

Einfluss von doppelsträngiger RNA auf die Thrombusbildung in der Mikrozirkulation der Maus



Dissertation an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

Philipp Blüm

Eidesstattliche Versicherung

Blüm, Philipp

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einfluss von doppelsträngiger RNA auf die Thrombusbildung in der Mikrozirkulation der Maus

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

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

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke

und dem

Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Ulrich Pohl

Einfluss von doppelsträngiger RNA auf die Thrombusbildung in der Mikrozirkulation der Maus

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Philipp Blüm

aus Mainz

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München

Berichterstatter

PD Dr. med. Markus Wörnle

Mitberichterstatter

Prof. Dr. Bernd Engelmann
Prof. Dr. Michael Spannagl

Mitbetreuung durch den promovierten
Mitarbeiter

Dr. med. Joachim Pircher

Dekan

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung

06.10.2016

INHALT

1. Einleitung.....	1
1.1 Einfluss viraler Infektionen auf die Blutstillung	1
1.2 Die Rolle des angeborenen Immunsystems im Prozess der Hämostase.....	2
1.3 Mechanismen zur Erkennung doppelsträngiger RNA durch das angeborene Immunsystem	8
1.4 Das synthetische doppelsträngige RNA-Analogon Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly(I:C))11	
1.5 aktiviertes Protein C – Rolle in der Gerinnung und Entzündung	11
1.6 Protein C – Synthese, Aktivierung und Inaktivierung.....	12
1.7 Die antikoagulative Wirkung von aktiviertem Protein C	13
1.8 Die zytoprotektive Wirkung von aktiviertem Protein C.....	14
1.9 Protein C – Alternative Einsatzmöglichkeiten	16
2. Fragestellung.....	17
3. Material und Methoden.....	18
3.1 Chemikalien.....	18
3.1.1 Krebs-Henseleit-Superfusionslösung.....	18
3.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe.....	18
3.1.3 Anästhetika	18
3.1.4 pharmakologisch aktive Wirkstoffe.....	18
3.2 Zellkultur	19
3.2.1 Substanzen für die Zellkultur.....	19
3.2.2 Geräte für die Zellkultur	20
3.2.3 Human microvascular endothelial cell (HMEC) – Kultivierung.....	20
3.2.4 Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) – Gewinnung aus Nabelschnüren in halbsterilem Verfahren.....	21
3.2.5 HUVEC – Kultivierung	21
3.2.6 Human Mesangial Cells (HMC).....	21
3.3 in vitro und ex vivo – Experimente	22
3.3.1 Geräte.....	22
3.3.2 Antikörper	22
3.3.3 mRNA Primer	22
3.3.4 Untersuchung der mRNA-Transkription mit der quantitativen real time PCR	22
3.3.4.1 Transkription von mRNA proinflammatorischer Zytokine, Adhäsionsmoleküle und prothrombotischer Faktoren auf HMEC nach Inkubation mit poly(I:C) über verschiedene Zeitpunkte	22
3.3.5 Durchflusszytometrie auf humanen Thrombozyten.....	23
3.3.6 Licht-Transmission-Aggregometrie (Born-Aggregometrie)	23

3.3.7 Untersuchung der Gerinnungszeit menschlichen Vollbluts nach Zugabe von Zellysatmaterial in vitro – „Clotting Assay“	24
3.4 in vivo – Experimente.....	24
3.4.1 Intravitalmikroskopie.....	24
3.4.2 sonstige Instrumente	25
3.4.3 Tiere	25
3.4.4 Narkose	26
3.4.5 Präparationsablauf Arteria carotis – Katheter.....	26
3.4.6 Blutbilduntersuchung mit einem Coulter-Counter.....	26
3.4.7 Tail bleeding – Experiment in der Maus.....	26
3.4.7 Präparationsablauf M. cremaster Modell.....	27
3.4.8 Light-dye-Schädigung mit FITC-Dextran im Cremaster der Maus.....	27
3.5 Statistische Auswertung.....	29
4. Ergebnisse	30
4.1 Einfluss von Poly(I:C) auf das Blutbild von C57Bl/6-WT- und TLR-3-KO-Mäusen	30
4.2 Arteriöläre Thrombusbildung in vivo im Musculus cremaster nach photochemischer Schädigung mit FITC-Dextran und Stimulation mit Poly(I:C) in C57Bl/6WT-Mäusen	31
4.3 Arteriöläre Thrombusbildung in vivo im Musculus cremaster nach photochemischer Schädigung mit FITC-Dextran und Stimulation mit Poly(I:C) in TLR-3-KO-Mäusen	33
4.4 Einfluss von Poly(I:C) auf die Expression prokoagulatorischer Faktoren in menschlichen Endothelzellen sowie in intrinsischen Nierenzellen	34
4.5 Einfluss von Poly(I:C) auf die Aggregation und Aktivierung menschlicher Thrombozyten in vitro.....	36
4.6 Einfluss von aktiviertem Protein C auf die Transkription prothrombotischer Faktoren auf menschlichen Endothelzellen (HUVECs) sowie intrinsischen Nierenzellen (HMCs) in vitro ...	39
4.7 Einfluss einer Therapie mit Protein C auf die durch poly(I:C) bedingten Blutbildveränderungen	40
4.8 Effekte von Protein C auf die durch Poly(I:C) hervorgerufenen Veränderungen in der Mikrozirkulation des M. cremaster	41
5. Diskussion.....	44
5.1 Poly(I:C) fördert in Endothelzellen in vitro die Transkription und die Proteinexpression von Tissue factor und PAI-1 und wirkt dadurch prothrombotisch.....	45
5.2 Poly(I:C) scheint keine direkten Effekte auf die Aktivierung und das Aggregationsverhalten von menschlichen Thrombozyten in vitro zu haben.....	45
5.3 Die Blutbildveränderungen nach Stimulation mit Poly(I:C) in vivo sind wahrscheinlich Resultat eines veränderten Expressionsprofils oberflächlicher prothrombotischer Proteine auf den Endothelzellen	47
5.4 Die Blutbildveränderungen zeigen keine merklichen Effekte auf die primäre Hämostase der mit Poly(I:C) behandelten Tiere	47

5.5 Tiere, die zuvor mit Poly(I:C) behandelt worden sind, zeigen eine beschleunigte Thrombusbildung in den Arteriolen der Mikrozirkulation des M. cremaster	48
5.6 TLR-3-KO Mäuse zeigen diese Effekte nicht, aber ähnliche Blutbildveränderungen	49
5.7 Aktiviertes Protein C kann in Endothelzellen in vitro die durch Poly(I:C) induzierte Transkription prothrombotischer Faktoren, wie Tissue factor und PAI-1, hemmen.....	49
5.8 Die kurzfristige Gabe von Protein C hat keinen Einfluss auf die durch Poly(I:C) hervorgerufenen Veränderungen des Blutbilds	50
5.9 Die kurzfristige Gabe von Protein C kann die durch Poly(I:C) bedingten Veränderungen der Thrombusbildung in der Mikrozirkulation des M. cremasters rückgängig machen.....	51
5.10 Pathophysiologie und klinische Bedeutung.....	52
6. Zusammenfassung.....	54
7. Appendix.....	56
7.1 Abbildungsverzeichnis	56
7.2 Tabellenverzeichnis	56
7.3 Abkürzungsverzeichnis.....	57
7.4 Quellenverzeichnis	59
7.5 Publikationen	67
7.6 Danksagung	68

1. EINLEITUNG

1.1 EINFLUSS VIRALER INFEKTIONEN AUF DIE BLUTSTILLUNG

Die Blutstillung (Hämostase) ist ein wichtiger physiologischer Prozess, der im Falle einer Gefäßverletzung einen übermäßigen Blutverlust verhindern soll. Im unverletzten Gefäßsystem sollte dagegen keine Hämostase stattfinden, da dadurch die Durchblutung der betroffenen Gewebe verloren gehen würde und ein Gewebsuntergang die Folge wäre. Deshalb sollten sich unter physiologischen Bedingungen die blutstillungsfördernden und die blutstillungshemmenden Faktoren in einem Gleichgewicht zu Gunsten der hemmenden Faktoren befinden.

Unterschiedliche Einflussfaktoren können das System der Blutstillung aus dem Gleichgewicht bringen. Es sind sowohl Änderungen in Richtung verstärkter Hämostaseaktivität mit Prädisposition zur Thrombusbildung, als auch in Richtung verminderter Hämostaseaktivität mit verstärkter Blutungsneigung möglich. Bakterielle und virale Infektionserkrankungen gehen häufig mit Veränderungen der Hämostaseaktivität einher.

Virale Infektionen können verschiedene Aspekte der Blutstillung beeinflussen, beispielsweise die Gerinnungskaskade, die Thrombozytenfunktion und die Fibrinolyse [1, 2]. Viren, deren Infektion die Blutstillung herabsetzt, werden nach Goeijenbier et al. [1] „hämorrhagische Viren“ genannt und von den „nicht-hämorrhagischen Viren“ abgegrenzt. Hämorrhagische Viren können ein Krankheitsbild mit spontanen und verstärkten Blutungen auslösen, während durch „nicht-hämorrhagische Viren“ in erster Linie Thrombosen auftreten. Eine ernste Komplikation einer Infektion mit hämorrhagischen Viren ist das „viral hemorrhagic fever syndrome“ (VHF), das sich aus den Kardinalsymptomen Fieber, Hämorrhagie und Schock mit Gerinnungsstörung, Hypotonie und Flüssigkeitsverteilungsstörung zusammensetzt [3-5].

Hämorrhagische Viren. Zu den hämorrhagischen Viren gehören hauptsächlich RNA-Viren der Virusfamilien der Flaviviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae und Filoviridae [4, 6, 7]. Ein bedeutender Vertreter ist das Ebola-Virus, bei dem eine Mortalitätsrate von bis zu 90% beschrieben ist [5, 8] und das im Sommer 2014 erneut in einer großen Epidemie in Westafrika mit über 10000 Toten (Stand: 27. Mai 2015) [9] für Aufsehen gesorgt hat. Weitere Vertreter dieser Gruppe sind u.a. das Dengue- und das Marburg-Virus [5, 10]. Eine zentrale Rolle in der Pathogenese dieser Viruserkrankungen spielen u.a. infizierte Monozyten und dendritische Zellen, die durch eine massive, pathologische Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen („Zytokinsturm“) zu einer Alteration der Permeabilität der Gefäßwände und zu einem veränderten Oberflächenexpressionprofil der Endothelzellen führen. Aber auch direkte Effekte der Viren auf Endothelzellen wurden beschrieben, die sich z.B. im infektionsbedingten Zelluntergang äußern [6]. Durch eine Zunahme der Permeabilität der Gefäßwände, durch Hochregulation der Expression prothrombotischer Faktoren (z.B. Tissue factor) und Reduktion der Expression von antithrombotischen Faktoren (z.B. Thrombomodulin) auf Endothelzellen und durch Thrombozytenaggregation und -verbrauch kann es zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) mit anschließender Verbrauchskoagulopathie kommen [11-13]. Typisch sind neben diesen Veränderungen, auch Veränderungen des Blutbildes und hier insbesondere eine Abnahme der Leukozytenzahl [12].

Nicht-hämorrhagische Viren. Andere virale Infektionen sind mit einem gehäuftem Auftreten von Thrombosen assoziiert. Zu den sogenannten „nicht-hämorrhagischen“ Viren gehören nach Goeijenbier et al. [1] z.B. das Influenza A Virus, das Vogelgrippevirus H5N1, das Schweinegrippevirus H1N1, Vertreter der Herpesviren, die Hepatitisviren A und C, sowie das HI-Virus [14]. Typische

Komplikationen einer Infektion mit diesen Viren sind Thrombozytopenien, Pfortaderthrombosen, sowie thrombotische Mikroangiopathien [1]. Eine gefürchtete Komplikation einer Infektion mit dem Hepatitis C Virus ist eine kryoglobulinämische Vaskulitis, die durch Immunkomplexablagerungen entsteht und sich an der Haut mit palpablen Purpura, in der Niere in Form einer Glomerulonephritis, im peripheren Nervensystem mit motorisch-sensorischen Axonopathien und in seltenen Fällen in Form einer hämorrhagischen Alveolitis, einer interstitiellen Lungenfibrose oder einer dilatativen Kardiomyopathie mit Herzversagen äußert [15-17].

