rekrutierung der CD4⁺ T Zellen in das Lungengewebe. Bei der Bestimmung der Subtypen wurde eine Reduktion der CD4⁺ROR_{γt}⁺ T Zellen (TH17-Zellen) nach Rivaroxaban beobachtet (**Abb. 27b**). Bei der uninfizierten Gruppe konnten keine T Zell Subtypen identifiziert werden (**Abb. 27b**).

Bezüglich der Organassoziation der CD8⁺ T Zellen war kein Unterschied zwischen den infizierten beziehungsweise uninfizierten Gruppen festzustellen (**Abb. 27c**). Bei den CD8⁺ Subtypen zeigte Rivaroxaban in der infizierten Gruppe keinen Effekt. In der uninfizierten Gruppe konnten keine T Zell Subtypen identifiziert werden. (**Abb. 27d**).

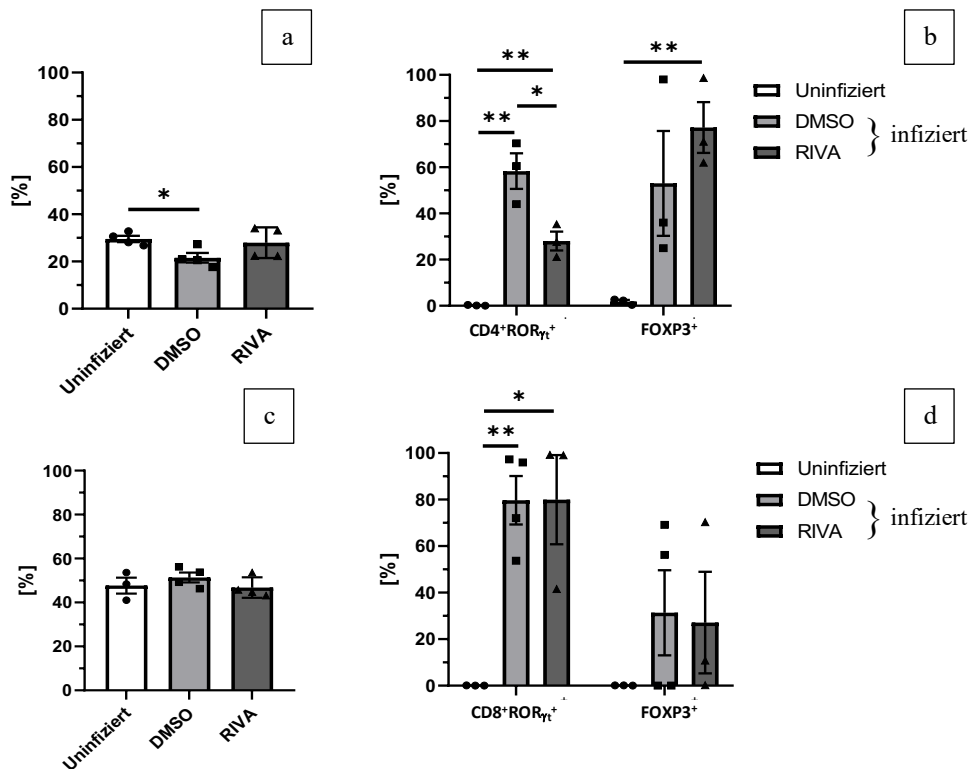


Abbildung 27: T Zellrekrutierung in die Mikrozirkulation der Lunge bei alten Mäusen (FACS)

Rekrutierung von CD4⁺ (a) bzw. CD8⁺ T Zellen (c) in mit *S. pneumoniae* infizierten bzw. uninfizierten Versuchstieren (6h DMSO bzw. Rivaroxaban-Behandlung). Bestimmung der prozentualen Menge der T Zellsubtypen (ROR_{γt}⁺ bzw. FOXP3⁺) der CD4⁺ (b) bzw. CD8⁺ Zellen (d), n=3, p < 0,05 *, p < 0,01 **.

5.3.3 T Zellrekrutierung in das Lebergewebe

Für die Analyse der Zellen des Lebergewebes wurde analog zu 5.3.2 vorgegangen. Die Infektion bewirkte keine Veränderung der CD4⁺ T Zellrekrutierung im Vergleich zu der uninfizierten Vergleichsgruppe. Rivaroxaban zeigte ebenfalls keinen Effekt auf die T Helferzell-Rekrutierung (**Abb. 28a**). Nach Infektion war die Rekrutierung der CD4⁺ROR_{γt}⁺ T Zellen im Vergleich zu der uninfizierten Gruppe erhöht (**Abb. 28b**). Zudem zeigte sich ein Anstieg der CD4⁺FOXP3⁺ T Zellen nach Infektion (DMSO) im Vergleich zur uninfizierten Gruppe (**Abb. 28b**).

In Bezug auf die CD8⁺ T Zellfraktion zeigte die Infektion keinen Effekt auf die Rekrutierung in das Lebergewebe (**Abb. 28c**). Hingegen zeigte sich ein drastischer Anstieg an CD8⁺ROR_{γt}⁺ T Zellen im Vergleich zu der uninfizierten Vergleichsgruppe (**Abb. 28d**). Rivaroxaban beeinflusste die Rekrutierung der T Zellsubtypen nicht.

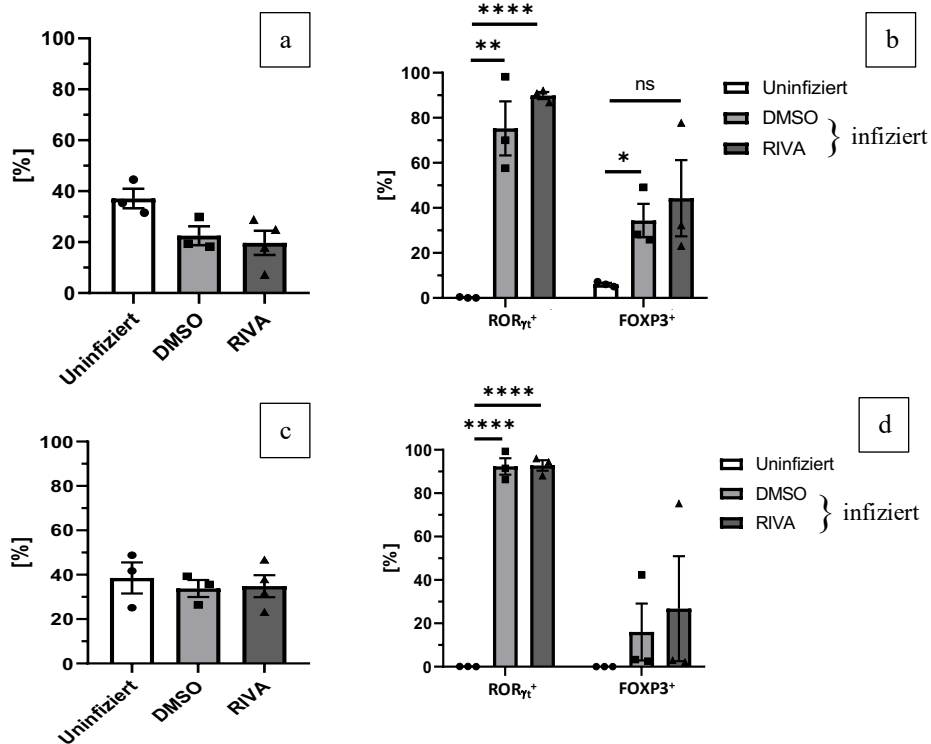


Abbildung 28: T Zellrekrutierung in die Leber bei alten Mäusen (FACS)

Rekrutierung von CD4⁺ (a) bzw. CD8⁺ Zellen (c) in mit *S. pneumoniae* infizierten bzw. uninfizierten Versuchstieren (6h DMSO bzw. Rivaroxaban-Behandlung). Bestimmung der prozentualen Menge der T Zellsubtypen (ROR γ t⁺ bzw. FOXP3⁺) von CD4⁺ (b) bzw. CD8⁺ Zellen (d), n=3;4, p < 0,05 *, p < 0,01 **, p < 0,0001 ****.

5.3.4 CD4⁺ T Zellrekrutierung nach 3h, 18h Infektion mit *E. coli* bei alten Mäusen

Im Anschluss daran wurde immunhistochemisch überprüft, welchen Einfluss die Infektionsdauer auf die Rekrutierung von CD4⁺ T Zellen in das sinusoidale Lebergewebe besitzt. Zudem sollte getestet werden, ob die Rekrutierung der Zellen fibrinabhängig ist. In Vorversuchen bei jungen Mäusen konnte in der Arbeitsgruppe von Professor Engelmann gezeigt werden, dass Rivaroxaban die Fibrinbildung innerhalb der Mikrozirkulation im Lebergewebe nach Infektion mit *E. coli* signifikant reduziert (gezeigt durch M. Tonina). Daher wurde eine Gruppe von alten Mäusen mit Rivaroxaban behandelt. Es ließ sich kein Unterschied in der zeitabhängigen Rekrutierung der CD4⁺ T Zellen zwischen 3 Stunden und 18 Stunden feststellen (**Abb. 29a**). Im Vergleich zur Kontrolle reduzierte Rivaroxaban die Rekrutierung nach 18 Stunden deutlich und verminderte tendenziell die Rekrutierung der CD4⁺ T Zellen nach 3 Stunden. Zudem verminderte Rivaroxaban die T Zell Clusterbildung nach 18 Stunden (**Abb. 29b**).

