

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Antikörper als neue Faktoren im immunologischen Prozess der
venösen Thrombose

von Johanna Busse
aus München

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichem Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Angefertigt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikums der
Universität München

Mentor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin P. Märtelbauer
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke
Priv.-Doz. Dr. Gerhard Wess
Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Tag der Promotion: 18. Juli.15

Meiner Familie und Fabian

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Venöse Thrombose	2
1.1.	Definition der Thrombose	2
1.2.	Inzidenz und klinische Bedeutung der Venenthrombose	2
1.3.	Aufbau venöser Thromben	3
1.4.	Entstehungsmechanismen der venösen Thrombose	4
1.4.1.	Blutgerinnung	6
1.4.2.	Die venöse Thrombusbildung als Entzündungsreaktion	8
1.4.2.1.	Aktivierung des Endothels	9
1.4.2.2.	Bedeutung von Leukozyten	10
1.4.2.3.	Einfluss von Thrombozyten	13
1.5.	Induktion venöser Thromben in Tiermodellen	14
1.5.1.	Stase-Modelle	15
1.5.2.	Stenose-Modelle	15
1.5.3.	Elektrolytisches Modell	16
2.	Die Bedeutung von Antikörpern für die Thrombose	16
2.1.	Ursprung von Antikörpern	16
2.2.	Aufbau und Funktion	17
2.3.	Immunglobulinklassen	20
2.4.	Fc-Rezeptoren	21
2.5.	Natürliche Antikörper	23
2.6.	Prothrombotische Eigenschaften von Antikörpern	25
2.6.1.	Interaktion mit dem Komplementsystem	25
2.6.1.1.	Antikörper-abhängige Aktivierung	27
2.6.1.1.1.	Klassischer Weg	28
2.6.1.1.2.	Lektin-Weg	29
2.6.1.1.3.	Alternativer Weg	30
2.6.1.2.	Interaktion des Komplementsystems mit der Gerinnung	30
2.6.1.3.	Einfluss des Komplementsystems auf die venöse Thrombose	31
2.6.2.	Beteiligung von Antikörpern an klinisch relevanten thrombotischen Erkrankungen	32

III.	ZIELSETZUNG	34
1.	Untersuchung des Einflusses von Antikörpern auf die venöse Thrombose	34
2.	Charakterisierung der antikörperabhängigen Thrombusbildung.....	34
3.	Analyse der Bedeutung natürlicher Antikörper für die venöse Thrombose	35
IV.	MATERIAL UND METHODEN	36
1.	Versuchstiere	36
1.1.	Wildtypstamm C57BL/6J.....	36
1.2.	Komplementfaktorrezeptor 2-defiziente Mäuse.....	36
1.3.	Mäuse mit veränderter Antikörper-Produktion	37
1.3.1.	sIgM-Knockout-Mäuse	37
1.3.2.	AID-Knockout-Mäuse.....	37
1.3.3.	sIgM-AID-Knockout-Mäuse.....	38
1.4.	Fcy-Rezeptor-Knockout-Mäuse	38
1.5.	Tierhaltung	39
1.5.1.	Haltungsbedingungen.....	39
1.5.2.	Haltungsbedingungen im Experiment.....	39
2.	Operationsverfahren.....	40
2.1.	Narkose.....	40
2.2.	Vorbereitung auf die Operation.....	42
2.3.	Intravenöse Applikation über den Schwanzvenen-Katheter	44
2.4.	Operatives Vorgehen an der Vena cava caudalis	45
2.4.1.	Stenosierung der Vena cava caudalis	45
2.4.2.	Entnahme der Vena cava caudalis und Gewichtsbestimmung.....	47
2.4.3.	Sham-Operation	50
2.5.	Blutentnahmemethoden.....	51
2.5.1.	Blutgewinnung aus dem Herzen	51
2.5.2.	Blutgewinnung aus der Vena facialis.....	51
3.	Blutanalysen.....	52
3.1.	Blutbilder.....	52
3.2.	Thrombelastometrie	52
3.2.1.	Messprinzip	52

3.2.2.	EXTEM-Analyse.....	54
3.2.3.	FIBTEM-Analyse.....	54
3.2.4.	Interpretation der Messergebnisse.....	55
4.	Intravitalmikroskopie (IVM)	57
4.1.	Geräte	57
4.2.	Durchführung	58
4.2.1.	Flussgeschwindigkeitsbestimmung.....	58
4.2.2.	Untersuchung der Thrombusentstehung über 6h	59
4.3.	Verwendete Fluoreszenz-Farbstoffe	60
4.3.1.	Acridine Orange	60
4.3.2.	Rhodamin B.....	60
4.4.	Isolation und Färbung von Thrombozyten.....	61
4.5.	Auswertung	62
4.5.1.	Bestimmung der Flussgeschwindigkeit.....	62
4.5.2.	Bestimmung der Leukozytenaggregationsfläche	62
4.5.3.	Bestimmung der mittleren Anzahl adhärenter Thrombozyten.....	63
5.	Immunhistologie	63
5.1.	Anfertigung histologischer Schnitte.....	63
5.2.	Immunhistologische Färbungen	64
5.2.1.	Ly-6G-, CD45- und CD41-Färbung.....	64
5.2.2.	IgG-/IgM-CD31-Doppelfärbung.....	65
5.3.	Auswertung	66
5.3.1.	Ly-6G- und CD41-Färbung.....	66
5.3.2.	IgG-/IgM-CD31-Doppelfärbung.....	67
6.	ELISA.....	67
6.1.	Probengewinnung.....	68
6.2.	Durchführung	68
6.2.1.	IgG-ELISA	68
6.2.2.	IgM-ELISA	69
6.3.	Auswertung	71
7.	Antikörperklassen und Antikörperfragmente.....	71
7.1.	Gepooltes polyklonales IgG und IgA.....	71
7.2.	Monoklonales anti-gp120 IgG	72
7.3.	Monoklonales anti-Influenza-Virus IgG	72

7.4.	Fc-Fragmente	72
8.	Versuchsplanung und Durchführung	73
8.1.	Tierzahl.....	73
8.2.	Dokumentation	73
8.3.	Versuchsgruppen.....	73
8.3.1.	Standardisierung.....	73
8.3.2.	Chronische Versuche zur Bestimmung von Thrombusgewicht und – inzidenz	73
8.3.3.	Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung	74
8.3.4.	Thrombelastometrie	74
9.	Statistische Auswertung.....	75
V.	ERGEBNISSE	77
1.	Standardisierung des venöse-Thrombose-Mausmodells	77
1.1.	Flussgeschwindigkeit	77
1.2.	Leergewicht.....	78
1.3.	Thrombusinzidenz.....	78
1.4.	Sham-Operation	78
2.	Präventiver Effekt der Antikörperdefizienz auf die Bildung venöser Thromben im Mausmodell.....	78
2.1.	Effekt der Antikörperdefizienz auf die venöse Thrombose	79
2.2.	Evaluierung des thrombogenen Effekts von Antikörpern bei venöser Thrombose.....	85
2.3.	Einfluss unspezifisch bindender Antikörper auf die venöse Thrombose...87	
3.	Antikörper-abhängige molekulare Mechanismen der venösen Thrombus-Bildung.....	89
3.1.	Die Bedeutung von Fc-Rezeptoren für die Ausbildung venöser Thromben im Mausmodell.....	89
3.2.	Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung im Stenose-Mausmodell ...91	
3.3.	Einfluss von Antikörpern auf die Blutgerinnung	96
4.	Beteiligung natürlicher Antikörper im Geschehen der venösen Thrombose	98
VI.	DISKUSSION	109

1.	Wahl der Mauslinien.....	109
2.	Stenosemodell	110
3.	Spezifischer Einfluss von Antikörpern auf die Ausbildung venöser Thromben.....	110
4.	Mechanismen der Antikörper-abhängigen Thrombusentstehung	113
4.1.	Abhängigkeit der venösen Thrombusbildung von Antikörper-bedingter Zell-Rekrutierung und Fibrinbildung	113
4.2.	Abhängigkeit der venösen Thrombusbildung von der Interaktion von Antikörpern mit Antigenen	118
5.	Ausblick.....	122
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	124
VIII.	SUMMARY.....	125
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	126
X.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	145
XI.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	150
XII.	TABELLENVERZEICHNIS	153
XIII.	DANKSAGUNG	156

I. EINLEITUNG

Tiefe Venenthrombosen und die damit assoziierte Abschwemmung von Thrombusmaterial in Lungengefäße mit deren Verlegung sind eine häufige und lebensbedrohliche Krankheit.

Eine geeignete Prophylaxe und Therapie gestaltet sich schwierig, da nur wenige eindeutige Prädiktoren des Auftretens der Erkrankung bekannt sind und das Problem medikamentös derzeit fast ausschließlich auf Basis einer Blutgerinnungshemmung angegangen werden kann.

Die venöse Thrombose ist jedoch kein Prozess, der einzig aus einer pathologisch veränderten Blutgerinnung heraus entsteht. Es handelt sich vielmehr um eine überschießende Reaktion des Immunsystems, welche eine Koagulation nach sich zieht. In einem neu etablierten in-vivo Mausmodell für Entstehungsmechanismen der tiefen Venenthrombose konnten grundlegende Zusammenhänge zwischen Blutstase-bedingter venöser Thrombusbildung und einer sterilen Entzündungsreaktion mit massiver Rekrutierung von Leukozyten aufgedeckt werden¹. Darüber hinaus scheinen auch andere wichtige Effektoren des Immunsystems, wie Komplementkomponenten, die Entstehung venöser Thromben zu beeinflussen². Als weitere Verbindung von Immunsystem und tiefer Venenthrombose konnte in den letzten Jahren in verschiedenen Krankheitsbildern eine Assoziation des Auftretens venöser Thrombosen mit dem Vorkommen pathologischer Antikörpermoleküle hergestellt werden³⁻⁵.

Immunologische Prozesse scheinen demnach die Ausbildung venöser Thromben erst zu ermöglichen. Sie stellen einen erfolgversprechenden neuen Angriffspunkt dar, um zukünftig das Problem der tiefen Venenthrombose und ihrer fatalen Folgen effektiver eindämmen zu können, sind allerdings im Detail noch nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, ein besseres Verständnis der auslösenden immunologischen Prozesse zu erhalten und die venöse Thrombose hinsichtlich des Einflusses von Antikörpermolekülen eingehend zu studieren.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Venöse Thrombose

1.1. Definition der Thrombose

Der Begriff „Thrombose“ leitet sich vom griechischen Wort „thrombos“ ab, was geronnene Masse, Klumpen bedeutet⁶. Es bezeichnet die intravitale Bildung eines Blutpfropfes im Gefäßsystem bzw. im Herzen und ist daher vom postmortal gebildeten Leichengerinnsel abzugrenzen^{6,7}. Ebenfalls abzugrenzen ist der pathologische Prozess der Thrombose von der zwar auch intravital stattfindenden, aber physiologischen Hämostase. Während der physiologische Mechanismus der Hämostase einen Schutz vor massivem Blutverlust bei Gefäßverletzung darstellt und exakt reguliert abläuft, ist die Thrombose das pathologische Pendant, bei welcher veränderte auslösende und regulierende Mechanismen vorliegen, auf die in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird⁶⁻⁸.

1.2. Inzidenz und klinische Bedeutung der Venenthrombose

Bei der tiefen Venenthrombose (TVT) des Menschen handelt es sich i.d.R. um ein akutes Krankheitsgeschehen, das mit chronischen Symptomen wie Schwellung, Schmerzen und Zyanose einhergeht⁹. Diese sind aber sehr unspezifisch und teilweise nur mild oder gar nicht vorhanden, was die frühzeitige Diagnose ausgesprochen erschwert¹⁰.

Die venöse Thrombose kommt am häufigsten als tiefe Venenthrombose der Beinvenen und/oder Lungenembolie vor, was als venöse Thrombembolie (VTE) bezeichnet wird. VTE ist die dritt häufigste kardiovaskuläre Erkrankung mit einer jährlichen Inzidenz von 1-2 Individuen von 1000^{11,12}. Die Inzidenz ist stark altersabhängig: Während sie bei Individuen unter 15 Jahren noch bei jährlich 5 Fällen pro 100.000 liegt, steigt sie nach dem 45. Lebensjahr stark an und liegt mit 80 Jahren bei jährlich 5-6 Fällen von 1000¹³⁻¹⁵. Der Grund dafür ist unklar, es wird aber vermutet, dass Faktoren wie verminderte Mobilität und Aktivität, häufigeres Erleiden prädisponierender Erkrankungen, schwächerer Muskeltonus und altersbedingte Veränderungen der Venenklappen und der Gefäßwand damit zusammen hängen^{9,16}.

Das fatale Krankheitsbild der VTE wird in 1/3 der Fälle durch das Abschwemmen

von Thrombusmaterial und dadurch verursachten Lungenembolien bestimmt. Diese Komplikation erhöht die Sterblichkeitsrate der VTE-Patienten erheblich^{12-14,17}.

Allerdings kann auch in der Folge einer TVT ohne Lungenembolie die Lebensqualität massiv vermindert werden, da bis zu 20% der Patienten innerhalb von 5 Jahren das postthrombotische Syndrom entwickeln¹⁰: Durch die Schädigung der Venenklappen und die Einengung der Vene entsteht eine chronische Stauung, die zu Beinschwellung und –schmerzen, Ulzerationen, Dermatitisen und Wundheilungsstörungen führen kann^{10,16,18}.

Das Rückfallrisiko für VTE liegt bei 30% in 10 Jahren und ist in den ersten 6-12 Monaten am größten¹⁹. Während einer Therapie mit Antikoagulanzen werden Rückfälle sehr effektiv eingedämmt und auch die Ausbreitung der Thrombose sowie das Lungenembolierisiko gesenkt^{10,19}. Allerdings besteht unter dieser Therapie die Gefahr von Blutungen¹⁹⁻²¹.

Aufgrund der großen Inzidenz und hohen klinischen Relevanz der venösen Thrombose in der Bevölkerung und die noch nicht zufrieden stellenden Therapie-, Diagnose- und Prophylaxe-Möglichkeiten, besteht der Bedarf die Pathophysiologie dieses Krankheitsbilds auf zellulärer wie molekularer Ebene im Detail zu erforschen, um zukünftig eine bessere Herangehensweise an das Problem zu haben und schwerere Komplikationen wie Lungenembolien zu vermeiden.

1.3. Aufbau venöser Thromben

Venöse Thromben werden als sog. „Gerinnungsthromben“ bezeichnet, was die Tatsache beschreibt, dass durch eine Aktivierung der Gerinnung viel Fibrin gebildet wird – sie sind fibrinreich^{1,6}. Das Fibrin bildet ein Maschenwerk, in welches andere Zellen eingelagert werden⁶.

Bei den beteiligten Zellen handelt es sich primär um passiv eingelagerte Erythrozyten sowie Thrombozyten und Leukozyten, welche zum einen passiv eingelagert, zum anderen aber auch aktiv rekrutiert werden, indem sie mit den Endothelzellen der Venenauskleidung interagieren.

Der Aufbau humaner venöser Thromben deckt sich mit dem muriner Thromben, welche aus dem Stenose-Mausmodell (siehe Punkt II.1.5.2.) gewonnen wurden¹. Sie weisen stets eine charakteristische laminare Schichtung auf: Makroskopisch

und mikroskopisch können größere rote Areale von kleineren weißen unterschieden werden^{1,22}.

Der rote Teil des Thrombus ist derjenige, der in der Thrombogenese als erstes entsteht. Er ist Erythrozyten-reich und mit Fibrinsträngen durchzogen²². Der weiße Thrombus besteht hauptsächlich aus einem Fibrinmaschenwerk, welches dicht gepackte Thrombozyten umschließt²². Kernhaltige Leukozyten sind randständig am Endothel zu finden und gruppenweise im Thrombus verteilt. Bei dem Hauptteil dieser Zellen handelt es sich um neutrophile Granulozyten^{1,23}.

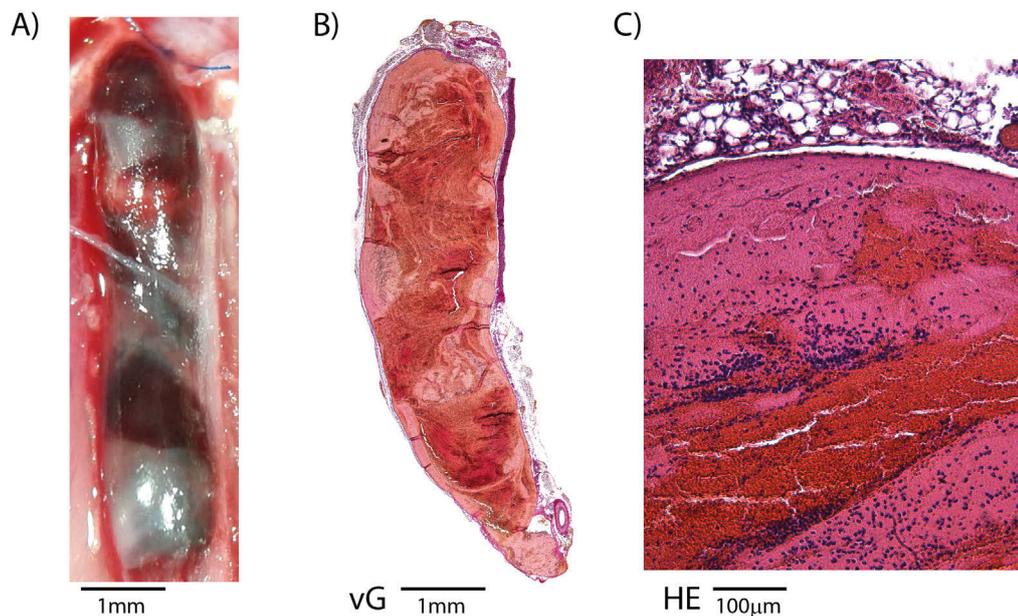


Abbildung 1: Aufbau muriner venöser Thromben aus dem Stenose-Mausmodell 48h nach Ligatur

A) Venöser Thrombus in situ mit kranialer Ligatur; erkennbar ist die schon makroskopisch sichtbare typische laminare Schichtung in rote und weiße Areale; B) Van Gieson-Färbung (vG) eines venösen Thrombus im Längsschnitt; auch hier sind die weißen und roten Areale gut voneinander abgrenzbar; C) Detaillierte Aufnahme der Schichten im Querschnitt eines venösen Thrombus (HE-Färbung): rot=Erythrozyten; lila=Zellkerne (anhand der Zellkernmorphologie hauptsächlich Neutrophile); rosa=Fibrin und Thrombozyten

1.4. Entstehungsmechanismen der venösen Thrombose

Schon 1856 beschrieb der deutsche Mediziner und Pathologe Rudolf Ludwig Karl Virchow die drei noch heute gültigen allgemeinen Grundlagen, welche zur Entstehung einer Thrombose führen können²⁴:

- 1) Die als **Wandfaktor** bezeichnete Läsion der Gefäßwand²⁴.
- 2) Die als **Blutfaktor** bezeichnete gesteigerte Gerinnungsbereitschaft des Blutes (Hyperkoagulabilität)²⁴.

- 3) Die als **Kreislauffaktor** bezeichnete Blutflussstörung²⁴, welche Strömungsverlangsamung und Turbulenzen des Blutes einschließt⁶.

Anders als arterielle, entstehen venöse Thromben gewöhnlich auf intaktem Endothel^{22,25}. Der Wandfaktor scheint demnach eine untergeordnete Rolle in der Bildung venöser Thromben zu spielen. Dagegen sind Hyperkoagulabilität und speziell die Strömungsverlangsamung von großer Bedeutung^{9,22}, was sich in den Risikofaktoren der Venenthrombose widerspiegelt.

Häufig sind diese mit Blutstase verbunden: Unter physiologischen Bedingungen führen Bewegungen der Skelettmuskulatur zu einem Pumpmechanismus, indem die anliegenden Venen regelmäßig komprimiert und wieder entlastet werden (sog. Muskelpumpe)²⁶. Alle Arten der Immobilisation führen durch einen Ausfall dieser Muskelpumpe zum Stagnieren des Blutflusses in den Beinvenen⁹. Dazu zählen Lähmungen, Bettruhe, Gipsverbände, Hospitalisierung und lange (Flug-) Reisen^{9,27,28}.

Bei Hospitalisierung kann das Risiko zusätzlich durch die zugrunde liegenden Erkrankungen, Traumata und operative Eingriffe erhöht sein^{16,29,30}.

Auffallend hoch ist das Thromboserisiko außerdem bei Krebspatienten mit bösartigen Tumoren, da sie eine Vielzahl an Risikofaktoren vereinen⁹: Tumore können Venen komprimieren und zu Stase führen, Krebspatienten sind häufig Operationen und längerem Krankenhausaufenthalt mit Immobilisation ausgesetzt, sie sind meist älter als 45 Jahre und auch eine Chemotherapie ist mit einer erhöhten Gefahr von Venenthrombose verbunden^{9,16,29}. Der bösartige Tumor an sich steigert das Risiko noch, indem er prokoagulatorische Mikropartikel freisetzt, welche unter anderem über Gewebsthromboplastin den extrinsischen Weg der Gerinnung einleiten können³¹.

Erbliche Veränderungen in Spiegeln natürlicher Antikoagulanzen und Gerinnungsfaktoren führen zu einer für venöse Thrombose prädisponierenden Hyperkoagulabilität^{9,16}. Auf ähnliche Weise tragen Fettleibigkeit, Schwangerschaft und Puerperium, hormonelle Therapien in der Menopause sowie die Verwendung von oralen Kontrazeptiva zu einem erhöhten Thromboserisiko bei³²⁻³⁵.

1.4.1. Blutgerinnung

An einem thrombotischen Geschehen ist immer eine Aktivierung der Blutgerinnung beteiligt. Gerade venöse Thromben sind durch eine massive Fibrinbildung gekennzeichnet, unter gleichzeitiger Abwesenheit einer Gefäßverletzung^{1,22,25}. Die Auslösung der plasmatischen Gerinnung scheint demnach eine große Rolle zu spielen. Diese besteht aus einer kaskadenartig hintereinandergeschalteten Aktivierung von, als inaktive Proenzyme vorliegenden Serinproteasen und ihren Kofaktoren³⁶. Sie lässt sich in die intrinsische und extrinsische Gerinnung unterteilen, welche in einem gemeinsamen Weg enden.

Der **extrinsische Weg** wird von aktiviertem Gewebsthromboplastin (=tissue factor, TF, Faktor III) eingeleitet⁶, welches in hoher Konzentration in der Gefäßwand vorhanden ist sowie in geringerer Konzentration und inaktiv auf Monozyten im Blut. TF ist ein Glykoprotein und reich an Phospholipiden⁶. Es muss zunächst aktiviert werden, damit seine prokoagulatorischen Eigenschaften zum Tragen kommen. Mit diesem aktivierten TF kann nun im Blut vorhandener Faktor VII einen Komplex bilden⁶. Dieser Komplex wird durch Kalzium-abhängige Aktivierung hochaktiv und setzt zirkulierenden Faktor X in aktiven Faktor Xa um^{6,37}. Über die Aktivierung dieses Faktors mündet der extrinsische Weg in den gemeinsamen Weg.

Im **intrinsischen Weg** wird zunächst durch hochmolekulares Kininogen (HMWK) und Präkallikrein, welche auf negativ geladenen Oberflächen mit Faktor XII (Hageman-Faktor) Komplexe bilden, Faktor XII aktiviert⁶. Dieser führt zur Aktivierung von Faktor XI⁶. Aktivierter Faktor XIa setzt Faktor IX zu aktiviertem Faktor IXa um, welcher seinerseits auf den Phospholipid-haltigen Zelloberflächen (wie die der Plättchen) mit Kalzium und Faktor VIII Komplexe bildet⁶. Faktor VIII wird durch Thrombin aktiviert, was den ganzen Komplex befähigt, Faktor X zu aktivieren und dadurch die Verbindung zum gemeinsamen Weg zu schaffen⁶. Faktor IX kann daneben auch über den TF-Faktor-VIIa-Komplex des extrinsischen Wegs aktiviert werden, wodurch eine physiologisch bedeutsame Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Weg geschaffen wird^{6,37}.

Der Ausgangspunkt des **gemeinsamen Wegs** ist aktivierter Faktor Xa - dieser ist auf Endothelzellen und Thrombozyten gebunden⁶. Auf diesen Phospholipid-haltigen Oberflächen setzt er Prothrombin zu Thrombin um – einen

Hauptmediator der Gerinnung³⁶. Am besten funktioniert das in einem Komplex mit Faktor Va und Kalzium (Prothrombinase-Komplex)^{6,8}. Thrombin führt zum eigentlichen Ziel der Kaskade: Es spaltet aus Fibrinogen Fibrin ab⁶. Das entstandene Fibrin wird durch Faktor XIIIa zu Polymeren vernetzt⁶.

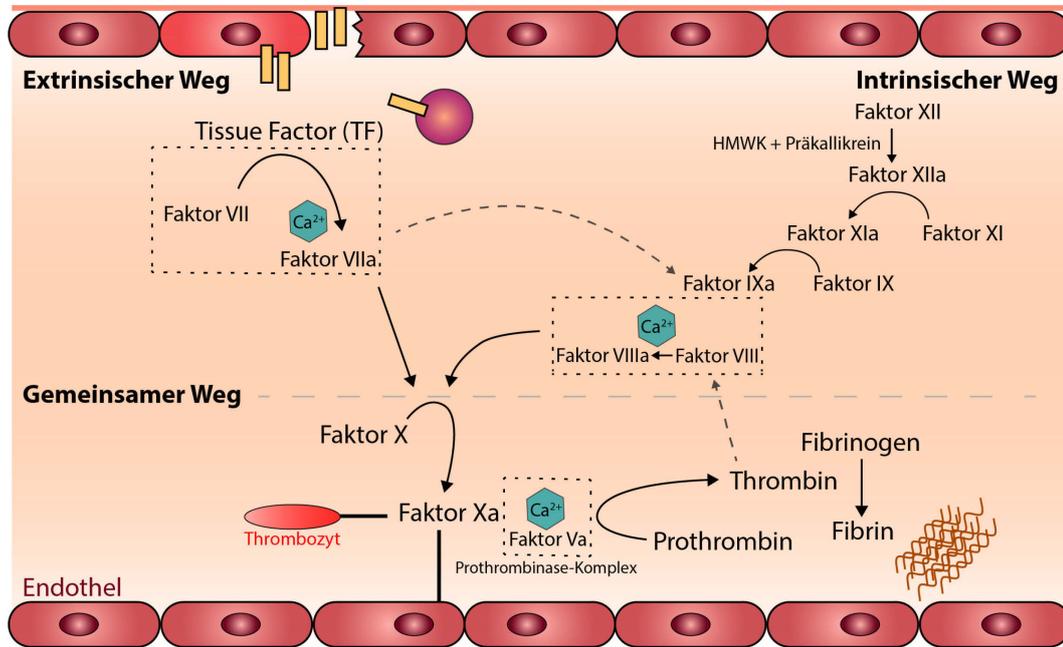


Abbildung 2: Ablauf der Gerinnungskaskade im Blutgefäßlumen, modifiziert nach MARSHALL et al.³⁸

Links oben: Extrinsischer Weg: TF kommt nach Endothelzellschädigung mit dem Blutstrom in Kontakt bzw. wird auf aktivierten Endothelzellen oder Zelloberflächen exprimiert; aktivierter TF setzt die extrinsische Gerinnungskaskade in Gang, welche in den gemeinsamen Weg mündet; rechts oben: Intrinsischer Weg, welcher auf negativ geladenen Oberflächen durch die Aktivierung von Faktor XII eingeleitet wird und über aktivierten Faktor VIIIa in den gemeinsamen Weg mündet; unten: Gemeinsamer Weg: Die Aktivierung von Faktor X führt zur Generierung von Thrombin, welches Fibrinogen in das Endprodukt der Kaskade – Fibrin – umwandelt

Um eine übertriebene Gerinnung zu vermeiden, läuft der Prozess der Hämostase normalerweise exakt reguliert ab^{6,36}. Die wichtigsten natürlichen Antikoagulanzen, welche einer überschießenden Gerinnung entgegenwirken sind Antithrombin III (ATIII), Thromboplastininhibitor (TFPI=tissue factor pathway inhibitor) und Protein C^{6,39}. Mit der Umwandlung von Plasminogen in Plasmin setzt die Fibrinolyse ein und die Thrombinaktivität wird gehemmt^{6,37}.

Erblich bedingte Veränderungen im Spiegel von Gerinnungsfaktoren oder natürlichen Antikoagulanzen sind weitere wichtige Risikofaktoren für die Entstehung von venösen Thrombosen.

Relativ häufig findet man in der Bevölkerung erhöhte Spiegel an Faktor VIII (11%), eine Mutation im Prothrombin-Gen 20210 (2%) und Faktor V Leiden (4-

6%)^{40,41}. Das Risiko der Entwicklung einer venösen Thrombose wird bei heterozygoter Vererbung moderat erhöht^{41,42}.

Defizite in natürlichen Antikoagulanzen, wie Antithrombin oder Protein C sind seltener (1% der Bevölkerung⁴⁰). Allerdings stellen sie auch ein höheres Risiko für die Bildung eines venösen Thrombus dar^{43,44}.

1.4.2. Die venöse Thrombusbildung als Entzündungsreaktion

In der Pathophysiologie der venösen Thrombose ist die Blutgerinnung eng mit einem sterilen Entzündungsprozess verknüpft: Während die Fibrinbildung für die Ausbildung stabiler Thromben nötig ist, stellen auf dem Endothel adhärierende Entzündungszellen den Auslöser des Geschehens dar¹.

Endothelzellen dienen nicht nur als mechanische Barriere zwischen Blut und Gewebe, sondern besitzen auch die Fähigkeit Substanzen freizusetzen und Adhäsionsmoleküle zu exprimieren, was unter anderem Entzündungsreaktionen erst ermöglicht⁴⁵. Im Zytoplasma verfügen Endothelzellen über Speicherorgane: Die Weibel-Palade-Körperchen (WPB). Hier sind von-Willebrand-Faktor (vWF) und Adhäsionsmoleküle wie Selektine gespeichert, welche nach Aktivierung der Zelle an ihre Oberfläche mobilisiert werden können⁴⁵⁻⁴⁷. Im Zuge von Entzündungsgeschehen werden diese Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren sowie Chemokine freigesetzt und an die Zelloberfläche transloziert. Dadurch werden sie zirkulierenden Blutzellen präsentiert und können so u.a. dazu beitragen, dass Leukozyten zum Entzündungsfokus rekrutiert werden⁴⁵.

Im Rahmen einer sterilen Entzündung kommt es zur Ansammlung von Leukozyten, welche als Zellen der unspezifischen Immunabwehr agieren. Leukozyten können unterteilt werden in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten. Leukozyten sind hauptsächlich in lymphatischen Organen und im Bindegewebe des Körpers angesiedelt, wohin sie über den Blutstrom gelangen⁴⁸. Im Blut zirkulieren deshalb nur etwa 5% der Gesamtpopulation des Körpers³⁷.

Alle Leukozyten können sich amöboid bewegen und über die Gefäßwand von Kapillaren und postkapillären Venolen ins Gewebe auswandern⁴⁵. Dieser Vorgang wird als Diapedese bezeichnet und verläuft nach einer Adhäsionskaskade. Die Kaskade umfasst das sog. Einfangen (Tethering), gefolgt vom Rollen auf der intraluminalen Gefäßwand, welches über langsames Rollen in einen Arrest übergeht und eine Adhäsion auf dem Endothel nach sich zieht^{45,49}. Das Rollen

wird hauptsächlich durch eine Interaktion zwischen endothelialelem P-Selektin und dem P-Selektin-Rezeptor der Leukozyten (PSGL-1) sowie zwischen leukozytärem L-Selektin und dem Sialyl-Lewis-X-Rezeptor des Endothels vermittelt⁴⁵. Während des Rollens werden die Leukozyten durch von aktivierten Endothelzellen und Plättchen sezernierte Chemokine und Zytokine aktiviert. Daraufhin werden Integrine wie LFA-1 und Mac-1 aktiviert, mit welchen die Leukozyten schließlich an den ICAM-1-Rezeptoren der Endothelzellen adhären können^{45,49}. In den folgenden Schritten festigt sich die Adhäsion auf dem Endothel und die Leukozyten finden durch Kriechen (Crawling) geeignete Stellen für die letztendliche trans- oder parazelluläre Migration aus dem Gefäßlumen ins Gewebe⁴⁹.

Am Entzündungsgeschehen der venösen Thrombose sind neben Endothelzellen und Leukozyten auch Blutplättchen beteiligt. Die Hauptfunktion von Plättchen ist die Blutgerinnung an Stellen der Gefäßschädigung, allerdings sind sie auch in immunologische und entzündliche Prozesse involviert⁵⁰ und können mit Leukozyten und Endothelzellen interagieren.

Ihre Funktion wird über freigesetzte Substanzen aus Granula und spezifische Rezeptoren der Plättchenoberfläche vermittelt: Plättchen enthalten sog. elektronendichte Granula mit Substanzen wie ADP oder Serotonin und α -Granula, in welchen Proteine und Adhäsionsmoleküle wie vWF oder P-Selektin gespeichert sind^{37,45,48,50}. Werden die Plättchen aktiviert, können sie den Inhalt ihrer Granula in die Umgebung freisetzen oder auf ihrer Oberfläche exprimieren⁵⁰. Mit ihrem Glykoprotein-Rezeptor-Komplex Ib-V-IX (GPIb-V-IX), der aus den Untereinheiten GPIb α , GPIb β , GPV und GPIX aufgebaut ist, können Thrombozyten unter anderem an kollagengebundenen vWF binden^{8,37}. Darüber hinaus verfügen sie über den Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa: Durch die Plättchenaktivierung erfährt das α Ib β III-Integrin der Plättchenoberfläche eine Konformationsveränderung und kann nun als GPIIb-IIIa-Rezeptor Fibrinogen binden^{8,37,51}.

1.4.2.1. Aktivierung des Endothels

Der erste Schritt in der Einleitung der venösen Thrombose stellt nach heutigen Kenntnissen die Aktivierung des Endothels dar: Im Stenose-Mausmodell konnte festgestellt werden, dass das Endothel bei reduziertem Blutfluss zwar intakt bleibt,

aber aktiviert wird¹. In der Folge einer Aktivierung werden in WPB gespeicherte Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin und vWF an die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert⁴⁶. Aus der veränderten Dynamik des Blutflusses resultiert demnach ein proinflammatorischer Phänotyp des Endothels^{1,52}.

Ursächlich für die Endothel-Aktivierung sind vermutlich veränderte Scherkräfte durch Wirbelbildung im Blutfluss und der hypoxische Zustand bei venöser Stase. Es ist erwiesen, dass Hypoxie einen aktivierten und prokoagulatorischen Zustand des Endothels herbeiführen kann⁵²⁻⁵⁵. Auch, dass venöse Thromben ihren Ursprung am häufigsten in den Nischen der Venenklappensinus nehmen, wo die Sauerstoffspannung bei Stase am schnellsten reduziert ist, spricht für den Auslöser Hypoxie^{22,25,56-58}.

Das wichtigste Adhäsionsmolekül bei der Initiierung der venösen Thrombose ist P-Selektin, welches von aktivierten Endothelzellen bereitgestellt wird¹. Es stellt den initialen Kontakt zwischen Endothel und dem PSGL-1-Rezeptor der Leukozyten her – das Einfangen (Tethering) und Rollen⁴⁵ (siehe Punkt II.1.4.2.). In der Folge akkumulieren die Leukozyten an der Gefäßwand und es kommt zur Thrombusbildung. Im Mausmodell waren P-Selektin-Knockout-Mäuse vor der Ausbildung eines venösen Thrombus geschützt und zeigten keine Interaktion der Gefäßwand mit Leukozyten. Auch das P-Selektin, welches auf Plättchen vorkommt, konnte diesen Zustand nicht verändern, was beweist, dass allein das endothelial bereitgestellte P-Selektin in der venösen Thrombose entscheidend ist¹.

1.4.2.2. Bedeutung von Leukozyten

Gleich zu Beginn des Geschehens der venösen Thrombose tritt eine massive Rekrutierung an Leukozyten auf. Nach 48h kann man 70% Neutrophile sowie 30% Monozyten ausmachen und trotz des lymphozytären Blutbildes von Mäusen nur sehr wenige Lymphozyten¹. Entsprechend einer sterilen Entzündung, beginnen die beteiligten Zellen etwa eine Stunde nach Flussgeschwindigkeitsreduktion mit der für Leukozyten typischen Adhäsionskaskade (siehe Punkt II.1.4.2.). Fünf bis sechs Stunden nach Einleitung der venösen Thrombose bedecken die Leukozyten die gesamte Endotheloberfläche und lagern sich in Aggregaten zusammen¹.

Allein die Ansammlung von Leukozyten führt allerdings noch nicht zur Entstehung eines Thrombus. Gerade venöse Thromben sind durch eine starke

Fibrinbildung charakterisiert, was dem Gerinnungssystem bei ihrer Entstehung eine große Rolle zukommen lässt¹. Für die eigentliche Initiierung einer Thrombusbildung muss die Gerinnungskaskade deshalb erst aktiviert werden. Dieser Vorgang ist umgekehrt jedoch wieder abhängig von den rekrutierten Leukozyten: Hauptsächlich Monozyten stellen den Hauptinitiator der Gerinnung bereit - tissue factor (TF)¹. Ohne TF konnte man im Stenose-Mausmodell keine Fibrinbildung feststellen und die Tiere waren komplett vor der Ausbildung von Thromben geschützt¹.

TF kann hauptsächlich in Tunica media und adventitia gefunden werden, wo er ohne Gefäßschädigung nicht mit dem Blutfluss in Kontakt kommt und folglich auch keine Gerinnung induzieren kann. Allerdings wurde TF-Antigen auch ohne Gefäßschädigung im Blut nachgewiesen: Er wird von aktivierten Endothelzellen präsentiert, aber auch von myeloiden Blutzellen auf ihrer Oberfläche sowie über sezernierte Mikropartikel bereitgestellt und zirkuliert in inaktiver Form im Blutkreislauf⁵⁹⁻⁶¹.

Entgegen früheren Vermutungen^{62,63} scheint TF von aktivierten Endothelzellen jedoch bei der venösen Thrombose eine untergeordnete Rolle zu spielen und auch die TF-Bereitstellung durch Neutrophile ist umstritten, weshalb Monozyten in dieser Hinsicht den wichtigsten Einfluss haben¹. Genau wie Endothelzellen, werden Monozyten durch hypoxische Zustände zu einer vermehrten Transkription von TF angeregt und exprimieren diesen daraufhin vermehrt auf ihrer Oberfläche⁶⁴. Im aktivierten Zustand können Monozyten außerdem Teile ihrer Zellmembran als Mikropartikel abschnüren, welche die gleiche Membranzusammensetzung aufweisen, deshalb wie die Monozyten selbst TF tragen und über PSGL-1 mit P-Selektin-exprimierenden Oberflächen interagieren^{65,66}.

Um die Gerinnung aktivieren zu können, muss der im Blut verschlüsselt vorliegende TF erst aktiviert werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) über eine Oxidationsreaktion zur Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten und so zu einer Konformationsveränderung im Molekül führt. Dadurch kann dem TF zu seiner aktiven Form verholfen werden, in welcher er Faktor X binden kann⁶⁷⁻⁶⁹. PDI wird von aktivierten Endothelzellen und Plättchen freigesetzt⁶⁸, ist aber auch auf verschiedenen Zelloberflächen gebunden⁷⁰. Ein PDI-abhängiger Mechanismus der

Thrombusbildung wird durch zahlreiche Studien und Veröffentlichungen unterstützt^{68,69,71,72}. Trotzdem wird der genaue molekulare Mechanismus der TF-Aktivierung noch stark diskutiert.

Monozyten initiieren mit dem bereitgestellten TF die venöse Thrombusbildung. Neutrophile dagegen tragen entscheidend zu deren Fortschreiten bei¹. Ein dabei beteiligter Mechanismus ist die Freisetzung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs).

In ihrem Zytoplasma enthalten Neutrophile, neben einem stark segmentierten Zellkern, verschiedene Arten von Granula, die antibakterielle Proteine und Enzyme enthalten^{45,48}. Neutrophile können ihre Granula bei inflammatorischen Prozessen in die Umgebung abgeben und eine extrazelluläre Abwehr- und Entzündungsreaktion hervorrufen⁴⁵. Die NET-Freisetzung aus Neutrophilen stellt eine weitere Möglichkeit der Pathogenabwehr dieser Zellen dar. NETs bestehen aus nukleärer DNA und Histonen, welchen antibakterielle Proteine und Enzyme aus neutrophilen Granula aufgelagert sind⁷³. Der Kontakt mit bestimmten Mikroorganismen führt zur Aktivierung von Neutrophilen und einem Zelltod-ähnlichem Prozess („Netose“), bei welchem letztendlich die nukleäre Membran sowie die Zellmembran der Neutrophilen rupturiert und die NETs aktiv in den extrazellulären Raum freigesetzt werden⁷⁴. Diese umschließen Bakterien netzartig und vernichten sie durch die aufgelagerten antibakteriellen Enzyme⁷³. Auch aktivierte Endothelzellen oder Plättchen sind in der Lage die „Netose“ von Neutrophilen zu induzieren^{75,76}.

Es wurde bewiesen, dass NETs aus Neutrophilen entscheidend für das Fortschreiten einer venösen Thrombose sind. Im Mausmodell konnten schon drei Stunden nach Flussreduktion intravitalmikroskopisch große Mengen nachgewiesen werden¹. Sie agieren als prothrombotische Oberfläche: An ihre gerüstartige Struktur lagern sich mit TF, PDI und Faktor XII wichtige Initiatoren der Gerinnung an¹. Außerdem können sie über ihre Histone vWF binden und darüber Plättchen rekrutieren und aktivieren^{77,78}. Daneben sind sie in der Lage TFPI proteolytisch zu spalten⁷⁹ und die Thrombomodulin-abhängige Protein-C-Aktivierung zu behindern⁸⁰, wodurch sie die Funktion natürlicher Antikoagulanzen blockieren und ein prothrombotisches Milieu schaffen.

Ein daran angeschlossener Mechanismus der Progression der Thrombose durch

Neutrophile, ist die Aktivierung von Faktor XII. Auch daran sind NETs beteiligt: Da sie aus DNA bestehen, besitzen sie eine negativ geladene Oberfläche und deshalb die Fähigkeit Faktor XII zu aktivieren¹. Infolge dieser Aktivierung spielt aber keineswegs die Kaskade des intrinsischen Gerinnungssystems eine Rolle, sondern Faktor XIIIa allein ist durch direkte Interaktion mit Fibrin in der Lage die Fibrindichte im Thrombus zu erhöhen und diesen dadurch zu stabilisieren^{1,81}.

1.4.2.3. Einfluss von Thrombozyten

Genauso wie Neutrophile nehmen auch Plättchen eine Funktion für das Fortschreiten einer bereits initiierten venösen Thrombose ein. Zwei Stunden nach Flussreduktion tritt im Mausmodell eine erste Thrombozyten-Adhäsion auf, welche mit der Zeit stetig zunimmt. Plättchen werden im Vergleich zu Leukozyten deutlich langsamer und weniger rekrutiert und bedecken deshalb das Endothel nur stellenweise. Sie treten eher als Einzel-Zellen auf und formen nur wenige Aggregate¹.

Über ihren GPIb-V-IX-Rezeptor können sie an den bereitgestellten vWF des aktivierten Endothels binden¹.

Aktiviert Plättchen sind durch die Freisetzung von Thromboxan A₂ und ADP in der Lage die weitere Thrombozyten-Rekrutierung und -Aktivierung zu beschleunigen⁸. Als neues Oberflächen-Molekül kann im aktivierten Zustand unter anderem P-Selektin exprimiert werden⁸².

Durch eine Interaktion des P-Selektins der adhären Plättchen und dem PSGL-1-Rezeptor der Leukozyten können weitere zirkulierende Leukozyten ans Endothel rekrutiert werden⁸³. Plättchen entlassen außerdem verschiedene Mediatoren, die zusätzlich Leukozyten anlocken³⁶. Auf diese Weise verstärken die Thrombozyten das Ausmaß der sterilen Entzündung.

Zusätzlich zur Bindung von Plättchen ans Endothel findet auch eine Bindung der Thrombozyten an bereits adhären Leukozyten statt. Dies wird zwischen dem GPIIb α -Rezeptor der Plättchen und dem Mac-1-Integrin der Leukozyten vermittelt^{1,84}. Dadurch trägt jeder Leukozyt mindestens ein Plättchen und erhöht somit die Thrombozyten-Aggregation¹. Leukozyten-Rekrutierung und Plättchen-Rekrutierung potenzieren sich demzufolge gegenseitig.

Einen weiteren Beitrag zur Steigerung des Ausmaßes der venösen Thrombose

leisten die Thrombozyten durch die Verstärkung der Leukozyten-abhängigen Gerinnung: Aktivierte Plättchen stellen PDI für die TF-Entschlüsselung bereit⁶⁸, unterstützen die NETose über die GPIIb/IIIa-abhängige Interaktion mit den Neutrophilen^{1,79} und ihre Anwesenheit führt zu einer stärkeren Aktivierung von Faktor XII auf NETs¹.

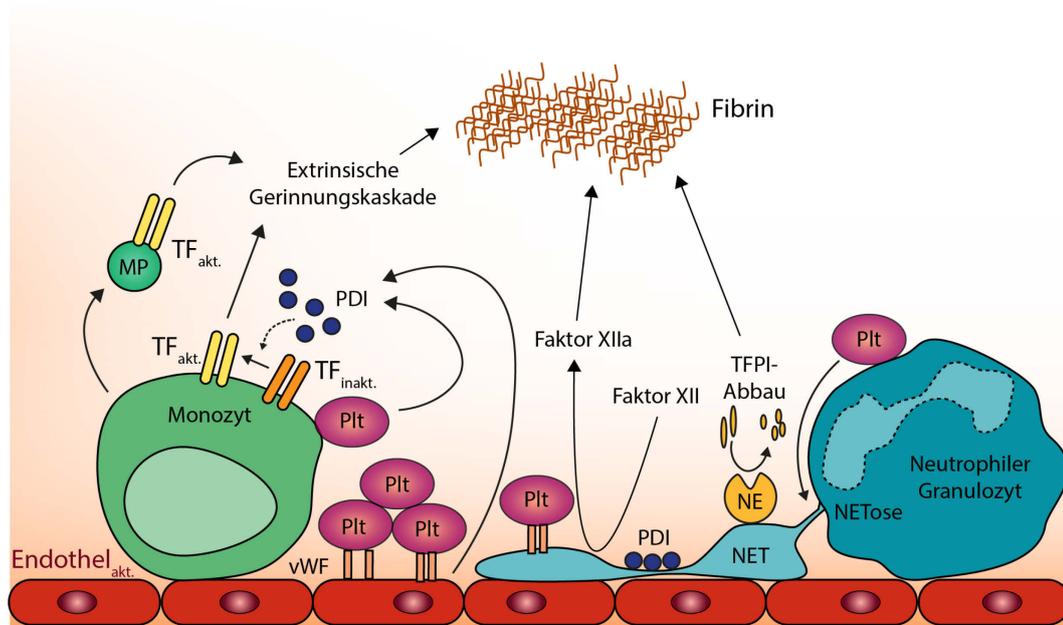


Abbildung 3: Schema des Mechanismus der Thrombusentstehung bei TVT, modifiziert nach SCHULZ et al.⁸⁵

Das durch Hypoxie aktivierte Endothel (=Endothel akt.) exprimiert Adhäsionsmoleküle, an welche Monozyten, neutrophile Granulozyten und Plättchen (=Plt, gebunden an vWF=von-Willebrand-Faktor) adhäreren; aktivierte Monozyten exprimieren tissue factor (=TF; inaktiv=TF inakt.), welcher über das Enzym Protein-Disulfid-Isomerase (=PDI) aktiviert wird; zudem werden TF-exprimierende Mikropartikel (=MP) freigesetzt; aktivierter TF (=TF akt.) setzt die extrinsische Gerinnungskaskade in Gang, was in einer massiven Fibrinbildung resultiert; neutrophile Granulozyten setzen Neutrophil Extracellular Traps (=NETs) frei, was durch an Neutrophilen adhärerende Plättchen gefördert wird; NETs bieten eine prokoagulatorische Oberfläche, indem sie PDI anreichern, Faktor XII spalten und das natürliche Antikoagulum TFPI durch die ihnen aufgelagerte neutrophile Elastase (=NE) abbauen

1.5. Induktion venöser Thromben in Tiermodellen

Für die genaue Erforschung der pathologischen Prozesse während der Entstehung einer venösen Thrombose, aber auch zur Erprobung neuer Behandlungsstrategien sind in-vivo-Modelle unumgänglich. In-vivo-Versuche bleiben zwar immer artifizielle Situationen, dennoch lassen sich nur in einem intakten biologischen System die komplexen beteiligten Prozesse studieren⁸⁶.

Neben dem für diese Arbeit verwendeten Mausmodell, gibt es je nach Fokus der Forschung noch andere TVT-Modelle in der Vena cava caudalis, wobei jedes spezifische Vor- und Nachteile aufweist, auf die im Folgenden näher eingegangen

wird.

1.5.1. Stase-Modelle

Bei Stase- oder Ligatur-Modellen wird die Vene mit einem Faden komplett abgebunden, sodass kein Restfluss des Blutes mehr vorhanden ist. Hier wird die infrarenale Vena cava verwendet, welche nicht nur kranial, hinter der linken Nierenvene ligiert wird, sondern von der auch die kaudale Blutzufuhr sowie die aller Seitenäste durch Abbinden komplett gestoppt wird^{46,86,87}. In diesem Modell kommt es immer zu okklusiven Thromben⁸⁶. Die Thrombusentstehung ist auf TF-Expression auf Endothelzellen und Leukozyten zurückzuführen⁶³. Interaktionen zwischen Gefäßwand und Zellen im sich formierenden Thrombus können mit diesem Modell gut untersucht werden⁸⁶. Auch ist die Größe der entstehenden Thromben gut reproduzierbar und vergleichbar⁸⁶. Nachteilig ist der fehlende Blutfluss, wenn das häufige klinische Szenario nicht-okklusiver Thromben untersucht werden soll⁸⁶ oder die Initialphase der Thrombogenese im Vordergrund steht, in der fast immer ein Restfluss vorhanden ist¹.

1.5.2. Stenose-Modelle

Um die frühe akute Phase der venösen Thrombose genauer zu untersuchen, entwickelten Singh et al. 2002 ein sog. Stenosemodell⁸⁸. Auch hierbei wird die infrarenale Vena cava der Maus herangezogen. Allerdings wird die Vene dabei nicht mehr völlig abgebunden, sondern zunächst ein Gefäßclip kurzzeitig auf das Gefäß gesetzt, der durch die Kompression das Endothel schädigen soll. In der Folge wird die Vene ausschließlich kranial mit Hilfe eines Platzhalters ligiert. Nachdem der Platzhalter entfernt wird, erhält man einen reduzierten, aber nicht komplett absenten Blutfluss und ein aktiviertes Endothel⁸⁸.