Inwiefern die während der viralen Replikation freigesetzte doppelsträngige RNA als „Pathogen-associated molecular pattern“ (PAMPs) zu Veränderungen der Thrombusbildung in vivo beiträgt, war Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit.

1.2 DIE ROLLE DES ANGEBORENEN IMMUNSYSTEMS IM PROZESS DER HÄMOSTASE

Immunothrombose. Infektionen können Veränderungen innerhalb der Gefäße auslösen, die zur Etablierung eines prokoagulatorischen Zustands beitragen und die intravasale Thrombusbildung fördern. Es besteht eine feste Beziehung zwischen der Immunabwehr und der Blutstillung, wobei beide Systeme sich gegenseitig beeinflussen können [18-20]. Wenn die regulatorischen Mechanismen während der akuten Infektion versagen, kann es zur disseminierten intravasalen Gerinnung mit Verbrauch von Gerinnungsfaktoren, Thrombozyten und anschließender Blutung kommen [18]. Im chronischen Prozess der viralen Infektion steht weniger die unstillbare Blutung, sondern eher die Thrombose im Vordergrund [21]. Die Blutstillung als Bestandteil der Immunabwehr begrenzt durch den Verschluss der Gefäße mit nachfolgender Stase die weitere Ausbreitung des Pathogens und fängt dieses quasi ein. Das angeborene Immunsystem und die Blutstillung wirken hier synergistisch, sodass viele der angeborenen Immunantworten nicht nur allein der Bekämpfung des eindringenden Pathogens dienen, sondern auch gleichzeitig die Thrombusbildung fördern [22]. Die Hämostase der Säugetiere und das angeborene Immunsystem weisen eine phylogenetische Verwandtschaft auf [23, 24], weshalb Massberg et al. zur Beschreibung oben genannter Zusammenhänge und zur Abgrenzung zum pathologischen Zustand „Thrombose“, den Begriff der „Immunothrombose“ eingeführt haben [25]. Die Aufgaben und Wirkmechanismen des Immunsystems und der Hämostase werden im Folgenden kurz erläutert.

Aufgaben des Immunsystems. Die Aufgabe des Immunsystems besteht in der Aufrechterhaltung der Homöostase und der Funktionsfähigkeit des Organismus, indem möglicher Schaden durch eindringende Pathogene oder andere Noxen frühzeitig erkannt und verhindert wird [26]. Das Immunsystem kann dabei nicht nur durch direkten Kontakt mit dem Pathogen und der Unterscheidung von „selbst“ und „fremd“, sondern auch indirekt über die Wahrnehmung von Veränderungen der Gewebshomöostase und Chemokinlevel aktiviert werden [27]. Es ist daher wichtig zu wissen, dass Immunantworten im Gewebe nicht nur von spezialisierten Immunzellen ausgelöst werden, sondern auch andere Zellen wie Epithelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Adipozyten diese Aufgabe übernehmen [26].

Das angeborene Immunsystem. Das angeborene Immunsystem erkennt Pathogene über sogenannte „Pathogen recognition receptors“ (PRR). Diese Rezeptoren können konservierte, molekulare Muster („Pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs)) detektieren, die im menschlichen Organismus gewöhnlich in dieser Form nicht vorkommen, aber typische Merkmale von Mikroorganismen sind [28]. Daneben sind die PRRs in der Lage pathologische Muster körpereigener Moleküle, sogenannte „Danger-associated molecular patterns“ (DAMPs), zu erkennen und damit indirekt das Resultat pathologischer Prozesse nachzuweisen [29, 30]. Obwohl die Spezifität der PRRs relativ gering ist,

können durch sie eindringende Pathogene frühzeitig erkannt und eine Immunantwort initiiert werden [31, 32].

Die Erkennung von Bakterien durch das angeborene Immunsystem erfolgt über eine weite Bandbreite an PAMPs. Dazu zählen charakteristische Lipoproteine, Lipopolysaccharide, das Flagellin, das Peptidoglycan und bakterientypische Nukleinsäuren. Viren werden dagegen hauptsächlich über Glykoproteine der Oberfläche und charakteristische Eigenschaften der viralen Nukleinsäuren, wie z.B. doppelsträngige RNA, „uncapped“ einzelsträngige RNA und virale DNA erkannt [28, 30, 33].

Die Blutstillung. Die Hämostase ist ein wichtiger Mechanismus, der losgelöst vom Immunsystem und dem Begriff der Immuno-thrombose primär einen übermäßigen Blutverlust nach Gefäßschaden verhindert und aus didaktischen Gründen in die Bestandteile plasmatische Gerinnung und Thrombozytenaggregation unterteilt werden kann [34]. Die plasmatische Gerinnung ist ein Prozess, der durch im Blut gelöste Proteine - den sogenannten Gerinnungsfaktoren - gewährleistet wird, während die Thrombozytenaggregation durch Zellen des Blutes erfolgt. Die Hämostase setzt sich demnach aus einem zellulären und humoralen Anteil zusammen. Subendotheliales Kollagen und Tissue factor tragen entscheidend zur Aufrechterhaltung eines geschlossenen Blutkreislaufs bei. Nach Schädigung der Endothelzellschicht geraten die Bestandteile des Blutes direkt in Kontakt zum subendothelialen Kollagen, das unmittelbar zu einer Thrombozytenaktivierung führt, und zum Tissue factor, der über eine Thrombinaktivierung die Gerinnungskaskade auslöst und ebenfalls zur Aktivierung von Thrombozyten beiträgt.

Thrombozytenrekrutierung und –aktivierung. Thrombozyten sind kleine (Durchmesser ca. 1-3 μm), kernlose, scheibenförmige Zellen des Blutes, die von Megakaryozyten des Knochenmarks in das Blut abgegeben werden [25, 35, 36]. Die Thrombozyten liegen im menschlichen Plasma in Konzentrationen von mehreren Hunderttausenden Thrombozyten pro Mikroliter vor und überwachen die Integrität des Gefäßsystems. Veränderungen des Expressionsprofils von Endothelzellen oder ein Endothelzelldefekt mit Freilegung der subendothelialen Matrix führen zur Aktivierung der Thrombozyten, zur Thrombozytenaggregation und damit in Zusammenarbeit mit dem Gerinnungssystem zur Defektdeckung und Verhinderung eines übermäßigen Blutverlustes [25]. Die Thrombozytenaktivierung durch freiliegendes Kollagen erfolgt abhängig von der Flussgeschwindigkeit des Blutes entweder bei niedrigem Fluss direkt über das Glykoprotein VI oder bei höheren Flussgeschwindigkeiten mittels des im Blut gelösten von Willebrand Faktors und dem Glykoproteinkomplex Ib-V-IX [37, 38]. Binden Thrombozyten über diese Proteine an Kollagen kommt es zu einem „outside-in Signaling“ mit Aktivierung und Degranulation der Thrombozyten. Durch die Freisetzung thrombozytenaktivierender Moleküle, wie Thrombin, ADP, Serotonin und Thromboxan A₂ werden aus der Umgebung weitere Thrombozyten aktiviert und die Aggregation gefördert, sodass sich in exponentieller Weise ein Thrombozyten-reicher Thrombus bildet. Die Thrombozytenaktivierung über diesen Signalweg erfolgt unabhängig von Thrombin [34]. Ein zweiter Signalweg ist auf die Anwesenheit von Thrombin angewiesen und läuft über eine limitierte Proteolyse des auf Thrombozyten exprimierten „Protease activated receptor 1“ (PAR-1), dessen Aktivierung zur Degranulation der Thrombozyten führt und über die oben beschriebene Freisetzung Thrombozytenaktivierender Moleküle die Thrombozytenaggregation fördert [39]. In beiden Fällen verhalten sich die Thrombozyten passiv und werden durch eine verstärkte Expression von Tissue factor auf dem Endothel oder durch Kontakt mit subendothelialen Kollagen bzw. Tissue factor aktiviert. Direkte Einflüsse von z.B. doppelsträngiger RNA auf die Thrombozytenaktivierung wurden noch nicht gezeigt.

Calcium und kleineren Molekülen wie ADP, ATP und Serotonin, während in den sogenannten α -Granula verschiedene Effektormoleküle, wie der „platelet derived growth factor“ (PDGF), diverse Zytokine und Chemokine, die Gerinnungsfaktoren Faktor V und Faktor VIII, Fibrinogen, Thrombin und eine ganze Reihe an anderen Molekülen enthalten sind [41]. Thrombozyten fließen unter physiologischen Bedingungen in einer inaktiven Form im Blut und dienen als Wächter der Gefäßintegrität, die am Ort eines Gefäßschadens aktiviert werden können und durch Aggregation und Aktivierung des Gerinnungssystems einen übermäßigen Blutverlust verhindern können. Durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, wie dem „platelet derived growth factor“ (PDGF), unterstützen Thrombozyten zusätzlich die Gefäßheilung [42, 43]. Aber auch in der Immunabwehr scheinen sie eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten sowohl in der Immunerkennung als auch in der direkten Immunabwehr von Bedeutung sind [43]. Die Aktivierung der Thrombozyten wird durch Kontakt der Thrombozyten mit subendothelialen Kollagen ausgelöst. Die Thrombozyten im Blutstrom werden durch den Gefäßschaden initial abgebremst, über das Kollagen gespült und bleiben schließlich fest hängen. Liegen hohe Scherkräfte und Flussgeschwindigkeiten vor, binden Thrombozyten zunächst über den Rezeptorkomplex GP Ib-V-IX und den im Blut gelösten von Willebrand-Faktor (vWF) an Kollagen und werden dadurch abgebremst und schließlich am Ort der Verletzung festgehalten [44]. Unter niedrigen Flussgeschwindigkeiten und Scherkräften können Thrombozyten über die Rezeptoren GP VI und GP Ia direkt an das subendotheliale Kollagen binden [45]. Nach Bindung der Thrombozyten an das subendotheliale Kollagen über die oben genannten Rezeptorkomplexe werden sie durch ein „outside in – signaling“ aktiviert [46]. Die Aktivierung der Thrombozyten führt zur Änderung der Zellform mit Ausbildung dünner, langer Fortsätze und zur Freisetzung der Inhaltstoffe der Thrombozytengranula. Der inaktive Rezeptor GP IIb/IIIa wird aktiviert und kann im Anschluss Fibrin und über den vWF an Kollagen binden [40]. Dadurch kommt es zu einer ausgeprägten Quervernetzung des entstehenden Thrombozytenaggregats mit Fibrin und zu einer Stabilisierung des entstandenen primären Thrombus. Durch die Freisetzung von Thrombin, Faktor V und Faktor VIII, von vWF, Fibronectin, Fibrinogen und Calcium aus den α -Granula und durch die verstärkte Ausstülpung negativ geladener Phospholipide in die äußere Schicht des Lipiddoppellayers der Plasmamembran bilden aktivierte Thrombozyten eine gute Plattform zur Initiierung der Gerinnung. Abgespaltene negative-geladene Microvesicles, die sich aus aggregierten Thrombozyten ablösen können, zeigen ebenfalls eine prothrombotische Wirkung [42]. Neben der Gerinnungsaktivierung können bereits aktivierte und aggregierte Thrombozyten durch die Freisetzung von Thrombin, Calcium, Serotonin, Thromboxan A2 und ADP weitere Thrombozyten rekrutieren. Thrombin ist ein sehr potenter Thrombozytenaktivator und aktiviert Thrombozyten über eine limitierte Proteolyse des „protease-activated receptor 1“ (PAR-1) [46]. ADP wird durch die P_2Y -Rezeptoren erkannt und aktiviert über diesen Signalweg Thrombozyten sehr effektiv. Dagegen besteht die Wirkung von Serotonin und Thromboxan A2 primär in einer Vasokonstriktion mit Verengung des Lumens und Herabsetzung der Flussgeschwindigkeit, die die Thrombusbildung durch Verminderung der Scherkräfte fördert [41, 46].