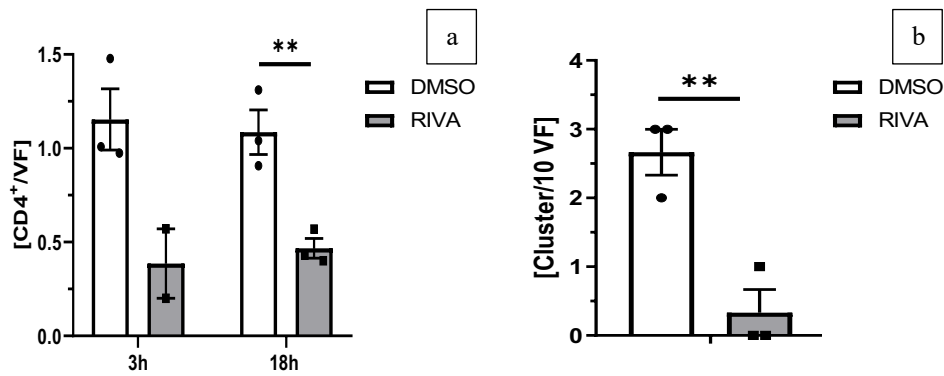


Abbildung 29: Einfluss von Rivaroxaban auf die T Zellrekrutierung bei alten Mäusen

Rekrutierung von CD4⁺ T Zellen in die Mikrozirkulation der Leber nach 3h bzw. 18h Infektion mit *E. coli* (a). CD4⁺ T Zellcluster nach 18h Infektion mit *E. coli* (b). Je biologischem Replikant wurden mindestens 10 VF ausgewertet, n=2;3, p < 0,01 **.

5.3.5 Rekrutierung von ROR_{γt}⁺ T Zellen nach Infektion mit *E. coli* bei alten Mäusen

Die Rekrutierung der ROR_{γt}⁺CD4⁺ T Zellen wurde durch die Behandlung mit Rivaroxaban reduziert (**Abb. 30a**). Interessanterweise war ein größerer Teil der ROR_{γt}⁺ Zellen CD4⁻. Die Rekrutierung dieses Zelltyps wurde durch Rivaroxaban tendenziell ebenfalls vermindert (**Abb. 30b**).

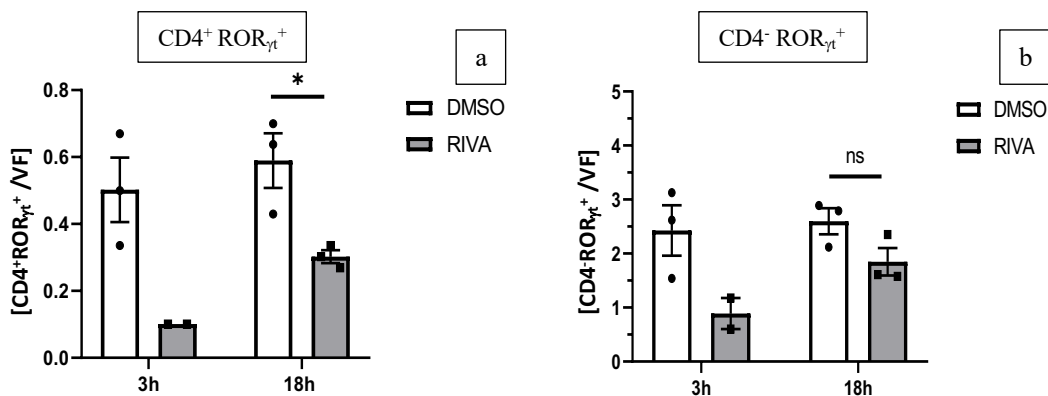


Abbildung 30: Rekrutierung von ROR_{γt}⁺ Zellen

Rekrutierung von ROR_{γt}⁺CD4⁺ T Zellen im sinusoidalen Lebergewebe nach 3h bzw. 18h Infektion mit *E. coli* (a). Menge an ROR_{γt}⁺ Zellen, ohne CD4⁺ Signal (b). Je biologischem Replikant wurden mindestens 10 VF ausgewertet, n=2;3, p < 0,05 *.

5.3.6 Rekrutierung von CD8⁺ T Zellen in die Mikrozirkulation alter Mäuse

Die FACS Analyse zeigte, dass ein erheblicher Anteil der organassoziierten Immunzellen in Leber und Lunge von mit *E. coli* infizierten alten Mäusen CD8⁺ T Zellen darstellten. Die Rekrutierung von CD8⁺ T Zellen in die Mikrozirkulation der Leber war in alten Mäusen gegenüber den jungen Mäusen deutlich erhöht (Abb. 31a). Die Rekrutierung wurde durch Rivaroxaban in den alten Mäusen deutlich reduziert. Zudem war in den alten Mäusen im Vergleich zu der jungen Vergleichsgruppe nach 3 Stunden beziehungsweise 18 Stunden eine höhere Menge an GranzymK⁺CD8⁺ T Zellen nachweisbar (Abb. 31b). Rivaroxaban hatte keinen Einfluss auf die Rekrutierung dieses T Zell Subtyps. GranzymK⁺CD8⁺ T Zellen zeigten keine scharfe Zellbegrenzung und waren mit Fibrin assoziiert (Abb. 31c).

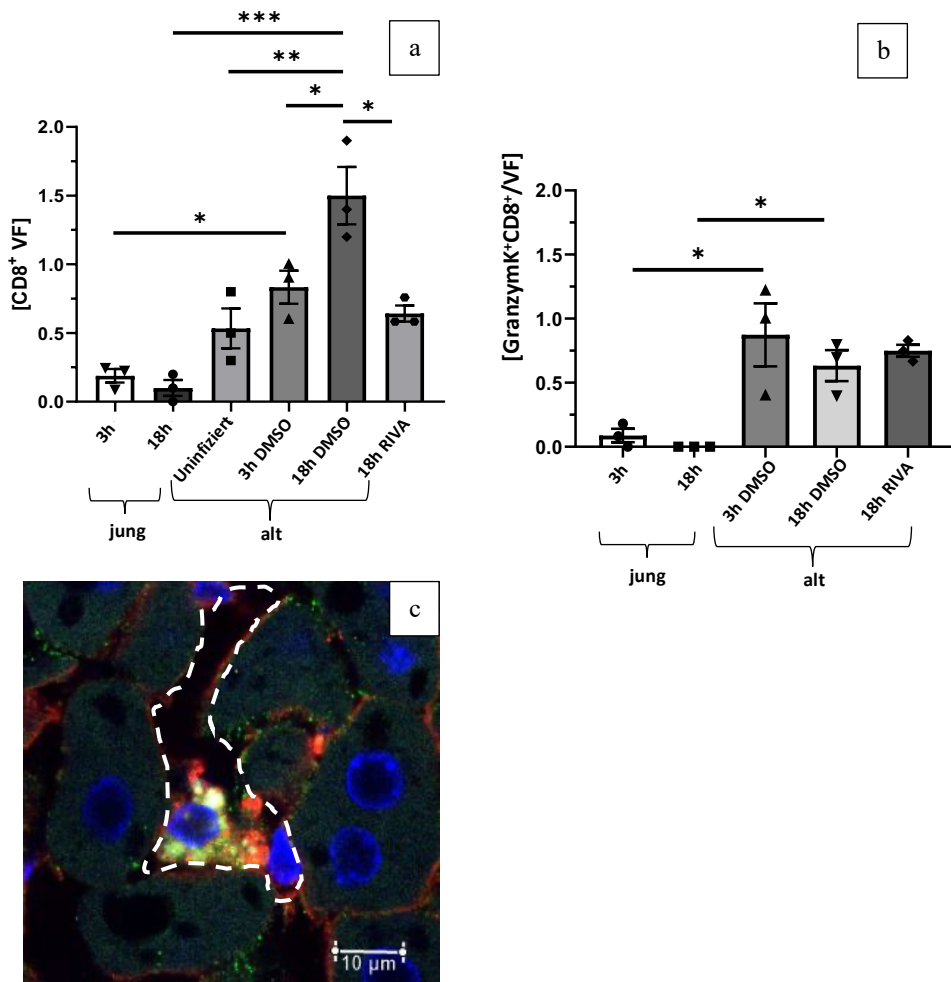


Abbildung 31: Rekrutierung von CD8⁺ T Zellen in die Mikrozirkulation der Leber in alten verglichen mit jungen Mäusen

Rekrutierung von CD8⁺ T Zellen in die Mikrozirkulation nach Infektion mit *E. coli* in jungen bzw. alten Mäusen nach Behandlung mit DMSO bzw. Rivaroxaban (a). GranzymK⁺CD8⁺ T Zellen in jungen bzw. alten Mäusen nach Behandlung mit DMSO bzw. Rivaroxaban (b). Repräsentatives Bild einer CD8⁺ (orange), GranzymK⁺ (grün) T Zelle assoziiert mit Fibrin (rot) innerhalb eines Mikrogefäßes (gestrichelte Linie), (c). Maßstab 10 µm. Je biologischem Replikat wurden mindestens 10 VF ausgewertet, n=3, p < 0,05 *, p < 0,01 **, p < 0,001 ***.

