

Zusammenspiel von Thrombozyten  
und neutrophilen Granulozyten in der Leber unter  
inflammatorischen Bedingungen

von Marie-Louise Laura Hoffknecht

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

Zusammenspiel von Thrombozyten  
und neutrophilen Granulozyten in der Leber unter  
inflammatorischen Bedingungen

von Marie-Louise Laura Hoffknecht

aus Hannover

München 2022

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Prof. Dr. Frank Ebel

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

Mentor: Dr. med. Leo Johannes Nicolai

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Ebel

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel  
Univ.-Prof. Dr. Stefan Unterer  
Priv.-Doz. Dr. Petra Kölle  
Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Tag der Promotion: 12.02.2022

Meiner Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II. LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Infektion und Sepsis.....</b>	<b>5</b>
1.1. Definition von Infektion und Sepsis .....	5
1.2. Lipopolysaccharid .....	7
1.3. Pneumonie und ARDS ( <i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i> ) .....	9
<b>2. Neutrophile Granulozyten.....</b>	<b>10</b>
2.1. Rekrutierung von Neutrophilen in der akuten Inflammation .....	14
2.1.1. rTEM (reverse transendotheliale Migration) von Neutrophilen .....	16
2.2. Die Rolle von Neutrophilen in der Wundheilung und der adaptiven Immunantwort .....	18
<b>3. Thrombozyten.....</b>	<b>19</b>
3.1. Aufbau von Thrombozyten .....	19
3.1.1. Immunologische Rezeptoren von Thrombozyten .....	20
3.1.2. Aus Thrombozyten freigesetzte Immunmediatoren.....	20
3.1.3. Von Thrombozyten exprimierte Adhäsionsmoleküle .....	21
3.2. Thrombozyten in der Immunabwehr.....	22
3.2.1. Thrombozyten-vermittelte Rekrutierung von Leukozyten.....	22
3.2.2. Modulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort durch Thrombozyten .....	23
3.2.3. Einfangen und Neutralisierung von Pathogenen durch Thrombozyten ....	23
3.2.4. Sonderfall der Thrombose: die Immunthrombose .....	24
3.3. Negative Aspekte der Aktivierung von Thrombozyten und Beteiligung in verschiedenen Krankheitsbildern .....	25
<b>4. Leber.....</b>	<b>27</b>
4.1. Immunologische Funktion der Leber .....	27
4.1.1. Hepatozyten.....	28
4.1.2. Endothelzellen der Leber (LSECs, <i>liver sinusoidal endothelial cells</i> ) .....	29
4.1.3. Kupffer-Zellen.....	29
4.2. Rekrutierung von Leukozyten bei akuter Inflammation .....	31
<b>III. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>33</b>

---

<b>1.</b>	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>33</b>
1.1.	Tierstämme.....	33
1.1.1.	C57BL/6J .....	33
1.1.2.	P-Sel KO .....	33
1.1.3.	Pf4-Cre x ROSA26-iDTR.....	34
1.2.	Tierhaltung und Zucht.....	34
<b>2.</b>	<b>Erstellung von Knochenmarkschimären .....</b>	<b>36</b>
2.1.	Definition Chimärismus .....	36
2.2.	Ablauf der Knochenmarkstransplantation.....	36
<b>3.</b>	<b>Operative Eingriffe .....</b>	<b>39</b>
3.1.	Narkose.....	39
3.1.1.	Narkosemittel und Analgesie .....	40
3.2.	Blutentnahmetechniken.....	43
3.2.1.	<i>V. facialis</i> .....	43
3.2.2.	Retrobulbärer Venenplexus.....	44
3.3.	Applikationstechniken.....	45
3.3.1.	Intravenöse Applikation .....	45
3.3.2.	Intraperitoneale Applikation .....	45
3.4.	Sepsismodelle.....	46
3.4.1.	Sterile Peritonitis .....	47
3.4.2.	ALI ( <i>Acute Lung Injury</i> ) .....	47
3.4.3.	Bewertung der klinischen Symptomatik einer LPS-induzierten Sepsis anhand eines klinischen Überwachungsbogens (Score Sheet).....	48
3.5.	Depletion von Thrombozyten.....	49
3.5.1.	Antikörpervermittelte Depletion .....	49
3.5.2.	Depletion mithilfe von Diphtherietoxin .....	49
3.6.	Konfokalmikroskopie.....	51
3.6.1.	Grundlagen der Konfokalmikroskopie.....	51
3.6.2.	Ablauf der Konfokalmikroskopie.....	52
3.6.3.	Intravitalmikroskopie der Leber.....	53
<b>4.</b>	<b>Thrombozyten Funktionsassays.....</b>	<b>57</b>
4.1.	Herstellung Thrombozytenpuffer .....	57
4.2.	Thrombozytenisolation.....	57
4.3.	Durchführung des Migrationsassays .....	58

4.4.	Funktionsweise des OLYMPUS Epifluoreszenzmikroskops.....	61
<b>5.</b>	<b>Durchflusszytometrie .....</b>	<b>61</b>
5.1.	Prinzip der Fluoreszenz.....	61
5.2.	Grundlagen der Durchflusszytometrie .....	62
5.3.	Aufbereitung der Leber zur durchflusszytometrischen Analyse.....	64
5.4.	Aufbereitung von Blut zur durchflusszytometrischen Analyse .....	67
5.5.	Auswertung .....	68
5.6.	Thrombozyten Aktivierungsassay.....	70
5.6.1.	Durchführung .....	70
5.7.	Legendplex Assay .....	71
5.7.1.	Plasmaisolation.....	72
5.7.2.	Durchführung .....	72
<b>6.</b>	<b>Immunhistochemie .....</b>	<b>73</b>
6.1.	Grundlagen der Immunhistochemie .....	73
6.2.	Organaufbereitung und Herstellung von Kryoschnitten .....	75
6.3.	Durchführung von Färbungen .....	77
6.4.	Aufnahme und Auswertung .....	79
<b>7.</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>80</b>
<b>IV.ERGEBNISSE.....</b>		<b>81</b>
<b>1.</b>	<b>Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten während akuter Inflammation.....</b>	<b>81</b>
1.1.	LPS-induzierte sterile Peritonitis .....	81
<b>2.</b>	<b>Auswirkungen einer Thrombozytendepletion in der LPS-induzierten Sepsis .....</b>	<b>87</b>
2.1.	Eine antikörpervermittelte Depletion von Thrombozyten in der LPS-induzierten sterilen Peritonitis führt zu einer erhöhten klinischen Symptomatik und erhöhter Mortalität .....	87
2.1.1.	Durchflusszytometrische Analyse von Leber und Blut.....	93
2.1.2.	LEGENDplex Assay mit Thrombozyten-depletiertem Plasma .....	101
2.2.	LPS-induzierte sterile Peritonitis nach Thrombozytendepletion in Pf4-Cre x ROSA26-iDTR Tieren.....	102
2.3.	LPS-induzierte sterile Pneumonie (ALI, <i>Acute Lung Injury</i> ) nach Thrombozytendepletion in C57BL/6J Tieren .....	107



---

<b>3.</b>	<b>Einfluss von P-Selectin auf die Efferozytose.....</b>	<b>113</b>
3.1.	LPS-induzierte sterile Peritonitis in P-Selectin Knockout Tieren.....	113
3.2.	LPS-induzierte sterile Peritonitis in P-Selectin KO-Chimären .....	117
3.2.1.	Migrationsassay von aus P-Selectin KO-Chimären isolierten Thrombozyten .....	122
<b>4.</b>	<b>Einfluss der Inhibition von TIM-4 auf die Efferozytose.....</b>	<b>123</b>
4.1.	LPS-induzierte Sepsis unter Blockade von TIM-4 als Alternative zu P-Selectin .....	123
<b>5.</b>	<b>Intravitalmikroskopie der Leber in LPS Sepsis.....</b>	<b>127</b>
<b>V. DISKUSSION .....</b>	<b>.....</b>	<b>130</b>
<b>1.</b>	<b>Die intraperitoneale Injektion von LPS führt zum Abfall der im Blut zirkulierenden Neutrophilen und Thrombozyten bei gleichzeitiger Akkumulation in der Leber.....</b>	<b>130</b>
<b>2.</b>	<b>Thrombozytopenie ist in der LPS-induzierten Sepsis mit schwerwiegenderen klinischen Symptomen sowie mit einer erhöhten Mortalität assoziiert .....</b>	<b>133</b>
<b>3.</b>	<b>Die Depletion von Thrombozyten führt unter dem Einfluss von LPS zur verminderten Efferozytose von Neutrophilen durch Kupffer- Zellen .....</b>	<b>135</b>
<b>4.</b>	<b>Thrombozytendepletion bewirkt die vermehrte Produktion proinflammatorischer Zytokine.....</b>	<b>141</b>
<b>5.</b>	<b>Untersuchung des Einflusses von P-Selectin auf eine mögliche Thrombozyten-assistierte Efferozytose von Neutrophilen in der Leber .....</b>	<b>143</b>
<b>6.</b>	<b>Untersuchung des Einflusses von TIM-4 auf die Efferozytose von Neutrophilen in der Leber .....</b>	<b>147</b>
<b>VI.AUSBLICK .....</b>	<b>.....</b>	<b>150</b>
<b>VII. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>.....</b>	<b>152</b>
<b>VIII. SUMMARY .....</b>	<b>.....</b>	<b>154</b>
<b>IX.ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>.....</b>	<b>156</b>

---

<b>X. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>162</b>
<b>XI.ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>164</b>
<b>XII. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>168</b>
<b>XIII. DANKSAGUNG .....</b>	<b>189</b>

## I. EINLEITUNG

Nach einer Zusammenkunft der *Society of Critical Care Medicine* sowie der *European Society of Intensive Care Medicine* im Jahr 2016, wurden die Kriterien zur Erkennung und Kategorisierung einer Sepsis als eine „lebensbedrohliche Organfunktionsstörung, entstanden aus einer fehlregulierten Immunreaktion infolge einer Infektion“ neu definiert [1]. Das als „Sepsis-3“ bezeichnete Konzept ergänzte bisher genutzte Parameter um neu gewonnene Erkenntnisse hinsichtlich der Pathogenese, Epidemiologie und möglicher Behandlungsstrategien mit dem Ziel, Patienten effektiver therapieren bzw. vor der Entstehung einer Sepsis bewahren zu können [1].

Laut einer im *Lancet* publizierten Studie im Rahmen der *Global Burden of Disease Study* erkrankten allein im Jahr 2017 rund 50 Millionen Menschen weltweit an einer Sepsis [2]. Die Zahl der Todesfälle wird dabei auf 11 Millionen geschätzt, und obwohl sich die Mortalität im Zeitraum von 1990-2017 um insgesamt 53 % verringerte, sind immer noch 1/5 aller weltweiten Todesfälle auf eine Sepsis zurückzuführen [2, 3]. Vor allem Länder mit niedrigem soziodemographischem Index (SDI), der demographische und sozioökonomische Merkmale zur Charakterisierung einer Population nutzt, weisen in Bezug auf Sepsiserkrankungen eine stark erhöhte Inzidenz und Mortalität auf [2, 4]. Wichtig hierbei ist, dass sich bei mehr als der Hälfte der tödlichen Verläufe eine Sepsis erst sekundär aus einer zugrundeliegenden Verletzung oder NCD (*non-communicable disease*, nicht-übertragbare Erkrankung) entwickelt [2] und als bestimmender Faktor des klinischen Verlauf nicht etwa die Art des auslösenden Pathogens, sondern die Immunreaktion selbst angesehen wird, die sich aus den Folgen von komplexen Wechselwirkungen zwischen Zellen und löslichen Faktoren ergibt. [3, 5].

Ein typisches Merkmal der Sepsis sowie des septischen Schocks ist ein zunehmender Abfall der zirkulierenden Thrombozyten, die sogenannte Thrombozytopenie. Thrombozyten, denen früher lediglich eine Bedeutung in der Hämostase zugeschrieben wurde, erlangen stetig mehr Aufmerksamkeit hinsichtlich ihrer immunologischen Funktion. So übertreffen sie beim Menschen die Anzahl der zirkulierenden Leukozyten um das 40fache und scheinen als „Wächterzellen“ das Endothel kontinuierlich auf Veränderungen zu scannen [6-8].

Anhand verschiedener Mustererkennungsrezeptoren wie Toll-Like Rezeptoren (TLR) sind sie in der Lage sowohl schadens- als auch pathogenassoziierte Strukturen zu erkennen und daraufhin im Zuge ihrer Aktivierung Leukozyten zum Inflammationsherd zu rekrutieren [9-12]. Wie Neutrophile können auch Thrombozyten bakterizide Stoffe, sog. Thrombocidine, aus intrazellulären Speichern freisetzen und die Ausbreitung der Erreger im Rahmen eines Phänomens, das Immunthrombose genannt wird, verhindern [13]. Durch die Bindung von Thrombozyten an neutrophile Granulozyten werden diese aktiviert und tragen durch Mechanismen wie der Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies oder diverser proteolytischer Enzyme zur Bekämpfung der eingedrungenen Pathogene bei [10, 14, 15]. Dabei ist die Aktivierung von Neutrophilen und ihre anschließende Rekrutierung ins entzündete Gewebe zwar essenziell, um Pathogene schnellstmöglich zu eliminieren, jedoch können akkumulierte Neutrophile auch zu einer Schädigung des Gewebes führen. Es gilt daher, die Freisetzung, Aktivierung und den Abbau von Neutrophilen streng zu regulieren, um eine Balance zu finden zwischen einer erfolgreichen Abwehr von Pathogenen und einer übersteigerten Immunreaktion, die dem Körper schadet [10, 14, 16, 17]. Die Entschlüsselung der auf zellulärer Ebene ablaufenden Mechanismen sowie deren Betrachtung innerhalb eines sowohl räumlichen als auch zeitlichen Kontext dieser hochgradig komplexen Immunreaktion können zur Entwicklung neuartiger Therapien zur Behandlung einer Sepsis beitragen [5, 18].

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit wurde auf die Leber gelegt: Als größtes solides inneres Organ kommen ihr neben Stoffwechselfunktionen wie der Proteinproduktion oder der Neutralisation von Toxinen auch eine immunologische Funktion zu [19-21]. Ausgestattet mit der größten Einzelpopulation gewebsansässiger Makrophagen sowie einer hohen Zahl an Sentinel- und Effektorzellen innerhalb des retikulohistiozytären Systems, erreichen sie über die Pfortader kontinuierlich verschiedenste Antigene und mikrobielle Produkte aus dem Darm, darunter auch LPS, was normalerweise nicht in der systemischen Zirkulation nachweisbar ist, im Portalblut aber in Konzentrationen von bis zu 1 ng/ml enthalten sein kann [6, 19, 21, 22]. Der unter diesen Umständen erforderliche antiinflammatorische Zustand unter *steady state* Bedingungen, der auch als „aktives Toleranzstadium“ bezeichnet wird, kann in einer akuten systemischen Inflammation rapide in einen proinflammatorischen umschlagen,

wodurch die Leber unter Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und der daraus resultierenden Rekrutierung verschiedenster Immunzellen maßgeblich an der Initiierung einer schnellen Immunantwort beteiligt ist [6, 19, 23]. Zur Wiederherstellung des ursprünglichen Gewebszustands ist es notwendig, von der zunächst proinflammatorischen in die auflösende Phase der Entzündung überzuleiten. Hierbei wurde ein Mechanismus mit antiinflammatorischer Wirkung identifiziert: Durch die Aufnahme aktivierter Neutrophiler durch Makrophagen, u.a. durch die Kupffer-Zellen in der Leber, werden diese nicht nur unschädlich gemacht und abgebaut, sondern auch eine antiinflammatorische Signalkaskade in den Makrophagen induziert [18, 24].

Die Auswirkungen der Interaktionen von Neutrophilen und Granulozyten in der akuten systemischen Inflammation sollten im Mausmodell einer Lipopolysaccharid-(LPS)-induzierten Sepsis untersucht werden. Thrombozyten könnten in diesem Zusammenhang eine protektive und immunmodulatorische Funktion einnehmen, indem sie den Abbau apoptotischer Neutrophiler (Efferozytose) vermitteln [6, 21, 25, 26]. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Bedeutung des auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten exprimierten Adhäsionsproteins P-Selectin (*platelet selectin*) gelegt.



## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Infektion und Sepsis

#### 1.1. Definition von Infektion und Sepsis

Eine Infektion ist definiert als die Invasion von Mikroorganismen in normalerweise steriles Gewebe [5, 25]. Als eine Sepsis wird ein wird hingegen die auf die Infektion folgende systemische Entzündungsreaktion bezeichnet, die sowohl durch das auslösende Pathogen als auch wirtsspezifische, endogene Faktoren beeinflusst wird und sich durch eine fehlregulierte Immunantwort sowie die Funktionsstörung eines oder mehrerer Organe von einer Infektion unterscheidet [1, 5]. Während früher lediglich Kriterien des *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) zur Einschätzung des Schweregrads evaluiert wurden, berücksichtigt das aktuelle Konzept „Sepsis-3“ auch nicht-immunologische Prozesse: So gelten kardiovaskuläre, neuronale, metabolische oder auch hormonelle Mechanismen für den klinischen Verlauf einer Sepsis als prognostisch relevant [1, 27-29], wobei voneinander abhängige, nichtlineare Wechselwirkungen aus zellulären und löslichen Komponenten im Kontext der Gesamtreaktion betrachtet und die Frage gestellt werden muss, wann eine funktionelle (adaptive) in eine dysfunktionelle (maladaptive) Immunantwort übergeht [5, 25].

Zur Beurteilung des klinischen Zustands eines Patienten wird der *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) Score herangezogen. Ein Punktestand von mindestens zwei deutet dabei auf das Vorliegen einer Organfunktionsstörung hin und ist mit einer Mortalität von mehr als zehn Prozent assoziiert [1]. Mit mehr als 40 Prozent liegt die Mortalität eines septischen Schocks als Unterkategorie einer Sepsis dagegen deutlich höher. Dieser liegt nach neuer Definition vor, wenn in einer Sepsis trotz erfolgter Volumensubstitution eine Katecholaminpflichtigkeit besteht bei gleichzeitigem Serumlaktat von mehr als 2 mmol/L (>18 mg/dL) [1, 30].

Häufig einhergehend mit einer Sepsis ist das Auftreten einer Thrombozytopenie, wobei ein inverses Verhältnis zwischen dem Schweregrad der Sepsis und der Thrombozytenzahl besteht [6, 21, 25, 26]. Laut einer Studie von Venkata *et al.* [31] leiden septische Intensivpatienten mit Thrombozytopenie häufiger an schwerwiegenden Blutungen und das Risiko eines akuten Nierenversagens ist

erhöht. Diese Patienten müssen im Durchschnitt länger intensivmedizinisch versorgt werden und weisen bei nicht überwundener Thrombozytopenie eine erhöhte 28-Tage-Mortalität auf [31].

Unter physiologischen Bedingungen liegt das Endothel in einem antikoagulantem Zustand vor, der während einer Sepsis und im septischen Schockgeschehen in einen hyperkoagulantem Zustand übergeht [32]. Angetrieben durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren wie dem Thrombozyten-aktivierenden Faktor (PAF, *platelet activating factor*) und Cathepsin G, die sowohl die Aktivierung des Endothels als auch der Thrombozyten zur Folge haben, kommt es letztendlich u.a. zur massiven Ablagerung von Fibrin, Endothelschädigung und durch die Ausbildung von Mikrothromben zur verminderten Perfusion der Gewebe [32]. Durch den übermäßigen Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten, kann diese Hyperkoagulabilität sekundär in den als disseminierte intravasale Gerinnung (DIC, *disseminated intravascular coagulation*) bezeichneten Zustand umschlagen [5, 25, 32, 33]. Gekennzeichnet wird dieser durch den aufgrund von Fibrinolyse auftretenden Anstieg zirkulierender Fibrinabbauprodukte, Thrombozytopenie und der Erschöpfung der in der Leber produzierten Faktoren Prothrombin, Fibrinogen sowie Faktor X und V, was mit schwerwiegenden Blutungen assoziiert ist [32].

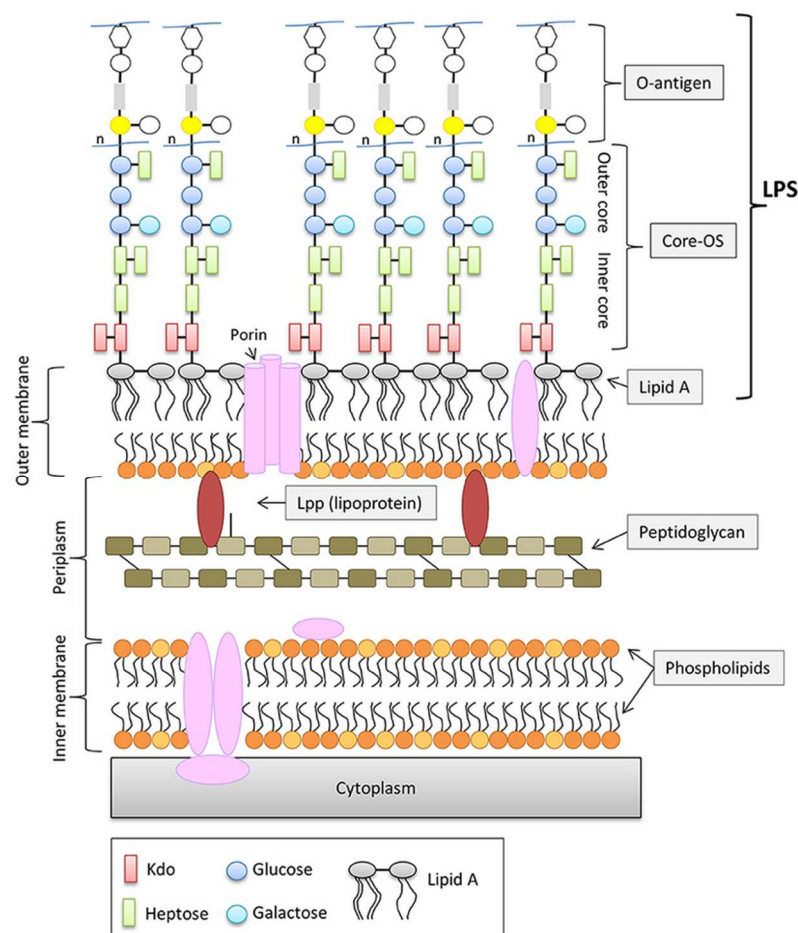
Bisherige Therapieansätze wie eine Anti-Endotoxin-Therapie scheiterten weitestgehend [5], was auf verschiedene Faktoren, z.B. eine schlechte Übertragbarkeit von Tiermodellen auf den Menschen oder uneinheitliche Versorgungsmaßnahmen zurückgeführt werden kann [5, 25]. Jedoch wurde eine höhere Überlebenschance bei Therapieansätzen, die auf die Wiederherstellung des Endothels abzielen, beobachtet. Dazu zählen im Rahmen der intensivmedizinischen Therapie ein verringertes Tidalvolumen bei beatmeten Patienten, um die Schädigung des Lungenendothels zu minimieren [34], niedrig dosierte Glucocorticoidgaben [35] oder auch die Insulingabe zur protektiven Wirkung auf das Endothel und zur Normalisierung des Glucosespiegels [36]. So kann in diesem Zuge auch die Thrombozytopenie durch eine Umkehrung des proinflammatorischen Zustands des Endothels und damit eine Verringerung der Thrombozyten-Endothel-Interaktionen korrigiert werden [25].



## 1.2. Lipopolysaccharid

LPS ist ein Glykolipid in der äußeren Membran der meisten gramnegativen Bakterien [37, 38] und dient als Strukturbestandteil und Permeabilitätsbarriere gegenüber Umwelteinflüssen, so kann LPS das Eindringen hydrophober Moleküle wie Antibiotika und Detergenzien verhindern (siehe Abbildung 1) [37, 38]. Grundsätzlich besteht es aus drei Hauptbestandteilen: Lipid A, eine auf Glucosamin basierende Phospholipidschicht als hydrophober Anteil, die mit dem Kernoligosaccharid verbunden ist. An dieses schließt wiederum das sog. O-Antigen an, welches durch eine hohe Variabilität gekennzeichnet ist [38, 39]. Lipid A bindet an Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4), einen Mustererkennungsrezeptor (PRR, *pattern recognition receptor*), der sowohl von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen als auch Thrombozyten exprimiert wird [6, 11]. Der Name Toll-like-Rezeptor geht dabei auf Untersuchungen der angeborenen Immunantwort in Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) zurück: Diese verfügen im Gegensatz zu Wirbeltieren, denen ein adaptives Immunsystem vorbehalten ist, lediglich über Komponenten des angeborenen Immunsystems [40, 41]. Ungeachtet dessen sind sie imstande auf das Eindringen von Pathogenen mit einer kompetenten Immunantwort zu reagieren, indem mithilfe einer Aktivierung von Toll-Proteinen antimikrobielle Peptide synthetisiert werden [40]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Untersuchungen im Menschen durchgeführt und ein homologes Protein identifiziert, was fortan als Toll-Like-Rezeptor 4 bezeichnet wurde [40]. Durch nachfolgende Studien konnten weitere Proteine einer gesamten TLR-Familie in sowohl niederen Lebewesen als auch Säugetieren entdeckt werden, die eine Vielzahl molekularer Strukturen auf Bakterien, Viren und Pilzen erkennen und mithilfe einer MyD88-abhängigen Signalkaskade zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems sowie der Produktion proinflammatorischer Zytokine, darunter TNF- $\alpha$  führen [6, 11, 20] [94]. Aslam *et al.* [11] stellten in einer Studie die Vermutung auf, dass die in der Sepsis auftretende Thrombozytopenie auf einen TLR-4-abhängigen Mechanismus zurückzuführen sein kann: So führte die systemische LPS-Injektion im Mausmodell zu einem Abfall der peripher zirkulierenden Thrombozyten, jedoch nicht in TLR-4-defizienten Tieren bzw. Tieren, die eine Punktmutation im TLR-4 Gen aufwiesen. Sie waren laut der Autoren gegenüber den immunstimulatorischen und pathophysiologischen Effekten von LPS resistenter als Kontrolltiere [9, 11, 42].

Letztendlich ist die hohe Mortalität der gramnegativen Sepsis auf die körpereigene Reaktion der LPS-Freisetzung und die Folgen des septischen Schocks zurückzuführen [38]. Trotzdem ist eine schnelle Erkennung der eingedrungenen Erreger und die darauffolgende Aktivierung des Immunsystems zu deren effektiven Beseitigung essenziell, um deren Ausbreitung im Organismus zu verhindern [43-45]. Einige Bakterien nutzen LPS, um sich vor der Erkennung durch das Immunsystem zu verbergen [38]. *Yersinia pestis*, der Erreger der Beulenpest beispielsweise, modifiziert unter Einfluss der Körpertemperatur des Wirts Lipid A durch Acetylierung, was daraufhin weniger immunstimulierend wirkt [38]. Obwohl Lipid A der am stärksten konservierte Strukturbestandteil von LPS ist, wird auch dort eine hohe Variabilität verzeichnet [46]. Die fortwährende Entdeckung und Charakterisierung neuer Lipid A Varianten wird daher zur Entwicklung aktueller Therapieansätze genutzt [46].



**Abbildung 1: Struktureller Aufbau der Zellwand von *Escherichia coli* K-12**

LPS als äußerer Bestandteil der Zellwand ist aus drei Hauptbestandteilen zusammengesetzt: Lipid A, dem Kernoligosaccharid und dem O-Antigen [47]

### 1.3. Pneumonie und ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*)

Die Lunge gilt als das kritischste und verletzlichste Organ in der Sepsis [48, 49] und ist hierbei einerseits durch direkte lokale Effekte des infizierenden Pathogens im Rahmen einer Pneumonie, andererseits durch eine endotheliale Schädigung der systemischen Immunreaktion betroffen, was als *Acute Lung Injury* (ALI) bezeichnet wird [10, 48]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass LPS diesen Zustand durch eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität und eine exzessive Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen in die Lunge hervorruft [48, 50]. Die Akkumulation von Neutrophilen ist dabei vorrangig für die entstehenden Gewebeschäden unter Beteiligung ihrer Rezeptoren PSGL-1, LFA-1 und Mac-1 verantwortlich [49, 51], deren induzierte Blockade sowohl eine verminderte Rekrutierung von Neutrophilen in der Lunge als auch weniger Gewebeschäden nach intraperitonealer LPS-Gabe zur Folge hatte [49, 52]. Bislang ist unklar, inwiefern Thrombozyten durch die Bindung an Neutrophile als PLAs (*platelet leukocyte aggregates*) zur Pathogenese beitragen [10]. So sollen sie mit der P-Selectin vermittelten Bindung die Rekrutierung der Neutrophilen erleichtern [10, 53-55], was durch die von ihnen ausgeschütteten Chemokine CCL5 und CXCL4 zusätzlich verstärkt wird [10, 56]. Sreeramkumar *et al.* [57] beobachteten, dass Neutrophile durch die Ausbildung von Fortsätzen aktiv die Blutgefäße nach Thrombozyten absuchen. Kommen sie mit diesen in Kontakt, führt die Bindung von PSGL-1 an seinen Liganden P-Selectin auf Thrombozyten zur Migration der Neutrophilen ins umliegende, entzündete Gewebe, wohingegen eine Inhibition dieser Interaktion mit geringfügigeren kollateralen Gewebeschäden nach der Aktivierung der Neutrophilen assoziiert ist und in verschiedenen Entzündungsmodellen reproduziert werden konnte. In einem durch Säure induzierten Maus-Modell der ALI wurde durch eine Blockade von P-Selectin oder durch die Depletion von Thrombozyten eine Verminderung des pulmonalen Schweregrads festgestellt [54, 55]. P-Selectin Chimären bestätigten daraufhin, dass dieser Effekt auf die Expression von P-Selectin auf Thrombozyten zurückzuführen ist und nicht auf die des Endothels [54]. Wird die Bildung der PLAs somit verhindert, wirkt sich das positiv auf den Gasaustausch und die Überlebenschance aus [54].

Das *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) gilt als schwerste Form der ALI und geht mit einer hohen Letalität von bis zu 60 % einher [58]. Gekennzeichnet

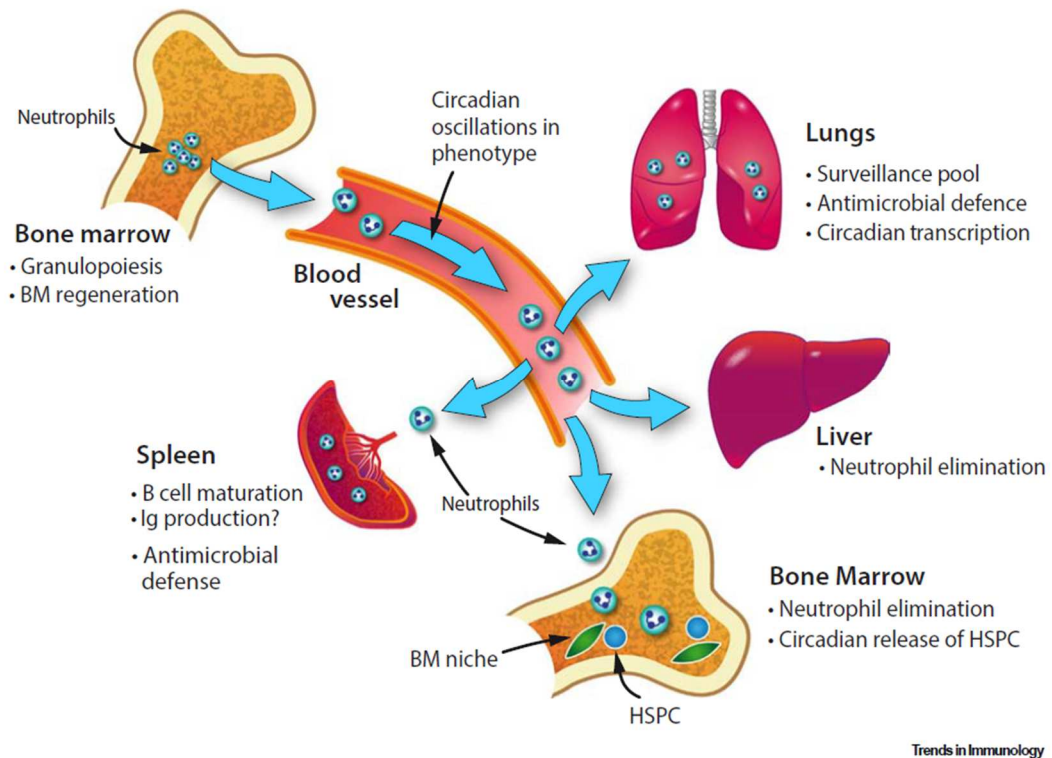
durch Ödeme und massive Endothelschädigung mit der Folge eines nicht kardiogen bedingten Atemversagens [53, 59], tritt es als Komplikation nach Trauma, Verbrennungen oder Sepsis auf [59-61]. Definiert wird es anhand der sog. Berlin-Klassifikation [62], die Parameter wie den Zeitpunkt der Erkrankung, Bildgebungsverfahren wie Röntgen- oder Computer-Tomographie sowie atemmechanische Parameter, assoziiert mit dem Grad der Oxygenierungsstörung, berücksichtigt [58, 63]: Das ARDS äußert sich durch ein akutes Auftreten der klinischen Symptomatik innerhalb einer Woche oder durch eine Verschlechterung der klinischen Symptomatik [58, 63]. Im Thorax-Röntgen sind bilaterale Infiltrate erkennbar, die weder auf einen Pleuraerguss, eine Atelektase oder eine Raumforderung zurückzuführen sind [58, 63]. Die Einteilung des Schweregrades erfolgt anhand des Horovitz-Quotienten, der als hinweisend für das Ausmaß der Oxygenierungsstörung gilt und durch den ein milder von einem moderaten oder schweren Verlauf unterschieden werden kann [58, 63].

Während man sich früher auf eine alleinige Dysfunktion der Lunge bezog, wird es heute als frühe Komponente des Multiorganversagens (MOFS, *Multisystem Organ Failure Syndrome*), des multisystemischen Organversagens, angesehen [60]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine durch LPS induzierte ALI durchgeführt, um die Auswirkung der Depletion von Thrombozyten zu untersuchen (siehe IV.2.3.).

## 2. Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten (in der vorliegenden Arbeit kurz als „Neutrophile“ bezeichnet), die zu den polymorphkernigen Granulozyten zählen, nehmen v.a. in der akuten Inflammation eine wichtige Rolle ein, da sie typischerweise die ersten Zellen sind, die zum Inflammationsherd rekrutiert werden [10]. Die Angaben zur durchschnittlichen Lebensspanne dieser Zellen variieren in der Literatur, so ging man bisher von einer eher kurzen Zeitspanne von bis zu acht Stunden beim Menschen und von nur max. 1,5 Stunden in der Maus aus [10, 64], wohingegen aktuelleren Berichten zufolge die durchschnittliche Halbwertszeit deutlich länger ausfallen könnte. Die Ergebnisse von Pillay *et al.* weisen auf eine Lebensdauer von durchschnittlich 5,4 Tagen beim Menschen sowie 12,5 Stunden bei der Maus hin [64], wurden jedoch bezüglich der zugrundeliegenden Vorgehensweise bereits mehrfach in Zweifel gezogen [65, 66]. Auch eine Aktivierung durch Zytokine oder

bakterielle Bestandteile, wie sie im Rahmen einer Entzündung auftreten, soll sich verlängernd auf die Lebensdauer auswirken und könnte in Verbindung mit einer längeren Zirkulationszeit auch auf komplexere Aufgaben der Neutrophilen hindeuten, wie eine Rolle bei der Auflösung einer Inflammation und der anschließenden Wundheilung [10, 67, 68]. Dabei sollte nicht unbeachtet bleiben, dass eine Persistenz im Gewebe auch mit einer Schädigung der umliegenden Zellen einhergehen kann [10]. Ein höchst effektiver Mechanismus aktivierter Neutrophiler zur Immobilisation und Elimination eingedrungener Pathogene ist die Freisetzung von sog. *neutrophil extracellular traps* (NETs) [10, 69]. Diese Form des Zelluntergangs wird als NETose bezeichnet und ist sowohl funktional als auch morphologisch von der Apoptose sowie der Nekrose von Zellen abzugrenzen [69, 70]: nach einer Depolarisation der Neutrophilen kommt es nach dem Untergang der Kernmembran und der Dekondensation des Chromatins zunächst zu einer Vermischung der intrazellulären Bestandteile der Zelle, bevor die netzartigen Strukturen, basierend auf einem Gerüst aus dekondensiertem Chromatin, explosionsartig freigesetzt werden [69-71]. Dem Gerüst anhaftend enthalten NETs neben Histonen verschiedene Proteine, darunter Cathepsine und Lactoferrin, aber auch Enzyme mit proteolytischer Aktivität wie die Neutrophilen Elastase (NE) oder die Myeloperoxidase (MPO) [10, 69], durch die neben dem direkten Einfangen der Erreger auch ein direktes Abtöten von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten ermöglicht wird [69, 72-75]. Die Zusammensetzung der enthaltenen antimikrobiellen Komponenten richtet sich dabei abhängig vom einwirkenden inflammatorischen Stimulus. So konnte gezeigt werden, dass selbst verschiedene Stämme eines Bakteriums, in diesem Fall *Pseudomonas aeruginosa*, zu unterschiedlichen Proteinzusammensetzungen führen [69, 76].



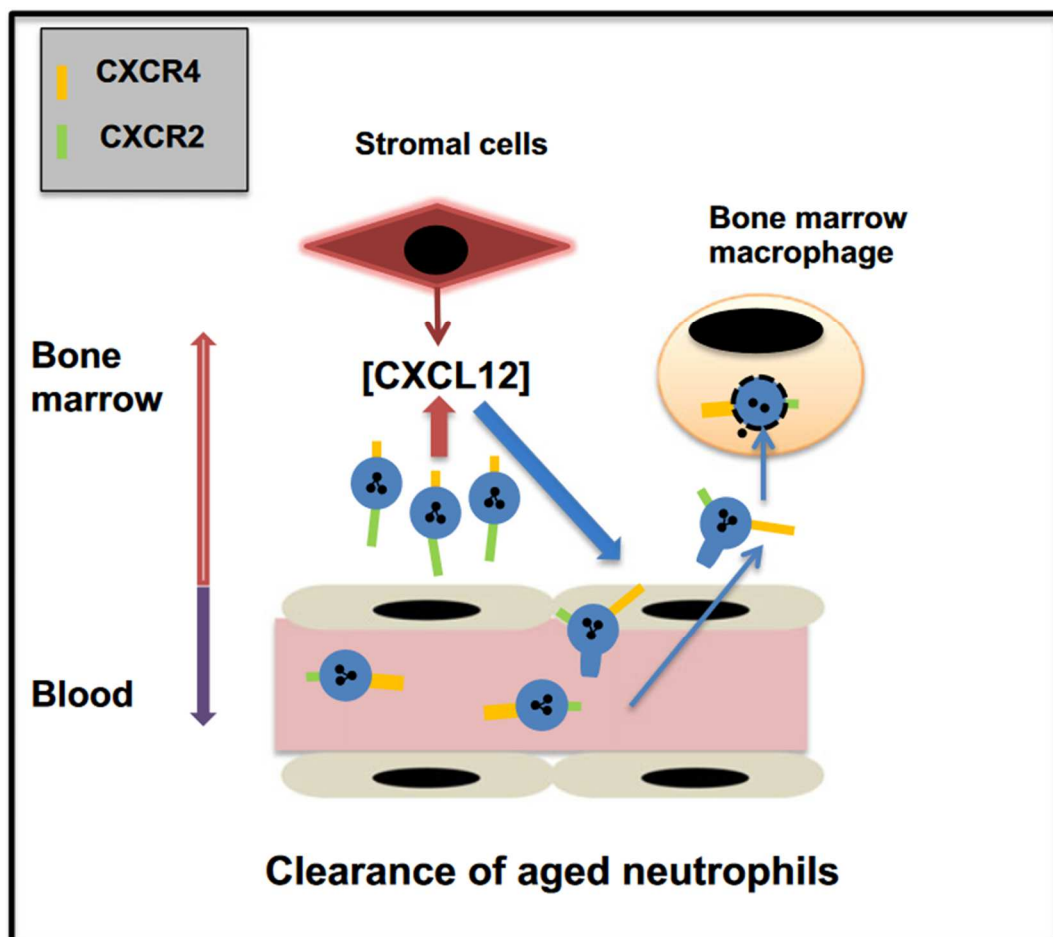
**Abbildung 2: Freisetzung, Verteilung und Abbau von Neutrophilen**

Neutrophile übernehmen nach ihrer Freisetzung aus dem Knochenmark unterschiedliche Funktionen in den einzelnen Kompartimenten [17].

Mit freundlicher Genehmigung von: Elsevier, Copyright © 2019

Unter basalen Bedingungen liegt ein Reservoir von Neutrophilen v.a. in Lunge, Leber, Milz und Knochenmark vor, um einerseits die schnelle Mobilisierung im Falle eines Infektionsgeschehens zu ermöglichen, oder auf ein ständiges Patrouillieren dieser Zellen hinweisen könnte (siehe Abbildung 2) [10, 77]. Sowohl die Freisetzung als auch der Abbau gealterter Neutrophiler im Knochenmark unter physiologischen Bedingungen unterliegt der Regulation durch CXCR-4 (*CXC chemokine receptor 4*), welches an dessen Liganden *stromal derived factor-1* (SDF-1), auch als CXCL-12 bekannt) auf Stromazellen des Knochenmarks bindet und zunächst eine Retention von Neutrophilen bewirkt [77]. CXCR-4, was zunächst nur in geringen Mengen auf der Oberfläche freigesetzter Neutrophiler zu finden ist, jedoch mit fortschreitendem Alter hochreguliert wird, bewirkt die Rückkehr (sog. *homing*) der seneszenten Zellen ins Knochenmark (siehe Abbildung 3). Dort werden sie zunächst apoptotisch, um anschließend von ortsansässigen Makrophagen abgebaut zu werden. Gleichzeitig wird durch CXCR-4 auch die Freisetzung von Neutrophilen aus dem Knochenmark negativ reguliert [77, 78]. Neben dem Knochenmark findet ein Abbau von Neutrophilen hauptsächlich in

Makrophagen und Dendritischen Zellen von Leber und Milz statt und wird durch eine Zytokinachse bestehend aus IL-23, IL-17 und dem *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) reguliert [10, 79]. Es konnte gezeigt werden, dass die Phagozytose apoptotischer Neutrophiler in diesen Zellen zu einer verminderten Produktion von IL-23 führt. IL-23 wiederum stimuliert die Freisetzung von IL-17 aus Neutrophilen-regulierenden T-Zellen (T<sub>n</sub>). IL-17 ist ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin, welches über G-CSF die Granulopoese induziert. Der durch die Phagozytose entstehende negative Feedback-Mechanismus verringert die Neubildung von Neutrophilen und ist somit maßgeblich an der Homöostase der Neutrophilenanzahl beteiligt [79]. Ein weiterer Mechanismus, der im weiteren Verlauf dieser Arbeit thematisiert werden soll, ist der Abbau aktivierter Neutrophiler durch gewebständige Makrophagen, wie die Kupffer-Zellen der Leber.



**Abbildung 3: Abbau gealterter Neutrophiler im Knochenmark**

Gealterte Neutrophile exprimieren vermehrt CXCR4, was zur Rückkehr ins Knochenmark und zum Abbau durch dort ansässige Makrophagen führt [80].

Man vermutet das Vorliegen mehrerer Untergruppen von Neutrophilen, wobei unklar ist, ob diese dabei aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle hervorgehen oder von unterschiedlicher Abstammung sind. So konnten in einer Versuchsreihe von Tsuda *et al.* aus MRSA-resistenten und -sensitiven Mäusen Neutrophile mit verschiedenen Phänotypen isoliert werden, die entweder pro- oder antiinflammatorisch wirkten und sich zudem von Neutrophilen aus naiven Kontrolltieren hinsichtlich ihrer Zytokin-/ Chemokinexpression, der Aktivierung von Makrophagen oder ihrer TLR-Expression unterschieden [81]. Neutrophile könnten somit den Verlauf einer Infektion durch ihren Phänotyp beeinflussen oder, was jedoch gegen unterschiedliche Abstammungslinien spräche, als plastische Zellen ihren Phänotyp situationsabhängig anpassen [10]. Diese Theorie wird von einer Studie von Grieshaber-Bouyer *et al.* [82] unterstützt, die murine Neutrophile aus unterschiedlichen Geweben nach der Induktion einer sterilen Inflammation isolierten und mithilfe von RNA-Sequenzierung (*single-cell RNA-seq*) analysierten. Sie fanden heraus, dass sich die Neutrophilen hinsichtlich ihres Phänotyps, abhängig vom jeweiligen Differenzierungsstadium und einwirkenden Stimuli, unterscheiden. Jedoch entwickeln sie sich dabei in longitudinaler Weise aus einem gemeinsamen Vorgängerphänotypen, was die Autoren als *neutrotime* bezeichnen [82].

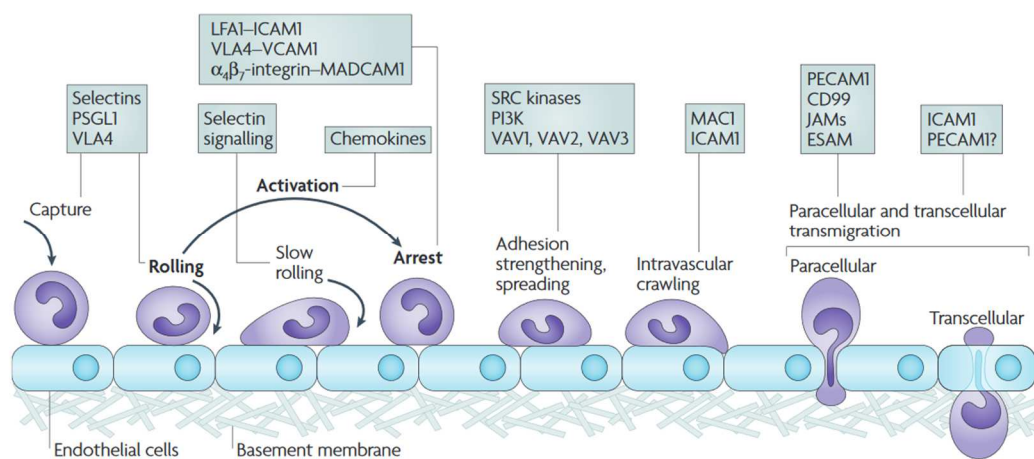
### **2.1. Rekrutierung von Neutrophilen in der akuten Inflammation**

Die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Gefäßsystem zum Inflammationsherd trotz vorherrschender Scherkräfte wird als mehrstufiger Prozess beschrieben (siehe Abbildung 4). Zunächst erfolgt das Rollen (*rolling*) in Strömungsrichtung des Bluts auf dem Endothel mithilfe haftender Verbindungen. Neutrophile haften über PSGL-1 an dessen Liganden P-Selectin, welches auf dem aktivierten Endothel exprimiert wird [10]. Eine gerichtete Vorwärtsbewegung entsteht, indem diese Verbindung auf der rückliegenden Seite der Zelle gelöst und gleichzeitig durch eine auf der vorderen Seite liegende ersetzt wird [83, 84]. Unterstützt wird dieser Mechanismus durch die Bildung von langen Membranfortsätzen (*slings*), deren Oberfläche mit LFA-1 bedeckt ist, das an ICAM-2 auf dem Endothel bindet. Indem sich die Bindungen dieser Fortsätze stückweise wieder ablösen, wickeln sich die *slings* um die Neutrophilen und führen durch eine verstärkte Adhäsion dazu, dass sich die Fortbewegung der Zellen weiter verlangsamt [85]. So kann der Kontakt zum Endothel, welches Antigene und Chemokine zum Aufbau eines



intravaskulären chemotaktischen Gradienten präsentiert, maximiert werden, was letztendlich zum sog. *priming* und der nachfolgenden Aktivierung der Neutrophilen führt [10]. Der Vorgang des *primings* wird u.a. durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , aber auch PAMPs und verschiedene Wachstumsfaktoren wie IL-8, Leukotrien B4 (LTB4) und dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) induziert [10, 77]. Lediglich Neutrophile, die diese Vorstufe durchlaufen, sind zur vollständigen Degranulation und Aktivierung der NADPH-Oxidase befähigt [10, 86].

Bevor Neutrophile letztendlich transmigrieren, zeigen sie eine Art Sondierungsverhalten und bilden Pseudopodien aus, mit denen sie die Umgebung abzusuchen scheinen [87]. Danach überwinden sie entweder trans- oder vorzugsweise parazellulär (109) erst das Endothel und anschließend die Basalmembran, wobei Zellverbindungen wie VE-Cadherin aktiv gespalten werden müssen [10, 85]. Nach dem Eintritt ins Gewebe folgen sie einem neuen chemotaktischen Gradienten, ausgelöst z.B. durch Komplementfaktor C5a, weg vom Endothel hin zum Inflammationsherd [10].



**Abbildung 4: Adhäsion von Leukozyten im Rahmen ihrer Rekrutierung während der Inflammation**

Leukozyten zeigen auf dem Endothel zunächst ein Selectin-vermitteltes *rolling*, gefolgt von Zytokin-induzierter Aktivierung und einer Integrin-vermittelten Arretierung [88].

Mit freundlicher Genehmigung von Nature Research, Copyright © 2007

Es gibt jedoch auch Ausnahmen dieser „klassischen“ Adhäsionskaskade, so ist nicht in jedem Organ die Rekrutierung von Neutrophilen abhängig von Selectinen und Integrinen [10, 85, 89, 90]. Das Beispiel der Lebersinusoiden, in denen statt eines

Entlangrollens eine direkte Adhäsion über das Ligandenpaar Hyaluron-CD44 zu beobachten ist, wurde bereits beschrieben [89]. Die Sinusoide der Lunge sind dagegen so schmal, dass es zu einer mechanischen Sequestrierung der Neutrophilen kommt, was neben dem geringen Durchmesser auch durch die erhöhte Starrheit der Zellen nach Aktivierung bedingt ist [86]. Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Mikrozirkulation haben darstellen können, wie Thrombozyten als Brücke zwischen Endothel und Neutrophilen fungierten, indem sie durch zusätzliche Expression von P-Selectin zur Rekrutierung von Neutrophilen unter hohen Scherkräften beitrugen [91].

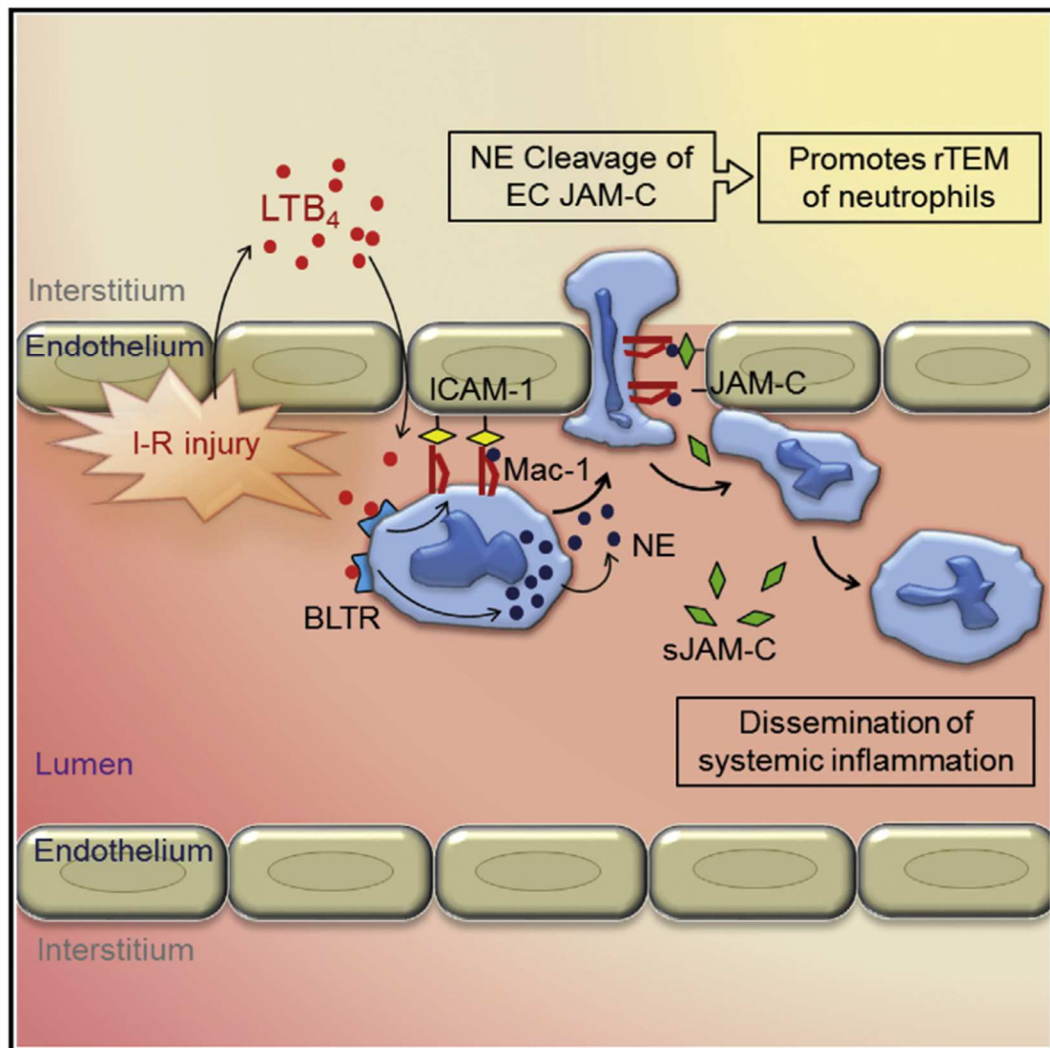
In den durchgeführten Versuchen dieser Arbeit sollte der Einfluss der P-Selectin Expression auf Thrombozyten auf den Abbau aktivierter Neutrophiler in der Leber unter LPS Einfluss untersucht werden. P-Selectin wird jedoch nicht nur auf Thrombozyten, sondern auch auf aktiviertem Endothel exprimiert. Nach LPS Gabe wurde dort ein 20-50facher Anstieg der Expression festgestellt, weswegen P-Selectin als Aktivierungsmarker für das Endothel geeignet zu sein scheint [42].

Als Alternative zu P-Selectin auf Thrombozyten wurde die Auswirkung der Inhibition von TIM-4 auf die Phagozytose von Neutrophilen durch Kupffer-Zellen untersucht. TIM (*T-cell Ig and mucin domain*)-Proteine gehören zu den Oberflächenrezeptoren, wobei TIM-4 als einziger nicht auf T-Zellen zu finden ist, sondern auf der Oberfläche von dendritischen Zellen und Makrophagen, darunter auch den Kupffer-Zellen der Leber, exprimiert wird. Die Funktion ist auf die Aufnahme apoptotischer Zellen im Rahmen der Phagozytose durch die Bindung von Phosphatidylserin zurückzuführen. Phosphatidylserin umfasst etwa 7% der Phospholipide einer Zelle, liegt aber im inneren Blatt der Zellmembran vor. Erst durch eine Umverteilung an die äußere Oberfläche im frühen Stadium der Apoptose, dem programmierten Tod einer Zelle, bewirkt es als sog. „eat me-Signal“ die Erkennung durch andere Zellen [92-95].

### **2.1.1. reverse transendotheliale Migration (rTEM) von Neutrophilen**

Obwohl die meisten der rekrutierten Neutrophilen innerhalb einer akuten Inflammation nach Aktivierung im Gewebe absterben und von ansässigen Makrophagen phagozytiert werden, konnten Colom *et al.* im Mausmodell zeigen, dass ein Teil zurück ins Gefäßsystem migriert, was als reverse transendotheliale Transmigration (rTEM) bezeichnet wird und sowohl im

Ischämie-Reperfusionen-Modell als auch nach lokaler Administration von LPS auftritt [96]. Dabei steht die rTEM in Zusammenhang mit dem Verlust des Adhäsionsproteins *junctional adhesion molecule C* (JAM-C), das als Verbindung zwischen Endothelzellen lokalisiert ist [96, 97]. Verantwortlich für die Verminderung ist das im Rahmen der Entzündung freigesetzte LTB<sub>4</sub>, wobei die JAM-C Expression selektiv in den postkapillären Venolen gesenkt wird, einem Hotspot der Neutrophilen-Transmigration. Der zugrundeliegende Mechanismus ist dabei Neutrophilen-abhängig, da LTB<sub>4</sub> zur Freisetzung der Neutrophilen-Elastase (NE) führt, die die JAM-C Verbindungen des Endothels spaltet (siehe Abbildung 5). Lokale LTB<sub>4</sub>-Injektion im Cremaster-Modell führt zudem zu einer Akkumulation von Neutrophilen in der Lunge sowie Gewebeschädigung in Organen wie Lunge, Leber und Herz, was durch Inhibition der NE vermindert wird [96]. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass ein lokaler Verlust von JAM-C im Rahmen der rTEM von Neutrophilen die Entwicklung einer lokal begrenzten in eine sekundäre systemische Inflammation bewirken kann. Lösliches JAM-C (sJAM-C), welches bei der enzymatischen Spaltung entsteht, ist im Plasma von ARDS-Patienten im Vergleich zu Probanden mit normaler Lungenfunktion erhöht. Außerdem ergibt sich eine direkte Korrelation zwischen der sJAM-C Plasmakonzentration und dem klinischen Outcome von Patienten mit Multiorganversagen nach dem dazugehörigen SOFA Score [96]. Neutrophile, die eine rTEM durchlaufen haben, unterscheiden sich hinsichtlich ihres Phänotyps von naiven Neutrophilen und zeigen im Vergleich weniger Apoptose [98]. Ob die Fähigkeit zur rTEM dazu dienen soll, Neutrophile, wenn sie nicht an der Infektion zugrunde gegangen sind, in der Zirkulation zu erhalten und damit einen positiven Aspekt darstellt, ist noch unklar [10]. Jedoch ist die aktive Beendigung der Entzündungsreaktion durch den Wirt als streng regulierter Prozess essenziell, um vor exzessiver Gewebeschädigung oder der Entwicklung einer chronischen Entzündung zu schützen [10]. Dabei unterscheidet man eine antiinflammatorische Phase, in der die Leukozytenrekrutierung limitiert wird, von einer die Inflammation auflösenden Phase, bei der Makrophagen apoptotische Neutrophile und Debris entfernen [10, 99].



**Abbildung 5: Funktionsweise der reversen transendothelialen Migration von Neutrophilen**

Durch die Spaltung interzellulärer Moleküle mithilfe der Neutrophilen-Elastase sind Neutrophile in der Lage, aus dem Gewebe wieder in die Zirkulation zu gelangen und in stromabwärts gelegene Organe abgeschwemmt zu werden [96].

Mit freundlicher Genehmigung von CELL PRESS, Copyright © 2015

## 2.2. Die Rolle von Neutrophilen in der Wundheilung und der adaptiven Immunantwort

Neben der Beteiligung an der Bekämpfung von Infektionen, gibt es auch Hinweise auf entzündungshemmende und wundheilungsfördernde Eigenschaften von Neutrophilen, so können sie durch das Entfernen abgestorbener Zellen und Bakterien selbst zum Wunddebridement beitragen oder dies durch das Anlocken von Monozyten zusätzlich unterstützen [10]. Durch die Freisetzung von Proteasen wie Matrixmetalloproteinase 9 (MMP9) können DAMP-haltige Strukturen, definiert als schadensassoziierte molekulare Muster (*damage associated molecular patterns*), die beim Gewebeerfall frei werden, abgebaut werden [10].

Neutrophile können auch die Angiogenese positiv beeinflussen, indem sie u.a. den Wachstumsfaktor *vascular endothelial growth factor-A* (VEGFA) freisetzen [100]. Neutrophile sind außerdem an der Ausbildung der adaptiven Immunreaktion durch Förderung der humoralen und im Gegenzug Suppression der zellulären Antwort beteiligt. So können Neutrophile der Milz sich zu sog. B-Zell-Helfer Neutrophilen umwandeln, die durch die Freisetzung von *B-cell activating factor* (BAFF) und CD40L B-Zellen aktivieren und imstande sind die Produktion von Antikörpern zu fördern [10].

### 3. Thrombozyten

Bei Thrombozyten handelt es sich um kernlose Zellen [6], die in hoher Zahl im Blut zirkulieren. Während ein Erwachsener durchschnittlich zwischen  $150-400 \times 10^9/L$  zirkulierender Thrombozyten mit einer Lebensdauer von etwa acht bis zehn Tagen besitzt [6, 101], liegt die Zahl der Thrombozyten bei der Maus mit  $900-1600 \times 10^9/L$  Blut sogar deutlich höher [6, 21]. Murine Thrombozyten weisen dagegen lediglich eine Lebensdauer von vier bis fünf Tagen auf [6, 21]. Täglich werden 100 Milliarden neue Blutplättchen im Knochenmark produziert: Dort werden tausende sog. Prothrombozyten stückweise aus einem einzigen Megakaryozyten freigesetzt, dessen perlenkettenartige Zytoplasmafortsätze, aufbauend auf einem Gerüst aus Mikrotubuli, zwischen den Endothelzellen ins Gefäßsystem ragen [6, 102].

