

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



CD4⁺ T-Zellen als Gegenspieler von neutrophilen Granulozyten während der
Immunothrombose im Rahmen systemischer Infektionen

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

vorgelegt von
Mona Pilartz
geb. Wohlrab

aus
Fürth

Jahr
2025

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

Erstes Gutachten: Prof. Dr. med. Bernd Engelmann

Zweites Gutachten: Prof. Dr. med. Christian Schulz

Drittes Gutachten: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2025

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	7
Abstract	9
Zusammenfassung.....	11
I. Einleitung.....	13
1.1 Zusammenhang von Thrombosen mit systemischen Infektionen	13
1.2 Die Rolle der Immunothrombose in systemischen Infektionen.....	14
1.2.1 Die Hämostase.....	14
1.2.2 Die Immunothrombose	15
1.2.3 Pathologische Thrombosen.....	17
1.2.4 Die Faktor XII-Aktivierung durch NETs	18
1.2.5 Immunothrombosen bei viralen Infektionen	19
1.2.6 Zirkadiane Rhythmen und Reifung der Neutrophilen	20
1.3 Die Funktion von T-Helferzellen bei systemischen Infektionen.....	22
1.3.1 Charakterisierung von T-Helferzellsubtypen.....	22
1.3.2 Die Funktion von Immunkomplexen	24
1.3.3 Die Bedeutung der Kupffer-Zellen in der Frühphase der Immunabwehr	25
1.4 Migrationsverhalten von T-Helferzellen.....	25
1.5 Zielsetzungen.....	27
II. Material	28
2.1 Technische Ausstattung und Geräte	28
2.2 Verbrauchsmaterialien	29
2.3 Chemikalien und Reagenzien	31
2.4 Hergestellte Puffer und Lösungen.....	33
2.5 Verwendete Kits	34
2.6 Verwendete Antikörper.....	34
III. Methoden.....	38
3.1. Tiermodelle und Tierversuche.....	38
3.1.1. Infektionsmodell.....	38
3.1.2 Tierversuchsvorhaben	38
3.1.3 Vorbehandlung der Tiere	39
3.1.4 Beschreibung des Versuchsablaufs	41
3.2 Probenentnahme aus der Maus.....	42
3.2.1 Organentnahme und Blutaufbereitung.....	42
3.2.2 Isolierung von Neutrophilen aus Lunge und Leber	42

3.2.3 Isolierung und Aktivierung von nicht-klassischen Monozyten und Aktivierung	43
3.2.4 Isolation von T-Helferzellen aus der Milz und Farbstoffmarkierung.....	44
3.3 Humane Proben.....	45
3.4. Färbungen von Zellen oder Geweben	45
3.4.1 Färbungen der Zellen für durchflusszytometrische Analysen	45
3.4.2 Immunohistochemische Färbungen von Kryoschnitten (Maus)	46
3.4.3 Immunohistochemische Färbungen von Paraffinschnitten (Mensch)	48
3.5. Fluoreszenzfarbstoff-basierte Analysen.....	49
3.5.1 Durchflusszytometrische Analysen	49
3.5.2 Konfokale Lasermikroskopie	50
3.5.3 Multiphotonen-Mikroskopie	50
3.6. Immunohistochemische Quantifizierungen	50
3.6.1 Quantifizierung in der Leber (Maus)	50
3.6.2 Quantifizierung in der Lunge (Mensch).....	51
3.7 Quantifizierung der 4D-Visualisierungen	52
3.8 <i>In vitro</i> Versuche.....	52
3.8.1 <i>In vitro</i> Generierung von Thromben und Bestimmung der koloniebildenden Einheiten	52
3.8.2 Bestimmung der Faktor XIIa-Bildung mittels chromogenem Substrat	53
3.8.3 Generierung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten α BSA-BSA-IK	54
3.9 RNA-Sequenzierung von isolierten T-Helferzellen aus der Maus-Leber	55
3.10 Statistik	56
IV. Ergebnisse	57
4.1 Funktionsweise der T-Helferzellen bei systemischen Infektionen in jungen Mäusen	57
4.1.1 CD4 ⁺ T-Zellen als negative Regulatoren der Blutgerinnung und Thrombosebildung.....	57
4.1.2 Abhängigkeit der CD4 ⁺ T-Zellaktivierung von der Fibrinbildung	60
4.1.3 Assoziation von Interleukin-2 mit T-Helferzellen	62
4.1.4 Bestimmung des Subtyps von T-Helferzellen	63
4.2 Einfluss von Fibrin auf das intravaskuläre Bewegungsverhalten von T-Helferzellen in jungen Mäusen	65
4.2.1 Bewegungsverhalten von CD4 ⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf der Infektion.....	65
4.2.2 Vermindertes Crawling der T-Helferzellen durch Blockade von LFA-1	67
4.2.3 Bewegungsverhalten von CD4 ⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von der Fibrindeposition	69
4.2.4 Fibrin-abhängiges Auftreten von extravaskulären T-Helferzellen	71
4.3 Die Rolle von T-Helferzellen im fortgeschrittenen Infektionsverlauf in jungen Mäusen.....	73
4.3.1 Anzahl arretierter T-Helferzellen im Vergleich zu anderen Immunzellen.....	73
4.3.2 Clusterbildung von T-Helferzellen in Abhängigkeit von Fibrin	74

4.3.3 Zirkulierende folliculäre T-Helferzellen in der Lebermikrozirkulation	76
4.4 Aufnahme von IK durch CD4 ⁺ T-Zellen in jungen Mäusen	78
4.4.1 Interaktion von T-Helferzellen mit IK	78
4.4.2 Assoziation von CD4 ⁺ T-Zellen mit internalisierten IK mit Thrombosen	79
4.4.3 Verhinderung der Aufnahme von IK durch Blockade des Fcγ-Rezeptors.....	81
4.5 Bildung von Mikrothrombosen in der Leber alter Mäuse bei systemischer Infektion.....	82
4.5.1 Gefäßverschlüsse in der Mikrozirkulation der Leber	82
4.5.2 Interaktion von Immunzellen mit Mikrothromben und Gefäßverschlüssen	83
4.6 Charakterisierung von NETs-Formation und Neutrophilen Subtypen bei systemischer Infektion in alten Mäusen.....	84
4.6.1 Einfluss der Koagulation auf die NETs-Bildung in jungen und alten Mäusen.....	84
4.6.2 Die Aktivierung von Faktor XII durch Nukleosomen	86
4.6.3 Verteilung maturer und unreifer Neutrophiler während systemischer Infektionen.....	87
4.6.4 Einfluss des Alters und der Koagulation auf die Neutrophilen-Expression von CXCR4.....	89
4.6.5 Vorläuferzellen von Neutrophilen: Effekt des Alters und der Koagulation.....	91
4.7 Potentielle Rolle der T-Helferzellen für die Thrombosebildung von Patienten mit viralen Infektion	93
4.7.1 Negative Assoziation von Gefäßverschlüssen mit T-Helferzellen	93
4.7.2 Negative Korrelationen zwischen Gefäßverschlüssen und der Anzahl intravaskulärer CD4 ⁺ T-Zellen	95
V. Diskussion.....	97
5.1 Schlüsselfunktion von T-Helferzellen bei Immuno­thrombosen im Rahmen systemischer Infektionen	97
5.1.1 CD4 ⁺ T-Zellen als fibrinolytische Immuno­thrombose-Regulatoren.....	97
5.1.2 Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen durch Fibrin.....	98
5.1.3 Arrest verschiedener Subtypen der T-Helferzellen im Infektionsverlauf.....	98
5.2 Abhängigkeit des Bewegungsverhalten von T-Helferzellen in der Lebermikrozirkulation von der Fibrindeposition	99
5.2.1 Abhängigkeit der Fortbewegung der T-Helferzellen von Fibrin	99
5.2.2 Einfluss von Fibrin auf die transendotheliale Migration von T-Helferzellen.....	101
5.3 Interaktion von T-Helferzellen mit IK im Zusammenhang mit der Koagulation.....	103
5.4 Rolle der T-Helferzellcluster im fortgeschrittenen Infektionsverlauf	103
5.5 Einfluss des Alterns auf die Koagulationsantwort bei bakteriellen und viralen Infektionen	105
5.5.1 Gesteigerte Thrombosebildung bei systemischen Infektionen in alten Mäusen.....	105
5.5.2 Negative Korrelation von Gefäßokklusionen mit verringerter Anzahl arretierter CD4 ⁺ T- Zellen bei Patienten mit pulmonalen Infektionen	106
5.6 Einfluss von Alter und Infektionsparameter auf exprimierten Phänotyp von Neutrophilen....	107
5.6.1 Verminderte Rekrutierung von Neutrophilen und gesteigerte NETose nach Rivaroxaban	107

5.6.2 Aktivierung von Faktor XII durch den Nukleosom-Kernpartikel ONO	108
5.6.3 Erhöhtes Vorkommen immaturer Neutrophiler in alten Mäusen bei systemischen Infektionen	108
5.6.4 Erhöhte Expression von CXCR4 in Neutrophilen junger Mäuse während systemischer Infektion	109
5.6.5 Zahlreiche CD117 ⁺ Neutrophile in jungen Mäusen im Gegensatz zu alten Tieren	109
5.7 Wechselspiel von CD4 ⁺ T-Zellen und Neutrophilen bei der Regulation der Immuno-thrombose	110
Literaturverzeichnis	113
Anhang	124
Legenden zu Videos 1-5.....	124
Zusätzliche Abbildungen I-VI	126
Publikationen.....	130

Die Forschungsdaten können unter <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/36091/> eingesehen werden.

Danksagungen

Als Erstes möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Bernd Engelmann ganz Besonders für die Möglichkeit diese Doktorarbeit anzufertigen danken, sowie die außerordentlich engmaschige und gute Betreuung und die vielfältige Unterstützung während des gesamten Zeitraums. Des Weiteren möchte ich auch meinen Zweitbetreuer Herrn Prof. Christian Schulz für die Betreuung und das zur Verfügung stellen des FACS (flow cytometry, Durchflusszytometrie) -Sorters danken.

Von ganzen Herzen möchte ich auch PD Dr. Hellen Ishikawa-Ankerhold für die allumfassende Unterstützung und Hilfe danken, sowie die viele Zeit, die sie trotz ständiger Zeitknappheit für mich aufbringen konnte.

Ebenso gilt mein besonderer Dank allen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe für die allumfassende Unterstützung, das gute Miteinander, die aufbauenden Worte und den Humor, der nie zu kurz gekommen ist. Namentlich möchte ich da besonders Manovriti Thakur, Lena Berchtold, Tonina Müller, Michael Völkl, Jonathan Höflinger, Martina Reiser, Torben LangHeinrich, Maximilian Wieser, Flavio Karaj, Adriana Usheva, Rebecca Block und Claire Lallemang nennen.

Danke auch für die wundervolle Zeit auch außerhalb des Labors und ich bin von Herzen froh, dass manche Kontakte nun auch außerhalb des Labors erhalten geblieben sind.

Für die viele Hilfe und Zeitinvestition beim FACS-Sorter und der FACS-Analyse möchte ich auch ganz besonders Pardis Khosravani, Anna Titova, und Dr. Lisa Richter danken. Ebenso möchte ich auch von Herzen Mariia Likhodeeva für die Herstellung der nuklearen Kernpartikel und die Unterstützung danken.

Sehr herzlich möchte ich auch Dr. Thomas Engleitner für die hilfreiche fachliche Unterstützung danken. Des Weiteren möchte ich mich auch sehr herzlich bei Prof. Uwe Ködel, Dr. Thomas Engleiter, Prof. Malgorzata Wygrecka, Prof. Paul Declerck, Dr. Rupert Öllinger und Dr. Johan Duchêne für das zur Verfügung stellen von Material, sowie die hilfreiche fachliche Unterstützung bedanken. Auch gilt mein ganz besonderer Dank Kristina Niedermeier für das zur Verfügung stellen der gealterten Mäuse.

Des Weiteren möchte ich auch Friedrich Schilder für das Unmögliche Mögliche machen bedanken, wenn mal wieder eine Lieferung nicht rechtzeitig angekommen ist. Genauso möchte ich auch Anna Titova, Wolfgang Wilfert und PD Dr. Andreas Herbst für das zur Verfügung von Materialien in Notsituationen danken.

In allen tierischen Belangen möchte ich mich ganz besonders bei Dr. Julia Winterhalter, Dr. Denise Messerer und Dr. Mehdi Shakarami bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Core Facility „Bioimaging“, vor allem PD Dr. Steffen Dietzel und Dr. Andreas Thomae, für die umfassende fachliche Unterstützung und das zur Verfügung stellen der Mikroskope am Biomedizinischen Zentrum der LMU bedanken.

Außerdem möchte ich mich auch bei Dominic van den Heuvel, Larissa Belz und Daniel Setzensack für die Einführung und Unterstützung am Multiphotonen-Mikroskop bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern der Tier- und Humanpathologie der LMU für die Hilfe und Unterstützung.

Schließlich möchte ich mich auch bei den Unternehmen Bitplane (Zürich, CH), GraphPad Software (San Diego, USA) und FlowJo Software (Ashland, USA) für das zur Verfügung stellen der Demo-Versionen bedanken.

Abschließend möchte ich auch meinem Ehemann Philipp Pilartz für seine Geduld und sein Verständnis danken, wenn ich mal wieder deutlich später als angekündigt aus dem Labor nach Hause gekommen bin und für das nächtliche oder früh morgendliche Chauffieren, wenn ich mir nach 17-stündigen Versuchstagen das Fahren nicht mehr zugetraut habe.

Auch möchte ich ausdrücklich meiner Mutter Gaby Wohlrab, meiner Schwester Nina Wohlrab und Katrin Eberhorn für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Abstract

Immunothrombosis is an intravascular process of innate immunity mediated primarily by the interaction of classical monocytes, neutrophils and platelets with blood clotting factors. Severe systemic bacterial or viral diseases, such as COVID-19 or sepsis, lead to dysregulation of immunothrombosis, especially during aging. So far, the role of lymphoid cells, especially T helper cells, in intravascular fibrin homeostasis and the mechanisms that counteract immunothrombosis as driven by myeloid cells are largely unknown.

The present work is based on 4D visualization by intravital multiphoton microscopy of liver sinusoids and immunohistochemical analyses of mouse and human liver and lung microcirculations, RNA sequencing of T lymphocytes, targeted *in vivo* depletion of immune cells, and flow cytometry, among others. The results show that activated CD4⁺ T cells express various pro- and anti-fibrinolytic molecules such uPA and PAI-1, respectively, and significantly regulate fibrinolysis in systemic bacterial and viral infections *in vivo*. Consequently, the number of thrombotic vascular occlusion in the pulmonary vessels of patients infected with influenza virus or SARS-CoV-2 showed a strong negative correlation with arrested T helper cells.

At the beginning of the infection, the arrested CD4⁺ T cells were mainly represented by RORγT⁺ Th17 cells. In contrast, Treg cells increased during the course of the infection, with the population of RORγT⁺ Treg cells eventually forming the largest group.

The development of thrombotic vascular occlusions during systemic infections was increased in old mice compared to young animals. This was likely in part due to an age-dependent increase in immature neutrophils with increased prothrombotic competence. Overall, CD4⁺ T cells are important antagonists of neutrophils in immunothrombosis, which may explain why increases in neutrophil-to-lymphocyte ratios are important risk factors for thrombosis.

Examination of T helper cells in the liver sinusoids during systemic infections by 4D visualization using intravital multiphoton microscopy revealed a strong dependence of T cell mobility on intravascular fibrin. As a consequence, fibrin deposition controlled the arrest and transmigration of CD4⁺ T cells into the perivascular tissue. The movement was mainly mediated by the interaction of the T cell receptor LFA-1 with fibrin.

T helper cells, including follicular T helper cells, formed intravascular clusters, which was triggered by increased fibrin deposition. These clusters were embedded inside specialized immunothrombi that often also contained B cells.

We identified the expression of Fcγ receptors I, II, III and IV on arrested T helper cells. T helper cells, inside immunothrombi prominently incorporated immune complexes via Fcγ receptors II and III, as detected by neutralizing antibodies.

Thus, T helper cell-containing immunothrombi control activation and clustering of T helper cells, contributing to the transition from innate to adaptive immunity.

Zusammenfassung

Die Immuno­thrombose ist ein intravaskulärer Prozess der angeborenen Immunität, der hauptsächlich durch Interaktion von klassischen Monozyten, Neutrophilen und Thrombozyten mit Blutgerinnungsfaktoren vermittelt wird. Schwere systemische bakterielle oder virale Erkrankungen, wie COVID-19 oder Sepsis, bewirken eine Dysregulation der Immuno­thrombose, vor allem im Alter. Bisher sind sowohl die Rolle der lymphoiden Zellen, insbesondere der T-Helferzellen, bei der intravaskulären Fibrin­homöostase als auch die Mechanismen, die der von myeloiden Zellen gesteuerten Immuno­thrombose entgegenwirken, weitgehend unbekannt.

Die vorliegende Arbeit basiert unter anderem auf 4D-Visualisierung der Lebersinusoide durch intravitale Multiphotonenmikroskopie und immunhistochemische Analysen der Mikrozirkulation der Leber und Lunge von Mäusen und Menschen, RNA-Sequenzierung von T-Lymphozyten, gezielte *in-vivo*-Depletionen von Immunzellen sowie der Durchflusszytometrie. Die Ergebnisse zeigen, dass aktivierte CD4⁺ T-Zellen verschiedene pro- und anti-fibrinolytische Moleküle wie uPA bzw. PAI-1 exprimieren und *in vivo* die Fibrinolyse bei systemischen bakteriellen und viralen Infektionen maßgeblich regulieren. Folglich wies die Anzahl der thrombotischen Gefäßverschlüsse in den Lungengefäßen von Patienten, die mit dem Influenzavirus oder SARS-CoV-2 infiziert waren, eine starke negative Korrelation mit den arretierten T-Helferzellen auf.

Zu Beginn der Infektion handelte es sich bei den arretierten CD4⁺ T-Zellen hauptsächlich um RORγT⁺ Th17-Zellen. Im Gegensatz dazu nahmen die Treg-Zellen im Verlauf der Infektion zu, wobei die Population der RORγT⁺ Treg-Zellen schließlich die größte Gruppe bildete.

Im Vergleich zu jungen Mäusen entwickelten sich in alten Mäusen vermehrt thrombotische Gefäßverschlüsse während systemischer Infektionen. Dies war vermutlich zum Teil auf eine altersabhängige Zunahme immaturer Neutrophiler mit erhöhter prothrombotischer Kompetenz zurückzuführen. Insgesamt handelt es sich bei den CD4⁺ T-Zellen um wichtige Antagonisten der Neutrophilen bei der Immuno­thrombose, was erklären könnte, warum ein erhöhtes Verhältnis von Neutrophilen zu Lymphozyten einen wichtigen Risikofaktor für Thrombosen darstellt.

Aus den Untersuchungen von T-Helferzellen in den Lebersinusoiden durch 4D-Visualisierung mittels intravitaler Multiphotonenmikroskopie ergab sich eine starke Abhängigkeit der T-Zellmobilität von intravaskulärem Fibrin. Demzufolge kontrollierten die Fibrinablagerungen das Arretieren von CD4⁺ T-Zellen im Gefäß und die Transmigration in das perivaskuläre Gewebe. Die Fortbewegung wurde hauptsächlich durch die Interaktion des T-Zell-Rezeptors LFA-1 mit Fibrin vermittelt.

T-Helferzellen, einschließlich der folliculären T-Helferzellen, bildeten intravaskuläre Cluster, die durch eine erhöhte Fibrinablagerung ausgelöst wurden. Diese Cluster waren in spezialisierte Immuno­thromben eingebettet, die häufig auch B-Zellen enthielten.

In den arretierten T-Helferzellen wurden Expressionen der Fcγ-Rezeptoren I, II, III und IV detektiert. Innerhalb der Immunothromben nahmen die T-Helferzellen die Immunkomplexe über die Fcγ-Rezeptoren II und III auf, wie durch neutralisierende Antikörper nachgewiesen wurde. Somit steuern T-Helferzell-beinhalten Immunothromben die Aktivierung und Clusterbildung von T-Helferzellen und tragen so zum Übergang des angeborenen zum adaptiven Immunsystems bei.

I. Einleitung

1.1 Zusammenhang von Thrombosen mit systemischen Infektionen

Sepsis – oft auch Blutvergiftung genannt – wird durch pathogene Keime ausgelöst, welche in den Blutkreislauf gelangen, und eine unkontrollierte, überschießende Immunreaktion auslösen. Auslöser für die Sepsis können nicht nur Infektionen der Lungen- oder Atemwege, sondern auch infizierte Wunden oder auch scheinbar harmlose Erkrankungen wie Harnwegsinfekte oder Zahnentzündungen sein¹. Seit vielen Jahren sind die Morbidität und Mortalität bei der Sepsis unverändert hoch: 2017 wurden weltweit fast 50 Millionen Sepsis-Fälle registriert, gleichzeitig stehen etwa 20% aller weltweiten Sterbefälle mit Sepsis im Zusammenhang². Auch in Deutschland stellt Sepsis die Haupttodesursache auf Intensivstationen und die dritthäufigste Todesursache im Allgemeinen dar³. Das Risiko, dass sich eine Infektion zu einer Sepsis entwickelt, ist vor allem bei älteren Menschen erhöht, wobei die Krankenhausletalität bereits ab dem 40. Lebensjahr linear mit steigendem Alter zunimmt⁴. Auf Grund des demografischen Wandels steigt der Anteil an Personen über 65 Jahren in Deutschland deutlich an. So lag dieser im Jahr 1991 noch bei 15%, 2021 bereits bei 22%⁵.

Bei der Sepsis gerät das Gleichgewicht von Entzündungsreaktion und entzündungshemmenden Kontrollmechanismen außer Takt, was zur Auslösung einer überschießenden, unkontrollierbaren Entzündungsreaktion führt. Die durch Leukozyten im Blut freigesetzten Zytokine und Toxine bekämpfen zwar die Erreger, schädigen aber gleichzeitig auch das Gefäßendothel massiv. Dies bewirkt nicht nur den Austritt von Flüssigkeit ins Interstitium mit einer daraus resultierenden Bildung von Ödemen, sondern steigert auch die Blutgerinnung und hemmt die Fibrinolyse, sodass es zur Bildung zahlreicher intravaskulärer Blutgerinnsel, sogenannter Mikrothrombosen, kommt. Durch die daraus resultierende Minderversorgung der Organe mit Sauerstoff können auf Grund der Organschädigungen schließlich ein Kreislaufversagen mit multiplen Organversagen induziert werden, dem sogenannten septischen Schock⁶. Die exzessive Thrombosebildung bewirkt paradoxerweise im weiteren Verlauf durch „Verbrauch“ von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten verheerende Blutungen⁷, daher ist die Sepsis auch mit dem Krankheitsbild der disseminierten intravasalen Gerinnung („disseminated intravascular coagulation“, DIC) assoziiert⁸.

Im Jahr 2017 trugen Durchfallerkrankungen und Infektionen der unteren Atemwege am stärksten zu Sepsisfällen in allen Altersgruppen weltweit bei^{2,9}. Eine Sepsis kann generell durch Infektion mit bakteriellen oder viralen Erregern oder auch durch Pilzkrankungen ausgelöst werden¹⁰. Auch Ko-Infektionen, wie beispielsweise mit Influenza Virus und dem Bakterium *Staphylococcus aureus*, sind möglich⁹. Unter den bakteriellen Erregern der Sepsis sind Gram-negative Bakterien, wie *Escherichia coli* (*E. coli*), sowie die Gram-positiven *Staphylococcus aureus* und *Streptokokken* am häufigsten⁶. Zwar ist davon auszugehen, dass häufig auch virale Erreger Auslöser einer Sepsis sind, der Labornachweis gelingt jedoch deutlich seltener⁹. Unter den viralen Erregern ist das SARS-CoV-2 Virus von hohem

aktuellem Interesse. Jedoch unterscheidet sich die COVID-19-Sepsis in einigen Kriterien von den üblichen bakteriellen und viralen Septitiden¹¹. Auf der Intensivstation zeigen etwa 76% der COVID-19 Patienten Anzeichen einer viralen Sepsis, auf der Normalstation etwa ein Drittel¹².

1.2 Die Rolle der Immuno-thrombose in systemischen Infektionen

1.2.1 Die Hämostase

Die Hämostase ermöglicht dem Organismus nach Ruptur der Gefäßwand die Gefäßkontinuität wiederherzustellen, indem die Gefäßläsion mit einem Blutgerinnsel verschlossen und gleichzeitig das Blut in einem flüssigen Zustand gehalten wird. So werden Blutverluste verhindert und die Versorgung des Körpers mit Sauerstoff gewährleistet. Anschließend wird das Gerinnsel wieder abgebaut^{8,13}.

Thrombozyten werden als eine der ersten Zellen an die verletzte Gefäßwand rekrutiert. An dem mehrstufigen Prozess sind die Adhäsions-Rezeptoren der Thrombozyten und ihre entsprechenden Liganden wie der von-Willebrand-Faktor (vWF), Kollagen und Fibrin(ogen) beteiligt¹³. Hierdurch werden die Thrombozyten aktiviert, wodurch sie ihre Form verändern, ihre Adhäsionskraft erhöhen und so eine pro-hämostatische Oberfläche ausbilden¹⁴. Das während der Fibrinbildung entstandene Thrombin fördert dabei zusätzlich die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten¹⁵.

Für die Fibrinbildung ist eine sequenzielle Aktivierung von Serinproteasen und deren Kofaktoren im Blut nötig, die in 3 Phasen unterteilt werden kann (Abbildung 1):

Initiationsphase: Auf Grund von Endothelschädigung ist der subendotheliale Gewebefaktor („Tissue factor“, TF) im Blut frei zugänglich und bindet Faktor VII, der dadurch zu Faktor VIIa aktiviert wird und die Gerinnungskaskade initiiert⁸. Der extrinsische Tenasekomplex (TF:FVIIa) aktiviert anschließend Faktor IX (Faktor IXa) und Faktor X (Faktor Xa)^{13,14}. Faktor Xa wiederum verbindet sich mit dem Kofaktor Va (Prothrombinase-Komplex, FXa:FVa) und initiiert so die Bildung von Thrombin, des zentralen Vermittlers der Blutstillung, aus dem inaktiven Zymogen Prothrombin^{8,13}. Die Initiationsphase wird klassischerweise auch als extrinsischer Weg der Gerinnung bezeichnet¹³.

Amplifikationsphase: Der so gebildete Thrombus aktiviert die an der Verletzungsstelle anhaftenden Thrombozyten über die Protease-aktivierenden Rezeptoren (PARs). Diese exponieren Phosphatidylserin (PS) auf ihrer Oberfläche, wodurch die Gerinnungsfaktoren aktiviert werden. Gleichzeitig aktiviert Thrombin die Faktoren XI, VIII (Kofaktor für Faktor IX) und V (Kofaktor für Faktor X)¹³.

Ausbreitungsphase: Durch Faktor XIa entsteht nun zusätzliches FIXa, das sich mit FVIIIa auf der Thrombozytenmembran zum intrinsischen Tenasekomplex (FIXa:FVIIIa) verbindet und so die Effizienz der Faktor X-Aktivierung erhöht^{13,14,16}. Als Folge bewirkt der Prothrombinase-Komplex FXa:FVa eine starke Steigerung der Thrombinbildung, demzufolge massiv Fibrinogen zu Fibrin umgewandelt wird.

Im letzten Schritt katalysiert die durch Thrombin aktivierte Plasmatransglutaminase Faktor XIII (FXIIIa) die Bildung kovalenter Querverbindungen zwischen benachbarten Fibrinketten, um ein elastisches, polymerisiertes Fibringerinnsel zu bilden. Der hämostatische Pfropfen wird durch den von Thrombin aktivierten Faktor XIII (Plasmatransglutaminase) über Ausbildung kovalenter Querverbindungen weiter stabilisiert (nicht gezeigt)¹³.

Nach dem zellbiologischen Modell der Gerinnung dient der intrinsische FXII-FXI-Signalweg der extrinsischen Gerinnung als Verstärkungsschleife¹⁷. Für die Aktivierung des intrinsischen FXII-FXI-Signalwegs (Kontaktaktivierung) gibt es drei physiologische Trigger: Kollagen¹⁸, lineare Phosphatpolymere – so genannte Polyphosphate (PolyP) – die von Thrombozyten stammen können (siehe Abbildung 1, Einsatz)¹⁶, und NETs („neutrophil extracellular traps“)^{8,13}. Die Aktivierung von FXII führt anschließend zur Aktivierung von Kallikrein (FXIa), was über die Aktivierung weiterer nachgeschalteter Gerinnungsfaktoren zur Bildung von Thrombin führt¹⁴. Gleichzeitig bewirkt aktiviertes Kallikrein wiederum reziprok die Aktivierung von Faktor XII¹⁹.

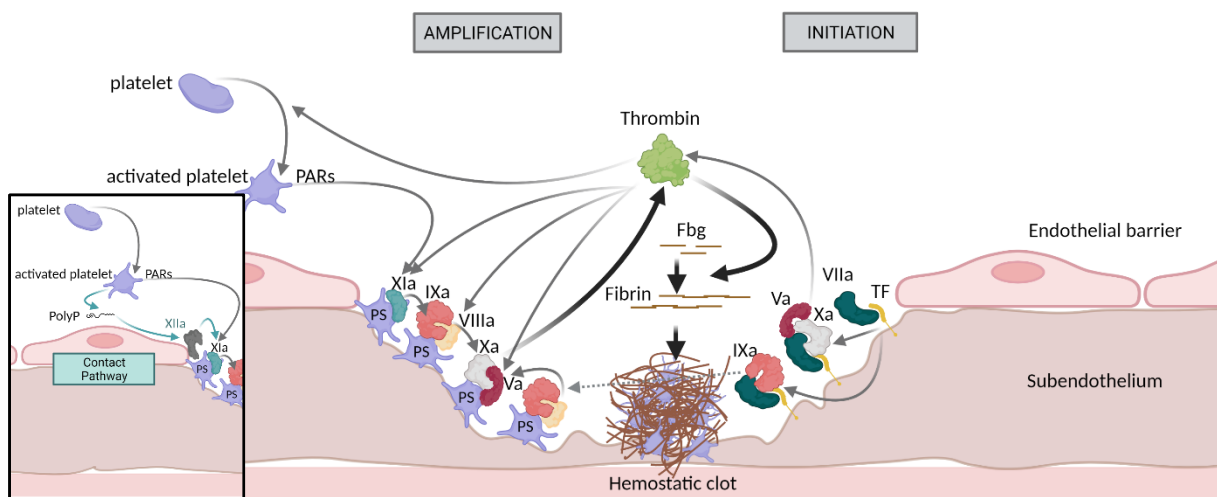


Abbildung 1 – Initiierung und Verstärkung der Gerinnungskaskade während der Hämostase (modifiziert nach¹⁴, erstellt mit biorender.com)

1.2.2 Die Immuno-thrombose

Als Immuno-thrombose bezeichnet man einen Mechanismus der angeborenen Immunität, bei dem aktivierte Neutrophile und klassische Monozyten mit Thrombozyten und der Gerinnungskaskade interagieren, um intravaskuläre Gerinnselbildungen in kleineren Blutgefäßen zu induzieren^{8,20}. Dadurch werden eingedrungene Pathogene an der weiteren Ausbreitung im Gefäß und an der Extravasation ins Gewebe gehindert^{8,21}. Zusätzlich werden antimikrobielle Mechanismen und Erreger

lokal konzentriert, sodass die Abtötung der Pathogene begünstigt wird. Darüber hinaus bewirkt Fibrin die Rekrutierung weiterer Immunzellen an den Ort der Gewebeeinfektion⁸.

Aktivierte klassische Monozyten exprimieren TF und können so – nach dessen Aktivierung – den extrinsischen Signalweg der Blutgerinnung aktivieren (Abbildung 2)⁸. Die Expression von TF wird beispielsweise durch das Binden von ‚pathogen-associated molecular patterns‘ (PAMPs), wie den Lipopolysacchariden (LPS) Gram-negativer Bakterien und/oder ‚damage-associated molecular patterns‘ (DAMPs) ausgelöst^{22–24}. TF kann auch von anderen Arten von Immunzellen, wie Neutrophilen²⁵ und Eosinophilen²⁶, sowie von Thrombozyten²⁷ exprimiert werden. Zusätzlich können klassische Monozyten TF mit Hilfe von extrazellulären Vesikeln an den Ort der Infektion transportieren⁸.

Aktivierung von Neutrophilen über PAMPs und DAMPs bewirkt die Freisetzung von NETs, ein Prozess, der auch als NETose bezeichnet wird²⁸. Bei NETs handelt es sich um eine Matrix aus klebrigen DNA-Fasern und Histonen. Sobald sie aus den Neutrophilen herauskatapultiert werden, bewirken sie das Einfangen des Erregers und gleichzeitig eine Aktivierung der Gerinnung^{8,17,29}.

Aktivierte Thrombozyten an der Oberfläche von Neutrophilen verstärken zusätzlich die Bildung der NETs. Reziprok dazu unterstützen gebildete NETs die Rekrutierung der Thrombozyten über vWF⁸.

Die Gerinnungsaktivierung durch die NETs funktioniert auf vielfältige Weise: Die Bildung von NETs bewirkt zum einen eine lokale Anreicherung von Enzymen wie neutrophile Elastase (NE) und Myeloperoxidase (MPO), welche Antikoagulantien wie TFPI (‚tissue factor pathway inhibitor‘) spalten bzw. oxidieren können, was wiederum die Gerinnung fördert^{30,31}. Darüber hinaus können NETs-Bestandteile andere natürliche Antikoagulantien wie Thrombomodulin abbauen und modifizieren⁸. Neben der indirekten Aktivierung der Gerinnung können NETs auch direkt Faktor XII (den Kontaktsignalweg der Gerinnung) aktivieren, was über die nachgeschaltete Gerinnungskaskade die Bildung von Fibrin zur Folge hat³². Ebenso kann die Fibrinbildung auch direkt aktiviert werden, indem das Histon H4 an Prothrombin bindet, wodurch Thrombin durch Autoaktivierung erzeugt wird³³. Zusätzlich können die Histonkomponenten H3 und H4 der NETs über Aktivierung der Thrombozyten die Thrombosebildung fördern³⁴.

Auch Thrombozyten unterstützen die Ausbildung von Immunothrombosen: Hierzu gehört die Aktivierung des Faktor XII-Signalwegs der Gerinnung über PolyP, aber auch die Freisetzung zahlreicher Mediatoren, die die Rekrutierung von Leukozyten unterstützen und ihre mikrobiziden Aktivitäten fördern⁸.

Das Komplementsystem (insbesondere die aktivierten Komplementkomponenten C3a und C5a) unterstützt ebenfalls die Immunothrombose, indem es die Aktivierung von Thrombozyten bewirkt³⁵.

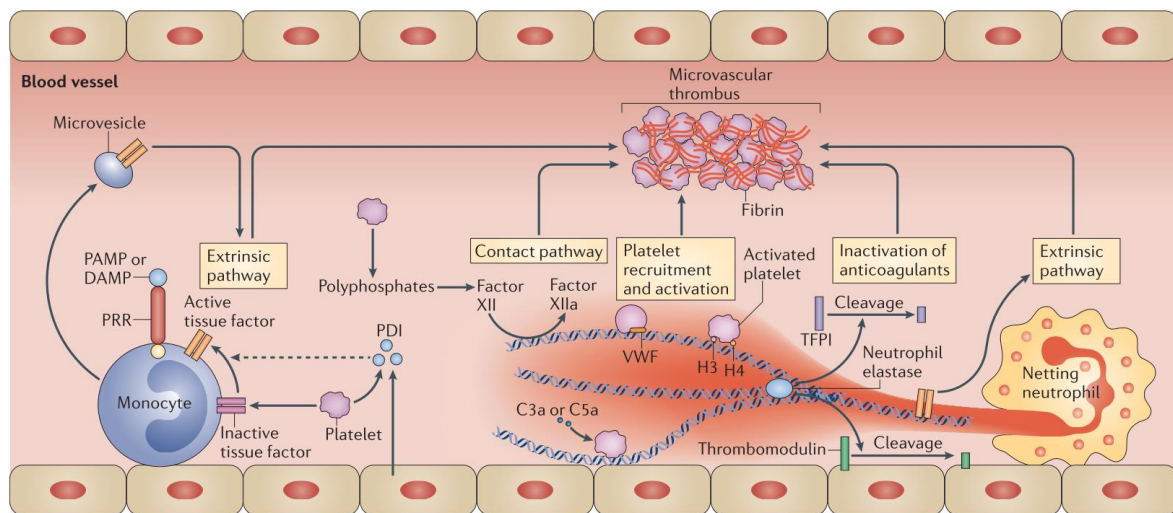


Abbildung 2 – Die Immuno­thrombose – Klassische Monozyten und Neutrophile aktivieren die Gerinnung⁸

Um der Wirtsabwehr durch die Immunothrombosen zu umgehen, sind mehrere Krankheitserreger mit ausgeklügelten Strategien ausgestattet. Beispielsweise exprimieren die Gram-positiven Bakterien *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) eine DNase, die NETs abbaut und die NET-vermittelte Abtötung hemmt^{36,37}. Bei Tieren mit gestörter NET-Bildung wird eine erhöhte bakterielle Dissemination beobachtet³⁷, gleichzeitig werden die Tiere jedoch vor Organschäden besser geschützt²³. Bei Mäusen mit stark beeinträchtigter TF-Expression ist die Fähigkeit zur Gerinnungsaktivierung als Reaktion auf Krankheitserreger vermindert, was mit einer erhöhten Erregerbelastung und einem geringeren Überleben der Tiere einhergeht³⁸.

1.2.3 Pathologische Thrombosen

Liegen dagegen Dysregulationen der Hämostase bzw. der Immuno­thrombose vor, so kann es zur Entstehung von pathologischen Thrombosen kommen⁸. Die exzessive Aktivierung der Immuno­thrombose, mit einer gleichzeitigen massiv einhergehenden Entzündungsreaktion (Inflammation), wird auch als ‚Thromboinflammation‘ bezeichnet, und ist durch einen systemischen prothrombotischen Phänotyp charakterisiert, welcher ein entscheidender Auslöser nicht-infektiöser Herz-Kreislauf-assoziiierter Thrombosebildungen ist²¹. Aufgrund der Coronavirus-Pandemie hat dieser Prozess in den vergangenen Jahren große Aufmerksamkeit erregt. Patienten mit schweren COVID-19-Erkrankungen leiden nicht nur an Lungenentzündung und akutem Atemnotsyndrom (ARDS), sondern besitzen auch ein hohes Risiko für das Auftreten pathologischer Thrombosen^{20,21}.

1.2.4 Die Faktor XII-Aktivierung durch NETs

Nukleosomen enthalten Dimere der Histone H2A, H2B, H3 und H4, welche von einem 147 Basenpaar langen dsDNA-Strang umhüllt sind und dabei 2 Nukleosome über den „Linker“-Abschnitt (40 bp dsDNA) verbinden³⁹. Die Bildung der NETs wird von der kalziumabhängigen Peptidyl-Arginin-Deiminase 4 (PAD4) vermittelt, welche positiv geladene Argininreste in neutral geladenes Citrullin an den Histonschwänzen von H2A, H3 und H4 umwandelt (Abbildung 3a)^{40–42}. Die Ladungsänderung verändert die Chromatinstruktur, indem die Wechselwirkung zwischen den Histonen und der DNA geschwächt wird, sodass NETs aus der rupturierten Plasmamembran freigesetzt werden können⁴¹ (Abbildung 3b). Die Chromatindekondensation stellt die Voraussetzung für die Freisetzung von NETs und der mit ihnen assoziierten Proteinen in den extrazellulären Raum dar (Abbildung 3c).

Zwar ist bekannt, dass die NETs Faktor XII aktivieren können, jedoch sind die molekularen Mechanismen dahinter bislang ungeklärt. Prinzipiell können polyanionische Moleküle, wie DNA-Stränge, Faktor XII und XI aktivieren²⁹. Auch konnte mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie nachgewiesen werden, dass Faktor XII an DNA *in vivo* bindet⁴³. Jedoch konnte die Faktor XII-Aktivierung *in vitro* weder durch Nukleosomen selbst, noch durch Histon-Oktamere in einer Thrombozyten-freien Umgebung gezeigt werden⁴⁴. Da *in vivo* DNA nicht frei, sondern vor allem in Nukleosomen gepackt vorliegt, ist nicht geklärt, wie die Aktivierung von Faktor XII durch NETs funktioniert^{29,44}.

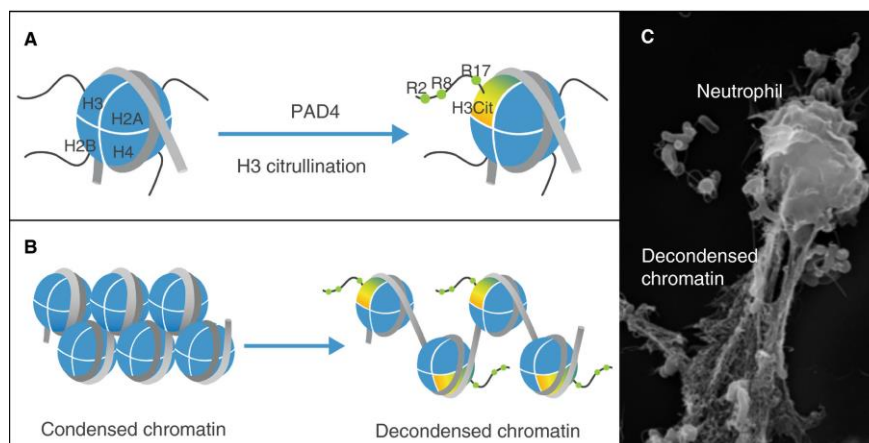


Abbildung 3 – PAD4 bewirkt die Citrullinierung von Histon H3 (citH3) und anderer Histone und erleichtert damit die Bildung und Freisetzung von NETs⁴²

Eine Möglichkeit wäre, dass Faktor XIIa mit den sogenannten „acidic patch“ des Histon-Dimers (Histon 2A: Histon 2B) mit höherer Affinität als freie dsDNA interagiert und daher seine koagulationsaktivierende Wirkung inhibiert wird, bei ausreichend vorliegender freier dsDNA (im Falle von NETs), aber eine Aktivierung von Faktor XIIa möglich ist. Der Hintergrund ist, dass die zyklische Guanin-Monophosphat - Adenin-Monophosphat - Synthase („cyclic GMP-AMP synthase“, cGAS) von körpereigenen nukleosomalen DNA nicht aktiviert wird, da sie mit höherer Affinität am „acidic patch“

des Histon-Dimers als an freier DNA bindet³⁹. Gleichzeitig ist bekannt, dass NETs-Komponenten cGAS aktivieren können⁴⁵.

1.2.5 Immunothonosen bei viralen Infektionen

Viele virale Krankheitserreger können die Bildung von NETs auslösen, was oft mit einem schweren Verlauf der Infektion einhergeht⁴⁶. Neben SARS-CoV-2-Viren können auch Influenzaviren die Entstehung von dysregulierten Immunothonosen bewirken^{47–49}. Bei schweren COVID-19-Erkrankungen entwickelt sich auf Grund der Dysregulation der Immunothonosen, der abnormalen Zytokin-Antwort⁵⁰ und der exzessiven thromboinflammatorischer Aktivierung ein systemischer prothrombotischer Zustand, der sich in der Bildung multipler mikro- und makrovaskulärer Thrombosen manifestiert und zu lebensbedrohlichen kardiovaskulären Ereignissen führen kann (Abbildung 4c, d)^{20,21}.

Die Immunothonose bei COVID-19 wird vermutlich maßgeblich durch eine Entzündung des Lungenendothels (COVID-19-assoziierte endotheliale Dysfunktion) ausgelöst (Abbildung 4b)^{20,21,51}. Neben den Alveolarepithelzellen exprimieren auch vaskuläre Endothelzellen den Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE2)-Rezeptor, welcher dem Virus als Zelleintrittsrezeptor dient⁵² (Abbildung 4a). Das Eindringen von SARS-CoV-2 in Endothelzellen führt möglicherweise zu deren Aktivierung und zur Freisetzung von vWF. Dadurch werden Thrombozyten und Neutrophile an den Ort der Endothelaktivierung rekrutiert und stimulieren sich gegenseitig. Gleichzeitig könnten Thrombozyten durch Beteiligung von Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK) und Interferon-induziertem Transmembranprotein 3 (IFITM3) aktiviert werden. Aktivierte Thrombozyten könnten wiederum die Freisetzung von NETs über direkte Interaktion von P-Selektin mit dem P-Selektin-Glykoprotein-Liganden 1 (PSGL1) induzieren²¹. Neutrophile sind auch an der akuten Lungenschädigung beteiligt, indem sie innerhalb des Lungengewebes Lungenepithelzellen zerstören (Abbildung 4b)⁵³. Durch die von NETs induzierten mikrovaskulären Thrombosen und den zerstörten alveolären Epithelzellen, wird der pulmonale Gasaustausch beeinträchtigt und das Lungenversagen verschlimmert.

Das durch die Virusinfektion entstandene entzündliche Umfeld bewirkt die Hochregulation von TF auf Endothelzellen und Neutrophilen, was die Gerinnungskaskade in der Lunge verstärkt^{54–57}. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Thrombozyten von Patienten mit schwerem COVID-19 einen hyperreaktiven Phänotyp aufweisen und daher mit Neutrophilen Aggregate bilden, wodurch NETose ausgelöst wird^{58,59}.

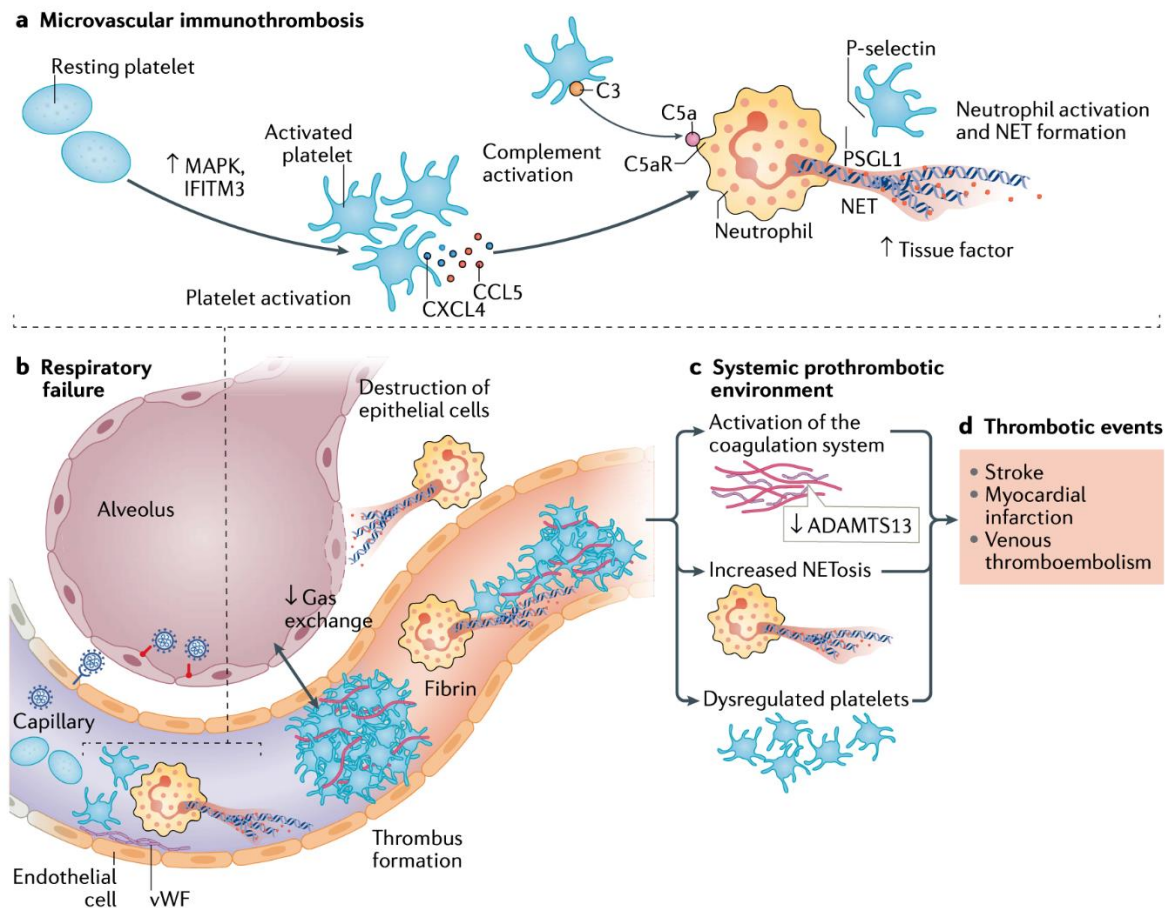


Abbildung 4 – Immunothrombosen verbinden ARDS mit systemischer Koagulopathie bei COVID-19 (modifiziert)²¹

1.2.6 Zirkadiane Rhythmen und Reifung der Neutrophilen

Neutrophile Granulozyten reifen in der mehrstufigen Granulopoese heran, wobei aus hämatopoetischen Stammzellen zunächst Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen (GMPs) entstehen, aus denen wiederum neutrophile Vorläuferzellen (preNeu) gebildet werden. Bei Mäusen sind preNeu vermutlich vor allem über die Ly6G⁺ und CD117⁺-Marker von den anderen Reifestadien im Knochenmark unterscheidbar⁶⁰. Man nimmt an, dass sich die preNeu erst in nicht-proliferierende unreife (immature) Neutrophile (CXCR2⁻ CD101⁻) und anschließend in reife (mature) Neutrophile (CXCR2⁺CD101⁺) differenzieren⁶⁰. Typischerweise handelt es sich bei muren Neutrophile um Zellen mit hoher Dichte und bei immaturen Neutrophilen um Zellen mit niedriger Dichte. In kranken Individuen können allerdings sowohl mature Neutrophile mit hoher als auch mit niedrigerer Dichte vorkommen⁶¹.