6 DISKUSSION

6.1 Interaktionen von T Zellen und Koagulation in vitro und in vivo

Zur Charakterisierung der Rolle von humanen T Zellen im Rahmen der Immuno-thrombose wurden T Zellen in vitro aktiviert und auf eine homogene und reproduzierbare Fibrin- bzw. Poly-l-ornithin-Oberfläche appliziert, um ihren koaguloregulatorischen Phänotyp zu analysieren.

Parallel dazu wurde die Wechselwirkung zwischen Fibrinbildung und T Zellrekrutierung in einem in vivo Mausmodell der Immuno-thrombose analysiert. Dazu wurden Mäuse einer systemischen Infektion mit *E. coli* bzw. *S. pneumoniae* ausgesetzt. In diesem Modell der bakteriellen Infektion wird eine starke Immunreaktion hervorgerufen, ohne dass es zu lebensbedrohlichen septischen Krankheitsverläufen kommt.

Um den Einfluss des Alterungsprozesses auf die T Zell vermittelte Immunantwort nach systemischer Infektion zu überprüfen, wurde ein Mausmodell mit 20-22 Monaten alten Versuchstieren verwendet, was einem menschlichen Alter von circa 70 Jahren entspricht [155]. Nach Euthanasie der Versuchstiere wurden die Organe der Mäuse detailliert analysiert, um potenziell maligne Veränderungen und Vorerkrankungen zu identifizieren. Versuchstiere mit malignen Veränderungen wurden ausgeschlossen.

6.2 Methoden

Zum Nachweis der Expression koaguloregulatorischer Proteine wurden die isolierten aktivierten T Zellen in vitro immunocytochemisch markiert und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Dabei wurden unterschiedliche T Zell-Aktivierungsintervalle untersucht. Des Weiteren wurde der Effekt von aktivierten Thrombozyten auf die T Zellaktivierung überprüft. Auch wurde die T Zell vermittelte Fibrinolyseaktivität bestimmt sowie die Migration und Adhäsion der T Zellen auf verschiedenen Oberflächen untersucht.

Um die intravasale Fibrindeposition in vivo zu bestimmen, wurden die präparierten Organschnitte immunhistochemisch angefärbt, wobei zur Visualisierung der Lebersinusoiden ein anti-Stabilin-2 Antikörper verwendet wurde [156]. Zur Visualisierung der Gefäßstruktur der Lunge wurde ein anti-CD31 Antikörper verwendet. Für die Fibrinfärbung wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch die beta II-Kette des Fibrins markiert, ohne dabei Fibrinogen anzufärben.

In der Kohorte der alten Mäuse wurden die Leber- beziehungsweise Lunge- assoziierten Immunzellen zunächst mittels FACS analysiert, um einen Überblick über die Gesamtheit der Zellpopulationen zu erhalten. Darauf aufbauend wurde mittels Immunhistochemie die spezifische Rekrutierung der Immunzellen in die Mikrozirkulation der Lunge und Leber untersucht. Da ein Schwerpunkt der Untersuchung auf der Analyse der reziproken Beeinflussung von Fibrin und T Zellen lag, wurde innerhalb der Interventionsgruppe der direkte Faktor Xa Inhibitor Rivaroxaban eingesetzt.

6.3 T Zellaktivierung und dessen Effekt auf die Koagulation

Nach TCR-abhängiger Aktivierung der T-Helferzellen exprimierten 75 % der T Zellen innerhalb von 24 Stunden den frühen Aktivierungsmarker CD69 [157]. Zudem wurde eine verstärkte Clusterbildung der aktivierten T Zellen beobachtet.

Nach Aktivierung der T Zellen wurde eine verstärkte Expression des Adhäsionsmoleküls (ICAM-1) festgestellt, dessen Beteiligung an der Bildung von CD8⁺ T Zellaggregaten beschrieben wurde [120]. Neutralisierung von ICAM-1 reduzierte die CD4⁺ T Zellclusterbildung deutlich. Das Integrin CD11b ist ein weiteres Adhäsionsmolekül, welches in vivo nach bakterieller Infektion und Aktivierung von T Zellen exprimiert wird [117] und bei der Leukozytenmigration eine wichtige Rolle einnimmt. Die Neutralisierung von CD11b auf aktivierten CD4⁺ T Zellen zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Clusterbildung. Somit sind sowohl ICAM-1 als auch CD11b an der Bildung der T Zellaggregate beteiligt.

Die Expression des wichtigsten fibrinolytischen Rezeptors uPAR wurde durch Aktivierung der T Zellen gesteigert [158]. Aggregierte T Helferzellen wiesen einen höheren Prozentsatz an uPAR⁺ Zellen auf als CD4⁺ Einzelzellen. Dies deutet darauf hin, dass aktivierte CD4⁺ T Zellen in Clustern durch wechselseitige Interaktion vermehrt die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin begünstigen. Nach T-Zell-Aktivierung war auch der Prozentsatz an PAI-1 positiven CD4⁺ T Zellen in Clustern im Vergleich zu den Einzelzellen erhöht. Allerdings war das Ausmaß der Steigerung nicht so deutlich wie die Zunahme der uPAR Expression. Somit lässt sich eine koaguloregulatorische Kompetenz im Zuge der CD4⁺ T Zellclusterbildung annehmen. Des Weiteren konnte innerhalb der T Helferzell-Cluster eine erhöhte IL-2 Signalintensität pro Fläche gezeigt werden. Interleukin 2 besitzt pleiotrope Effekte (pro und antiinflammatorisch) auf T Zellen, wobei die Differenzierung zu TH17-Zellen und folliculären T Helferzellen inhibiert wird. In vivo scheint IL-2 die Koagulation zu aktivieren und tPA zu erhöhen [159].

Im Rahmen von Immunantworten kann es zu Thrombozyten-T-Zell Interaktionen kommen, wobei Thrombozyten unter anderem Adhensionsmoleküle, Chemokine und Cytokine freisetzen, welche die Aktivierung und Rekrutierung von Lymphozyten am Ort der Infektion begünstigen [160]. In vivo haben Thrombozyten eine fundamentale Rolle im Zuge der Thrombus Bildung. Daher wurde der Effekt der Interaktion zwischen Thrombozyten und CD4⁺ T Zellen untersucht. Thrombozyten exprimieren nach Aktivierung CD154 auf ihrer Zellmembran, welches CD40L bindet, das unter anderem von T Zellen exprimiert wird [161]. Die Inkubation von aktivierten T-Helferzellen mit aktivierten Thrombozyten erhöhte die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf den T- Helferzellen sowie deren Cluster Bildung. CD154-Inhibierung antagonisierte den beschriebenen thrombozytären Effekt. Somit könnten aktivierte Thrombozyten über Aktivierung der T Helferzellen einen Einfluss auf die Regulierung Koagulation besitzen.

6.4 Der Einfluss von Fibrin auf die T Zellaktivierung

In vivo zeigte sich neben der beschriebenen Interaktion zwischen Thrombozyten und CD4⁺ T Zellen eine deutliche Assoziation zwischen CD4⁺ T Zellen und Fibrin innerhalb von Mikrothrombosen. Um den Einfluss von Fibrin auf die CD4⁺ T Zellen zu untersuchen, wurden T Helferzellen auf Poly-l-ornithin, Fibrinogen bzw. Fibrin aktiviert. Die T-Zellaktivierung auf Fibrin war im Vergleich zur Aktivierung auf Fibrinogen und Poly-l-ornithin deutlich erhöht. Da die in vitro Bildung von Fibrin durch Thrombin verursacht wurde und Thrombin in der Lage ist die Proliferation von T Zellen über den Protease activated receptor 1 (PAR-1) zu fördern [162], wurde die Fibrinoberfläche nach Ausbildung mit dem direkten Thrombininhibitor Hirudin versetzt. Dadurch wurde die Menge an CD69⁺ Zellen deutlich reduziert, was zunächst für einen Thrombin-assoziierten Effekt auf die T Zellaktivierung sprechen würde. Allerdings kam es nach Einsatz von Hirudin zu deutlichen strukturellen (mikroskopisch und makroskopischen) Veränderungen des Fibrins. Insbesondere war die Fibrinstruktur weniger kompakt und dicht (**Abb. 16**), so dass die Ergebnisse mit beziehungsweise ohne Hirudin bezüglich der Beteiligung von Thrombin nicht miteinander vergleichbar sind. Die Inkubation von aktivierten CD4⁺ T Zellen mit Thrombin in Abwesenheit von Fibrin zeigte keinen Effekt auf die T Zellaktivierung im Vergleich zu aktivierten T Zellen ohne Thrombin. Somit ist der aktivierende Effekt auf die T Helferzellen vorwiegend durch eine direkte Interaktion der T Zellen mit Fibrin erklärbar.