Während die Rolle von Thrombozyten in Hämostase und Thrombose hinreichend untersucht wurde, präsentieren neuere Studien eine zentrale Funktion von Thrombozyten in der Immunabwehr [103]. Sie werden als im Gefäßsystem patrouillierende Wächter beschrieben, die aufgrund einer Vielzahl an Immunrezeptoren, immunmodulatorischen Mediatoren und Adhäsionsmolekülen imstande sind, die Immunantwort des Wirts zu aktivieren und modulieren [103].

#### 3.1. Aufbau von Thrombozyten

Nachfolgend soll ein Überblick über die von Thrombozyten exprimierten Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle zur Interaktion mit verschiedenen Zellarten sowie die von Thrombozyten freigesetzten immunmodulatorischen Stoffe gegeben werden.

### 3.1.1. Immunologische Rezeptoren von Thrombozyten

Thrombozyten exprimieren verschiedene Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, darunter Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) einschließlich Toll-Like-Rezeptoren (TLR), Komplementrezeptoren und Fc-Rezeptoren (FcR) zur Bindung von Immunglobulinen (siehe Abbildung 6) [103]. Die meisten davon sind funktionelle Rezeptoren, die bei Bindung ihres Liganden zur Aktivierung der Zelle führen [103].

Toll-Like-Rezeptoren werden neben Thrombozyten auch auf Neutrophilen, Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert und erkennen als PRRs eine Vielzahl an molekularen Strukturen auf Bakterien, Viren und Pilzen, die als PAMPs bezeichnet werden [6, 11]. Sowohl humane als auch murine Thrombozyten verfügen dabei über die TLR2, 4 und 9, über die es letztendlich, vermittelt durch eine MyD88-abhängige Signalkaskade, zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine kommt [9, 11, 20, 42]. Es wird angenommen, dass die TLR-Expression während der akuten Inflammation die LPS-induzierte Thrombozytopenie und die Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) moduliert, da in TLR-defizienten Mäusen die Administration von LPS nicht wie bei Kontrolltieren zur Thrombozytopenie führte [11]. Wurden die Thrombozyten vor der Gabe von LPS depletiert, wurde insgesamt weniger TNF $\alpha$  freigesetzt, was für eine Rolle von Thrombozyten bei der LPS-induzierten Produktion proinflammatorischer Zytokine spricht [11].

### 3.1.2. Aus Thrombozyten freigesetzte Immunmediatoren

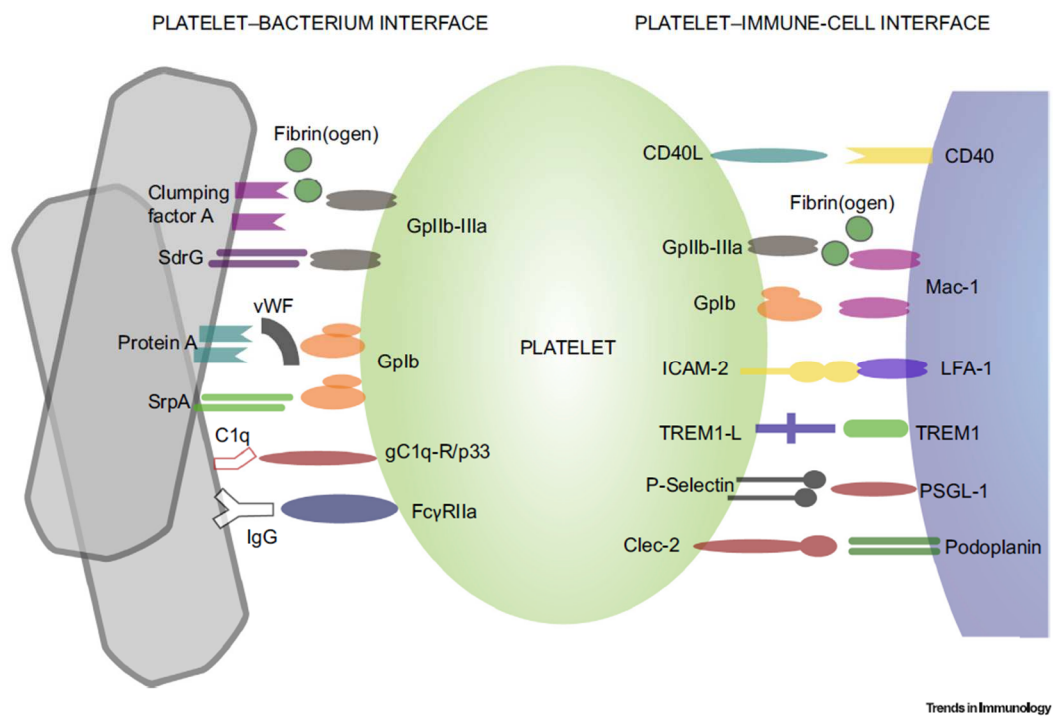
Unter basalen Bedingungen liegen Thrombozyten als linsenförmige Zellen mit glatter Oberfläche vor, die jedoch durch ins Zytoplasma ragende Membraneinstülpungen um ein Vielfaches vergrößert wird und damit die Aufnahme sowie schnelle Abgabe biologisch aktiver Moleküle im Rahmen einer Aktivierung ermöglicht [6]. Gespeichert werden diese Stoffe in drei verschiedenen Arten von Granula, bevor sie entweder direkt ans Blut abgegeben oder auf der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert werden. Den Hauptanteil machen  $\alpha$ -Granula aus, in denen v.a. Mediatoren zur Interaktion mit Leukozyten oder dem Endothel gespeichert sind, darunter P-Selectin und *platelet factor 4* (PF4). Einigen Berichten zufolge existieren zwei verschiedene Subtypen von  $\alpha$ -Granula, wodurch Thrombozyten je nach Freisetzungsmuster entweder pro- oder antiinflammatorisch wirken könnten [6, 104].  $\delta$ -Granula, auch „dense bodies“ genannt, enthalten potente

Immunmodulatoren wie Adenosindiphosphat/ -triphosphat (ADP/ATP) und Serotonin, um neben der Aggregation von Thrombozyten auch Effekte wie Vasokonstriktion und die Produktion proinflammatorischer Zytokine induzieren können [103]. Einen weiteren Speicher stellen Lysosomen dar, die Enzyme wie Glykosidasen oder Proteasen, aber auch kationische Proteine mit bakteriziden Eigenschaften ( $\beta$ -Glucuronidase, Elastase, Kollagenase) enthalten und somit einen Beitrag zur direkten Abwehr von Pathogenen leisten [103].

### 3.1.3. Von Thrombozyten exprimierte Adhäsionsmoleküle

Zur Interaktion mit dem Endothel oder Leukozyten exprimieren Thrombozyten auf ihrer Oberfläche verschiedene Adhäsionsmoleküle, darunter P-Selectin, was auch auf aktiviertem Endothel zu finden ist und über *P-selectin glycoprotein ligand 1* (PSGL-1) auf Leukozyten binden kann (siehe Abbildung 6) [42, 103]. Ebenso werden verschiedene Integrine, die als heterodimere transmembrane Proteine nach ihrer Aktivierung und Bindung an den zugehörigen Liganden eine Rolle in der Signalübertragung von Zellen spielen, auf Thrombozyten gefunden [103]. Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ III (GPIIb/IIIa) bindet ebenso wie GPIIb $\alpha$  als Bestandteil des Glykoproteinkomplex GPIIb-V-IX an den von-Willebrand-Faktor (vWF) und ist überdies als Ligand für Fibrinogen, Fibronectin und CD40L an der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten beteiligt [103, 105-108]. Der GPIIb-V-IX Komplex bindet an P-Selectin und Mac-1 (Integrin  $\alpha_2\beta_M$ ) auf Leukozyten und trägt somit ebenfalls zur Induktion der inflammatorischen Antwort bei [105, 109, 110]. In der Leber konnte außerdem eine über GPIIb $\alpha$  und vWF vermittelte Überwachungsfunktion von Thrombozyten identifiziert werden. Hierbei scannten Thrombozyten unter basalen Bedingungen die Oberfläche von Kupffer-Zellen, die vWF exprimieren, durch kurze *touch and go*-Interaktionen [111]. Nach Infektion mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder *Bacillus cereus* und der Präsentation von Bakterienantigenen auf der Oberfläche der Kupffer-Zellen, aggregierten die Thrombozyten daraufhin, um den Erreger regelrecht einzukapseln [19, 111]. Wurde die Interaktion zwischen Thrombozyten und Kupffer-Zellen inhibiert, zeigten die Tiere nach Infektion eine erhöhte Sterblichkeit [19, 111]. Rezeptoren wie *intercellular adhesion molecule 2* (ICAM-2) oder *platelet and endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1) gehören zur Immunglobulin Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle (IgCAM) und vermitteln die Interaktion mit Leukozyten, bspw. über

*lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) auf Leukozyten [103].



**Abbildung 6: Interaktion von Thrombozyten mit Immunzellen und Bakterien**

Dargestellt wird ein Überblick über die verschiedenen Rezeptor-Liganden Paare. Viele der gezeigten Rezeptoren zur Interaktion mit Leukozyten werden erst nach Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert, um eine unnötige oder vorschnelle Aktivierung der Immunzellen zu verhindern [8].

Mit freundlicher Genehmigung von: Elsevier, Copyright © 2019

### 3.2. Thrombozyten in der Immunabwehr

Thrombozyten übernehmen in ihrer Beteiligung an der Immunantwort verschiedene Funktionen, die im Folgenden in die Rekrutierung von Leukozyten, die Modulation der Immunantwort, das Einfangen von Pathogenen und das Abtöten von Pathogenen kategorisiert werden [103].

#### 3.2.1. Thrombozyten-vermittelte Rekrutierung von Leukozyten

Es konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten während einer Endotoxämie zunächst via GPIIb $\alpha$  und P-Selectin an das aktivierte Endothel binden, bevor die feste Adhäsion durch GPIIbIIIa erfolgt [103, 105]. Indem sie in aktiviertem Zustand selbst P-Selectin exprimieren, wird eine Oberfläche zur Bindung von Leukozyten, v.a. Neutrophilen, mittels PSGL-1 geschaffen, die letztendlich über Mac-1 an gebundenem Fibrinogen auf der Oberfläche der Thrombozyten adhärieren [103]. Intravitalmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass Neutrophile selbst zur Rekrutierung von weiteren Thrombozyten zum Inflammationsherd führen, die auf



anhaftenden Neutrophilen aggregieren und Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregate (*platelet neutrophil aggregates*, PNAs) bilden [14, 19, 112]. Diese Aggregate sind nicht als statische, sondern vielmehr als dynamische Strukturen zu betrachten, wobei die Thrombozyten über die Oberfläche der Neutrophilen zu fließen scheinen (14) und in Neutrophilen die Ausschüttung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) bewirken (siehe II.2.) [19, 111-113].

### **3.2.2. Modulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort durch Thrombozyten**

Thrombozyten gelten als die größte Quelle von sCD40L, also löslichem CD40L, welches neben der Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf Neutrophilen auch zur Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) führt [103]. Darüber hinaus aktiviert es Makrophagen, und ist an der adaptiven Immunantwort durch die Induktion von zytotoxischen T-Zellen und B-Zellen beteiligt [103, 114]. Durch Wechselwirkungen von Thrombozyten mit dem Endothel kommt es auf dessen Oberfläche zur Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM, *vascular cell adhesion molecule* (VCAM) und Selectinen, die die Adhäsion von Leukozyten fördern sowie zur direkten Ausschüttung von Zyto- und Chemokinen durchs Endothel [103].

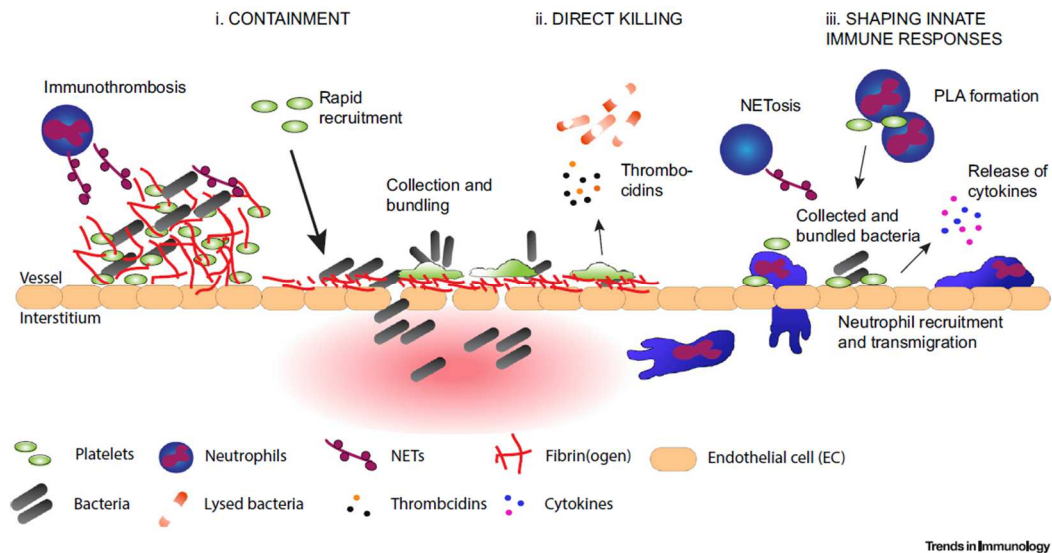
### **3.2.3. Einfangen und Neutralisierung von Pathogenen durch Thrombozyten**

Wie unter II.3.2.1. beschrieben, führt die Bildung von PLAs zur Ausschüttung von NETs durch Neutrophile, mit deren Hilfe Pathogene eingefangen werden, um deren Vermehrung und Dissemination zu verhindern (siehe auch II.4.1.) [111]. Bakterien wie z.B. MRSA, die die Aggregation von Thrombozyten induzieren, werden durch Faktoren wie  $\beta$ -Defensine aus Thrombozyten in ihrem Wachstum gehemmt [103, 115]. Im Fall des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum* wurde ein einzigartiger Mechanismus von Thrombozyten entdeckt, bei dem diese nach Aktivierung an infizierte Erythrozyten binden und das Parasitenwachstum durch die Freisetzung von PF4 aus den  $\alpha$ -Granula inhibieren [116]. PF4 bindet zusätzlich an den Duffy-Antigen-Rezeptor (Fy) der Erythrozyten und bewirkt damit ein Absterben der Zelle [103, 116]. Zwar wurde auch eine Internalisierung von Pathogenen durch Thrombozyten *in vitro* beschrieben, jedoch können diese in Ermangelung eines oxidativen Bursts oder einer Ansäuerung der Vakuole nicht abgetötet werden, wie

es in spezialisierten Phagozyten der Fall ist [103, 115].

### 3.2.4. Sonderfall der Thrombose: die Immunthrombose

Die Hämostase, der zur Verhinderung von Blutungen nach einer Gefäßverletzung eine essenzielle Funktion zukommt, beruht auf zwei grundlegenden Mechanismen: Der Aktivierung von Thrombozyten und Induktion der Gerinnungskaskade [13]. Im Gegensatz dazu steht die Thrombose als pathologische Abweichung der Hämostase. Diese gilt als weltweit häufigste Todesursache, indem sie durch intravaskuläre Thrombenbildung und Gefäßverschlüsse zu kardiovaskulären Ereignissen wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall, aber auch indirekt nach einer tiefen Venenthrombose (DVT, *deep vein thrombosis*) zu einer Lungenembolie führen kann [13]. Bislang angewandte Therapieansätze haben den Nachteil auch die physiologische Hämostase zu beeinträchtigen, was ein höheres Blutungsrisiko nach sich zieht. Daher ist die Entwicklung neuer Strategien ohne negative Auswirkungen auf die Hämostase von wachsender Bedeutung [13]. Als ein vielversprechender Ansatz hierfür gilt die Inhibition der Gerinnungsfaktoren, genauer Faktor XII und XI, beispielsweise durch den Einsatz inhibitorischer Antikörper [117]. Eine Sonderform der Thrombose ist die sog. Immunthrombose, die nicht immer pathologisch, sondern vielmehr als Effektormechanismus der angeborenen Immunantwort angesehen wird, um eingedrungene Pathogene zu erkennen und sie an ihrer Ausbreitung zu hindern (siehe Abbildung 7) [13, 118]. Eine Fehlregulation der Immunthrombose könnte laut Engelmann *et al.* allerdings den Ausgangspunkt für die Entstehung thrombo-embolischer Erkrankungen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall oder einer DIC (disseminierte intravasale Gerinnung) darstellen [13]. Letztere entsteht als Reaktion auf eine systemische Infektion und wird durch thromboseassoziierte Moleküle wie den intravaskulären Gewebefaktor (*tissue factor*, TF) und NET-assoziierte Nukleosomen in Verbindung mit einer überschießenden Entzündungsreaktion initiiert [13, 119, 120]. Es kommt zu Fibrinablagerungen und der Bildung von Mikrothromben in kleinen bis mittelgroßen Gefäßen, die zum Organversagen führen können [13, 121]. In Folge der übermäßigen Aktivierung und des damit einhergehenden Verbrauchs von Thrombozyten, der Gerinnungskaskade sowie thrombolytischer Signalkaskaden treten oftmals schwere Blutungen auf, die als Leitsymptom der DIC gelten und die Behandlung erheblich erschweren können (siehe II.1.1.) [121].



**Abbildung 7: Übersicht der immunologischen Funktion von Thrombozyten**

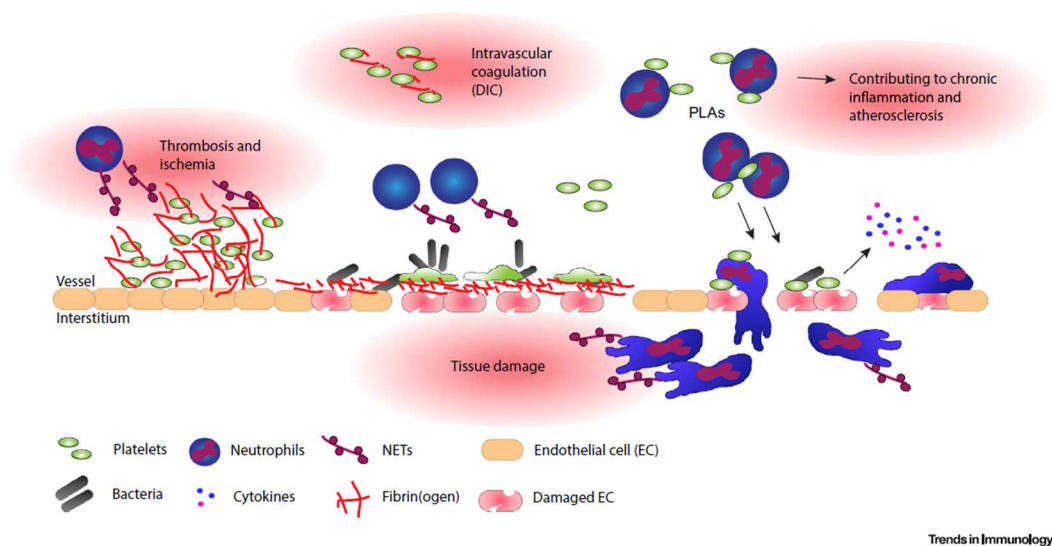
Thrombozyten werden zusammen mit Neutrophilen an den Inflammationsherd rekrutiert und verhindern die Verbreitung eingedrungener Pathogene, indem sie das angeborene und adaptive Immunsystem aktivieren [8].

Mit freundlicher Genehmigung von: Elsevier, Copyright © 2019

### 3.3. Negative Aspekte der Aktivierung von Thrombozyten und Beteiligung in verschiedenen Krankheitsbildern

Die genannten Auswirkungen einer Aktivierung von Thrombozyten sind jedoch nicht ausschließlich als positiv zu bewerten (siehe Abbildung 8) [103]. Zu nennen sind beispielsweise durch die PLAs und generelle Thrombozytenaggregation ausgelöste Störungen in der Mikrozirkulation der Organe (Ischämie), die in Zusammenhang mit Sepsis auftreten und zur Organdysfunktion mit anschließender Gewebeschädigung führen können [103, 122, 123]. Auch die induzierte Freisetzung von NETs sowie zytotoxischen Molekülen durch Neutrophile tragen dazu bei [14, 90, 103]. Ebenso wird eine Beteiligung von Thrombozyten in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis vermutet. Diese chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung, die vor allem die synovialen Gelenke der distalen Extremitäten betrifft und durch schmerzhafte Schwellungen und Knochenerosion gekennzeichnet ist, verläuft unter Beteiligung sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems [6]. In betroffenen Gelenken konnten Ablagerungen aus Thrombozyten und daraus freigesetzten Mikropartikeln identifiziert werden, wobei noch unklar ist, ob dieses Phänomen zum weiteren Fortschreiten der Krankheit beiträgt [6, 124]. Eine Hypothese führt als möglichen Pathomechanismus eine

durch ebendiese Mikropartikel induzierte Aktivierung von Synoviozyten an, was in diesen die Produktion von IL-1 (Interleukin 1) zur Folge hat. Eine hierdurch ausgelöste proinflammatorische Zytokinkaskade führt wiederum zur Aktivierung von Leukozyten und deren nachfolgender Rekrutierung in die betroffenen Gelenke [6]. Eine weitere wahrscheinlich auf die Aktivierung von Thrombozyten zurückzuführende Erkrankung ist die *transfusion related acute lung injury* (TRALI), ein nicht kardiogen bedingtes Lungenödem in Verbindung mit Hypoxie, das typischerweise während oder kurz nach plasmahaltigen Transfusionen auftritt [6, 125]. Man vermutet, dass das transfundierte Plasma von aktivierten Thrombozyten freigesetztes, lösliches CD154 enthält, das bei Übertragung auf den Empfänger zur Aktivierung pulmonaler Neutrophiler führt [6, 125].



### Abbildung 8: Übersicht der pathophysiologischen Aspekte der Thrombozytenaktivierung

Die Aktivierung von Thrombozyten kann auch negative Folgen auf den Organismus haben, die den Ausgangspunkt für verschiedene Krankheitsbilder, darunter die DIC oder chronische Entzündungen, bilden können [8]

Mit freundlicher Genehmigung von: Elsevier, Copyright © 2019

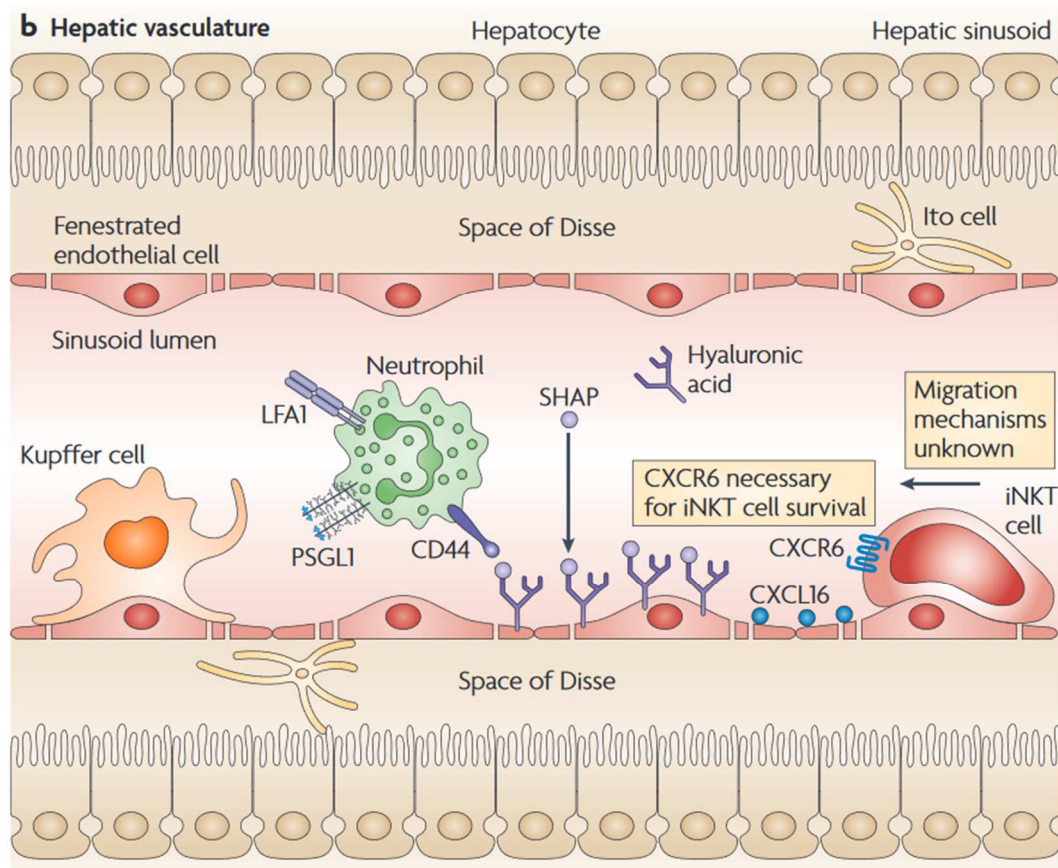
## 4. Leber

### 4.1. Immunologische Funktion der Leber

Die bisher vorherrschende Meinung, dass die Milz eine Schlüsselfunktion bei der Erkennung und Entfernung von ins Blut eingedrungenen Pathogenen einnimmt, konnte insofern relativiert werden, dass diese Fähigkeit nicht durch eine Splenektomie beeinträchtigt wird. Vielmehr rückt die Leber als primäres Überwachungsorgan für intravaskuläre Infektionen in den Fokus [19]. Als größtes solides inneres Organ [19, 21] verfügt sie neben den Kupffer-Zellen als größte Einzelpopulation gewebständiger Makrophagen auch über die höchste Dichte an natürlichen Killerzellen (NKs) und natürlichen Killer T-Zellen (NKTs) [19, 20] sowie das größte retikuloendotheliale Netzwerk [19]. Letzteres beschreibt den Vorgang, dass Monozyten aus dem Blut in die verschiedenen Gewebe auswandern, um sich dort zu spezifischen Gewebsmakrophagen ausdifferenzieren: Die Kupffer-Zellen der Leber sind ebenso ein Teil davon wie die Alveolarmakrophagen der Lunge, oder Sinusendothelzellen in lymphatischen Organen [126].

Alle diese Immunsentinelns und Effektorzellen sind dabei im Gefäßsystem ansässig, um Erreger zu erkennen und direkt abfangen zu können (siehe Abbildung 9) [19]. Der Begriff einer *sentinel cell* leitet sich von ihrer Funktion als „Wächterzellen“ ab, da sie Informationen aus dem umliegenden Gewebe, beispielsweise die Bindung von PAMPs oder DAMPs, verarbeiten, und sie durch die Ausschüttung von Zytokinen an das periphere Nervensystem weitergeben [127].

Rund 30 % des gesamten Blutvolumens durchströmt die Leber pro Minute, wovon rund 20 % der *A. hepatica* und 80 % der *V. portae* entstammen [19]. Das Portalblut enthält dabei Verdauungsprodukte, verschiedenste Antigene und mikrobielle (Abbau-) Produkte aus dem Darm [6], darunter auch LPS, was normalerweise nicht in der systemischen Zirkulation, im Portalblut jedoch in Konzentrationen von bis zu 1 ng/ ml enthalten sein kann. Aufgrund dieser kontinuierlichen Exposition befindet sich die Leber in einem sog. „aktiven Toleranzstadium“, was nach Aktivierung jedoch rapide in eine kompetente Immunantwort umschlagen kann [6, 19]. Um den Kontakt mit den Erregern und die Wahrscheinlichkeit ihrer Detektion zu maximieren, sickert das Blut nur sehr langsam durch die Lebersinusoiden, dabei ist die Flussrate nur etwa halb so hoch wie in den Kapillarbetten anderer Organe [19].



**Abbildung 9: Überwachungsmechanismen in der Leber**

Die Lebersinusoiden sind mit einem fenestrierten Endothel ausgekleidet, über das im Falle einer Aktivierung Leukozyten rekrutiert und aktiviert werden können. Immobilisierte Kupffer-Zellen sind im Gefäß ansässig, um Pathogene direkt aus dem Blutstrom abzufangen [118]

Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, Copyright © 2009

#### 4.1.1. Hepatozyten

Hepatozyten, die rund 80 % der Leberzellen ausmachen, sind vor allem an Stoffwechselfvorgängen, der Proteinbiosynthese und Beseitigung von Toxinen beteiligt [19]. Daneben kommt ihnen auch eine immunologische Funktion zu, da sie unter inflammatorischen Bedingungen *major histocompatibility complex* (MHC I und II) exprimieren können [128, 129] und vermutet wird, dass sie direkten Kontakt zu naiven T-Zellen herstellen, um diese zu aktivieren [19]. Diese Funktion ist dabei nicht nur auf die Leber selbst beschränkt: Mit der Produktion von Akute Phase Proteinen oder den Komplementsystemfaktoren C3 und dem Mannose-bindenden Lektin zur Opsonisierung von Pathogenen tragen sie auch zur systemischen Abwehrreaktion bei [19, 129, 130].

#### **4.1.2. Endothelzellen der Leber (LSECs, *liver sinusoidal endothelial cells*)**

LSECs machen in der Leber bis zu 50 % der nichtparenchymalen Zellen aus [19]. Dabei stellen sie nicht nur eine physikalische Trennung zwischen Blut und den darunterliegenden Hepatozyten dar: als fenestriertes Endothel ohne organisierte Basalmembran regeln sie selektiv den Austausch von Molekülen über den so entstehenden Disse-Raum und ermöglichen den Hepatozyten über die *fenestrae* einen direkten Kontakt zum Sinusoidallumen [19-21].

Das Endothel ist somit als dynamisches, heterogenes Organ zu betrachten, welches sekretorische, synthetisierende, metabolische und immunologische Funktion übernimmt [6]. So verfügen LSECs über TLR, die als Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) pathogenassoziierte Strukturen (PAMPs) binden sowie Adhäsionsmoleküle wie ICAM zur Bindung von Lymphozyten besitzen [5, 10, 19, 25, 131]. Mittels Rezeptoren für Immunglobuline, Immunkomplexe oder Mannose zur direkten Internalisierung von Debris und Antigenen sind sie imstande diese den in der Leber ansässigen und zirkulierenden Leukozyten in ihrer Funktion als APCs (*antigen presenting cells*) zu präsentieren [19, 20]. Diese werden hierdurch aktiviert und schütten Entzündungsmediatoren wie Histamin und Zytokine aus, was wiederum zu einer Aktivierung des Endothels und damit zur Hochregulation von Selectinen auf dessen Oberfläche führt [10, 19].

#### **4.1.3. Kupffer-Zellen**

Kupffer-Zellen, benannt nach dem Pathologen C. von Kupffer, sind leberresidente Makrophagen im Gefäßsystem der Leber. Hier machen sie etwa 35 % der nichtparenchymalen Zellen aus und repräsentieren darüber hinaus sogar zwischen 80 und 90 % aller Makrophagen des Körpers [19, 21, 132]. Während frühere Annahmen davon ausgingen, dass Kupffer-Zellen ursprünglich aus dem Knochenmark stammen, um als Monozyten in die Leber einzuwandern und sich zu gewebständigen Makrophagen ausdifferenzieren [133], geht man heutzutage eher von einer direkten Entwicklung in der Leber aus hämatopoetischen Stammzellen aus [19, 132, 134]. Da die Angaben zur durchschnittlichen Lebensdauer von eher kurz- (1-2 Wochen) bis langlebig (drei Monate bis zu einem Jahr) variieren, liegt die Vermutung nahe, dass Subpopulationen vorliegen, die einerseits durch lokale Proliferation, andererseits durch monozytäre Einwanderung gespeist werden [19, 134, 135]. Im Gegensatz zu anderen Arten von Makrophagen, die auf der Suche nach Pathogenen aktiv durch das umliegende Gewebe migrieren, handelt es sich

bei Kupffer-Zellen um stationäre Zellen, die imstande sind Bakterien direkt aus dem vorbeifließenden Blut abzufangen [19, 111]. Ausgestattet mit einer Vielzahl von Rezeptoren, darunter Scavenger-Rezeptoren, TLRs und Komplementrezeptoren, binden sie Entzündungsmediatoren oder PAMPs, um nach ihrer Aktivierung selbst Zyto- und Chemokine zur Aktivierung anderer Immunzellen freizusetzen [131, 136, 137]. Dahingehend konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Kupffer-Zellen oder ihrer Rezeptoren, insbesondere CR1g als Komplementrezeptor für C3b, zu unkontrollierter Bakteriämie und erhöhter Mortalität führen kann [138, 139]. Darüber hinaus fungieren sie selbst als APCs, um z.B. durch die Expression von MHC I und II zur T-Zell Aktivierung beizutragen [20].

Makrophagen können, da sie verschiedene Rezeptoren zur Erkennung von PAMPs und DAMPs tragen, auf einwirkende Stimuli des sie umgebenden Milieus dynamisch reagieren und verschiedene Phänotypen annehmen [140]. Dieses Phänomen wird Polarisation genannt. Angelehnt an die Unterteilung von T-Helferzellen in TH1 und TH2, unterscheidet man hierbei die beiden Subpopulationen der M1- und M2-Makrophagen. Diese Klassifikation stellt lediglich eine Vereinfachung dar, da man mittlerweile nicht mehr von einer klaren Trennung der beiden Untergruppen, sondern vielmehr von fließenden Übergängen einer nahezu unbegrenzten Anzahl an Phänotypen ausgeht [141]. M1-Makrophagen werden auch proinflammatorische Makrophagen genannt und entstehen durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, vor allem Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und TNF- $\alpha$  durch TH1 oder Natürlicher Killerzellen, aber auch unter Einwirkung von bakteriellem LPS [141, 142]. Sie reagieren darauf, indem sie ihrerseits eine Reihe proinflammatorischer Zytokine ausschütten. Dazu zählen unter anderem TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23, COX-2 sowie geringe Mengen von IL-10 [142]. Als Folge werden Leukozyten, allen voran Neutrophile und Monozyten, zum Inflammationsherd rekrutiert [140]. Zusätzlich besitzen M1-Makrophagen eine antimikrobielle Wirkung, indem sie durch Aktivierung des NADPH-Oxidase Systems und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies direkt an der Pathogenabwehr beteiligt sind. Dessen ungeachtet können diese Prozesse eine Gewebeschädigung bewirken und zudem einen verzögerten Regenerationsprozess nach sich ziehen [142]. Dem gegenüberzustellen sind die M2-Makrophagen, die, aktiviert durch die TH2 Zytokine IL-4 und IL-13, eine insgesamt antiinflammatorische Funktion



aufweisen und neben der Abwehr parasitärer Infektionen maßgeblich an der Gewebewiederherstellung sowie Wundheilung beteiligt sind [141, 143].

#### **4.2. Rekrutierung von Leukozyten bei akuter Inflammation**

In der Leber kommt es zur schnellen Rekrutierung von Neutrophilen, Thrombozyten und Lymphozyten aus der Zirkulation als Reaktion auf bakterielle und virale Moleküle [87, 89, 111, 144], aber auch endogene schadensassoziierte molekulare Muster (DAMPs), darunter ATP oder die klassischen Chemokine *CXC-motif chemokine ligand 1 und 2* (CXCL1/ 2) konnten im Modell der sterilen Inflammation eine vermehrte Rekrutierung von Neutrophilen in der Leber hervorrufen [90, 111]. Die Adhäsion von Neutrophilen tritt in der Leber, anders als in anderen Organen, nicht nur in den postkapillären Venolen, sondern auch in den Sinusoiden auf und wird nicht von Selectinen vermittelt, die normalerweise eine Schlüsselfunktion beim „Rollen“ der Leukozyten auf dem Endothel spielen; die sich daraufhin verlangsamen Zellen können so aktivierende Signale empfangen, wodurch es letztendlich zur integrinvermittelten Adhäsion an der Gefäßwand kommt [10, 19, 42, 145]. In den Lebersinusoiden dagegen konnte unter dem Einfluss von LPS eine direkte Adhäsion, vermittelt von CD44 auf Neutrophilen und Hyaluron auf dem Endothel, beobachtet werden [87, 89]. Zusätzlich wurde ein weiterer, Dipeptidase-1 (DPEP1) -abhängiger Mechanismus identifiziert: Nach genetischer Depletion dieses Enzyms (DPEP1<sup>-/-</sup>) zeigten Mäuse nach systemischer LPS Injektion eine geringere Rekrutierung von Neutrophilen in Lunge und Leber im Vergleich zu Kontrolltieren (ohne Unterschied in der Gesamtzahl der zirkulierenden Neutrophilen) und zeigen gleichzeitig eine geringere Mortalität. Bei Gabe eines anti-CD44 Antikörpers in DPEP1<sup>-/-</sup> Tieren fand nahezu keine Rekrutierung statt, sodass sowohl CD44 als auch DPEP1 als vorherrschende Adhäsionsmechanismen in der Leber während der Inflammation angesehen werden [146].

Die adhärenen Neutrophilen selbst führen wiederum zur Rekrutierung von Thrombozyten zum Inflammationsherd [14, 112], die auf der Oberfläche der adhärenen Neutrophilen anlagern und Aggregate (PNAs) bilden (siehe Abbildung 7). Intravitalmikroskopische Aufnahmen stellten zudem weitere Interaktionen zwischen den Thrombozyten dar, wodurch sich die Aggregate weiter vergrößern und die Neutrophilen einschließen [112]. Die Bildung solcher PNAs initiiert in Neutrophilen die Ausschüttung von NETs [87]. Diese DNA-basierten, netzartigen

Strukturen werden, wie in *in vitro* Studien gezeigt, innerhalb von fünf Minuten in Strömungsrichtung freigesetzt, jedoch nur in Anwesenheit von LPS-aktivierten Thrombozyten, und verhindern die Ausbreitung von Pathogenen [14, 147] (siehe II.2.). Durch die Fähigkeit zur NETose kann zusätzlich zur bestehenden Phagozytose durch Makrophagen die Zahl der aus dem Blutstrom abgefangenen Bakterien um das Vierfache gesteigert werden [147]. Darüber hinaus wurde im Modell nach systemischer Infektion durch *Escherichia coli* gezeigt, dass Mäuse bei Depletion von Thrombozyten oder nach der Gabe des Enzyms DNase zur direkten Inhibition der NET-Formation eine höhere Anzahl im Blut zirkulierender Bakterien und zudem sechs Stunden nach Infektion mehr Bakterienansammlungen in der Lunge aufwiesen [14, 147]. Einige bakterielle Erreger, darunter *Streptococcus pneumoniae* als häufigste Ursache der ambulant erworbenen Pneumonien (*community-acquired pneumonia*, CAP) haben durch die Fähigkeit zur Produktion von DNAsen eine Möglichkeit gefunden, um NETs abzubauen und sich anschließend weiterhin über die Lunge ins Blut auszubreiten [14, 148]. Zusammenfassend stellt die Produktion von NETs zwar einen potenten Mechanismus zur Eindämmung bakterieller Infektionserreger im Rahmen einer Sepsis dar, jedoch darf eine damit einhergehende mögliche negative Auswirkung auf das umliegende Gewebe nicht außer Acht gelassen werden [14]. Mäuse, bei denen die NETose inhibiert worden war, zeigten insgesamt weniger Zellnekrosen in der Histologie sowie niedrigere Alanin-Aminotransferase- (ALT-) Spiegel als Marker für eine hepatozelluläre Schädigung [147]. Ein Therapieansatz könnte hierbei die Hemmung von TLR4 auf Thrombozyten sein, da unter Anwendung von Eritoran als TLR4-Antagonist die Degranulation der Neutrophilen signifikant reduziert werden konnte [14].

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Versuchstiere

Die Maus ist das in der Forschung am häufigsten eingesetzte Versuchstier und wurde auch für die in der hier vorliegenden Doktorarbeit durchgeführten Versuche verwendet [149]. Sie zeichnet sich durch eine kurze Generationszeit von zehn Wochen aus, bei der die Tiere bereits mit vier bis sieben Wochen geschlechtsreif sind und ihre Zuchtreife mit acht bis zehn Wochen erreichen. Nach einer Trächtigkeitsdauer von nur 18-21 Tagen werden vier bis zwölf Jungtiere geboren [150]. Die anfallenden Kosten bei Anschaffung und Haltung sind insgesamt als gering zu betrachten. Als ebenfalls vorteilhaft ist die Vielzahl transgener Linien zu nennen, die durch Inzucht eine hohe genetische Standardisierung aufweisen. Mit einem durchschnittlichen Gewicht von 20-40 Gramm, abhängig von Alter und Linie, ist die Maus leicht zu handhaben, jedoch besteht auf Grund der Größe auch eine methodische und chirurgische Limitierung [150].

Die Tierversuche wurden gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Fassung vom 18.05.2006, zuletzt geändert durch Artikel 105 vom 10.08.2021) und von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2532.Vet\_02-15-190).

#### 1.1. Tierstämme

##### 1.1.1. C57BL/6J

C57BL/6J, auch bekannt als B6 („Black 6“) ist der in der Forschung am häufigsten genutzte Inzuchtstamm und findet vor allem in Gebieten wie der kardiovaskulären Forschung, der Genetik oder der Immunologie Verwendung. Die Tiere gelten als langlebig, vermehren sich gut und weisen eine geringe Anfälligkeit gegenüber Tumoren auf. Sie werden als Hintergrundstamm auch zur Generierung transgener Mauslinien verwendet [151].

##### 1.1.2. P-SEL KO

P-Selectin KO oder auch 129S2-*Selp*<sup>tm1Hyn</sup>/J Tiere besitzen eine Mutation im *Selp* Gen, woraus sich eine Defizienz von P-Selectin auf Thrombozyten und dem Endothel ergibt. Bei Homozygotie zeigen sie im Inflammationsmodell eine

verminderte Adhäsion und Extravasation von Leukozyten bei gleichzeitiger 2-3facher Erhöhung der Gesamtzahl an Neutrophilen. Die Zahl der Lymphozyten und Monozyten ist dagegen nicht verändert. Homozygote Tiere sind lebensfähig und fruchtbar [152].

### 1.1.3. Pf4-Cre x ROSA26-iDTR

Bei dieser Linie handelt es sich um eine Kreuzung aus zwei transgenen Mauslinien. Tiere der Linie Pf4-Cre exprimieren die Cre-Rekombinase (iCre), deren Gen unter der Kontrolle des Maus-Pf4 (Thrombozytenfaktor 4) oder CXCL4-Promotors steht, in Thrombozyten und Megakaryozyten [153]. Bei Verpaarung mit ROSA26iDTR Tieren, bei denen ein Diphtherietoxin-Rezeptor (*simian Hbegf*) in den ROSA26 Locus integriert wurde, exprimieren Thrombozyten und Megakaryozyten, vermittelt durch die Cre-Rekombinase, diesen Rezeptor und werden für eine Ablation durch eine Injektion von Diphtherietoxin empfänglich [154, 155]. Zur genauen Beschreibung der Wirkungsweise von Diphtherietoxin siehe auch III.3.5.2.

## 1.2. Tierhaltung und Zucht

In Abhängigkeit der in den Versuchen verwendeten Mauslinie entstammten die Tiere entweder der Eigenzucht der Versuchstierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums, oder wurden aus der SPF-Haltung (*specific pathogen free*, spezifiziert pathogenfrei) des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) in die hauseigene Tierhaltung überführt. Zudem bestand die Möglichkeit Mäuse direkt von „The Jackson Laboratory“ zu beziehen. Nachdem die Tiere geliefert wurden, diente ihnen eine einwöchige Quarantäne- und Ruhephase zur Akklimatisierung.

Im ZNP wurden die Tiere in einem IVC-System (*individually ventilated cages*) gehalten, bei der Polysulfonkäfige (Typ M II, verlängert) einzeln an eine Belüftungseinheit angeschlossen sind und ausschließlich von gefilterter Raumluft durchströmt werden. Dabei betrug die Raumtemperatur 21 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von  $\pm 55 \%$ ; ein automatisiertes Lichtprogramm steuerte die Hell- und Dunkelphase in einem zwölfstündigen Abstand. Um eine Kontamination der Tiere zu vermeiden, erfolgte die Handhabung der Käfige nur unter Laminar-Flow-Bedingungen. Die maximale Besatzdichte lag bei drei Tieren, denen Futter (Standardfutter für Labornager, Haltungsfutter V 1536) und Wasser aus

Trinkflaschen unbegrenzt zur Verfügung stand. Zuchttiere erhielten dagegen ein hochkalorisches Zuchtfutter.

In der Tierhaltung im Walter-Brendel-Zentrum wurden die Mäuse in Standard Makrolon Käfigen (Typ II long) mit einer maximalen Besatzdichte von fünf Tieren gehalten. Die Käfige waren mit zertifizierter, staubarmer Weichholzfaser eingestreut und enthielten als *enrichment* zusätzlich grobe Einstreu (Abbed Nestbaumaterial NGB E-011, Faserbreite 3,5 mm, E-012, Faserbreite 4 mm + NBU E-014, Faserbreite 120 mm), Zellstofftupfer (4 x 5 cm) sowie Tunnel oder Häuschen aus rotem Kunststoff, um den Tieren einen unter den gegebenen Umständen angemessenen Lebensraum zu ermöglichen, in dem sie ihren „physiologischen sowie ethologischen Bedürfnissen“ nachkommen konnten [156]. Einmal pro Woche wurden die Tiere in einen sauberen Käfig umgesetzt und die benutzten, entleerten Käfige wurden in einer dafür vorgesehenen Spülmaschine bei 80 °C gereinigt und anschließend autoklaviert (20 min, 121 °C, 2 bar). Zum Schutz vor Einschleppung von Pathogenen erfolgte der Zugang zur Tierhaltung restriktiv und geschah ausschließlich über eine Hygieneschleuse mit Nassdusche sowie nach Anlegen vollständig autoklavierbarer Dienstkleidung. Von den Zucht- und Haltungsräumen hin zur Schleuse und dem Reinigungsbereich bestand zudem ein Druckgefälle. Äußere Faktoren wie Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit und Tag-Nacht-Rhythmus der Tierhaltung glichen denen des ZNP.

Die hygienischen Anforderungen der Tierhaltung entsprachen den Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Association* (FELASA) aus dem Jahr 2014, in denen ein funktionierendes Hygienemonitoring nicht nur als tierschutzrelevant beschrieben wird, sondern als für die Erhebung valider Daten notwendig sei [157]. Vierteljährlich wurde der Gesundheitsstatus der Tiere mittels des erweiterten FELASA-Protokolls sowie Stichproben nach dem kleinen FELASA-Protokoll evaluiert. Der Einsatz von Sentinels sowie postmortale Untersuchungen erkrankter oder verstorbener Tiere waren ebenfalls Teil der mikrobiologischen Qualitätskontrolle.

Zusätzlich zur o.g. Tierhaltung konnten die Tiere zur besseren Überwachung während eines Akutversuchs oder nach operativen Eingriffen aus der Tierhaltung entnommen und für max. 72 Stunden in ein *ventilated storage cabinet* (Techniplast, Italy) im Tier-OP verbracht werden.

## **2. Erstellung von Knochenmarkschimären**

### **2.1. Definition Chimärismus**

Chimären sind Organismen, die zwei oder mehr genetisch verschiedene Zelllinien in sich tragen, welche ursprünglich aus unterschiedlichen Zygoten stammen. Davon abzugrenzen ist das Mosaik, bei dem sich die verschiedenen Zellen aus einer gemeinsamen Zygote entwickelt haben. Dieser natürlicherweise bei Tieren und Pflanzen vorkommende, fehlerhafte Entwicklungsprozess wird in der biomedizinischen Forschung gezielt zur Untersuchung zellulärer Prozesse und Genfunktionen eingesetzt [158].

### **2.2. Ablauf der Knochenmarkstransplantation**

Direkt nach Anlieferung wurden die Empfängertiere in die IVC-Haltung verbracht. Eine Woche vor Transplantation wurde das Trinkwasser angesäuert und ab dem Tag vor der Transplantation für 4 Wochen mit 480 mg Cotrimoxazol/L (Cotrim-ratiopharm Ampullen, ratiopharm GmbH, Ulm) versetzt, um einer Infektion der durch die Bestrahlung immunsupprimierten Tiere vorzubeugen. Um die Knochenmarkszellen der Empfängertiere zu zerstören und eine Implantation der transferierten Spenderzellen zu ermöglichen, wurden die Tiere in ein dafür vorgesehenes Kunststofffrondell gesetzt und insgesamt zweimal im Abstand von vier Stunden für jeweils drei Minuten und 44 Sekunden (195 kV, 10 mA) in einem Bestrahlungsgerät (Xstrahl Cabinet Irradiator, RS225, Camberley, United Kingdom) einer Röntgenstrahlung ausgesetzt. Nach dieser ersten Behandlung wurde die Knochenmarksentnahme der Spendertiere durchgeführt. Um eine ausreichende Zahl an Knochenmarkszellen transplantieren zu können, benötigte man für drei Empfängertiere die Zellen jeweils eines Spendertieres. Alter und Geschlecht sollten dabei bei beiden Gruppen übereinstimmen. Die Tiere wurden in tiefe Isoflurannarkose versetzt (siehe III.3.1.1.) und durch zervikale Dislokation getötet. Mit einem Desinfektionsmittel (Bacillol AF Lösung zur Flächendesinfektion, Paul Hartmann AG, Heidenheim an der Brenz) wurde das Fell großzügig durchfeuchtet, um die anhaftende Keimzahl zu reduzieren und die Entnahme der Knochen zu erleichtern. Nach manueller Dislokation der Hüftgelenke wurden zunächst Oberschenkel- und Schienbeinknochen, im Anschluss beide Oberarmknochen mithilfe eines Skalpells (Feather Disposable Scalpel No. 10, FEATHER Safety Razor Co. Ltd., Japan) von umliegender

Muskulatur separiert. Jeder Knochen wurde zur oberflächlichen Desinfektion durch eine mit 70 %igem Ethanol gefüllte Petrischale (Falcon, Corning Science, Mexiko) gezogen und bis zum nächsten Schritt in PBS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) auf Eis gelagert, um ein vorzeitiges Absterben der Zellen zu verhindern. Die Knochen aller Spendertiere konnten dabei in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Corning Science, Mexiko) gepoolt werden. Nachfolgend wurden unter einer Laminar-Flow Werkbank die Epiphysen an beiden Seiten mit dem Skalpell gekappt, um die Markhöhle zu eröffnen. Diese wurde mit insgesamt 10 ml eiskaltem PBS über eine vorsichtig in den Schaft eingeführte 26 G Kanüle (Becton, Dickinson and Co. Ltd., Irland) gespült und die Spülflüssigkeit aufgefangen. Die Kanüle wurde gegen eine groß-lumigere 20 G (Becton, Dickinson and Co. Ltd., Irland) Kanüle getauscht und mit dieser die Flüssigkeit mehrmals langsam in eine 10 ml Spritze (Braun Injekt Solo Einmalspritze (Luer), B. Braun Melsungen AG, Melsungen) aufgezogen, um größere Zellklumpen zu lösen. Zuletzt wurde die Suspension durch ein mit PBS angefeuchtetes 70 µm Zellsieb (Falcon, Corning Science, NY) auf einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gedrückt und gleich im Anschluss für 7 Minuten bei 300 g, 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet für 5 Minuten in 3 ml Ammoniumchlorid-Lysepuffer (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) inkubiert, um eine hypotone Lyse der Erythrozyten zu bewirken. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 ml PBS gestoppt und die Probe erneut, wie bereits beschrieben, zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands konnte das Zellpellet anschließend in 100 µl eiskaltem PBS resuspendiert werden. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde davon 1 µl mit 99 µl einer phosphatgepufferten Salzlösung, die bereits 5 % BSA (Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) enthielt, vermischt. 10 µl dieser Lösung wurden entnommen und zu gleichen Teilen mit Trypanblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) versetzt, um wiederum 10 µl Volumen in eine Neubauer-Zählkammer zu pipettieren. Da in diesem Versuch alle gewonnenen Zellen injiziert werden sollten, diente dies lediglich der Überprüfung der Mindestzellzahl von 10 Millionen/ Tier. Die Zellsuspension wurde bei beiden Gruppen auf insgesamt 2 ml mit eiskaltem PBS verdünnt, um bei zehn Tieren pro Gruppe ein Volumen von 200 µl zu verabreichen. Hierbei sollte zügig gearbeitet werden, da es zur Aggregatbildung der Zellen in Lösung kommen und dies die zuvor eingestellte Zellzahl beeinflussen konnte.

Nach Ablauf der vierstündigen Wartezeit erfolgte die zweite Bestrahlung der Empfängertiere wie soeben beschrieben, um im Anschluss die Transfusion der Knochenmarkszellen vornehmen zu können. Unter dem Laminar Flow wurden die Tiere aus dem Käfig in einen Restrainer verbracht und 200 µl Zellsuspension in die laterale Schwanzvene (siehe III.3.3.1.) injiziert. Die Tiere wurden in den Käfig zurückgesetzt und entsprechend des Score Sheets am Tag der Transfusion engmaschig, anschließend einmal täglich über einen Zeitraum von 24 Tagen überwacht (siehe Abbildung 10). Besonderes Augenmerk war dabei auf einen möglicherweise auftretenden Gewichtsverlust zu legen, der bei >10 % als Abbruchkriterium für den Versuch zu werten war. Eine als Nebenwirkung der Bestrahlung häufig vorkommende Graufärbung des ursprünglich schwarzen Fells stellte dagegen keine Belastung für die Tiere dar. Um zu überprüfen, ob die Bestrahlung erfolgreich war und sich die übertragenen Zellen etablieren konnten, wurde den Tieren nach vier Wochen unter Isoflurannarkose und erfolgter Prämedikation mit Buprenorphin (Buprenovet, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) (siehe III.3.1.1.) 200 µl Blut aus der *V. facialis* (siehe III.3.2.1.) entnommen, die Thrombozyten isoliert und einem Aktivierungsassay (siehe III.5.6.) unterzogen. Im besten Fall sollten die Thrombozyten im Vergleich zu denen einer C57BL/6J Maus kein P-Selectin exprimieren, was mittels Durchflusszytometrie überprüft wurde (siehe IV.3.2.).



Parameter	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
<b>Allgemeines Befinden</b>	gut (normale Aktivitäten, z.B. Fressen, Ruhen, Bewegen)	geringgradig reduziert (gewölbter Rücken, gestäubtes Fell, bewegt sich verlangsamt) angestrengte Atmung, eingefallene Flanken	mittelgradig reduziert (kein Explorationsverhalten, gewölbter Rücken, Atmung schnell und flach)	hochgradig reduziert (sichtlich abgemagert, dehydriert, apathisch, Maulatmung)
<b>Körpergewichtsreduktion prozentual zum Ausgangsgewicht</b>	0-5%	6-10%	11-15%	> 15%
<b>Wundheilung</b>	Injektionsbereich reizlos	leicht gerötet, trocken	stark gerötet, warm, nässend	klaffend, geschwollen, eitrig
<b>Pflegezustand</b>	Fell: glatt, glänzend, Körperöffnungen sauber	verminderte oder übersteigerte Fellpflege	Fell: stumpf, matt, struppig	Fell: aufgestellt, verklebt Körperöffnungen: verschmutzt
<b>Verhalten</b>	aktiv, Nestbau, interessiert an der Umgebung, munter	reduzierte Aufmerksamkeit, Reaktion auf äußere Reize	Selbstisolation, Reaktion auf äußere Reize	apathisch, keine Reaktion auf äußere Reize
<b>Kotabsatz</b>	physiologisch	leicht reduziert/breiig	Durchfall < 24h	Blutung oder Durchfall aus dem Rektum > 24h oder fehlender Kotabsatz, Rektumprolaps
<b>Harnabsatz</b>	physiologisch	vermindert/vermehrt	ggf. blutiger Harn	fehlender Harnabsatz

<b>Gesamtscore 0</b>	<b>keine Belastung</b>	<b>Versuchsfortführung, tägliche Kontrolle</b>
<b>max. 2x Gesamtscore 1 an aufeinanderfolgenden Tagen</b>	<b>leichte bis mittlere Belastung</b>	<b>Versuchsfortführung *, tägliche Kontrolle</b>
<b>Gesamtscore 2</b>	<b>mittlere Belastung</b>	<b>Kontrolle innerhalb der nächsten 6 Stunden *, dann Entscheid</b>
<b>vor Erreichen eines Gesamtscore 3 oder mindestens drei aufeinanderfolgende Male Gesamtscore 1</b>	<b>schwere Belastung</b>	<b>sofortiger Versuchsabbruch</b>

\* ggf. subkutane Injektion von 200µl 5%iger Glucose-Lösung

**Abbildung 10: Belastungsbeurteilung von Knochenmarkschimären anhand des klinischen Überwachungsbogens**

Die Tiere wurden im Anschluss an die Bestrahlung über einen Zeitraum von 24 Tagen überwacht.

### 3. Operative Eingriffe

#### 3.1. Narkose

Bei der in unserem Labor etablierten Injektionsanästhesie handelte es sich um eine Kombination der Wirkstoffe Fentanyl, Medetomidin und Midazolam, die im Folgenden näher beschrieben werden soll. Zur Einleitung der Narkose wurde die

Maus dafür an der Schwanzbasis aus dem Käfig entnommen und in die Induktionskammer gesetzt, die an einen Isofluranverdampfer angeschlossen ist (Ohmeda Isotec 5 UniVet, Enchendorf) (siehe III.3.1.1.). Da Isofluran eine reizende Wirkung auf die Atemwege besitzt, kann es zu Beginn der Anflutung zu Abwehrbewegungen beim Versuchstier kommen. Die Narkosetiefe kann zum einen über die Atmung bestimmt werden, die zu Beginn noch schnell und flach, später aber immer tiefer wird und bis zur Schnappatmung führen kann, zum anderen über das leichte Bewegen der Kammer zur Überprüfung des Aufstellreflexes, der bei ausreichender Tiefe nicht mehr vorhanden sein sollte. Die initiale Dosis der Injektionsnarkose wurde intraperitoneal verabreicht (siehe III.3.3.2.) und die Maus in eine Schlafbox verbracht, um ein möglichst stressfreies Einleiten zu ermöglichen und Exzitationen zu vermeiden. Damit sie während der Narkose nicht auskühlte, wurde eine Wärmematte untergelegt.

Zur erfolgreichen Durchführung operativer Eingriffe ist das chirurgische Toleranzstadium unter Ausschaltung der Schmerzreflexe anzustreben, welches sich durch einen negativen Zwischenzehenreflex und eine regelmäßige, nicht zu flache Atmung auszeichnet [159]. Neben den in regelmäßigen Abständen zu überprüfenden Reflexen wurde alle 30 Minuten 0,5-1 Dosis s.c. nachdosiert, wobei der klinische Zustand der Maus beachtet werden muss, um eine Unter- oder Überdosierung zu vermeiden.

### **3.1.1. Narkosemittel und Analgesie**

Fentanyl:

Bei Fentanyl handelt es sich um ein synthetisches Opioid aus der Gruppe der  $\mu$ -Rezeptor Agonisten, besitzt dabei eine 100fach stärkere Wirkpotenz als Morphin und wird zur Behandlung von akuten und chronischen Schmerzzuständen eingesetzt [160, 161]. Bei längerfristiger Anwendung kann es neben einer physischen auch zur psychischen Abhängigkeit mit entsprechenden Entzugserscheinungen kommen, daher unterliegen die Opiode mit wenigen Ausnahmen dem Betäubungsmittelgesetz. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft reichert es sich vor allem im Muskel- und Fettgewebe an. Die Halbwertszeit liegt bei intravenöser Verabreichung zwischen drei und zwölf Stunden, bei intradermaler Gabe sogar bei 17 Stunden. Die  $\mu$ -Rezeptoragonisten zeichnen sich durch eine sowohl zentral als auch peripher wirkende analgetische Wirkung aus. Weitere

zentrale Wirkungen führen u.a. zu Sedation, Bradypnoe, Hypothermie und Hypotonie. Peripher kann es durch eine spastische Hemmung der Peristaltik zu Obstipation und Harnretention kommen, deswegen ist eine Anwendung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie bei Gallen- oder Nierenkolik kontraindiziert. Ebenso dürfen sie nicht bei Vorliegen von Lungenerkrankungen angewandt werden, da die Gefahr einer Hyperkapnie besteht. Weil sie imstande sind die Plazentaschranke zu überwinden, sollte auch die perinatale Applikation vermieden werden, um eine Atemdepression beim Neugeborenen zu vermeiden. Eine akute Opioidintoxikation ist durch Miosis, Atemdepression und Bewusstlosigkeit gekennzeichnet und führt im schlimmsten Fall zum Tod durch Atemlähmung [160]. Als Antidot fungiert Naloxon, ein reiner Opioidantagonist, der kompetitiv an alle Rezeptortypen bindet und aufgrund seiner kurzen Plasmahalbwertszeit von 70 Minuten oft mehrfach nachdosiert werden muss [160]. Die in unserem Labor durchgeführte Narkose wurde nur teilweise antagonisiert, so wurde kein Naloxon beigemischt, um eine durchgehende Analgesie bis zum Wirkungseintritt der postoperativen Buprenorphingabe zu gewährleisten. Die verwendete Dosierung lag bei 0,05 mg/kg KG Fentanyl (Fentadon, Albrecht GmbH Aulendorf) bei intraperitonealer Injektion.