Im Anschluss an die Reifung werden die Neutrophilen schließlich aus dem Knochenmark freigesetzt (Abbildung 5)⁶⁰. Die Freisetzung der Neutrophilen aus dem Knochenmark erfolgt in zirkadianen Rhythmen, sodass die Anzahl von Neutrophilen im Blutkreislauf tageszeit-abhängigen Schwankungen unterliegt^{62–64}. Dabei haben Neutrophile unter homöostatischen Bedingungen eine Verweildauer von

unter einem Tag bis zu mehreren Tagen in der Zirkulation^{62,63}. Diese Regulationsmechanismen stellen unter anderen einen Schutz des Gewebes vor den von Neutrophilen freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) am Entzündungs- bzw. Infektionsherds dar. Nach Alterung in der Zirkulation und Peripherie scheiden sie in das Knochenmark, die Milz, die Lunge oder die Leber aus^{62,65}.

Neutrophile exprimieren sowohl beim Menschen als auch bei der Maus den CXCR4-Rezeptor, der für ihren zirkadianen Lebenszyklus wesentlich ist: Neutrophile des Knochenmarks exprimieren im Gegensatz zu zirkulierenden Neutrophilen hohe Mengen von CXCR4. Durch die Interaktion von CXCR4 mit seinem Liganden CXCL12 wird ein großer Pool von Neutrophilen im Knochenmark und in der Milz zurückgehalten. Der CXCR2-Rezeptor ist ein Antagonist von CXCR4 und fördert somit die Freisetzung von Neutrophilen aus dem Knochenmark⁶². Zirkulierende mature Neutrophile exprimieren die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 und werden durch Konzentrationsgradienten verschiedener Zytokine zur Extravasation ins entzündete Gewebe gelenkt. Dort entfalten sie ihre Effektoraktivitäten, wie die Freisetzung von ROS und NETs zur Bekämpfung der Krankheitserreger⁶⁶.

Im Zuge des Alterungsprozesses kommt es bei Neutrophilen in der Zirkulation zu einer Hochregulation von CXCR4, wodurch sie den CXCL12-Gradienten folgend, ins Knochenmark oder in andere Organe, wie der Milz und der Leber, ausgeschieden werden um dort phagozytiert zu werden oder beispielsweise in der Lunge als spezialisiertes Reservoir verbleiben^{67,65}. Bei diesem Reservoir an alten Neutrophilen scheint es sich um eine bedeutsame physiologische Funktionseinheit zu handeln⁶².

Die Expressionszunahme von CXCR4 auf Neutrophilen kann durch Interaktion mit PAMPs ausgelöst werden⁶⁷. Daher wird bei zirkulierenden Neutrophilen infizierter Patienten eine höhere Expression von CXCR4 nachgewiesen verglichen mit gesunden Probanden⁶². Mit zunehmender Alterung weisen Neutrophile einen pro-inflammatorischen Phänotyp auf und besitzen eine gesteigerte Fähigkeit zur Bekämpfung der Krankheitserreger, jedoch ist ihre Fähigkeit zur Extravasation in das entzündete Gewebe verringert^{60,68,69}.

Als Reaktion auf Stress, ausgelöst durch schwere Infektionen, Trauma oder Krebs, kommt es sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen zu einer Notfall-Granulopoese, um den steigenden Bedarf an Neutrophilen zu decken, in dessen Verlauf immature Neutrophile verstärkt aus dem Knochenmark freigesetzt werden^{60,66}.

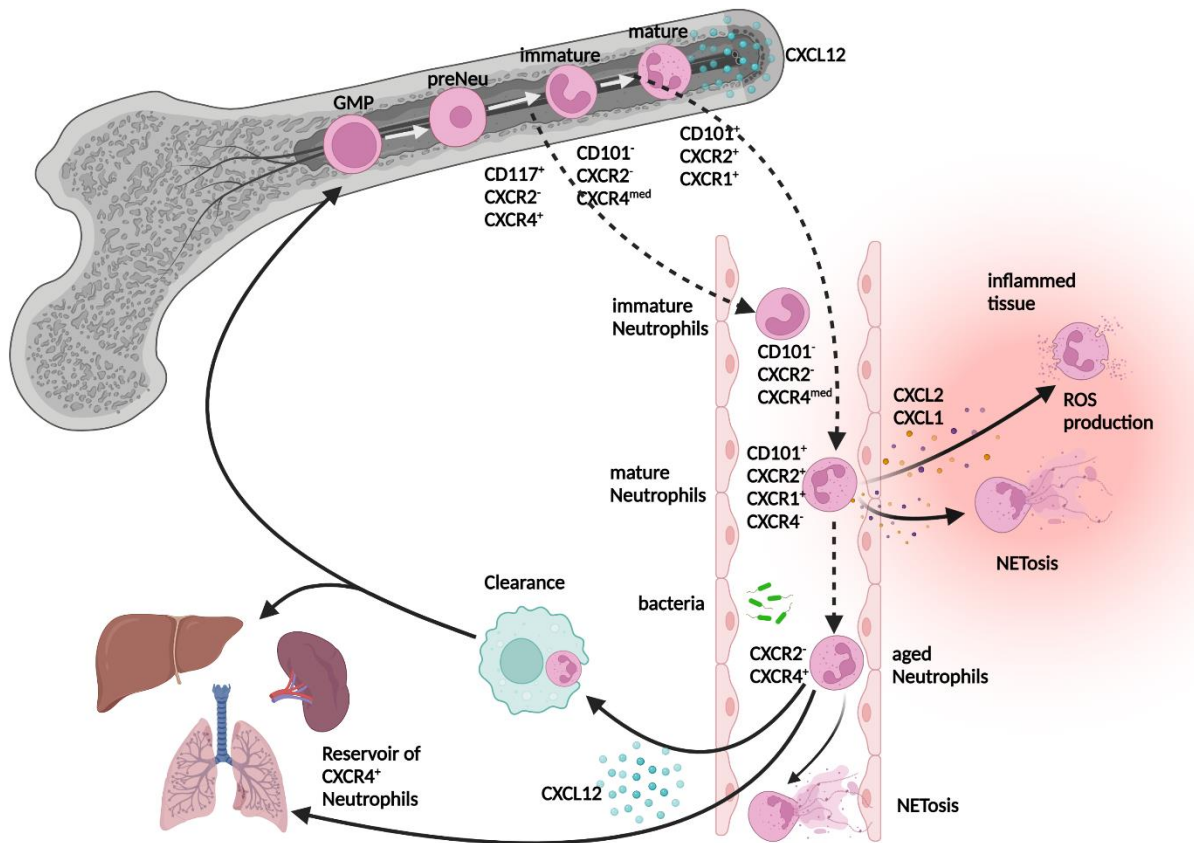


Abbildung 5 – Der Lebenszyklus von Neutrophilen (modifiziert nach⁶⁴, erstellt mit biorender.com)

1.3 Die Funktion von T-Helferzellen bei systemischen Infektionen

1.3.1 Charakterisierung von T-Helferzellsubtypen

Die verschiedenen T-Helferzellsubtypen entstehen dann, wenn naive T-Zellen aktiviert werden und sich zu Effektorzellen entwickeln. Üblicherweise gelangen naive T-Zellen nach ihrer Reifung im Thymus ins Blut und zirkulieren anschließend zwischen Blutgefäßen und sekundärem Lymphgewebe (Milz, Lymphknoten, Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT)) bis ihnen schließlich das für ihren T-Zell-Rezeptor („T cell receptor“, TCR) spezifische Antigen über den MHC-II-Rezeptor einer antigenpräsentierenden Zelle (APC), wie der dendritischen Zelle (DC), präsentiert wird (Abbildung 6). Bei gleichzeitiger Präsentation von co-stimulierenden Molekülen, wie PAMPs, wird die T-Zelle „geprint“ und verbleibt in der T-Zell-Zone des lymphatischen Organs⁷⁰. Während des Kontakts mit APCs machen die T-Zellen Veränderungen durch, die als "Blasting" bezeichnet werden: Sie nehmen an Größe zu, erhöhen ihren Gesamt-RNA-Gehalt um das 30-fache, verdoppeln ihren Proteingehalt und verändern ihren Stoffwechsel, bevor sie nach etwa einem Tag beginnen sich zu T-Effektorzellen oder T-Gedächtniszellen, mit identischer Spezifität für ein bestimmtes Antigen, zu differenzieren und zu proliferieren (klonale Expansion)^{70,71}. Danach verlassen die Zellen den Lymphknoten und zirkulieren im Blutkreislauf. Aus den T-Effektorzellen können sich ebenfalls Gedächtniszellen (T-

Effektorgedächtniszellen (T_{EM}) und zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}) entwickeln, die zwischen Blutgefäßen und Lymphsystem zirkulieren. Bei akuter Infektion können sich T_{EM} wieder zu T-Effektorzellen zurückentwickeln^{72,73}.

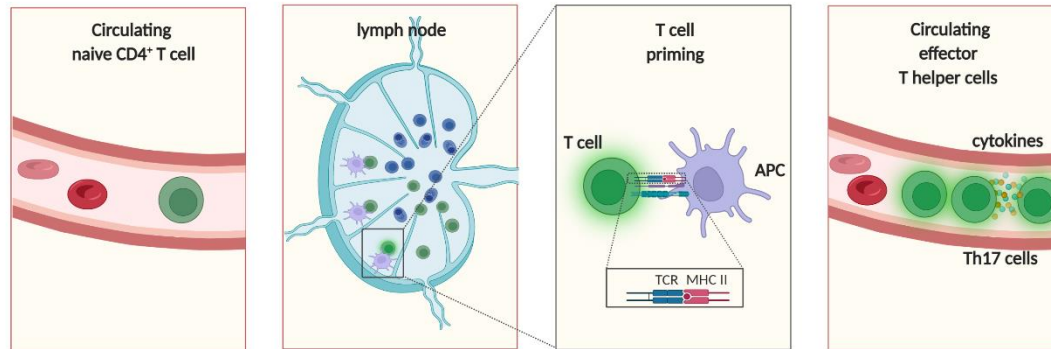


Abbildung 6 – Priming von naiven $CD4^+$ T-Zellen (erstellt mit biorender.com)

Die häufigsten Subpopulationen der $CD4^+$ T-Effektorzellen sind Th1-, Th2-, Th17-Zellen, sowie regulatorische T-Zellen (Treg) und folliculäre T-Helferzellen (Tfh).

Die genannten Zellsubpopulation setzen jeweils subtypen-spezifische Zytokine frei und unterscheiden sich jeweils durch ihre unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften: Th1-Zellen unterstützen vor allem Makrophagen in der Beseitigung von phagozytierten Pathogenen wie bestimmten Viren, Protozoen und intrazelluläre Bakterien. Th2-Zellen verstärken dagegen die Reaktion von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen auf extrazelluläre Parasiten. Th17-Zellen entstehen üblicherweise als Reaktion auf die Infektion mit extrazellulären Bakterien oder Pilzen und verstärken vor allem Neutrophile in der Beseitigung der Erreger. Zusätzlich aktivieren Th17-Zellen auch über bestimmte Zytokine die mikrobizide Funktion barrierebildender Epithelzellen des Verdauungstrakts, der Atemwege, des Urogenitaltrakts, sowie der Haut⁷⁰. Die Hauptaufgabe der Tfh-Zellen besteht in der Aktivierung von naiven B-Zellen, sodass diese sich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen differenzieren. Damit eine naive B-Zelle aktiviert wird, ist neben Bindung des Antigens eine Co-Stimulation durch eine Tfh-Zelle, welche an den Antigen:MHC-II-Komplex der B-Zelle binden, oder in Ausnahmefällen durch PAMPs wie LPS zwingend notwendig⁷⁴.

Neben den Tfh in den Lymphknoten, finden sich in der Blutzirkulation ‚circulating‘ Tfh (cTfh), die ebenso die Antikörperbildung durch B-Zellen fördern⁷⁵ und funktionell eine Art Gedächtniszelle der Tfh bilden^{76,77}. Bei viralen Infektionen korreliert die Anzahl gebildeter Antikörper mit der Menge an cTfh im Blut^{78,79}.

Treg-Zellen entwickeln sich entweder im Thymus (nTreg) oder, sofern kein Krankheitserreger vorhanden ist, wird ihre Differenzierung in der Peripherie (Blutkreislauf oder Darmschleimhautgewebe) induziert (iTreg)⁷⁰. Die Funktionsweise der Treg-Zelle besteht in der

Blockade von Immunreaktionen anderer T-Zellen: Hierfür binden sie beispielsweise an APCs mit höherer Affinität und verhindern so die Bindung der T-Helferzellen an APCs. Gleichzeitig hemmen sie die Expression von MHC-Molekülen und weiteren co-stimulierenden Molekülen, sodass das Priming der T-Helferzellen durch die APCs verhindert wird. Auch blockieren sie die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch APCs, sodass die Reaktion der Effektorzellen beeinträchtigt wird, und produzieren immunsuppressive Zytokine, die die Proliferation anderer T-Helferzellen hemmen⁷⁰. Bei Infektionen wurde auch eine Gruppe unkonventioneller innater T-Helferzellen beschrieben, die bei Aktivierung schnell, das heißt in unter 2 Stunden, reagieren und als Brücke zwischen dem Innaten und dem adaptiven Immunsystem fungieren⁸⁰. Die Innaten T-Zellen zirkulieren nach ihrer Entwicklung im Thymus in der Peripherie und halten sich vor allem in den Blutgefäßen von Leber und Lunge auf. Im Gegensatz zu den adaptiven T-Zellen verbringen sie nur kurze Zeit in den Lymphknoten⁸¹. Innerhalb der Gruppe der Innaten T-Zellen werden 3 Hauptpopulationen unterschieden: invariante Natürliche-Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), Mukosa-assoziierte invariante T-Zellen (MAIT) und $\gamma\delta$ -T-Zellen. Im Gegensatz zu den konventionellen, adaptiven T-Zellen erkennen die Innaten T-Zellen Antigene, die ihnen präsentiert werden, nicht über den MHC-II-Komplex. NKT- und MAIT-Zellen reagieren stattdessen auf Präsentation von Antigenen über die Rezeptoren CD1d bzw. MR1 der APCs, während $\gamma\delta$ -T-Zellen Antigene über den CD1c-Rezeptor erkennen. Alternativ können Innate T-Zellen auch durch Zytokine, die von anderen Immunzellen freigesetzt worden sind, aktiviert werden⁸⁰: Sowohl NKT-Zellen als auch MAIT-Zellen spielen vor allem in der Frühphase bakterieller und viraler Infektionen eine bedeutsame Rolle und sind für das Überleben oder das Vermeiden eines schweren Infektionsverlaufs unerlässlich⁸²⁻⁸⁷.

Bei einem gesunden Menschen machen MAIT-Zellen etwa 5% der zirkulierenden T-Zellen aus (25% der hepatischen T-Zellen). Im Gegensatz dazu sind NKT-Zellen beim Menschen selten (etwa 0,1%). Mäuse dagegen haben einen größeren Anteil NKT-Zellen (etwa 1%; 30% der hepatischen T-Zellen) und dagegen nur wenige MAIT-Zellen (bis zu 0.1%). Im Falle einer Infektion ändern sich diese Anteile rapide^{81,88}.

1.3.2 Die Funktion von Immunkomplexen

Bei jeder Antikörperreaktion kommt es zur Bildung von Immunkomplexen (Antigen:Antikörper-Komplex)⁸⁹. Zirkulierende Immunkomplexe (IK) werden als Reaktion auf Infektionen und Gewebeverletzungen kontinuierlich produziert und verursachen eine Entzündungsreaktion. Hierbei reagiert etwa die 5-fache Menge an Antikörpern mit Antigen (Gewichtsverhältnis)⁹⁰. Größere Aggregate aktivieren das Komplementsystem und werden schnell von Phagozyten beseitigt. Kleinere Aggregate werden bei Antigenüberschuss gebildet und lagern sich oft an den Gefäßwänden ab. Eine exzessive IK-Akkumulation ist dagegen mit dem Auftreten verschiedener Autoimmunerkrankungen

verbunden. Leukozyten binden IK über Fcγ-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und werden dadurch aktiviert, was auch eine Schädigung des umliegenden Gewebes verursachen kann⁸⁹. Fcγ-Rezeptoren werden von zahlreichen Zellen exprimiert, darunter Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, DCs und B-Zellen⁹¹.

Sobald IK, bestehend aus IgG und Antigenen, von Fcγ-Rezeptoren erkannt werden, kommt es über die entstandene Quervernetzung zur Internalisierung und damit zur Aktivierung einer nachgeschalteter Signalkaskade. Die Internalisierung ist die Voraussetzung, dass APCs das im IK enthaltene Antigen anderen Zellen, wie T-Zellen, präsentieren können. Die Präsentationsfähigkeit von Antigenen durch APCs ist bei einer Aufnahme des Antigens in einem IK im Vergleich zur Aufnahme des Antigens ohne Komplex deutlich verbessert. Auch scheint in bestimmten Fällen die Aktivierung der T-Zellen durch APCs effektiver zu verlaufen⁹¹. Die Aufnahme von IK kann durch Blockade des FcγII- und FcγIII-Rezeptors (CD16/32) mittels Antikörper effektiv verhindert werden⁹².

1.3.3 Die Bedeutung der Kupffer-Zellen in der Frühphase der Immunabwehr

Lebermakrophagen sind eine heterogene Population aus den sich selbst erneuernden, im Gewebe ansässigen Phagozyten – den so genannten Kupffer-Zellen – und den Makrophagen, welche aus der Peritonealhöhle oder dem Knochenmark rekrutiert werden⁹³. Dabei handelt es sich bei den Kupfferzellen um die größte Population von Gewebsmakrophagen im ganzen Körper. Kupfferzellen spielen eine entscheidende Rolle bei der angeborenen Immunantwort; ihre Lokalisierung im hepatischen Sinusoid ermöglicht ihnen eine effiziente Phagozytierung von Krankheitserregern, die aus dem portalen oder arteriellen Kreislauf eindringen. Kupffer-Zellen dienen auch als erste Verteidigungslinie gegen Partikel und immunreaktives Material, das aus dem Gastrointestinaltrakt über den portalen Kreislauf eindringt, und können als letzte Komponente der Darmbarrierefunktion betrachtet werden⁹⁴.

1.4 Migrationsverhalten von T-Helferzellen

In allen Lebensstadien der T-Zellen ist ihre Fähigkeit zur (Trans-)Migration von entscheidender Bedeutung, und zwar vom Eintritt der T-Zell-Vorläufer in den Thymus über den Eintritt naiver T-Zellen in die Lymphknoten bis hin zur (Trans-)Migration (Extravasation) von Effektor-T-Zellen aus der Blutzirkulation in das Gewebe. Die Transmigration erfolgt über einen mehrstufigen Weg, der das Rollen der Lymphozyten, die Aktivierung, die feste Adhäsion und die Transmigration (Diapedese) umfasst (Abbildung 7). Hierbei wird jeder Schritt durch Wechselwirkungen zwischen Adhäsionsmolekülen oder Chemokinrezeptoren, die auf der T-Zelloberfläche exprimiert werden, und ihren Liganden, die auf

Endothelzellen der Gefäßwand exprimiert werden, reguliert^{70,95-97}. Der Prozess läuft folgendermaßen ab:

1. Rollen: Aufgrund der Entzündung kommt es zur Bindung der T-Zelle über L-Selektin an endothelspezifische Adressine, sodass lose Wechselwirkungen entstehen, die das Rollen auf der Endotheloberfläche ermöglichen. P-Selektin und E-Selektin werden am Infektionsherd auf der Endotheloberfläche exprimiert und lotsen so die Zellen zum infizierten Gewebe.
2. Aktivierung: Chemokine wie der ,CC-chemokine ligand 21' (CCL21), werden vom entzündeten Endothel ausgeschüttet und bewirken so eine Konformationsänderung der auf den T-Zellen exprimierten Rezeptoren wie der ,C-C chemokine receptor type 7' (CCR7). Dies führt zu deren Aktivierung.
3. Adhäsion: Aufgrund der Konformationsänderung kommt es zu einer Zunahme der Affinität der T-Zell-Integrine wie ,lymphocyte function-associated antigen 1' (LFA-1) und CD11a:CD18 für die Adhäsionsmoleküle auf dem Endothel wie das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül 1 (,intercellular adhesion molecule 1', ICAM-1), sodass es zur festen Adhäsion kommt. Dabei kann LFA-1 auch von ICAM-2 der Endothelzellen gebunden werden. Bei Effektorzellen wird zusätzlich oder alternativ zu LFA-1 auch das Integrin ,very late antigen-4' (VLA-4) exprimiert. VLA-4 bindet an ,vascular cell adhesion protein 1' (VCAM-1) der aktivierten Endothelzelle. Über LFA-1:ICAM-1 kann auch die Adhäsion der T-Zelle an APC stattfinden, was die Differenzierung der T-Zelle anregt.
4. Kriechen (Crawling): Während Interaktionen mit hoher Affinität für die Adhäsion notwendig sind, ermöglicht die anschließende konstitutive Expression von LFA-1 mit mittlerer Affinität das teilweise Ablösen der Zelle vom Endothel, sodass ein kriechende Fortbewegung über das Endothel möglich ist. Dies ermöglicht die Fortbewegung bis zu einer geeigneten Extravasationsstelle und führt gleichzeitig die Zelle Chemokin-gesteuert näher an ihren Zielort.
5. Diapedese: Anschließend folgen die T-Zellen bestimmten Chemokingradienten (CCL21, CXCL12) um die Endothelwand zu durchdringen^{70,98}.

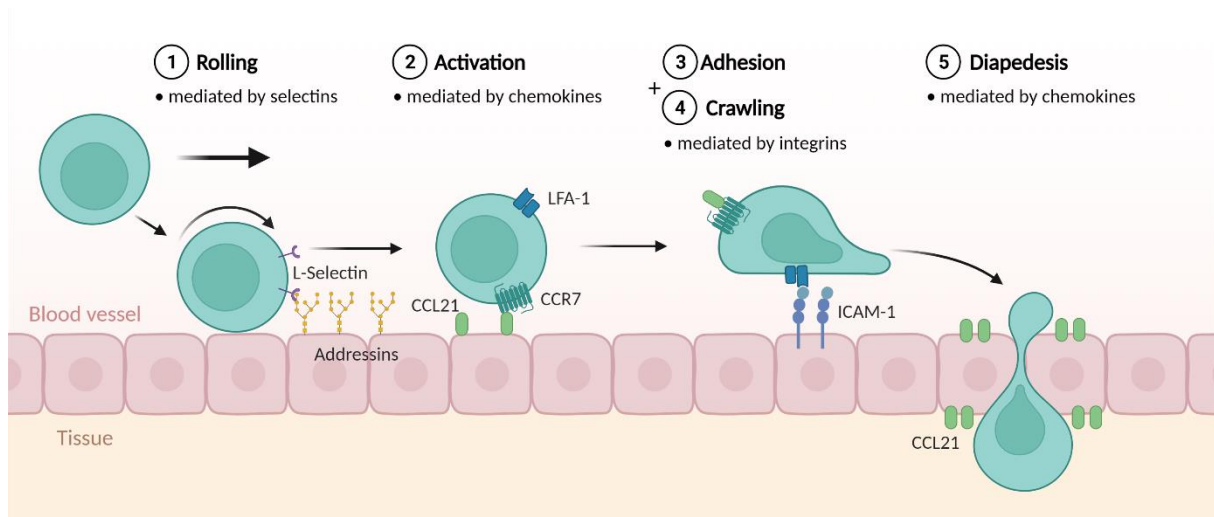


Abbildung 7 – Migration von T-Zellen ins Zielgewebe (erstellt mit biorender.com, Template modifiziert nach^{70,99})

1.5 Zielsetzungen

Mit der vorliegenden Promotionsarbeit sollen Antworten auf folgende Fragen gefunden werden:

1. Welche Funktion haben die T-Helferzellen bei systemischen Infektionen im Zusammenhang mit der Immuno-thrombose?
2. Ist das Bewegungsverhalten von T-Helferzellen in der Lebermikrozirkulation abhängig von Fibrindeposition?
3. Inwieweit interagieren T-Helferzellen mit IK im Rahmen systemischer Infektionen?
4. Welche Rolle haben T-Helferzellen im fortgeschrittenen systemischen Infektionsverlauf?
5. Hat das Alter des Individuums Einfluss auf die Koagulationsantwort bei systemischen bakteriellen und viralen Infektionen?
6. Welchen Phänotyp tragen Neutrophile bei systemischen Infektionen und wie ist der Zusammenhang mit dem Alter des Individuums?

II. Material

2.1 Technische Ausstattung und Geräte

Artikel, Typenbezeichnung	Hersteller
Autoklav, VX-95	Systec GmbH und Co. KG (Linden, D)
Analysenwaage, LA 214i	VWR International (Radnor, USA)
Biologische Sicherheitswerkbank, MSC Advantage Type 1.2	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Brutschrank/ Inkubator, Serie C	Binder GmbH (Tuttlingen, D)
Durchflusszytometrische Analyse, LSRFortessa mit 355nm, 405 nm, 488 nm, 561 nm und 640 nm-Lasern	BD Bioscience (Heidelberg D)
Durchflusszytometrische Zellsortierung, FACS Aria III mit den Lasern 405 nm, 488 nm und 633 nm	BD Bioscience (Heidelberg D)
Gefrierschrank, -80°C, HERA freeze	Kendro laboratory Products (Hanau, D)
Inkubationshaube, Unihood 550	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH (Planegg, D)
Isofluran-Verdampfersystem mit Induktionskammer, UniVet Narkosesystem	Groppler Medizintechnik (Deggendorf, D)
Konfokales Lasermikroskop, LSM 510 Meta	Carl Zeiss GmbH (Jena, D)
Konfokales Lasermikroskop, SP8X WLL (Core Facility Bioimaging, LMU)	Leica Biosystems (Wetzlar, D)
Konfokales Lasermikroskop, TCS SP8 (Core Facility Bioimaging, LMU)	Leica Biosystems (Wetzlar, D)
Kryotom, CM3050 Cryostat	Leica Biosystems (Wetzlar, D)
Kühlschrank, +4°C und Gefrierschrank, -20°C, Liebherr Profi-line	Liebherr-International Deutschland GmbH (Bieberach an der Riß, D)
Lichtmikroskop, Axiovert 100	Carl Zeiss GmbH (Jena, D)
Magnetrührer, IKA MAG® RCT	IKA GmbH & Co. KG (Staufen, D)
Magnetseparator, MidiMACS™	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Mikropipetten, 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Mikroplatten-Reader, SpetraMax® Paradigm®	Molecular Devices (San Jose, USA)
Multiphotonen-Mikroskop mit	LaVision BioTec GmbH (Bielefeld, Germany)

Ti:Sa-Laser Chameleon Ultra II (Laserklasse 4)	Coherent (Parkland, USA)
Neubauer Zählkammer, Improved	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, D)
pH-Meter, HI221	HANNA Instruments (Québec, Canada)
Pipettierhilfe, Pipetboy 2	Integra-Bioscience AG (Biebertal, D)
Precellys 24 (Lyse und Homogenisierung)	Peqlab (Erlangen, D)
Restrainer-Set	Labart (Waldbüttelbrunn, D)
Schüttler, KS 250	IKA GmbH & Co. KG (Staufen, D)
Taumler	
Tischzentrifuge, Centrifuge 5415	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Vortexer, Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG (Zurich, Switzerland)
Waage, Balance MC1 LC 620 S	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.KG (Göttingen, D)
Wasserbad, Julabo U3	Julabo Labortechnik GmbH (Allentown, USA)
Zentrifugen (Mikro 22R/ Rotina 35R/ Universal 32)	Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, D)

Tabelle 1 – Technische Ausstattung und Geräte

2.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
96-Well Mikrotiter-Platte, Flachboden, Corning™	Corning Inc. Life Sciences (Schiphol-Rijk, NL)
Adhäsionsobjektträger, Superfrost™ Plus	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)/ Epredia (Kalamazoo, USA)
Ausplattierspatel	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Butterfly-Kanüle, Safety-Multifly®, 21G	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Super PAP Pen, Liquid Blocker Mini	Science Service GmbH (München, D)
Deckgläser, 24 x 50 mm	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

Einmalspritzen, steril, zweiteilig, 2 ml/ 5ml/ 10 ml	BD Bioscience (Heidelberg D)
Einwegskalpell, Feather®	Feather Safety Razor (Ohyodo-Minami, JPN)
Injektionsspritze, Spritze Injekt®-F, 1ml	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG (Melsungen, D)
Kanülen, Microlance™ 3, 26G/ 30G	BD Bioscience (Heidelberg D)
Katheterschlauch, Polyethylen (0.28 ID, 0.61 OD)	Smith Medical (Plymouth, USA)/ Warner Instruments (Holliston, USA)
Kryoeinbettformen, Tissue Tek® Cryomold®	Sakura Finetek Germany GmbH (Umkirch, D)
Küvetten, farblos	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, D)
Mikrotom- und Kryostatklängen	Leica Biosystems (Wetzlar, D)
Petrischale, PS, steril	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Ö)
Pipetten (serologisch, Wattestopf), 5 ml/ 10 ml	Omnilabs GmbH Co. KG (Bremen, D)
Pipettenspitzen (mit Filter; DNase/RNase-frei) 2.5 µl/ 10 µl/ 200µl/ 1000 µl	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, D) oder Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Reaktionsgefäß (2 ml) mit Bulk Beads (2.8 mm, Zirkonoxid)	Peqlab (Erlangen, D)
Reaktionsgefäß, Easy-Cap, steril, 0.5 ml/ 1.5 ml	Omnilab GmbH & Co. KG (Bremen, D)
Reaktionsgefäß, Safe-Lock, steril, 1.5 ml/ 2 ml	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Selektionssäulen, LS Column	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Zellsieb, Falcon® 40 µm/ 100 µm	Corning Inc. Life Sciences (Schiphol-Rijk, NL)
Zentrifugenröhrchen, konisch, 15ml/ 50ml	Corning Inc. Life Sciences (Schiphol-Rijk, NL)/ Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, D)/ Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Ö)

Tabelle 2 – Verbrauchsmaterialien

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Artikel	Hersteller
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Ampicillin	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)
Bacto™ Agar	BD Bioscience (Heidelberg D)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)
Chromogenes Substrat , Chromogenix S-2302	Diapharma Group, Inc. (West Chester, USA)
Dade® Innovin® (TF)	Siemens Healthcare GmbH (Erlangen, D)
Dimethylsulfoxide (DMSO) für Zellkultur	PAN Biotech GmbH (Aidenbach, D)
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
DNAse I	Roche Holding (Basel, CH)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), steril	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)
EDTA	Sigma-Aldrich GmbH (St. Louis, USA)
Eindeckmedium mit DAPI, Fluoroshield	Abcam plc (Cambridge, UK)
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Fentanyl	CuraMed Pharma GmbH (München, D)
Fibrinogen aus Humanplasma, 50-70% Protein	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)
FITC-Dextran 2000 kDa	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)
fötales Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Gibco™ RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™-I	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)

HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Isofluran CP 1 ml/ml	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH (Burgdorf, D)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Kalziumchlorid-Dihydrat CaCl ₂ 2H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Kaolin	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)
Kollagenase (Liberase™)	Roche Holding (Basel, CH)
Kryoeibettmedium, O.C.T Tissue Tek® Compound	Sakura Finetek Germany GmbH (Umkirch, D)
LPS, E. Coli O111:B4	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)
Medetomidin	KG Pfizer (Karlsruhe, D)
Midazolam	Ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Natriumcitrat-Trihydrat (CH ₃ COO 3H ₂ O)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ H ₂ O)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)
Natronhydroxid (NaOH)-Plättchen	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)
Rivaroxaban	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, USA)
Roti® Histol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Salzsäure 37 %, reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Succrose	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)

TCL-Puffer, 2X	Quiagen N. V. (Hilden, D)
Thrombin aus Humanplasma	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)
Tris-Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Tris-HCl (C ₄ H ₁₁ NO ₃ HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Triton™ X-100	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Trypanblau	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Tween 20	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)
Viabilitätsfarbstoff, eFluor™ 780, fixierbar	eBioscience™, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Viabilitätsfarbstoff, SYTOX™ Orange Dead Cell Stain	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Zellmarker, CellTracker™ Red CMTPX Dye	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Ziegenserum	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)
ZnCl ₂	AppliChem (Darmstadt, D)

Tabelle 3 – Chemikalien und Reagenzien

2.4 Hergestellte Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Rezeptur	
4% PFA-Lösung, neutral-gepufferte (1:1, 8% PFA und 0.2 M Phosphat-Puffer)	8% PFA (w/v)	Na ₂ HPO ₄ 10.9g
		NaH ₂ PO ₄ 3.2g
	in 0.5l dest. H ₂ O	in 0.5l dest. H ₂ O, pH 7.4
Erythrozyten-Lysepuffer	150 mM NH ₄ Cl	
	10 mM KHCO ₃	
	0.1 mM EDTA	
	in 1l dest. H ₂ O, pH 7.4	
FACS-Puffer	0.5% BSA (w/v)	
	2mM EDTA	
	in 1l sterilem PBS, pH 7.4	

1X PBS	NaCl 8g
	KH ₂ PO ₄ 0,2g
	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O 1,42g
	KCl 0,2g
	in 1l sterilem PBS, pH 7.4
Reaktionspuffer	20 mM HEPES
	100 mM NaCl
	in 1l dest. H ₂ O, pH 7.4
1X TBS	Tris-Base 2.4g
	88g NaCl
	in 1l dest. H ₂ O, pH 7.4
Tris-EDTA-Puffer	10 mM Tris-Base
	1 mM EDTA
	0,05% Tween 20
	in 1l dest. H ₂ O, pH 9

Tabelle 4 – Hergestellte Puffer und Lösungen

2.5 Verwendete Kits

Artikel	Hersteller
Antibody Labeling Kit mit Alexa Fluor™	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
CD115 MicroBead Kit (Maus) 130-096-354	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD4 ⁺ T-Zell Isolationskit (Maus) 130-104-454	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

Tabelle 5 - Verwendete Kits

2.6 Verwendete Antikörper

Antikörper (Wirt)	Klon/ Immunogen, Wirt	Hersteller	Verwendung
αCX3CR1	SA011F11, Maus	Biolegend (San Diego, USA)	FACS-Sorting
αBCL6	Ag15519, Kaninchen	Proteintech Group (Rosemont, USA)	IHC, prim. AK.
αBSA	polyklonal, Kaninchen	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA (Darmstadt, D)	IK

α CD101	REA301, rek. Human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)	FACS-Analyse
α CD115 (c-fms)	AF598, Ratte	eBioscience™, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	IHC, prim. AK
α CD117	3C11, Ratte	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)	FACS-Analyse
α CD11b	M1/70, Ratte	Biolegend (San Diego, USA)	FACS-Analyse
α CD16/32	2.4G-2, Ratte	BD Bioscience (Heidelberg D)	Tierversuch
α CD19	6D5, Ratte	Southern Biotech (Birmingham, USA)	IHC, prim. AK
α CD31, α Maus	Ag27828, Kaninchen	Proteintech Group (Rosemont, USA)	IHC, prim. AK.
α CD31, α Maus	IC/70A, Maus	Abcam plc (Cambridge, UK)	IHC, prim. AK
α CD38	38C03, Maus	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	IHC, prim. AK
α CD4	GK1.5, Ratte	Biolegend (San Diego, USA)	Tierversuch
α CD4	GK1.5, Ratte	Biorbyt (Cambridge, UK)	IHC, prim. AK.
α CD4, α Maus/ Human	polyklonal, Kaninchen	Bioss Antibodies (Woburn, USA)	IHC, prim. AK
α CD42b	polyklonal, Kaninchen	Proteintech Group (Rosemont, USA)	IHC, prim. AK
α CD45	REA737, rek. Human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)	FACS-Analyse
α CD5	53-7.3, Ratte	eBioscience™, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	IHC, prim. AK
α CD69	polyklonal, Ziege	R & D Systems (Minneapolis, USA)	IHC, prim. AK
α CD8a	53-6.7, Ratte	eBioscience™, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	IHC, prim. AK
α citH3, citrulline R2+R8+R17)	polyklonal, Kaninchen	Abcam plc (Cambridge, UK)	IHC, prim. AK.
α CX3CR1	polyklonal, Kaninchen	Abcam plc (Cambridge, UK)	IHC, prim. AK
α CXCR4	L276F12, Ratte	Biolegend (San Diego, USA)	FACS-Analyse
α CXCR5	C1C2, Kaninchen	GeneTex (Irvine, USA)	IHC, prim. AK
α F4/80	BM8, Ratte	Biolegend (San Diego, USA)	IHC, prim. AK.

αFibrin (IIβ-Kette), αMaus/ Human	NYB T2G1, Maus	WAK-Chemie Medical GmbH (Steinbach, Germany)	IHC, prim. AK
αFibrin-β, αHuman	monoklonal, Maus	Loxo GmbH (Dossenheim D)	IHC, prim. AK.
αFOXP3	Ag17571, Kaninchen	Proteintech Group (Rosemont, USA)	IHC, prim. AK
αGATA3	1A12-1D9, Maus	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	IHC, prim. AK
αIgG1bk	monoklonal, Maus	Prof. Paul Declerck (Laboratory for Therapeutic and Diagnostic Antibodies, KU Leuven, B)	Tierversuch
αIgG2ak	monoklonal, Ratte	BioXcell (Lebanon, USA)	Tierversuch
αIgG2bk	monoklonal, Ratte	Biolegend (San Diego, USA)	Tierversuch
αIL-2	polyklonal, Kaninchen	Abcam plc (Cambridge, UK)	IHC, prim. AK
αKaninchen IgG, Alexa Fluor™ 488/ 546/ 594/ 647	polyklonal, Ziege	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	IHC, sek. AK
αLFA-1	M17/4, Ratte	BioXcell (Lebanon, USA)	Tierversuch
αLPS (<i>E. coli</i> O157)	polyklonal, Ziege	GeneTex (Irvine, USA)	IHC, prim. AK.
αLy6C	ER-MP20, Ratte	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	IHC, prim. AK
αLy6G	REA526, rek. Human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)	FACS-Sorting
αLy6G	1A8, Ratte	Biolegend (San Diego, USA)	FACS-Analyse/ IHC, prim. AK
αMaus IgG, Alexa Fluor™ 488/ 555/ 594/ 647	polyklonal, Ziege	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	IHC, sek. AK
αMPO, αMaus/ Human	polyklonal, Kaninchen	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	IHC, prim. AK
αPAI-1	MA-33H1F7, Maus	Prof. Paul Declerck (Laboratory for Therapeutic and Diagnostic Antibodies, KU Leuven, B)	Tierversuch
αPAI-1, αMaus/ Human	Ag22411, Maus	Proteintech Group (Rosemont, USA)	IHC, prim. AK
αPD1	Ag12470, Maus	Proteintech Group (Rosemont, USA)	IHC, prim. AK
αRatte IgG, Alexa Fluor™ 488/ 546/ 594/ 647	polyklonal, Ziege	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	IHC, sek. AK
αRORγT	polyklonal, Kaninchen	Biorbyt (Cambridge, UK)	IHC, prim. AK.

α Stabilin-2	#34-2, Ratte	MBL International (Woburn; USA)	IHC, prim. AK
α Tbet (Tbx21)	AA160-399, Kaninchen	Antikoerper-online.de (Aachen, D)	IHC, prim. AK
α uPA, α Maus/ Human	Ag11813, Kaninchen	Proteintech Group (Rosemont, USA)	IHC, prim. AK
α Ziege IgG, Alexa Fluor™ 488/ 555/ 594	polyklonal, Esel	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	IHC, sek. AK

Tabelle 6 – Verwendete Antikörper

Abkürzungen: FACS: ‚flow cytometry‘, Durchflusszytometrie

III. Methoden

3.1. Tiermodelle und Tierversuche

3.1.1. Infektionsmodell

Um die Immunantwort auf eine systemische bakterielle Infektion in Mäusen zu untersuchen, wurden diese mit dem Gram-negativen Bakterienstamm *E. coli*, dem Gram-positiven Bakterienstamm *S. pneumoniae* oder mit LPS infiziert.

Hierfür wurden *E. coli* des Stamms DH5 α (ohne oder mit Plasmid mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) und Ampicillin-Resistenz) über Nacht bis zur späten log-Phase in LB-Medium (mit 100 μ g/ml Ampicillin) bei 37°C unter konstantem Schütteln kultiviert. Alternativ wurden der *E. coli* Stamm DH5 α ohne GFP-Plasmid verwendet. Anschließend wurden die Bakterien 2-mal mit steriler Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphat buffered saline“, PBS) bei Raumtemperatur (RT) gewaschen (2700 g, 5 Minuten) und die optische Dichte gemessen, um die Bakterienzahl zu bestimmen ($OD_{600} \approx 1 \times 10^9$ KBE/ml).

S. pneumoniae (Stamm D39gfp, Serotyp 2, pMV158GFP) wurde uns von Prof. Uwe Ködel (Neurologische Klinik und Poliklinik, LMU Klinikum) zur Verfügung gestellt. *S. pneumoniae* wurde in DMEM GlutaMAX™ Medium mit hohem Glukosegehalt, 10% hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum (FBS) und 0,5 g/ml Tetracyclin kultiviert. Das bakterielle Inokulum wurde für jede Charge durch quantitative Ausplattierung von Bakterien auf Schafsblut-Agarplatten bestimmt, anschließend wurden die Bakterien bis zum Versuchsbeginn eingefroren.

LPS des *E. coli* Stamms O111:B4 wurde als lyophilisiertes Pulver in sterilem Wasser gelöst (5 mg/ml) und mit sterilem PBS weiter verdünnt.

3.1.2 Tierversuchsvorhaben

Für die vorliegende Arbeit wurde als Modellorganismus die Hausmaus (*Mus musculus*) gewählt, welche dem Menschen zu 95% genetisch ähnelt¹⁰⁰. Weitere Vorteile in diesem Modellorganismus bestehen in der raschen Generationenfolge, der einfachen Händelbarkeit des Tieres und der Verwendung von Inzuchtlinien, sodass die natürliche biologische Varianz innerhalb einer Versuchsgruppe äußerst gering ist¹⁰⁰. Der Großteil der tierexperimentellen Untersuchungen wurde am Wildtypstamm C57BL/6J durchgeführt. Für die Versuche wurden sowohl junge Tiere von 8 - 14 Wochen verwendet (Charles River), als auch alte Tiere von 22 Monaten, die der Zucht von Dr. Daniela Vogt-Weisenhorn (Institute of Developmental Genetics, Helmholtz Zentrum München) entstammen.

Um den Einfluss von nicht-klassischen Monozyten auf den Verlauf von Immunothrombosen zu untersuchen, wurden Nur77^{-/-} Mäuse verwendet¹⁰¹. Die Tiere entstammten sowohl der Zucht von Prof. Heinz Wiendl, Institut für Translationale Neurologie, Universitätsklinikum Münster, als auch der Zucht

von Prof. Anxo Vidal Figueroa des „The Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CiMUS)“ in Santiago de Compostela, Spanien. Bei diesen Mäusen kommt es auf Grund des Mangels an Transkriptionsfaktor Nr4a1 zu einer unvollständigen Differenzierung der Monozyten und damit zu einem Fehlen von nicht-klassischen Monozyten in der Zirkulation¹⁰².

Die Haltung der Tiere erfolgte unter den erforderlichen speziellen Hygienebedingungen in dafür eingerichteten Räumen. Die Mäuse wurden in Gruppen von bis zu 5 Tieren in individuell ventilierten Käfigen oder Käfigschränken mit dualtem Belüftungssystem gehalten. Die Fütterung und Trinkwasserversorgung erfolgte ad libitum. Nest- und Spielmaterial stand frei zur Verfügung. Der Hell-Dunkel-Rhythmus betrug zwölf Stunden, zusätzlich wurde Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit konstant gehalten. Alle durchgeführten Tierversuchsvorhaben waren zuvor von der Regierung von Oberbayern genehmigt worden (Aktenzeichen ROB-55.2-2532.Vet_02-15-42, ROB-55-2-2532.Vet_02-20-133).

3.1.3 Vorbehandlung der Tiere

Infektion

Um die Bedeutung verschiedener Immunzellen für die Immunothrombose im Rahmen einer bakteriellen Infektion zu charakterisieren, wurde den Mäusen über die Schwanzvene *E. coli* oder *S. pneumoniae* injiziert. Dabei wurde die bakterielle Dosis so gewählt, dass eine systemische Infektion mit mittelgradiger Belastung erzielt wurde ohne bleibende Schäden zu hinterlassen. Dies ermöglicht es die physiologische Immunantwort untersuchen zu können. Für junge Mäuse wurde eine Dosis von 3.2×10^8 koloniebildenden Einheiten (KBE) *E. coli* eingesetzt, bei alten Mäusen eine Dosis von 2.95×10^8 KBE. Für die immunohistochemischen Untersuchungen wurde den Tieren GFP-markierte *E. coli* injiziert, für die Multiphotonen-Mikroskopie oder durchflusszytometrische Untersuchungen („flow cytometry“, FACS) *E. coli* ohne Fluoreszenz-Markierung. Für die *S. pneumoniae* Infektion wurde bei jungen Tieren eine Dosis von 1×10^8 KBE verabreicht und bei alten Tieren eine Dosis von 6.5×10^7 KBE. Die Applikation der Pathogene erfolgte via Schwanzvenenkatheter am wachen Tier: Dazu wurden die Tiere kurzzeitig in einem Restraîner fixiert, der Schwanz an der Schwanzwurzel gestaut und die zu applizierende Substanz über eine 30G Kanüle, welche über einen elastischen Polyethylenschlauch mit einer Spritze verbunden war, in die Vena coccygea lateralis injiziert (i. v.). LPS wurde den Tieren in einer Konzentration von 3 µg/g Körpergewicht (KG) mit PBS verdünnt intraperitoneal (i. p.) injiziert, während das Tier mit Hilfe des Nackengriffs fixiert worden war. Im Anschluss an die Applikation wurden die Tiere zurück in den Käfig zu ihren Artgenossen gesetzt, wo sie bis zum Versuchsende verblieben. Die Injektionen sind mit einer geringen Belastung für das Versuchstier verbunden, bei der Infektion selbst handelt es sich um eine mittelgradige Belastung.