6.5 Der Einfluss von LFA-1 auf die Aktivierung und Migration von CD4⁺ T Zellen

Da Fibrin die Aktivierung der T Helferzellen verstärkte wurde als nächstes untersucht, welcher Mechanismus für die gesteigerte T Zellaktivierung verantwortlich sein könnte. Nach TCR-Stimulierung wird die Expression des Integrins LFA-1 erhöht, wodurch anschließend die T Zellaktivierung über den Erk 1/2 Signalweg verstärkt wird [163]. LFA-1 ist auch für die Migration und Adhäsion von Lymphozyten an Endothelzellen beziehungsweise APC verantwortlich, die durch die Bindung an das Adhäsionsmolekül ICAM-1 vermittelt wird [116]. Die Adhäsion der T Zellen an Fibrin(-ogen) wird primär über das Integrin CD11b und unabhängig von LFA-1 gesteuert [164], was innerhalb der in vitro Experimente in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden konnte (**Abb. 14**). Nach Neutralisierung von LFA-1 wurde die durch Fibrin induzierte verstärkte T-Zellaktivierung antagonisiert. Die Neutralisierung von LFA-1 auf Poly-l-ornithin adhären, aktivierten T Zellen zeigte hingegen keinen Effekt. Zudem reduzierte LFA-1 Neutralisierung das Clustering der T Helferzellen auf Fibrin. LFA-1 vermittelt somit die direkte T-Zellaktivierung durch Fibrin sowie die Bildung von T-Zell Clustern.

Die LFA-1 abhängige Aktivierung der T Zellen durch Fibrin konnte darüber hinaus auch für die T Zellmigration gezeigt werden. Die mit antiLFA-1 Antikörpern behandelten Zellfraktionen legten in einem Zeitintervall von 3 Stunden eine signifikant geringere Strecke zurück und zeigte zudem eine geringere Zellgeschwindigkeit im Vergleich zur Isotyp Kontrolle. Der Effekt war auf das System mit Fibrin beschränkt und konnte auf einer Poly-l-ornithin Beschichtung nicht festgestellt werden. Hieraus kann gefolgert werden, dass Fibrin (vermittelt über LFA-1) auch die T Zell-Migration fördert.

6.6 CD4⁺ T Zellen und ihre fibrinolytische Wirkung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie früheren Arbeiten zeigen, dass die Aktivierung der T Zellen die Expression profibrinolytischer Proteine erhöht [158, 165]. Darüber hinaus war in den aktivierten T Zellen nach 18 Stunden auch die Expression von PAI-1 erhöht, einem wichtigen antifibrinolytisch wirksamen Protein. Der fibrinolytische Effekt der CD4⁺ T Zellen wurde immuncytochemisch bestärkt, da es nach 18 beziehungsweise 36 Stunden T-Zell Aktivierung insbesondere im Bereich der T Zellclusterformationen zum Abbau von Fibrin kam (**Abb. 20**). Nach Neutralisierung von LFA-1 war die durch Fibrin induzierte fibrinolytische Kapazität der T Zellen deutlich reduziert. Insbesondere wurde eine enge Verbindung von LFA-1 abhängiger T

Zellaktivierung, der fibrinolytischen Kompetenz der T Zellen und dem Fibrin-abhängigen Einfluss von LFA-1 auf die Fibrinolyse gezeigt. Da ein Zusammenhang zwischen der Plasmin vermittelten Fibrinolyse und der Migration von Makrophagen in entzündliches Gewebe postuliert werden konnte [153], wurde überprüft ob auch die fibrinolytische Wirkung der T Zellen einen Einfluss auf die Migration der Zellen auf Fibrin besitzt. Dabei konnte eine Tendenz festgestellt werden, dass aktivierte T Zellen über einen Zeitraum von 3 Stunden Aktivierung eine größere Strecke zurücklegen und zudem eine durchschnittlich höhere Zellgeschwindigkeit erreichen.

Der fibrinolytische Effekt der CD4⁺ T Zellen wurde abgesehen von den in vitro Experimenten auch im Tiermodell bestätigt. Dazu wurden Mäuse nach T Zelldepletion mit *S. pneumoniae* bzw. *E. coli* infiziert, um immunhistochemisch die Fibrindeposition innerhalb der Mikrozirkulation der Lunge zu bestimmen. Es zeigte sich in beiden Modellen eine erhöhte intravasale Fibrinbildung nach T Zelldepletion. Somit kann gefolgert werden, dass T Helferzellen die intravasale Fibrinbildung während systemischer Infektionen in vivo limitieren.

Allgemein wird davon ausgegangen, dass neben PAI-1 auch TAFI während der Sepsis für die Hemmung der Fibrinolyse verantwortlich sein könnte. Zudem besitzt TAFI über die Regulierung von C5A Anaphylatoxin eine anti-inflammatorische Wirkung [166]. In der frühen Phase der Sepsis-Erkrankung wurde ein verringertes Level an TAFI beziehungsweise erhöhte Menge an C5A im Plasma identifiziert [167]. Um die Wirkung von TAFI auf die Fibrindeposition beziehungsweise Bildung von Immuno-thrombosen in den Lebersinusoiden nach 18 Stunden bakterieller Infektion mit *E. coli* zu überprüfen, wurde den Versuchsmäusen ein neutralisierender antiTAFI Antikörper injiziert. TAFI-Inhibition reduzierte die Fibrindeposition in der Leber und verringerte die Bildung von Immuno-thrombosen im Vergleich zur Kontrolle. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass TAFI bei schweren systemischen Infektionserkrankungen vor allem im späteren Verlauf der Erkrankung für die Inhibierung der Fibrinolyse verantwortlich sein könnte [166].

6.7 Einfluss des Alters auf die T Zell Antwort nach systemischer Infektion

Es ist bekannt, dass sich im Laufe des Alterungsprozesses das Immunsystem und somit auch die Immunantwort auf Pathogene verändert. Um die T Zell vermittelte Immunantwort zu untersuchen, wurde in einem Pilotversuch die Verteilung der Zellen in Leber und Lungengewebe nach Infektion (6 Stunden) mit *S. pneumoniae* mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei zeigte sich in der Lunge eine signifikante Reduktion der CD4⁺ T Zellen nach Infektion im Vergleich zur uninfizierten Gruppe. Auch waren die Level an ROR_{γt}⁺CD4⁺ T Zellen in der Lunge nach Einsatz von Rivaroxaban reduziert. Die uninfizierte Kohorte zeigte signifikant weniger ROR_{γt}⁺ bzw. FOXP3⁺ CD4⁺ T Zellen im Vergleich zu der infizierten Gruppe, was für eine pathogen induzierte Proliferation der T Zellen spricht und zeigt, dass trotz fortgeschrittenen Alters die Differenzierung der T Zellen partiell funktionsfähig ist.

Auch innerhalb der CD8⁺ T Zellfraktion konnte nach Infektion ein hoher Anteil an ROR_{γt}⁺ und FOXP3⁺ Zellen identifiziert werden. Wohingegen die immunologische Kompetenz der CD8⁺ T Zellen bei Tumorerkrankungen beziehungsweise viralen Infektionen gut dokumentiert ist [168, 169], ist die Rolle der CD8⁺ T Zellen bei bakteriellen Infektionen noch unzureichend aufgeklärt. CD8⁺ROR_{γt}⁺ T Zellen scheinen ein hohes proinflammatorisches Potenzial zu besitzen [170]. CD8⁺FOXP3⁺ T Zellen bilden einen Bruchteil der nachweisbaren T Zellen im peripheren Blut gesunder Menschen beziehungsweise Mäuse aus (0,4 bzw. 0,1 %) und können während Infektionen stark suppressiv auf Effektor-T Zellen wirken [171]. Durch den Pilotversuch wurde somit deutlich, dass neben den CD4⁺ T Zellen eine genauere Betrachtung der CD8 T Zellfraktion bei alten Mäusen sinnvoll sein könnte. Um die Beteiligung der T Zellen während der Immunothrombose zu untersuchen, wurde das Lebergewebe immunhistochemisch untersucht. Dabei konnte eine fibrinabhängige intravasale Rekrutierung der CD4⁺ T Zellen bei Infektion mit *E. coli* nachgewiesen werden, wobei der Einsatz von Rivaroxaban die Menge an intravasalen CD4⁺ T Zellen signifikant reduzierte und die T Zell Clusterbildung verminderte. Zudem reduzierte Rivaroxaban das intravasale Level an ROR_{γt}⁺CD4⁺ T Zellen, was ebenso für eine fibrinabhängige Rekrutierung der TH17 Zellen innerhalb der Lebersinusoiden spricht.