#### Buprenorphin:

Im Gegensatz zum reinen  $\mu$ -Rezeptor Agonisten Fentanyl gehört Buprenorphin zu den partiellen  $\mu$ -Rezeptor Agonisten und wird gleichzeitig den gemischten Agonist-Antagonisten zugeordnet, da es am  $\delta$ -Rezeptor als Antagonist und am ORL1-Rezeptor als partieller Agonist wirkt. Beim Tier wird im Gegensatz zum Menschen der sog. „*ceiling*-Effekt“ beobachtet, wodurch auch bei hoher Dosierung sehr starke Schmerzen nicht vollständig unterdrückt werden können [160]. Buprenorphin wurde in den durchgeführten Versuchen 30 Minuten vor Blutentnahmen aus der *V. facialis* s.c. in der Dosierung von 0,1 mg/kg KG verabreicht, um Schmerzen an der Entnahmestelle vorzubeugen.

#### Medetomidin:

Medetomidin ist das Razemat aus dem pharmakologisch aktiven D-Isomer Dexmedetomidin und dem in therapeutischer Dosierung inaktiven L-Isomer und wirkt als selektiver  $\alpha_2$ -Rezeptoragonist, was zu einer Noradrenalinfreisetzung im ZNS führt [161, 162]. Es wird zur Sedation und Prämedikation vor chirurgischen

Eingriffen eingesetzt, ist aber zur ausreichenden Analgesie immer mit einem Opioid zu kombinieren. Im Vergleich zu Xylazin besitzt es eine 20fach höhere Wirkpotenz; die Wirkung selbst tritt bereits nach fünf Minuten ein [161]. Die Halbwertszeit ist altersabhängig und beträgt zwischen 60 und 120 Minuten. Die Metabolisierung findet in der Leber statt. Es kann zu Hypotonie und Abfall der Herzfrequenz kommen, bei höheren Dosierungen auch zur Minderdurchblutung in der Peripherie, ausgelöst durch eine periphere Vasokonstriktion, dagegen wirkt es kaum atemdepressiv. Als Kontraindikationen ergeben sich Hypotonie und Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems. Im Fall einer Überdosierung wird Atipamezol (Alzane, zoetis Deutschland GmbH, Ulm) als  $\alpha_2$ -Rezeptorantagonist als Antidot verabreicht [161, 162]. Dieses wurde auch in unserem Labor in der Dosierung 3,75 mg/kg KG in Kombination mit Flumazenil zur Antagonisierung der Narkose angewendet.

Midazolam:

Midazolam gehört zur Gruppe der Benzodiazepine, die aufgrund ihrer beruhigenden und dämpfenden Wirkung zu den Tranquillanzien und Anxiolytika gezählt werden [163]. Die meisten Benzodiazepine vermitteln ihre Wirkung über die Bindung am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, wo sie als Agonist die Wirkung des Neurotransmitters  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) verstärken [163, 164]. Midazolam ist eine lipophile Verbindung und wird bei einer Bioverfügbarkeit von mehr als 80 % schnell resorbiert; die Halbwertszeit ist mit durchschnittlich zwei bis fünf Stunden eher kurz [163]. Durch eine Dämpfung des limbischen Systems haben Benzodiazepine eine anxiolytische Wirkung [164]. Sie werden darüber hinaus zur Sedation und Hypnose eingesetzt, dabei wirken sie zwar schlafinitiierend und muskelrelaxierend, allerdings nicht narkotisch [163]. Wichtig zu wissen ist, dass Benzodiazepine keinerlei analgetische Wirksamkeit besitzen [163]. Zur Antagonisierung wird Flumazenil eingesetzt, das durch seine hohe Affinität zum GABA<sub>A</sub>-Rezeptor bereits gebundene Benzodiazepine zu verdrängt [161]. Die in unserem Labor eingesetzte Dosierung als Bestandteil der MMF-Narkose betrug 5mg/kg KG Midazolam (B. Braun, Melsungen).

Isofluran:

Isofluran gehört zu den halogenierten Kohlenwasserstoffen und wird als Inhalationsanästhetikum eingesetzt. Es handelt sich um ein Strukturanantiomer von

Enfluran, besitzt jedoch durch den geringeren Blut-/ Gas-Verteilungskoeffizienten eine bessere Steuerbarkeit, was neben einer schnelleren Anflutung auch eine schnellere pulmonale Elimination bedingt. Die negative inotrope Wirkung ist minimal, daher wird das Risiko einer Hypotonie durch abfallenden peripheren Gefäßwiderstand gesenkt. Als klare, farblose Flüssigkeit vorliegend, wird zur Anästhesie ein Verdampfer benötigt, der zusätzlich Frischgas in Form von reinem Sauerstoff beimischt. Mit einem MAC-Wert (minimale alveoläre Konzentration) von 1,2 Vol.-% ist es nach Halothan das potenteste Inhalationsanästhetikum [162]. In unserem Labor wurde das Versuchstier in eine dem Verdampfer angeschlossene Kammer mit geschlossenem Zu- und Abluftsystem verbracht und zur Einleitung 5 Vol.-% zugeführt, die bei andauernden Eingriffen auf 1-2 Vol.-% reduziert wurden. Da nur eine geringe analgetische Wirkung besteht, sollte Isofluran zur Aufrechterhaltung immer mit einem Opioid kombiniert werden. Neben einer dosisabhängigen atemdepressiven sowie einer muskelrelaxierenden Wirkung von Isofluran, wird zusätzlich ein kardioprotektiver Effekt vor und während kardiochirurgischen Eingriffen diskutiert. Als mögliche Nebenwirkung ist das Auftreten einer malignen Hyperthermie nach Anwendung von Inhalationsanästhetika und Muskelrelaxantien zu nennen, die bei genetischer Prädisposition einen seltenen Narkosezwischenfall darstellen kann [162].

### **3.2. Blutentnahmetechniken**

#### **3.2.1. *V. facialis***

Wurde bei einem Versuch nur eine kleinere Blutmenge benötigt, bot sich die Entnahme aus der *V. facialis* an. Handelte es sich um eine nicht terminale Blutentnahme, bei der das Tier anschließend weiterleben sollte, konnte sie mit entsprechender Regenerationszeit, abhängig von der körperlichen Konstitution des Versuchstiers und des entnommenen Blutvolumens, auch als serielle Blutentnahme wiederholt an einem Tier angewendet werden. Hierbei war eine 30 Minuten im Voraus verabreichte Analgesie mit Buprenorphin (siehe III.3.1.1.) zu empfehlen.

Die Maus wurde nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe, wie bereits unter III.3.1. beschrieben, aus der Induktionskammer entnommen und mit zwei Fingern im Nackenfell fixiert, um die Venen im Gesichtsbereich zu stauen. Dabei war darauf zu achten, keinen übermäßigen Druck auf die Trachea auszuüben, um die Atmungstätigkeit nicht einzuschränken. Im Angesichtsbereich der Maus dient

der sog. *freckle-spot* als Orientierungspunkt, der sich kaudoventral am Unterkieferast als haarlose Stelle darstellt. Die Einstichstelle befindet sich wenige Millimeter kaudodorsal dieses Punkts. Dort wurde eine Blutlanzette (Solofix Einmal-Blutlanzette Edelstahl, steril, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) in einer schnellen, aber kontrollierten Bewegung orthogonal auf etwa 3mm eingestochen und das Blut mit einem Mikro-EDTA-Röhrchen (Microvette 100 K3E, Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht) oder einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg), dessen Innenseite mit einem Antikoagulant wie z.B. Heparin (Heparin-Natrium 25000 I.E., ratiopharm GmbH, Ulm) benetzt wurde, aufgefangen und anschließend leicht geschwenkt, um vorzeitige Koagulation zu vermeiden. Mithilfe eines Wattestäbchens wurde so lange Druck auf die Einstichstelle ausgeübt, bis die Blutung gestillt war und die Maus in den Käfig zurückgesetzt werden konnte. Sie wurde danach noch einige Minuten auf Anzeichen einer wiedereinsetzenden Blutung oder anhaltende Schmerzen engmaschig überwacht.

### **3.2.2. Retrobulbärer Venenplexus**

Wurde für einen Versuchsaufbau eine größere Menge Blut benötigt, konnte eine Entnahme aus dem retrobulbären Venenplexus erfolgen. Dies stellt eine terminale Blutentnahme ohne anschließendes Wiedererwachen unter tiefer Narkose dar und ermöglicht die Gewinnung von Blutvolumina von bis zu 1,5 ml. Die Maus wurde dafür in die intraperitoneal gesetzte, unter III.3.1. beschriebene Injektionsnarkose versetzt und die absolute Bewusst- und Empfindungslosigkeit durch Ausfallen der Schmerzreflexe (Zwischenzehenreflex, Lidreflex) überprüft. War eine ausreichende Narkosetiefe erreicht, wurde das Tier im Nackenfell fixiert. Mit der anderen Hand wurde nun eine mit 10 µl Antikoagulant (*Acid-Citrate-Dextrose*, ACD) vollständig gefüllte Kapillare zwischen Daumen und Zeigefinger gehalten, am besten nicht behandschuht, um einen sichereren Griff zu gestatten. In einer kontinuierlichen, schraubenden Bewegung wurde die Kapillare in den nasalen Augenwinkel des dem Versuchsdurchführenden zugewandten Auge zwischen knöcherner Orbita und Bulbus eingeführt, um den dahinterliegenden Venenplexus zu punktieren. Das ausströmende Blut wurde über die im Augenwinkel steckende Kapillare in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg) aufgefangen, in welches ebenfalls ACD im Verhältnis 1:7 vorgelegt worden war, um eine Koagulation zu vermeiden. Aufgrund des hohen Blutverlusts zeigte die Maus gegen Ende der Blutentnahme oft Schnappatmung, woraufhin man sie nach zügigem

Entfernen der Kapillare schnellstmöglich durch zervikale Dislokation euthanasieren sollte. Durch den höheren Durchmesser der Kapillare im Gegensatz zu dem einer Kanüle, wie bei der intrakardialen Blutentnahme, wurden Scherkräfte minimiert und somit eine Aktivierung der Thrombozyten verhindert.

### **3.3. Applikationstechniken**

#### **3.3.1. Intravenöse Applikation**

Zur Durchführung einer intravenösen Injektion wurde das Versuchstier in eine zur Fixation vorgesehene Röhre verbracht, den sog. Restrainer, wobei der Schwanz des Tieres über eine Öffnung frei zugänglich gemacht wurde. Von den sich dorsal, ventral sowie lateral befindlichen Schwanzvenen wurden die beiden lateralen Gefäße (*Vv. coccygeales laterales*) zur Applikation genutzt. Zur besseren Darstellung wurde der Schwanz gestreckt, die Gefäße manuell gestaut und die Injektionsstelle oberflächlich desinfiziert. Zusätzlich empfahl es sich, den Schwanz anzuwärmen, um eine Hyperämisierung zu erzielen; beispielsweise durch einen mit körperwarmer Flüssigkeit gefüllten Einmalhandschuh. Der Schwanzvenenkatheter bestand aus einem dünnen Polyethylenschlauch (0,28 mm innerer Durchmesser, Smiths Medical, Kent) mit angeschlossener 30 G Kanüle (Becton, Dickinson and Co. Ltd., Irland) und konnte am unteren Ende über den Konus einer weiteren 30 G Kanüle auf eine 1ml Spritze (Injekt Solo, B. Braun SE, Melsungen) aufgesetzt werden. Da eine versehentliche Applikation von Luft wegen der bestehenden Gefahr einer Embolie zu vermeiden war, wurde der Katheter vor Injektion mit isotoner Kochsalzlösung (0,9 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) gespült. Die zu verabreichenden Substanzen sollten möglichst körperwarm und kontinuierlich injiziert werden, wobei ein maximales Injektionsvolumen von 5 ml/kg KG nicht überschritten werden sollte [165]. Nach Entfernen des Katheters wurde die Blutung gestoppt, indem mit einem Zellulosetupfer Druck auf die Einstichstelle ausgeübt wurde. Anschließend wurde das Versuchstier in den Käfig zurückgesetzt und auf Anzeichen von Schmerz oder Symptome, die auf die Injektion zurückzuführen sein konnten, überwacht.

#### **3.3.2. Intraperitoneale Applikation**

Die intraperitoneale Injektion wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl für die Verabreichung der Injektionsnarkose als auch bei der Gabe von LPS oder Diphterietoxin angewandt. Sie besitzt, nach der intravenösen Injektion, die

schnellste Verteilungsgeschwindigkeit und kann vom Versuchsdurchführenden allein und ohne weitere Hilfsmittel durchgeführt werden [165]. Die Maus wurde hierzu an der Schwanzbasis aus dem Käfig gehoben und auf das dazugehörige Gitter gesetzt. Mit Daumen und Zeigefinger der nicht führenden Hand näherte man sich ihr von kaudal und übte vorsichtig Druck auf beiden Seiten der Wirbelsäule im Bereich der Schwanzwurzel aus. Indem man dann die Finger kranial bis zum Hinterkopf vorschob, um das Tier auf der Unterlage zu fixieren, konnten Abwehrbewegungen verhindert und somit die Gefahr von Bissverletzungen minimiert werden. Mit bestimmtem Griff ins Nackenfell wurde das Tier kontrolliert angehoben und auf dem Handballen abgelegt. Während der kleine Finger die Schwanzbasis fixierte, fasste der Ringfinger das linke Hinterbein. So war die Maus sicher fixiert und konnte durch eine Kippbewegung der Hand um etwa 15 Grad in die sog. „Trendelenburg-Lagerung“ verbracht werden, bei dem der Kopf den tiefsten Punkt des Körpers darstellt und sich die Bauchorgane Richtung Brustkorb verlagern [166]. Die Einstichstelle befindet sich kranio-medial der Kniefalte im linken unteren Quadranten, wobei die Punktion der Gesäuge beim weiblichen Tier, da diese mit zusätzlichen Schmerzen verbunden ist, in jedem Fall vermieden werden sollte. Mit der rechten Hand wurde der Zylinder einer 1 ml Spritze (Injekt Solo, B. Braun SE, Melsungen) mit der zu verabreichenden Substanz zwischen Zeige- und Mittelfinger gehalten und dabei mit dem Daumen an der Griffplatte abgestützt. Der Spritze aufgesetzt war eine 26 G Kanüle (Becton, Dickinson and Co. Ltd., Irland), deren Anschliff zum Versuchsdurchführenden zeigte. Eingestochen wurde in einem Winkel von 10-30 Grad und die Flüssigkeit durch kontinuierlichen Druck auf den Kolben langsam injiziert [167]. Als nachteilig bei der intraperitonealen Injektion sind trotz korrekter Durchführung häufig vorkommende Fehlinjektionen, etwa in die Subkutis, Teile des Darmkonvoluts oder die Harnblase zu nennen [168]. Handelt es sich um reizende Substanzen, können, vor Allem bei wiederholter Anwendung, Verklebungen oder eine Peritonitis die Folge sein [165].

#### **3.4. Sepsismodelle**

Im Folgenden sollen die in den durchgeführten Versuchen angewandten Sepsismodelle näher beschrieben werden. Zur Wirkungsweise von LPS und der Pathogenese der ALI siehe auch II.1.2. und II.1.3.



### 3.4.1. Sterile Peritonitis

Zur Induktion einer systematischen Infektion wurde LPS (*Lipopolysaccharides from Escherichia coli* O111:B4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verwendet. Das verwendete Produkt wurde mithilfe von Phenolextraktion aufgereinigt, was bedeutet, dass bis zu 60 % RNA und <1 % Protein enthalten sein können. Die Maus wurde zur Injektion von LPS in wachem Zustand manuell fixiert (siehe auch III.3.3.2.) und 1 µg LPS/g KG Körpergewicht, gelöst in 150 µl isotoner Kochsalzlösung (0,9%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) i.p. verabreicht. Anschließend wurde das Tier nach Zurücksetzen in den Käfig für 30 Minuten engmaschig überwacht, um evtl. auftretende Schmerzen detektieren zu können. Mithilfe des etablierten klinischen Überwachungsbogens (siehe III.3.4.3.) erfolgte die Bewertung der klinischen Symptome einmal pro Stunde, bei Überschreiten einer Gesamtpunktzahl von zwei alle 30 Minuten bis zur Beendigung des Versuchs und Tötung des Tieres durch zervikale Dislokation.

### 3.4.2. ALI (*Acute Lung Injury*)

Zunächst erfolgte eine Blutentnahme von 100 µl aus der *V. facialis* (siehe III.3.2.1.) unter Isoflurannarkose zur Erstellung eines Differentialblutbildes unter basalen Bedingungen und anschließend die antikörpervermittelte Thrombozytendepletion (siehe III.3.5.1.). Die Versuchstiere wurden daraufhin engmaschig überwacht, um evtl. auftretende Schmerzzustände durch die Injektion oder die Blutentnahme erkennen zu können. Nach vier Stunden wurden die Tiere unter Anwendung der MMF-Injektionsnarkose wie unter III.3.1. anästhesiert und pro Tier 15 µg LPS (*Lipopolysaccharides from Escherichia coli* O111:B4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in 52 µl isotoner Kochsalzlösung (0,9 % Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) intranasal verabreicht. Dazu wurde das Versuchstier auf dem Rücken liegend auf einer Wärmematte positioniert und die Flüssigkeit mithilfe einer 100 µl Pipette (Eppendorf Research plus, Eppendorf AG, Hamburg) zügig auf beide Nasenlöcher aufgetragen. Um ein Wiederaustreten der Flüssigkeit durch reflexartiges Husten zu verhindern, wurde die Maus im Nacken fixiert und 5mal kontrolliert in dorsoventraler Richtung geschwenkt. Da häufig Schnappatmung und unregelmäßige Atmung auftrat, wurden die Tiere bei Bedarf mit Sauerstoff versorgt und sorgfältig überwacht. Die Narkose wurde durch subkutane Injektion von Flumazenil und Atipamezol antagonisiert (siehe III.3.1.1.) und die Tiere bis zum Wiedererwachen in eine abgedunkelte Schlafbox auf einer

Wärmematte gelegt. Auch in diesem Modell wurden die klinischen Symptome anhand des klinischen Überwachungsbogens (siehe III.3.4.3.) über einen Zeitraum von zwölf Stunden bis zur Tötung durch zervikale Dislokation erfasst. Diese fand unter tiefer Isoflurannarkose statt, gefolgt von kardialer Perfusion und Organentnahme zur histologischen Aufbereitung (siehe III.6.2.).

### 3.4.3. Bewertung der klinischen Symptomatik einer LPS-induzierten Sepsis anhand eines klinischen Überwachungsbogens (Score Sheet)

Der in unserem Labor etablierte klinische Überwachungsbogen ermöglichte das Erfassen klinischer Symptome, die auf eine systemische Inflammationsreaktion im Rahmen einer LPS-induzierten Sepsis hindeuteten und umfasste neben der äußeren Beurteilung des Einzeltiers (darunter Aktivität, Reaktion auf optische und akustische Stimuli oder Körperhaltung) auch das Verhalten in Bezug auf Artgenossen und ausgelehtes Sozialverhalten (siehe Abbildung 11).

Parameter	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
<b>Allgemeines Erscheinungsbild</b>	gut (Explorationsverhalten; keine Anspannung beim Umgang)	Lautäußerung beim Umgang	Lautäußerung, Anspannung und Nervosität beim Umgang	Lautäußerung bei Bewegung/ spontan
<b>Verhalten</b>	Fell: glatt, glänzend, Körperöffnungen sauber	verminderte oder übersteigerte Fellpflege; leicht struppiges Fell	leichte Piloerektion	deutliche Piloerektion
<b>Reaktion auf externe Stimuli</b>	sofortige Reaktion auf akustischen oder manuellen Reiz (Berührung)	Reaktion auf akustischen Reiz vermindert, sofortige Reaktion auf manuellen Reiz (Berührung)	keine Reaktion auf akustischen Reiz, moderate Reaktion auf manuellen Reiz (Berührung)	keine Reaktion auf akustischen Reiz, verzögert auf manuellen Reiz (Berührung): (bewegt sich wenige Schritte)
<b>Augen</b>	vollständig geöffnet	nicht vollständig geöffnet, Sekretspuren möglich	Augen halb geschlossen, Sekretspuren möglich	Augen fast vollständig geschlossen, Sekretspuren möglich
<b>Atmungsfrequenz</b>	Atmung physiologisch	Atemfrequenz geringgradig erhöht	Atemfrequenz erhöht, geringgradig verstärkte abdominale Atmung	Atemfrequenz erhöht, mittelgradig verstärkte abdominale Atmung
<b>Atmungsqualität</b>	aktiv, Nestbau, interessiert an der Umgebung, munter	bei geringem Leiden keine Änderung erwartet, Punktebewertung beginnt bei 2	reduzierte Interaktion mit anderen Tieren	deutlich reduzierte Interaktion, passiv

Abbildung 11: Bewertungskriterien der klinischen Symptomatik mit dazugehöriger Punktzahl

Score 0	keine Belastung	Überprüfung der Überwachungshäufigkeit
Score 1	leichte bis mittlere Belastung	Verantwortliche Person/en informieren. Überwachungsfrequenz jede Stunde. Bei 3 oder mehr Symptomen der Kategorie 1 ist von einer mittleren Belastung auszugehen, Anweisungen "Score 2" sind auszuführen
Score 2	mittlere Belastung	Das Tier ist der verantwortlichen Person und dem Tierarzt vorzustellen, es sind ggf. Interventionen notwendig (z.B. Analgesie, s.c. Substitution von Flüssigkeit, Feuchtfutter). Überwachungsfrequenz alle 30 Minuten. Bei 3 oder mehr Symptomen der Kategorie 2 ist von einer schweren Belastung auszugehen, Anweisungen "Score 3" sind auszuführen
Score 3	schwere Belastung	Beachtung eines möglichst schmerzlosen Endpunkts; Versuchsabbruch

Abbildung 12: Übersicht der Vorgehensweise bei Erreichen der jeweiligen Gesamtpunktzahl

### 3.5. Depletion von Thrombozyten

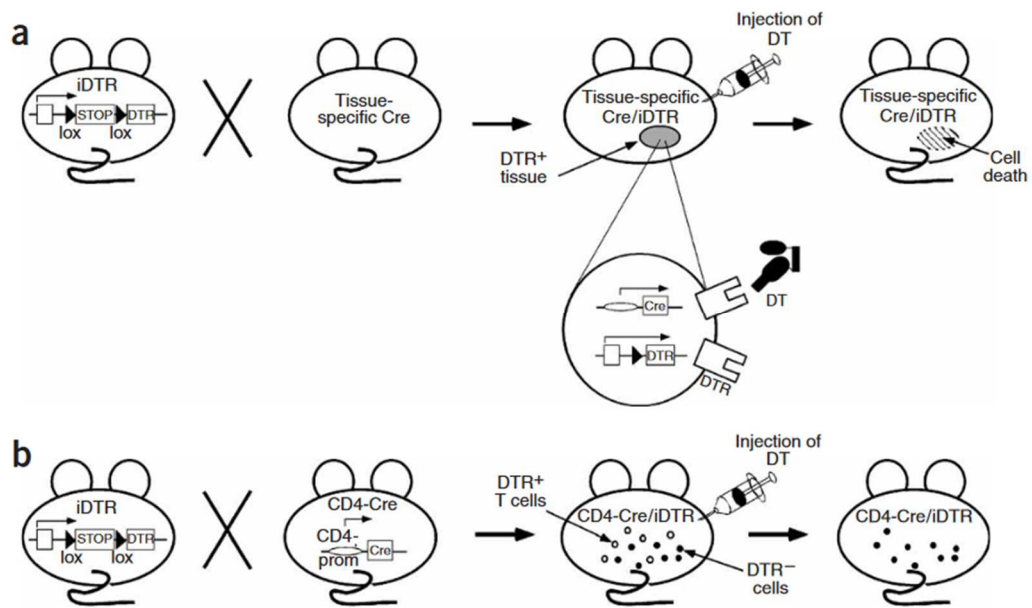
#### 3.5.1. Antikörpervermittelte Depletion

Für die antikörpervermittelte Depletion von Thrombozyten wurde R300 (#R300, emfret Analytics, Würzburg) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Mix aus verschiedenen monoklonalen Antikörpern, die gegen unterschiedliche Epitope des Glykoproteins GPIb $\alpha$  (CD42b) auf der Thrombozytenoberfläche von Mäusen gerichtet sind. Es kommt zu einer Fc-Rezeptor-unabhängigen, irreversiblen Depletion, die dosisabhängig bis zu 96 Stunden anhält [169]. In den vorliegenden Versuchen wurden zur Depletion zwölf Stunden vor LPS-Injektion 50  $\mu$ g Antikörper (in 100  $\mu$ l Suspension) pro Tier intravenös über einen Schwanzvenenkatheter injiziert, was bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 25 g einer Dosierung von 2  $\mu$ g/g KG entsprach. Im Fall der akuten Pneumonie (ALI, siehe III.3.4.2.) erfolgte die Injektion vier Stunden vor LPS-Gabe. Die Kontrollgruppe erhielt die entsprechende Isotypkontrolle C301 (#C301, emfret Analytics, Würzburg) in gleicher Dosierung, die eine Mischung von aus Ratten isolierter, nicht immuner Antikörper ohne zytotoxische Wirkung auf Thrombozyten enthielt [169].

#### 3.5.2. Depletion mithilfe von Diphtherietoxin

Neben der physikalischen Entfernung von Vorläuferzellen, der Zerstörung des Gens, was für die Entwicklung oder das Fortbestehen einer Zelllinie erforderlich ist oder der Anwendung zytotoxischer Antikörper, besteht die Möglichkeit Zellen durch die Gabe von Diphtherietoxin zu abladieren [155]. Zunächst wird der „simian DTR“ (Hbgef), ein aus dem Affen stammender Diphtherietoxin-Rezeptor in

den Gt(ROSA)26Sor Locus (auch bekannt als ROSA26) einer Mauslinie, der auf vielen Zelllinien zu finden ist, eingefügt. Durch den Einbau einer stromaufwärtsgelegenen, loxP-flankierten STOP-Sequenz wird die Expression des DT-Rezeptors jedoch zunächst aufgrund eines transkriptionellen Abbruchmechanismus inhibiert [154]. Eine Verpaarung mit einer Cre-Rekombinase exprimierenden Maus bedingt die selektive Entfernung der STOP Sequenz in Geweben, oder spezifischen Zellreihen, in denen Cre gebildet wird. Es kommt daraufhin zu einer Expression des DT-Rezeptors auf diesen Zellen, wodurch sie empfänglich für die Bindung von Diphtherietoxin werden (siehe Abbildung 13) [154]. Über die B-Untereinheit bindet dieses an die Zelloberfläche und es kommt zur rezeptorvermittelten Endozytose. Im Zytoplasma führt die A-Untereinheit dann zur Inaktivierung des Elongationsfaktors 2 und somit zum Abbruch der Proteinbiosynthese, die Zelle wird daraufhin apoptotisch [155]. Da hierfür bereits ein Molekül im Zytoplasma ausreichend ist, handelt es sich bei diesem Modell um eine effektive und auch sensitive Methode [170], die auch wiederholt angewendet werden kann, da keine neutralisierenden Antikörper gegen das Toxin gebildet werden [155]. In den durchgeführten Versuchen wurde den Tieren jeweils fünf Tage in Folge 10 ng/g KG, gelöst in 150 µl isotoner Kochsalz-Lösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen), intraperitoneal verabreicht. Am Morgen des 6. Tages erfolgte das Experiment selbst. Zu beachten ist, dass das Toxin nach dem Auftauvorgang sofort verwendet werden sollte, da es temperaturlabil ist. Es empfahl sich daher sowohl das Auftauen als auch die Lagerung bis zur Verwendung auf Eis vorzunehmen.



**Abbildung 13: Wirkungsweise der durch DT-Injektion vermittelten Zellablation in Mäusen**

Cre-Rekombinase-exprimierende Gewebe werden durch die Expression des DT-Rezeptors empfänglich für eine Ablation durch DT-Injektion [155]

Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, Copyright © 2005

### 3.6. Konfokalmikroskopie

#### 3.6.1. Grundlagen der Konfokalmikroskopie

Konfokalmikroskope gehören zu den Lichtmikroskopen und zeichnen sich vor Allem durch ein hohes Auflösungsvermögen und eine daraus resultierende, beachtliche Bildqualität aus [171, 172]. Bei dem in unserem Labor befindlichen Modell handelte es sich um ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (*confocal laser scanning microscope* LSM880, Zeiss), bei dem Laser verschiedener Wellenlängen als Lichtquelle eingesetzt werden. Der Laserstrahl passiert hierbei zunächst eine Lochblende (*pinhole*) und wird von einem Strahlteiler auf mehrere, hintereinandergeschaltete Spiegel abgelenkt, bevor er durch das Objektiv auf das Präparat fällt [171]. Dieses wurde zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um die gewünschten Strukturen sichtbar zu machen. Trifft der Laser auf ein Fluorochrom, wird Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert und denselben Weg wieder zurückgeworfen, wobei es den Strahlteiler durchbricht und letztendlich den Detektor erreicht. Eine Besonderheit des Konfokalmikroskops ist die dem Detektor vorgeschaltete zweite Lochblende, die nur einen kleinen Teil des Lichtstrahls passieren lässt. Der Anteil, welcher auf den Detektor trifft, wird auf

Höhe der Lochblende gebündelt und liegt dabei konfokal zum Fokuspunkt des Präparats. Sich in der Z-Ebene über- bzw. unterhalb des Fokuspunkts befindliche Strukturen emittieren zwar ebenfalls Lichtstrahlen, fokussieren sich jedoch nicht an der Blende und werden daher durch diese vor dem Detektor abgefangen. Das bedingt, dass nur ein kleiner Teil der Photonen auf den Detektor auftrifft, was zwar für weniger Unschärfe und einen höheren Kontrast sorgt, auf der anderen Seite aber auch ein schwächeres Signal bedeutet [171]. Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurde die sog. „AiryScan“ Technologie entwickelt, bei dem statt eines einheitlichen Detektors (*photomultiplier tube*, PMT) ein aus 32 Hexagonen zusammengesetzter Detektor genutzt wird, bei dem jedes ebendieser Hexagone als eigenständiges *pinhole* fungiert und Positionsdaten weiterleitet. So kann das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR, *signal-to-noise ratio*) erheblich erhöht werden [173, 174]. Da immer nur ein einzelner Punkt vom Laser erfasst wird, rastert das Mikroskop durch Bewegen der Spiegel in X- und Y-Richtung die Fläche des Präparats kontinuierlich ab. Die dazugehörige Software (ZEN black) erstellt dann später aus den aufgenommenen Punkten ein zusammenhängendes Bild. Die Zeit, die der Laser auf einem Punkt verharrt, bis er zum nächsten übergeht, die sog. *pixel dwell time*, entscheidet zusammen mit der Länge der abgerasterten Fläche über die Auflösung des Bildes. Auch 3D-Aufnahmen sind möglich, indem sich die Fokusebene auf dem Präparat in Z-Richtung verändert [171]. Mit einem entsprechenden Bildbearbeitungsprogramm wie IMARIS (Oxford Instruments) können daraus 3D-Rekonstruktionen erstellt werden und, wenn es sich dabei um live Aufnahmen sich bewegender Objekte handelt, Geschwindigkeiten oder Bewegungsmuster im Video analysiert werden. Da es sich um ein inverses Mikroskop handelt, befinden sich die Objektive unterhalb der sog. *stage*, daher müssen bei Objektträgern die Seite des Präparats mit dem Deckglas nach unten positioniert werden und, handelt es sich um Intravitalmikroskopie an der Maus, Organe direkt der Glasplatte aufliegen.

### **3.6.2. Ablauf der Konfokalmikroskopie**

Die Plattform (*stage*), auf der histologische Schnittpräparate oder in diesem Fall die anästhesierte Maus platziert wurden, befand sich mitsamt der Objektive in einer Inkubationskammer, die zum besseren Zugang über mehrere Klappen geöffnet werden konnte. Mit dem eingebauten Thermostat konnte der Innenraum dieser Kammer auf 36 °C aufgeheizt werden, um ein Auskühlen des Tieres während der

Mikroskopie zu verhindern. Da eine Intubation nicht möglich war, wurde über einen Schlauch kontinuierlich Sauerstoff zugeführt, um die Sauerstoffsättigung aufrecht zu erhalten. Das Mikroskop befand sich in einem dunklen Raum, um einen der Bildqualität abträglichen Lichteinfall zu vermeiden. Nachdem das Schnittpräparat bzw. das Versuchstier über dem Objektiv platziert worden war, konnte über den Epifluoreszenzmodus des Geräts zunächst der Fokus eingestellt und der gewünschte Bereich aufgesucht werden. Für die hier gezeigten Aufnahmen wurde das 20x Objektiv verwendet und der Bildausschnitt über den Zoom angepasst. Da es durch Atembewegungen des Tieres und Austrocknen der die Leber beschwerenden Papiertücher zu einem Abheben des Organs von der Glasplatte kommen konnte, wurde der sog. „Autofocus“ eingeschaltet, der, nachdem ein bestimmter Fokuspunkt manuell als Fixpunkt eingestellt wurde, diesen als Richtwert beibehält und die Laserposition immer neu anpasst.

### **3.6.3. Intravitalmikroskopie der Leber**

Die Maus wurde wie unter III.3.1. beschrieben durch Injektionsanästhesie unter Narkose versetzt und, um Exzitationen während der Einschlafphase zu vermeiden, in eine Schlafbox auf einer Wärmematte gelegt. Zum Schutz der Augen wurde Bepanthen Augen- und Nasensalbe (Bayer AG, Leverkusen) großzügig auf die gesamte Kornea aufgetragen. Nach etwa zehn Minuten wurde die Narkosetiefe mittels Zwischenzehenreflex und Atemtätigkeit überprüft und, falls nötig, 0,5 Dosen MMF nachinjiziert. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums (siehe III.3.1.), wurde das Tier aus der Schlafbox entnommen und in Rückenlage auf der Wärmematte mithilfe von Leukoplast (Beiersdorf AG, Hamburg) an allen Extremitäten fixiert. Ein Schwanzvenenkatheter wurde, wie unter III.3.3.1. beschrieben, gelegt und mit Histoacryl Gewebekleber (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) dauerhaft an der Schwanzhaut fixiert. Über den Zugang konnten fluoreszierende Antikörper, die die Zielzellen während der Intravitalmikroskopie sichtbar machen, und isotone Kochsalzlösung (0,9 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verabreicht werden. Zur Vorbereitung des Operationsfeldes wurde das Fell im Bauchbereich von der Kniefalte bis zum Ansatz des Rippenbogens mithilfe eines elektrischen Rasierers entgegen der Wuchsrichtung entfernt und anschließend für fünf Minuten Enthaarungscreme (asid-med, Asid Bonz GmbH, Herrenberg) aufgetragen. Nach deren möglichst rückstandsfreier Entfernung durch angefeuchtete Papiertücher wurde die enthaarte Haut mit einem Antiseptikum

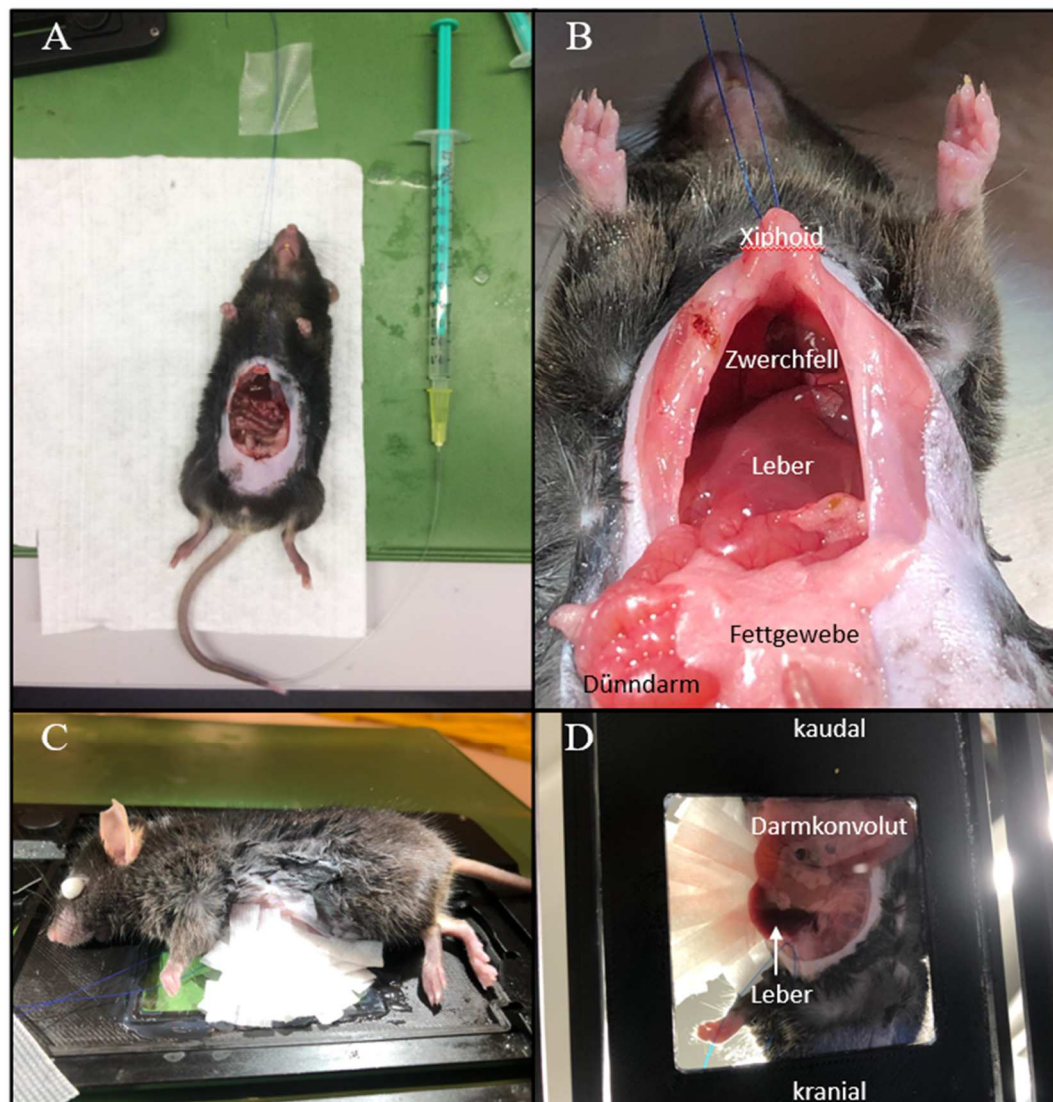
(Octenisept, Schülke & Mayr GmbH, Wien) desinfiziert.

Zunächst erfolgte mittels einer Schere ein medianer Hautschnitt, beginnend auf Höhe der Kniefalte bis zum *Proc. xiphoideus* des Sternums. Die Schnittkante wurde mit einer Pinzette angehoben und die Haut vom darunterliegenden Muskel- und Bindegewebe separiert, indem die geschlossen eingeschobenen Scherenblätter mehrmals vorsichtig aufgespreizt wurden. Unter Beachtung der in der Haut verlaufenden Gefäße wurde die mit einer Pinzette gestraffte Haut bogenförmig von den Schnittenden ausgehend entfernt. Falls Blutungen auftraten, wurden diese mithilfe eines Kauters gestillt und der Bereich zur Schonung des angrenzenden Gewebes anschließend mit isotoner Kochsalzlösung gespült. Nachdem der Blick auf das subkutane Bindegewebe samt Muskulatur frei lag, wurde mit dieser ebenso verfahren. Es empfahl sich, bereits im Vorhinein in der Schnittlinie befindliche Gefäße zu kauterisieren, da unbemerkte Sickerblutungen aus der gut vaskularisierten Muskulatur die Qualität der intravitalmikroskopischen Aufnahmen negativ beeinflussen und zu einem vorzeitigen Kreislaufversagen des Tieres führen konnten. Die sich im Anschluss darstellenden Bauchorgane, vor allem das Darmkonvolut, sollten mit angefeuchteten Papiertüchern (Tapira plus Kosmetiktücher, Tapira, Friedewald) bedeckt werden, um Austrocknen vorzubeugen. Von der mit der *Fac. diaphragmatica* dem Zwerchfell anliegenden Leber war nur der ventrale Rand erkennbar, wobei der linke Hauptabschnitt über das *Lig. falciforme* und dem darin befindlichen *Lig. teres hepatis* mit der ventralen Bauchwand verbunden ist. Um das Organ aus der Bauchhöhle mobilisieren und auf der Glasplatte platzieren zu können, musste diese Verbindung vorher durchtrennt werden. Ein 5-0 Faden (Prolene blau monofil FS2 5-0, Johnson & Johnson, New Jersey) wurde um den stieligen Ansatz des *Proc. xiphoideus* geschlungen und mit einem chirurgischen Knoten fixiert. Vorsichtig wurden die losen Fadenenden gestrafft und über den Kopf des Tieres hinweg in etwa 20 cm Höhe befestigt (siehe Abbildung 14). Mit einem angefeuchteten Wattestäbchen (Meditrade GmbH, Kiefersfelden) zog man die Leber behutsam zu sich heran, bis sich das *Lig. falciforme* aufspannte und man es dicht an der Leberoberfläche entlang in dorsaler Richtung durchschneiden konnte. Das sich permanent bewegende Zwerchfell war dabei unbedingt zu schonen, um eine versehentliche Perforation und damit Eröffnung der Brusthöhle zu vermeiden. Eine zusätzliche Lichtquelle konnte hierbei hilfreich sein, um den Spalt besser auszuleuchten.



Da es sich beim LSM 880 um ein inverses Konfokalmikroskop handelte, traf der Laserstrahl von unten kommend auf das auf einer Plattform befindliche Objekt. Der zu betrachtende Bereich lag dabei direkt einer 50 x 50 mm großen Glasplatte auf. Die Maus wurde mitsamt des am Sternum befestigten Fadens auf die rechte Körperseite gelegt, sodass der geöffnete Bauch auf dem Glas zu liegen kam. Die Fadenenden wurden nun wieder gestrafft und auf der Plattform selbst vor dem Kopf des Tieres mit Leukoplast (Beiersdorf AG, Hamburg) befestigt, um den Zugang zur Leber zu erleichtern. Mit befeuchteten Tüchern wurde diese, möglichst ohne Druck auf das Gewebe auszuüben, auf die eher plane viszerale Seite gezogen und mit weiteren, sich überlappenden Lagen feuchter Papierstreifen (1 x 2 cm lang) auf der Glasplatte fixiert (siehe Abbildung 14). Bereits kleinste Bewegungen, die durch Sickerblutungen oder übermäßig angefeuchtetes Papier entstanden, weil sich zwischen Organ und Glas ein Flüssigkeitsspiegel bildete und die sich durch die Atembewegungen noch verstärkten, stellten sich als kräftige Ausschläge im Video dar und sollten daher vermieden werden.

Die Maus wurde nun auf der Plattform liegend in die Kammer des Mikroskops oberhalb des Lasers verbracht und die Öffnungen der Kammer verschlossen. Die Narkosetiefe wurde während der gesamten Versuchsdauer in 30minütigem Abstand durch den Zwischenzehenreflex überprüft und durch subkutane Nachinjektion von 0,2 ml MMF in die leicht zugängliche Nackenfalte aufrechterhalten. Um den Flüssigkeitsverlust und die fehlende Wasseraufnahme während der Narkose auszugleichen, wurde stündlich über den Schwanzvenenkatheter 0,2-0,3 ml isotoner Kochsalzlösung verabreicht, dem täglichen Bedarf entsprechend und auf das Körpergewicht der Maus abgestimmt [175]. Auch sollten die Papiertücher regelmäßig befeuchtet werden, um Austrocknen der darunterliegenden Organe vorzubeugen.



**Abbildung 14: Ablauf der chirurgischen Präparation zur Intravitalmikroskopie der Leber**

A: Das Versuchstier wurde auf einer Wärmematte platziert. Die intravenöse Injektion von Antikörpern und isotoner Kochsalzlösung erfolgte über den Schwanzvenenkatheter. Das OP-Feld war bereits enthaart und die Peritonealhöhle eröffnet worden.

B: Durch Fixieren des Xiphoids mit chirurgischem Nahtmaterial hob sich der Brustkorb ab, sodass sich die Leber und das *Lig. falciforme* gut darstellen ließen. Dieses war hier zur besseren Mobilisierung der Leber bereits entfernt worden.

C: Das Versuchstier wurde seitlich auf der Plattform positioniert und der Brustkorb durch Zug auf das Xiphoid nach kranial verlagert. Die Leber wurde vorsichtig auf die Glasplatte verschoben und mit angefeuchteten Papierstreifen beschwert.

D: Blick von ventral auf die Glasplatte der Plattform. Die Leber lag mittig mit ihrer *Facies visceralis* auf der Glasplatte und wurde vom Darmkonvolut umgeben. Durch die Papierstreifen wurden Bewegungen, ausgehend von Peristaltik und Atmung, minimiert.

## 4. Thrombozyten Funktionsassays

### 4.1. Herstellung Thrombozytenpuffer

Für den Tyrode's-Puffer (siehe Tabelle 1 rechte Seite) wurden folgende Reagenzien in einen Erlenmeyerkolben gegeben und auf einem Magnetrührer (IKA Magnetrührer RCT-basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) mit Rührfischchen bei Raumtemperatur gelöst.

Tyrode's Stocklösung (10x)	Tyrode's-Puffer
1L destilliertes Wasser	0,1 g Glucose (D (+) Glucose, Anhydrous, CALBIOCHEM, EMD Chemicals, Darmstadt)
80 g NaCl (Natriumchlorid, #0601.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)	90 ml destilliertes Wasser
10,15 g NaHCO <sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat, # 6885.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)	10 ml Tyrode's Stocklösung (10x)
1,95 g KCl (Kaliumchlorid, # 6781.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)	1 ml HEPES Puffer (HEPES solution 1 M, pH 7.0-7.6, <i>sterile filtered</i> , Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

**Tabelle 1: Zusammensetzung Tyrode's-Puffer**

Mithilfe eines pH-Meters (Labor-pH Meter inoLab pH 7110, Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim) wurde der pH-Wert zunächst auf 7,2 eingestellt und die Hälfte der Flüssigkeit in ein weiteres Gefäß abgefüllt. Der verbliebene Rest wurde durch tropfenweises Zugabe von 2 M HCl (Salzsäure, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) auf einen pH von 6,5 eingestellt.

### 4.2. Thrombozytenisolation

Das über den retroorbitalen Venenplexus gewonnene Blut wurde, wie unter III.3.2.2. beschrieben, mit ACD als Antikoagulant im Verhältnis 1:7 versetzt, in ein FACS Röhrchen (5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, Falcon, Corning Science, Mexiko) überführt, dann wurde Tyrode's Puffer (pH 6,5) zu gleichen Teilen

zugegeben. Durch den nachfolgenden Zentrifugationsschritt bei 25 °C Raumtemperatur bei 70 g für 35 Minuten (ohne Bremse) konnte die Thrombozyten enthaltende *platelet rich plasma* (PRP) gewonnen werden. Diese leicht gelblich-trübe, mittlere Phase des entstandenen Überstands wurde mithilfe einer 200 µl Pipette vorsichtig ohne Durchmischung der beiden Phasen entnommen und in ein weiteres FACS Röhrchen transferiert. Eine Zielkonzentration zwischen 150.000-300.000 Thrombozyten/µl war dabei anzustreben und konnte durch Analyse im Blutanalysegerät (XN-1000, SYSMEX GmbH, Norderstedt) überprüft werden. Es folgte eine weitere Zentrifugation des PRP bei 1200g für sieben Minuten (25 °C, Beschleunigung und Abbremsen des Geräts auf höchster Stufe 9). Der Überstand wurde verworfen und die Thrombozyten (auch als *washed platelets*, WP bezeichnet), die sich als Pellet abgesetzt hatten, in 300 µl Tyrode's (pH 6,5) resuspendiert.

### 4.3. Durchführung des Migrationsassays

Zunächst wurden die Deckgläser (Haemocytometer Deckgläser CE, Assistant, Sondheim vor der Rhön), auf welche die Migrationskammern später geklebt wurden, gewaschen. Dazu wurden sie am Vortag des Experiments einzeln für 30 Sekunden in ein Ultraschallbad, gefüllt mit destilliertem Wasser, getaucht und anschließend jeweils zwei davon senkrecht in einen gläsernen Färbekasten nach Coplin gestellt. Dieser wurde zum Waschen mit 70 % Ethanol befüllt und die Platten für zehn Minuten auf einem rotierenden Laborschüttler (ORBI Shaker JR., Benchmark Scientific, Sayreville NJ) bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Flüssigkeit wurde gegen 20 % Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) ausgetauscht und die Platten wieder für eine Stunde geschwenkt. Danach wurde die Flüssigkeit verworfen und die Platten viermal mit destilliertem Wasser ausgewaschen und über Nacht abermals auf den Schüttler gestellt. Am Tag des Experiments wurden die Glasplatten dann mit einer Pinzette aus dem Färbekasten mit der zuvor wasserexponierten Seite auf einen rotierenden *spin coater* (KLM Spin Coater) unter einem Abzug gelegt, um sie mit HMDS (Hexamethyldisilazane, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) zu beschichten. Dafür wurden sie erst auf höchster Rotationsstufe für zehn Sekunden getrocknet und ein dünner Film des HMDS für 30 Sekunden tröpfchenweise mit einer Spritze (2 ml Injekt Solo, B. Braun SE, Melsungen) aufgetragen. Als Migrationskammern wurden 6-teilige Flusskammern mit jeweils

30  $\mu$ l Kammervolumen (IBIDI  $\mu$ -Slide VI 0.4, IBIDI GmbH, Gräfelfing) verwendet und manuell zugeschnitten, sodass eine Kammer mit der klebenden Seite diagonal auf die beschichteten Deckgläser geklebt werden konnte.

Anschließend wurde die Oberfläche der Kammern mit fluoreszenzmarkiertem Fibrinogen (z.B. Fibrinogen from human plasma AF-488, Cat.-Nr.: #F13191 oder AF-546, Cat.-Nr.: #13192 1,5 mg/ml Stocklösung, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) und HSA (humanes Serum Albumin, in PBS gelöst, Bio & Sell GmbH, Feucht) überzogen, um die Migration der Thrombozyten darauf zu ermöglichen. Das dafür verwendete Protokoll war zuvor in unserem Labor etabliert worden (siehe Tabelle 2). Um die Thrombozyten im Rahmen eines Aktivierungsassays zusätzlich zu stimulieren, wurde Kollagen (Horm's collagen 2 mg/ml, Takeda Pharmaceutical Company Ltd, Linz) hinzugefügt.

Reagenz ( $\mu$ l)	Art des Assays		
	Migration	Migration u. Thrombozyten-aktivierung	„Spreading“
Tyrode's (pH 7,2)	114	111	117
8 % HSA-Puffer	3	3	-
Fibrinogen	3	3	3
Kollagen (Horm's collagen)	-	3	-

**Tabelle 2: Beschichtung der Flusskammern zur Durchführung des Migrationsassays**

Die insgesamt 120  $\mu$ l Volumen wurden in ein Reservoir der Kammern pipettiert, sodass diese vollständig durchspült wurden und nach einer Inkubationsdauer von 15 min anschließend 5mal mit Tyrode's-Puffer (pH 7,2) gewaschen, indem die Kammern wieder durchspült und die aus dem gegenüberliegenden Reservoir austretende Flüssigkeit abpipettiert wurde. Für die Aktivierung der Thrombozyten wurden die WP mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (Calciumchlorid, Sigma-Aldrich, 10 mM Stocklösung 1:10 in  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt, Merck KGaA, Darmstadt), 0,5 mM ADP (Adenosin 5'-Diphosphat #A2754, 20mM Stocklösung 1:40 in PBS verdünnt, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) sowie 100  $\mu$ g eines Thromboxan A2 ( $\text{TXA}_2$ )-Analogon (U46619 #BML-PG023-0001, 10 mg/ml

1:100 verdünnt in PBS, Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach) versetzt und jeweils 150 µl in die Kammern gegeben (siehe Tabelle 3).

Reagenz	Volumen (µl)
Tyrode's (pH 7,2) + 8 % HSA-Puffer	211,2
WP ( <i>washed platelets</i> )	20
CaCl <sub>2</sub>	4,8 (2,4 für Aktivierungsassay)
ADP	2
U46619 (TXA <sub>2</sub> -Analogon)	2

**Tabelle 3: Inkubation der WP mit ADP, CaCl<sub>2</sub> und einem TXA<sub>2</sub> Analogon zu deren Aktivierung**

Damit die Thrombozyten auf der Fibrinogen-haltigen Oberfläche adhäreren konnten, wurden die Kammern für 15 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Es folgte ein 3-maliger Waschschrift mit jeweils 150 µl Waschlösung (bestehend aus: 9675 µl Tyrode's (pH 7,2) + 125 µl 8 % HSA-Puffer + 200 µl CaCl<sub>2</sub> (10 mM)), die zuvor auf ebenfalls 37 °C vorgewärmt worden war. Optional konnten nach diesem Schritt weitere Antikörper oder Inhibitoren hinzugefügt werden, um den Assay beliebig zu variieren. Nach einer weiteren Inkubation von 20 Minuten (*spreading*) bzw. 30-90 Minuten (Migration) im Wärmeschrank, wurden die Kammern lichtgeschützt unter dem Fluoreszenzmikroskop befestigt, um Bilder und Videos der migrierenden Thrombozyten aufzunehmen. Die Fähigkeit zu migrieren konnte durch das sich zunächst als gleichmäßig fluoreszierendes Hintergrundsignal darstellende Fibrinogen gemessen werden, welches durch die wandernden Thrombozyten nach und nach von der Oberfläche aufgesammelt wurde. Auch Formveränderungen der Zellen während der Fortbewegung oder nach Aktivierung durch Kollagenfasern wurden erfasst. Nach der Live-Mikroskopie wurden die Kammern mit 150 µl einer Lösung aus 2 % PFA (neutral-gepufferte Formaldehydlösung 4 %, Microcos GmbH, Garching) und 0,05 % Glutaraldehyd-Lösung (GDA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in PBS für zehn Minuten gespült, um die Thrombozyten zu fixieren und im Anschluss Übersichtsaufnahmen der Kammern zur quantitativen Analyse am Konfokalmikroskop (ZEISS LSM 880 with Airyscan, Carl Zeiss AG, Oberkochen)

aufnehmen zu können.

#### 4.4. Funktionsweise des OLYMPUS Epifluoreszenzmikroskops

Bei dem im Migrationsassay verwendeten Mikroskop handelte es sich um ein automatisiertes inverses Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX83, Olympus K.K., Shinjuku). Dieses verfügte neben der Möglichkeit des Phasenkontrasts über die Möglichkeit der DIC-Mikroskopie (Differenzieller Interferenz-Kontrast), bei dem polarisiertes Licht genutzt wird, um durch den unterschiedlichen Brechungsindex (intra-)zellulärer Strukturen ein plastisches Bild der Zellen zu erzeugen [176]. Für Fluoreszenzaufnahmen wird eine Lichtquelle hoher Intensität benötigt, um die Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen (für das Prinzip der Fluoreszenz siehe auch III.5.1.). Der Lichtstrahl wird über das Objektiv auf das Präparat geleitet, wobei er zunächst auf den Filterblock trifft. Dieser besteht aus mehreren Exzitations- und Emissionsfiltern, die selektiv Licht eines bestimmten Wellenlängenspektrums hindurchlassen sowie dem dichromatischen Spiegel (Strahlenteiler, *beam splitter*), der, nachdem er das Anregungslicht reflektiert und im 45 ° Winkel auf das Präparat abgelenkt hat, das emittierte Licht zum Detektor passieren lässt [177].

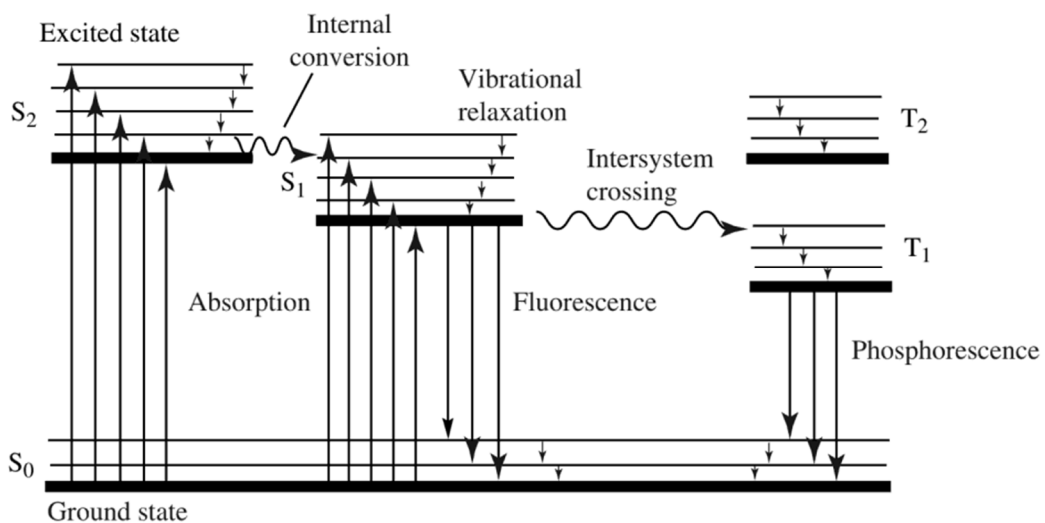
Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe während der teils mehrstündigen Aufnahmen zu vermeiden, wurden die Präparate mit Alufolie bedeckt. Die Mikroskop-Plattform wurde zusätzlich beheizt, um optimale Bedingungen für die Zellmigration zu schaffen. Es wurden das 100x Objektiv im Phasenkontrast und das 40x Objektiv im DIC-Modus verwendet, um für Zeitrafferaufnahmen im Abstand von 12, 20 oder 30 Sekunden Bilder zu generieren.

## 5. Durchflusszytometrie

### 5.1. Prinzip der Fluoreszenz

Fluoreszenz wird nach dem Schema von A. Jabłoński als dreistufiger Prozess dargestellt (siehe Abbildung 15), bei dem ein fluoreszierendes Molekül (meist polyaromatische Kohlenwasserstoffe) Energie in Form von elektromagnetischer, kurzwelliger Strahlung (Exzitation) aufnimmt und dadurch vom Grundzustand ( $S_0$ ) in einen energiereicheren Zustand ( $S_1$ ) überführt wird. Dieser sog. Quantensprung dauert nur 1-10 ns, wobei das Elektron die gewonnene Energie in Form von sichtbarem Licht wieder abgibt (Emission), um in den Grundzustand

zurückzukehren [178]. Das emittierte Licht ist energieärmer und unterscheidet sich vom absorbierten Licht durch eine längere Wellenlänge, wobei die Differenz der Wellenlängenmaxima zwischen Exzitations- und Emissionslicht auch als Stokes'sche Verschiebung (*stoke's shift*) bezeichnet wird [177, 178]. Das Prinzip der Fluoreszenz ist dabei zum Einen von dem der Phosphoreszenz abzugrenzen, bei dem durch eine langsamere Emission der phosphoreszierenden Stoffe ein Weiterleuchten auch nach Abschalten des Anregungslichts besteht, zum Anderen von der Lumineszenz, bei der keine Lichtquelle benötigt wird, da die Energie aus chemischen Prozessen stammt [177].