Das Gerinnungssystem. Neben den Thrombozyten spielt die Gerinnungskaskade eine wesentliche Rolle im Prozess der Hämostase und ist für die mechanische Stabilisierung des entstandenen primären Thrombus von essentieller Bedeutung. Eine zentrale Aufgabe übernimmt hier der sogenannte Tissue factor, ein Membranprotein, das auf unterschiedlichsten Zellen konstitutiv oder nach Stimulation exprimiert wird. Eine konstitutive Expression liegt auf Zellen außerhalb des Gefäßlumens vor und betrifft vor allem Fibroblasten, Perizyten und glatte Gefäßmuskelzellen der Gefäßwand [47]. Eine Expression auf Monozyten und Endothelzellen kann durch Stimulation mit proinflammatorisch wirkenden Substanzen ausgelöst werden [48-51]. Daneben kommt auch mit dem sogenannten „blood borne tissue factor“ eine im Blut gelöste Form vor, die wohl hauptsächlich von Leukozyten, Endothelzellen und Thrombozyten stammt [52] und sowohl in physiologischen, als auch pathologischen Prozessen beteiligt sein könnte [34]. Da der Tissue factor in einer inaktiven und einer aktiven Konformation vorkommt und der „blood borne tissue factor“ als auch der intraluminale Tissue factor erst nach Reaktion mit der „Protein disulfide isomerase“ (PDI) in seine aktive Form

umgewandelt wird, lösen diese unter physiologischen Bedingungen keine Gerinnung aus [53]. Die aktive Form des Tissue factors bindet den im Blut gelösten Gerinnungsfaktor VII und bildet mit diesem einen membranständigen Enzymkomplex, der Faktor X in die aktive Form Xa spaltet. Gerinnungsfaktor Xa wiederum bildet mit dem Cofaktor Va den sogenannten Prothrombinasekomplex, der für die proteolytische Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin verantwortlich ist [49, 54]. Thrombin ist ebenfalls ein membranständiges Enzym, das durch limitierte Proteolyse Fibrinogen in Fibrin umwandelt, das dann anschließend polymerisiert und die fädige Verbindungsstruktur innerhalb des Thrombus bildet. Das entstandene Fibrinpolymer wird abschließend durch den Faktor XIIIa, der eine Transglutaminaseaktivität besitzt, quervernetzt und stabilisiert. Die Gerinnungskaskade wird zunächst über den Tissue-factor-Signalweg ausgelöst und mündet schließlich in der Bildung von Thrombin, dem zentralen Gerinnungsfaktor [37, 54, 55]. Sobald dieser in ausreichenden Mengen gebildet ist, kann er seine eigene Bildung durch verschiedene Mechanismen fördern. So aktiviert er den Faktor VIII zu Faktor VIIIa, der zusammen mit Faktor IX die Faktor Xa-Bildung unterstützt und er aktiviert ferner Faktor V zu Va, der als Cofaktor mit Faktor Xa die Thrombinbildung fördert. Somit hält sich die Gerinnung nach Aktivierung über den Tissue-factor-Signalweg selbstständig und unabhängig von Tissue factor am Laufen bzw. wird sogar verstärkt [34]. Der Tissue factor kann also als Auslöser der Gerinnung und damit als Signalgeber verstanden werden, während Thrombin als zentraler Regulator des Ausmaßes der Gerinnung fungiert [34]. Ein modifiziertes Schema nach Furie et al. zeigt diese Zusammenhänge in einer Übersicht (Abbildung 2). All diese Prozesse dienen primär der Verhinderung eines übermäßigen Blutverlustes nach Schädigung der Endothelzellschicht bzw. des Gefäßlumens. Es handelt sich um physiologische Prozesse.

Thrombose. Im Unterschied zur physiologischen Hämostase wird der pathologische Prozess der übermäßigen intravasalen Gerinnselbildung als Thrombose bezeichnet [25]. Bereits 1856 hat der deutsche Pathologe Virchow eine wichtige Theorie zur Entstehung der Thrombose entwickelt. Die sogenannte Virchow-Trias umfasst Veränderungen der Gerinnungsaktivität des Blutes, des Blutflusses und der Gefäßwand. Heute weiß man, dass dies auf veränderte Konzentrationen von pro- und antikoagulatorischen Faktoren innerhalb des Blutes, auf Strömungsveränderungen des Blutstroms und Änderungen der Endothel Eigenschaften, z.B. in der Oberflächenexpression pro- und antikoagulatorischer Faktoren zurückzuführen ist [56-58]. Außerdem unterscheidet man heute zwischen dem Pathomechanismus der arteriellen Thrombose, die für die in der westlichen Welt häufigsten zum Tode führenden Erkrankungen (Herzinfarkt und Schlaganfall) verantwortlich ist und dem Pathomechanismus der venösen Thrombose, die in Form von thrombembolischen Ereignissen, insbesondere der Lungenembolie, ebenfalls zu vielen Todesfällen führt [56, 57].

Der Begriff der Immunothrombose versucht die Verbindungen zwischen dem Immunsystem und dem System der Blutstillung zu veranschaulichen. Unter physiologischen Konditionen wirken beide Systeme synergistisch und sind stark miteinander verwoben. Erst im Moment der unzureichenden Immunabwehr oder übermäßigen Aktivierung des Gerinnungssystems stellt sich ein pathologischer Zustand ein, der sich klinisch in Veränderungen der Blutgerinnung äußert [25].

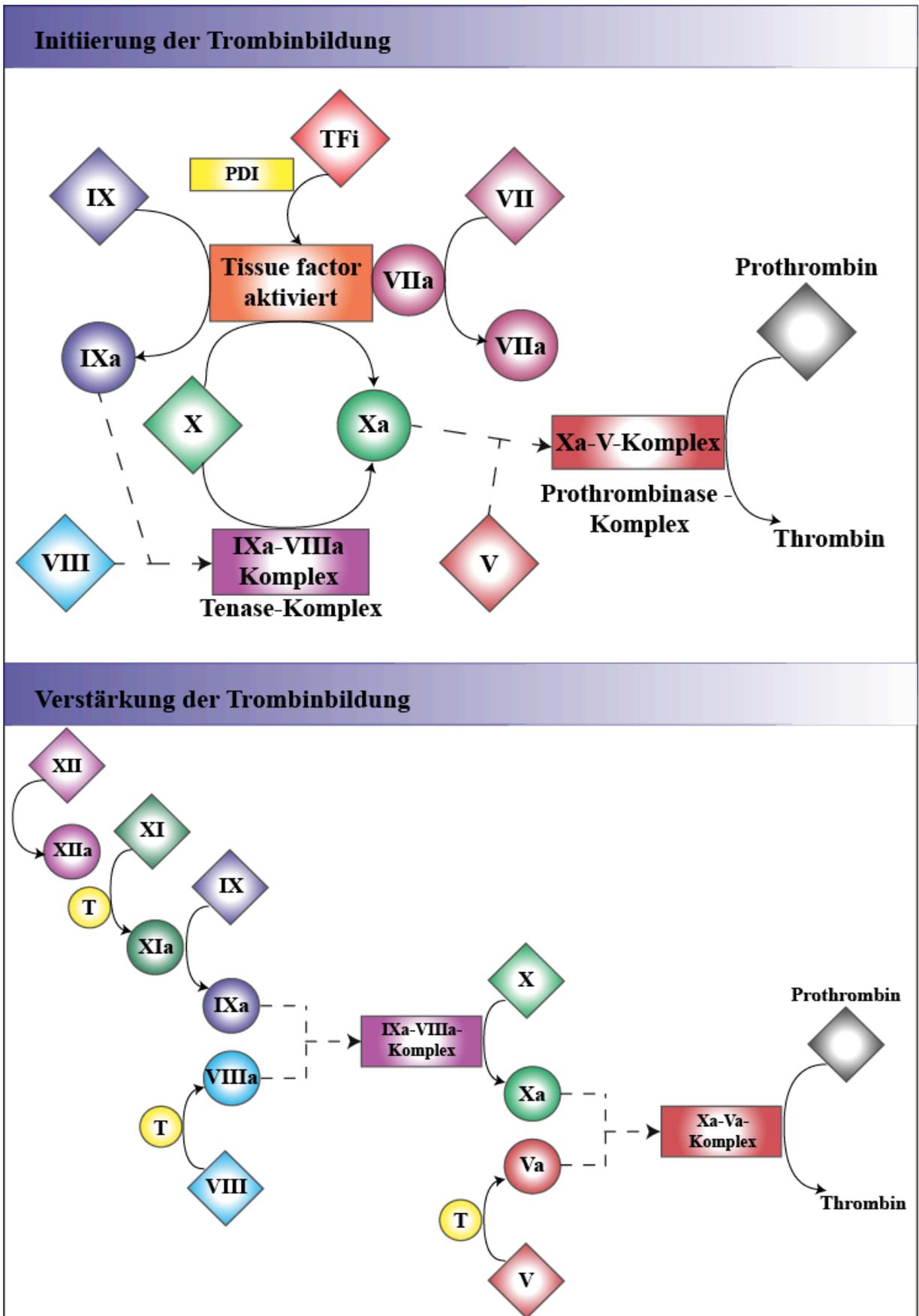


ABBILDUNG 2. GERINNINGSKASKADE MODIFIZIERT NACH FURIE ET AL (N ENGL J MED 2008;359:938-49.)

Die Gerinnung kann didaktisch in zwei unterschiedliche und teilweise unabhängige Reaktionsketten unterteilt werden. Der zentrale Faktor in der Initiierung der Gerinnung ist der aktivierte Tissue factor. Der Tissue factor - Faktor VIIa Komplex als zentraler Auslöser der Gerinnung fördert durch limitierte Proteolyse von Faktor IX und X zu IXa und Xa die Bildung des Prothrombinasekomplexes und die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin. Thrombin seinerseits verstärkt unabhängig von der Anwesenheit des Tissue factors seine eigene Produktion und hält damit den Gerinnungsprozess in Gang. Die Abhängigkeit des Beginns der Thrombinbildung vom Tissue factor, der jedoch für die Aufrechterhaltung der Gerinnung nicht notwendig ist, bietet einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt, der eine übermäßige Thrombusbildung verhindert und gleichzeitig das Gerinnungssystem an sich nicht verändert. Gerinnungsfaktoren in römischen Ziffern, Thrombin (T), Tissue factor (TF), Protease disulfide isomerase (PDI).

Da einige der Mediatoren der Immunothrombose bereits bekannt und diese zum Teil im Prozess der Hämostase entbehrlich sind, könnte durch eine therapeutische Beeinflussung dieser Mediatoren Einfluss auf eine übermäßige Thrombusbildung ausgeübt werden, ohne die physiologischen Aufgaben der Hämostase zu gefährden [25]. Ob doppelsträngige RNA, die z.B. bei der Replikation von Viren innerhalb der Zelle anfällt, einen Einfluss auf die Gerinnungsbildung in vivo hat und die Mechanismen der ds-RNA-Erkennung mögliche Ansatzpunkte einer Therapie sind, wurde nachfolgend untersucht.

1.3 MECHANISMEN ZUR ERKENNUNG DOPPELSTRÄNGIGER RNA DURCH DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM

Das Immunsystem der Säugetiere kann grob in zwei Kategorien unterteilt werden: in das angeborene und das adaptive Immunsystem. Das adaptive Immunsystem ist über spezialisierte Zellen, den sogenannten B- und T-Lymphozyten und durch somatische Rekombination, somatische Hypermutation, sowie klonale Expansion in der Lage hochspezifisch Antigene diverser Pathogene zu erkennen und selektive Immunantworten auszulösen [59-62]. Diese Prozesse benötigen weitere Helferzellen, die Bestandteile des angeborenen Immunsystems und eine gewisse Zeit um eine effektive Immunantwort zu gewährleisten. Nach einem ersten Kontakt kann jedoch auf diese erworbenen Fähigkeiten direkt zurückgegriffen werden und die Immunantwort bei einem erneuten Kontakt wesentlich schneller aktiv werden. Das angeborene Immunsystem der Säugetiere erkennt Pathogene über konservierte molekulare Muster („Pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs)), die in dieser Form im menschlichen Organismus nicht vorkommen und kann dadurch eine frühzeitige Immunantwort auslösen [28, 29, 63]. Die Erkennung erfolgt über „Pathogen recognition receptors“ (PRR), die relativ spezifisch bestimmte PAMPs, aber auch andere Gefahrensignale des Körpers wie z.B. „Danger-associated molecular patterns“ (DAMPs) detektieren können [33, 64].