Unsere Arbeitsgruppe arbeitete darauf hin, dieses Modell zu modifizieren und zu etablieren, sodass es geeignet erschien, zelluläre Mechanismen in der Thrombose-Initiierung zu studieren^{1,89,90}. Im modifizierten Modell, welches auch dieser Arbeit zugrunde liegt, wird auf einen Gefäßclip verzichtet, um das Endothel nicht zu beschädigen. Mithilfe eines Platzhalters wird auch hier ein um etwa 80% reduzierter Blutfluss erreicht, wodurch das Endothel aktiviert wird und Leukozyten sowie Plättchen rekrutiert werden¹. Nachteilig ist, dass ein Teil der Mäuse keine Thromben entwickelt, große Variationen im Thrombusgewicht auftreten und die Thrombusbildung durch laterale Zuflüsse, die in die Vena cava

münden, beeinträchtigt werden kann⁸⁶. Für die Untersuchung der Initialphase der Pathogenese mit Ursache Stase bietet es aber optimale Bedingungen^{1,86}.

1.5.3. Elektrolytisches Modell

Das elektrolytische Modell bietet eine Alternative zum Stenose-Modell⁹¹. Nur die Seitenäste der Vena cava werden ligiert, bevor eine Kathode aus mit Silber beschichtetem Kupferdraht subkutan und eine Anode kaudal in die Vene platziert werden⁹². Über 15 Minuten wird ein Stromimpuls mit 250 μ Amp gesetzt, welcher das Endothel aktiviert⁹¹. Daraufhin bildet sich bei erhaltenem Blutfluss ein nicht-okklusiver laminarer Thrombus aus^{86,92}. Allerdings kann in diesem Modell nicht das Szenario eines okklusiven Thrombus untersucht werden⁸⁶. Außerdem wird an der Stelle der Platzierung der Anode das Endothel beschädigt, was zu verfälschten Ergebnissen führen kann⁸⁶.

2. Die Bedeutung von Antikörpern für die Thrombose

Die venöse Thrombose stellt einen Prozess dar, welcher Blutgerinnung mit Elementen der sterilen Entzündung verknüpft und ist deshalb als immunologische Reaktion zu verstehen. Einen Blick auf andere, nicht-zelluläre Bestandteile der Immunabwehr zu werfen, scheint daher interessant.

Antikörper (oder auch Immunglobuline) sind aus heutiger Sicht der wichtigste Teil des erworbenen spezifischen Immunsystems. Durch sie können Pathogene, Toxine und körperfremde Moleküle spezifisch erkannt und effektiv bekämpft werden.

2.1. Ursprung von Antikörpern

Die Produktion von Antikörpern erfolgt in B-Lymphozyten, sog. B-Zellen. Als unreife Vorläufer wandern sie aus dem Knochenmark in die lymphatischen Gewebe ein und residieren hauptsächlich als reife B2-Zellen in Lymphfollikeln der Milz und Lymphknoten⁹³.

Nach erstem Antigenkontakt mit Aktivierung von entsprechenden B-Zellen, vermehren sich diese klonal und produzieren als Plasmazellen die spezifischen Antikörper gegen das Antigen³⁷. Durch die Differenzierung der B-Zellen zu Gedächtniszellen kann gegen das Antigen noch Jahre später eine schnelle Abwehrreaktion eingeleitet werden³⁷. So können Säugetiere auf mehr als 100

Millionen verschiedene Antigene spezifisch reagieren⁹⁴.

Neben diesen konventionellen B2-Zellen, welche für die spezifische T-Zell-abhängige Antikörperproduktion nötig sind, existieren noch andere Subpopulationen, die sich hinsichtlich Funktion und Lokalisation im Körper unterscheiden⁹³. Sog. B-Zellen der Marginalzone sind primär aus der Milz der Maus bekannt, ob sie im Menschen existieren ist unklar. Sie stellen durch die T-Zell-unabhängige Produktion von IgM eine schnelle erste Immunantwort gegen Pathogene her^{93,95}. Zudem sind in der Maus B1-Zellen gut charakterisiert, welche im Peritoneum lokalisiert sind und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen⁹⁶. Ob sie die gleiche Vorläuferzelle wie B2-Zellen besitzen ist umstritten⁹⁷. Sie können unterteilt werden in B1a- und B1b-Zellen und sind maßgeblich beteiligt an der Produktion natürlicher Antikörper⁹⁶.

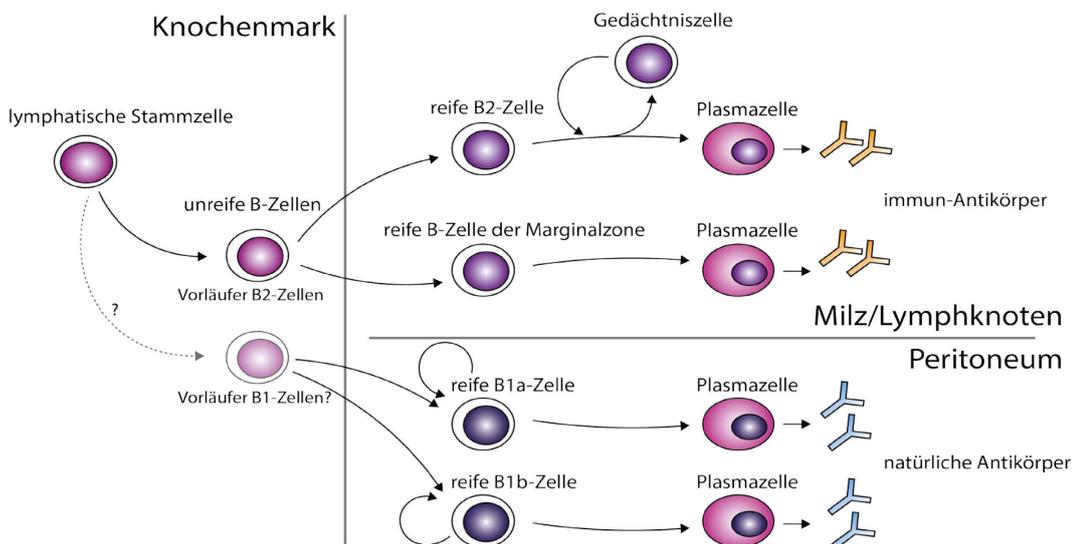


Abbildung 4: Ursprung von Antikörpern in B-Zellen

Aus dem Knochenmark wandern die unreifen B-Zellen in lymphatische Gewebe des Körpers aus; als reife B2-Zellen befinden sie sich in Follikeln der Milz und Lymphknoten und sind fähig zur Gedächtniszellproduktion und der Produktion von spezifischen immun-Antikörpern; reife B-Zellen der Marginalzone residieren in der Milz und produzieren immun-IgM als schnelle Immunantwort; B1-Zellen befinden sich im Peritoneum und haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung; sie produzieren natürliche Antikörper

2.2. Aufbau und Funktion

Antikörper sind Glykoproteine der Immunoglobulin-Gen-Superfamilie. Ihre Aminosäuresequenz ist anders als bei sonst vorkommenden Proteinen nicht streng konserviert und variiert von Antikörper zu Antikörper⁹⁴. Trotzdem besitzen sie alle einen relativ ähnlichen Y-förmigen Aufbau, mit einer Art Stamm (Fc-Region), der sich in zwei Arme (Fab-Regionen) aufgabelt. Jedes

Antikörpermolekül besteht aus vier Polypeptidketten: Zwei identische längere schwere Ketten (50-60 kD) und zwei identische kürzere leichte Ketten (25 kD), welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind³⁷. Die schwere Kette bestimmt durch antigene Determinanten die Immunglobulinklasse des Antikörpers. Die leichte Kette kommt unabhängig von der Immunglobulinklasse in zwei Typen vor: Kappa und Lambda⁹⁴.

Diese heute allgemein anerkannte Struktur von Antikörpern wurde in den 1960er Jahren von den Forschern PORTER und EDELMAN geprägt⁹⁴: Durch die Zerstörung von Disulfidbrücken und kovalenten Bindungen erhielt EDELMAN die vier Polypeptidketten des Antikörpermoleküls. PORTER zerstörte mit dem Enzym Papain Polypeptidbindungen im Molekül und erhielt die beiden identischen Fab-Fragmente und das Fc-Fragment. Die Fab-Fragmente konnten Antigene binden, weshalb sie als „fragments of antigen binding“ kurz „Fab“ bezeichnet wurden⁹⁴. Das Fc-Fragment war dazu nicht in der Lage. Aufgrund ihres Kristallisierens bei kalter Lagerung bekam es den Namen „fragment crystallizable“ oder „Fc“⁹⁴. Die Fab-Fragmente sind über die sog. „Hinge“-Region mit dem Fc-Fragment verbunden⁹⁴.

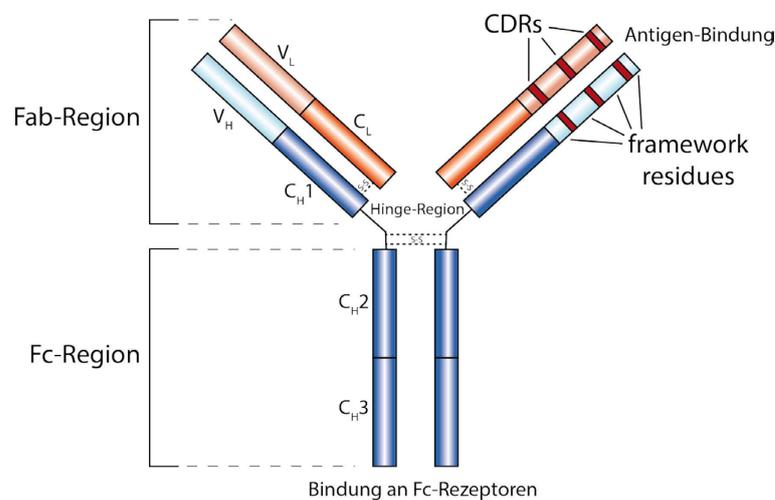


Abbildung 5: Aufbau eines Antikörpermoleküls

Die Fab-Region besteht aus einer variablen leichten (V_L), einer konstanten leichten (C_L), einer variablen schweren (V_H) und der konstanten schweren Kette C_{H1}, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind; die variablen Regionen exprimieren complementarity determining regions (CDRs) zur Antigen-Bindung mit dazwischen liegenden framework residues; die Fc-Region besteht aus zwei C_{H2}- und zwei C_{H3}-Ketten, ebenfalls über Disulfidbrücken verbunden; Fab- und Fc-Teile sind über die Hinge-Region miteinander assoziiert

Jede der vier Polypeptidketten besteht am C-terminalen Ende aus einem konstanten Teil (C-Region) und am N-terminalen Ende aus einem variablen Teil

(V-Region)⁹⁴. Die leichte Kette setzt sich stets aus einer variablen und einer konstanten Domäne zusammen - V_L und C_L ^{94,98}. Die schwere Kette dagegen besitzt eine variable und meist drei konstante Domänen (V_H , C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}), nur IgM hat mit C_{H4} eine Zusätzliche^{94,98}. Die konstanten Regionen weisen innerhalb von Isotypen bzw. Subklassen immer nahezu die gleiche Aminosäurestruktur auf, wohingegen die variablen Regionen durch eine hoch variable Aminosäurestruktur geprägt sind^{94,98}. Aus dieser Variabilität entstehen Millionen verschiedener Antikörpermoleküle, welche spezifisch sind für ein bestimmtes Antigen. Die Spezifität eines Antikörpers wird damit maßgeblich durch die variable Region bestimmt: Zwischen Aminosäuresequenzen mit verminderter Variabilität („framework residues“), besitzt sie in jeder Polypeptidkette drei hypervariable Regionen – die „complementarity-determining regions“ (CDR1, CDR2 und CDR3) – welche dazu führen, dass genau ein bestimmtes Epitop eines Antigens gebunden werden kann^{7,94}. Die „framework residues“ bestimmen die Position der CDRs und beteiligen sich an der Antigenbindung⁹⁴. Die Vielfalt der hypervariablen Regionen ergibt sich bei der Antikörperproduktion in der Plasmazelle: Für den variablen Teil existieren verschiedene Genabschnitte, organisiert in V-, D- und J-Gen-Sequenzen welche immer neu zusammengesetzt eine große Vielfalt an Kombinationsmöglichkeiten zulassen⁹⁸. Obendrein treten bei der Zelldifferenzierung nach Antigenkontakt Punktmutationen auf^{37,98}. Durch diese gehäuften Punktmutationen und Selektion der Plasmazellen, die den am besten passenden Antikörper produzieren, entstehen in einem Prozess, der somatische Hypermutation genannt wird, hoch-affine Antikörper^{98,99}.

Dabei produziert ein Plasmazellklon strukturell identische, sog. monoklonale Antikörper, welche gegen ein bestimmtes Epitop des Antigens gerichtet sind¹⁰⁰. Die Kombination aus der Antikörperproduktion mehrerer Plasmazellklone führt zu einer polyklonalen Antikörperantwort, in welcher ein Antigen über mehrere seiner Epitope spezifisch erkannt werden kann¹⁰⁰.

Die Bindung des Antigens erfolgt nach dem sog. „Schlüssel-Schloss-Prinzip“: Ein Antigen muss sich perfekt an die Bindungsstelle des Antikörpers anheften, damit eine Bindung entsteht. Diese wird durch Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen ermöglicht und ist reversibel³⁷. Je stärker die Bindung ausgeprägt ist, desto höher ist die

Affinität des Antiköpers zu seinem Antigen. Nach mehrmaligem Antigenkontakt nimmt die Affinität zu³⁷.

Mit der Fc-Region kann der Antigen-Antikörper-Komplex an Zellen binden, welche mit einem Fc-Rezeptor ausgestattet sind und eine biologische Reaktion auslösen⁹⁴. Dadurch werden beispielsweise Makrophagen zur Phagozytose angeregt und die Aktivierung von B-Zellen reguliert^{94,98}.

Mittels einer Bindung an Toxine und Viren können diese unschädlich gemacht werden^{94,98}. Um Zielstrukturen zu zerstören, müssen sich Antikörper allerdings der Mechanismen der unspezifischen Immunantwort bedienen. Deshalb fungieren an Oberflächen gebundene IgG-Moleküle als Opsonine: Sie markieren die Struktur zur Phagozytose durch Makrophagen und Neutrophile⁹⁴. Außerdem sind bestimmte Immunglobulinklassen in der Lage über die Fc-Region das Komplementsystem zu aktivieren, wodurch Zellen aufgelöst werden können, aber auch Chemokine und Opsonine entstehen, welche die Immunantwort intensivieren⁹⁴.

2.3. Immunglobulinklassen

Innerhalb der Familie der Antikörper gibt es große strukturelle und funktionelle Variationen. Anhand dessen kann man fünf Immunglobulinklassen (oder Isotypen) unterscheiden, welche sich strukturell in ihrer schweren Kette unterscheiden: IgG, IgM, IgA, IgE und IgD.

IgM ist die Antikörperklasse, die als erstes in der B-Zell-Entwicklung exprimiert wird sowie die der ersten Antwort auf eindringende Fremdkörper (Primärantwort)^{94,98}. Vor der Sekundärantwort auf ein Antigen erfolgt in den Plasmazellen ein Immunglobulin-Klassenwechsel von IgM-Antikörpern hin zu einer der anderen Klassen, welche dann diese zweite Reaktion prägt³⁷. IgM-Antikörper machen 8% der Serum-Antikörper aus⁹⁴. Eine μ -Kette bildet ihre schwere Kette⁹⁴. Über eine „joining“-Kette am C-terminalen Ende der letzten Domäne können mehrere Antikörpermoleküle assoziieren und multimere Formen ausbilden⁹⁴. IgM kommt hauptsächlich als radiäres Pentamer vor, in welchem die Fab-Regionen nach außen gerichtet sind. Dadurch kann ein solcher Komplex schnell viele Antigene binden und sehr effektiv das Komplementsystem aktivieren⁹⁴. Monomeres IgM befindet sich ausschließlich in der Membran von B-Zellen als B-Zell-Rezeptor⁹⁴. Nicht alle IgM-Antikörper sind so spezifisch für ein

Antigen: Es treten polyreaktive natürliche IgM-Antikörper auf, die eine Vielzahl an Antigenen erkennen können⁹⁸.

IgG ist das häufigste Immunglobulin im Serum (80%)⁹⁴, der Hauptantikörper der Sekundärantwort und maßgeblich an der Beseitigung von eindringenden Pathogenen beteiligt. Seine schwere Kette ist als γ -Kette ausgeprägt⁹⁴. Es gibt verschiedene Subklassen: Beim Mensch IgG1-IgG4⁹⁴, bei der Maus IgG1, IgG2, IgG3, IgG2a oder 2c und IgG2b⁷.

IgA ist der Antikörper der Schleimhaut-Immunität und ist Bestandteil von Sekreten^{37,94}. Im Serum liegt der Spiegel deshalb nur bei 13% aller Immunglobulinklassen⁹⁴. Es besitzt eine α -Kette, kommt in zwei Subklassen (IgA1 und 2) vor und bildet Dimere⁹⁴.

IgE ist maßgeblich an allergischen Reaktionen beteiligt, da es an Basophile und Mastzellen binden kann und bei Antigenkontakt ihre Degranulation bewirkt⁴⁸. Es stellt neben IgD mit 0,003% den geringsten Teil der Serum-Antikörper dar⁹⁴.

IgD ist gebunden an B-Zellen ein weiterer B-Zell-Rezeptor. Abgesehen davon sind seine Funktionen weitgehend unbekannt⁹⁴.

2.4. Fc-Rezeptoren

Über Fc-Rezeptoren sind Antikörper in der Lage mit der zellulären Immunantwort in Kontakt zu treten und zelluläre Funktionen wie Phagozytose oder die Freisetzung von Granula zu beeinflussen^{98,101}.

Fc-Rezeptoren sind Transmembranproteine mit einer extrazellulären Domäne, an welche die Antikörper mit ihrer Fc-Region binden, und einer intrazellulären Domäne für die Signaltransduktion¹⁰¹. Dabei kann je nach Rezeptortyp ein aktivierendes oder inhibierendes Signal an die Zelle vermittelt werden¹⁰¹. Ein Signal wird nur ausgelöst, wenn mehrere Fc-Rezeptoren über die bindenden Antikörpermoleküle quervernetzt sind – dies geschieht allein dann, wenn mehrere Antikörpermoleküle dasselbe Antigen gebunden haben¹⁰¹.

Die verschiedenen Immunglobulinklassen unterscheiden sich darin, an welche Fc-Rezeptoren sie binden können:

Für IgG-Moleküle stehen im humanen sowie im murinen Organismus die drei Rezeptorklassen Fc γ I, Fc γ II und Fc γ III zur Verfügung^{98,102}. Zum aktivierend

wirkenden Fc γ RI besteht die höchste Affinität⁹⁸. Er kann deshalb im Gegensatz zu Fc γ RII und Fc γ RIII auch monomeres IgG binden¹⁰². In Nagern konnte zusätzlich ein vierter hoch-affiner IgG-Rezeptor für die Bindung von IgG2a und IgG2b nachgewiesen werden: Fc γ IV¹⁰³. Die Fc γ -Rezeptoren II und III kommen je in zwei Isoformen vor: A und B. Die Isoform A vermittelt wie Fc γ RI eine aktivierende Funktion, Fc γ RIIB dagegen wirkt inhibierend und Fc γ RIIB übermittlelt überhaupt kein Signal⁹⁸. Die Maus besitzt davon allerdings lediglich Fc γ RIIB und Fc γ RIIIA¹⁰⁴. Aktivierend wirkende Fc γ -Rezeptoren haben die Gemeinsamkeit, dass sie für ihr stimulierendes Signal eine γ -Kette mit einem ITAM-Motiv benötigen, welche für das inhibitorische Signal von Fc γ RIIB nicht nötig ist^{105,106}. Die Fc γ -Rezeptoren unterscheiden sich außerdem in ihrer Bindungsaffinität zu den verschiedenen IgG-Subklassen. Hierbei existieren große Unterschiede zwischen humanen und murinen Fc γ -Rezeptoren¹⁰⁶. Eine Besonderheit von murinen Fc γ -Rezeptoren ist, dass Fc γ RIIB, Fc γ RIII und Fc γ RIV auch IgE binden können^{107,108}. In ihrer Expression auf Zellen der Immunabwehr bestehen ebenfalls große Differenzen zwischen den Fc γ -Rezeptoren von Mensch und Maus: Während sich Fc γ RI im Menschen auf Monozyten, Makrophagen, aktivierten Neutrophilen und dendritischen Zellen befindet, kann er in der Maus nur auf letzteren gefunden werden^{94,106}. Dafür besitzen Mäuse mit Fc γ RIV einen hochaffinen aktivierenden Rezeptor auf Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen^{103,106,108}. Fc γ RIIIA kann im Gegensatz zum Menschen in der Maus neben der Expression auf natürlichen Killer-Zellen, auf einer Vielzahl an Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen, dendritischen Zellen, Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen gefunden werden^{104,106}. Der inhibitorische Fc γ RIIB befindet sich im humanen und im murinen Organismus auf Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen, dendritischen Zellen, Basophilen und B-Zellen^{104,106}.

IgM kann zusammen mit IgA an den Fc α/μ -Rezeptor auf Makrophagen und B-Lymphozyten binden¹⁰⁹. Daneben steht auch ein individueller Rezeptor für IgM auf B-Zellen zur Verfügung: Der Fc μ -Rezeptor, auch als Toso/Fas apoptotic inhibitory molecule 3 (FAIM3) bezeichnet¹¹⁰. Dieser wird in der Maus auf B-Lymphozyten exprimiert und ist involviert in IgM-Homöostase, B-Zell-Überleben und humoralen Immunantworten¹¹¹. Ob er jedoch daneben auch auf Granulozyten oder Monozyten und Makrophagen vorhanden ist, wird kontrovers diskutiert¹¹²⁻

IgA kann zusätzlich über den Fc α -Rezeptor mit myeloiden Zellen wie Neutrophilen, Monozyten und bestimmten dendritischen Zellen interagieren⁹⁸.

Tabelle 1: Expression der murinen Fc-Rezeptoren auf verschiedenen Zelloberflächen

Zellart	Fc γ RI	Fc γ RIIB	Fc γ RIIA	Fc γ RIV	Fc μ R (Toso)	Fc α / μ R	Fc α R
B-Lymphozyten		+			+	+	
Monozyten		+	+	+	?		+
Makrophagen		+	+	+	?	+	
Neutrophile		+	+		?		+
Eosionophile		+	+		?		
Basophile		+	+		?		
Mastzellen		+	+				
Dendritische Zellen	+	+	+	+			+
Natürliche Killerzellen			+				

2.5. Natürliche Antikörper

IgM-Antikörper kommen in verschiedenen Varianten vor. Membran-gebunden auf B-Zellen fungieren sie als B-Zell-Rezeptor¹¹⁵. Gelöst im Blut kann man zwischen immun-IgM und natürlichem IgM unterscheiden¹¹⁵. Immun-IgM wird Antigen-spezifisch als Primärantwort auf eindringende Pathogene gebildet¹¹⁵. Natürliches IgM kann hingegen im Nabelschnurblut und im Blut von Fremd-Antigen-frei gehaltenen Mäusen gefunden werden¹¹⁶. Demnach wird es nicht als Reaktion auf exogene Antigene gebildet, sondern vermutlich vermittelt durch endogene Antigene produziert^{115,117}.

Als Hauptquelle dieser natürlichen Antikörper werden B1-B-Zellen der Peritonealhöhle angesehen⁹⁶. In der Maus sind diese gut charakterisiert und können je nach Expression von CD5 in zwei Unterklassen – B1a(CD5+)- und B1b(CD5-)-Zellen – unterteilt werden^{96,115}. Dadurch unterscheiden sich natürliche Antikörper auch im Ursprung von immun-IgM, welches größtenteils B2-Zellen entstammt^{96,115}.

Die Produktion natürlicher Antikörper scheint durch Komplementfaktorrezeptor 2

(CR2) beeinflusst zu sein. CR2 vermittelt normalerweise Funktionen des Komplementsystems an B-Zellen und folliculäre dendritische Zellen¹¹⁸. Neben CD19 und CD81 ist er Bestandteil eines B-Zell-Korezeptor-Komplexes, welcher für die B-Zell-Aktivierung und -Differenzierung notwendige Signale vermittelt^{119,120}. So interagiert CR2 mit Antigen-oponisierenden Spaltprodukten der Komplementkomponente C3, wie C3dg, C3d und iC3b¹¹⁸. Die gleichzeitige Bindung eines C3d-oponisierten Antigens an den B-Zell-Rezeptor sowie über C3d an CR2 führt zu einer starken Stimulation der B-Zelle: Auf diese Weise haben schon kleine Mengen Antigen eine starke B-Zell-Antwort zur Folge^{121,122}. Für viele Antigene scheint dieser Mechanismus wichtig zu sein für eine spezifische Antikörperproduktion mit Klassenwechsel^{120,123-125}. Darüber hinaus konnte in CR2-defizienten Mäusen eine Verbindung von CR2 und einer Hauptquelle natürlicher Antikörper hergestellt werden: Ohne den Komplementfaktorrezeptor 2 entsteht ein partielles Defizit der CD5+-Subpopulation von B1-Zellen^{123,126}. Es ist möglich, dass CR2 in der Entwicklung von B1-Zellen nötig ist für positive und negative Selektion^{126,127}. Ein Fehlen von CR2 in diesem Stadium führt demnach zu einem veränderten Repertoire an natürlichen Antikörpern¹²⁷.

Natürliche Antikörper sind normalerweise polyreaktiv und deshalb multispezifisch für Eigen- und Fremd-Antigen. Durch den Antigenkontakt können auch B1-Zellen eine positive Selektion und klonale Expansion, wie auch einen Klassenwechsel erfahren^{128,129}. Beim IgG der Sekundärantwort handelt es sich jedoch normalerweise um ein IgG, welches schwach oder überhaupt nicht mit Fcγ-Rezeptoren interagieren kann (bei der Maus z.B. IgG3)¹²⁹.

Natürliche Antikörper sind in der Lage phylogenetisch konservierte Strukturen wie Nukleinsäuren, Phospholipide und Kohlenhydrate zu erkennen^{115,130}. Dies befähigt sie einerseits an der Immunabwehr teilzunehmen und eingedrungene Pathogene über unspezifische Oberflächen-Strukturen zu binden und der Phagozytose bereitzustellen¹¹⁵. Ihre Hauptfunktion scheint allerdings in der Beseitigung von apoptotischen Zellen und alternden Erythrozyten zu liegen. Bedingt durch die oxidativen Veränderungen solcher Zellen, werden neue Phospholipid-Antigene wie Phosphorylcholin, Malondialdehyd und Phosphatidylcholin auf der Oberfläche exprimiert^{129,131-135}. Diese werden von natürlichen IgM-Molekülen gebunden, welche den Kontakt zu Phagozyten

herstellen^{131,132}. Die Abwesenheit von natürlichen IgM führt zu einer 3- bis 4-fach verringerten Phagozytoserate¹³⁶. Dank des Erkennens und des Beseitigens von gealterten oder geschädigten Zellen bieten natürliche Antikörper einen Schutz vor Autoimmun-Reaktionen^{115,129}.

Allerdings sind die Effekte von natürlichen Antikörpern nicht immer schützend: Unter anderem stehen sie mit der Entstehung von Ischämie-Reperfusionsschäden (IRS) in Verbindung¹¹⁵. WEISER et al. konnten feststellen, dass infolge einer Ischämie IgM-Moleküle ans hypoxische Endothel binden¹³⁷. Sauerstoff-unterversorgte Zellen erfahren eine Membran-Schädigung, welche zur Expression von neuen antigenen Determinanten wie Annexin IV und nonmuscle Myosin auf ihrer Oberfläche führt¹³⁷⁻¹⁴⁰. ZHANG et al. konnten 2004 einen natürlichen IgM-Klon als Auslöser identifizieren, der nonmuscle Myosin heavy chain Typ II A und C bindet^{141,142}.

2.6. Prothrombotische Eigenschaften von Antikörpern

Es gibt mehrere Hinweise dafür, dass Antikörper einen prothrombotischen Effekt besitzen. Ob diese Eigenschaft mit der Aktivierung des Komplementsystems und dessen prokoagulatorischer Wirkung in Verbindung steht, oder ob die Antikörpermoleküle selbst gerinnungsfördernd wirken, ist dabei meist unbekannt.

Schon 1958 konnte von ROBBINS und STETSON eine Verbindung zwischen Antigen-Antikörper-Komplexen und der Blutgerinnung festgestellt werden. In ihren ex-vivo-Versuchen war das Serum spezifisch immunisierter Kaninchen bei Zugabe des entsprechenden Antigens in der Lage die Gerinnung deutlich zu beschleunigen, womit ein gerinnungsfördernder Effekt durch Antigen-Antikörper-Reaktionen nachgewiesen wurde. Offen blieb dabei allerdings, ob Antikörper, welche mit ihrem Antigen reagieren, die Gerinnung nur beschleunigen oder sogar initiieren können und, ob das Komplementsystem an diesem Geschehen beteiligt ist¹⁴³.

2.6.1. Interaktion mit dem Komplementsystem

Mit der massiven Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten hat das unspezifische Immunsystem unbestreitbar einen großen Einfluss in der Entstehung der venösen Thrombose. Ein weiterer maßgeblicher Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr ist das Komplementsystem, ohne welches eine solch massive Entzündungszellansammlung schwer denkbar ist. Über die

Interaktion mit Antikörpern stellt das Komplementsystem gleichzeitig eine Verbindung zur spezifischen Immunabwehr her.

Genau wie das Gerinnungssystem, ist auch das Komplementsystem kaskadenartig aufgebaut. Es besteht aus einer Folge inaktiver Proteine, welche nach ihrer Entstehung in der Leber im Blut-Plasma zirkulieren⁴⁵. Werden sie aktiviert, verändern sie ihre Struktur und können sich mit anderen Komponenten verbinden. Dadurch werden sie direkt zu Effektoren des Komplementsystems mit biologischer Aktivität oder zu einem aktiven Enzym der Kaskade, welches die nächst-folgende Komponente aktivieren kann¹⁴⁴. Die Kern-Komponenten der Kaskade stellen die aufeinanderfolgenden 9 Zentralproteine C1-C9 dar¹⁴⁴. Außerdem sind entsprechende Rezeptoren für die Komplement-Komponenten sowie die nötigen Regulatoren und Inhibitoren wichtige Bestandteile.

Das Komplementsystem ist von entscheidender Bedeutung für die Immunabwehr. Es ist maßgeblich beteiligt an der Beseitigung von Mikroorganismen und absterbenden Zellen des Körpers.

Zur Zerstörung von Mikroorganismen und zur Beseitigung apoptotischer Zellen, werden diese durch das Komplementsystem mit den **Opsoninen** C3b und C4b für Phagozyten gekennzeichnet^{45,144-146}.

Mit Hilfe der Freisetzung von C3a und C5a wird ein entzündliches Milieu geschaffen: Als **Anaphylatoxine** führen diese Komponenten zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, indem sie die Histamin-Freisetzung aus Mastzellen stimulieren, und als **Chemokine** rekrutieren sie Leukozyten an den Ort des Geschehens^{45,146}. Die angesammelten Immunzellen besitzen Rezeptoren, worüber sie die Komplement-markierten Erreger erkennen können und diese phagozytieren^{144,146}.

Zudem kann der gebildete **terminale Membranangriffskomplex** C5b-9 (MAK) Mikroorganismen und Zellen direkt auflösen. Mit diesem lipophilen Komplex, der sich wie eine Pore in Zellmembranen einlagert und zum Wassereinstrom in die Zelle führt, wird es möglich Zellen zu zerstören⁴⁵. Bei seinem Zusammenbau werden zunächst C5b, C6, C7 und C8 an die Zellmembran angelagert. C8 kann nachfolgend mehrere C9-Moleküle zu einer Pore in der Zellmembran polymerisieren, wodurch der MAK vervollständigt wird^{37,45}. In sublethalen Dosen in Zellmembranen eingelagert, wirkt der MAK jedoch auch Zell-aktivierend¹⁴⁷.

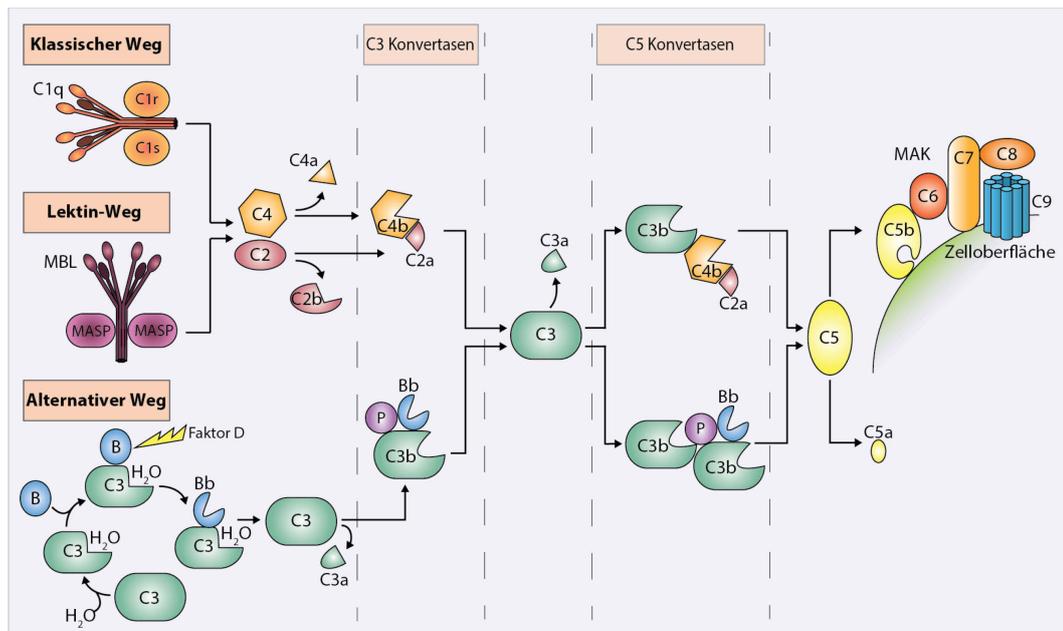


Abbildung 6: Drei Aktivierungswege der Komplementkaskade, modifiziert nach KOLEV et al.¹⁴⁸

Der klassische Weg über die Komponente C1q sowie der Lektin-Weg über MBL münden gemeinsam in der Aktivierung von C4 und C2 sowie in der Bildung der C3-Konvertase C4bC2a; im alternativen Weg wird spontan hydrolysiertes C3 an Faktor B („B“) gebunden und durch Faktor D in die erste C3-Konvertase des alternativen Wegs umgewandelt (C3(H₂O)Bb); diese setzt C3 in C3a und C3b um, was in einer zweiten oberflächengebundenen C3-Konvertase des alternativen Wegs (C3bBbP) resultiert („P“=Properdin); die C3-Konvertasen setzen C3 in C3a und C3b um; dies führt unter anderem zur Bildung der C5-Konvertasen, welche C5 spalten und zur Bildung von C5a und der Zusammensetzung des MAK auf Zelloberflächen führen

2.6.1.1. Antikörper-abhängige Aktivierung

Die Aktivierung des Komplementsystems kann durch vielseitige Strukturen und Moleküle erfolgen. Einen Hauptaktivator stellen Antigen-Antikörper-Komplexe dar.

Die Aktivierung kann auf drei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Alle münden jedoch in der Bildung einer **C3-Konvertase**: Im klassischen und Lektin-Weg C4b2a, im alternativen Weg C3bBb⁴⁵. Die C3-Konvertase kann C3 in C3a und C3b spalten⁴⁵.

Nach der Bildung von C3b, kann in allen Wegen die **C5-Konvertase** zusammengesetzt werden. Abgespaltenes C3b heftet sich an Zelloberflächen und kann wiederum C5 und die C3-Konvertasen des jeweiligen Wegs binden^{45,144}. Auf diese Weise entstehen die entsprechenden C5-Konvertasen: Im klassischen und Lektin-Weg C4b2a3b, im alternativen Weg C3bBb3b⁴⁵. Mit der C5-Konvertase kann C5 in die Komponenten C5a und C5b umgesetzt werden⁴⁵.

2.6.1.1.1. Klassischer Weg

Der klassische Weg ist der am längsten bekannte Weg der Komplementaktivierung. Seine Aktivierung wurde seit jeher mit Antikörpern in Zusammenhang gebracht: Antigen-gebundenes IgG oder IgM bindet mit der Fc-Region an die erste Komponente der Komplementkaskade - C1q⁴⁵.

C1q ist ein Protein, dessen Gestalt an einen Blumenstrauß erinnert¹⁴⁹: Es besteht aus 6 strukturellen Einheiten, jeweils aufgebaut aus den 3 Aminosäureketten A, B und C, welche eine Triple-Helix ausbilden¹⁴⁹. Am N-terminalen Ende sind jeweils ein A-B-Dimer und ein C-C-Dimer über Disulfidbrücken miteinander verbunden, was die 6 Triple-Helices zu einem Molekül vereint^{150,151}. Am C-terminalen Ende divergieren die einzelnen Einheiten in verschiedene Richtungen auseinander und münden in einer Art Kopf – der globulären Domäne, mit welcher der Kontakt zum Liganden hergestellt wird¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

Die 6 C1q-Köpfe haben spezielle Oberflächenstrukturen, die ihnen ermöglichen über geladene und hydrophobe Aminosäurereste mit Liganden in Kontakt zu treten¹⁴⁹. C1q ist ein sog. „pattern-recognition-molecule“, das neben Immunglobulinen eine Vielzahl anderer Strukturen erkennen und binden kann. So können auch Antikörper-unabhängig Mikroorganismen und apoptotische Zellen erkannt werden^{149,152-154}.

Die Immunglobulin-assoziierte Bindung von Antigenen an C1q stellt allerdings immer noch einen unabhkömmlichen Auslösemechanismus des klassischen Wegs dar. Nicht alle Antikörper-Isotypen sind dabei gleich effektiv: IgM, IgG1 und IgG3 können besser binden als IgG4, während IgA, IgD und IgE den klassischen Weg überhaupt nicht aktivieren können^{155,156}.

In Untersuchungen zum Bindemechanismus von IgG an C1q, konnte die CH2-Domäne der Fc-Region des Antikörpers als Bindungsstelle für C1q ausgemacht werden¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Lys322 des IgG-Moleküls und mehrere Arginin-Reste der B-Kette von C1q sind an der Bindung hauptsächlich beteiligt^{160,161}.

IgM soll über die Aminosäurereste Asp356, Asp417, Glu418, His420 sowie Proline an Position 434 und 436 seiner CH3-Domäne an C1q binden¹⁶²⁻¹⁶⁵. Über die genaue Bindungsstelle an der globulären Domäne von C1q ist wenig bekannt¹⁶⁴.

C1q ist nur einer der drei Bestandteile der ersten Komplementkomponente C1. Diese besteht außerdem aus den Serinproteasen C1r und C1s. Bei der C1-Aktivierung müssen die drei Komponenten so lange miteinander interagieren, bis C1r und in der Folge C1s aktiviert wird. Dies gelingt am besten in Anwesenheit von Immunkomplexen, da diese die Assoziationszeit der einzelnen Komponenten verlängern und dadurch die Aktivierung von C1 stärken¹⁶⁶.

Über die Aktivierung von C1 führt der klassische Weg zur Spaltung von C4 in C4a und C4b sowie von C2 in C2a und C2b. C4b kann mit C2a die C3-Konvertase des klassischen Wegs (C4b2a) bilden⁴⁵.

Abweichend von der traditionellen Sichtweise, nach welcher allein der klassische Weg durch Antikörper aktiviert wird, konnte inzwischen gezeigt werden, dass auch die anderen beiden Aktivierungswege des Komplementsystems Antikörper-abhängig initiiert werden können.

2.6.1.1.2. Lektin-Weg

Das Mannose-bindende Lektin (MBL) des Lektin-Wegs ist ähnlich aufgebaut wie C1q: MBL besteht aus Polypeptidketten, welche N-terminal durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden und C-terminal auseinander divergieren^{167,168}. C-terminal besitzt das Protein globuläre Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen, welche einzelne Bindungsstellen für bestimmte Monosaccharide aufweisen¹⁶⁸. Hierüber erfolgt die Erkennung von auf Mikroorganismen exprimierten Kohlenhydratgruppen^{167,168}.

Antikörper besitzen ebenfalls glykosilierte Stellen in ihren schweren Ketten. Wenn diese am Ende N-Acetylglucosamin aufweisen, kann MBL daran binden^{169,170}. IgG, IgM und auch IgA tragen solche Strukturen¹⁷¹. Bei Antigen-gebundenem humanem IgM sind diese allerdings nicht mehr gut zugänglich für MBL, sodass die schwache MBL-Bindung für eine Aktivierung des Komplementsystems über den Lektin-Weg nicht ausreichend ist¹⁶⁹. Antigen-gebundenes IgG und IgA ist dagegen in der Lage die Kaskade nach MBL-Bindung zu initiieren. Dies gelingt jedoch nur dann effektiv, wenn Immunkomplexe vorliegen und MBL gleichzeitig an mehrere Glykane auf einmal binden kann¹⁷⁰.

Infolge der Bindung an Zielstrukturen erfahren die MBL-assoziierten Serinproteasen (MASP-1, MASP-2 und MASP-3) eine Konformationsänderung

und aktivieren über die Spaltung von C2 und C4 die Komplement-Kaskade¹⁶⁸. Auch der Lektin-Weg bedient sich der C3-Konvertase (C4bC2a) des klassischen Wegs⁴⁵.

2.6.1.1.3. Alternativer Weg

Im alternativen Weg kann spontan hydrolysiertes C3 als C3(H₂O) an Faktor B des Serums binden. Dieser C3(H₂O)-Faktor B-Komplex wird durch Faktor D in die lösliche C3-Konvertase (C3(H₂O)Bb) des alternativen Wegs gespalten¹⁴⁶. Auch im alternativen Weg können spezifisch Strukturen von Mikroorganismen und apoptotischen Zellen erkannt werden. Dies erfolgt über das „pattern-recognition-molecule“ Properdin. Aus der Spaltung von C3 resultierendes C3b wird durch Properdin an die Oberfläche der erkannten Zellen rekrutiert. Dies ermöglicht die Zusammensetzung einer stabilen Oberflächen-gebundenen C3-Konvertase des alternativen Wegs: C3bBbP^{172,173}.

Im alternativen Weg gibt es ebenfalls Wechselwirkungen mit Antikörpern. IgG-Moleküle sind mit ihrer schweren Kette in der Lage C3b zu binden und auf diese Weise die Zusammensetzung der C3-Konvertase des alternativen Wegs zu initiieren. Obendrein wird das IgG-gebundene C3b weniger schnell gespalten, als ungebundenes¹⁷⁴. Polymeres IgA kann den alternativen Weg aktivieren¹⁷⁵. Der genaue Mechanismus ist noch nicht klar¹⁶⁵. Wahrscheinlich stabilisiert es die C3-Konvertase, möglicherweise kann es aber auch direkt mit Properdin interagieren¹⁶⁵.

2.6.1.2. Interaktion des Komplementsystems mit der Gerinnung

Länger ist bekannt, dass die beiden ähnlich aufgebauten Kaskaden der Gerinnung und des Komplementsystems miteinander interagieren – eventuell stammen sie von einem gemeinsamen Vorläufer ab¹⁷⁶. Im gleichen Sinne findet auch eine gegenseitige Stimulierung von Komplementsystem und Thrombozyten statt.

MARKIEWSKI et al. haben 2007 bekannte prokoagulatorische Einflüsse von Komplementkomponenten dargestellt¹⁴⁷:

Die Thrombozyten-Aktivierung via Komplement erfolgt im Wesentlichen über eine Modifikation ihrer Oberfläche: Der terminale sublytische C5b-9-Komplex der Komplementkaskade kann sich in die Zellmembran einlagern und so die Plättchen dazu veranlassen, prokoagulatorische Granula und Mikropartikel frei zu

setzen^{177,178}. Durch die Einlagerung wird auch die Anordnung der Phospholipide verändert – die Gerinnungskaskade kann nun auf der Oberfläche stattfinden¹⁷⁹. Zudem wird die Expression von P-Selektin und Integrinen auf der Plättchen-Oberfläche durch gebundenes C1q induziert¹⁸⁰. An P-Selektin wiederum kann C3b binden und dadurch die Aggregation der Thrombozyten fördern¹⁸¹. C3a allein kann ebenfalls Plättchen aktivieren und ihre Aggregation veranlassen¹⁸².

Auf ähnliche Weise wie Thrombozyten können Komplement-Komponenten auch Endothelzellen aktivieren: Auch hier führt die Einlagerung der inaktiven Form des MAK in die Zellmembran sowie die Bindung von Immunkomplexen zusammen mit C1q zur Bildung von Mikropartikeln, zur Expression von Adhäsionsmolekülen und zur Bildung einer Plattform für die Zusammensetzung des Prothrombinase-Komplexes¹⁸³⁻¹⁸⁵. Zusätzlich wird die antikoagulatorisch wirksame Schicht aus Heparansulfat von der Endotheloberfläche durch Antikörper in Kombination mit C5a entfernt¹⁸⁶.

Ebenfalls mittels C5a und des inaktiven MAK, wird die TF-Expression auf der Oberfläche von Endothelzellen sowie der von Leukozyten gesteigert^{183,187,188}.

Zusammengefasst provoziert ein aktiviertes Komplementsystem neben einer Entzündungszellrekrutierung ein prokoagulatorisches Milieu.

Umgekehrt können allerdings auch Gerinnungsfaktoren und Plättchen das Komplementsystem aktivieren^{181,189,190}. Auf diese Weise wird die Aktivierung des Komplementsystems bei vorliegendem prokoagulatorischen Status noch potenziert, was wiederum die Gerinnung aktiviert – es entsteht ein sich immer weiter steigender Kreislauf, der zu Blutgerinnung, Fibrinbildung und Entzündung führt.

2.6.1.3. Einfluss des Komplementsystems auf die venöse Thrombose

Die oben beschriebene Verbindung von Komplementsystem und Gerinnung macht deutlich, dass alle Mechanismen, die in der Entstehung einer venösen Thrombose relevant sind, gleichzeitig mit dem Komplementsystem verknüpft sein können: Im aktivierten Zustand kann es Leukozyten rekrutieren, Plättchen und auch Endothelzellen aktivieren.

In der Dissertation von FIOLA wurde der Einfluss von bestimmten Komplementkomponenten auf die Entstehung der venösen Thrombose im

Stenose-Mausmodell untersucht. Dabei konnte ein statistisch signifikant vermindertes Thrombusgewicht bei Mäusen ohne die Komplementkomponente C4 sowie bei einem gleichzeitigen Fehlen von C3 und C4 ermittelt werden. Histologisch und intravitalmikroskopisch konnte eine große Bedeutung von C4 für die Ansammlung von Leukozyten im Thrombus beobachtet werden².

2.6.2. Beteiligung von Antikörpern an klinisch relevanten thrombotischen Erkrankungen

Obwohl Antikörper über die Aktivierung des Komplementsystems wichtige Mediatoren der Entzündungsreaktion darstellen, sind die Mechanismen ihrer prothrombotischen Wirkung weitgehend unklar. Es existieren jedoch klinische Beobachtungen, die auch bei der Thrombose eine bedeutende Rolle von Antikörpern nahe legen. So gibt es mehrere Studien, die den Zusammenhang zwischen der Erkrankung monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) mit dem Auftreten arterieller und venöser Thrombosen herstellen. MGUS kann eine Vorstufe des Multiplen Myeloms darstellen, ist an sich aber eine gutartige B-Zell-Proliferation. Durch die exzessive Vermehrung eines Plasmazellklons resultieren große Mengen eines monoklonalen Immunglobulins, welches prinzipiell aus jeder Immunglobulinklasse stammen kann¹⁹¹. KRISTINSSON et al. fanden ein 4-fach erhöhtes Risiko für venöse Thrombose bei Patienten mit IgG- oder IgA-MGUS – nicht aber bei Patienten mit IgM-Klonen³. Auch eine dänische Studie kam zu dem Ergebnis, dass MGUS zu einem erhöhten VTE-Risiko führt¹⁹².

Für das Antiphospholipid-Syndrom (APS) ist ein Auftreten von Thrombosen im Zusammenhang mit Antiphospholipid(aPL)-Antikörpern erwiesen. Dieses Syndrom ist durch das Vorkommen von pathologischen Antikörpern, welche gegen Phospholipid-bindende Proteine wie β_2 -Glykoprotein I (β_2 -GPI) oder Prothrombin gerichtet sind, gekennzeichnet und durch das Auftreten vaskulärer Thrombose geprägt⁵. In-vitro und in-vivo konnten aPL-Antikörper eine Thrombenbildung verstärken^{5,193,194}. ISHIKURA et al. untersuchten außerdem das Vorkommen von Antiphospholipid-Antikörpern bei Patienten mit TVT und beobachteten eine hohe Prävalenz an anti-Prothrombin-IgG⁴. Der Mechanismus, mittels welchem die aPL-Antikörper eine Thrombose einleiten können, ist jedoch noch nicht ganz geklärt. YANG et al. konnten in vitro eine Prothrombinase-Aktivität der anti-Prothrombin-Antikörper beobachten, was in Patienten die

Fibrin-Bildung verstärken könnte¹⁹⁵. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Antikörper mit Phospholipid-bindenden Proteinen interagieren, die selbst auf bestimmten Zellmembranen gebunden sind. Auf diese Weise entsteht durch einen indirekten Kontakt eine Stimulation von verschiedenen Zelltypen. Endothelzellen reagieren darauf mit einem entzündlichen und prokoagulatorischen Phänotyp mit verstärkter Leukozyten-Adhäsion und vermehrter TF-Expression^{5,194,196,197}. Auch Monozyten werden zur TF-Expression angeregt^{5,197} sowie Thrombozyten zur Aggregation^{5,193}. Eine direkte Hemmung von natürlichen Antikoagulanzen soll ebenfalls zu einem prokoagulatorischen Status beitragen⁵. Da bei dem Syndrom jedoch immer aPL-Antikörper, aber nicht immer auch eine thrombotische Erkrankung vorliegen, scheint der durch Antikörper verursachte prokoagulatorische Zustand für die Induktion eines Gerinnsels noch nicht auszureichen. Gleichzeitig muss eine andere, bisher unbekannte Gegebenheit als endgültiger Auslöser vorliegen⁵. Sicher ist, dass auch das aktivierte Komplementsystem eine wichtige Rolle bei der Thrombenbildung spielt, da in APS-Modellen Tiere ohne die Komponenten C3, C5 oder Teile des terminalen Komplement-Komplexes (MAK) resistent waren gegen aPL-Antikörper-induzierte Thrombosen^{198,199}. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Phospholipid-haltige Antigen nur in bestimmten Zuständen durch die aPL-Antikörper erkannt werden kann²⁰⁰. Dafür muss es möglicherweise erst durch eine Konformationsänderung oder biochemische Änderung entschlüsselt werden²⁰⁰, vielleicht auch auf bestimmten biologischen Oberflächen in einer entsprechenden Dichte exprimiert werden²⁰¹.

Antikörper scheinen demnach in der Lage zu sein, die Gerinnung selbstständig oder über die Aktivierung des Komplementsystems zu beeinflussen. Ob dies auch eine Rolle für die venöse Thrombose spielt und welche zellulären und molekularen Mechanismen daran beteiligt sind, soll in dieser Arbeit aufgeklärt werden.