**Abbildung 15: Darstellung des Jablonski-Schemas**

Nach Anhebung vom Grundzustand  $S_0$  in den energiereicheren Zustand  $S_1$  (Exzitation) folgt die Abgabe der Energie (Emission) zurück zu  $S_0$  [179]

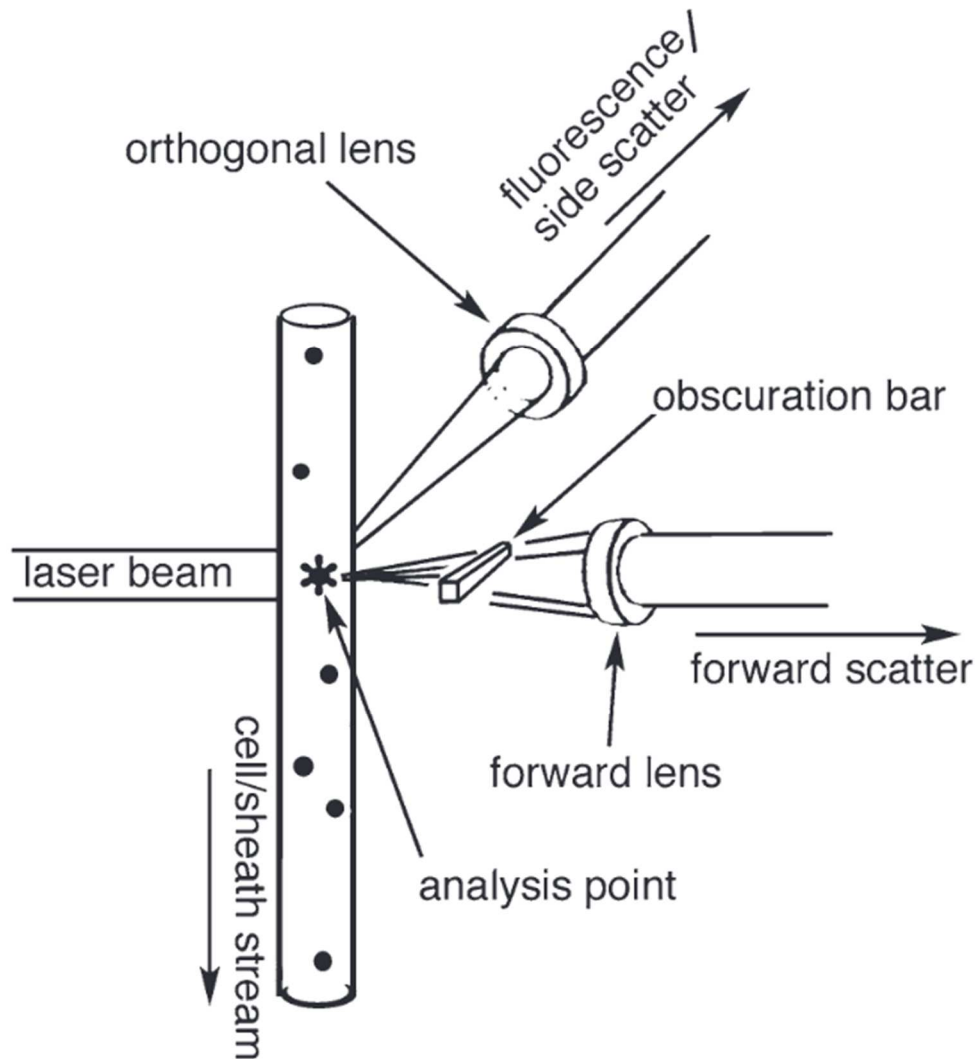
Mit freundlicher Genehmigung von Wiley, Copyright © 2015

## 5.2. Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine weit verbreitete Methode in Bereichen wie der Immunologie und Molekularbiologie dar und ermöglicht die Charakterisierung von Zellen auf Einzelzellebene im Hinblick auf Zellmorphologie, -physiologie oder die Expression extra- und intrazellulärer Proteine [180, 181]. Die Zellen müssen dafür als Zellsuspension gelöst vorliegen. Je nachdem, ob sie einer Zellkultur entstammen, oder aus einem Organ isoliert wurden, ist der Aufbereitungsvorgang unterschiedlich komplex. So wurden in den durchgeführten Versuchen solide Gewebe zuerst mechanisch zerkleinert und anschließend enzymatisch aufgeschlossen. Blutproben wurden, handelte es sich um Vollblut, einer



Erythrozytenlyse unterzogen und die Zellen mit einem formaldehydhaltigen Puffer (BD FACS Lysing Solution, BD Biosciences, San José) fixiert. Die Zellsuspension wurde in ein Röhrchen (5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, Falcon, Corning Science, Mexiko) überführt und unter eine Messküvette in Form einer Hohnadel eingespannt. Über diese wurde die Suspension in das Durchflusszytometer (LSRFortessa, BD Biosciences, San José) eingesaugt und von einem kontinuierlichen Strom einer Trägerflüssigkeit (BD FACSTFlow, Sheath Fluid, BD Biosciences, San José) umschlossen, wobei die Zellen über eine Düse separiert wurden und anschließend Laser verschiedener Wellenlängen passierten, die orthogonal zur Fließrichtung angeordnet waren (siehe Abbildung 16) [180]. Damit die Zellen vom Laser erfasst werden konnten, mussten sie entweder ein endogenes Fluoreszenzsignal aufweisen, wie es bei vielen transgenen Reporter-Mauslinien der Fall ist, oder sie waren im Vorfeld farblich markiert worden. Dazu wurden neben Farbstoffen, die z.B. die DNA der Zellen direkt anfärben, vor Allem fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet [180]. Bei konstanter Laserleistung/ -power ist die Stärke des emittierten Signals dabei proportional zur Menge des gebundenen Farbstoffs, sodass die Durchflusszytometrie sowohl für qualitative als auch quantitative Analysen herangezogen werden kann [181]. Das vom Laser emittierte Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregungswellenlänge) trifft auf das gebundene Fluorochrom und wird von diesem absorbiert, bevor es seinerseits Licht in einer anderen Wellenlänge (Emissionswellenlänge) abstrahlt [182]. Dieses wird von einer Reihe dichroider Filter zum Detektor, einem sog. PMT (*photomultiplier tube*) geleitet und schließlich in ein digitales Signal umgewandelt, das von der Computersoftware (BD FACSDiva Software) erfasst werden kann [180]. Zusätzlich zum Fluoreszenzsignal wird auch die Lichtbrechung durch die vorbeifließenden Zellen gemessen, dabei korreliert der FSC Wert (*forward scatter*) als in Fließrichtung gebrochenes Licht mit der Größe der Zellen und der SSC-Wert (*side scatter*) als perpendikular gebrochenes Licht mit der Granularität derselbigen [181].



**Abbildung 16: Schematischer Aufbau eines FACS-Geräts zur durchflusszytometrischen Analyse**

Die Zellen passieren den Laserstrahl, der orthogonal zur Flussrichtung angeordnet ist. Neben dem Fluoreszenzsignal werden auch die Streuungsparameter gemessen (FSC, SSC) [183]

Mit freundlicher Genehmigung von Springer, Copyright © 2011

### 5.3. Aufbereitung der Leber zur durchflusszytometrischen Analyse

Nach Tötung des Versuchstiers durch cervikale Dislokation und Perfusion der Organe mit 10 ml eiskaltem PBS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) (siehe auch III.6.2.), wurde ein ca. 0,5 x 0,5 x 0,5 cm großes Stück des medialen linken Leberlappens (*Lobus hepatis sinister medialis*) entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf-AG, Hamburg), gefüllt mit eiskaltem PBS, auf Eis gelagert. Mit einem Skalpell (Feather Disposable Scalpel No. 10, FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka) wurde das Organ im Anschluss in einer Petrischale (TC-Schale 35, Standard, Sarstedt AG & Co.KG,

Nümbrecht) fein zerkleinert, um den enzymatischen Verdau zu erleichtern. Pro Organ wurden 2 ml einer Enzymlösung (siehe Tabelle 4) zugefügt und das gesamte Volumen mit einer Transferpipette (3,5 ml, Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht) in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf-AG, Hamburg) überführt. Um eine vorzeitige Aktivierung der Enzyme zu vermeiden, wurden diese, nachdem sie in einer mit Calcium und Magnesium angereicherten Lösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline + CaCl<sub>2</sub> + MgCl<sub>2</sub>, Gibco, New York) vorlagen, auf Eis gelagert.

Enzym	Konzentration	Menge	Hersteller
Dispase	120 mg/ ml	40 µl	Thermo Fisher Scientific
Collagenase D	50 mg/ ml	40 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DNase I	3000 U/ ml	40 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

**Tabelle 4: Übersicht der für die Zellisolierung der Leber verwendeten Enzyme**

Alle Proben wurden zur optimalen Wirksamkeit der Enzyme für 40 Minuten bei 37 °C in einem Schüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg) inkubiert, um das Gewebe aufzuschließen und die Zellen zu isolieren. Danach wurde die Zellsuspension in ein 70 µm Zellsieb (*cell strainer* 70 µm Nylon, Corning) überführt, welches in die Vertiefung einer 6-Well Platte (Non-Tissue Culture Treated Plate, 6-Well, Flat Bottom with Low Evaporation Lid, FALCON Corning Science, Corning) gelegt worden war und bereits 3 ml FACS-Puffer (siehe Tabelle 5) enthielt. Mit dem Kolben einer 2 ml Spritze (Injekt Solo, 2-teilige Einmalspritze, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) wurden feste Bestandteile der Zellsuspension kreisenden Bewegungen vorsichtig durch das Zellsieb gedrückt und dieses anschließend mit 3 ml FACS-Puffer gespült, um möglichst viele Zellen zu erhalten.

Reagenz	Menge	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	500 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bovines Serum Albumin (Albumin Fraktion V)	2,5 g	Carl Roth GmbH + Co. KG
0,5M EDTA (Ethyldiaminteetraacetic acid solution)	2 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

**Tabelle 5: Reagenzien zur Herstellung der FACS-Pufferlösung**

Die Flüssigkeit wurde mittels einer Transferpipette in ein 15 ml Falcon (15 ml Polypropylene Conical Tube, FALCON Corning Science, Corning) pipettiert und die Zellen bei 4 °C (7 min, 320 g) zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg). Der Überstand wurde abgesaugt (FTA-1 Absauggerät mit Verschlusskolben (*aspirator with trap flask*), Biosan medical-biological research and technologies, Riga) und jedes Zellpellet mit 50 µl des 1:50 in FACS-Puffer verdünnten Fc-Block (AntiCD16/ CD32 antibody, eBioscience, invitrogen, Kalifornien) resuspendiert, um nachfolgend unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, und sofort 50 µl davon in eine 96-Well-Platte (96 Well Suspension Culture Plate, sterile, U-Bottom, with lid, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) pipettiert. Es folgte die 20minütige Inkubation der Proben mit dem Antikörper-Mastermix (siehe Tabelle 6) auf Eis, wobei die Platte mit Alufolie bedeckt wurde, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern.

Oberflächen-molekül	Fluorochrom	Verdünnung (in FACS-Puffer)	Wirtsspezies	Klon	Hersteller
CD45 (PTPRC)	PerCP-Cy5.5	1:100	Rat IgG2b, $\kappa$	30-F11	biolegend
F4/80 (EMR1)	PE	1:100	Rat IgG2a, $\kappa$	BM8	biolegend
CD11b (Integrin- $\alpha$ M)	PE-Cy7	1:100	Rat IgG2b, $\kappa$	R1-2	biolegend
CD62L (L-Selectin)	APC-Cy7	1:100	Rat IgG2a, $\kappa$	MEL-14	biolegend
Ly6G	BV-711	1:100	Rat IgG2a, $\kappa$	1A8	biolegend
GPIb	DyLight 649	1:100	Rat IgG	GPIb $\beta$	emfret Analytics
Annexin V	FITC	1:100	-	-	biolegend

**Tabelle 6: Antikörper zur Herstellung des verwendeten Mastermix der Leber**

Zu allen Proben wurden 100  $\mu$ l FACS-Puffer zugegeben und die Platte wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Absaugen entfernt und das Zellpellet in 200  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert. Direkt vor der Analyse durch das FACS-Gerät wurde die Probe mit einer 200  $\mu$ l Pipette entnommen und durch ein 50  $\mu$ m Zellsieb (CellTrics Disposable Filters, Sysmex Partec GmbH, Görlitz) ins FACS-Röhrchen (5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, FALCON Corning Science, Mexico) gedrückt, um eine Einzelzellsuspension zu gewährleisten. Um tote Zellen anzufärben, wurde ein Farbstoff (SYTOX Blue Dead Cell Stain, for flow cytometry, Thermo Scientific, Braunschweig) im Verhältnis 1:1000 mit der Probe vermischt und für fünf Minuten inkubiert.

#### 5.4. Aufbereitung von Blut zur durchflusszytometrischen Analyse

Unter Isoflurannarkose wurde dem Versuchstier direkt vor der cervicalen Dislokation 200  $\mu$ l Blut aus der *V. facialis* (siehe 3.2.1.) in ein Micro-EDTA-Röhrchen (Microvette 100 K3E, Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht) entnommen. Während ca. 100 $\mu$ l zur Erstellung des Differentialblutbilds am Blutanalysegerät (XN-1000, SYSMEX GmbH, Norderstedt) zurückbehalten wurden, wurden 50  $\mu$ l in ein braun-eingefärbtes 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf-AG, Hamburg) pipettiert und mit 50  $\mu$ l des zuvor angefertigten Antikörper-Mastermixes (siehe Tabelle 7) vermischt. Dieser enthielt zur

Erleichterung der späteren Differenzierung der Fluorochrome am FACS-Gerät fluoreszierende „Beads“ (Rainbow Calibration Particles, BD Biosciences, San Jose) im Verhältnis 1:10. Bei Raumtemperatur wurden die Proben 20 Minuten lang inkubiert und das gesamte Probenvolumen in 500 µl FACS-Lysing-Puffer (BD FACS Lysing Solution, BD Biosciences, San Jose) zur Lyse der Erythrozyten überführt.

Oberflächenmolekül	Fluorochrom	Verdünnung (in FACS-Puffer)	Wirtsspezies	Klon	Hersteller
CD62P (P-Selectin)	FITC	1:100	Rat Lewis IgG1, λ	RB40.34	BD Bio-sciences
CD184 (CXCR-4)	AF-647	1:100	Rat IgG2b, κ	L276F12	biolegend
CD369 (Dectin-1)	PE	1:100	Rat IgG1, κ	RH1	biolegend
GARP (LRRC32)	PE-Cy7	1:100	Rat IgG2a, κ	F011-5	biolegend
IL-10	PE-Dazzle	1:100	Rat IgG2b, κ	JES5-16E3	biolegend
CD49d (α4-Integrin)	PerCP-Cy5.5	1:100	Rat IgG2b, κ	R1-2	biolegend
CD62L (L-Selectin)	APC-Cy7	1:100	Rat IgG2a, κ	MEL-14	biolegend
CD11b (Integrin-αM)	BV-605	1:100	Rat IgG2b, κ	M1/70	biolegend
CD44 (HCAM)	AF-700	1:100	Rat IgG2b, κ	IM7	biolegend

**Tabelle 7: Antikörper zur Herstellung des verwendeten Mastermixes des Blutes**

### 5.5. Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte anhand der Software FlowJo v10.3., wobei Zellpopulationen, die über gemeinsame Merkmale wie Größe, Granularität oder der Expression eines zuvor gebundenen, fluoreszenzmarkierten Antikörpers verfügen, untersucht und quantifiziert werden [184, 185]. Anhand von manuell gesetzten Grenzwerten (*gates*) und Regionen um eine Zellpopulation herum, kann diese

entweder ausgeschlossen oder durch positive Selektion weiter eingegrenzt werden [185]. Die meist zu Beginn vorgenommene Einschätzung der Größe und Granularität der Zellen mittels FSC und SSC kann dabei von verschiedenen Faktoren, wie der Probe selbst, der Wellenlänge des verwendeten Lasers oder dem Brechungsindex der Probe und des FACS-Fluids abhängen [185]. Komplex gestaltet sich v.a. die Analyse von Proben, die verschiedene Zelltypen enthalten, wie es bei Organsuspensionen oder lysiertem Vollblut der Fall ist. Debris, der die Ergebnisse durch eine erhöhte Autofluoreszenz und die unspezifische Bindung von Antikörpern beeinflussen kann, sollte zu Anfang durch „gating“, oder zuverlässiger, durch die Zugabe eines Farbstoffs (*viability dye*, siehe III.5.3.) ausgeschlossen werden [184]. Bei der Darstellung unterscheidet man *dot plot*, *density* oder *contour plot*, die durch Farbintensitäten oder Konturlinien eine unterschiedliche Zellzahldichte angeben und so ermöglichen, Populationen voneinander abzugrenzen. Daneben gibt es die Möglichkeit des Histogramms, bei der die relative Signalstärke gegenüber der Zellzahl aufgetragen wird, die dieses Signal aussenden und bei der die Zellen in zwei Ausschläge (*peaks*) geteilt sind, wobei eine positiv und die andere negativ für diesen Marker ist [184, 185]. Zusätzlich sollten immer Kontrollen wie eine Isotyp- oder eine FMO-Kontrolle durchgeführt werden. Isotypkontrollen testen die Spezifität der Antikörperbindung und grenzen sie von möglichen Artefakten ab, während bei der Fluorescence-Minus-One-Kontrolle die Probe mit allen Antikörpern eines Panels bis auf einen gefärbt wird, um dessen Streuungseigenschaften in benachbarte Farbkanäle zu definieren [184, 185]. Neben der Anzahl der aufgenommenen Zellen und ihrem prozentualen Anteil der Probe, können auch Parameter wie die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*, MFI) bestimmt werden. Indem immer zwei Parameter gegeneinander aufgetragen werden, kann durch diese positive bzw. negative Selektion von Zellpopulationen eine immer tiefgreifendere, hintereinandergeschaltete Analyse durchgeführt werden, wobei nicht außer Acht gelassen werden sollte, dass sich durch eine größere Anzahl an Fluorochromen zwar vielschichtige Ergebnisse erzielen lassen, dies jedoch immer mit der Gefahr von unspezifischen Bindungen, Hintergrundsignalen und Überschneidungen der Farbkanäle einhergeht und somit die Ergebnisse negativ beeinflussen kann [185].

### 5.6. Thrombozyten Aktivierungsassay

Um zu überprüfen, ob die Erstellung der P-Selectin KO-Chimären erfolgreich verlaufen war und sich die Knochenmarkszellen in den Empfängertieren etablieren konnten, wurde vier Wochen nach dem Transfer ein Aktivierungsassay an zuvor isolierten Thrombozyten durchgeführt. Im Assay wurden diese dann mit unterschiedlich potenten Aktivatoren inkubiert (siehe Tabelle 8), um eine mögliche Hochregulation von P-Selectin auf der Zelloberfläche zu induzieren. Zusätzlich wurde Jon/A hinzugefügt, ein Antikörper, der an den Integrinkomplex  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  in der *high affinity*-Konformation auf aktivierten Thrombozyten bindet und ebenfalls als Aktivierungsmarker Verwendung findet [186]. Als Kontrollen wurde zusätzlich Blut einer homozygoten P-Selectin KO Maus und einer C57BL/6J Maus analysiert.

#### 5.6.1. Durchführung

Zunächst erfolgte bei jeweils drei Tieren der P-Selectin KO- und der Kontrollgruppe sowie den beiden zusätzlichen Kontrolltieren 30 Minuten nach Analgesie durch subkutane Injektion von Buprenorphin eine Blutentnahme von 200  $\mu\text{l}$  aus der *V. facialis* (siehe III.3.2.1.). Das Blut wurde im Verhältnis 1:7 mit ACD als Antikoagulant versetzt und in ein FACS-Röhrchen transferiert. Anschließend wurde Tyrode's-Puffer (pH 6,5) im Verhältnis 1:1 hinzugefügt. Die Isolation der Thrombozyten erfolgte entsprechend der Beschreibung unter III.4.2.

Reagenzien ( $\mu\text{L}$ )	Probennummer			
	1	2	3	4
Tyrode's (pH 7,2)	42	42	42	42
WP (Thrombozyten)	5	5	5	5
X649 (emfret)	0,5	0,5	0,5	0,5
Jon/A-PE (emfret)	0,5	0,5	0,5	0,5
CD62P-APC (Biolegend)	0,5	0,5	0,5	0,5
$\text{Ca}^{2+}$ (100 mM)	1	1	1	1
PBS	0,5	0	0	0
ADP (100 $\mu\text{M}$ )	0	0,5	0	0
Thrombin (0,1 U)	0	0	0,5	0
Convulxin (10 $\mu\text{g/ml}$ )	0	0	0	0,5



**Tabelle 8: Übersicht der Reagenzien zur Durchführung des Aktivierungsassays**

Zuerst wurden alle verwendeten Reagenzien vorbereitet (siehe Tabelle 8) und mit Ausnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Zur Detektion der Thrombozytenpopulation enthielt der Antikörpermix neben den Antikörpern gegen den Aktivierungsmarker P-Selectin (CD62P-APC, Biolegend) und JonA (Integrin  $\alpha\text{IIb}3$ , PE, emfret Analytics) auch Antikörper gegen GPIb (X649, emfret Analytics). Alle Antikörper wurden dazu im Verhältnis 1:100 angewendet. Die Aktivatoren wurden entsprechend den Angaben in Tabelle 8 in PBS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) vorverdünnt und 20  $\mu\text{l}$  davon mit 40  $\mu\text{l}$  einer 100 mM  $\text{Ca}^{2+}$  Lösung vermischt. Zur Stimulation der Thrombozyten wurden diese vor dem letzten Zentrifugationsschritt mit Prostaglandin I<sub>2</sub> (Prostacyclin) versetzt. Dieses musste dafür zunächst zusammen mit 100  $\mu\text{l}$  einer 0,5 %igen Casein Stocklösung (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) in 10 ml PBS im Verhältnis 1:10.000 vorverdünnt werden, bevor 200  $\mu\text{l}$  davon zum PRP gegeben wurden. Die WP wurden erst direkt vor der Hinzugabe der Aktivatoren in den Antikörpermix transferiert und davon jeweils 48,5  $\mu\text{l}$  in ein Plastik-Inlay für FACS-Röhrchen pipettiert. Daraufhin wurden 1,5  $\mu\text{l}$  der mit Calcium versetzten Agonisten zum Antikörpermix hinzugefügt und das Ganze für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Zellen zu fixieren, wurden 3  $\mu\text{l}$  einer 16 %igen PFA-Lösung (Pierce 16 % Formaldehyde (w/v), Methanol-free, Thermo Scientific, Braunschweig) dazugegeben, durch langsames Auf- und Abpipettieren durchmischt und für weitere 5 Minuten inkubiert. Nach der Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Tyrode's-Puffer (pH 7,2) wurden die Proben im FACS analysiert.

### 5.7. LEGENDplex Assay

Um eine mögliche antiinflammatorische Funktion der Thrombozyten im Rahmen der akuten Inflammation und ihren Einfluss auf die Kupffer-Zellen in der Leber zu untersuchen, wurde ein LEGENDplex-Assay (Biolegend Inc., San Diego) durchgeführt, welcher der Detektion pro- und antiinflammatorischer Zytokine von Makrophagen dient und auf dem Prinzip eines Sandwich-Immunassays basiert. Das verwendete Plasma stammte von C57BL/6J Tieren, deren Thrombozyten, wie unter III.3.5.1. beschrieben, antikörpervermittelt (R300, emfret) depletiert worden waren, während die Kontrollgruppe die Isotypkontrolle (C301, emfret) erhalten hatte. Allen Tieren wurde im Anschluss 1  $\mu\text{g/g}$  KG LPS intraperitoneal verabreicht und diese über einen Zeitraum von vier Stunden mithilfe des „Score Sheets“ klinisch

überwacht. Die terminale Blutentnahme erfolgte anschließend unter MMF Narkose aus dem retroorbitalen Plexus (siehe III.3.2.2.) Als Antikoagulanzen wurde hierfür ACD im Verhältnis 1:7 verwendet.

#### **5.7.1. Plasmaisolation**

Pro Maus wurden 500 µl des entnommenen, antikoagulierten Blutes in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf-AG, Hamburg) mit 500 µl eiskaltem PBS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) vermischt und zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Mit einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5424, Eppendorf AG, Hamburg) wurden die Proben im Anschluss bei 4 °C, 2000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, das farblos bis schwach gelblich erscheinende Plasma, wurde mit einer 200 µl Pipette von den zellulären Blutbestandteilen getrennt und in ein weiteres Reaktionsgefäß (Eppendorf-AG, Hamburg) auf Trockeneis überführt. Bis zur Durchführung des Assays wurde es bei -80 °C gelagert.

#### **5.7.2. Durchführung**

Die Plasmaproben wurden von -80 °C auf Eis stehend aufgetaut und bei 4 °C, 500 g für fünf Minuten zentrifugiert, um möglichen Debris zu entfernen. Der Überstand wurde im Verhältnis 1:2 mit Assay Buffer (LEGENDplex, Biolegend Inc., San Diego) verdünnt und in eine 96 Wellplatte mit konischem Boden (V-plate) zu den bereits vorgelegten Reagenzien pipettiert. Zusätzlich wurde eine Standardverdünnungsreihe mit dem Faktor 1:4 angelegt. In jedes Well wurden 25 µl der Beadsuspension gegeben, in der fluoreszierende Partikel zur Detektion insgesamt 13 verschiedener Zytokine enthalten waren. Sie ließen sich zunächst anhand ihrer Größe in zwei Gruppen unterteilen, wobei jede der 13 Untergruppen zur Unterscheidung ein unterschiedlich starkes Fluoreszenzsignal in Allophycocyanin (APC) aufwies. Die Beads waren an spezifische Antikörper gebunden, sodass diese während der anschließenden Inkubation mit den in der Probe vorhandenen Zytokinen Aggregate bilden konnten. Die Platte wurde dafür mit einer Klebefolie versiegelt, mit lichtundurchlässiger Aluminiumfolie bedeckt und auf einem Schüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg) bei 25 °C, 800 rpm für zwei Stunden geschwenkt. Danach wurde die Platte bei Raumtemperatur, 700 g für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand durch ein schwungvolles Auskippen in den Abfluss verworfen. Das zurückgebliebene Pellet

wurde mit 200 µl Waschpuffer resuspendiert und für eine Minute inkubiert. Danach wiederholte sich der Zentrifugationsschritt mit anschließendem Verwerfen des Überstands. Die Waschschriffe dienten dazu, um Verunreinigungen zu entfernen, die sich später im FACS als Hintergrundsignal dargestellt hätten. Nun wurden 25 µl der biotinylierten Detektionsantikörper hinzugefügt, die ebenfalls spezifisch an die zuvor gebundenen Zytokine banden und mit den beadgekoppelten Antikörpern sog. Sandwich-Aggregate bildeten. Dies geschah während eines einstündigen Inkubationsschritts, wie oben beschrieben. Nach Entfernen der Folie wurden direkt 25 µl einer Lösung zugegeben, die Phycoerythrin-gebundenes Streptavidin enthielt und an die Detektionsantikörper binden konnte. Die Stärke des PE-Fluoreszenzsignals korrelierte später im FACS mit der in der Probe vorhandenen Menge des Zytokins. Abermals wurde die Platte dafür 30 Minuten bei 25 °C auf dem Schüttler bei 800 rpm inkubiert, anschließend wie bereits beschrieben, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachdem mit 150 µl Waschpuffer resuspendiert worden war, wurden die Proben in FACS Röhrcchen (5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, Falcon, Corning Science, Mexiko) überführt und am Gerät (LSRFortessa, BD Biosciences, San José) analysiert. Dazu wurde der Messbereich auf das APC-Signal der Beads mit den beiden zugehörigen Populationen A und B beschränkt, um die Messung von Debris ausschließen zu können. Pro Probe wurden 3000 *events* gemessen, wobei zuerst die Standardverdünnungsreihe aufgenommen wurde. Für die Auswertung wurde das unter [www.biolegend.com/en-us/legendplex](http://www.biolegend.com/en-us/legendplex) frei zugängliche Programm LEGENDplex Data Analysis Software genutzt und die Daten graphisch in GraphPad Prism 8 dargestellt.

## **6. Immunhistochemie**

### **6.1. Grundlagen der Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie ist die Vereinigung dreier Fachgebiete: der Immunologie, Histologie und Chemie, mit dem Ziel, Antigene in Gewebsschnitten durch spezifische Antikörper, die Bindungsstellen für ebenjene Antigene besitzen, sichtbar zu machen [187]. Ermöglicht wird das entweder durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen (Immunfluoreszenzfärbung), oder, indem im Rahmen einer enzymatischen Reaktion ein zunächst farbloses Reagenz in ein farbiges Präzipitat

umgewandelt wird [188]. Zwar ist diese quantitative Methodik weniger sensitiv als verwandte Techniken wie Western Blot oder ELISA, dafür jedoch einfacher in der Durchführung und ermöglicht im Gegensatz zu den beiden anderen genannten Methoden eine subzelluläre Lokalisation von Proteinen/ Antigenen [187]. Bei den in dieser Arbeit vorliegenden Färbungen handelte es sich ausschließlich um Immunfluoreszenzfärbungen, die eine weit verbreitete Methode der Immunhistologie darstellen [187, 188]. Obwohl durch neuere Techniken auch weniger stark exprimierte Antigene detektiert werden können, bringen diese den Nachteil eines höheren Hintergrundsignals mit sich. Daher sollte die Vorgehensweise immer einen Kompromiss darstellen und sich an folgenden Faktoren orientieren: Gewebebeschaffenheit, der Expression und Lokalisation des gesuchten Antigens sowie den anfallenden Kosten [187].

Man unterscheidet bei Färbungen zwischen direkter und indirekter Methode [187-189]. Bei der direkten Methode werden fluoreszenzmarkierte Antikörper in einem einstufigen Prozess verwendet, die an das Antigen binden. Dies bietet sich vor allem bei Antigenen mit starker Expression an oder wenn der Einsatz von Sekundärantikörpern aufgrund der Gewebeart oder des Wirts, aus dem die Primärantikörper isoliert wurden, zu einer unspezifischen Färbung führen würde [187, 188]. Nachteilig sind zum einen die im Gegensatz zur indirekten Methode höheren Kosten, da alle verwendeten Antikörper markiert sein müssen, zum anderen die bei der indirekten Methode höhere Sensitivität, da dort mindestens zwei Sekundärantikörper pro Primärantikörper gebunden werden können, wodurch ein stärkeres Signal entsteht [187-189]. Bei der indirekten Methode bindet ein nicht markierter Primärantikörper die Zielantigene und wird dann seinerseits von mehreren fluoreszenzmarkierten polyklonalen Sekundärantikörpern gebunden. Diese Methode ist zeitaufwändiger, da zwischen Primär- und Sekundärantikörper Blocklösungen aufgetragen werden müssen, um unspezifische Bindungen zu verhindern [187].

Des Weiteren muss zwischen mono- und polyklonalen Antikörpern unterschieden werden. Das Prinzip zur Gewinnung monoklonaler Antikörper wurde von Köhler und Milstein entwickelt, die Mäuse mit aufgereinigtem Antigen immunisierten, um anschließend spezifische B-Lymphozyten aus deren Milzen zu isolieren. Diese werden in Kultur mit Myelomzellen verbracht und produzieren Antikörper mit hoher Spezifität für ein einzelnes Epitop [188, 189]. Demgegenüber werden für die

Herstellung von polyklonalen Antikörpern verschiedene Tierarten herangezogen, darunter Kaninchen und Ratten, aber auch größere Nutztiere wie Ziegen oder Esel. Die Immunisierung erfolgt auch hier über aufgereinigte Antigene, um die Produktion von Antikörpern anzuregen, die später aus dem Blut gewonnen werden [188, 189]. Wesentlich einfacher ist die Isolation von Antikörpern aus Hühnereiern, wobei die Elterntiere immunisiert werden und ihre Antikörper ins Ei übertragen [189]. Zwar sind polyklonale Antikörper günstiger in der Herstellung und zeigen eine höhere Affinität sowie breitere Reaktivität, dafür sind sie weniger spezifisch als monoklonale und können zu falsch positiven Ergebnissen durch Kreuzreaktionen führen [188, 189].

## **6.2. Organaufbereitung und Herstellung von Kryoschnitten**

Nachdem das Versuchstier durch zervikale Dislokation getötet worden war, wurden direkt im Anschluss Bauch- und Brusthöhle unter Zuhilfenahme chirurgischen Bestecks eröffnet und um eine bessere Sicht auf das Herz zu erlangen, die Rippen beidseits des Sternums durchtrennt. Dieses konnte dann nach kranial abgehoben werden. Für die sich anschließende Perfusion wurde ein etwa 0,5 cm langer Schnitt in einen der ventralen Leberlappen gesetzt, aus dem das Blut und die Spülflüssigkeit ablaufen konnten. Eine mit eiskaltem PBS vollständig gefüllte 10 ml Spritze (Injekt Solo, B. Braun SE, Melsungen) wurde über eine 26 G Kanüle (Becton, Dickinson and Co. Ltd., Irland) etwa 5 mm in die Herzspitze eingestochen, um in die linke Kammer injizieren zu können. Dabei war darauf zu achten, nicht zu tief einzustechen, um ein Durchstechen des Myokards zu vermeiden. Langsam und unter Ausübung kontinuierlichen Drucks wurde dann die gesamte Flüssigkeit über einen Zeitraum von ca. einer Minute über den großen Körperkreislauf appliziert, um das nach Herzstillstand im Gewebe versackende Blut zu verdrängen. Augenscheinlich war eine korrekte Ausführung durch ein Aufhellen der Leberlappen von rotbraun zu lehmfarben und die blassrötliche Verfärbung der austretenden Flüssigkeit zu erkennen. Die benötigten Organe wurden rasch entnommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Corning Science, Mexiko), gefüllt mit 4 ml 4 % Formaldehyd (neutral-gepufferte Formaldehydlösung 4 %, Microcos GmbH, Garching), überführt. Dort verblieben sie für eine Stunde bei Raumtemperatur, um die Zellen zu fixieren, um dann in ein weiteres Zentrifugenröhrchen mit 4 ml 30 % Sucroslösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) transferiert

und über Nacht bei 4 °C gelagert zu werden. Die hypertone Sucroselösung entzog dem Gewebe zusätzlich Wasser und schützte somit vor Gefrierartefakten, wodurch sie zu einer besseren Haltbarmachung beitrug [190].

Am darauffolgenden Tag wurde jedes Organ in ein auf die jeweilige Größe abgestimmtes Einbettgeschälchen (Tissue-Tek Cryomold Intermediate/ Standard, Sakura Finetek Europe, Staufen) gelegt und vollständig mit einem wasserlöslichen Einbettmedium (Tissue-Tek O.C.T. TM Compound, Sakura Finetek Europe, Staufen) bedeckt. Dieses gefror bei Temperaturen unter -10 °C und konnte beim späteren Färbevorgang rückstandslos ausgewaschen werden. Nach einer kurzzeitigen Lagerung der Schälchen auf Trockeneis, in der das Medium aushärtete, konnten die eigentlichen Schnitte am Kryotom (Thermo Scientific CryoStar NX70 Kryostat, Thermo Scientific, Braunschweig) angefertigt werden. Dazu wurde der gefrorene TissueTek-Block aus dem Schälchen entnommen, mithilfe eines Tropfens flüssigen TissueTek auf einer kreisförmigen Metallscheibe fixiert und hochkant in die Halterung des Geräts eingespannt. Mit der an der Seite gelegenen Kurbel wurde die Halterung mitsamt dem zu schneidenden Organ auf und ab bewegt, derweil sich die gegenüberliegende Klinge kontinuierlich darauf zu bewegte. Hierbei konnte die Schnittdicke manuell eingestellt werden, wobei die dieser Arbeit zugrundeliegenden Präparate eine Dicke von 10 µm aufwiesen. Je nachdem, um welches Gewebe es sich handelte, empfahl sich zudem eine unterschiedliche Temperatureinstellung von Halterung und Klinge (siehe Tabelle 9). Um ein Aufrollen der entstandenen Schnitte zu verhindern, befand sich eine Glasplatte direkt über der Klinge, wodurch die Schnitte auf der Platte zu liegen kamen und durch kurzes Anpressen auf den Objektträger übertragen werden konnten. Nach einer Trocknungszeit von fünf Minuten wurden sie bis zur Färbung in einen Objektträgerhalter bei -20 °C verbracht. Ein wiederholtes Auftauen sollte dabei vermieden werden, um einem Ablösen der Gewebe vom Objektträger vorzubeugen.

Gewebeart	Temperatur Schneidblock (°C)	Temperatur Klinge (°C)
Lunge	-25	-15
Leber	-23	-13
Milz	-25	-16

Knochenmark	-30	-30
-------------	-----	-----

**Tabelle 9: Temperatureinstellung des Kryotoms angepasst an das zu schneidende Gewebe**

### **6.3. Durchführung von Färbungen**

Die Objektträger wurden zunächst in eine dafür vorgesehene Färbebox gelegt, durch deren schwarze Abdeckung die fluoreszenzgekoppelten Antikörper während der Inkubationszeiten vor Ausbleichen geschützt waren. Indem der Boden mit etwas Wasser befüllt wurde, konnte auch bei längeren Färbeschritten ein Austrocknen der Schnitte verhindert werden. Nun wurde die Box unter einen Abzug gestellt und die Schnitte mithilfe einer Transferpipette (3,5 ml, Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht) vollständig mit 4 % Formaldehyd (neutral-gepufferte Formaldehydlösung 4 %, Microcos GmbH, Garching) bedeckt, um sie noch einmal für 15 Minuten zu fixieren. Im Anschluss wurde die überschüssige Flüssigkeit verworfen und die Objektträger in einen Glastiegel nach Coplin, gefüllt mit Waschlösung, gesteckt. Diese bestand aus 100 ml einer 10fach konzentrierten PBS-Lösung (Phosphate Buffered Saline (10X) pH 7.4, gibco, NY) und 900 ml destilliertem Wasser, dem 1ml Tween (Tween20, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) als Detergens zur verbesserten Reinigung zugesetzt wurde. Gewaschen wurde dreimal für jeweils fünf Minuten auf einem Wippschüttler (Heidolph Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach), wobei zwischen den einzelnen Waschschrritten die Waschlösung komplett ausgetauscht wurde. Danach wurden die Objektträger wieder in die Färbebox transferiert und das Glas um die Gewebeschnitte mit einem Zellstofftupfer vorsichtig trocken getupft, sodass die Probe mit einem wasserabweisenden Stift (Super PAP Pen Liquid Blocker, Science Services, München) umrandet werden konnte. So wurde das Auslaufen der Färbelösung über den Objektträger verhindert und ermöglichte nicht nur eine Ersparnis an verwendeten Antikörpern und Färbelösung, sondern überdies auch verschiedene gleichzeitige Färbungen auf einem Objektträger. Nachdem die Markierung getrocknet war, wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Blocklösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper unzugänglich zu machen [191]. Diese wurde wie folgt hergestellt: in einem 100 ml Erlenmeyerkolben wurden zuerst 50 ml 1x PBS-Lösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), 500 mg bovines Serumalbumin (Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH + Co. KG,

Karlsruhe) und 250 mg Saponin (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) mithilfe eines Rührfischchens auf einem Magnetrührer (IKA Magnetrührer RCT-basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) vermischt, bis alle festen Bestandteile vollständig gelöst waren. Das Saponin diente dabei zur Permeabilisierung des Gewebes, um eine bessere Anfärbung intrazellulärer Strukturen zu ermöglichen, wohingegen das enthaltene BSA unspezifischen Bindungen der Primärantikörper am Gewebe vorbeugen sollte [192, 193]. Die Flüssigkeit wurde danach in eine 20 ml Spritze aufgezogen und durch einen Filter mit 0,2 µm Porendurchmesser (Spritzenvorsatzfilter, qpore, Heidelberg) gedrückt, um etwaige ungelöste Rückstände zu entfernen. Von der so entstandenen Stocklösung, in welcher später die Sekundärantikörper gelöst wurden, wurden 4,5 ml entnommen und in einem separaten 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Corning Science, Mexiko) 500 µl normales Ziegen Serum (BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching) zur Verhinderung unspezifischer Bindungen der Sekundärantikörper zugefügt (Blocklösung) [193]. Alle verwendeten Primärantikörper wurden, unabhängig ob diese bereits fluoreszenzmarkiert waren, in der entsprechenden Konzentration in die Blocklösung vorgelegt und nach Abkippen der Blocklösung aus dem vorangegangenen Schritt jeweils 100 µl pro Organschnitt auf den Objektträger pipettiert. Zur Inkubation wurde die Färbebox über Nacht bei 4 °C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden dann die nicht gebundenen Primärantikörper durch einen weiteren Waschschrift mit PBS-Tween, wie zuvor beschrieben, entfernt und 100 µl Stocklösung mit fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern zur Bindung an die nicht markierten Primärantikörper in der Verdünnung 1:200 auf die Objektträger pipettiert. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde abermals die überschüssige Flüssigkeit durch Abkippen entfernt und zur Sichtbarmachung der Zellkerne eine DNA-Färbung (Hoechst 33342 Solution (20 mM), Thermo Scientific, Braunschweig) durchgeführt, wobei der Farbstoff 1:1000 verdünnt angewendet und jeder Schnitt für zehn Minuten mit 100 µl Lösung bedeckt wurde. Es erfolgte ein letzter Waschschrift mit PBS-Tween für 3mal fünf Minuten, bevor pro Schnitt ein Tropfen eines später aushärtenden Mediums (Dako Fluorescence Mounting Medium, Dako North America, Inc., Carpinteria) aufgetragen wurde, welches das Deckglas auf dem Objektträger fixierte und die Fluorochrome während der Mikroskopie vor Ausbleichen schützte. Die Schnitte konnten so bei 4 °C vor Licht geschützt lagern, für einen längeren Zeitraum von mehreren Wochen empfahl sich dagegen die Lagerung bei -20 °C.



#### 6.4. Aufnahme und Auswertung

Zunächst wurden Aufnahmen der histologischen Schnittpräparate am Konfokalmikroskop mithilfe der Software ZEN (*black edition*) vorgenommen. Mit dem 20x Objektiv wurde dafür eine Übersichtsaufnahme des gesamten Präparats erstellt und 6 *regions of interest* (ROIs) festgelegt, die sich gleichmäßig über das Gewebe verteilten. Um eine ungewollte Beeinflussung in Bezug auf die Zellzahlen zu vermeiden, wurden die sechs Bilder in dem Farbkanal gemacht, in welchem lediglich die DNA und somit die Zellkerne gefärbt waren. Die Größe der einzelnen Bildausschnitte lag im 1x Zoom bei 420,11 x 420,11  $\mu\text{m}$  bei einer Auflösung von 2048 x 2048 Pixeln und ergab in Summe eine analysierte Fläche von 1,058  $\text{mm}^2$ , deren Ergebnisse später auf  $\text{Zellzahl}/\text{mm}^2$  umgerechnet wurde. Die Auswertung gestaltete sich im Anschluss wie folgt: jedes Bild wurde in der OpenSource Software „FIJI“ als „*multichannel image*“ geöffnet, in dem alle aufgenommenen Farbkanäle gleichzeitig dargestellt wurden, um Zellinteraktionen quantifizieren zu können. Wurden Zellen ausgezählt, die wie Thrombozyten in großer Zahl im Gewebe vorzufinden sind und teilweise Aggregate bilden, wurde der dazugehörige Kanal dupliziert und in ein binäres Bild umgewandelt, sodass Hintergrundsignale ausgeblendet wurden und lediglich die Kontur der Zellen zurückblieb. Damit bei Überlagerungen Zellaggregate nicht als eine große Zelle gewertet wurden, konnten, um Ungenauigkeiten zu vermeiden, diese mittels „*Process*  $\rightarrow$  *Binary*  $\rightarrow$  *Watershed*“ in einzelne Zellen abgegrenzt werden. Über „*Analyze*  $\rightarrow$  *Analyze Particles*“ wurde schließlich die Größe der Partikel, die inkludiert werden sollten, festgelegt. Bei Thrombozyten entsprach das einer Größe von 2-10  $\mu\text{m}^2$ ; die Zirkularität der Partikel wurde nicht berücksichtigt. Die in einer Tabelle dargestellten Werte, gaben neben der absoluten Zellzahl auch die *percentage of area* an, also den prozentualen Wert der Fläche, den die gezählten Zellen einnahmen. Diese Einheit wurde als *% field of view* (FOV) bei der Auswertung von Fibrinogen herangezogen. Größere Zellen wie Neutrophile dagegen wurden manuell über die Option „*Cell Counter*“ gezählt. Wenn diese sich im Bild mit Makrophagen überlagerten oder bereits vollständig phagozytiert waren, wurde das als Interaktion gewertet.

## 7. Statistische Auswertung

Die graphische Darstellung der Daten erfolgte ebenso wie die statistische Analyse unter Zuhilfenahme der Software GraphPad Prism 8. Zunächst wurden dort alle Daten mittels „Shapiro-Wilk-Test“ auf Normalverteilung geprüft. Bei normalverteilten Werten wurde zur Testung auf Signifikanz ein „Student’s t-test“ durchgeführt, falls in zwei Gruppen jedoch keine Normalverteilung vorlag, wurde stattdessen ein „Mann-Whitney-Rank Sum-Test“ angewandt. Zusätzlich wurde immer der *standard error of the mean* (SEM) also der Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wurde eine statistische Signifikanz der Ergebnisse angenommen (gekennzeichnet durch „\*“). Als „sehr signifikant“ wurden Werte von  $p \leq 0,01$  bezeichnet (gekennzeichnet durch „\*\*“), als „extrem signifikant“ Werte von  $p \leq 0,001$  (gekennzeichnet durch „\*\*\*“). Nicht signifikante Ergebnisse wurden als „n.s.“ gekennzeichnet. Im Falle des LEGENDplex-Assays wurde die Methode der multiplen Mittelwertvergleiche (*multiple comparisons*) nach Benjamini, Krieger and Yekutieli angewandt (5 % FDR). Auch die Analyse des Sepsis Scores erfolgte nach dieser Methode. Die unter IV.1.1. dargestellte Auswertung der Histologie und des Differentialblutbildes (ausgenommen Abbildung 20, B, dort *multiple comparisons*) erfolgte anhand einer „Ordinary one-way ANOVA“ unter Anwendung des Holm-Sidak-Tests.

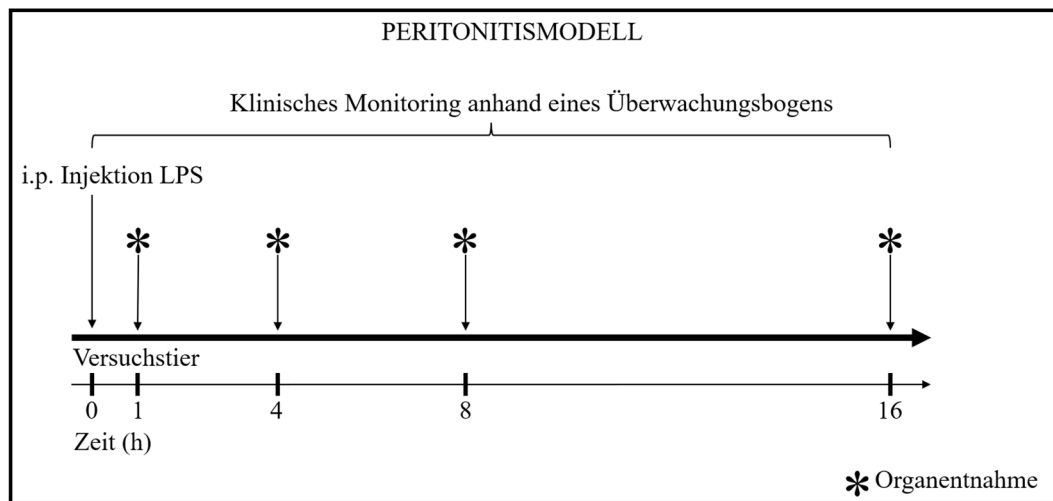
Die weitere Aufarbeitung und Darstellung der Daten erfolgte anschließend unter Verwendung von Microsoft PowerPoint für Microsoft 365 MSO.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten während akuter Inflammation

#### 1.1. LPS-induzierte sterile Peritonitis

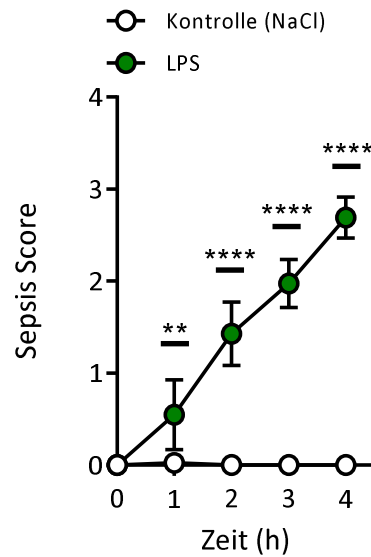
Um die Interaktionen zwischen Thrombozyten, Neutrophilen und Kupffer-Zellen im Rahmen einer systemischen Inflammationsreaktion betrachten zu können, wurde das Modell einer sterilen Peritonitis herangezogen. Nach intraperitonealer Injektion von 1 µg/g KG LPS in zehn Wochen alte weibliche C57BL/6J Tiere, wurden diese zunächst auf mögliche, auf die LPS-Injektion zurückzuführende, klinische Symptome hin überwacht. Mithilfe des Sepsis-Überwachungsbogens konnten hierbei verschiedene Parameter wie die Aktivität der Tiere, Respirationsrate/ -qualität oder die Reizantwort auf externe Stimuli erfasst und dem Schweregrad entsprechend eingeordnet werden (siehe III.3.4.3). Tieren aus der zugehörigen Kontrollgruppe wurde statt des in 200 µl isotoner Kochsalzlösung gelösten LPS lediglich die entsprechende Menge der Kochsalzlösung appliziert. In beiden Gruppen erfolgte nach einem definierten Zeitraum von 1, 4, 8 oder 16 Stunden nach LPS Injektion eine Blutentnahme aus der *V. facialis*, bevor die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Organe nach vorangegangener Perfusion zur histologischen Aufbereitung entnommen wurden (siehe Abbildung 17).



**Abbildung 17: Flussdiagramm zur Durchführung des Modells einer sterilen Peritonitis**

Induktion einer Sepsis durch i.p. Injektion von 1  $\mu\text{g/g}$  LPS in C57BL/6J Tiere ( $n=3$ ), gefolgt von klinischem Monitoring über 1, 4, 8 bzw. 16 Stunden bis zur Beendigung des Versuchs einschließlich Blut- und Organentnahme.

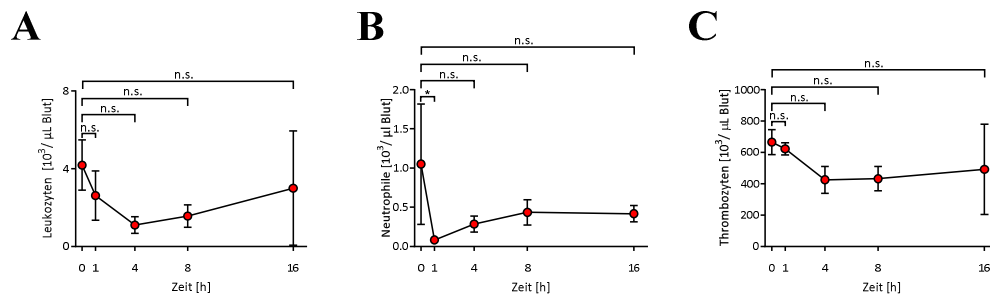
Wie in Abbildung 18 dargestellt, zeigten Kontrolltiere, denen lediglich isotone Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht wurde, im Sepsis-Überwachungsbogen über den gesamten vierstündigen Zeitraum konstant einen Wert von Null. Dagegen wiesen Tiere, die LPS erhalten hatten, bereits nach einer Stunde klinische Symptome auf, die bis zum Zeitpunkt vier Stunden nach LPS-Injektion kontinuierlich bezüglich ihres Schweregrads zunahm. Über den gesamten Zeitraum stieg der Sepsis Score dabei um insgesamt 67,5 % an, wobei die Gesamtpunktzahl zum Zeitpunkt vier Stunden nach LPS-Injektion bei 2,7 von vier möglichen Punkten lag.



**Abbildung 18: Die intraperitoneale Injektion von LPS führt zur Ausprägung einer Sepsis-assoziierten klinischen Symptomatik**

Erfassung des Sepsis Scores zum direkten Vergleich zwischen der mit LPS injizierten Gruppe (grün) und der Kontrollgruppe (weiß) innerhalb des vierstündigen Zeitraums ( $n = 3$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ).

Die Analyse des Differentialblutbildes mithilfe des Blutanalysegeräts ergab einen Abfall der im Blut zirkulierenden Leukozyten bereits eine Stunde nach LPS-Injektion (siehe Abbildung 19). Die Gesamtleukozytenzahl reduzierte sich bis zum Zeitpunkt vier Stunden nach LPS-Gabe um insgesamt 73,7 %, nachdem bis zum Zeitpunkt 16 Stunden nur ein leichter Anstieg folgte. Ähnlich verhielt es sich mit der Anzahl der Neutrophilen, die sich, bezogen auf den Kontrollwert vor LPS-Injektion, innerhalb der ersten Stunde signifikant verringerte ( $p = 0,0313$ ), um anschließend geringfügig bis zum Ende des Überwachungszeitraums anzusteigen. Auch die Thrombozytenzahl reduzierte sich in Folge von LPS, allerdings nicht signifikant, bis sie zum Zeitpunkt vier Stunden ihren niedrigsten Wert erreichte und danach bis zum Ende der 16 Stunden kaum merklich wieder anstieg.



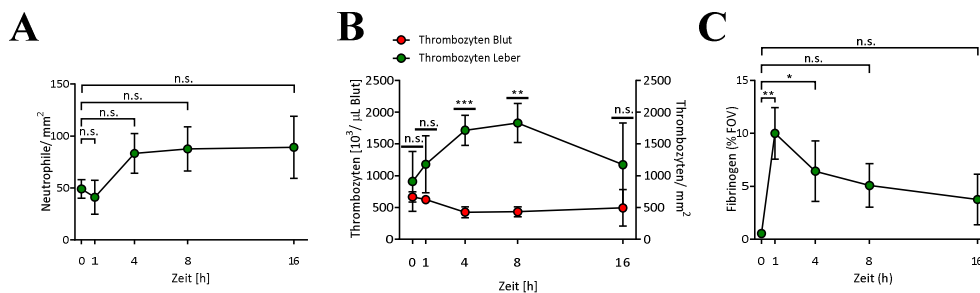
**Abbildung 19: Die Injektion von LPS führt zu einem Abfall sowohl der Gesamtleukozytenzahl als auch der Neutrophilen und Thrombozyten in der peripheren Zirkulation**

Differentialblutbild zum Zeitpunkt 0 (vor LPS-Injektion) sowie zu den Zeitpunkten 1, 4, 8 und 16 Stunden nach LPS-Injektion. Anzahl der im Blut zirkulierenden Leukozyten (A), Neutrophilen (B) sowie Thrombozyten (C). Angaben als Zellzahl  $\times 10^3/\mu\text{l Blut}$  ( $n = 3$ , \*  $p \leq 0,05$ ; n.s. nicht signifikant).

Während sich im Blut unter dem Einfluss von LPS sowohl ein Abfall der Neutrophilen als auch der Thrombozytenzahlen zeigte, ergab die histologische Quantifizierung einen gleichzeitigen Anstieg dieser beiden Zellpopulationen in der Mikrozirkulation der Leber (siehe Abbildung 20). So nahm die Zahl der Neutrophilen im Vergleich zum Ausgangswert innerhalb von vier Stunden um 40,93% zu ( $p = 0,248$ ), ehe sie nur noch geringfügig bis zum Erreichen ihres Höchstwertes zum Zeitpunkt 16 Stunden anstieg, entsprechend einer absoluten Erhöhung von 44,88%. Die Thrombozytenzahl, die unter *steady state* Bedingungen bei durchschnittlich 909 Zellen/ $\text{mm}^2$  lag, verdoppelte sich innerhalb von acht Stunden und erreichte damit einen maximalen Wert von 1831 Zellen/ $\text{mm}^2$ , um letztendlich wieder auf durchschnittlich 1173 Zellen/ $\text{mm}^2$  zu sinken. Die aus dem Abfall der zirkulierenden und dem Anstieg der in der Leber befindlichen Thrombozyten resultierende Differenz war sowohl zum Zeitpunkt von vier Stunden ( $p = 0,005$ ) als auch acht Stunden ( $p = 0,006$ ) nach LPS-Injektion signifikant.

Um die direkten Auswirkungen auf das Gewebe infolge des inflammatorischen Stimulus zu veranschaulichen, wurde Fibrinogen als Marker für die Aktivierung der Gerinnungskaskade in die immunhistologische Färbung inkludiert. Dabei wurde der Anteil des analysierten Bildausschnitts, der mit Fibrin(ogen)-ablagerungen bedeckt war, bezogen auf die Gesamtfläche des Bildausschnitts in Prozent angegeben (*% field of view, FOV*) (siehe Abbildung 20). In Kontrolltieren, wie auch in Abbildung 21 noch einmal deutlich wird, war

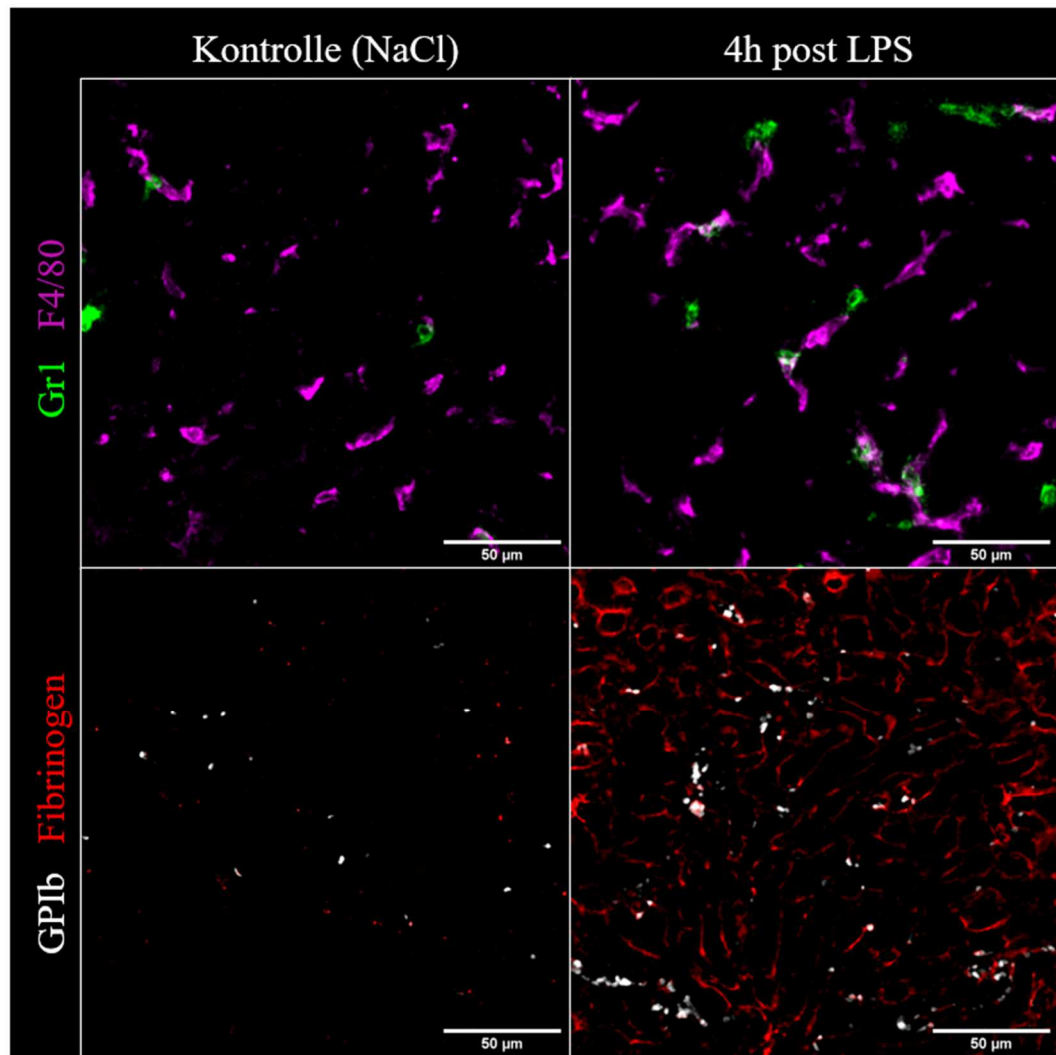
Fibrin(ogen) nahezu nicht nachweisbar. Infolge der LPS-Injektion zeigten sich jedoch bereits innerhalb einer Stunde ausgedehnte, netzartige Ablagerungen ausgeprägten Ausmaßes ( $p = 0,001$ ), wobei rund 10 % der Gesamtfläche von Fibrin(ogen) bedeckt waren. Dieser Wert sank daraufhin kontinuierlich bis zum Zeitpunkt 16 Stunden nach LPS auf mehr als die Hälfte ab, was nur noch einem prozentualen Anteil von 3,76 % der Gesamtfläche entsprach.



**Abbildung 20: In der Leber kommt es nach der Injektion von LPS zur Rekrutierung von Neutrophilen und Thrombozyten sowie Fibrinablagerungen**

Darstellung der histologischen Analyse der Leber, bezogen auf die Zeitpunkte vor LPS-Injektion sowie auf die Zeitpunkte 1, 4, 8 und 16 Stunden nach LPS-Injektion. (A) Anzahl der Neutrophilen in der Leber. (B) Direkter Vergleich zwischen der Anzahl der im Blut zirkulierenden (rot) und der in der Leber befindlichen Thrombozyten (grün). (C) Prozentsatz der mit Fibrinogen bedeckten Fläche eines histologischen Bildausschnitts ( $n = 3$ ,  $** p \leq 0,01$ ;  $* p \leq 0,05$ ; n.s. nicht signifikant).