Die Erkennung viraler Infektionen durch das angeborene Immunsystem erfolgt hauptsächlich über den Nachweis viraler Nukleinsäuren, da Viren kaum andere konservierte molekulare Strukturen besitzen [65]. Doppelsträngige RNA, die z.B. während der viralen Replikation in der Zelle anfällt, ist ein typisches PAMP, das durch verschiedene Rezeptorsignalwege nachgewiesen werden kann [64, 66-70]. Eine wichtige Rezeptorfamilie der PRRs sind die sogenannten Toll-like-Rezeptoren (TLRs), von denen man aktuell beim Menschen 10 verschiedene Vertreter kennt.

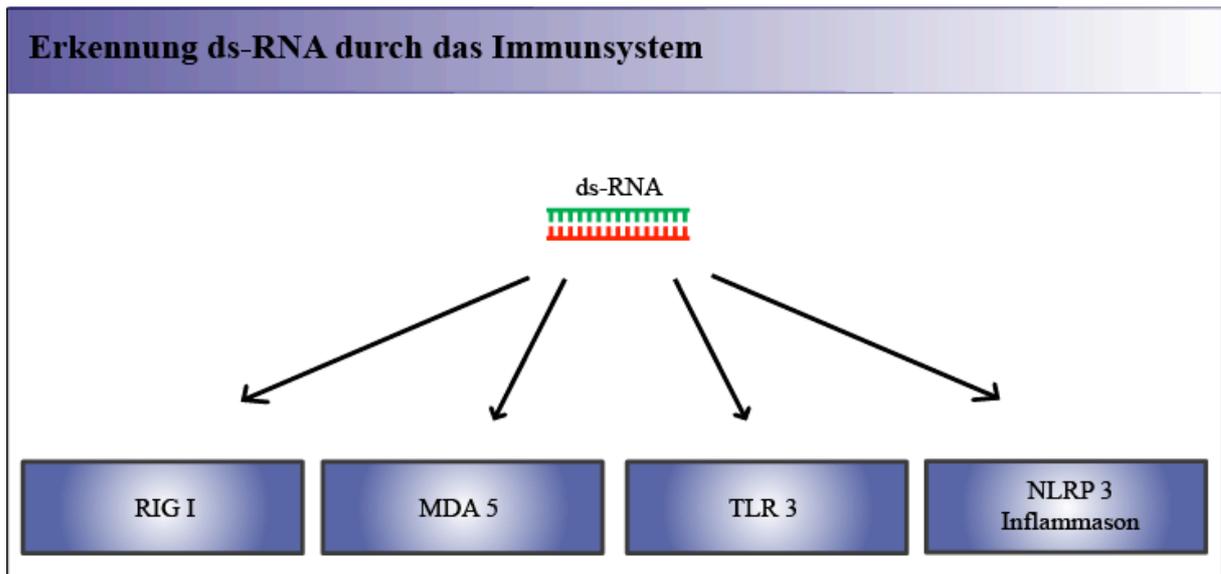


ABBILDUNG 3. ÜBERSICHT DER DS-RNA ERKENNUNG

Bei der Erkennung von ds-RNA durch das angeborene Immunsystem spielen vier große „pathogen recognition receptor“ (PRR) – Signalwege eine bedeutende Rolle. Zu diesen Signalwegen gehören u.a.: die „retinoic acid-inducible gene-I-like receptors“ (RIG I), das „melanoma differentiation-associated protein 5“, der „Toll like receptor 3“ (TLR 3) und der „multi-protein NLRP 3 inflammasome complex“ (NLRP 3) [28, 30, 33, 71].

Der Toll-like-Rezeptor 3 (TLR 3) ist in den Endosomen lokalisiert und erkennt doppelsträngige RNA (ds-RNA) [28, 63, 72, 73]. Anders als bei den anderen TLRs läuft der Signalweg nicht über das Adapterprotein „myeloid differentiation primary-response protein 88“ (MYD88), sondern über das „TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β “ (TRIF). Über eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B wird die Expression proinflammatorischer Zytokine und über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 die Expression von Typ I Interferonen gefördert [28, 30, 64]. Zytosolische RNA wird u.a. durch Mitglieder der DExD/H-box Helikase-Superfamilie erkannt. Wichtige Vertreter sind hier das „retinoic acid-inducible gene I“ (RIG-I), das „laboratory of genetics and physiology 2“ (LGP-2) und das „nucleotide-binding oligomerization domain protein 2“ (NOD2), die kurze einzelsträngige RNA mit einem freien 5'-Triphosphatende erkennen und das „melanoma differentiation-associated protein 5“ (MDA5), das speziell zytosolische doppelsträngige RNA nachweist [63, 69, 70, 74-76]. Über diese sich ergänzenden Mechanismen ist das angeborene Immunsystem sehr gut in der Lage doppelsträngige RNA in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle zu erkennen.

In den letzten Jahren wurde in interessanten Arbeiten der Einfluss der Erkennung von doppelsträngiger RNA auf die Prozesse der Atherosklerose und Thrombose untersucht. Bereits 1994 berichteten Doukas et al. [77], dass ds-RNA in Form von Poly(I:C) ein potenter Aktivator von Endothelzellen ist. In vivo konnten Zimmer et al. [78] zeigen, dass die Aktivierung des Toll-like-Rezeptor 3 mittels Poly(I:C) die endotheliale Funktion im chronischen Prozess der Atherosklerose maßgeblich verschlechtert. Lundberg et al. [79] wiesen u.a. in Endothelzellen eine verstärkte Freisetzung von Zytokinen nach Stimulation mit Poly(I:C) und eine verstärkte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B nach.

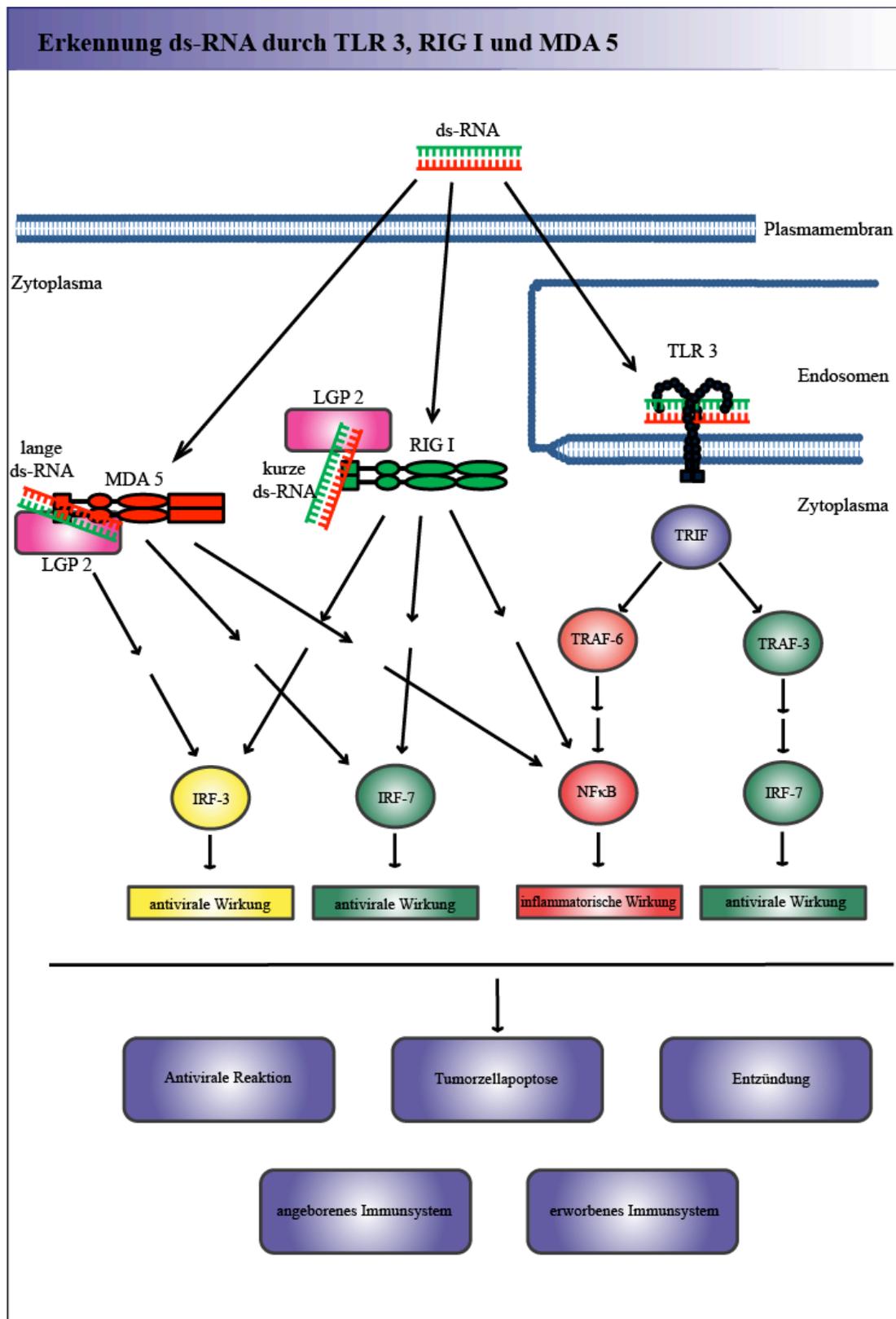


ABBILDUNG 4. ERKENNUNG DS-RNA DURCH TLR 3, RIG I UND MDA 5

Ds-RNA als „pathogen associated molecular pattern“ (PAMP) wird vom angeborenen Immunsystem durch „pathogen recognition receptors“ (PRR) erkannt und dient u.a. der Abwehr viraler Infektionen, die charakteristische ds-RNA besitzen bzw. während des Replikationszyklus in der Zelle bilden. Ds-RNA kann bei einer viralen Infektion frei im Zytosol während der Infektion oder der Replikation vorkommen oder nach Phagozytose oder zur Oberflächenexpression auf MHC I Molekülen in die

Endosomen gelangen. Freie ds-RNA wird im Zytosol durch das „retinoic acid-inducible gene-I-like“ (RIG I) und das „melanoma differentiation-associated protein 5“ (MDA 5) erkannt. Die ds-RNA-Erkennung wird durch das Adapterprotein „laboratory of genetics and physiology 2“ (LGP 2) unterstützt. Kurzkettige ds-RNA wird bevorzugt von RIG I detektiert, während längere Stränge von ds-RNA leichter durch MDA 5 nachgewiesen werden. Eine Aktivierung von RIG I und MDA 5 führt durch anschließend komplexe Signalwege zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren „interferon regulatory factors 3 and 7“ (IRF 3, IRF 7), die durch Freisetzung von Interferonen eine antivirale Wirkung vermitteln und zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB, der proinflammatorisch wirkt. Der „Toll like receptor 3“ (TLR 3) kann ds-RNA in den Endosomen nachweisen und durch das Adaptermolekül „TIR domain-containing cytosolic adapter inducing interferon β“ (TRIF) mit anschließender Aktivierung von „tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 and 6“ (TRAF 3, TRAF 6) IRF 7 und NFκB aktivieren [28, 33, 63, 71, 73]. Grafik basiert auf dem Artikel von Yu et. al. [71].

Schließlich zeigten Preissner et al. [80] in Endothelzellen *in vitro* eine Hochregulation von prothrombotischen Molekülen, wie z.B. des Tissue factor nach Inkubation mit Poly(I:C). Diese Arbeiten haben als Grundlage für die Etablierung der Fragestellung dieser Dissertation gedient. In einer kürzlich erschienen Publikation konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten in geringen Mengen den TLR-3-Rezeptor exprimieren und das Poly(I:C) gewisse „direkte“ Effekte auf Thrombozyten zeigt [81]. Ob Poly(I:C) allerdings das Aggregationsverhalten von Thrombozyten beeinflussen kann und ob ds-RNA *in vivo* den akuten Prozess der Thrombusbildung in der Mikrozirkulation nach endothelialer Schädigung begünstigt, ist bis jetzt noch unbekannt.

1.4 DAS SYNTHETISCHE DOPPELSTRÄNGIGE RNA-ANALOGON POLYINOSINIC:POLYCYTIDYLIC ACID (POLY(I:C))

Poly(I:C) dient als doppelsträngiges RNA-Analogon und wird durch verschiedene PRRs erkannt. Zu diesen PRRs gehören u.a. der TLR-3, RIG-I und MDA 5 [30, 72, 73]. Das von uns verwendete Poly(I:C) besteht aus einem Strang Polyinosinsäure (Poly(I)) und einem Strang Polycytidylsäure (Poly(C)) und hat eine durchschnittliche Größe von 1,5 – 8 kb (INVIVOGEN, San Diego, California, USA). Poly(I:C) ist ein potenter Aktivator von Endothelzellen [77].