III. ZIELSETZUNG

1. Untersuchung des Einflusses von Antikörpern auf die venöse Thrombose

Hauptziel dieser Arbeit ist es, erste Erkenntnisse über die Beteiligung von Antikörpern am Geschehen der durch Flussreduktion induzierten TVT zu gewinnen. Zu diesem Zweck werden verschiedene Antikörper-Knockout-Mausstämme hinsichtlich Thrombusgewicht und -inzidenz im Stenose-Mausmodell untersucht.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen Antikörpern und der Auslösung venöser Thrombose soll auf zellulärer und molekularer Ebene im Detail analysiert werden: Im Mausmodell soll bestimmt werden, welche Immunglobulinklassen an dem Prozess beteiligt sind und, ob Antikörpermoleküle ohne spezifische Bindung an ein Antigen TVT induzieren können oder eine spezifische Antigenbindung erfolgen muss.

Blutanalysen sowie Antikörperserumspiegel der Mausstämme sollen ebenfalls zur Auswertung herangezogen werden.

2. Charakterisierung der antikörperabhängigen Thrombusbildung

Im Anschluss soll auf die zellulären und molekularen Mechanismen eingegangen werden, welche den Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Antikörpern und dem Auftreten venöser Thromben erklären. Die bisher bekannten Entstehungsmechanismen der venösen Thrombose basieren auf dem immunologischen Prozess der Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten, wie auch einer massiven Fibrinbildung. Antikörpermoleküle könnten an der Akkumulierung von Leukozyten und Blutplättchen im Thrombus beteiligt sein, wie auch direkt die Blutgerinnung beeinflussen.

Deshalb soll zunächst untersucht werden, ob eine direkte Fc-Rezeptor-abhängige Interaktion von Antikörpermolekülen mit im Rahmen der venösen Thrombose relevanten Zellen der unspezifischen Immunabwehr, wie Monozyten und Neutrophilen, für die Ausbildung einer TVT relevant ist.

Im Mausmodell wird anschließend mittels Intravitalmikroskopie die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten in den ersten sechs Stunden der Thrombusbildung bei kompletter Antikörperdefizienz untersucht.

Ein möglicher direkter Einfluss von Antikörpern auf die Blutgerinnung wird mit Hilfe thrombelastometrischer Analysen dargestellt.

3. Analyse der Bedeutung natürlicher Antikörper für die venöse Thrombose

Im Speziellen soll auch der Effekt natürlicher Antikörper eingehender studiert werden.

Ihre Beteiligung im Geschehen der TVT wird im Mausmodell über Thrombusgewicht und –inzidenz überprüft und im Anschluss histologisch genauer charakterisiert. Dabei soll die Verteilung von IgG- und IgM-Molekülen in venösen Thromben aus dem Stenose-Modell immunhistologisch dargestellt werden.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Allen Versuchen dieser Arbeit liegen Untersuchungen an der Maus (in-vivo und ex-vivo) zugrunde. Für die immunologische Fragestellung scheint diese Tierart gut geeignet, denn sie ist immunologisch gut charakterisiert. Außerdem stehen von diesem Versuchstier zahlreiche genetisch veränderte Knockout-Stämme zur Verfügung, wovon auch die vorliegende Arbeit zur Erforschung der Rolle von Antikörpern bei der TVT abhängig war. Das in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierte Modell zur Stenosierung der Vena cava caudalis wurde ebenfalls in der Maus entwickelt und hat sich dort gut bewährt. Zudem eignet sich die Maus als Versuchstier durch schnelle Reproduktionsraten und geringe Haltungskosten.

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

1.1. Wildtypstamm C57BL/6J

Alle relevanten genetisch veränderten Linien für diese Arbeit wurden auf dem genetischen Hintergrund des C57BL/6J-Mausstamm gezüchtet. Deshalb wurde diese Mauslinie als Wildtyp-Kontrollgruppe verwendet.

Der C57BL/6J-Inzuchtstamm ist ein ausgezeichneter Hintergrundstamm für viele induzierte Mutationen, weshalb er in der Forschung gerne und häufig eingesetzt wird²⁰².

1.2. Komplementfaktorrezeptor 2-defiziente Mäuse

Eine Mutation im CR2-Lokus führt bei dieser Mauslinie zu einem Fehlen von Komplementfaktorrezeptor 1 und 2, da sich diese bei der Maus auf demselben Gen befinden^{123,203}.

CR2-defiziente Mäuse (kurz CR2^{-/-}) haben eine normale B- und T-Zell-Entwicklung¹²⁰ und physiologische Serumspiegel an Komplementproteinen, wie auch an IgM, IgG1 und IgA^{123,126}.

Allerdings besitzt dieser Stamm Defizite in der spezifischen Antikörperproduktion

gegen T-Zell-abhängige Antigene^{120,123} sowie in der Ausprägung von peritonealen CD5+ B1-Zellen¹²³. Durch eine 50%-ige Reduktion von CD5+ B1-Zellen haben CR2-defiziente Mäuse ein verändertes Repertoire an natürlichen Antikörpern und deshalb eine veränderte Immunreaktion auf körpereigene Antigene^{123,126,127}.

Die Mäuse sind phänotypisch gesund und züchten normal.

1.3. Mäuse mit veränderter Antikörper-Produktion

1.3.1. sIgM-Knockout-Mäuse

Ein mittels homologer Rekombination in das Genom von C57BL/6J-Wildtyp-Tieren eingebrachter cDNA-Vektor, führt zu einem Austausch sämtlicher schwerer μ_s -Ketten von sezerniertem IgM gegen die schweren μ_m -Ketten von membrangebundenen IgM²⁰⁴. Daraus entstehende sIgM-Knockout-Mäuse (kurz sIgM^{-/-}) können daher nur noch membrangebundenes IgM in physiologischer Menge exprimieren, haben aber die Fähigkeit, sezerniertes IgM zu produzieren, verloren²⁰⁴. Trotzdem ist dieser Stamm zu einem normalen Klassenwechsel mit der Produktion anderer Immunglobulinklassen in physiologischen Konzentrationen in der Lage: ELISA-Analysen der Serumspiegel verschiedener Antikörper-Isotypen in adulten sIgM^{-/-}-Mäusen ergaben für IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 sowie IgA annähernd gleiche Werte wie für Wildtyp-Mäuse²⁰⁴. Die IgM-Konzentration war dagegen bei sIgM-Knockout signifikant erniedrigt²⁰⁴.

Dieser Stamm eignet sich für die isolierte Darstellung des Effekts eines IgM-Defizits auf die venöse Thrombusbildung, bei gleichzeitiger Anwesenheit der anderen Immunglobulinklassen in physiologischen Konzentrationen. Die Mäuse sind phänotypisch gesund und züchten normal.

1.3.2. AID-Knockout-Mäuse

AID-Knockout-Mäuse (kurz AID^{-/-}) haben nur Antikörper der Klasse IgM, da ihnen das Enzym aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase (Activation-induced cytidine deaminase, AID) fehlt. Dieses Enzym ist essenziell für den Immunglobulin-Klassenwechsel und die somatische Hypermutation⁹⁹. Deshalb kann dieser Maus-Stamm die Produktion von IgM-Antikörpern nicht auf eine andere Klasse umstellen, aber trotzdem spezifische IgM-Antikörper gegen ein Antigen herstellen. Allerdings besitzen diese IgM-Antikörper bedingt durch die defekte Hypermutation weniger Punktmutationen und sind nicht hoch-affin⁹⁹. Die

Serum-Level an IgM, IgG und IgA wurden von MURAMATSU et al. bestimmt: IgG3, IgG2b und IgA waren nicht detektierbar. IgG1- und IgG2a-Spiegel waren extrem niedrig. Dagegen waren IgM-Antikörper stark erhöht, was auf eine stärkere Aktivierung und Akkumulierung der B-Zellen nach Antigen-Stimulation zurückgeführt wurde⁹⁹. AID^{-/-}-Mäuse produzieren daher große Mengen an IgM, die weit über dem physiologischen Normalwert liegen.

Mit dieser Linie kann der Effekt von IgM sowie gleichzeitig die Auswirkung fehlender anderer Immunoglobulinklassen auf das Geschehen der venösen Thrombose analysiert werden. Die Mäuse sind phänotypisch gesund und züchten normal.

1.3.3. sIgM-AID-Knockout-Mäuse

sIgM-AID-Knockout-Mäuse (kurz sIgM^{-/-}AID^{-/-}) vereinen die genetischen Veränderungen des sIgM- mit denen des AID-Knockout-Stammes, weshalb sie überhaupt keine Antikörper mehr bilden können, aber dennoch B- und T-Lymphozyten besitzen.

Deshalb kann mit diesen Tieren die venöse Thrombose allein hinsichtlich einer kompletten Antikörper-Defizienz untersucht werden. Die Mäuse sind phänotypisch gesund und züchten normal.

1.4. Fcγ-Rezeptor-Knockout-Mäuse

Den verwendeten Fcγ-Rezeptor-Knockout-Mäusen (kurz FcγR^{-/-}FcγRIIb^{-/-}) fehlt Knockout-bedingt die für die aktivierenden IgG-Rezeptoren FcγRI, FcγRIII und FcγRIV essenzielle γ-Kette wie auch der γ-Ketten-unabhängige inhibitorische FcγIIB-Rezeptor^{102,105,205}. Dadurch besitzen sie ein Defizit aller vier Unterarten muriner Fcγ-Rezeptoren und sind demnach nicht mehr in der Lage die Funktion von IgG über Fc-Rezeptoren zu vermitteln. Zusätzlich führt das Fehlen der γ-Kette auch zum Defekt des IgE-Rezeptors FcεRI^{102,205}.

Mit dieser Linie kann daher die Bedeutung der Fc-Rezeptor-abhängigen Interaktion von IgG mit Zielzellen wie Monozyten und Neutrophilen im Geschehen der venösen Thrombose analysiert werden. Die Mäuse sind phänotypisch gesund und züchten normal.

1.5. Tierhaltung

1.5.1. Haltungsbedingungen

Die Haltung der Mäuse im Walter-Brendel-Zentrum erfolgte nach FELASA-Hygienebedingungen (Federation of European Laboratory Animal Associations) in Tierhaltungsschränken (Bioscape Uniprotect, Bioscape GmbH, Castrop-Rauxel), welche eine eigene hygienische Einheit darstellen und in für die Tierhaltung vorgesehenen Räumen aufgestellt waren. Der Zugang zu diesen Räumen war zur Reduktion der Stress- und Keimbelastung durch ein Transpondersystem personenlimitiert und nur nach Anlegen von Schutzkleidung gestattet. Innerhalb der Tierhaltungsschränke konnte ein Mikroklima von $22\pm 1^\circ\text{C}$ bei einer rel. Luftfeuchtigkeit von $55\pm 5\%$ aufrechterhalten und gleichzeitig ein 12-Stunden Tag-Nachtrhythmus etabliert werden.

Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen vom Typ II long in Gruppen von mindestens 2 und maximal 4 Tieren gehalten (gewichtabhängig). Die staubarme und sehr saugfähige Weichholzfaser-Einstreu (Firma Abbed) wurde einmal wöchentlich gewechselt und die Tiere in einen neuen sauberen Käfig mit frischer Trinkflasche umgesetzt. Über die Trinkflasche stand Wasser ad libitum zur Verfügung. Auch das pelletierte Alleinfutter für Mäuse (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) wurde den Tieren ad libitum angeboten. Als Enrichment stand den Mäusen grobe Einstreu (Abbed Nestbaumaterial B E-011, Faserbreite 3,5mm, E-012, Faserbreite 4mm + NBU E014, Faserbreite 120mm) und Maushäuschen aus Pappe zur Verfügung.

Vierteljährlich fand ein erweitertes Hygiene Monitoring nach FELASA-Richtlinien statt. Situationsbedingt gab es stichprobenartige Untersuchungen nach dem kleinen FELASA-Protokoll.

Da die Zucht der Tiere nicht am Walter-Brendel-Zentrum erfolgte, wurden die Mäuse für die Experimente dorthin transportiert. Nach dem Transport wurden die Tiere frühestens nach sechs Tagen in den Versuch genommen, damit sie sich an die veränderten Umweltbedingungen gewöhnen und sich vom Transportstress erholen konnten.

1.5.2. Haltungsbedingungen im Experiment

Im Versuch mit Wiedererwachen musste die Unterbringung der Tiere nach der

Operation anders erfolgen als unter normalen Bedingungen:

Die wieder vollständig wachen Tiere wurden in Makrolon-Käfigen gehalten, welche statt mit Einstreu mit saugfähigen Papiertüchern (Wypall, Kimberly-Clark, Koblenz) und Kosmetiktüchern (facial tissues, WEPA Professional GmbH, Arnsberg) zum Nestbau ausgelegt waren. Auf diese Weise wurde verhindert, dass Einstreumaterial und Staub an der Wunde anhaftet und diese irritiert. Außerdem konnte so eine wesentlich bessere Kontrolle auf Harn- und Kotabsatz gemäß des Score-Sheets erfolgen. Des Weiteren wurden die operierten Tiere einzeln gehalten, um ein gegenseitiges Belecken der Operationswunde zu vermeiden.

Zur regelmäßigen Überwachung wurden die Tiere in einem separaten Tierhaltungsschrank (Ventilated Cabinet, Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) gehalten. Dort waren sie abgeschirmt von Lärm und Stress durch die roten Plexiglastüren ständig kontrollierbar, ohne dass der Käfig herausgenommen werden musste.

Die Überwachung während der 48h nach dem Eingriff erfolgte nach einem Score-Sheet mit streng definierten Abbruchkriterien. Dadurch fand in genau festgelegten Zeitabständen eine regelmäßige Kontrolle von Allgemeinbefinden, Nahrungsaufnahme, Bewegungsaktivität, Verhalten sowie Harn- und Kotabsatz statt. Diese Parameter wurden mit Hilfe eines Punktesystems (Score 0-2) bewertet. Bei einem Score von 2 oder mindestens zwei Mal hintereinander Score 1 wurde der Versuch abgebrochen und die Maus euthanasiert.

2. Operationsverfahren

2.1. Narkose

Alle operativen Eingriffe wurden unter Vollnarkose durchgeführt. Im Anschluss an eine Operation mit Wiedererwachen wurde ein Schmerzmanagement eingeleitet. Durch diese Maßnahmen konnte die Belastung der im Versuch befindlichen Tiere auf ein Minimum reduziert werden.

Die Einleitung der Vollnarkose erfolgte in einer durchsichtigen Kunststoffröhre, in der die Maus mit 3,0 Vol.% Isofluran (Isofluran CP[®], cp pharma, Burgdorf) bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion von 0,35 l/l begast werden konnte. Nach Erlöschen der Stellreflexe wurde die Maus aus der Narkosekammer entnommen. Der kurzzeitig schlafenden Maus konnte nun stressfrei und ohne großes

Verletzungsrisiko intraperitoneal eine Tripelnarkose aus Fentanyl (Fentanyl HEXAL®, Hexal AG, Holzkirchen), Medetomidin (Dorbene®, Pfizer GmbH, Berlin) und Midazolam (Midazolam-hameln®, Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln), verdünnt mit 0,1ml 0,9%-NaCl-Lösung (Isotonische Kochsalzlösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) in einer Mischspritze verabreicht werden. Bis zum Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurde die Maus in eine Box aus Pappe mit Luftlöchern gebettet, um die akustischen und visuellen Eindrücke möglichst abzuschirmen. Vor Beginn des operativen Eingriffs wurde geprüft, ob der Zwischenzehenreflex erloschen und damit die chirurgische Toleranz des Tieres vorhanden war.

Mit Hilfe der Kombination der Wirkstoffe der Tripelnarkose konnte eine Allgemeinanästhesie, definiert durch Hypnose, Relaxation und Analgesie erzeugt werden.

Das Betäubungsmittel **Fentanyl** in der Dosierung 0,05mg/kg Körpergewicht sorgte dabei für eine effektive zentrale Schmerzausschaltung. Fentanyl ist ein synthetisches Opioid, das reversibel an μ -Opioidrezeptoren bindet und via Naloxon von diesen verdrängt werden kann²⁰⁶.

Medetomidin wurde in der Dosis 0,5mg/kg angewendet. Als α_2 -Agonist aktiviert es α_2 -Adrenozeptoren am Hirnstamm²⁰⁶. Dadurch führt es zu Sedation und Muskelrelaxation, welche das Tier immobilisieren²⁰⁶. Zudem besitzt es eine analgetische Wirkung, welche vor allem viszerale Schmerz gut abdeckt²⁰⁶. Es kann durch Atipamezol antagonisiert werden²⁰⁶.

Der dritte Bestandteil der Injektionsnarkose war das Benzodiazepin **Midazolam** in einer Dosierung von 5,0mg/kg. Durch die Bindung an GABA_A-Rezeptoren im limbischen System des Gehirns, führen Benzodiazepine zu sedativen Zuständen und Muskelrelaxation und unterstützen somit die Wirkung von Midazolam²⁰⁶. Ihr Antagonist ist Flumazenil²⁰⁶.

Der Vorteil dieser Art der Injektionsnarkose ist die vollständige **Antagonisierbarkeit** aller Bestandteile. Mäuse, die in einem chronischen Versuch wiedererwachen sollten, bekamen direkt nach Beendigung der Operation die antagonisierenden Arzneimittel Naloxon (1,7mg/kg) (Naloxon-Inresa®, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg), Atipamezol (3,75mg/kg) (Antisedan®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) und Flumazenil (0,72mg/kg) (Flumazenil-Inresa®, Inresa

Arzneimittel GmbH, Freiburg) in einer Mischspritze subkutan verabreicht und wachten daraufhin innerhalb von 5 Minuten schonend auf. Dadurch waren sie vor einer langen Nachschlafphase mit Auskühlen geschützt.

Bei längeren Narkosen wurde in regelmäßigen Abständen die Abwesenheit des Zwischenzehenreflexes überprüft und alle 45-60 Minuten eine halbe Dosis des Narkosegemischs subkutan nachgegeben. Unterstützend wurde die Narkose durch die Zufuhr von 0,5 Vol.% Isofluran über eine Kopfkammer aufrechterhalten. Durch das Trägergas Sauerstoff war gleichzeitig die Sauerstoffzufuhr gesichert und regulierbar.

Mäuse, welche nach der Operation zur Stenosierung der Vena cava wieder erwachen sollten, wurde 30 Minuten vor Erwachen 0,1mg/kg **Buprenorphin** (Temgesic®, Reckitt Benckiser Healthcare, Hull, UK) verdünnt mit 0,1ml isotonischer NaCl-Lösung subkutan verabreicht. Das Betäubungsmittel Buprenorphin ist ein Morphinderivat, welches partiell agonistisch mit einer hohen Affinität an μ -Opioidrezeptoren bindet und antagonistisch an κ -Opioidrezeptoren wirkt²⁰⁶. Durch die hohe Affinität werden volle μ -Agonisten, wie Fentanyl, verdrängt²⁰⁶. Seine analgetische Wirkung hält acht bis zwölf Stunden an²⁰⁶. Bedingt durch eine stärkere Affinität an den Opioidrezeptor als Naloxon, ist es durch diese Substanz nicht antagonisierbar²⁰⁷. Demnach konnte die Tripelnarkose 30 Minuten nach Buprenorphin-Gabe antagonisiert werden, ohne dass die Wirkung von Buprenorphin nachließ. 0,1mg/kg Buprenorphin wurden in den nächsten 48h bis zum Versuchsende zwei Mal täglich subkutan nachdosiert. Eine höhere Frequenz förderte das Auftreten von Harnverhalten. Unter dem angewendeten Schmerzregime war das Allgemeinbefinden der Mäuse stets hervorragend.

2.2. Vorbereitung auf die Operation

Für die Operation wurde ein mikrochirurgisches Operationsbesteck verwendet (siehe Abbildung 7). Die Instrumente wurden vor jeder Operation mit antibakteriellem Gerätedesinfektionsmittel (Bacillol® AF, Bode Chemie GmbH, Heidenheim) desinfiziert sowie nach der Operation für 24h in ein Bad mit Instrumentendesinfektionsmittel (Sekusept® Plus, Ecolab GmbH & Co. OHG, Düsseldorf) eingelegt und im Anschluss gesäubert.



Abbildung 7: Mikrochirurgisches OP-Besteck und Histocage

Um ein Auskühlen der Mäuse während der Operation zu verhindern, erfolgte der Eingriff auf einer Wärmematte (Intraoperatives Tierbewärmungssystem IOW-3704, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach). Die Temperatur konnte mit Hilfe einer Rektalsonde auf die Körpertemperatur des Tieres angepasst werden und wurde somit auf 37-38°C konstant gehalten.

Vor Einleitung der Narkose erfolgte die Gewichtsbestimmung der Mäuse mit einer Feinwaage (Kern ABJ, Kern&Sohn GmbH, Balingen).

Nach zehnminütigem Einwirken der Narkose wurde an den bereits schlafenden Mäusen das Operationsfeld vorbereitet. Dafür wurde das Fell im entsprechenden Bereich mit einem elektrischen Rasierapparat (Ermila Magnum Handy, Wahl GmbH, Unterkirnach) geschoren und die restlichen Haare mit Hilfe einer Enthaarungscreme (asid®-med, Asid Bonz GmbH, Herrenberg) entfernt. Zum Schutz der Hornhaut vor Austrocknung wurde auch bei kurzen Eingriffen eine Augensalbe mit 5%-igem Dexpanthenol (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) aufgetragen. Dann konnte das Tier in Rückenlage mit feinen Klebestreifen (Transpore™ 3M, 3M Deutschland GmbH, Health Care Business, Neuss) auf der Wärmematte fixiert werden. Die Schnauze wurde in einer kleinen Kopfkammer platziert, über welche die Zufuhr des Sauerstoff-Isofluran-Gemischs erfolgte. Das Operationsfeld wurde vor Beginn der Operation mit einem Hautantiseptikum (octenisept®, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) desinfiziert.

Alle mikrochirurgischen Eingriffe wurden mit Hilfe eines Stereomikroskops

(Stemi-2000-C, Zeiss, Jena) und einer Kaltlichtquelle (Schott-Kaltlichtquelle K1200, Zeiss, Jena) durchgeführt.

2.3. Intravenöse Applikation über den Schwanzvenen-Katheter

Die Applikation von fluoreszierenden Farbstoffen zur Visualisierung von Leukozyten und Thrombozyten während der intravitalmikroskopischen Aufnahmen erfolgte in Vollnarkose über einen Schwanzvenenkatheter. Auch für die Verabreichung von Antikörpern und ihren Fragmenten wurde die Schwanzvene verwendet. Dies fand unmittelbar vor der Operation zur Stenosierung der Vena cava caudalis statt, weshalb sich auch hier die Tiere in Vollnarkose befanden.

Die Narkose durfte für die intravenöse Applikation noch nicht zu tief sein, um ein Kollabieren der Schwanzvenen bedingt durch einen reduzierten Kreislauf zu verhindern. Ein Katheter, bestehend aus einem dünnen Polyethylen-Schlauch (Fine Bore Polythene Tubing, 0,28mm ID 0,61mm OD, Smiths Medical International Ltd., Hythe, UK) und zwei daran angebrachten 30G-Kanülen (BD Microlane™ 3, Becton Dickinson and Company Limited, Drogheda, Louth, Irland) wurde vorbereitet und mit 0,9%-NaCl-Lösung gespült, bis keine Luftblasen mehr vorhanden waren. Der Schwanz wurde mittels eines mit warmem Wasser gefüllten Handschuhs erwärmt, sodass sich die Venen gut darstellten. Anschließend erfolgte eine Haut-Desinfektion mit Sprühalkohol (octenisept®, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt). Eine der beiden lateralen Schwanzvenen wurde aufgesucht, das Blut gestaut und der bereitgelegte Katheter mit Hilfe eines Nadelhalters in die Vene vorgeschoben. Um den Sitz zu überprüfen, wurde darauf geachtet, dass Blut in den Schlauch zurückfloss und dann vorsichtig etwas 0,9%-NaCl-Lösung injiziert.

2.4. Operatives Vorgehen an der Vena cava caudalis

2.4.1. Stenosierung der Vena cava caudalis

Die Narkose wurde wie oben beschrieben (Punkt IV.2.1.) eingeleitet und ein Operationsfeld am Abdomen vorbereitet, welches sich vom Xyphoid bis zum Schambein und ausgehend von der Medianen etwa 1 cm nach lateral erstreckte. Im Anschluss wurde die Maus in Rückenlage fixiert und nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes ein Hautschnitt in der Linea alba gesetzt. Dieser wurde für intravitalmikroskopische Aufnahmen länger angelegt (etwa 0,5mm kaudal des Xyphoids bis zum Beckeneingang) als bei Mäusen, welche nach Vernähen des Schnittes wieder erwachen sollten (hier ein ca. 1 cm langer Schnitt 0,5mm kaudal des Xyphoids bis kurz kaudal des Nabels). Das Peritoneum konnte nun auf der Länge des Schnitts in der Linea alba vorsichtig durchtrennt werden. Dabei wurde am Nabel begonnen und darauf geachtet, keine Organe zu verletzen. Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe angefeuchteter Wattestäbchen (Wattestäbchen, Noba Verbandmittel Danz GmbH, Wetter) der Darm vorsichtig aus der Bauchhöhle heraus verlagert und links der Maus auf einem zur Erhöhung angebrachten Histocage (Rotilabo®-Einbettkassetten, für Biopsien, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe) mit befeuchteter steriler Gaze (Mullkompressen, NOBA Verbandmittel Danz GmbH, Wetter) platziert. Zum Schutz vor Austrocknung wurde das Darmkonvolut vollständig in feuchte sterile Gaze gehüllt und regelmäßig mit 0,9%-NaCl-Lösung befeuchtet. Für eine bessere Sicht auf die sich nun dorsal in der Bauchhöhle darstellende Vena cava caudalis, wurde bei Bedarf auf der rechten Seite der Maus ein Haltefaden (7-0, Prolene, monofil, nicht resorbierbar, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) durch Muskulatur und Peritoneum gezogen und die Inzision aufgespannt. Nun konnte die Vena cava caudalis vorsichtig von aufgelagertem Fett und Bindegewebe befreit werden. An der Ligaturstelle wurde rechts der Vena cava caudalis stumpf in die Tiefe präpariert und links vorsichtig ein Durchgang zwischen der anliegenden Aorta abdominalis und der Hohlvene geschaffen, bis es möglich war die Vena cava zu untertunneln. Mit einer gebogenen Pinzette wurde die Vena cava caudalis von rechts nach links unterfahren und direkt kaudal der Vena renalis sinistra ein ca. 1,5cm langes Fadenstück der Stärke 8-0 (Premilene, monofil, nicht resorbierbar, B. Braun Aesculap, Aesculap AG & CO. KG, Tuttlingen) unter der Vena cava

hindurchgezogen. Besonders in diesem Schritt, wie aber auch in der restlichen Operation, musste peinlich genau darauf geachtet werden, jegliche Blutung zu vermeiden. Am unter der Hohlvene hindurchgezogenen Faden wurde im Anschluss ein einfacher chirurgischer Knoten vorgelegt. Ein etwa 0,5mm langes Drahtstück eines humanen Herzkatheters mit sorgfältig abgeschliffenen Enden wurde als Platzhalter für die Stenosierung der Vena cava caudalis verwendet. Dieser wurde zwischen Vene und Ligaturfaden platziert. Im Anschluss wurde der vorgelegte Ligaturfaden derart zugezogen, dass nach folgender Entfernung des Platzhalters eine Stenose mit Blutflussreduktion um 70 bis 80% eintrat. Vor Entfernen des Platzhalters wurde der vorgelegte chirurgische Knoten mit einem Zweiten gesichert. Bedingt durch die Ligatur wölbte sich die Vena cava kaudal davon unmittelbar stark auf. Die Enden des Ligaturfadens wurden gekürzt und das angefeuchtete Darmkonvolut in die Bauchhöhle zurückverlagert. Peritoneum und Muskulatur wurden mit Hilfe eines 7-0er Fadens (Prolene, monofil, nicht resorbierbar, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) in einer fortlaufenden diagonalen Kürschnernaht adaptiert. Die Haut wurde mit dem gleichen Faden durch Einzelhefte verschlossen und die Wunde mit Jodlösung (Braunol®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) desinfiziert.

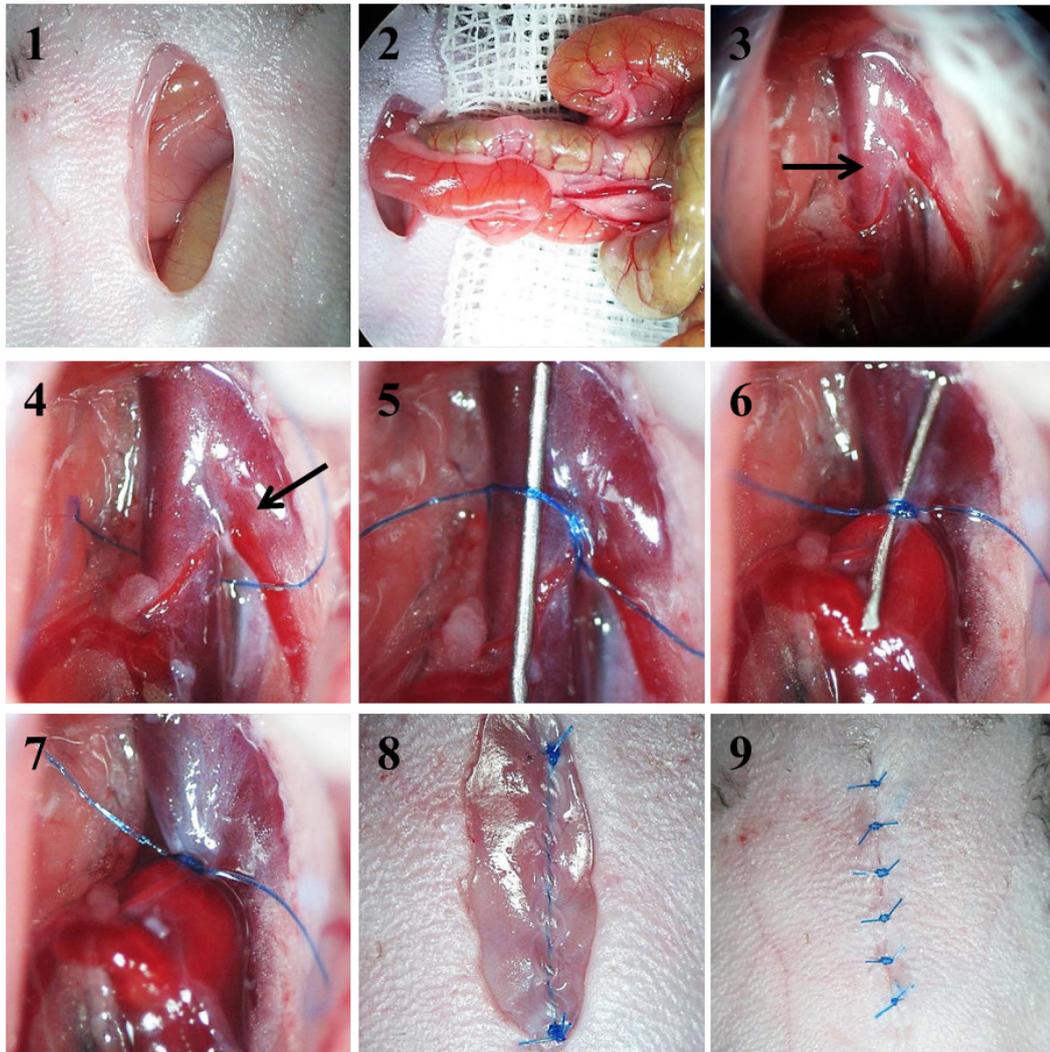


Abbildung 8: Stenosierung der Vena cava caudalis

1. Blick auf die eröffnete Bauchhöhle; 2. Herauslagern des Darmkonvoluts auf sterile Gaze; 3. Blick auf die Vena cava caudalis (Pfeil); 4. Vorlegen des 8-0er Ligatur-Fadens kaudal der Abzweigung der linken Nierenvene (Pfeil) 5. Knüpfen des einfachen chirurgischen Knotens und Einfügen des Platzhalters; 6. Zuziehen der Ligatur über dem Platzhalter; 7. Stenosierte Vena cava caudalis nach Entfernen des Platzhalters; 8. Naht des Peritoneums und der Bauchmuskulatur; 9. Hautnaht mit Einzelheften

2.4.2. Entnahme der Vena cava caudalis und Gewichtsbestimmung

Bei chronischen Versuchen zur Bestimmung des Thrombusgewichts, wurde der entstandene Thrombus in der Vena cava caudalis nach 48h entnommen und gewogen.

Dazu wurde die zuvor zur Stenosierung der Vena cava caudalis operierte Maus erneut in Narkose gelegt. Das Operationsfeld am Abdomen wurde desinfiziert und die Maus in Rückenlage fixiert. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurde ein Schnitt paramedian, neben der schon vorhandenen vernähten Wunde durch Haut und Muskulatur angelegt. Auf diese Weise konnte

ein rechteckiger Lappen der Bauchwand abpräpariert werden, welcher zur Seite geklappt wurde. Das Darmkonvolut wurde erneut aus der Bauchhöhle vorverlagert, um den Blick auf die Vena cava caudalis freizugeben. 0,5cm kranial der 48h zuvor angelegten Ligatur wurde nun ein Schnitt in die Vene gesetzt, woraufhin sofort ein massiver Blutaustritt erfolgte. Direkt im Anschluss wurde mit einer vorbereiteten 5ml-Spritze (BD DiscarditTM II, Becton Dickinson S.A., Fraga, Huesca, Spanien) das Herz punktiert (siehe Punkt IV.2.5.1.) und 5ml 0,9%-NaCl-Lösung infundiert. Auf diese Weise konnte über den zuvor angelegten Schnitt kranial der Ligatur alles Blut aus dem Gefäßsystem herausgespült werden, wodurch vermieden wurde, dass restliches Blut in der ligierten Hohlvene gerinnt und das Thrombusgewicht bzw. das Leergewicht verfälscht. Durch den schnellen, kompletten Blutentzug starb die Maus. Im Anschluss wurde das ausgetretene Blut-NaCl-Gemisch aus der Bauchhöhle entfernt. Nun konnte beurteilt werden, ob sich ein makroskopisch sichtbarer Thrombus kaudal der Ligatur gebildet hatte. Zur Entnahme des Thrombus (oder der leeren Vene zur Leergewichtsbestimmung) wurde diese bis zur Aufzweigung der Aorta abdominalis in die beiden Arteriae iliacae von angelagerten Strukturen befreit. An der Stelle dieser Bifurkation wurde die Vena cava gemeinsam mit der Aorta abdominalis stumpf untertunnelt, sodass ein Faden (7-0) hindurchgezogen und beide Gefäße gemeinsam abgebunden werden konnten. Kaudal dieser neu angelegten Ligatur wurden nun beide Gefäße mit einem Scherenschlag abgetrennt und nach kranial frei präpariert, bis sie auch kranial der stenosierenden Ligatur abgesetzt werden konnten. Auf diese Weise konnte der Thrombus, eingeschlossen in die Vena cava caudalis mit der damit bindegewebig verbundenen Aorta, isoliert werden.

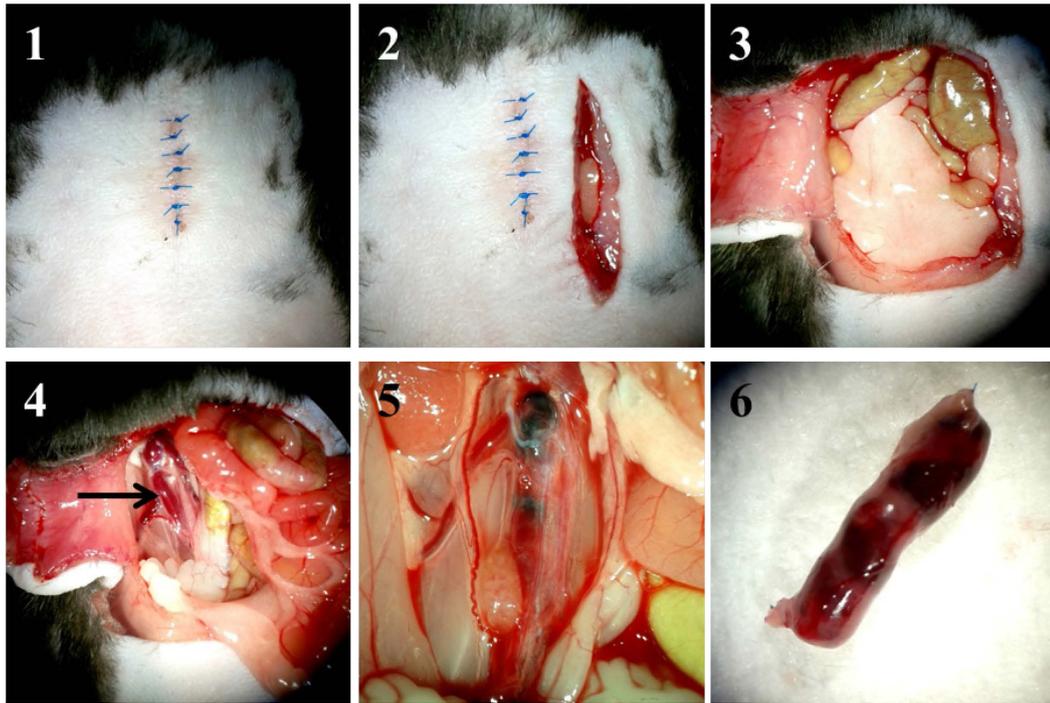


Abbildung 9: Entnahme des Thrombus nach 48h

1. Blick auf die Bauchnaht; 2. Eröffnung der Bauchhöhle links der Bauchnaht; 3. Blick auf das Darmkonvolut nach Aufklappen der Bauchhöhle; 4. Blick auf die ligierte Vena cava caudalis (Pfeil); 5. Venöser Thrombus in situ; 6. Venöser Thrombus nach der Entnahme mit typischer laminarer Schichtung

Die entnommenen Strukturen wurden von restlichem Blut und NaCl befreit und anschließend auf einen bereitgelegten 0,5x0,3cm großen Filterpapierzuschnitt (Machery-Nagel GmbH & Co.KG, Düren) gelegt. Auf einer Feinwaage erfolgte eine Gewichtsbestimmung. Das ermittelte Gewicht beinhaltet das Thrombusgewicht, das Gewicht des Abschnitts der Vena cava caudalis und der Aorta abdominalis, das Gewicht der Ligaturfäden sowie das Gewicht des Filterpapiers. Um daraus das reine Thrombusgewicht zu ermitteln, wurden Leergewichte der genannten Strukturen ohne Thrombus bestimmt. Dafür wurden einer Kontrollgruppe (siehe Punkt IV.8.3.1.) auf die gleiche Weise die blutleeren Gefäße ohne Thrombus entnommen und das Gewicht auf einem Filterpapierzuschnitt entsprechend ermittelt. Aus den einzelnen Leergewichten konnte ein Mittelwert bestimmt werden. Wenn man nun diesen Mittelwert des Leergewichts von dem Gesamtgewicht eines sich gebildeten Thrombus mit angelagerten Strukturen abzog, erhielt man das reine Thrombusgewicht.

Nach der Gewichtsbestimmung wurde der entnommene Thrombus zusammen mit den angelagerten Gefäßen in einem Schlauchstück in Tissue-Tek (Tissue-Tek® O.C.T.TM Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn,

Niederlande) eingebettet und in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß (Eppendorf Tubes®, Eppendorf AG, Hamburg) gegeben. Der verpackte Thrombus wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Anfertigung von histologischen Schnitten bei -80°C aufbewahrt.

2.4.3. Sham-Operation

Mit dem Ziel zu zeigen, dass die induzierte Thrombenbildung allein auf die Reduktion der Flussgeschwindigkeit und nicht auf eine durch den Operationsvorgang bedingte Verletzung des Endothels zurückzuführen war, wurde eine Gruppe an Tieren an der Vena cava operiert, ohne diese zu ligieren. Diese sog. Sham-Operation hatte den gleichen Ablauf wie die Operation zur Stenosierung der Vena cava: Unter Vollnarkose wurde die Bauchhöhle eröffnet und das Darmkonvolut heraus gelagert. Die kaudale Hohlvene wurde wie unter Punkt IV.2.4.1. beschrieben frei präpariert und kaudal der Abzweigung der linken Nierenvene ein Faden (8-0) vorgelegt. Dieser wurde abweichend von der gewöhnlichen Präparation allerdings nicht zugezogen, sondern ohne diese einzuengen, locker um die Vene gelegt und doppelt verknötet. Es war jedoch darauf zu achten, die Fadenschlinge so eng anzulegen, dass sich später kein Darmabschnitt verfangen konnte. Nun konnte die Bauchwunde nach dem oben beschriebenen Prinzip wieder verschlossen werden und die Maus aus der Narkose erwachen. Nach 48h wurde auch in der Sham-operierten Gruppe die Bauchhöhle wie unter Punkt IV.2.4.2. beschrieben wieder eröffnet und überprüft, ob sich ein Gerinnsel in der Vena cava caudalis gebildet hatte. Die Maus wurde dabei durch Entbluten getötet.

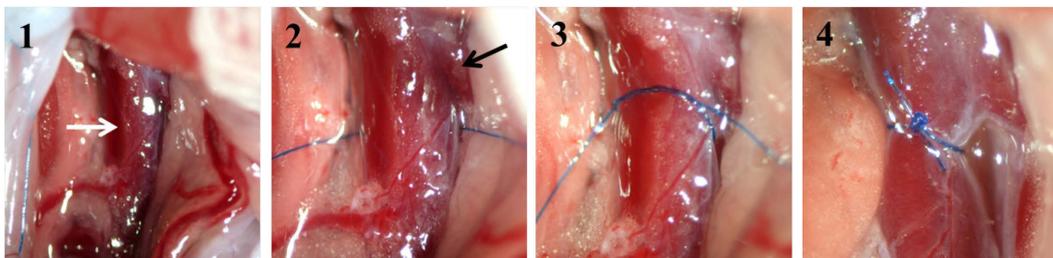


Abbildung 10: Sham-Operation

1. Sicht auf die Vena cava caudalis (Pfeil); 2. Untertunneln der Vena cava caudalis mit dem Ligaturfaden kaudal der Abzweigung der linken Nierenvene (Pfeil); 3. Vorlegen des chirurgischen Knotens; 4. Sicherung mit einem zweiten Knoten, ohne eine Stenose der Vena cava caudalis zu erzeugen

2.5. Blutentnahmemethoden

2.5.1. Blutgewinnung aus dem Herzen

Die Blutgewinnungsmethode aus dem Herzen fand Anwendung, wenn eine große Menge Blut benötigt wurde.

Die Maus wurde dafür mit Isofluran in Narkose gelegt und bekam Fentanyl intraperitoneal zur Schmerzausschaltung.

Wenn alle Schmerzreflexe erloschen waren, wurde die Haut über dem Brustkorb mit Alkohol desinfiziert und mit einer Schere über der Operationsstelle abpräpariert. Nun konnte die zweite linke Rippe aufgesucht werden. Hinter dieser wurde mit einer, auf einer 2ml-Spritze (BD Discardit™ II, Becton Dickinson S.A., Fraga, Huesca, Spanien) aufgesetzten, 26G-Kanüle (BD Microlane™ 3, Becton Dickinson and Company Limited, Drogheda, Louth, Irland) direkt neben dem Sternum senkrecht eingestochen. Unter leichtem Aspirieren wurde die Kanüle bis ins Herz vorgeschoben. Auf diese Weise konnte etwa 1ml Blut gewonnen werden. Durch den schnellen massiven Blutentzug starb die Maus. Um den Tod schneller herbeizuführen, folgte direkt im Anschluss an die Blutabnahme zusätzlich ein Genickbruch.

2.5.2. Blutgewinnung aus der Vena facialis

Die Punktion der Vena facialis („fraggeln“) ist eine geeignete Blutentnahmemethode für kleinere Blutmengen bis zu 150µl.

Hierfür wurde der Maus 30 Minuten vor dem Eingriff 0,1mg/kg Buprenorphin verabreicht. Sobald die Wirkung dieser Schmerzausschaltung nach einer halben Stunde vorhanden war, konnte die Maus mit Isofluran betäubt werden. Alternativ wurde diese Art der Blutentnahme in einem Finalversuch unter Tripelnarkose mit Midazolam, Medetomidin und Fentanyl durchgeführt – beispielsweise vor der Thrombusentnahme.

Die Maus wurde im Nacken gegriffen, um die Vena facialis zu stauen und seitlich auf einer Unterlage platziert. Mit einer Blutlanzette (Solofix®, B. Braun Melsungen AG, OPM, Melsungen) wurde kaudal der haarlosen Stelle auf der Wange - dem sog. „fraggel“ – senkrecht eingestochen. Die hervortretenden Blutstropfen konnten mit einer EDTA- oder Serum-Microvette (Microvette® 100 K3E oder 100 Z, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) mit Kapillarkraft aufgesogen

werden. Sobald genug Blut gewonnen war, wurde der Stau der Vene gelöst und die Einstichstelle mit Hilfe eines Wattestäbchens fest komprimiert, um die Blutung zu stillen und Hämatome zu vermeiden. Die Maus wurde zum Aufwachen in ihren Käfig zurückgesetzt und durfte sich zwei Wochen von dem Eingriff erholen.

3. Blutanalysen

3.1. Blutbilder

Von den einzelnen Mauslinien wurden große Blutbilder sowie Differenzialblutbilder angefertigt, um eventuelle durch den Knockout bedingte Veränderung festzustellen.

Für die Blutabnahme war die Methode des „fraggelns“ (siehe Punkt IV.2.5.2.) Mittel der Wahl, da nur geringe Mengen Blut (70µl) nötig waren. Das mit EDTA ungerinnbar gemachte Vollblut wurde mit Hilfe eines Blutanalysegeräts (ABX Micros ES60 Hämatologie Analysegerät, HORIBA ABX, Montpellier, Frankreich) untersucht und aus den berechneten Werten für den jeweiligen Mausstamm ein Mittelwert gebildet.

Als für die Ausbildung venöser Thromben relevante Parameter, wurde die Anzahl weißer Blutzellen (WBC) sowie die Plättchenanzahl (Plt) herangezogen und mit Hilfe des Differentialblutbilds die genaue Anzahl an Lymphozyten (LYM), Granulozyten (GRA) sowie Monozyten (MON) im Anteil der weißen Blutzellen bestimmt.

3.2. Thrombelastometrie

3.2.1. Messprinzip

Die Thrombelastometrie (TEM) ist ein Verfahren zur detaillierten Analyse verschiedener Gerinnungseigenschaften von Vollblut. So kann mit dieser Methode neben der Zeit bis zum Einsetzen der Gerinnung auch die Festigkeit und das Lyseverhalten eines Gerinnsels bestimmt werden, was mit klassischen Gerinnungstests wie der partiellen Thromboplastinzeit oder dem Quick-Wert nicht möglich ist²⁰⁸. „Die rheologischen Bedingungen dieser Methode imitieren [außerdem] den stagnierenden Blutfluss in Venen“²⁰⁹.

Das für die Messung nötige Blut wurde einer Maus kardial entnommen (siehe

Punkt IV.2.5.1) und dabei mit 100µl Zitrat (aus einer S-Monovette® 3.8ml 9NC (PFA), Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) die Gerinnung gehemmt.

Die Messungen erfolgten an einem vorgewärmten Rotationsthrombelastografie-Messgerät (ROTEG®05, Pentapharm GmbH, München). Dieses Messgerät besteht aus einer mit einem Computer verbundenen Messeinheit. An der Messeinheit sind eine Wärmeplatte und eine magnetische Vorrichtung mit vier beweglichen Stahlachsen montiert. Passend dazu sind vier magnetische, beheizbare Küvettenhalter (Tem Innovations GmbH, München) sowie Einmal-Küvetten und –Stempel aus Plastik nötig (Cup & Pin pro, Tem Innovations GmbH, München). Die Einmal-Küvetten werden in den Küvettenhalter eingesetzt und der Einmal-Stempel auf die Stahlachsen der Messeinheit geschoben. Nachdem die Küvetten mit dem gewonnenen Blut und den entsprechenden Reagenzien befüllt sind, werden diese auf die Stempel an der Messeinheit gesetzt und sind dann mit Hilfe der magnetischen Küvettenhalter fixiert. Zwischen Stempel und Küvette bleibt so ein 1mm großer blutgefüllter Spalt²⁰⁹. Durch den Start der Messung über das Bedienfeld des Computers werden die Stahlachsen mit dem aufgesetzten Stempel in Bewegung gebracht. Sie rotieren um 4,75° abwechselnd nach links und nach rechts, die Küvette bewegt sich dabei nicht^{208,209}. Die Rotationsbewegung erfolgt zunächst ungehindert. Durch die einsetzende Blutgerinnung bilden sich jedoch Gerinnselstränge, die den Stempel in seiner Drehbewegung einschränken^{208,210}. Diese veränderte Rotation der Stahlachse wird mit einem Spiegel und einer LED Lichtquelle optisch erfasst und mit Hilfe des Computerprogramms ausgewertet²⁰⁹. So kann ein zeitlicher Verlauf der Gerinnselbildung und –lyse erstellt werden.

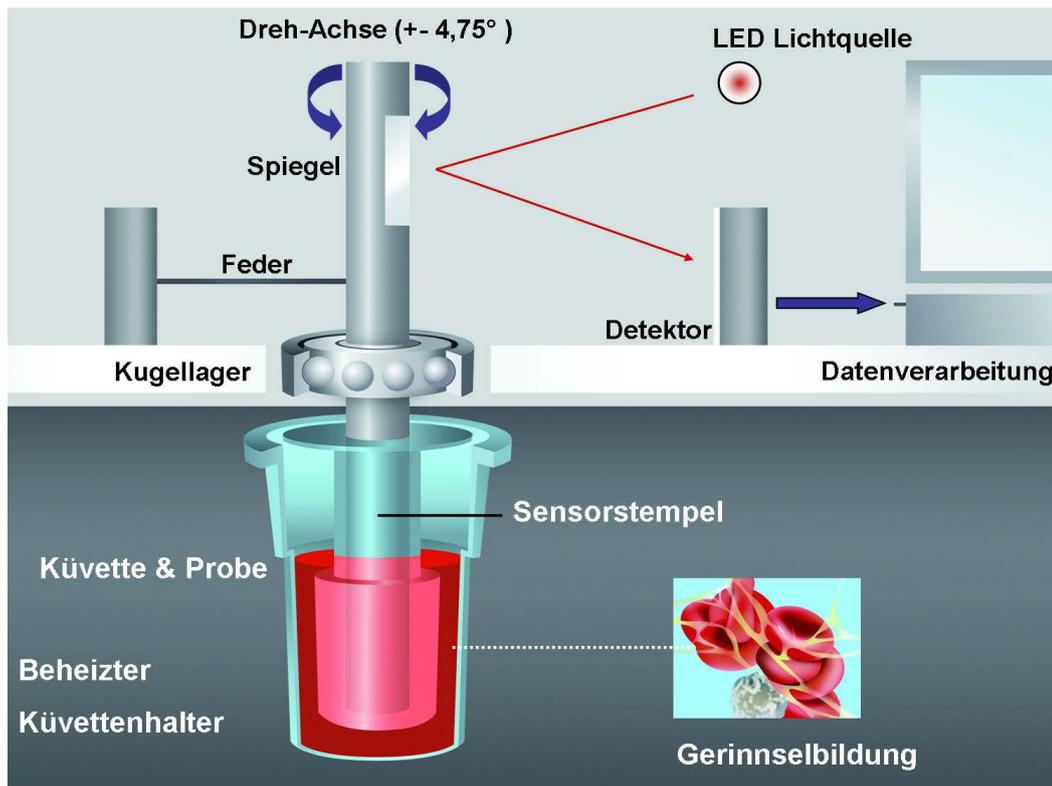


Abbildung 11: Messprinzip der Thrombelastometrie; © Tem International GmbH

In einem beheizten Kuvettenhalter wird die Blutprobe auf den um $\pm 4,75^\circ$ rotierenden Stempel geschoben; das mit der Zeit entstehende Gerinnsel hemmt die Drehbewegung, was optisch über eine LED Lichtquelle und einen Spiegel an der Drehachse registriert und an einen Computer zur Datenverarbeitung weitergeleitet wird

3.2.2. EXTEM-Analyse

Mit der EXTEM-Analyse kann die Funktion der gesamten Gerinnung in Anwesenheit von Plättchen und Gerinnungsfaktoren überprüft werden.