Die soeben genannten Ergebnisse der histologischen Auswertung der Leber werden zusätzlich durch Abbildung 21 veranschaulicht: Während unter *steady state* Bedingungen im Kontrolltier lediglich vereinzelt Neutrophile zu finden waren, traten diese vermehrt unter dem Einfluss von LPS (hier zum Zeitpunkt vier Stunden) auf, wobei sie sowohl einzeln vorlagen als auch in engem räumlichem Kontakt standen mit den ebenfalls dargestellten Kupffer-Zellen. Die in den Kontrollen ebenfalls nur vereinzelt vorzufindenden Thrombozyten sammelten sich infolge von LPS vornehmlich als Aggregate in der Mikrozirkulation in unmittelbarer Nähe der Fibrin(ogen)-ablagerungen an.



**Abbildung 21: Repräsentatives Beispiel einer immunhistologischen Färbung von Leberschnitten 4 h nach LPS-Injektion**

Thrombozyten (GPIIb) und Neutrophile (Gr1) sind in der Kontrolle nur vereinzelt nachweisbar. Unter LPS-Einfluss kommt es zur Akkumulation beider Zelltypen in der Leber sowie großflächigen Fibrin(ogen)-ablagerungen (rot). Neutrophile sind häufig in engem räumlichem Kontakt mit Kupffer-Zellen (lila).

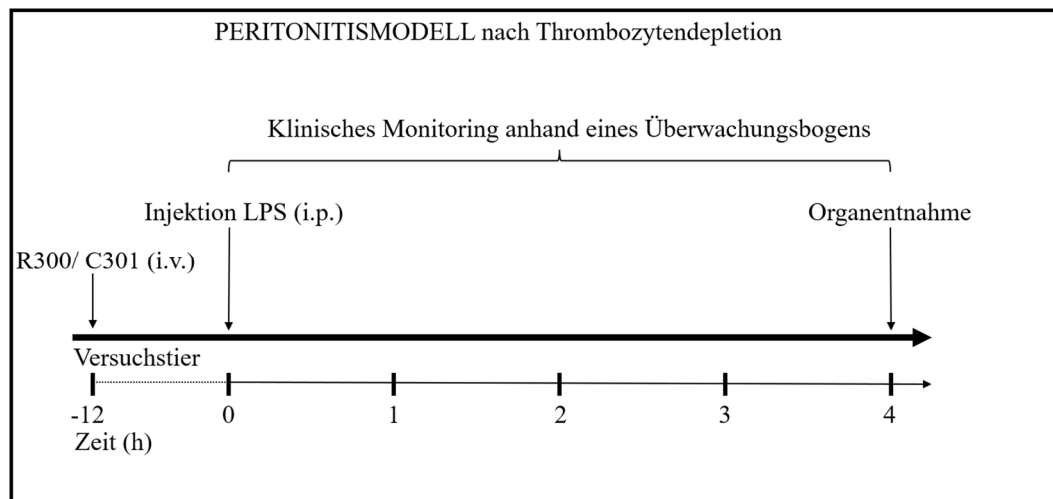


## **2. Auswirkungen einer Thrombozytendepletion in der LPS-induzierten Sepsis**

Nachdem die intraperitoneale Injektion von LPS eine Rekrutierung von sowohl Neutrophilen als auch Thrombozyten in die Leber zur Folge hatte, sollte untersucht werden, inwiefern diese beiden Zellpopulationen sich gegebenenfalls gegenseitig beeinflussen und insbesondere, ob die Thrombozyten an der Rekrutierung der Neutrophilen in die Leber beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden daraufhin die Thrombozyten auf unterschiedliche Weise depletiert: Zunächst wurde eine antikörpervermittelte Depletion durchgeführt, bevor die Thrombozyten in einer weiteren Versuchsreihe durch die Injektion von Diphtherietoxin in eine transgene Knockout-Linie depletiert wurden (siehe auch IV.2.2.).

### **2.1. Eine antikörpervermittelte Depletion von Thrombozyten in der LPS-induzierten sterilen Peritonitis führt zu einer erhöhten klinischen Symptomatik und erhöhter Mortalität**

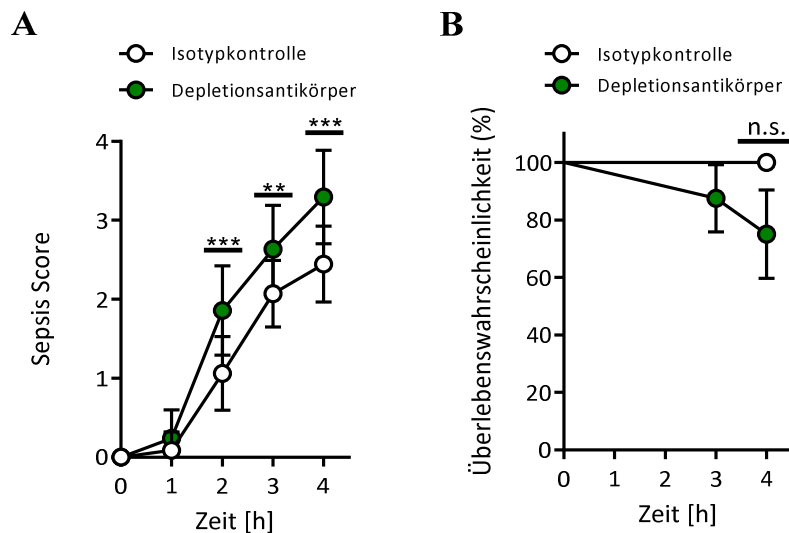
Zur Depletion der Thrombozyten wurde weiblichen, zehn Wochen alten C57BL/6J Tieren jeweils 50 µg eines Depletionsantikörpers (R300) bzw. der Isotypkontrolle (C301) intravenös über einen Schwanzvenenkatheter verabreicht (siehe Abbildung 22). In der verwendeten Dosis von 2 µg/g KG führt die irreversible Bindung an GPIIb/IIIa zur nahezu vollständigen Depletion der Thrombozyten in einem Zeitraum von mindestens 48 Stunden. In den durchgeführten Versuchen wurde der Antikörper jeweils zwölf Stunden vor Induktion der sterilen Peritonitis durch die intraperitoneale Injektion von 1 µg/g KG LPS injiziert, um sich nach den Vorgaben des Herstellers zu orientieren. Nach einem vierstündigen klinischen Monitoring anhand des klinischen Überwachungsbogens erfolgte die Blut- und Organentnahme nach Perfusion wie unter III.6.2. beschrieben.



**Abbildung 22: Flussdiagramm zum Ablauf einer antikörpervermittelten Thrombozytendepletion im Modell der sterilen Peritonitis**

Depletion der Thrombozyten durch i.v. Injektion eines anti-GPIIb/IIIa Antikörpers. Zwölf Stunden später i.p. Injektion von 1 µg/g LPS in C57BL/6J Tiere (n=8), gefolgt von klinischem Monitoring über vier Stunden bis zur Beendigung des Versuchs einschließlich Blut- und Organentnahme.

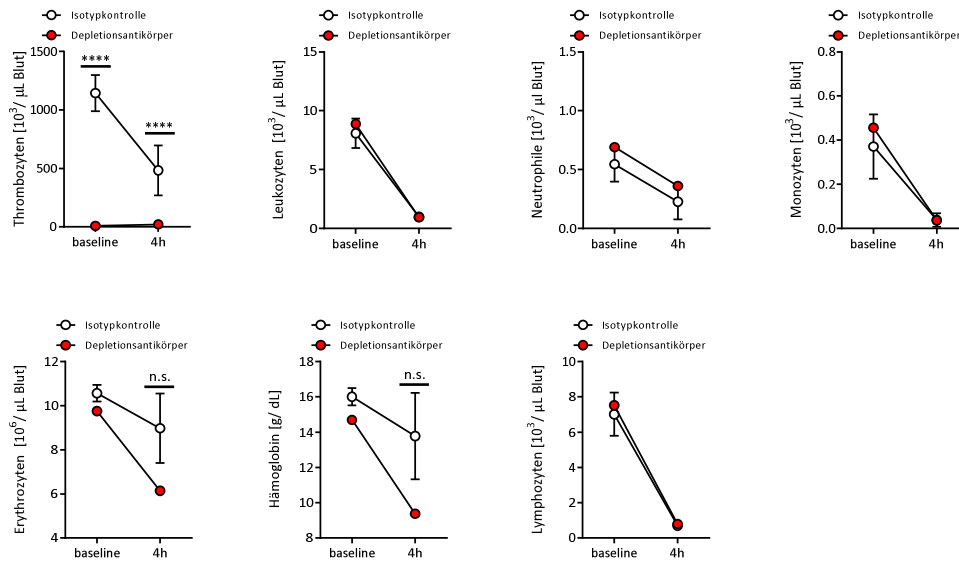
Interessanterweise ergaben sich deutliche Unterschiede in der Ausprägung der klinischen Symptomatik. So zeigten Tiere, die den Depletionsantikörper R300 erhalten hatten, einen schwerwiegenderen Krankheitsverlauf, der sich in einer höheren Gesamtpunktzahl im Sepsis Scores widerspiegelte (siehe Abbildung 23). Bereits nach zwei Stunden post LPS war die Gesamtpunktzahl der depletierten Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ( $p=0,0004$ ), was ebenfalls zu den beiden späteren Zeitpunkten, also nach drei ( $p=0,0056$ ) und vier ( $p=0,0003$ ) Stunden der Fall war. Verglichen mit der alleinigen LPS-Injektion wie unter IV.1.1. beschrieben, erreichten die Kontrolltiere mit 2,45 von maximal vier möglichen Punkten einen ähnlich hohen Gesamtpunktstand, dagegen war dieser bei den depletierten Tieren mit durchschnittlich 3,3 Punkten um 26 % erhöht. Ebenfalls in Abbildung 23 dargestellt, verstarben zwei dieser depletierten Tiere innerhalb des vierstündigen Zeitraums trotz engmaschiger Überwachung, woraus sich ein Trend hin zu einer verminderten Überlebenschance ergab. So lag diese zum Zeitpunkt 3 h bei 87,5 % und sank auf 75 % zum Zeitpunkt 4 h ab, wohingegen die Kontrollgruppe über den gesamten Zeitraum eine Überlebenschance von 100 % aufwies.



**Abbildung 23: Thrombozyten-depletierte Tiere zeigen einen schwerwiegenden klinischen Verlauf sowie eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit**

(A) Darstellung der klinischen Symptomatik mithilfe des Sepsis Scores zum direkten Vergleich zwischen der mit R300 depletierten Gruppe (grün) und der mit C301 injizierten Isotyp-Kontrollgruppe (weiß) innerhalb des vierstündigen Zeitraums. (B) Überlebenswahrscheinlichkeit der jeweiligen Gruppe in Prozent ( $n = 8$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; n.s. nicht signifikant).

Es erfolgte bei allen Tieren eine Blutentnahme von  $100 \mu\text{l}$  aus der *V. facialis* sowohl direkt vor der LPS-Injektion als auch unmittelbar vor der Organentnahme am Ende des vierstündigen Überwachungszeitraums. Diese wurde mithilfe des Blutanalysegeräts analysiert und bestätigte die erfolgreiche Depletion der Thrombozyten in der mit R300 behandelten Gruppe (siehe Abbildung 24), bei der die Thrombozyten fast vollständig fehlten (baseline:  $p = <0,000001$ ; 4 h LPS:  $p = 0,000029$ ). In der Isotyp-Kontrollgruppe fiel die Thrombozytenzahl, ausgehend vom Zeitpunkt vor LPS-Injektion in der Sepsis von zunächst rund  $1144 \times 10^3$  Zellen/ $\mu\text{l}$  Blut auf  $483 \times 10^3$  Zellen/ $\mu\text{l}$  Blut ab, was einer Verminderung von 58 % entspricht (siehe dazu auch Abb. X). Überdies zeigten beide Gruppen einen generellen Abfall von Leukozyten (Isotypkontrolle (K): 88 % vs. Depletionsantikörper (D): 89 %), Erythrozyten (K: 15 % vs. D: 37 %), Hämoglobin (K: 14 % vs. D: 36 %) und Neutrophilen (K: 59 % vs. D: 48 %) zum Zeitpunkt 4 h post LPS im Vergleich zum Ausgangszustand vor Sepsis.



**Abbildung 24: Bestätigung der antikörpervermittelten Depletion von Thrombozyten anhand des Differentialblutbilds**

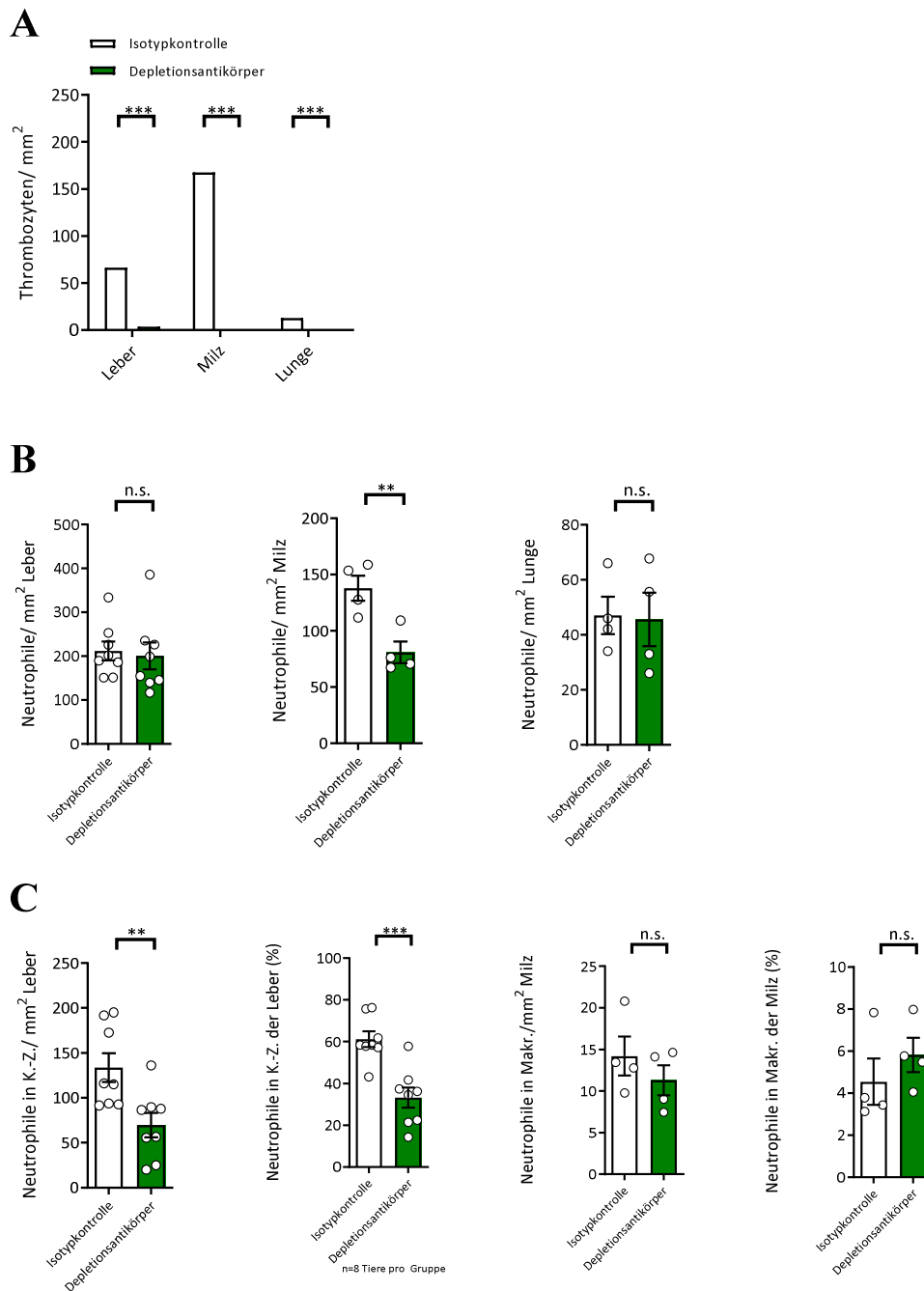
Darstellung der im Blut befindlichen Zellzahlen nach Erstellung eines Differentialblutbilds. Angaben in Zellzahl  $\times 10^3/\mu\text{l Blut}$  (Thrombozyten, Leukozyten, Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten) bzw. Zellzahl  $\times 10^6/\mu\text{l Blut}$  (Erythrozyten) und g/dl (Hämoglobin) ( $n=8$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; n.s. nicht signifikant).

Entsprechend der Ergebnisse des Differentialblutbildes konnte die erfolgreiche Depletion in der histologischen Auswertung bestätigt werden (siehe Abbildung 25): So sank die Zahl der Thrombozyten in der Leber um 94 % ab, in Milz und Lunge waren sie nahezu nicht nachweisbar (Abfall um knapp 100 %).

In Leber und Lunge zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in der Gesamtzahl der Neutrophilen ( $p= 0,7706$  und  $p= 0,9076$ ). Einzig in der Milz sank die Zahl der Neutrophilen von durchschnittlich 138 auf 81 Zellen/ $\text{mm}^2$  ab, was einem signifikanten prozentualen Abfall von 41 % entspricht ( $p= 0,0081$ ). Hervorzuheben ist, dass in der depletierten Gruppe die absolute Zahl der Neutrophilen, die mit Kupffer-Zellen assoziiert war, um 48 % signifikant ( $p= 0,0088$ ) gegenüber der Isotyp-Kontrollgruppe erniedrigt war. Dieser Effekt bestätigte sich auch unter Betrachtung des prozentualen Anteils, bei dem die Anzahl der mit Kupffer-Zellen assoziierten Neutrophilen in Bezug auf die Gesamtzahl der Neutrophilen in der Leber gesetzt wurden. Bei Thrombozyten-depletierten Tieren war dieser Wert, nachfolgend als Efferozytoserate bezeichnet, mit 33 % nur halb so groß verglichen mit der Kontrollgruppe, bei der mit 61 % mehr als die Hälfte der Neutrophilen von

---

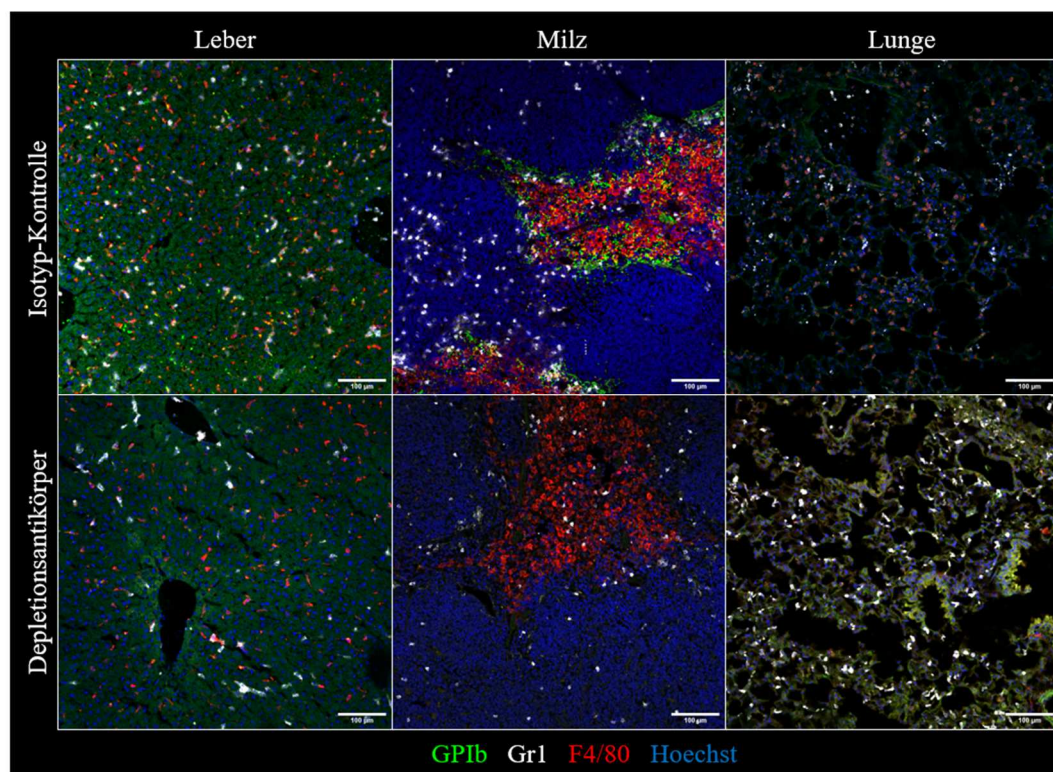
Kupffer-Zellen aufgenommen worden war. Dieser ebenfalls signifikante Unterschied ( $p= 0,0005$ ) konnte lediglich in der Leber, nicht jedoch in der Milz festgestellt werden. Hier ließen die absoluten Zahlen zwar einen Trend zu weniger mit Makrophagen assoziierten Neutrophilen vermuten ( $p= 0,3639$ ), allerdings ergab sich kein Unterschied in der Efferozytoserate nach Thrombozytendepletion ( $p= 0,3879$ ).



**Abbildung 25: Die Depletion von Thrombozyten führt in septischen C57BL/6J Tieren zu einer verminderten Aufnahme neutrophiler Granulozyten in Kupfer-Zellen**

Darstellung der histologischen Analyse von Leber, Milz und Lunge von der mit R300 depletierten Gruppe (grün) und der Isotyp-Kontrollgruppe (C301, weiß) zum Zeitpunkt 4 h nach LPS-Injektion. (A) Anzahl der Thrombozyten pro mm<sup>2</sup> Gewebe. (B) Anzahl der Neutrophilen pro mm<sup>2</sup> Gewebe. (C) Anzahl der mit Kupfer-Zellen (K.-Z.) assoziierten Neutrophilen der Leber bzw. der mit Makrophagen assoziierten Neutrophilen in der Milz sowie der prozentuale Anteil der assoziierten Neutrophilen bezogen auf die Gesamtzahl der Neutrophilen im jeweiligen Gewebe (n = 4 (Milz, Lunge) / 8 (Leber); \*\*\* p ≤ 0,001 \*\* p ≤ 0,01; n.s. nicht signifikant).

Wie in Abbildung 26 dargestellt, zeigte die histologische Aufbereitung Thrombozyten(-ansammlungen) (grün) in jedem der drei Organe der Isotyp-Kontrollgruppe, wohingegen sie in der depletierten Gruppe fast vollständig fehlten. Die Zahl der Neutrophilen (weiß) war in dieser Gruppe lediglich in der Milz sichtbar gegenüber der Kontrollgruppe reduziert. In der Leber war zu erkennen, dass deutlich weniger Neutrophile mit Kupffer-Zellen assoziiert vorlagen.



**Abbildung 26: Repräsentatives Beispiel einer immunhistologischen Färbung von Leber, Milz und Lunge für das fast vollständige Fehlen von Thrombozyten 4 h nach LPS-Injektion**

Anfärbung von Thrombozyten (GPIb), Neutrophilen (Gr1), Makrophagen (F4/80) und Zellkernen (Hoechst)

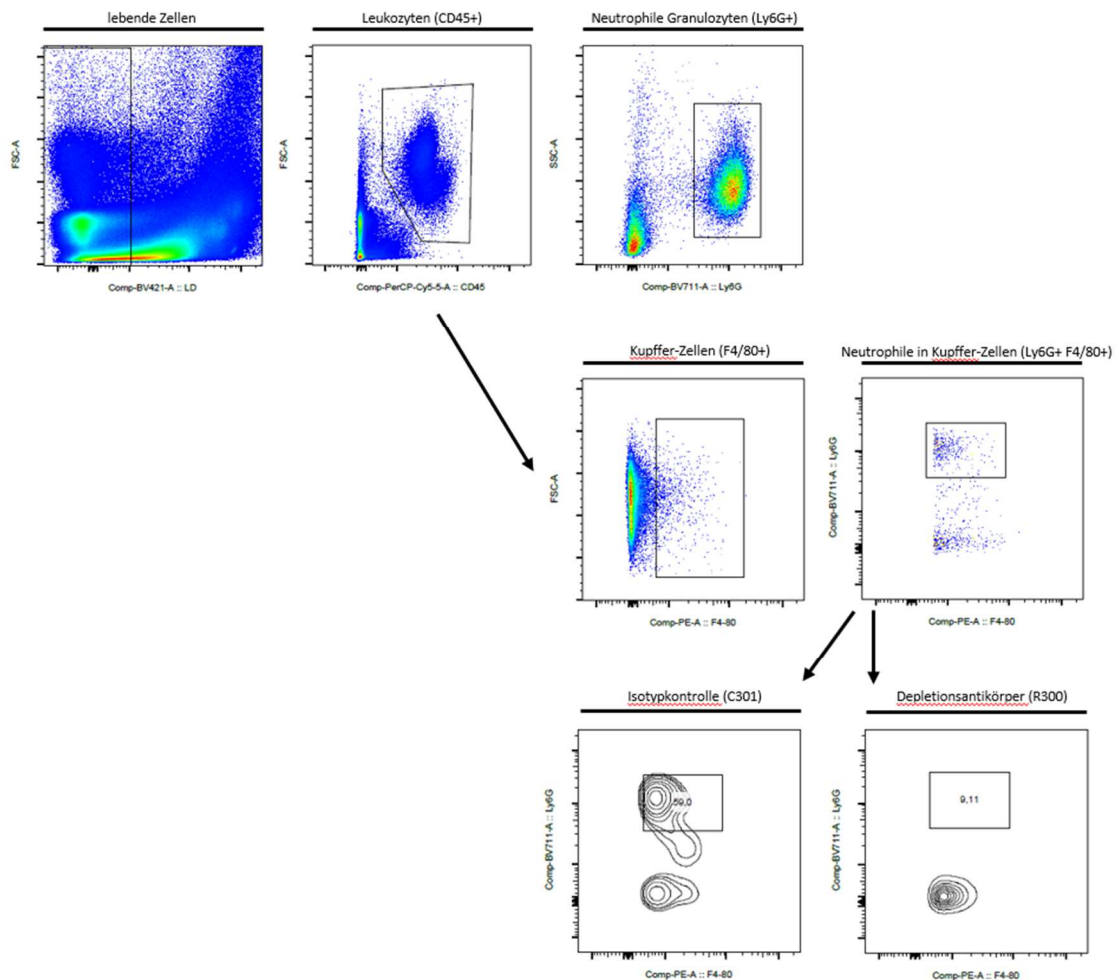
### 2.1.1. Durchflusszytometrische Analyse von Leber und Blut

Um die zuvor dargestellten Ergebnisse der histologischen Analyse über eine verminderte Efferozytose der Neutrophilen in der Leber nach Depletion der Thrombozyten zu bestätigen, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der Leber durchgeführt. Dazu wurde das entnommene Gewebe zunächst mechanisch zerkleinert und anschließend durch enzymatischen Verdau aufgeschlossen, um eine Suspension der aus dem Gewebeverband herausgelösten Zellen zu erhalten. Diese wurden mithilfe fluoreszierender Antikörper gefärbt und daraufhin am FACS-Gerät

analysiert (siehe III.5.3.).

Nachfolgend ist die Gating-Strategie zur Identifikation der einzelnen Zellpopulationen dargestellt (siehe Abbildung 27). Zunächst erfolgte die Differenzierung zwischen lebenden Zellen und Debris mithilfe des *viability dyes* „Sytox Blue“, welcher zur Anfärbung freigewordener DNA-Fragmente dient, die während des Verfalls der Zelle entstehen. Somit konnten tote Zellen, die positiv für den Farbstoff waren, ausgeschlossen werden. Aus allen lebenden Zellen wurden Leukozyten als für den Marker CD45 positiv selektiert. Ausgehend von der CD45+ Population erhielt man sowohl die Neutrophilen als auch die Kupffer-Zellen durch die Selektion auf Ly6G+ Zellen (Neutrophile) bzw. F4/80+ Zellen (Kupffer-Zellen). Ausgehend von der F4/80+ Population wurden Neutrophilen-Kupffer-Zell-Aggregate identifiziert, indem Zellen eingegrenzt wurden, die neben F4/80 auch für Ly6G positiv waren. Zur besseren Veranschaulichung der Populationsgröße wurde in dieser letzten Darstellung statt eines *scatter plots* der sog. *contour plot* gewählt.





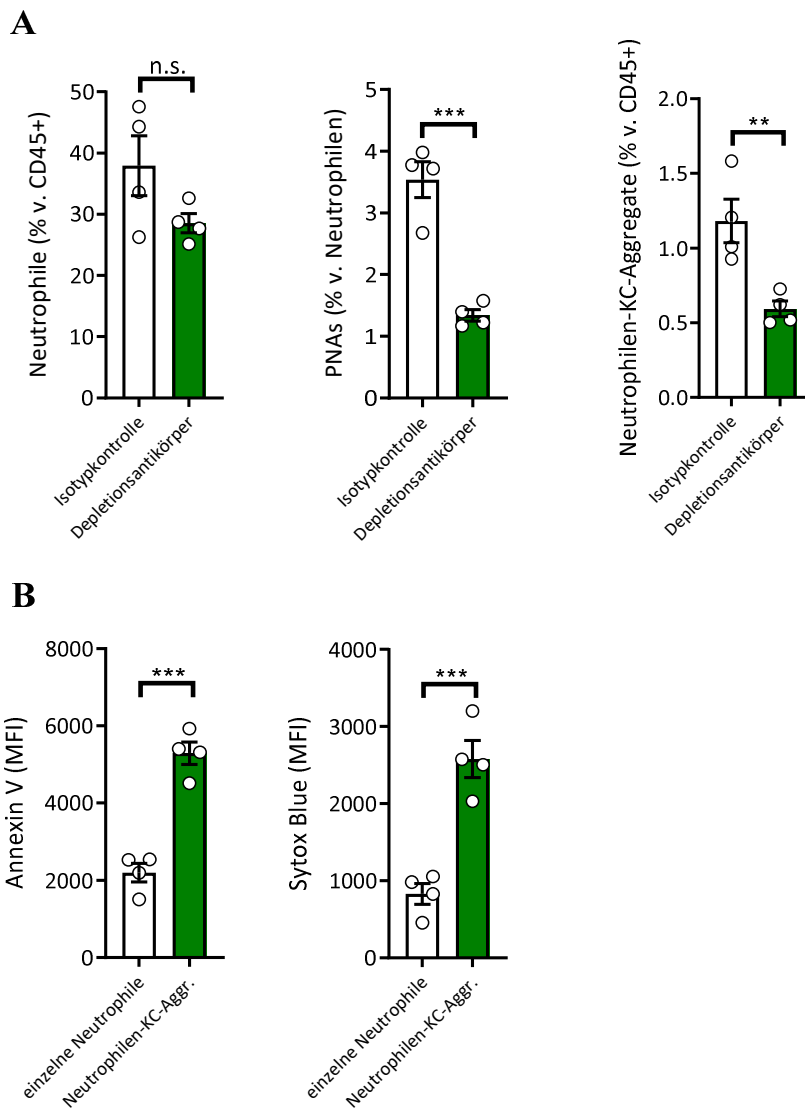
**Abbildung 27: Quantifizierung der von Kupfer-Zellen aufgenommenen Neutrophilen in der Leber mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse**

Darstellung der Gating-Strategie in der Leber. Ausschluss toter Zellen, Identifikation von Leukozyten (CD45+), Neutrophilen (Ly6G+) und Kupfer-Zellen (F4/80+).

Wie in Abbildung 28 dargestellt, verringerte sich die Anzahl der Neutrophilen nach Depletion der Thrombozyten um 25 % ( $p=0,1177$ ). In der depletierten Gruppe fanden sich signifikant ( $p=0,0004$ ) weniger Aggregate aus Neutrophilen und Thrombozyten (PNAs), was einem Abfall von 62 % entspricht und auf das Fehlen der Thrombozyten zurückzuführen ist. Hervorzuheben ist, dass der zuvor in der Histologie beobachtete Effekt einer verminderten Efferozytose von Neutrophilen nach Depletion der Thrombozyten auch in der durchflusszytometrischen Analyse der Leber bestätigt werden konnte: Die Zahl der Neutrophilen-Kupfer-Zell-Aggregate sank in Abwesenheit der Thrombozyten in diesem Fall sogar um knapp 50 % signifikant ab ( $p=0,0090$ ).

---

Verglichen mit einzeln vorliegenden Neutrophilen zeigten solche, die als Aggregate mit Kupffer-Zellen vorlagen, eine mehr als doppelt so hohe Expression von Annexin V ( $p= 0,0002$ ). Dieses kann zur Detektion apoptotischer Zellen genutzt werden, indem es an das auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen exprimierte Phosphatidylserin bindet. Darüber hinaus wurden deutlich mehr Neutrophile, die von Kupffer-Zellen aufgenommen worden waren, mit dem DNA-Farbstoff „Sytox Blue“ angefärbt, was erst beim Absterben der Zelle und Freiwerden von DNA möglich wird. Hier verdreifachte sich der MFI im Vergleich zu dem der einzeln vorliegenden Neutrophilen ( $p= 0,0007$ ). Zusammengenommen lassen diese Daten darauf schließen, dass die Neutrophilen im Rahmen der Efferozytose durch die Kupffer-Zellen zunächst apoptotisch werden, um im Anschluss von diesen abgebaut zu werden.



**Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analysen der Leber bestätigen die verringerte Assoziation von Neutrophilen und Kupffer-Zellen in Thrombozyten-depletierten Tieren**

Säulendiagramme der durchflusszytometrischen Analyse der Leber von Thrombozyten-depletierten Tieren (grün) und Kontrolltieren (weiß). (A) Ermittlung von Neutrophilen, PNAs und Neutrophilen-Kupffer-Zellen-Aggregaten. (B) Expression von Neutrophilen bzw. von Neutrophilen-Kupffer-Zell-Aggregaten hinsichtlich eines Apoptosemarkers/ *viability dyes* (n=4; \*\*\*  $p \leq 0,001$  \*\*  $p \leq 0,01$ ; n.s. nicht signifikant).

Neben der Leber wurde auch Vollblut zur durchflusszytometrischen Analyse aufbereitet (siehe hierzu auch III.5.4.). Das mit EDTA versetzte, aus der *V. facialis* entnommene Blut wurde dazu mit dem entsprechenden Antikörper-Mastermix für 20 Minuten inkubiert mit anschließender Erythrozytenlyse, bevor die Proben am FACS-Gerät analysiert wurden.

Wie bereits im Differentialblutbild dargestellt, ergaben sich keine Unterschiede in der Anzahl der im Blut zirkulierenden Neutrophilen ( $p= 0,7288$ ). Die erfolgreiche Depletion der Thrombozyten konnte insofern bestätigt werden, dass es zu einem signifikanten Abfall der PNAs von 73 % auf rund 7 % kam ( $p= <0,0001$ ).

Zur Charakterisierung des Funktionszustands der Neutrophilen wurden diese auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker hin untersucht, um herauszufinden, ob die Neutrophilen infolge der Depletion der Thrombozyten ein verändertes Expressionsprofil in der LPS-induzierten Sepsis aufweisen (siehe Abbildung 29).

CD44 auf Neutrophilen, welches über die Bindung an Hyaluron die Adhäsion vermittelt, zeigte keine Veränderung ( $p= 0,5287$ ), ebenso CXCR-4 ( $p= 0,5605$ ), welches auf gealterten Neutrophilen exprimiert wird [78]. Die Expression von L-Selectin (CD62L), die sich nach Gabe von LPS vermindert, schien durch die Depletion nicht signifikant beeinflusst zu werden ( $p= 0,2213$ ).

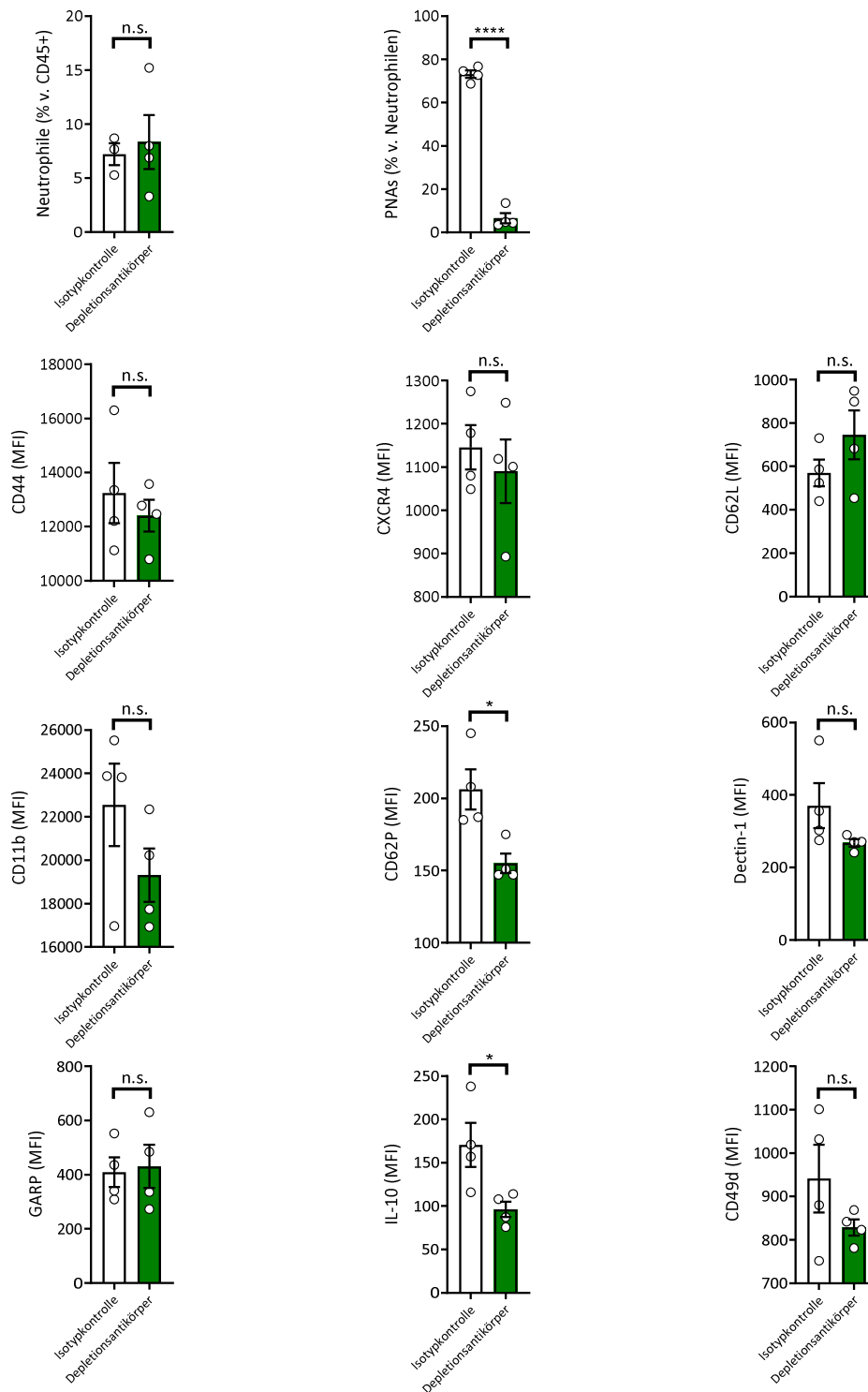
CD11b ( $\alpha$ -Integrin) bildet mit CD18 ( $\beta$ 2-Integrin) einen Komplex, über den die kriechende Fortbewegung auf dem Endothel mediiert wird [194]. Nach LPS Gabe wird die CD11b Expression auf Neutrophilen hochreguliert [194] und schien im Vergleich zur Isotyp-Kontrollgruppe in der depletierten Gruppe geringfügig vermindert zu sein ( $p= 0,2031$ ). Bei P-Selectin (CD62P) reduzierte sich die Expression in thrombozytopenen Tieren signifikant um 25 % ( $p= 0,0161$ ). Dectin-1 (Clec-7), der als nicht-TLR zu den PRRs zählt und v.a. an der Erkennung von Pilzerregern beteiligt ist [195], zeigte einen unwesentlich niedrigeren MFI ( $p= 0,1534$ ).

GARP (LRRC32, *leucine-rich repeat containing 32*) mediiert die Umwandlung von TGF- $\beta$  (*transforming-growth-factor- $\beta$* ) in dessen aktive Form und wurde in Versuchen nach niedrigen Dosierungen von LPS herunterreguliert [196]. In dem vorliegenden Experiment zeigte sich kein Unterschied des MFI, wenn Thrombozyten depletiert waren ( $p= 0,8333$ ). IL-10 (*interleukin 10*) wird auch *cytokine synthesis inhibitory factor* genannt [197] und wirkt auf Neutrophile antiinflammatorisch, indem es die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine, darunter TNF- $\alpha$ , IL-8 und IL-1 $\beta$  hemmt [198]. Eine Depletion von Thrombozyten bewirkte eine signifikante Erniedrigung des gemessenen IL-10 um 43 % ( $p= 0,0328$ ). CD49d, das mit CD29 das Integrin VLA-4, *very-late-antigen-4*)

---

bildet, vermittelt die Adhäsion von Leukozyten am Endothel über (*vascular cell-adhesion molecule 1* (VCAM-1) [88] und zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p= 0,2109$ ).

Insgesamt kam es bei der Mehrheit der untersuchten Oberflächenmarker zu einer verringerten Expression, die sich bezüglich P-Selectin und IL-10 sogar signifikant von der Isotyp-Kontrollgruppe unterschied.



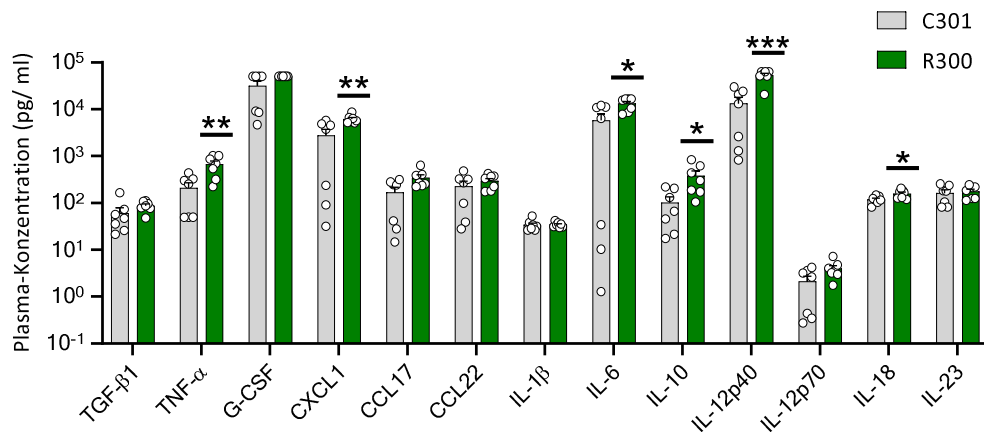
**Abbildung 29: Durchflusszytometrische Charakterisierung von peripheren Blut-Neutrophilen bei Thrombozytendepletion zeigt eine Herunterregulation neutrophiler Oberflächenmarker**

Säulendiagramme der *mean fluorescence intensity* (MFI) im Blut zirkulierender Neutrophiler Granulozyten von Kontroll- (weiß) oder Thrombozyten-depletierten Tieren (grün) (n=4; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  \*  $p \leq 0,05$ ; n.s. nicht signifikant).

### 2.1.2. LEGENDplex Assay mit Thrombozyten-depletiertem Plasma

Wie unter IV.2.1. sowie IV.2.3. dargestellt, zeigten Tiere, die mithilfe von R300 depletiert worden waren, ein schlechteres klinisches Outcome, assoziiert mit einer erhöhten Mortalität. Um herauszufinden, ob sich das Fehlen von Thrombozyten und die daraus resultierende verringerte Efferozytose auf die Zytokinproduktion von Makrophagen auswirken, wurde septisches Plasma von depletierten Tieren isoliert und daran ein LEGENDplex-Assay durchgeführt, anhand dessen sich 13 verschiedene von Makrophagen stammende Zytokine qualitativ und quantitativ mittels Durchflusszytometrie bestimmen ließen (zum genauen Ablauf siehe III.5.6.). Der Versuchsaufbau entsprach dem Ablauf wie unter IV.2.1. beschrieben: Zwölf Stunden vor intraperitonealer LPS-Injektion erhielten zehn Wochen alte, weibliche C57BL/6J Tiere jeweils 50 µg des Depletionsantikörpers R300 bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle C301, gelöst in 150 µl isotoner Kochsalzlösung intravenös über einen Schwanzvenenkatheter verabreicht. Nach intraperitonealer Injektion mit 1 µg/g LPS wurden die Tiere mithilfe des klinischen Überwachungsbogens beobachtet und nach Ablauf des vierstündigen Zeitraums in tiefe MMF-Narkose versetzt, um 1 ml Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus zu entnehmen (siehe auch III.3.2.2.). Die Tiere wurden direkt im Anschluss ohne Wiedererwachen durch zervikale Dislokation getötet und das mit ACD als Antikoagulanzen versetzte Blut zentrifugiert, um das Plasma zu isolieren. Bis zur Durchführung des LEGENDplex-Assays wurde es dann bei -80 °C gelagert.

Die Auswertung mithilfe der speziell für LEGENDplex entwickelten Analyse-Software ergab Unterschiede in der Zytokinkonzentration im Plasma thrombozytopener Tiere unter dem Einfluss von LPS verglichen mit der Isotypkontrolle. Signifikant erhöht waren in der mit R300 injizierten Gruppe TNFα (p= 0,005), CXCL-1 (p= 0,008), IL-6 (p= 0,02), IL-10 (p= 0,02), IL-12p40 (p= <0,001) sowie IL-18 (p= 0,02), die u.a. von Makrophagen produziert werden [199-203] und hauptsächlich als proinflammatorische Zytokine gelten. Alle Messungen erfolgten in doppelter Ausführung; die gemessenen Konzentrationen wurden in Abbildung 30 als dekadischer Logarithmus ( $\log_{10}$ ) dargestellt.



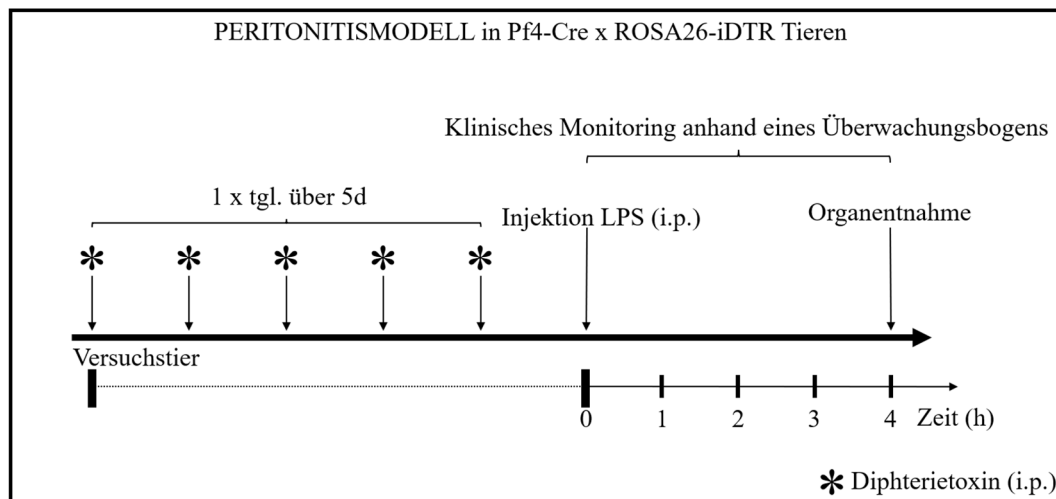
**Abbildung 30: Im septischen Plasma Thrombozyten-depletierter Tiere ist die Konzentration proinflammatorischer Zytokine erhöht**

Säulendiagramm der im Plasma gemessenen Zytokine (pg/ ml) von depletierten (R300, grün) und Isotyp-Kontrolltieren (C301, weiß) (n=4; \*\* p ≤ 0,01; \* p ≤ 0,05).

## 2.2. LPS-induzierte sterile Peritonitis nach Thrombozytendepletion in Pf4-Cre x ROSA26-iDTR Tieren

Um sicherzustellen, dass die verminderte Efferozytose der Neutrophilen in Abwesenheit der Thrombozyten nicht auf einen Nebeneffekt des verwendeten Antikörpers zurückzuführen war, wurde eine weitere Methode der Thrombozytendepletion angewandt. Durch Verwendung von Tieren der Mauslinie Pf4-Cre x ROSA26-iDTR können Thrombozyten selektiv durch die wiederholte Injektion von Diphterietoxin abladiert werden. Diese Tiere exprimieren, induziert durch die Cre-Rekombinase, einen Diphterietoxinrezeptor auf Pf4 exprimierenden Zellen, der sie empfänglich für die Bindung des Toxins macht und zum Absterben der Zellen führt (siehe dazu auch III.3.5.2.). Wie in Abbildung 31 veranschaulicht, wurde zehn Wochen alten, weiblichen Pf4-Cre x ROSA26-iDTR Tieren an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 10 ng/g KG Diphterietoxin, gelöst in 150 µl isotoner Kochsalz-Lösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen), intraperitoneal verabreicht. Der Versuch zur Induktion einer sterilen Peritonitis fand am darauffolgenden 6. Tag statt (analog zum Versuchsaufbau wie unter IV.2.1. beschrieben).

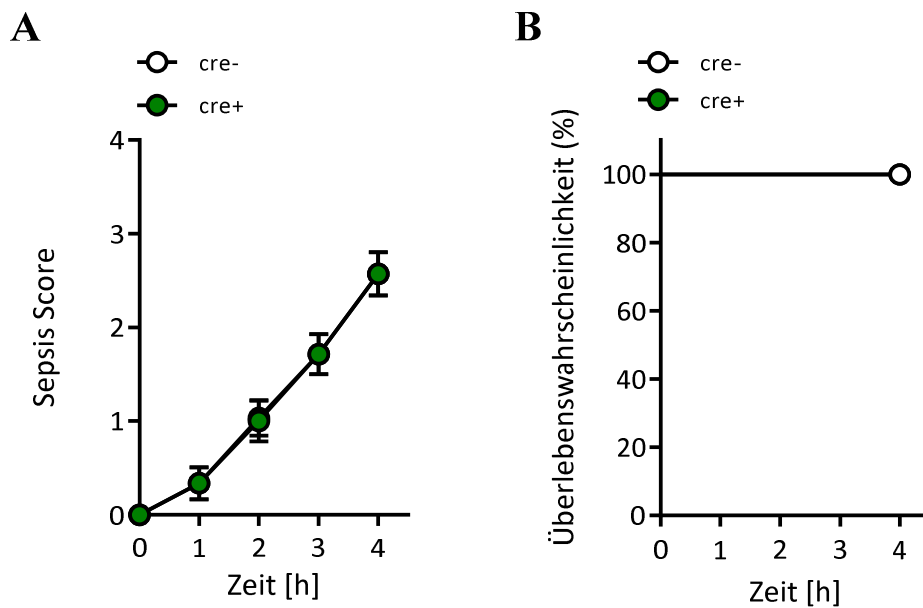




**Abbildung 31: Flussdiagramm zum Ablauf einer Diphtherietoxin-vermittelten Thrombozytendepletion**

Depletion der Thrombozyten durch fünfmalige i.p. Injektion von 10 ng/g KG Diphtherietoxin (n=4) und anschließende i.p. LPS-Injektion, gefolgt von klinischem Monitoring über vier Stunden bis zur Beendigung des Versuchs einschließlich Blut- und Organentnahme.

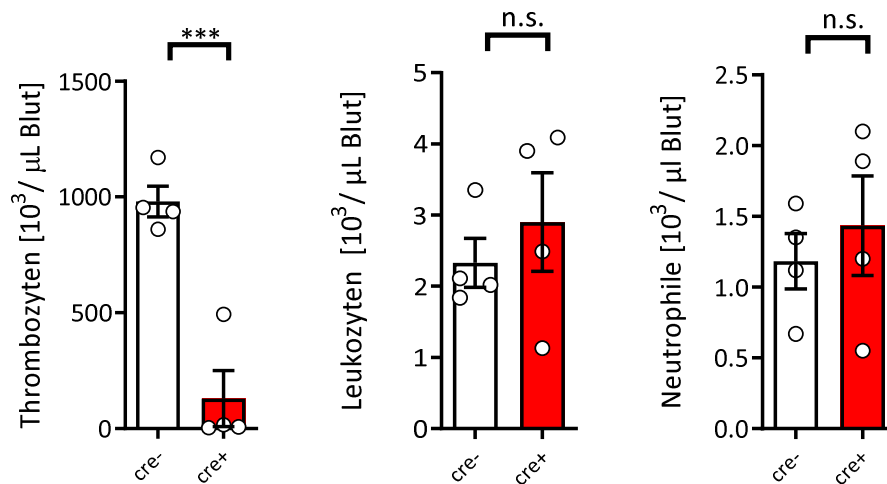
Gegensätzlich zur antikörpervermittelten Depletion der Thrombozyten unter IV.2.1. zeigten Cre+ Tiere, deren Thrombozyten für die Depletion durch Diphtherietoxin empfänglich sind, keinen schwerwiegenderen Krankheitsverlauf (siehe Abbildung 32). Vier Stunden nach LPS-Injektion hatten sowohl die Thrombozyten-depletierten Tiere (Cre+), als auch die Kontrolltiere (Cre-) einen Gesamtpunktestand von 2,57 von maximal vier möglichen Punkten im Sepsis Score, der anhand des klinischen Überwachungsbogens ermittelt wurde. Auch die zuvor aufgetretene erhöhte Mortalität konnte in diesem Modell nicht reproduziert werden. Da keines der Tiere verstarb, ergab sich bei beiden Gruppen eine Überlebenschance von 100 %.



**Abbildung 32:** Nach der genetischen Depletion von Thrombozyten in Pf4-Cre x ROSA26-iDTR zeigen sich keine Unterschiede hinsichtlich des Schweregrads der induzierten Sepsis

(A) Darstellung der anhand des klinischen Überwachungsbogens erfassten Symptome mithilfe des Sepsis Scores zum direkten Vergleich zwischen Cre+ (grün) und Cre- (weiß) innerhalb des vierstündigen Zeitraums. (B) Überlebenswahrscheinlichkeit der jeweiligen Gruppe in Prozent (n=4).

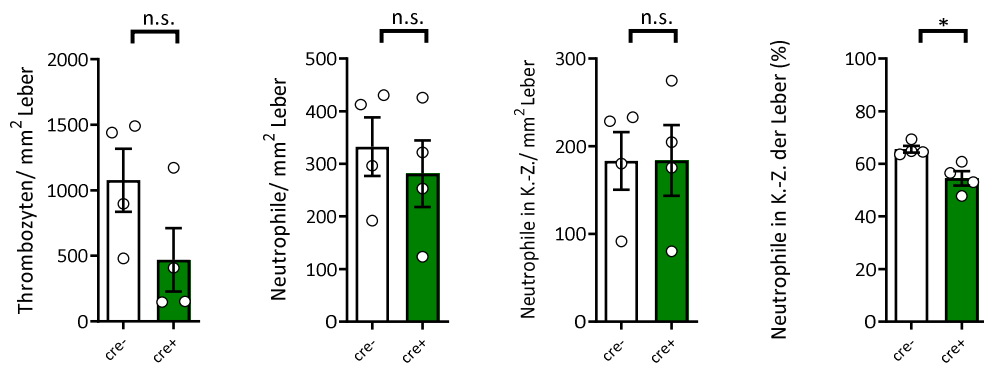
Die erfolgreiche Depletion konnte anhand des signifikanten Abfalls ( $p=0,0008$ ) um 87 % von im Blut zirkulierenden Thrombozyten in Cre+ Tieren gegenüber Cre- Tieren bestätigt werden. Allerdings war die Anzahl der verbliebenen Thrombozyten verglichen mit der durch R300 depletierten Gruppe, bei der die Zellen fast vollständig fehlten, erhöht. Hinsichtlich der Anzahl der Leukozyten ( $p=0,4861$ ) und Neutrophilen ( $p=0,5540$ ) konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.



**Abbildung 33: Bestätigung der antikörpervermittelten Depletion von Thrombozyten anhand des Differentialblutbilds**

Darstellung der im Blut befindlichen Zellzahlen nach Erstellung eines Differentialblutbilds. Angaben in Zellzahl  $\times 10^3/\mu\text{l}$ ; Messung vier Stunden nach LPS-Injektion ( $n=4$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; n.s. nicht signifikant).

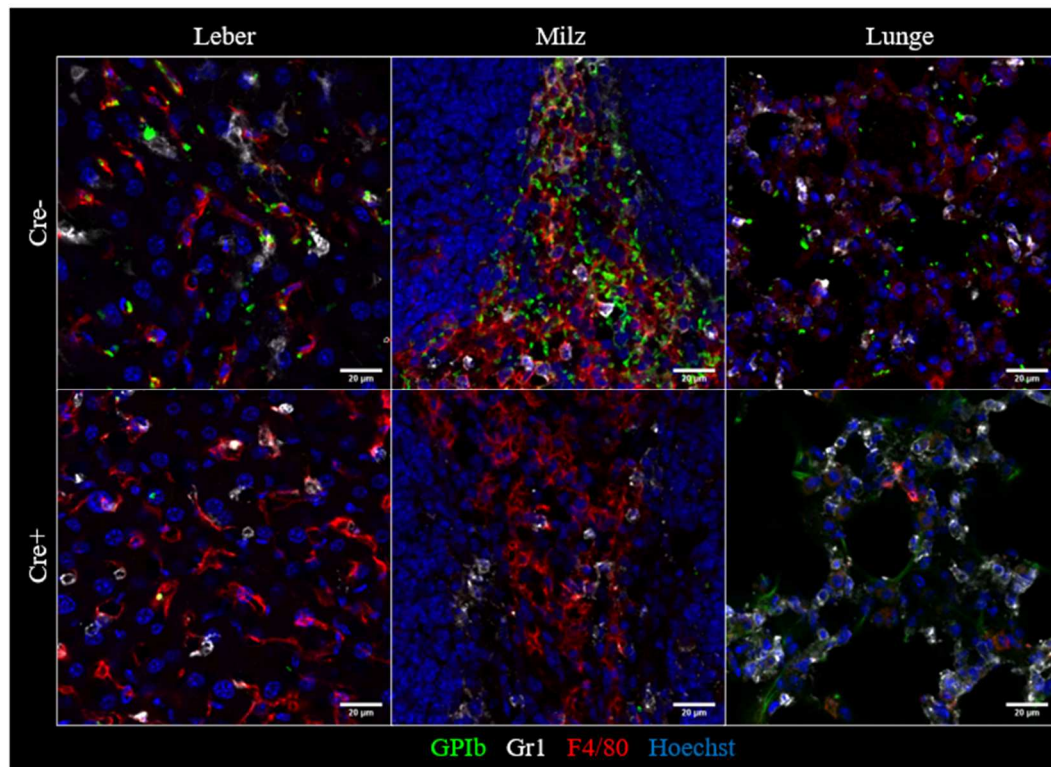
Die histologische Auswertung ergab, dass sich die Zahl der Thrombozyten in der Cre+ Gruppe zwar um 56 % verringerte ( $p= 0,1251$ ), jedoch weiterhin vereinzelt Thrombozyten im Gewebe vorzufinden waren. Im Vergleich zu den mithilfe von R300 depletierten Tieren, bei denen durchschnittlich nur noch ca. vier Thrombozyten/ $\text{mm}^2$  Leber nachweisbar waren (siehe Abbildung 25), lag die Anzahl in der Cre+ Gruppe noch bei rund 471 Thrombozyten/ $\text{mm}^2$ . Es wurden keine Unterschiede bezüglich der Neutrophilenanzahl in der Leber festgestellt ( $p= 0,5624$ ). Die absolute Anzahl der mit Kupffer-Zellen assoziierten Neutrophilen war im Gegensatz zu den Ergebnissen unter IV.2.1.1. nicht vermindert ( $p= 0,9931$ ). Allerdings reduzierte sich, wie auch bei den mithilfe von R300 depletierten Tieren, der prozentuale Anteil der mit Kupffer-Zellen assoziierten Neutrophilen um 17 % signifikant gegenüber der Cre- Kontrollgruppe ( $p= 0,0109$ ). Somit konnte der Effekt einer reduzierten Efferozytoserate nach Thrombozytendepletion erfolgreich im genetischen Modell reproduziert werden, was darauf hindeutet, dass es sich bei diesem Phänomen nicht um einen Nebeneffekt des Antikörpers handelt.



**Abbildung 34: Die Depletion von Thrombozyten führt in septischen Pf4-Cre x ROSA26-iDTR Tieren zu einer verminderten Aufnahme neutrophiler Granulozyten in Kupfer-Zellen**

Darstellung der histologischen Analyse der Leber in Cre+ (grün) und Cre- Tieren (weiß) zum Zeitpunkt 4h nach LPS-Injektion (n=4; \*  $p \leq 0,05$ ; n.s. nicht signifikant).