Bei alten Mäusen war die intravasale CD8⁺ T Zellrekrutierung nach 3 beziehungsweise 18 Stunden deutlich erhöht gegenüber den jungen Mäusen. Rivaroxaban reduzierte die T

Zell-Rekrutierung bei alten Mäusen. Die fibrinabhängige Rekrutierung der CD8⁺ T Zellen ist somit spezifisch für alte Mäuse. Dies lässt vermuten, dass CD8⁺ T Zellen im Rahmen der Immuno-thrombose eine besondere Funktion im Alter einnehmen könnten.

Veränderungen der CD8⁺ T Zellpopulation im Alter wurden in der Literatur bereits beschrieben, wobei ein spezieller Phänotyp identifiziert werden konnte, der in der Maus ca. 50 % der CD8⁺ T Zellpopulation ausmacht [172]. Dieser mit dem Alter assoziierte CD8-Phänotyp exprimiert GranzymK, eine proinflammatorische Serinprotease, welche in Kombination mit IFN γ die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen aus Fibroblasten begünstigt. Zudem konnte gezeigt werden, dass der beschriebene Phänotyp eine positive Korrelation mit den Leveln von IL-6, IL-8 und TNF α aufweist, die als Marker für das sog. Inflammaging gelten [172]. Die CD8⁺GranzymK⁺ T Zellen scheinen somit maßgeblich an dem im Alter beschriebenen Senescence associated secretory phenotype (SASP) beteiligt zu sein [173, 174]. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob der beschriebene CD8-Phänotyp auch während der Infektion alter Mäuse mit *E. coli* intravaskulär detektiert werden kann. Nach 3 Stunden und 18 Stunden Infektion wurde ein signifikanter Anstieg der intravasalen CD8⁺GranzymK⁺ T Zellen im Vergleich zur jungen Vergleichsgruppe nachgewiesen. Der Einsatz von Rivaroxaban zeigte dabei keinen Einfluss auf die Rekrutierung in der betagten Kohorte. Die immunhistochemischen Bilder zeigten, dass CD8⁺GranzymK⁺ T Zellen keine scharfe Zellbegrenzung besitzen (**Abb. 31**), was für eine möglicherweise veränderte Zellmembran spricht, die im Zuge der Zellseneszenz mit veränderter Lipidstruktur einhergehen könnte [175]. Zudem zeigten die Zellen eine deutliche Assoziation mit Fibrin. Um den genauen Einfluss der Fibrinbildung auf den Phänotyp der Zellen zu untersuchen, sind weitere Experimente notwendig. Dabei würde sich das etablierte in vitro System ideal anwenden lassen, um in isolierten CD8⁺ T Zellen Seneszenz zu induzieren, um anschließend die Expression von GranzymK und koaguloregulatorischer Proteine zu untersuchen. Somit könnte der Effekt auf die Fibrinbildung und der Einfluss der CD8⁺ T Zellen im Zuge der Immuno-thrombose im Alter besser nachvollzogen werden.

7 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die koaguloregulatorische Kompetenz der CD4⁺ T Zellen im Zuge der pathogen-induzierten Immuno-thrombose untersucht. Dafür wurde mit Hilfe eines in vitro Modells zur T Zellrezeptor abhängigen Aktivierung von CD4⁺ T Zellen die Bildung von T Zellcluster induziert, die über die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und CD11b vermittelt wurden. Innerhalb der T Zell Cluster wurde eine erhöhte Expression/Assoziation mit pro-fibrinolytischen Proteinen (uPA, uPAR, tPA) sowie antifibrinolytischem PAI-1 festgestellt, was auf eine koaguloregulatorische Kompetenz der CD4⁺ T Zellen hindeutet.

Aufgrund der engen Verknüpfung zwischen T Zellaktivierung und der Expression koaguloregulatorischer Proteine, wurde überprüft, inwiefern die Aktivierung durch Kernkomponenten der Immuno-thrombose beeinflusst wird. Dabei wurde nach Inkubation der T Zellen mit aktivierten Thrombozyten eine CD154(CD40L) vermittelte verstärkte T Zellaktivierung beobachtet. Zudem konnte gezeigt werden, dass Fibrin in der Lage ist, die Aktivierung der CD4⁺ T Zellen deutlich zu verstärken und somit die Clusterbildung begünstigt. Des Weiteren bewirkte die T Zell Aktivierung eine massive Steigerung der fibrinolytischen Aktivität der CD4⁺ T Zellen, wobei nach 18 Stunden Aktivierung die maximale fibrinolytische Wirkung erreicht wurde. LFA-1 konnte als entscheidendes Integrin identifiziert werden, welche die fibrin-abhängige T Zellaktivierung vermittelt und maßgeblichen Anteil an der fibrinolytischen Aktivität der T Zellen aufweist. Auch für die Migration der CD4⁺ T Zellen auf Fibrin ist LFA-1 wichtig. Im Tiermodell bestätigte sich die beschriebene Fähigkeit der T Zellen die Koagulation negativ zu regulieren.

Untersuchungen zeigten, dass nach bakterieller Infektion alter Mäuse CD8⁺ T Zellen vermehrt in der Mikrozirkulation detektiert werden. Dabei wurde ein spezieller CD8⁺ T Zell-Phänotyp identifiziert, welcher GranzymK exprimiert und eine potenziell hoch potente proinflammatorische Kompetenz besitzt, die eng mit dem sog. Inflammaging und einer verstärkten intravaskulären Fibrindeposition in Verbindung stehen könnte.

8 ABSTRACT

The aim of the present thesis is to investigate the coaguloregulatory competence of CD4⁺ T cells during pathogen-induced immunothrombosis. An in vitro model for T-cell receptor-dependent activation of CD4⁺ T cells was used to induce the formation of so-called T cell clusters, as mediated through the adhesion molecules ICAM-1 and CD11b. Within the T cell clusters, increased expressions/associations of pro-fibrinolytic proteins (uPA, uPAR, tPA) as well as of anti-fibrinolytic PAI-1 were observed, indicating coaguloregulatory competences of CD4⁺ T cells.

Due to the close relationship between T cell activation and the expression of coaguloregulatory proteins, it was investigated, which core components of immunothrombosis influence the activation of T cells. After incubation of T cells with activated platelets, a CD154(CD40L)-mediated enhanced T cell activation was observed. Additionally, it was demonstrated that fibrin is capable of significantly enhancing the activation of CD4⁺ T cells, thereby favoring cluster formation. Furthermore, T cell activation led to a massive increase in the fibrinolytic activity of CD4⁺ T cells, with the maximum fibrinolytic effect being achieved after 18 hours of activation. LFA-1 was identified as a crucial integrin mediating fibrin-dependent T cell activation and playing a significant role in the fibrinolytic activity of T cells. LFA-1 is also important for the migration of CD4⁺ T cells on fibrin. In animal models, the ability of T cells to negatively regulate coagulation was confirmed.

Studies revealed that during bacterial infection of old mice CD8⁺ T cells are detectable in increased numbers in the microcirculation. A specific CD8⁺ T cell phenotype was identified, which expresses GranzymeK and potentially possesses highly potent proinflammatory competence. This phenotype could be associated with the phenomenon of "inflammaging" and an enhanced intravascular fibrin deposition.

9 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Engelmann bedanken. Sie haben es mir ermöglicht meinen tief verwurzelten Wunsch des wissenschaftlichen Arbeitens zu erfüllen. Dabei waren Sie stets offen für eigene Anregungen und Ideen, was mir das Gefühl von Wertschätzung vermittelt hat. Ich möchte mich für eine Zeit bedanken, in der ich sowohl fachlich als auch persönlich so viel dazulernen durfte wie wahrscheinlich noch nie zuvor in meinem Leben. Ich kann felsenfest behaupten, dass diese Zeit mich immens positiv geprägt hat und mich in meinem persönlichen Entwicklungsprozess enorm weitergebracht hat.

Vielen Dank an meine Betreuer Prof. Spannagl und Prof. Schäfer, die mir bei unseren anregenden Gesprächen stets mit wertvollen Ideen und ihrer großen Erfahrung zur Seite standen und weiterhalfen. Vielen herzlichen Dank an Prof. Uwe Ködel, der im Zuge unserer Tierversuche mit seiner freundlichen Art eine unglaublich angenehme Atmosphäre geschaffen hat, in der es große Freude bereitete zu arbeiten. Danke an das gesamte Institut für Laboratoriumsmedizin. Ihr habt stets für einen professionellen und reibungslosen Arbeitsablauf gesorgt und standet mir bei Fragen und Problemen zu jeder Zeit zur Seite. Besonderer Dank soll dabei an Wolfgang Wilfert und Andreas Herbst gehen. Ohne eure Hilfe, wäre der ein oder andere Versuch wahrscheinlich kurzfristig in die Hose gegangen. Vielen Dank an die freundlichen Mitarbeiter des BMC. Andreas Thomae für die Unterstützung und ausführliche Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie und Lisa Richter und Pardis Khosravani, die mir bei der Planung und Durchführung der Versuche mit dem Flow Cytometer geholfen haben.