Für diese Analyse mussten $300\mu\text{l}$ des zuvor gewonnenen Zitratbluts zunächst rekalkifiziert werden. Dies geschah durch die Substitution von $20\mu\text{l}$ STARTEM-Reagenz (star-tem[®] Tem Innovations GmbH, München). Im Anschluss wurde die Blutgerinnung mit rekombinatem TF gestartet. Dafür wurden $20\mu\text{l}$ EXTEM-Reagenz (r ex-tem[®] Tem Innovations GmbH, München) zugesetzt, welches zusätzlich Phospholipide und einen Heparin-Inhibitor enthält. Die Messung wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten durchgeführt.

3.2.3. FIBTEM-Analyse

Bei der FIBTEM-Analyse wird mit der Hemmung der Thrombozyten allein die plasmatische Gerinnung durch Gerinnungsfaktoren betrachtet. Es entsteht ein Fibringerinnsel, an welchem das Ausmaß der Fibrinpolymerisation genau

analysiert werden kann²¹¹.

Für diese Analyse wurden 300µl des zuvor gewonnenen Zitratbluts zunächst mit 20µl FIBTEM-Reagenz (fib-tem® Tem Innovations GmbH, München) versetzt. Darin sind CaCl₂ zur Rekalzifizierung des Blutes und das Zellgift Cytochalasin D enthalten, welches die im Blut vorhandenen Thrombozyten hemmt, sodass diese nicht mehr am Gerinnungsprozess teilnehmen können. Zusätzlich wurde die Probe mit 20µl EXTEM-Reagenz versetzt und die Gerinnung durch den darin enthaltenen TF gestartet. Die Messung wurde nach 30 Minuten beendet und die Werte abgelesen.

3.2.4. Interpretation der Messergebnisse

In der EXTEM-Analyse sowie in der FIBTEM-Analyse berechnet der Computer verschiedene Parameter der Gerinnung:

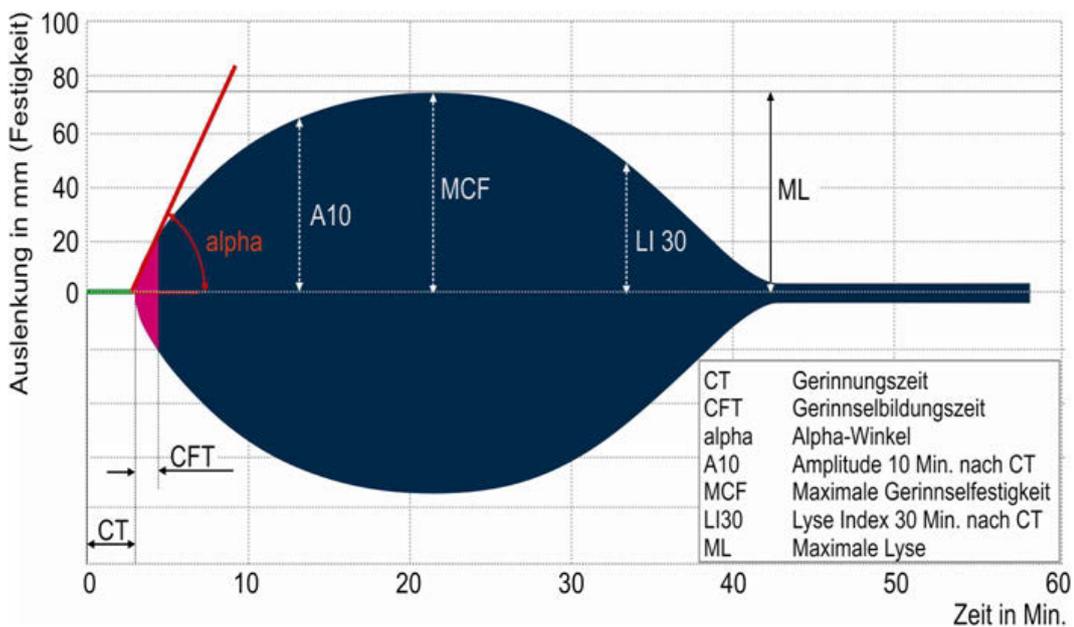


Abbildung 12: Parameter der Thrombelastometrie; © Tem International GmbH

Durch die Datenverarbeitung am Computer wird ein Diagramm erstellt, anhand dessen man wichtige Parameter zur Beurteilung der Gerinnselfestigkeit ablesen kann

Der CT-Wert („coagulation time“ in s) gibt die Dauer bis zum Einsetzen der Gerinnung und damit die Geschwindigkeit des Gerinnungsprozesses an²⁰⁸. Dieser Parameter ist ausschließlich für die EXTEM-Analyse interessant²⁰⁸. Sie entspricht bei Verwendung des extrinsischen Aktivators TF dem Quick-Wert²⁰⁸.

Der CFT-Wert („clot formation time“ in s) beschreibt die Dauer vom Einsetzen der Gerinnung bis zur Bildung einer Gerinnselfestigkeit von 20mm²⁰⁸. Dadurch

wird die Geschwindigkeit der Gerinnelbildung erfasst²⁰⁸. Auch dieser Wert wird allein zur Auswertung der EXTEM-Analyse herangezogen²⁰⁸.

Der **α -Winkel** (in °) gibt die Steilheit des Kurvenanstiegs wieder²⁰⁸. Damit ist er neben der CFT ein zusätzliches Maß für die Geschwindigkeit der Gerinnelbildung: Ein steiler Anstieg spricht für eine schnelle, ein flacher für eine langsame Bildungszeit²¹². Er wird genau wie die CFT zur Auswertung der EXTEM-Analyse verwendet²⁰⁸.

Der **MCF-Wert** („maximum clot firmness“ in mm) ist ein Maß für die Gerinnselfestigkeit und –Stabilität und wird anhand der größten Amplitude des Gerinnsels gemessen^{208,212}. Dieser Wert wird sowohl in der EXTEM-Analyse als auch in der FIBTEM-Analyse zur Auswertung herangezogen²⁰⁸.

Der Wert für den **LI30** (Lyse-Index 30 in %) beschreibt den prozentualen Anteil der Gerinnelamplitude 30 Minuten nach Beginn der Gerinnung, im Vergleich zum zuvor ermittelten MCF-Wert²⁰⁸. Damit ist er ein Maß für die nach 30 Minuten bereits stattgefundene Auflösung des Gerinnsels oder Fibrinolyse²⁰⁸.

Alternativ kann zur Beschreibung des Lyse-Verhalten des Gerinnsels der **ML**-Wert (maximale Lyse in %) herangezogen werden. Er wird in % für den jeweiligen Zeitpunkt der Messung angegeben und bezieht sich ebenfalls auf den zuvor ermittelten MCF-Wert²¹².

Mit diesen Werten kann nun ermittelt werden, ob und auf welche Weise die Blutgerinnung beeinträchtigt ist. Dabei kann ausschließlich die sekundäre Gerinnung und damit die Funktionsfähigkeit der Gerinnungskaskade betrachtet werden, da TF als externe Quelle hinzugegeben wird²⁰⁸. Eine Störung der Aktivierung der Gerinnung wird durch einen verlängerten CT-Wert angezeigt²¹². Eine Verlängerung der Gerinnungszeit kann durch einen Mangel an Gerinnungsfaktoren sowie durch einen Heparineffekt ausgelöst werden^{208,212}. Durch Erfassung der Werte CFT und MCF kann beurteilt werden, ob die Gerinnelbildung beeinträchtigt ist: Über den CFT-Wert die Geschwindigkeit und über den MCF-Wert Festigkeit. Die Festigkeit wird hauptsächlich durch die Faktoren Fibrinogen, Thrombozyten und Faktor XIII (nötig zur Quervernetzung von Fibrin) bestimmt²⁰⁸.

4. Intravitalmikroskopie (IVM)

4.1. Geräte

Alle intravitalmikroskopischen Versuche wurden mit einem Auflicht- oder Epifluoreszenzmikroskop (BX51WI, Olympus, Hamburg) durchgeführt.

Mit Hilfe einer Quecksilberlampe wird bei dieser Art von Mikroskop UV-Licht ausgestrahlt. Dieses wird durch einen Anregungsfilter geleitet und trifft dann auf einen Strahlungssteiler, welcher das gesamte kurzwellige Anregungslicht durch das Objektiv auf das Objekt lenkt²¹³. Die Fluoreszenzfarbstoffe im Objekt werden durch Absorption des kurzwelligen Lichts angeregt, woraufhin sie selbst weniger energetische Lichtstrahlen mit größerer Wellenlänge aussenden^{7,213}. Diese gelangen durch das Objektiv zurück in die Mikroskop-Optik und treffen auf den Strahlungssteiler. Dieser lässt nun das langwellige Licht passieren, woraufhin es zum Okular geleitet wird²¹³. Dem Strahlungssteiler ist ein System individuell anwählbarer Filter nachgeschaltet, wodurch Strahlen bestimmter Wellenlänge ausgewählt werden können und so eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen möglich ist²¹³.

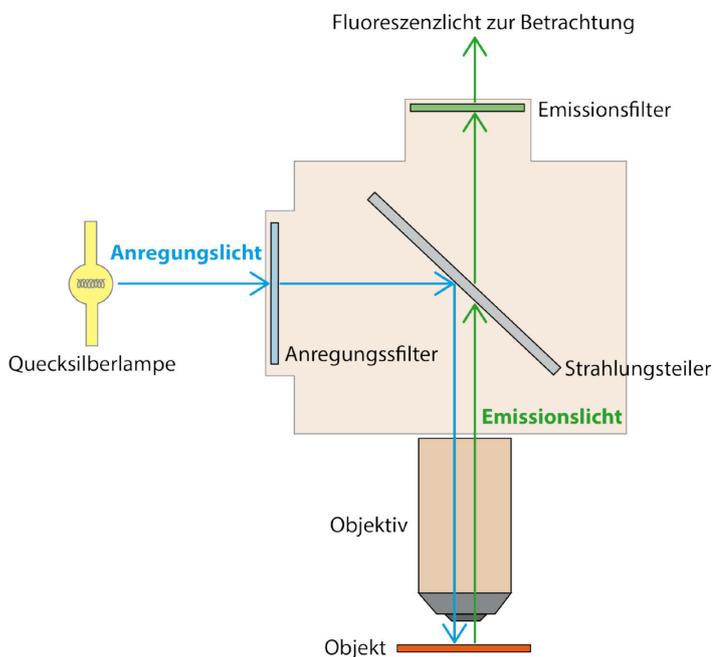


Abbildung 13: Strahlengang im Epifluoreszenzmikroskop

Das durch eine Quecksilberlampe generierte Anregungslicht trifft auf einen Anregungsfilter; angeregte Lichtstrahlen werden vom Strahlungssteiler durch das Objektiv aufs Objekt geleitet und fluoreszierende Farbstoffe angeregt; das von angefärbten Strukturen im Objekt ausgesandte längerwellige Emissionslicht trifft über das Objektiv auf den Strahlungssteiler, welcher es passieren lässt, sodass es auf den entsprechenden Emissionsfilter trifft und für den Betrachter sichtbar wird

Die Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe einer CCD (charge coupled device)-Kamera (ORCA-ER, Hamamatsu, Japan) registriert und an einen Computer mit einer Steuerungseinheit weitergeleitet. Somit konnte ein live-Bild erstellt sowie Schnappschüsse und Videosequenzen aufgenommen werden.

Als Objektiv diente eine 20-fache Vergrößerung, welche nur in einer Flüssigkeitsimmersion (Wasserimmersionsobjektiv, UMPLand Fl 20x/0,50Na, 3,3mm, Water dipping Lens, Olympus, Hamburg) arbeitete. Aus diesem Grund wurde zur Darstellung der Vena cava caudalis angewärmte 0,9%-NaCl-Lösung in die eröffnete Bauchhöhle der Maus eingeleitet.

4.2. Durchführung

Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen erfolgten in Vollnarkose mit ständiger Zufuhr eines Sauerstoff-Isofluran-Gemischs über eine Kopfkammer (siehe Punkt IV.2.1.). Es handelte sich ausschließlich um akute Versuche, an deren Ende die Tiere euthanasiert wurden.

4.2.1. Flussgeschwindigkeitsbestimmung

Zweck dieser Versuche war, die Standardisierung der Operationsmethode bezüglich der Blutflussreduktion zu überprüfen. Mithilfe des Vergleichs einer Aufnahme von im Blutstrom fließenden Leukozyten vor der Ligatur der Vena cava caudalis (prä-Aufnahme) mit einer Aufnahme nach der erfolgten Ligatur (post-Aufnahme), konnte die Flussgeschwindigkeit und deren Reduktion bestimmt werden. Angestrebt wurde eine mittlere Reduktion um 70 bis 80%.

Dafür wurde zunächst ein venöser Zugang über die Schwanzvene für die Applikation des fluoreszierenden Farbstoffs Acridine Orange geschaffen (siehe Punkt IV.2.3. und IV.4.3.1.). Im Anschluss wurde, wie in Punkt IV.2.4.1. beschrieben, die Vena cava caudalis freipräpariert und der Faden zur späteren Ligatur der Vene vorgelegt.

Nun platzierte man die auf einer Wärmeplatte fixierte Maus auf dem höhenverstellbaren Objektisch des Epifluoreszenzmikroskops so, dass das Objektiv auf die freigelegte Hohlvene gerichtet war. Es wurde mit einer 20-fachen Vergrößerung in einer NaCl-Flüssigkeitsimmersion gearbeitet. Zur Anfärbung der Leukozyten wurden 50µl des Acridine-Orange-NaCl-Gemischs über den Schwanzvenenkatheter appliziert und bei Bedarf nachdosiert.

Für die prä-Aufnahme wurde das Anregungslicht des Mikroskops auf die Vena cava caudalis gelenkt, der entsprechende Filter für den Fluoreszenz-Farbstoff Acridine Orange eingelegt und das Bild auf die nun grün fluoreszierenden zirkulierenden Leukozyten im Blutstrom scharf gestellt. An einer Stelle mit ruhigem Blutfluss ohne Turbulenzen relativ weit kaudal in der Vene, konnten Video-Aufnahmen von 10s angefertigt werden.

Direkt im Anschluss erfolgte die Stenosierung der Vena cava caudalis (siehe Punkt IV.2.4.1.). Nun konnte die post-Aufnahme angefertigt werden: Unter dem Mikroskop wurde dieselbe Position aufgesucht, wie sie für die prä-Aufnahme verwendet wurde, und Video-Aufnahmen des nun reduzierten Blutflusses erstellt.

4.2.2. Untersuchung der Thrombusentstehung über 6h

Mit diesen Versuchen konnte die Initiierung der Thrombusbildung in den verschiedenen Mauslinien dargestellt werden. Dabei wurde die Leukozyten- und Thrombozyten-Rekrutierung zu Beginn der Entstehung eines venösen Thrombus untersucht.

Auch hierfür musste zuerst ein Venenzugang geschaffen werden, um der Maus Rhodamin B-gefärbte Thrombozyten und Acridin Orange zur Anfärbung der Leukozyten verabreichen zu können. Für die Versuche über 6h wurde zu diesem Zweck der Schwanzvenenkatheter mit Hilfe eines Gewebeklebers (1x Histoacryl®, B. Braun Surgical SA, Rubi, Spanien) an der Maus fixiert, da er so über diese lange Dauer sicherer lag. Anschließend wurde die Operation zur Stenosierung der Vena cava caudalis durchgeführt (siehe Punkt IV.2.4.1.).

Direkt nach der Ligatur der Hohlvene, erfolgte die intravenöse Verabreichung der isolierten, Rhodamin B-gefärbten Thrombozyten (siehe Punkt IV.2.3., IV.4.3.2. und IV.4.4.). Sie sollten sich nun wie körpereigene Plättchen verhalten. Acridine Orange wurde zum Sichtbarmachen der Leukozyten zu Beginn in einem Bolus von 50µl verabreicht und bei Bedarf kleinere Mengen nachdosiert.

Im stündlichen Abstand zum Zeitpunkt der Ligatur wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop nun Aufnahmen der Leukozyten- und Thrombozyten-Rekrutierung in der Vene angefertigt. Dazu wurde die operierte Maus auf einer Wärmeplatte auf dem Objektisch unter dem Objektiv platziert. Für die Aufnahmen und Auswertung wurde mit der 20-fachen Vergrößerung in einer Flüssigkeitsimmersion aus angewärmter 0,9%-NaCl-Lösung gearbeitet. Es

wurden Videos mit 50 Bildern und einer Dauer von 10s angefertigt.

Es sollten zu jedem Zeitpunkt möglichst die gleichen Stellen in der Vene miteinander verglichen werden. Zu diesem Zweck unterteilte man die freigelegte Vene in vier aufeinanderfolgende Fenster. Von kranial nach kaudal wurden diese mit Fenster 1 bis Fenster 4 bezeichnet. Zur Auswertung wurden ausschließlich Fenster 3 und Fenster 4 herangezogen, da weiter kranial eine durch einmündende Gefäße verursachte turbulente Blutströmung sowie eine starke Venenwölbung die Aufnahmen stören konnten.

Zur Unterscheidung der emittierten Lichtstrahlen der beiden verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin B und Acridine Orange, wurden verschiedene Filter angewählt. Diese ließen jeweils nur Licht der Wellenlänge eines der beiden fluoreszierenden Farbstoffe passieren. Die Leukozyten konnten so grün und die Thrombozyten rot fluoreszierend dargestellt und getrennt voneinander beurteilt werden.

Anders als bei der Bestimmung der Flussgeschwindigkeit, wurden hier die adhärennten Zellen auf dem Endothel scharf gestellt und der Blutfluss so gut wie möglich ausgeblendet.

4.3. Verwendete Fluoreszenz-Farbstoffe

4.3.1. Acridine Orange

Zur Visualisierung der Leukozyten wurde der grün fluoreszierende Farbstoff Acridine Orange (Acridine Orange hemi(zinc chloride) salt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) verwendet. Acridine Orange kann Zellen penetrieren und an Nukleinsäuren binden²¹⁴. In den hier durchgeführten Versuchen wurde es intravenös verabreicht und konnte sich auf diese Weise an die DNA-Doppelstränge der im Blut zirkulierenden oder auf dem Endothel adhärennten Leukozyten anlagern. Nach einer Anregung mit 490nm, wurde Licht einer Wellenlänge von 519nm emittiert²¹⁴. Der Farbstoff wurde in einer Konzentration von 0,05% in einem Bolus von 0,05ml verabreicht und bei Bedarf nachdosiert.

4.3.2. Rhodamin B

Die isolierten Thrombozyten des Spendertiers wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B Isothiocyanat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Taufkirchen) in einer Konzentration von 20µg/ml ex vivo angefärbt und im Anschluss dem Empfängertier intravenös verabreicht. Mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops konnte die emittierte Wellenlänge von 580nm rot fluoreszierend dargestellt werden²¹⁴.

Da sich die Emissionsspektren von Acridine Orange und Rhodamin B deutlich voneinander unterscheiden, war eine getrennte Aufnahme der beiden angefärbten Zellarten möglich.

4.4. Isolation und Färbung von Thrombozyten

Zur Visualisierung der Thrombozyten wurden diese von einem Spendertier isoliert und gefärbt und dem Empfängertier ein definierter Teil davon intravenös verabreicht.

Vor der Isolation wurde ein Tyrode's-Puffer hergestellt, um die gewonnenen Thrombozyten während der Isolation in einem möglichst physiologischen Milieu zu halten. Somit wurden diese weder zerstört noch voraktiviert. Für 100ml Tyrode's-Puffer wurden 0,1mg D(+)-Glucose (Merck KGaA, Darmstadt) und 0,1mg bovines Serumalbumin (Albumin Fraktion V, fettsäurefrei, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe) mit einer geeichten Waage abgewogen und anschließend in 90ml Nanopore-Wasser gelöst. Dann wurden 1ml HEPES (Invitrogen, Darmstadt) und 10ml eines bereits hergestellten, steril filtrierten 10x Tyrode's-Puffer (10,15g NaHCO₃ (VWR International, Darmstadt), 1,95g KCL (VWR International, Darmstadt), 80g NaCl (VWR International, Darmstadt) in 1000ml Aqua dest. gelöst) hinzugegeben. Etwa 70ml des hergestellten Puffers wurden auf den pH-Wert 6,5 eingestellt (Tyrode's 6,5) - die restlichen 30ml auf einen pH von 7,4 (Tyrode's 7,4).

Für die Isolation wurde dem Spendertier intrakardial Blut abgenommen (siehe Punkt IV.2.5.1.), wobei dessen Gerinnung durch 170µl in der Spritze vorgelegtes Zitrat (aus einer S-Monovette® 3ml 9NC, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) gehemmt wurde. Im nächsten Schritt wurde das schonend in ein Plastik-Röhrchen überführte Blut mit dem vorher zubereitetem Tyrode's 6,5 auf 2ml aufgefüllt und vermengt. Es folgte ein 20-minütiger Zentrifugationsschritt bei 68xg ohne Bremse (Eppendorf centrifuge 5804, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg). Nun konnte das Plättchen-reiche Plasma (PRP) von den sich am Boden abgesetzten zellulären Bestandteilen abgehoben werden. Das PRP wurde in ein

neues Glas-Röhrchen überführt und mit Tyrode's 6,5 auf 4ml aufgefüllt. Es folgte die Färbung mit Rhodamin B: 6,5µl des Farbstoffs wurden zu dem verdünnten PRP gegeben und damit vermengt. Zur vollständigen Einwirkung des Farbstoffs erfolgte eine Inkubation von 3 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Dann wurde ein zweiter Zentrifugationsschritt von 10 Minuten, 1277xg mit Bremse gestartet. Der sich gebildete Überstand wurde verworfen und das entstandene Thrombozyten-Pellet in 4ml Tyrode's 6,5 resuspendiert. Es folgte ein dritter Zentrifugationsschritt von 10 Minuten, 1277xg mit Bremse, woraufhin der Überstand erneut verworfen wurde. Das erhaltene Thrombozyten-Pellet wurde nun in 250µl Tyrode's 6,5 gelöst und mit 250µl Tyrode's 7,4 ergänzt. Mit Hilfe eines Blutanalysegeräts konnte nun die gewonnene Thrombozytenzahl bestimmt werden.

Im Anschluss wurde die zu verwendende Portion für ein Empfängertier bestimmt, welche stets 150.000 Teilchen pro µl enthielt. Davon wurden dem Empfängertier 250µl intravenös über den zuvor angebrachten Schwanzvenenkatheter verabreicht.

4.5. Auswertung

4.5.1. Bestimmung der Flussgeschwindigkeit

Für die Bestimmung der Flussgeschwindigkeit wurden die angefertigten Videoaufnahmen mit dem Programm Cell^R (Olympus, Hamburg) bearbeitet und exportiert. Anschließend erfolgte mit Hilfe der Software VirtualDub 1.9.11 eine Umwandlung in segmentierte Videosequenzen. Mit dem Programm ImageJ (ImageJ 1.43u, National Institutes of health, USA) war nun eine Verfolgung der fließenden Zellen mit Berechnung der zurückgelegten Geschwindigkeit möglich („cell-tracking“). Aus einem Vergleich zwischen der mittleren Geschwindigkeit der prä-Aufnahmen und der post-Aufnahmen, konnte die mittlere Geschwindigkeitsreduktion in % errechnet werden.

4.5.2. Bestimmung der Leukozytenaggregationsfläche

Zur Ermittlung der Fläche der am Endothel adhärenen Leukozyten zu den Zeitpunkten 1h, 2h, 3h, 4h, 5h und 6h post Ligatur, wurden aus den angefertigten Videosequenzen repräsentative Standbilder herausgeschnitten. In die Auswertung wurden für jeden der sechs Zeitpunkte drei Bilder einbezogen.

Das Herausschneiden und die Bearbeitung der Standbilder erfolgte mit der

Software Cell[^]R (Olympus, Hamburg). Anschließend konnte die Fläche der adhärenen Leukozyten im Programm CapImage 8.6.3 berechnet werden. Die Aggregationsflächen zu den einzelnen Zeitpunkten wurden auf 1mm^2 genormt und Mittelwerte bestimmt.

4.5.3. Bestimmung der mittleren Anzahl adhärenter Thrombozyten

Um die Zahl der adhärenen Thrombozyten bestimmen zu können, wurden wie bei der Bestimmung der Leukozytenaggregationsfläche mit der Software Cell[^]R für jeden Zeitpunkt drei Standbilder aus den angefertigten Videosequenzen ausgewählt. Von diesen wurde mit der Software ImageJ jeweils ein Ausschnitt von $200\mu\text{m}^2$ ausgewählt und die adhärenen Plättchen in diesem Ausschnitt gezählt. Die Thrombozyten-Anzahl der drei Bilder zu jedem Zeitpunkt wurde gemittelt.

5. Immunhistologie

Mit Hilfe immunhistologischer Färbungen konnten die gewonnenen venösen Thromben auf ihre genaue Zusammensetzung untersucht werden. Dabei wurde in C57BL/6J- und CR2^{-/-}-Thromben die Leukozyten- und Neutrophilenanzahl (CD45-, Ly-6G-Färbung) sowie die Fläche an Thrombozyten (CD41-Färbung) ermittelt. Zusätzlich erfolgte bei C57BL/6J- und CR2^{-/-}-Thromben eine Färbung von IgG- und IgM-Molekülen im Thrombus, um deren Verteilung zu analysieren. Gleichzeitig wurde in diesen Thromben das Endothel mit Hilfe eines anti-CD31-körpers angefärbt.

5.1. Anfertigung histologischer Schnitte

Nach ihrer Entnahme wurden die, in der Vena cava caudalis eingeschlossenen, Thromben mit Tissue Tek in einem Schlauchstück eingebettet und bei -80°C gelagert (siehe Punkt IV.2.4.2.). Zum Schneiden wurden sie mit Hilfe von Tissue Tek auf dem Stempel eines Kryotoms (Cryostar NX70, Histo Service GmbH, Celle) angebracht. Bei einer Gerätetemperatur von -20°C konnten damit $5\mu\text{m}$ dünne Schnitte durch den Querschnitt des Thrombus von kranial nach kaudal angefertigt werden. Die Schnitte wurden auf einen beschichteten Objektträger (Thermo Scientific, Superfrost® Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) gezogen, beschriftet und bei -20°C gelagert.

5.2. Immunhistologische Färbungen

Die immunhistologische Färbung der zuvor angefertigten Schnitte erfolgte stets in einer lichtundurchlässigen Färbekammer, die mit Wasser gefüllt war, um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden. Vor dem Auftragen der Färbelösungen wurden die Präparate mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako Deutschland GmbH, Hamburg) umfahren, um die Lösung auf dem Präparat zu halten.

5.2.1. Ly-6G-, CD45- und CD41-Färbung

Die Ly-6G-, die CD45- und die CD41-Färbung wurden nach einem Standardfärbeprotokoll durchgeführt:

Zunächst erfolgte die Fixierung der Schnitte auf dem Objektträger mit 4%-igem Formalin (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) in Aqua dest. für 3 Minuten sowie ein anschließender 3-facher Waschschrift mit PBS (gibco® by life technologies, Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA) und 0,1% Tween (Tween® 20, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Vor der eigentlichen Färbung mussten mögliche unspezifische Bindungen am Fc-Rezeptor blockiert werden. Dies war mit einem anti-mouse CD16/32-Antikörper (affinity purified rat anti-mouse CD 16/32, Clone 93, BD Pharming, San Diego, Kalifornien, USA) in einer Verdünnung von 1:200, der zusammen mit 3% BSA (Bovines Serum Albumin, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) in PBS für 30 Minuten auf die Schnitte gegeben wurde möglich. Für die CD41-Färbung wurde der Fc-Block zusammen mit 2% Glycin (Roth, Karlsruhe) angewendet. Nach Abklopfen der Fc-Block-Lösung, konnte nun der gegen das jeweilige zu färbende Antigen gerichtete Primärantikörper (siehe Tabelle 2) aufgetragen werden. Als Isotypkontrolle wurde jeweils ein Antikörper der gleichen IgG-Klasse, welcher gegen ein irrelevantes Antigen gerichtet war, verwendet. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Schnitte gewaschen und der rot fluoreszierende Sekundärantikörper donkey anti-rat Alexa 594 (Invitrogen, Emissionsmaximum 594nm) in einer Verdünnung von 1:200 bei einer Ausgangskonzentration von 2mg/ml aufgetragen. Auch für diesen galt eine Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Im Anschluss erfolgte eine Zellkernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylidole, Dihydrochloride, Invitrogen, Damstadt) in der Verdünnung 1:3000, welche 30 Sekunden einwirken musste und bei Betrachtung unter dem Mikroskop, bei einem Emissionsmaximum von 461nm, blau fluoreszierend dargestellt werden konnte.

Nach einem weiteren Waschschrift konnte das nun vollständig gefärbte Präparat mit Eindeckmedium (Dako Fluorescent Mounting Medium, Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA) und einem Deckglas (MEDITE GmbH, Burgdorf) versehen werden.

Nach der Färbung wurden die Schnitte im Kühlschrank aufbewahrt, bis sie am Mikroskop (Leica DMRB, Firma Leica, Bensheim) mit einer Digitalkamera (AcioCam, Firma Zeiss, Göttingen) abfotografiert wurden.

Tabelle 2: Für die immunhistologischen Färbungen CD41, CD45 und Ly-6G verwendete Primärantikörper

Antigen	Antikörper	Konzentration	Verdünnung	Hersteller
CD41	rat; Klon: MWReg30	0,2mg/ml	1:25	BD Pharmingen
CD45	rat; Klon: 30-F11	0,2mg/ml	1:100	BD Pharmingen
Ly-6G	rat; Klon: 1A8	0,2mg/ml	1:500	BD Pharmingen

5.2.2. IgG-/IgM-CD31-Doppelfärbung

Zunächst wurden auch für diese Färbung die Schnitte mit Hilfe von 4%-igem Formalin auf dem Objektträger fixiert. Im Anschluss erfolgte ein 3-facher Waschschrift mit PBS und 0,1% Tween, bevor ein 30-minütiges Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit Goat-Serum (5%) (Normal goat serum ready-to-use, invitrogen cooperation, Frederick, MD, USA) erfolgen konnte. Im nächsten Schritt wurde das Goat-Serum vorsichtig abgeklopft, um den für die Endothelfärbung nötigen Primär-Antikörper anti-mouse CD31 (Anti-Mouse CD31 (PECAM-1) Functional Grade Purified, eBioscience Inc., San Diego, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:100 auftragen zu können. Nach einer Stunde Einwirkzeit, konnte ungebundener Primärantikörper in einem 3-fachen Waschschrift mit PBS und Tween entfernt werden. Direkt im Anschluss wurde, in einer Verdünnung von 1:50, der Antikörper zur Färbung von thrombuseigenem IgG oder IgM aufgetragen (Alexa Fluor® 488 Goat anti-Mouse IgG (H+L) Antibody, Life Technologies GmbH, Darmstadt; Alexa Fluor® 488 Goat anti-Mouse IgM (μ chain), Life Technologies GmbH, Darmstadt) sowie zeitgleich der gegen den CD31-Primärantikörper gerichtete, rot fluoreszierende Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 594 Goat anti-Rat IgG (H+L), Life Technologies GmbH, Darmstadt; Verdünnung 1:200) auf den Schnitt gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde, erfolgte eine 3-minütige Kern-Färbung mit 1:1000-verdünntem HOECHST (Hoechst 33342 trihydrochloride trihydrate, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Ein 3-faches Waschen mit PBS und Tween war nötig, bevor der fertig gefärbte histologische Schnitt mit einem Eindeckmedium und einem Deckglas zur Auswertung unter dem Mikroskop (Axio Imager.M2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) bereit war.

Tabelle 3: Zur immunhistologischen Doppelfärbung IgG/IgM-CD31 verwendete Antikörper

Antigen	Antikörper	Konzentration	Verdünnung	Hersteller
CD31 (PECAM-1)	Primärantikörper: rat; Klon: 390	0,2mg/ml	1:100	eBioscience
rat CD31 Primärantikörper	Sekundärantikörper: goat anti-rat Alexa Fluor® 594	2mg/ml	1:200	Life Technologies
IgG (H+L)	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG	2mg/ml	1:50	Life Technologies
IgM (μ chain)	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgM	2mg/ml	1:50	Life Technologies

5.3. Auswertung

5.3.1. Ly-6G- und CD41-Färbung

Zur Auswertung der gefärbten Schnitte wurde die Anzahl an Leukozyten, Neutrophilen und die Thrombozytenfläche herangezogen.

Die CD45-gefärbten Leukozyten sowie die Ly-6G-gefärbten Neutrophilen wurden dazu auf den erstellten Bildern manuell ausgezählt.

Für die Flächenberechnung der gefärbten Thrombozyten (CD41) wurden die aufgenommenen Fotos zunächst mit Hilfe der Software ImageJ (ImageJ 1.43u) in schwarz-weiß-Bilder umgewandelt. Diese wurden dann im Programm CapImage 8.6.3 geöffnet, mit welchem eine Flächenberechnung von Thrombozyten und des gesamten Thrombusquerschnitts möglich war. Als Ergebnis konnte der prozentuale Anteil an Thrombozyten im Verhältnis zur Gesamtfläche des Thrombus ermittelt werden.

5.3.2. IgG-/IgM-CD31-Doppelfärbung

Es sollte die Menge an IgG und IgM im Thrombus bestimmt sowie die Lokalisation dieser Immunoglobuline im gebildeten Thrombus eruiert werden.

Die gefärbten Antikörpermoleküle konnten mit Hilfe der Epifluoreszenz-Funktion des Mikroskops im Farbkanal für grüne Fluoreszenz dargestellt und abfotografiert werden. Für die weitere Auswertung mit der Software AxioVision SE65 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) wurde das grüne Fluoreszenzsignal der Antikörpermoleküle in Graustufen entsprechender Intensität umgewandelt. Das Programm konnte nun den Mittelwert dieser Grauwerte im zuvor auf die reine Thrombusfläche reduzierten Querschnitt errechnen (Einheit: Grey), wodurch die Stärke des Fluoreszenzsignals und dadurch auch die Menge an Antikörpern im Thrombus näherungsweise quantifiziert war. Um die Lokalisation der Immunoglobuline zu evaluieren, wurde die Verteilung des grün fluoreszierenden Signals im Thrombus analysiert. Die Assoziation von Antikörpern mit dem Endothel wurde genauer untersucht. Dafür wurde die mit dem Endothel assoziierte, grün fluoreszierende Fläche mit Hilfe des Programms Axio Vision eingegrenzt und, wie oben beschrieben, der Mittelwert der Grauwerte in Grey direkt am Endothel bestimmt.

6. ELISA

Zur Bestimmung der Immunoglobulinkonzentration im Blut der einzelnen Mausstämme wurden IgG- und IgM-ELISAs (enzyme linked immunosorbent assays) durchgeführt.

ELISAs laufen generell nach demselben Grundprinzip ab: In den Vertiefungen einer Well-Platte sind Primär-Antikörper gebunden, welche gegen das zu identifizierende Antigen (in diesem Fall IgG oder IgM) gerichtet sind. Wird dieses hinzugegeben, kann es binden. Ein Sekundärantikörper, welcher das Antigen ebenfalls erkennt und mit einem Enzym gekoppelt ist, wird zur Detektion hinzugegeben. Zugefügtes Substrat kann nun von dem gebundenen Enzym umgesetzt werden, was zu einem Farbumschlag führt. Die Farbintensität repräsentiert die Menge an enthaltenem Antigen in der Probe und kann photometrisch bestimmt werden.

6.1. Probengewinnung

Zur Untersuchung auf die IgG- und IgM-Konzentration im Blut wurden Serumproben der einzelnen Mausstämmen benötigt. Für die nötigen Blutproben wurde die Vena facialis punktiert und 150µl mit einer Serum-Microvette (Microvette® 100 Z, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) aufgesogen (siehe Punkt IV.2.5.2). Anschließend wurde 15 bis 30 Minuten gewartet, bis das Blut in der Microvette bei Raumtemperatur vollständig geronnen war. Nun konnten die Proben in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge (Eppendorf centrifuge 5424 R, Eppendorf AG, Hamburg) bei 1500xg 10 Minuten lang zentrifugiert werden. Man erhielt eine typische Schichtung: Unten im Gefäß sammelten sich die zellulären Bestandteile des Blutes, oben setzte sich das klare Serum ab. Dieses konnte nun in ein Eppendorf-Gefäß überführt und sofort bei -80°C eingefroren werden.

6.2. Durchführung

Zur Durchführung der ELISA-Kits (ab15127-IgG Mouse ELISA Kit abcam®; ab13307-IgM Mouse ELISA Kit abcam®; Abcam Pic, Cambridge, UK) wurden die Proben und bei -20°C gelagerte Reagenzien auf Eis aufgetaut und vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Bei den Proben sowie bei den Standardreihen wurde in einem Doppelansatz gearbeitet.

Zur Ermittlung der IgG- bzw. IgM-Konzentration mussten die Proben verdünnt werden. Für Proben von sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Mäusen wurde aufgrund der zu erwartenden niedrigen Antikörper-Konzentration eine Verdünnung von 1:12,5 gewählt. Sämtliche andere Proben wurden 1:10.000-fach verdünnt eingesetzt.

6.2.1. IgG-ELISA

Zur Herstellung der Standardreihe wurde der mitgelieferte Normal Mouse IgG Standard (1µg) in 1ml 1x Incubation Buffer (hergestellt aus einer 1:9-Verdünnung des im Kit enthaltenen 10x Blocking Buffer mit dem 1x Wasch-Puffer) vollständig gelöst (1µg/ml). In sieben Eppendorf-Gefäße wurden 150µl des 1x Incubation Buffers vorgelegt. Nun konnten 50µl des vorbereiteten Normal Mouse IgG Standards in das Gefäß Nummer 1 pipettiert werden (0,25µg/ml). Aus diesem wurden nach sorgfältigem Mischen ebenfalls 50µl entnommen und in Gefäß 2 pipettiert (0,0625µg/ml). Die Reihe wurde so fortgesetzt bis zu Gefäß 6 (0,00024µg/ml). Der Inhalt in Gefäß 7 sollte als Leerwert dienen, weshalb er ausschließlich aus 1x Incubation Buffer bestand.

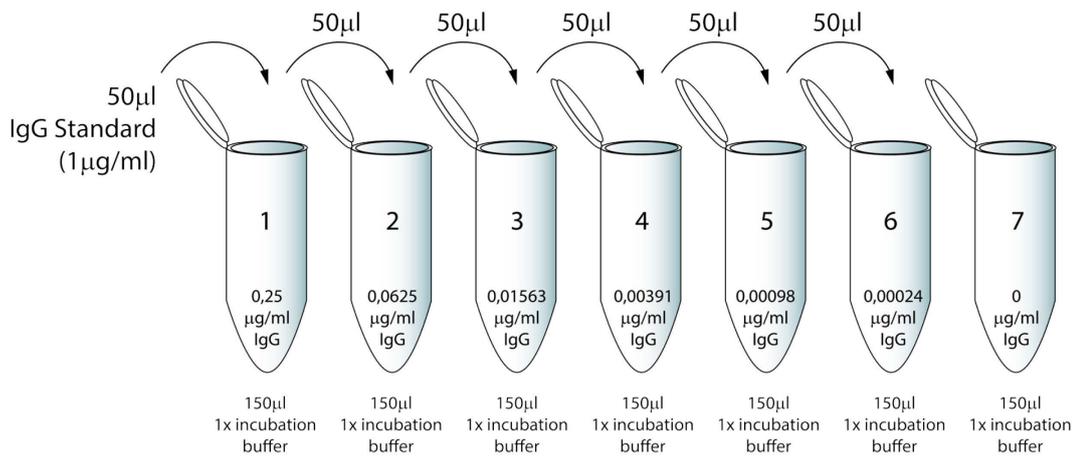


Abbildung 14: Herstellung der Standardreihe für den IgG-ELISA

Um die IgG-Konzentration der Serum-Proben bestimmen zu können, mussten diese zunächst mit 1x Incubation Buffer verdünnt werden (siehe Punkt IV.6.2.).

Von den hergestellten Proben und den acht Verdünnungsstufen der Standardreihe wurden je 50 µl in eine Vertiefung der 96-Well-Platte (IgG Mouse Microplate) pipettiert. Dann wurde die Platte abgedeckt bei Raumtemperatur für 2 Stunden auf einem ELISA-Plattenschüttler (Heidolph Duomax 1030, Heidolph Instruments, Schwabach) inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der ungebundene Inhalt der Wells komplett entleert und mit 300 µl 1x Wasch-Puffer (hergestellt aus mitgeliefertem 20x Wash Buffer und deionisiertem Wasser (aqua ad injectabilia Braun, B.Braun Melsungen AG, Melsungen)) jedes Well zwei Mal gewaschen. Nach gründlichem Entfernen des Wasch-Puffers wurden in jedes Well 50 µl 1x HRP labelled detector antibody (hergestellt als 10-fache Verdünnung des im Kit enthaltenen 10x GAM (H+L)-HRP Detector Antibody mit 1x Incubation Buffer) als Sekundärantikörper gegeben. Die abgedeckte Platte wurde erneut für 60 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf den Plattenschüttler gestellt. Nach drei anschließenden Waschschrritten, konnten jeweils 50 µl Substrat-Lösung (TMB Development Solution) in jede Vertiefung pipettiert werden. Nach 15 Minuten Einwirkzeit wurde die Reaktion mit 50 µl Stop-Lösung beendet und sofort die Absorption bei 450nm mit Hilfe eines ELISA-Readers sowie der entsprechenden Computer-Software bestimmt.

6.2.2. IgM-ELISA

Um die Standardreihe herzustellen, musste zunächst der im Kit enthaltene Maus-IgM-Standard (250ng) in 1ml 1x Assay Buffer 13 (1:9-Verdünnung aus Assay Buffer 13 Concentrate und deionisiertem Wasser) gelöst werden (250ng/ml).

Anschließend wurden jeweils 500µl 1x Assay Buffer 13 in sieben Eppendorf-Gefäßen vorgelegt. In das Gefäß Nummer 1 wurden nun 500µl des vorher gelösten Maus-IgM-Standards pipettiert und vermischt (125ng/ml). Nun wurden aus dem Gefäß Nummer 1 500µl entnommen und in das Gefäß Nummer 2 gebracht (62,5ng/ml). Auf diese Weise wurde die Reihe bis zum Gefäß 6 (3,91ng/ml) pipettiert. Das Gefäß 7 sollte als Leerwert (0ng/ml) verwendet werden und enthielt daher ausschließlich 1x Assay Buffer 13 und keinen Maus-IgM-Standard.

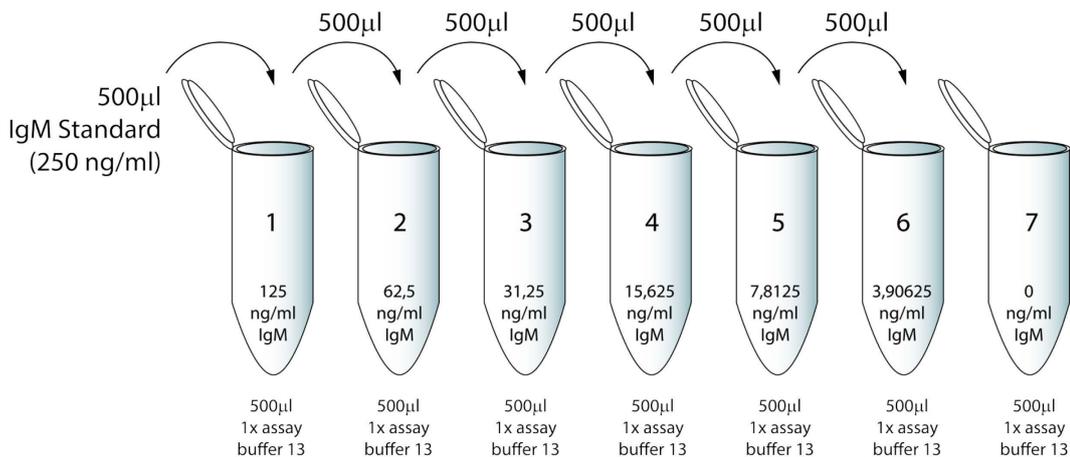


Abbildung 15: Herstellung der Standardreihe für den IgM-ELISA

Für die Bestimmung der IgM-Konzentration in den einzelnen Serum-Proben, mussten diese mit dem zuvor hergestellten 1x Assay Buffer 13 verdünnt werden (siehe Punkt IV.6.2.).

Nun konnten jeweils 50µl der hergestellten Proben und der acht Standardreihen-Verdünnungsstufen auf die 96-Well-Platte (Goat anti-mouse IgM Microplate) des ELISA-Kits aufgetragen werden. Direkt im Anschluss wurde mit 50µl Mouse IgM Horseradish Peroxidase Conjugate der enzym-gebundene Sekundäntikörper hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler, wurde der ungebundene Inhalt der Wells entleert und vier Mal mit 400µl des 1x Wasch-Puffers (hergestellt aus mitgeliefertem 20x Wash Buffer Concentrate und deionisiertem Wasser) gewaschen. Der Wasch-Puffer wurde vollständig aus den Wells entfernt, bevor im nächsten Schritt 100µl der Substrat-Lösung (TMB substrate) hineingegeben wurden. Die Substratlösung benötigte eine Einwirkzeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler, dann konnte die Reaktion mit 100µl der Stop-Lösung (stop solution 2) beendet werden.

Die Farbintensität wurde sofort im Anschluss bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Korrektur zwischen 570 und 590nm mit Hilfe eines ELISA-Readers sowie der entsprechenden Computer-Software ausgelesen.

6.3. Auswertung

Die Auswertung der ELISAs erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Readers (infinite F200, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim), welcher mit einem Computer verbunden war. Mit Hilfe der Software i-control 1.9 (2011, Tecan Austria GmbH) konnte die Absorption der sich entwickelten Farbe ausgelesen werden.

Die weitere Auswertung der erhaltenen Werte erfolgte mit der Software ReaderFit (Hitachi Solutions America, Ltd.). Die ausgelesenen Absorptions-Werte der Standardreihe konnten gegen ihre bekannte Konzentration an IgG- bzw. IgM-Standard aufgetragen werden. Man erhielt eine Kurve, anhand welcher nun die passenden Konzentrationen zu den ermittelten Absorptionswerten der Proben abgelesen sowie berechnet werden konnten.

7. Antikörperklassen und Antikörperfragmente

In einigen Versuchsreihen sollte die Bedeutung einzelner Antikörperklassen und das Bindungsverhalten von Antikörpermolekülen in der Entstehung der venösen Thrombose genauer untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde Tieren des Antikörper-defizienten Mausstamms sIgM^{-/-}AID^{-/-} unmittelbar vor der Operation zur Stenosierung der Vena cava caudalis die entsprechenden Antikörper bzw. Antikörperfragmente intravenös über die Schwanzvene (siehe Punkt IV.2.3.) verabreicht. Pro Maus wurden 0,6mg der jeweiligen Antikörper-Formulierung, gelöst in 200µl PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), injiziert.

7.1. Gepooltes polyklonales IgG und IgA

Die verwendeten murinen gepoolten polyklonalen Antikörper bestanden größtenteils aus IgG, enthielten aber auch geringe Mengen IgA (Mouse Gamma Globulin, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA). Mit Hilfe dieser Antikörper sollte überprüft werden, ob Antikörper allgemein in der Lage sind eine venöse Thrombose zu induzieren.

Das Ausgangsprodukt lag in einer Konzentration von 11,2mg/ml vor. Für eine

Applikation von 0,6mg pro Maus wurden davon 54 μ l entnommen und in 146 μ l PBS gelöst.

7.2. Monoklonales anti-gp120 IgG

Monoklonales anti-gp120 IgG (InVivoMAb anti gp120, BioXCell, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln) ist ein Antikörper, welcher gegen das Glykoprotein 120 auf der Oberfläche des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) gerichtet ist. Dieses IgG1 wurde als Modell für einen Antikörper verwendet, welcher in der Maus mangels des HI-Virus kein Antigen binden kann. Es sollte untersucht werden, ob dieses reine, nicht spezifisch gebundene IgG dennoch in der Lage ist die venöse Thrombose zu induzieren.

125 μ l des anti-gp120 IgG, mit einer Ausgangskonzentration von 4,79mg/ml, wurden mit 75 μ l PBS verdünnt. Dadurch entstand die Dosis für eine Maus mit einer Konzentration von 0,6mg pro 200 μ l.

7.3. Monoklonales anti-Influenza-Virus IgG

Das anti-Influenza-Virus IgG (InVivoMAb anti Influenza A, np, BioXCell, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln) wurde als Modell für einen weiteren in der Maus allenfalls unspezifisch bindenden Antikörper verwendet. Dabei handelte es sich um einen IgG2a-Isotyp, der gegen das Nukleoprotein (NP) des Influenza-A-Virus gerichtet ist.

Der gelieferte Antikörper lag in einer Konzentration von 5,65mg/ml vor. Um eine Konzentration von 0,6mg in 200 μ l zu erhalten, wurden davon 94 μ l in 106 μ l PBS gelöst.

7.4. Fc-Fragmente

Einzelne Fc-Fragmente (InVivoMAb recombinant Mouse Fc-G2a BioXCell, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln) wurden mit der Intention verabreicht, eine Kontrollgruppe zu generieren, welche durch das Fehlen von Fab-Fragmenten nicht in der Lage ist spezifisch oder unspezifisch an Antigene zu binden.

Die Ausgangskonzentration betrug 7,71mg/ml. Auch hier wurde mit einer Konzentration von 0,6mg/200 μ l gearbeitet. Deshalb wurden 78 μ l mit 122 μ l PBS verdünnt.

8. Versuchsplanung und Durchführung

8.1. Tierzahl

Insgesamt wurden für sämtliche durchgeführte Versuche dieser Arbeit 176 Tiere benötigt. Diese waren mindestens 9 und maximal 25 Wochen alt. Operiert wurden nur Mäuse, welche ein Körpergewicht von mehr als 20g hatten. Tiere, die während der Operation eine Blutung erlitten, wurden aus dem Versuch genommen und euthanasiert. Ebenso wurde mit Tieren verfahren, welche bei einem chronischen Versuch von 48h die streng definierten Abbruchkriterien des Score-Sheets aufwiesen (siehe Punkt IV.1.5.3.).

8.2. Dokumentation

Für jeden durchgeführten Versuch an einem Tier wurde ein Versuchsprotokoll angefertigt. In diesem wurden der Ablauf der Operation sowie Daten des Tieres (Stamm, Geburtsdatum, Geschlecht, Tiernummer) und angewendete Betäubungsmittel dokumentiert. Außerdem wurde in einem speziell auf den Versuch zugeschnittenen Score-Sheet die Belastung von Tieren in einem chronischen Versuch von 48h aufgezeichnet (siehe Punkt IV.1.5.3.).