Im Gewebe von Cre- Kontrolltieren fanden sich, wie in Abbildung 35 dargestellt, Thrombozyten (-ansammlungen) (grün) in jedem der drei Organe, wohingegen sich die Anzahl der Thrombozyten in Cre+ Tieren deutlich reduzierte. Die Zahl der Neutrophilen (weiß) war in der Leber nur geringfügig vermindert, allerdings lagen weniger Neutrophile, die mit Kupfer-Zellen assoziiert waren, vor.

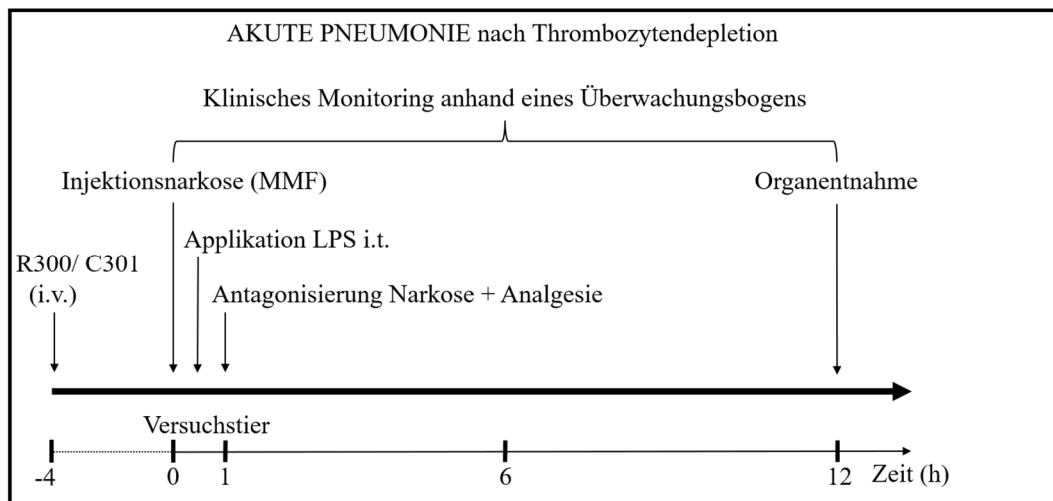


**Abbildung 35: Repräsentatives Beispiel einer immunhistologischen Färbung von Leber, Milz und Lunge zur Bestätigung des Fehlens von Thrombozyten in Cre+ Pf4-Cre x ROSA26-iDTR Tieren 4 h nach LPS-Injektion**

Anfärbung von Thrombozyten (GPIb), Neutrophilen (Gr1), Makrophagen (F4/80) und Zellkernen (Hoechst)

### **2.3. LPS-induzierte sterile Pneumonie (ALI, *Acute Lung Injury*) nach Thrombozytendepletion in C57BL/6J Tieren**

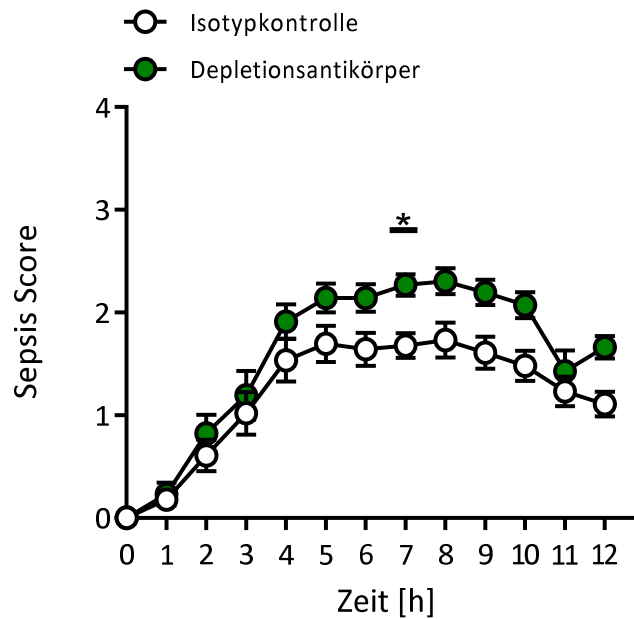
Nachdem bis zu diesem Zeitpunkt lediglich das Modell einer sterilen Peritonitis herangezogen worden war, sollte untersucht werden, inwiefern die Depletion von Thrombozyten bei lokal begrenzter Inflammation ähnliche Auswirkungen zeigte. Hierfür wurde ein Modell einer akuten, LPS-induzierten Pneumonie herangezogen. Zur Depletion wurde zehn Wochen alten weiblichen, C57BL/6J Tieren vier Stunden vor LPS-Gabe jeweils 50 µg eines Depletionsantikörpers (R300) bzw. der Isotypkontrolle (C301) intravenös verabreicht (siehe Abbildung 36). 15 µg LPS wurden unter MMF-Narkose intranasal appliziert, die Anästhesie anschließend antagonisiert und die Tiere über einen Zeitraum von zwölf Stunden klinisch unter Zuhilfenahme des Überwachungsbogens überwacht. Es erfolgte eine Blutentnahme aus der *V. facialis* vor der Tötung durch zervikale Dislokation, anschließender Perfusion und Organentnahme.



**Abbildung 36: Flussdiagramm des Ablaufs einer durch LPS-induzierten akuten Pneumonie nach antikörpervermittelter Thrombozytendepletion**

Depletion der Thrombozyten zwölf Stunden vor intraperitonealer LPS-Injektion durch i.v. Injektion eines anti-GPIIb/IIIa Antikörpers. Induktion einer Sepsis durch i.n. Applikation von 1 µg/g LPS in C57BL/6J Tiere (n= 8), gefolgt von klinischem Monitoring über zwölf Stunden bis zur Beendigung des Versuchs einschließlich Blut- und Organentnahme.

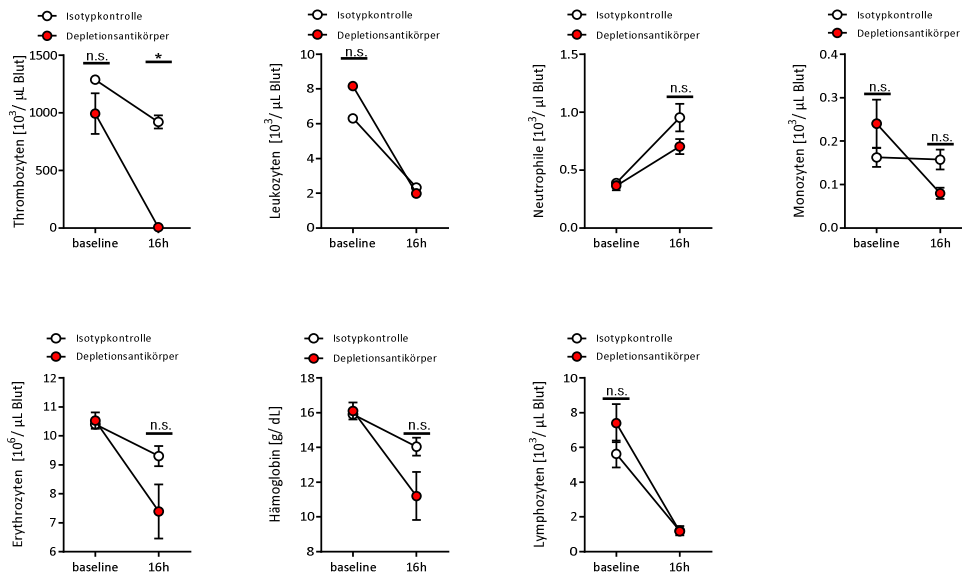
Tiere, denen der Depletionsantikörper R300 verabreicht worden war, zeigten ebenso wie im Modell der sterilen Peritonitis (siehe IV.2.1.) eine durchweg schwerere klinische Symptomatik, die sich in einem höheren Gesamtpunktestand des Sepsis Score widerspiegelt. Dieser unterschied sich zum Zeitpunkt von sieben Stunden nach LPS-Injektion sogar signifikant ( $p= 0,0031$ ) um 0,59 Punkte. Beide Gruppen erreichten den maximalen Wert nach acht Stunden von durchschnittlich 2,30 (R300) bzw. 1,73 (C301) von insgesamt vier möglichen Punkten. Danach war eine stündliche Verbesserung des klinischen Zustands wahrzunehmen, bis der Gesamtpunktestand zum Zeitpunkt der Organentnahme nur noch bei durchschnittlich 1,66 (R300) bzw. 1,11 (C301) Punkten lag.



**Abbildung 37: Thrombozyten-depletierte Tiere zeigen einen schwerwiegenderen klinischen Verlauf in der akuten Pneumonie**

Darstellung des Sepsis Scores zum direkten Vergleich zwischen der mit R300 depletierten Gruppe (grün) und der mit C301 injizierten Isotyp-Kontrollgruppe (weiß) innerhalb des zwölfstündigen Zeitraums (n= 4; \* p ≤ 0,05)

Die Ergebnisse des Differentialblutbildes lassen, was die Veränderungen der Zellzahlen angeht, Parallelen zur sterilen Peritonitis erkennen. Auch in diesem Modell ließ sich die Depletion durch den Abfall der zirkulierenden Thrombozyten um knapp 100 % von vorher  $994 \times 10^3/\mu\text{l}$  auf nur noch rund  $5 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut bestätigen. Ein gegenteiliger Effekt war nur in der Anzahl der Neutrophilen zu sehen, die in beiden Gruppen während der akuten Pneumonie um das knapp 2,5fache (C301) bzw. 1,9fache (R300) anstieg, während es, wie unter IV.2.1. dargestellt, in der sterilen Peritonitis zu einem Abfall der Neutrophilen um 59 % (C301) bzw. 48 % (R300) kam.



**Abbildung 38: Bestätigung der antikörpervermittelten Depletion von Thrombozyten anhand des Differentialblutbilds**

Darstellung der im Blut befindlichen Zellzahlen nach Erstellung eines Differentialblutbilds. Angaben in Zellzahl  $\times 10^3/\mu\text{l Blut}$  (Thrombozyten, Leukozyten, Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten) bzw. Zellzahl  $\times 10^6/\mu\text{l Blut}$  (Erythrozyten) und g/dl (Hämoglobin) (n=4; \*  $p \leq 0,05$ ; n.s. nicht signifikant).

Die histologische Auswertung bestätigte die erfolgreiche Depletion der Thrombozyten sowohl in der Leber als auch in Milz und Lunge (siehe Abbildung 39). Dabei verringerte sich die Zahl der im Gewebe vorliegenden Thrombozyten in der Leber um 90 % ( $p= 0,0951$ ), in der Milz um 99 % ( $p= 0,0019$ ) und in der Lunge sogar um 99,7 % ( $p= 0,0134$ ).

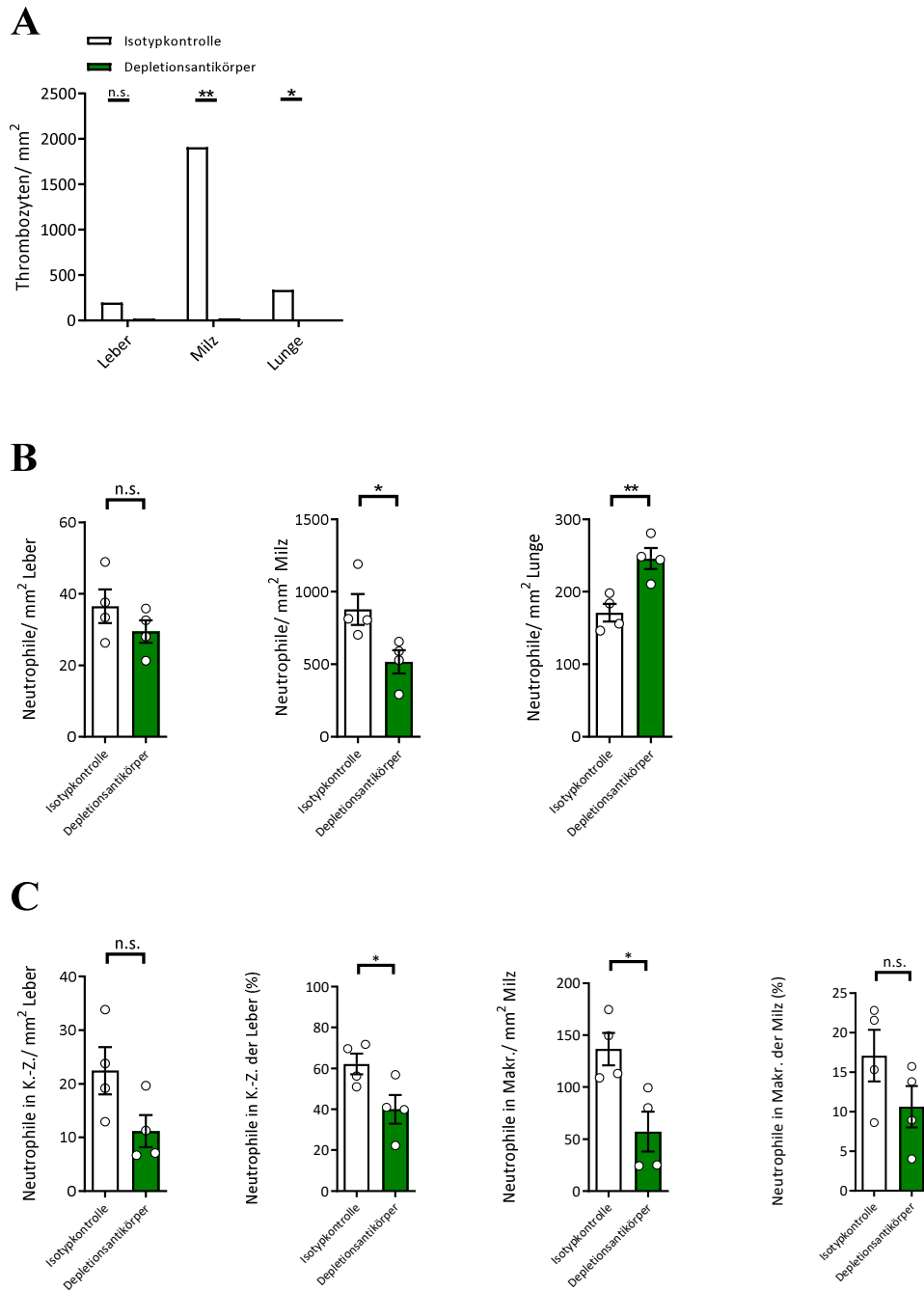
Die Anzahl der Neutrophilen war in der Interventionsgruppe in der Leber leicht ( $p= 0,2581$ ), in der Milz mit einem Abfall von 41 % sogar signifikant erniedrigt ( $p= 0,0349$ ), was mit den Ergebnissen der sterilen Peritonitis unter IV.1.2. übereinstimmt. In der Lunge dagegen stieg die Zahl der ins Gewebe eingewanderten Neutrophilen im Vergleich zur sterilen Peritonitis in der Isotyp-Kontrollgruppe um das 3,6 fache und sogar um das 5,4fache in der Thrombozyten-depletierten Gruppe an. Auch der direkte Vergleich zwischen der depletierten Gruppe und der Isotyp-Kontrollgruppe in der akuten Pneumonie zeigte, dass die Anzahl der in der Lunge befindlichen Neutrophilen von durchschnittlich 171 Zellen/ $\text{mm}^2$  auf 246 Zellen/ $\text{mm}^2$  in der depletierten Gruppe anstieg, was einer



Erhöhung von 44 % ( $p= 0,0071$ ) entspricht.

In der Leber ließ sich der Effekt einer verringerten Efferozytose der Neutrophilen in der Thrombozyten-depletierten Gruppe reproduzieren, was nicht nur die absolute Anzahl der mit Kupffer-Zellen assoziierten Neutrophilen ( $p= 0,0786$ ), sondern auch den prozentualen Anteil ebendieser betraf. Die Efferozytoserate verringerte sich mit einem Abfall von 22 % signifikant ( $p= 0,0432$ ). In der Milz kam es zwar ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung der absoluten Zahl der mit Makrophagen assoziierten Neutrophilen ( $p= 0,0184$ ), allerdings relativierte sich dieser Effekt bezogen auf die Efferozytoserate ( $p= 0,1741$ ), wohingegen in der depletierten Gruppe lediglich ein Trend zu weniger Efferozytose zu sehen war.

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Efferozytoserate, definiert als die Anzahl der von Kupffer-Zellen aufgenommenen Neutrophilen bezogen auf die Gesamtzahl der Neutrophilen, in der Leber sowohl im Modell einer sterilen Peritonitis als auch in dem einer akuten Pneumonie nach Depletion der Thrombozyten verringert war. Das konnte nicht nur durch die antikörpervermittelte Depletion, sondern auch im genetischen Ablationsmodell (siehe IV.2.2.) bestätigt werden und somit auf eine Funktion der Thrombozyten bei der Efferozytose der Neutrophilen in der Leber hindeuten. In Abwesenheit von Thrombozyten würden Neutrophile, statt durch die Kupffer-Zellen abgebaut zu werden, weiter in der Zirkulation verbleiben. Ob ein kausaler Zusammenhang zwischen der verringerten Efferozytose der Neutrophilen in der LPS-induzierten Sepsis mit dem sowohl in der sterilen Peritonitis als auch in der akuten Pneumonie auftretenden, schwerwiegenderen Krankheitsverlauf besteht, sollte im nachfolgenden Versuch genauer betrachtet werden.



**Abbildung 39: Die Depletion von Thrombozyten führt im Modell einer akuten Pneumonie in C57BL/6J Tieren zu einer verminderten Aufnahme neutrophiler Granulozyten in Kupffer-Zellen**

Darstellung der histologischen Analyse von Leber, Milz und Lunge von der mit R300 depletierten Gruppe (grün) und der Isotyp-Kontrollgruppe (C301, weiß) zum Zeitpunkt 4 h nach LPS-Injektion. (A) Anzahl der Thrombozyten pro mm<sup>2</sup> Gewebe. (B) Anzahl der Neutrophilen pro mm<sup>2</sup> Gewebe. (C) Anzahl der mit Kupffer-Zellen (K.-Z.) assoziierten Neutrophilen der Leber bzw. der mit Makrophagen assoziierten Neutrophilen in der Milz sowie der prozentuale Anteil der assoziierten Neutrophilen bezogen auf die Gesamtzahl der Neutrophilen im jeweiligen Gewebe (n= 4; \*\* p ≤ 0,01 \* p ≤ 0,05; n.s. nicht signifikant).

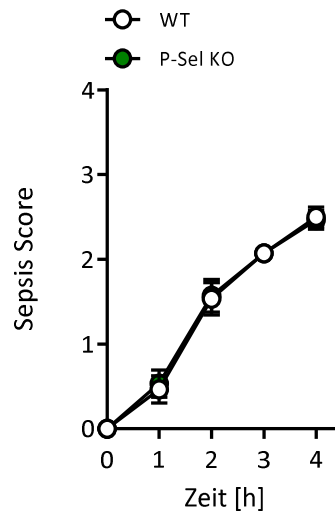
### **3. Einfluss von P-Selectin auf die Efferozytose**

#### **3.1. LPS-induzierte sterile Peritonitis in P-Selectin Knockout Tieren**

Um zu untersuchen, inwiefern Thrombozyten an der Efferozytose der Neutrophilen beteiligt sein könnten, wurde das Hauptaugenmerk der nachfolgenden Versuche auf P-Selectin gelegt. Dieses Adhäsionsmolekül wird, wie unter II.3.1.3. beschrieben, sowohl auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten als auch auf dem Endothel in Folge von LPS Einwirkung exprimiert und ist imstande an Neutrophile über den dazugehörigen Liganden PSGL-1 zu binden. Indem das Modell einer sterilen Peritonitis in P-Selectin KO-Tieren wiederholt wurde, sollte überprüft werden, ob das Fehlen von P-Selectin eine Auswirkung auf die Efferozytose der Neutrophilen hat und somit Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden Mechanismus gezogen werden.

Der Ablauf des Versuchs entsprach dem Aufbau der Induktion einer sterilen Peritonitis wie unter IV.1.1. beschrieben. Dazu wurde zehn Wochen alten, weiblichen P-Sel KO-Tieren bzw. gleichaltrigen C57BL/6J als Kontrolltieren 1 µg/g KG LPS intraperitoneal injiziert. Nach vier Stunden klinischen Monitorings erfolgte zunächst die Blutentnahme, bevor die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und ihre Organentnahme nach vorheriger Perfusion entnommen wurden.

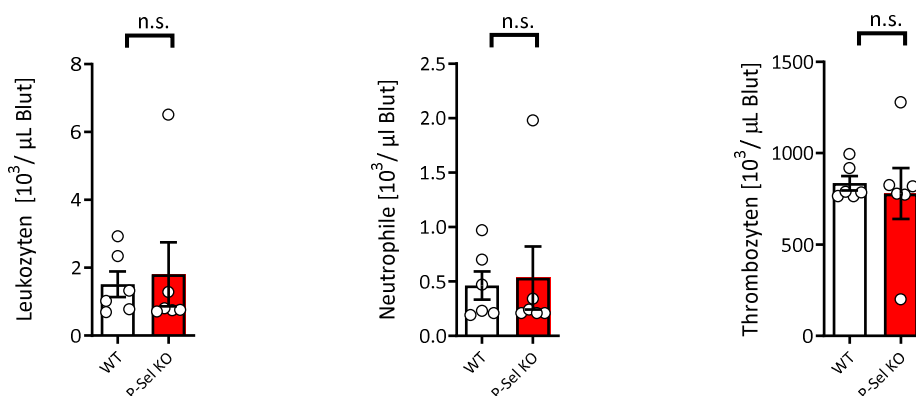
Der Verlauf der klinischen Symptomatik war bei beiden Gruppen nahezu identisch, so entwickelten alle Tiere bereits innerhalb der ersten Stunde nach LPS-Injektion Sepsis-assoziierte Symptome und erreichten nach vier Stunden einen Gesamtpunktestand von 2,46 (Wildtyp) und 2,5 (P-Selectin KO) von insgesamt vier möglichen Punkten (siehe Abbildung 40).



**Abbildung 40: P-Selectin KO-Tiere zeigen in der sterilen Peritonitis keine Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung der klinischen Symptomatik verglichen mit C57BL/6J Tieren**

Darstellung des Sepsis Scores zum direkten Vergleich zwischen P-Sel KO (grün) und C57BL/6J (WT, weiß) innerhalb des vierstündigen Zeitraums (n= 6)

Die in Abbildung 41 dargestellte Analyse des aus der *V. facialis* entnommenen Blutes zum Zeitpunkt vier Stunden nach LPS-Injektion ergab keine wesentlichen Unterschiede zwischen P-Selectin KO und Kontrolltieren in Bezug auf die Anzahl der Gesamtleukozyten ( $p= 0,7823$ ) sowie der Neutrophilen ( $p= 0,8303$ ) und Thrombozyten ( $p= 0,7035$ ).



**Abbildung 41: Septische P-Selectin KO-Tiere zeigen keinen Unterschied gegenüber Kontrolltieren hinsichtlich des Differentialblutbilds**

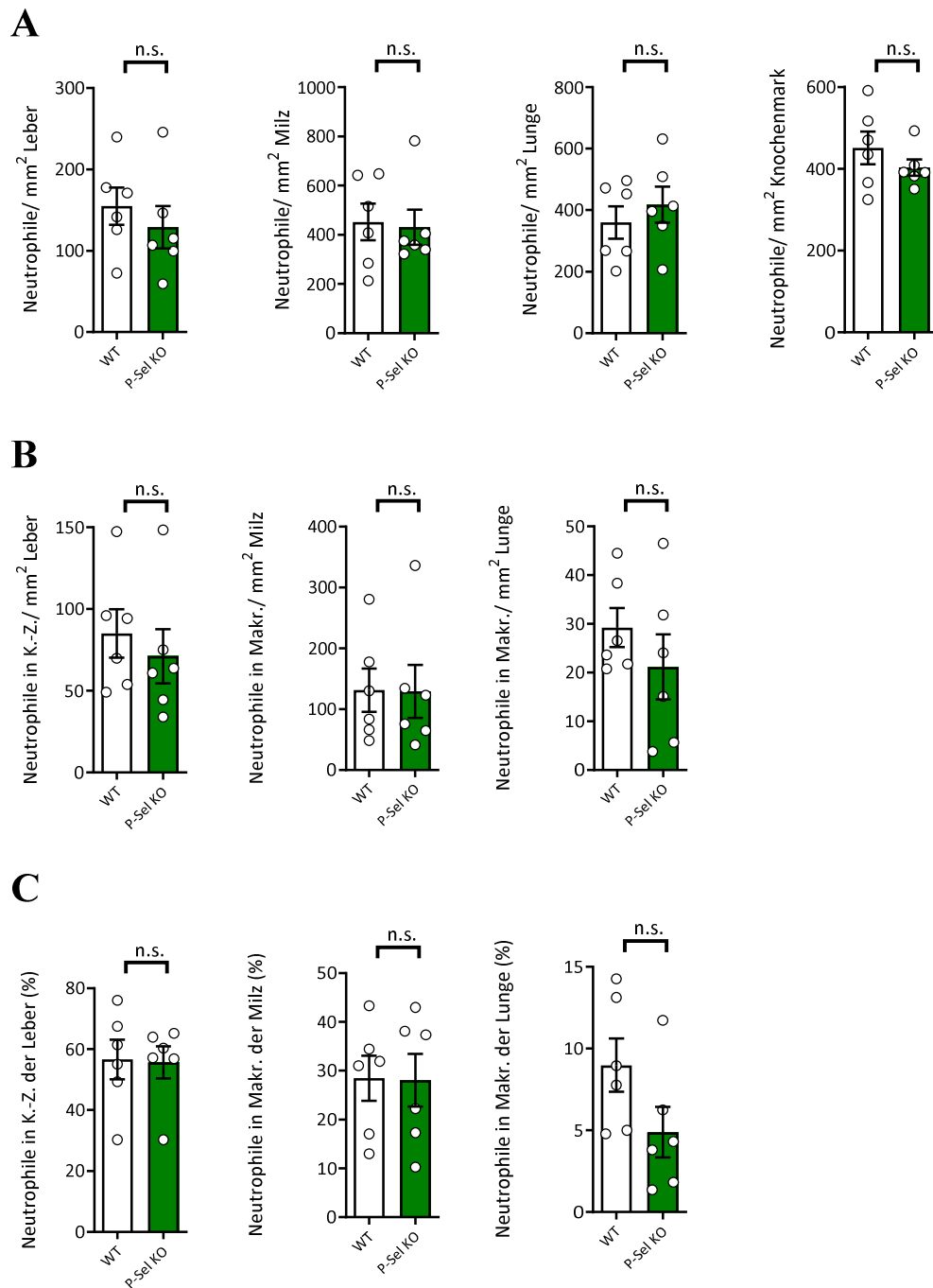
Darstellung der im Blut befindlichen Zellzahlen. Angaben in Zellzahl  $\times 10^3/\mu\text{L Blut}$  (n= 6; n.s. nicht signifikant)

Die Anzahl der Neutrophilen unterschied sich bei P-Selectin defizienten Tieren nicht signifikant von Tieren der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 42). Ansatzweise Trends zu weniger Neutrophilen in der Leber ( $p=0,4708$ ) und im Knochenmark ( $p=0,3068$ ), bzw. zu mehr Neutrophilen in der Lunge ( $p=0,4793$ ) in P-Selectin KO-Tieren war erkennbar. In der Milz war die Differenz zwischen beiden Gruppen am geringsten ( $p=0,8397$ ).

In Bezug auf die Zahl der mit Makrophagen assoziierten Neutrophilen konnte lediglich in der Leber zumindest ein Trend zu einer verminderten Efferozytose verzeichnet werden ( $p=0,5427$ ), in der Milz ( $p=0,9733$ ) und der Lunge ( $p=0,3247$ ) war dagegen kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu sehen.

Auch der Prozentsatz der mit Makrophagen assoziierten Neutrophilen (Efferozytoserate) zeigte im direkten Vergleich der beiden Gruppen in keinem der untersuchten Organe einen signifikanten Unterschied (Leber:  $p=0,9098$ ; Milz:  $p=0,9543$ ; Lunge:  $p=0,0984$ ).

Da P-Selectin KO-Tiere weder auf den Thrombozyten, noch auf dem Endothel P-Selectin exprimieren können und der Einfluss der P-Selectin exprimierenden Thrombozyten unabhängig vom Endothel betrachtet werden sollte, wurde ein weiterer Versuch in eigens generierten P-Selectin Knochenmarks-Chimären durchgeführt, die P-Selectin zwar auf dem Endothel, jedoch nicht auf den Thrombozyten besaßen.



**Abbildung 42: Septische P-Selectin KO-Tiere zeigen keine verminderte Efferozytose von Neutrophilen**

Säulendiagramme zur histologischen Analyse von Leber, Milz, Lunge und Knochenmark von P-Selectin KO-Tieren (grün) und C57BL/6J Kontrolltieren (weiß) zum Zeitpunkt 4 h nach LPS-Injektion. (A) Anzahl der Thrombozyten pro mm<sup>2</sup> Gewebe. (B) Anzahl der mit Makrophagen assoziierten Neutrophilen pro mm<sup>2</sup> Gewebe. (C) Prozentualer Anteil der mit Makrophagen assoziierten Neutrophilen bezogen auf die Gesamtzahl der Neutrophilen im jeweiligen Gewebe (n= 6; n.s. nicht signifikant).

### 3.2. LPS-induzierte sterile Peritonitis in P-Selectin KO-Chimären

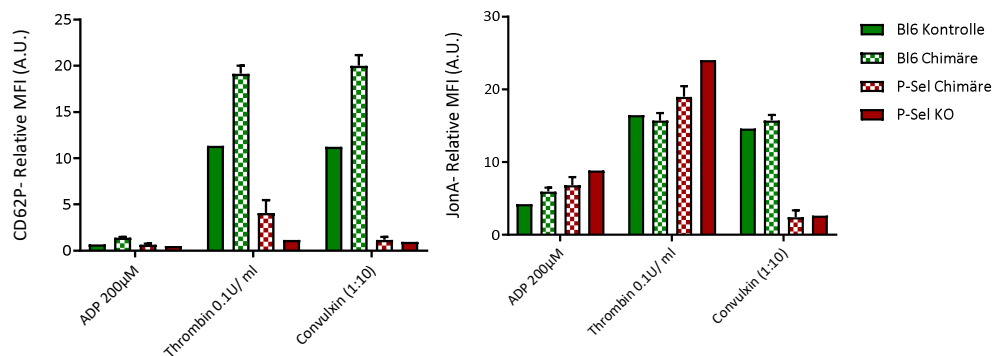
Vier Wochen nach Knochenmarkstransfer von P-Selectin KO-Tieren bzw. von C57BL/6J Tieren als Kontrollen in sechs Wochen alte C57BL/6J Empfängertiere, wurde zunächst der Chimärismus überprüft. Dazu wurde ein Aktivierungsassay (siehe III.5.6.) an jeweils drei Tieren pro Gruppe durchgeführt. Um die Ergebnisse in Relation setzen zu können, wurde als zusätzliche Kontrolle das Blut eines P-Selectin KO-Tieres sowie das eines C57BL/6J Tieres analysiert.

Nachdem den Tieren jeweils 300 µl Blut aus der *V. facialis* entnommen worden war, wurden die Thrombozyten isoliert und mit unterschiedlich starken Aktivatoren inkubiert, um eine Hochregulation von P-Selectin auf ihrer Oberfläche hervorzurufen. Anschließend wurden die Thrombozyten für die durchflusszytometrische Analyse mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt, wobei neben eines anti-CD62P Antikörpers zur Messung von P-Selectin auch Jon/A hinzugefügt wurde. Dieses ist kaum auf ruhenden, dafür aber in großer Menge auf aktivierten Thrombozyten zu finden und an deren Adhäsion und Aggregation beteiligt ist [186]. Da es an den Integrinkomplex  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  auf aktivierten Thrombozyten binden kann, wird es als Aktivierungsmarker für diese Zellen genutzt.

Die verwendeten Aktivatoren sind der Potenz nach von links nach rechts in aufsteigender Reihenfolge angeordnet (siehe Abbildung 43). Die Messwerte ergaben sich aus der *mean fluorescence intensity* (MFI) und wurden als relative MFI in Bezug zur nichtstimulierten Kontrolle (PBS, nicht dargestellt) gesetzt. Dabei zeigte sich eine um 56 % geringere MFI der Expression von P-Selectin auf den Thrombozyten der P-Selectin KO-Chimären verglichen mit den Kontrollchimären nach Stimulation mit ADP. Auch bei der Verwendung von Thrombin und Convulxin war die P-Selectin Expression gegenüber der Kontrollgruppe um 78 % bzw. sogar um 94 % erniedrigt. Im direkten Vergleich zwischen P-Selectin KO-Chimären und der P-Selectin KO Maus zeigte letztere kontinuierlich niedrigere MFIs. Unerwarteterweise war die relative MFI bei der C57BL/6J Maus immer geringer als bei den Kontrollchimären.

Die durchgehend höheren relativen MFIs der Kontrollchimären gegenüber den P-Selectin KO-Chimären, die auf eine höhere Expression von P-Selectin auf den Thrombozyten schließen ließ, wurde als Erfolg der Knochenmarkstransplantation gewertet. Darauf aufbauend wurde das Modell der sterilen Peritonitis in den

Chimären analog zum Versuchsablauf bei den P-Selectin KO-Tieren durchgeführt (siehe IV.3.1.).

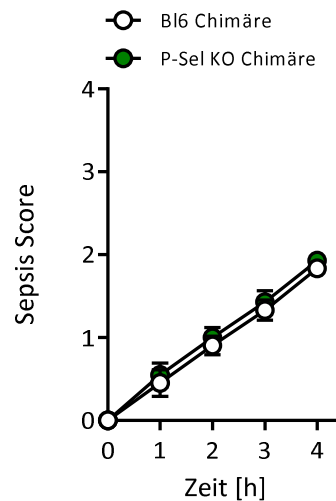


**Abbildung 43: Die Expression von P-Selectin ist in P-Selectin Chimären im Vergleich zu B6-Kontrollchimären verringert**

Säulendiagramm zur Darstellung der gemessenen relativen MFI in C57BL/6J (grün), C57BL/6J-Kontrollchimären (grün-kariert), P-Selectin KO-Chimären (rot-kariert) und P-Selectin KO-Tieren (rot).

Wie zuvor bereits unter IV.3.1. bei den P-Selectin KO-Tieren festgestellt worden war, zeigten sich auch zwischen den beiden Chimärengruppen keine wesentlichen Unterschiede im Verlauf des Sepsis Scores (siehe Abbildung 44). Alle Tiere entwickelten über den vierstündigen Zeitraum kontinuierlich stärker werdende Krankheitssymptome, bis sie zum Zeitpunkt vier Stunden nach LPS-Injektion einen Gesamtpunktestand von 1,8 (Kontrollchimären) und 1,9 (P-Selectin KO-Chimären) von insgesamt vier möglichen Punkten.

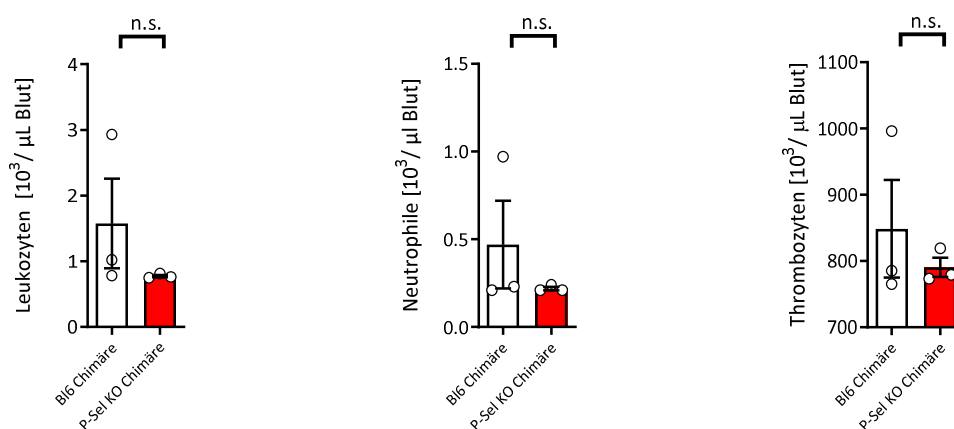




**Abbildung 44: P-Selectin KO-Chimären zeigen in der sterilen Peritonitis keine Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung der klinischen Symptomatik verglichen mit C57BL/6J-Kontrollchimären**

Darstellung der anhand des klinischen Überwachungsbogens erfassten Symptome mithilfe des Sepsis Scores zum direkten Vergleich zwischen P-Sel KO-Chimären (grün) und C57BL/6J-Kontrollchimären (weiß) innerhalb des vierstündigen Zeitraums (n= 3).

Die Zellzahlen der P-Selectin KO-Chimären zeigten im Differentialblutbild (siehe Abbildung 45) keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren (Leukozyten:  $p=0,3032$ ; Thrombozyten:  $p=0,4817$ ; Neutrophile:  $p=0,3744$ ).



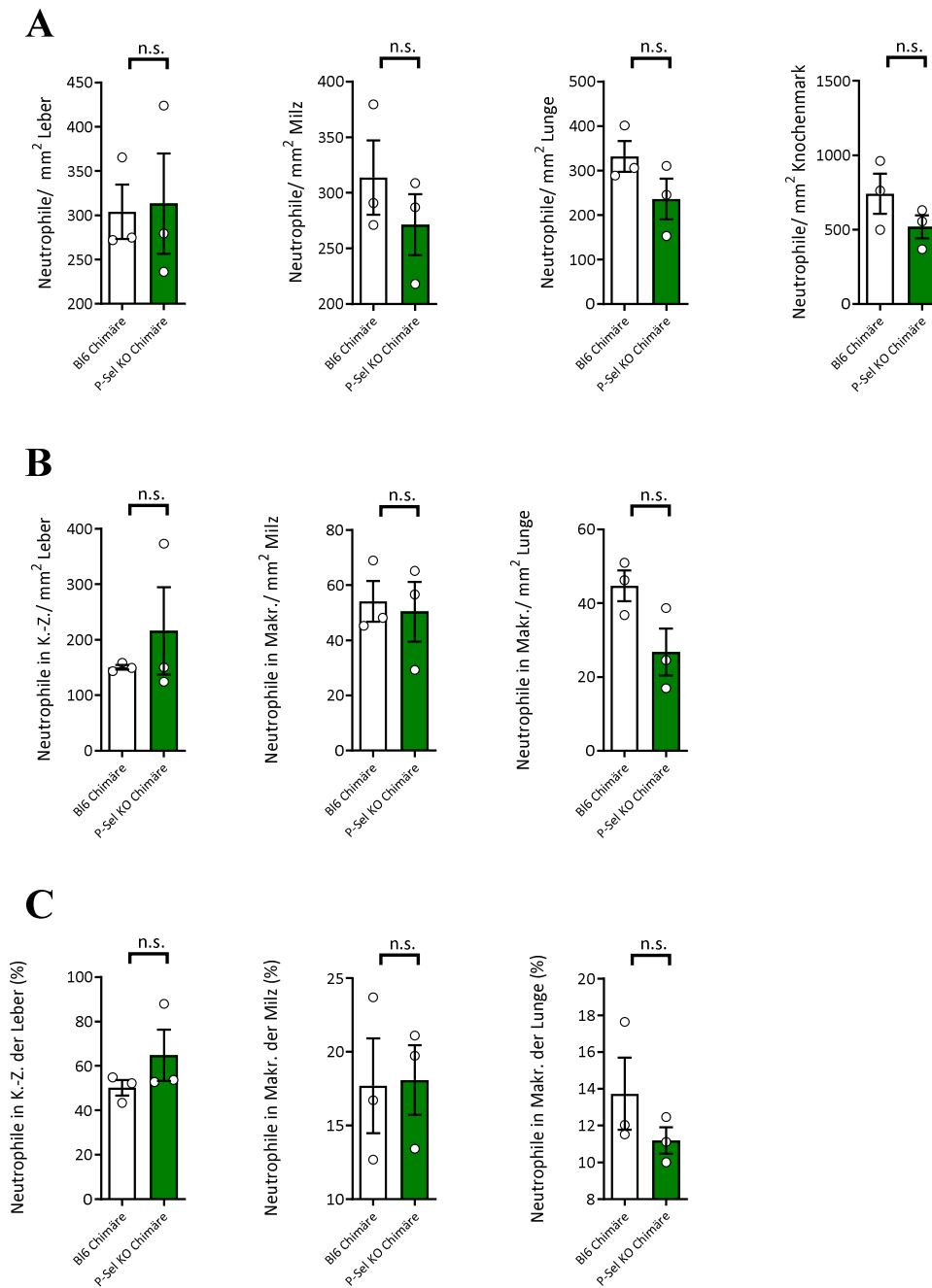
**Abbildung 45: Septische P-Selectin KO-Chimären zeigen keinen Unterschied gegenüber Kontrollchimären hinsichtlich des Differentialblutbilds**

Darstellung der im Blut befindlichen Zellzahlen nach Erstellung eines Differentialblutbilds. Angaben in Zellzahl  $\times 10^3/\mu\text{L Blut}$  (n= 3; n.s. nicht signifikant).

Wie zuvor in der sterilen Peritonitis der P-Selectin KO-Tiere unter IV.3.1. beschrieben, ergaben sich auch in den Chimären keine wesentlichen Unterschiede in der Anzahl der Neutrophilen zwischen beiden Gruppen in Leber ( $p=0,8944$ ), Milz ( $p=0,3804$ ) und Knochenmark ( $p=0,2234$ ) (siehe Abbildung 46). Lediglich in der Lunge waren es durchschnittlich 29 % weniger, jedoch war auch dieser Unterschied nicht signifikant ( $p=0,1719$ ).

Ebenfalls ähnlich zu den Ergebnissen wie in IV.3.1., unterschieden sich die Zahl der mit Makrophagen assoziierten Neutrophilen der beiden Gruppen weder bezogen auf die Leber ( $p=0,4538$ ) noch auf die Milz ( $p=0,7880$ ). In der Lunge dagegen war die Neutrophilenzahl der P-Selectin KO-Chimären um 40 % gegenüber den B6-Kontrollchimären reduziert ( $p=0,0778$ ).

Auch der prozentuale Anteil der assoziierten Neutrophilen unterschied sich weder in der Leber ( $p=0,2917$ ), der Milz ( $p=0,9285$ ) noch in der Lunge ( $p=0,2890$ ) signifikant. Ein in der Lunge auf den ersten Blick ersichtlicher Effekt einer verminderten Efferozytose wurde durch die insgesamt geringere absolute Neutrophilenzahl abgeschwächt.



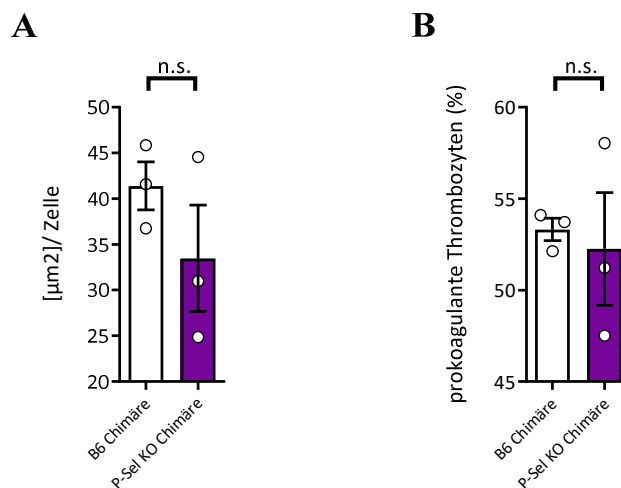
**Abbildung 46: Septische P-Selectin KO-Chimären zeigen keine verminderte Efferozytose von Neutrophilen**

Säulendiagramme zur histologischen Analyse von Leber, Milz, Lunge und Knochenmark von P-Selectin KO-Chimären (grün) und C57BL/6J Kontrollchimären (weiß) zum Zeitpunkt 4 h nach LPS-Injektion. (A) Anzahl der Thrombozyten pro mm<sup>2</sup> Gewebe. (B) Anzahl der mit Makrophagen assoziierten Neutrophilen pro mm<sup>2</sup> Gewebe. (C) Prozentualer Anteil der mit Makrophagen assoziierten Neutrophilen bezogen auf die Gesamtzahl der Neutrophilen im jeweiligen Gewebe (n= 3; n.s. nicht signifikant).

### 3.2.1. Migrationsassay von aus P-Selectin KO-Chimären isolierten Thrombozyten

Um zu untersuchen, ob sich das Fehlen von P-Selectin auf Thrombozyten auf deren Migrationsverhalten auswirkt, wurde ein Migrationsassay *in vitro* durchgeführt. Dazu wurde jeweils drei Tieren pro Gruppe terminal unter tiefer MMF-Narkose 1ml Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen, die Tiere ohne Wiedererwachen durch zervikale Dislokation getötet und die Thrombozyten wie unter III.4.2. beschrieben isoliert.

Unter A in Abbildung 47 ist mit der Größe der Fläche in  $\mu\text{m}^2$  dargestellt, wie viel Fibrin während des Assays durchschnittlich von einem Thrombozyten aufgesammelt werden konnte bzw. inwieweit dieser sich auf dem fibrinbeschichteten Untergrund fortbewegt hatte. Hier war kein signifikanter Unterschied zwischen P-Selectin KO-Chimären im Vergleich zu Kontrollchimären bezüglich des Migrationsverhaltens zu erkennen ( $p=0,2825$ ). Auf der rechten Seite wurde die Aktivierung der Thrombozyten und ihre Fähigkeit einen prokoagulanten Zustand anzunehmen gemessen. Dies wurde untersucht, indem die Kammer mit Kollagenfasern beschichtet wurde, was analog zum verletzten Epithel freiliegendes subendotheliales Bindegewebe imitierte und bei Auftreffen der Thrombozyten eine Aktivierung nach sich zog. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt ( $p=0,7532$ ).



**Abbildung 47: P-Selectin defiziente Thrombozyten zeigen keinen Migrationsdefekt *in vitro* (Migrationsassay)**

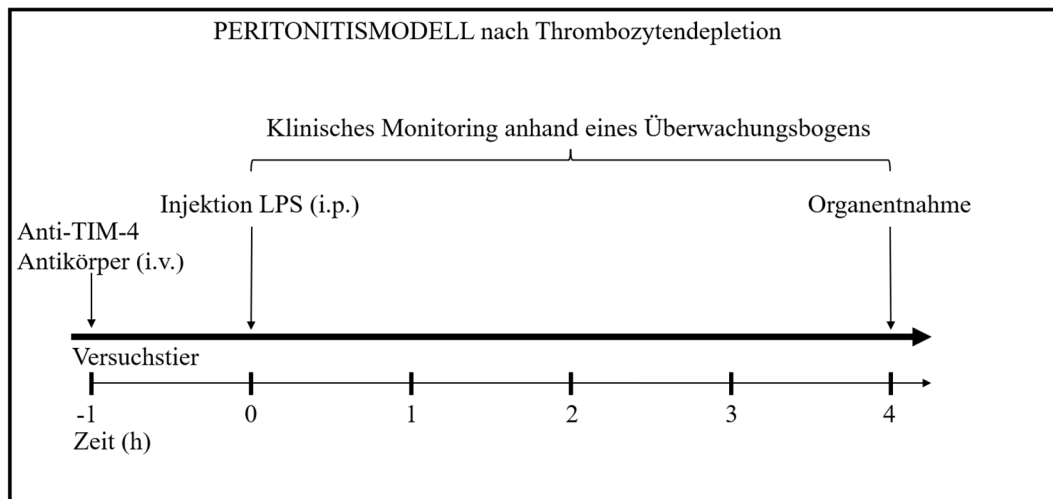
Säulendiagramm der Ergebnisse des Migrationsassays zwischen P-Selectin KO-Chimären (lila) und C57BL/6J Kontrollchimären (weiß) ( $n=3$ ; n.s. nicht signifikant).

## **4. Einfluss der Inhibition von TIM-4 auf die Efferozytose**

### **4.1. LPS-induzierte Sepsis unter Blockade von TIM-4 als Alternative zu P-Selectin**

Da weder ein globaler P-Selectin-Knockout noch eine selektive P-Selectin-Defizienz in Knochenmarkszellen, insbesondere Thrombozyten, einen Einfluss auf die Efferozytoserate der Neutrophilen zu haben schien, wurde mit *T-cell immunoglobulin and mucin domain 4* ein weiterer Rezeptor getestet. Dieser wird u.a. auf Kupffer-Zellen der Leber exprimiert und stellt einen Liganden für Phosphatidylserin dar [92, 204], welches in hohem Maß auf der Oberfläche apoptotischer Zellen vorkommt und als sog. „eat me signal“ deren Phagozytose initiiert [93-95]. Es konnte bereits im Ischämie-Reperusionsmodell (*ischemic reperfusion injury model*, IRI) in der Leber eine verminderte Phagozytoseaktivität nach Inhibition von TIM-4 gezeigt werden [92], aufgrund dessen eine Beteiligung von TIM-4 an der Beseitigung apoptotischer Zellen vermutet wurde.

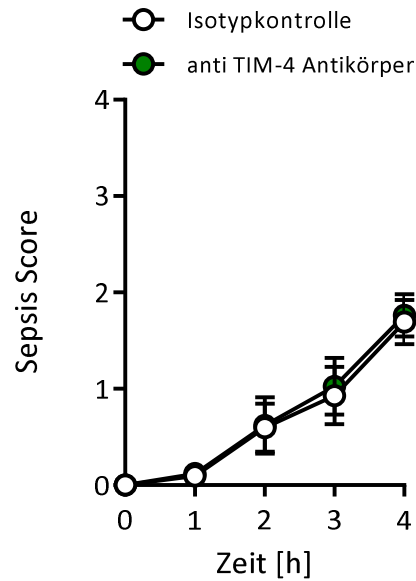
Zur Inhibition von TIM-4 wurden 10 Wochen alten, weiblichen C57BL/6J Tieren jeweils 0,5 mg eines TIM-4 bindenden Antikörpers bzw. einer Isotypkontrolle intravenös injiziert (siehe Abbildung 48). Eine Stunde später erfolgte die intraperitoneale Applikation von 1 µg/g KG LPS. Nach vier Stunden klinischen Monitorings erfolgte eine Entnahme von 100 µl Blut aus der *V. facialis*, bevor die Tiere durch cervikale Dislokation getötet und die Organe nach vorangegangener Perfusion entnommen wurden.



**Abbildung 48: Flussdiagramm zum Ablauf einer antikörpervermittelten Blockade von TIM-4 im Modell einer sterilen Peritonitis**

Blockade von TIM-4 durch i.v. Injektion von 0,5 mg eines anti-TIM-4 Antikörpers eine Stunde vor i.p. LPS-Injektion. Klinisches Monitoring über vier Stunden bis zur Beendigung des Versuchs einschließlich Blut- und Organentnahme (n= 3).

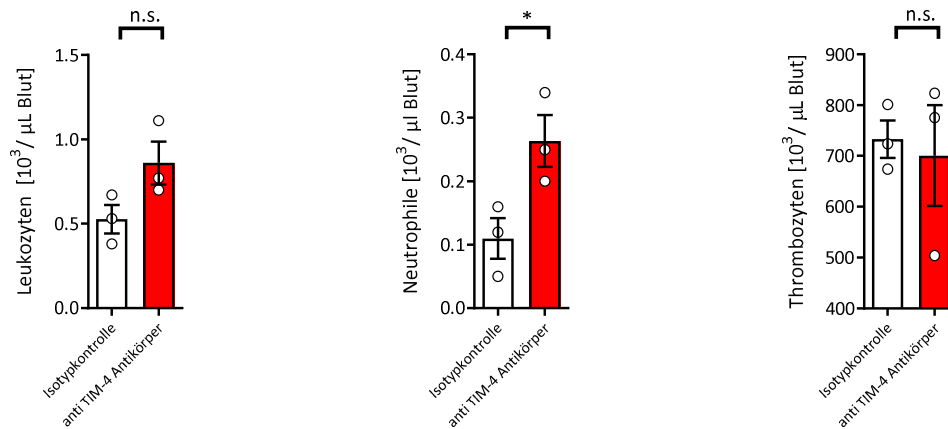
Eine Blockade von TIM-4 zeigte im Überwachungsbogen (siehe Abbildung 49) keinen Einfluss auf den Schweregrad des Sepsis-assoziierten Krankheitsverlaufs, wobei beide Gruppen bereits eine Stunde nach LPS-Injektion sichtbare Symptome zeigten, die sich über den gesamten vierstündigen Zeitraum weiter verstärkten. Die Kontrollgruppe erreichte somit zum Zeitpunkt vier Stunden post LPS einen durchschnittlichen Gesamtpunktestand von 1,69 und die anti-TIM-4 Antikörpergruppe von 1,76 von insgesamt vier möglichen Punkten.



**Abbildung 49: Eine antikörpervermittelte Blockade von TIM-4 zieht keine Unterschiede hinsichtlich des LPS-induzierten klinischen Verlaufs verglichen mit der Kontrollgruppe nach sich**

Darstellung der anhand des klinischen Überwachungsbogens erfassten Symptome mithilfe des Sepsis Scores zum direkten Vergleich zwischen anti-TIM-4 Antikörpergruppe (grün) und der Isotyp-Kontrollgruppe (weiß) innerhalb des vierstündigen Zeitraums (n= 3).

Die Analyse des aus der *V. facialis* entnommenen Blutes (siehe Abbildung 50) zum Zeitpunkt vier Stunden nach LPS-Injektion zeigte, dass sich die Gesamtleukozytenzahl im Blut im Gegensatz zur Kontrollgruppe um 39 % ( $p= 0,0931$ ), die Anzahl der Neutrophilen mit einem Anstieg von 58 % sogar um mehr als die Hälfte erhöhte. Der Unterschied zur Kontrollgruppe war dabei statistisch signifikant ( $p= 0,0422$ ). Bezüglich der Thrombozytenzahl ergab sich kein wesentlicher Unterschied ( $p= 0,7755$ ) nach der Blockade von TIM-4.



**Abbildung 50: Nach der antikörpervermittelten TIM-4 Blockade kommt es in septischen Tieren zu einem signifikanten Anstieg der im Blut zirkulierenden Neutrophilen**

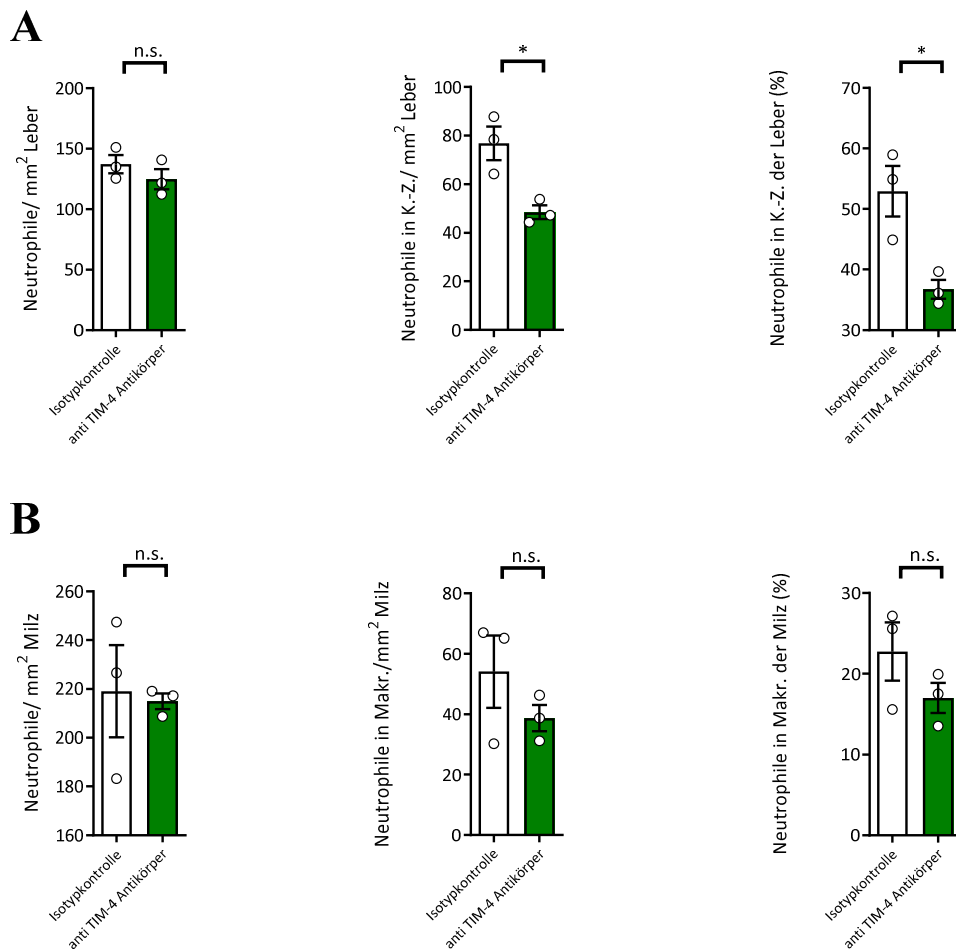
Darstellung der im Blut befindlichen Zellzahlen nach Erstellung eines Differentialblutbilds. Angaben in Zellzahl  $\times 10^3/\mu\text{l Blut}$  ( $n=3$ ; \*  $p \leq 0,05$ ; n.s. nicht signifikant).

Die histologische Auswertung (siehe Abbildung 51) ergab, dass die Anzahl der Neutrophilen in der Leber im Vergleich zur Kontrollgruppe geringfügig vermindert ( $p=0,3334$ ) war. Interessanterweise verringerte sich sowohl die absolute Zahl der efferozytierten Neutrophilen um 37 % ( $p=0,0187$ ), als auch die prozentuale Efferozytoserate um 16 % ( $p=0,0220$ ) signifikant.

In der Milz ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Neutrophilenanzahl ( $p=0,8415$ ), dafür war wie in der Leber die Efferozytose nach Blockade von TIM-4 um 28 % vermindert ( $p=0,2928$ ), ebenso die prozentuale Efferozytoserate mit einer Verminderung von rund 6 % ( $p=0,2301$ ). Allerdings wies somit keiner der gezeigten Parameter eine statistische Signifikanz auf.

Die dargestellten Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung von TIM-4 bei der Aufnahme aktivierter Neutrophiler in Makrophagen der Leber und Milz schließen. Statt abgebaut zu werden, würden die Neutrophilen beim Fehlen von TIM-4 vermittelter Phagozytose weiterhin im Blut zirkulieren. Dies würde die Erhöhung der Leukozyten sowie insbesondere der Neutrophilen im Blut erklären und dass diese eventuell in nachfolgende Organe wie die Lunge abgeschwemmt werden.





**Abbildung 51: Eine antikörpervermittelte TIM-4 Blockade unter LPS reduziert die Aufnahme von Neutrophilen in Kupffer-Zellen**

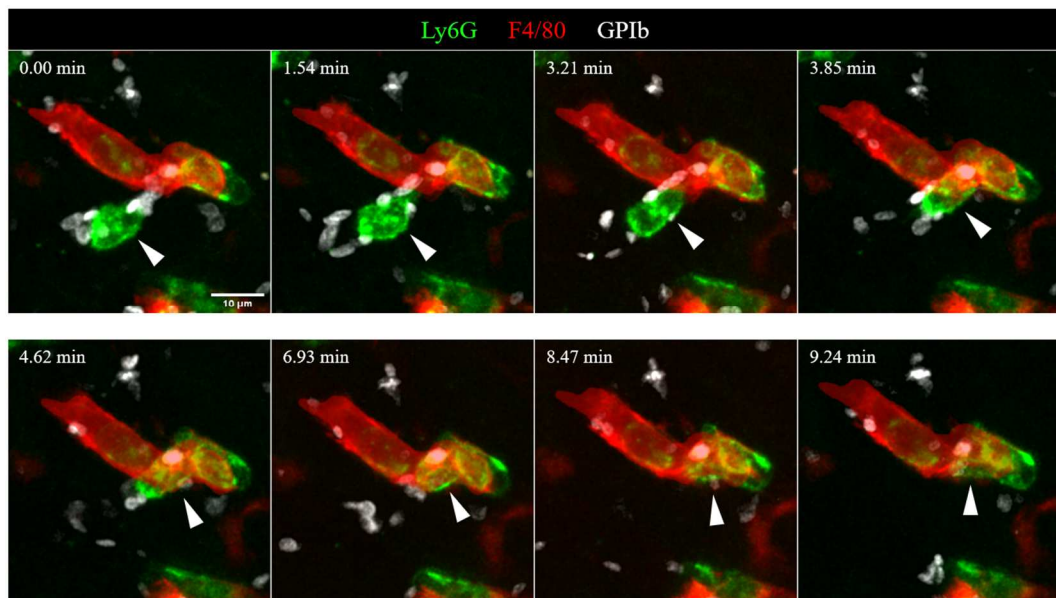
Säulendiagramme zur histologischen Analyse von Leber und Milz von der mit anti-TIM-4 Antikörper behandelten (grün) und der Isotyp-Kontrollgruppe (weiß) zum Zeitpunkt 4 h nach LPS-Injektion (n= 3; \* p ≤ 0,05; n.s. nicht signifikant).