Behandlung

In Tabelle 7 sind die verschiedenen Behandlungen der Mäuse aufgelistet. Rivaroxaban verhindert die Bildung von Faktor Xa und blockiert damit sowohl die intrinsische als auch extrinsische Gerinnungskaskade¹⁰³. Vor der Behandlung wurde Rivaroxaban in der Konzentration von 2mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die intravenöse Injektion des gelösten Rivaroxabans erfolgte anschließend mit Hilfe von sterilem PBS. Die Antikörper wurden in Konservierungsmittel-freien, Azid-freien und neutral-gepufferten PBS-Lösungen ohne Stabilisatoren gelöst. Die Herstellung der Alexa Fluor™-IK wird unter 3.8.3 beschrieben. Zum Spülen der Katheter während der intravenösen Injektion wurde steriles PBS verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass für das jeweilige Gewicht des Tieres zugelassene Volumenmaximum bei der Injektion nicht überschritten wurde. Die Behandlung selbst und deren Wirkungsweise stellt für das Tier eine geringe Belastung dar.

Substanz/ Antikörper	Dosis	Zeitpunkt	Wirkung	Kontrolle
Alexa Fluor™ -IK	550 µg/ Tier	4 h nach Infektion	Immunstimulation	-
αCD16/32	8 mg/kg KG, i. v. in PBS	2.5 h nach Infektion	Blockade von FcγII und III	αIgG2bκ (Ratte)
αCD4	500 µg/ Tier, i. p.	24 h vor Infektion	Depletion der CD4 ⁺ T-Zellen	αIgG2bκ (Ratte)
αLFA-1	100 µg/Tier, i. v. in PBS	5 min vor Infektion	Neutralisation von LFA-1	αIgG2aκ (Ratte)
αPAI-1	5 mg/kg KG, i. v. in PBS	5 min vor Infektion	Neutralisation von PAI-1	αIgG1bκ (Maus)
Rivaroxaban	3 mg/kg KG, i. v. in Vehikel-Lsg.	4 h vor Infektion	Inhibierung von Faktor Xa	Vehikel-Lsg. (DMSO/PBS)

Tabelle 7 – Übersicht über die Behandlung der Mäuse mit Antikörpern oder Substanzen

Für den adoptiven Transfer von nicht-klassischen Monozyten oder CD4⁺-T-Zellen wurden diese aus Spendermäusen isoliert und anschließend intravenös in die Empfängermaus injiziert (Beschreibung unter 3.2.3 und 3.2.4).

Zellen	Dosis	Zeitpunkt	Farbstoff
CD4 ⁺ -T-Zellen	2.5 Mio Zellen, i. v. in PBS	10 min nach Infektion	CMPTX
nicht-klassische Monozyten	400,000 Zellen, i. v. in PBS	4 h nach Infektion	-

Tabelle 8 – Übersicht über den adoptiven Transfer von Immunzellen in Empfängerermäuse

3.1.4 Beschreibung des Versuchsablaufs

Versuchsablauf für immunohistochemische oder durchflusszytometrische Untersuchungen

Die Euthanasie der Tiere wurde 3, 6, 8 oder 18 Stunden nach Infektionsbeginn durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere durch kurzzeitige Inhalation von 5.0 Vol.% Isofluran in der Induktionskammer (inspiratorische Sauerstofffraktion von 0.35 l/l) vorübergehend narkotisiert. Anschließend erfolgte die i. p. Injektion der Tripelnarkose MMF bestehend aus Midazolam (5.0 mg/kg KG), Medetomidin (0.5 mg/kg KG) und Fentanyl (0.05 mg/kg KG), welche die Maus in eine tiefe Narkose unter Schmerzausschaltung versetzte. Selbstständiges Atmen war jedoch trotz Muskelrelaxans weiterhin möglich. Erst nach ausreichender Narkosetiefe (Überprüfung mittels Zwischenzehreflex) wurde kardial Blut entzogen und die Maus durch zervikale Dislokation getötet.

Versuchsablauf für 4D-Visualisierungen

Die mittels Isofluran-Inhalationsnarkose narkotisierte Maus, wurde durch i. p. Injektion von MMF in eine tiefe Narkose unter Schmerzausschaltung versetzt. Nach Überprüfung der Narkosetiefe wurde die Maus auf die beheizbare Platte platziert und der Schwanzvenenkatheter gelegt, um das FITC-Dextran zur Visualisierung des Blutflusses zu injizieren. Anschließend erfolgte die Präparation der Leber für das Imaging. Hierzu wurde die Maus in Rückenlage fixiert. Nach Desinfektion der Körperoberfläche erfolgte ein kleiner Hautschnitt, um die Haut oberhalb der Leber zu öffnen. Ein Teil des sich an oberster Stelle befindlichen Leberlappens wurde freipräpariert und mittels Saugring und durch die angeschlossene Absaugpumpe erzeugten Unterdruck fixiert.

Anschließend erfolgte die 4D-Visualisierung der Lebermikrozirkulation mittels Multiphotonen-Mikroskopie, während die Maus in physiologischen Zustand verblieb und stabil in Narkose lag. Dabei wurde die Körpertemperatur des Tieres konstant aufrechterhalten.

3.2 Probenentnahme aus der Maus

3.2.1 Organentnahme und Blutaufbereitung

Aus dem euthanasierten Tier wurden die Organe für weiterführende Untersuchungen entnommen.

Die für immunohistochemische (IHC) Untersuchungen vorgesehenen Leberlappen wurden mit neutral-gepufferter 4% Paraformaldehyd (PFA)-Lösung für eine Stunde bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Organe zum Schutz vor Gefrierbrüchen in 15% Saccharose-Lösung gegeben und nach vollständiger Durchtränkung in eine 30% Saccharose-Lösung überführt. Waren die Leberlappen zu Boden gesunken, wurden diese als Gewebestücke mit Hilfe von Trockeneis in Tissue-Tek®-gefüllten Kryoeinbettformen schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Sollten Zellen für durchflusszytometrische Analysen oder für Spendertiere isoliert werden, wurden die Organe nach Entnahme unverzüglich in zuvor hergestelltem FACS-Puffer auf Eis gestellt (siehe 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4).

Zur Verhinderung der Blutgerinnung bei der Blutentnahme wurden die 2ml – Spritzen mit dem Antikoagulans Natriumcitrat (129 mmol/l; Verhältnis 1:10 zu Blut) versehen. Anschließend erfolgte der erste Zentrifugationsschritt (150 g, 20 min, RT), wodurch sich das Blut von unten nach oben in die Schicht aus Erythrozyten, anschließend den Buffy Coat, d.h. der Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten, und abschließend dem Thrombozyten-reichen Plasma (PRP) auftrennt. Das PRP konnte nun vorsichtig mit der Pipette abgesaugt werden, wobei die darunter liegenden Schichten nicht zerstört werden durften. Mit Hilfe eines erneuten Zentrifugationsschritt (180 g, 2 min, RT) konnten eventuelle Verunreinigungen durch verbliebene Zellen entfernt werden. Bei Bedarf konnte aus dem PRP durch Entfernung der Thrombozyten auch das Thrombozyten-arme Plasma (PPP) hergestellt werden. Hierfür wurde das PRP bei 1800 g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Um die Leukozyten zu isolieren, wurde die Erythrozytenschicht zusammen mit der Buffy Coat-Schicht bei 300 g für 5 Minuten, Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet anschließend in eiskaltem Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Durch anschließende Zugabe von mindestens der 5-fachen Menge PBS konnte die Lyse gestoppt werden.

3.2.2 Isolierung von Neutrophilen aus Lunge und Leber

Die Freisetzung von Neutrophilen aus dem Knochenmark erfolgt bei tagaktiven Individuen wie dem Menschen am Morgen und bei nachtaktiven Tieren wie der Maus am Abend. Am Ende des Tages bzw. der Nacht werden die gealterten Neutrophilen im Knochenmark oder in anderen Organen durch Phagozytose aus dem Blutkreislauf entfernt. Auf Grund dessen erfolgte die Tötung der Tiere stets um 9.00 Uhr morgens. Zu diesem Zeitpunkt sollten in gesunden Tieren etwas mehr „frische“ als „alte“ Neutrophile im Blutkreislauf vorhanden sein⁶².

Die Leber wurde in eisgekühltes RPMI-Medium überführt und behutsam in sehr kleine Stücke geschnitten (ca. 0.5 x 0.5 cm). Anschließend wurden die Gewebestücke mit Hilfe eines Spritzenstempels sanft durch ein 100 µm Zellsieb filtriert während durchgehend mit eiskaltem FACS-Puffer gespült wurde. Schließlich wurde die Zellsuspension mit einem 40 µm Zellsieb gefiltert, um Zellaggregate und Zelltrümmer zu entfernen und im Anschluss pelletiert (350 g, 5 min, 8°C). Das Zellpellet wurde in auf 4°C-gekühltem Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für eine Minute inkubiert. Anschließend wurde die Lyse durch Zugabe von mindestens der 5-fachen Menge an FACS-Puffer gestoppt. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 42 g für 3 Minuten bei 8°C um die Hepatozyten von den Leukozyten zu trennen. Anschließend wurde der Überstand mit den Leukozyten entnommen und auf Eis gestellt, das Zellpellet mit den Hepatozyten wurde verworfen.

Die Lunge wurde ebenfalls in eisgekühltes RPMI-Medium überführt und behutsam in sehr kleine Stücke geschnitten. Anschließend wurden die Gewebestücke mit einer Verdaulösung (1M HEPES, 5% FBS, DNase I (100 µg/ml), Kollagenase (Liberase™, 80 µg/ml) in RPMI) für 45 Minuten im 37°C-Wasserbad inkubiert. Dabei wurde das Reaktionsgefäß mit den Gewebestücken und der Verdaulösung etwa alle 10 - 15 Minuten gevortext. Anschließend wurden die Gewebestücke sanft mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein 100 µm Zellsieb filtriert, dabei erfolgte permanentes Spülen mit eiskaltem FACS-Puffer. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe eines 40 µm Zellsiebes gefiltert und im Anschluss zentrifugiert (350 g, 5 min, 8°C). Schließlich wurde das Pellet in eisgekühltem Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für eine Minute inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von mindestens der 5-fachen Menge an FACS-Puffer gestoppt und erneut gewaschen (350 g, 5 min, 8°C).

3.2.3 Isolierung und Aktivierung von nicht-klassischen Monozyten und Aktivierung

Nicht-klassische Monozyten wurden aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark von *E. coli*-infizierten Spendertieren isoliert. Hierfür wurde das Blut wie unter 3.2.1 beschrieben aufbereitet.

Die Milz wurde mit Hilfe eines Spritzenstempels behutsam durch ein 70 µm Zellsieb filtriert, dabei wurde durchgehend mit eiskaltem FACS-Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (450 g, 5 min, 8°C) und das Zellpellet in eisgekühltem Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Lyse durch Zugabe von mindestens der 5-fachen Menge an FACS-Puffer gestoppt. Mittels eines 70 µm Zellsiebs wurden Zellaggregate und Zelltrümmer entfernt. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen (450 g, 5 min, 8°C).

Um die nicht-klassischen Monozyten aus dem Knochenmark zu isolieren wurden die Extremitäten mittels kräftigen Ziehens aus den Gelenken luxiert und das Fell/Haut entfernt. Nachfolgend wurden die Extremitäten gelenknah von der Schulter bzw. der Hüfte abgetrennt und das Weichgewebe vom Knochen mit dem Skalpell entfernt. Zusätzlich wurden die Wirbelsäule und das Sternum entnommen

und ebenfalls gereinigt. Nun wurden die Knochen der geopfert Maus mit 70% Ethanol gereinigt. Mit dem Skalpell wurden Femur und Tibia, sowie Humerus und Brachium abgetrennt, wobei die Knochen nicht beschädigt werden durften. Die gereinigten Knochen wurden jeweils sofort in steriles PBS auf Eis gelegt. Knochen, die nicht beschädigt worden waren, wurden zusätzlich mit 70% Ethanol desinfiziert. Danach wurden die Knochen in eine Petrischale mit sterilem PBS gelegt und die beiden Epiphysen abgetrennt, sodass das Mark mit Hilfe einer 26G Kanüle und sterilem PBS (mit 2% FBS) in eine weitere Petrischale gespült werden konnte. Die Wirbelsäule und das Sternum wurden in eine Petrischale mit sterilem PBS (mit 2% FBS) platziert und mit Hilfe eines Spritzenstempels gemörsert. Nachfolgend wurden die Zellsuspensionen mit Hilfe einer 30G Kanüle und einer Spritze resuspendiert und im Anschluss mit Hilfe eines 40 µm Zellsiebs unter andauernden Spülen mit PBS (mit 2% FBS) weiter aufgereinigt. Die Zellsuspensionen wurden schließlich bei 400 g für 7 Minuten bei 4°C pelletiert und in Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Nach 3-minütiger Inkubation wurde die Reaktion mit mindestens der 5-fachen Menge an FACS-Puffer gestoppt und erneut gewaschen (400 g, 7 min, 4°C). Mittels Neubauer-Zählkammer und Trypton-Blau wurden die Zellen gezählt, auf ihre Viabilität untersucht, und anschließend mit Hilfe von CD115 MicroBeads in einer MACS® Zellseparierung gemäß Protokoll positiv selektioniert.

Anschließend wurden die Zellen erneut gezählt, auf 1 Mio. Zellen/ 100 µl FACS-Puffer verdünnt und mit den Antikörpern αLy6C-APC (1:50) und αCX3CR1-FITC (1:800) für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Vor der durchflusszytometrischen Zellsortierung wurde mit dem Viabilitätsmarker Sytox™ Orange gefärbt und anschließend die Zellen anhand ihrer Größe und Granularität, sowie mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffmarkierungen nach viablen CX3CR1⁺ Ly6C^{/schwach} Zellen sortiert. Anschließend wurden die Zellen 2-mal gewaschen (400 g, 8 min, RT) und in sterilem PBS für die Injektion gelöst.

3.2.4 Isolation von T-Helferzellen aus der Milz und Farbstoffmarkierung

Die Isolation der Zellen aus der Milz nicht-infizierter Spendertieren erfolgte wie unter 3.2.3 beschrieben. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Neubauer-Zählkammer und Trypton-Blau gezählt und mit Hilfe der MACS® Zellseparierung und dem CD4⁺ T-Zell Isolationskit für Milz und Lymphknoten gemäß Protokoll negativ selektioniert.

Zur späteren Visualisierung der isolierten CD4⁺ T-Zellen im Multiphotonen-Mikroskop wurden die Zellen mit 10 µM CMTPX für 20 Minuten bei 37°C in befeuchteter Atmosphäre rot angefärbt. Im Anschluss wurden die CD4⁺ T-Zellen 2-mal gewaschen (450 g, 5 min, 8°C) und mittels Neubauer Zählkammer gezählt.

3.3 Humane Proben

Die humanen Lungenproben stammten von Autopsien von Patienten mit ARDS welche an oder im Rahmen der Infektion mit dem Influenzavirus bzw. SARS-CoV-2 verstorben waren (Influenzavirus: 3 Frauen, 3 Männer; SARS-CoV-2: 3 Frauen, 4 Männer). Das Durchschnittsalter betrug $72.0 \pm 4,4$ Jahre bei den Influenza-Patienten, $76.1 \pm 4,2$ Jahre bei den SARS-CoV-2-Patienten. Alle Untersuchungen wurden von den lokalen Ethikkommissionen genehmigt (Medizinische Fakultät der Justus-Liebig-Universität: 29/01 und Medizinische Universität Graz: 32-362ex19/20).

3.4. Färbungen von Zellen oder Geweben

3.4.1 Färbungen der Zellen für durchflusszytometrische Analysen

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden die Zellisolate mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und im Verhältnis 1 Mio. Zellen/ 100 μ l FACS-Puffer verdünnt. Anschließend wurden die Zellen mit dem fixierbaren Viabilitätsstoff eFluor™ 780 (1:5000) für 30 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend 3-mal gewaschen (400 g, 5 min, 4°C). Die Zellen wurden erneut im Verhältnis 1 Mio. Zellen/ 100 μ l FACS-Puffer verdünnt und 20 Minuten bei 4°C mit den folgenden Antikörpern inkubiert (Tabelle 9):

Antikörper	Fluorophor	Konzentration	Hersteller
α CD101	PE-Vio770	1:100	Miltenyi
α CD117	PE	1:100	Miltenyi
α CD11b	FITC	1:200	Biolegend
α CD45	VioGreen	1:100	Miltenyi
α CXCR4	Brilliant Violet 421	1:100	Biolegend
α Ly6G	APC	1:300	Biolegend

Tabelle 9 – Übersicht über verwendete Antikörper für durchflusszytometrische Untersuchungen an Neutrophilen

3.4.2 Immunohistochemische Färbungen von Kryoschnitten (Maus)

Mit Hilfe des Kryotoms wurden bei -15°C aus den mit Tissue-Tek® bedeckten Leberstücken Gewebeschnitte von 10 µm Dicke angefertigt. Anschließend wurden die Objektträger aufgetaut und das flüssige Tissue-Tek durch 3-minütiges Waschen in einer Küvette mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung plus 0.1 % Tween-20 (TBS-T) entfernt und anschließend mit 2% BSA in TBS-T für 40 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. War eine Permeabilisierung der Membran nötig, wurde der Blockierungslösung 0,1%-0,3% Triton-X 100 zugesetzt.

Erneut folgten 3 Waschschritte für je 3 Minuten in TBS-T, wonach die Gewebeschnitte mit primären Antikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in TBS-T inkubiert wurden (siehe Tabelle 10). Bei Verwendung von primären Antikörpern mit gleichem Wirt wurden entweder die Antikörper mit Hilfe eines ‚Antibody Labeling Kit‘ mit Alexa Fluor™ Fluoreszenzfarbstoffen nach Herstellerangaben direkt markiert oder kommerziell erhältliche, bereits primär-markierte Antikörper verwendet. Alternativ wurde teilweise dazwischen mit dem den Wirt entsprechendem Serum blockiert (5% Wirtsserum, 2% BSA in TBS-T, 1h RT).

Die primären Antikörper, die nicht bereits mit Fluoreszenzfarbstoff markiert waren, wurden erneut gewaschen (3 x 3 min mit TBS-T) und anschließend mit den sekundären Alexa Fluor™ Antikörpern (1:1000, AF488, AF546, AF555, AF594, AF647) entsprechend des Wirts des primären Antikörpers (Ratte, Kaninchen, Maus oder Ziege) für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Vor dem Eindecken wurden die Schnitte erneut gewaschen (3 x 3 min mit TBS-T). Als Eindeckmedium wurde ein Fluoroshield-Medium mit zugesetztem DAPI verwendet, um die Fluorophore vor dem Ausbleichen zu schützen und die Nuclei sichtbar zu machen.

Antikörper	Konzentration	Inkubation	Kombination mit...	Nachweis
αBCL6	1:200	über Nacht, 4°C	αCD4, αCXCR5	TfH-Zellen
αCD115	1:75	über Nacht, 4°C und 1h, RT	-	Monozyten
αCD19	1:200	über Nacht, 4°C	B-Zellen	B-Zellen
αCD31	1:50	über Nacht, 4°C und 1h, RT	-	Endothelzellen
αCD38	1:200	über Nacht, 4°C	αCD4	aktivierte T-Zellen
αCD4	1:150	über Nacht, 4°C und 1h, RT	-	CD4 ⁺ T-Zellen
αCD42b	1:200	über Nacht, 4°C	-	Thrombozyten

α CD5	1:200	über Nacht, 4°C	α CD19	B1a-Zellen
α CD69	1:400	über Nacht, 4°C	α CD4	aktivierte T-Zellen
α CD8a	1:100	über Nacht, 4°C	-	CD8 ⁺ T-Zellen
α citH3	1:100	über Nacht, 4°C/ 1h, RT	MPO	NETs
α CX3CR1	1:200	über Nacht, 4°C	α Ly6C	nicht-klassische Monozyten
α CXCR5	1:200	über Nacht, 4°C	α CD4, α BCL6	TfH-Zellen
α F4/80	1:300	über Nacht, 4°C	-	Makrophagen/ Kupfferzellen
α Fibrin (II β -Kette)	1:200	über Nacht, 4°C	-	Fibrin
α FOXP3	1:300	über Nacht, 4°C	α CD4	Treg-Zellen
α GATA3	1:200	über Nacht, 4°C	α CD4	Th2 -Zellen
α IL-2	1:400	über Nacht, 4°C	-	Interleukin-2
α LPS	1:700	über Nacht, 4°C	-	LPS von <i>E. coli</i>
α Ly6C	1:400	über Nacht, 4°C/ 1h, RT	α CD115	klassische/ n.-kl. Monozyten
α Ly6G	1:75	über Nacht, 4°C und 1h, RT	-	Neutrophile
α MPO	1:200	über Nacht, 4°C/ 1h, RT	-	Neutrophile
α PD1	1:100	über Nacht, 4°C	α CD4, α BCL6/ α CXCR5	TfH-Zellen
α ROR γ T	1:200	über Nacht, 4°C	α CD4	Th17-Zellen
α Stabilin-2	1:200	1h, RT	-	Leber-Sinusoide
α Tbet	1:100	über Nacht, 4°C	α CD4	Th1-Zellen
α uPA	1:100	über Nacht, 4°C	-	Urokinase-Plg.- Aktivator

Tabelle 10 – Übersicht über verwendete primäre Antikörper im Lebergewebe der Maus

3.4.3 Immunohistochemische Färbungen von Paraffinschnitten (Mensch)

3.4.3.a Deparaffinierung, Antigen-Demaskierung

Die Gewebeproben wurden uns von Prof. Malgorzata Wygrecka (Center for Infection and Genomics of the Lung (CIGL), Justus-Liebig-Universität, Gießen, Germany) für dieses Projekt freundlicherweise bereits als 3 µm breite Paraffinschnitte zur Verfügung gestellt.

Die Schnitte wurden 20 Minuten lang mit ROTI®Histol deparaffiniert und durch eine absteigende Ethanolreihe rehydriert (100%, 95%, 80%, 70%, 50%; jeweils 3 Minuten). Im Anschluss wurde die Küvette mit den Objektträgern unter fließendes kaltes Leitungswasser zum Abspülen gestellt.

Zwar ist die Fixierung für den Erhalt der Gewebemorphologie unerlässlich, doch bewirkt sie auch eine Quervernetzung der Proteine untereinander, sodass die gewünschten Epitope maskiert sind und von Antikörpern nicht mehr erkannt werden können. Nötig ist daher eine Demaskierung der Antigene, damit eine Antikörper-Antigen-Bindung wieder möglich wird. Die Antigen-Demaskierung erfolgte mit Tris-EDTA-Puffer für 7 Minuten bei vollem Druck in einem Schnellkochtopf. Anschließend wurde der Schnellkochtopf mit Hilfe von kaltem Leitungswasser gekühlt, geöffnet und 10 Minuten gespült.

3.4.3.b Blockierung und Färbung

Danach wurden die Schnitte mit Blockierlösung (2% BSA, 10% Ziegen Serum und 0,1% Tween-20 in TBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert und anschließend mit TBS-T gewaschen (3 x 3 min). Die Lungenproben wurden mit den primären Antikörpern in TBS-T oder TBS, wie im Falle vom αCD4-Antikörper, inkubiert (Details siehe Tabelle 11) und gewaschen (3 x 3 min mit TBS-T).

Antikörper	Konzentration	Inkubation	Nachweis von...
αCD31	1:100	über Nacht, 4°C und 1h, RT	Gefäßwände
αCD4	1:200	über Nacht, 4°C	CD4 ⁺ T-Zellen
αFibrin-β	1:100	über Nacht, 4°C und 1h, RT	Fibrin
αMPO	1:250	über Nacht, 4°C oder 1h, RT	Neutrophile
αPAI-1	1:75	über Nacht, 4°C und 1h, RT	Plg.-Aktivator-Inhibitor
αuPA	1:75	über Nacht, 4°C	Urokinase-Plg.-Aktivator

Tabelle 11 – Übersicht über verwendete primäre Antikörper in humanen Lungengewebe

Die Antikörper, die nicht bereits mit Fluoreszenzfarbstoff markiert waren, wurden mit sekundären Alexa Fluor™ Antikörpern aus der Ziege (1:1000) für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Vor dem Eindecken mit Fluoroshield-Medium mit DAPI wurden die Schnitte erneut gewaschen (3 x 3 min mit TBS-T).

3.4.3.c Strippen der Antikörper

Für das Entfernen der bereits gebundenen Antikörper wurde eine 2-ME/SDS-Stripping-Lösung verwendet (2% SDS (Natriumdodecylsulfat; w/v), 62.5 mM Tris-HCl, 0.8% β -Mercaptoethanol (2-ME) in bidest. Wasser, pH 6.8). 2-ME war nach Herstellung der Lösung und Einstellung des pHs zugegeben worden.

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden in der 2-ME/SDS-Stripping-Lösung für eine Stunde bei 50°C inkubiert und anschließend unter mehrfachen Pufferwechsel in TBS-T für mindestens 20 Minuten gewaschen.

3.5. Fluoreszenzfarbstoff-basierte Analysen

3.5.1 Durchflusszytometrische Analysen

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit Hilfe des Geräts BD LSR Fortessa, welches mit 5 Lasern der Nanometerlängen 355, 405, 488, 561, 640 bestückt ist, an der Core Facility „Flow Cytometry“ am Biomedizinischen Zentrum der LMU München durchgeführt. Die an den Antikörper gebundenen Fluorophore wurden folgendermaßen detektiert: Die Fluorophore Brilliant Violet 421 und VioGreen wurden jeweils mit dem 405nm-Laser und dem Bandbreitenfilter (BP-Filter) 450/40 bzw. 525/50 detektiert. Das Fluorophor FITC wurde mit dem 488 nm-Laser und dem BP-Filter 530/30 detektiert. Die Fluorophore PE und PE-Vio770 wurden dagegen mit dem 561 nm-Laser und jeweils den BP-Filtern 586/15 bzw. 780/60 detektiert. APC und eFluor™ 780 wurden beide mit dem Laser von 640 nm Wellenlänge und den BP-Filtern 670/14 bzw. 780/60 detektiert.

Da sich die Emissionsspektren der Fluorophore überlappen können und der zum Fluorophor zugehörige Filter auch jeweils zu einem geringeren Anteil Emissionen der anderen Fluorophore detektieren kann (Fluoreszenz-„Spillover“), ist es nötig den Fluoreszenz-"Spillover" zwischen den Detektoren mathematisch zu korrigieren. Dieser Prozess wird als Kompensation bezeichnet und mit Hilfe von Einzelfärbungen und FMO („full stained minus one“)-Färbungen durchgeführt.

Zellen wurden als neutrophile Granulozyten gezählt, wenn sie nach Auftrennung über den Forward- und Sideward-Scatter zur Gruppe der Granulozyten zugehörig identifiziert werden konnten, sowie vereinzelt vorlagen und als lebend detektiert werden konnten und positiv für die Marker CD45⁺,

CD11b⁺ und Ly6G^{+/medium} waren. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm Flowjo™ Version 10.8.1.

3.5.2 Konfokale Lasermikroskopie

Die Bildgebung der IHC-Färbungen erfolgte mittels konfokaler Lasermikroskopie. Hierfür wurde zum einen das LSM 510 META der Firma Zeiss mit den Lasern der Wellenlängen 488 nm, 546 nm, 594 nm und 647 nm verwendet, sowie das invertierte SP8X WLL-Mikroskop der Firma Leica, ausgestattet mit dem 405 nm-Laser, dem WLL2-Laser (470 - 670 nm) und dem akusto-optischem Strahlteiler der Core Facility „Bioimaging“ des Biomedizinischen Zentrums der LMU München. Die Bilder wurden mit einem 63x-Objektiv (Zeiss) bzw. 40x-Objektiv (Zeiss, Leica) aufgenommen.

Die Aufnahmen erfolgten sequenziell, um ein Ausbluten in die anderen Kanäle zu vermeiden. Im Falle des Leica-Mikroskops wurden zur Detektion neben den herkömmlichen Photomultiplier-Röhren (PMTs) auch Hybridphotodetektoren verwendet.

3.5.3 Multiphotonen-Mikroskopie

Für die intravitale 4D-Bildgebung wurde das Multiphotonen-Mikroskop TrimScope II von LaVision BioTec verwendet, welches mit einem Ti:Sa-Laser Chameleon Ultra II (Laserklasse 4) von Coherent ausgestattet ist, der im Bereich zwischen 690 bis 1040 nm verwendbar ist. Zusätzlich ist ein aufrechtes Fluoreszenzmikroskop angeschlossen. Für die Aufnahmen wurde eine Anregungswellenlänge von 800 nm verwendet und die Emission mit hochempfindlichen GaAsP-Detektoren (Galliumarsenidphosphid) für die Einzelstrahlabtastung und einem zusätzlichen PMT detektiert. Die Einzelbilder wurden in einer Tiefe von 20 bis 30 µm mit jeweils Z-Intervallen von 2 µm aufgenommen. Als Erfassungssoftware wurde ImSpector Pro (LaVision Biotec) verwendet.

3.6. Immunohistochemische Quantifizierungen

3.6.1 Quantifizierung in der Leber (Maus)

Immunzellen wurden mit Hilfe der Antikörperfärbungen bestimmt (3.4.2). Sofern nicht anderweitig beschrieben, wurden nur intravaskuläre Immunzellen in der Leber analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Zellen jeweils über die Expression der Transkriptionsfaktoren „T-box expressed in T cells“ (Tbet), „GATA Binding Protein 3“ (GATA3), „RAR-related orphan receptor gamma“ (RORγT) bzw. „forkhead box P3“ (FOXP3) definiert. Die Tfh-Zellen wurden dagegen über den Transkriptionsfaktor „B-cell lymphoma 6“ (BCL6) und die Rezeptoren „CXC-

Motiv-Chemokinrezeptor 5“ (CXCR5) und „programmiertes Zelltodprotein 1“ (PD1) bestimmt. Die Anzahl intravaskulärer Immunzellen wurde jeweils pro Gesichtsfeld ($150\ \mu\text{m}^2$) angegeben. Die Position der Gefäße wurden hierfür über Färbung des Endothels bestimmt. NETs⁺ Neutrophile wurden als citH3⁺ MPO⁺ DNA-haltige Zellen definiert. Pro Tier wurden für jede Auswertung intakte Gewebestrukturen von mindestens 10 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern von jeweils $150\ \mu\text{m}^2$ untersucht. CD4⁺ T-Zell-Cluster wurden als intravaskuläre Aggregate von ≥ 2 CD4⁺ T-Zellen mit einem Abstand unter $2\ \mu\text{m}$ zwischen ihren Kernen definiert. Die Werte beziehen sich jeweils auf die Summe von Clustern in insgesamt 10 Gesichtsfeldern.

Die Fibrin-Assoziation von Zellen wurde als direkte Co-Lokalisation des Fibrins mit der Zelle definiert. Zur Analyse der intravaskulären Fibrinablagerung wurden die gesamte Gefäßfläche der Mikrogefäße ($\leq 20\ \mu\text{m}$ Durchmesser) und die mit Fibrin bedeckte Fläche innerhalb der Gefäße gemessen. Die Fibrinbildung wurde als prozentualer Anteil der fibrinbedeckten Fläche an der gesamten intravaskulären Fläche berechnet. Mikrothromben (ohne oder mit Immunzellen) wurden als Gefäßobstruktionen definiert, die das Gefäßlumen zu $\geq 60\%$ ausfüllen, und Gefäßverschlüsse wurden als Okklusion von $\geq 90\%$ definiert. Des Weiteren konnten die Mikrothromben und Okklusion noch danach unterschieden werden, ob sie Immunzellen beinhalten oder nicht (Fibrin- bzw. zellhaltige Mikrothromben und Fibrin- bzw. zellhaltige Okklusionen). Die zellspezifischen Mikrothromben und Okklusionen konnten zusätzlich nach der Zellart aufgeschlüsselt werden, die sie beinhalten. Die Anzahl der Gefäße mit Mikrothromben bzw. Okklusionen wurde jeweils als Anteil pro 100 Mikrogefäßen definiert. Alle Fibrinparameter wurden anhand von mindestens 3 Gesichtsfeldern berechnet, was einer Gesamtzahl von >100 analysierten Gefäßen pro Maus entspricht. Die Quantifizierungen erfolgten mit den Programmen ZEN 2 lite (blue edition) und free LAS X.

3.6.2 Quantifizierung in der Lunge (Mensch)

Immunzellen wurden mit Hilfe der Antikörperfärbungen bestimmt (3.4.3). Es wurden nur intravaskuläre Immunzellen in der Lunge analysiert. Für jede Probe wurden mindestens 50 Gesichtsfelder mit einer Fläche von jeweils $290\ \mu\text{m}^2$ analysiert. Es wurde jeweils die durchschnittliche Anzahl intravaskulärer Immunzellen pro Gefäß angegeben.

Zur Analyse der Thrombusbildung oder der Gefäßokklusion wurde die mit Fibrin bedeckte Fläche pro Gefäß gemessen. Als Thrombose wurden Aggregate aus Fibrin definiert, die die Blutgefäßfläche zu $\geq 60\%$ verschlossen. Bei Gefäßverschlüssen war die Gefäßfläche zu $\geq 90\%$ mit Fibrin bedeckt. Auch Immunzellen, die an den Aggregaten aus Fibrin assoziiert waren, wurden zur Fläche gerechnet.

Für die Analyse der verschiedenen Thrombenpopulationen wurden alle Thromben mit einer Mindestfläche von $\geq 80\ \mu\text{m}^2$ unabhängig von der Gefäßgröße in die Berechnungen einbezogen und

prozentual aufgeteilt. Fibrinthromben wurden als Thromben definiert, die Fibrin, Thrombozyten und/oder Erythrozyten und keine kernhaltigen Immunzellen enthielten. Immunzellspezifische Thromben wurden als Thromben definiert, die aus Fibrin, Thrombozyten und/oder Erythrozyten, sowie Immunzellen bestanden. Dabei wurde nach CD4⁺-Thromben, MPO⁺ Thromben, sowie CD4⁺ und MPO⁺-Thromben unterschieden und darüber hinaus unterschieden, ob diese weitere kernhaltige Immunzelle(n) enthielten. Für jede Probe wurden mindestens 50 Gesichtsfelder analysiert.

3.7 Quantifizierung der 4D-Visualisierungen

Für die Quantifizierung der mittels Multiphotonenmikroskopie erhaltenen Videos wurde Imaris 9.6.0 verwendet. Pro Tier wurden Videos von durchschnittlich 25 Minuten Dauer, die über einen Zeitraum von 5 bis 6 Stunden aufgenommen waren, ausgewertet. Für die Analyse wurden ausschließlich CMPTX-markierte CD4⁺ T-Zellen berücksichtigt, die sich in FITC-Dextran-markierten Gefäßen befanden.

Als Cluster wurden intravaskuläre Zellaggregate von ≥ 2 CD4⁺ T-Zellen definiert, wobei die CMPTX-markierten Zellen einen Abstand von $< 1 \mu\text{m}$ besaßen.

Die Bewegung der CD4⁺ T-Zellen wurde über die Zeit verfolgt. Dabei wurde die Fortbewegung als vorwärtsgerichtet crawling oder wechselseitig rück- und vorwärtsgerichtet crawling definiert, wenn sich die T-Helferzelle in einem Geschwindigkeitsrange von über $0.1 \mu\text{m/s}$ und unter $1.0 \mu\text{m/s}$ fortbewegte. Die Analysen erfolgten jeweils vom Beginn bis zum Ende des Videos, sodass eventuelle Bewegungspausen miteinberechnet wurden. Ein weiteres Kriterium war daher, dass die Durchschnittsgeschwindigkeit einer crawlingen Zelle unter $0.35 \mu\text{m/s}$ liegen sollte.

3.8 *In vitro* Versuche

3.8.1 *In vitro* Generierung von Thromben und Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

E. coli-GFP wurden über Nacht kultiviert und ihre KBE bestimmt (3.1.1). Anschließend wurde PPP aus humanem Vollblut gewonnen (3.2.1). Das Blut entstammte der eigenen Spende und war mit Hilfe einer Flügelkanüle in einer 10 ml-Spritze mit dem Antikoagulans Natriumcitrat abgenommen worden (129 mmol/l ; Verhältnis 1:10 zu Blut). Zusätzlich wurden folgende Stammlösungen hergestellt: „Fibrinogen“ ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Fibrinogen in 0.9% NaCl-Lösung), „TF“ (7.5 mg Tissue Factor in $100 \mu\text{l}$ Resuspensions-Puffer), „Thrombin“ (4 NIH Units Thrombin in 1 ml dest. H_2O), „CaCl₂“ (20 mM CaCl₂ in dest. H_2O). Im Anschluss wurden die Kontroll- bzw. Thromben-Suspensionen wie in Tabelle 12 beschrieben, hergestellt und bei 37°C für 90 Minuten sanft geschüttelt.

Kontrolle	Thrombus – Thrombin	Thrombus – TF	Thrombus – PPP
40 µl PBS	40 µl Fibrinogen	39 µl PBS 1 µl TF	40 µl Fibrinogen
6.1 x 10 ⁶ KBE in 200 µl PBS	6.1 x 10 ⁶ KBE in 200 µl PBS	6.1 x 10 ⁶ KBE in 200 µl PBS	6.1 x 10 ⁶ KBE in 200 µl PBS
40 µl PBS	40 µl Thrombin	40 µl PPP	25 µl PPP 15 µl PBS
40 µl CaCl ₂	40 µl CaCl ₂	40 µl CaCl ₂	40 µl CaCl ₂

Tabelle 12 – Zusammensetzung der Kontroll- und Thrombensuspensionen zur Thrombengenerierung

Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in ein Reaktionsgefäß mit Bulk Beads transferiert. Auch der Thrombus wurde mit Hilfe zweier Pipettenspitzen in ein Reaktionsgefäß mit Bulk Beads transferiert und mit 100 µl sterilem PBS befeuchtet. Die Reaktionsgefäße mit den Beads waren jeweils vor und nach der Transferierung auf einer Feinwaage gewogen worden. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in einen Homogenisator gegeben und für 2-mal 45 Sekunden bei 2500 rpm gedreht, sodass der Thrombus mit Hilfe der Bulk Beads zerstört wurde.

Nachfolgend wurden aus den Suspensionen Verdünnungsreihen hergestellt (1:10, 1:100 und 1:1000) und auf LB-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht mit der Unterseite nach oben bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag ausgezählt. Anschließend konnten die KBE pro 100 µl Überstand bzw. in 100 µl gelösten Thrombus kalkuliert werden. Es wurden jeweils die Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten gebildet.

3.8.2 Bestimmung der Faktor XIIa-Bildung mittels chromogenem Substrat

Die Experimente hatten zum Ziel, den Effekt der Nukleosom-Kernpartikel 40N40, ONO, sowie der 147 bp dsDNA auf die Aktivierung von Faktor XII zu untersuchen (Kooperation mit Prof. Karl-Peter Hopfner, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Genzentrum, LMU)³⁹. Nukleosom-Kernpartikel bzw. die dsDNA wurde für jedes Experiment neu isoliert, über einen Membrantausch im Reaktionspuffer (siehe Tabelle 4) gelöst und die Konzentration mittels Nanodrop über A₂₆₀ anschließend bestimmt.

Um die Bildung von Faktor XIIa zu messen, wurden 100 µg/ml Nukleosom-Kernpartikel, 167 nM Faktor XII, sowie das chromogene Substrat S-2302 in Reaktionsgefäße gegeben und die Absorption des Substrats über die Zeit bestimmt. Vor Durchführung der Messung wurden die Stammlösungen hergestellt: Die Nukleosom-Kernpartikel bzw. die dsDNA wurden mit dem Reaktionspuffer verdünnt (240 µg/ml) und für ca. eine Minute resuspendiert, um eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten. Das Vortexen der Probenlösungen wurde dabei vermieden. Das chromogene Substrat

S-2302 wurde in dest. H₂O in der Konzentration 4 mM gelöst. Erst unmittelbar vor Messbeginn wurde Faktor XII in Zinkchlorid-Reaktionspuffer (20 µM ZnCl₂ in Reaktionspuffer) in der Konzentration 400 nM gelöst. Als Positiv-Kontrolle wurde Kaolin verwendet (50 µg/ml). Dieses Material aktiviert FXII über seine negativ geladene Oberfläche zuverlässig¹⁰⁴. Kaolin wurde ebenfalls in Reaktionspuffer gelöst (Stammlösung 120 µg/ml), bei Bedarf wurde zur besseren Lösbarkeit 1M Natronlauge tröpfchenweise zugegeben.

Anschließend wurden in eine 96-well Platte jeweils 10 µl chromogenes Substrat S-2302 vorgelegt und 25 µl Probenlösung sowie 25 µl Faktor XII Stammlösung hinzugefügt. Neben der Positivkontrolle mit Kaolin wurde parallel eine Faktor XII-Kontrolle (Faktor XII-Lösung, Reaktionspuffer, chromogenes Substrat S-2302) und eine Pufferkontrolle (Reaktionspuffer, chromogenes Substrat S-2302) analysiert. Von allen Proben bzw. Kontrollen wurden Duplikate angefertigt.

Unmittelbar nach Zugabe der Faktor XII-Lösung wurde das Programm am Mikroplatten-Reader gestartet und der aus der Aktivierung von FXII resultierende Farbumschlags des Substrats S-2302 bei einer Absorption von 405 nm über die Zeit bei 37°C gemessen. Vor der ersten Messung wurde die 96-well Platte durch den Reader mit mittlerer Stärke für 2 Minuten orbital geschwenkt. Anschließend wurde alle 5 Minuten gemessen, 5 bis 100 Minuten nach Versuchsbeginn. Der Absorptionswert der Pufferkontrolle (ohne FXII) wurde von allen Proben abgezogen. Insgesamt wurde das Experiment mit 5 biologischen Replikaten durchgeführt. Zur besseren Darstellung des Kurvenverlaufs wurde zusätzlich die „area under the curve“ (AUC) mit Graph Pad Prism 8.0.1 bestimmt.

3.8.3 Generierung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten αBSA-BSA-IK

Damit sich ein IK bildet, müssen Antikörper gegenüber dem Antigen zwingend im Überschuss Vorhandensein, am besten etwa um das Fünffache. Es wurde daher BSA im Verhältnis 10 mg/ml in dest. H₂O gelöst. Anschließend wurde die BSA-Lösung mit einem αBSA-Antikörper (51 mg/ml Stammkonzentration, aus dem Kaninchen) im Verhältnis 1:1 für eine Stunde bei Raumtemperatur unter gemäßigtem Schütteln inkubiert. Zur Sichtbarmachung wurde ein αKaninchen Alexa Fluor™ im Verhältnis 1:10 (2mg/ml Stammkonzentration) zugegeben und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit den IK in Reaktionsgefäße mit Bulk Beads transferiert und diese für 2-mal 45 Sekunden bei 2500 rpm in einem Homogenisator gedreht, sodass die IK mechanisch verkleinert wurden.

3.9 RNA-Sequenzierung von isolierten T-Helferzellen aus der Maus-Leber

CD4⁺ T-Zellen wurden aus der Leber von Mäusen, welche nicht infiziert waren, und aus der Leber infizierter Mäuse, 3 Stunden bzw. 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion isoliert. Die Isolation wurde von der Kollegin Manovriti Thakur durchgeführt. Anschließend wurden die lebenden CD4⁺ T-Zellen in Lysepuffer isoliert (je 2000 - 3000 Zellen in 10 µl Lysepuffer (50% 2X TCL-Puffer, 49% RNase-freies H₂O, 1% 2-ME).

Die RNA-Sequenzierung und Analysen erfolgten in Kooperation mit Thomas Engleitner und Dr. Rupert Öllinger (Arbeitsgruppe von Prof. Roland Rad, Institut für Molekulare Onkologie und Funktionelle Genomik, TUM Klinikum rechts der Isar) und wurde folgendermaßen durchgeführt: Die Vorbereitung der Bibliothek für die Massen-Sequenzierung von poly(A)-RNA erfolgte weitgehend wie zuvor beschrieben¹⁰⁵. Die Bibliothek wurde auf einem NextSeq 500 (Illumina) mit 67 Zyklen für die cDNA in read1 und 16 Zyklen für die Barcodes und UMIs in read2 sequenziert. Die Daten wurden mithilfe der veröffentlichten Drop seq-Pipeline (v1.12) verarbeitet, um Proben- und Genweise UMI-Tabellen zu erstellen¹⁰⁶. Für das Mapping der Rohsequenzierungsdaten wurde das Referenzgenom (GRCm38) für das Alignment verwendet. Transkript- und Gendefinitionen wurden entsprechend der GENCODE Version M25 verwendet. Die resultierende UMI-gefilterte Zählmatrix wurde in R v3.4.4 importiert. Vor der differentiellen Expressionsanalyse mit DESeq2 v1.18.1 (10.1186/s13059-014-0550-8) wurde die Streuung der Daten mit einer parametrischen Anpassung unter Verwendung des Zeitpunkts als erklärende Variable geschätzt. Der Wald-Test wurde für die Bestimmung von unterschiedlich regulierten Genen zwischen verschiedenen Zeitpunkten verwendet. Anschließend wurden die geschrumpften log₂-Fachveränderungen berechnet. Ein Gen wurde als differentiell reguliert eingestuft, wenn die absolute apeglm-geschrumpfte log₂-Fachveränderung mindestens 1 betrug und der nach Benjamini-Hochberg korrigierte P-Wert < 0.01 war. Die Rlog-Transformation der Daten wurde zur Visualisierung und für weitere nachgeschaltete Analysen durchgeführt.

Um die Funktion von T-Helferzellen als Gerinnungsregulatoren im Kontext einer systemischen Infektion weiter zu untersuchen, wurde eine unverzerrte Clusteranalyse mit allen signifikant veränderten (Benjamini-Hochberg korrigierte P-Wert < 0.05) Genen durchgeführt. Diese wurde mit Hilfe der Bioinformatik-Datenbank DAVID^{107,108} durchgeführt, indem die signifikant veränderten Gene mit den folgenden definierten Kategorien verglichen worden sind: KEGG Pathway, Gene Ontology Term Biological Process und die funktionellen Kategorien Biological Process, Cellular Components und Molecular Function. Anschließend wurden automatisch Cluster mit mittlerer Stringenz erstellt. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurde Graphpad Prism 9.3.1 verwendet.

3.10 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 8.0.1 und 9.3.1 durchgeführt. Die Boxplots zeigen Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts („standard error of the mean“, SEM). Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant bezeichnet bei einem P-Wert von unter 0.05. Beim Vergleich zweier Gruppen wurden die Signifikanzen mittels ungepaartem, zweiseitigen t-Test bestimmt. Diese wurden teilweise in einem Schätzungsdiagramm mit der Differenz zwischen den beiden Mittelwerten visualisiert. Um größere Datengruppen auf Normalverteilung zu überprüfen, wurde der D'Agostino-Pearson Omnibus-Normalitätstest verwendet. Bei nicht normal verteilten Daten wurde ein Mann-Whitney-Test anstelle eines ungepaarten zweiseitigen t-Tests durchgeführt.

Wurden mehr als 2 Gruppen verglichen bzw. flossen noch zusätzliche Parameter ein, wurden für die Analysen eine ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse („analysis of variance“, ANOVA) mit nachfolgendem (*post hoc*) Tukey- bzw. Sidak-Mehrfachvergleichstest herangezogen.

Korrelationsanalysen wurden mit einem 95% Konfidenzintervall erstellt und der Pearson R-Wert bestimmt. Auf Signifikanz wurde mit einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test getestet.

Sofern nicht anders beschrieben, beziehen sich alle angegebenen n-Werte auf separate biologische Replikate.

IV. Ergebnisse

4.1 Funktionsweise der T-Helferzellen bei systemischen Infektionen in jungen Mäusen

4.1.1 CD4⁺ T-Zellen als negative Regulatoren der Blutgerinnung und Thrombosebildung

Die Rolle von Neutrophilen und klassischen Monozyten bei der Bildung von Immunothrombosen ist bereits partiell beschrieben worden⁸. Jedoch ist die Bedeutung der T-Helferzellen für die Koagulation als Bestandteil der frühen Phase der Immunantwort auf systemische Infektionen weitgehend unbekannt.