1.5 AKTIVIERTES PROTEIN C – ROLLE IN DER GERINNUNG UND ENTZÜNDUNG

Das Protein C-System besitzt antikoagulative, antiinflammatorische und antiapoptotische Eigenschaften, weshalb es in systemischen Entzündungsprozessen, die z.B. bei Sepsis, infolge von Traumata und dem akuten Lungenversagen (ARDS, „acute respiratory distress syndrome“) auftreten, von großer Bedeutung sind und ein mögliches therapeutisches Target darstellen [82]. Veränderungen der Protein C-Konzentration im Plasma sind mit einer Vielzahl von Veränderungen innerhalb der Gerinnung und des Immunsystems verbunden. Protein C wurde im Jahr 1976 durch Stenflo und Kollegen als weiteres Vitamin K-abhängiges Plasmaprotein entdeckt [83, 84]. In den folgenden Jahren erkannte man zunächst seine wichtige antikoagulative Rolle in der Gerinnung, wobei früh auch antiinflammatorische und zytoprotektive Effekte beschrieben wurden. Wie wichtig die antikoagulative Funktion von Protein C ist, zeigt sich auch im Menschen. In Neugeborenen geht ein schwerer homozygoter Protein C Mangel mit massiven thrombotischen Komplikationen, Purpura fulminans und disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) einher. Heterozygote Erwachsene besitzen ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von venösen Thrombosen [85, 86]. Aber auch Mutationen des Gerinnungsfaktors Faktor Va, der durch aktiviertes Protein C dann nicht mehr inaktiviert werden kann, können die Wirkung von Protein C aufheben und ebenfalls zu einem prothrombotischen Zustand beitragen [87, 88]. Im Tiermodell äußert sich eine absolute Inaktivierung von Protein C in KO-Mäusen in einem letalen Phänotyp, der kurz nach der Geburt verstirbt, während Mäuse mit niedrigen Protein C

Plasmakonzentrationen frühzeitig thrombotische Komplikationen erleiden [89, 90]. Verminderte Serumspiegel von Protein C können jedoch auch erworben sein, sind z.B. in Patienten mit schwerer Sepsis zu finden und ebenfalls mit einem erhöhten Sterberisiko verbunden [91-93].

Immunologische Effekte von Protein C. Protein C zeigt aber nicht nur Effekte auf die Gerinnung, sondern besitzt auch einen bedeutenden Einfluss auf die Immunabwehr und das Zellüberleben. Erste Hinweise auf die immunmodulatorischen Eigenschaften von Protein C konnte Ende der 1980er Jahre in einem Tiermodell bei bakterieller Sepsis gezeigt werden [94]. Hier konnte eine Behandlung mit Protein C das Überleben der Tiere signifikant verlängern [94].

Aktiviertes Protein C in der Sepsistherapie. Daher stieg das Interesse an einer therapeutischen Verwendung von Protein C bei Sepsis im Menschen. Die Wirkung des rekombinanten humanen aktivierten Protein C (Drotrecogin alfa, rh aPC) auf die Sterberate von Patienten mit schwerer Sepsis und hohem Sterberisiko wurde in einer großen klinisch-randomisierten, doppel verblindeten, placebokontrollierten, multizentrischen Phase-III-Studie untersucht. Die sogenannte PROWESS Studie zeigte eine Abnahme der Sterberate von 30,8% bei der mit dem Placebo behandelten Gruppe auf 24,7% bei der mit Drotrecogin alfa behandelten Gruppe, bei gleichzeitig leicht erhöhter Blutungsneigung [95]. Nach Zulassung von Drotrecogin alfa durch die zuständigen Arzneimittelbehörden der USA und der EU wurden jedoch in einer Vielzahl von Studien widersprüchliche Ergebnisse über dessen Wirksamkeit veröffentlicht, was schließlich in der Durchführung einer großen Kontrollstudie endete. Die sogenannte PROWESS-Shock Studie konnte nach Veröffentlichung im Frühjahr 2012 die Ergebnisse der PROWESS Studie nicht bestätigen. Die Behandlung mit Drotrecogin alfa senkte die Mortalität von Patienten im septischen Schock im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht, was zur Rücknahme der Behandlungsempfehlung und zur Einstellung der Produktion und des Vertriebs von Drotrecogin alfa durch den Hersteller führte [96]. Ähnliche Ergebnisse zeigten weitere Studien, die zum einen den Effekt von Drotrecogin alfa bei schwerer Sepsis des Kindes (RESOLVE) [97] und zum anderen die Wirksamkeit bei Erwachsenen mit schwerer Sepsis und niedrigem Sterberisiko untersuchten (ADDRESS) [98]. In beiden Studien konnte kein positiver Effekt auf die Mortalität festgestellt werden, wobei in der ADDRESS-Studie ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von schweren Blutungen unter der Behandlung mit Drotrecogin alfa zu sehen war. Da die Herstellung von aktiviertem Protein C (aPC) technisch schwierig ist und der einzige Hersteller das Medikament vom Markt genommen hat, ist der Einsatz beim Menschen aktuell nicht möglich. Daher wird weitere Grundlagenforschung über die Wirkung des Protein C-Systems im Bereich der akuten Entzündung in Sepsis, Trauma oder ARDS nötig sein. Die Herstellung von selektiven zytoprotektiven aPC-Varianten stellt hier eine interessante Alternative dar [99].

1.6 PROTEIN C – SYNTHESE, AKTIVIERUNG UND INAKTIVIERUNG

Aufbau von Protein C. Protein C ist das 62 kDa große Zymogen der Serinprotease „aktiviertes Protein C“ (aPC), wird in der Leber Vitamin K-abhängig synthetisiert und in das Blut abgegeben [82, 100, 101]. Es wurde erstmals im Jahre 1976 von Stenflo aus bovinem Plasma isoliert, wobei die Funktion zu diesem Zeitpunkt noch nicht geklärt war [102, 103]. Die physiologische Plasmakonzentration von Protein C im Menschen beträgt etwa 70 nM bei einer Halbwertszeit von 8 Stunden [82, 104]. Die Halbwertszeit von aPC ist mit 20-25 min recht kurz, die Plasmakonzentration liegt bei etwa 40 pM [82, 105]. Die Inaktivierung von aPC erfolgt durch Serinproteaseninhibitoren, wie z.B. durch den Protein C Inhibitor, Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1), α_1 -Antitrypsin, α_2 -Macroglobulin und α_2 -Antiplasmin [106]. Protein C besteht aus 419 Aminosäuren und wird vom menschlichen Gen PROC auf Chromosom 2 kodiert, das 9 Exons besitzt [104]. In der Tertiärstruktur des Protein C unterscheidet man eine Gla-Domäne, zwei „epidermal growth factor like“-Regionen

(EGF-1 und -2), das Aktivierungspeptid und die enzymatische Serinproteasen-Domäne mit einem His211, Asp257 und Ser360 [104].

Aktivierung von Protein C. Die Umwandlung von Protein C zu aktiviertem Protein C geschieht durch limitierte Proteolyse und findet auf der Oberfläche von Endothelzellen statt [107]. Der Gerinnungsfaktor Thrombin erfährt nach Bindung an Thrombomodulin, einem an der Oberfläche von Endothelzellen exprimierten Protein, eine Konformationsänderung und ist dadurch in der Lage das Aktivierungspeptid von Protein C an Position Arg169 abzuspalten [100, 108-112]. Dies führt zur Freilegung des katalytischen Zentrums und zur Bildung von aktiviertem Protein C. Die Anwesenheit des endothelialen Protein C Rezeptors (EPCR) [113], an den Protein C über seine Gla-Domäne bindet und dadurch in direkter Nähe des Thrombin-Thrombomodulin-Komplexes gehalten wird, steigert die Aktivierungsrate von Protein C durch den Thrombin-Thrombomodulin-Komplex um etwa das Zwanzigfache [100, 104, 114, 115]. Der endotheliale Protein C Rezeptor (EPCR) ist daher essentiell für die Aktivierung von Protein C zu aktiviertem Protein C und beeinflusst damit direkt die durch aPC vermittelten Effekte bezüglich Gerinnung, als auch Zytoprotektion. Die Bedeutung von EPCR konnte in einem Tiermodell bestätigt werden, indem eine Überexpression von EPCR zu einer verstärkten Bildung von aPC beitrug und die Tiere gegen thrombotische Ereignisse als auch septische Prozesse schützte [116].

Das aktivierte Protein C kann seine Funktionen einerseits gebunden an den endothelialen Protein C Rezeptor oder frei im Plasma gelöst erfüllen.

1.7 DIE ANTIKOAGULATIVE WIRKUNG VON AKTIVIERTEM PROTEIN C

Aktiviertes Protein C entfaltet seine antikoagulative Wirkung durch proteolytische Spaltung und damit Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Faktor Va und VIIIa [100, 117-120]. Dadurch wird die Gerinnungskaskade an wichtigen Punkten gehemmt und das Ausmaß der primären und sekundären Thrombinbildung eingeschränkt. Dies führt zu einer verminderten Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, einer geringeren Fibrinpolymerisation und Gerinnselbildung [83, 100, 111, 118].

Inaktivierung von Faktor Va. Die Inaktivierung des Gerinnungsfaktors Faktor Va geschieht durch Proteolyse an Arg306, Arg506, Arg697 und Lys994, wobei die Schnittstelle Arg306 entscheidend für die Inaktivierung ist [120]. Da Faktor Va die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin um etwa den Faktor 10.000 verstärkt, folgt aus der Inaktivierung von Faktor Va durch aPC eine deutliche Reduktion der Thrombinbildung [121]. Die Bedeutung der Inaktivierung von Faktor Va für die Gerinnung und die Spezifität der Schnittstellen zeigt sich in den Folgen von Mutationen, wie Faktor V_{Leiden} (Arg506Gln), Faktor V_{Cambridge} (Arg306Thr) und Faktor V_{Hong Kong} (Arg306Gly), die eine Inaktivierung von Faktor Va durch aktiviertes Protein C verhindern. Faktor V_{Leiden} ist der häufigste hereditäre Risikofaktor für das Auftreten von venösen Thrombosen unter Kaukasiern [88, 122].

Inaktivierung von Faktor VIIIa. Die Bedeutung der Inaktivierung von Faktor VIIIa durch aPC ist umstritten, da Faktor VIIIa mit einer Halbwertszeit von nur 2 min durch spontane Dissoziation inaktiviert wird [106, 123]. Dennoch könnte aPC auch hier eine gewisse Funktion erfüllen, da Faktor VIIIa die Bildung des Tenase-Komplexes deutlich um den Faktor 200.000 erhöht [106, 124].

Wichtige Kofaktoren des aktivierten Protein C sind das Protein S, der Gerinnungsfaktor Faktor V und negativ geladene Phospholipide [100, 118, 125].

Protein S. Die Inaktivierung des aktivierten Faktors Va durch aktiviertes Protein C wird unter Anwesenheit des Kofaktors Protein S um ein Vielfaches gesteigert. Protein S alleine zeigt allerdings keine direkten Effekte auf die Gerinnung [126, 127], wobei ein Fehlen von Protein S mit einem

höheren Risiko für das Auftreten von venösen Thrombembolien verbunden ist [128]. In Anwesenheit des Kofaktors Protein S beschleunigt der Gerinnungsfaktor Faktor V die Inaktivierung des Gerinnungsfaktors Faktor VIIIa durch aktiviertes Protein C um das Doppelte [129, 130].

Da es sich bei all diesen Prozessen um Abläufe handelt, die an der Oberfläche von Membranen ablaufen, spielen ferner negativ geladene Phospholipide eine wichtige Rolle [125].

1.8 DIE ZYTOPROTEKTIVE WIRKUNG VON AKTIVIERTEM PROTEIN C

Neben seiner antikoagulativen Funktion besitzt das Protein C-System auch zytoprotektive und antiapoptische Eigenschaften. Zur Erfüllung seiner zytoprotektiven Aufgaben benötigt Protein C den „endothelial protein C receptor“ (EPCR) und den „protease-activated receptor 1“ (PAR-1) [131, 132].