8.3. Versuchsgruppen

8.3.1. Standardisierung

Tabelle 4: Versuchsgruppen zur Standardisierung des Stenose-Mausmodells

Parameter	Stamm	Anzahl und Geschlecht	mittleres Körpergewicht	Alter (Wochen)
Flussgeschwindigkeit	C57BL/6J	6m, 7w	24,52g	15 bis 18
Leergewicht	C57BL/6J	4m, 4w	26,22g	15 bis 21
Thrombusinzidenz	C57BL/6J	8m, 8w	23,15g	16 bis 19
Sham-Operation	C57BL/6J	3m, 4w	26,25g	14 bis 20

8.3.2. Chronische Versuche zur Bestimmung von Thrombusgewicht und –inzidenz

Tabelle 5: Versuchsgruppen zur Bestimmung von Thrombusgewicht und Inzidenz nach 48h

Stamm		Anzahl und Geschlecht	mittleres Körpergewicht	Alter (Wochen)
WT	C57BL/6J	6m, 2w	24,48g	10 bis 19
KO	AID ^{-/-}	4m, 2w	23,27g	20 bis 23

KO	sIgM ^{-/-}	8m	26,36g	14 bis 22
KO	sIgM ^{-/-} AID ^{-/-}	6m, 2w	23,45g	9 bis 20
KO	sIgM ^{-/-} AID ^{-/-} +Fc-Fragment	4m, 3w	24,98g	12 bis 20
KO	sIgM ^{-/-} AID ^{-/-} +polyklonales IgG/IgA	9m, 1w	27,29g	11 bis 22
KO	sIgM ^{-/-} AID ^{-/-} +anti-gp120-IgG	4w, 4m	24,46g	11 bis 20
KO	sIgM ^{-/-} AID ^{-/-} +anti-Influenza-IgG	9m, 1w	24,81g	12 bis 16
WT	C57BL/6J	6m	29,12g	10 bis 18
KO	FcγR ^{-/-} FcRIIb ^{-/-}	6m	28,85g	14
WT	C57BL/6J	4m, 6w	25,80g	13 bis 22
KO	CR2 ^{-/-}	3m, 8w	25,54g	11 bis 18

8.3.3. Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung

Tabelle 6: Versuchsgruppen zur intravitalmikroskopischen Analyse der Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung in den ersten 6h nach Ligatur der Vena cava caudalis im Mausmodell

Stamm		Anzahl und Geschlecht	mittleres Körpergewicht	Alter (Wochen)
WT	C57BL/6J	4m, 6w	25,28g	13 bis 21
KO	sIgM ^{-/-} AID ^{-/-}	3m, 5w	23,25g	13 bis 22

8.3.4. Thrombelastometrie

Tabelle 7: Versuchsgruppen zur Analyse der Blutgerinnung mittels Thrombelastometrie

Stamm		Anzahl	Alter (Wochen)
WT	C57BL/6J	7	11 bis 14
KO	sIgM ^{-/-} AID ^{-/-}	5	10 bis 25
KO	CR2 ^{-/-}	4	10 bis 16

9. Statistische Auswertung

Da die Beteiligung von Antikörpern in der Entstehung der TVT zuvor noch nie untersucht wurde, handelte es sich um eine Orientierungsstudie. In erster Linie war dabei das Ziel, hinweisende biologisch relevante Zusammenhänge aufzudecken, auch wenn diese nicht statistisch signifikant waren.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc., Erkrath). Dabei wurden generell Ergebnisse mit einem p-Wert von $\leq 0,05$ als statistisch signifikant angenommen. Vor der Durchführung eines statistischen Tests auf signifikante Unterschiede, ermittelte das Programm mit dem Shapiro-Wilk-Test die Normalverteilung der Daten. War diese gegeben, wurde bei einem Vergleich von einer Gruppe zu ihrer Kontrollgruppe der t-Test angewendet. Lag keine Normalverteilung vor, wurde statt dem t-Test auf den Man-Whitney-U-Test zurückgegriffen.

Wurden mehrere Gruppen gegen eine Kontrollgruppe verglichen, fand im Anschluss an die jeweiligen t-Tests bzw. Man-Whitney-U-Tests eine Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Holm statt. Somit wurde je nach Anzahl der mit der Kontrollgruppe verglichenen Gruppen, nicht mehr bei $p \leq 0,05$ von einer statistischen Signifikanz ausgegangen, sondern erst ab dem jeweiligen angeglichenen Signifikanzniveau. Dies bedeutete für eine gegen die Kontrolle verglichene Gruppenanzahl von 2 eine statistische Signifikanz des kleineren p-Werts bei 0,025 und des größeren p-Werts bei 0,05. Bei einer Gruppengröße von 3 war eine statistische Signifikanz des kleinsten p-Werts bei 0,01667, des mittleren p-Werts bei 0,025 und des größten p-Werts bei 0,05 gegeben. Für eine Gruppengröße von 5 wurde für den kleinsten p-Wert ein statistisch signifikanter Unterschied ab 0,01, für den nächst größeren ab 0,0125, für den dritt größten ab 0,01667, für den viert größten ab 0,025 und für den größten ab 0,05 angenommen. In den Grafiken wurden die gegen eine Kontrollgruppe verglichenen Gruppen dabei, passend zum Inhalt des Abschnitts, teilweise getrennt voneinander dargestellt (siehe Abbildung 18, Abbildung 20, Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 25, Abbildung 28, Abbildung 30, Abbildung 31, Abbildung 32).

Neben Überprüfung der Signifikanz der Daten, fand auch eine Berechnung der Effektgröße Cohen's d des jeweilig festgestellten Unterschieds zur

Kontrollgruppe statt. Dies erfolgte mit Hilfe eines Effect Size Calculators in Microsoft Excel 2010²¹⁵. Anhand der Effektgröße konnte die Stärke des Effekts des ermittelten Unterschieds definiert werden: Werte unter 0,2 wurden als vernachlässigbarer Effekt eingestuft, Werte $\geq 0,2$ als schwacher Effekt, Werte $\geq 0,5$ als mittel-starker Effekt und Werte $\geq 0,8$ als besonders große Effekte²¹⁵.

Zusätzlich wurde die Korrelation zwischen Thrombusgewicht und Antikörpermenge in drei Antikörper-Knockout- sowie in C57BL/6J-Mäusen überprüft (siehe Punkt V.2.1.). Nach der Bestätigung der Normalverteilung der Daten mittels Shapiro-Wilk-Test, erfolgte dies über die Ermittlung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r) mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2010. R kann Werte von -1 bis +1 annehmen. Bei $r > 0$ liegen positive Zusammenhänge vor, bei $r < 0$ negative. Während für Werte, die sich 0 annähern von einem schwachen linearen Zusammenhang ausgegangen wird, sprechen sich der +1 oder der -1 annähernde Werte für einen hohen linearen Zusammenhang der untersuchten Parameter. Zur Darstellung in der Grafik wurde der Korrelationskoeffizient r quadriert als Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben.

V. ERGEBNISSE

1. Standardisierung des venöse-Thrombose-Mausmodells

Ziel dieser Arbeit ist es, die Beteiligung von Antikörpern im Geschehen der TVT zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde das oben beschriebene Stenose-Mausmodell in der Vena cava caudalis herangezogen (siehe Punkt II.1.5.2. und IV.2.4.1.). Für eine optimale Arbeitsgrundlage musste dieses Modell zunächst standardisiert werden, um konsistente und vergleichbare Daten zu erhalten.

1.1. Flussgeschwindigkeit

Mit Hilfe der stenosierenden Ligatur der Vena cava caudalis soll eine Reduktion des Blutflusses um 70 bis 80% erfolgen, um eine optimale und immer gleiche Ausgangslage für die Erzeugung venöser Thromben in der Maus zu erhalten.

Für die Standardisierung der Blutflussreduktion wurden im Rahmen dieser Arbeit 13 Mäuse des Wildtypstamms C57BL/6J mittels Intravitalmikroskopie auf die Blutflussgeschwindigkeit vor und nach Ligatur der Vena cava caudalis untersucht. Die Auswertung ergab eine mittlere Reduktion der Flussgeschwindigkeit um $73,91\% \pm 6,72\%$. Bei einer mittleren Flussgeschwindigkeit von $0,49\text{mm/s} \pm 0,13\text{mm/s}$ vor der Ligatur, war diese mit $0,12\text{mm/s} \pm 0,03\text{mm/s}$ nach der Ligatur signifikant ($p < 0,001$) langsamer.

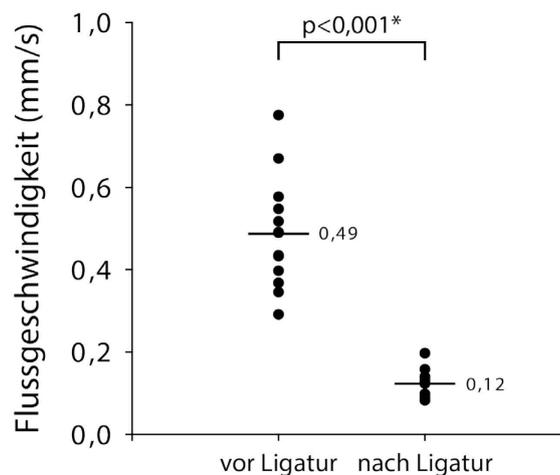


Abbildung 16: Vergleich der Blutflussgeschwindigkeit vor und nach Ligatur der Vena cava caudalis; Querbalken $\hat{=}$ Mittelwert; prä und post jeweils $n=13$; *=statistisch signifikantes Ergebnis

1.2. Leergewicht

Zur Ermittlung des reinen Thrombusgewichts musste das Gewicht der angelagerten Gefäße, des Ligaturfadens und des zum Wiegen nötigen Filterpapiers (=Leergewicht) vom Gesamtgewicht abgezogen werden.

Die Ermittlung dieses Leergewichts erfolgte durch Stenosierung der Vena cava caudalis und unmittelbar anschließender Entblutung von 8 C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen. Die entnommenen „leeren“ Gefäße mit den beiden Ligaturen wurden auf einem Filterpapierzuschnitt gewogen. Dies ergab ein mittleres Leergewicht von 6,84mg. Als Standard-Leergewicht wurde dieses bei jedem in dieser Arbeit entstandenen Thrombus vom Gesamtgewicht abgezogen, um das reine Thrombusgewicht zu erhalten.

1.3. Thrombusinzidenz

Selbst bei Wildtyp-Tieren entstehen im angewendeten Modell nicht immer Thromben. Um eine Einschätzung der Standard-Thrombusinzidenz für das Mausmodell zu erhalten, wurden 16 Mäuse des Wildtypstamms C57BL/6J herangezogen und bezüglich Inzidenz und Gewicht der Thromben untersucht. 10 von 16 Tieren entwickelten einen Thrombus, 6 blieben „leer“, was einer mittleren Thrombusinzidenz von 62,5% entspricht. Das Thrombusgewicht betrug im Mittel 7,29mg.

1.4. Sham-Operation

Mit Hilfe von 7 Sham-operierten C57BL/6J-Wildtyp-Tieren sollte überprüft werden, ob durch die Operationsmethode an sich eine Endothelläsion erfolgt, welche eine Thrombusbildung nach sich zieht. Keines der operierten Tiere entwickelte einen Thrombus in der Vena cava caudalis, was zeigt, dass im verwendeten Mausmodell die Blutflussreduktion und nicht etwa eine Endothelschädigung den Auslöser der TVT darstellt. Eine Standardisierung bezüglich des Mechanismus der Thrombusentstehung ist demnach gegeben.

2. Präventiver Effekt der Antikörperdefizienz auf die Bildung venöser Thromben im Mausmodell

Mit dem Ziel eine mögliche Bedeutung von Antikörpern im immunologischen Geschehen der TVT zu analysieren, wurden verschiedene Mausstämme mit genetisch veränderter Antikörperproduktion hinsichtlich der Bildung venöser

Thromben untersucht. Zu diesem Zweck wurde das Stenose-Mausmodell verwendet und die Thrombusbildung nach 48h beurteilt.

2.1. Effekt der Antikörperdefizienz auf die venöse Thrombose

Um herauszufinden, ob generell die Anwesenheit von Antikörpern für die Ausbildung venöser Thromben relevant ist, wurden zunächst die Antikörper-Knockout-Mausstämme $sIgM^{-/-}$, $AID^{-/-}$ und $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ mit C57BL/6J-Wildtyp-Tieren bezüglich Thrombusgewicht und -inzidenz verglichen. Dabei sollte auch ein Vergleich des Einflusses unterschiedlicher Immunglobulinklassen erfolgen.

Die Analyse der Thrombusbildung nach 48h ergab für die Wildtyp-Kontrollgruppe (n=8) ein mittleres Thrombusgewicht von 9,85mg, bei einer Thrombusinzidenz von 62,50%, was dem Auftreten eines Thrombus bei 5 von 8 Tieren entsprach.

$sIgM^{-/-}$ -Mäuse zeigten mit 6,66mg ein um 32,34% niedrigeres mittleres Thrombusgewicht, als die Kontrollgruppe (p=0,505). 3 der 8 Tiere entwickelten einen Thrombus, was eine Thrombusinzidenz von 37,50% ergab. Die Effektgröße dieses Unterschieds im Thrombusgewicht war bedingt durch die hohe individuelle Variabilität mit 0,35 gering.

Von den 6 untersuchten $AID^{-/-}$ -Mäusen entwickelten bis auf eines alle Tiere einen venösen Thrombus. Die Inzidenz lag damit bei 83,33%, bei einem, verglichen mit der Kontrollgruppe, um 45,99% höherem und damit nahezu verdoppeltem mittleren Thrombusgewicht von 18,23mg. Der beobachtete Effekt des $AID^{-/-}$ -Knockouts war dadurch relativ stark, was sich in einer hohen Effektgröße von 0,86 äußerte, sich mit einem p-Wert von 0,139 allerdings mit der verwendeten Tierzahl nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterschied.

Im Vergleich dazu trat nur bei einem von 8 operierten $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Mäusen eine Thrombusbildung auf, was einer sehr geringen Inzidenz von 14,29% entsprach. Das ermittelte mittlere Thrombusgewicht von nur 0,98mg war im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe mit einem relativen Unterschied von 90,10% und einer sehr großen Effektgröße von 1,41 signifikant (p=0,013) niedriger.

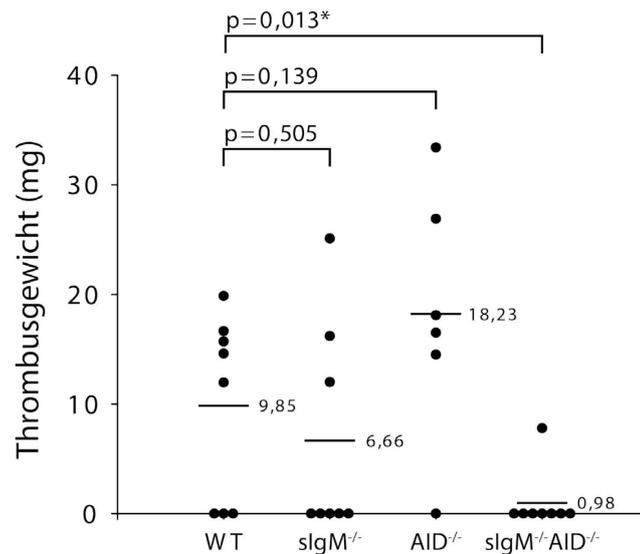


Abbildung 17: Vergleich von Thrombusgewicht und -inzidenz verschiedener Antikörper-Knockout-Mausstämme (sIgM^{-/-}: n=8; AID^{-/-}: n=6; sIgM^{-/-}AID^{-/-}: n=8) zu einer Wildtyp-Kontrollgruppe (n=8); Querbalken $\hat{=}$ Mittelwert; *=statistisch signifikantes Ergebnis des mittleren Thrombusgewichts nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 3 Gruppen

Tabelle 8: Übersicht des relativen Unterschieds im Thrombusgewicht der Antikörper-Knockout-Mausstämme zum C57BL/6J-Wildtyp-Stamm sowie der zugehörigen Effektgröße

Knockout-Mausstamm	Relativer Unterschied des Thrombusgewichts zum Wildtyp	Effektgröße
sIgM ^{-/-}	32,34%	0,35
AID ^{-/-}	45,99%	0,86
sIgM ^{-/-} AID ^{-/-}	90,10%	1,41

Im Folgenden wurden die Ergebnisse der Thrombusbildung in den Antikörper-Knockout-Mausstämmen sIgM^{-/-}, AID^{-/-} und sIgM^{-/-}AID^{-/-} mit den Antikörper-Serumspiegeln dieser Mauslinien in Zusammenhang gebracht, um die Bedeutung von IgG und IgM für die Thrombusbildung zu untersuchen. Zu diesem Zweck erfolgte eine Analyse der IgG- und IgM-Serumkonzentration mittels ELISA.

C57BL/6J-Wildtyp-Mäuse zeigten eine mittlere IgG-Konzentration von 0,889±0,155mg/ml Serum und eine mittlere IgM-Konzentration von 0,598±0,102mg/ml Serum.

Im Mausstamm mit komplettem Antikörper-Knockout (sIgM^{-/-}AID^{-/-}) waren konsequenterweise kaum Antikörper vorhanden: Der mittlere IgG-Serumspiegel von 0,0011±0,0004mg/ml wie auch der mittlere IgM-Serumspiegel von 0,0014±0,001mg/ml lag weit unter den jeweilig ermittelten Serumkonzentrationen von Wildtyp-Mäusen (IgG: p<0,001; IgM: p<0,001).

AID^{-/-}-Mäuse haben bedingt durch den Knockout die Fähigkeit zum Klassenwechsel verloren. Deshalb war ihre sehr niedrige IgG-Serumkonzentration von $0,0028 \pm 0,0001 \text{ mg/ml}$ nicht überraschend. Dagegen lag die IgM-Serumkonzentration mit $0,880 \pm 0,061 \text{ mg/ml}$, einem relativen Unterschied von 31,95% und einer extrem hohen Effektgröße von 3,34, signifikant über dem physiologischen Niveau der Wildtyp-Kontrollgruppe ($p=0,015$). Dieses Phänomen ist bereits als Hyper-IgM Phänotyp publiziert⁹⁹ und eine mögliche Erklärung für die erhöhte Thromboserate in diesem Mausstamm.

sIgM^{-/-}-Mäuse zeigten mit $0,0001 \pm 0,00001 \text{ mg IgM/ml}$ Serum erwartungsgemäß, dass sie nahezu keine IgM besitzen. Der IgG-Spiegel hingegen war mit $1,565 \pm 0,210 \text{ mg/ml}$ Serum und einem relativen Unterschied von 43,19% mit einer extrem hohen Effektgröße von 3,67 überraschenderweise signifikant höher, als der der Wildtyp-Kontrollgruppe ($p=0,011$).

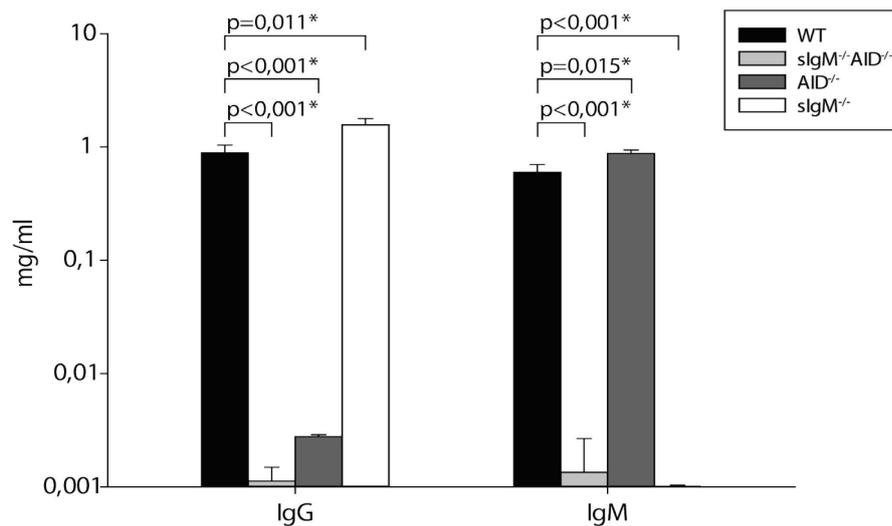


Abbildung 18: Mittelwerte der IgG- und IgM-Serumkonzentrationen in den verschiedenen Antikörper-Knockout-Mausstämmen (jeweils n=3) verglichen mit der C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=3); Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung; *=statistisch signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 5 Gruppen

Tabelle 9: Übersicht des relativen Unterschieds der IgG- und IgM-Serumkonzentration der Antikörper-Knockout Mausstämmen zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen

Knockout-Mausstamm	Relativer Unterschied des Antikörpergehalts zum Wildtyp		Effektgröße	
	IgG	IgM	IgG	IgM
sIgM ^{-/-} AID ^{-/-}	-99,87%	-99,77%	8,13	8,26
AID ^{-/-}	-99,69%	31,95%	8,11	3,34
sIgM ^{-/-}	43,19%	-99,98%	3,67	8,28

Ausgehend von dem bekannten Thrombusgewicht sowie der bekannten Antikörperkonzentration in den einzelnen Antikörper-Knockout-Mausstämmen, konnte nun überprüft werden, inwiefern diese Parameter miteinander korrelieren. Dabei wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) für die mittlere IgG-, die mittlere IgM-, oder die mittlere Gesamt-Antikörpermenge und das jeweilige mittlere Thrombusgewicht bestimmt. Dieser ergab für die IgG- wie auch für die Gesamt-Antikörpermenge eine schwache, nicht statistisch signifikante Korrelation mit dem Thrombusgewicht mit Werten von $r=-0,1654$ für die IgG-Konzentration ($p=0,833$) und $r=0,3845$ für die Gesamt-Antikörpermenge ($p=0,617$). Einzig für die IgM-Konzentration konnte ein starker Zusammenhang mit dem Thrombusgewicht errechnet werden, was sich in einem Korrelationskoeffizient von $r=0,9138$ äußerte. Dieser konnte in das Bestimmtheitsmaß R^2 von $0,8351$ umgerechnet werden, was darauf hindeutet, dass die venöse Thrombusbildung maßgeblich von der IgM-Serumkonzentration bestimmt werden kann. Aufgrund der geringen Gruppengröße war dieses Ergebnis jedoch mit einem p -Wert von $0,086$ nicht statistisch signifikant.

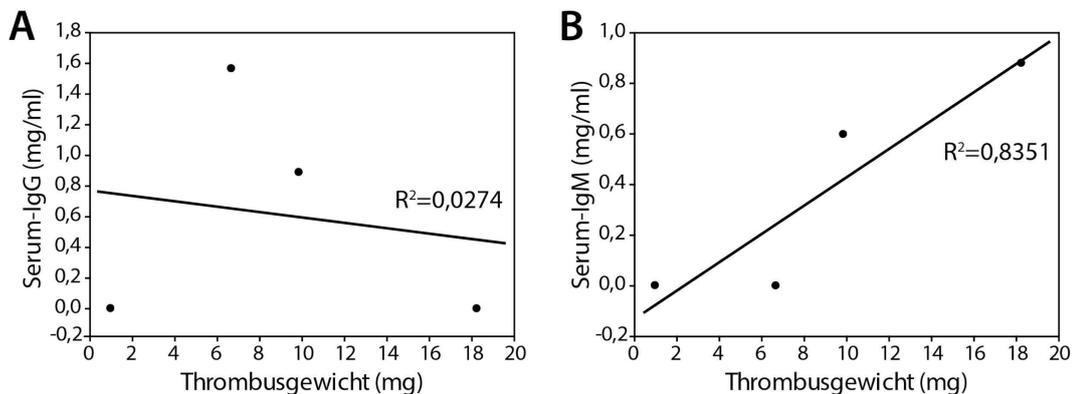


Abbildung 19: Korrelation der mittleren IgG- bzw. IgM-Konzentration im Serum der drei Antikörper-Knockout-Mausstämmen $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$, $sIgM^{-/-}$ und $AID^{-/-}$ sowie der C57BL/6J-Wildtypgruppe mit den jeweilig ermittelten mittleren Thrombusgewichten

A) Abhängigkeit des Serum-IgG-Gehalts vom Thrombusgewicht; R^2 =Bestimmtheitsmaß

B) Abhängigkeit des Serum-IgM-Gehalts vom Thrombusgewicht; R^2 =Bestimmtheitsmaß

Zusätzlich konnte mit Hilfe von IgG- und IgM-ELISAs aus dem Serum von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen 48h nach Ligatur der Vena cava caudalis ($n=3$) ein weiterer Hinweis gewonnen werden, der auf eine stärkere Beteiligung von IgM im Geschehen der venösen Thrombose hindeutet: Im Vergleich zum basalen IgM-Serumspiegel in C57BL/6J-Mäusen ($0,598 \pm 0,102$ mg/ml), war dieser 48h nach Stenosierung der Vena cava caudalis mit einem mittleren Wert von

0,275±0,0618mg/ml signifikant reduziert ($p=0,009$). Der relative Unterschied betrug 45,99% mit einer extrem hohen Effektgröße von 3,83. Im Gegensatz dazu konnte ein solcher Effekt für IgG-Moleküle nicht gefunden werden. Hier betrug die mittlere Serumkonzentration 48h post Ligatur 0,806±0,3836mg/ml und war deshalb annähernd identisch zu den basalen IgG-Spiegeln von 0,889±0,155mg/ml Serum ($p=0,746$). Dieses Ergebnis ist hinweisend dafür, dass IgM-Moleküle durch den Prozess der TVT aus der Zirkulation entfernt und möglicherweise an die Stelle des sich entwickelnden Thrombus rekrutiert werden.

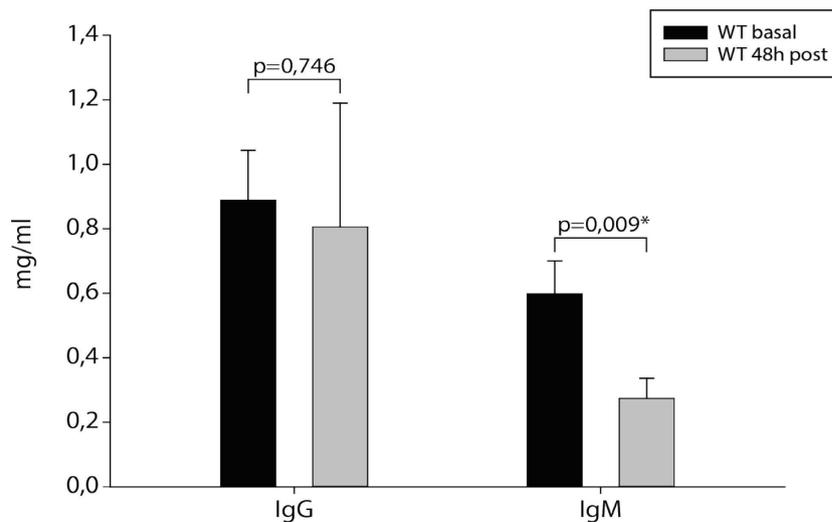


Abbildung 20: Mittelwerte der IgG- und IgM-Serumkonzentrationen einer C57BL/6J-Wildtyp-Gruppe (n=3) 48h nach Ligatur der Vena cava caudalis, verglichen mit den basalen Werten der C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=3); *=statistisch signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 5 Gruppen; Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung

Tabelle 10: Übersicht des relativen Unterschieds der IgG- und IgM-Serumkonzentration des C57BL/6J-Wildtypstammes 48h post Ligatur zum basalen Wert des C57BL/6J-Wildtypstammes sowie der zugehörigen Effektgrößen

Mausstamm	Relativer Unterschied des Antikörpergehalts zum basalen Wert des Wildtyps		Effektgröße	
	IgG	IgM	IgG	IgM
C57BL/6J 48h post Ligatur	-9,34%	-45,99%	0,28	3,83

Die Möglichkeit einer Knockout-bedingten Veränderung des Blutbilds, welche die Ausbildung venöser Thromben in $sIgM^{-/-}$, $AID^{-/-}$ und $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Mäusen beeinflussen könnte, wurde mit Hilfe der Anfertigung von Blutbildern eruiert. Dabei wurden die Werte folgender, für die Initiierung der venösen Thrombose relevanter, Parameter untersucht: Die Anzahl weißer Blutzellen (WBC), die Plättchenanzahl (Plt) sowie im Differentialblutbild die Lymphozyten-,

Granulozyten- und Monozyten-Anzahl (LYM, GRA, MON).

In sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Mäusen (n=5) konnte im Vergleich zur C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=11) eine signifikante Erhöhung der Anzahl weißer Blutzellen um 41,81% mit einer sehr großen Effektgröße von 2,01 festgestellt werden (p=0,005). Dies äußerte sich im Differentialblutbild in einer signifikanten Erhöhung aller Leukozytensubpopulationen mit sehr hohen Effektgrößen (siehe Tabelle 11). Die Anzahl an Blutplättchen war in der sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Gruppe mit einem absoluten Wert von 608,60±98,20, verglichen mit den 741,09±118,50 Plättchen des Wildtyps, um 17,88% und einer sehr großen Effektgröße von 1,17 vermindert, was sich jedoch nach einer Bonferroni-Holm-Adjustierung als nicht statistisch signifikant darstellte (p=0,041; Signifikant erst bei p<0,0125).

Auch in AID^{-/-}-Mäusen (n=3) konnte eine Verminderung der Plättchenanzahl mit einer sehr hohen Effektgröße von 1,29 im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Jedoch war auch diese nicht statistisch signifikant (p=0,070). Die Zahl weißer Blutzellen war um 26,32% und einer Effektgröße von 1,61 erhöht, was durch eine signifikant höhere Anzahl an Monozyten (p=0,008) mit einer extrem hohen Effektgröße von 6,40 sowie moderat erhöhten Lymphozyten- (p=0,273) und stärker erhöhten Granulozytenzahlen (p=0,040; nach Bonferroni-Holm-Adjustierung erst bei p<0,025 statistisch signifikant) bedingt war.

sIgM^{-/-}-Tiere (n=5) zeigten dagegen eine um 14,15% geringere Anzahl an weißen Blutzellen, als die Wildtyp-Kontrollgruppe (p=0,099). Dies war bedingt durch eine Erniedrigung von Lymphozyten und Granulozyten: Dabei unterschieden sich die Lymphozyten mit 16,83% und einer hohen Effektgröße von 0,81 nicht signifikant vom Wildtyp (p=0,078). Ähnlich verhielt es sich für die Granulozytenanzahl: Diese war trotz eines relativen Unterschieds von 26,67% und einer sehr hohen Effektgröße von 1,26 nicht statistisch signifikant vermindert (p=0,027; nach Bonferroni-Holm-Adjustierung erst bei p<0,01667 statistisch signifikant). Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Erhöhung der Monozytenanzahl um 54,55% festgestellt werden (p=0,012). Die Anzahl an Blutplättchen lag in sIgM^{-/-}-Tieren mit einem relativen Unterschied von 22,38% und einer sehr hohen Effektgröße von 1,62 signifikant unter der Wildtypkontrollgruppe (p=0,003).

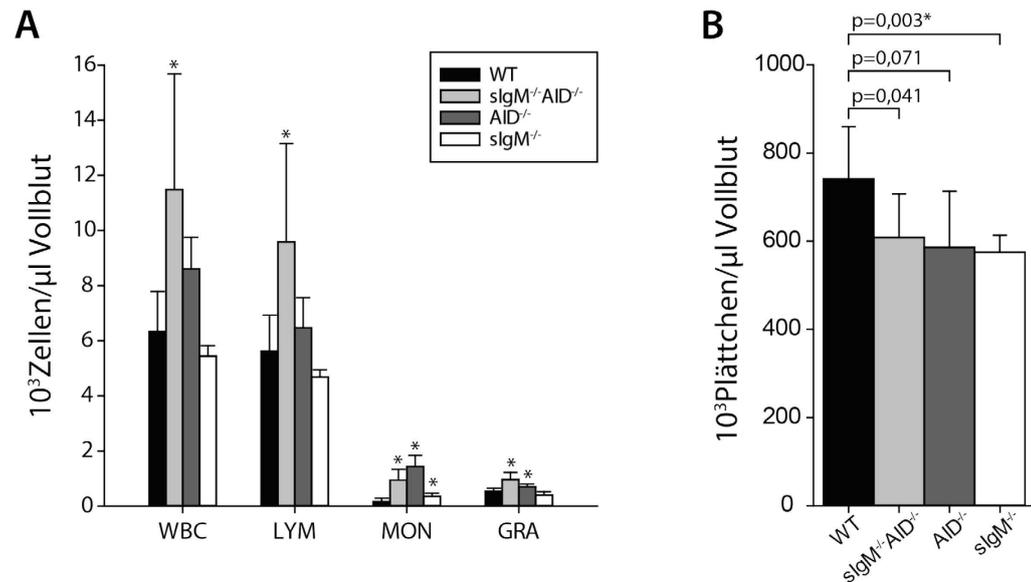


Abbildung 21: Blutbild der verschiedenen Antikörper-Knockout-Mausstämme (sIgM^{-/-}AID^{-/-}: n=5; sIgM^{-/-}: n=5; AID^{-/-}: n=3) im Vergleich zu einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=11)

- A) Anzahl weißer Blutzellen im Vollblut und Differentialblutbild (Mittelwerte); Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung; *=statistisch signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 5 Gruppen
- B) Anzahl an Blutplättchen im Vollblut (Mittelwerte); Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung; *=statistisch signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 5 Gruppen

Tabelle 11: Übersicht des relativen Unterschieds im Blutbild der Antikörper-Knockout Mausstämme zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen

Mausstamm	Relativer Unterschied zum Blutbild des Wildtyps in %					Effektgröße				
	WBC	LYM	MON	GRA	Plt	WBC	LYM	MON	GRA	Plt
sIgM ^{-/-}	-14,2	-16,8	54,55	-26,7	-22,4	0,72	0,81	1,56	1,26	1,62
AID ^{-/-}	26,32	12,98	88,58	22,08	-20,9	1,61	0,66	6,4	1,5	1,29
sIgM ^{-/-} AID ^{-/-}	44,81	41,26	82,59	43,18	-17,9	2,01	1,79	3,34	2,52	1,17

2.2. Evaluierung des thrombogenen Effekts von Antikörpern bei venöser Thrombose

Die Verifizierung des thrombogenen Effekts von Antikörpern im Geschehen der venösen Thrombose erfolgte durch die Rekonstitution von sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Mäusen mit gepoolten Antikörpern aus Wildtyp-Tieren.

Dazu wurde jedem Tier (n=10) dieses komplett Antikörper-defizienten Mausstamms direkt vor der Operation zur Stenosierung der Vena cava caudalis 0,6mg an murinem, gepooltem, polyklonalem IgG mit geringen Mengen IgA intravenös verabreicht.

Die anschließende Ermittlung der Thrombusbildung in dieser Versuchsgruppe über einen Zeitraum von 48h ergab ein mittleres Thrombusgewicht von 5,67mg, bei einer Inzidenz von 50,00%.

Als Kontrollgruppe diente hier eine lediglich mit Fc-Fragmenten (0,6mg/Maus) substituierte $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Gruppe, bestehend aus 7 Tieren. Hier entwickelte 1 von 7 Tieren einen Thrombus (14,29%) mit einem mittleren Gewicht von nur 0,69mg. Verglichen zu dieser ergab sich bezüglich der Thrombusbildung ein deutlicher relativer Unterschied von 87,91% mit einer hohen Effektgröße von 0,84, welcher allerdings mit der verwendeten Tierzahl als nicht statistisch signifikant errechnet wurde ($p=0,098$). Anhand des starken Effekts, kann dennoch geschlussfolgert werden, dass die Substitution mit Antikörpern zum Wiederauftreten venöser Thromben führt.

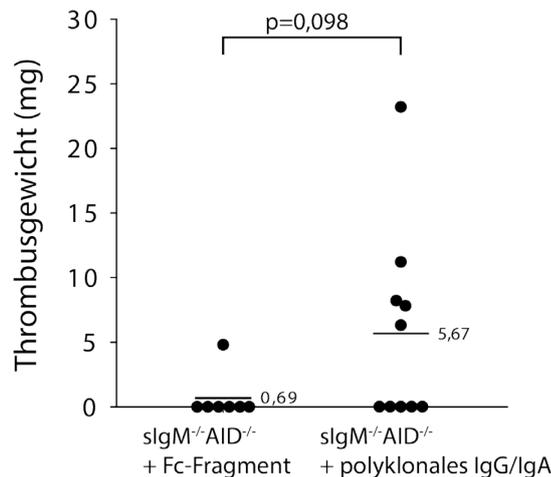


Abbildung 22: Vergleich von Thrombusgewicht und -inzidenz einer mit polyklonalem IgG/IgA substituierten $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Gruppe ($n=10$) zu einer mit Fc-Fragmenten substituierten $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Kontrollgruppe ($n=7$); Querbalken $\hat{=}$ Mittelwert; *=statistisch signifikantes Ergebnis des mittleren Thrombusgewichts nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 3 Gruppen

Tabelle 12: Übersicht des relativen Unterschieds im Thrombusgewicht der mit polyklonalem IgG/IgA substituierten $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Gruppe zur Kontrollgruppe sowie der zugehörigen Effektgröße

Knockout-Mausstamm	Relativer Unterschied des Thrombusgewichts zur Kontrollgruppe	Effektgröße
$sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ +polyklonales IgG/IgA	87,91%	0,84

2.3. Einfluss unspezifisch bindender Antikörper auf die venöse Thrombose

Die anschließenden Versuchsreihen sollten Aufschluss darüber geben, ob ein Antikörper für die Interaktion mit der Entstehung der TVT spezifisch an ein bestimmtes Antigen binden muss, oder ob eine unspezifische Bindung ausreichend ist.

Deshalb wurden zwei nicht spezifisch bindende virale Antikörper hinsichtlich ihres Einflusses auf die Entstehung der venösen Thrombose untersucht: Anti-gp120 - ein IgG-Antikörper gegen das Glykoprotein 120 (gp120) auf der Oberfläche des HI-Virus und ein IgG-Antikörper gegen das Nukleoprotein (NP) des Influenza-A-Virus. Diese wurden Antikörper-defizienten Mäusen direkt vor der Operation zur Stenosierung der Vena cava caudalis intravenös verabreicht.

Der gegen das HI-Virus gerichtete anti-gp120-Antikörper findet im normalen murinen Organismus keinen spezifischen Bindungspartner. Er wird demnach, wenn überhaupt, unspezifisch gebunden oder kann mit anderen Liganden kreuzreagieren.

Mit diesem Antikörper wurde eine sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Gruppe, bestehend aus 8 Tieren, in einer Dosis von 0,6mg/Maus substituiert. Als Kontrollgruppe diente erneut die mit Fc-Fragmenten (0,6mg/Tier) substituierte sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Gruppe (n=7) mit einer Thrombusinzidenz von 14,29% und einem Thrombusgewicht von 0,69mg. Durch das völlige Fehlen der Fab-Fragmente in dieser Gruppe, konnte hier überhaupt keine Antigen-Bindung erfolgen.

Nach 48h konnten Thrombusgewicht und -inzidenz der mit anti-gp120 substituierten sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Gruppe ermittelt werden: Von 8 operierten Tieren entwickelten nur 3 einen Thrombus, was einer Inzidenz von 37,50% entsprach. Das Gewicht der Thromben lag im Mittel bei 7,63mg, war aber trotz des relativen Unterschieds von 91,01% und einer hohen Effektgröße von 0,84, bedingt durch starke individuelle Schwankungen, nicht signifikant größer als das der Kontrollgruppe (p=0,397).

Um dieses nicht ganz eindeutige Ergebnis zu verifizieren, wurde als zweiter unspezifisch bindender monoklonaler Antikörper ein IgG gegen das NP des Influenza-A-Virus hinsichtlich Auslösung der TVT im Mausmodell untersucht.

Mangels Influenza-Virus in der Maus, kann auch der anti-Influenza-Antikörper kein Antigen spezifisch binden.

Ebendieser Antikörper wurde einer $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Versuchsgruppe (n=10) in einer Dosis von 0,6mg/Maus intravenös verabreicht. Im Anschluss wurde die stenosierende Operation an der Vena cava durchgeführt und die Thrombusbildung nach 48h beurteilt. 6 der 10 operierten Tiere bildeten im Mausmodell venöse Thromben aus, was einer Inzidenz von 60,00% entsprach. Das mittlere Thrombusgewicht lag bei 8,89mg. Verglichen mit der Fc-Fragment-substituierten Kontrollgruppe (n=7, mittleres Thrombusgewicht 0,69mg, Thrombusinzidenz 14,29%), führte die anti-Influenza-IgG-Substitution zu mehr und schwereren Thromben mit einem relativen Unterschied von 92,29% und einer sehr hohen Effektgröße von 1,08, was allerdings mit der verwendeten Tierzahl nicht als statistisch signifikant errechnet werden konnte (p=0,043; nach Bonferroni-Holm-Adjustierung erst bei p<0,01667 statistisch signifikant).

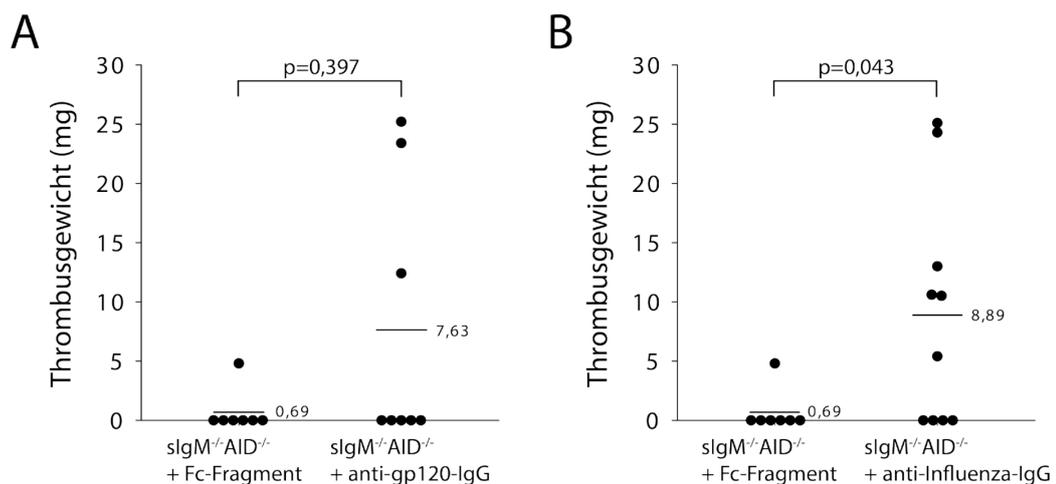


Abbildung 23: Vergleich von Thrombusgewicht und -inzidenz einer mit Fc-Fragmenten substituierten $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Kontrollgruppe zu mit unspezifisch bindenden Antikörpern substituierten $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Versuchsgruppen

- A) Vergleich einer mit anti-gp120-IgG substituierten $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Gruppe (n=8) zu einer mit Fc-Fragmenten substituierten $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Kontrollgruppe (n=7); Querbalken $\hat{=}$ Mittelwert; * = statistisch signifikantes Ergebnis des mittleren Thrombusgewichts nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 3 Gruppen
- B) Vergleich einer mit anti-Influenza-IgG substituierten $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Gruppe (n=10) zu einer mit Fc-Fragmenten substituierten $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Kontrollgruppe (n=7), Querbalken $\hat{=}$ Mittelwert; * = statistisch signifikantes Ergebnis des mittleren Thrombusgewichts nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 3 Gruppen

Tabelle 13: Übersicht des relativen Unterschieds im Thrombusgewicht der mit unspezifisch bindenden Antikörpern substituierten sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Gruppen zur Kontrollgruppe sowie der zugehörigen Effektgröße

Knockout-Mausstamm	Relativer Unterschied des Thrombusgewichts zur Kontrollgruppe	Effektgröße
sIgM ^{-/-} AID ^{-/-} +anti-gp120-IgG	91,01%	0,84
sIgM ^{-/-} AID ^{-/-} +anti-Influenza-IgG	92,29%	1,08

3. Antikörper-abhängige molekulare Mechanismen der venösen Thrombus-Bildung

Als nächstes sollte der beobachtete Einfluss von Antikörpern auf die TVT genauer spezifiziert werden. Aus diesem Grund wurde auf die Interaktion von Antikörpern mit zellulären und molekularen Mechanismen in der Entstehung venöser Thromben eingegangen. Die wichtigsten Auslöser der Bildung venöser Thromben sind der immunologische Prozess der Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten sowie die starke Fibrinbildung.

3.1. Die Bedeutung von Fc-Rezeptoren für die Ausbildung venöser Thromben im Mausmodell

Als Zellen der unspezifischen Immunabwehr sind Leukozyten maßgeblich an der Entstehung der TVT beteiligt. Über ihre Fc-Rezeptoren sind Leukozyten in der Lage mit Antikörpern zu interagieren. Um Aufschluss darüber zu bekommen, ob eine direkte Interaktion von Antikörpern mit Fc γ -Rezeptoren der Immunzellen für die Entstehung eines venösen Thrombus relevant ist, wurde mit Hilfe des Stenose-Mausmodells die Bildung venöser Thromben in Fc γ -Rezeptor-defizienten Mäusen untersucht.

Von Fc γ R^{-/-}Fc γ RIIb^{-/-}-Mäusen (n=6) entwickelten 50% der operierten Tiere venöse Thromben mit einem mittleren Gewicht von 5,62mg. Dies ergab einen nicht signifikanten (p=0,818) relativen Unterschied von nur 10,61% mit einer sehr geringen Effektgröße von 0,10 zur C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=6), in welcher 50% der Tiere Thromben eines mittleren Gewichts von 6,28mg ausbildeten.

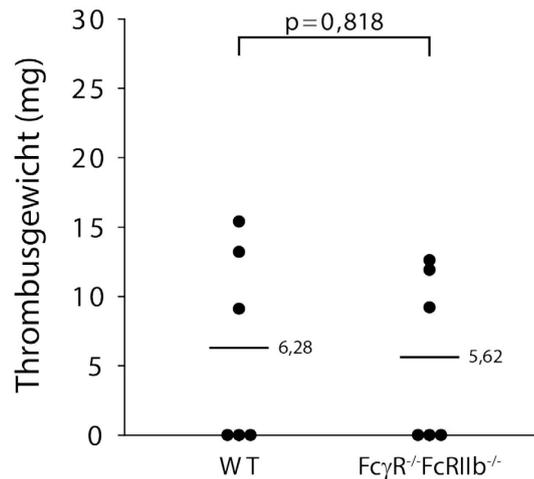


Abbildung 24: Thrombusgewicht und -inzidenz von Fcγ-Rezeptor-defizienten Mäusen (n=6), verglichen mit einer Wildtyp-Kontrollgruppe (n=6); Querbalken ≙ Mittelwert; *=statistisch signifikantes Ergebnis des mittleren Thrombusgewichts

Tabelle 14: Übersicht des relativen Unterschieds im Thrombusgewicht des Fcγ-Rezeptor-Knockout-Stammes zum C57BL/6J-Kontrollstamm sowie der zugehörigen Effektgröße

Knockout-Mausstamm	Relativer Unterschied des Thrombusgewichts zur Kontrollgruppe	Effektgröße
FcγR ^{-/-} FcγRIIb ^{-/-}	10,61%	0,1

Zusätzlich galt es auch für den FcγR^{-/-}FcγRIIb^{-/-}-Stamm auszuschließen, dass Veränderungen im Blutbild die Thrombusbildung beeinflussten. Eine Analyse relevanter Blutparameter einer FcγR^{-/-}FcγRIIb^{-/-}-Gruppe (n=3) ergab im Vergleich zur C57BL/6J-Wildtyp-Gruppe (n=11) nahezu identische gemittelte Werte, niedrige relative Unterschiede und geringe bis moderate Effektgrößen (siehe Tabelle 15). Einzig eine signifikant erhöhte Monozyten-Anzahl mit einem relativen Unterschied von 67,27% und einer sehr hohen Effektgröße von 2,86 fiel auf (p=0,015).

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass der Effekt der Antikörper auf die Thrombusbildung unabhängig von ihrer Bindung an den Fcγ-Rezeptor von Leukozyten ist.

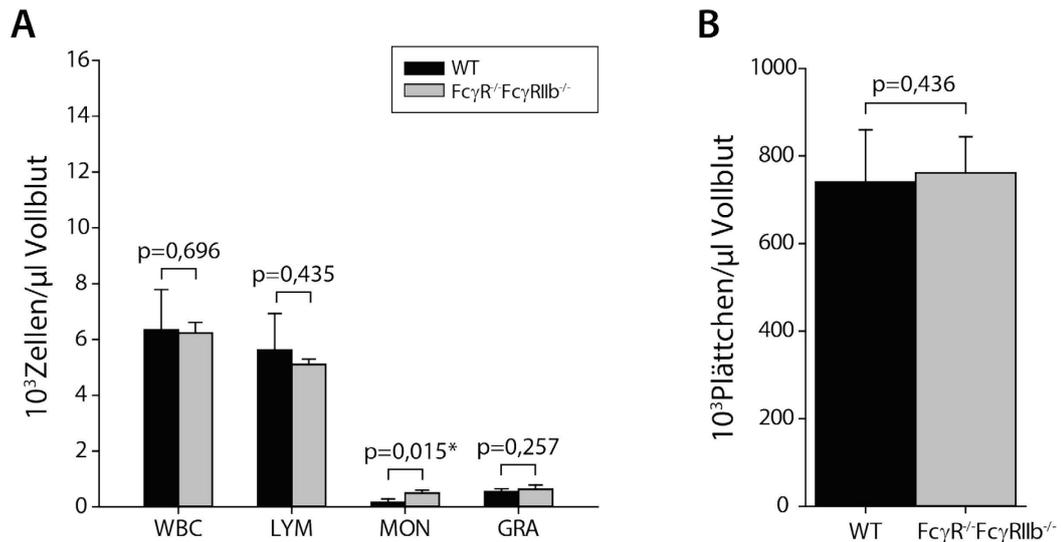


Abbildung 25: Blutbild einer FcγR^{-/-}FcγRIIb^{-/-}-Gruppe (n=3) im Vergleich zu einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=11)

A) Anzahl weißer Blutzellen im Vollblut und Differentialblutbild (Mittelwerte); Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung; *=statistisch signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 5 Gruppen

B) Anzahl an Blutplättchen im Vollblut (Mittelwerte); Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung; *=statistisch signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 5 Gruppen

Tabelle 15: Übersicht des relativen Unterschieds im Blutbild des Fcγ-Rezeptor-Knockout Mausstamms zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen

Mausstamm	Relativer Unterschied zum Blutbild des Wildtyps in %					Effektgröße				
	WBC	LYM	MON	GRA	Plt	WBC	LYM	MON	GRA	Plt
FcγR ^{-/-} FcγRIIb ^{-/-}	-1,63	-9,36	67,27	13,88	2,7	0,08	0,44	2,86	0,78	0,18

3.2. Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung im Stenose-Mausmodell

Mit Hilfe intravitalmikroskopischer Untersuchungen im Stenose-Mausmodell, konnte die Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung in den ersten sechs Stunden nach Ligatur der Vena cava caudalis untersucht werden.

Dabei fand ein Vergleich zwischen einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe und einer sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Gruppe statt, um den Effekt des kompletten Antikörperdefizits auf die Zellrekrutierung zu beobachten.