Danke an meine Laborkollegen, die schon nach kurzer Zeit zu Laborfreunden wurden. Mona, Jonathan, Martina, Tonina, Junfu, Marian, Flavio, Rebecca, Adriana, Sezer, Claire und Michi: Ihr wart der Grund, warum es jeden Tag so viel Freude bereitet hat in das Labor zu kommen und teilweise bis spät in die Nacht zu bleiben. Danke für diese einmalige Zeit zusammen. Danke auch an meine loborexternen Freunde und meinen Bruder. Ihr habt mir in Gesprächen und der gemeinsamen Zeit die Kraft und Motivation gegeben, um an der anstrengenden und aufreibenden Reise der Doktorarbeit festzuhalten.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Ohne euch hätte ich meine Ausbildung und meine Doktorarbeit niemals so unbeschwert absolvieren können. Danke dass ihr immer hinter mir standet und mir den Rücken freigehalten habt.

10 LITERATURVERZEICHNIS

1. Undas, A. and R.A. Ariëns, *Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(12): p. e88-99.
2. Wendelboe, A.M. and G.E. Raskob, *Global Burden of Thrombosis: Epidemiologic Aspects*. *Circ Res*, 2016. **118**(9): p. 1340-7.
3. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(1): p. 34-45.
4. Heemskerk, J.W., E.M. Bevers, and T. Lindhout, *Platelet activation and blood coagulation*. *Thromb Haemost*, 2002. **88**(2): p. 186-93.
5. Lasne, D., B. Jude, and S. Susen, *From normal to pathological hemostasis*. *Can J Anaesth*, 2006. **53**(6 Suppl): p. S2-11.
6. Owens, A.P., 3rd and N. Mackman, *Tissue factor and thrombosis: The clot starts here*. *Thromb Haemost*, 2010. **104**(3): p. 432-9.
7. Osterud, B., *Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1998. **9 Suppl 1**: p. S9-14.
8. Palta, S., R. Saroa, and A. Palta, *Overview of the coagulation system*. *Indian J Anaesth*, 2014. **58**(5): p. 515-23.
9. Grover, S.P. and N. Mackman, *Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. **38**(4): p. 709-725.
10. Mast, A.E., *Tissue Factor Pathway Inhibitor: Multiple Anticoagulant Activities for a Single Protein*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(1): p. 9-14.
11. Grover, S.P. and N. Mackman, *Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019. **39**(3): p. 331-338.
12. Hoffman, M. and D.M. Monroe, 3rd, *A cell-based model of hemostasis*. *Thromb Haemost*, 2001. **85**(6): p. 958-65.
13. 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*, 2006. **203**(3): p. 513-518.
14. Wilbs, J., et al., *Cyclic peptide FXII inhibitor provides safe anticoagulation in a thrombosis model and in artificial lungs*. *Nature Communications*, 2020. **11**(1): p. 3890.
15. Tsurupa, G., et al., *Structure, stability, and interaction of the fibrin(ogen) alphaC-domains*. *Biochemistry*, 2009. **48**(51): p. 12191-201.
16. Yang, Z., I. Mochalkin, and R.F. Doolittle, *A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(26): p. 14156-61.
17. Collet, J.P., et al., *The alphaC domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis*. *Blood*, 2005. **106**(12): p. 3824-30.
18. Ryan, E.A., et al., *Influence of a natural and a synthetic inhibitor of factor XIIIa on fibrin clot rheology*. *Biophys J*, 1999. **77**(5): p. 2827-36.
19. Yan, M.T.S., et al., *Acquired factor XIII deficiency: A review*. *Transfus Apher Sci*, 2018. **57**(6): p. 724-730.
20. Roshal, M., *Chapter 123 - Thrombin Time and Fibrinogen Determination*, in *Transfusion Medicine and Hemostasis (Second Edition)*, B.H. Shaz, et al., Editors. 2013, Elsevier: San Diego. p. 793-798.
21. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(6): p. 448-54.

22. Chapin, J.C. and K.A. Hajjar, *Fibrinolysis and the control of blood coagulation*. Blood Rev, 2015. **29**(1): p. 17-24.
23. Bu, G., I. Warshawsky, and A.L. Schwartz, *Cellular receptors for the plasminogen activators*. Blood, 1994. **83**(12): p. 3427-36.
24. Hoylaerts, M., et al., *Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin*. J Biol Chem, 1982. **257**(6): p. 2912-9.
25. Cesarman-Maus, G. and K.A. Hajjar, *Molecular mechanisms of fibrinolysis*. Br J Haematol, 2005. **129**(3): p. 307-21.
26. Khalafallah, A., et al., *Evaluation of the innovance d-dimer assay for the diagnosis of disseminated intravascular coagulopathy in different clinical settings*. Clin Appl Thromb Hemost, 2014. **20**(1): p. 91-7.
27. Gomes, M. and A.A. Khorana, *Risk assessment for thrombosis in cancer*. Semin Thromb Hemost, 2014. **40**(3): p. 319-24.
28. van der Hulle, T., et al., *Variable D-dimer thresholds for diagnosis of clinically suspected acute pulmonary embolism*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(11): p. 1986-92.
29. Richardson, D.L., D.S. Pepper, and A.B. Kay, *Chemotaxis for human monocytes by fibrinogen-derived peptides*. Br J Haematol, 1976. **32**(4): p. 507-13.
30. Senior, R.M., et al., *Effects of fibrinogen derivatives upon the inflammatory response. Studies with human fibrinopeptide B*. J Clin Invest, 1986. **77**(3): p. 1014-9.
31. Schneider, M. and M. Nesheim, *A study of the protection of plasmin from antiplasmin inhibition within an intact fibrin clot during the course of clot lysis*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 13333-9.
32. Dong, J., et al., *IL-1 and IL-6 induce hepatocyte plasminogen activator inhibitor-1 expression through independent signaling pathways converging on C/EBPdelta*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C209-15.
33. Urano, T., F.J. Castellino, and Y. Suzuki, *Regulation of plasminogen activation on cell surfaces and fibrin*. J Thromb Haemost, 2018. **16**(8): p. 1487-97.
34. Hotchkiss, R.S., et al., *Sepsis and septic shock*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16045.
35. Bauer, M., et al., *Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America and Australia between 2009 and 2019— results from a systematic review and meta-analysis*. Critical Care, 2020. **24**(1): p. 239.
36. Minasyan, H., *Sepsis: mechanisms of bacterial injury to the patient*. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2019. **27**(1): p. 19.
37. Tang, D., et al., *PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity*. Immunol Rev, 2012. **249**(1): p. 158-75.
38. Uhle, F., et al., *[Pathophysiology of sepsis]*. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2015. **50**(2): p. 114-22.
39. Evans, L., et al., *Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021*. Crit Care Med, 2021. **49**(11): p. e1063-e1143.
40. Gando, S., M. Levi, and C.-H. Toh, *Disseminated intravascular coagulation*. Nature Reviews Disease Primers, 2016. **2**(1): p. 16037.
41. Madoiwa, S., et al., *Plasminogen activator inhibitor 1 promotes a poor prognosis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation*. Int J Hematol, 2006. **84**(5): p. 398-405.
42. Zinsser, H.H. and A.W. Pryde, *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, 1952. **136**(5): p. 818-27.

43. Szaba, F.M. and S.T. Smiley, *Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo*. *Blood*, 2002. **99**(3): p. 1053-9.
44. Assinger, A., et al., *Platelets in Sepsis: An Update on Experimental Models and Clinical Data*. *Frontiers in Immunology*, 2019. **10**.
45. Massberg, S., et al., *Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases*. *Nat Med*, 2010. **16**(8): p. 887-96.
46. Clark, S.R., et al., *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. *Nat Med*, 2007. **13**(4): p. 463-9.
47. von Brühl, M.L., et al., *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*. *J Exp Med*, 2012. **209**(4): p. 819-35.
48. Morrison, D.C. and C.G. Cochrane, *Direct evidence for Hageman factor (factor XII) activation by bacterial lipopolysaccharides (endotoxins)*. *J Exp Med*, 1974. **140**(3): p. 797-811.
49. Hamad, O.A., et al., *Platelets, complement, and contact activation: partners in inflammation and thrombosis*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **946**: p. 185-205.
50. Markiewski, M.M., et al., *Complement and coagulation: strangers or partners in crime?* *Trends Immunol*, 2007. **28**(4): p. 184-92.
51. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. *Nature Reviews Immunology*, 2013. **13**(1): p. 34-45.
52. Ma, A.C. and P. Kuberski, *Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis*. *J Thromb Haemost*, 2008. **6**(3): p. 415-20.
53. Pawlinski, R., et al., *Hematopoietic and nonhematopoietic cell tissue factor activates the coagulation cascade in endotoxemic mice*. *Blood*, 2010. **116**(5): p. 806-14.
54. van der Poll, T., J.D. de Boer, and M. Levi, *The effect of inflammation on coagulation and vice versa*. *Curr Opin Infect Dis*, 2011. **24**(3): p. 273-8.
55. Turvey, S.E. and D.H. Broide, *Innate immunity*. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S24-S32.
56. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 197-216.
57. Wiktor-Jedrzejczak, W. and S. Gordon, *Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse*. *Physiological reviews*, 1996. **76**(4): p. 927-947.
58. Dai, X.-M., et al., *Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2002. **99**(1): p. 111-120.
59. Cecchini, M.G., et al., *Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse*. *Development*, 1994. **120**(6): p. 1357-1372.
60. Fang, F.C., *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies*. *Nature Reviews Microbiology*, 2004. **2**(10): p. 820-832.
61. Randolph, G.J., et al., *Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo*. *Immunity*, 1999. **11**(6): p. 753-761.
62. Fingerle, G., et al., *The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients*. 1993.
63. Thieblemont, N., et al., *CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection*. *European journal of immunology*, 1995. **25**(12): p. 3418-3424.