Die zytoprotektiven Wirkungen von aktiviertem Protein C umfassen Veränderungen der Genexpression, antiinflammatorische Eigenschaften, antiapoptische Effekte und eine Förderung der endothelialen Barrierefunktion [132-136].

Mechanismen der zytoprotektiven Wirkung. Aktiviertes Protein C fördert die Expression von antiinflammatorischen und antiapoptischen Genprodukten und hemmt proinflammatorische und proapoptische Signalwege [133, 134, 136-140]. aPC unterdrückt unter anderem die Expression und Funktionalität des proinflammatorischen und proapoptischen Transkriptionsfaktors NF- κ B, wodurch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Leukozyten und Endothelzellen und die Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen gehemmt wird [141-143]. Die antiapoptischen Wirkungen von aPC resultieren aus Änderungen des Gleichgewichts von pro- und antiapoptischen Molekülen zu Gunsten der antiapoptischen Moleküle des intrinsischen und extrinsischen Apoptosesignalwegs. So konnte in einem Tiermodell gezeigt werden, dass aPC die Konzentrationen der proapoptischen Moleküle p53 und Bax senkt und gleichzeitig die Konzentration des antiapoptischen Moleküls Bcl-2 erhöht. Zusätzlich werden auch hemmende Effekte auf den extrinsischen Apoptosesignalweg beschrieben [144]. Die antiapoptischen Effekte von aPC konnten experimentell in vitro und in vivo gezeigt werden und sind ein wichtiger Aspekt der pharmakologischen Wirkung von aPC als Therapeutikum bei entzündlichen Prozessen, wobei bis heute keine intrazellularen Targets für aPC beschrieben worden sind [143, 145]. Die endothelstabilisierende Wirkung von aPC wird unter anderem durch EPCR abhängige PAR-1 Aktivierung und über den Sphingosin-1-Phosphat (S1P) Weg vermittelt. aPC induziert die Sphingosinkinase 1, wodurch es zu einer Hochregulation von S1P und über den S1P-Rezeptor 1 zu einer Stabilisierung der endothelialen Barriere kommt [104]. Neben diesen direkten Effekten kann aPC indirekt durch Hemmung der durch tPA induzierten Matrixmetalloproteinase 9 (MMP 9), deren Wirkung in einer Durchbrechung der Endothelbarriere beruht, ebenfalls Einfluss auf die Integrität des Endothels nehmen [134, 138, 144].

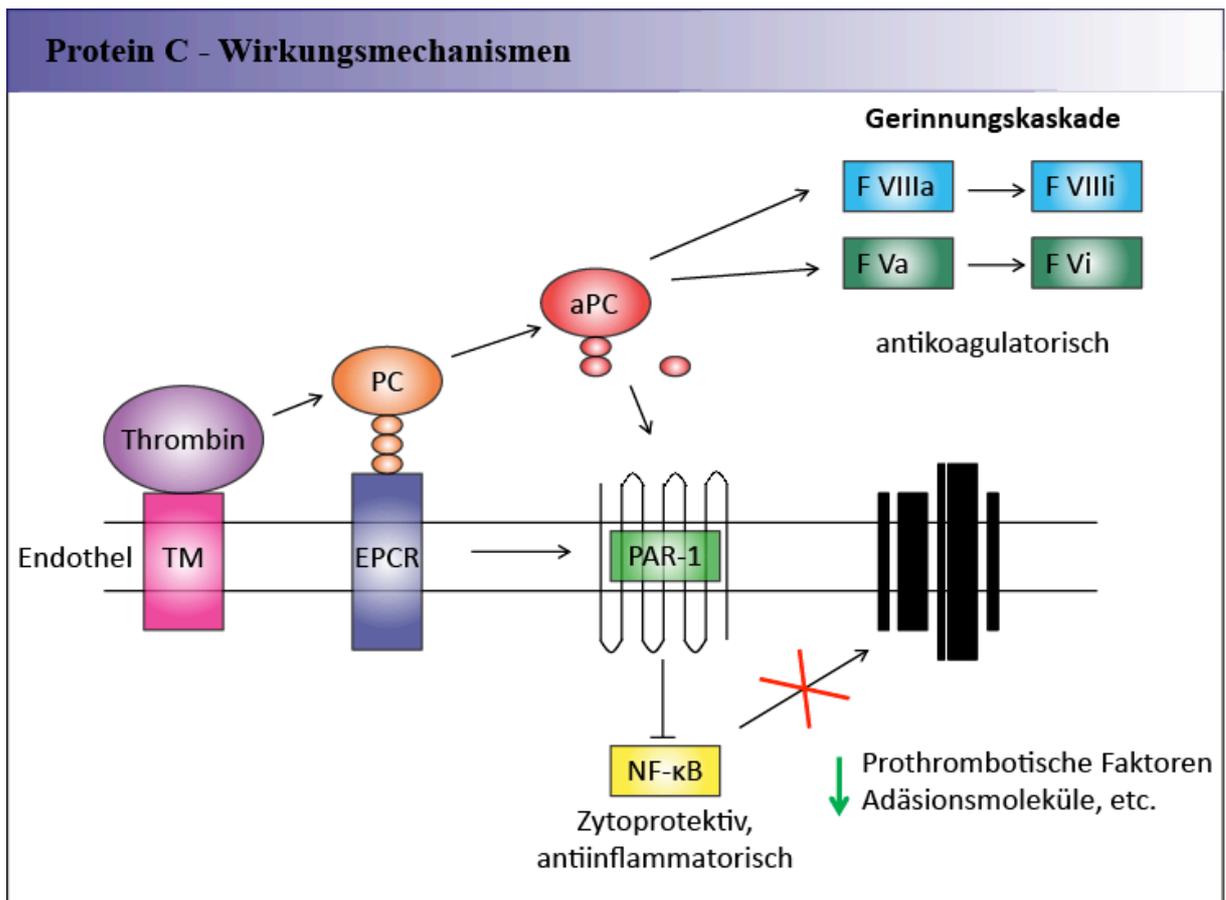


ABBILDUNG 5. PROTEIN C – WIRKUNGSMECHANISMEN

Protein C wird in der Leber Vitamin-K-abhängig synthetisiert und in das Blut abgegeben. Nach Bindung an den „endothelial protein C receptor“ (EPCR), der auf Endothelzellen konstitutiv exprimiert wird, kann Protein C durch Thrombin, das an „thrombomodulin“ (TM) gebunden ist, aktiviert werden. Durch limitierte Proteolyse und Abspaltung des Aktivierungspeptides entsteht aktiviertes Protein C (aPC). aPC wirkt durch Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Faktor Va (F Va) und Faktor VIIIa (F VIIIa) antikoagulatorisch. Die zytoprotektive und antiinflammatorische Wirkung von Protein C wird durch eine Konformationsänderung mit anschließend veränderten Signaling des „protease-activated receptor 1“ (PAR-1) vermittelt. Bindet Protein C bzw. aPC an den EPCR führt dies zu einer Konformationsänderung des EPCR, die ihrerseits zu einer Konformationsänderung des PAR-1 beiträgt. Die eigentliche Aktivierung des PAR-1 geschieht über limitierte Proteolyse des extrazellulären Aktivierungspeptides durch Thrombin bzw. aktiviertes Protein C. Durch Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB wird die Transkription proinflammatorischer Gene von Zytokine und Adhäsionsmoleküle gehemmt [100, 104, 131, 136, 137, 141, 143, 146].

Für die Erfüllung der oben genannten zytoprotektiven Wirkungen benötigt aPC die Gegenwart von EPCR, Caveolin-1 und PAR-1 [101, 132, 136, 147, 148]. Das protektive Signaling durch aPC ist dabei an die Aktivierung von Protein C auf den Endothelzellen gebunden [149]. Aktiviertes Protein C kann durch limitierte Proteolyse den „protease-activated receptor 1“ (PAR-1) aktivieren [136]. Durch Spaltung an einer spezifischen Schnittstelle der N-terminalen extrazellulären Domäne entsteht eine Konformationsänderung, die ein G-Protein gekoppeltes Signaling bedingt [150]. Dieses ist für die Aufrechterhaltung der Endothelzellintegrität und –funktion, sowie für die Hemmung der Apoptose und damit für die Zytoprotektion der Endothelzellen verantwortlich [143]. Interessanter Weise ist der wichtigste Aktivator von PAR-1 Thrombin, das mit einer um mehrere Potenzen höheren Affinität PAR-1 aktiviert [151] und über dessen Aktivierung zu einer Permeabilitätssteigerung des Endothels und zu einem Anstieg der Apoptoserate führt [136]. Diese widersprüchlichen Effekte werden u.a. mit

der Anwesenheit oder dem Fehlen des endothelialen Protein C Rezeptors (EPCR), von Caveolin-1, veränderten S1P- und Tie2-Leveln erklärt [106, 141, 143]. So scheint die Anwesenheit von Thrombomodulin, EPCR und PAR-1 in Lipidmikrodomänen der Zellmembran Voraussetzung für das zytoprotektive Signaling von aPC zu sein [106, 148, 152]. Demnach ist in Anwesenheit von aPC gebunden an den EPCR und Kolokalisation mit dem PAR-1 auch Thrombin in der Lage zytoprotektive und endothelstabilisierende Effekte auszulösen [146, 152]. In Abwesenheit von EPCR und aPC dagegen zeigt Thrombin die entgegengesetzten Wirkungen.

1.9 PROTEIN C – ALTERNATIVE EINSATZMÖGLICHKEITEN

Das Protein C-System bietet interessante therapeutische Möglichkeiten, da es sowohl antikoagulative, als auch zytoprotektive Eigenschaften vereint [100, 101, 104, 106, 127, 146]. In verschiedenen in vitro und in vivo Experimenten wurden positive Effekte in der Therapie von schweren systemischen Entzündungsreaktionen, akutem Lungenversagen und Gewebeschädigung nach Ischämie nachgewiesen [82, 94, 142]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde der Einsatz von aktiviertem Protein C zur Therapie der schweren Sepsis des Menschen in einer groß angelegten Studie untersucht und ein therapeutischer Gewinn festgestellt. Die PROWESS-Studie zeigte eine deutliche Risikoreduktion der Letalität bei schwerer Sepsis [95]. Das Handling von aktiviertem Protein C ist jedoch nicht einfach, da die erwünschten zytoprotektiven Effekte zum Preis eines höheren Blutungsrisikos erkaufte werden. Das Auftreten von schweren Blutungen war dann unter anderem auch verantwortlich für die Reevaluation der aPC-Therapie bei schwerer Sepsis. Infolge veränderter lungenprotektiver Beatmungstechnik von Sepsispatienten im septischen Schock, konnte im Jahr 2012 in der so genannten PROWESS-Schock Studie kein therapeutischer Nutzen von aPC mehr gesehen werden [82, 96]. Durch die Rücknahme der Behandlungsempfehlung der zuständigen Arzneimittelbehörden der USA und der EU, hat der einzige Hersteller von aPC die weitere Produktion eingestellt, sodass ein weiterer Einsatz im Menschen momentan nicht möglich ist [82]. Um das Problem der übermäßigen Blutung zu minimieren, könnte der Einsatz von selektiv zytoprotektiven aPC-Mutanten sinnvoll sein [143, 153]. Außerdem sollte der Einsatz des Zymogens Protein C (Ceprotin) anstelle des aktivierten Protein C erwogen werden, da die Aktivierung des Protein C zu aPC lokal am Ort der Entzündung gefördert und damit systemisch hohe Dosen an aPC vermieden werden könnten. Inwiefern Protein C in chronisch systemischen Krankheitsprozessen, wie z.B. einer chronischen viralen Infektion (z.B. chronische Hepatitis C) von Bedeutung sein kann, ist bis jetzt noch nicht ausreichend untersucht worden. Hier könnte zusätzlich die antikoagulative Wirkung von therapeutischem Interesse sein.

2. FRAGESTELLUNG

Doppelsträngige RNA dient dem angeborenen Immunsystem als wichtiges molekulares Muster zur Erkennung eindringender Pathogene und hier insbesondere zur Erkennung von RNA-Viren. Zimmer et al. konnten zeigen, dass das synthetische ds-RNA Analogon Poly(I:C) in vivo zu einer endothelialen Dysfunktion beiträgt, die Expression proinflammatorischer Zytokine und die Plaquebildung im Prozess der Atherosklerose fördert [78]. Ex vivo konnten Preissner et al. einen prothrombotischen Einfluss von Poly(I:C) auf die Expression von Oberflächenmolekülen von Endothelzellen nachweisen [80].