Die Auswertung der Fläche am Endothel adhärenter Leukozyten zu den Zeitpunkten 1h bis 6h ergab in sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Mäusen (n=8) eine leichte Reduktion der Leukozytenrekrutierung zu allen Zeitpunkten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe (n=10). Die stärksten Unterschiede, mit Effektgrößen im mittleren

bis hohen Bereich, konnten 1h, 3h und 5h nach Stenosierung der Vena cava caudalis beobachtet werden: 1h nach Ligatur dehnte sich die mittlere Leukozytenaggregationsfläche in Wildtyp-Tieren auf $0,315\text{mm}^2/\text{mm}^2$ aus, während sie in $\text{sIgM}^{-/-}\text{AID}^{-/-}$ -Mäusen nur $0,215\text{mm}^2/\text{mm}^2$ betrug. Damit lag zwar ein relativer Unterschied von 31,54% mit einer hohen Effektgröße von 0,80 vor, dieser Effekt war jedoch mit einem p-Wert von 0,111 nicht statistisch signifikant. Zum Zeitpunkt 3h waren die Leukozyten in Wildtyp-Tieren auf einer Fläche von $0,485\text{mm}^2/\text{mm}^2$ am Endothel adhären, wohingegen $\text{sIgM}^{-/-}\text{AID}^{-/-}$ -Tiere eine Leukozytenaggregationsfläche von $0,372\text{mm}^2/\text{mm}^2$ aufwiesen ($p=0,155$). Dies ergab einen relativen Unterschied von 23,35% und eine mittlere Effektgröße von 0,71. 5h nach stenosierender Ligatur wiesen die Leukozyten in Wildtyp-Tieren eine Aggregationsfläche von $0,677\text{mm}^2/\text{mm}^2$ auf, was sich mit einem p-Wert von 0,130 und einem relativen Unterschied von 24,23%, mit der mittleren Effektgröße von 0,76, nicht signifikant von der $0,513\text{mm}^2/\text{mm}^2$ großen Leukozytenaggregationsfläche der $\text{sIgM}^{-/-}\text{AID}^{-/-}$ -Gruppe unterschied. Gering dagegen waren die Unterschiede 2h, 4h und 6h nach Ligatur mit Effektgrößen im unteren mittleren bis niedrigen Bereich. Nach 2h betrug die Leukozytenaggregationsfläche in $\text{sIgM}^{-/-}\text{AID}^{-/-}$ -Mäusen $0,279\text{mm}^2/\text{mm}^2$ und unterschied sich um 20,98% sowie einer moderaten Effektgröße von 0,58 von den $0,353\text{mm}^2/\text{mm}^2$ des Wildtyps ($p=0,241$). Zum Zeitpunkt 4h konnte ein schwacher relativer Unterschied von 17,58% mit der geringen Effektgröße 0,48 in der Aggregationsfläche von Wildtyp-Tieren ($0,496\text{mm}^2/\text{mm}^2$) und $\text{sIgM}^{-/-}\text{AID}^{-/-}$ -Tieren ($0,408\text{mm}^2/\text{mm}^2$) ausgemacht werden ($p=0,322$). 6h nach Ligatur war dieser Unterschied, mit einer Leukozytenaggregation von $0,728\text{mm}^2/\text{mm}^2$ der Wildtyp-Gruppe im Vergleich zu $0,666\text{mm}^2/\text{mm}^2$ der $\text{sIgM}^{-/-}\text{AID}^{-/-}$ -Gruppe, mit nur noch 8,41% und einer niedrigen Effektgröße von 0,29 sehr gering und mit einem p-Wert von 0,554 auch nicht statistisch signifikant.

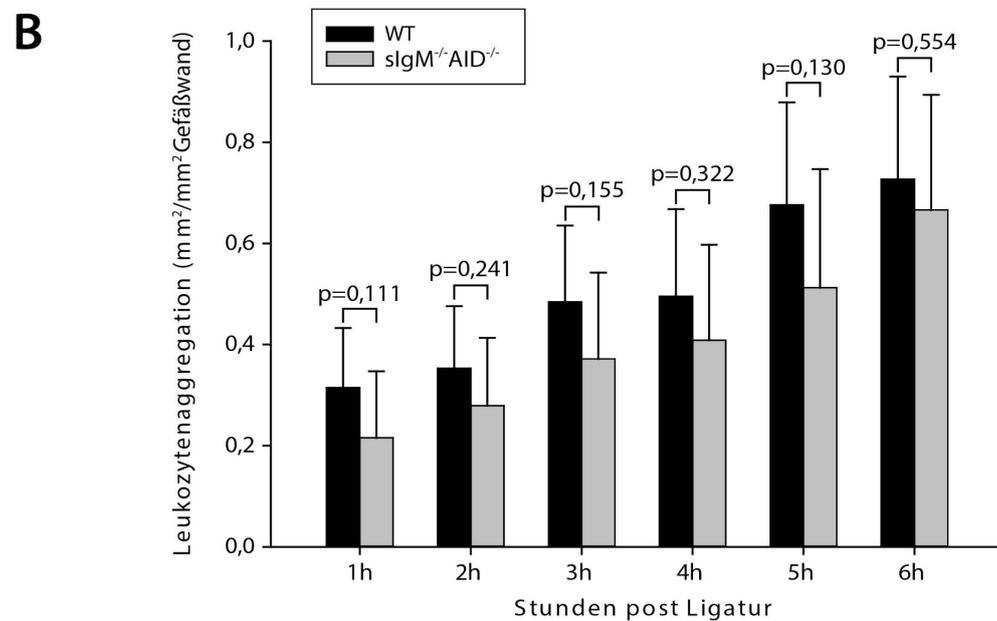
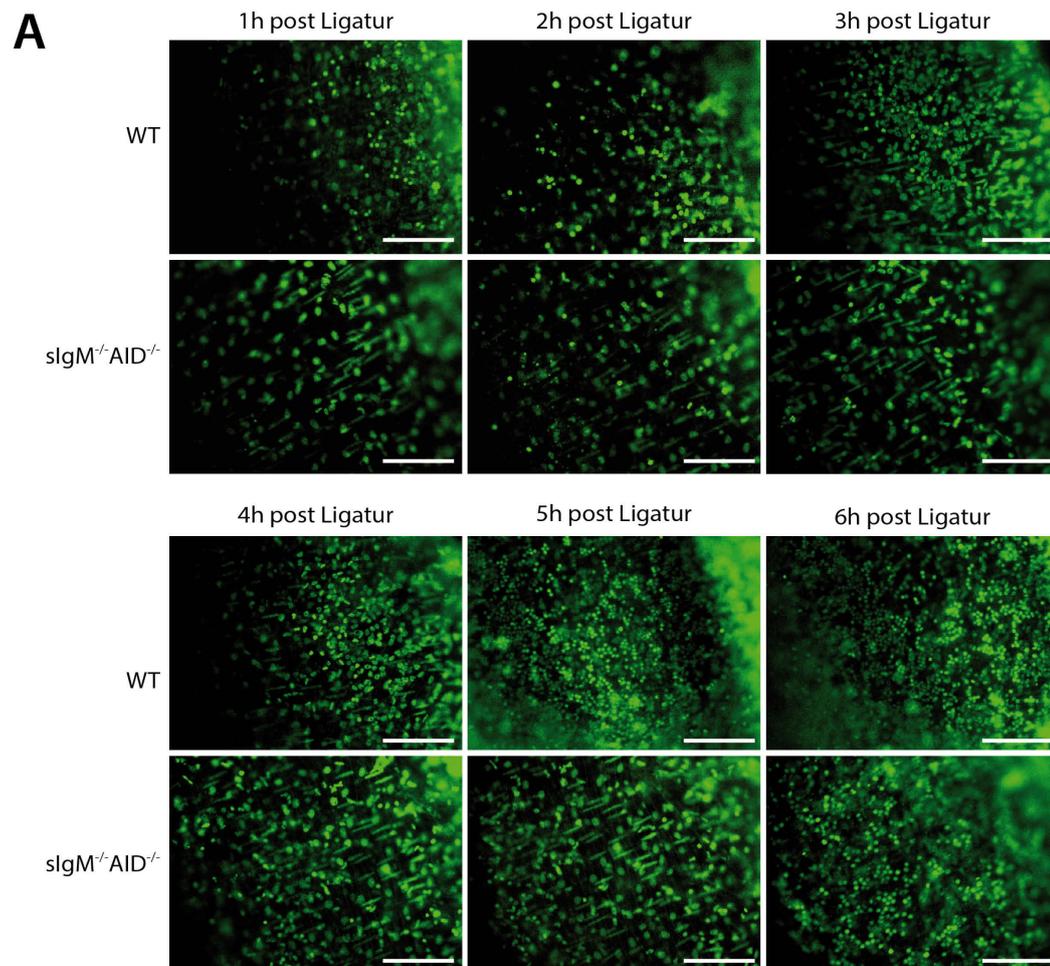


Abbildung 26: Vergleich der Leukozytenrekrutierung einer slgM^{-/-}AID^{-/-}-Gruppe (n=8) mit einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=10) zu den Zeitpunkten 1h bis 6h nach Ligatur der Vena cava caudalis

- A) Bild-Aufnahmen der Intravitalmikroskopie; Färbung der Leukozyten mit Acridine Orange; Maßstab entspricht einer Länge von 100µm
- B) Grafische Darstellung der Leukozytenaggregationsfläche in mm²/mm² (Mittelwerte); Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung; *=statistisch signifikantes Ergebnis

Tabelle 16: Übersicht des relativen Unterschieds der Leukozytenrekrutierung über 6h einer sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Gruppe im Vergleich zu einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe sowie der zugehörigen Effektgrößen

Relativer Unterschied der Leukozytenrekrutierung im Vergleich zum Wildtyp in %						Effektgröße					
1h	2h	3h	4h	5h	6h	1h	2h	3h	4h	5h	6h
-31,5	-21	-23,4	-17,6	-24,2	-8,41	1	0,58	0,71	0,48	0,76	0,29

Die mittlere Anzahl adhärenter Thrombozyten pro 200 μm^2 zu den gleichen Zeitpunkten zeigte in sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Tieren (n=6) eine verringerte Zellrekrutierung im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe (n=10). Besonders deutlich wurden die Unterschiede der Thrombozytenrekrutierung ab 4h nach Ligatur der Vena cava caudalis: Zum Zeitpunkt 4h zeigten sich in der Wildtyp-Kontrollgruppe 43,73 \pm 22,77 Zellen adhärent, während es in der sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Gruppe nur 16,83 \pm 8,24 waren. Damit lag ein signifikanter relativer Unterschied der Thrombozytenadhäsion von 61,51% mit einer sehr hohen Effektgröße von 1,42 vor (p=0,016). Zum Zeitpunkt 5h waren in der Kontrollgruppe 71,37 \pm 29,16 Zellen adhärent, in sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Tieren nur 41,06 \pm 26,09, was mit der hier verwendeten Tierzahl einen zwar statistisch nicht signifikanten, aber einen, mit 1,08 eine sehr hohe Effektgröße aufweisenden, relativen Unterschied von 42,47% ausmachte (p=0,055). 6h nach Ligatur konnten bei Wildtyp-Tieren schon 88,97 \pm 34,12 adhärenente Thrombozyten ausgemacht werden, wohingegen es in sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Tieren nur 51,28 \pm 29,24 waren. Dies entsprach einem relativen Unterschied von 42,36% mit einer sehr hohen Effektgröße von 1,16, welcher mit einem p-Wert von 0,041 als statistisch signifikant errechnet werden konnte.

Zusammenfassend führt der Mangel an Antikörpern zu einer nur moderaten Reduzierung der Leukozytenrekrutierung, hat aber einen signifikanten Effekt auf die Adhäsion und Akkumulation von Thrombozyten am Endothel.

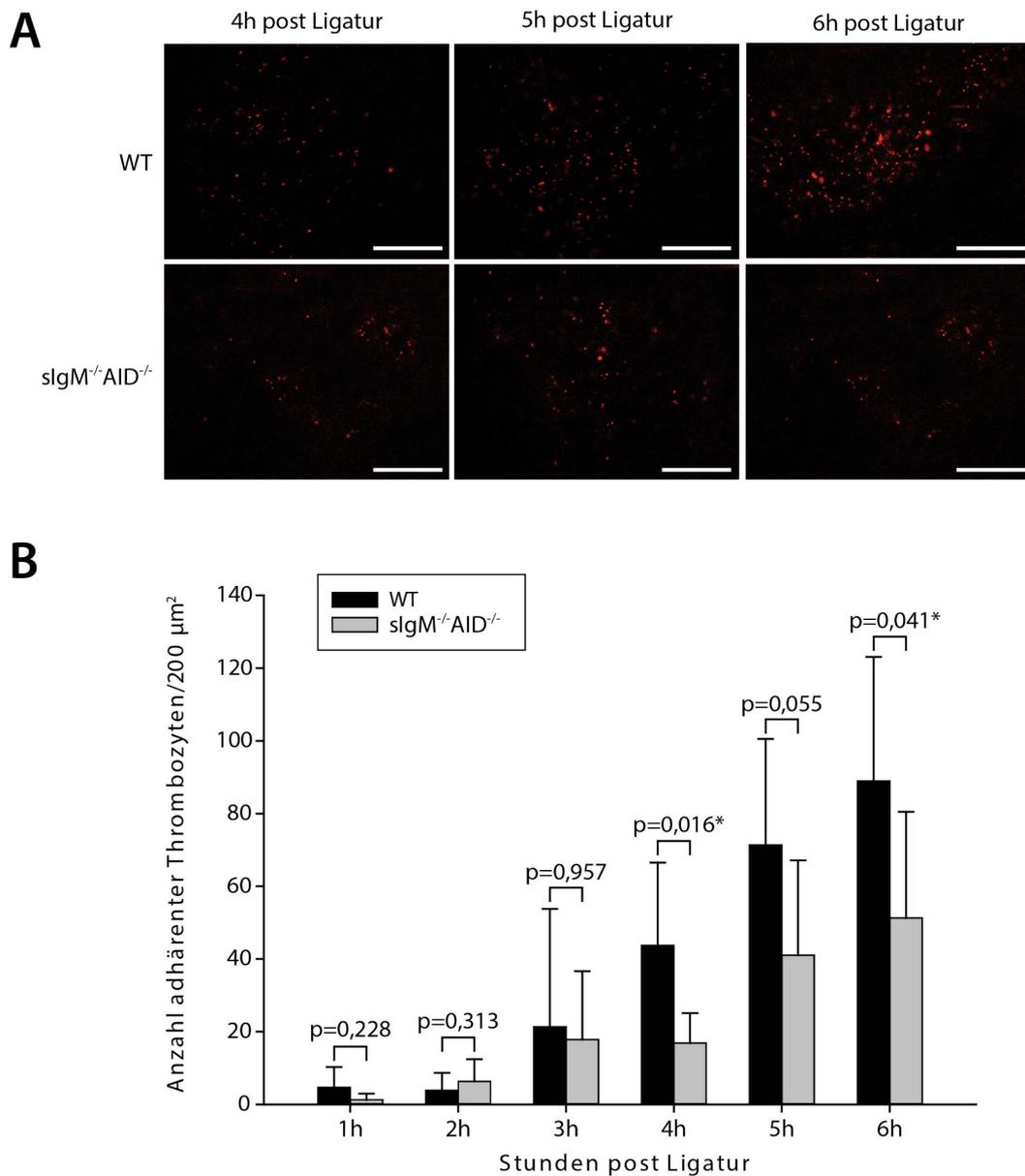


Abbildung 27: Vergleich der Thrombozytenrekrutierung einer slgM^{-/-}AID^{-/-}-Gruppe (n=6) mit einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=10) zu den Zeitpunkten 1h bis 6h nach Ligatur der Vena cava caudalis

- A) Bild-Aufnahmen der Intravitalmikroskopie; Färbung der Thrombozyten mit Rhodamin B; Maßstab entspricht einer Länge von 100 μm
- B) Grafische Darstellung der Anzahl adherenter Thrombozyten/200 μm^2 Gefäßwandfläche (Mittelwerte); Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung; *=statistisch signifikantes Ergebnis

Tabelle 17: Übersicht des relativen Unterschieds der Thrombozytenrekrutierung über 6h einer slgM^{-/-}AID^{-/-}-Gruppe im Vergleich zu einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe sowie der zugehörigen Effektgrößen

Relativer Unterschied der Thrombozytenrekrutierung im Vergleich zum Wildtyp in %						Effektgröße					
1h	2h	3h	4h	5h	6h	1h	2h	3h	4h	5h	6h
-72,9	39,18	-16,5	-61,5	-42,5	-42,36	1	0,47	0,12	1,42	1,08	1,16

3.3. Einfluss von Antikörpern auf die Blutgerinnung

Neben diesen zellulären Prozessen stellt die Aktivierung der Blutgerinnung einen weiteren essenziellen Mechanismus der Thrombusentstehung im Prozess der TVT dar. Daher wurde die Blutgerinnung hinsichtlich des direkten Einflusses von Antikörpern untersucht.

Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe der thrombelastometrischen Analysen EXTEM und FIBTEM die Gerinnungsfähigkeit intrakardial gewonnenen Vollbluts aus C57BL/6J-Wildtyp-Kontrolltieren und sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Tieren evaluiert. Bei beiden Analysemethoden wurde mit TF als Gerinnungsaktivator gearbeitet.

Die Ergebnisse zeigten eine Abhängigkeit der Gerinnung und insbesondere der Fibrinbildung von Antikörpern:

Zunächst wurde mit EXTEM-Untersuchungen das Funktionieren der Blutgerinnung unter Anwesenheit von Blutplättchen und aller Gerinnungsfaktoren untersucht. In diesen Analysen zeigten sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Mäuse (n=5) mit 32,20±14,03s und 56,00±21,18s eine um 20,81% längere mittlere Gerinnungszeit (CT) bzw. eine um 24,11% längere Gerinnselbildungszeit (CFT), als die Wildtyp-Kontrollgruppe (n=6) (CT: 25,50±4,92s bzw. CFT: 42,50±9,25s). Bei einer mittleren Effektgröße von 0,67 für die CT und einer großen Effektgröße von 0,85 für die CFT, konnte dabei kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (CT: p=0,237; CFT: p=0,349).

Die mittels EXTEM-Test bestimmte Gerinnselhaftigkeit (MCF) war in der sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Gruppe mit einem mittleren Wert von 63,40±13,20mm nur etwas geringer, als die gemittelten 69,33±3,99mm der Kontrollgruppe (p=0,369). Der relative Unterschied betrug 8,56% mit einer mittleren Effektgröße von 0,64.

In FIBTEM-Analysen, mit welchen durch die Inaktivierung von Thrombozyten allein die plasmatische Gerinnung evaluiert werden kann, zeigte sich hinsichtlich der Gerinnselhaftigkeit ein deutlicherer Unterschied: Hier lag der MCF-Wert von sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Tieren (n=5) mit 34,60±2,94mm und einem relativen Unterschied von 15,61%, mit einer sehr hohen Effektgröße von 1,37, deutlich unter den 40,86±5,51mm der Kontrollgruppe (n=7), was allerdings mit der verwendeten Tierzahl nicht als statistisch signifikant errechnet werden konnte (p=0,061).

Als weiterer Parameter der Thrombelastometrie wurde die maximale Lyse des

Gerinnsels nach 30 Minuten (ML30) zur Auswertung herangezogen.

Diese war in den, mittels EXTEM-Test untersuchten $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Tieren, mit $5,20 \pm 10,40\%$ um $9,62\%$ stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe ($0,50 \pm 1,12\%$). Allerdings lag die Effektgröße für diesen Parameter in der EXTEM-Analyse mit $0,67$ im mittleren Bereich und es konnte bedingt durch hohe individuelle Schwankungen in der Antikörper-defizienten Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p=0,931$).

In FIBTEM-Analysen konnte für $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Tiere mit $5,80 \pm 5,59\%$ ebenfalls eine stärkere Lyse des Gerinnsels nach 30 Minuten festgestellt werden, als dies in Wildtyp-Tieren der Fall war ($0,71 \pm 1,39\%$). Mit der verwendeten Tierzahl war dieser sehr große relative Unterschied von $97,13\%$ zwar mit einer sehr hohen Effektgröße von $1,55$ versehen, jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,058$).

Dies deutet darauf hin, dass ein Mangel an Antikörpern vor allem die Stabilität der Fibrinbildung beeinflusst und, dass Gerinnsel unter diesen Bedingungen leichter aufgelöst werden, wobei dieser Effekt unabhängig von Thrombozyten ist.

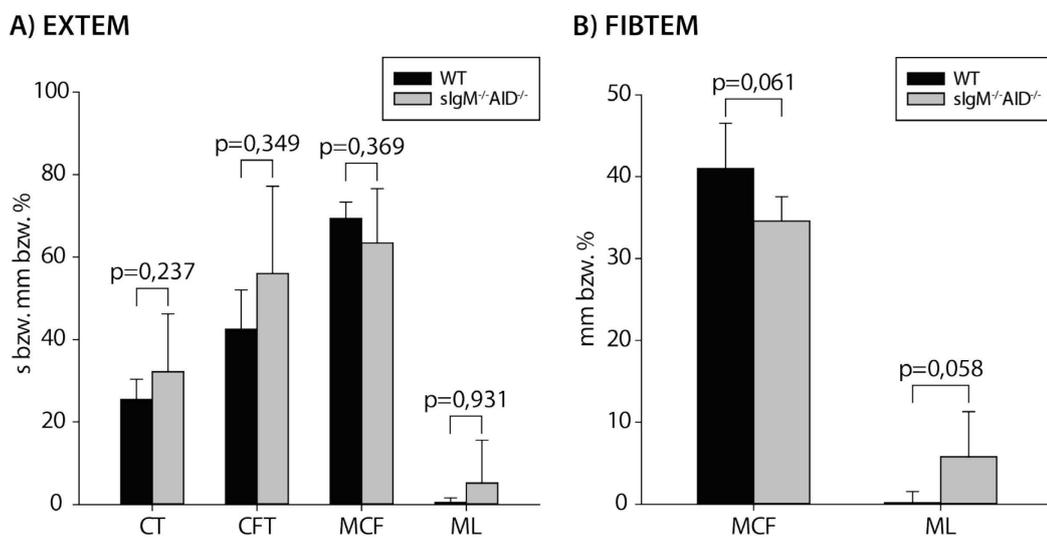


Abbildung 28: Thrombelastometrische Analyse des Blutes von $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Mäusen ($n=5$) im Vergleich zu einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe ($n=6$)

- A) Mittelwerte der Parameter der EXTEM-Analyse; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; *= $\text{statistisch signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 2 Gruppen}$
- B) Mittelwerte der Parameter der FIBTEM-Analyse; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; *= $\text{statistisch signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 2 Gruppen}$

Tabelle 18: Übersicht des relativen Unterschieds in Parametern der Thrombelastometrie-Analyse des sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Stammes zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen

TEM-Methode	Relativer Unterschied zur Analyse des Wildtyps in %				Effektgröße			
	CT	CFT	MCF	ML	CT	CFT	MCF	ML
EXTEM	20,81	24,11	-8,56	9,62	0,7	0,85	0,64	0,67
FIBTEM	-	-	-15,61	97,1	-	-	1,37	1,55

4. Beteiligung natürlicher Antikörper im Geschehen der venösen Thrombose

Mit dem Ziel eine bestimmte Gruppe an in der venösen Thrombose beteiligten Antikörpern und deren Bindungspartnern zu identifizieren, wurde der Effekt natürlicher Antikörper eingehend studiert.

Im pathologischen Prozess von Ischämie-Reperfusionsschäden scheint diese Antikörper-Gruppe maßgeblich beteiligt zu sein^{137,141}. Da im hypoxischen Zustand als Auslöser von Ischämie-Reperfusionsschäden Parallelen zur TVT gesehen werden können und gleichzeitig auch in der Entstehung der TVT Antikörper beteiligt zu sein scheinen, wurde der Effekt natürlicher Antikörper im Modell der venösen Thrombose untersucht.

Da CR2-defiziente Mäuse ein verändertes Repertoire an natürlichen Antikörpern besitzen, jedoch normale Serumkonzentrationen an Immunglobulinen aufweisen¹²³, dienten 11 dieser Tiere dazu, den Effekt natürlicher Antikörper im Geschehen der TVT genauer zu spezifizieren. Diese Versuchsgruppe wurde hinsichtlich der Ausbildung venöser Thromben über einen Zeitraum von 48h im Stenose-Mausmodell gegen eine C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=10) verglichen. Die Ergebnisse des mittleren Thrombusgewichts der CR2^{-/-}-Gruppe von leichten 1,95mg zeigten eine signifikante Reduktion (p=0,036) gegenüber der im Mittel 9,10mg schweren Thromben der Kontrollgruppe. Der relative Unterschied betrug dabei 78,61% mit einer sehr hohen Effektgröße von 1,02. Auch die Thrombusinzidenz lag bei CR2^{-/-}-Mäusen mit 18,18% weit unter den 60,00% der Wildtyp-Tiere.

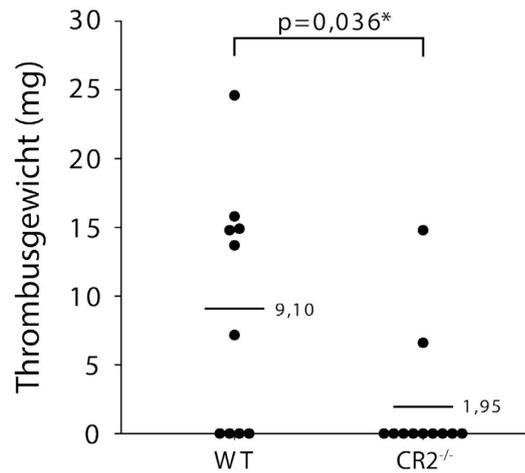


Abbildung 29: Thrombusgewicht und -inzidenz von Komplementfaktorrezeptor-2-defizienten Mäusen (n=11) verglichen mit einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=10); Querbalken \triangleq Mittelwert; *=statistisch signifikantes Ergebnis des mittleren Thrombusgewichts

Tabelle 19: Übersicht des relativen Unterschieds im Thrombusgewicht des CR2-defizienten-Mausstammes zum C57BL/6J-Kontrollstamm sowie der zugehörigen Effektgröße

Knockout-Mausstamm	Relativer Unterschied des Thrombusgewichts zur Kontrollgruppe	Effektgröße
CR2 ^{-/-}	78,61%	1,02

Auch bei den CR2^{-/-}-Tieren sollte die Thrombusentstehung im Zusammenhang mit den Serumspiegeln der Haupt-Immunglobulinklassen gesehen werden. Mit Hilfe von ELISAs wurde die Konzentration an IgG und IgM im Serum bestimmt. Dabei konnten keine statistisch signifikanten Abweichungen von den physiologischen Serum-Antikörperspiegeln der C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollmäuse gesehen werden: Die IgG-Konzentration lag in CR2-defizienten Tieren bei $1,865 \pm 1,111$ mg/ml Serum und unterschied sich daher um 52,31%, bei einer sehr hohen Effektgröße von 1,23, von den $0,889 \pm 0,155$ mg/ml Serum der Wildtypgruppe. Dieser Unterschied war bedingt durch hohe individuelle Schwankungen in den IgG-Spiegeln der CR2^{-/-}-Mäuse jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,206$). Die IgM-Konzentration in CR2^{-/-}-Tieren lag bei $0,487 \pm 0,129$ mg/ml Serum, wohingegen die Wildtyp-Kontrollgruppe mit einem relativen Unterschied von 18,75% annähernd identische IgM-Spiegel von $0,598 \pm 0,102$ mg/ml Serum aufwies ($p=0,308$). Die Thrombusentstehung steht in CR2-defizienten Tieren demnach nicht direkt im Zusammenhang mit der Höhe der Serumantikörperspiegel.

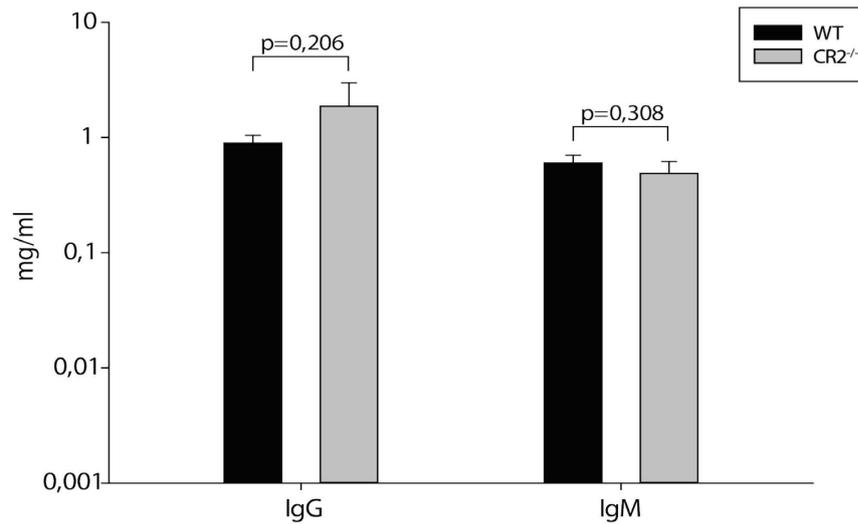


Abbildung 30: Mittelwerte der IgG- und IgM-Serumkonzentrationen im CR2^{-/-}-Stamm (n=3) verglichen mit der C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=3); Fehlerbalken \pm Standardabweichung; *=statistisch signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 5 Gruppen

Tabelle 20: Übersicht des relativen Unterschieds der IgG- und IgM-Serumkonzentration des CR2^{-/-}-Stammes zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen

Knockout-Mausstamm	Relativer Unterschied des Antikörpergehalts zur Kontrollgruppe		Effektgröße	
	IgG	IgM	IgG	IgM
CR2 ^{-/-}	52,31%	-18,75%	1,23	0,95

Auf der Suche nach Ursachen für die verminderte Thrombusbildung in CR2^{-/-}-Mäusen wurden Blutbilder und Gerinnungsanalysen erstellt.

In Blutbildern des Stammes (n=3) zeigten sich im Vergleich zur C57BL/6J-Wildtypkontrollgruppe (n=11) signifikant erhöhte Werte der Monozyten- sowie der Granulozytenanzahl (p=0,008 bzw. p<0,001). Für die Monozytenzahl bedeutete dies einen relativen Unterschied von 83,64% zur Kontrollgruppe und eine extrem hohe Effektgröße von 7,12. Bei der Granulozytenzahl betrug der relative Unterschied zum Wildtyp 37,06% mit einer sehr hohen Effektgröße von 3,04. Dies wurde jedoch kaum in der Gesamtzahl weißer Blutzellen bemerkbar: Diese unterschied sich mit einer Erhöhung um 11,17% und einer moderaten Effektgröße kaum von der Wildtyp-Kontrollgruppe (p=0,213). Ähnlich verhielt es sich für die Anzahl an Blutplättchen: Sie war mit einem relativen Unterschied von 1,86% und einer sehr niedrigen Effektgröße von 0,13 nahezu identisch mit der Wildtyp-Gruppe (p=0,640). Die verminderte Thrombusbildung in diesem

Mausstamm kann folglich nicht durch Veränderungen im Blutbild erklärt werden.

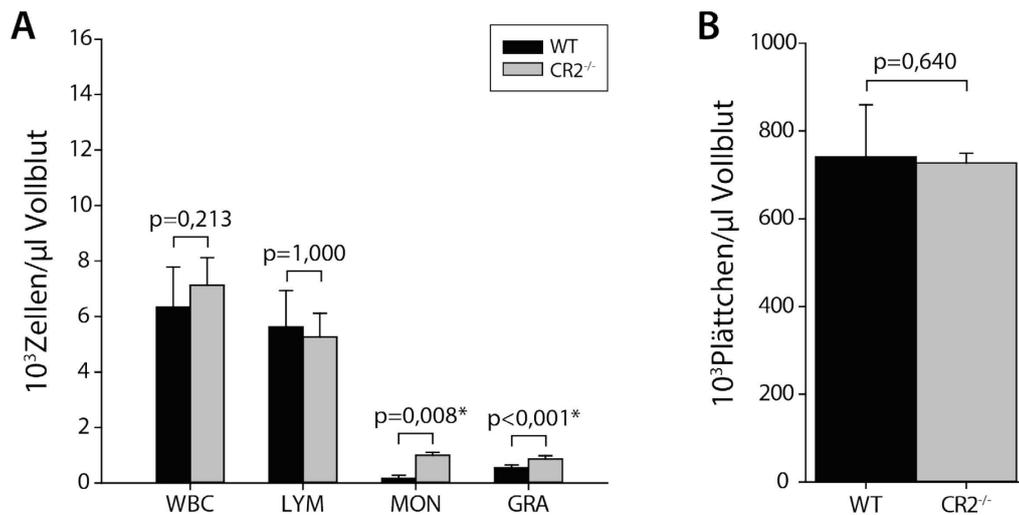


Abbildung 31: Blutbild einer CR2^{-/-}-Gruppe (n=3) im Vergleich zu einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=11)

A) Anzahl weißer Blutzellen im Vollblut und Differentialblutbild (Mittelwerte); Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; *=statistisch signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 5 Gruppen

B) Anzahl an Blutplättchen im Vollblut (Mittelwerte); Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; *=statistisch signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 5 Gruppen

Tabelle 21: Übersicht des relativen Unterschieds im Blutbild des CR2-defizienten Mausstamms zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen

Mausstamm	Relativer Unterschied zum Blutbild des Wildtyps in %					Effektgröße				
	WBC	LYM	MON	GRA	Plt	WBC	LYM	MON	GRA	Plt
CR2 ^{-/-}	11,17	-6,41	83,64	37,06	-1,86	0,58	0,29	7,12	3,04	0,13

Thrombelastometrische Untersuchungen von CR2^{-/-}-Mäusen (n=4) ergaben in EXTEM-Analysen eine mit 59,25±5,93s, im Vergleich zu 42,50±9,25s der Wildtyp-Kontrollgruppe (n=6), signifikant verlängerte Gerinnselbildungszeit (CFT) (p=0,023; nach Bonferroni-Holm-Adjustierung bei p<0,025 statistisch signifikant). Der relative Unterschied zum Wildtyp betrug 28,27% mit einer sehr hohen Effektgröße von 2,00. Dagegen war die Zeit bis zum Einsetzen der Gerinnung (CT) bei CR2-Knockout mit 18,75±2,17s kürzer, als bei Kontrolltieren (25,50±4,92s). Dieser relative Unterschied von 26,47% mit der sehr hohen Effektgröße von 1,64 war allerdings nicht statistisch signifikant (p=0,050; nach Bonferroni-Holm-Adjustierung erst bei p<0,025 statistisch signifikant). Die Gerinnselfestigkeit (MCF) der CR2^{-/-}-Gruppe in der EXTEM-Untersuchung war

mit $65,50 \pm 2,06$ mm um 5,53% niedriger als die $69,33 \pm 3,99$ mm der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0,152$), hatte aber mit 1,13 eine sehr hohe Effektgröße. Im Vergleich dazu, zeigten CR2^{-/-}-Tiere ($n=4$) in der FIBTEM-Analyse mit einem p-Wert $<0,001$ hoch signifikant kleinere MCF-Werte ($20,50 \pm 2,29$ mm) als die Wildtyp-Kontrollgruppe ($n=7$) ($40,86 \pm 5,51$ mm). Die Effektgröße dieses relativen Unterschieds von 50,00% war mit 4,37 extrem hoch. Die Evaluierung der maximalen Gerinnsel-Lyse nach 30 Minuten (ML30) in CR2-defizienten Tieren ergab in EXTEM- und FIBTEM-Analyse 0,00%. Durch diesen Nullwert betrug der relative Unterschied zur Lyse von $0,50 \pm 1,12\%$ in der EXTEM- bzw. $0,71 \pm 1,39\%$ in der FIBTEM-Untersuchung von Wildtyp-Tieren 100%. In den p-Werten (EXTEM: $p=0,762$; FIBTEM: $p=0,527$) sowie in der moderaten Effektgröße von 0,57 für die EXTEM-Analyse und in der mit 0,15 sehr niedrigen Effektgröße für die FIBTEM-Analyse spiegelte sich jedoch wieder, dass es sich um keinen erheblichen Unterschied handelte. Anhand dieser Ergebnisse der thrombelastometrischen Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass der CR2^{-/-}-Mausstamm weniger stabile Fibringerinnsel ausbildet, was möglicherweise die Ausbildung venöser Thromben nachhaltig beeinflusste.

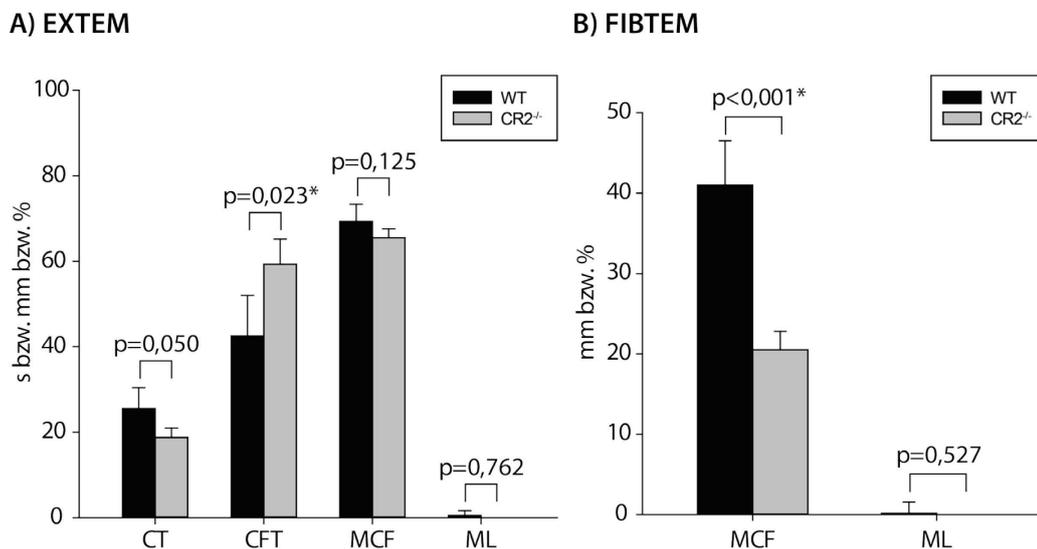


Abbildung 32: Thrombelastometrische Analyse des Blutes von CR2^{-/-}-Mäusen ($n=4$) im Vergleich zu einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe ($n=6$)

- A) Mittelwerte der Parameter der EXTEM-Analyse; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung;
 *=statistisch signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 2 Gruppen
- B) Mittelwerte der Parameter der FIBTEM-Analyse; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung;
 *=statistisch signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Holm-Adjustierung für 2 Gruppen

Tabelle 22: Übersicht des relativen Unterschieds in Parametern der Thrombelastometrie-Analyse des CR2^{-/-}-Stammes zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen

TEM-Methode	Relativer Unterschied zur Analyse des Wildtyps in %				Effektgröße			
	CT	CFT	MCF	ML	CT	CFT	MCF	ML
EXTEM	-26,47	28,3	-5,53	-100	1,64	2	1,13	0,57
FIBTEM	-	-	-50	-100	-	-	4,37	0,15

Die nach 48h in den Thrombus rekrutierten Leukozyten sowie die Thrombozytenfläche wurden mittels immunhistologischer Färbungen der aus dem Mausmodell gewonnenen Thromben quantifiziert.

Dabei konnte in CR2-defizienten Tieren eine im Verhältnis zum Gesamthrombus vergrößerte Thrombozytenfläche festgestellt werden: In Wildtyp-Thromben (n=3) betrug die errechnete CD41-gefärbte Thrombozytenfläche im Mittel 31,11% des Gesamthrombus, während sie bei CR2-Defizienz (n=2) 66,26% ausmachte. Mit der verwendeten Tierzahl war dieser relative Unterschied von 53,05% zwar gerade nicht statistisch signifikant ($p=0,055$), zeigte aber mit 2,79 eine sehr große Effektgröße. Folglich ist die Thrombuszusammensetzung in diesen Tieren verändert, was aber nicht bedeutet, dass auch eine vermehrte Thrombozyten-Akkumulation stattfand, da dieses Ergebnis nicht die absolute Menge an angesammelten Thrombozyten widerspiegelt.

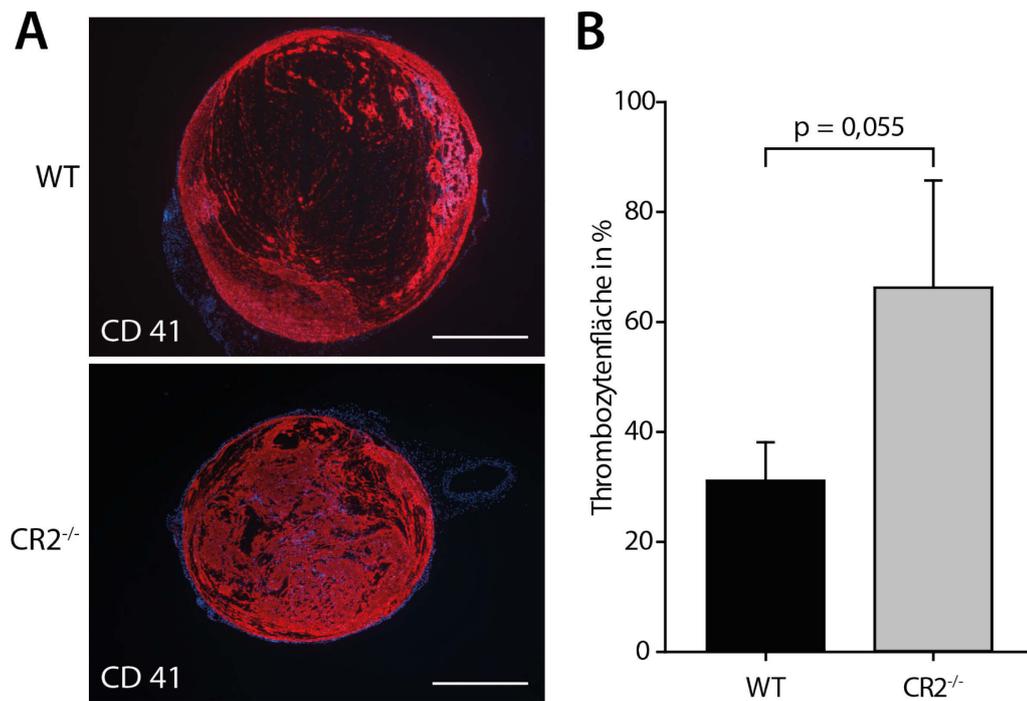


Abbildung 33: Ermittlung der Thrombozytenfläche in Relation zur Fläche des Gesamthrombus in C57BL/6J-Wildtyp (n=3)- und CR2^{-/-}-Thromben (n=2)

- A) Immunhistologische Färbung von CD41 zur Darstellung der Thrombozytenfläche in C57BL/6J-Wildtyp- und CR2^{-/-}-Thromben; Maßstab = 200µm
- B) Vergleich der Thrombozytenfläche in % in C57BL/6J-Wildtyp- und CR2^{-/-}-Thromben (Mittelwerte); Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung; *=statistisch signifikantes Ergebnis

Weiterhin zeigten CR2-defiziente Mäuse eine im Vergleich zum Wildtyp stark verringerte Ansammlung an Leukozyten in den untersuchten Thromben: Mit Hilfe der CD45-Färbung konnten alle kernhaltigen Zellen im Thrombus als Leukozyten definiert werden. Im Anschluss wurde in der Ly-6G-Färbung die Anzahl an Gesamtleukozyten über die Anzahl an vorhandenen Zellkernen ermittelt: Während im Wildtyp $2203,20 \pm 373,66$ Zellen/mm² ausgemacht werden konnten, waren es in CR2^{-/-}-Thromben $891,00 \pm 206,19$ Zellen/mm², was einen statistisch signifikanten (p=0,022) relativen Unterschied von 59,56% mit einer extrem hohen Effektgröße von 4,01 ergab. Anhand der Bestimmung der Anzahl an Ly-6G-positiven Neutrophilen, konnte diese starke Reduktion der rekrutierten Leukozyten auf eine verminderte Neutrophilen-Ansammlung zurückgeführt werden: Diese betrug in CR2^{-/-}-Thromben $675,00 \pm 145,10$ Zellen/mm² und unterschied sich damit um 67,76% und einer extrem hohen Effektgröße von 4,68 signifikant (p=0,014) von den $2030,40 \pm 339,47$ Zellen/mm² der Wildtyp-Thromben. Bedingt durch die stark verminderte Anzahl an neutrophilen Granulozyten, war auch die Anzahl an, von diesen Zellen gebildeten, NETs in CR2^{-/-}-Thromben reduziert: Mit $48,60 \pm 38,18$ NETs/mm² waren 46,55% weniger

als in Wildtyp-Thromben enthalten ($104,40 \pm 43,65$ NETs/mm²). Dieser Unterschied war zwar nicht statistisch signifikant ($p=0,241$), jedoch mit einer sehr hohen Effektgröße von 1,33 verbunden.

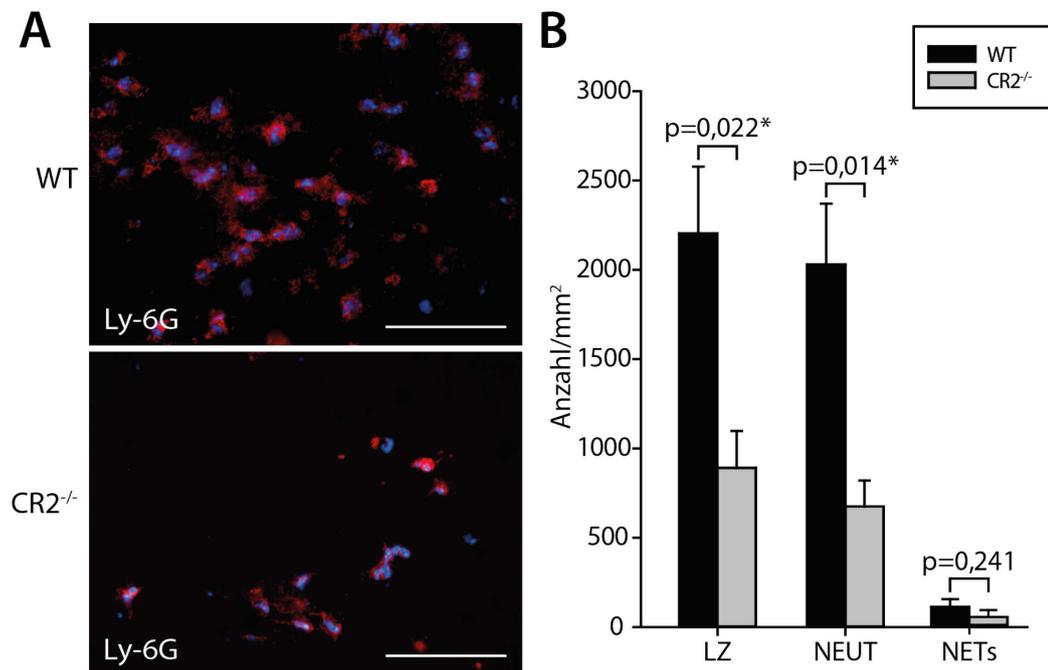


Abbildung 34: Ermittlung der Gesamtleukozyten- und Neutrophilenzahl in C57BL/6J-Wildtyp- ($n=3$) und CR2^{-/-}-Thromben ($n=2$)

- A) Immunhistologische Färbung von Ly-6G sowie DAPI-Kernfärbung in C57BL/6J-Wildtyp- und CR2^{-/-}-Thromben; rot-fluoreszierend=Ly-6G-positive Neutrophile Granulozyten; blau fluoreszierend=Zellkerne der Leukozyten; Maßstab=50µm
- B) Vergleich der Anzahl an Gesamtleukozyten und neutrophilen Granulozyten in C57BL/6J-Wildtyp- und CR2^{-/-}-Thromben (Mittelwerte); LZ=Leukozyten; NEUT=Neutrophile; NETs=Neutrophil extracellular traps; Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung; *=statistisch signifikantes Ergebnis

Tabelle 23: Übersicht des relativen Unterschieds in immunhistologischen Untersuchungen von Thrombozytenfläche, Leukozytenanzahl und NETs des CR2^{-/-}-Stammes zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen

Mausstamm	Relativer Unterschied zur Analyse des Wildtyps in %				Effektgröße			
	CD41	LZ	NEUT	NETs	CD41	LZ	NEUT	NETs
CR2 ^{-/-}	53,05	-59,56	-67,76	-46,55	2,79	4,01	4,68	1,33

Mit Hilfe immunhistologischer Färbungen konnten die im Mausmodell nach 48h entstandenen Thromben außerdem bezüglich der Verteilung an IgG und IgM untersucht werden. Damit sollte ein direkter Zusammenhang zwischen der Ansammlung von Antikörpermolekülen und der Thrombusbildung dargestellt werden. Da die Antikörper-Serumkonzentration in C57BL/6J-Wildtypieren

ähnlich groß ist wie die der CR2^{-/-}-Tiere, CR2^{-/-}-Tiere jedoch trotzdem weniger Thromben entwickeln, erschien dieser Stamm ideal als Vergleichsgruppe: Hier war sicher gestellt, dass die Ansammlung von Antikörpermolekülen nicht direkt proportional zur Serumkonzentration erfolgte, sondern eventuell durch bestimmte Bindungspartner im Gefäß oder im sich entwickelnden Thrombus geleitet wurde. Auf der Suche nach einem Antigen, mit welchem natürliche Antikörper im Geschehen der venösen Thrombose interagieren könnten, schien diese histologische Untersuchung zusätzlich besonders interessant zu sein für den CR2^{-/-}-Stamm.

Aus diesen Gründen wurde die Verteilung von IgG und IgM in C57BL/6J-Wildtyp-Thromben (n=3) mit der in Thromben von CR2^{-/-}-Tieren (n=2) verglichen. Die Ansammlung von IgG- und IgM-Molekülen wurde in aus dem jeweiligen Fluoreszenzsignal ermittelten Grauwerten in einem Grauwert-Mittelwert (Einheit: Grey) dargestellt.

Bezüglich der Ansammlung von IgG und IgM im Gesamtquerschnitt des Thrombus, unterschieden sich die CR2^{-/-}-Thromben nur geringfügig von den Wildtyp-Thromben: Die Auswertung des Gesamtfluoreszenzsignals von IgG-Molekülen lag in Thromben der Wildtyp-Kontrollgruppe bei 705,67±238,83 Grey und in Thromben von CR2^{-/-}-Tieren bei 694,00±134,35 Grey. Der relative Unterschied von nur 1,65% mit einer extrem niedrigen Effektgröße von 0,06 war vernachlässigbar (p=0,955). Für IgM-Moleküle betrug das Fluoreszenzsignal in Wildtyp-Thromben 412,00±205,24 Grey und unterschied sich daher mit 17,96% und einer niedrigen Effektgröße von 0,43 nicht signifikant (p=0,670) von den 338,00±70,71 Grey der CR2^{-/-}-Gruppe.

Hinsichtlich der Lokalisation der Antikörpermoleküle konnte eine starke Assoziation zum Endothel beobachtet werden: In Wildtyp-, wie auch in CR2^{-/-}-Thromben wurde die Innenseite des Gefäßes von einer grün-fluoreszierenden Antikörperschicht bedeckt. Jedoch wiesen CR2-defiziente Mäuse mit einem direkt am Endothel gemessenem Fluoreszenzsignal von 962,50±256,68 Grey für IgG und 514,00±93,34 Grey für IgM dort eine um 53,92 bzw. 63,11% geringere Antikörperansammlung auf, als dies in Wildtypthromben mit einem Fluoreszenzsignal von 2088,67±717,40 Grey für IgG und 1393,33±772,97 Grey für IgM am Endothel der Fall war. Dieser Unterschied war für IgG und IgM mit einer sehr hohen Effektgröße verbunden (IgG:1,86; IgM:1,39), jedoch mit der

verwendeten Tierzahl nicht statistisch signifikant (IgG: $p=0,134$; IgM: $p=0,226$).