Daher analysierten wir zunächst die Abhängigkeit der CD4⁺ T-Zell-Rekrutierung von der Fibrinbildung in Mäusen. Nach Behandlung mit dem Faktor Xa-Inhibitor Rivaroxaban nahm die Anzahl arretierter T-Helferzellen in der Leberzirkulation der Mäuse stark ab. Dies galt sowohl nach dreistündiger¹⁰⁹. und 18-stündiger *E. coli*-Infektion, als auch tendenziell nach sechsstündiger *S. pneumoniae*-Infektion (Abbildung 8a, b).

Zusammen mit intravaskulärem Fibrin und Thrombozyten bildeten die CD4⁺ T-Zellen spezifische Mikrothromben in der Leber-Mikrozirkulation infizierter Mäuse (Abbildung 8c).

Nach Depletion der T-Helferzellen mittels Verabreichung spezifischer anti-CD4⁺ T Zell-Antikörper, war die intravaskuläre Fibrinbildung in der Leber gesteigert. Nach einstündiger *E. coli*-Infektion induzierte die T-Helferzell-Depletion eine Steigerung der Fibrinbildung um das Dreifache, auch nach dreistündiger *E. coli*-Infektion und sechsstündiger *S. pneumoniae*-Infektion war diese um mehr als das Doppelte erhöht, wie in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte¹⁰⁹. In mit LPS behandelten Mäusen war nach CD4⁺ T-Zell-Depletion ebenfalls tendenziell eine gesteigerte Fibrinbildung erkennbar (Anhang, Abbildung I).

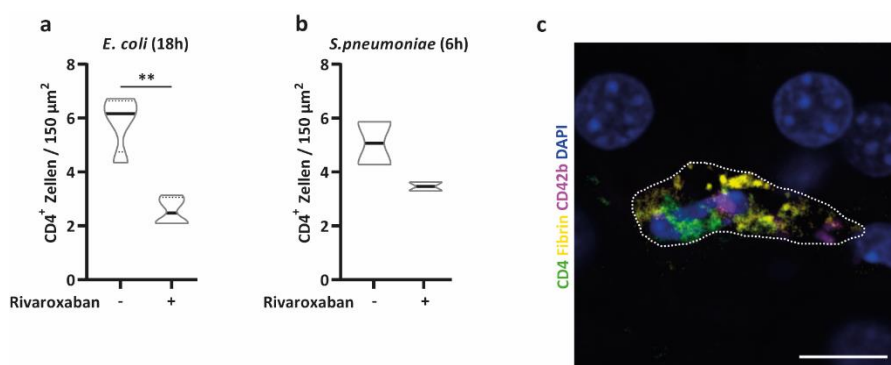


Abbildung 8 – CD4⁺ T-Zellen und intravaskuläre Fibrinbildung in jungen Mäusen

a, b Arretierte CD4⁺ T-Zellen 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion (**a**) bzw. 6 Stunden nach *S. pneumoniae* (**b**) in jungen Mäusen in Abhängigkeit von der Rivaroxaban Behandlung. **c** Repräsentatives Bild eines Mikrothrombus in der Mikrozirkulation der Leber junger Mäuse, bestehend aus Fibrin (gelb), CD42b⁺ Thrombozyten (magenta) und einer CD4⁺ T-Zelle (grün), 6 Stunden nach *E. coli*-Infektion. Messbalken ist 10 µm.

In Violinplots zeigen verstärkte horizontale Linien den Median und die gestrichelten Linien die 25te und 75te Quartile an. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.01$ (**).

Um die molekularen Grundlagen der Interaktion von Fibrin und T-Helferzellen zu ermitteln, wurde die mRNA-Expression der T-Helferzellen infizierter junger Mäuse analysiert. Hierfür wurden CD4⁺ T-Zellen aus der Leber von Mäusen, welche nicht infiziert waren bzw. aus infizierten Mäusen nach dreistündiger bzw. 18-stündiger *E. coli* Infektion isoliert. Nach der Sequenzierung wurde eine ungerichtete Clusteranalyse aller signifikant veränderten Gene mit mittlerer Stringenz erstellt. Wie in Abbildung 9a zu sehen ist, kam es zu allen untersuchten Zeitpunkten (3h vs. 0h, 18h vs. 3h) zur größten Überlapung der signifikant veränderten Gene mit dem Cluster 1 „Innate Immunantwort“. Den zweitgrößten Enrichment Score hatte der Cluster „Blutkoagulation, Hämostase, Fibrinolyse“ (3h vs. 0h) bzw. „Blutkoagulation, Hämostase“ (18h vs. 0h). Die drittgrößte Übereinstimmung ergab sich mit den Clustern „Th1-, Th2- und Th17-Zelldifferentierung, T-Zellrezeptor-Signalgebung“ (3h vs. 0h) und dem Cluster „positive Regulation der T-Zellaktivierung, Antigen-Präsentation“ (3h vs. 0h). Darüber hinaus kam es 3 Stunden nach Infektionsbeginn zu einer deutlichen Expressionssteigerung von Genen, welche die Koagulation negativ regulieren (GO: 0030195) (Abbildung 9b).

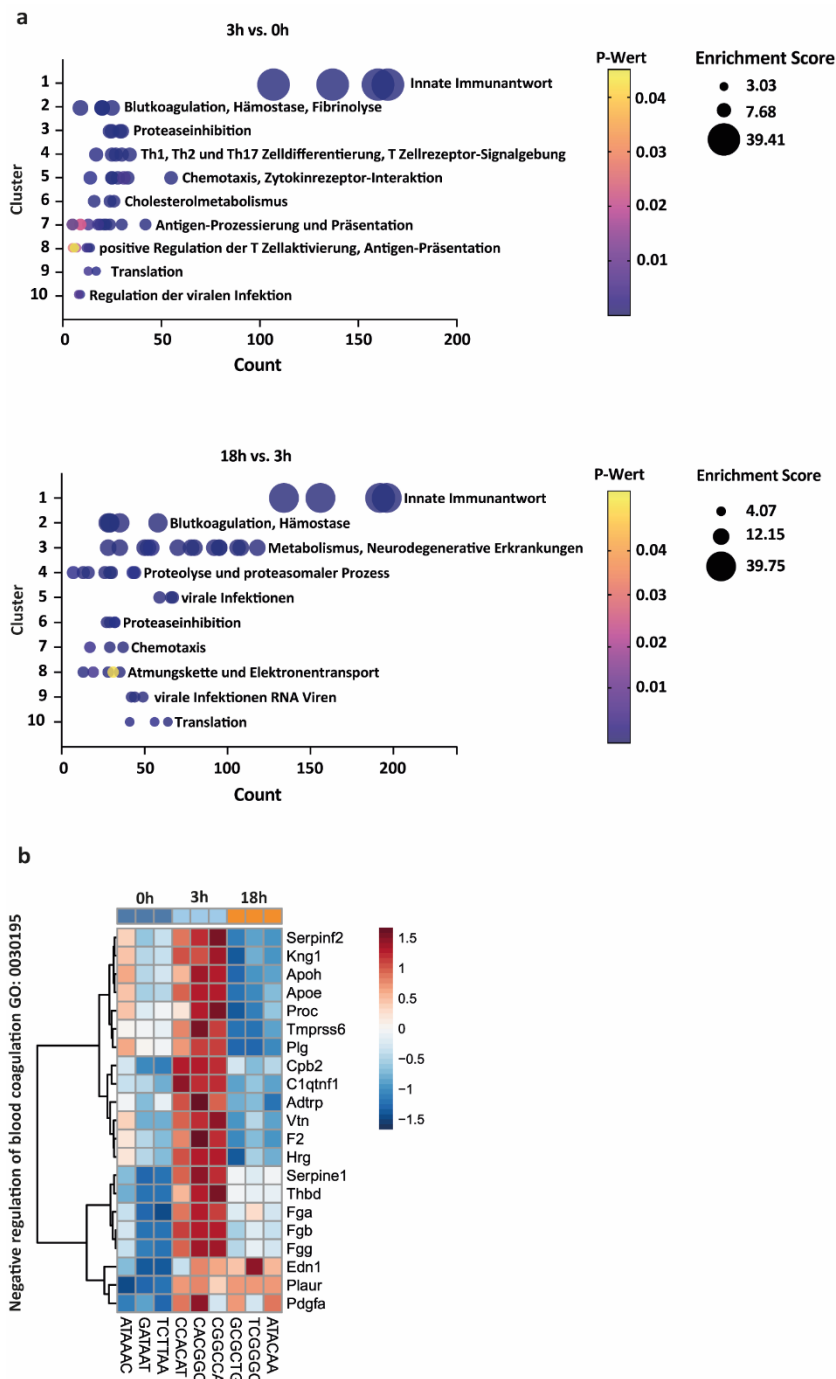


Abbildung 9 – mRNA-Expressionsanalysen aus der Leber isolierter T-Helferzellen

a Ungerichtete Clusteranalyse signifikant veränderter Gene (< 0.05 adjusted p-value). Clusternamen fassen jeweils die im Cluster enthaltenen Gene Ontologies und Pathways zusammen. Clusteranordnung nach ihrem Enrichment Score (von oben nach unten absteigend). Count bezieht sich auf die Anzahl der im Cluster enthaltenen Gene. **b** Heatmap-Darstellung von RNA-Expressionsdaten der aus der Leber junger Mäuse isolierten CD4⁺ T-Zellen die im Zusammenhang mit der negativen Regulation der Koagulation stehen (GO: 0030195). Nicht-infizierte junge Mäuse (0h) bzw. 3 und 18 Stunden nach der Infektion mit *E.coli* (3h, 18h). Dargestellt ist die relative Expressionsänderung.

4.1.2 Abhängigkeit der CD4⁺ T-Zellaktivierung von der Fibrinbildung

Da sich Fibrin als wichtig für die Arretierung der CD4⁺ T-Zellen in der Mikrozirkulation herausstellte und CD4⁺ T-Zellen mit Fibrin kolokalisierten (Abbildung 10a), wurde als Nächstes untersucht, ob das Fibrin einen Einfluss auf den Aktivierungsstatus von CD4⁺ T-Zellen hat. Die Aktivierung intravaskulärer T-Helferzellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion mittels der Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD38 analysiert (Abbildung 10b, c). Zu Beginn der *E. coli*-Infektion wurden in den Lebersinusoiden junger Mäuse keine aktivierten T-Helferzellen detektiert (Abbildung 10b). 8 Stunden nach Injektion von LPS bzw. 18 Stunden nach der Infektion mit *E. coli* stieg die Anzahl aktivierter CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 10b, c).

Die höchste Expression von Genen, die im Zusammenhang mit der T-Zell Aktivierung stehen (GO: 0042110) waren 3 Stunden nach *E. coli*-Infektion detektierbar (Abbildung 10d). Aus Abbildung 10e ist ersichtlich, dass Gene, die im Zusammenhang mit der Regulierung der T-Zell Aktivierung stehen (GO: 0050863), vor allem 18 Stunden nach Infektion am höchsten exprimiert waren.

Abbildung 10f zeigt, dass es nach Rivaroxaban-Behandlung zu einer starken Abnahme des Anteils aktivierter intravaskulären CD4⁺ T-Zellen in jungen Mäusen kam. Dies war sowohl nach drei-als auch nach 18-stündiger *E. coli*-Infektion zu erkennen. Zusätzlich zeigte sich nach Infektion mit *E. coli* und Injektion von LPS, dass nahezu alle aktivierten T-Helferzellen gleichzeitig auch mit Fibrin assoziiert waren (Abbildung 10g, h).

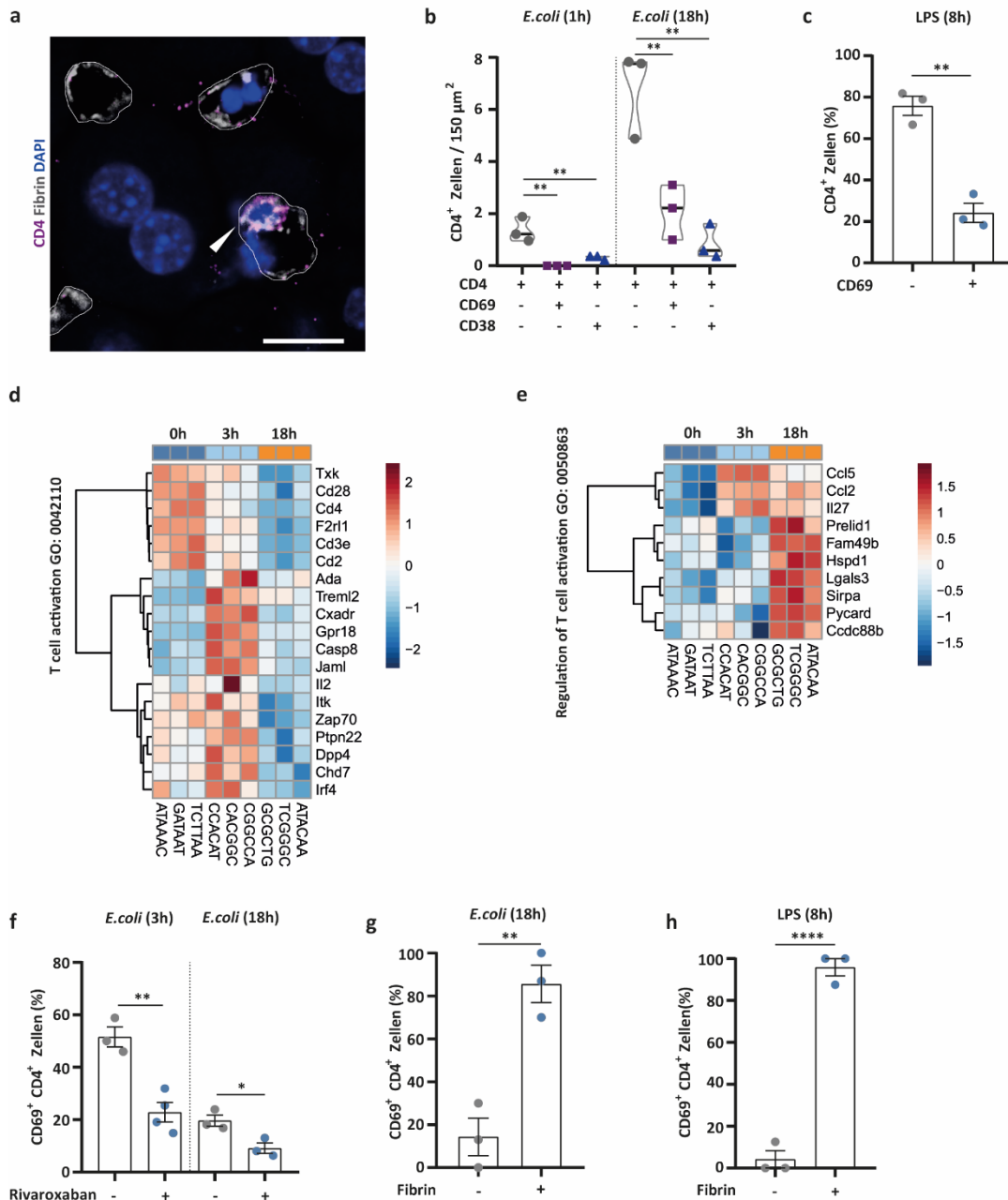


Abbildung 10 – Abhängigkeit der CD4⁺ T-Zellaktivierung von der Fibrinbildung

a Assoziation einer CD4⁺ T-Zelle (Pfeil) mit Fibrin im Lebersinusoid einer Maus, 6 Stunden nach *E. coli* Infektion. Messbalken ist 10 µm. **b** Anzahl rekrutierter aktivierter CD4⁺ T-Zellen in der Mikrozirkulation der Leber nach einer Stunde und 18 Stunden Infektion mit *E. coli*. **c** Anteil nicht-aktivierter und aktivierter CD4⁺ T-Zellen nach Injektion von LPS. **d, e**, Heatmap-Darstellung von RNA-Expressionsdaten aus der Leber isolierter CD4⁺ T-Zellen zur T-Zell Aktivierung (GO: 0042110) und der Regulation der T-Zell-Aktivierung (GO: 0050863) in nicht-infizierten Mäusen (0h) bzw. 3 Stunden und 18 Stunden nach Infektion mit *E. coli* (3h, 18h). Dargestellt ist die relative Expressionsänderung. **f** Fibrinabhängige Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen 3 und 18 Stunden nach Infektion mit *E. coli* in der Mikrozirkulation der Leber. Anteil fibrin-assoziiierter aktivierter CD4⁺ T-Zellen 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion (**g**) bzw. 8 Stunden nach LPS Injektion (**h**) in den Lebersinusoiden. Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles junges Tier (**b, c, f-h**).

Fehlerbalken zeigen SEM. In Violinplots zeigen verstärkte horizontale Linien den Median und die gestrichelten Linien die 25te und 75te Quartile an. $P < 0.01$ (**), $P < 0.0001$ (****).

4.1.3 Assoziation von Interleukin-2 mit T-Helferzellen

Interleukin-2 (IL-2) stellt ein bedeutendes immunmodulatorisches Zytokin dar, das die Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen in seine Effektorzellen beeinflusst. IL-2 ist entscheidend für die Entwicklung von Tregs im Thymus und für die Vermehrung und Aufrechterhaltung des Bestands von Tregs in peripheren Geweben. Des Weiteren fördert IL-2 die Differenzierung in Th1- und Th2-Effektorzellen und unterdrückt die Bildung von Th17 und Tfh-Zellen¹¹⁰.

Visualisierung der IL-2 Lokalisation zeigte, dass intravaskuläre fibrin-assoziierte T-Helferzellen positiv für IL-2 waren (Abbildung 11a). IL-2 war dabei sowohl mit einzelnen CD4⁺ T-Zellen, als auch mit intravaskulären T-Helferzell-Clustern assoziiert. Reduktion der Fibrinbildung in der Lebermikrozirkulation junger Mäuse durch einen PAI-1 neutralisierenden Antikörper verminderte das Vorhandensein von IL-2 (Abbildung 11b). Gleichzeitig kam es nach Neutralisation von PAI-1 zu einem Rückgang der CD4⁺-Mikrothromben (Abbildung 11c).

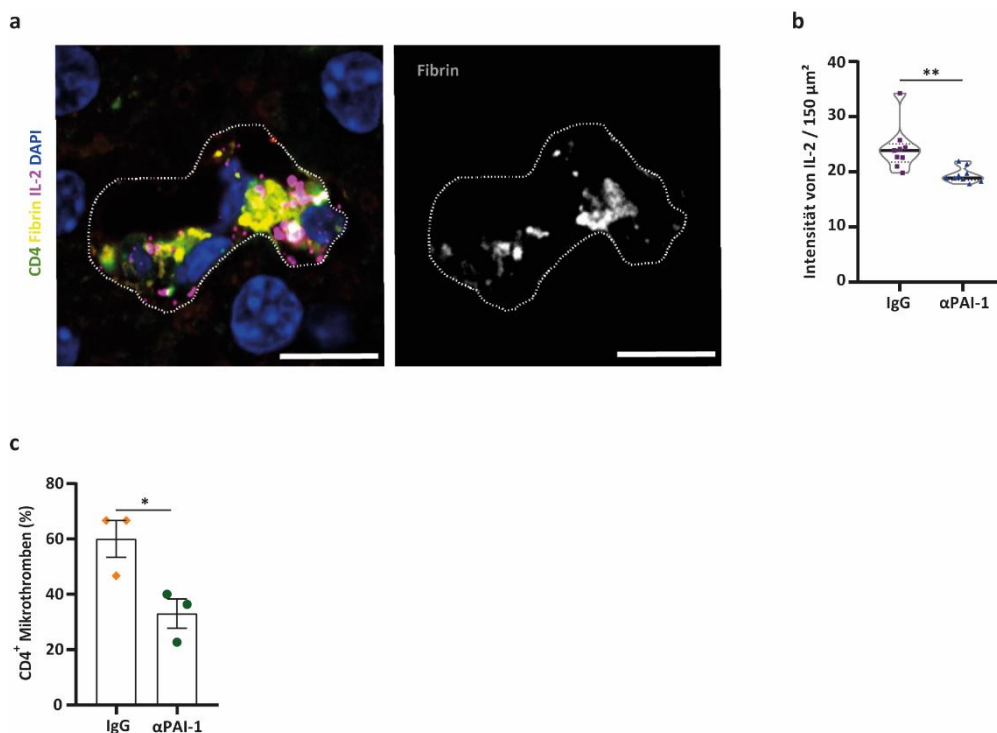


Abbildung 11 – Assoziation von IL-2⁺ T-Helferzellen mit Fibrin

a Repräsentatives Bild eines intravaskulären IL-2⁺ T-Helferzellclusters in Assoziation mit Fibrin 18 Stunden nach *E.coli*-Infektion. Messbalken ist 10 µm. **b** Relative Intensität von IL-2 pro Gesichtsfeld (150 µm²) der Leber. Vergleich von PAI-1 neutralisierten Tieren mit der Kontrollgruppe, jeweils 18 Stunden nach Infektion mit *E. coli*. Gezeigt sind Daten von mindestens 3 jungen Mäusen pro Gruppe. **c** Anteil CD4⁺ Mikrothromben von allen Mikrothromben nach PAI-1 Neutralisierung. Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles junges Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. In Violinplots zeigen verstärkte horizontale Linien den Median und die gestrichelten Linien die 25te und 75te Quartile an. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**).

4.1.4 Bestimmung des Subtyps von T-Helferzellen

Als nächstes wurde der Subtyp der arretierten mikrovaskulären T-Helferzellen in jungen Mäusen bestimmt (Abbildung 12a-d). Zu Beginn der *E. coli*-Infektion stellten Th17-Zellen (ROR γ T⁺) den größten Anteil der CD4⁺ T-Zellen dar (Abbildung 12a). ROR γ T⁺ Treg (ROR γ T⁺ FOXP3⁺) waren im Vergleich zum frühen Zeitpunkt erst nach 18-stündiger *E. coli*-Infektion am meisten vorhanden (Abbildung 12a, d). Th1-Zellen (Tbet⁺) konnten im Vergleich zu späteren Zeitpunkten der Infektion nicht detektiert werden (Abbildung 12a, c, d). Die Beteiligung der T-Helferzellen an der Aktivierung der Fibrinolyse wurde durch ihre Assoziation mit Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) ermittelt, welche vor allem an Th17-Zellen assoziiert waren (Abbildung 12b).

3 Stunden nach *E. coli*-Infektion bildeten Th17-Zellen ebenfalls die größte Gruppe der CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 12c), gefolgt von Treg-Zellen (FOXP3⁺). Den kleinsten Anteil machten die Th1- und Th2-Zellen (GATA3⁺) aus. Im Vergleich zum früheren Zeitpunkt blieb der Anteil der Th2-Zellen unverändert. Dagegen stellten 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion die ROR γ T⁺ Treg-Zellen den größten Anteil der T-Helferzellen dar (Abbildung 12d). Die Anteile der Th1-, Th2- und Th17-Zellen, sowie der Treg-Zellen waren deutlich geringer. Die Anzahl der Th1- und der Th2-Zellen blieb im Vergleich zu den 3-Stundenwerten in etwa identisch.

Rivaroxaban führte zu einer Reduzierung der Rekrutierung von Th17-Zellen, vor allem im *E. coli*-Modell (Abbildung 12e, f). Dies lässt darauf schließen, dass die Abhängigkeit der T-Helferzellaktivierung von Fibrin und die damit verbundene Rolle der CD4⁺ T-Zellen als negative Regulatoren der Blutgerinnung in erster Linie durch die Wirkung von Fibrin auf die Th17-Zellen bedingt ist.

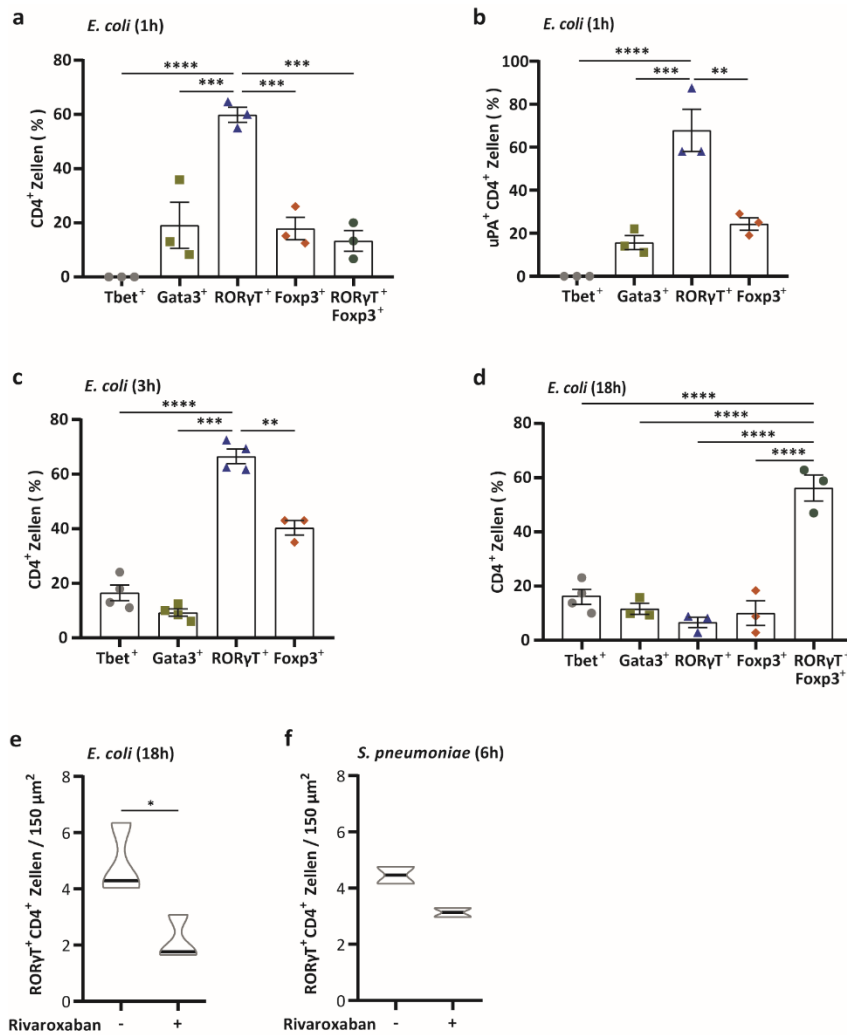


Abbildung 12 – Charakterisierung intravaskulärer arretierter $CD4^+$ T-Zellsubpopulationen zu verschiedenen Infektionszeitpunkten

Anteil von $Th1$ ($Tbet^+$), $Th2$ ($GATA3^+$), $Th17$ ($ROR\gamma T^+$), $Treg$ ($FOXP3^+$) und $ROR\gamma T^+$ $Treg$ ($ROR\gamma T^+ FOXP3^+$) an T-Helferzellen in der Mikrozirkulation der Leber nach einer (a), 3 (c) und 18 Stunden (d) nach *E. coli*-Infektion.

b Anteil an fibrinolytischer (uPA^+) T-Helferzellsubtypen eine Stunde nach *E. coli*-Infektion. e Rekrutierung von $Th17$ Helferzellen in die Lebersinusoiden in Abhängigkeit von der Fibrinbildung nach 18-stündiger *E. coli*-Infektion (e) bzw. sechsstündiger *S. pneumoniae*-Infektion (f).

Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. In Violinplots zeigen verstärkte horizontale Linien den Median und die gestrichelten Linien die 25te und 75te Quartile an. $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), $P < 0.0001$ (****).

4.2 Einfluss von Fibrin auf das intravaskuläre Bewegungsverhalten von T-Helferzellen in jungen Mäusen

4.2.1 Bewegungsverhalten von CD4⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf der Infektion

Durch Multiphotonen-Mikroskopie können Veränderungen der Zelllokalisierung in der Mikrozirkulation der Leber in Echtzeit *in vivo* dargestellt werden. Die 2-Photonen-Mikroskopie ist hierfür besonders geeignet, da scharfe, hoch aufgelöste und genau lokalisierbare Bilder in größerer Gewebstiefe mit gleichzeitig verminderter Fototoxizität aufgenommen werden können. Mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie wurde das Bewegungsverhalten von CMTPX-markierten CD4⁺ T-Zellen in der Mausleber während verschiedener Stadien der *E. coli*-Infektion untersucht. Hierbei wurden Aufnahmen in der Frühphase der Infektion getätigt (1 bis 5 Stunden, sowie 5 bis 10 Stunden nach Infektionsbeginn) und im fortgeschrittenen Verlauf der Infektion (10 bis 16 Stunden nach Infektionsbeginn). Aus bisherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass in dem *E. coli*-Infektionsmodell die Gefäßokklusionen durch Immunothrombosen und die Bildung von Fibrin nach 3 bzw. 6 Stunden einen Peak erreichen und, dass 18 Stunden nach Infektionsbeginn die Thrombosen zum Teil bereits abgebaut sind.

Die T-Helferzellen zeigten in der Frühphase der *E. coli*-Infektion ein „Crawling“-Verhalten – sie bewegten sich in den Lebersinusoiden sowohl vorwärtsgerichtet crawlend als auch wechselseitig rück- und vorwärts crawlend fort (Abbildung 13a und b; Link zum zugehörigen Video 1 im Anhang). Ein Teil der CD4⁺ T-Zellen bewegte sich deutlich schneller als die crawlenden CD4⁺ T-Zellen fort (Abbildung 13d). Generell war der Anteil aller sich bewegenden T-Helferzellen in der Frühphase der Infektion am größten (Abbildung 13c, d).

Auf mRNA-Ebene zeigte sich anhand der relativen Expressionsänderung im Infektionsverlauf eine deutliche Zunahme der Expression von Genen, welche mit der T-Zell Migration (GO: 0072678) assoziiert sind (Abbildung 13e).

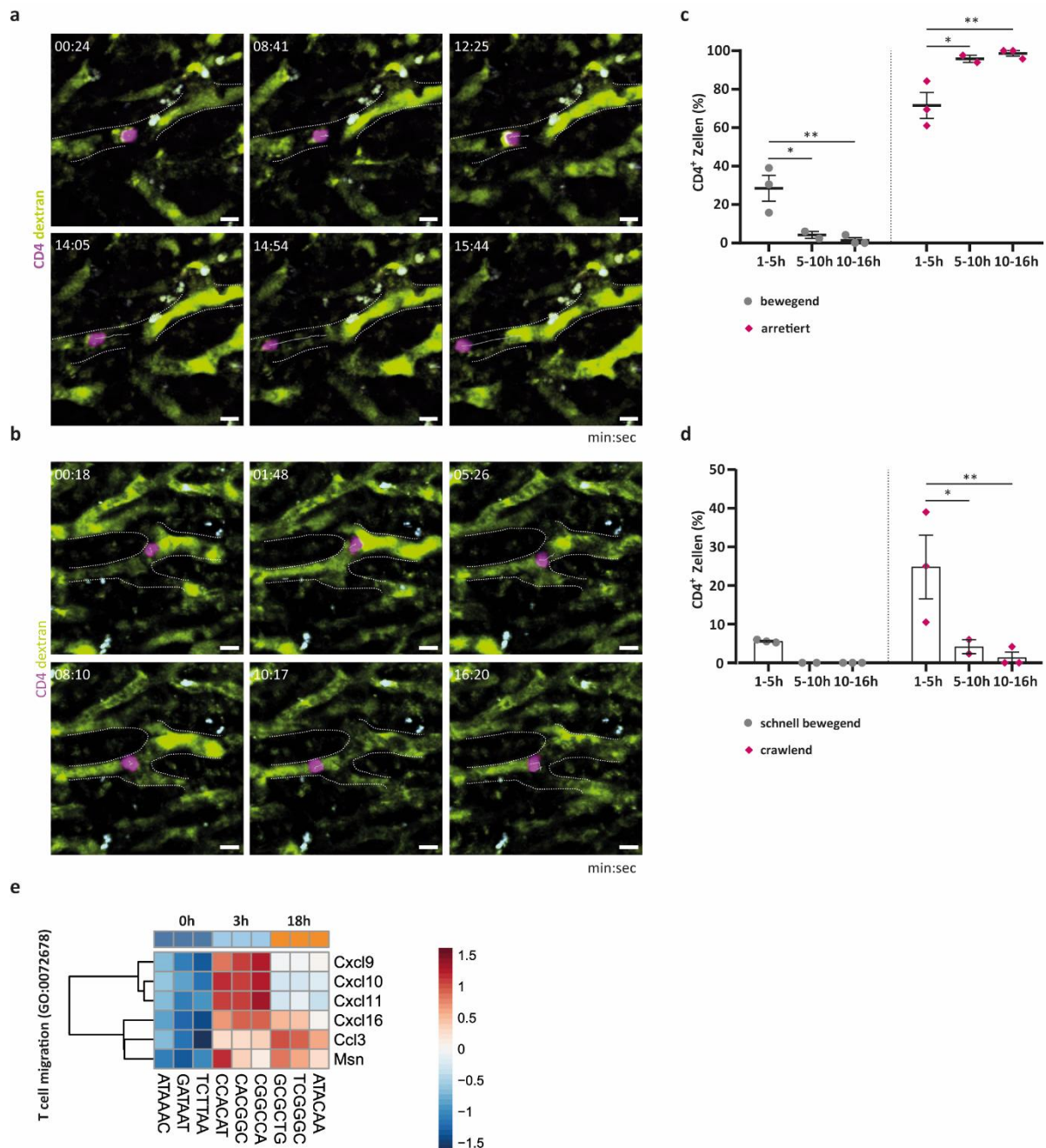


Abbildung 13 – Bewegungsverhalten von CMPTX-markierten $CD4^+$ T-Zellen in der Lebermikrozirkulation im zeitlichen Verlauf der Infektion

a, b Detektion einer vorwärts crawlenden (**a**) bzw. rück- und vorwärts crawlenden (**b**) CMPTX-markierten $CD4^+$ T-Zelle im Lebersinusoid einer jungen Maus mittels Multiphotonen-Mikroskopie. Die Gefäße wurden mit FITC-Dextran sichtbar gemacht. Zeitraum der Aufnahmen zwischen 1 bis 5 Stunden nach Infektion mit *E. coli*. Messbalken ist 10 μm . Link zum zugehörigen Video 1 im Anhang. **c** Verteilung sich bewegender oder arretierter Zellen über verschiedene Zeitspannen nach Infektionsbeginn. Auswertung mittels Multiphotonen-Mikroskopie. **d** Weitere Differenzierung der sich bewegenden Zellen aus (**c**) nach ihrem Bewegungsverhalten in crawlende und schnell bewegende Zellen. Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles, junges Tier (**c, d**). **e** Heatmap-Darstellung von RNA-Expressionsdaten aus der Leber isolierter $CD4^+$ T-Zellen zur T-Zell Migration (GO: 0072678) in nicht-infizierten jungen Mäusen bzw. 3 und 18 Stunden nach Infektionsstart. Dargestellt ist die relative Expressionsveränderung.

Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**).

4.2.2 Vermindertes Crawling der T-Helferzellen durch Blockade von LFA-1

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Bewegungsverhalten von T-Helferzellen von dem Integrin LFA-1 wurde LFA-1 mittels Antikörper-Gabe in den Mäusen neutralisiert. Die Kontrolltiergruppe wurde dagegen mit dem entsprechenden IgG-Antikörper behandelt. Pro Gruppe wurden 3 Mäuse analysiert. Der Untersuchungszeitraum lag zwischen einer bis 5 Stunden nach Start der *E. coli*-Infektion. Das Bewegungsverhalten der T-Helferzellen wurde anschließend mittels Multiphotonen-Mikroskopie am lebenden Tier untersucht. Durch Messen der Maximal- bzw. Durchschnittsgeschwindigkeit der sich bewegenden CD4⁺ T-Zellen in der Mikrozirkulation der Leber konnte unterschieden werden, ob es sich um eine crawlende oder um eine nicht-crawlende, schnell bewegende Zelle handelt. Hierbei zeigte sich eine Abnahme crawlender T-Helferzellen nach Neutralisation von LFA-1 (Abbildung 14a, b; Video 2 im Anhang). Gleichzeitig blieb der Anteil nicht-crawlender, schnell fortbewegender sowie der Anteil arretierter T-Helferzellen unverändert. Bei näherer Betrachtung zeigte sich, dass dieser Unterschied vor allem auf dem Verhalten der vorwärts crawlenden T-Helferzellen beruhte (Abbildung 14c). Bei der Analyse der Geschwindigkeiten der bewegenden T-Helferzellen zeigte sich eine Zunahme der Maximal- und der Durchschnittsgeschwindigkeit bei den schnell bewegenden Zellen nach Neutralisation von LFA-1 (Abbildung 14d). Die Geschwindigkeiten der crawlenden T-Helferzellen blieb dagegen unverändert (Abbildung 14e).

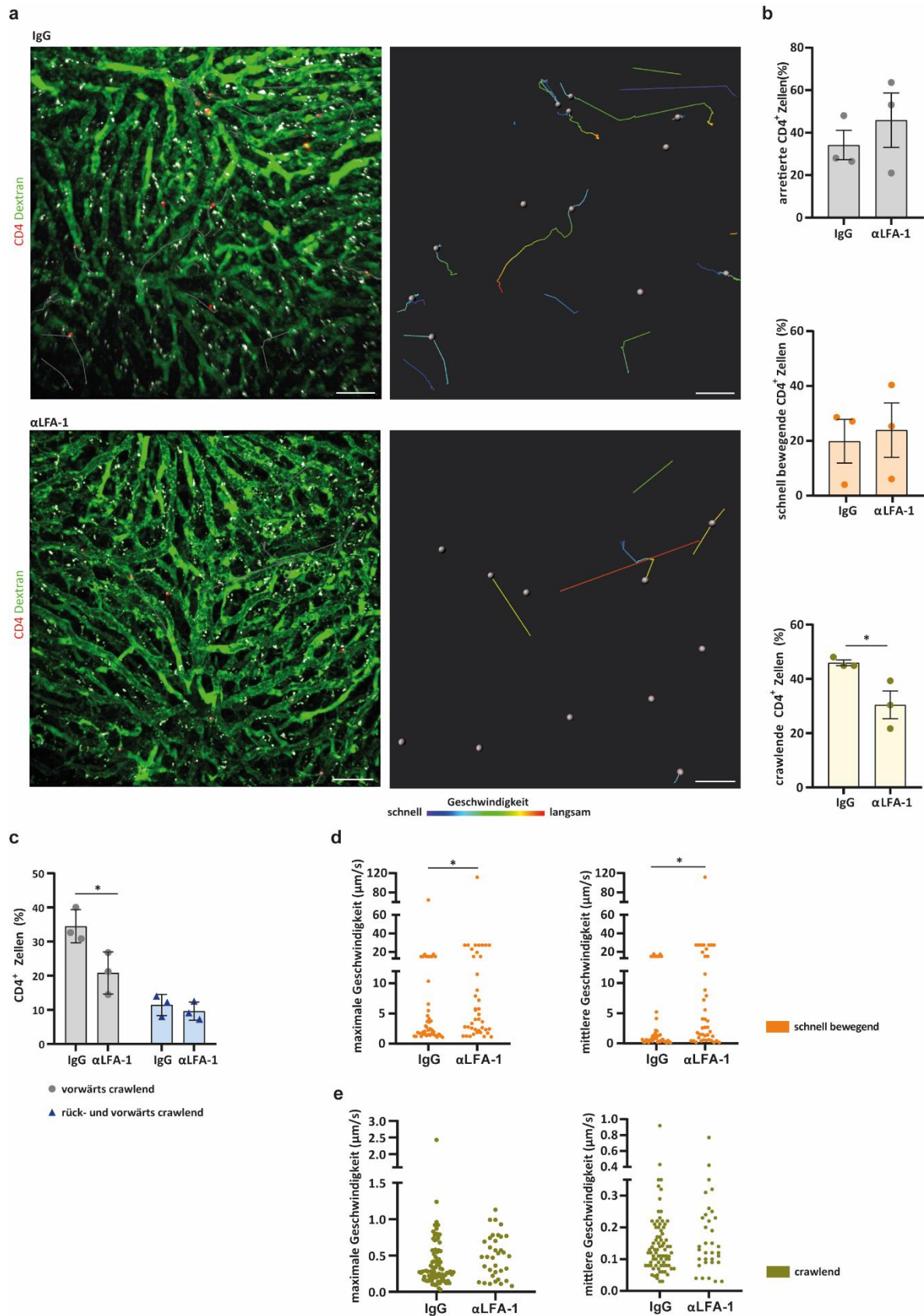


Abbildung 14 – Vermindertes Crawling von $CD4^+$ T-Zellen durch Blockade von LFA-1

a Bewegungsverhalten von T-Helferzellen in der Mikrozirkulation der Leber in Abhängigkeit von der Neutralisation des LFA-1 Rezeptors. Detektion mittels Multiphotonen-Mikroskopie. $CD4^+$ T-Zellen sind mit CMPTX markiert, die Gefäße wurden mit FITC-Dextran sichtbar gemacht. Zellen sind jeweils mit Punkten markiert (linke und rechte

Abbildungen). Die farbkodierte Geschwindigkeit und das Bewegungsmuster sind jeweils in der rechten Abbildung dargestellt. Crawlende Zellen zeigen Zick-Zack-ähnliches und schnell vorwärtsbewegende Zellen geradliniges Bewegungsmuster. Arretierte Zellen sind ohne farbkodiertes Bewegungsmuster. Zeitraum der Aufnahmen zwischen einer bis 5 Stunden nach *E. coli*-Infektionsbeginn. Messbalken ist 50 µm. Der Link zum zugehörigen Video 2 befindet sich im Anhang. **b** Anteil arretierter, schnell bewegender (nicht-crawler) und crawler T-Helferzellen. Untersucht wurden jeweils 3 Tiere pro Gruppe. **c** Weitere Differenzierung der migrierenden Zellen aus (**c**) nach ihrem Bewegungsverhalten in vorwärts migrierende und rückwärts-vorwärts migrierende Zellen. **d**, **e** Bestimmung der maximalen und mittleren Geschwindigkeit aller schnell bewegenden (nicht-crawler, **d**) und crawlernden (**e**) CD4⁺ T-Zellen in jeweils 3 LFA-1-neutralisierten bzw. IgG-behandelten Tiere. Grüne Punkte markieren crawlernde Zellen, orangene Punkte stellen schnell bewegende (nicht-crawler) Zellen dar. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*).

Als nächstes wurden die Expressionen von Rezeptorgenen auf CD4⁺ T-Zellen bestimmt, über welche eine Interaktion der T-Helferzelle mit Fibrin vermittelt werden könnte: LFA-1 (*ITGAL*), Mac-1 (CD11b (*ITGAM*)/ CD18 (*ITGB2*)), CD11c (*ITGAX*)/ CD18 (*ITGB2*). Hierbei war neben LFA-1 vor allem bei CD11b und CD18 im späteren Infektionsverlauf eine erhöhte Expression feststellbar (Tabelle 13).

Rezeptor-Gen	3h vs. 0h	18h vs. 3h
<i>ITGAM</i>	0.813630	2.375919
<i>ITGAL</i>	0.057329	0.756106
<i>ITGAX</i>	0.044196	0,126272
<i>ITGB2</i>	0.626577	1,487884

Tabelle 13 – Relative Expressionsänderung von Genen, potentiell mit Fibrin interagierenden Rezeptoren, der CD4⁺ T-Zellen

Relative Expressionsänderung ($\log_2FC - a_{\text{peglm}}$) der mRNA aus der Leber isolierten CD4⁺ T-Zellen von nicht-infizierten und infizierten Mäusen nach drei- bzw. 18-stündiger *E. coli*-Infektion. Gezeigt sind nur signifikante Expressionsänderungen der Gene (adjusted p-value < 0.05).

4.2.3 Bewegungsverhalten von CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von der Fibrindeposition

Um den Einfluss der Fibrindeposition auf das Bewegungsverhalten von CD4⁺ T-Zellen in den Lebersinusoiden zu bestimmen, erfolgte eine Lebendmikroskopie der jungen Maus durch Multiphotonen-Mikroskopie. Der Untersuchungszeitraum fand jeweils ein bis 5 Stunden nach *E. coli*-Infektion statt, da dies dem Höhepunkt der Fibrindeposition in den Lebergefäßen entspricht¹⁰⁹ und hier bereits die meiste Zahl bewegender T-Helferzellen detektiert werden konnte (Abbildung 13c).

Nach Behandlung mit Rivaroxaban kommt es in infizierten jungen Mäusen zu einer verminderten Fibrinbildung in der Lebermikrozirkulation, welche im Vergleich zur Kontroll-behandelten Maus etwa um 80% reduziert ist¹⁰⁹. Rivaroxaban induzierte eine Zunahme der schnell vorwärts-bewegenden,

nicht-crawlenden $CD4^+$ T-Zellen und eine Abnahme der arretierten $CD4^+$ -T-Zellen. Das Crawling der T-Helferzellen blieb unbeeinflusst (Abbildung 15a und b; Video 3 im Anhang). Gleichzeitig zeigte sich eine tendenzielle Zunahme der Maximal- und Durchschnittsgeschwindigkeit von schnell bewegenden und von crawlenden Zellen nach Behandlung mit Rivaroxaban (Abbildung 15c).

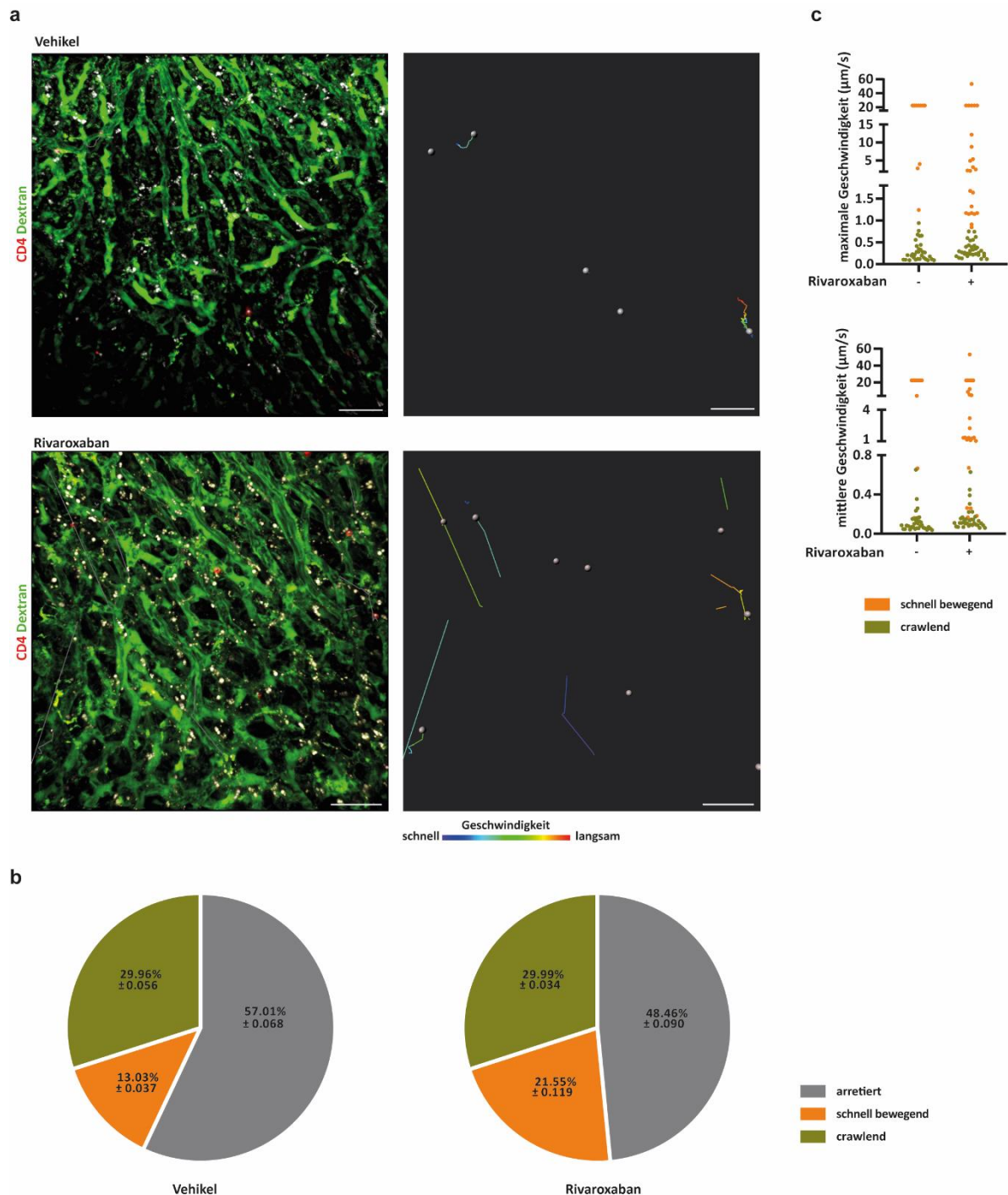


Abbildung 15 – Bewegungsverhalten von $CD4^+$ T-Zellen in Abhängigkeit von der Fibrindepotion

a Bewegungsverhalten von T-Helferzellen in der Mikrozirkulation der Leber in Abhängigkeit von Rivaroxaban. Detektion von CMPTX-markierten $CD4^+$ T-Zellen mittels Multiphotonen-Mikroskopie. Die Gefäße wurden mit FITC-Dextran sichtbar gemacht. Zellen sind jeweils mit Punkten markiert (linke und rechte Abbildungen). Die farbkodierte Geschwindigkeit und das Bewegungsmuster sind jeweils in der rechten Abbildung dargestellt.