64. Weber, C., et al., *Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations*. Journal of leukocyte biology, 2000. **67**(5): p. 699-704.
65. Ancuta, P., et al., *Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes*. The Journal of experimental medicine, 2003. **197**(12): p. 1701-1707.
66. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
67. Narasimhan, P.B., et al., *Nonclassical Monocytes in Health and Disease*. Annu Rev Immunol, 2019. **37**: p. 439-456.
68. Hussell, T. and T.J. Bell, *Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(2): p. 81-93.
69. Kohyama, M., et al., *Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis*. Nature, 2009. **457**(7227): p. 318-21.
70. Lavin, Y., et al., *Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(12): p. 731-44.
71. Kolios, G., V. Valatas, and E. Kouroumalis, *Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease*. World journal of gastroenterology, 2006. **12**(46): p. 7413-7420.
72. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nature Immunology, 2008. **9**(5): p. 503-510.
73. Walzer, T., et al., *Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2252-8.
74. von Vietinghoff, S. and K. Ley, *IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 865-73.
75. Rosales, C., *Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?* Frontiers in Physiology, 2018. **9**.
76. Hajshengallis, G. and T. Chavakis, *Endogenous modulators of inflammatory cell recruitment*. Trends Immunol, 2013. **34**(1): p. 1-6.
77. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
78. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.
79. Chistiakov, D.A., Y.V. Bobryshev, and A.N. Orekhov, *Neutrophil's weapons in atherosclerosis*. Exp Mol Pathol, 2015. **99**(3): p. 663-71.
80. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(36): p. 15880-15885.
81. Garley, M., E. Jabłońska, and D. Dąbrowska, *NETs in cancer*. Tumor Biology, 2016. **37**(11): p. 14355-14361.
82. Qi, H., S. Yang, and L. Zhang, *Neutrophil extracellular traps and endothelial dysfunction in atherosclerosis and thrombosis*. Frontiers in immunology, 2017. **8**: p. 928.
83. Bonaventura, A., et al., *The pathophysiological role of neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases*. Thrombosis and haemostasis, 2018. **118**(01): p. 006-027.
84. Zúñiga-Pflücker, J.C., *T-cell development made simple*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(1): p. 67-72.
85. Kumar, B.V., T.J. Connors, and D.L. Farber, *Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life*. Immunity, 2018. **48**(2): p. 202-213.
86. Saravia, J., N.M. Chapman, and H. Chi, *Helper T cell differentiation*. Cellular & Molecular Immunology, 2019. **16**(7): p. 634-643.

87. O'Shea, J.J., et al., *Genomic views of STAT function in CD4+ T helper cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 239-50.
88. Thierfelder, W.E., et al., *Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells*. Nature, 1996. **382**(6587): p. 171-174.
89. Kaplan, M.H., et al., *Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice*. Nature, 1996. **382**(6587): p. 174-177.
90. Usui, T., et al., *T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription*. The Journal of experimental medicine, 2006. **203**(3): p. 755-766.
91. Ouyang, W., et al., *Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism*. Immunity, 1998. **9**(5): p. 745-755.
92. Josefowicz, S.Z., et al., *Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 395-399.
93. Zheng, Y., et al., *Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate*. Nature, 2010. **463**(7282): p. 808-812.
94. Cua, D.J., et al., *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 744-748.
95. Zhou, L., et al., *IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways*. Nature immunology, 2007. **8**(9): p. 967-974.
96. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-234.
97. Zielinski, C.E., et al., *Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β* . Nature, 2012. **484**(7395): p. 514-518.
98. Ciofani, M., et al., *A validated regulatory network for Th17 cell specification*. Cell, 2012. **151**(2): p. 289-303.
99. Schaerli, P., et al., *CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function*. The Journal of experimental medicine, 2000. **192**(11): p. 1553-1562.
100. Bryant, V.L., et al., *Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells*. The Journal of Immunology, 2007. **179**(12): p. 8180-8190.
101. Nurieva, R.I., et al., *Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 138-149.
102. Badovinac, V.P., A.R. Tvinnereim, and J.T. Harty, *Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma*. Science, 2000. **290**(5495): p. 1354-8.
103. van der Leun, A.M., D.S. Thommen, and T.N. Schumacher, *CD8(+) T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis*. Nat Rev Cancer, 2020. **20**(4): p. 218-232.
104. McLane, L.M., M.S. Abdel-Hakeem, and E.J. Wherry, *CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer*. Annu Rev Immunol, 2019. **37**: p. 457-495.
105. Sullivan, M.R., et al., *Quantifying the efficacy of checkpoint inhibitors on CD8+ cytotoxic T cells for immunotherapeutic applications via single-cell interaction*. Cell Death & Disease, 2020. **11**(11): p. 979.
106. Lasfar, A., et al., *IFN- λ : A New Inducer of Local Immunity against Cancer and Infections*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 598.
107. Reina-Campos, M., N.E. Scharping, and A.W. Goldrath, *CD8(+) T cell metabolism in infection and cancer*. Nat Rev Immunol, 2021. **21**(11): p. 718-738.

108. Yajima, T., et al., *Fas/FasL signaling is critical for the survival of exhausted antigen-specific CD8(+) T cells during tumor immune response*. *Mol Immunol*, 2019. **107**: p. 97-105.
109. Flores-Mendoza, G., et al., *Fas/FasL Signaling Regulates CD8 Expression During Exposure to Self-Antigens*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 635862.
110. LeBien, T.W. and T.F. Tedder, *B lymphocytes: how they develop and function*. *Blood*, 2008. **112**(5): p. 1570-80.
111. Haas, K.M., et al., *B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to S. pneumoniae*. *Immunity*, 2005. **23**(1): p. 7-18.
112. Yanaba, K., et al., *A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses*. *Immunity*, 2008. **28**(5): p. 639-650.
113. Aziz, M., et al., *B-1a Cells Protect Mice from Sepsis: Critical Role of CREB*. *J Immunol*, 2017. **199**(2): p. 750-760.
114. Letourneur, F. and R.D. Klausner, *Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 ϵ* . *Science*, 1992. **255**(5040): p. 79-82.
115. Hwang, J.-R., et al., *Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development*. *Experimental & Molecular Medicine*, 2020. **52**(5): p. 750-761.
116. Walling, B.L. and M. Kim, *LFA-1 in T cell migration and differentiation*. *Frontiers in immunology*, 2018. **9**: p. 952.
117. Kotsougiani, D., et al., *Activation of T Lymphocytes in Response to Persistent Bacterial Infection: Induction of CD11b and of Toll-Like Receptors on T Cells*. *Int J Inflam*, 2010. **2010**: p. 526740.
118. Hyun, Y.-M., et al., *LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) distinctly regulate neutrophil extravasation through hotspots I and II*. *Experimental & Molecular Medicine*, 2019. **51**(4): p. 1-13.
119. van de Stolpe, A. and P.T. van der Saag, *Intercellular adhesion molecule-1*. *J Mol Med (Berl)*, 1996. **74**(1): p. 13-33.
120. Zumwalde, N.A., et al., *ICAM-1-dependent homotypic aggregates regulate CD8 T cell effector function and differentiation during T cell activation*. *J Immunol*, 2013. **191**(7): p. 3681-93.
121. Shimaoka, M., J. Takagi, and T.A. Springer, *Conformational regulation of integrin structure and function*. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 2002. **31**(1): p. 485-516.
122. Alarcón, B., D. Mestre, and N. Martínez-Martín, *The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering?* *Immunology*, 2011. **133**(4): p. 420-425.
123. Spangrude, G., B. Braaten, and R. Daynes, *Molecular mechanisms of lymphocyte extravasation. I. Studies of two selective inhibitors of lymphocyte recirculation*. *The Journal of Immunology*, 1984. **132**(1): p. 354-362.
124. Sumagin, R., et al., *LFA-1 and Mac-1 define characteristically different intraluminal crawling and emigration patterns for monocytes and neutrophils in situ*. *The Journal of Immunology*, 2010. **185**(11): p. 7057-7066.
125. Montecino-Rodriguez, E., B. Berent-Maoz, and K. Dorshkind, *Causes, consequences, and reversal of immune system aging*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(3): p. 958-65.
126. Thompson, W.W., et al., *Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States*. *Jama*, 2003. **289**(2): p. 179-86.