Virale Infektionen äußern sich in Patienten häufig mit Veränderungen der Blutstillung, die durch intravasale Thrombusbildung und im Extremfall durch unkontrollierte disseminierte intravasale Gerinnung zur Verbrauchskoagulopathie mit nachfolgender schwerer Hämorrhagie führen kann. Diese Komplikationen spielen sowohl bei akuten als auch chronischen viralen Infektionen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese und Therapie. Infektionen mit hämorrhagischen Viren, wie z.B. die Ebola-Epidemie 2014 in Westafrika, zeigen eindrücklich die Gefahren, die mit den Veränderungen des Gerinnungssystems verbunden sind. Aber auch in Patienten mit chronisch-viralen Infektionen, z.B. mit dem Hepatitis C-Virus, können häufig disseminierte Gerinnungsstörungen in der Mikrozirkulation mit nachfolgender Beeinflussung der Hämostase des Patienten gesehen werden.

In der Behandlung der bakteriellen Sepsis wurde in den vergangenen Jahren aktiviertes Protein C eingesetzt. Dabei war vor allem die zytoprotektiven Wirkung therapeutisch gewünscht. Da aPC aber auch ausgeprägte antikoagulative Wirkungen besitzt und es unter der Behandlung zu verstärkten Blutungen gekommen ist, ist der weitere Einsatz aktuell nicht mehr empfohlen. Der Einsatz des Zymogens Protein C stellt jedoch eine interessante Alternative da.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung folgender Fragen:

- 1.) Führt eine Behandlung von Mäusen mit Poly(I:C) zu einer verstärkten Thrombusbildung in vivo?
- 2.) Können die prothrombotische Effekte auch in TLR-3-KO Mäusen gesehen werden?
- 3.) Sind diese Effekte rein endothelabhängig oder zeigt Poly(I:C) auch direkte Effekte auf die Thrombozytenfunktion.
- 4.) Kann aktiviertes Protein C / Protein C die Wirkung von Poly(I:C) günstig beeinflussen?

Zur Beantwortung der Fragen wurde intravitalmikroskopisch die Thrombusbildung in der Mikrozirkulation im M. cremaster-Modell in Wildtyp- und TLR-3-KO Mäusen in vivo durchgeführt. In vitro wurden der Einfluss von Poly(I:C) auf Endothelzellen und Thrombozyten, sowie die Wirkung von aPC auf die Zellexpression untersucht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 CHEMIKALIEN

3.1.1 KREBS-HENSELEIT-SUPERFUSIONSLÖSUNG

TABELLE 1. IONENKONZENTRATION KREBS-HENSELEIT-SUPERFUSIONSLÖSUNG

Ion gelöst in H ₂ O	Konzentration in mM	Salz	Masse in mg pro 5 l H ₂ O
Na ⁺	145,0	NaCl	35064,00
K ⁺	6,0	KCl	1864,50
Cl ⁻	127,4	CaCl ₂	882,12
Ca ²⁺	1,2	MgSO ₄	1478,88
Mg ²⁺	1,2	NaHCO ₃	10501,25
SO ₄ ²⁻	1,2	KH ₂ PO ₄	680,45
H ₂ PO ₄ ⁻	1,0		
HCO ₃ ⁻	2,5		

Osmolarität: 308 mosm/l

Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt.

Alle Salze wurden von Applichem, Darmstadt, Deutschland bezogen.

3.1.2 FLUORESZENZFARBSTOFFE

TABELLE 2. FLUORESZENZFARBSTOFFE

Name	Firma
Fluorescein isothiocyanate-dextran, average mol wt 150,000	SIGMA-ALDRICH Co. LCC., Deutschland
Fluoresbrite®YG Carboxylate Microspheres 0,5µm	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland

3.1.3 ANÄSTHETIKA

TABELLE 3. ANÄSTHETIKA

Anästhetika	Konzentration (mg/ml)	Dosis (mg/kgKG)	Firma
Midazolam	5	3	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Fentanyl	0,05	0,003	Cura MED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Medetomidinhydrochlorid	1	0,3	Pfizer, Berlin, Deutschland; hergestellt durch Orion Pharma Espoo, Finnland

3.1.4 PHARMAKOLOGISCH AKTIVE WIRKSTOFFE

TABELLE 4. WIRKSTOFFE UND STIMULANTIEN

Substanz	Hersteller
Poly(I:C) HMW	INVIVOGEN, San Diego, California, USA
Ceprothin 1000 I.E.	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim,

	Deutschland
Aktiviertes Protein C	Eli Lilly, Indianapolis, Indiana, USA

3.2 ZELLKULTUR

Zur Untersuchung von Zellsignalwegen und funktionellen Mechanismen endothelialer Zellen wurden „human microvascular endothelial cells“ (HMEC), „human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) und „human mesangial cells“ (HMC) verwendet. Die HUVECs wurden aus menschlichen Spendernabelschnüren im Labor isoliert und kultiviert. Bei der Zelllinie der HMECs handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie, die von der Arbeitsgruppe von Ades et al.[154] zur Verfügung gestellt wurde. Die primären HMCs wurden von der Clonetics Corp. (San Diego, CA, USA) erworben und im eigenen Labor immortalisiert (Banas et al.)[155].

3.2.1 SUBSTANZEN FÜR DIE ZELLKULTUR

TABELLE 5. SUBSTANZEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Substanz	Hersteller
ENDOPAN 3 kit	PAN BIOTECH GmbH, Aidenbach, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium Modified (DMEMM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fetal bovine serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Newborn calf serum (NBCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin + Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
n-Octyl- β -D-glucopyranosid	Applichem, Darmstadt, Deutschland

TABELLE 6. MEDIUM ENDOTHELZELLEN

„Endopan“	500 ml Endothelzellmedium von PAN Biotech 12,3 ml Supplement-Mix für Endothelzellen 5 ml PS (Penicillin / Streptomycin)
------------------	---

TABELLE 7. HUVEC MEDIUM (20%)

„20% HUVEC Medium / HELA-WT / HEK“	500 ml DMEM 100 ml Newborn Calf Serum (NBCS) 5 ml PS (Penicillin / Streptomycin)
---	--

TABELLE 8. HUVEC WACHSTUMSMEDIUM

„HUVEC Wachstumsmedium“	$\frac{1}{2}$ „Endopan“ + $\frac{1}{2}$ 20% HUVEC Medium
--------------------------------	--

TABELLE 9. HMEC MEDIUM (10%)

“HMEC Medium”	500 ml DMEM 50 ml Fetal bovine serum (FBS) 50 ml Endopan 5 ml PS (Penicillin / Streptomycin)
----------------------	---

TABELLE 10. HUNGERMEDIUM (1%)

“1 % Hungermedium”	500 ml DMEM 5 ml Fetal bovine serum (FBS) 5 ml PS (Penicillin / Streptomycin)
---------------------------	---

TABELLE 11. PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS)

	PBS+ (in g)	PBS- (in g)
NaCl	8,00	8,00
KCl	0,20	0,20
Na ₂ HPO ₄	1,15	1,42
KH ₂ PO ₄	0,20	0,20
MgCl ₂	0,04	
CaCl ₂	0,50	
Destilliertes Wasser pH 7,4	1000 ml	1000 ml

TABELLE 12. COLLAGENASE A LÖSUNG

Collagenase Typ 1 (1700 U/mg)	1 g
PBS+	1000 ml
Die Lösung wurde zur Sterilisation durch den Filter Membrex 25 CA mit einer Porengröße von 0,2 µm gedrückt.	

TABELLE 13. RNA-LYSATE (GEWEBE UND ZELLKULTUR)

peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
-----------------------	---

3.2.2 GERÄTE FÜR DIE ZELLKULTUR

Heraeus Megafuge 1.0R	Kendro, Langensfeldbold, Deutschland
Microflow Biological Safety Cabinet Klasse 2	Astec Microflow, Hampshire, Großbritannien
Inkubator Function Line	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland

3.2.3 HUMAN MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELL (HMEC) – KULTIVIERUNG

Vor dem Splitten wurde eine konfluente Schale HMECs mit PBS- gründlich gewaschen. Anschließend wurde PBS- mit Trypsin auf die Zellen gegeben. Nach einer Einwirkzeit von ca. 3 Minuten wurde unter mikroskopischer Kontrolle das Ablösen der Zellen festgestellt. Eine ausreichende Ablösung war erreicht, wenn sich ca. 90 % der Zellen nach leichtem Anklopfen der Schale an das Mikroskop von der Schale ablösten. Die Trypsinreaktion wurde daraufhin mit HMEC – Medium (Tabelle 9) gestoppt. Durch gründliches Auf- und Abpipettieren und Abspülen der Schale wurde eine möglichst große

Menge an Zellen aufgenommen. Beim Splitten im Verhältnis 1:2 wurde nach einem Tag ausreichende Konfluenz erzielt. Ein Splitten von 1:3 verlängerte die Wachstumszeit auf ca. 2 Tage. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphärenanteil kultiviert.

Das HMEC – Medium wurde etwa alle 2 Tage gewechselt.

3.2.4 HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELL (HUVEC) – GEWINNUNG AUS NABELSCHNÜREN IN HALBSTERILEM VERFAHREN

HUVECs sind menschliche Endothelzellen, die aus Nabelschnurvenen isoliert werden. Nach der Isolation können diese bis zur dritten Passagen in vitro kultiviert werden. Die menschlichen Nabelschnüre wurden von den Geburtsabteilungen des Klinikums Schwabing und des Klinikums Rechts der Isar zur Verfügung gestellt. Die Patienten wurden zuvor informiert und ein schriftliches Einverständnis eingeholt. Die Untersuchungen entsprachen den Prinzipien der „Declaration of Helsinki“.

Die Nabelschnur wurde zu Beginn von Blut befreit, mit PBS+ gespült und etwas gekürzt. Die PBS-Lösung wurde aus der Vene gedrückt und anschließend einige Milliliter Collagenase A Lösung in die Vene eingefüllt. Die ersten auslaufenden Tropfen wurden verworfen. Anschließend wurde Collagenase A Lösung vollständig in die Vene eingefüllt. Die Nabelschnur wurde in einem Becherglas mit 0,9% NaCl-Lösung (37°C – Wasserbad) für 10 min angedaut und nach der Inkubationszeit aus dem Becherglas genommen. Die Nabelschnur wurde mit HUVEC-Medium (Tabelle 7) gespült und Collagenase A - Lösung mit Medium in einem Falcon aufgefangen. Die Collagenase-Medium-Zellsuspension wurde für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R von Kendro, Langenseldbold, Deutschland) und das Collagenase-Medium-Gemisch abgesaugt. Die Zellen wurden daraufhin in Endopan 3 aufgenommen und in sterile T-Flasche gefüllt und etwa 5 Tropfen PS zugeben.

Die Zellen wurden täglich mit PBS+ und PS gewaschen und frisches Endopan 3 darauf gegeben.

3.2.5 HUVEC – KULTIVIERUNG

Materialien und Chemikalien:

Frisch isolierte HUVEC in T-Flasche (25 cm²) wurden wie folgt jeden Tag kultiviert:

- PBS⁺ + Penicillin / Streptomycin (PS)
- Endopan 3, steril (vorgewärmt)
- PS

Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt, mit PBS⁺ + PS gewaschen und Endothelgrowthmedium (Tabelle 8) auf die Zellen gegeben.

Die primären HUVEC wurden nur bis zur dritten Passage benutzt.

HUVEC splitten:

Sobald die T-Flaschen konfluent bewachsen waren, wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und Trypsin dazugegeben. Nach kurzer Wartezeit bis die Zellen sich abgelöst hatten, wurde 20% HUVEC-Medium + 20-50% Endopan 3 dazugegeben um die Trypsinreaktion zu stoppen. Anschließend wurden die Zellen auf neue Petrischalen ausgesät.

3.2.6 HUMAN MESANGIAL CELLS (HMC)

Die „human mesangial cells“ (HMCs) wurden mit „Dulbecco’s modified Eagle’s medium“ (DMEM), das mit 10% hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt war,

kultiviert. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen im Inkubator wachsen lassen und bei Erreichen einer 90-prozentigen Konfluenz mit Trypsin und EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:5 auf neue Petrischalen aufgeteilt. Das Medium wurde regelmäßig alle drei Tage gewechselt.