## 5. Intravitalmikroskopie der Leber in LPS Sepsis

Im Rahmen der nächsten Versuchsreihe sollte die dynamische Interaktion von Neutrophilen und Kupffer-Zellen während der LPS-induzierten Sepsis longitudinal untersucht werden. Hierfür wurde nach intraperitonealer LPS-Injektion die Leber der Versuchstiere exponiert und mithilfe der 4D-Konfokalmikroskopie untersucht. Folgende Aufnahmen entstanden zwei Stunden nach intraperitonealer Gabe von 1 µg/g KG LPS. Alle Antikörper wurden über einen Schwanzvenenkatheter direkt vor Beginn der Mikroskopie intravenös verabreicht.

In der in Abbildung 52 dargestellten Bildsequenz ist die Aufnahme eines

Neutrophilen (grün) in eine Kupffer-Zelle (rot) in der hepatischen Mikrozirkulation dargestellt. Der Neutrophile wird dabei von mehreren Thrombozyten (grau) umgeben, die in engem räumlichem Kontakt zu seiner Oberfläche stehen. Im ersten Bild (Zeitpunkt 0.00 min) scheinen die Thrombozyten als eine Art Bindeglied sowohl in Verbindung mit dem Neutrophilen als auch mit der Kupffer-Zelle zu stehen und ebenfalls von dieser zusammen mit dem Neutrophilen aufgenommen zu werden. Im letzten Bild (Zeitpunkt 9.24 min) ist der Neutrophile vollständig von der Kupffer-Zelle aufgenommen worden. Ein weiterer Neutrophiler im rechten distalen Abschnitt der Kupffer-Zelle verändert seine Position über den gesamten Zeitraum hinweg nicht und steht ebenfalls in engem räumlichem Kontakt mit der Kupffer-Zelle.

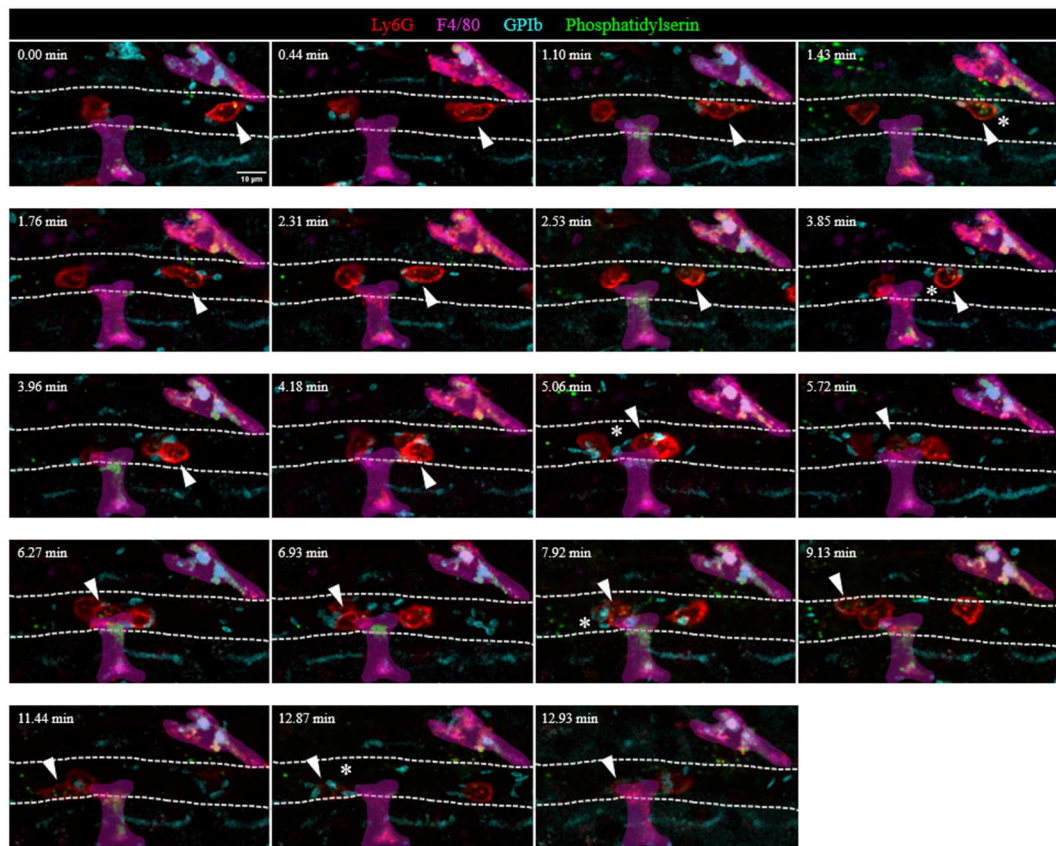


**Abbildung 52: Thrombozyten-assistierte Efferozytose von Neutrophilen in der Leber in der LPS-induzierten Sepsis**

Anfärbung von Thrombozyten (GPIb), Neutrophilen (Ly6G) und Kupffer-Zellen (F4/80)

Die Bildsequenz unter Abbildung 53 zeigt mehrere Neutrophile (rot) innerhalb eines kleinen Gefäßes (gestrichelte Linie) der Leber zum Zeitpunkt zwei Stunden nach i.p. LPS-Injektion. Ober- und unterhalb ans Gefäßinnere angrenzend sind zwei Kupffer-Zellen (magenta) positioniert, deren Fortsätze bis in den Blutstrom hineinragen. Kontinuierlich strömen Thrombozyten (cyan) entlang der Fließrichtung durch das Gefäß, wobei sie sich sowohl dem Endothel als auch den Neutrophilen anzunähern scheinen (mit \* markiert). Mit einem Pfeil ist ein

neutrophiler Granulozyt markiert, der auf seiner Oberfläche Phosphatidylserin exprimiert (grüne Punkte) und sich entlang des Gefäßendothels fortbewegt, indem er seine Form immer wieder verändert und am Endothel regelrecht zu haften scheint. Gegen Ende der Bildsequenz (ab Minute 6) nähert sich dieser Neutrophile der unteren Kupffer-Zelle und ist dabei ständig in engem räumlichem Kontakt zu den ihn direkt umgebenden Thrombozyten, die, wie im vorletzten Bild zu sehen (Zeitpunkt 12.78) ist, offenbar eine Verbindung zwischen dem Neutrophilen und der Kupffer-Zelle herstellen.



**Abbildung 53: Neutrophile exprimieren Phosphatidylserin in der entzündeten Leber und sind von Thrombozyten umgeben**

Anfärbung von Thrombozyten (GPIb), Neutrophilen (Ly6G), Kupffer-Zellen (F4/80) und Phosphatidylserin (grün)

## V. DISKUSSION

Die durchgeführten Versuche der vorliegenden Arbeit dienten der Untersuchung der Interaktionen zwischen Thrombozyten und Neutrophilen während einer akuten systemischen Inflammation. Es sollte untersucht werden, ob Thrombozyten in der akuten systemischen Inflammation eine immunmodulatorische Funktion innehaben, indem sie den Abbau aktivierter neutrophiler Granulozyten durch Kupffer-Zellen in der Leber fördern, wodurch die Kupffer-Zellen einen antiinflammatorischen Phänotyp einnehmen und letztendlich die Entzündungsreaktion eindämmen können.

### **1. Die intraperitoneale Injektion von LPS führt zum Abfall der im Blut zirkulierenden Neutrophilen und Thrombozyten bei gleichzeitiger Akkumulation in der Leber**

Im Modell der LPS-induzierten sterilen Peritonitis kam es infolge der intraperitonealen LPS-Injektion zu deutlichen Veränderungen hinsichtlich der im Blut zirkulierenden Leukozyten. So ergab die Analyse des Differentialblutbilds einen Abfall der Gesamtleukozytenzahl innerhalb einer Stunde nach LPS-Injektion, bevor diese innerhalb eines vierstündigen Zeitraumes ihren Tiefstwert erreichte, was einer Verringerung um insgesamt 73,7 % (SD) entsprach. Auch die Anzahl der Neutrophilen sank bis zum Zeitpunkt von einer Stunde nach LPS-Injektion verglichen zum Ausgangswert signifikant ab ( $p=0,0313$ ), um bis zum Ende des insgesamt 16stündigen Überwachungszeitraums nur leicht wieder anzusteigen. Mit diesem Verlauf korrelierte die Thrombozytenzahl, die sich zwar in nicht signifikanter Weise, jedoch innerhalb von vier Stunden um insgesamt mehr als ein Drittel (36 %) reduzierte.

Gleichzeitig zeigte die histologische Auswertung eine deutliche Zunahme von Neutrophilen und Thrombozyten in der Mikrozirkulation des entzündeten Lebergewebes im Vergleich zu Kontrolltieren, bei denen diese Zellen lediglich vereinzelt vorzufinden waren. Dabei erreichte die Akkumulation der Neutrophilen nach acht Stunden ihren Höchststand, entsprechend einem Anstieg von

55,1 % (SD), um anschließend bis zum Zeitpunkt von 16 Stunden nach LPS-Injektion nur leicht wieder abzusinken. Auch die Zahl der Thrombozyten stieg innerhalb der ersten acht Stunden nach LPS-Injektion auf das Doppelte an und verringerte sich anschließend geringgradig bis zum Ende der 16 Stunden. Der Effekt einer Thrombozytopenie und Akkumulation von Thrombozyten in der Leber konnte auch durch andere entzündliche Stimuli erfolgreich im Mausmodell induziert werden: Jenne *et al.* [87] injizierten das Immunstimulanz *Polyinosinic:polycytidylic acid* (poly I:C) systemisch und stellten neben einer Thrombozytopenie der Tiere in intravitalmikroskopischen Aufnahmen auch eine massive Ansammlung von Thrombozyten in den hepatischen Sinusoiden fest, die sich zu anwachsenden Aggregaten zusammenlagerten. Die Ergebnisse durch die Verabreichung von poly I:C waren in dieser Studie vergleichbar mit einer viralen Infektion durch den Erreger der Myxomatose (*Leporipoxvirus myxomatosis*) [87]. Laut den Autoren sei die Aggregation der Thrombozyten in der Leber dabei ein reversibler Vorgang, da die Thrombozytenzahlen in der Leber innerhalb eines Zeitraums von 48 Stunden wieder den Ausgangswert erreichten. Diese Aussage korreliert mit den Daten in der in dieser Arbeit durchgeführten sterilen Peritonitis, in der nach einem maximalen Wert acht Stunden nach LPS-Injektion ein Abfall der Thrombozyten zu sehen war.

Die frühzeitig nach inflammatorischem Stimulus auftretende Neutropenie sowie Thrombozytopenie bei gleichzeitiger Akkumulation dieser beiden Zelltypen in der Leber spricht für eine Umverteilung im Sinne einer Rekrutierung. Dieses Phänomen wurde bereits vielfach in der Literatur beschrieben, darunter in einer Studie von Clark *et al.* [14], die bereits wenige Minuten nach intravenöser LPS-Injektion eine Neutropenie, gefolgt von einer Thrombozytopenie beobachteten. Mittels intravitalmikroskopischer Aufnahmen stellten sie dar, wie sich im Gegensatz zu *steady state*-Bedingungen Neutrophile und Thrombozyten in den hepatischen Sinusoiden ansammelten und kolokalisiert vorlagen. Ähnliche Ergebnisse finden sich auch in einer Studie von Shi *et al.* [205], die nach intraperitonealer LPS-Gabe eine erhebliche Zunahme an Neutrophilen in der Leber darstellen konnten und die sowohl mit dem Endothel als auch mit Thrombozyten und Kupffer-Zellen in engem räumlichem Kontakt standen. Diese Beobachtungen stimmen mit einer Studie von Wong *et al.* [111] überein, die beschreiben, dass die Kupffer-Zellen als „Landeplattform“ für Thrombozyten dienen und deren Adhäsion unter

inflammatorischen Bedingungen erleichtern. Während die Neutrophilenzahl in den hier vorliegenden Versuchen auch 16 Stunden nach LPS nicht merklich absank, war dies laut Shi *et al.* bereits nach sechs Stunden der Fall [205]. Die Autoren führten das auf eine Phagozytierung der apoptotisch gewordenen Neutrophilen durch Kupffer-Zellen zurück, da sie nicht nur einen generellen Anstieg von TUNEL-positiven Neutrophilen, sondern überdies die vermehrte Aufnahme dieser apoptotischen Zellen durch Kupffer-Zellen nachweisen konnten. In einer Studie von Ebe *et al.* [206] wurden nach einer Clodronat-vermittelten Depletion der Makrophagen in Abwesenheit der Kupffer-Zellen weniger Neutrophile in der Leber vorgefunden als in den nicht depletierten Kontrolltieren, was die Rolle der Kupffer-Zellen bei der Rekrutierung von Leukozyten noch einmal verdeutlicht.

Zusammen mit der Kumulation der Thrombozyten, die größtenteils als Aggregate vorlagen, wurden in den Gefäßen großflächige Fibrin(ogen) -ablagerungen sichtbar. Diese traten vor allem in der initialen Phase nach LPS-Injektion auf und bedeckten dabei rund 10 % der histologisch ausgewerteten Fläche. Fibrinogen wurde in diesem Zusammenhang angefärbt, um die Aktivierung der Gerinnungskaskade als Reaktion auf das Endotoxin darzustellen. Humanmedizinische Studien, darunter die von Mavrommatis *et al.* [33], konnten diesen Vorgang durch eine Erhöhung der Aktivierungsmarker sowie eine Aktivierung der Thrombozyten im Blut septischer Patienten bestätigen. Durch die generalisierte Aktivierung des Gerinnungssystems und dem daraus resultierenden übermäßigen Verbrauch an Gerinnungsfaktoren, kam es als Folge bei den Patienten mit septischem Schock letztendlich zum Versagen der Hämostase und dem Abfall der Gerinnungsfaktoren [33].

Eine frühzeitige Mobilisierung von Neutrophilen und Thrombozyten in die Leber nach inflammatorischem Stimulus hebt ihre Funktion als immunologisches Organ noch einmal hervor [89, 112, 147, 207]. Bereits unter basalen Bedingungen übernehmen Kupffer-Zellen der Leber zusammen mit Thrombozyten einen GPIb-vermittelten Überwachungsmechanismus, indem die Thrombozyten in kurzen, als *touch and go* bezeichneten Interaktionen die Oberfläche der Kupffer-Zellen auf gebundene Antigenstrukturen hin untersuchen [111]. Bei Erkennung von Pathogenassoziierten molekularen Mustern (PAMPs) kommt es daraufhin zur Aktivierung mit nachfolgender Aggregation der Thrombozyten [19, 111, 112]. Wong *et al.* [111] konnten in einer Studie demonstrieren, dass Mäuse,

deren Thrombozyten zuvor depletiert worden waren, vier Stunden nach gezielter Infektion mit *B. cereus* signifikant mehr Bakterien im Blut aufwiesen als Kontrolltiere: dies führte zu einer erhöhten Mortalität. Jedoch ist dieser Überwachungsmechanismus nicht allein thrombozytenabhängig, was die Depletion von Makrophagen (inklusive der Kupffer-Zellen) mithilfe von Clodronat-Liposomen zeigte. In intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurde deutlich, dass in Abwesenheit der Kupffer-Zellen signifikant weniger Thrombozyten nach *B. cereus* Infektion in der Leber aggregierten und infolgedessen weniger Bakterien aus dem Blutstrom abgefangen werden konnten [111]. Ebenso wird die Bedeutung der Kupffer-Zellen bei der Abwehr hämatogener Infektionen durch eine Studie von Ebe *et al.* [206] verdeutlicht, bei der eine subletale Dosis von *L. monocytogenes* nach Clodronat-vermittelter Depletion der Makrophagen zu einer 100 %igen Mortalitätsrate im Mausmodell führte.

In den hier durchgeführten Versuchen sollte die Funktion der Thrombozyten in der LPS-induzierten Sepsis hinsichtlich ihrer Interaktion mit Neutrophilen näher untersucht werden, indem die Thrombozyten entweder mithilfe eines Depletionsantikörpers oder im genetischen Knockout depletiert wurden.

## **2. Thrombozytopenie ist in der LPS-induzierten Sepsis mit schwerwiegenderen klinischen Symptomen sowie mit einer erhöhten Mortalität assoziiert**

Das Fehlen von Thrombozyten wirkte sich in den durchgeführten Versuchen negativ auf den Verlauf der durch LPS induzierten Sepsis aus. Die mithilfe des Antikörpers depletierten Tiere zeigten laut Evaluation des klinischen Überwachungsbogens schwerwiegendere Symptome, wobei sich der Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl im Modell der sterilen Peritonitis als auch in der ALI sogar als signifikante Erhöhung darstellte. Von insgesamt acht thrombozytopenen Tieren der mit R300 depletierten Gruppe verstarben im Peritonitismodell zwei Tiere innerhalb des vorgesehenen Zeitraumes von vier Stunden, was einer Mortalitätsrate von 25% zum Zeitpunkt 4h entspricht. Dieser umgekehrte Zusammenhang zwischen dem Abfallen der zirkulierenden Thrombozyten und der Ausbildung der Sepsissymptomatik wird auch in der Humanmedizin beschrieben, in der eine Thrombozytopenie sogar als klinischer

Marker für den Schweregrad einer Sepsis angesehen wird [25]. Laut Warkentin *et al.* [25] sei dies durch verschiedene Faktoren bedingt: die Aktivierung von Thrombozyten und ihre vermehrte Interaktion mit dem Endothel sowie einen daraus resultierenden Zustand der Hyperkoagulabilität. Neben der Sepsis fände sich der zugrundeliegende Pathomechanismus auch in Krankheitsbildern wie der heparininduzierten Thrombozytopenie (HIT, *Heparin-induced thrombocytopenia*) oder dem Antiphospholipid-Syndrom (APS) und würde die Wiederherstellung der endothelialen Integrität erfordern, um einen Anstieg der Thrombozyten zu bewirken und somit auch den Verlauf einer Sepsis positiv zu beeinflussen [25]. Aird *et al.* stellen als Problem der bisherigen Therapieansätze die sog. *single target* Strategie dar, die den Pathomechanismus als „linear gerichteten Prozess“ beschreibt und bei der es durch die Inhibition eines einzelnen Faktors zum Stillstand der Immunreaktion kommen soll, ähnlich wie beim Umfallen einer Kette von Dominosteinen [5]. Stattdessen seien die ablaufenden Prozesse keineswegs linear, sondern vielmehr eine Abfolge räumlicher und zeitlicher Interaktionen, die eher breit gestreute Therapieansätze erfordern. Es sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass keine universelle Therapie existiert: eher sei der Schlüssel die Anpassung an den Einzelpatienten oder eine Subpopulation, da dieselbe Therapie, die sich auf ein Individuum positiv auswirkt, einem anderen eher schaden könne und auch vom zeitlichen Krankheitsverlauf abhängig sei [5].

Die Tatsache, dass sich kein Unterschied des klinischen Verlaufs im Modell der genetischen Ablation der Thrombozyten verglichen mit der antikörpervermittelten Depletion findet, ist wahrscheinlich auf die wiederholte Verabreichung von Diphtherietoxin zurückzuführen, so könnten ungewollte Nebeneffekte des Toxins zu einer Beeinflussung der Ergebnisse führen. Die Tatsache, dass Cre-positive Tiere also keinen schwereren Verlauf zeigten, könnte durch eine durch das Toxin ausgelöste Entzündungsreaktion in den Cre-negativen Tieren ausgelöst werden, was den ausschließlich in Cre-positiven Tieren beobachteten Effekt der Thrombozytopenie relativiert. Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass, wie bereits unter III.3.3.2. erwähnt, die intraperitoneale Injektion zu Verletzungen der inneren Organe mit anschließender Entzündungsreaktion führen kann. Außerdem ist sie durch eine relativ hohe Fehlinjektionsrate gekennzeichnet ist. Falls also ein Teil der applizierten Flüssigkeit statt in die Peritonealhöhle ins Darmkonvolut oder die Harnblase gelangte und nicht systemisch wirksam werden



konnte, würde das auch erklären, warum im Vergleich zur antikörpervermittelten Depletion noch verhältnismäßig viele Thrombozyten in der histologischen Auswertung und im Blut zu finden waren. Trotzdem war die Gefahr einer fehlerhaften Injektion in allen durchgeführten Modellen dieser Arbeit, so auch bei der antikörpervermittelten Depletion der Thrombozyten gegeben, daher scheint diese Theorie zumindest als alleinige Erklärung für das Ausbleiben der verminderten Efferozytose im genetischen Ablationsmodell eher unwahrscheinlich.

### **3. Die Depletion von Thrombozyten führt unter dem Einfluss von LPS zur verminderten Efferozytose von Neutrophilen durch Kupffer-Zellen**

Eine Depletion von Thrombozyten hatte, unabhängig davon, ob sie antikörpervermittelt oder durch genetische Ablation der Zellen induziert worden war, keinen Einfluss auf die Anzahl der in die Leber rekrutierten Neutrophilen. Die Tatsache, dass LPS zur Neutropenie und gleichzeitiger Akkumulation von Neutrophilen führt, wurde sowohl in der Lunge als auch in der Leber beschrieben [9, 14, 42, 89, 112, 194, 205, 208]. Darüber hinaus stellten Andonegui *et al.* jedoch fest, dass eine durch Antikörper induzierte Neutropenie die Akkumulation von Thrombozyten in der Lunge verhindert. So seien lediglich die Neutrophilen essenziell für die Sequestration von Thrombozyten in den Lungenkapillaren, die Rekrutierung von Neutrophilen bei einer Depletion der Thrombozyten sei dagegen nicht beeinträchtigt [9]. Intravitalmikroskopische Aufnahmen bestätigten diese Hypothese insofern, dass vor Allem die bereits am Endothel anhaftenden Neutrophilen zur Rekrutierung von Thrombozyten zum Inflammationsherd beitrugen und dagegen fast keine Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und dem Endothel oder zwischen zirkulierenden Neutrophilen und anhaftenden Thrombozyten festgestellt wurden. Erst die darauffolgende Aggregation der Thrombozyten auf den Neutrophilen unter Bildung von PNAs führte zu einer Aktivierung der Neutrophilen und der sich anschließenden Produktion von *neutrophil extracellular traps* (NETs) [19, 111-113].

Auch in den unter IV.5. dargestellten Bildsequenzen intravitalmikroskopischer Aufnahmen der Leber ist die Adhäsion von Neutrophilen auf dem Endothel und deren rollende Fortbewegung zu sehen, während sie scheinbar von Thrombozyten

umschwärmt werden, die auf ihrer Oberfläche binden (siehe Abbildung 53). Ebenso bei der aufgenommenen Efferozytose selbst scheint es, als würden die Thrombozyten den Neutrophilen „geleiten“ und ihm voran von der Kupffer-Zelle phagozytiert (siehe Abbildung 52). Bis zur Fertigstellung dieser Arbeit konnte das Ereignis einer direkten Thrombozyten-medierten Efferozytose in der Leber in der IVM nur wenige Male dargestellt werden, daher müssten, um weitere Erkenntnisse zu gewinnen, weitere Videos in einer größeren Kohorte angefertigt werden. So könnte man beispielsweise untersuchen, wie häufig die Efferozytose von Neutrophilen von Thrombozyten begleitet wird, ob in Thrombozyten-depletierten Tieren tatsächlich weniger Neutrophile efferozytiert werden, oder ob sich die Thrombozyten-medierte Efferozytose vornehmlich in einer definierten Zeitspanne der akuten systemischen Inflammation abspielt. Auch durch eine gezielte Inhibition von Rezeptoren, die laut aktuellem Wissensstand an der Efferozytose beteiligt sind, könnte die Interaktion von Neutrophilen und Thrombozyten demonstriert werden.

Der prozentuale Anteil der von Kupffer-Zellen aufgenommenen Neutrophilen unter LPS-Einfluss war bei Thrombozyten-depletierten Tieren sowohl in der histologischen (siehe IV.2.1.) als auch in der durchflusszytometrischen Analyse signifikant niedriger (siehe IV.2.1.1.), was zusammen mit den *in vivo* gemachten Beobachtungen ein Hinweis auf eine Funktion von Thrombozyten bei der Efferozytose sein könnte. Dabei sollte bei der histologischen Auswertung nicht außer Acht gelassen werden, dass es durch einzelne Fixationsschritte wie der Perfusion der Organe vor der Entnahme zu Veränderungen der im Gewebe befindlichen Zellzahlen oder einer Schädigung des Gewebeverbands kommen kann. Darüber hinaus basierte die manuelle Auswertung auf einem zweidimensionalen Bild, welches jedoch aus einem ursprünglich 12  $\mu\text{m}$  dicken Schnittpräparat generiert wurde. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich teilweise bei dem als Assoziation gewerteten Kontakt zwischen Neutrophilen und Makrophagen lediglich um eine Überlappung in der Z-Ebene handelte, die mit der Reduktion eines dreidimensionalen Gewebeverbands auf ein zweidimensionales Bild wie ein direkter Kontakt der Zellen schien. Zusätzlich handelt es sich bei histologischen Abbildungen immer um Momentaufnahmen: In der durchgeführten Intravitalmikroskopie, wie auch in Abbildung 53 zu sehen, wurde beobachtet, dass die Neutrophilen zum Teil nur vorübergehend in Kontakt mit den Kupffer-Zellen traten, bevor sie sich weiter in der Mikrozirkulation bewegten. Somit könnte es sich

bei einem Teil der als Efferozytose der Neutrophilen gewerteten Assoziationen lediglich um eine vorübergehende Interaktion, nicht aber um einen Abbaumechanismus der Neutrophilen handeln. Zwar konnte die von Thrombozyten begleitete Phagozytose der Neutrophilen in Kupffer-Zellen durch intravitalmikroskopische Aufnahmen (siehe Abbildung 52) dargestellt werden, jedoch müsste der Abbau der Neutrophilen selbst in den Kupffer-Zellen demonstriert werden. Dazu würde sich in der Intravitalmikroskopie beispielsweise die Anwendung von Farbstoffen wie pHrodo anbieten, die erst nach Ansäuerung innerhalb des Phagolysosoms ein Fluoreszenzsignal aufweisen. Durch die Detektion apoptotischer Neutrophiler in der Histologie, beispielsweise mithilfe der TUNEL-Methode (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) wie in der Studie von Shi *et al.* [208], könnte ebenfalls eine temporäre Interaktion von einer tatsächlich vorliegenden Efferozytose unterschieden werden. Ungeachtet der methodischen Limitation der histologischen Auswertung, konnte der Effekt einer verminderten Efferozytoserate in der Leber in Abwesenheit der Thrombozyten darüber hinaus auch in der durchflusszytometrischen Analyse durch eine signifikante Verringerung ( $p=0,0090$ ) der Anzahl an Kupffer-Zell-Neutrophilen-Aggregaten von knapp 50 % bestätigt werden. Damit einhergehend zeigten Neutrophile, die als Aggregate mit Kupffer-Zellen vorlagen, eine mehr als doppelt so hohe Expression von Annexin V als einzelne Neutrophile ( $p=0,0002$ ). Annexin V wurde als Apoptosemarker verwendet, da es an das auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen exprimierte Phosphatidylserin bindet. Auch die Färbung der Zellen mit *Sytox Blue*, das als *viability dye* zur Diskriminierung toter Zellen dient, ergab eine dreimal so hohe *mean fluorescence intensity* (MFI) ( $p=0,0007$ ) der als Aggregate vorliegenden Neutrophilen gegenüber einzelnen Neutrophilen. Zusammengenommen lassen diese Daten darauf schließen, dass zum einen in Abwesenheit von Thrombozyten weniger Efferozytose von Neutrophilen in der Leber stattfindet und zum anderen die Neutrophilen während des Vorgangs der Efferozytose apoptotisch werden, bevor sie in den Kupffer-Zellen abgebaut werden.

Ein schwerwiegenderer klinischer Verlauf in der Sepsis bei Fehlen der Thrombozyten könnte also damit zusammenhängen, dass aktivierte Neutrophile durch Ausschüttung ihres „Waffenarsenals“, das neben NETs auch antimikrobielle Peptide und reaktive Sauerstoffspezies umfasst, eine Schädigung des umliegenden

Gewebes bewirken und dies nicht durch vorherige Phagozytose verhindert werden kann. NETs, die nach Aktivierung der Neutrophilen „explosionsartig“ freigesetzt werden und dabei zum Untergang der Neutrophilen führen [69, 71], tragen zum Einfangen und zur Neutralisation von sowohl bakteriellen als auch viralen, mykotischen und parasitären Erregern bei [69, 72-75]. Interessanterweise konnte in einer *in vitro* Studie von Clark *et al.* [14] gezeigt werden, dass Neutrophile NETs nur in Anwesenheit von Thrombozyten freisetzen, die zuvor durch LPS aktiviert worden waren. In Abwesenheit von Thrombozyten, oder wenn diese nicht in aktivierter Form vorlagen, wurde dagegen keine NETose beobachtet. Die Autoren konnten auch demonstrieren, dass sich die Degranulation von Neutrophilen nach Inhibition von thrombozytenständigem TLR4 signifikant reduzierte und beschrieben NETose daraufhin als thrombozytenabhängigen, genauer gesagt TLR4-abhängigen Mechanismus [14]. Später visualisierten McDonald *et al.* [147] in intravitalmikroskopischen Aufnahmen in septischen Mäusen die Bindung von Thrombozyten auf adhärenen Neutrophilen in der Leber, die auf deren Oberfläche aggregierten. Dies führte zur Bildung von PNAs und zur anschließenden NETose. Auch die Autoren dieser Studie nannten somit die Thrombozyten-Neutrophilen-Interaktion als Auslöser für die Freisetzung von NETs in der LPS- oder *E. coli*-induzierten Sepsis, führten das allerdings nicht auf TLR4, sondern eine  $\beta$ 2-Integrin medierte Interaktion der beiden Zellarten zurück [147]. Beide Studien demonstrierten, dass nach Inhibition der NETose bzw. der Zerstörung der NETs durch DNase I deutlich weniger Bakterien aus der Zirkulation abgefangen werden konnten [14, 147]. *In vivo* führte das zu einer vermehrten Dissemination der Erreger in stromabwärts gelegene Organe [147]. Die NETose als potenter Effektormechanismus während einer akuten systemischen Inflammation ist dabei jedoch nicht ausschließlich als positiv zu bewerten. Kolaczowska *et al.* [209] führten die nach experimenteller Infektion mit MRSA entstandene Schädigung der Leber auf die massive Neutrophilenrekrutierung und die darauffolgende NETose zurück. Die Aktivität einiger proteolytischer Enzyme wie der Neutrophilen Elastase (NE) als Bestandteil der NETs blieb über einen Zeitraum von mehr als 24 Stunden aktiv, was nach Meinung der Autoren die fokalen Nekrosen im unmittelbar anschließenden Gewebe erklären würde. Nach einer Inhibition der NETose beispielsweise durch die Nutzung von *Peptidylarginine deiminase 4* (PAD4)-defizienten Mäusen, reduzierte sich die kollaterale Gewebeschädigung deutlich [209].

So lassen sich sowohl positive als auch negative Aspekte der Neutrophilenaktivierung und NETose nennen, weshalb dieser Effektoormechanismus in der Literatur oftmals als „zweischneidiges Schwert“ bezeichnet wird und einer strengen Regulation durch den Organismus bedürfe [209]. Insgesamt stehen die soeben genannten Aspekte teilweise konträr zu unseren Ergebnissen: Ausgehend von der Theorie, dass die Neutrophilen erst durch die Interaktion mit aktivierten Thrombozyten zur NETose angeregt werden und die NETose darüber hinaus als Hauptursache für die kollaterale Gewebeschädigung genannt wird, könnte angenommen werden, dass eine Depletion der Thrombozyten eher eine Verbesserung des klinischen Zustands in der LPS-induzierten Sepsis zur Folge hat. Im Gegensatz dazu zeigten Tiere, deren Thrombozyten mit dem Antikörper R300 depletiert worden waren, einen signifikant schwerwiegenderen Krankheitsverlauf in den hier durchgeführten Versuchen. Dieser Effekt wurde mithilfe des Sepsis Scores ermittelt und ließ sich sowohl im Modell der sterilen Peritonitis als auch in der akuten Pneumonie erfolgreich reproduzieren (siehe IV.2.1 und IV.2.3.).

Im ALI-Modell wurde darüber hinaus in der Thrombozyten-depletierten Gruppe eine massive Neutrophilenrekrutierung in die Lunge verzeichnet, die mit einem Anstieg von 44 % signifikant erhöht gegenüber der Isotyp-Kontrollgruppe war. Verglichen mit dem Modell der sterilen Peritonitis ergab sich in der durch R300 depletierten Gruppe sogar ein 5,4facher Anstieg der Neutrophilenanzahl in der Lunge. Diese Ergebnisse stehen entgegengesetzt zu denen aus einer Studie von Zarbock *et al.* [54], die im ALI-Modell als Ursache für die Neutrophilenrekrutierung in die Lunge auf dem Endothel anhaftende Thrombozyten sehen, welche die Adhäsion der Neutrophilen begünstigen. Nachdem die Bildung von PNAs durch Depletion der Thrombozyten mithilfe von Busulfan bzw. eines Antikörpers inhibiert worden war, verringerte sich die Rekrutierung von Neutrophilen deutlich, was mit einer reduzierten Mortalität sowie einer Verbesserung des klinischen Outcomes assoziiert war [54].

Zusammenfassend wurden im ALI-Modell nach Depletion der Thrombozyten signifikant mehr Neutrophile in die Lunge rekrutiert bei einer gleichzeitig verminderten Anzahl von Neutrophilen in Leber ( $p=0,2581$ ) und Milz (in letzterer signifikant vermindert,  $p=0,0349$ ). Zusammen mit der signifikant verringerten Efferozytoserate in der Leber lässt das auf einen verminderten Abbau der

aktivierten Neutrophilen in diesem Organ in Abwesenheit der Thrombozyten schließen. Diese würden stattdessen in die periphere Zirkulation zurückkehren und in stromabwärts gelegene Organe wie die Lunge abgeschwemmt werden, wo sie zu einer Schädigung des Gewebes führen. Interessanterweise ergaben Untersuchungen von Jimenez *et al.* [210], dass im Blut zirkulierende Neutrophile von Patienten, die am *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) litten, nicht nur eine verlängerte Zirkulationszeit aufwiesen, sondern auch resistenter gegenüber Apoptose waren als Neutrophile, die aus Kontrollpatienten stammten. Die Autoren schlossen zwar nicht aus, dass die höhere Lebensdauer dieser Neutrophilen Bestandteil einer adäquat ablaufenden Immunantwort waren, allerdings könnte diese aktivierten und Apoptose-beständigen Neutrophilen in Gegenwart von antiapoptotischen Faktoren im Blut auch zur Aufrechterhaltung der Inflammation beitragen und sogar die Entwicklung des Multiorgan dysfunktionssyndrom (MODS) begünstigen [210]. Buckley *et al.* [98] stellten bei Neutrophilen, die, statt in der akuten Inflammation nach ihrer Aktivierung im Gewebe zugrunde zu gehen, zurück ins Blut gelangten, eine höhere inflammatorische Aktivität verglichen mit naiven Neutrophilen fest: So schütteten diese „geprimten“ Neutrophilen (RT-Neutrophilen) größere Mengen ROS aus als solche, die keine reverse Transmigration durchlaufen hatten. Zusätzlich waren die RT-Neutrophilen in einem durchgeführten *in vitro* Assay nicht wie naive Zellen imstande durch einen Monolayer aktivierter Endothelzellen zu migrieren [98]. Laut der Autoren könnte das allerdings bedeuten, dass die geprimten Neutrophilen zwar nicht mehr ins Gewebe auswandern, jedoch stattdessen in der Mikrozirkulation wie dem Kapillarbett der Lunge anhaften/ sequestriert werden, um dort durch einen oxidativen Burst zu einer Gewebeschädigung zu führen [98].

Wie in der Literatur beschrieben, beeinflusst die Efferozytose apoptotischer Neutrophiler durch Makrophagen den weiteren Verlauf der akuten Inflammation positiv: So konnte von Ren *et al.* [211] demonstriert werden, dass apoptotische Neutrophile imstande sind LPS zu binden und damit die Aktivierung anderer Zellen im Rahmen einer überschießenden Immunreaktion zu verhindern: Die systemische Administration apoptotischer humaner Neutrophiler in LPS-behandelte, septische Mäuse führte nicht nur zu einer Verringerung der im Serum befindlichen LPS-Konzentration, sondern war darüber hinaus mit einer geringeren Rekrutierung der Neutrophilen ins Gewebe verbunden. Die Tiere wiesen eine geringere

Letalitätsrate auf, was neben der geringeren Menge an proinflammatorischen Zytokinen auf die Efferozytose der apoptotischen Neutrophilen durch Makrophagen zurückgeführt wurde. Dieser Prozess löste darüber hinaus eine antiinflammatorische Reaktion in den Makrophagen aus, die u.a. nicht nur durch die Ausschüttung von IL-10 die Auflösung der Inflammation vorantrieb, sondern überdies die Regeneration des Gewebes hin zum ursprünglichen Zustand förderte [211, 212].

#### **4. Thrombozytendepletion bewirkt die vermehrte Produktion proinflammatorischer Zytokine**

Um zu untersuchen, ob die bisher dargestellten Ergebnisse miteinander in Einklang zu bringen waren, wurden Plasmaproben der Thrombozyten-depletierten Tiere mithilfe eines LEGENDplex-Assays analysiert. Sollten Thrombozyten tatsächlich an der Efferozytose von Neutrophilen in der Leber beteiligt sein und diese infolge des Fehlens von Thrombozyten bei depletierten Tieren vermindert ablaufen, könnte das den schwerwiegenderen Krankheitsverlauf in der LPS-induzierten Sepsis erklären: Ohne die durch die Efferozytose induzierten antiinflammatorischen Signalwege in den Makrophagen würden auch weniger antiinflammatorische Zytokine von diesen produziert, um so die Immunreaktion zu begrenzen. Und tatsächlich ergab die Analyse des LEGENDplex-Assays, dass im Plasma Thrombozyten-depletierter Tiere verschiedene proinflammatorisch wirkende Zytokine, darunter TNF- $\alpha$ , CXCL-1, IL-6, IL-12p40, IL-18 und IP-10, im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht waren (siehe IV.2.1.2.)

TNF- $\alpha$  (Cachectin) wird durch aktivierte Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten und Mastzellen produziert und ist imstande einen Schockzustand auszulösen, so kam es in Ratten durch die Injektion von TNF- $\alpha$  u.a. zu einer metabolischen Azidose, Hypotension und hämorrhagischen Infarkten der inneren Organe [199, 213]. In Hunden konnten als „Stressreaktion“ darauf vermehrt Glucocorticoide, Katecholamine und Glukagon im Plasma gemessen werden [214]. Zusätzlich fördert TNF- $\alpha$  die Produktion von Acharidonsäuremetaboliten, die zur Entwicklung eines septischen Schockgeschehens beitragen sowie die Induktion der akuten Phase Reaktion in der Leber zusammen mit IL-6 und IL-11 [197, 214, 215]. Entweder direkt oder indirekt durch die vermehrte Produktion von IL-1 wird neben einer

Hyperthermie auch die Produktion von IL-6 in anderen Zelltypen stimuliert, was letztendlich eine Zytokinkaskade auslöst und somit zur Aufrechterhaltung der inflammatorischen Antwort beiträgt [197, 215].

CXCL-1, ebenfalls durch Makrophagen und Mastzellen als Reaktion auf LPS produziert, fördert sowohl die Rekrutierung von Neutrophilen zum Inflammationsherd als auch die Mastzelldegranulation [202, 203].

IL-12 führt zusammen mit IL-18 zur Produktion von IFN- $\gamma$  durch Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen, wodurch die zelluläre Reaktion auf LPS weiter verstärkt wird [216-218].

Im Hinblick auf die soeben genannten Auswirkungen der erhöhten Zytokinproduktion scheint es nicht verwunderlich, dass bei den Thrombozyten-depletierten Tieren schwerwiegendere klinische Symptome und eine erhöhte Mortalität auftraten. Zusammen mit der verminderten Efferozytoserate würde das die Theorie der durch Thrombozyten vermittelten Efferozytose unterstützen und bestätigen, dass die Efferozytose selbst einen immunmodulatorischen Effekt auf die Makrophagen hat, indem weniger proinflammatorische bzw. eher antiinflammatorische Zytokine produziert werden. Shi *et al.* vermuten hinter der positiven Auswirkung der Efferozytose, dass die Neutrophilen, ob apoptotisch oder nicht, aufgenommen werden noch bevor sie ihr Repertoire an zytotoxischen Stoffen freisetzen können [16].

Im Gegensatz zur Nekrose behalten apoptotische Zellen bis zuletzt ihre Membranintegrität, was das Freiwerden der zytotoxischen Bestandteile aus den Granula der Neutrophilen ins umliegende Gewebe verhindert [212]. Dennoch kann das Ausbleiben der Beseitigung apoptotischer Zellen die Entstehung von Gewebnekrosen nach sich ziehen und damit die Inflammation noch verstärken [212]. Es konnte bereits ein Zusammenhang zwischen gestörten/ verringerten Abbaumechanismen von Zellen und der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen sowie Autoimmunerkrankungen wie *Lupus erythematosus* hergestellt werden, was die Bedeutung des Efferozytosemechanismus hinsichtlich der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase noch einmal hervorhebt [18, 212].

Auch die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse des Blutes ergaben in der Gruppe der Thrombozyten-depletierten Mäuse eine um 43 % niedrigere Expression von IL-10 ( $p=0,0328$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe. IL-10, was



durch CD4<sup>+</sup>/ CD8<sup>+</sup> T-Zellen und aktivierte B-Zellen produziert wird, hemmt die IFN- $\gamma$  Produktion von NK-Zellen und überdies die durch IL-4 und IFN- $\gamma$  induzierte MHCII-Expression von Monozyten [197, 219, 220]. Dies unterstützt zusammen mit den Ergebnissen des LEGENDplex-Assays die Hypothese der fehlenden antiinflammatorischen Zytokinantwort durch Makrophagen beim Fehlen der Thrombozyten und gleichzeitig verminderter Efferozytose von Neutrophilen. Die Analyse von Plasmaproben bringt jedoch einen Nachteil mit sich, da die Konzentration der systemischen Zytokine gemessen wurde. Somit kann keine Aussage über die Quelle der Zytokine getroffen werden, um zu bestätigen, dass es sich um einen vornehmlich in der Leber ablaufenden Mechanismus handelt. Obgleich es sich beim verwendeten LEGENDplex-Assay offiziell um einen Nachweis für makrophagenspezifische Zytokine handelt, werden diese, wie bereits beschrieben, nicht ausschließlich von Makrophagen freigesetzt. Um nachzuweisen, dass die veränderte Zytokinkonzentration speziell auf die Kupffer-Zellen in der Leber zurückzuführen ist, müsste dieser Vorgang dazu isoliert von anderen Zellpopulationen und Geweben betrachtet werden.

Ungeklärt bleibt zu diesem Zeitpunkt weiterhin, inwiefern Thrombozyten tatsächlich eine protektive Funktion einnehmen könnten und die Efferozytose der Neutrophilen medieren. Wie in den angefertigten intravitalmikroskopischen Aufnahmen unter IV.5 dargestellt, schienen die Thrombozyten die Neutrophilen während der Aufnahme in die Kupffer-Zelle zu umschwärmen. Als eine Art Bindeglied interagierten sie sowohl mit den Neutrophilen als auch mit den Kupffer-Zellen, um evtl. sogar zusammen mit dem Neutrophilen efferozytiert zu werden.

## **5. Untersuchung des Einflusses von P-Selectin auf eine mögliche Thrombozyten-assistierte Efferozytose von Neutrophilen in der Leber**

In den durchgeführten Versuchen wurde untersucht, inwiefern P-Selectin als möglicher Rezeptor an der Interaktion zwischen Thrombozyten und Neutrophilen und damit auch an der Efferozytose von Neutrophilen beteiligt sein könnte. Zwar besitzen Thrombozyten eine Reihe unterschiedlicher Oberflächenrezeptoren, über die die Bindung an Leukozyten vermittelt wird, allerdings erschien eine Beteiligung

von P-Selectin am Abbau von Neutrophilen in der Leber im Hinblick auf bisher veröffentlichte Ergebnisse wahrscheinlich. In einer Studie von Shi *et al.* [208] wurde zunächst eine Akkumulation von Neutrophilen in der Leber nach systemischer LPS-Injektion festgestellt. Diese erreichte ihren Höchstwert sechs Stunden post LPS und fiel anschließend innerhalb von 24 Stunden wieder auf den Ausgangswert zurück. Dieser Effekt wurde auch in den hier durchgeführten Versuchen einer sterilen Peritonitis beobachtet und bereits unter V.1. diskutiert. Gleichzeitig konnten die Autoren der Studie jedoch mit einer histologischen Analyse der Leber zeigen, dass die Veränderungen der Neutrophilenzahl in den hepatischen Sinusoiden mit der dortigen Expression von P-Selectin korrelierten: So stieg auch die P-Selectin Expression bis zum Zeitpunkt von sechs Stunden nach LPS-Injektion an, um parallel zu den dort vorgefundenen Neutrophilen wieder abzufallen. P-Selectin wurde dabei nicht nur vom Endothel, sondern auch von arretierten Thrombozyten exprimiert, die mit den Neutrophilen, aber auch dem Endothel und den Kupffer-Zellen in Kontakt standen. Mithilfe der TUNEL-Methode wurden apoptotische Neutrophile detektiert: Die Zahl der TUNEL-positiven Neutrophilen stieg nach der LPS-Injektion in der Leber signifikant an, wobei nach sechs Stunden mehr als die Hälfte der Neutrophilen apoptotisch waren und die meisten von Kupffer-Zellen aufgenommen worden waren [208]. Die Theorie, dass sowohl P-Selectin als auch die Kupffer-Zellen am Abbau der Neutrophilen beteiligt seien, wurde dadurch bestätigt, dass sich nach einer Inhibition von P-Selectin nicht nur die absolute Anzahl der Neutrophilen in der LPS-induzierten Sepsis, sondern auch die Anzahl der phagozytierten Neutrophilen signifikant reduzierte. Den größten Effekt einer verminderten Efferozytose der Zellen hatte allerdings die Ablation der Kupffer-Zellen durch Gadoliniumchlorid ( $GdCl_3$ ) [208]. Diese chemische Verbindung wird häufig zur Untersuchung der Beteiligung von Kupffer-Zellen in Erkrankungen der Leber, darunter der hepatischen Steatose, des Ischämie-Reperfusionssyndroms oder der toxischen Leberschädigung angewendet [221]. In einer Studie von Hardonk *et al.* [222] konnte gezeigt werden, dass andere Arten von Makrophagen nur geringfügig durch eine systemische Administration von  $GdCl_3$  beeinflusst werden und daher somit gut geeignet ist, um die Funktionen von Kupffer-Zellen isoliert von anderen Makrophagen zu betrachten. Die Wirkungsweise ist noch nicht abschließend geklärt, ist aber wahrscheinlich auf die Beeinflussung intrazellulärer Kalziumströme zurückzuführen [223, 224]: Neben einer Inhibition der

phagozytotischen Aktivität kommt es daraufhin zur Ablation der Kupffer-Zellen [222].

Die Ergebnisse konnten durch die hier vorliegenden Versuche teilweise bestätigt werden, so wurde in P-Selectin KO-Tieren in der sterilen Peritonitis zumindest ein Trend zu weniger Neutrophilen in der Leber festgestellt. Allerdings sind beide Studien nicht unmittelbar miteinander vergleichbar, da Shi *et al.* [208] Wildtypmatten in ihrem Versuch verwendeten, denen sie niedermolekulares Heparin (LMWH, *low molecular weight heparin*) oder einen anti-P-Selectin Antikörper verabreichten und keine transgene Linie wie die hier verwendeten P-Selectin-KO-Tiere. Nicht auszuschließen wäre z.B. eine dosisabhängige Beeinflussung der Ergebnisse sowie ein vorzeitiger Abbau der Antagonisten/-Antikörper noch vor Ende des inflammatorischen Stimulus im Gegensatz zu einer reinen Knockout-Linie. Shi *et al.* [208] stellten die Hypothese auf, dass die Neutrophilen in der systemischen Inflammation vornehmlich von P-Selectin-exprimierenden Thrombozyten gebunden würden, um ihre Bindung am Endothel zu erleichtern. Die Aufnahme der von Thrombozyten opsonierten Neutrophilen durch Kupffer-Zellen würde somit gefördert werden. Damit bildete die Studie den Ausgangspunkt für die hier aufgestellte Hypothese, dass die P-Selectin-exprimierenden Thrombozyten als Bindeglied zwischen Neutrophilen und Kupffer-Zellen fungieren, wie es in den intravitalmikroskopischen Aufnahmen den Anschein hatte.

In den durchgeführten Versuchen konnte bei P-Selectin KO-Tieren unter dem Einfluss von LPS kein Unterschied in der Anzahl der rekrutierten Neutrophilen in Lunge, Leber oder Milz festgestellt werden. In der Leber könnte das z.T. auf einen Selectin-unabhängigen Adhäsionsmechanismus unter Beteiligung von CD44 und Hyaluron zurückgeführt werden (siehe II.4.2.), steht aber im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Daten in der Literatur. Diese stellten in P-Selectin defizienten Mäusen zwar eine Rekrutierung von Neutrophilen in die Leber fest, wobei jedoch die Anzahl der in den Sinusoiden befindlichen Zellen im Gegensatz zu Kontrolltieren signifikant vermindert war und die Neutrophilen insgesamt weniger Endothelkontakt (sog. *rolling*) zeigten [225, 226]. Ob die verminderte Rekrutierung der Zellen dabei eher von der P-Selectin Expression des Endothels oder der Thrombozyten abhängig war, blieb zunächst unklar [226]. Für eine Funktion der Thrombozyten würde allerdings sprechen, dass die in der Leber sequestrierten

Neutrophilen im engen räumlichen Kontakt mit den Thrombozyten standen [205, 208].

Auch wird in der Literatur bei P-Selectin defizienten Tieren eine Neutrophilie beschrieben, was ebenfalls auf einen verminderten Abbau auch unter basalen Bedingungen hinweisen könnte [225, 226]. Dies ließ sich im septischen Zustand durch das Differentialblutbild in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigen (siehe IV.3.1.). Dort ergab die Analyse des aus der *V. facialis* entnommenen Blutes zum Zeitpunkt vier Stunden nach LPS-Injektion keine wesentlichen Unterschiede zwischen P-Selectin KO und Kontrolltieren in Bezug auf die Anzahl der Neutrophilen ( $p=0,8303$ ). Auch die Anzahl der peripher zirkulierenden Gesamtleukozyten ( $p=0,7823$ ) und der Thrombozyten ( $p=0,7035$ ) war im Vergleich zu Kontrolltieren nahezu unverändert, was mit einer Studie von Mayadas *et al.* [226] übereinstimmt: Diese hatten das Blut von P-Selectin KO-Tieren untersucht und festgestellt, dass diese zwar keine Unterschiede bezogen auf die Gesamtleukozyten- und Thrombozytenzahl zeigten, jedoch einen 2,4fachen Anstieg der Neutrophilen unter basalen Bedingungen aufwiesen.

Sowohl P-Selectin KO-Tiere als auch die generierten P-Selectin KO-Chimären zeigten keinen Unterschied in der Anzahl der von Kupffer-Zellen aufgenommenen Neutrophilen. Auch die Efferozytoserate, also der prozentuale Anteil der aufgenommenen Neutrophilen bezogen auf die Gesamtzahl der Neutrophilen, war entgegen der ursprünglich angenommenen Hypothese in Abwesenheit von P-Selectin nicht vermindert. Da es also nicht den Anschein hatte, dass eine Thrombozyten-assistierte Efferozytose der Neutrophilen hauptsächlich durch P-Selectin mediiert ist, wurde nachfolgend nach einem alternativen Mechanismus gesucht. Bei den Überlegungen zum grundlegenden Mechanismus und den beteiligten Rezeptoren der einzelnen Zellen, sollte hierbei jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei der Efferozytose um einen mehrstufigen Prozess handelt, wie bereits unter V.3. beschrieben. Allein bezogen auf die direkte Interaktion zwischen apoptotischer Zelle und Phagozyt wurden laut Elliott *et al.* [227] bereits mehr als zwölf unterschiedliche Efferozytoserezeptoren zur Erkennung von Phosphatidylserin auf der Oberfläche der apoptotischen Zelle identifiziert. Zusätzlich sind teilweise lösliche Faktoren, die als Oponine bezeichnet werden, involviert, beispielsweise MFG-E8, über die eine indirekte

Bindung der apoptotischen Zellen an den Efferozytosrezeptor erst möglich wird [227]. Als Konsequenz ergibt sich die Frage, ob durch die Betrachtung eines einzelnen Bestandteils dieses Prozesses überhaupt ein Rückschluss auf den zugrundeliegenden Mechanismus der Efferozytose gezogen werden kann. Aus zeitlichen Gründen wurden in dieser Arbeit daher nur zwei Rezeptoren untersucht: P-Selectin und nachfolgend das auf Kupffer-Zellen exprimierte *T-cell Ig and mucin domain 4* (TIM-4).

## **6. Untersuchung des Einflusses von TIM-4 auf die Efferozytose von Neutrophilen in der Leber**

Die Genfamilie der TIM-Rezeptoren, darunter auch TIM-4, gehört zu den Zelloberflächenproteinen, von denen acht (TIM-1 bis TIM-8) bei der Maus und lediglich drei im Menschen (TIM-1, 3 und 4) identifiziert wurden [92]. TIM-4 wird als einziger dieser Rezeptoren nicht von T-Zellen, sondern stattdessen von Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert [204]. Indem TIM-4 Phosphatidylserin auf apoptotischen Zellen bindet, initiiert es damit die Aufnahme apoptotischer Zellen im Rahmen der Efferozytose [92, 204]. Das wiederum trägt zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase bei: Der fehlende Abbau apoptotischer Zellen führte in einem Modell TIM-4 defizienter Mäuse zur übermäßigen Aktivierung von Lymphozyten und der Entwicklung einer systemischen Autoimmunität [228, 229].

In den durchgeführten Versuchen sollten die Auswirkungen einer gezielten Inhibition von TIM-4 mittels eines anti-TIM-4 Antikörpers in der akuten systemischen Inflammation untersucht werden.

Die histologische Analyse ergab dabei keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Anzahl der sich in der Leber und Milz befindlichen Neutrophilen (siehe IV.4.1.), jedoch war die Anzahl der efferozytierten Neutrophilen in der Leber um 37 % ( $p=0,0187$ ) und in der Milz um 28 % ( $p=0,0293$ ) gegenüber der Isotyp-Kontrollgruppe vermindert. Auch der prozentuale Anteil der efferozytierten Neutrophilen (Efferozytoserate) sank nach Inhibition von TIM-4 um 16 % (Leber,  $p=0,0220$ ) bzw. 6 % (Milz,  $p=0,2301$ ) ab. Im Gegensatz dazu war die Zahl der im Blut zirkulierenden Neutrophilen verglichen mit der Kontrollgruppe

um mehr als die Hälfte (58 %,  $p=0,0422$ ) erhöht. Ebenso war ein Anstieg der Gesamtleukozytenzahl um rund 39 % ( $p=0,0931$ ) festzustellen, wohingegen die Anzahl der Thrombozyten unverändert blieb.

Diese Ergebnisse stimmen mit den oben genannten Studien überein, da durch die Inhibition von TIM-4 die Efferozytose von Neutrophilen sowohl in der Leber als auch in der Milz reduziert wird und die Neutrophilen, statt in diesen Organen abgebaut zu werden, zurück in die Zirkulation gelangen, was den Anstieg der peripheren Leukozyten- und Neutrophilenzahl erklären würde.

Interessanterweise zeigten die Tiere trotz des verminderten Abbaus der Neutrophilen keinen schwerwiegenderen Sepsisverlauf. Dagegen hätte man erwarten können, dass falls die Neutrophilen stattdessen in stromabwärts gelegene Organe wie die Lunge abgeschwemmt würden (siehe V.3.), eine daraus resultierende Gewebeschädigung zu einem höheren Sepsis Score führen könnte. Eine Studie von Ji *et al.* [92] verweist dagegen auf einen negativen Effekt von TIM-4 im hepatischen Ischämie-Reperusionsmodell: TIM-4 defiziente Tiere bzw. solche, bei denen ein anti-TIM-4 Antikörper systemisch verabreicht wurde, zeigten in der histologischen Auswertung weniger Gewebeschädigung in Form von ödematösen Veränderungen, Nekrosen oder Stauung der hepatischen Sinusoide. Auch die Konzentration gemessener Alanin-Amino-Transferase (sALT) verringerte sich gegenüber der Kontrollgruppe. Die Autoren begründeten das mit der Inhibition der durch TIM-4 initiierten proinflammatorischen Antwort in Makrophagen: Nach Inhibition/ Ablation von TIM-4 wurden weniger proinflammatorischer Zytokine, darunter TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, gemessen [92]. Diese Ergebnisse stehen nicht nur im Gegensatz zu den bisher dargestellten Studien, in denen postuliert wird, dass die Efferozytose in Makrophagen antiinflammatorische Signalwege induziert (siehe V.4) um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern und die Inflammation zu limitieren. Auch die zugrundeliegende Hypothese dieser Arbeit, die die verminderte Efferozytose von Neutrophilen durch Kupffer-Zellen mit einem schwerwiegenderen Krankheitsverlauf in der LPS-induzierten Sepsis und einer erhöhten Konzentration proinflammatorischer Zytokine in direkten Zusammenhang setzt, steht zu den Ergebnissen der Studie von Ji *et al.* in Kontrast. Da Ji *et al.* [92] in ihrer Studie mit der IRI allerdings ein anderes Modell untersuchten und nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Aktivierung von TIM-4 in diesem Modell andere Signalwege

als in der LPS-induzierten Sepsis initiiert, sind beide Studien nicht unbedingt miteinander vergleichbar. Die Tatsache, dass im hier durchgeführten Versuch kein Unterschied im Sepsis Score der beiden Gruppen festzustellen war, könnte auch damit begründet werden, dass das auf den Kupffer-Zellen befindliche TIM-4 zwar an Phosphatidylserin auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen bindet, jedoch zur vollständigen Aufnahme der Zellen mit weiteren Rezeptoren wie MerTK und Integrin $\beta$ 1 kooperieren muss [18]. MerTK (Mer-Tyrosin-Kinase) gehört zur TAM-Familie (Tyro3-Axl-MerTK) und fördert als Verbindungsstelle zwischen der Erkennung und Aufnahme apoptotischer Zellen deren Phagozytose. Eine MerTK-Defizienz bewirkte im Modell des akuten Leberversagens (*acute liver failure*, ALF) einen drastischeren Krankheitsverlauf, bei dem die histologische Analyse eine Erhöhung der MPO-positiven (Myeloperoxidase) Neutrophilen ergab [18, 24]. Zudem kommt dem Enzym eine immunmodulatorische Funktion zu, da es in Makrophagen die Produktion antiinflammatorischer Zytokine bewirkt [24]. So könnte es sein, dass die Inhibition von TIM-4 in den vorliegenden Versuchen zwar zu einer verringerten Efferozytose der Neutrophilen führte, jedoch das eigentlich induzierte *postengulfment-signaling* erst durch MerTK initiiert wird, was die vermehrte Gewebeschädigung bei MerTK-Defizienz erklären würde. Interessant wären in diesem Zusammenhang weiterführende Untersuchungen, wie z.B. die Messung pro-/ und antiinflammatorischer Zytokine nach Inhibition von TIM-4 im Modell einer LPS-induzierten Sepsis. Zudem stellt sich die Frage, inwiefern Thrombozyten an der Bindung apoptotischer Neutrophiler an Rezeptoren wie TIM-4 beteiligt sein könnten. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden [230, 231], dass Inflammation zu einem systemischen Anstieg einer spezialisierten Thrombozyten-Subpopulation, sog. prokoagulanter Thrombozyten, führt, die große Mengen an Phosphatidylserin (PS) exprimieren. Eine Bindung prokoagulanter, PS-positiver Plättchen an gealterte oder reaktive Neutrophile könnte so deren Abbau in hepatischen Kupffer-Zellen fördern, und durch TIM-4-Blockade effektiv supprimiert werden. Auch eine Depletion von Thrombozyten mit anschließender Blockade von TIM-4 wäre in diesem Zusammenhang denkbar.