*Crawlende Zellen zeigen Zick-Zack-ähnliches und schnell vorwärtsbewegende Zellen geradliniges Bewegungsmuster. Arretierte Zellen sind ohne farbkodiertes Bewegungsmuster. Zeitraum der Aufnahmen zwischen einer bis 5 Stunden nach E. coli-Infektion. Messbalken ist 50 µm. Der Link zum zugehörigen Video 3 befindet sich im Anhang. **b** Verteilung der Bewegungsarten von CD4⁺ T-Zellen in der Leber-Mikrozirkulation junger Mäuse nach Rivaroxaban-Behandlung. Ermittelter Mittelwert und Standardfehler von jeweils 3 unabhängigen Experimenten pro Gruppe. **c** Maximale und mittlere Geschwindigkeiten von CD4⁺ T-Zellen für jeweils 3 mit Rivaroxaban- bzw. Vehikel-behandelter jungen Tiere. Grüne Punkte markieren crawlende Zellen, orangene Punkte stellen schnell bewegende, nicht-crawlende Zellen dar.*

4.2.4 Fibrin-abhängiges Auftreten von extravaskulären T-Helferzellen

In der Leber junger Mäuse waren 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion deutlich mehr T-Helferzellen und B-Zellen als Neutrophile extravasiiert (Abbildung 16a). Beim Vergleich mit der Anzahl der intravaskulären Zellen (Abbildung 17) war feststellbar, dass etwa die Hälfte aller T-Helferzellen und B-Zellen extravaskulär waren. Dahingegen befand sich nur etwa ein Drittel der MPO⁺ Neutrophilen im Gewebe.

Zum selben Zeitpunkt lag der Großteil der CD4⁺ T-Zellen als singuläre Zelle im Gefäß oder perivaskulär außerhalb des Gefäßes vor, wobei die meisten der intra- und perivaskulären singulären Zellen mit Fibrin assoziiert waren (Abbildung 16b). Auch die intravaskulären und perivaskulären CD4⁺ T-Zellcluster waren nahezu alle zu Fibrin assoziiert (Abbildung 16d).

Im Gegensatz zu den intra- und perivaskulären Zellen, lagen die Zellen extravaskulär tendenziell vermehrt geclustert als vereinzelt vor, wobei die Behandlung mit Rivaroxaban zu einer verminderten Assoziation der geclusterten Zellen mit extravaskulärem Fibrin führte (Abbildung 16b, c). Auch induzierte Rivaroxaban die Abnahme kleinerer extravaskulärer Cluster, bestehend aus 5 oder weniger CD4⁺ T-Zellen, und in Tendenzen auch größerer extravaskulärer Cluster, bestehend aus 6 oder mehr T-Helferzellen (Abbildung 16e).

Auch zu einem früheren Infektionszeitpunkt war nach Behandlung mit Rivaroxaban eine Abnahme extravaskulärer CD4⁺ T-Zellen und Th17-Zellen unabhängig vom Clusterstatus zu beobachten (Anhang, Abbildung II). In diesem Fall waren die Tiere statt mit *E. coli* mit dem Keim *S. pneumoniae* infiziert worden.

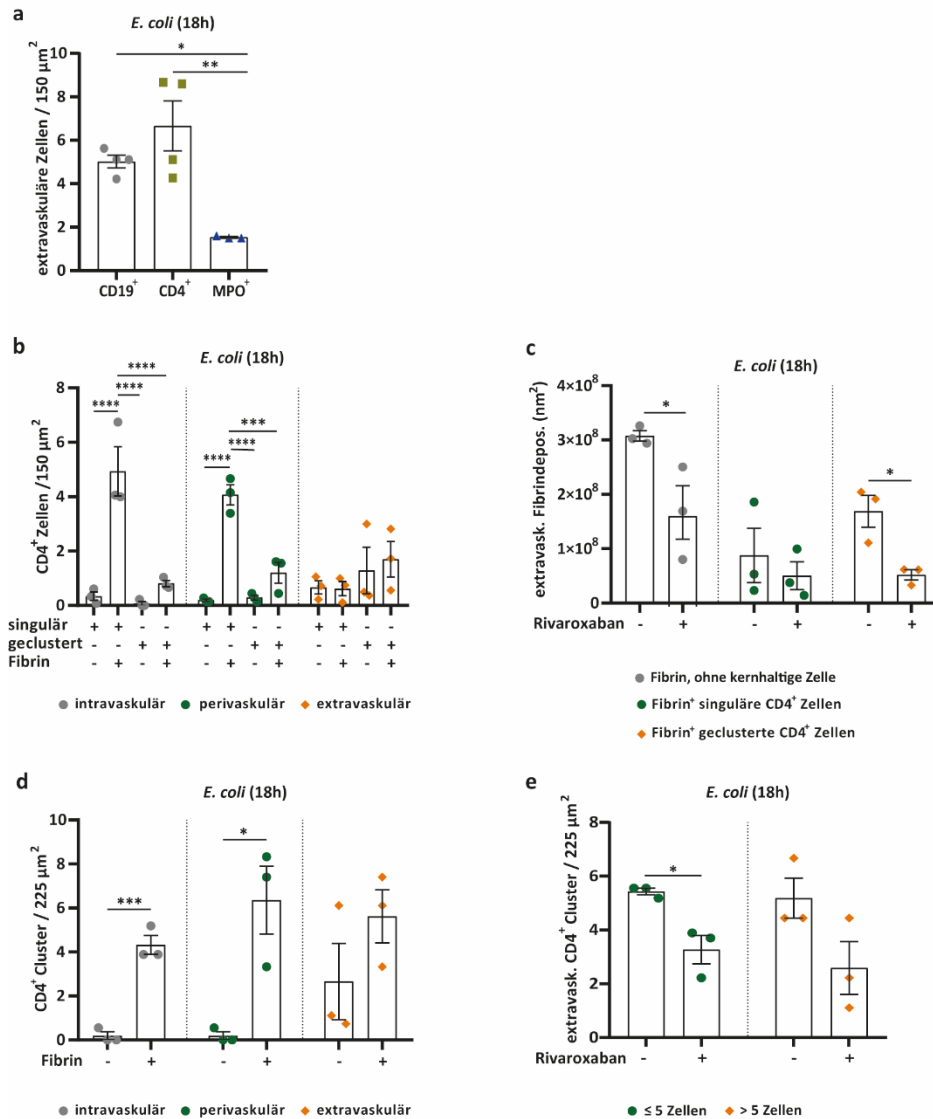


Abbildung 16 – Fibrinassoziation extravaskulärer CD4⁺ T-Zellen und T-Helferzell-Cluster in der Leber

a Extravaskuläre B-Zellen, T-Helferzellen und Neutrophile in der Leber junger Mäuse 18 Stunden nach Infektion mit *E. coli*. **b** Assoziation von singulären und geclusterten CD4⁺ T-Zellen mit Fibrin, welche sich intravaskulär, perivaskulär und extravaskulär in der Leber junger Mäuse befinden. Untersuchungszeitpunkt ist 18 Stunden nach *E. coli* Infektion. **c** Extravaskuläre Fibrindepotion, nicht assoziiert mit kernhaltigen Zellen oder assoziiert mit entweder einzeln vorkommenden extravaskulären CD4⁺ T-Zellen oder CD4⁺ T-Zellclustern 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion in Abhängigkeit von Rivaroxaban. **d** Assoziation von CD4⁺ T-Zellclustern mit Fibrin, welche sich intravaskulär, perivaskulär und extravaskulär in der Leber junger Mäuse befanden. Untersuchungszeitpunkt ist 18 Stunden nach *E. coli* Infektion. **e** Anzahl und Größe extravaskulärer CD4⁺ T-Zellcluster 18 Stunden nach *E. coli* Infektion in Abhängigkeit von Rivaroxaban in der Leber junger Mäuse.

Als perivaskulär lokalisiert werden Zellen bezeichnet, die sich extravaskulär befinden, der Abstand zur Gefäßwand jedoch < 1 μm ist. Als Cluster wurden Ansammlungen von mindestens 2 T-Helferzellen gewertet, wobei die Distanz zwischen den Nuklei ≤ 2 μm betrug. Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), $P < 0.0001$ (****).

4.3 Die Rolle von T-Helferzellen im fortgeschrittenen Infektionsverlauf in jungen Mäusen

4.3.1 Anzahl arretierter T-Helferzellen im Vergleich zu anderen Immunzellen

In den Lebersinusoiden junger Tiere war 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion die Anzahl intravaskulärer arretierter T-Helferzellen höher als die Adhäsion von B-Zellen, Neutrophilen, klassischen und nicht-klassischen Monozyten (Abbildung 17).

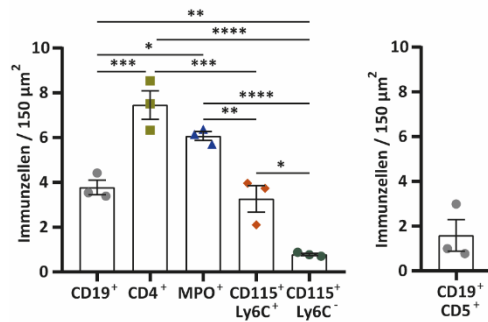


Abbildung 17 –Anzahl arretierter T-Helferzellen im Vergleich zu anderen Immunzellen in der Mikrozirkulation der Leber

Anzahl arretierter Immunzellen 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion in den Sinusoiden der Leber junger Mäuse. Charakterisierung von B-Zellen über CD19⁺, CD4⁺ T-Zellen über CD4⁺, Neutrophilen über MPO⁺, klassischen Monozyten über CD115⁺ Ly6C^{stark} und nicht-klassischen Monozyten über CD115⁺ Ly6C^{schwach}. B1a-Zellen wurden über CD19⁺ und CD5⁺ bestimmt.

Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), $P < 0.001$ (****).

Nach Depletion der T-Helferzellen kam es während der *E. coli*-Infektion zu einer Abnahme der adhärenen B-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion (Anhang, Abbildung IIIa, b). Kein Einfluss war dagegen auf Neutrophile, klassische und nicht-klassische Monozyten zu beobachten (Anhang, Abbildung IIIb).

4.3.2 Clusterbildung von T-Helferzellen in Abhängigkeit von Fibrin

Mittels Multiphotonen-Mikroskopie wurde mit Zunahme der Infektionsdauer eine vermehrte Clusterbildung der T-Helferzellen in der Mikrozirkulation der Leber junger Mäuse beobachtet (Abbildung 18a, b). Die Zunahme war am deutlichsten beim Vergleich mit dem Zeitraum von ein bis 5 Stunden zu erkennen. In Abbildung 18a wird eine repräsentative Multiphotonen-Aufnahme eines intravaskulären CD4⁺ T-Zell-Clusters gezeigt. Der Link zum zugehörigen Video 4 befindet sich im Anhang.

Um zu ergründen, ob diese Clusterbildung in jungen Mäusen fibrin-abhängig ist, wurde die Anzahl der intravaskulären T-Helferzell-Cluster nach Rivaroxaban-Behandlung zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion untersucht: Nach Rivaroxaban-Gabe waren 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion die intravaskulären T-Helferzellcluster in der Leber reduziert (Abbildung 18c). In Tendenzen war dies auch 6 Stunden nach *S. pneumoniae* Infektion der Fall (Abbildung 18d). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei Untersuchung der Th17-Zellen (Abbildung 18c, d). Die Mehrheit der detektierten T-Helferzell-Cluster waren fibrin-assoziiert, wobei dies durch die Behandlung mit Rivaroxaban stark reduziert wurde (Abbildung 18e). Rivaroxaban führte auch zu einer Reduzierung der Anzahl intravaskulärer CD4⁺ T-Zell-Cluster, welche zusätzlich noch mit mindestens einer B-Zelle assoziiert waren (Abbildung 18f).

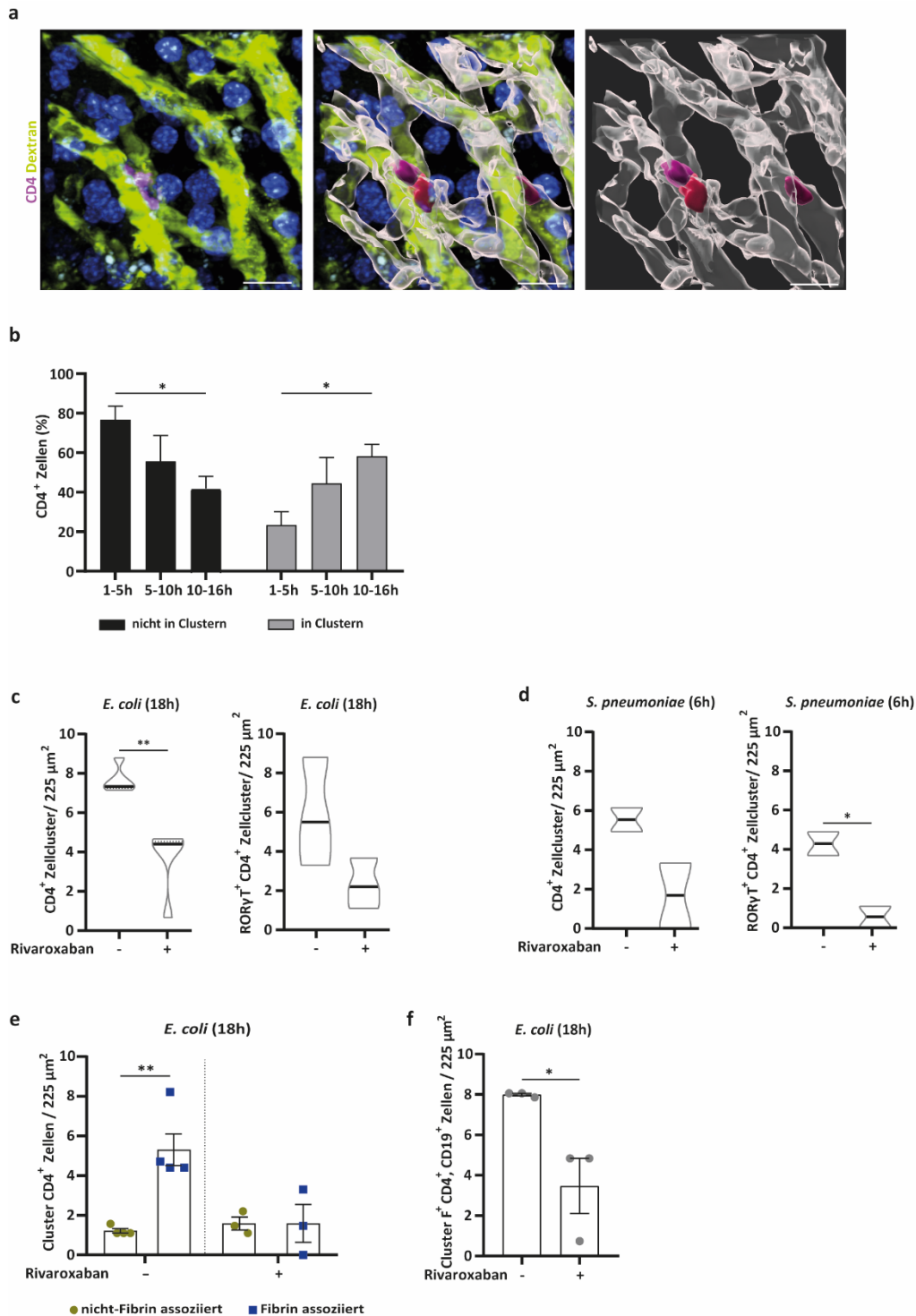


Abbildung 18 – Kinetik der Clusterbildung von T-Helferzellen in der Lebermikrozirkulation in Abhängigkeit von der Fibrinbildung

a Clusterbildung von $CD4^+$ T-Zellen im Lebermikrogefäß einer jungen Maus. Detektion mittels Multiphotonen-Mikroskopie, $CD4^+$ T-Zellen sind mit CMPTX markiert, die Gefäße wurden mit FITC-Dextran sichtbar gemacht. Aufnahmezeitraum zwischen 10 und 16h nach *E. coli*-Infektion. Messbalken ist $20\ \mu\text{m}$. Link zum zugehörigen Video 4 befindet sich im Anhang. **b** Zeitabhängige Clusterbildung von T-Helferzellen in der Lebermikrozirkulation junger Mäuse. Detektion mittels Multiphotonen-Mikroskopie. Pro Gruppe wurden jeweils 3 (1-5h, 10-16h) bzw. 2 (5-10h) Tiere untersucht. **c, d** Intravaskuläre Cluster bestehend aus T-Helferzellen und Th17-Zellen in den Lebersinusoiden junger Mäuse 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion (**c**) bzw. 6 Stunden nach *S. pneumoniae*-Infektion (**d**), jeweils nach

Rivaroxaban-Behandlung. e, f Fibrinassoziation der intravaskulären T-Helferzellcluster (e) bzw. mit zusätzlicher assoziierten B-Zellen (CD19⁺ Zellen) (f) 18 Stunden nach E. coli-Infektion in Abhängigkeit von Rivaroxaban. Als Cluster wurden Ansammlungen von mindestens 2 T-Helferzellen bezeichnet, welche sich in den Mikrogefäßen der Leber befanden und dabei die Distanz zwischen den Nuklei $\leq 2 \mu\text{m}$ betrug. Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. In Violinplots zeigen verstärkte horizontale Linien den Median und die gestrichelten Linien die 25te und 75te Quartile an. $P < 0.05$ (), $P < 0.01$ (**).*

4.3.3 Zirkulierende folliculäre T-Helferzellen in der Lebermikrozirkulation

Im Rahmen der Immunantwort kann es zur Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen in folliculäre T-Helferzellen (TfH) kommen¹¹¹. Neben den TfH in den Lymphknoten finden sich in der Blutzirkulation zirkulierende TfH (cTfH), die die Antikörperbildung durch B-Zellen fördern⁷⁵ und funktionell eine Art Gedächtniszelle der TfH bilden^{76,77}.

cTfH werden über ihre Rezeptoren PD1 und CXCR5 sowie über den Transkriptionsfaktor BCL6 definiert. Ein repräsentatives Bild einer einzelnen cTfH-Zelle sowie eines partiell extrahierenden cTfH-Clusters ist in Abbildung 19a zu sehen. Die cTfH hatten einen Anteil von etwa 40% an allen T-Helferzellen und lagen in den Sinusoiden der Leber gleichermaßen als Einzelzellen sowie in Clustern vor (Abbildung 19b, c).

cTfH lassen sich in verschiedene Subtypen wie Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Zellen unterteilen¹¹². In Abbildung 19d ist zu sehen, dass der Anteil an FOXP3⁺ cTfH deutlich größer war als der Anteil an GATA3⁺ cTfH. Der Anteil der Treg- und der Th2-cTfH-Zellen ist mit der Subtypen-Verteilung der gesamten T-Helferzellen vergleichbar (Abbildung 12d).

Generell scheint das Vorhandensein von cTfH nur tendenziell von der Höhe der Fibrindeposition in der Leber abhängig zu sein (Abbildung 19e).

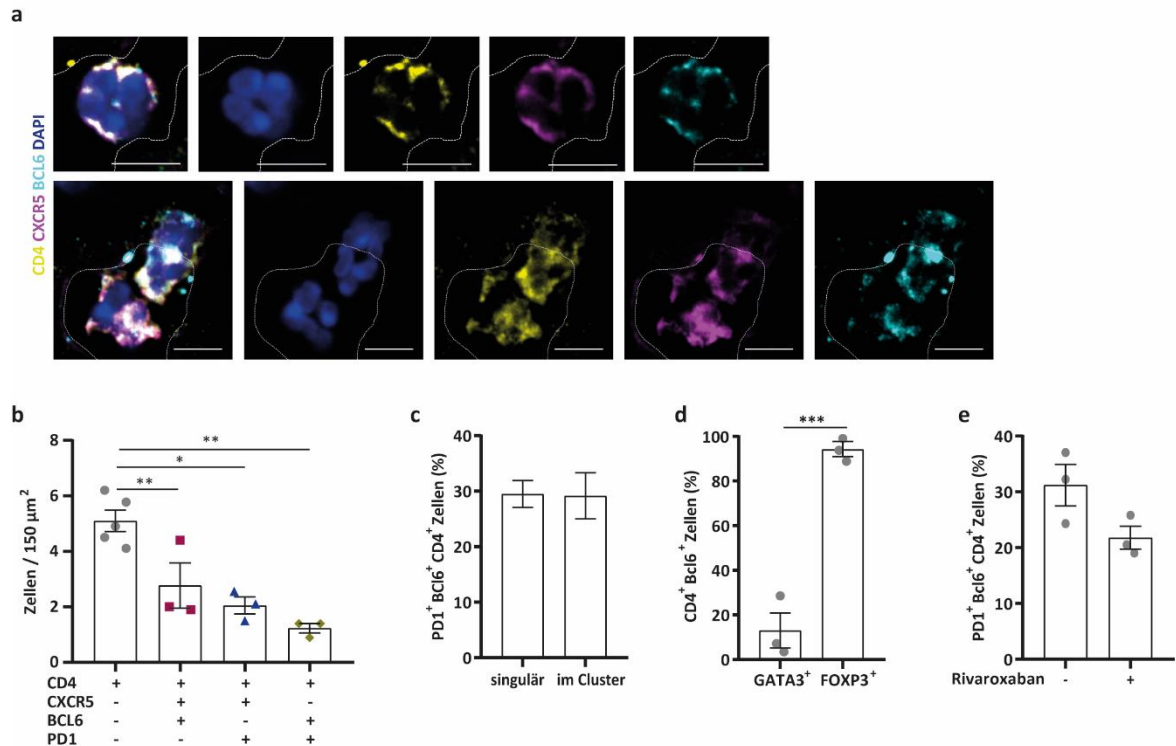


Abbildung 19 – Zirkulierende folliculäre T-Helferzellen in der Lebermikrozirkulation

a cTfH als Einzelzellen (oben) bzw. als Cluster vorliegend (unten), 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion. Messbalken ist 5 μ m. **b** Identifikation von cTfH über CD4, CXCR5, BCL6 und PD1, 18 Stunden nach Infektion mit *E. coli*. **c** Th2- und Treg-Subtyp-Bestimmung von intravaskulären cTfH, 18 Stunden nach Infektion. **d** Anteil intravaskulärer cTfH, vorliegend als Einzelzellen bzw. Cluster 18 Stunden nach Infektion. Jeweils 3 Tiere pro Gruppe. **e** Rekrutierung von cTfH in die Mikrozirkulation der Leber in Abhängigkeit von Rivaroxaban, 18 Stunden nach Infektion. Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***).

4.4 Aufnahme von IK durch CD4⁺ T-Zellen in jungen Mäusen

4.4.1 Interaktion von T-Helferzellen mit IK

Mit voranschreitender Infektion kommt es zur Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, welche mit dem Blutstrom zirkulieren. Hierbei wird Fremd-Antigen durch die Verbindung mit körpereigenen Antikörpern neutralisiert und anschließend phagozytiert. Typischerweise erfolgt die Aufnahme und Phagozytose der zirkulierenden IK mittels Fcγ Rezeptoren, welche auf B-Zellen, Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen exprimiert sind^{113,90}.

Um das Vorhandensein zirkulierender IK in infizierten Mäusen zu imitieren, wurden den jungen Mäusen 4 Stunden nach *E. coli*-Infektion Fluoreszenz-markierte αBSA-BSA-IK intravenös injiziert. In der Multiphotonen-Mikroskopie zeigte sich, dass die IK von intravaskulären CD4⁺ T-Zellclustern aufgenommen werden (Abbildung 20a; Video 5 im Anhang).

Neben den CD4⁺ T-Zellen wurden auch Kupfferzellen (F40/80⁺), B-Zellen (CD19⁺), Neutrophile (Ly6G⁺) sowie klassische Monozyten (Ly6C^{stark} Ly6G⁻) auf ihre Assoziation mit den IK untersucht. Hierbei waren die größten Anteile an IK mit den Kupfferzellen bzw. in intravaskulären Arealen ohne kernhaltige Zellen assoziiert (Abbildung 20b).

Auch die Fähigkeit zur Phagozytose von IK war bei den Kupfferzellen am ausgeprägtesten (Abbildung 20c). Jedoch hatten aber auch knapp 40% der CD4⁺ T-Zellen IK internalisiert, dies war tendenziell mehr als bei B-Zellen, Neutrophilen und klassischen Monozyten beobachtet werden konnte. Beim Vergleich der Aufnahmeeffizienz zeigte sich, dass – auf die Zellfläche gerechnet – T-Helferzellen mehr IK im Vergleich zu Kupfferzellen und B-Zellen aufnehmen (Abbildung 20d).

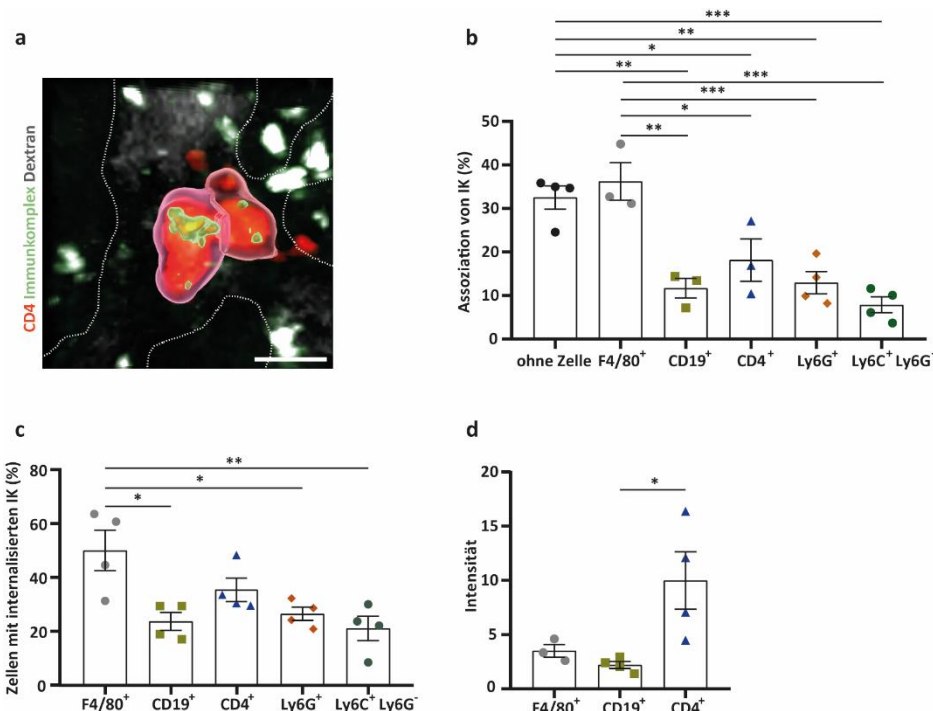


Abbildung 20 – Aufnahme von IK durch intravaskuläre CD4⁺ T-Zellen in der Leber junger Mäuse

a Aufnahme von fluoreszenzmarkierten IK durch CD4⁺ T-Zellcluster in den Lebersinusoiden. Detektion mittels Multiphotonen-Mikroskopie. CD4⁺ T-Zellen wurden mit CMPTX markiert, die Gefäße wurden mit FITC-Dextran sichtbar gemacht. Aufnahmezeitraum zwischen 10 bis 16 Stunden nach *E. coli*-Infektion. Messbalken ist 10 μ m. Zugehöriger Link zu Video 5 befindet sich im Anhang. **b** Assoziation von intravaskulären IK mit verschiedenen Zelltypen 6 Stunden nach *E. coli*-Infektion in der Leber. **c** Internalisierung von IK durch verschiedene Zelltypen in den Lebersinusoiden, 6 Stunden nach *E. coli*-Infektion. **d** Durchschnittliche Intensität der aufgenommenen IK pro Zelltyp 6 Stunden nach *E. coli*-Infektion.

Jeweils Charakterisierung von Kupfferzellen über F4/80⁺, B-Zellen über CD19⁺, CD4⁺ T-Zellen über CD4⁺, Neutrophilen über Ly6G⁺, klassischer Monozyten über Ly6C⁺ Ly6G⁻. Jeder Punkt steht jeweils für eine individuelle junge Maus. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)

4.4.2 Assoziation von CD4⁺ T-Zellen mit internalisierten IK mit Thrombosen

Die meisten der mikrovaskulären IK waren sowohl mit Thrombozyten als auch mit Fibrin assoziiert, unabhängig davon, ob eine kernhaltige Immunzelle vorhanden war (Abbildung 21a). Nur ein kleiner Anteil war weder mit Fibrin noch mit Thrombozyten assoziiert (*Daten nicht gezeigt*).

Im Vergleich zu den Kontrolltieren war nach IK-Injektion ein höherer Anteil an T-Helferzellen sowohl mit Thrombozyten als auch Fibrin assoziiert (Abbildung 21b).

Generell waren nahezu alle CD4⁺ T-Zellen mit internalisierten IK mit Fibrin assoziiert (Abbildung 21c). Von allen Neutrophilen (Ly6G⁺), welche IK internalisiert hatten, waren etwa 70% assoziiert zu Fibrin. Bei den klassischen Monozyten (Ly6C^{stark} Ly6G⁻) mit internalisierten IK war dahingegen keine Präferenz in der Fibrinassoziation zu erkennen.

Der Anteil der CD4⁺ T-Zellen mit internalisierten IK, welche assoziiert zu Thrombozyten und Fibrin waren, war deutlich höher als der Anteil, der nicht assoziiert war (Abbildung 21d).

Zusammengenommen bedeutet dies, dass IK vornehmlich mit T-Helferzellen in Thrombosen assoziiert sind bzw. von T-Helferzellen in Thrombosen internalisiert werden.

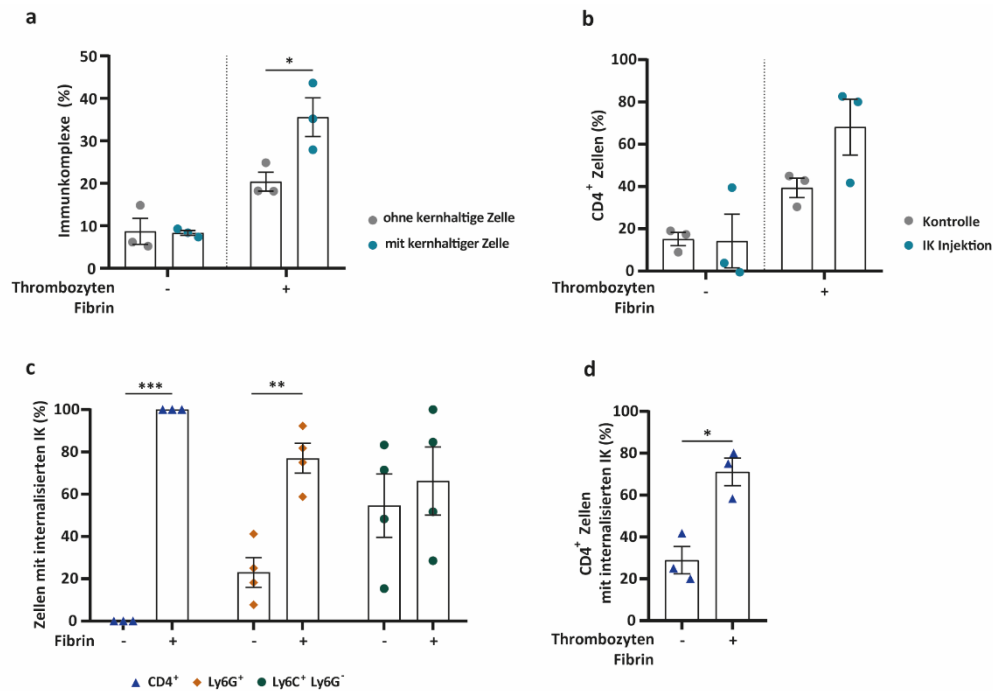


Abbildung 21 – Assoziation von CD4⁺ T-Zellen mit internalisierten IK mit Mikrothromben

a Intravaskuläre IK mit assoziierten Thrombozyten und Fibrin in den Lebersinusoiden junger Mäuse, ohne bzw. mit Assoziation einer kernhaltigen Immunzelle. **b** Assoziation von Thrombozyten und Fibrin mit CD4⁺ T-Zellen in den Lebermikrogefäßen von IK-supplementierten Tieren. **c** Assoziation verschiedener Zelltypen, welche IK internalisiert haben, mit Fibrin in den Lebersinusoiden. Charakterisierung von CD4⁺ T-Zellen über CD4⁺, Neutrophilen über Ly6G⁺, klassischer Monozyten über Ly6C⁺ Ly6G⁻. **d** Assoziation von Thrombozyten und Fibrin mit CD4⁺ T-Zellen, die IK internalisiert haben. Untersuchung junger Mäuse, jeweils 6 Stunden nach Infektion mit *E. coli* (**a-d**).

Jeder Punkt steht für ein individuelles junges Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)

Neben der Internalisierung von IK durch Kupfferzellen wurde auch die Phagozytose von LPS im Zusammenhang mit der Fibrin-Bildung in den Lebersinusoiden junger Mäuse untersucht. Zwar war die Anzahl der Kupfferzellen, welche LPS aufgenommen hatten, bei erniedrigter Fibrinbildung unverändert, dagegen in Nur77^{-/-} - Mäusen, welche nach *E. coli* - Infektion sichtbar verstärkte Fibrinbildung zeigten, deutlich erhöht. Wurde die Fibrinbildung durch „Rescue“-Injektion nicht-klassischer Monozyten wieder vollständig auf WT-Niveau gebracht, lag auch die Anzahl der LPS⁺ Kupferzellen wieder auf Niveau des WT (Anhang, Abbildung IV; vgl. Daten zur Fibrinbildung¹¹⁴).

4.4.3 Verhinderung der Aufnahme von IK durch Blockade des Fcγ-Rezeptors

Die Aufnahme von IK wird über Fcγ-Rezeptoren vermittelt⁹¹. Dieser Prozess kann durch Inhibierung der Fcγ-Rezeptoren III und II (CD16 und CD32) mittels intravenöser Injektion von αCD16/CD32-Antikörpern, blockiert werden¹¹⁵. Bisher ist in der Literatur noch wenig darüber bekannt, ob CD4⁺ T-Zellen Fcγ-Rezeptoren exprimieren. Ausgehend von der mRNA-Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass T-Helferzellen die Fcγ-Rezeptoren I, IIb, III und IV exprimieren, und dass deren Expression im Laufe der Infektion zunimmt (Tabelle 14). Die RNA wurde hierbei aus der Leber von Mäusen, welche nicht infiziert waren, und aus der Leber infizierter Mäuse 3 bzw. 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion isoliert.

FcγR-Gen	3h vs. 0h	18h vs. 3h
<i>FCGR1</i>	0.610690	1.829649
<i>FCGR2B</i>	0.270086	1.089095
<i>FCGR3</i>	0.719321	2.167122
<i>FCGR4</i>	1.096360	1.638213

Tabelle 14 – Relative Expressionsänderung von Genen der Fcγ-Rezeptoren der CD4⁺ T-Zellen
Relative Expressionsänderung (log2FC – apeg1m) der mRNA aus der Leber isolierten CD4⁺ T-Zellen von nicht-infizierten und infizierten Mäusen nach drei- bzw. 18-stündiger *E. coli*-Infektion. Gezeigt sind nur signifikante Expressionsänderungen der Gene (adjusted p-value < 0.05).

Durch die Blockade von CD16 und CD32 kam es zu einer stark verringerten Aufnahme von IK durch T-Helferzellen in der Lebermikrozirkulation (Abbildung 22a und b). Auch reduzierte die Blockade der Rezeptoren deutlich die Aufnahme von IK durch kernhaltige intravaskuläre Zellen allgemein (Abbildung 22c).

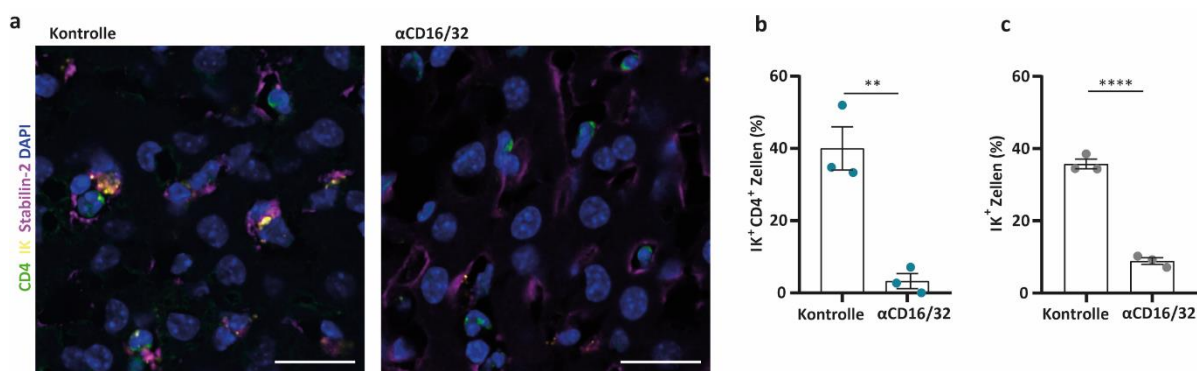


Abbildung 22 – Blockade der Aufnahme von IK durch CD4⁺ T-Zellen nach Inhibition von Fcγ-Rezeptoren (CD16/32)
Repräsentative Bilder (a) und Quantifizierung (b) der Aufnahme von IK durch intravaskuläre T-Helferzellen in der Lebermikrozirkulation nach Inhibition des Fcγ-Rezeptors mit αCD16/CD32-Antikörper. Messbalken ist 20 μm. c Aufnahme von IK durch intravaskuläre Immunzellen in der Leber nach Behandlung mit αCD16/CD32-Antikörpern. Jeweils 6 Stunden nach Infektion mit *E. coli* (b, c).

Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.01$ (**), $P < 0.0001$ (****).

4.5 Bildung von Mikrothrombosen in der Leber alter Mäuse bei systemischer Infektion

4.5.1 Gefäßverschlüsse in der Mikrozirkulation der Leber

Um den Einfluss des Alters auf die Bildung von (Immuno-)Thrombosen im Rahmen einer systemischen bakteriellen Infektion zu untersuchen, wurden alten Mäusen *E.coli* intravenös injiziert und die dadurch induzierte intravaskuläre Fibrinbildung und Gefäßobstruktionen in der Mikrozirkulation der Leber analysiert (Abbildung 23a-c). Ein Teil der Mäuse war zuvor mit Rivaroxaban behandelt worden. Rivaroxaban induzierte eine verminderte Fibrinbildung in den Lebersinusoiden (Abbildung 23a). Parallel dazu kam es zu einer starken Abnahme der Bildung von Mikrothromben und tendenziell zu einer Reduktion von Okklusionen (Abbildung 23b). Die Abnahme zeigte sich vor allem bei den zellhaltigen Mikrothromben (Abbildung 23c).

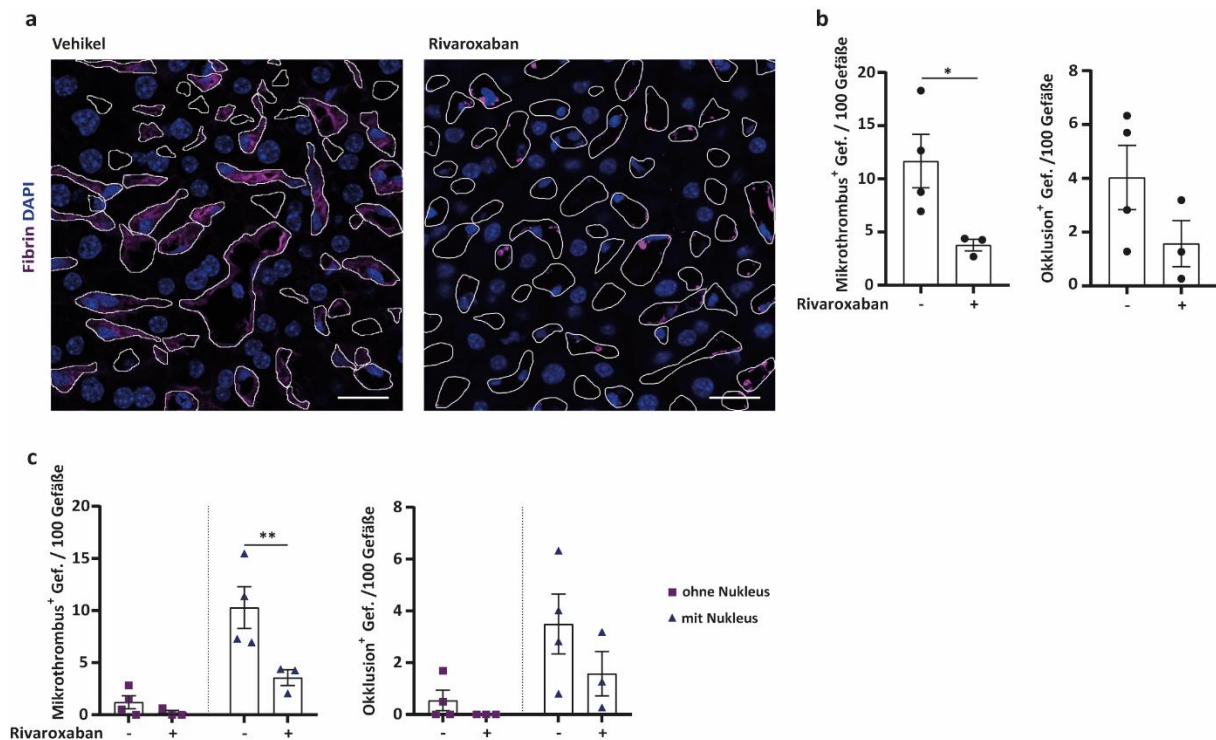


Abbildung 23 – Mikrovaskuläre Fibrinbildung und Gefäßverschluss bei alten Mäusen während systemischer Infektion

a Repräsentative Darstellung von Fibrinbildung und Gefäßokklusion in der Mikrozirkulation der Leber 3 Stunden nach *E. coli*-Infektion in alten Mäusen. Behandlung mit Rivaroxaban bzw. Vehikellösung. Messbalken ist 20 μ m. **b, c** Anzahl der Gefäße mit Mikrothromben und Okklusionen (**b**) und Verteilung der zellfreien und -haltigen Mikrothromben bzw. Okklusionen (**c**) in den Lebersinusoiden alter Mäuse, 3 Stunden nach *E. coli*-Infektion. Punkte beziehen sich jeweils auf biologische Replikate. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**).

4.5.2 Interaktion von Immunzellen mit Mikrothromben und Gefäßverschlüssen

Wir untersuchten zunächst welche Immunzellen in die Mikrozirkulation alter Mäuse rekrutiert wurden. Wir fanden, dass neben CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, Neutrophile, klassische und nicht-klassische Monozyten rekrutiert wurden (Abbildung 24a). Rivaroxaban verminderte selektiv die Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen.

Anschließend wurden die Mikrothromben bei alten Mäusen näher charakterisiert. Im Einzelnen fanden sich CD8⁺ T-Zell-, CD4⁺ T-Zell-, Neutrophil-, klassische und nicht-klassische Monozyt-spezifische Thromben (Abbildung 24b). Die CD4⁺ T-Zell-, Neutrophil- und klassischen Monozyt-spezifischen Thromben führten zu zell-spezifischen Okklusionen (Abbildung 24c). Nach Behandlung mit Rivaroxaban waren die T-Helferzell- sowie die klassischen Monozyten-spezifischen Mikrothromben bzw. Okklusionen deutlich reduziert (Abbildung 24b, c). Auch die Neutrophil-spezifischen Mikrothromben und Okklusionen nahmen tendenziell ab.

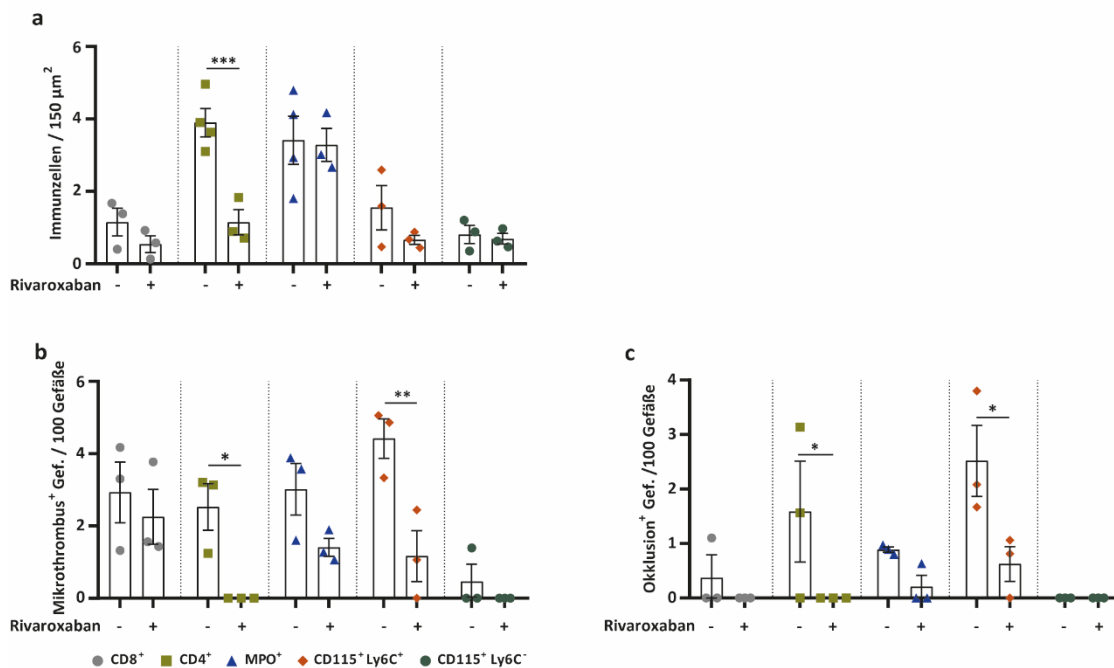


Abbildung 24 – Charakterisierung zellhaltiger Mikrothromben und Gefäßverschlüsse in der Lebermikrozirkulation alter Mäuse

a Effekt von Rivaroxaban-Behandlung auf Anzahl arretierter Immunzellen in der Mikrozirkulation der Leber nach dreistündiger *E. coli*-Infektion in alten Mäusen. **b, c** Differenzierung intravaskulärer zellhaltiger Mikrothromben (**b**) und Okklusionen (**c**) anhand ihres Zelltypes. Untersuchung der Lebersinusoiden alter Mäuse nach dreistündiger *E. coli* Infektion in Abhängigkeit von vorausgegangener Rivaroxaban-Behandlung.