127. Nasa, P., D. Juneja, and O. Singh, *Severe sepsis and septic shock in the elderly: An overview*. World J Crit Care Med, 2012. **1**(1): p. 23-30.
128. Linton, P.J. and K. Dorshkind, *Age-related changes in lymphocyte development and function*. Nature immunology, 2004. **5**(2): p. 133-139.
129. Dorshkind, K. and N.D. Horseman, *The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency*. Endocrine Reviews, 2000. **21**(3): p. 292-312.
130. Rossi, D.J., et al., *Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(26): p. 9194-9199.
131. Pang, W.W., et al., *Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(50): p. 20012-20017.
132. Schraml, B.U., et al., *The AP-1 transcription factor Batf controls TH17 differentiation*. Nature, 2009. **460**(7253): p. 405-409.
133. Jamieson, B.D., et al., *Generation of functional thymocytes in the human adult*. Immunity, 1999. **10**(5): p. 569-575.
134. Effros, R.B., *Loss of CD28 expression on T lymphocytes: a marker of replicative senescence*. Developmental & comparative immunology, 1997. **21**(6): p. 471-478.
135. Goronzy, J.J., et al. *Signaling pathways in aged T cells—a reflection of T cell differentiation, cell senescence and host environment*. in *Seminars in immunology*. 2012. Elsevier.
136. Coppé, J.-P., et al., *The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression*. Annual review of pathology: mechanisms of disease, 2010. **5**: p. 99-118.
137. Cavanagh, M.M., C.M. Weyand, and J.J. Goronzy, *Chronic inflammation and aging: DNA damage tips the balance*. Current opinion in immunology, 2012. **24**(4): p. 488-493.
138. Rodier, F., et al., *Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion*. Nature cell biology, 2009. **11**(8): p. 973-979.
139. Low, W.S. and W.A. Wan Abas, *Bechtop technologies for circulating tumor cells separation based on biophysical properties*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 239362.
140. Macs, M.B. *Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood by density gradient centrifugation*. [cited 2022 01.03.2022]; Available from: https://www.miltenyibiotec.com/Resources/Persistent/6d7e0fb8a3eab613958d142051e3c7050eb0c8a9/SP_MC_PB_density_gradient.pdf.
141. Macs, M.B. *CD4+ T Cell Isolation Kit, human*. [cited 2022 01.03.2022]; Available from: <https://www.miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0001983.PDF>.
142. Scientific, T. [02.03.2022]; T Zell Aktivierungsprotokoll]. Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/immunology-at-work/immunology-protocols/t-cell-activation-anti-cd3-anti-cd28.html>.
143. Longstaff, C. and C.M. Whitton, *A proposed reference method for plasminogen activators that enables calculation of enzyme activities in SI units*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(8): p. 1416-21.
144. Kubo, M., et al., *Fibrinogen and fibrin are anti-adhesive for keratinocytes: a mechanism for fibrin eschar slough during wound repair*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(6): p. 1369-81.

145. Tinevez, J.Y., et al., *TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking*. *Methods*, 2017. **115**: p. 80-90.
146. Nicolai, L., et al., *Vascular surveillance by haptotactic blood platelets in inflammation and infection*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 5778.
147. Sanderson, M.J., et al., *Fluorescence microscopy*. Cold Spring Harb Protoc, 2014. **2014**(10): p. pdb.top071795.
148. Bayguinov, P.O., et al., *Modern Laser Scanning Confocal Microscopy*. *Curr Protoc Cytom*, 2018. **85**(1): p. e39.
149. affymetrix, e. *Flow Cytometry - Best Protocols (Viability Dye Staining)*. 10.03.22]; Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/viability-staining.pdf>.
150. Scientific, T. *BestProtocols: Staining Cell Surface Targets for Flow Cytometry*. 10.03.22]; Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/staining-cell-surface-targets-flow-cytometry.html#suspensions>.
151. Scientific, T. *BestProtocols: Staining Intracellular Antigens for Flow Cytometry*. 10.03.22]; Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/staining-intracellular-antigens-flow-cytometry.html#nuclear>.
152. Zecchinon, L., et al., *Key roles of LFA-1 in leukocyte migration and immune response*. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 2006. **6**(3): p. 191-200.
153. Mullins, E.S., et al., *Plasmin-Mediated Fibrinolysis Enables Macrophage Migration Via Liberation from Fibrin- α M β 2 Interactions*. *Blood*, 2018. **132**: p. 136.
154. Engbers, M.J., A. van Hylckama Vlieg, and F.R. Rosendaal, *Venous thrombosis in the elderly: incidence, risk factors and risk groups*. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(10): p. 2105-12.
155. Dutta, S. and P. Sengupta, *Men and mice: Relating their ages*. *Life Sci*, 2016. **152**: p. 244-8.
156. Bhandari, S., et al., *The Scavenger Function of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Health and Disease*. *Frontiers in Physiology*, 2021. **12**.
157. Simms, P.E. and T.M. Ellis, *Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1996. **3**(3): p. 301-4.
158. Nykjaer, A., et al., *Urokinase receptor. An activation antigen in human T lymphocytes*. *J Immunol*, 1994. **152**(2): p. 505-16.
159. Baars, J.W., et al., *Interleukin-2 induces activation of coagulation and fibrinolysis: resemblance to the changes seen during experimental endotoxaemia*. *Br J Haematol*, 1992. **82**(2): p. 295-301.
160. Polasky, C., et al., *Platelet Induced Functional Alteration of CD4(+) and CD8(+) T Cells in HNSCC*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(20).
161. Dewitte, A., et al., *New frontiers for platelet CD154*. *Exp Hematol Oncol*, 2015. **4**: p. 6.
162. Naldini, A., et al., *Thrombin enhances T cell proliferative responses and cytokine production*. *Cell Immunol*, 1993. **147**(2): p. 367-77.
163. Li, D., J.J. Molldrem, and Q. Ma, *LFA-1 regulates CD8+ T cell activation via T cell receptor-mediated and LFA-1-mediated Erk1/2 signal pathways*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(31): p. 21001-10.
164. Flick, M.J., et al., *Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor α M β 2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(11): p. 1596-606.

165. Lorenz, N., et al., *Human T cell activation induces synaptic translocation and alters expression of the serine protease inhibitor neuroserpin and its target protease*. J Leukoc Biol, 2015. **97**(4): p. 699-710.
166. Zeerleder, S., et al., *TAFI and PAI-1 levels in human sepsis*. Thromb Res, 2006. **118**(2): p. 205-12.
167. Vollrath, J.T., et al., *Post-Traumatic Sepsis Is Associated with Increased C5a and Decreased TAFI Levels*. J Clin Med, 2020. **9**(4).
168. Raskov, H., et al., *Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy*. British Journal of Cancer, 2021. **124**(2): p. 359-367.
169. Wong, P. and E.G. Pamer, *CD8 T cell responses to infectious pathogens*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 29-70.
170. Chellappa, S., et al., *CD8+ T Cells That Coexpress ROR γ t and T-bet Are Functionally Impaired and Expand in Patients with Distal Bile Duct Cancer*. J Immunol, 2017. **198**(4): p. 1729-1739.
171. Churlaud, G., et al., *Human and Mouse CD8(+)/CD25(+)/FOXP3(+) Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 171.
172. Mogilenko, D.A., et al., *Comprehensive Profiling of an Aging Immune System Reveals Clonal GZMK(+)/CD8(+) T Cells as Conserved Hallmark of Inflammaging*. Immunity, 2021. **54**(1): p. 99-115.e12.
173. Joeckel, L.T., et al., *Mouse granzyme K has pro-inflammatory potential*. Cell Death & Differentiation, 2011. **18**(7): p. 1112-1119.
174. Faget, D.V., Q. Ren, and S.A. Stewart, *Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer*. Nature Reviews Cancer, 2019. **19**(8): p. 439-453.
175. Gorgoulis, V., et al., *Cellular Senescence: Defining a Path Forward*. Cell, 2019. **179**(4): p. 813-827.

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A2AP	α 2-Antiplasmin
APC	Antigen presenting cell
Csf-1	Colony stimulating factor 1
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
FDP	Fibrin-Abbauprodukte
GH	Growth hormon
GP-Ib	Glykoprotein Ib Komplex
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1

IGF-1	Insulin-like growth factor 1
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen
MHC	Major-histocompatibility complex
NETs	Neutrophil extracellular traps
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PAR-1	Protease-activated receptor 1
PRR	Pattern recognition receptor
RCF	Relative centrifugal force
rpm	Rounds per minute
RNs	Reactive nitrogen species
ROs	Reactive oxygen species
SASP	Senescence associated secretory phenotype
STAT	Signaling transducer and activator of transcription
TCR	T Cell Receptor
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
tPA	Gewebespezifischer Plasminogen Aktivator
uPA	Urokinase Typ Plasminogen Aktivator

vWF	Von-Willebrand-Faktor
-----	-----------------------

12 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

München den 02.12.2024

Torben LangHeinrich

Name (+ Unterschrift)