Mit Hilfe der Berechnung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensität von IgG bzw. IgM am Endothel zur Fluoreszenzintensität von IgG bzw. IgM im Gesamthrombus, konnte die verminderte Assoziation zum Endothel von IgG und IgM in CR2-defizienten Tieren gut dargestellt werden: In Wildtyptieren war dieses Verhältnis für IgM mit einem Wert von $3,30 \pm 1,09$ um 52,12% größer als das von $1,58 \pm 0,61$ in der CR2^{-/-}-Gruppe, was zwar mit 1,80 eine sehr große Effektgröße aufwies, jedoch mit der verwendeten Tierzahl nicht als statistisch signifikant errechnet werden konnte ($p=0,143$). Für die IgG-Verteilung konnte ein signifikanter Unterschied bestimmt werden ($p=0,044$): Hier war das Verhältnis mit $3,00 \pm 0,42$ in Wildtyptieren um 51,67% größer als ein Verhältnis von $1,45 \pm 0,65$ in CR2^{-/-}-Tieren und mit einer extrem hohen Effektgröße von 3,05 verbunden.

Bei CR2-defizienten Tieren lag demnach, bei gleichbleibender Antikörperansammlung im Gesamthrombus, eine verminderte Assoziation der vorhandenen Antikörpermoleküle zum Endothel und damit eine andere Verteilung von IgG und IgM im Thrombus vor.

Tabelle 24: Übersicht des relativen Unterschieds in immunhistologischen Untersuchungen der Verteilung von IgG und IgM in Thromben des CR2^{-/-}-Stammes zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen

Parameter	Relativer Unterschied zur Analyse des Wildtyps	Effektgröße
IgG Gesamthrombus	-1,65%	0,06
IgG Endothel	-53,92%	1,86
IgG Verhältnis	-51,67%	3,05
IgM Gesamthrombus	-17,96%	0,43
IgM Endothel	-63,11%	1,39
IgM Verhältnis	-52,12%	1,80

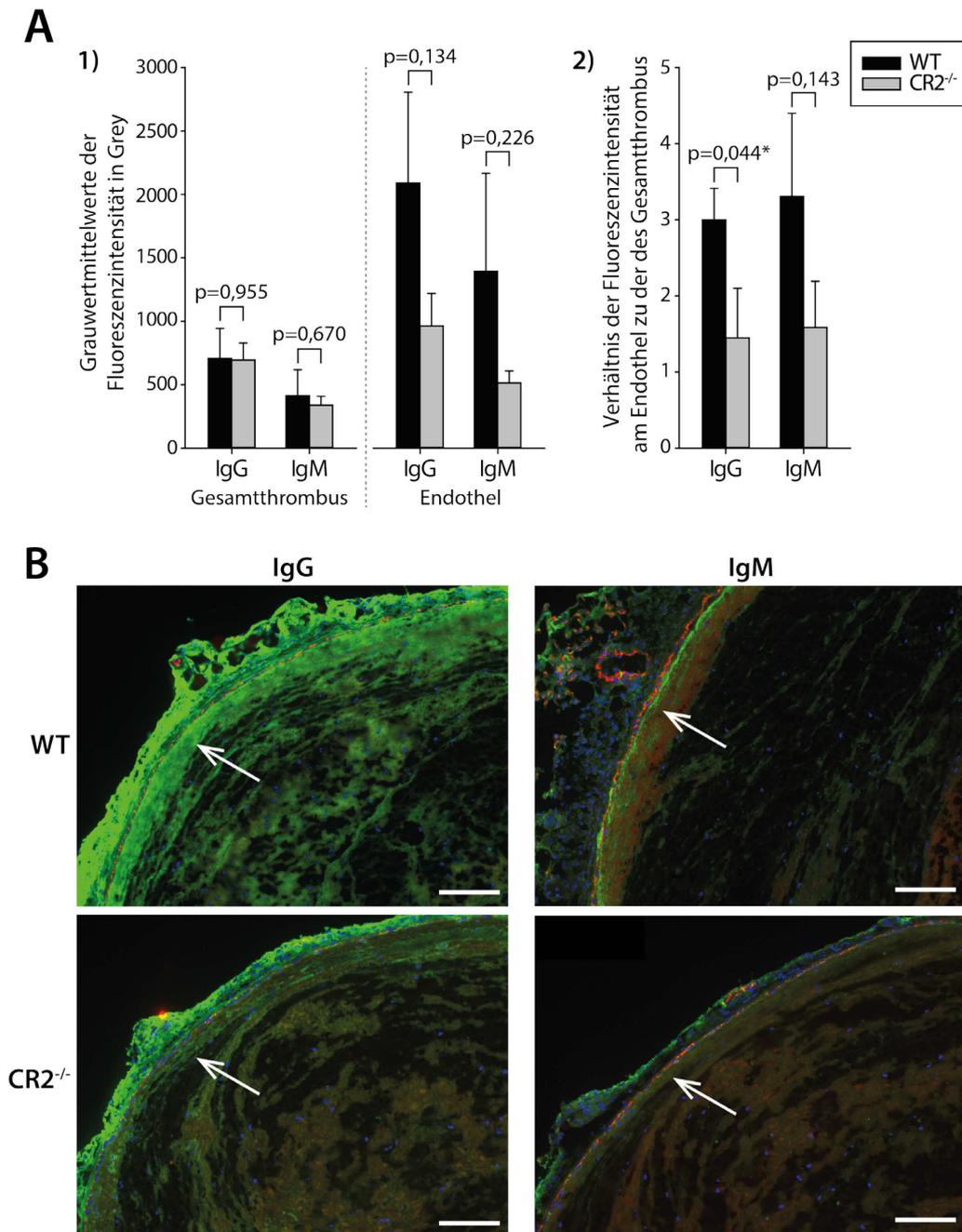


Abbildung 35: Immunhistologische Analyse der IgG- bzw. IgM-Verteilung in Thromben von CR2-defizienten Mäusen (n=2) im Vergleich zu C57BL/6J-Thromben (n=3)

A) 1) Darstellung der in Grauwertmittelwerten gemessenen grünen Fluoreszenzintensität (Grey) im Gesamthrombus (links) und am Endothel (rechts) von C57BL/6J-Wildtyp- bzw. CR2^{-/-}-Thromben

2) Verhältnis der grünen Fluoreszenzintensität am Endothel zu der des Gesamthrombus in C57BL/6J-Wildtyp- bzw. CR2^{-/-}-Thromben

B) Bildaufnahmen der immunhistologischen Färbung; grün fluoreszierend=links IgG bzw. rechts IgM; rot fluoreszierend=Endothelzellen; blau fluoreszierend=Zellkerne; Pfeilspitzen markieren den Bereich am Endothel mit Antikörperansammlung; Maßstab=100μm

VI. DISKUSSION

1. Wahl der Mauslinien

Die Maus als Versuchstier wurde herangezogen, da bei dieser Tierart eine genetische Manipulation leicht möglich ist und innerhalb kurzer Zeit viele Nachkommen mit dem gewünschten Genotyp produziert werden können. Daher stehen von der Maus auch speziell für immunologische Fragestellungen zahlreiche Knockout-Stämme zur Verfügung. Diese sind zum Teil aus Publikationen bekannt, weshalb für dieses Projekt eine gezielte Auswahl möglich war.

Die Linie $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ wurde anderen Stämmen mit Antikörper-Knockout, wie z.B. Rag1- oder Rag2-Knockout-Mäusen vorgezogen, da nur bei dieser Linie ein alleiniges Antikörperdefizit ohne das gleichzeitige Fehlen von B- und T-Lymphozyten vorliegt. So war gewährleistet, dass ein beobachteter Effekt einzig durch die fehlenden Antikörper bedingt war. Auch waren Ergebnisse des $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Doppelknockouts vergleichbar mit den Ergebnissen der Stämme, die nur einen der beiden Knockouts aufwiesen.

Die CR2-defiziente Mauslinie wurde zur Untersuchung des Einflusses natürlicher Antikörper im Geschehen der venösen Thrombose herangezogen. Dieser Mausstamm erschien für diesen Zweck besonders geeignet, da er, bedingt durch das Fehlen des CR2-Rezeptors, ein verändertes Repertoire an natürlichen Antikörpern besitzt^{123,126,127}, gleichzeitig aber normale IgG- und IgM-Serumspiegel aufweist^{123,126}, weshalb er sich für eine Beurteilung des alleinigen Effekts natürlicher Antikörper optimal anbot.

Mit Hilfe des Stammes $Fc\gamma R^{-/-}Fc\gamma RIIB^{-/-}$ war es möglich, den allgemeinen Einfluss von IgG über Fc γ -Rezeptoren auf die TVT zu untersuchen, da in dieser Linie, bedingt durch den Doppelknockout, kein einziger funktioneller Fc γ -Rezeptor mehr vorhanden ist^{102,105,205}.

Da die verwendeten Knockout-Linien alle auf einem C57BL/6J-Hintergrund gezüchtet wurden, konnte der Stamm C57BL/6J als Wildtypstamm für die Kontrollgruppen eingesetzt werden. Die C57BL/6J-Linie ist eine in der Forschung häufig eingesetzte und sehr gut charakterisierte Linie. Für das Vena-cava-

Stenosemodell, das auch dieser Arbeit zugrunde liegt, wurde sie schon häufig verwendet, wodurch eine gewisse methodische Sicherheit und Vergleichbarkeit gegeben war.

2. Stenosemodell

Das verwendete Mausmodell ist gut geeignet, die initialen auslösenden Mechanismen im Geschehen der TVT zu analysieren⁸⁶. Mit Hilfe dieses Modells konnte bereits gezeigt werden, dass eine Entzündungsreaktion notwendig ist, um das Gerinnungssystem zu aktivieren, was schließlich zur Ausbildung eines okkludierenden Thrombus führt¹. Auf zellulärer Ebene kommt der Interaktion von Thrombozyten mit Monozyten und neutrophilen Granulozyten dabei eine Schlüsselrolle zu. Thrombozyten sind hierbei nicht nur wichtig für die Rekrutierung von Monozyten, welche über bereitgestellten TF den extrinsischen Gerinnungsweg aktivieren, sondern auch für die Ausbildung von NETs, welche den intrinsischen Gerinnungsweg in Gang setzen¹. Die molekularen Prozesse und insbesondere die Bedeutung des adaptiven Immunsystems beim Prozess der venösen Thrombose sind jedoch weitgehend unbekannt, weshalb in der vorliegenden Arbeit das etablierte Stenosemodell erneut herangezogen wurde, um zu untersuchen, ob Antikörper in dieser Entstehungsphase der venösen Thrombose beteiligt sind.

Mit Hilfe der Standardisierung des Modells konnte sichergestellt werden, dass bezüglich der Operationsmethode für jede untersuchte Gruppe gleiche Bedingungen herrschten und dass außerdem die Thrombusbildung allein durch eine Blutstase und nicht durch eine Gefäßverletzung verursacht wurde. Demnach imitiert dieses Modell genau die sehr häufig in humanen Patienten vorliegenden Bedingungen für das Entstehen einer TVT: Ein zunächst unvollständiger Venenverschluss mit Blutstase und Restfluss, wodurch ein typischer laminarer Thrombus entsteht^{1,22}.

3. Spezifischer Einfluss von Antikörpern auf die Ausbildung venöser Thromben

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit im Sinne einer Orientierungsstudie gewonnenen Daten, kann davon ausgegangen werden, dass Antikörper einen spezifischen Einfluss auf die Entstehung venöser Thromben haben:

Ein kompletter Antikörper-Knockout führte zu nahezu absenter Thrombusbildung, wohingegen die Überexpression von IgM in AID^{-/-}-Mäusen eine stärkere Thrombusbildung mit einer hohen Effektgröße zur Folge hatte. Darüber hinaus führte die Rekonstitution von komplett Antikörper-defizienten Mäusen mit polyklonalem murinem IgG zu einem Wiederauftreten venöser Thromben, was den spezifischen Effekt von Antikörpermolekülen auf die Thrombusentstehung bestätigt.

Da sich bei einer alleinigen Anwesenheit von IgM wie auch bei einem IgM-Knockout trotzdem noch Thromben entwickelten und sich die Thrombusbildung erst bei einem Fehlen aller Immunoglobulinklassen dramatisch reduzierte, scheinen sowohl IgG als auch IgM die Entstehung der TVT zu beeinflussen. Jedoch konnte mit Hilfe der Bestimmung der Antikörperkonzentration im Serum der einzelnen Antikörper-Knockout-Mausstämme einzig eine starke Korrelation des Thrombusgewichts mit dem IgM-Spiegel festgestellt werden. Der IgG-Serumspiegel zeigte, bedingt durch die unerwartet hohen IgG-Gehalte in sIgM^{-/-}-Mäusen sowie durch das Knockout-bedingte Fehlen von IgG in AID^{-/-}-Tieren, keine Korrelation mit dem Thrombusgewicht. Auch der Gesamtantikörper-Gehalt korrelierte nur schwach mit der Ausbildung von Thromben. Außerdem zeigten Wildtyp-Mäuse, die 48h nach Ligatur Thromben entwickelt hatten, im ELISA signifikant reduzierte IgM-Serumspiegel bei unveränderten IgG-Spiegeln, was durch eine IgM-Anreicherung an der Stelle der Thrombusentstehung bedingt sein kann. Anhand dieser Ergebnisse kann zum einen bestätigt werden, dass Antikörper einen extrem starken Einfluss auf die Entstehung venöser Thromben haben, zum anderen sind sie hinweisend darauf, dass dieser Effekt hauptsächlich auf IgM zurückzuführen ist. Diese Immunoglobulinklasse ist in Wildtyp-Mäusen vertreten sowie in AID^{-/-}-Mäusen stark überexprimiert. Die Tatsache, dass aber auch IgM-Knockout-Mäuse sowie mit IgG substituierte Mäuse Thromben entwickelten, kann damit zusammenhängen, dass bestimmte IgG-Moleküle unspezifisch mit den Bindungsstellen der eigentlich auslösenden IgM-Moleküle interagieren und ebenfalls eine Thrombusbildung triggern. Dieser Effekt ist jedoch bei einem Fehlen der wesentlich stärker thrombogenen IgM vermindert – was sich durch die im Vergleich zum Wildtyp etwas geringeren Thrombusgewichte in sIgM^{-/-}-Mäusen wie auch in mit polyklonalem IgG substituierten sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Mäusen äußert.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde hauptsächlich auf den Einfluss der Immunoglobulinklassen IgG und IgM eingegangen: IgG als Hauptantikörper des Serums sowie der sekundären Immunreaktion und IgM als Ursprung der spezifischen Immunantwort wie auch Haupt-Immunoglobulinklasse natürlicher Antikörper^{94,98}. Antikörper dieser beiden Antikörperklassen konnten bereits als Initiatoren verschiedener pathologischer Prozesse identifiziert werden. So spielen IgM eine große Rolle bei der Auslösung der Entzündungsreaktion im Zuge von Ischämie-Reperfusionsschäden (IRS)^{137,141} und die bei APS-Patienten für eine Erkrankung relevanten aPL-Antikörper stammen primär aus der Klasse IgG – wie wichtig IgM und IgA dabei sind, ist strittig²¹⁶. Bei der monoklonalen Gammopathie MGUS steht IgG im Zusammenhang mit der Auslösung venöser Thrombose, aber auch von IgA wird bei dieser Erkrankung eine Verbindung mit der Entstehung venöser Thromben angenommen³. Deshalb kann, trotz einer geringen Serumkonzentration und Hauptfunktion in der Schleimhautimmunität⁹⁴, eine Beteiligung von IgA im Prozess der TVT nicht völlig ausgeschlossen werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Näher auf IgE und IgD einzugehen, erschien aufgrund ihrer spezifischen Funktion und ihren geringen Serumspiegeln bei hauptsächlich lokaler Verteilung^{94,98} für dieses Projekt von untergeordneter Bedeutung.

Bei den beobachteten Veränderungen im weißen Blutbild der Stämme $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$, $sIgM^{-/-}$ und $AID^{-/-}$ ist, trotz einer hohen Relevanz von Leukozyten für die Entstehung einer TVT, eine positive oder negative Beeinflussung der Ausbildung venöser Thromben im verwendeten Modell sehr unwahrscheinlich. Die signifikante Erhöhung aller Leukozyten-Subpopulationen in $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Tieren mit extrem hohen Effektgrößen könnte lediglich zu einer stärkeren Thrombusbildung beitragen, was hinsichtlich eines äußerst geringen Thrombusgewichts und –inzidenz der Gruppe jedoch nicht gegeben zu sein scheint. In $AID^{-/-}$ -Tieren könnte die signifikante Erhöhung von Monozyten und Granulozyten mit extrem hohen Effektgrößen tatsächlich einen Einfluss auf das hohe Thrombusgewicht und –inzidenz dieser Gruppe haben, was aber im Vergleich zur $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Gruppe – bei welcher eine ähnliche Erhöhung keinen Einfluss zu haben scheint – relativiert wird. Demnach scheint die An- oder Abwesenheit von Antikörpermolekülen für die Thrombusbildung ausschlaggebender zu sein als Veränderungen im weißen Blutbild.

Die beobachtete verminderte Anzahl an Blutplättchen in den Stämmen $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$, $AID^{-/-}$ und $sIgM^{-/-}$ könnte theoretisch eine verminderte Thrombusbildung bedingen, da diese Zellen im Geschehen der venösen Thrombose maßgeblich beteiligt sind. Diese Blutbildveränderung sollte jedoch im Zusammenhang mit dem Gesamtbild gesehen werden. Und hier wird deutlich, dass die Entstehung einer venösen Thrombose vielmehr durch die in $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Tieren fehlenden bzw. in $AID^{-/-}$ -Tieren überexprimierten Antikörper bedingt ist wie auch durch eine Antikörpersubstitution in $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Tiere ausgelöst werden kann. Bei einem starken Einfluss der reduzierten Thrombozytenzahl, wäre in $AID^{-/-}$ -Tieren sowie in substituierten $sIgM^{-/-}AID^{-/-}$ -Tieren keine normale oder gar gesteigerte Thrombusbildung zu erwarten. Diese Ergebnisse relativieren den Thrombozytenmangel hinsichtlich der Entstehung venöser Thromben und zeigen, dass dieser keinen ausschlaggebenden Effekt haben kann.

4. Mechanismen der Antikörper-abhängigen Thrombusentstehung

4.1. Abhängigkeit der venösen Thrombusbildung von Antikörper-bedingter Zell-Rekrutierung und Fibrinbildung

VON BRÜHL et al. konnten zeigen, dass besonders die Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten, aber auch eine Thrombozytenrekrutierung in den ersten sechs Stunden der Thrombusentstehung essenziell ist für die Entwicklung einer TVT¹. Außerdem ist die Monozyten-induzierte Fibrinbildung von größter Bedeutung für die Ausbildung stabiler venöser Thromben¹. Da ein komplettes Antikörperdefizit sowie das Fehlen natürlicher Antikörper in CR2-defizienten Tieren die Thrombusentstehung annähernd vollständig verhindert, wurde die Interaktion von Antikörpern mit der Zellrekrutierung sowie der Fibrinbildung analysiert.

Die Untersuchung von FcγR-defizienten Mäusen ergab, dass eine direkte Interaktion von Antikörpern mit Fcγ-Rezeptoren der, im Geschehen der venösen Thrombose beteiligten, Leukozyten wohl nicht Bestandteil des Antikörper-abhängigen Entstehungsmechanismus von TVT ist. Der Einfluss von Fc-Rezeptoren für IgM war nicht Bestandteil der Untersuchungen, weshalb die Beeinflussung der venösen Thrombose durch diese Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden kann. Allerdings ist nicht ganz klar, inwiefern IgM-Fc-

Rezeptoren für die Beeinflussung direkt beteiligter Zellen im Geschehen der TVT, wie Neutrophile und Monozyten, relevant sind. Ihr Vorkommen auf Granulozyten, Monozyten und Makrophagen wird immer noch kontrovers diskutiert¹¹¹⁻¹¹⁴, darum ist ein direkter Einfluss von IgM-Fc-Rezeptoren auf die rekrutierten Leukozyten schwer zu überprüfen. Sicher ist dagegen die Expression von IgM-Fc-Rezeptoren auf B-Zellen, aber Lymphozyten sind im murinen TVT-Modell nicht am lokalen Entzündungsprozess beteiligt¹, weshalb ein Einfluss auf ihre Rekrutierung irrelevant ist. Möglicherweise sind B-Zell-IgM-Fc-Rezeptoren aber ausschlaggebend für die, die TVT-beeinflussende, Antikörperproduktion.

Bei Untersuchungen zur Leukozytenrekrutierung konnte mit Hilfe der intravitalmikroskopischen Aufnahmen von sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Mäusen generell ein ausschlaggebender Einfluss von Antikörpern auf die initiale Leukozytenrekrutierung ausgeschlossen werden. In den ersten fünf Stunden zeigten die Antikörper-defizienten Mäuse, verglichen mit dem Wildtyp, zwar eine mit mittleren bis hohen Effektgrößen teilweise deutlich verminderte Leukozytenakkumulierung am Endothel, zum Zeitpunkt 6h glich sich diese allerdings so stark an den Wert des Wildtyps an, dass davon ausgegangen werden muss, dass eine Antikörperdefizienz zwar zu einer anfänglichen Verzögerung in der Rekrutierung weißer Blutzellen führt, diese langfristig jedoch nicht so stark reduziert, um für die enorm verringerte Ausbildung venöser Thromben in sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Tieren verantwortlich zu sein.

Gleichzeitig sollte die Leukozytenakkumulierung in nach 48h entnommenen Thromben immunhistologisch untersucht werden. Mit einer Thrombusanzahl von n=1 stand von sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Tieren keine für eine histologische Auswertung ausreichende Menge an Thromben zur Verfügung. Allerdings konnten, um den Einfluss natürlicher Antikörper auf die Leukozytenakkumulation zu untersuchen, CR2^{-/-}-Thromben verwendet werden. Hier wurde eine starke Reduktion an Leukozyten und insbesondere an Neutrophilen nachgewiesen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in der venösen Thrombose beteiligte Antikörper zwar initial keine verminderte Leukozyten-Rekrutierung verursachen, aber essenziell sind für die spätere Akkumulierung von Neutrophilen und die Ausbildung von NETs im Thrombus. Diese beiden Faktoren sind entscheidend an der venösen Thrombusbildung beteiligt, da sowohl eine Depletion von Neutrophilen als auch die Auflösung von NETs durch DNase die Thrombusbildung verringert¹.

Ähnliche Ergebnisse konnten in der Dissertation von FIOLA für die Komplementkomponente C4 erhoben werden: Auch hier wurde in intravitalmikroskopischen Aufnahmen der ersten sechs Stunden kaum ein Einfluss auf die Leukozytenrekrutierung entdeckt, jedoch über 48h eine signifikant verminderte Leukozyten-Anreicherung in aus C4-Knockout-Mäusen gewonnenen Thromben festgestellt².

Eventuell findet folglich eine Interaktion von Antikörpern mit dem Komplementsystem und über den klassischen oder Lektin-Weg speziell mit der Komponente C4 statt. Eine Aktivierung des Komplementsystems führt zur Produktion von Leukozyten-anlockenden Chemokinen, was zwar nicht für die initiale Leukozytenrekrutierung relevant ist, aber über 48h zu einer verminderten Leukozytenanreicherung in venösen Thromben führt.

Anders verhält es sich bei der Rekrutierung von Thrombozyten: Hier scheint bei Antikörper-defizienten Mäusen schon initial ein, für die verminderte Entstehung venöser Thromben relevantes Defizit vorzuliegen. Dies wurde in intravitalmikroskopischen Analysen mit einer verminderten Anzahl adhärenter Thrombozyten ab einem Zeitpunkt von 4h nach Ligatur der Vena cava caudalis deutlich und dauerte bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt von 6h an. Ein Zusammenhang mit der verminderten Anzahl an Plättchen im Blut des Mausstammes ist in diesem Versuchsaufbau ausgeschlossen, da die Thrombozyten von einem Spendertier isoliert und jedem Versuchstier - auch dem Wildtyp - in derselben Menge verabreicht wurden.

Wie können aber nun Antikörper die Plättchen-Rekrutierung beeinflussen? Eine direkte Interaktion von Antikörpermolekülen mit Thrombozyten ist nur von humanen Plättchen bekannt: Diese können über ihren Fc γ IIA-Rezeptor an IgG-Immunkomplexe binden und aktiviert werden²¹⁷. Da die Maus aber keinen Fc γ IIA-Rezeptor besitzt^{104,106} und auch kein vergleichbarer Fc-Rezeptor auf murinen Plättchen aus der Literatur bekannt ist, scheint diese Möglichkeit der direkten Interaktion ausgeschlossen. Allerdings wird beim Antiphospholipid-Syndrom vermutet, dass aPL-Antikörper direkt mit Phospholipiden der Plättchen-Oberfläche interagieren und darüber in der Lage sind, die Plättchen-Aktivierung und -Aggregation zu fördern^{5,218-221}, was auch für relevante Antikörper in der venösen Thrombose der Fall sein könnte. Daneben existiert die Möglichkeit der indirekten Interaktion von Antikörpern und Thrombozyten – und zwar über die

Aktivierung des Komplementsystems: Antigen-gebundene Antikörpermoleküle können die Komplementkaskade einleiten und dadurch die Produktion aktiver Spaltprodukte sowie des terminalen MAK bedingen. Die Einlagerung des terminalen sublytischen C5b-9-Komplexes in die Zellmembran von Blutplättchen sowie eine Interaktion mit C1q, C3a oder C3b bewirkt deren Aktivierung und Aggregation^{177,178,180-182,222}. Für aPL-Antikörper in Patienten mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) wurde gezeigt, dass sie die klassische Komplementaktivierung und die C4d-Ablagerung auf Plättchen unterstützen. Dies war mit dem Auftreten venöser Thrombose assoziiert²²³. In der Dissertation von FIOLA konnte allerdings für Mäuse mit einem Knockout der Komplementkomponente C4 mit Hilfe intravitalmikroskopischer Untersuchungen im TVT-Mausmodell keine Reduktion der Plättchenanzahl festgestellt werden². Daher kann ein Komplement-abhängiger Einfluss von Antikörpern auf die Plättchenrekrutierung nicht allein abhängig sein von C4 und der weiteren Aktivierung der Komplementkaskade über den klassischen oder den Lektin-Weg. Eventuell wird die Thrombozytenrekrutierung durch eine direkte Interaktion der Plättchen mit C1q, eine Aktivierung des alternativen Wegs oder einen Synergismus mehrerer Komplementkomponenten beeinflusst. Die genauen Zusammenhänge müssen zukünftig über die intravitalmikroskopische Analyse weiterer Komplement-Knockout-Mausstämme herausgefunden werden.

Neben der Zell-Rekrutierung ist die Aktivierung der Gerinnungskaskade entscheidend für die Ausbildung eines okkludierenden venösen Thrombus. Auch auf diesen Mechanismus nehmen Antikörper Einfluss. Thrombelastometrische Untersuchungen des Blutes von Mäusen mit komplettem Antikörper-Knockout (sIgM^{-/-}AID^{-/-}) sowie von CR2-defizienten Mäusen zeigten in EXTEM-Analysen verlängerte Gerinnselbildungszeiten. Die maximale Gerinnselhaftigkeit war besonders in FIBTEM-Untersuchungen vermindert: In sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Tieren zwar nicht statistisch signifikant, aber mit einer sehr hohen Effektgröße verbunden, in CR2^{-/-}-Tieren hoch signifikant. Zusätzlich war die maximale Lyse des Gerinnsels nach 30 Minuten in FIBTEM-Tests von sIgM^{-/-}AID^{-/-}-Mäusen stark erhöht.

Allgemein vermindert ein quantitativer Mangel oder eine qualitative Funktionsstörung der Faktoren Fibrinogen, FXIII und Thrombozyten die Stabilität des Gerinnsels und damit den MCF-Wert²⁰⁸. Der Vergleich von EXTEM- und FIBTEM-Analyse ermöglicht die Aussage, dass die veränderten Parameter sehr

wahrscheinlich auf eine gestörte plasmatische Gerinnung und damit auf die Faktoren Fibrinogen und FXIII zurückzuführen sind, da sie selbst dann bzw. sogar stärker ausgeprägt sind, wenn die im Blut vorhandenen Thrombozyten mit dem FIBTEM-Reagenz gehemmt werden.

Es scheint also, dass Antikörper die Fibrinbildung und –stabilisierung unterstützen. Dabei kann es sich nur um Antikörper handeln, welche auch in den mit normalen IgG- und IgM-Serumspiegeln ausgestatteten CR2^{-/-}-Tieren fehlen: Natürliche Antikörper. Eine gestörte Fibrinbildung könnte auch einen weiteren Beitrag zu der so enorm verminderten Bildung venöser Thromben in sIgM^{-/-}AID^{-/-}- und CR2^{-/-}-Tieren leisten, da für deren Entstehen eine massive Fibrinbildung nötig ist¹.

Offen bleibt die Frage, mit welchen molekularen Mechanismen Antikörper die Fibrinbildung beeinflussen. Ein durch den Antikörper-Knockout bedingter quantitativer oder qualitativer Mangel an Fibrinogen oder des zur Vernetzung von Fibrin nötigen FXIII, würde für einen Einfluss von Antikörpermolekülen auf deren Bildung in der Leber bzw. für einen danach stattfindenden Antikörper-abhängigen Schutz vor Abbau sprechen. Dafür gibt es jedoch in der Literatur keine Hinweise. Direkte Interaktionen von Antikörpern mit Fibrinbildung und Fibrinolyse werden beim Antiphospholipid-Syndrom vermutet: Zum einen wurde beschrieben, dass bei diesem Syndrom vorkommende Anti-Prothrombin-Antikörper mit Prothrombin interagieren können und dadurch eine Thrombin-ähnliche Aktivität katalysieren. Dies hätte einen direkten prokoagulatorischen Effekt mit vermehrter Fibrin-Bildung zur Folge¹⁹⁵. Zum anderen gibt es mehrere Untersuchungen dazu, dass aPL-Antikörper die Fibrinolyse hemmen und dadurch zu einem prokoagulatorischen Zustand beitragen. Für den zugrunde liegenden Mechanismus gibt es mehrere Ansätze²²⁴: Direkte und indirekte Interaktionen der Antikörper mit Plasminogen, Plasminogen-Aktivatoren, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor I sowie mit Plasmin konnten gezeigt werden²²⁵⁻²²⁷. Außerdem wird vermutet, dass ein engmaschigeres Fibrinnetz Thromben in APS-Patienten weniger durchlässig für fibrinolytische Faktoren macht. Diese veränderte Fibrinstruktur kann durch erhöhte Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Spiegel, veränderte Spiegel an Fibrinogen-Bindeproteinen sowie vermehrte FXIII-Aktivität bedingt sein²²⁸. Zusätzlich sollen aPL-Antikörper natürliche Antikoagulanzen wie TFPI, Protein C und Annexin A5 inaktivieren^{5,224}. Ein

Mechanismus, der speziell die Fibrinbildung im Geschehen der TVT beeinträchtigt, könnte natürlich auch die TF-Bereitstellung bzw. -Aktivierung auf Monozyten betreffen, da monozytär bereitgestellter TF die Hauptquelle für die Fibrinbildung bei der Entstehung venöser Thromben darstellt¹. Hinweise für eine Antikörper-abhängige Aktivierung des TF-entschlüsselnden Enzyms PDI gibt es zwar²²⁹, dies kann jedoch in den thrombelastometrischen Untersuchungen, die den Ergebnissen dieser Arbeit zugrunde liegen, ausgeschlossen werden: Hier wird schon mit den verwendeten Reagenzien TF hinzugefügt und dadurch die Gerinnung in Gang gesetzt, weshalb ein direkter Einfluss von Antikörpern auf die TF-Aktivierung unwahrscheinlich ist.

4.2. Abhängigkeit der venösen Thrombusbildung von der Interaktion von Antikörpern mit Antigenen

Weiterhin stellte sich die Frage, wie an der Initiierung der TVT beteiligte Antikörper an den Ort des Geschehens der venösen Thrombose gelangen. Einerseits kann rein durch die Flussverlangsamung und Blutstauung eine lokalisierte starke Antikörperansammlung auftreten, bei der die Antikörpermoleküle überhaupt nicht oder unspezifisch binden. Andererseits besteht jedoch auch die Möglichkeit einer gezielten spezifischen Interaktion von Antikörpern mit Antigenen, welche erst bei der Initiierung der venösen Thrombose exprimiert werden.

Um dies zu eruieren, wurden Antikörper-defiziente Mäuse mit den zwei verschiedenen antiviralen Antikörpern anti-gp120 (IgG1) und anti-Influenza A (IgG2a) substituiert, welche in der Maus mangels des relevanten Antigens nicht spezifisch binden können. Da in beiden Versuchsgruppen wieder eine „normale“, den Wildtyptieren entsprechende, Thrombusbildung auftrat, kann geschlossen werden, dass antivirale IgG-Antikörper auch ohne spezifische Antigen-Bindung in der Lage sind, die Entstehung venöser Thromben auszulösen. Ob diese Antikörper dabei unspezifisch mit Antigenen interagierten oder allein ihre Anwesenheit im gestauten Blutstrom ausreichte ist ungeklärt.

Gleichzeitig wurde der Effekt von natürlichen Antikörpern auf die TVT untersucht, da von Ischämie-Reperfusionsschäden (IRS) eine Interaktion ebendieser natürlichen Antikörper mit von hypoxischem Endothel exprimierten Antigenen bekannt ist. Der CR2-defiziente Mausstamm erschien dafür perfekt

geeignet, da er, bedingt durch den CR2-Knockout, ein partielles Defizit an CD5+ peritonealen B1-Zellen und dadurch ein verändertes Repertoire an natürlichen Antikörpern aufweist, gleichzeitig aber normale Antikörperserumspiegel besitzt¹²³. Mit den Daten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein CR2-Knockout zu einer signifikant verminderten Ausbildung venöser Thromben führt. In der immunhistologischen Untersuchung von aus dem TVT-Mausmodell gewonnenen Wildtyp-Thromben konnte eine Assoziation der IgG- und IgM-Moleküle zum Endothel beobachtet werden, was auch aus dem Verteilungsverhältnis der Antikörper am Endothel zur Gesamtantikörpermenge hervorging. Dieses Verteilungsverhältnis war in CR2-defizienten Mäusen verändert, sodass davon ausgegangen werden muss, dass in diesem Stamm eine stark verminderte Anlagerung von IgG- und IgM-Molekülen ans Endothel erfolgte. Da in CR2-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp hauptsächlich die Produktion natürlicher Antikörper verändert ist und physiologische Antikörperserumspiegel vorliegen, ist eine logische Konsequenz, dass die in diesem Stamm auf dem Endothel fehlenden Antikörper vor allem aus natürlichen Antikörpern bestehen. Im Einklang mit der stark reduzierten Thrombusbildung in CR2^{-/-}-Mäusen weist dies darauf hin, dass die Bindung von natürlichen Antikörpern ans Endothel eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung venöser Thromben ist.

Hinweise für die Beteiligung von natürlichen Antikörpern in pathologischen, hypoxischen Prozessen liefern Untersuchungen der Entstehungsmechanismen von IRS. Kernhaltige Zellen sind hoch sensitiv gegenüber Sauerstoffunterversorgung, weshalb ischämische Zustände zu einer massiven Zellschädigung mit nachfolgender Entzündungsreaktion führen¹⁴². Deshalb wird als ein Ausgangspunkt der Entstehung von IRS eine Hypoxie-bedingte Endothelzellschädigung und -aktivierung angenommen¹³⁷, was sich mit dem vermuteten Entstehungsmechanismus der tiefen Venenthrombose deckt (siehe Punkt II.1.4.2.1.). Sauerstoff-unterversorgte Endothelzellen erfahren eine Membran-Schädigung, welche zur Bildung und Freisetzung von neuen Produkten und zur Expression von neuen antigenen Determinanten auf ihrer Oberfläche führt^{137,138}. Dies erleichtert möglicherweise die Bindung von zirkulierenden Antikörpern an neu exprimierte Antigene¹³⁷. Tatsächlich konnten ZHANG et al. mit CM22 einen natürlich vorkommenden pathogenen IgM-Klon und mit

nonmuscle Myosin heavy chain Typ II A und C das zugehörige Antigen auf dem Endothel identifizieren, welche zur Auslösung von IRS führten^{141,142}. Daneben konnten jedoch auch andere potentielle Antigene beschrieben werden: FLEMING et al. beobachteten, dass es im intestinalen Gewebe zu einer vermehrten Phospholipid-Bindung von β 2-GPI an ischämische Membranen kommt²³⁰. In einem intestinalen IRS-Modell wurde festgestellt, dass IgG-Antikörper gegen Phospholipide und an Phospholipid bindendes β 2-GPI die IR-bedingten Gewebeschäden auslösen können²³⁰. Peptide, die mit β 2-GPI um die Bindung an Phospholipiden konkurrierten, waren in der Lage, den induzierten Gewebeschaden im Wildtyp zu vermindern²³¹. Da allen bisher identifizierten möglichen Zielantigenen gemeinsam ist, dass sie an Phosphatidylserin binden können, schlägt FLEMING vor, dass ischämische Veränderungen zu einer Verlagerung des Phosphatidylserins der inneren zur äußeren Zellmembran führen und an IRS beteiligte natürliche Antikörper allgemein Proteine binden, die mit Phosphatidylserin assoziiert sind²³². Es könnte jedoch auch sein, dass beteiligte Antigene infolge der Ischämie nicht erst an der Zelloberfläche exprimiert werden, sondern ständig dort vorhanden sind und vielmehr in ihrer Konformation oder biochemisch verändert werden, weshalb sie dann von pathogenen Antikörpern gebunden werden können. Dies wird von CINES et al. für die aPL-Interaktion mit β 2-GPI in APS-Patienten vorgeschlagen. Die Konformationsveränderung kann durch oxidativen Stress oder bestimmte freigesetzte Proteine ausgelöst werden²⁰⁰.

Mit welchem Antigen die Endothel-assoziierten natürlichen Antikörper bei der TVT interagieren, ist ungeklärt. Da die auslösende Komponente der TVT – Hypoxie - mit der von IRS übereinstimmt und genau wie in IRS natürliche Antikörper beteiligt zu sein scheinen, könnte ein bereits für IRS identifiziertes Antigen, wie nonmuscle Myosin oder Phospholipide und β 2-GPI, in Frage kommen.

Wie steht das aber nun im Zusammenhang mit dem zuvor beobachteten Effekt auf die Thrombusbildung von viralen Antikörpern, welche nicht spezifisch an ein Antigen binden können? Eine unspezifische Interaktion mit Zielstrukturen von natürlichen Antikörpern wird hier als sehr wahrscheinlich erachtet. Natürliche Antikörper besitzen auch eine Funktion in der Immunabwehr und können hoch konservierte Strukturen in verschiedenen Pathogenen erkennen¹¹⁵. Gerade von Influenza-Viren ist bekannt, dass sie im Körper von natürlichen Antikörpern

erkannt und gebunden werden können^{233,234}. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass spezifisch gegen Influenza-Viren gebildete Antikörper (wie das in den hier vorliegenden Versuchen verwendete IgG) ähnliche Epitope binden können wie natürliche Antikörper und deshalb mit deren Zielstrukturen kreuzreagieren. Alternativ könnte es sich um einen Prozess mit geteilten Mechanismen handeln: Natürliche Antikörper binden spezifisch an ein Antigen und induzieren die TVT über die Komplementaktivierung und Zellrekrutierung. Parallel dazu kann eine unspezifische Antikörperbindung das entstehende Fibrinnetzwerk stabilisieren.

Zusammenfassend muss durch die erhobenen Daten davon ausgegangen werden, dass Antikörpermoleküle und speziell natürliche IgM die Entstehung einer TVT maßgeblich beeinflussen. Die zugrunde liegenden Mechanismen konnten bereits in Ansätzen aufgeklärt werden. Ein möglicher Gesamtmechanismus, den es zu überprüfen gilt, wäre, dass natürliche Antikörpermoleküle mit auf dem hypoxischen Endothel neu exprimierten Antigenen interagieren. Durch die Antigen-Antikörper-Bindung kann das Komplementsystem aktiviert werden, welches die Akkumulation von Thrombozyten und Leukozyten beeinflusst. Die Antikörpermoleküle alleine unterstützen die Fibrinbildung und hemmen die Fibrinolyse auf eine bisher unbekannte, jedoch TF-unabhängige Weise.

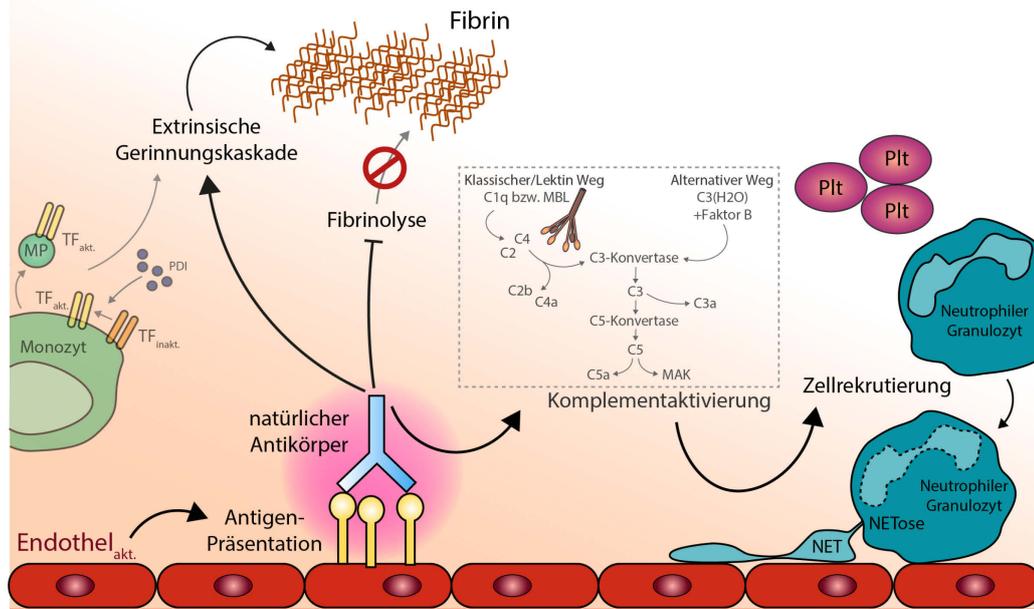


Abbildung 36: Vermuteter Mechanismus der Antikörper-abhängigen TVT-Entstehung

Das durch die Hypoxie aktivierte Endothel (=Endothel akt.) exprimiert Antigene auf seiner Oberfläche, an welche die in der TVT beteiligten natürlichen Antikörper binden können; diese aktivieren einerseits (links) die Fibrinbildung über den extrinsischen Weg der Gerinnung, jedoch unabhängig von der TF-Aktivierung und hemmen die Fibrinolyse; andererseits (rechts) verstärken sie über die Aktivierung des Komplementsystems die Rekrutierung der für die TVT nötigen Plättchen (=Plt) und neutrophilen Granulozyten und auf diese Weise auch die NETose

5. Ausblick

Die Identifizierung bestimmter auslösender Antikörper und ihrer Bindungspartner im Geschehen der venösen Thrombose könnte einen wichtigen neuen Ansatzpunkt in Prävention und Therapie tiefer Venenthrombosen darstellen. Die spezifische Blockierung der Antigenbindung natürlicher Antikörper verhinderte im Mausmodell von IRS zuverlässig das Entstehen von Schäden^{142,235}. Eine ähnliche protektive Funktion solcher Peptide im Mausmodell der TVT und die Anwendbarkeit in humanen Patienten würden einen neuen therapeutischen Ansatz darstellen, zukünftig die Entstehung tiefer Venenthrombosen einzudämmen.

Darüber hinaus hätte die Präsenz bestimmter auslösender Antikörperpopulationen in Patienten möglicherweise auch eine prognostische Aussagekraft hinsichtlich der Entwicklung venöser Thromben.

Um diesem Ziel näher zu kommen, muss das für die TVT relevante Antigen identifiziert und überprüft werden, ob es wirklich auf dem Endothel exprimiert wird. Außerdem gilt es herauszufinden, ob eine Interaktion mit dem

Komplementsystem für die Zellrekrutierung nötig ist und wie genau die Interaktion mit der Fibrinbildung erfolgt, da auch ein Verständnis dieser Zusammenhänge neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen kann.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Antikörper als neue Faktoren im immunologischen Prozess der venösen Thrombose

Die tiefe Venenthrombose (TVT) entsteht nicht allein durch eine pathologische Blutgerinnung, sondern wird primär durch eine Entzündungsreaktion mit massiver Rekrutierung von Zellen der unspezifischen Immunabwehr ausgelöst. In der vorliegenden Dissertation wurde, mit Hilfe eines etablierten Mausmodells zur Untersuchung der zellulären und molekularen Entstehungsmechanismen der tiefen Venenthrombose (TVT), der Einfluss von Antikörpermolekülen auf die Bildung venöser Thromben untersucht - einer weiteren wichtigen Komponente in immunologischen Prozessen und bekannter Auslöser verschiedener pathologischer Geschehen.

Dabei stellte sich heraus, dass Antikörpermoleküle die Entstehung venöser Thromben im Mausmodell beeinflussen: In Mäusen ohne Antikörper war die Thrombusbildung massiv beeinträchtigt und konnte durch Antikörper-Substitution wiederhergestellt werden. Es wurde eine starke Korrelation zwischen IgM-Serumspiegel und Thrombusgewicht sowie eine Beteiligung natürlicher Antikörper festgestellt. Die zugrunde liegenden Mechanismen konnten bereits in Ansätzen aufgeklärt werden: Beteiligte Antikörpermoleküle scheinen an Strukturen des hypoxischen Endothels zu binden und Einfluss zu nehmen auf die initiale Thrombozytenrekrutierung, auf die Leukozytenakkumulation im Thrombus wie auch auf die Fibrinbildung und -stabilisierung.

Die gewonnenen Ergebnisse weisen demnach darauf hin, dass bestimmte Antikörpermoleküle in der Lage sind, die Entstehung einer TVT zu begünstigen. Dieses Wissen und eingehendere Forschung kann dazu beitragen, zukünftig neue prognostische Faktoren für das Auftreten venöser Thrombose zu gewinnen und Behandlungsstrategien zu entwickeln, welche die unerwünschten Nebenwirkungen einer alleinigen Hemmung der Blutgerinnung umgehen.

VIII. SUMMARY

Antibodies as new factors in the immunological process of venous thrombosis

Deep vein thrombosis (DVT) is not exclusively triggered by activation of blood coagulation, but mainly develops due to an immunological process involving massive recruitment of innate immune cells. In this thesis an established mouse model for investigation of cellular and molecular mechanisms in the development of DVT was used to study the effects of antibodies - important players in immunity and well known trigger of different pathologic processes.

It could be demonstrated that antibody molecules have a significant impact on the development of venous thrombosis in this mouse model: In mice without any antibodies the development of venous thrombi was massively impaired and could be restored by antibody-substitution. A strong correlation between IgM-serum-levels and thrombus weight as well as the participation of natural antibodies were detected. The underlying mechanisms could already be elucidated to some extent: Involved antibody-molecules seem to bind to structures of the hypoxic endothelium and to influence the initial platelet-recruitment, leukocyte-accumulation in venous thrombi as well as fibrin formation and stabilization.

These results indicate that certain antibody molecules are able to promote the development of DVT. This knowledge and further intensive studies might contribute to obtain new predictors for DVT-occurrence and can help in the development of new therapeutic strategies that avoid problems related to an exclusive inhibition of blood coagulation.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. von Brühl, M.L., *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of experimental medicine* 209, 819-835 (2012).
2. Fiola, I.T. Die Rolle des Komplementsystems bei der Entstehung der venösen Thrombose. Dissertation, LMU München (2014).
3. Kristinsson, S.Y., *et al.* Arterial and venous thrombosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma: a population-based study. *Blood* 115, 4991-4998 (2010).
4. Ishikura, K., *et al.* High prevalence of anti-prothrombin antibody in patients with deep vein thrombosis. *American journal of hematology* 76, 338-342 (2004).
5. Meroni, P.L., Borghi, M.O., Raschi, E. & Tedesco, F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nature reviews. Rheumatology* 7, 330-339 (2011).
6. Mosier, D.A. Zirkulationsstörungen und Thrombose. in *Pathologie der Haustiere. Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie.* (Hrsg. Mc Gavin, M.D. & Zachary, J.F.). Elsevier GmbH, München (2009).
7. Wiesner, E. & Ribbeck, R. *Lexikon der Veterinärmedizin.* Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart (2000).
8. Furie, B. & Furie, B.C. Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine* 359, 938-949 (2008).
9. Rosendaal, F.R. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology.* American Society of Hematology. Education Program, 1-12 (2005).
10. Ludwig, M., Rieger, J. & Ruppert, V. *Gefäßmedizin in Klinik und Praxis: Leitlinienorientierte Angiologie, Gefäßchirurgie und interventionelle Radiologie.* Thieme, Stuttgart (2010).
11. Cushman, M., *et al.* Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in two cohorts: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *The American journal of medicine* 117, 19-25 (2004).
12. Naess, I.A., *et al.* Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5, 692-699 (2007).

13. Silverstein, M.D., *et al.* Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Archives of internal medicine* 158, 585-593 (1998).
14. White, R.H. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation* 107, I4-8 (2003).
15. Anderson, F.A., Jr., *et al.* A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study. *Archives of internal medicine* 151, 933-938 (1991).
16. Cushman, M. Epidemiology and Risk Factors for Venous Thrombosis. *Seminars in hematology* 44, 62-69 (2007).
17. Murin, S., Romano, P.S. & White, R.H. Comparison of outcomes after hospitalization for deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *Thrombosis and haemostasis* 88, 407-414 (2002).
18. Brandjes, D.P.M., *et al.* Randomised trial of effect of compression stockings in patients with symptomatic proximal-vein thrombosis. *The Lancet* 349, 759-762 (1997).
19. Heit, J.A., *et al.* Predictors of recurrence after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based cohort study. *Archives of internal medicine* 160, 761-768 (2000).
20. Kuijer, P.M., Hutten, B.A., Prins, M.H. & Büller, H.R. Prediction of the risk of bleeding during anticoagulant treatment for venous thromboembolism. *Archives of internal medicine* 159, 457-460 (1999).
21. Levine, M.N., Raskob, G., Landefeld, S. & Kearon, C. Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment. *CHEST Journal* 119, 108S-121S (2001).
22. Sevitt, S. The structure and growth of valve-pocket thrombi in femoral veins. *Journal of clinical pathology* 27, 517-528 (1974).
23. Chandraratne, S. Rolle der Neutrophil Extracellular Traps (NETs) bei der Entstehung der venösen Thrombose. Dissertation, LMU München (2012).
24. Virchow, R.L.K. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin Von Meidinger & Sohn, Frankfurt am Main* (1856).
25. Sevitt, S. Thrombosis and embolism after injury. *Journal of clinical pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)* 4, 86-101 (1970).
26. Liebich, H.-G., Forstenpointner, G. & König, H.E. Einführung und

allgemeine Anatomie. in Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. (Hrsg. König, H.E. & Liebich, H.-G.). Schattauer GmbH, Stuttgart (2005).