Charakterisierung von CD8⁺ T-Zellen über CD8⁺, CD4⁺ T-Zellen über CD4⁺, Neutrophilen über MPO⁺, klassischer Monozyten über CD115⁺ Ly6C^{stark} und nicht-klassischer Monozyten über CD115⁺ Ly6C^{schwach}.

Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***).

4.6 Charakterisierung von NETs-Formation und Neutrophilen Subtypen bei systemischer Infektion in alten Mäusen

4.6.1 Einfluss der Koagulation auf die NETs-Bildung in jungen und alten Mäusen

Bisher wurde gezeigt, dass CD4⁺ T-Zellen während systemischer Infektionen in jungen Mäusen im Rahmen einer frühen innate Immunantwort eine bedeutende Funktion als Fibrinolyse-fördernde Immunzellen besitzen. Bekanntermaßen fungieren im Gegensatz dazu Neutrophile als prothrombotische Immunzellen durch ihre Fähigkeit zur NETs-Bildung als Hauptakteure bei der Entstehung von Immunothrombosen⁸.

Da mit zunehmendem Alter das Risiko steigt einen schweren septischen Verlauf im Rahmen einer systemischen Infektion zu entwickeln und auch die Entwicklung von Thrombosen erhöht ist, wurden hier Mäuse unterschiedlichen Alters untersucht^{116,117}. Um potentielle Unterschiede in der NETs-Bildung bei alten Mäusen zu detektieren, wurden alte und junge Tiere mit *E. coli* bzw. *S. pneumoniae* infiziert.

Die Anzahl rekrutierter Neutrophiler war nach dreistündiger *E. coli* Infektion in jungen und alten Tieren vergleichbar (Abbildung 25a). Die Reduktion der Fibrinbildung durch den Faktor Xa-Inhibitor Rivaroxaban beeinflusste die Rekrutierung der Neutrophilen und die NETs-Bildung in alten Mäusen nicht (Abbildung 25a, b). Jedoch war die Bildung von NETs in alten Mäusen im Vergleich zu jungen Mäusen tendenziell erhöht (Abbildung 25b).

In jungen Mäusen und tendenziell auch in alten Mäusen kam es zu einer Abnahme arretierter Neutrophiler in der Lebermikrozirkulation 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion auf Grund vorausgegangener Rivaroxaban-Behandlung (Abbildung 25c). Interessanterweise bewirkte dagegen Rivaroxaban sowohl in jungen als auch alten Mäusen eine deutlich gesteigerte Bildung von NETs pro arretierten Neutrophilen (Abbildung 25d).

In alten Mäusen war auch nach *S. pneumoniae*-Infektion zu einem etwas früheren Zeitpunkt auf Grund der Behandlung mit Rivaroxaban eine gesteigerte NETose beobachtbar, wobei die Anzahl arretierter Neutrophiler unverändert blieb (Abbildung 25e, f).

Die Ursachen für die verstärkte NETs-Bildung nach Rivaroxaban-Gabe sind unklar.

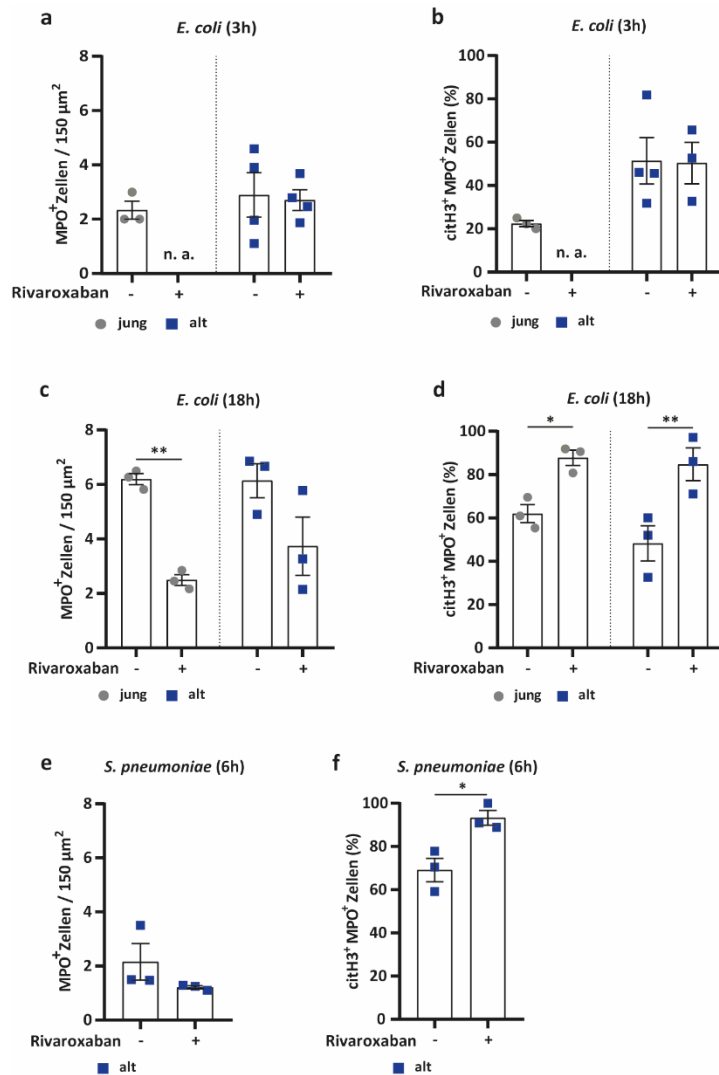


Abbildung 25 – Koagulationsabhängige Freisetzung von NETs in der Mikrozirkulation der Leber

a, c, e Rekrutierung MPO⁺ Neutrophiler 3 Stunden (**a**) bzw. 18 Stunden (**c**) nach Infektion mit *E. coli* in jungen und alten Mäusen oder 6 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* in alten Mäusen (**e**) jeweils nach Behandlung mit Rivaroxaban. **b, d, f**, Anteil der von Neutrophilen freigesetzten citH3⁺ MPO⁺ NETs pro Gesamtzahl MPO⁺ Neutrophiler in der Mikrozirkulation der Leber 3 (**b**) bzw. 18 Stunden (**d**) nach Infektion mit *E. coli* in jungen und alten Mäusen oder 6 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* in alten Mäusen (**f**), jeweils nach Behandlung mit Rivaroxaban.

Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**).

n. a. - nicht analysiert.

4.6.2 Die Aktivierung von Faktor XII durch Nukleosomen

Es ist bekannt, dass negativ geladene Polymere wie die DNA FXII aktivieren können. Jedoch sind die Mechanismen der Faktor XII-Aktivierung durch NETs noch ungeklärt. Da NETs externalisierte Nukleosome darstellen, wurden verschiedenen Nukleosom-Kernpartikel präpariert und ihre Wirkung auf die FXII-Aktivierung analysiert.

Als Negativkontrolle diente Puffer, als Positivkontrolle Kaolin. Das negativ geladene Kaolin bewirkte erwartungsgemäß eine sehr starke Aktivierung von FXII (Abbildung 26). Unter den Nukleosom-Kernpartikeln induzierten die nukleosomalen Kernpartikel ohne Linker DNA (ON0) eine starke FXIIa-Bildung. Die Aktivierung durch die 147 bp DNA-Fragmente viel im Vergleich dazu geringer aus. 40N40 induzierte dagegen nur eine mäßige Aktivierung von Faktor XII.

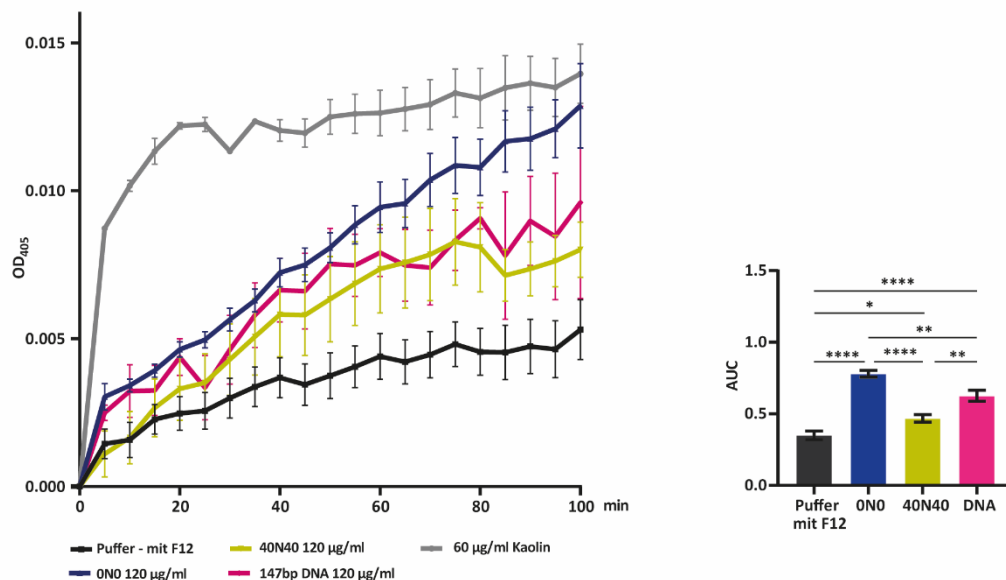


Abbildung 26 – Wirkung verschiedener Nukleosom-Kernpartikel bzw. freier DNA auf die Bildung von Faktor XIIa in vitro

Links: Veränderung der 405nm-Absorption durch Spaltung des chromogenen Substrats S-2302 als Maß für die Aktivierung von Faktor XII. Messpunkte zwischen 5 und 100 Minuten nach Reaktionsstart. Als Proben wurden die Nukleosom-Kernpartikel ON0 und 40N40, sowie 147 bp DNA jeweils in der Konzentration 100 µg/ml eingesetzt.

Rechts: „Area under the curve“ (AUC) der im linken Teil der Abbildung gezeigten Kurven.

Alle Messreihen stammen von jeweils 5 unabhängigen biologischen Replikaten. Für jede Messreihe wurden jeweils 2 technische Replikate gemittelt. Fehlerbalken zeigt SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.0001$ (***).

4.6.3 Verteilung maturer und unreifer Neutrophiler während systemischer Infektionen

Neutrophile werden üblicherweise erst nach vollständiger Reifung in den Blutkreislauf freigesetzt. Ist der Bedarf an Neutrophilen – beispielsweise durch eine systemische Infektion – größer als es die im Blutstrom vorhandenen Neutrophilen bewältigen können, wird die Reifezeit der Neutrophilen im Knochenmark verkürzt und es kommt zur Freisetzung von unreifen (immaturen) Neutrophilen⁶⁶. Für schwere systemische Infektionen wie Sepsis und COVID-19 ist ein erhöhtes Auftreten unreifer Neutrophiler im Blutkreislauf bekannt^{66,118,119}, unklar ist, ob dies mit dem Alter des Individuums korreliert.

Daher wurde mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen analysiert, ob sich bei jungen und alten Mäusen der Anteil unreifer (CD101⁻) bzw. maturer (CD101⁺) Neutrophiler unterscheidet. 3 Stunden nach *E. coli*-Infektion war bei jungen Mäusen der Anteil matura Neutrophiler in Leber und Lunge deutlich höher als der Anteil unreifer Neutrophiler (Abbildung 27a, b). Umgekehrt konnten in der Leber alter Mäuse mehr unreife und weniger matura Neutrophile detektiert werden. In der Lunge wiederum war die Verteilung bei den alten Mäusen ähnlich wie bei den jungen Mäusen (Abbildung 27b).

Generell war in Leber und Lunge nicht-infizierter alter Tiere der Anteil unreifer Neutrophiler höher als der Anteil maturer Neutrophiler (Abbildung 27c, d). Mit Infektionsverlauf nahm schließlich der Anteil unreifer Neutrophiler wieder ab (Abbildung 27c, d).

Des Weiteren wurde die koagulationsabhängige Verteilung unreifer und maturer Neutrophiler in der Leber und Lunge alter Mäuse in unterschiedlichen Stadien einer bakteriellen Infektion analysiert (Abbildung 27d; Anhang, Abbildung V). In der Leber veränderte Rivaroxaban die Verteilung unreifer und maturer Neutrophiler nicht (Anhang, Abbildung V). In der Lunge von alten Mäusen kam es nach Rivaroxaban-Gabe zu allen Zeitpunkten der Infektion zu einer starken Zunahme der unreifen Neutrophilen im Vergleich zu den Kontrollbehandelten Tieren (Abbildung 27e).

Da bei systemischen Infektionen in alten Individuen im Vergleich zu jungen Tieren verstärkt unreife Neutrophile auftreten und bei alten Tieren gleichzeitig im Infektionsverlauf die Anzahl unreifer Neutrophiler abnimmt, könnte dies den Schluss zulassen, dass unreife Neutrophile bei schweren Infektionen nicht nur verstärkt freigesetzt werden, sondern auch verstärkt verbraucht werden. Gleichzeitig könnte das verstärkte Vorhandensein bei alten Individuen nachteilig für einen raschen Genesungsprozess sein.

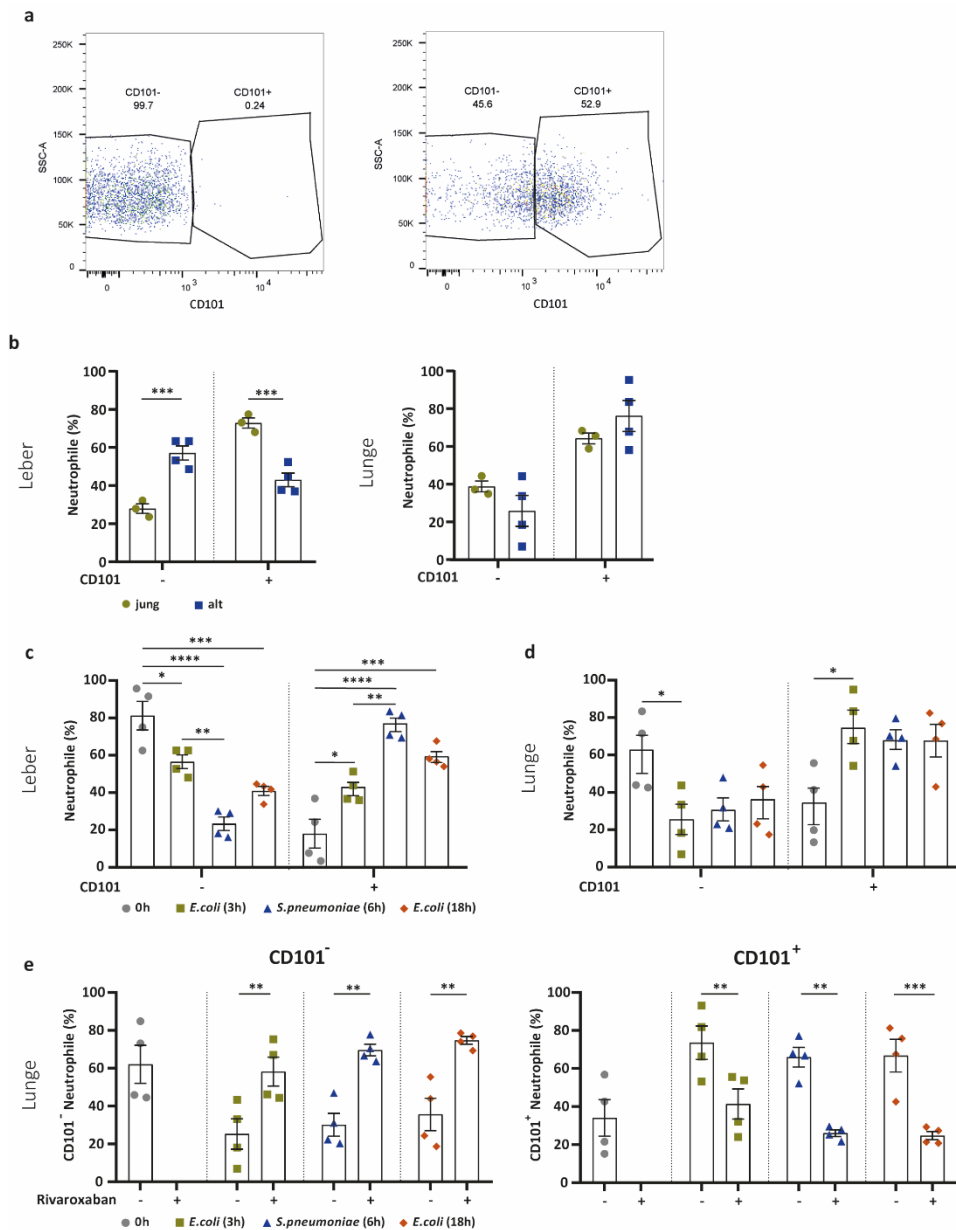


Abbildung 27 – Einfluss des Alters und von Rivaroxaban auf die Verteilung immaturer (CD101⁻) und maturer (CD101⁺) Neutrophiler

a Repräsentative Darstellung des Gatings der durchflusszytometrischen Analyse: FMO-Kontrolle des Antikörpers CD101 (links) und Vollfärbung (rechts) der Zellisolate aus der Leber einer jungen WT-Maus 3 Stunden nach Infektion. **b** Durchflusszytometrische Auswertung der Verteilung CD101⁻ und CD101⁺ Neutrophiler in jungen und alten Mäusen 3 Stunden nach Infektion mit *E. coli*. Zellisolate jeweils aus Leber (links) und Lunge (rechts). **c, d** Verteilung von CD101⁻ und CD101⁺ Neutrophilen in nicht-infizierten alten Mäusen, sowie 3 und 18 Stunden nach *E.coli*-Infektion bzw. 6 Stunden nach *S. pneumoniae*-Infektion. Zellisolate jeweils aus Leber (**c**) und Lunge (**d**). **e**, Verteilung von CD101⁻ und CD101⁺ Neutrophilen in nicht-infizierten alten Mäusen, sowie 3 und 18 Stunden nach *E.coli*-Infektion bzw. 6 Stunden nach *S. pneumoniae*-Infektion. Vor Infektion wurden die Tiere mit Rivaroxaban bzw. der Vehikel-Lösung als Kontrolle behandelt. Zellisolate jeweils aus der Lunge. Daten zu Kontroll-behandelten, infizierten alten Tieren aus **b, c, d** und **e** identisch. Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), $P < 0.0001$ (****).

4.6.4 Einfluss des Alters und der Koagulation auf die Neutrophilen-Expression von CXCR4

Die Rekrutierung der Neutrophilen in den Blutkreislauf unterliegt zirkadianen Rhythmen: Die Freisetzung und das „Homing“ der Neutrophilen ist hauptsächlich von der zirkadianen Expression des Rezeptors CXCR4 abhängig. Mit zunehmender Verweildauer der Neutrophilen in der Zirkulation nimmt auch die Expression von CXCR4 zu. Auch das Vorhandensein von Pathogenen kann die Expression von CXCR4 und damit das Altern der Neutrophilen in der Zirkulation beeinflussen⁶⁷.

Jedoch ist unklar, ob das Alter des Individuums einen Einfluss auf die CXCR4-Expression bei der Pathogenbekämpfung hat. Diese Fragestellung sollte mittels durchflusszytometrischen Analysen beantwortet werden.

In jungen Tieren exprimierten nahezu alle Neutrophilen der Leber und Lunge den „Homing“-Marker CXCR4 während einer dreistündigen *E. coli*-Infektion (Abbildung 28a, b). Im Gegensatz dazu war in den alten Tieren die CXCR4-Expression der Neutrophilen in der Leber und vor allem in der Lunge deutlich reduziert (Abbildung 28b).

In nicht-infizierten, alten Tieren war der Anteil von CXCR4⁻ und CXCR4⁺ Neutrophilen in Leber und Lunge jeweils bei etwa 50% (Abbildung 28c, d). Des Weiteren wurde die Expression von CXCR4 bei alten Mäusen in unterschiedlichen Stadien bakterieller Infektionen untersucht, wobei die Infektion keine Änderung der Expression in der Leber hervorrief (Abbildung 28c). Dagegen kam es in der Lunge über die Zeit zu einer Abnahme des Anteils CXCR4⁺ Neutrophiler (Abbildung 28d).

Grundsätzlich hatte die Verabreichung von Rivaroxaban bei alten Tieren keinen Einfluss auf die Expression von CXCR4 auf Neutrophilen (Anhang, Abbildung VI). Jedoch kam es 3 Stunden nach *E. coli*-Infektion bei Rivaroxaban-behandelten alten Mäusen anteilig zu einer verminderten Expression von CXCR4 im Verhältnis zu den Kontroll-behandelten Tieren und dementsprechend zur Abnahme des Anteils an CXCR4⁺ Neutrophilen (Abbildung 28e).

Da junge Mäuse im Vergleich zu alten Tieren nach Infektion eine erhöhte Expression des Alterungsrezeptors CXCR4 auf Neutrophilen aufweisen, könnte dies ein Grund für die bessere Pathogenbekämpfung durch Neutrophile in jungen Individuen sein¹²⁰.

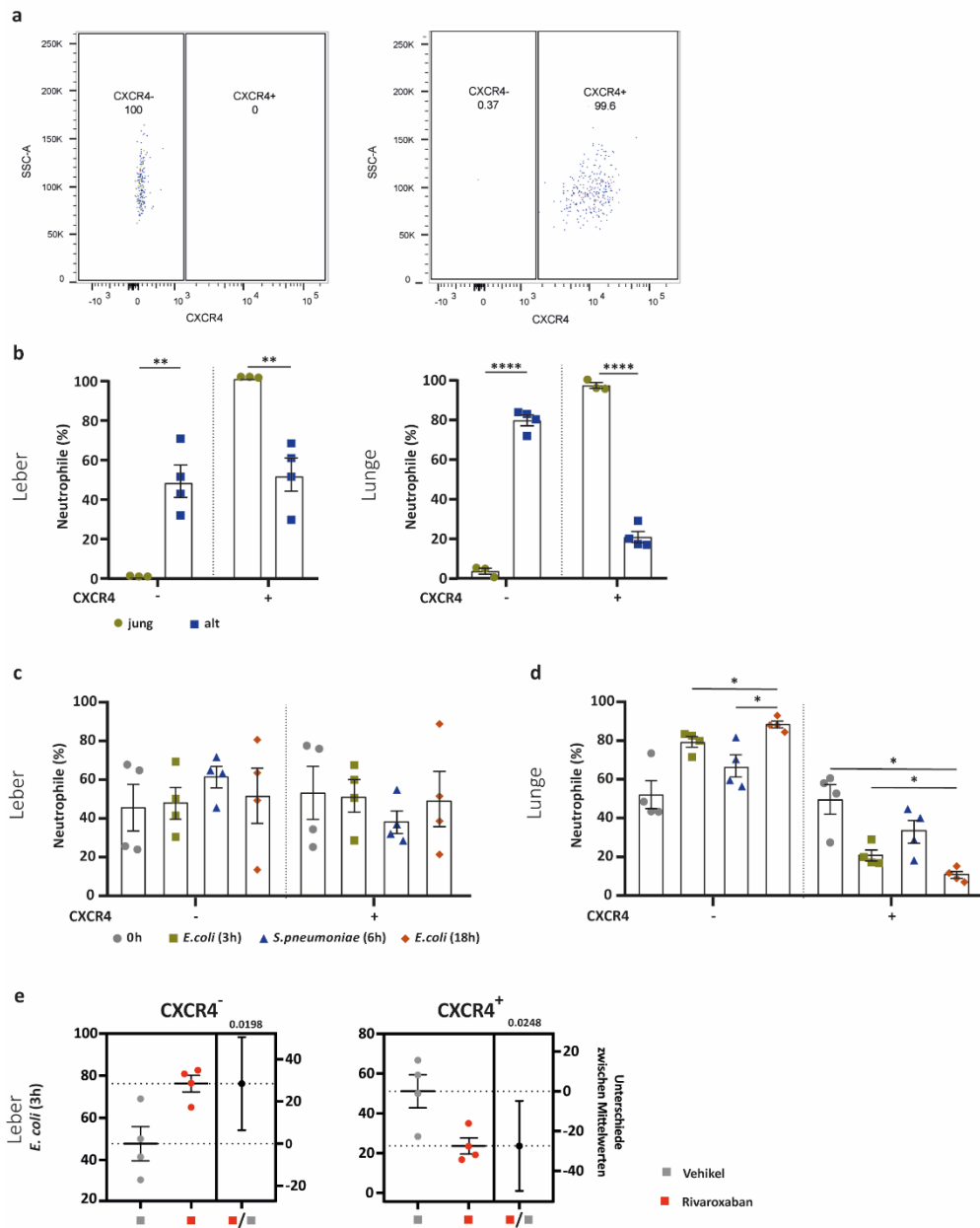


Abbildung 28 – Expression von CXCR4 in Neutrophilen

a Repräsentative Darstellung des Gatings der durchflusszytometrischen Analyse: FMO-Kontrolle des Antikörpers CXCR4 (links) und Vollfärbung (rechts) der Zellisolate aus der Leber einer jungen WT-Maus 3 Stunden nach *E. coli*-Infektion. **b** Durchflusszytometrische Auswertung der Verteilung CXCR4⁻ und CXCR4⁺ Neutrophiler in jungen und alten Mäusen 3 Stunden nach Infektion mit *E. coli*. Zellisolate jeweils aus Leber (links) und Lunge (rechts). **c, d** Verteilung von CXCR4⁻ und CXCR4⁺ Neutrophilen in nicht-infizierten alten Mäusen, sowie 3 bzw. 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion und 6 Stunden nach *S. pneumoniae*-Infektion in alten Mäusen. Zellisolate jeweils aus Leber (**c**) und Lunge (**d**). **e** Schätzungsdiagramme stellen die Größe eines Effekts zusammen mit der visuellen Darstellung seiner Genauigkeit (Konfidenzintervall) dar. Linke Hälfte: Zellisolate aus der Leber alter Mäuse, 3 Stunden nach *E. coli*-Infektion. Rechte Hälfte: Effektgröße, die Differenz zwischen den Mittelwerten und Präzision der berechneten Effektgröße als 95%-Konfidenzintervall. Ungepaarte, zweiseitige t-Tests, P-Werte: 0.0198 (*) für CXCR4⁻ und 0.0248 (*) für CXCR4⁺.

Daten zu Kontroll-behandelten, infizierten alten Tieren aus **b, c, d** und **e** identisch. Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.0001$ (****).

4.6.5 Vorläuferzellen von Neutrophilen: Effekt des Alters und der Koagulation

Die im Knochenmark befindlichen Vorläuferzellen von Neutrophilen (preNeu) sind CD117⁺ und reifen über immature CD101⁻ CD117⁻ Neutrophile zu murenen CD101⁺ CD117⁻ Neutrophilen heran. Die in die Zirkulation freigesetzten Neutrophile CD117⁻ und können sowohl CD101⁻ als auch CD101⁺ sein⁶⁰. Da bereits festgestellt wurde, dass es im Rahmen bakterieller systemischer Infektionen zum Auftreten immaturer Neutrophiler in Leber und Lunge kommt, wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht, ob während systemischer bakterieller Infektionen auch CD117⁺ preNeu in Leber oder Lunge nachweisbar sind.

Der Anteil an CD117⁺ Neutrophilen war 3 Stunden nach *E. coli*-Infektion bei jungen Tieren deutlich höher als bei alten Tieren (Abbildung 29a, b), wobei der Unterschied in der Leber ausgeprägter als in der Lunge war.

Anschließend wurde in alten Mäusen das Vorhandensein von preNeu im weiteren Infektionsverlauf mit *E. coli* und *S. pneumoniae*, sowie in Abhängigkeit einer Rivaroxaban-Behandlung untersucht (Anhang, Abbildung VII). Die meisten der Neutrophilen in der Leber alter Tiere waren CD117⁻, dabei war kein Unterschied zu nicht-infizierten Tieren erkennbar. Auch die Dauer der Infektion, der Keim und die Behandlung mit Rivaroxaban bewirkten kein verstärktes Vorkommen von preNeu in der Leber (Anhang, Abbildung VII). Im Vergleich zur Leber kam es in der Lunge alter Mäuse zu einem verstärkten Auftreten von preNeu, hier lag der Anteil CD117⁺ Neutrophiler bei etwa 60%. Dennoch war kein Unterschied zu infizierten Tieren erkennbar. Dabei hatten weder die Infektionsdauer, die Wahl des Keims, noch die Behandlung mit Rivaroxaban einen Einfluss auf das Verhältnis CD117⁻ zu CD117⁺ Neutrophiler (Anhang, Abbildung VII).

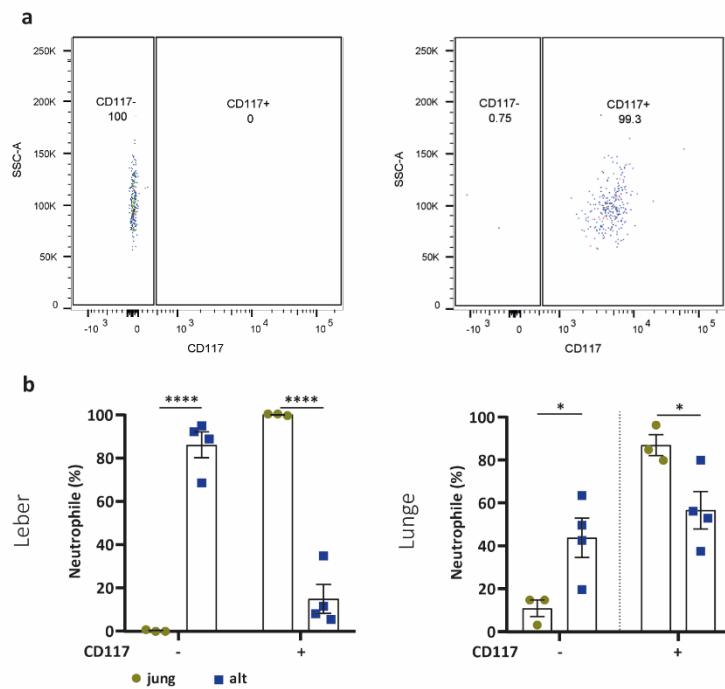


Abbildung 29 – Verteilung von Vorläufer-Neutrophiler (CD117⁺) in Abhängigkeit vom Mausalter

a Repräsentative Darstellung des Gatings der durchflusszytometrischen Analyse: FMO-Kontrolle des Antikörpers CD117 (links) und Vollfärbung (rechts) der Zellisolate aus der Leber einer jungen WT-Maus 3 Stunden nach Infektion. **b** Durchflusszytometrische Auswertung der Verteilung von CD117⁻ und CD117⁺ Neutrophiler in jungen und alten Mäusen 3 Stunden nach Infektion mit *E. coli*. Zellisolate jeweils aus Leber und Lunge.

Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.0001$ (****).

4.7 Potentielle Rolle der T-Helferzellen für die Thrombosebildung von Patienten mit viralen Infektion

4.7.1 Negative Assoziation von Gefäßverschlüssen mit T-Helferzellen

Virale Krankheitserreger können beim Menschen die Bildung von dysregulierten Immuno-thrombosen mit potentiell lebensbedrohlichen mikro- und makrovaskulären Gefäßverschlüssen auslösen. Über die Rolle der T-Helferzellen bei Immuno-thrombosen während viraler Infektionen ist dabei noch wenig bekannt.

Um die Bedeutung der T-Helferzellen für die Entstehung von Thrombosen bei Patienten mit viralen Infektionen zu untersuchen, wurden Lungenproben von Patienten ausgewertet, welche an oder mit dem Influenza-Virus bzw. SARS-CoV-2-Viren verstorben waren.

Bei allen untersuchten Patienten wurden multiple Gefäßobstruktionen beobachtet (Abbildung 30a, b). In den SARS-CoV-2-Patienten waren im Vergleich zu den Influenza-Patienten tendenziell höhere Anteile an Mikrothromben bzw. Okklusionen detektierbar (Abbildung 30b).

Auch die Anzahl intravaskulärer CD4⁺ T-Zellen unterschied sich zwischen den Patientengruppen (Abbildung 30c). So fanden sich in den kleinen Lungengefäßen (< 50 µm Durchmesser) von Influenza-Patienten deutlich mehr T-Helferzellen im Vergleich zu SARS-CoV-2-Patienten. Auch in großen Gefäßen (> 50 µm Durchmesser) wurden höhere Level von T-Helferzellen detektiert.

Sowohl in kleinen (< 50 µm) als auch in großen Gefäßen (> 50 µm) fanden sich bei Patienten mit Influenza-Virus eine tendenziell höhere Zahl MPO⁺ Neutrophiler im Vergleich zu Patienten mit SARS - CoV- 2 (Abbildung 30d).

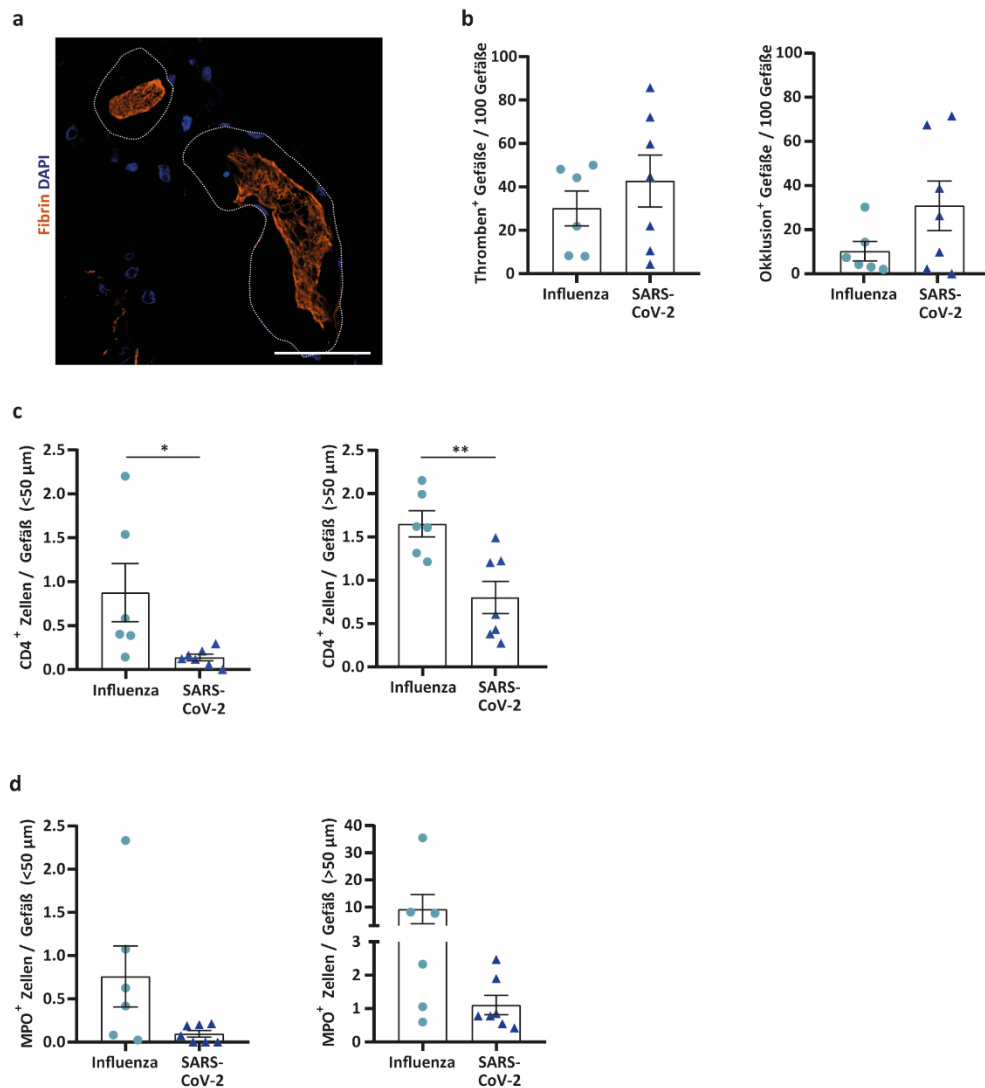


Abbildung 30 – T-Helferzellen, Neutrophile und Okklusionen in den Lungengefäßen von Patienten mit viralen Infektionen

a Repräsentatives Bild von thrombotierten Gefäßen der Lunge eines SARS-CoV-2-Patienten. Messbalken ist 50 µm. **b** Gefäßthromben und Gefäßokklusionen in der Lunge von Patienten mit Influenza-Virus bzw. SARS-CoV-2 **c**, **d** Anzahl durchschnittlicher CD4⁺ T-Zellen (**c**) bzw. MPO⁺ Neutrophiler (**d**) in kleinen bzw. größeren Gefäßen in Lungenproben von Patienten mit Influenza- bzw. SARS-CoV-2-Infektion (**c**, **d**).

Jeder Punkt steht jeweils für einen Patienten. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**).

4.7.2 Negative Korrelationen zwischen Gefäßverschlüssen und der Anzahl intravaskulärer CD4⁺ T-Zellen

Danach wurden in den Lungenproben von Patienten, die mit dem Influenza- bzw. SARS-CoV-2-Virus infiziert waren, die intravaskulären Thromben analysiert (Abbildung 31a-c). Repräsentative Bilder der verschiedenen Thromben-Typen in den Lungengefäßen von SARS-CoV-2-Patienten sind in Abbildung 31a zu sehen.

Zellfreie Fibrin-Thromben bildeten bei den COVID-19 Patienten im Vergleich zu den zellspezifischen-Thromben den größten Anteil (Abbildung 31b). Bei den Influenza-Patienten war dagegen kein Unterschied feststellbar (Abbildung 31c).

Interessanterweise korrelierte die Anzahl intravaskulärer CD4⁺ T-Zellen stark negativ mit der Anzahl der Thromben ($r = -0.8822$) und der Anzahl der Okklusionen ($r = -0.7566$) (Abbildung 31d). Dabei wurden die Daten der Influenza-Patienten (hellblau, Kreis) und der SARS-CoV-2-Patienten (dunkelblau, Dreieck) gemeinsam ausgewertet.

Zusätzlich wurden die intravaskulären CD4⁺ T-Zellen beider Gruppen hinsichtlich ihres pro-fibrinolytischen (uPA⁺) und anti-fibrinolytischen (PAI-1⁺) Subtyps charakterisiert (Abbildung 31e). Hierbei waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Influenza- und den SARS-CoV-2-Lungenproben zu erkennen. Jedoch war der Anteil der PAI-1⁺ T-Helferzellen gegenüber der uPA⁺ T-Helferzellen in den COVID-Patienten erhöht.

Im Rahmen eines *in vitro* Experiments wurden verschieden zusammengesetzte Thromben bezüglich ihrer Fähigkeit zum „Trapping“ bzw. Abtöten von *E. coli* untersucht. Hierbei zeigte sich, dass durch TF-initiierte Thromben die Bakterien effizienter einfangen und eliminierten als Thrombin-initiierte Thromben (Anhang, Abbildung VIII).

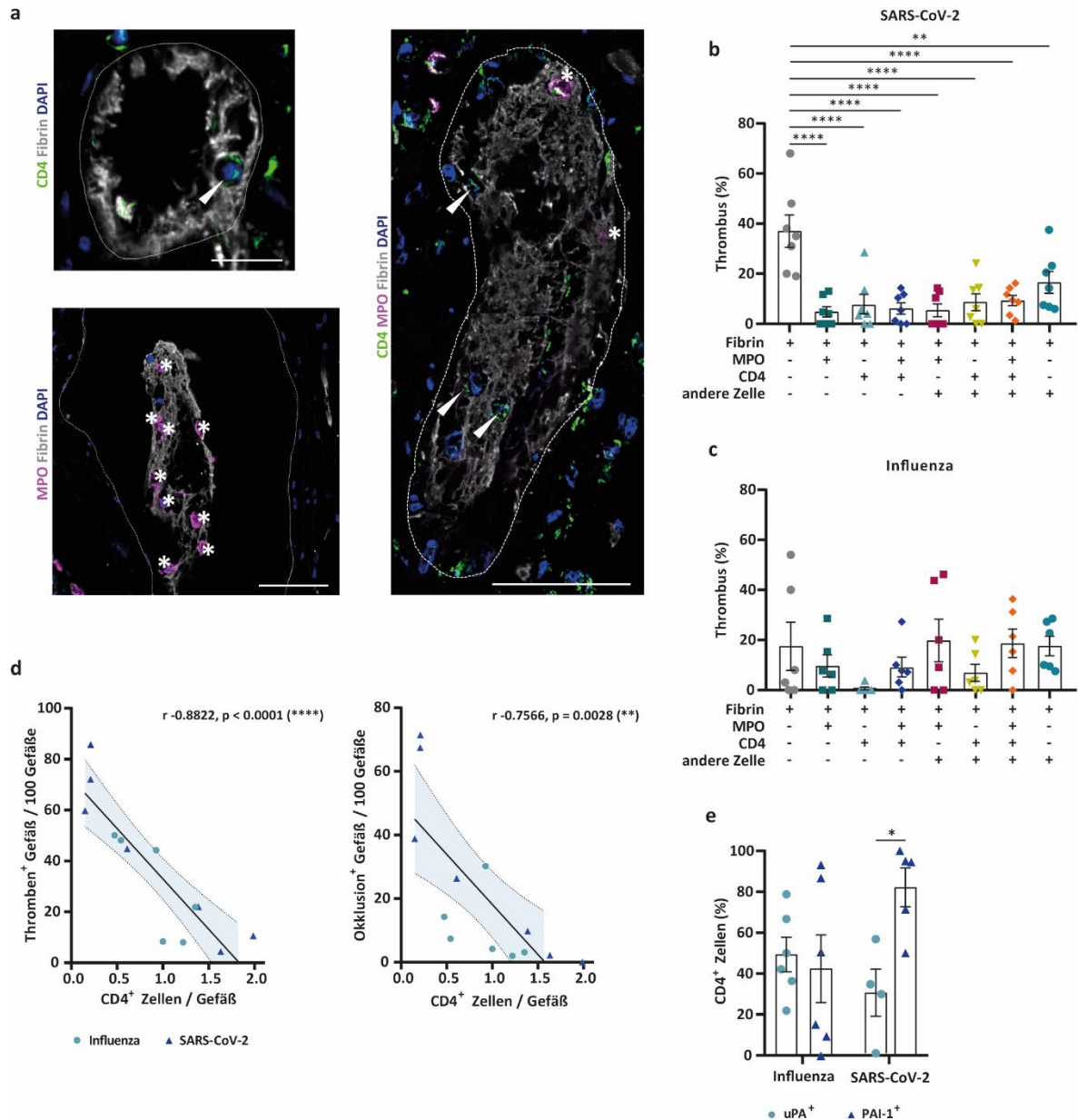


Abbildung 31 – Beziehung zwischen pulmonalen Thrombosen und T-Helferzellen bei viralen Infektionen

a Repräsentative Bilder von Thromben mit T-Helferzellen (links oben), Neutrophilen (links unten) oder beiden Zelltypen (rechts) in Lungengefäßen von SARS-CoV-2 Patienten. Kennzeichnung der CD4⁺ T-Zellen durch Pfeile und der MPO⁺ Neutrophilen durch Sternchen. Messbalken sind 20 µm (links oben) und 50 µm (links unten und rechts).

b, c Anteil zellfreier und zellhaltiger Thromben in den Lungengefäßen von SARS-CoV-2- (**b**) und Influenza-Patienten (**c**), unterschieden wurde nach den beinhaltenden Zelltypen. **d** Negative Korrelation der rekrutierten CD4⁺ T-Zellen zu den thrombosierte (links) bzw. okkludierten Gefäßen (rechts) in Lungenproben von Influenza- und SARS-CoV-2 Patienten. Daten sind normalverteilt, Pearson R-Werte sind -0.8822 (links) bzw. -0.7566 (rechts). Das 95% Konfidenzintervall ist farbig hinterlegt. **e** Assoziation von uPA und Pai-1 mit intravaskulären CD4⁺ T-Zellen in Lungenproben von Influenza- und SARS-CoV-2 Patienten. Jeder Punkt steht jeweils für einen Patienten. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.0001$ (****).

V. Diskussion

5.1 Schlüsselfunktion von T-Helferzellen bei Immunothrombosen im Rahmen systemischer Infektionen

Zu anfangs wurde untersucht welche Funktion die CD4⁺ T-Zellen während systemischer Infektionen für die Entstehung und Regulation der Immunothrombose besitzen. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob die während der Infektion verstärkte Fibrindeposition in der Mikrozirkulation reziprok regulierend auf die T-Helferzellen wirkt. Des Weiteren sollten die in unterschiedlichen Häufigkeiten während des Infektionsverlaufs auftretenden CD4⁺ T-Zellsubtypen näher charakterisiert werden.

5.1.1 CD4⁺ T-Zellen als fibrinolytische Immunothrombose-Regulatoren

Neben klassischen Monozyten und Neutrophilen könnten auch T-Helferzellen wichtige Regulatoren von Immunothrombosen darstellen.

RNA-Sequenzierungsanalysen lassen den Schluss zu, dass CD4⁺ T-Zellen durch ihre fibrinolytischen Eigenschaften der Blutgerinnungsaktivierung entgegenwirken können. In der Frühphase der systemischen Infektion wurde bspw. eine verstärkte mRNA-Expression des fibrinolyse-fördernden Gens *PLG*, welches das Protein Plasminogen translatiert und des Gens *PLAUR*, welches den Rezeptor uPAR kodiert und die Fibrinolyse durch Bindung von uPA oder tPA fördert, beobachtet. Gleichzeitig fanden sich auch erhöhte Expressionen von fibrinolyse-inhibierender bzw. pro-koagulatorischer Genen wie *SERPINF2* und *SERPINE1*. Das Gen *SERPINF2* (Serpins Family F Member 2) kodiert für den Alpha-2-Plasmin Inhibitor und das Gen *SERPINE1* für den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor PAI-1.

Um die Beteiligung der T-Helferzellen an der Regulation der Immunothrombosen zu überprüfen, wurden die CD4⁺ T-Zellen vor Infektion depletiert. Hierdurch kam es zu einer deutlichen Zunahme der Fibrindeposition in der Lebermikrozirkulation, die in der Frühphase der Infektion am stärksten ausgeprägt war¹⁰⁹.

Arbeiten von Mukhopadhyay et al. und Loef et al. sind in Einklang mit der pro-fibrinolytischen Aktivität der CD4⁺ T-Zellen^{121, 122}. Durch gleichzeitige Depletion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen kam es zu einer beeinträchtigten Auflösung tiefer Beinvenen-Thromben in Mäusen¹²¹. Des Weiteren konnte Loef et al. 2022 zeigen, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verschiedene Plasminogen-Rezeptoren exprimieren, mit denen sie Plasminogen auf ihrer Oberfläche binden. Damit bringen die zirkulierenden aktivierten T-Zellen Plasmin in peripheres Gewebe, wo es für die fibrinolytische Aktivität im Rahmen der Immunantwort benötigt wird¹²².

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass T-Helferzellen eine bedeutende Funktion als pro-fibrinolytische Akteure im frühen Infektionsgeschehen haben. Generell besitzen sie Fibrinolyse regulierende

Oberflächenproteine, die sie entsprechend den Erfordernissen im Rahmen der Immunantwort exprimieren. Damit handelt es sich bei den CD4⁺ T-Zellen um fibrinolytische Immunothrombose-Regulatoren.

5.1.2 Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch Fibrin

Die meisten aktivierten T-Helferzellen waren mit Fibrin assoziiert. Gleichzeitig nahm bei verminderter Fibrindeposition der Anteil aktivierter CD4⁺ T-Zellen ab. Demnach kann geschlussfolgert werden, dass die Assoziation mit Fibrin die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen fördert.

Der zeitliche Höhepunkt der T-Zellaktivierung entspricht auch etwa dem Zeitpunkt stärkster fibrinolytischer Aktivität, sodass auch hier ein kausaler Zusammenhang denkbar wäre.

Obwohl T-Helferzellen eine bedeutende Rolle für die Zell-basierte Fibrinolyse spielen, persistierte die Assoziation der T-Helferzellen mit Fibrin über ein längeres Zeitintervall. Dies könnte durch eine vermehrte Bildung des Fibrinolyse-Inhibitors PAI-1 erklärt werden. In der Tat verringerte die Inhibition von PAI-1 die Anzahl CD4⁺ T-Zell-spezifischer Mikrothromben.