## VI. AUSBLICK

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen auf eine protektive Funktion von Thrombozyten bei der Efferozytose von Neutrophilen im Rahmen einer akuten systemischen Entzündung schließen, die, vermittelt durch eine antiinflammatorische Signalkaskade in Makrophagen der Leber, zur Limitierung der Inflammation beiträgt. So könnte verhindert werden, dass aktivierte Neutrophile, statt in der Leber phagozytiert und unschädlich gemacht zu werden, in der Zirkulation verbleiben und in stromabwärts gelegenen Organen eine Gewebeschädigung verursachen. Welche Rezeptoren an der Interaktion von Neutrophilen und Thrombozyten beteiligt sind, um die Efferozytose der Neutrophilen zu ermöglichen bzw. zu fördern, bedarf weiterer Untersuchungen. Zum einen könnten Thrombozyten, wie es sich in den intravitalmikroskopischen Aufnahmen darstellt, als „Bindeglied“ zwischen den Neutrophilen und Kupffer-Zellen fungieren, zum anderen könnten sie durch die Bindung an Neutrophile in diesen eine apoptotische Signalkaskade induzieren.

Eine Isolation von Kupffer-Zellen aus R300 depletierten Tieren mit anschließendem *RNA-sequencing* könnte Aufschluss darüber geben, ob das Fehlen von Thrombozyten und die sich daraus ergebende verminderte Efferozytose Auswirkungen auf die Genexpression dieser Zellen hat. Zusätzlich ist eine Visualisierung der Phagozytose sowohl in der histologischen Analyse als auch bei intravitalmikroskopischen Aufnahmen anzustreben, was durch spezielle Farbstoffe wie pHrodo erreicht werden könnte. Diese fluoreszieren erst nach Abfall des pH-Werts, wie es nach erfolgreicher Phagozytose unter Bildung des Phagolysosoms der Fall ist [232].

Durch die Kreuzung der Mauslinie Clec4f-Cre-tdTomato mit Tieren der Linie ROSA26iDTR ist neben der genauen Identifikation der Kupffer-Zellen durch spezifisches Fluoreszenzsignal in tdTomato auch eine Ablation dieser Zellen mithilfe von Diphterietoxin möglich [233]. Hierdurch könnten die Auswirkungen einer gezielten Eliminierung der Kupffer-Zellen und dadurch auch die Rolle der Leber in der akuten systemischen Inflammation im Hinblick auf die Dynamik der Neutrophilen und das klinische Outcome untersucht werden.

Nach der Isolation von Neutrophilen aus septischen bzw.



Thrombozyten-depletierten Tieren wäre auch die Durchführung einer Proteomanalyse denkbar. Das Proteom wird als „Gesamtheit der Proteine eines Organismus“ definiert und variiert in seiner Zusammensetzung bezüglich der „Menge und Aktivität der einzelnen Proteine“ [234]. Auch hier könnte eine Auswirkung des Fehlens der Thrombozyten auf die Neutrophilen selbst bzw. Veränderungen im Phänotyp bei verminderter Apoptoserate aktivierter Neutrophiler detektiert werden.

Zusätzlich könnten *in vitro* Phagozytoseassays etabliert werden, indem Kupffer-Zellen isoliert und mit aktivierten Neutrophilen und Thrombozyten inkubiert werden. Mithilfe von Antikörpern oder Inhibitoren wären die Auswirkungen einer gezielten Inhibition einzelner Rezeptoren dieser drei Zellarten auf die Efferozytose möglich.

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Thrombozyten eine protektive Funktion während der LPS-induzierten, akuten systemischen Inflammation einnehmen, indem sie den Abbau aktivierter Neutrophiler durch gewebsständige Makrophagen der Leber fördern und somit das Auftreten einer überschießenden Immunreaktion verhindern.

Durch das Modell der LPS-induzierten, sterilen Peritonitis in C57BL/6J Mäusen wurde zunächst das Migrationsverhalten von Thrombozyten und Neutrophilen untersucht. Bereits eine Stunde nach intraperitonealer Injektion von LPS kam es zu einem deutlichen Abfall zirkulierender Thrombozyten und Neutrophilen bei gleichzeitiger Akkumulation dieser Zelltypen in der Mikrozirkulation der Leber. Die Neutrophilenansammlungen waren vermehrt in den hepatischen Sinusoiden zu finden, wobei die histologische Analyse ergab, dass ein Großteil der Zellen dabei mit Kupffer-Zellen assoziiert war.

Eine antikörpervermittelte Depletion der Thrombozyten wirkte sich sowohl in der sterilen Peritonitis als auch im Modell der akuten Pneumonie (ALI, *acute lung injury*) negativ auf das Überleben der Tiere und die Intensität der klinischen Symptomatik aus. Auch in der Humanmedizin ist eine Sepsis oft mit dem Auftreten einer Thrombozytopenie assoziiert, wobei ein umgekehrter Zusammenhang zwischen dem Schweregrad und der Thrombozytenzahl besteht. Gleichzeitig ergaben die histologische und durchflusszytometrische Analyse der Leber, dass bei Fehlen der Thrombozyten weniger Neutrophile von Kupffer-Zellen aufgenommen worden waren. Daraus ergab sich die Hypothese, dass Thrombozyten, wie auch zuvor in intravitalmikroskopischen Aufnahmen beobachtet worden war, die Aufnahme der Neutrophilen in Kupffer-Zellen (Efferozytose) fördern und dass dieser Effekt sich positiv auf das klinische Outcome der Tiere auswirken könnte.

P-Selectin wird nach Gabe von LPS sowohl auf der Oberfläche des Endothels als auch auf Thrombozyten exprimiert und vermittelt über seinen Liganden PSGL-1 auf Neutrophilen die Bildung von *platelet neutrophil aggregates* (PNAs, Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregaten) [8, 205, 208]. Durch die Verwendung von P-Selectin KO-Mäusen sollte untersucht werden, inwiefern sich

das Fehlen von P-Selectin auf die Efferozytose der Neutrophilen im Peritonitismodell auswirkt. Es konnte allerdings keine wesentliche Verminderung der Anzahl aufgenommener Neutrophiler in der Leber festgestellt werden. Da der Einfluss des ebenfalls P-Selectin exprimierenden Endothels ausgeschlossen werden sollte, wurde der Versuch in dafür eigens generierten Knochenmarkschimären wiederholt, die zwar P-Selectin auf dem Endothel, nicht jedoch auf den Thrombozyten aufwiesen. Auch hier ergab sich keine Verminderung der Efferozytoserate. Daraufhin wurde der Fokus auf den Rezeptor TIM-4 gelegt, der auf Kupffer-Zellen exprimiert wird und von dem bekannt ist, dass er an der Aufnahme apoptotischer Zellen beteiligt ist [92]. Eine antikörpervermittelte Blockade von TIM-4 führte zur signifikanten Verringerung der Efferozytoserate in der Leber bei einem gleichzeitig signifikanten Anstieg der im Blut befindlichen Neutrophilen. Dies würde nahelegen, dass durch den fehlenden Abbau die Neutrophilen in der Zirkulation verbleiben, um daraufhin in stromabwärts gelegene Organe wie die Lunge abgeschwemmt zu werden und infolgedessen zu einer Schädigung des Gewebes führen. Durchflusszytometrische Untersuchungen des murinen Plasmas zeigten außerdem, dass bei Thrombozyten-depletierten Tieren die Konzentration proinflammatorischer Zytokine, darunter  $\text{TNF-}\alpha$  und CXCL-1, signifikant erhöht waren, was wiederum auf die verminderte Efferozytose zurückgeführt wurde, von der bekannt ist, dass sie in Makrophagen eine antiinflammatorische Signalkaskade zur Auflösung der Inflammation induziert [227]. Es ist also anzunehmen, dass eine schwerwiegendere klinische Symptomatik während einer Sepsis und die damit assoziierte Thrombozytopenie in direktem Zusammenhang mit dem verminderten Abbau der aktivierten Neutrophilen steht. Durch weiterführende Untersuchungen könnten in Zukunft zugrundeliegende Rezeptor-Ligand Interaktionen definiert und als neuartige Therapieansätze eingesetzt werden.

## VIII. SUMMARY

The aim of this study was to investigate if platelets might play a protective role during acute systemic inflammation. By promoting the efferocytosis of activated neutrophils via tissue-resident macrophages in the liver they could prevent an exaggerated immune response.

In a sterile peritonitis model in C57/B6J mice we took a closer look at the migratory behavior of platelets and neutrophils. One hour after the intraperitoneal LPS administration the number of circulating platelets and neutrophils decreased while the histological analysis revealed their accumulation in the microcirculation of the liver, accompanied by endothelial fibrin depositions. Most of the neutrophils were associated with Kupffer cells.

Mice lacking platelets after antibody-mediated depletion showed severe clinical symptoms and higher mortality in both sterile peritonitis and acute lung injury (ALI). It is known that in human medicine septic patients also often show thrombocytopenia indicating that a negative correlation between number of platelets and clinical outcome exists. In our experiments less neutrophils were associated with Kupffer cells when platelets were depleted, confirmed not only by histological analysis and flow cytometry, but also by performing intravital microscopy in the liver. As a result, we hypothesized that platelets could support the uptake of neutrophils, called efferocytosis, and therefore improve the clinical outcome of the mice.

P-Selectin is upregulated on the surface of endothelial cells and platelets after inflammatory stimuli like LPS mediating the formation of PLAs (platelet-leukocyte-aggregates) via its ligand PSGL-1 on neutrophils [8, 205, 208]. By using P-Selectin KO mice in our sterile peritonitis model we investigated whether P-Selectin on platelets mediates the efferocytosis of neutrophils, however, the number of engulfed neutrophils didn't decrease in the absence of P-Selectin. Next, we generated bone marrow chimeras, where P-Selectin only was missing on platelets to exclude the impact of P-Selectin expression on the endothelium, but as described above no difference in efferocytosis was observed. We then focused on TIM-4, a surface marker expressed by Kupffer cells, which is known to mediate efferocytosis of apoptotic cells [92]. Inhibition of this receptor via intravenous

---

administration of a blocking antibody resulted in a significant reduction of efferocytosis in the liver, accompanied by increasing numbers of circulating neutrophils. Based on these results we assumed that neutrophils, if not phagocytosed, remain in the bloodstream, and get flushed in downstream organs like the lung, where they are able to cause harmful tissue damage. Furthermore, flow cytometry analysis of septic plasma obtained from platelet-depleted mice showed significantly higher concentrations of proinflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$  and CXCL-1. We attributed this to a decreased efferocytosis, which is usually known to induce an anti-inflammatory signaling in macrophages. This, in turn, facilitates the resolution of inflammation [227]. Taken together we propose a causal relation between thrombocytopenia, combined with severe symptoms in sepsis, and a reduced degradation of activated neutrophils. Though the underlying mechanisms remain uncovered, their disclosure is crucial for finding new therapeutic strategies.

**IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung
ACD	<i>Acid-citrate-dextrose</i>
ALF	<i>Acute Liver Failure,</i>
ALI	<i>Acute Lung Injury,</i> akute Pneumonie
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	<i>Antigen-Presenting-Cell,</i> Antigen-präsentierende Zelle
APS	Anti-Phospholipidsyndrom
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome,</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BUN	Harnstoff-Stickstoff (Blutharnstoff)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C301	Isotyp-Kontrollantikörper
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAP	<i>community-acquired pneumonia,</i> ambulant erworbene Pneumonie
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CLEC4F	<i>C-Type Lectin Domain Family 4 Member F</i>
COX-2	Cyclooxygenase-2
cm	Zentimeter
CXCL1, 2	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 1, 2</i>
CXCR-4	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 4</i>
CREA	Kreatinin
d	Tag(e)
DAMPs	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DIC	Differenzieller Interferenz-Kontrast
DPEP-1	Dipeptidase 1
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
DVT	<i>Deep vein thrombosis</i>

---

ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fac.	<i>Facies</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FcR	<i>fragment crystallizable receptor</i>
FDR	<i>False discovery rate</i> , Falscherkennungsrate
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Association</i>
FOV	<i>Field of view</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
Fy	<i>Duffy-antigen receptor</i>
G	Gauge
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
G-CSF	<i>Granulocyte-colony-stimulating-factor</i>
GDA	Glutaraldehyd
GdCl <sub>3</sub>	Gadoliniumchlorid
GM-CSF	Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor
GP	Glykoprotein
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HMDS	Hexamethyldisilazane
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
HSA	Humanes Serumalbumin
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
iCre	Cre-Rekombinase
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRI	<i>ischemic reperfusion injury model</i> , Ischämie-Reperusionsmodell
i.v.	intravenös
IVC	<i>Individually ventilated cabinet</i>
JAM-C	<i>Junction-endothelial-molecule C</i>
kg	Kilogramm

---

KG	Körpergewicht
KO	<i>Knockout</i>
IVC	<i>Individually Ventilated Cage</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
Lig.	<i>Ligamentum</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRRC32	<i>Leucine-Rich Repeat Containing 32</i>
LSEC	<i>Liver Sinusoidal Endothelial Cell</i>
LTB4	<i>Leukotrien B4</i>
MAC	Minimale alveoläre Konzentration
Mac-1	Integrin $\alpha M\beta 2$
MerTK	<i>MER Proto-Oncogene, Tyrosine Kinase</i>
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9
MPO	Myeloperoxidase
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response protein</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCD	<i>Non-communicable disease</i> , nicht-übertragbare Krankheit
NE	Neutrophilen-Elastase
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
n.s.	nicht signifikant
ORL-1	<i>opioid receptor like-1 receptor</i>
PAD4	Peptidylarginin-Deiminase, Typ IV
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin



---

PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PF4	<i>Platelet factor 4</i>
pg	Pikogramm
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
pH	<i>Pondus hydrogenii</i> , negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
PLA	<i>Platelet-leukocyte-aggregate</i> , Thrombozyten-Leukozyten-Aggregat
PNA	<i>Platelet-neutrophil-aggregate</i> , Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregat
PMT	<i>Photomultiplier tube</i>
poly I:C	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
Proc.	<i>Processus</i>
PRP	<i>Platelet rich plasma</i>
PRR	<i>Pattern-recognition-receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand 1</i>
R300	Antikörper zur Depletion von Thrombozyten
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of interest</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , reactive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Rounds per minute</i>
rTEM	<i>Reverse transendothelial migration</i>
s.c.	subkutan
SDF-1	<i>Stromal-derived-factor 1</i>
SDI	Soziodemografischer Index
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
SNR	<i>Signal-to-noise-ratio</i> , Signal-Rausch-Verhältnis
SOFA	<i>Sepsis-related organ failure assessment score</i>
sog.	sogenannt
SPF	<i>specific pathogen free</i> , spezifiziert pathogenfrei
SSC	<i>Sideward scatter</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
TAM-Familie	Tyro3-Axl-MerTK Familie
TF	<i>Tissue factor</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming-growth-factor-<math>\beta</math></i>
TH1/ 2 Zellen	T-Helfer-Zellen
TIM	<i>T-cell Ig and mucin domain</i>

---

TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TRALI	<i>Transfusion-related acute lung injury</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
v.a.	Vor allem
VCAM	<i>Vascular-cell adhesion molecule 1</i>
VEGF-A	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLA-4	<i>very-late-antigen-4</i>
Vol.-%	Volumenprozent
vs.	<i>versus</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor
WP	<i>Washed platelets</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNP	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter



## X. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Zusammensetzung Tyrode's-Puffer .....</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 2: Beschichtung der Flusskammern zur Durchführung des Migrationsassays.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabelle 3: Inkubation der WP mit ADP, CaCl<sub>2</sub> und einem TXA<sub>2</sub> Analogon zu deren Aktivierung .....</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 4: Übersicht der für die Zellisolierung der Leber verwendeten Enzyme .</i>	<i>65</i>
<i>Tabelle 5: Reagenzien zur Herstellung der FACS-Pufferlösung .....</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 6: Antikörper zur Herstellung des verwendeten Mastermix der Leber....</i>	<i>67</i>
<i>Tabelle 7: Antikörper zur Herstellung des verwendeten Mastermixes des Blutes</i>	<i>68</i>
<i>Tabelle 8: Übersicht der Reagenzien zur Durchführung des Aktivierungsassays</i>	<i>71</i>
<i>Tabelle 9: Temperatureinstellung des Kryotoms angepasst an das zu schneidende Gewebe .....</i>	<i>77</i>



**XI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<i>Abbildung 1: Struktureller Aufbau der Zellwand von Escherichia coli K-12.....</i>	<i>8</i>
<i>Abbildung 2: Freisetzung, Verteilung und Abbau von Neutrophilen.....</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 3: Abbau gealterter Neutrophiler im Knochenmark .....</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 4: Adhäsion von Leukozyten im Rahmen ihrer Rekrutierung während der Inflammation .....</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 5: Funktionsweise der reversen transendothelialen Migration von Neutrophilen.....</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 6: Interaktion von Thrombozyten mit Immunzellen und Bakterien .....</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 7: Übersicht der immunologischen Funktion von Thrombozyten .....</i>	<i>25</i>
<i>Abbildung 8: Übersicht der pathophysiologischen Aspekte der Thrombozytenaktivierung.....</i>	<i>26</i>
<i>Abbildung 9: Überwachungsmechanismen in der Leber.....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 10: Belastungsbeurteilung von Knochenmarkschimären anhand des klinischen Überwachungsbogens .....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 11: Bewertungskriterien der klinischen Symptomatik mit dazugehöriger Punktzahl.....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 12: Übersicht der Vorgehensweise bei Erreichen der jeweiligen Gesamtpunktzahl .....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 13: Wirkungsweise der durch DT-Injektion vermittelten Zellablation in Mäusen .....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 14: Ablauf der chirurgischen Präparation zur Intravitalmikroskopie der Leber .....</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 15: Darstellung des Jabłoński-Schemas.....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 16: Schematischer Aufbau eines FACS-Geräts zur durchflusszytometrischen Analyse.....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 17: Flussdiagramm zur Durchführung des Modells einer sterilen Peritonitis .....</i>	<i>82</i>

---

<i>Abbildung 18: Die intraperitoneale Injektion von LPS führt zur Ausprägung einer Sepsis-assoziierten klinischen Symptomatik.....</i>	<i>83</i>
<i>Abbildung 19: Die Injektion von LPS führt zu einem Abfall sowohl der Gesamtleukozytenzahl als auch der Neutrophilen und Thrombozyten in der peripheren Zirkulation .....</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 20: In der Leber kommt es nach der Injektion von LPS zur Rekrutierung von Neutrophilen und Thrombozyten sowie Fibrinablagerungen.....</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 21: Repräsentatives Beispiel einer immunhistologischen Färbung von Leberschnitten 4 h nach LPS-Injektion .....</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 22: Flussdiagramm zum Ablauf einer antikörpervermittelten Thrombozytendepletion im Modell der sterilen Peritonitis.....</i>	<i>88</i>
<i>Abbildung 23: Thrombozyten-depletierte Tiere zeigen einen schwerwiegenderen klinischen Verlauf sowie eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit .....</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 24: Bestätigung der antikörpervermittelten Depletion von Thrombozyten anhand des Differentialblutbilds .....</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 25: Die Depletion von Thrombozyten führt in septischen C57BL/6J Tieren zu einer verminderten Aufnahme neutrophiler Granulozyten in Kupffer-Zellen .....</i>	<i>92</i>
<i>Abbildung 26: Repräsentatives Beispiel einer immunhistologischen Färbung von Leber, Milz und Lunge für das fast vollständige Fehlen von Thrombozyten 4 h nach LPS-Injektion .....</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 27: Quantifizierung der von Kupffer-Zellen aufgenommenen Neutrophilen in der Leber mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse .....</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analysen der Leber bestätigen die verringerte Assoziation von Neutrophilen und Kupffer-Zellen in Thrombozyten-depletierten Tieren .....</i>	<i>97</i>
<i>Abbildung 29: Durchflusszytometrische Charakterisierung von peripheren Blut-Neutrophilen bei Thrombozytendepletion zeigt eine Herunterregulation neutrophiler Oberflächenmarker .....</i>	<i>100</i>

- Abbildung 30: Im septischen Plasma Thrombozyten-depletierter Tiere ist die Konzentration proinflammatorischer Zytokine erhöht..... 102*
- Abbildung 31: Flussdiagramm zum Ablauf einer Diphtherietoxin-vermittelten Thrombozytendepletion ..... 103*
- Abbildung 32: Nach der genetischen Depletion von Thrombozyten in Pf4-Cre x ROSA26-iDTR zeigen sich keine Unterschiede hinsichtlich des Schweregrads der induzierten Sepsis ..... 104*
- Abbildung 33: Bestätigung der antikörpervermittelten Depletion von Thrombozyten anhand des Differentialblutbilds ..... 105*
- Abbildung 34: Die Depletion von Thrombozyten führt in septischen Pf4-Cre x ROSA26-iDTR Tieren zu einer verminderten Aufnahme neutrophiler Granulozyten in Kupffer-Zellen..... 106*
- Abbildung 35: Repräsentatives Beispiel einer immunhistologischen Färbung von Leber, Milz und Lunge zur Bestätigung des Fehlens von Thrombozyten in Cre+ Pf4-Cre x ROSA26-iDTR Tieren 4 h nach LPS-Injektion..... 107*
- Abbildung 36: Flussdiagramm des Ablaufs einer durch LPS-induzierten akuten Pneumonie nach antikörpervermittelter Thrombozytendepletion 108*
- Abbildung 37: Thrombozyten-depletierte Tiere zeigen einen schwerwiegenderen klinischen Verlauf in der akuten Pneumonie..... 109*
- Abbildung 38: Bestätigung der antikörpervermittelten Depletion von Thrombozyten anhand des Differentialblutbilds ..... 110*
- Abbildung 39: Die Depletion von Thrombozyten führt im Modell einer akuten Pneumonie in C57BL/6J Tieren zu einer verminderten Aufnahme neutrophiler Granulozyten in Kupffer-Zellen..... 112*
- Abbildung 40: P-Selectin KO-Tiere zeigen in der sterilen Peritonitis keine Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung der klinischen Symptomatik verglichen mit C57BL/6J Tieren..... 114*
- Abbildung 41: Septische P-Selectin KO-Tiere zeigen keinen Unterschied gegenüber Kontrolltieren hinsichtlich des Differentialblutbilds. 114*



- Abbildung 42: Septische P-Selectin KO-Tiere zeigen keine verminderte Efferozytose von Neutrophilen ..... 116*
- Abbildung 43: Die Expression von P-Selectin ist in P-Selectin Chimären im Vergleich zu B6-Kontrollchimären verringert ..... 118*
- Abbildung 44: P-Selectin KO-Chimären zeigen in der sterilen Peritonitis keine Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung der klinischen Symptomatik verglichen mit C57BL/6J-Kontrollchimären ..... 119*
- Abbildung 45: Septische P-Selectin KO-Chimären zeigen keinen Unterschied gegenüber Kontrollchimären hinsichtlich des Differentialblutbilds ..... 119*
- Abbildung 46: Septische P-Selectin KO-Chimären zeigen keine verminderte Efferozytose von Neutrophilen ..... 121*
- Abbildung 47: P-Selectin defiziente Thrombozyten zeigen keinen Migrationsdefekt in vitro (Migrationsassay) ..... 122*
- Abbildung 48: Flussdiagramm zum Ablauf einer antikörpervermittelten Blockade von TIM-4 im Modell einer sterilen Peritonitis ..... 124*
- Abbildung 49: Eine antikörpervermittelte Blockade von TIM-4 zieht keine Unterschiede hinsichtlich des LPS-induzierten klinischen Verlaufs verglichen mit der Kontrollgruppe nach sich ..... 125*
- Abbildung 50: Nach der antikörpervermittelten TIM-4 Blockade kommt es in septischen Tieren zu einem signifikanten Anstieg der im Blut zirkulierenden Neutrophilen ..... 126*
- Abbildung 51: Eine antikörpervermittelte TIM-4 Blockade unter LPS reduziert die Aufnahme von Neutrophilen in Kupffer-Zellen ..... 127*
- Abbildung 52: Thrombozyten-assistierte Efferozytose von Neutrophilen in der Leber in der LPS-induzierten Sepsis ..... 128*
- Abbildung 53: Neutrophile exprimieren Phosphatidylserin in der entzündeten Leber und sind von Thrombozyten umgeben ..... 129*

## XII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 801-10.
2. Rudd, K.E., et al., *Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study*. Lancet, 2020. **395**(10219): p. 200-211.
3. ärzteblatt.de. *Sepsis weltweit für jeden 5. Todesfall verantwortlich*. 2020 30.08.2021]; Available from: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/108736/Sepsis-weltweit-fuer-jeden-5-Todesfall-verantwortlich>.
4. Hoffmeyer-Zlotnik, J. and U. Warner, *Nationale soziodemographische Standards und international harmonisierte soziodemographische Hintergrundvariablen*, in *Handbuch Methoden der empirischen Sozialforschung*, N.B. Baur, J., Editor. 2019, Springer VS: Wiesbaden. p. 875-892.
5. Aird, W.C., *The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome*. Blood, 2003. **101**(10): p. 3765-77.
6. Semple, J.W., J.E. Italiano, Jr., and J. Freedman, *Platelets and the immune continuum*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 264-74.
7. Gaertner, F., et al., *Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria*. Cell, 2017. **171**(6): p. 1368-1382.e23.
8. Nicolai, L., F. Gaertner, and S. Massberg, *Platelets in Host Defense: Experimental and Clinical Insights*. Trends Immunol, 2019. **40**(10): p. 922-938.
9. Andonegui, G., et al., *Platelets express functional Toll-like receptor-4*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2417-23.
10. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
11. Aslam, R., et al., *Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo*. Blood, 2006. **107**(2): p. 637-41.

12. Yeaman, M.R., *Platelets: at the nexus of antimicrobial defence*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(6): p. 426-37.
13. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 34-45.
14. Clark, S.R., et al., *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nat Med, 2007. **13**(4): p. 463-9.
15. Stark, K. and S. Massberg, *Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology*. Nat Rev Cardiol, 2021. **18**(9): p. 666-682.
16. Shi, J., et al., *Apoptosis of neutrophils and their elimination by Kupffer cells in rat liver*. Hepatology, 1996. **24**(5): p. 1256-63.
17. Hidalgo, A., et al., *The Neutrophil Life Cycle*. Trends Immunol, 2019. **40**(7): p. 584-597.
18. Horst, A.K., G. Tiegs, and L. Diehl, *Contribution of Macrophage Efferocytosis to Liver Homeostasis and Disease*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2670.
19. Jenne, C.N. and P. Kubes, *Immune surveillance by the liver*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 996-1006.
20. Crispe, I.N., *The liver as a lymphoid organ*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 147-63.
21. Jiang, Y., et al., *Kupffer cell receptor CLEC4F is important for the destruction of desialylated platelets in mice*. Cell Death Differ, 2021. **28**(11): p. 3009-3021.
22. Bizzozero, G., *Sur un nouvel élément morphologique du sang chez les mammifères et son importance dans la thrombose et dans la coagulation*. Archives Italiennes de Biologie, 1882. **1**: p. 1-5.
23. Kubes, P. and C. Jenne, *Immune Responses in the Liver*. Annu Rev Immunol, 2018. **36**: p. 247-277.
24. Lee, C.H. and T. Chun, *Anti-Inflammatory Role of TAM Family of Receptor Tyrosine Kinases Via Modulating Macrophage Function*. Mol Cells, 2019. **42**(1): p. 1-7.

25. Warkentin, T.E., W.C. Aird, and J.H. Rand, *Platelet-endothelial interactions: sepsis, HIT, and antiphospholipid syndrome*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2003: p. 497-519.
26. Newman, P.M. and B.H. Chong, *Further characterization of antibody and antigen in heparin-induced thrombocytopenia*. Br J Haematol, 1999. **107**(2): p. 303-9.
27. Angus, D.C. and T. van der Poll, *Severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med, 2013. **369**(9): p. 840-51.
28. Deutschman, C.S. and K.J. Tracey, *Sepsis: current dogma and new perspectives*. Immunity, 2014. **40**(4): p. 463-75.
29. Singer, M., et al., *Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation*. Lancet, 2004. **364**(9433): p. 545-8.
30. AMBOSS GmbH. *Sepsis*. 2021 02.09.21 [cited 2021 26.09.21]; Available from: <https://www.amboss.com/de/wissen/Sepsis/>.
31. Venkata, C., et al., *Thrombocytopenia in adult patients with sepsis: incidence, risk factors, and its association with clinical outcome*. J Intensive Care, 2013. **1**(1): p. 9.
32. Hotchkiss, R.S., et al., *Sepsis and septic shock*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16045.
33. Mavrommatis, A.C., et al., *Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis*. Crit Care Med, 2000. **28**(2): p. 451-7.
34. Brower, R.G., et al., *Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1301-8.
35. Annane, D., et al., *Hydrocortisone plus Fludrocortisone for Adults with Septic Shock*. N Engl J Med, 2018. **378**(9): p. 809-818.
36. van den Berghe, G., et al., *Intensive insulin therapy in critically ill patients*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1359-67.
37. Zhang, G., T.C. Meredith, and D. Kahne, *On the essentiality of lipopolysaccharide to*

*Gram-negative bacteria*. *Curr Opin Microbiol*, 2013. **16**(6): p. 779-85.

38. Bertani, B. and N. Ruiz, *Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides*. *EcoSal Plus*, 2018. **8**(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018.

39. Raetz, C.R. and C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins*. *Annu Rev Biochem*, 2002. **71**: p. 635-700.

40. Takeda, K. and S. Akira, *Roles of Toll-like receptors in innate immune responses*. *Genes Cells*, 2001. **6**(9): p. 733-42.

41. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. *Nature*, 1997. **388**(6640): p. 394-7.

42. Andonegui, G., S.M. Goyert, and P. Kubes, *Lipopolysaccharide-induced leukocyte-endothelial cell interactions: a role for CD14 versus toll-like receptor 4 within microvessels*. *J Immunol*, 2002. **169**(4): p. 2111-9.

43. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. *Science*, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.

44. O'Brien, A.D., et al., *Genetic control of susceptibility to Salmonella typhimurium in mice: role of the LPS gene*. *J Immunol*, 1980. **124**(1): p. 20-4.

45. Rosenstreich, D.L., A.C. Weinblatt, and A.D. O'Brien, *Genetic control of resistance to infection in mice*. *Crit Rev Immunol*, 1982. **3**(4): p. 263-330.

46. Scott, A.J., et al., *Lipid A structural modifications in extreme conditions and identification of unique modifying enzymes to define the Toll-like receptor 4 structure-activity relationship*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017. **1862**(11): p. 1439-1450.

47. Ebbensgaard, A., et al., *The Role of Outer Membrane Proteins and Lipopolysaccharides for the Sensitivity of Escherichia coli to Antimicrobial Peptides*. *Front Microbiol*, 2018. **9**: p. 2153.

48. Hwang, J.S., et al., *Glucosamine improves survival in a mouse model of sepsis and attenuates sepsis-induced lung injury and inflammation*. *J Biol Chem*, 2019. **294**(2): p. 608-622.

49. Hasan, Z., et al., *Targeting CD44 expressed on neutrophils inhibits lung damage in abdominal sepsis*. Shock, 2011. **35**(6): p. 567-72.
50. Sakaguchi, M., et al., *Sodium thiosulfate attenuates acute lung injury in mice*. Anesthesiology, 2014. **121**(6): p. 1248-57.
51. Asaduzzaman, M., et al., *LFA-1 and MAC-1 mediate pulmonary recruitment of neutrophils and tissue damage in abdominal sepsis*. Shock, 2008. **30**(3): p. 254-9.
52. Zhang, S., et al., *Streptococcal M1 protein-induced lung injury is independent of platelets in mice*. Shock, 2011. **35**(1): p. 86-91.
53. Grommes, J. and O. Soehnlein, *Contribution of neutrophils to acute lung injury*. Mol Med, 2011. **17**(3-4): p. 293-307.
54. Zarbock, A., K. Singbartl, and K. Ley, *Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation*. J Clin Invest, 2006. **116**(12): p. 3211-9.
55. Kornerup, K.N., et al., *Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration*. J Appl Physiol (1985), 2010. **109**(3): p. 758-67.
56. Grommes, J., et al., *Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **185**(6): p. 628-36.
57. Sreeramkumar, V., et al., *Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation*. Science, 2014. **346**(6214): p. 1234-8.
58. AMBOSS GmbH. *Acute Respiratory Distress Syndrome*. 2021 06.08.21 [cited 2021 26.09.21]; Available from: [https://www.amboss.com/de/wissen/Acute\\_Respiratory\\_Distress\\_Syndrom/](https://www.amboss.com/de/wissen/Acute_Respiratory_Distress_Syndrom/).
59. Kabir, K., et al., *Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury*. Shock, 2002. **17**(4): p. 300-3.
60. Demling, R.H., *The modern version of adult respiratory distress syndrome*. Annu Rev Med, 1995. **46**: p. 193-202.

61. Kollef, M.H. and D.P. Schuster, *The acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 1995. **332**(1): p. 27-37.
62. Ranieri, V.M., et al., *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition*. Jama, 2012. **307**(23): p. 2526-33.
63. Gottschaldt, U.R., A.W. *Pathophysiology of acute respiratory distress syndrome*. 2018 [cited 2021 26.09.21]; Available from: [https://www.ai-online.info/images/ai-ausgabe/2018/05-2018/2018\\_5\\_249-264\\_Pathophysiologie%20des%20Lungenversagens.pdf](https://www.ai-online.info/images/ai-ausgabe/2018/05-2018/2018_5_249-264_Pathophysiologie%20des%20Lungenversagens.pdf).
64. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2010. **116**(4): p. 625-7.
65. Tofts, P.S., et al., *Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2011. **117**(22): p. 6050-2; author reply 6053-4.
66. Li, K.W., et al., *Deuterium and neutrophil kinetics*. Blood, 2011. **117**(22): p. 6052-3; author reply 6053-4.
67. Colotta, F., et al., *Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products*. Blood, 1992. **80**(8): p. 2012-20.
68. Kim, M.H., et al., *Neutrophil survival and c-kit(+)-progenitor proliferation in Staphylococcus aureus-infected skin wounds promote resolution*. Blood, 2011. **117**(12): p. 3343-52.
69. Papayannopoulos, V., *Neutrophil extracellular traps in immunity and disease*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(2): p. 134-147.
70. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.
71. Bruns, S., et al., *Production of extracellular traps against Aspergillus fumigatus in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA*. PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000873.
72. Abi Abdallah, D.S., et al., *Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps*. Infect Immun, 2012. **80**(2): p. 768-77.

73. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. *Science*, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
74. Saitoh, T., et al., *Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1*. *Cell Host Microbe*, 2012. **12**(1): p. 109-16.
75. Urban, C.F., et al., *Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms*. *Cell Microbiol*, 2006. **8**(4): p. 668-76.
76. Dwyer, M., et al., *Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor*. *J Innate Immun*, 2014. **6**(6): p. 765-79.
77. Summers, C., et al., *Neutrophil kinetics in health and disease*. *Trends Immunol*, 2010. **31**(8): p. 318-24.
78. Eash, K.J., et al., *CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions*. *Blood*, 2009. **113**(19): p. 4711-9.
79. Stark, M.A., et al., *Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17*. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 285-94.
80. De Filippo, K. and S.M. Rankin, *CXCR4, the master regulator of neutrophil trafficking in homeostasis and disease*. *Eur J Clin Invest*, 2018. **48 Suppl 2**(Suppl Suppl 2): p. e12949.
81. Tsuda, Y., et al., *Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 215-26.
82. Grieshaber-Bouyer, R., et al., *The neutrotime transcriptional signature defines a single continuum of neutrophils across biological compartments*. *Nat Commun*, 2021. **12**(1): p. 2856.
83. Ramachandran, V., et al., *Dynamic alterations of membrane tethers stabilize leukocyte rolling on P-selectin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(37): p. 13519-24.
84. Khismatullin, D.B. and G.A. Truskey, *Leukocyte rolling on P-selectin: a three-dimensional numerical study of the effect of cytoplasmic viscosity*. *Biophys J*, 2012. **102**(8): p. 1757-66.



85. Phillipson, M., et al., *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2569-75.
86. Guthrie, L.A., et al., *Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme*. J Exp Med, 1984. **160**(6): p. 1656-71.
87. Jenne, C.N., et al., *Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps*. Cell Host Microbe, 2013. **13**(2): p. 169-80.
88. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
89. McDonald, B., et al., *Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids*. J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 915-27.
90. McDonald, B., et al., *Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation*. Science, 2010. **330**(6002): p. 362-6.
91. Carvalho-Tavares, J., et al., *A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature*. Circ Res, 2000. **87**(12): p. 1141-8.
92. Ji, H., et al., *T-cell immunoglobulin and mucin domain 4 (TIM-4) signaling in innate immune-mediated liver ischemia-reperfusion injury*. Hepatology, 2014. **60**(6): p. 2052-2064.
93. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
94. Verhoven, B., R.A. Schlegel, and P. Williamson, *Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1597-601.
95. Savill, J. and C. Gregory, *Apoptotic PS to phagocyte TIM-4: eat me*. Immunity, 2007. **27**(6): p. 830-2.

96. Colom, B., et al., *Leukotriene B4-Neutrophil Elastase Axis Drives Neutrophil Reverse Transendothelial Cell Migration In Vivo*. *Immunity*, 2015. **42**(6): p. 1075-86.
97. Woodfin, A., et al., *The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(8): p. 761-9.
98. Buckley, C.D., et al., *Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration*. *J Leukoc Biol*, 2006. **79**(2): p. 303-11.
99. Serhan, C.N., *Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not?* *Am J Pathol*, 2010. **177**(4): p. 1576-91.
100. Gong, Y. and D.R. Koh, *Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model*. *Cell Tissue Res*, 2010. **339**(2): p. 437-48.
101. Kaushansky, K., *Lineage-specific hematopoietic growth factors*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(19): p. 2034-45.
102. Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Platelet formation*. *Semin Hematol*, 2010. **47**(3): p. 220-6.
103. Jenne, C.N., R. Urrutia, and P. Kubes, *Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity*. *Int J Lab Hematol*, 2013. **35**(3): p. 254-61.
104. Sehgal, S. and B. Storrie, *Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(10): p. 2009-16.
105. Ruggeri, Z.M. and G.L. Mendolicchio, *Adhesion mechanisms in platelet function*. *Circ Res*, 2007. **100**(12): p. 1673-85.
106. Coller, B.S., et al., *A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa*. *J Clin Invest*, 1983. **72**(1): p. 325-38.
107. Ginsberg, M.H., et al., *Reduced surface expression and binding of fibronectin by thrombin-stimulated thrombasthenic platelets*. *J Clin Invest*, 1983. **71**(3): p. 619-24.

108. André, P., et al., *CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 247-52.
109. Ehlers, R., et al., *Targeting platelet-leukocyte interactions: identification of the integrin Mac-1 binding site for the platelet counter receptor glycoprotein Ibalpha*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 1077-88.
110. Romo, G.M., et al., *The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin*. J Exp Med, 1999. **190**(6): p. 803-14.
111. Wong, C.H., et al., *Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance*. Nat Immunol, 2013. **14**(8): p. 785-92.
112. Jenne, C.N., et al., *The use of spinning-disk confocal microscopy for the intravital analysis of platelet dynamics in response to systemic and local inflammation*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25109.
113. Singer, G., et al., *Platelet recruitment in the murine hepatic microvasculature during experimental sepsis: role of neutrophils*. Microcirculation, 2006. **13**(2): p. 89-97.
114. Elzey, B.D., et al., *Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity*. Thromb Res, 2011. **127**(3): p. 180-3.
115. Kraemer, B.F., et al., *Novel anti-bacterial activities of  $\beta$ -defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation*. PLoS Pathog, 2011. **7**(11): p. e1002355.
116. McMorran, B.J., et al., *Platelet factor 4 and Duffy antigen required for platelet killing of Plasmodium falciparum*. Science, 2012. **338**(6112): p. 1348-51.
117. Weitz, J.I., *Factor XI and factor XII as targets for new anticoagulants*. Thromb Res, 2016. **141 Suppl 2**: p. S40-5.
118. Hickey, M.J. and P. Kubes, *Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 364-75.

119. Pawlinski, R., et al., *Hematopoietic and nonhematopoietic cell tissue factor activates the coagulation cascade in endotoxemic mice*. *Blood*, 2010. **116**(5): p. 806-14.
120. Ma, A.C. and P. Kubes, *Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis*. *J Thromb Haemost*, 2008. **6**(3): p. 415-20.
121. Levi, M. and H. Ten Cate, *Disseminated intravascular coagulation*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(8): p. 586-92.
122. Pak, S., et al., *Platelet adhesion in the sinusoid caused hepatic injury by neutrophils after hepatic ischemia reperfusion*. *Platelets*, 2010. **21**(4): p. 282-8.
123. Gawaz, M., et al., *Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure*. *Eur J Clin Invest*, 1995. **25**(11): p. 843-51.
124. Knijff-Dutmer, E.A., et al., *Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(6): p. 1498-503.
125. Cho, M.S., P. Modi, and S. Sharma. *Transfusion-related Acute Lung Injury*. StatPearls 2021 26.07.2021 [cited 2021 26.09.2021]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507846/>.
126. Liebich, H.-G., *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel*. 5., völlig überarb. und erw. Aufl. ed. 2009, Stuttgart: Schattauer Verlag. 448.
127. Mravec, B., Y. Gidron, and I. Hulin, *Neurobiology of cancer: Interactions between nervous, endocrine and immune systems as a base for monitoring and modulating the tumorigenesis by the brain*. *Semin Cancer Biol*, 2008. **18**(3): p. 150-63.
128. Franco, A., et al., *Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigens on human hepatocytes*. *Hepatology*, 1988. **8**(3): p. 449-54.
129. Bode, J.G., et al., *Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- $\kappa$ B-dependent signaling*. *Eur J Cell Biol*, 2012. **91**(6-7): p. 496-505.
130. Sarma, J.V. and P.A. Ward, *The complement system*. *Cell Tissue Res*, 2011. **343**(1): p. 227-

35.

131. Wu, J., et al., *Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific*. Immunology, 2010. **129**(3): p. 363-74.

132. Bilzer, M., F. Roggel, and A.L. Gerbes, *Role of Kupffer cells in host defense and liver disease*. Liver Int, 2006. **26**(10): p. 1175-86.

133. Gale, R.P., R.S. Sparkes, and D.W. Golde, *Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer cells) in humans*. Science, 1978. **201**(4359): p. 937-8.

134. Taniguchi, H., et al., *Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver*. Nat Med, 1996. **2**(2): p. 198-203.

135. Bouwens, L., et al., *Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver*. Hepatology, 1986. **6**(4): p. 718-22.

136. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675-80.

137. Decker, K., *Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells)*. Eur J Biochem, 1990. **192**(2): p. 245-61.

138. Helmy, K.Y., et al., *CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens*. Cell, 2006. **124**(5): p. 915-27.

139. Gorgani, N.N., et al., *Complement receptor of the Ig superfamily enhances complement-mediated phagocytosis in a subpopulation of tissue resident macrophages*. J Immunol, 2008. **181**(11): p. 7902-8.

140. Davies, L.C., et al., *Tissue-resident macrophages*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 986-95.

141. Cassetta, L., E. Cassol, and G. Poli, *Macrophage polarization in health and disease*. ScientificWorldJournal, 2011. **11**: p. 2391-402.

142. Shapouri-Moghaddam, A., et al., *Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease*. J Cell Physiol, 2018. **233**(9): p. 6425-6440.

143. Mantovani, A., et al., *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. J Pathol, 2013. **229**(2): p. 176-85.
144. Huang, L.R., et al., *Intrahepatic myeloid-cell aggregates enable local proliferation of CD8(+) T cells and successful immunotherapy against chronic viral liver infection*. Nat Immunol, 2013. **14**(6): p. 574-83.
145. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
146. Choudhury, S.R., et al., *Dipeptidase-1 Is an Adhesion Receptor for Neutrophil Recruitment in Lungs and Liver*. Cell, 2019. **178**(5): p. 1205-1221.e17.
147. McDonald, B., et al., *Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(3): p. 324-33.
148. Beiter, K., et al., *An endonuclease allows Streptococcus pneumoniae to escape from neutrophil extracellular traps*. Curr Biol, 2006. **16**(4): p. 401-7.
149. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. *Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2019*. 2021 05.08.2021; Available from: <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierschutz/versuchstierzahlen2019.html#doc85090bodyText> 1.
150. Müller, K., *HeimtierSkills: Praxisleitfaden zu Diagnose und Therapie bei kleinen Heimtieren*. 2017, Schattauer GmbH: Stuttgart. p. 426.
151. The Jackson Laboratory. *C57BL/6J*. 2021 09.08.2021]; Available from: <https://www.jax.org/strain/000664>.
152. The Jackson Laboratory. *B6;129S2-Selp<sup>tm1Hyn</sup>/J*. 2021 09.08.2021]; Available from: <https://www.jax.org/strain/002217>.
153. The Jackson Laboratory. *C57BL/6-Tg(Pf4-icre)Q3Rsko/J*. 2021 09.08.2021]; Available from: <https://www.jax.org/strain/008535>.
154. The Jackson Laboratory. *C57BL/6-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1(HBEGF)Awai</sup>/J*. 2021; Available from:

<https://www.jax.org/strain/007900>.

155. Buch, T., et al., *A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration*. *Nat Methods*, 2005. **2**(6): p. 419-26.

156. Bundesinstitut für Risikobewertung *RICHTLINIE DES RATES 86/609/EWG vom 24. November 1986*. 1986.

157. Mähler Convenor, M., et al., *FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units*. *Lab Anim*, 2014. **48**(3): p. 178-192.

158. Eckardt, S., K.J. McLaughlin, and H. Willenbring, *Mouse chimeras as a system to investigate development, cell and tissue function, disease mechanisms and organ regeneration*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(13): p. 2091-9.

159. Erhardt, W.H., J.; Haberstroh, J.; Baumgartner, C.; Tacke, S., *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier*. 2. Auflage ed. 2012, Stuttgart: Schattauer Verlag.

160. Höllt, V. and C. Allgaier, *Analgetika*, in *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, K.F. Aktories, U.; Hofmann, B.; Starke, K., Editor. 2013, Elsevier GmbH: München. p. 218-228.

161. Löscher, W. and H.-H. Frey, *Pharmakologie des zentralen Nervensystems (ZNS)*, in *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, W. Löscher and A. Richter, Editors. 2016, Enke Verlag: Stuttgart. p. 125-179.

162. Engelhard, K. and C. Werner, *Narkose- Inhalations- und Injektionsanästhetika*, in *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, K.F. Aktories, U.; Hofmann, B.; Starke, K., Editor. 2013, Elsevier GmbH: München. p. 241-259.

163. Möhler, H., *Pharmakotherapie von Schlafstörungen und Erregungszuständen*, in *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, K.F. Aktories, U.; Hofmann, B.; Starke, K., Editor. 2013, Elsevier GmbH: München. p. 261-266.

164. AMBOSS GmbH. *Benzodiazepine*. 2021 26.07.21 [cited 2021 27.09.21]; Available from: <https://www.amboss.com/de/wissen/Benzodiazepine/>.

165. Dülsner, A.P., M.; Scherer, K.; Schmelting, B.; Schmidt, M.; Weinert, H.; Jourdan, T.; Hack, R.; Krüger, C. *Fachinformation aus dem Ausschuss für Tierschutzbeauftragte und dem Arbeitskreis 4 in der TVT Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren 2017* 18.08.2021 [cited 2021 18.08.2021]; 7]. Available from: [http://www.gv-solas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publication/Tierschutzbeauftragte/2017Fachinformation\\_Injektionsvolumina.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Tierschutzbeauftragte/2017Fachinformation_Injektionsvolumina.pdf).
166. Baier, N., *Untersuchung der Belastung von Mäusen durch unterschiedliche Applikationsmethoden mit Hilfe telemetrischer Bestimmung physiologischer Reaktionen sowie mittels Corticosteronanalysen*, in *Tierärztliche Fakultät*. 2017, Ludwig-Maximilians-Universität: München. p. 129.
167. Lennox, A.M.B., L., *Chapter 26 - Basic Anatomy, Physiology, Husbandry, and Clinical Techniques*, in *Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*, K.E.C.J.W. Quesenberry, Editor. 2012. p. 339-353.
168. Diehl, K.H., et al., *A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes*. *J Appl Toxicol*, 2001. **21**(1): p. 15-23.
169. emfret Analytics GmbH und Co. KG. *Antibodies for Mouse Platelet Depletion*. 2021 Nov. 2015 [cited 2021 20.08.2021]; Available from: [https://www.emfret.com/fileadmin/user\\_upload/Datasheets/R300.pdf](https://www.emfret.com/fileadmin/user_upload/Datasheets/R300.pdf).
170. Yamaizumi, M., et al., *One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell*. *Cell*, 1978. **15**(1): p. 245-50.
171. Fellers, T.J. and M.W. Davidson. *Introduction to Confocal Microscopy*. 2021 18.08.2021]; Available from: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/confocalintro/>.
172. IBIDI GmbH. *Microscopy Techniques and Culture Surfaces: Find the Perfect Match: Confocal Microscopy*. 2021 18.08.2021]; Available from: <https://ibidi.com/content/216-confocal-microscopy>.
173. ZEISS Deutschland. *Das Airyscan-Prinzip*. 2021 18.08.2021]; Available from: <https://www.zeiss.de/mikroskopie/produkte/confocal-microscopes/compact-confocal-lsm-900-with-airyscan2-for-multiplex-fluorescence-imaging.html>.



174. Wu, X. and J.A. Hammer, *ZEISS Airyscan: Optimizing Usage for Fast, Gentle, Super-Resolution Imaging*. *Methods Mol Biol*, 2021. **2304**: p. 111-130.
175. Rowland, N.E., *Food or fluid restriction in common laboratory animals: balancing welfare considerations with scientific inquiry*. *Comp Med*, 2007. **57**(2): p. 149-60.
176. IBIDI GmbH. *Microscopy Techniques and Culture Surfaces: Find the Perfect Match: Differential Interference Contrast (DIC)*. 2021 [cited 2021 18.08.2021]; Available from: <https://ibidi.com/content/214-dic>.
177. Schmitz, S. and C. Desel, *Fluoreszenzmikroskopie*, in *Der Experimentator Zellbiologie*. 2018, Springer-Verlag GmbH Deutschland. p. 81-112.
178. Thermo Fisher Scientific Inc. *Fluorescence Fundamentals*. 2021 [cited 2021 10.08.2021]; Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/introduction-to-fluorescence-techniques.html>.
179. Ham, B.M. and A. MaHam, *Fluorescence Optical Emission Spectroscopy*, in *Analytical Chemistry- A Chemist and Laboratory Technician's Toolkit*. 2015, John Wiley & Sons Inc.: New York. p. 239-276.
180. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. *Curr Protoc Immunol*, 2018. **120**: p. 5.1.1-5.1.11.
181. Ibrahim, S.F. and G. van den Engh, *Flow cytometry and cell sorting*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2007. **106**: p. 19-39.
182. Mccoy, J.P., *Basic principles of flow cytometry*. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2002. **16**(2): p. 229-243.
183. Givan, A.L., *Flow cytometry: an introduction*. *Methods Mol Biol*, 2011. **699**: p. 1-29.
184. Sack, U., *Zelluläre Diagnostik und Therapie*. *Grundlagen der Durchflusszytometrie*, ed. G. A. 2016, Berlin/ Boston: De Gruyter.
185. BIO-RAD. *Flow Cytometry Data Analysis*. 2021 [cited 2021 18.08.2021]; Available from: <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-gating-strategies.html>.

186. Bergmeier, W., et al., *Flow cytometric detection of activated mouse integrin alphaIIb beta3 with a novel monoclonal antibody*. *Cytometry*, 2002. **48**(2): p. 80-6.
187. Shojaeian, S., N.M. Lay, and A.-H. Zarnani, *Detection Systems in Immunohistochemistry*, in *Immunohistochemistry- The Ageless Biotechnology*, C.F. Streckfus, Editor. 2020, IntechOpen: London. p. 3-6.
188. Kalyuzhny, A.E., *Immunohistochemistry: Essential Elements and Beyond*. 2016, Minneapolis, MN: Springer.
189. Ramos-Vara, J.A. and M.A. Miller, *When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique*. *Vet Pathol*, 2014. **51**(1): p. 42-87.
190. NYU Langone Medical Centre. *Tissue preparation and cryopreservation with sucrose- for frozen tissue sections* 2016 20.08.2021 [cited 2021 20.08.2021]; Available from: <https://med.nyu.edu/research/scientific-cores-shared-resources/sites/default/files/frozen-tissue-preparation-with-sucrose.pdf>.
191. Ramos-Vara, J.A., et al., *Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories*. *J Vet Diagn Invest*, 2008. **20**(4): p. 393-413.
192. Scheffler, J.M., N. Schiefermeier, and L.A. Huber, *Mild fixation and permeabilization protocol for preserving structures of endosomes, focal adhesions, and actin filaments during immunofluorescence analysis*. *Methods Enzymol*, 2014. **535**: p. 93-102.
193. Butler, J.L., B.J. Barham, and B.A. Heidenreich, *Comparison of indirect peroxidase and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) immunohistochemical staining procedures for c-fos in rat brain*. *J Anat*, 2019. **234**(6): p. 936-942.
194. Yipp, B.G., et al., *The Lung is a Host Defense Niche for Immediate Neutrophil-Mediated Vascular Protection*. *Sci Immunol*, 2017. **2**(10).
195. Brown, G.D., *Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(1): p. 33-43.
196. Geng, S., et al., *Novel reprogramming of neutrophils modulates inflammation resolution during atherosclerosis*. *Sci Adv*, 2019. **5**(2): p. eaav2309.

197. Feghali, C.A. and T.M. Wright, *Cytokines in acute and chronic inflammation*. Front Biosci, 1997. **2**: p. d12-26.
198. Cassatella, M.A., et al., *Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation*. J Exp Med, 1994. **179**(5): p. 1695-9.
199. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
200. Van Snick, J., *Interleukin-6: an overview*. Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 253-78.
201. Okamura, H., et al., *Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells*. Nature, 1995. **378**(6552): p. 88-91.
202. De Filippo, K., et al., *Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 4308-15.
203. De Filippo, K., et al., *Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation*. Blood, 2013. **121**(24): p. 4930-7.
204. Kobayashi, N., et al., *TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells*. Immunity, 2007. **27**(6): p. 927-40.
205. Shi, J., et al., *Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils*. Blood, 2001. **98**(4): p. 1226-30.
206. Ebe, Y., et al., *The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice*. Pathol Int, 1999. **49**(6): p. 519-32.
207. Menezes, G.B., et al., *Selective down-regulation of neutrophil Mac-1 in endotoxemic hepatic microcirculation via IL-10*. J Immunol, 2009. **183**(11): p. 7557-68.
208. Shi, J., Y. Kokubo, and K. Wake, *Expression of P-selectin on hepatic endothelia and platelets promoting neutrophil removal by liver macrophages*. Blood, 1998. **92**(2): p. 520-8.

209. Kolaczowska, E., et al., *Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6673.
210. Jimenez, M.F., et al., *Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome*. Arch Surg, 1997. **132**(12): p. 1263-9; discussion 1269-70.
211. Ren, Y., et al., *Apoptotic cells protect mice against lipopolysaccharide-induced shock*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4978-85.
212. Fox, S., et al., *Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease*. J Innate Immun, 2010. **2**(3): p. 216-27.
213. Tracey, K.J., et al., *Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin*. Science, 1986. **234**(4775): p. 470-4.
214. Beutler, B. and A. Cerami, *Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator*. Annu Rev Biochem, 1988. **57**: p. 505-18.
215. Warren, J.S., *Interleukins and tumor necrosis factor in inflammation*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1990. **28**(1): p. 37-59.
216. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
217. Munder, M., et al., *Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation*. J Exp Med, 1998. **187**(12): p. 2103-8.
218. Schindler, H., et al., *The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3075-82.
219. Chen, W.F. and A. Zlotnik, *IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor*. J Immunol, 1991. **147**(2): p. 528-34.
220. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin-10*. Curr Opin Immunol, 1992. **4**(3): p. 314-20.
221. Klein, A.D., et al., *Gadolinium Chloride Rescues Niemann-Pick Type C Liver Damage*. Int

J Mol Sci, 2018. **19**(11).

222. Hardonk, M.J., et al., *Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation*. J Leukoc Biol, 1992. **52**(3): p. 296-302.

223. Biagi, B.A. and J.J. Enyeart, *Gadolinium blocks low- and high-threshold calcium currents in pituitary cells*. Am J Physiol, 1990. **259**(3 Pt 1): p. C515-20.

224. Bloomer, S.A., et al., *Aging results in accumulation of M1 and M2 hepatic macrophages and a differential response to gadolinium chloride*. Histochem Cell Biol, 2020. **153**(1): p. 37-48.

225. Johnson, R.C., et al., *Blood cell dynamics in P-selectin-deficient mice*. Blood, 1995. **86**(3): p. 1106-1114.

226. Mayadas, T.N., et al., *Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice*. Cell, 1993. **74**(3): p. 541-54.

227. Elliott, M.R., K.M. Koster, and P.S. Murphy, *Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses*. J Immunol, 2017. **198**(4): p. 1387-1394.

228. Wong, K., et al., *Phosphatidylserine receptor Tim-4 is essential for the maintenance of the homeostatic state of resident peritoneal macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(19): p. 8712-7.

229. Rodriguez-Manzanet, R., et al., *T and B cell hyperactivity and autoimmunity associated with niche-specific defects in apoptotic body clearance in TIM-4-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(19): p. 8706-11.

230. Althaus, K., et al., *Antibody-induced procoagulant platelets in severe COVID-19 infection*. Blood, 2021. **137**(8): p. 1061-1071.

231. Yuan, Y., et al., *Neutrophil macroaggregates promote widespread pulmonary thrombosis after gut ischemia*. Sci Transl Med, 2017. **9**(409).

232. Thermo Fisher Scientific Inc. *pHrodo™ Deep Red Mammalian and Bacterial Cell Labeling Kit* 2021 [cited 2021 20.08.2021]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P35357#/P35357>.

---

233. The Jackson Laboratory. *C57BL/6J-Clec4fem1(cre)Glass/J*. 2021 [cited 20.08.2021]; Available from: <https://www.jax.org/strain/033296>.

234. NH DyeAGNOSTICS. *Proteomanalyse*. 2021 [cited 2021 20.08.2021]; Available from: <https://www.dyeagnostics.com/site/protein-services/proteomanalyse-tools-applications/>.

### XIII. DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Leo Nicolai, für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in unter seiner Anleitung anfertigen zu dürfen. Mit seinem unerschöpflichen Wissen und seinem wissenschaftlichen Tatendrang hat er nicht nur maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, sondern hat mich darüber hinaus durch seine motivierende Art immer wieder aufs Neue begeistert.

Herrn Prof. Dr. Frank Ebel danke ich für die Übernahme meines Dissertationsvorhabens, seine überaus hilfreichen Kommentare bei der Durchsicht dieser Arbeit sowie für die Einreichung an der Tiermedizinischen Fakultät der LMU München.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten AG Massberg/ Schulz und insbesondere der AG Vascular Immunobiology (Afra Anjum, Sophia Brambs, Raphael Escaig, Dr. med. Rainer Kaiser, Viktoria Knottenberg, Alexander Leunig, Magdalena Mader, Eva Riedlinger und Dario Rossaro) für die herzliche Arbeitsatmosphäre, den Zusammenhalt unserer Gruppe und die fortwährende Unterstützung bedanken. Es war eine Freude mit euch zusammenarbeiten zu dürfen! Besonders meine Freundin und Kollegin Vivien Polewka hat diese drei arbeitsintensiven Jahre durch ihre enthusiastische und herzliche Art zu etwas ganz Besonderem gemacht und ich bin froh, sie von Anfang an immer an meiner Seite gehabt zu haben.

Vielen Dank auch an Frau Dr. med. vet. Susanne Sauer und das gesamte Tierärzte-Team: Frau Dr. med. vet. Denise Messerer, Julia Winterhalter und Wanda Wendler, die sich allesamt so engagiert für das Tierwohl an unserem Institut einsetzen.

Ohne das technische Knowhow von Michael Lorenz, Zeljka Sisic und Anna Titova wäre ich des Öfteren an komplizierten Versuchsprotokollen, der Bedienung der Geräte (insbesondere dem FACS) und noch Vielem mehr verzweifelt. Dominic van den Heuvel hat diese großartigen IVM-Aufnahmen erst möglich gemacht und mich bei allen Problemen am Mikroskop sowie jeglicher Software unterstützt. Vielen lieben Dank dafür!

Ein großes Dankeschön auch an alle, die diese Arbeit zur Korrektur gelesen und mir mit ihrem Feedback weitergeholfen haben. Neben Herrn Dr. med. Leo Nicolai, Herrn Prof. Dr. Frank Ebel, Herrn Dr. med. Rainer Kaiser und meinen Eltern waren das auch meine langjährigen Freundinnen Pauline Frech und Eliane Teichmann.

Danke auch an unsere Katze Nancy, die mir beim Schreiben dieser Arbeit Gesellschaft geleistet hat und mich durch ihre ganz eigene, drollige Art jeden Tag zum Schmunzeln bringt.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich in allen Lebenslagen seit jeher unterstützen, Rückhalt geben und mir auch bei schwierigen Entscheidungen mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Zuletzt möchte ich meinem Partner Lukas Geisler für seine liebevolle und verständnisvolle Art danken. Er motiviert er mich jeden Tag aufs Neue und geht mit mir durch Dick und Dünn. Du bist einfach einmalig!