27. Gibbs, N.M. Venous thrombosis of the lower limbs with particular reference to bed-rest. *The British journal of surgery* 45, 209-236 (1957).

28. Cannegieter, S.C., Doggen, C.J., van Houwelingen, H.C. & Rosendaal, F.R. Travel-related venous thrombosis: results from a large population-based case control study (MEGA study). *PLoS medicine* 3, 1258-1265 (2006).

29. Heit, J.A., *et al.* Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Archives of internal medicine* 160, 809-815 (2000).

30. White, R.H., Zhou, H. & Romano, P.S. Incidence of symptomatic venous thromboembolism after different elective or urgent surgical procedures. *Thrombosis and haemostasis* 90, 446-455 (2003).

31. Rao, L.V. Tissue factor as a tumor procoagulant. *Cancer metastasis reviews* 11, 249-266 (1992).

32. Abdollahi, M., Cushman, M. & Rosendaal, F.R. Obesity: risk of venous thrombosis and the interaction with coagulation factor levels and oral contraceptive use. *Thrombosis and haemostasis* 89, 493-498 (2003).

33. Heit, J.A., *et al.* Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: a 30-year population-based study. *Annals of internal medicine* 143, 697-706 (2005).

34. Gomes, M.P. & Deitcher, S.R. Risk of venous thromboembolic disease associated with hormonal contraceptives and hormone replacement therapy: a clinical review. *Archives of internal medicine* 164, 1965-1976 (2004).

35. Vandenbroucke, J.P., *et al.* Oral contraceptives and the risk of venous thrombosis. *The New England journal of medicine* 344, 1527-1535 (2001).

36. Engelmann, B. & Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 13, 34-45 (2013).

37. Lösch, U., Cihak, J., Erhard, M.H. & Kaspers, B. Blut und Abwehr. in *Physiologie der Haustiere*. (Hrsg. Engelhardt, W.v. & Breves, G.). Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart (2000).

38. Marshall, J.C. Such stuff as dreams are made on: mediator-directed therapy in sepsis. *Nature reviews. Drug discovery* 2, 391-405 (2003).

39. Esmon, C.T. The interactions between inflammation and coagulation.

British journal of haematology 131, 417-430 (2005).

40. Dalen, J.E. Pulmonary embolism: what have we learned since Virchow? Natural history, pathophysiology, and diagnosis. *Chest* 122, 1440-1456 (2002).

41. Rosendaal, F.R., Koster, T., Vandenbroucke, J.P. & Reitsma, P.H. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 85, 1504-1508 (1995).

42. Poort, S.R., Rosendaal, F.R., Reitsma, P.H. & Bertina, R.M. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88, 3698-3703 (1996).

43. Koster, T., *et al.* Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood* 85, 2756-2761 (1995).

44. van Boven, H.H., Vandenbroucke, J.P., Briet, E. & Rosendaal, F.R. Gene-gene and gene-environment interactions determine risk of thrombosis in families with inherited antithrombin deficiency. *Blood* 94, 2590-2594 (1999).

45. Ackermann, M.R. Akute Entzündung. in *Pathologie der Haustiere. Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie.* (Hrsg. Mc Gavin, M.D. & Zachary, J.F.). Elsevier GmbH, München (2009).

46. Myers, D., Jr., *et al.* Selectins influence thrombosis in a mouse model of experimental deep venous thrombosis. *The Journal of surgical research* 108, 212-221 (2002).

47. Wagner, D.D., Olmsted, J.B. & Marder, V.J. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *The Journal of cell biology* 95, 355-360 (1982).

48. Hees, H. & Sinowatz, F. *Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie.* Deutscher Ärzte-Verlag, Köln (2000).

49. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology* 7, 678-689 (2007).

50. Semple, J.W., Italiano, J.E., Jr. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nature reviews. Immunology* 11, 264-274 (2011).

51. Du, X., *et al.* Long range propagation of conformational changes in integrin alpha IIb beta 3. *The Journal of biological chemistry* 268, 23087-23092 (1993).

52. Pinsky, D.J., *et al.* Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *The Journal of clinical investigation* 97, 493-500 (1996).
53. Dufourcq, P., *et al.* Membrane thrombomodulin levels are decreased during hypoxia and restored by cAMP and IBMX. *Thrombosis research* 77, 305-310 (1995).
54. Ogawa, S., *et al.* Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties. *The Journal of clinical investigation* 85, 1090-1098 (1990).
55. Closse, C., *et al.* Influence of hypoxia and hypoxia-reoxygenation on endothelial P-selectin expression. *Thrombosis research* 85, 159-164 (1997).
56. Paterson, J.C. & Mc Lachlin, J. Precipitating factors in venous thrombosis. *Surgery, gynecology & obstetrics* 98, 96-102 (1954).
57. Lund, F., Diener, L. & Ericsson, J.L. Postmortem intraosseous phlebography as an aid in studies of venous thromboembolism. With application on a geriatric clientele. *Angiology* 20, 155-176 (1969).
58. Hamer, J.D., Malone, P.C. & Silver, I.A. The PO₂ in venous valve pockets: its possible bearing on thrombogenesis. *The British journal of surgery* 68, 166-170 (1981).
59. Butenas, S., Bouchard, B.A., Brummel-Ziedins, K.E., Parhami-Seren, B. & Mann, K.G. Tissue factor activity in whole blood. *Blood* 105, 2764-2770 (2005).
60. Giesen, P.L., *et al.* Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2311-2315 (1999).
61. Furie, B. & Furie, B.C. In vivo thrombus formation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5 Suppl 1, 12-17 (2007).
62. Day, S.M., *et al.* Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood* 105, 192-198 (2005).
63. Zhou, J., May, L., Liao, P., Gross, P.L. & Weitz, J.I. Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 863-869 (2009).
64. Yan, S.F., Mackman, N., Kisiel, W., Stern, D.M. & Pinsky, D.J. Hypoxia/Hypoxemia-Induced activation of the procoagulant pathways and the

pathogenesis of ischemia-associated thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 2029-2035 (1999).

65. Falati, S., *et al.* Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *The Journal of experimental medicine* 197, 1585-1598 (2003).

66. Castellana, D., Kunzelmann, C. & Freyssinet, J.M. Pathophysiologic significance of procoagulant microvesicles in cancer disease and progression. *Hamostaseologie* 29, 51-57 (2009).

67. Chen, V.M., *et al.* Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond. *Biochemistry* 45, 12020-12028 (2006).

68. Reinhardt, C., *et al.* Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *The Journal of clinical investigation* 118, 1110-1122 (2008).

69. Versteeg, H.H. & Ruf, W. Tissue factor coagulant function is enhanced by protein-disulfide isomerase independent of oxidoreductase activity. *The Journal of biological chemistry* 282, 25416-25424 (2007).

70. Jiang, X.M., Fitzgerald, M., Grant, C.M. & Hogg, P.J. Redox control of exofacial protein thiols/disulfides by protein disulfide isomerase. *The Journal of biological chemistry* 274, 2416-2423 (1999).

71. Jasuja, R., *et al.* Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *The Journal of clinical investigation* 122, 2104-2113 (2012).

72. Cho, J., Furie, B.C., Coughlin, S.R. & Furie, B. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *The Journal of clinical investigation* 118, 1123-1131 (2008).

73. Brinkmann, V., *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)* 303, 1532-1535 (2004).

74. Fuchs, T.A., *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* 176, 231-241 (2007).

75. Gupta, A.K., *et al.* Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS letters* 584, 3193-3197 (2010).

76. Clark, S.R., *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine* 13, 463-469 (2007).

77. Fuchs, T.A., *et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 15880-15885 (2010).

78. Ward, C.M., Tetaz, T.J., Andrews, R.K. & Berndt, M.C. Binding of the von Willebrand factor A1 domain to histone. *Thrombosis research* 86, 469-477 (1997).

79. Massberg, S., *et al.* Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nature medicine* 16, 887-896 (2010).

80. Ammollo, C.T., Semeraro, F., Xu, J., Esmon, N.L. & Esmon, C.T. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 9, 1795-1803 (2011).

81. Konings, J., *et al.* Factor XIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin. *Blood* 118, 3942-3951 (2011).

82. Furie, B. & Furie, B.C. Thrombus formation in vivo. *The Journal of clinical investigation* 115, 3355-3362 (2005).

83. Kirton, C.M. & Nash, G.B. Activated platelets adherent to an intact endothelial cell monolayer bind flowing neutrophils and enable them to transfer to the endothelial surface. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 136, 303-313 (2000).

84. Wang, Y., *et al.* Leukocyte engagement of platelet glycoprotein Iba1 via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury. *Circulation* 112, 2993-3000 (2005).

85. Schulz, C., Engelmann, B. & Massberg, S. Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 11 Suppl 1, 233-241 (2013).

86. Diaz, J.A., *et al.* Critical review of mouse models of venous thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32, 556-562 (2012).

87. Diaz, J.A., *et al.* Impaired fibrinolytic system in ApoE gene-deleted mice with hyperlipidemia augments deep vein thrombosis. *Journal of vascular surgery* 55, 815-822 (2012).

88. Singh, I., *et al.* Antithrombotic effects of controlled inhibition of factor VIII with a partially inhibitory human monoclonal antibody in a murine vena cava thrombosis model. *Blood* 99, 3235-3240 (2002).

89. Brill, A., *et al.* von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical

- for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* 117, 1400-1407 (2011).
- 90.** Köllnberger, M. In vivo Analyse der zellulären und molekularen Mechanismen der arteriellen und venösen Thrombose in der Maus. Dissertation, LMU München (2006).
- 91.** Diaz, J.A., *et al.* Thrombogenesis with continuous blood flow in the inferior vena cava. A novel mouse model. *Thrombosis and haemostasis* 104, 366-375 (2010).
- 92.** Diaz, J.A., *et al.* Electrolytic inferior vena cava model (EIM) of venous thrombosis. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 1-4 (2011).
- 93.** LeBien, T.W. & Tedder, T.F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570-1580 (2008).
- 94.** Elgert, K.D. Antibody structure and function. in *Immunology: Understanding The Immune System*. Hrsg. Elgert, K.D.). 58-78 John Wiley & Sons (1998).
- 95.** Pillai, S., Cariappa, A. & Moran, S.T. Marginal zone B cells. *Annual review of immunology* 23, 161-196 (2005).
- 96.** Baumgarth, N., Tung, J.W. & Herzenberg, L.A. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer seminars in immunopathology* 26, 347-362 (2005).
- 97.** Dorshkind, K. & Montecino-Rodriguez, E. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nature reviews. Immunology* 7, 213-219 (2007).
- 98.** Schroeder, H.W., Jr. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125, S41-S52 (2010).
- 99.** Muramatsu, M., *et al.* Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-563 (2000).
- 100.** Lipman, N.S., Jackson, L.R., Trudel, L.J. & Weis-Garcia, F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal* 46, 258-268 (2005).
- 101.** Williams, A.E. *Immunology: Mucosal and Body Surface Defences*. Wiley-Blackwell, West Sussex (2011).
- 102.** Park, S.Y., *et al.* Resistance of Fc receptor- deficient mice to fatal glomerulonephritis. *Journal of Clinical Investigation* 102, 1229-1238 (1998).

103. Nimmerjahn, F., Bruhns, P., Horiuchi, K. & Ravetch, J.V. Fcγ₄RIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 23, 41-51 (2005).
104. Ravetch, J.V. & Kinet, J.P. Fc receptors. *Annual review of immunology* 9, 457-492 (1991).
105. van Montfoort, N., *et al.* Fcγ₄ receptor IIb strongly regulates Fcγ₄ receptor-facilitated T cell activation by dendritic cells. *Journal of immunology* 189, 92-101 (2012).
106. Bruhns, P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 119, 5640-5649 (2012).
107. Takizawa, F., Adamczewski, M. & Kinet, J.P. Identification of the low affinity receptor for immunoglobulin E on mouse mast cells and macrophages as Fc γ₂ RII and Fc γ₃ RIII. *The Journal of experimental medicine* 176, 469-475 (1992).
108. Mancardi, D.A., *et al.* Fcγ₄RIV is a mouse IgE receptor that resembles macrophage Fcε₁RI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *The Journal of clinical investigation* 118, 3738-3750 (2008).
109. Shibuya, A., *et al.* Fc α₁/μ receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nature immunology* 1, 441-446 (2000).
110. Shima, H., *et al.* Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM. *International immunology* 22, 149-156 (2010).
111. Honjo, K., *et al.* Altered Ig levels and antibody responses in mice deficient for the Fc receptor for IgM (FcmuR). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 15882-15887 (2012).
112. Honjo, K., Kubagawa, Y. & Kubagawa, H. Is Toso/IgM Fc receptor (FcmuR) expressed by innate immune cells? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E2540-2541 (2013).
113. Lang, K.S., *et al.* Involvement of Toso in activation of monocytes, macrophages, and granulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 2593-2598 (2013).
114. Lang, K.S., *et al.* Reply to Honjo et al.: Functional relevant expression of Toso on granulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E2542-2543 (2013).
115. Ehrenstein, M.R. & Notley, C.A. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nature reviews. Immunology* 10, 778-786 (2010).

- 116.** Coutinho, A., Kazatchkine, M.D. & Avrameas, S. Natural autoantibodies. *Current opinion in immunology* 7, 812-818 (1995).
- 117.** Haury, M., *et al.* The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *European journal of immunology* 27, 1557-1563 (1997).
- 118.** Roozendaal, R. & Carroll, M.C. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunological reviews* 219, 157-166 (2007).
- 119.** Bradbury, L.E., Kansas, G.S., Levy, S., Evans, R.L. & Tedder, T.F. The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *Journal of immunology* 149, 2841-2850 (1992).
- 120.** Molina, H., *et al.* Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 3357-3361 (1996).
- 121.** Carter, R.H. & Fearon, D.T. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science (New York, N.Y.)* 256, 105-107 (1992).
- 122.** Dempsey, P.W., Allison, M.E., Akkaraju, S., Goodnow, C.C. & Fearon, D.T. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science (New York, N.Y.)* 271, 348-350 (1996).
- 123.** Ahearn, J.M., *et al.* Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity* 4, 251-262 (1996).
- 124.** Croix, D.A., *et al.* Antibody response to a T-dependent antigen requires B cell expression of complement receptors. *The Journal of experimental medicine* 183, 1857-1864 (1996).
- 125.** Haas, K.M., *et al.* Complement receptors CD21/35 link innate and protective immunity during *Streptococcus pneumoniae* infection by regulating IgG3 antibody responses. *Immunity* 17, 713-723 (2002).
- 126.** Reid, R.R., *et al.* Functional activity of natural antibody is altered in Cr2-deficient mice. *Journal of immunology* 169, 5433-5440 (2002).
- 127.** Holers, V.M. Complement receptors and the shaping of the natural antibody repertoire. *Springer seminars in immunopathology* 26, 405-423 (2005).
- 128.** Pillai, S., Cariappa, A. & Moran, S.T. Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunological*

reviews 197, 206-218 (2004).

129. Grönwall, C., Vas, J. & Silverman, G.J. Protective Roles of Natural IgM Antibodies. *Frontiers in immunology* 3, 66 (2012).

130. Briles, D.E., *et al.* Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 streptococcus pneumoniae. *The Journal of experimental medicine* 153, 694-705 (1981).

131. Chou, M.Y., *et al.* Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. *The Journal of clinical investigation* 119, 1335-1349 (2009).

132. Chen, Y., Park, Y.B., Patel, E. & Silverman, G.J. IgM antibodies to apoptosis-associated determinants recruit C1q and enhance dendritic cell phagocytosis of apoptotic cells. *Journal of immunology* 182, 6031-6043 (2009).

133. Shaw, P.X., *et al.* Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *The Journal of clinical investigation* 105, 1731-1740 (2000).

134. Cox, K.O. & Hardy, S.J. Autoantibodies against mouse bromelain-modified RBC are specifically inhibited by a common membrane phospholipid, phosphatidylcholine. *Immunology* 55, 263-269 (1985).

135. Hardy, R.R. & Hayakawa, K. Development of B cells producing natural autoantibodies to thymocytes and senescent erythrocytes. *Springer seminars in immunopathology* 26, 363-375 (2005).

136. Quartier, P., Potter, P.K., Ehrenstein, M.R., Walport, M.J. & Botto, M. Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro. *European journal of immunology* 35, 252-260 (2005).

137. Weiser, M.R., *et al.* Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *The Journal of experimental medicine* 183, 2343-2348 (1996).

138. Ogawa, S., *et al.* Hypoxia induces endothelial cell synthesis of membrane-associated proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 9897-9901 (1991).

139. Kulik, L., *et al.* Pathogenic natural antibodies recognizing annexin IV are required to develop intestinal ischemia-reperfusion injury. *Journal of immunology* 182, 5363-5373 (2009).

140. Haas, M.S., *et al.* Blockade of self-reactive IgM significantly reduces

injury in a murine model of acute myocardial infarction. *Cardiovascular research* 87, 618-627 (2010).

141. Zhang, M., *et al.* Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3886-3891 (2004).

142. Zhang, M., *et al.* Identification of the target self-antigens in reperfusion injury. *The Journal of experimental medicine* 203, 141-152 (2006).

143. Robbins, J. & Stetson, C.A., Jr. An effect of antigen-antibody interaction on blood coagulation. *The Journal of experimental medicine* 109, 1-8 (1959).

144. Zipfel, P.F. & Skerka, C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature reviews. Immunology* 9, 729-740 (2009).

145. Mihlan, M., Stippa, S., Jozsi, M. & Zipfel, P.F. Monomeric CRP contributes to complement control in fluid phase and on cellular surfaces and increases phagocytosis by recruiting factor H. *Cell death and differentiation* 16, 1630-1640 (2009).

146. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J.D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology* 11, 785-797 (2010).

147. Markiewski, M.M., Nilsson, B., Ekdahl, K.N., Mollnes, T.E. & Lambris, J.D. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends in immunology* 28, 184-192 (2007).

148. Kolev, M., Le Friec, G. & Kemper, C. Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nature reviews. Immunology* 14, 811-820 (2014).

149. Gaboriaud, C., *et al.* The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *The Journal of biological chemistry* 278, 46974-46982 (2003).

150. Kishore, U. & Reid, K. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* 49, 159-170 (2000).

151. Reid, K.B. & Porter, R.R. Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement. *The Biochemical journal* 155, 19-23 (1976).

152. Navratil, J.S., Watkins, S.C., Wisnieski, J.J. & Ahearn, J.M. The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells. *Journal of immunology* 166, 3231-3239 (2001).

153. Thielens, N.M., Tacnet-Delorme, P. & Arlaud, G.J. Interaction of C1q and

- mannan-binding lectin with viruses. *Immunobiology* 205, 563-574 (2002).
- 154.** Bredt, W., Wellek, B., Brunner, H. & Loos, M. Interactions between mycoplasma pneumoniae and the first components of complement. *Infection and immunity* 15, 7-12 (1977).
- 155.** Bindon, C.I., Hale, G., Bruggemann, M. & Waldmann, H. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *The Journal of experimental medicine* 168, 127-142 (1988).
- 156.** Cooper, N.R. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Advances in immunology* 37, 151-216 (1985).
- 157.** Burton, D.R., *et al.* The C1q receptor site on immunoglobulin G. *Nature* 288, 338-344 (1980).
- 158.** Duncan, A.R. & Winter, G. The binding site for C1q on IgG. *Nature* 332, 738-740 (1988).
- 159.** Morgan, A., *et al.* The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, Fc gamma RI and Fc gamma RIII binding. *Immunology* 86, 319-324 (1995).
- 160.** Marques, G., *et al.* Arginine residues of the globular regions of human C1q involved in the interaction with immunoglobulin G. *The Journal of biological chemistry* 268, 10393-10402 (1993).
- 161.** Hezareh, M., Hessel, A.J., Jensen, R.C., van de Winkel, J.G. & Parren, P.W. Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 75, 12161-12168 (2001).
- 162.** Arya, S., *et al.* Mapping of amino acid residues in the C mu 3 domain of mouse IgM important in macromolecular assembly and complement-dependent cytotoxicity. *Journal of immunology* 152, 1206-1212 (1994).
- 163.** Taylor, B., *et al.* C1q binding properties of monomer and polymer forms of mouse IgM mu-chain variants. Pro544Gly and Pro434Ala. *Journal of immunology* 153, 5303-5313 (1994).
- 164.** Gadjeva, M.G., *et al.* Interaction of Human C1q with IgG and IgM: Revisited. *Biochemistry* 47, 13093-13102 (2008).
- 165.** Daha, N.A., *et al.* Complement activation by (auto-) antibodies. *Molecular immunology* 48, 1656-1665 (2011).
- 166.** Ziccardi, R.J. The role of immune complexes in the activation of the first

- component of human complement. *Journal of immunology* 132, 283-288 (1984).
- 167.** Wallis, R. & Drickamer, K. Molecular determinants of oligomer formation and complement fixation in mannose-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 274, 3580-3589 (1999).
- 168.** Wallis, R. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. *Immunobiology* 212, 289-299 (2007).
- 169.** Arnold, J.N., *et al.* Human serum IgM glycosylation: identification of glycoforms that can bind to mannan-binding lectin. *The Journal of biological chemistry* 280, 29080-29087 (2005).
- 170.** Malhotra, R., *et al.* Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nature medicine* 1, 237-243 (1995).
- 171.** Roos, A., *et al.* Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *Journal of immunology* 167, 2861-2868 (2001).
- 172.** Spitzer, D., Mitchell, L.M., Atkinson, J.P. & Hourcade, D.E. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *Journal of immunology* 179, 2600-2608 (2007).
- 173.** Fearon, D.T. & Austen, K.F. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *The Journal of experimental medicine* 142, 856-863 (1975).
- 174.** Fries, L.F., Gaither, T.A., Hammer, C.H. & Frank, M.M. C3b covalently bound to IgG demonstrates a reduced rate of inactivation by factors H and I. *The Journal of experimental medicine* 160, 1640-1655 (1984).
- 175.** Hiemstra, P.S., Gorter, A., Stuurman, M.E., Van Es, L.A. & Daha, M.R. Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *European journal of immunology* 17, 321-326 (1987).
- 176.** Krem, M.M. & Di Cera, E. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends in biochemical sciences* 27, 67-74 (2002).
- 177.** Sims, P.J., Faioni, E.M., Wiedmer, T. & Shattil, S.J. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *The Journal of biological chemistry* 263, 18205-18212

(1988).

178. Ando, B., Wiedmer, T., Hamilton, K.K. & Sims, P.J. Complement proteins C5b-9 initiate secretion of platelet storage granules without increased binding of fibrinogen or von Willebrand factor to newly expressed cell surface GPIIb-IIIa. *The Journal of biological chemistry* 263, 11907-11914 (1988).

179. Wiedmer, T., Esmon, C.T. & Sims, P.J. On the mechanism by which complement proteins C5b-9 increase platelet prothrombinase activity. *The Journal of biological chemistry* 261, 14587-14592 (1986).

180. Peerschke, E.I., Reid, K.B. & Ghebrehiwet, B. Platelet activation by C1q results in the induction of alpha IIb/beta 3 integrins (GPIIb-IIIa) and the expression of P-selectin and procoagulant activity. *The Journal of experimental medicine* 178, 579-587 (1993).

181. Del Conde, I., Cruz, M.A., Zhang, H., Lopez, J.A. & Afshar-Kharghan, V. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *The Journal of experimental medicine* 201, 871-879 (2005).

182. Polley, M.J. & Nachman, R.L. Human platelet activation by C3a and C3a des-arg. *The Journal of experimental medicine* 158, 603-615 (1983).

183. Tedesco, F., *et al.* The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *The Journal of experimental medicine* 185, 1619-1627 (1997).

184. Lozada, C., *et al.* Identification of C1q as the heat-labile serum cofactor required for immune complexes to stimulate endothelial expression of the adhesion molecules E-selectin and intercellular and vascular cell adhesion molecules 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8378-8382 (1995).

185. Hamilton, K.K., Hattori, R., Esmon, C.T. & Sims, P.J. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. *The Journal of biological chemistry* 265, 3809-3814 (1990).

186. Platt, J.L., Dalmaso, A.P., Lindman, B.J., Ihrcke, N.S. & Bach, F.H. The role of C5a and antibody in the release of heparan sulfate from endothelial cells. *European journal of immunology* 21, 2887-2890 (1991).

187. Ikeda, K., *et al.* C5a induces tissue factor activity on endothelial cells. *Thrombosis and haemostasis* 77, 394-398 (1997).

- 188.** Ritis, K., *et al.* A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *Journal of immunology* 177, 4794-4802 (2006).
- 189.** Amara, U., *et al.* Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *Journal of immunology* 185, 5628-5636 (2010).
- 190.** Huber-Lang, M., *et al.* Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nature medicine* 12, 682-687 (2006).
- 191.** Palladino, C., Bruno, B. & Boccadoro, M. Discovering the meaning of monoclonal gammopathy of undetermined significance: current knowledge, future challenges. *Translational medicine @ UniSa* 8, 12-18 (2014).
- 192.** Gregersen, H., *et al.* Monoclonal gammopathy of undetermined significance and risk of venous thromboembolism. *European journal of haematology* 86, 129-134 (2011).
- 193.** Jankowski, M., *et al.* Thrombogenicity of beta 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster. *Blood* 101, 157-162 (2003).
- 194.** Ramesh, S., *et al.* Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via beta2GPI and apoER2. *The Journal of clinical investigation* 121, 120-131 (2011).
- 195.** Yang, Y.H., *et al.* Identification of anti-prothrombin antibodies in the antiphospholipid syndrome that display the prothrombinase activity. *Rheumatology (Oxford, England)* 49, 34-42 (2010).
- 196.** Espinola, R.G., *et al.* E-Selectin mediates pathogenic effects of antiphospholipid antibodies. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 1, 843-848 (2003).
- 197.** Romay-Penabad, Z., *et al.* Apolipoprotein E receptor 2 is involved in the thrombotic complications in a murine model of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 117, 1408-1414 (2011).
- 198.** Pierangeli, S.S., *et al.* Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis and rheumatism* 52, 2120-2124 (2005).
- 199.** Fischetti, F., *et al.* Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood* 106, 2340-2346 (2005).
- 200.** Cines, D.B., *et al.* Antigen and substrate withdrawal in the management of

autoimmune thrombotic disorders. *Blood* 120, 4134-4142 (2012).

201. Roubey, R.A., Eisenberg, R.A., Harper, M.F. & Winfield, J.B. "Anticardiolipin" autoantibodies recognize beta 2-glycoprotein I in the absence of phospholipid. Importance of Ag density and bivalent binding. *Journal of immunology* 154, 954-960 (1995).

202. The Jackson Laboratory. JAX mice database. C57BL/6J 000664. <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html> (Zugriff: 05.10.14)

203. Molina, H., Kinoshita, T., Inoue, K., Carel, J.C. & Holers, V.M. A molecular and immunochemical characterization of mouse CR2. Evidence for a single gene model of mouse complement receptors 1 and 2. *Journal of immunology* 145, 2974-2983 (1990).

204. Boes, M., *et al.* Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. *Journal of immunology* 160, 4776-4787 (1998).

205. Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R. & Ravetch, J.V. FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 76, 519-529 (1994).

206. Ammer, H. & Potschka, H. Pharmakologie des zentralen Nervensystems (ZNS). in *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. (Hrsg. Frey, H.-H. & Löscher, W.). Enke Verlag, Stuttgart (2010).

207. Alef, M., Oechtering, G., Tacke, S. & Schimke, E. Schmerzausschaltung. in *Klinik der Hundekrankheiten*. (Hrsg. Christoph, H.-J., Grünbaum, E.-G. & Alef, M.). Enke Verlag, Stuttgart (2007).

208. Lang, T. & von Depka, M. Diagnostische Möglichkeiten und Grenzen der Thrombelastometrie/-graphie. *Hamostaseologie* 26, 20-29 (2006).

209. Rotem Tem International GmbH. Methodik Thrombelastometrie. <http://www.rottem.de/methodik/thromboelastometrie/> (Zugriff: 03.10.2014)

210. Calatzis, A., Fritzsche, P., Kling, M., Calatzis, A. & Mielke, L. A new technique for fast and specific coagulation monitoring. *European Surgical Research* 28(1996).

211. Rotem Tem International GmbH. Produkte, Reagenzien, Fibtem. <http://www.rottem.de/produkte/reagenzien/fib-tem/> (Zugriff: 03.10.14)

212. Rotem Tem International GmbH. Methodik Ergebnisinterpretation. <http://www.rottem.de/methodik/ergebnisinterpretation/> (Zugriff: 03.10.14)

213. Munk, K. & Kurth, T. Die Zelle. in *Taschenlehrbuch Biologie*. Biochemie

Zellbiologie. Hrsg. Munk, K.). Gerorg Thieme Verlag KG, Stuttgart (2008).

- 214.** Sigma Aldrich. Acridine Orange.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r6626?lang=de®ion=DE>
(Zugriff: 04.10.14)
- 215.** Nakagawa, S. & Cuthill, I.C. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 82, 591-605 (2007).
- 216.** de Groot, P.G. & Urbanus, R.T. The significance of autoantibodies against beta2-glycoprotein I. *Blood* 120, 266-274 (2012).
- 217.** Lopez, J.A. The platelet Fc receptor: a new role for an old actor. *Blood* 121, 1674-1675 (2013).
- 218.** Proulle, V., Furie, R.A., Merrill-Skoloff, G., Furie, B.C. & Furie, B. Platelets are required for enhanced activation of the endothelium and fibrinogen in a mouse thrombosis model of APS. *Blood* 124, 611-622 (2014).
- 219.** Lin, Y.L. & Wang, C.T. Activation of human platelets by the rabbit anticardiolipin antibodies. *Blood* 80, 3135-3143 (1992).
- 220.** Khamashta, M.A., *et al.* Immune mediated mechanism for thrombosis: antiphospholipid antibody binding to platelet membranes. *Annals of the rheumatic diseases* 47, 849-854 (1988).
- 221.** Opara, R., Robbins, D.L. & Ziboh, V.A. Cyclic-AMP agonists inhibit antiphospholipid/beta2-glycoprotein I induced synthesis of human platelet thromboxane A2 in vitro. *The Journal of rheumatology* 30, 55-59 (2003).
- 222.** Peerschke, E.I. & Ghebrehiwet, B. C1q augments platelet activation in response to aggregated Ig. *Journal of immunology* 159, 5594-5598 (1997).
- 223.** Lood, C., *et al.* Platelet activation and anti-phospholipid antibodies collaborate in the activation of the complement system on platelets in systemic lupus erythematosus. *PloS one* 9, e99386 (2014).
- 224.** Krone, K.A., Allen, K.L. & McCrae, K.R. Impaired fibrinolysis in the antiphospholipid syndrome. *Current rheumatology reports* 12, 53-57 (2010).
- 225.** Chen, P.P., *et al.* Some antiphospholipid antibodies bind to hemostasis and fibrinolysis proteases and promote thrombosis. *Lupus* 17, 916-921 (2008).
- 226.** Yang, C.D., *et al.* Identification of anti-plasmin antibodies in the antiphospholipid syndrome that inhibit degradation of fibrin. *Journal of immunology* 172, 5765-5773 (2004).
- 227.** Lu, C.S., *et al.* Identification of polyclonal and monoclonal antibodies

against tissue plasminogen activator in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis and rheumatism* 52, 4018-4027 (2005).

228. Vikerfors, A., *et al.* Studies of fibrin formation and fibrinolytic function in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thrombosis research* 133, 936-944 (2014).

229. Langer, F., *et al.* Rapid activation of monocyte tissue factor by antithymocyte globulin is dependent on complement and protein disulfide isomerase. *Blood* 121, 2324-2335 (2013).

230. Fleming, S.D., *et al.* Anti-phospholipid antibodies restore mesenteric ischemia/reperfusion-induced injury in complement receptor 2/complement receptor 1-deficient mice. *Journal of immunology* 173, 7055-7061 (2004).

231. Fleming, S.D., *et al.* Domain V peptides inhibit beta2-glycoprotein I-mediated mesenteric ischemia/reperfusion-induced tissue damage and inflammation. *Journal of immunology* 185, 6168-6178 (2010).

232. Fleming, S.D. Naturally occurring autoantibodies mediate ischemia/reperfusion-induced tissue injury. *Advances in experimental medicine and biology* 750, 174-185 (2012).

233. Baumgarth, N., *et al.* B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *The Journal of experimental medicine* 192, 271-280 (2000).

234. Choi, Y.S. & Baumgarth, N. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *The Journal of experimental medicine* 205, 3053-3064 (2008).

235. Pope, M.R., Bukovnik, U., Tomich, J.M. & Fleming, S.D. Small beta2-glycoprotein I peptides protect from intestinal ischemia reperfusion injury. *Journal of immunology* 189, 5047-5056 (2012).

X. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°	Grad (Winkel)	C1r, C1s	Serinproteasen der Komplementkomponente 1
°C	Grad Celsius		
β2-GPI	β2-Glykoprotein I	C3,	Komplementkomponente 3 und ihre Spaltprodukte
μAmp	Mikroampère	C3dg,	
μl	Mikroliter	C3d,	
μm ²	Quadratmikrometer	iC3b,	
Abb.	Abbildung	C3a, C3b	
ADP	Adenosindiphosphat	C4, C4a,	Komplementkomponente 4 und ihre Spaltprodukte
AID	Activation induced deaminase	C4b	
akt.	aktiviert	C5, C5a,	Komplementkomponente 5 und ihre Spaltprodukte
aPL-Antikörper	Anti-Phospholipid-Antikörper	C5b	
APS	Anti-Phospholipid-Syndrom	C2, C6,	Komplementkomponenten 2, 6, 7, 8, 9
Asp	Asparaginsäure	C7, C8,	
ATIII	Antithrombin III	C9	
B, Bb	Faktor B und Spaltprodukt	ca.	circa
bzw.	beziehungsweise	CCD-Kamera	charge-coupled-device-Kamera
C1q	Komplementkomponente 1q	CD	cluster of differentiation
		cDNA	komplementäre DNA
		CDR	complementarity determining regions

CFT	clot formation time	Gp	Glykoprotein
C _H	schwere konstante Kette	GRAN	Granulozyten
C _L	leichte konstante Kette	h	Stunden
cm	Zentimeter	H ₂ O	Wasser
CR2	Komplementfaktor-rezeptor 2	HE	Hämatoxylin Eosin-Färbung
CT	clotting time	His	Histidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	HIV	humanes Immundefizienz Virus
EDTA	Ethylendiamintetra-essigsäure	ICAM-1	intracellular-adhesion-molecule-1
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	ID	innerer Durchmesser
et al.	et alii, et aliae (und andere)	IgG	Immunglobulin G
FcγR	Fc-gamma-Rezeptor	IgM	Immunglobulin M
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations	IgA	Immunglobulin A
G	Gauge	IgE	Immunglobulin E
g	Gramm	IgD	Immunglobulin D
Glu	Glutaminsäure	inakt.	inaktiv
		IRS	Ischämie-Reperfusionsschäden
		IVC	individuell ventilierter Käfig
		IVM	Intravitalmikroskopie

kD	Kilodalton	MCF	maximum clot firmness
kg	Kilogramm	mg	Milligramm
KO	Knockout	MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
l	Liter	min	Minuten
LED	Licht-emittierende Diode	ml	Milliliter
LFA-1	lymphocyte- function-associated- antigen-1	ML30	maximale Lyse nach 30 Minuten
LI30	Lyse-Index nach 30 Minuten	mm	Millimeter
LYM	Lymphozyten	mm ²	Quadratmillimeter
Lys	Lysin	MONO	Monozyten
LZ	Leukozyten	MP	Mikropartikel
m	Männchen	n	Anzahl
Mac-1	macrophage-antigen- complex-1	NaCl	Natrium-Chlorid
MAK, C5b-9	Membranangriffs- komplex aus den Komplement- komponenten C5b, C6, C7, C8 und C9	NE	neutrophile Elastase
MASP- 1, -2, -3	MBL-assozierte Serinproteasen 1, 2 und 3	NET(s)	neutrophil extracellular trap(s)
MBL	Mannose-bindendes Lektin	NEUT	neutrophile Granulozyten
		nm	Nanometer
		NP	Nukleoprotein
		OD	äußerer Durchmesser

P	Properdin		Gewebsthrombo- plastin
p	p-Wert		
PBS	phosphate buffered saline	TFPI	tissue factor pathway inhibitor
PDI	Protein-Disulfid- Isomerase	TMB- Substrat	Tetramethylbenzidi- Substrat
PECAM- 1	platelet-endothelial- cell-adhesion- molecule-1	TVT	tiefe Venenthrombose
Plt	Plättchen, Thrombozyten	UV- Licht	ultraviolettes Licht
PRP	plättchenreiches Plasma	u.a.	unter anderem
PSGL-1	P-Selektin- Glykoprotein- Ligand-1	V _H	schwere variable Kette
s	Sekunden	V _L	leichte variable Kette
sIgM	sezerniertes IgM	Vol. %	Volumen-Prozent
SLE	systemischer Lupus erythematodes	vG	van Gieson-Färbung
sog.	sogenannt	VTE	venöse Thrombembolie
SPF	spezifisch Pathogen- frei	vWF	Von-Willebrand- Faktor
Tab.	Tabelle	w	Weibchen
TEM	Thrombelastometrie	WBC	Weiße Blutzellen
TF	tissue factor,	WPB	Weibel-Palade- Körperchen
		WT	Wildtyp

x	x-fach	z.B.	zum Beispiel
xg	x-faches der Erdbeschleunigung		

XI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau muriner venöser Thromben aus dem Stenose-Mausmodell 48h nach Ligatur.....	4
Abbildung 2: Ablauf der Gerinnungskaskade im Blutgefäßlumen, modifiziert nach MARSHALL et al. ³⁸	7
Abbildung 3: Schema des Mechanismus der Thrombusentstehung bei TVT, modifiziert nach SCHULZ et al. ⁸⁵	14
Abbildung 4: Ursprung von Antikörpern in B-Zellen	17
Abbildung 5: Aufbau eines Antikörpermoleküls.....	18
Abbildung 6: Drei Aktivierungswege der Komplementkaskade, modifiziert nach KOLEV et al. ¹⁴⁸	27
Abbildung 7: Mikrochirurgisches OP-Besteck und Histocage.....	43
Abbildung 8: Stenosierung der Vena cava caudalis	47
Abbildung 9: Entnahme des Thrombus nach 48h.....	49
Abbildung 10: Sham-Operation.....	50
Abbildung 11: Messprinzip der Thrombelastometrie; © Tem International GmbH	54
Abbildung 12: Parameter der Thrombelastometrie; © Tem International GmbH	55
Abbildung 13: Strahlengang im Epifluoreszenzmikroskop	57
Abbildung 14: Herstellung der Standardreihe für den IgG-ELISA	69
Abbildung 15: Herstellung der Standardreihe für den IgM-ELISA.....	70
Abbildung 16: Vergleich der Blutflussgeschwindigkeit vor und nach Ligatur der Vena cava caudalis;	77
Abbildung 17: Vergleich von Thrombusgewicht und –inzidenz verschiedener Antikörper-Knockout-Mausstämmen (sIgM ^{-/-} : n=8; AID ^{-/-} : n=6; sIgM ^{-/-} -AID ^{-/-} : n=8) zu einer Wildtyp-Kontrollgruppe (n=8);	80
Abbildung 18: Mittelwerte der IgG- und IgM-Serumkonzentrationen in den verschiedenen Antikörper-Knockout-Mausstämmen (jeweils n=3) verglichen mit der C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=3);	81
Abbildung 19: Korrelation der IgG- bzw. IgM-Konzentration im Serum der drei Antikörper-Knockout-Mausstämmen sIgM ^{-/-} -AID ^{-/-} , sIgM ^{-/-} und AID ^{-/-} sowie der C57BL/6J-Wildtypgruppe mit den jeweilig ermittelten mittleren Thrombusgewichten.....	82

Abbildung 20: Mittelwerte der IgG- und IgM-Serumkonzentrationen einer C57BL/6J-Wildtyp-Gruppe (n=3) 48h nach Ligatur der Vena cava caudalis, verglichen mit den basalen Werten der C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=3);	83
Abbildung 21: Blutbild der verschiedenen Antikörper-Knockout-Mausstämme (sIgM ^{-/-} AID ^{-/-} : n=5; sIgM ^{-/-} : n=5; AID ^{-/-} : n=3) im Vergleich zu einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=11)	85
Abbildung 22: Vergleich von Thrombusgewicht und –inzidenz einer mit polyklonalem IgG/IgA substituierten sIgM ^{-/-} AID ^{-/-} -Gruppe (n=10) zu einer mit Fc-Fragmenten substituierten sIgM ^{-/-} AID ^{-/-} -Kontrollgruppe (n=7);	86
Abbildung 23: Vergleich von Thrombusgewicht und –inzidenz einer mit Fc-Fragmenten substituierten sIgM ^{-/-} AID ^{-/-} -Kontrollgruppe zu mit unspezifisch bindenden Antikörpern substituierten sIgM ^{-/-} AID ^{-/-} -Versuchsgruppen	88
Abbildung 24: Thrombusgewicht und –inzidenz von Fc γ -Rezeptor-defizienten Mäusen (n=6), verglichen mit einer Wildtyp-Kontrollgruppe (n=6);	90
Abbildung 25: Blutbild einer Fc γ R ^{-/-} Fc γ RIIb ^{-/-} -Gruppe (n=3) im Vergleich zu einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=11)	91
Abbildung 26: Vergleich der Leukozytenrekrutierung einer sIgM ^{-/-} AID ^{-/-} -Gruppe (n=8) mit einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=10)	93
Abbildung 27: Vergleich der Thrombozytenrekrutierung einer sIgM ^{-/-} AID ^{-/-} -Gruppe (n=6) mit einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=10)	95
Abbildung 28: Thrombelastometrische Analyse des Blutes von sIgM ^{-/-} AID ^{-/-} -Mäusen (n=5) im Vergleich zu einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=6)	97
Abbildung 29: Thrombusgewicht und –inzidenz von Komplementfaktorrezeptor-2-defizienten Mäusen (n=11) verglichen mit einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=10);	99
Abbildung 30: Mittelwerte der IgG- und IgM-Serumkonzentrationen im CR2 ^{-/-} -Stamm (n=3) verglichen mit der C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=3);	100
Abbildung 31: Blutbild einer CR2 ^{-/-} -Gruppe (n=3) im Vergleich zu einer	

C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=11)	101
Abbildung 32: Thrombelastometrische Analyse des Blutes von CR2-/-Mäusen (n=4) im Vergleich zu einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe (n=6)	102
Abbildung 33: Ermittlung der Thrombozytenfläche in Relation zur Fläche des Gesamtthrombus in C57BL/6J-Wildtyp (n=3)- und CR2-/- Thromben (n=2)	104
Abbildung 34: Ermittlung der Gesamtleukozyten- und Neutrophilenzahl in C57BL/6J-Wildtyp-(n=3) und CR2-/-Thromben (n=2)	105
Abbildung 35: Immunhistologische Analyse der IgG- bzw. IgM-Verteilung in Thromben von CR2-defizienten Mäusen (n=2) im Vergleich zu C57BL/6J-Thromben (n=3)	108
Abbildung 36: Vermuteter Mechanismus der Antikörper-abhängigen TVT- Entstehung	122

XII. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Expression der murinen Fc-Rezeptoren auf verschiedenen Zelloberflächen.....	23
Tabelle 2: Für die immunhistologischen Färbungen CD41, CD45 und Ly-6G verwendete Primärantikörper	65
Tabelle 3: Zur immunhistologischen Doppelfärbung IgG/IgM-CD31 verwendete Antikörper	66
Tabelle 4: Versuchsgruppen zur Standardisierung des Stenose-Mausmodells ...	73
Tabelle 5: Versuchsgruppen zur Bestimmung von Thrombusgewicht und Inzidenz nach 48h.....	73
Tabelle 6: Versuchsgruppen zur intravitalmikroskopischen Analyse der Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung	74
Tabelle 7: Versuchsgruppen zur Analyse der Blutgerinnung mittels Thrombelastometrie	74
Tabelle 8: Übersicht des relativen Unterschieds im Thrombusgewicht der Antikörper-Knockout-Mausstämme zum C57BL/6J-Wildtyp-Stamm sowie der zugehörigen Effektgröße.....	80
Tabelle 9: Übersicht des relativen Unterschieds der IgG- und IgM-Serumkonzentration der Antikörper-Knockout Mausstämme zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen	81
Tabelle 10: Übersicht des relativen Unterschieds der IgG- und IgM-Serumkonzentration des C57BL/6J-Wildtypstammes 48h post Ligatur zum basalen Wert des C57BL/6J-Wildtypstammes sowie der zugehörigen Effektgrößen.....	83
Tabelle 11: Übersicht des relativen Unterschieds im Blutbild der Antikörper-Knockout Mausstämme zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen.....	85
Tabelle 12: Übersicht des relativen Unterschieds im Thrombusgewicht der mit polyklonalem IgG/IgA substituierten sIgM-/-AID-/-Gruppe zur Kontrollgruppe sowie der zugehörigen Effektgröße.....	86
Tabelle 13: Übersicht des relativen Unterschieds im Thrombusgewicht der mit unspezifisch bindenden Antikörpern substituierten sIgM-/-AID-/-Gruppen zur Kontrollgruppe sowie der zugehörigen Effektgröße....	89

Tabelle 14: Übersicht des relativen Unterschieds im Thrombusgewicht des Fc γ -Rezeptor-Knockout-Stammes zum C57BL/6J-Kontrollstamm sowie der zugehörigen Effektgröße	90
Tabelle 15: Übersicht des relativen Unterschieds im Blutbild des Fc γ -Rezeptor-Knockout Mausstamms zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen	91
Tabelle 16: Übersicht des relativen Unterschieds der Leukozytenrekrutierung über 6h einer sIgM-/-AID-/-Gruppe im Vergleich zu einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe sowie der zugehörigen Effektgrößen	94
Tabelle 17: Übersicht des relativen Unterschieds der Thrombozytenrekrutierung über 6h einer sIgM-/-AID-/-Gruppe im Vergleich zu einer C57BL/6J-Wildtyp-Kontrollgruppe sowie der zugehörigen Effektgrößen	95
Tabelle 18: Übersicht des relativen Unterschieds in Parametern der Thrombelastometrie-Analyse des sIgM-/-AID-/-Stammes zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen	98
Tabelle 19: Übersicht des relativen Unterschieds im Thrombusgewicht des CR2-defizienten-Mausstammes zum C57BL/6J-Kontrollstamm sowie der zugehörigen Effektgröße	99
Tabelle 20: Übersicht des relativen Unterschieds der IgG- und IgM-Serumkonzentration des CR2-/-Stammes zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen	100
Tabelle 21: Übersicht des relativen Unterschieds im Blutbild des CR2-defizienten Mausstamms zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen	101
Tabelle 22: Übersicht des relativen Unterschieds in Parametern der Thrombelastometrie-Analyse des CR2-/-Stammes zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen	103
Tabelle 23: Übersicht des relativen Unterschieds in immunhistologischen Untersuchungen von Thrombozytenfläche, Leukozytenanzahl und NETs des CR2-/-Stammes zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der zugehörigen Effektgrößen	105
Tabelle 24: Übersicht des relativen Unterschieds in immunhistologischen Untersuchungen der Verteilung von IgG und IgM in Thromben des CR2-/-Stammes zum C57BL/6J-Wildtypstamm sowie der	

zugehörigen Effektgrößen	107
--------------------------------	-----

XIII. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg bedanken. Er bot mir die Chance für die Bearbeitung dieses Projekts in seiner Arbeitsgruppe und seine Anregungen und Hilfestellungen waren essenziell für das Gelingen dieser Arbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. vet. Thomas Göbel für die Übernahme der Arbeit, deren gewissenhafte Durchsicht und Einreichung an der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität.

Mein größter Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. med. Konstantin Stark. Für meine zahlreichen Fragen und unermüdliche Diskussionen war er immer erreichbar, motivierte und begeisterte mich für dieses Projekt und neue Ideen. Ohne seine Gabe für das Sehen von Zusammenhängen, seine Einfälle und sein Engagement wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch Frau Dr. med. vet. Sue Chandraratne möchte ich besonders danken. Durch sie wurde ich auf dieses Dissertationsprojekt und die Arbeitsgruppe aufmerksam. Sie stand mir in jeder Situation zur Seite und unterstützte und motivierte mich. Eine große Hilfe war sie mir bei der Erstellung der histologischen Daten, der Einarbeitung in Computerprogramme und Auswertemethoden sowie bei tierärztlichen Belangen.

Darüber hinaus möchte ich mich von Herzen bei Frau Dr. med. vet. Irene Schubert bedanken, für die Einarbeitung in die unterschiedlichen Methoden, Operationsverfahren und Auswertemethoden, für ihre unermüdliche kompetente Unterstützung und Beantwortung meiner Fragen, die Durchsicht meiner Arbeit sowie tierärztlichen Rat.

Auch Frau Dr. med. vet. Isabel Fiola gilt mein größter Dank für die ausgezeichnete Einarbeitung in die Operationsmethoden und für Ihre großartige Arbeit im Vorfeld dieses Projekts, auf deren Grundlage meine Arbeit erst möglich wurde.

Für seine Unterstützung in der Erstellung der histologischen Daten und seine Kollegialität möchte ich Herrn Sven Stockhausen ganz besonders danken.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. Michael Lorenz für die Einweisung in die Arbeitstechniken im Labor und Unterstützung in allen Belangen.

Auch bei Frau Dr. med. vet. Annekathrin Eckart möchte ich mich besonders für ihre Hilfe bei der Erstellung der ELISAs sowie für die Beantwortung sämtlicher Fragen und tierärztlichen Rat bedanken.

Herrn Henrik Herbert danke ich sehr für seine Hilfe beim Isolieren von Thrombozyten und sein Knowhow von technischen Geräten und Computerprogrammen.

Aber auch dem Rest der Arbeitsgruppe möchte ich von ganzem Herzen Danken. Speziell Frau Meike Miller, Frau Vanessa Philippi, Frau Gerhild Rosenberger, Frau Dr. med. vet. Nicole Urtz, Herrn Dr. Raffaele Coletti, Frau Christin Lehmann und Herrn Sebastian Helmer.

Gemeinsam waren wir ein großartiges Team, das sich durch seine familiäre Atmosphäre, gegenseitige Unterstützung und Motivation, Teamgeist sowie wissenschaftliches Arbeiten auf hohem Niveau auszeichnet.

Daneben gilt mein Dank außerdem Herrn PD Dr. med. vet. Sven Reese für seine Hilfestellung bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Besonderer Dank gebührt auch Herrn Dr. Admar Verschoor für seine äußerst hilfreichen Ideen und Anregungen in diesem Projekt sowie ihm, seiner gesamten Arbeitsgruppe und speziell Herrn Andreas Wanisch für die zur Verfügung gestellten Knockout-Mauslinien.

Für die Benutzung des Rotem-Thrombelastometrie-Geräts möchte ich der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Bernd Engelmann ganz herzlich danken. Speziell Frau Dr. Susanne Pfeiler für die Einweisung, Hilfestellung und ständige Erreichbarkeit.

Großer Dank auch an Brigitte Blount und die Tierpfleger des Walter-Brendel-Zentrums für die zuverlässige Betreuung und Versorgung der Mäuse.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinem Partner danken, die mir mein Studium und die Dissertation erst ermöglicht haben, indem sie mir Rückhalt geben, stets an mich glauben und mich unterstützen, wo sie nur können. Fabian, danke, dass du immer an meiner Seite stehst.