Darüber hinaus ermöglicht PAI-1 auch, dass die arretierte T-Helferzelle IL-2 sezerniert, welches bekanntermaßen vor allem von aktivierten T-Zellen exprimiert wird⁷⁰. Gleichzeitig konnte die Aktivierung der T-Helferzellen über einen längeren Infektionszeitraum beobachtet werden. Dies könnte über eine durch PAI-1 geförderte IL-2 Sezernierung vermittelt sein.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass die Assoziation mit Fibrin die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen fördert und die vermehrte Bildung von PAI-1 sowohl die Fibrin-induzierte Aktivierung als auch die Persistenz der Fibrinassoziation der T-Helferzellen aufrechterhält. Somit besitzen CD4⁺ T-Zellen neben pro-fibrinolytischen auch anti-fibrinolytische Funktionen. Die variierenden Funktionen der CD4⁺ T-Zellen könnten durch unterschiedliche T-Zellsubtypen vermittelt werden.

5.1.3 Arrest verschiedener Subtypen der T-Helferzellen im Infektionsverlauf

Zu Beginn der Infektion stellten RORγT⁺ Th17-Zellen den Großteil der in der Mikrozirkulation der Leber arretierten T-Helferzellen. Auch war die Assoziation des pro-fibrinolytischen Proteins uPA bei diesem T-Helferzell-Subtyps am ausgeprägtesten. Im Infektionsverlauf nahmen die RORγT⁺ Treg-Zellen zu und bildeten schließlich den häufigsten Subtyp der CD4⁺ T-Zellen.

Bekannt ist bisher, dass RORγT⁺ Th17-Zellen als Reaktion auf Infektionen mit extrazellulären Bakterien entstehen. Bei den hier beobachteten RORγT⁺ Th17-Zellen könnte es sich um MAIT-Zellen handeln. In der Tat war beobachtbar, dass die Th17 Zellen teilweise aus dem Dünndarm rekrutiert werden und für MAIT-Zellen typisch, zusätzlich zu RORγT⁺ auch IL-17A in hoher Konzentration exprimierten^{123,124}.

Um eine rasche Immunantwort bei Infektionsbeginn zu gewährleisten, nimmt die Anzahl innater Immunzellen wie NKT-Zellen und MAIT-Zellen in infiziertem und entzündetem Gewebe rasch zu, entweder durch Rekrutierung an den Infektionsort oder durch lokale Proliferation^{123–127}. Auch bei schweren COVID-19 Verläufen konnte eine Expression des Aktivierungsmarkers CD69 vor allem in innaten T-Zellen detektiert werden¹²⁸.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich mit Zunahme der Infektionsdauer bei der Mehrheit der CD4⁺ T-Zellen um RORγT⁺ FOXP3⁺ CD4⁺ T-Zellen handelt, welche als innate MAIT-Zellen aus der Darmmukosae rasch an den Infektionsort rekrutiert worden sein könnten. Ob es sich bei den RORγT⁺ FOXP3⁺ CD4⁺ T-Zellen in unseren Analysen um RORγT⁺ Treg-Zellen handelt, welche vor allem in der Mukosa des Darms vorkommen und neben ihrer stabileren regulatorischen Funktion zusätzlich anti-inflammatorisch wirksam sind¹²⁹, oder um Treg-Zellen im Übergang zu Th17-Zellen, deren Entstehung als Antwort auf Pathogenen von myeloiden Zellen induziert wird¹³⁰, muss in Zukunft über die Analyse weiterer Marker geklärt werden.

5.2 Abhängigkeit des Bewegungsverhalten von T-Helferzellen in der Lebermikrozirkulation von der Fibrindeposition

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, inwieweit das Bewegungsverhalten der T-Helferzellen in der Lebermikrozirkulation während systemischer Infektionen abhängig von der lokalen Fibrindeposition ist. Dafür wurde der Einfluss von Fibrin auf unterschiedliche Fortbewegungsarten von CD4⁺ T-Zellen, nämlich das Crawling, das schnelle Fortbewegen, den Gefäßarrest und die transendotheliale Migration untersucht. In diesem Zusammenhang wurde auch die Funktion des T-Zellintegrins LFA-1 näher bestimmt.

5.2.1 Abhängigkeit der Fortbewegung der T-Helferzellen von Fibrin

In den Ergebnissen zeigte sich, dass CD4⁺ T-Zellen in der Lebermikrozirkulation in der Frühphase der Infektion im Vergleich zu späteren Zeitpunkten die größte Mobilität aufwiesen. Es waren sowohl zahlreiche schnell fortbewegende als auch crawlende T-Helferzellen zu beobachten. Interessanterweise fand sich in den Lebersinusoiden der größte Anteil mobiler T-Helferzellen in demselben Zeitraum der Infektion, in dem auch die maximale Fibrindeposition zu beobachten war¹⁰⁹. Rivaroxaban bewirkte in den frühen Zeitpunkten der Infektion eine Abnahme des Anteils arretierter T-Helferzellen und eine Zunahme des Anteils schnell bewegender CD4⁺ T-Zellen. Auch in den immunohistochemischen Analysen war die Anzahl der in den Lebersinusoiden arretierter T-

Helferzellen nach Rivaroxaban zu allen Zeitpunkten der Infektion deutlich verringert. Das Verhältnis crawlender T-Helferzellen schien von Rivaroxaban unbeeinflusst.

Die Ergebnisse zeigen, dass für die Fortbewegung und den Arrest bestimmter Immunzellen in der Mikrozirkulation eine Interaktion mit Fibrin erforderlich ist. Beispielsweise interagieren Neutrophile und Monozyten mit Fibrin über ihren Rezeptor Mac-1 (CD11b/CD18)^{131,132}. Auch das strukturell ähnliche Integrin CD11c/CD18, welches vor allem von dendritischen Zellen, aber auch von Monozyten, Neutrophilen und B-Zellen exprimiert wird, kann die Bindung an Fibrin vermitteln¹³³. Jedoch ist bisher noch nicht bekannt, über welchen Rezeptor CD4⁺ T-Zellen Fibrin binden können.

Die Neutralisation des T-Zellintegrins LFA-1 hatte eine Abnahme des Anteils der crawlenden CD4⁺ T-Zellen und eine tendenzielle Zunahme der schnell bewegenden T-Helferzellen zur Folge, wohingegen der Arrest unbeeinflusst blieb. Daraus geht hervor, dass das T-Zellintegrin LFA-1 bei durch Infektion gesteigerter Fibrindeposition Einfluss auf das Bewegungsverhalten der CD4⁺ T-Zellen hat. Dies könnte über die LFA-1:ICAM-1 Bindung vermittelt sein, wobei ICAM-1 Fibrin(ogen) binden kann, was die Adhäsion der T-Lymphozyten fördert^{134,135}, oder durch direkte Interaktion von LFA-1 mit Fibrin vermittelt sein: *In vitro* vermittelt Neutralisation von LFA-1 eine massive Reduktion der Migration humaner CD4⁺ T-Zellen auf Fibrin-bedeckter Oberfläche, wobei das Bewegungsverhalten auf der Kontrolloberfläche von der LFA-1-Neutralisation unbeeinflusst bleibt, wie in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte¹³⁶.

Fibrindepositionen am Endothel scheinen generell die Rekrutierung von Leukozyten wie den T-Lymphozyten zu fördern, womit das Fortschreiten der Entzündung stimuliert wird^{137,138}. Interessanterweise induzieren Fibrindepositionen auch die Bildung von ICAM-1 auf den Endothelzellen^{139,140}, was der Grund dafür sein könnte, dass bei erhöhter Fibrinablagerung auf Grund der Infektion der Anteil der schnell bewegenden T-Helferzellen verringert war.

Neben seinem Einfluss auf das Bewegungsverhalten, vermittelt LFA-1 auch die Aktivierung von T-Zellen⁹⁶. LFA-1 erleichtert die T-Zell-Aktivierung unter anderem, indem es die für die Aktivierung erforderlichen Antigenmengen senkt. In Abwesenheit von LFA-1 ist etwa die 100-fache Menge an Antigen für die Konjugation zwischen T-Zelle und APC und alle nachfolgenden Ereignisse der T-Zell-Aktivierung erforderlich¹⁴¹. Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zufolge nimmt nach Neutralisation von LFA-1 der Anteil CD69⁺ CD4⁺ T-Zellen ab und die Assoziation der T-Helferzellen zu Fibrin ist verringert¹¹⁴. *In vitro* zeigte sich, dass hierfür eine Fibrin-Interaktion zwingend Voraussetzung ist¹³⁶. Damit könnte LFA-1 die Schnittstelle zwischen Fibrindeposition und Aktivierung der T-Helferzellen vermitteln.

Im Gegensatz zur Mobilität scheint der Arrest der T-Helferzellen in der Lebermikrozirkulation während der Frühphase systemischer Infektionen nicht über die LFA-1:ICAM-1 Bindung vermittelt zu sein. Die Sequenzierungsdaten der mRNA von aus der Leber isolierten CD4⁺ T-Zellen ergaben, dass durch die Infektion die Expression von CD11b und CD18 erhöht waren. Jedoch hatte auch die Neutralisation von

CD11b (*Daten nicht gezeigt*) keinen Einfluss auf den Arrest. Ein weiterer möglicher Kandidat wäre beispielsweise der von T-Effektorzellen exprimierte Ligand VLA-4, der den von Endothelzellen exprimierten Rezeptor VCAM-1 bindet, oder der Rezeptor CD11c¹⁴².

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die Fibrindepositionen in der Lebermikrozirkulation das Bewegungsverhalten der CD4⁺ T-Zellen beeinflussen. Dies wird vermutlich über das T-Zellintegrin LFA-1 und ICAM-1 auf den Endothelzellen vermittelt.

5.2.2 Einfluss von Fibrin auf die transendotheliale Migration von T-Helferzellen

Die verminderte Fibrindeposition in den Lebersinusoiden nach Rivaroxaban-Behandlung induzierte bei Infektionen mit *E. coli* und *S. pneumoniae* eine deutlich geringere Anzahl an ins umliegende Lebergewebe transmigrierter CD4⁺ T-Zellen. Auch die Anzahl der extravasierten Neutrophilen war reduziert. Wie die verringerte Extravasation von T-Helferzellen und Neutrophilen mechanisch vermittelt wird, ist bisher noch nicht geklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass bei anderen Zelltypen die Migration über lokale Fibrinolyse vermittelt wird¹⁴³. Reichel et. al. konnte zeigen, dass durch Bindung von uPA an Mac-1 auf Leukozyten deren transendotheliale Migration durch lokale Aktivierung der Fibrinolyse erleichtert wird¹⁴⁴.

Im Falle der T-Helferzellen könnte die für die Extravasation erforderliche Migration durch LFA-1 induziert sein. In der Tat bewirkte die Neutralisation von LFA-1 eine verminderte Mobilität der CD4⁺ T-Zellen, gleichzeitig wurden auch weniger T-Helferzellen aktiviert. Unter der Annahme, dass durch eine gesteigerte Aktivierung die T-Helferzellen vermehrt fibrinolytisch aktiv sind, könnte dies die CD4⁺ T-Zellen auch verstärkt zur Extravasation befähigen. Für die Bedeutung von LFA-1 spricht auch, dass über dessen Ligand ICAM-1 bereits bekannt ist, dass dieser Fibrin(ogen) binden kann, was wiederum die Adhäsion und die anschließende (Trans-)migration der T-Lymphozyten und anderer Leukozyten *in vitro* förderte^{134,135}.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fibrindeposition in der Lebermikrozirkulation die (Trans-)Migration von T-Helferzellen begünstigt. Dies könnte über das T-Zellintegrin LFA-1 vermittelt werden.

Eine graphische Darstellung der möglichen verschiedenen fibrin-abhängigen Fortbewegungsarten von T-Helferzellen findet sich in Abbildung 32.

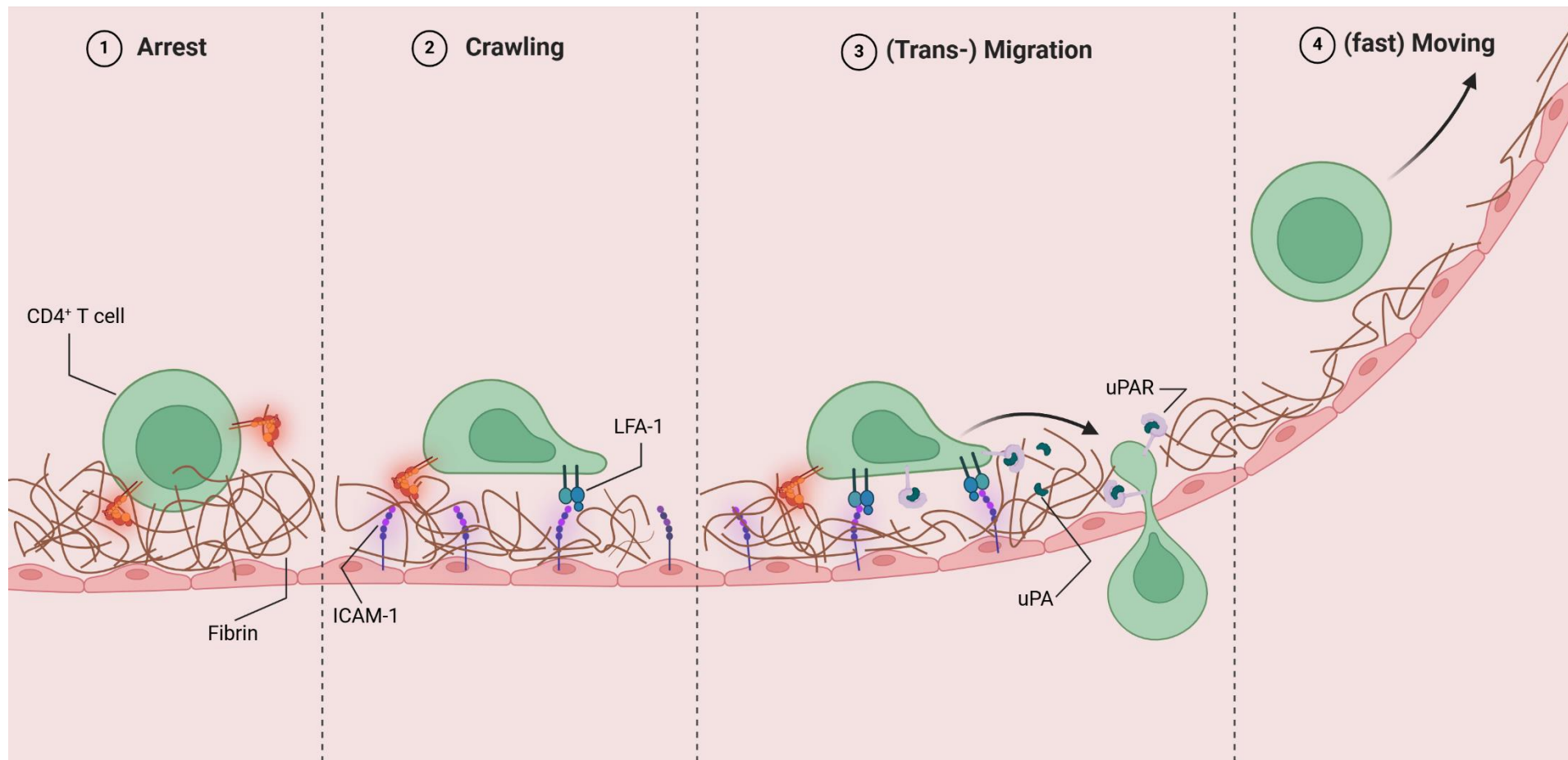


Abbildung 32 – Hypothetischer Zusammenhang zwischen Arrest, Fortbewegung und transendothelialer Migration von T-Helferzellen in Abhängigkeit von Fibrin

- 1) Möglicherweise bewirkt die Bindung zwischen einem von T-Helferzellen exprimierten Integrin und Fibrin einen verstärkten Arrest der T-Helferzellen am Ort der Fibrindeposition.
- 2) Die konstitutive Expression des T-Zellrezeptor LFA-1 ermöglicht das Crawling der T-Helferzellen entlang der Fibrin-bedeckten Gefäßwand.
- 3) Die transiente Bindung von LFA-1 mit der Fibrin-bedeckten Gefäßfläche leitet auch die Extravasation der CD4⁺ T-Zellen ein. Die für die Transmigration erforderliche lokale Fibrinolyse wird über uPA vermittelt, welches an uPAR auf der T-Zellmembran gebunden sein könnte.
- 4) Bei geringerem Vorhandensein von Fibrin oder verminderter Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 ist die intravaskuläre Fortbewegung der CD4⁺ T-Zellen gesteigert.

5.3 Interaktion von T-Helferzellen mit IK im Zusammenhang mit der Koagulation

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass fluoreszenzmarkierte BSA- α BSA IK von phagozytierenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und B-Zellen in der Lebermikrozirkulation infizierter Mäuse gebunden und internalisiert werden. Erstaunlicherweise vermochten auch CD4⁺ T-Zellen IK zu binden und zu internalisieren, wobei sogar die Internalisierungseffizienz der T-Helferzellen die der anderen Leukozyten überstieg. Eine Blockade der Fc γ II- und Fc γ III-Rezeptoren (CD16/32) bewirkte eine nahezu vollständige Inhibierung der Aufnahme von IK durch T-Helferzellen.

Darüber hinaus waren CD4⁺ T-Zellen welche IK internalisiert hatten, deutlich stärker mit Fibrin und Thrombozyten assoziiert als CD4⁺ T-Zellen ohne internalisierte IK. Im Vergleich zu anderen Leukozyten konnte eine verstärkte Assoziation mit Fibrin nach Internalisierung von IK nur noch bei Neutrophilen beobachtet werden, wenn auch deutlich weniger ausgeprägt als bei CD4⁺ T-Zellen. Zwar ist aus der Literatur bekannt, dass nach Inkubation mit IK menschliche Leukozyten einen pro-koagulatorischen Phänotypen *in vitro* aufweisen können¹⁴⁵, beispielsweise fördert auch die Interaktion von Neutrophilen mit zirkulierenden IK die Bildung von NETs¹⁴⁶, jedoch ist der beschriebene Zusammenhang von IK⁺ CD4⁺ T-Zellen und der Thrombenbildung ein Novum.

Schlussfolgernd ergibt sich, dass CD4⁺ T-Zellen IK über ihre Fc γ II- und Fc γ III-Rezeptoren binden und internalisieren können. Dies geschieht mit größerer Effizienz als bei anderen Leukozyten. Gleichzeitig bewirkt die Bindung und Internalisierung von IK durch T-Helferzellen eine verstärkte Assoziation mit Fibrin und Thrombozyten, die so nur noch bei Neutrophilen, jedoch in deutlich geringeren Umfang, zu finden ist.

5.4 Rolle der T-Helferzellcluster im fortgeschrittenen Infektionsverlauf

Nachfolgend wurde die Rolle der T-Helferzellen im fortgeschrittenen systemischen Infektionsverlauf untersucht. Mit zunehmender Infektion kam es intravaskulär zu einer steigenden Clusterbildung der T-Helferzellen. Interessanterweise waren häufig auch B-Zellen Bestandteil der intravaskulären T-Helferzell-Cluster.

Zwar ist aus der Literatur bekannt, dass bei Infektionen und Entzündung in der Blutzirkulation generell vermehrt intravaskuläre Leukozyten-Aggregate auftreten, doch wurden bisher speziell CD4⁺ T-Zellen nicht damit im Zusammenhang gebracht¹⁴⁷. Ausschließlich von CD8⁺ T-Zellen konnte man bisher in den Lebergefäßen eine Cluster-ähnliche Strukturbildung beobachten¹⁴⁸.

Die verminderte Fibrindeposition in der Mikrozirkulation der Leber nach Behandlung mit Rivaroxaban reduzierte die Anzahl von T-Helferzellclustern. Die Tatsache, dass gleichzeitig auch die Fibrin-

Assoziation der intravaskulären Cluster nach Rivaroxaban vermindert war, lässt vermuten, dass die Interaktion mit Fibrin für die Clusterbildung verantwortlich ist.

Lymphozyten-Aggregate, bestehend aus T- und B-Zellen und stabilisierenden Zellen wie Fibroblasten treten vor allem außerhalb von Gefäßen auf, wo sie am Ort der Entzündung tertiäre lymphoide Strukturen (TLS) bilden können^{149,150}. TLS tragen wiederum zur Aktivierung der T-Lymphozyten bei¹⁵¹. Bei etwa einem Drittel der intravaskulär arretierten T-Helferzellen im fortgeschrittenen Infektionsverlauf handelte es sich um cTfH-Zellen, die Bestandteil von intravaskulären TLS-ähnlichen Strukturen sein könnten. Eine der Hauptfunktionen der cTfH-Zellen stellt die Aktivierung von naiven B-Zellen dar, wodurch diese zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen differenzieren¹⁵². Gleichzeitig waren etwa 80% der TfH-Zellen positiv für FOXP3⁺, sodass es sich bei diesen Zellen um regulatorische cTfH-Zellen (cTFR) handeln könnte, welche, um Antikörperreaktionen zu optimieren und die Bildung von Auto-Antikörpern zu unterdrücken, die Aktivierung von B-Zellen negativ modulieren können^{75, 153}. Dass im Verlauf der bakteriellen Infektion eine Interaktion zwischen T-Helferzellen und B-Zellen in der Zirkulation stattgefunden hatte, ist daran ersichtlich, dass die Anzahl in der Mikrozirkulation arretierter B-Zellen nach Depletion der T-Helferzellen zurückging. Die Aktivierung von B-Zellen durch koagulations-vermittelte T-Helferzell-Cluster sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

Im späteren Infektionsverlauf konnte eine große Anzahl an CD4⁺ T-Zellcluster im Gewebe detektiert werden, welche verstärkt fibrin-assoziiert waren. In diesen extravaskulären Clustern befanden sich neben T-Helferzellen auch B-Zellen (*Daten nicht gezeigt*). Auch hier könnte es sich um eine funktionelle Einheit ähnlich der TLS handeln.

Zusammenfassend zeigte sich, dass das Vorhandensein von Fibrin ein wichtiger Auslöser für die Aggregatbildung der T-Helferzellen in den Gefäßen und im Gewebe ist. Gleichzeitig kann angenommen werden, dass es sich bei den T-Helferzellclustern mit eingeschlossenen B-Zellen um wichtige funktionale Einheiten der Immunabwehr handeln könnte.

5.5 Einfluss des Alterns auf die Koagulationsantwort bei bakteriellen und viralen Infektionen

In einem weiteren Teilprojekt sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit das Alter des Modellorganismus Maus und des Menschen bei systemischen bakteriellen bzw. viralen Infektionen Einfluss auf die Koagulationsantwort hat.

5.5.1 Gesteigerte Thrombosebildung bei systemischen Infektionen in alten Mäusen

Mäuse können bis zu zweieinhalb Jahre alt werden und gelten mit einem Alter von 3 bis 6 Monaten als ausgewachsen, was einem menschlichen Alter von 20-30 Jahren entspricht^{154,155}. Ein Mausalter von 10-16 Monaten entspricht einem Alter von 38-47 Lebensjahren beim Menschen. Ein Lebensalter von 18-24 Monaten bei der Maus entspricht einem Alter von 56-69 Jahren beim Menschen¹⁵⁶. Für die vorliegenden Versuche wurden daher insbesondere 8 bis 10 Wochen alte und 22 Monate alte Mäuse als Modell für junge bzw. alte Organismen eingesetzt. Erkenntnisse über die Immunantwort in infizierten Mäusen sind nicht vollständig auf den Menschen übertragbar, jedoch ist auf Grund der Ähnlichkeit der Immunantwort auf systemische Infektionen bei Mäusen und Menschen davon auszugehen, dass die Ergebnisse der Mausexperimente zumindest teilweise gesicherte Hinweise auf die Immunantwort des Menschen geben können.

Untersucht wurde die Bildung von Mikrothromben und Gefäßokklusionen in den Lebersinusoiden alter Mäuse während systemischer bakterieller Infektion. Dabei wurde beobachtet, dass die Anzahl von Gefäßen mit Mikrothrombosen und Okklusionen bei alten Mäusen um etwa ein Drittel höher lag als bei jungen Mäusen.

Um die potentielle Abhängigkeit des T-Helferzellarrest von der intravaskulären Fibrinbildung zu analysieren, wurde die Fibrinbildung mittels den Faktor Xa-Inhibitor Rivaroxaban inhibiert.

Nach Rivaroxaban-Behandlung war die Anzahl arretierter T-Helferzellen in den alten Mäusen deutlich reduziert. Der Arrest anderer Immunzellen, wie der CD8⁺ T-Zellen, der Neutrophilen und der klassischen und nicht-klassischen Monozyten blieb von der Fibrin-Deposition in den Lebersinusoiden unbeeinflusst. Rivaroxaban induzierte auch eine massive Reduktion CD4⁺ T-Zellhaltiger Mikrothromben und Gefäßokklusionen.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass in alten Mäusen von allen rekrutierten Immunzellspezies CD4⁺ T- Zellen am stärksten mit Fibrin interagierten und, dass Fibrin die Rekrutierung der T-Helferzellen förderte.

5.5.2 Negative Korrelation von Gefäßokklusionen mit verringerter Anzahl arretierter CD4⁺ T-Zellen bei Patienten mit pulmonalen Infektionen

In der Lunge von Patienten mit COVID-19 bzw. Influenza konnte gezeigt werden, dass bei verringerter CD4⁺ T-Zellanzahl die Gefäßokklusionen zunahmen und das beide Parameter stark negativ miteinander korrelierten. Dies bestätigt vermutlich die in der Maus beobachtete Fähigkeit der T-Helferzellen zur Reduktion der Fibrinbildung. Bei komplikationsreichen Verläufen von COVID-19 wurden in allen innaten T-Zellen eine gesteigerte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 detektiert¹²⁸. Da aus den vorliegenden experimentellen Daten des Modellorganismus Maus hervorgeht, dass die Aktivierung von T-Helferzellen die Koagulation negativ reguliert, wäre dies eine mögliche Erklärung für die negative Korrelation zwischen der Koagulation und der Anzahl von T-Helferzellen.

Gleichzeitig geben die Analysen zur Assoziation von uPA und PAI-1 mit den T-Helferzellen einen wichtigen Hinweis darauf, dass T-Zellen nicht nur die Fibrinolyse fördern, sondern diese auch inhibieren können. Die Daten zeigten, dass die CD4⁺ T-Zellen der COVID-19-Patienten im stärkeren Maße PAI-1 und weniger ausgeprägt uPA exprimieren. Bei den T-Helferzellen der Influenza Patienten war das Ausmaß der Positivität für uPA und PAI-1 in etwa ausgeglichen, jedoch waren im Vergleich zu den T-Helferzellen der COVID-Patienten tendenziell mehr CD4⁺ T-Zellen mit uPA bzw. weniger mit PAI-1 assoziiert. Da in den Influenza-Patienten auch weniger okkludierte Gefäße im Vergleich zu den COVID-Patienten zu finden waren, scheint zusätzlich zu der geringeren Anzahl an intravaskulären T-Helferzellen bei COVID-19 im Vergleich zu Influenza auch ein Switch der verbliebenen T-Helferzellen zu einem anti-fibrinolytischen Phänotypen stattgefunden zu haben. Dass T-Helferzellen auch anti-fibrinolytische Marker exprimieren können, konnte bereits in unserem Mausmodell auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Neu ist jedoch der Aspekt, dass CD4⁺ T-Zellen unter besonderen Umständen gezwungen zu sein scheinen, ihren Phänotypen in einem Art „Rescue“-Verhalten zu ändern. Hierbei könnte ein Zusammenhang mit dem „Exhaustion“-Phänotyps der T-Helferzellen vorliegen, welcher bisher vor allem bei zytotoxischen CD8⁺ Effektor T-Zellen beschrieben worden ist und unter anderem auftritt, wenn eine Infektion vom Wirt nicht beseitigt werden kann, und die Zellen daher ihre Funktion einschränken, um eine Schädigung des normalen Gewebes zu vermeiden. Dabei ist unter anderem ihre Fähigkeit zur Sekretion von Zytokinen vermindert, außerdem weisen sie eine erhöhte Expression von inhibierenden Rezeptoren auf¹⁵⁷. Ob es sich bei den CD4⁺ T-Zellen, welche anti-fibrinolytische Marker exprimieren, um „exhausted“ T-Zellen handelt, müsste durch Untersuchung der für „Exhaustion“ typischen Marker geklärt werden.

5.6 Einfluss von Alter und Infektionsparameter auf exprimierten Phänotyp von Neutrophilen

Nachfolgend wurde der Frage nachgegangen, welchen Phänotypen Neutrophile bei systemischer Infektion aufweisen und ob hier Unterschiede im Zusammenhang mit dem Alter zu beobachten sind. Außerdem sollte der Einfluss des Alters des Individuums sowie der Fibrinbildung auf den Prozess der NETose untersucht werden.

5.6.1 Verminderte Rekrutierung von Neutrophilen und gesteigerte NETose nach Rivaroxaban

Die Rekrutierung der Neutrophilen in die Mikrozirkulation der Leber während systemischer bakterieller Infektion war in jungen und alten Mäusen prinzipiell vergleichbar. Das Alter schien nur insofern Einfluss zu haben, als zu frühen Zeitpunkten der Infektion die Fähigkeit der Neutrophilen zur NETose bei alten Mäusen gegenüber jungen Mäusen tendenziell erhöht war.

In der Frühphase der Infektion hatte die Behandlung mit Rivaroxaban keinen Einfluss auf die Rekrutierung von Neutrophilen und deren Fähigkeit zur NETose. Jedoch war im späteren Verlauf der Infektion die Rekrutierung der Neutrophilen nach Behandlung mit Rivaroxaban sowohl in jungen als auch in alten Mäusen verringert und gleichzeitig deren Fähigkeit zur NETose erhöht.

Eine mögliche Erklärung für die erhöhte NETose nach Rivaroxaban-Behandlung könnte sein, dass bei verminderter Thrombosebildung die NETose kompensatorisch erhöht ist. Bisher wurde dies *in vivo* noch nie so gezeigt, in prinzipieller Übereinstimmung konnten Yu et. al. mit Hilfe eines *in vitro* „Vollblut-Perfusions-Modell“ zeigen, dass die Menge gebildeter NETs negativ mit dem Vorhandensein von Thrombin/Fibrin korreliert¹⁵⁸.

Die Förderung der Neutrophilenrekrutierung durch lokale Koagulationsaktivierung könnte unter anderem durch das von Neutrophilen exprimierte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18) vermittelt werden, welches an die D-Domäne von Fibrin(ogen) oder Degradierungsprodukte von Fibrin binden kann¹⁵⁹. Außerdem kann Mac-1 an ICAM-1 binden^{134,135}, welches unter anderem von Endothelzellen bei erhöhter Fibrindeposition verstärkt gebildet wird^{139,140}. Damit könnte die Adhäsion der Neutrophilen an die Fibrinfasern des Thrombus erleichtert werden und so den gesteigerten Arrest von Neutrophilen in der Zirkulation bei erhöhter Fibrindeposition erklären.

Die Bindung der Neutrophilen über Mac-1 an die Fibrin66-Fasern könnte auch die Clearance der Degradationsprodukte des Fibrins über Phagozytose ermöglichen^{160,161}. Dies könnte auch eine Erklärung für die verminderte NETose bei erhöhter Fibrindeposition darstellen, da Neutrophile Phagozytose und NETose nicht gleichzeitig betreiben können¹⁶².

5.6.2 Aktivierung von Faktor XII durch den Nukleosom-Kernpartikel ONO

Der Mechanismus der NETs-induzierten Koagulationsaktivierung ist noch weitgehend ungeklärt. Zukünftige Experimente müssen klären, inwieweit neben der Linker DNA auch Histonkomponenten an der Aktivierung von Faktor XII durch Nukleosomen der NETs beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Nukleosom-Kernpartikel auf ihre Wirkung auf die FXII-Aktivierung analysiert. Hierbei zeigte sich, dass FXII am stärksten durch den Nukleosom-Kernpartikel ONO aktiviert wird. Deutlich schwächer war die Aktivierung durch 40N40, die Aktivierung durch 147bp dsDNA war dagegen im mittleren Bereich.

Die unterschiedliche Aktivierung von Faktor XII durch die beiden Nukleosom-Kernpartikel lässt sich nicht auf unterschiedlich starke Bindungsaffinität zum "acidic patch" des Histon-Dimers (Histon 2A: Histon 2B) zurückführen, da der acidic patch bei beiden Nukleosom-Kernpartikel-Varianten gleichermaßen für cGAS zugänglich ist. Der bedeutsame Unterschied zwischen den beiden Nukleosom-Kernpartikeln besteht in der 40bp-Linker dsDNA der beidseitig bei 40N40 nicht aber bei ONO vorhanden ist³⁹. Jedoch könnte es sein, dass FXII mit höherer Affinität an den „acidic patch“ bindet als an die dsDNA, was den Unterschied von ONO zu dsDNA erklären würde, jedoch diese aktivierende Wirkung durch das Vorhandensein der beiden 40bp-Linker dsDNA-Stränge im Falle von 40N40 inhibiert wird.

5.6.3 Erhöhtes Vorkommen immaturer Neutrophiler in alten Mäusen bei systemischen Infektionen

Entzündungen und Infektionen erhöhen die Neutrophilenproduktion und verkürzen gleichzeitig die Reifungszeit der Vorläuferzellen im Knochenmark, sodass es zur Freisetzung immaturer Neutrophiler kommt¹⁶³. Die Fähigkeit von unreifen Neutrophilen zur Phagozytose und zur ROS-Erzeugung ist vermindert, auch die NETose ist beeinträchtigt¹⁶⁴.

Bei alten Mäusen zeigte sich ein erhöhtes Vorhandensein immaturer Neutrophiler im Vergleich zu den jungen Tieren in der frühen Infektionsphase in der Leber. In alten Menschen wurden in schweren Fällen systemischer Infektionen wie COVID-19 und Sepsis ebenfalls vermehrt immature Neutrophile im Blutkreislauf detektiert^{66,118,119}.

In der Lunge alter Tiere nahm die Anzahl immaturer Neutrophiler nach Behandlung mit Rivaroxaban stark zu. In der Leber war dies ebenfalls tendenziell erkennbar. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass nach Inhibierung von Faktor Xa die koagulations-aktivierende Wirkung der muren Neutrophilen beeinträchtigt ist, sodass mehr Neutrophile in die Zirkulation freigesetzt werden müssen und schließlich auch immature Neutrophile in die Zirkulation gelangen.

Ein Zusammenhang mit der beobachteten gesteigerten NETose nach Rivaroxaban-Gabe ist jedoch eher unwahrscheinlich, da zwar in immaturren Neutrophilen NETosen spontan auftreten können, jedoch NETosen hauptsächlich durch Aktivierung entstehen.

5.6.4 Erhöhte Expression von CXCR4 in Neutrophilen junger Mäuse während systemischer Infektion

Die Analyse der zirkadianen Expression des Alterungsrezeptors CXCR4 auf Neutrophilen zeigte, dass nach Infektion in jungen Mäusen nahezu alle Neutrophilen den Marker CXCR4 exprimierten, in alten Mäusen dagegen nur maximal die Hälfte. In nicht-infizierten Mäusen sollten frische (CXCR4⁻) und alte (CXCR4⁺) Neutrophile in den Morgenstunden etwa gleichmäßig verteilt sein⁶², was auch so in den nicht-infizierten alten Tieren zu beobachten war. Im Vergleich zu alten Mäusen scheinen in jungen Tieren die Bakterien die Expression von CXCR4 auf Neutrophilen besser anregen zu können⁶⁷.

Die erhöhte Expression von CXCR4 in Neutrophilen lässt vermuten, dass ein stärker pro-inflammatorischer Phänotyp bei den Neutrophilen vorliegt, wodurch diese unter anderem durch gesteigerte NETose besser zur Bekämpfung der Pathogene befähigt sind. Generell nimmt in Neutrophilen die Fähigkeit zur Pathogenbekämpfung mit zunehmendem Alter des Patienten ab, was mit einer schlechteren Prognose bei schweren bakteriellen Infektionen und Sepsis verbunden ist¹²⁰. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die deutlich gesteigerte Expression des Alterungsrezeptors CXCR4 in jungen Mäusen im Vergleich zu alten Tieren, unabhängig von den zirkadianen Rhythmen, den Neutrophilen einen pro-inflammatorischen Phänotypen zur besseren Pathogenbekämpfung verleiht, wobei dies durch Th17-Zellen reziprok verstärkt werden könnte^{165,166}. Dies könnte einer der Gründe für die schlechtere Prognose des Verlaufs systemischer Infektionen bei älteren Patienten darstellen.

5.6.5 Zahlreiche CD117⁺ Neutrophile in jungen Mäusen im Gegensatz zu alten Tieren

Nahezu alle Neutrophile, die in der Leber und der Lunge von jungen infizierten Mäusen detektiert wurden, waren positiv für den Marker CD117, von dem angenommen wird, dass er die Population der neutrophilen Vorläuferzellen im Knochenmark beschreibt⁶⁰. In alten Tieren war der Anteil CD117⁺ Neutrophiler im Gegensatz dazu deutlich geringer.

Das Vorhandensein von CD117⁺ Neutrophilen ist unerwartet, da man in der Literatur bisher kaum einen Hinweis auf preNeu in der Zirkulation findet. Im Rahmen einer Infektion mit *S. pneumoniae* wurde allerdings von einer CD117⁺ Vorläufer-Neutrophilen-Population, die in der Milz ansässig ist, berichtet. Dort durchlaufen die Neutrophile ähnlich wie im Knochenmark einen Reifungsprozess,

welcher durch Krankheitserreger getriggert wird^{167,168}. Auch wurde postuliert, dass im Falle einer Tumorerkrankung GMP-Zellen das Knochenmark verlassen können und extramedullär in Milz, Leber und dem Blutkreislauf zu maturen Neutrophilen heranreifen können¹⁶⁹. Die CD117⁺ Neutrophilen, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert worden sind, sind jedoch sowohl immatur als auch matur, sodass diese Erklärung hinfällig ist (*Daten nicht gezeigt*). Nichtsdestotrotz könnte der große Unterschied zwischen jungen und alten Tieren in der CD117⁺ Expression eine Erklärung für die verminderte Fähigkeit von Neutrophilen in alten Individuen in der Pathogenbekämpfung darstellen. Dies würde voraussetzen, dass die Expression von CD117 nicht ausschließlich eine Vorläufer-Neutrophilen-Population beschreibt, sondern auch eine Population bestimmter Pathogen-bekämpfender reifer Neutrophil-Subtypen.

5.7 Wechselspiel von CD4⁺ T-Zellen und Neutrophilen bei der Regulation der Immuno-thrombose

In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass mit Zunahme des Alters die Resolution von Thrombosen beeinträchtigt wird¹⁷⁰. Auch könnte es bei älteren Menschen zu einer persistierenden Gerinnungsaktivierung mit gleichzeitig verminderte Fibrinolyse kommen¹⁷¹.

Die Resultate der immunohistochemischen Analysen der Lungen von Patienten, die an COVID-19 bzw. Influenza verstorben waren, bestätigten die ausgeprägte mikro- und makrovaskuläre Thrombosierung. Im Falle der COVID-19 und Influenza-Proben konnte gezeigt werden, dass bei verringerter CD4⁺ T-Zellanzahl die Gefäßokklusionen zunahmen und intravaskuläre T-Helferzelllevel und Gefäßokklusionen negativ miteinander korrelierten. Dies bestätigt die in der Maus beobachtete Fähigkeit der T-Helferzellen zur Fibrinolyse und „Negativen Regulation der Koagulation“ bei systemischen Infektionen in einem humanen pathologischen Modell.

Bei dem Probenmaterial aus dem Menschen wurde darauf geachtet, dass die Altersverteilung der verschiedenen Gruppen (Kontrolle, Influenza, COVID-19) vergleichbar war. Jedoch variierte sowohl der Schweregrad des Krankheitsverlaufs innerhalb der Gruppe der Patienten als auch die Art der Vorerkrankung. Waren Vorerkrankungen bekannt, die im Zusammenhang mit einer thrombotischen Erkrankung standen, wie beispielsweise Herzinfarkt oder Krebserkrankungen, wurden die Patientenproben nicht berücksichtigt. Jedoch waren alle Patienten während ihres Krankenhausaufenthalts mit Heparin behandelt worden, wodurch die Koagulationsantwort reduziert wurde.

Bislang wurden Lymphozyten bzw. T-Helferzellen im Speziellen nicht in einen näheren Zusammenhang mit der Entstehung oder Manifestierung von Immuno-thrombosen gebracht. Interessanterweise stellt das Neutrophil-zu-Lymphozyten-Verhältnis einen der wichtigsten unabhängigen Risikofaktoren für

einen schweren COVID-19 Verlauf dar. Es zeigte sich in der Tat bei schwer erkrankten COVID-19 Patienten eine deutliche Zunahme der Neutrophilen und gleichzeitig eine Abnahme der Anzahl an T-Lymphozyten gegenüber Patienten mit leichterem Verlauf¹⁷². Auch korrelierten Lymphopenien, d.h. ein Mangel der Lymphozyten im Blut, stark mit der Schwere einer COVID-19-Erkrankung¹⁷³. Zusätzlich wurde auch bei anderen Erkrankungen, die im Zusammenhang mit der Bildung von Thrombosen stehen, ein erhöhtes Neutrophil-Lymphozyten-Verhältnis beobachtet, welches ebenfalls ein Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf darstellt^{174–176}.

Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, lässt dies den Schluss zu, dass es sich bei den T-Helferzellen möglicherweise um bedeutende Gegenspieler der pro-thrombotischen Neutrophilen handelt.

Zusätzlich dazu geben die Analysen zur Assoziation von uPA und PAI-1 mit den T-Helferzellen einen Hinweis darauf, dass T-Zellen nicht nur die Fibrinolyse fördern, sondern diese auch inhibieren können. Erhöhte Konzentrationen von PAI-1 gelten als zuverlässiger Biomarker für die Schwere des Verlaufs einer COVID-19 Erkrankung¹⁷⁷.

Die Daten deuten darauf hin, dass die CD4⁺ T-Zellen der COVID-19-Patienten stärker PAI-1 und weniger ausgeprägt uPA binden. Bei den Influenza-Patienten scheint das Verhältnis von uPA-Bindung und PAI-1-Bindung in etwa ausgeglichen. Da bei den Influenza-Patienten auch weniger okkludierte Gefäße im Vergleich zu den COVID-19-Patienten vorliegen, könnte zusätzlich neben der geringeren Anzahl intravaskulär arretierter T-Helferzellen auch ein Switch zu einem mehr anti-fibrinolytischen Phänotypen in den T-Helferzellen stattgefunden haben.

Gleichzeitig scheint auch der Phänotyp der Neutrophilen die Interaktion mit den T-Helferzellen zu beeinflussen: So erleichtert die erhöhte Expression von CXCR4 das Eindringen in den Lymphknoten, wo sie schließlich antigenspezifische Reaktionen in T-Helferzellen auslösen⁶². Th17-Zellen wiederum fördern durch sezerniertes IL-17F/A die Rekrutierung von Neutrophilen und regulieren zusätzlich die Granulopoese über G-CSF^{165,166}. Im Gegensatz dazu wird durch Phagozytose der gealterten Neutrophilen (CXCR4⁺ Neutrophilen) die Freisetzung von IL-17 durch T-Helferzellen verringert, was die Produktion von G-CSF im Knochenmark hemmt und so die Produktion und Mobilisierung von Neutrophilen verringert¹⁶⁶.

Über immature Neutrophile, welche in älteren Individuen bei systemischer Infektion verstärkt zu finden waren, ist bekannt, dass diese das Überleben von T-Zellen fördern und deren Proliferation durch Freisetzung von Interferon- γ (IFN- γ) induzieren. Im Gegensatz dazu hemmen mature Neutrophile die Proliferation von T-Zellen¹⁷⁸.

Das potentielle Zusammenspiel von CD4⁺ T-Zellen und Neutrophilen bei der Entstehung von Immunothrombosen in alten Individuen ist beispielhaft in Abbildung 33 dargestellt.

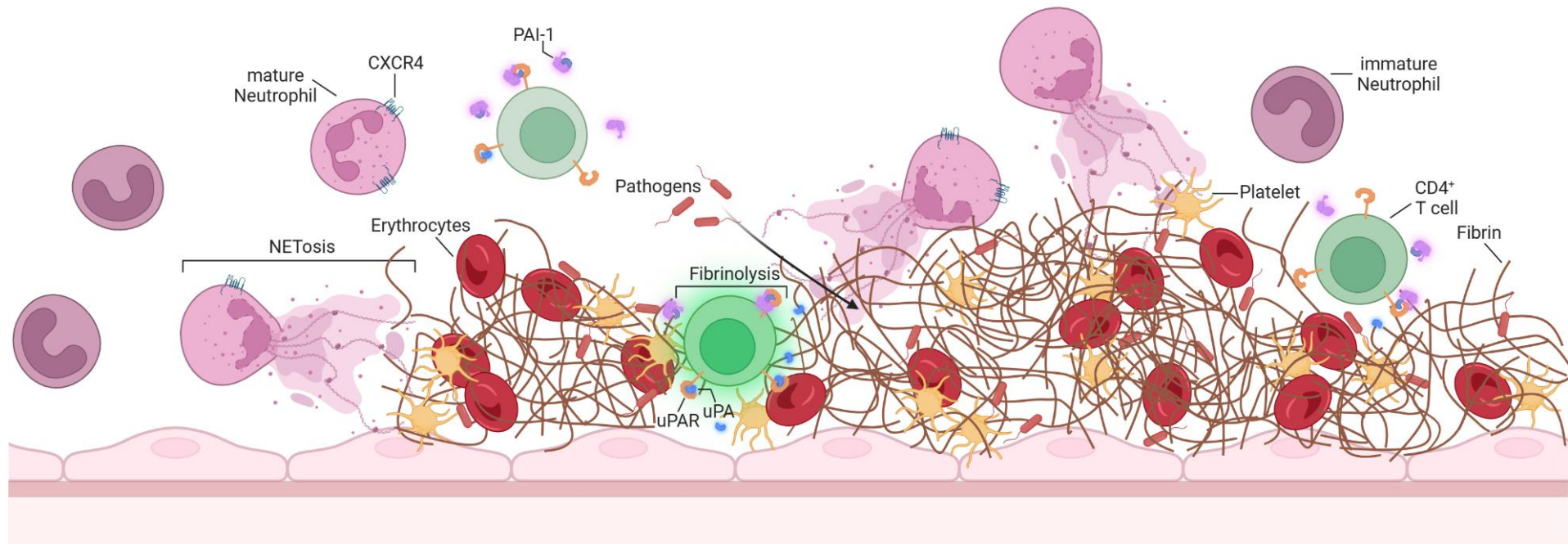


Abbildung 33 – Modell für das Wechselspiel von CD4⁺ T-Zellen und Neutrophilen bei der Regulation der Immunothrombose während systemischer Infektionen in alten Individuen

Die Bildung von Immunthrombosen, bestehend aus Fibrin, Erythrozyten und Thrombozyten, in den Lebermikrogefäßen wird vor allem durch die NETs-Bildung getriggert. Viele der muren Neutrophile haben bereits den zirkadianen Alterungsmarker CXCR4 gebildet und weisen dadurch einen verstärkt pro-koagulatorischen Phänotyp auf. Neben den muren Neutrophilen finden sich auch zahlreiche immature Neutrophile, die bei alten Individuen vermehrt auftreten. Die Gegenspieler der Neutrophilen, die T-Helferzellen, sind nur in geringer Zahl vorhanden, die Zahl der Neutrophilen ist hingegen deutlich erhöht, somit weisen die Patienten folglich einen hohen NLR-Wert auf, was ein Hinweis auf einen pathologischen Verlauf der Immunothrombose gibt. Die uPAR-Expression der CD4⁺ T-Zellen nimmt im Infektionsverlauf zu. Gleichzeitig ist die Expression von PAI-1 gegenüber uPA durch die T-Helferzellen verstärkt, es hat folglich ein Switch von einem pro-fibrinolytischen Phänotypen hin zu einem anti-fibrinolytischen Phänotypen stattgefunden. Durch die Einschränkung der fibrinolytischen Eigenschaften der T-Helferzellen ist der Abbau der Thromben beeinträchtigt.

Literaturverzeichnis

1. Sepsis-Stiftung. Sepsis Erkennen. Abgerufen am 04.01.2023 von <https://www.sepsiswissen.de/infozentrale/sepsis-erkennen>.
2. Rudd, K. E. *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet* 395 (10219), 200–211 (2020).
3. Bundesinstitut für Öffentliche Gesundheit. Sepsis - ein medizinischer Notfall. Abgerufen am 25.04.2022 von <https://www.infektionsschutz.de/infektionskrankheiten/krankheitsbilder/sepsis-ein-medizinischer-notfall/>.
4. Fleischmann, C. *et al.* Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int* 113 (10), 159–166 (2016).
5. Statistisches Bundesamt. Bevölkerung - Ältere Menschen. Die Bevölkerungsgruppe der älteren Menschen ab 65 Jahren.- Abgerufen am 25.04.2022 von <https://www.destatis.de/DE/Themen/Querschnitt/Demografischer-Wandel/Aeltere-Menschen/bevoelkerung-ab-65-j.html>.
6. Pflege-Redaktion, Georg Thieme Verlag. I care Pflege. Pflege von Menschen mit organübergreifenden Infektionen. Sepsis in *I care Pflege* (2020)
7. Samuels, J. M., Moore, H. B. & Moore, E. E. Coagulopathy in Severe Sepsis: Interconnectivity of Coagulation and the Immune System. *Surg Infect (Larchmt)* 19 (2), 208–215 (2018).
8. Engelmann, B. & Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13 (1), 34–45 (2013).
9. Lin, G. L., McGinley, J. P., Drysdale, S. B. & Pollard, A. J. Epidemiology and Immune Pathogenesis of Viral Sepsis. *Front Immunol* 9, 2147 (2018).
10. Rudd, K. E. *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet* 395 (10219), 200–211 (2020).
11. European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), Global Sepsis Alliance (GSA); Society of Critical Care Medicine (SCCM). Reducing the global burden of sepsis: a positive legacy for the COVID-19 pandemic? *Intensive Care Med* 47 (7), 733–736 (2021).
12. Karakike, E. *et al.* Coronavirus Disease 2019 as Cause of Viral Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit Care Med* 49 (12), 2042–2057 (2021).
13. Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W. M., Levi, M. & Reitsma, P. H. New Fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* 93 (1), 327–358 (2013).
14. Gaertner, F. & Massberg, S. Blood coagulation in immunothrombosis—At the frontline of intravascular immunity. *Semin Immunol* 28 (6), 561–569 (2016).
15. Coughlin, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407 (6801), 258–264 (2000).
16. Malik, R. A. *et al.* Polyphosphate-induced thrombosis in mice is factor XII dependent and is attenuated by histidine-rich glycoprotein. *Blood Adv* 5 (18), 3540–3551 (2021).

17. Hoffman, M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis* 16 (1–2), 17–20 (2003).
18. Van Der Meijden, P. E. J. *et al.* Dual role of collagen in factor XII–dependent thrombus formation. *Blood* 114 (4), 881–890 (2009).
19. Müller, F. *et al.* Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 139 (6), 1143–1156 (2009).
20. Bonaventura, A. *et al.* Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol* 21 (5), 319–329 (2021).
21. Stark K, Massberg S. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *Nat Rev Cardiol* 18 (9), 666–682 (2021)
22. Guha, M. & Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13 (2), 85–94 (2001).
23. Clark, S. R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13 (4), 463–469 (2007).
24. Cox, D., Kerrigan, S. W. & Watson, S. P. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *J Thromb Haemost* 9 (6), 1097–1107 (2011).
25. Ito, T. PAMPs and DAMPs as triggers for DIC. *J Intensive Care* 2 (1), 67 (2014).
26. Moosbauer, C. *et al.* Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. *Blood* 109 (3), 995–1002 (2007).
27. Müller, I. *et al.* Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* 17 (3), 476–478 (2003).
28. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303 (5663), 1532–1535 (2004).
29. Gould, T. J., Lysov, Z. & Liaw, P. C. Extracellular DNA and histones: double-edged swords in immunothrombosis. *J Thromb Haemost* 13 (Suppl 1), S82–S91 (2015).
30. Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A. & Zychlinsky, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 191 (3), 677–691 (2010).
31. Massberg, S. *et al.* Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 16 (8), 887–896 (2010).
32. von Brühl, M.-L. *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 209 (4), 819–835 (2012).
33. Barranco-Medina, S., Pozzi, N., Vogt, A. D. & Di Cera, E. Histone H4 promotes prothrombin autoactivation. *J Biol Chem* 288 (50), 35749–35757 (2013).
34. Semeraro, F. *et al.* Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood* 118 (7), 1952–1961 (2011).

35. Hamad, O. A., Bäck, J., Nilsson, P. H., Nilsson, B. & Ekdahl, K. N. Platelets, complement, and contact activation: partners in inflammation and thrombosis. *Adv Exp Med Biol* 946, 185–205 (2012).
36. Buchanan, J. T. *et al.* DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16 (4), 396–400 (2006).
37. Beiter, K. *et al.* An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16 (4), 401–407 (2006).
38. Luo, D. *et al.* Protective roles for fibrin, tissue factor, plasminogen activator inhibitor-1, and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, but not factor XI, during defense against the gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. *J Immunol* 187 (4), 1866–1876 (2011).
39. Michalski, S. *et al.* Structural basis for sequestration and autoinhibition of cGAS by chromatin. *Nature* 587 (7835), 678–682 (2020).
40. Thiam, H. R. *et al.* NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117 (13), 7326–7337 (2020).
41. Wang, Y. *et al.* Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyl elimination. *Science* 306 (5694), 279–283 (2004).
42. Thålin, C. *et al.* Quantification of citrullinated histones: Development of an improved assay to reliably quantify nucleosomal H3Cit in human plasma. *J Thromb Haemost* 18 (10), 2732–2743 (2020).
43. Oehmcke, S., Mörgelin, M. & Herwald, H. Activation of the Human Contact System on Neutrophil Extracellular Traps. *J Innate Immun* 1 (3), 225–230 (2009).
44. Noubouossie, D. F. *et al.* In vitro activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps. *Blood* 129 (8), 1021–1029 (2017).
45. Apel, F. *et al.* The cytosolic DNA sensor cGAS recognizes neutrophil extracellular traps. *Sci Signal* 14 (673), 7942 (2021).
46. Ackermann, M. *et al.* Patients with COVID-19: in the dark-NETs of neutrophils. *Cell Death Differ* 28 (11), 3125–3139 (2021).
47. Lê, V. B. *et al.* Platelet activation and aggregation promote lung inflammation and influenza virus pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 191 (7), 804–819 (2015).
48. Narasaraju, T. *et al.* Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Acute Lung Injury of Influenza Pneumonitis. *Am J Pathol* 179 (1), 199–210 (2011).
49. Boilard, E. *et al.* Influenza virus H1N1 activates platelets through FcγRIIA signaling and thrombin generation. *Blood* 123 (18), 2854–2863 (2014).
50. Bonaventura, A. *et al.* Targeting GM-CSF in COVID-19 Pneumonia: Rationale and Strategies. *Front Immunol* 11, 1625 (2020).
51. McGonagle, D., O'Donnell, J. S., Sharif, K., Emery, P. & Bridgewood, C. Immune mechanisms of pulmonary intravascular coagulopathy in COVID-19 pneumonia. *Lancet Rheumatol* 2 (7), 437–445 (2020).

52. Hamming, I. *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* 203 (2), 631–637 (2004).
53. Veras, F. P. *et al.* SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *J Exp Med* 217 (12), e20201129 (2020)
54. Varga, Z. *et al.* Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* 395 (10234), 1417–1418 (2020).
55. Witkowski, M., Landmesser, U. & Rauch, U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med* 26 (4), 297–303 (2016).
56. Kambas, K., Mitroulis, I. & Ritis, K. The emerging role of neutrophils in thrombosis-the journey of TF through NETs. *Front Immunol* 3, 385 (2012).
57. Frantzeskaki, F., Armaganidis, A. & Orfanos, S. E. Immunothrombosis in Acute Respiratory Distress Syndrome: Cross Talks between Inflammation and Coagulation. *Respiration* 93 (3), 212–225 (2017).
58. Nicolai, L. *et al.* Immunothrombotic Dysregulation in COVID-19 Pneumonia Is Associated With Respiratory Failure and Coagulopathy. *Circulation* 142 (12), 1176–1189 (2020).
59. Manne, B. K. *et al.* Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood* 136 (11), 1317–1329 (2020).
60. Ng, L. G., Ostuni, R. & Hidalgo, A. Heterogeneity of neutrophils. *Nat Rev Immunol* 19 (4), 255–265 (2019).
61. Pfirschke, C. *et al.* Tumor-Promoting Ly-6G⁺ SiglecF^{high} Cells Are Mature and Long-Lived Neutrophils. *Cell Rep* 32 (12), 108164 (2020).
62. Adrover, J. M., Nicolás-Ávila, J. A. & Hidalgo, A. Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends Immunol* 37 (5), 334–345 (2016).
63. Pillay, J. *et al.* In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116 (4), 625–627 (2010).
64. Capucetti, A., Albano, F. & Bonecchi, R. Multiple Roles for Chemokines in Neutrophil Biology. *Front Immunol* 11, 1259 (2020).
65. Casanova-Acebes, M. *et al.* Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* 153 (5), 1025–1035 (2013).
66. Reusch, N. *et al.* Neutrophils in COVID-19. *Front Immunol* 12, 652470 (2021).
67. Nicolás-Ávila, J. Á., Adrover, J. M. & Hidalgo, A. Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer. *Immunity* 46 (1), 15–28 (2017).
68. Zhang, D. *et al.* Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* 525 (7570), 528–532 (2015).
69. Adrover, J. M. *et al.* A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection. *Immunity* 50 (2), 390–402 (2019).
70. Murphy, K. & Weaver, C. Die T-Zell-vermittelte Immunität. in *Janeway - Immunologie* 444–515 (2018).

71. Obst, R. The timing of T cell priming and cycling. *Front Immunol* 6, 563 (2015).
72. Kaech, S. M., Wherry, E. J. & Ahmed, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2 (4), 251–262 (2002).
73. Andersen, P. & Smedegaard, B. CD4⁺ T-cell subsets that mediate immunological memory to Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Infect Immun* 68 (2), 621–629 (2000).
74. Murphy, K. & Weaver, C. Die humorale Immunatwort. in *Janeway - Immunologie* 518–580 (2018).
75. Walker, L. S. K. The link between circulating follicular helper T cells and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 22 (9), 567–575 (2022).
76. Weber, J. P., Fuhrmann, F. & Hutloff, A. T-follicular helper cells survive as long-term memory cells. *Eur J Immunol* 42 (8), 1981–1988 (2012).
77. Choi, Y. S. *et al.* Bcl6 Expressing Follicular Helper CD4 T Cells Are Fate Committed Early and Have the Capacity To Form Memory. *J Immunol* 190 (8), 4014–4026 (2013).
78. Boppana, S. *et al.* SARS-CoV-2-specific circulating T follicular helper cells correlate with neutralizing antibodies and increase during early convalescence. *PLoS Pathog* 17 (7), e1009761 (2021).
79. Zhang, J. *et al.* Circulating CXCR3⁺ Tfh cells positively correlate with neutralizing antibody responses in HCV-infected patients. *Sci Rep* 9 (1), 10090 (2019).
80. Gao, Y. & Williams, A. P. Role of innate T cells in anti-bacterial immunity. *Front Immunol* 6, 302 (2015).
81. Kim, E. Y. & Oldham, W. M. Innate T cells in the intensive care unit. *Mol Immunol* 105, 213–223 (2019).
82. Tessmer, M. S., Fatima, A., Paget, C., Trottein, F. & Brossay, L. NKT cell immune responses to viral infection. *Expert Opin Ther Targets* 13(2), 153-162 (2009).
83. Kawakami, K. *et al.* Critical role of Valpha14⁺ natural killer T cells in the innate phase of host protection against Streptococcus pneumoniae infection. *Eur J Immunol* 33 (12), 3322–3330 (2003).
84. Le Bourhis, L. *et al.* Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol* 11 (8), 701–708 (2010).
85. Chua, W.-J. *et al.* Polyclonal mucosa-associated invariant T cells have unique innate functions in bacterial infection. *Infect Immun* 80 (9), 3256–3267 (2012).
86. Meierovics, A., Chua Yankelevich, W.-J. & Cowley, S. C. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (33), 3119–3128 (2013).
87. Grimaldi, D. *et al.* Specific MAIT cell behaviour among innate-like T lymphocytes in critically ill patients with severe infections. *Intensive Care Med* 40 (2), 192–201 (2014).
88. Godfrey, D. I., Uldrich, A. P., McCluskey, J., Rossjohn, J. & Moody, D. B. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat Immunol* 16 (11), 1114–1123 (2015).

89. Murphy, K. & Weaver, C. Allergien und allergische Erkrankungen. in *Janeway - Immunologie* 783–834 (2018).
90. Stokol, T. *et al.* C1q governs deposition of circulating immune complexes and leukocyte Fcγ receptors mediate subsequent neutrophil recruitment. *J Exp Med* 200 (7), 835–846 (2004).
91. Junker, F., Gordon, J. & Qureshi, O. Fc Gamma Receptors and Their Role in Antigen Uptake, Presentation, and T Cell Activation. *Front Immunol* 11, 1393 (2020).
92. Kurlander, R. J., Ellison, D. M. & Hall, J. The blockade of Fc receptor-mediated clearance of immune complexes in vivo by a monoclonal antibody (2.4G2) directed against Fc receptors on murine leukocytes. *J Immunol* 133 (2), 855–862 (1984).
93. Dou, L., Shi, X., He, X. & Gao, Y. Macrophage Phenotype and Function in Liver Disorder. *Front Immunol* 10, 3112 (2020).
94. Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T. & Nagy, L. E. Kupffer Cells in the Liver. *Compr Physiol* 3 (2), 785–797 (2013).
95. Sharma, A. *et al.* LFA-1 Ligation by High Density ICAM-1 is Sufficient to Activate IFN-γ Release by Innate T lymphocytes. *J Immunol* 201 (8), 2452–2461 (2018).
96. Walling, B. L. & Kim, M. LFA-1 in T cell migration and differentiation. *Front Immunol* 9, 952 (2018).
97. British Society for Immunology. T Lymphocyte Transmigration. Abgerufen am 06.05.2022 von <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/systems-and-processes/t-lymphocyte-transmigration>.
98. Alon, R. & Shulman, Z. Chemokine triggered integrin activation and actin remodeling events guiding lymphocyte migration across vascular barriers. *Exp Cell Res* 317 (5), 632–641 (2011).
99. Girard, J.-P., Moussion, C. & Förster, R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 12 (11), 762–773 (2012).
100. Max-Planck-Gesellschaft, Warum erforschen Wissenschaftler Mäuse? Abgerufen am 30.05.2022 von <https://www.mpg.de/10888547/warum-erforschen-wissenschaftler-maeuse>.
101. Lee, S. L. *et al.* Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77). *Science* 269 (5223), 532–535 (1995).
102. Hanna, R. N. *et al.* The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and survival of Ly6C⁺ monocytes. *Nat Immunol* 12 (8), 778–785 (2011).
103. Samama, M. M. The mechanism of action of rivaroxaban--an oral, direct Factor Xa inhibitor--compared with other anticoagulants. *Thromb Res* 127 (6), 497–504 (2011).
104. Noubouossie, D. F. *et al.* In vitro activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps. *Blood* 129 (8), 1021–1029 (2017).
105. Parekh, S., Ziegenhain, C., Vieth, B., Enard, W. & Hellmann, I. The impact of amplification on differential expression analyses by RNA-seq. *Sci Rep* 6, 25533(2016).
106. Macosko, E. Z. *et al.* Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell* 161 (5), 1202–1214 (2015).

107. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4 (1), 44–57 (2008).
108. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37 (1), 1–13 (2009).
109. Mueller, T. T. *et al.* Mutual regulation of CD4⁺ T cells and intravascular fibrin in infections. *Haematologica* 109 (8), 2487–2499 (2024).
110. Ross, S. H. & Cantrell, D. A. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 36, 411–433 (2018).
111. Nguyen, Q. P., Deng, T. Z., Witherden, D. A. & Goldrath, A. W. Origins of CD4⁺ circulating and tissue-resident memory T-cells. *Immunology* 157 (1), 3–12 (2019).
112. Sage, P. T. & Sharpe, A. H. T follicular regulatory cells. *Immunol Rev* 271 (1), 246–259 (2016).
113. Eggleton, P., Javed, M., Pulavar, D. & Sheldon, G. Immune Complexes. *Wiley Online Library* (2006).
114. Tonina Theres Müller. Zusammenspiel zwischen intravaskulärer Koagulation und Immunzellrekrutierung in der systemischen bakteriellen Infektion. *Ludwig-Maximilian Universität München, München* (2021).
115. Kurlander, R. J., Ellison, D. M. & Hall, J. The blockade of Fc receptor-mediated clearance of immune complexes in vivo by a monoclonal antibody (2.4G2) directed against Fc receptors on murine leukocytes. *J Immunol* 133 (2), 855–862 (1984).
116. Viswanathan, P. & Krishnamurti, L. Changing Age Distribution of Deep Venous Thrombosis In the United States. *Blood* 116 (21), 1539 (2010).
117. Martin, G. S., Mannino, D. M. & Moss, M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med* 34 (1), 15–21 (2006).
118. Mare, T. A. *et al.* The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. *Crit Care* 19 (1), 57 (2015).
119. He, W., Xiao, K., Fang, M. & Xie, L. Immune Cell Number, Phenotype, and Function in the Elderly with Sepsis. *Aging Dis* 12 (1), 277–296 (2021).
120. Nikolich-Zugich, J. The twilight of immunity: Emerging concepts in aging of the immune system review-article. *Nat Immunol* 19 (1), 10–19 (2018).
121. Mukhopadhyay, S. *et al.* Depletion of CD4 and CD8 Positive T Cells Impairs Venous Thrombus Resolution in Mice. *Int J Mol Sci* 21 (5), 1650 (2020).
122. Loef, E. J., Sheppard, H. M., Birch, N. P. & Dunbar, P. R. Plasminogen and plasmin can bind to human T cells and generate truncated CCL21 that increases dendritic cell chemotactic responses. *J Biol Chem* 298 (7), 102112 (2022).
123. Reantragoon, R. *et al.* Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *J Exp Med* 210 (11), 2305–2320 (2013).

124. Rahimpour, A. *et al.* Identification of phenotypically and functionally heterogeneous mouse mucosal-associated invariant T cells using MR1 tetramers. *J Exp Med* 212 (7), 1095–1108 (2015).
125. Gherardin, N. A. *et al.* Human blood MAIT cell subsets defined using MR1 tetramers. *Immunol Cell Biol* 96 (5), 507–525 (2018).
126. Kinjo, Y., Kitano, N. & Kronenberg, M. The role of invariant natural killer T cells in microbial immunity. *J Infect Chemother* 19 (4), 560–570 (2013).
127. Nel, I., Bertrand, L., Toubal, A. & Lehuen, A. MAIT cells, guardians of skin and mucosa? *Mucosal Immunol* 14 (4), 803–814 (2021).
128. Jouan, Y. *et al.* Phenotypical and functional alteration of unconventional T cells in severe COVID-19 patients. *J Exp Med* 217 (12), e20200872
129. Yang, B. H. *et al.* Foxp3⁺ T cells expressing ROR γ t represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 9 (82), 444–457 (2016).
130. Murphy, K. & Weaver, C. Die Dynamik der angeborenen und adaptiven Immunantwort. in *Janeway - Immunologie* 581–639 (2018).
131. Altieris, D. C. *et al.* A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Biol Chem* 265 (21), 12119–12122 (1990).
132. Wright, S. D. *et al.* Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (20), 7734–7738 (1988).
133. Davalos, D. & Akassoglou, K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin Immunopathol* 34 (1), 43–62 (2011).
134. Languino, L. R. *et al.* Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (5), 1505–1509 (1995).
135. Languino, L. R. *et al.* Fibrinogen Mediates Leukocyte Adhesion to Vascular Endothelium through an ICAM-1-Dependent Pathway. *Cell* 73 (7), 1423–1434 (1993).
136. LangHeinrich, T. Die koaguloregulatorische Funktion der T Zellen während der Pathogen induzierten Immunothrombose. *Ludwig-Maximilian Universität München, München* (2024).
137. Litvinov, R. I. Fibrin opens the “gate” for leukocytes in the endothelium. *Thromb Res* 162, 101–103 (2018).
138. Yakovlev, S. & Medved, L. Effect of fibrinogen, fibrin, and fibrin degradation products on transendothelial migration of leukocytes. *Thromb Res* 162, 93–100 (2018).
139. Qi, J., Kreutzer, D. L. & Piela-Smith, T. H. Fibrin induction of ICAM-1 expression in human vascular endothelial cells. *J Immunol* 158 (4), 1880–1886 (1997).
140. Petzelbauer, P. *et al.* The fibrin-derived peptide B β 15–42 protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury. *Nat Med* 11 (3), 298–304 (2005).

141. Bachmann, M. F. *et al.* Distinct Roles for LFA-1 and CD28 during Activation of Naive T Cells: Adhesion versus Costimulation. *Immunity* 7 (4), 549–557 (1997).
142. Oppenheimer-Marks, N., Davis, L. S., Bogue, D. T., Ramberg, J. & Lipsky, P. E. Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol* 147 (9), 2913–2921(1991).
143. Shaw, M. A., Gao, Z. & Mullins, E. S. Plasmin(ogen) Mediates Macrophage Migration in a Fibrin(ogen) Dependent Mechanism. *Blood* 128, 18 (2016).
144. Reichel, C. A., Kanse, S. M. & Krombach, F. At the Interface of Fibrinolysis and Inflammation: The Role of Urokinase-Type Plasminogen Activator in the Leukocyte Extravasation Cascade. *Trends Cardiovasc Med* 22 (7), 192–196 (2012).
145. Rothberger, H., Zimmerman, T. S., Spiegelberg, H. L. & Vaughan, J. H. Leukocyte procoagulant activity. Enhancement of production in vitro by IgG and antigen-antibody complexes. *J Clin Invest* 59 (3), 549–557 (1977).
146. Chen, K. *et al.* Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood* 120 (22), 4421–4431 (2012).
147. Maharshak, N. *et al.* Size distribution of leukocyte aggregates differentiate between stress- and infection/inflammation-related leukocytosis. *Stress Med* 16 (2), 125–131 (2000).
148. Bénéchet, A. P. *et al.* Dynamics and genomic landscape of CD8+ T cells undergoing hepatic priming. *Nature* 574 (7777), 200–205 (2019).
149. Mitra, A. D., Rashidi, H. H., Matsukuma, K. GI biopsies with lymphoid aggregates: What does this mean? Abgerufen am 13.07.2022 von <https://health.ucdavis.edu/blog/lab-best-practice/gi-biopsies-with-lymphoid-aggregates-what-does-this-mean/2020/10>.
150. Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J. & Fridman, W. H. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 19 (6), 307–325 (2019).
151. Nasr, I. W. *et al.* Tertiary lymphoid tissues generate effector and memory T cells that lead to allograft rejection. *Am J Transplant* 7 (5), 1071–1079 (2007).
152. Walker, L. S. K. The link between circulating follicular helper T cells and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 22 (9), 567–575 (2022).
153. Crotty, S. T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity* 41 (4), 529–542 (2014).
154. The Jackson Laboratory, When are mice considered old? Abgerufen am 05.06.2022 von <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2017/november/when-are-mice-considered-old>.
155. University of Michigan Medical School, Mouse Breeding Colony Management – Training & Education, Abgerufen am 05.06.2022 von <https://brcf.medicine.umich.edu/cores/transgenic-animal-model/training-education/breed/>.
156. University of Michigan Medical School, Mouse Breeding Colony Management – 1. Mouse Reproduction, Abgerufen am 05.06.2022 von <https://brcf.medicine.umich.edu/cores/transgenic-animal-model/training-education/breed/>.

157. Blank, C. U. *et al.* Defining 'T cell exhaustion'. *Nat Rev Immunol* 19 (11), 665–674 (2019).
158. Yu, X. & Diamond, S. L. Fibrin modulates shear-induced NETosis in sterile occlusive thrombi formed under hemodynamic flow. *Thromb Haemost* 119 (4), 586–593(2019).
159. Goel, M. S. & Diamond, S. L. Neutrophil Enhancement of Fibrin Deposition Under Flow Through Platelet-Dependent and -Independent Mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 (12), 2093–2098 (2001).
160. Simon, D. I., Ezratty, A. M., Francis, S. A., Rennke, H. & Loscalzo, J. Fibrin(ogen) Is Internalized and Degraded by Activated Human Monocytoid Cells Via Mac-1 (CD11 b/CD18): A Nonplasmin Fibrinolytic Pathway. *Blood* 82 (8), 2414–2422 (1993).
161. Hunt, B. J. & Levi, M. Re The source of elevated plasma D-dimer levels in COVID-19 infection. *Br J Haematol* 190 (3), e133–e134 (2020).
162. Manfredi, A. A., Ramirez, G. A., Rovere-Querini, P. & Maugeri, N. The Neutrophil's Choice: Phagocytosis vs Make Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol* 9, 288 (2018).
163. Butcher, S., Chahel, H. & Lord, J. M. Ageing and the neutrophil: no appetite for killing? *Immunology* 100 (4), 411–416 (2000).
164. Ortmann, W. & Kolaczowska, E. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. *Cell Tissue Res* 371 (3), 473–488 (2018).
165. Liang, S. C. *et al.* An IL-17F/A Heterodimer Protein Is Produced by Mouse Th17 Cells and Induces Airway Neutrophil Recruitment. *J Immunol* 179 (11), 7791–7799 (2007).
166. Strydom, N. & Rankin, S. M. Regulation of Circulating Neutrophil Numbers under Homeostasis and in Disease. *J Innate Immun* 5 (4), 304–314 (2013).
167. Deniset, J. F. & Kubes, P. Neutrophil heterogeneity: Bona fide subsets or polarization states? *J Leukoc Biol* 103 (5), 829–838 (2018).
168. Deniset, J. F., Surewaard, B. G., Lee, W.-Y. & Kubes, P. Splenic Ly6G high mature and Ly6G int immature neutrophils contribute to eradication of *S. pneumoniae*. *J Exp Med* 214 (5), 1333–1350 (2017).
169. Mackey, J. B. G., Coffelt, S. B. & Carlin, L. M. Neutrophil maturity in cancer. *Front Immunol* 10, 1912 (2019).
170. McDonald, A. P. *et al.* Aging is associated with impaired thrombus resolution in a mouse model of stasis induced thrombosis. *Thromb Res* 125 (1), 72–78 (2010).
171. Montecino-Rodriguez, E., Berent-Maoz, B. & Dorshkind, K. Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *J Clin Invest* 123 (3), 958–965 (2013).
172. Liu, Y. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *J Infect* 81 (1), e6–e12 (2020).
173. Shaw, R. J., Bradbury, C., Abrams, S. T., Wang, G. & Toh, C.-H. COVID-19 and immunothrombosis: emerging understanding and clinical management. *Br J Haematol* 194 (3), 518–529 (2021).
174. Ayça, B. *et al.* Neutrophil to lymphocyte ratio is related to stent thrombosis and high mortality in patients with acute myocardial infarction. *Angiology* 66 (6), 545–552 (2015).

175. Karataş, M. B. *et al.* Assessment of Prognostic Value of Neutrophil to Lymphocyte Ratio and Platelet to Lymphocyte Ratio in Patients with Pulmonary Embolism. *Acta Cardiol Sin* 32 (3), 313-320 (2016).
176. Artoni, A. *et al.* Platelet to Lymphocyte Ratio and Neutrophil to Lymphocyte Ratio as Risk Factors for Venous Thrombosis. *Clin Appl Throm Hemost* 24 (5), 808–814 (2018).
177. Whyte, C. S., Morrow, G. B., Mitchell, J. L., Chowdary, P. & Mutch, N. J. Fibrinolytic abnormalities in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and versatility of thrombolytic drugs to treat COVID-19. *J Thromb Haemost* 18 (7), 1548–1555 (2020).
178. Marini, O. *et al.* Mature CD10+ and immature CD10– neutrophils present in G-CSF–treated donors display opposite effects on T cells. *Blood* 129 (10), 1343–1356 (2017).

Anhang

Legenden zu Videos 1-5

Video 1 Bewegungsverhalten von CD4⁺ T-Zellen während *E. coli* Infektion

Multiphotonen-Mikroskopie der Mikrozirkulation der Leber von Mäusen, während einer und 6 Stunden nach Infektionsbeginn (*E. coli*). Gesamt wurden 3 Tiere untersucht und analysiert. Die Videos zeigen repräsentative unidirektionales Crawling und rück- und-vorwärts Crawling von CD4⁺ T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen (CMPTX, rot), Blutfluss (FITC-Dextran, grün), Kupffer-Zellen (Autofluoreszenz, weiß/grau). Messbalken ist 10 µm. Videos gehören zu Abbildung 13.

Video 2 Verändertes Bewegungsverhalten von T-Helferzellen durch Blockade von LFA-1

Multiphotonen-Mikroskopie der Mikrozirkulation der Leber von *E. coli*-infizierten Mäusen, die mit αLFA-1 Antikörper oder Kontrollantikörper behandelt worden sind. Aufnahmen wurden zwischen einer und 6 Stunden nach Infektionsbeginn durchgeführt. Gesamt wurden 3 Tiere pro Gruppe untersucht und analysiert. Repräsentatives Bewegungs-Verhalten nach Blockade von LFA-1 und Kontrollbehandlung. CD4⁺ T Zellen (CMPTX, rot), Blutfluss (FITC-Dextran, grün), Kupfferzellen (Autofluoreszenz, weiß/grau). Messbalken ist 50 µm. Videos gehören zu Abbildung 14.

Video 3 Wirkung von Rivaroxaban auf die Bewegungsverhalten von CD4⁺ T-Zellen während Infektion

Multiphotonen-Mikroskopie der Mikrozirkulation der Leber von Mäusen, die mit *E. coli* infiziert und mit Vehikel oder Rivaroxaban behandelt worden sind. Aufnahmen wurden zwischen einer und 6 Stunden nach Infektionsbeginn durchgeführt. Gesamt wurden 3 Tiere pro Gruppe untersucht und analysiert. Repräsentatives Bewegungs-Verhalten nach Rivaroxaban-Verabreichung und Vehikel-Gabe. CD4⁺ T-Zellen (CMPTX, rot), Blutfluss (FITC-Dextran, grün), Kupffer-Zellen (Autofluoreszenz, weiß/grau,). Messbalken ist 50 µm. Videos gehören zu Abbildung 15.

Video 4 Bildung von T-Helferzell-Clustern in der Mikrozirkulation der Leber nach Infektion

Ansammlungen von immobilisierten CD4⁺ Zell-Cluster in der Mikrozirkulation der Leber, dargestellt durch Multiphotonen-Mikroskopie. Aufnahmen wurden zwischen 10 und 16 Stunden nach Infektionsbeginn durchgeführt. Gesamt wurden elf Tiere untersucht und analysiert. Repräsentatives Video von Experimenten an 11 verschiedenen Mäusen. CD4⁺ T-Zellen (CMPTX, rot), Zellkerne (Dapi, blau), Blutfluss (FITC-Dextran, grün), Kupffer-Zellen (Autofluoreszenz, weiß/grau,). Messbalken ist 20 µm. Videos gehören zu Abbildung 18.

Video 5 Aufnahme von IK durch gebündelte CD4⁺T-Zellen

3D-Bildprojektion von internalisierten IK durch CD4⁺ T-Zellcluster, aufgenommen mit Multiphotonen-Mikroskopie, 10 Stunden nach Infektionsbeginn mit *E. coli*. Mäusen wurden fluoreszenzmarkierte BSA- α BSA-IK injiziert. Gesamt wurden 3 Tiere untersucht und analysiert. CD4⁺ T-Zellen (CMPTX, rot), IK (AF488, grün), Blutfluss (Dextran-Blau, Pseudofarbe weiß). Messbalken ist 10 μ m. Videos gehören zu Abbildung 20.

Zusätzliche Abbildungen I-VI

Abbildung I

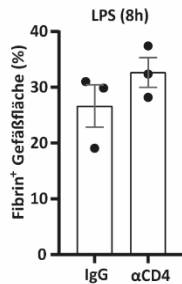


Abbildung I

Anteil fibrin-bedeckende Gefäßfläche in CD4⁺ T-Zell depletierten jungen Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe 8 Stunden nach Injektion von LPS. Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier (c). Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.01$ (**).

Abbildung II

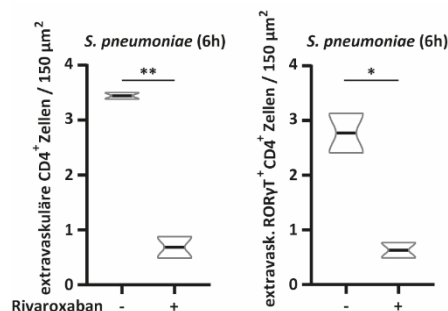


Abbildung II

Extravaskuläre T-Helferzellen (links) und Th17-Zellen (rechts) im Extravaskularraum der Leber junger Tiere in Abhängigkeit von Rivaroxaban 6 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae*. In Violinplots zeigen verstärkte horizontale Linien den Median und die gestrichelten Linien die 25te und 75te Quartile an.

Abbildung III

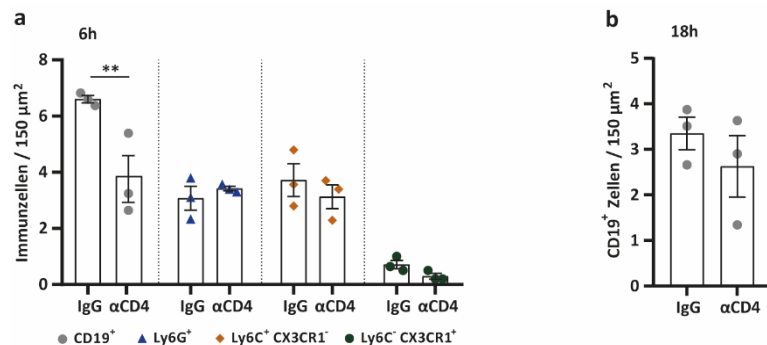


Abbildung III – Vorhandensein von CD4⁺ T-Zellen beeinflusst Arrest von B-Zellen

c Anzahl von Immunzellen 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion in den Sinusoiden der Leber. Charakterisierung von B-Zellen über CD19⁺, CD4⁺ T-Zellen über CD4⁺, Neutrophiler über MPO⁺, klassischer Monozyten über CD115⁺ Ly6C^{stark} und nicht-klassischer Monozyten über CD115⁺ Ly6C^{schwach}. B1a-Zellen wurden über CD19⁺ und CD5⁺ bestimmt. d

Arretierte Immunzellen in den Lebersinusoiden 6 Stunden nach *E. coli*-Infektion in $CD4^+$ T-Zell depletierten jungen Mäusen und der Kontrollgruppe. Charakterisierung von B-Zellen über $CD19^+$, Neutrophiler über $Ly6G^+$, klassischer Monozyten über $Ly6C^{stark} CX3CR1^{schwach}$ und nicht-klassischer Monozyten über $Ly6C^{schwach} CX3CR1^{stark}$. **e** Arretierte $CD19^+$ B-Zellen 18 Stunden nach *E. coli*-Infektion in jungen Mäusen nach $CD4^+$ T-Zelldepletion und der Kontrollgruppe.

Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. In Violinplots zeigen dicke Balken den Median und die gestrichelten Linien die 25te und 75te Quartile an. $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)

Abbildung IV

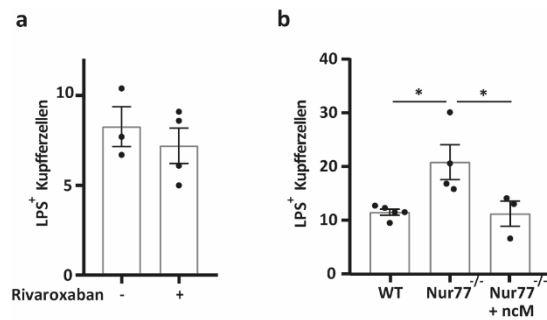


Abbildung IV

a, b Anzahl LPS positiver Kupfferzellen pro Gesichtsfeld ($150 \mu m^2$) 6 Stunden nach Infektion mit *E.coli* von jungen Rivaroxaban-behandelten Mäusen und der Kontrollgruppe (**a**) und von jungen *Nur77*^{-/-} Mäusen, des WTs und nach „Rescue“-Injektion nicht-klassischer Monozyten in *Nur77*^{-/-} Mäusen (**b**).

Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM. $P < 0.05$ (*).

Abbildung V

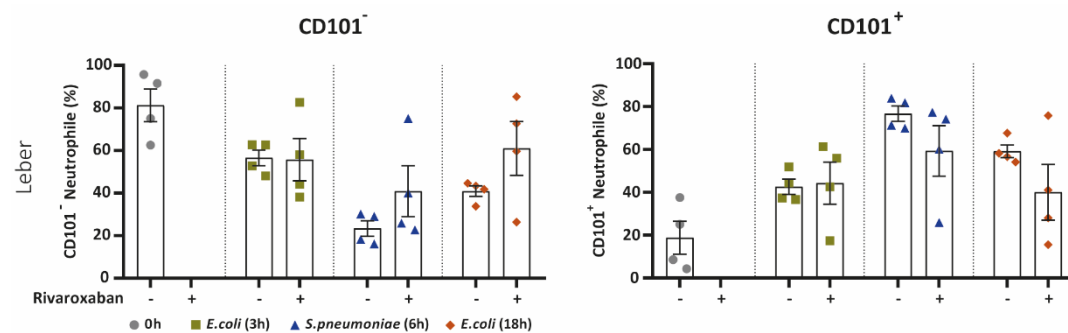


Abbildung V

Verteilung von $CD101^-$ und $CD101^+$ Neutrophilen in nicht-infizierten alten Mäusen, sowie 3 und 18 Stunden nach *E.coli*-Infektion bzw. 6 Stunden nach *S. pneumoniae*-Infektion. Vor Infektion wurden die Tiere mit Rivaroxaban bzw. der Vehikel-Lösung als Kontrolle behandelt. Zellisolate jeweils aus der Leber.

Daten zu Kontroll-behandelten, infizierten alten Tieren identisch mit Daten aus Abbildung 27b, c, d und e.

Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM.

Abbildung VI

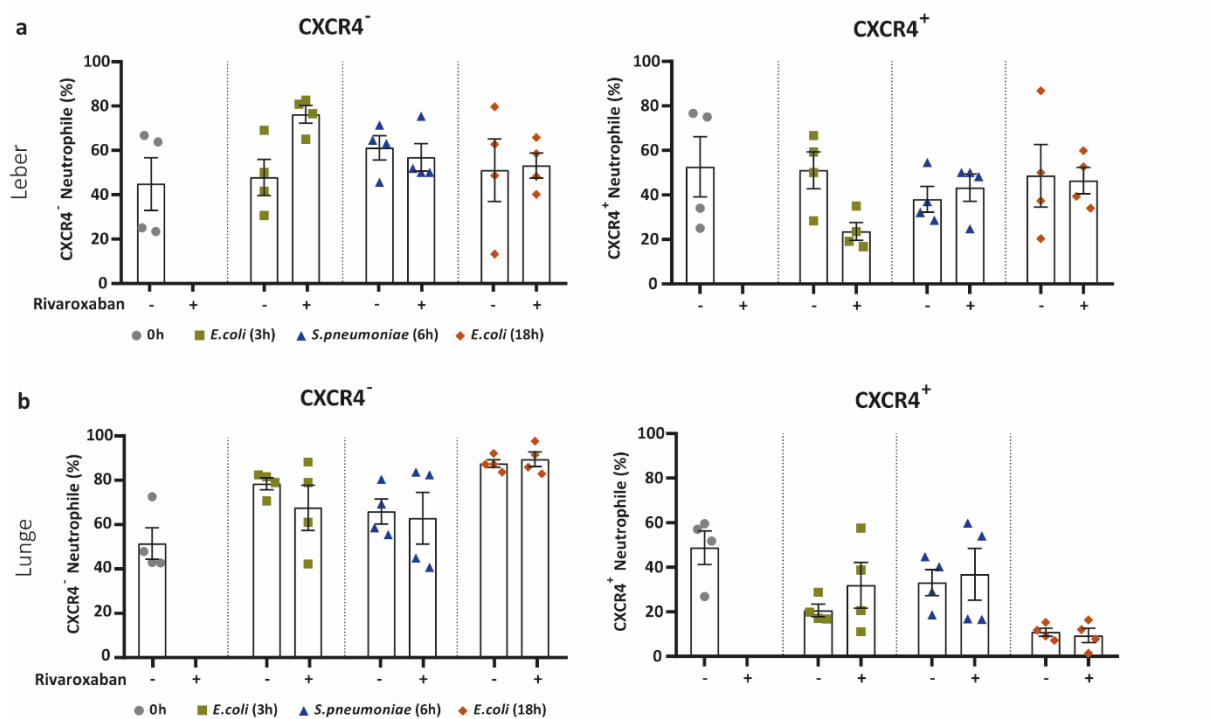


Abbildung VI

a, b Verteilung von CXCR4⁻ und CXCR4⁺ Neutrophilen in nicht-infizierten alten Mäusen, sowie 3 bzw. 18 Stunden nach *E.coli*-Infektion und 6 Stunden nach *S. pneumoniae*-Infektion in alten Mäusen. Vor Infektion wurden die Tiere mit Rivaroxaban bzw. der Vehikel-Lösung als Kontrolle behandelt. Zellisolate jeweils aus Leber (**a**) und Lunge (**b**). Daten zu Kontroll-behandelten, infizierten alten Tieren identisch mit Daten aus Abbildung 28b, c, d und e. Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM.

Abbildung VII

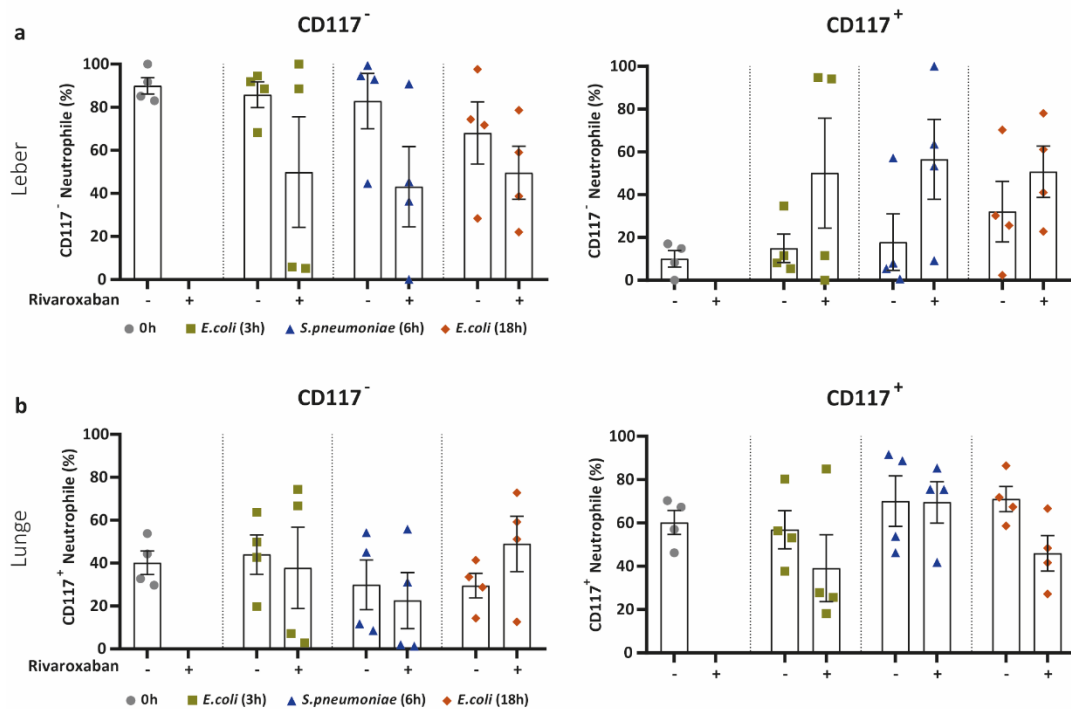


Abbildung VII

a, b Verteilung von CD117⁻ und CD117⁺ Neutrophilen in nicht-infizierten alten Mäusen, sowie 3 und 18 Stunden nach E.coli-Infektion bzw. 6 Stunden nach S. pneumoniae-Infektion. Vor der Infektion wurden die Tiere zusätzlich mit Rivaroxaban oder Vehikel-Lösung behandelt. Zellisolate jeweils aus Leber (**a**) und Lunge (**b**). Daten zu alten Kontroll-behandelten Tieren 3 Stunden nach E. coli Infektion aus **a** und **b** identisch mit Daten aus Abbildung 29b. Jeder Punkt steht jeweils für ein individuelles Tier. Fehlerbalken zeigen SEM.

Abbildung VIII

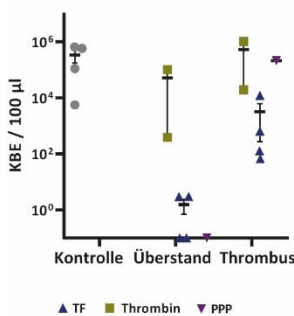


Abbildung VIII

Effizienz des Trappings und der Elimination von E.coli in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Thromben in vitro

Anzahl der koloniebildenden Einheiten nach 90-minütiger Inkubation in vitro. Punkte beziehen sich jeweils auf biologische Replikate. Fehlerbalken zeigen SEM.

Publikationen

Mueller, T. T. (*), Pilartz, M. (*), Thakur, M. (*), LangHeinrich, T., Luo, J., Block, R., Hoeflinger, J. K. L., Meister, S., Karaj, F., Garcia Perez, L., Öllinger, R., Engleitner, T., Thoss, J., Voelkl, M., Tersteeg, C., Koedel, U., Zigman Kohlmaier, A., Teupser, D., Wygrecka, M., Ye, H., Preissner, K. T., Radbruch, H., Elezkurtaj, S., Mack, M., von Hundelshausen, P., Weber, C., Massberg, S., Schulz, C., Rad, R., Huber, S., Ishikawa-Ankerhold, H. and Engelmann, B. **Mutual regulation of CD4+ T cells and intravascular fibrin in infections.** *Haematologica* 109 (8), 2487–2499 (2024) doi: 10.3324/haematol.2023.284619

* Erstautoren

Geplante Publikationen:

Mueller, T. T., Meister, S., Luo, J., Thoss, J., Lehner, Q., Thakur, M., **Pilartz, M.**, Ishikawa-Ankerhold, H., Mägdefessel, L., Duchene, J., Weber, C., Massberg, S., Teupser, D., Schulz, C., Schmidt-Supprian, M., Engelmann, B. **Stage specific control of intravascular fibrin by innate lymphoid and myeloid cells in infection/Timing**

Mueller, T. T., **Pilartz, M.**, ... Engelmann, B. **Microvascular thrombosis as origin of T cell clustering**



Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Pilartz, Mona

Name, Vorname

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

CD4+ T-Zellen als Gegenspieler von neutrophilen Granulozyten während der Immunothrombose im Rahmen systemischer Infektionen

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

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

Feldkirchen-Westerham, den 09.11.2025

Ort, Datum

Mona Pilartz

Unterschrift Doktorandin/Doktorand



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Pilartz, Mona

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

CD4+ T-Zellen als Gegenspieler von neutrophilen Granulozyten während der Immunothrombose im Rahmen systemischer Infektionen

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Feldkirchen-Westerham, den 09.11.2025

Ort, Datum

Mona Pilartz

Unterschrift Doktorandin/Doktorand