3.3 IN VITRO UND EX VIVO – EXPERIMENTE

3.3.1 GERÄTE

Instrument	Hersteller
Chrono log Aggregometer	Chrono log corporation, Havertown, USA
BD FACScanto II flow cytometer	BD Biosciences, San Jose, USA
BD FACSDiva Software	BD Biosciences, San Jose, USA
ROTEM® delta	Tem International GmbH, München, Deutschland

3.3.2 ANTIKÖRPER

Name	Hersteller
APC-Mouse Anti-Human CD62P-IgG1 (BD; #550888)	BD Biosciences, San Jose, USA
APC-Mouse-IgG1-Isotyp-Control (BD; #555751)	BD Biosciences, San Jose, USA
FITC- Anti Human PAC-1 (BD; #340507)	BD Biosciences, San Jose, USA

3.3.3 MRNA PRIMER

Alle verwendeten mRNA-Primer waren kommerziell erhältliche TaqMan® Produkte der Firma Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland.

3.3.4 UNTERSUCHUNG DER MRNA-TRANSKRIPTION MIT DER QUANTITATIVEN REAL TIME PCR

Zur quantitativen Untersuchung der mRNA-Menge in den Zellen wurde die „quantitative real time polymerase chain reaction“ (rt-PCR) verwendet, da dieses Verfahren gut zur Bestimmung der Menge einer gewünschten mRNA in den Zellen geeignet ist. Dazu wurden die Zellen bis zum subkonfluenten Stadium wachsen lassen und dann unter Zugabe von Hungermedium für unterschiedliche Zeitpunkte mit verschiedenen Substanzen inkubiert. Nach der Inkubation der Zellen, wurden diese mit PBS⁺ gründlich gewaschen, der RNA-Lysis Puffer von PeqLab Biotechnologie mit 1% Mercaptoethanol (zur Elimination von Ribonucleasen) auf die Zellen gegeben und diese anschließend abgeschabt. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem PeqGOLD total RNA Kit von PeqLab Biotechnologie analog des angegebenen Protokolls. Die PCR-Untersuchungen wurden mit kommerziell erhältlichen Primern der TaqMan®-Produktfamilie der Firma Life Technologies GmbH durchgeführt. Alle Messungen wurden in Duplikaten vorgenommen. Als Referenz wurde das „housekeeping gene“ GAPDH verwendet. Die Bestimmung der quantitativen mRNA-Menge wurde mittels der Pfaffl-Methode durchgeführt[156].

3.3.4.1 TRANSKRIPTION VON MRNA PROINFLAMMATORISCHER ZYTOKINE, ADHÄSIONSMOLEKÜLE UND PROTHROMBOTISCHER FAKTOREN AUF HMEC NACH INKUBATION MIT POLY(I:C) ÜBER VERSCHIEDENE ZEITPUNKTE

Auf subkonfluent bewachsene Schalen mit HMECs wurde 24 Stunden vor Ende des Versuchs 1%iges Hungermedium gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 10 µg/ml poly(I:C) über verschiedene Zeitpunkte. Am Ende des Versuchs wurden die Zellen lysiert und analog dem Protokoll in 3.3.4 die quantitative real time PCR durchgeführt. Untersucht wurde die mRNA-Expression der prothrombotischen Faktoren Tissue factor und PAI-1 bestimmt.

3.3.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE AUF HUMANEN THROMBOZYTEN

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, die sowohl das Zellvolumen, als auch die Beschaffenheit des Zellinneren untersucht. Durch die Konjugation von fluoreszenzmarkierten Antikörpern an bestimmte Antigene auf der Zelloberfläche, kann anhand des emittierten Lichtes eine Trennung in verschiedene Zellpopulationen durchgeführt werden. Außerdem verhält sich die Intensität der Emission proportional zur gebundenen Antikörpermenge und damit zur Oberflächenexpression des zu untersuchenden Antigens. Zur Untersuchung des Aktivierungsgrades menschlicher Thrombozyten wurde zunächst menschliches Vollblut gewonnen und mit Natriumcitrat im Verhältnis 1:10 antikoaguliert. Die erste Zentrifugation wurde bei 340 G für 15 min und ohne Bremse durchgeführt. Das entstandene Platelet-Rich-Plasma (PRP) wurde im Verhältnis 1:2 mit Thrombozytenpuffer verdünnt und im Verhältnis 1:1000 mit Iloprost gehemmt. Die zweite Zentrifugation erfolgte bei 600 G für 10 min ohne Bremse. Der Überstand wurde verworfen und das Thrombozytenpellet anschließend mit Thrombozytenpuffer resuspendiert. Die sogenannten „washed platelets“ wurden gepoolt und die Thrombozytenkonzentration mit dem Coulter-Counter bestimmt. Zur Färbung der Thrombozyten wurden die Ansätze auf 25000 Thrombozyten/µl verdünnt. Zur Stimulation wurde Thrombin in der Konzentration 2 U/ml für 3 min dazugegeben. Anschließend folgte die Inkubation mit den Antikörpern für 20 min bei 37°C. Für den Nachweis von P-Selectin wurde der APC-Mouse Anti-Human CD62P-IgG1 (BD; #550888) und für den aktivierten Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa der FITC- Anti Human PAC-1 (BD; #340507) benutzt. Als Isotypkontrolle wurde der APC-Mouse-IgG1-Isotyp-Control (BD; #555751) verwendet. Abschließend erfolgte die Fixierung der Thrombozyten mit 0,5% Formalin für 15 min bei Raumtemperatur und die FACS-Messung mit dem BD FACScanto II flow cytometer.

3.3.6 LICHT-TRANSMISSION-AGGREGOMETRIE (BORN-AGGREGOMETRIE)

Die Licht-Transmissions-Aggregometrie nach Born diente der Messung der Thrombozytenaggregation in Platelet-Rich-Plasma (PRP) nach Aktivierung mit unterschiedlichen Aktivatorssubstanzen[157]. Das Aggregometer funktionierte dabei als Spektrophotometer, das die Lichtintensität eines Infrarotlichtstrahls hinter der durchstrahlten Probe misst. Solange das PRP nicht aktiviert und mit einem Rührfisch umgerührt wurde, war die Intensität der Lichttransmission im Vergleich zur Kontrolllösung (PPP) geringer. Nach Aktivierung der Thrombozyten, kam es zur Aggregation und Ausfallen von Thrombozytenaggregaten, wodurch die Transparenz der Lösung und die Lichtintensität des austretenden Lichts zunahm. Die Zunahme der Lichtintensität verhielt sich dabei proportional zur Thrombozytenaggregation. Zu Beginn des Versuchs wurde menschliches Blut abgenommen und mit Natriumcitrat im Verhältnis 1:10 antikoaguliert. Das Vollblut wurde bei 340 G für 15 min ohne Bremse abzentrifugiert. Der Überstand entsprach danach dem PRP, das vorsichtig abpipettiert wurde. Als Referenz wurde Platelet-poor-Plasma (PPP) hergestellt, indem PRP für 5 min bei 5000 G zentrifugiert wurde. Es wurde anhand von Vorversuchen und mit Hilfe der Literatur eine Konzentration von 10 µg/ml Poly(I:C) in PRP verwendet und für 10 min, 20 min, 30 min und 45 min im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ – Atmosphärenanteil inkubiert. Die Aggregation wurde mit ADP in einer Konzentration zwischen 1-2 µM ausgelöst (Roche Diagnostics International Ltd., Schweiz). In einer weiteren Versuchsreihe betrug die Inkubationszeit mit 10 µg/ml poly(I:C) 15 min und die

Aggregation wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von ADP (low ADP < 10 μ M, high ADP \geq 10 μ M), TRAP-6 (20 μ M) und Collagen (10 μ g/ml) (alle von Roche Diagnostics International Ltd., Schweiz) gestartet.

3.3.7 UNTERSUCHUNG DER GERINNUNGSZEIT MENSCHLICHEN VOLLBLUTS NACH ZUGABE VON ZELLYSATMATERIAL IN VITRO – „CLOTTING ASSAY“

Zur Untersuchung der Expression prothrombotischer Moleküle wurde die Gerinnungszeit menschlichen Vollbluts nach Zugabe von Zellysatmaterial in der Thrombelastometrie (ROTEM® delta), im Sinne eines Funktionsassays, untersucht. Dabei korrelierte die Gerinnungszeit in der Untersuchung mit der Menge an prothrombotischen Molekülen im Lysat. Nach Inkubation mit 10 μ g/ml Poly(I:C) über 24 Stunden wurden Lysate von Human microvascular endothelial cells (HMECs) hergestellt. Dazu wurde am Ende der Inkubationszeit 15 mM n-Octyl- β -D-glucopyranosid auf die Zellen gegeben, die Zellen abgeschabt, bei 1200 G für 10 min bei 4°C zentrifugiert und dann der Überstand abgenommen. Da die Gerinnungszeit in menschlichem Vollblut gemessen wurde, wurde von einem Spender Blut abgenommen und mit Natriumcitrat antikoaguliert (Citrato/Buffer 9 NC/PFA Monovette®, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland). Vor Beginn der Thrombelastometrie wurde der Kanal „EXTEM®“ ausgewählt, 20 μ l CaCl₂ (Stock 200 mM („STARTEM®“)) und 20 μ l Zellysat im Messbehälter vorgelegt und anschließend nach Zugabe von 300 μ l menschlichen Vollbluts die Messung gestartet. Der Parameter von Interesse war hierbei die sogenannte Gerinnungszeit, also die Zeit vom Beginn des Versuchs bis zum Beginn der Gerinnungsbildung. Zum Ausschluss von individuellen Unterschieden des Spenderbluts, wurde zusätzlich eine „normale“ EXTEM®-Untersuchung durchgeführt.

3.4 IN VIVO – EXPERIMENTE

3.4.1 INTRAVITALMIKROSKOPIE

TABELLE 14. MATERIAL FÜR DIE INTRAVITALMIKROSKOPIE

Instrument	Firma
150-Watt Halogenlampe	KL 1500 LCD, Lighting and Imaging SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Bildverarbeitungsprogramm	AxioVision Rel. 4.6, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
Cremastertisch	Eigene Konstruktion zum Aufspannen des Cremasters über einem Deckglas zur Durchlichtmikroskopie
Einhängethermostat	ED Einhängethermostat, Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Fluoreszenzlampe	X-Cite® Series 120Q EXFO, Lumen Dynamics Group Inc., Mississauga, Ontario, Canada
Fluoreszenzlichtfilter	Filter Set 09, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland

Kamera	AxioCam HSm, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop	Axiotech vario, modifiziert, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
Objektiv 10x	A-Plan 10x/0,25 Ph1VAR1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
Objektiv 20x	ACHROPLAN 20x/0,50 W Ph 2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
Objektiv 40x	ACHROPLAN 40x/0,80 W, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
Objektiv 5x	EC Plan – NeoFLUAR 5x/0,15, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
Operationsinstrumente	Fine Science Tools GmbH (FST), Heidelberg, Deutschland
Operationsmikroskop	Stereomicroscope Stemi 2000-C with stand S, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
Superfusionslösung	Krebs-Henseleit- Lösung, siehe Protokoll
Superfusionspumpe	ISMATEC MS REGLO, IDEX Health & Science SA, Glattbrugg, Schweiz
Waage	Sartorius BP 410 S, Data Weighing Systems, Inc., Elk Grove, Irland

3.4.2 SONSTIGE INSTRUMENTE

TABELLE 15. SONSTIGE INSTRUMENTE

Instrument	Firma
COULTER® Ac T diff TM Analyser	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

3.4.3 TIERE

Alle Experimente wurden in C57Bl/6-Mäusen oder in TLR3KO-Mäusen (Tierstamname: B6;129S1-Tlr3tm1Flv/J) durchgeführt. Die Wildtypmäuse wurden von Charles River, Sulzfeld, Deutschland bezogen. Die TLR3KO-Mäuse stammten von The Jackson Laboratory aus Bar Harbor, Maine in den USA. Die Tiere wurden im Tierstall des physiologischen Instituts der LMU München in der Schillerstraße 44 gehalten und gezüchtet, wo sie einen 12 Stunden Licht-Dunkelheit-Zyklus hatten. Sie

konnten sich frei in ihren Käfigen bewegen und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Umgebungstemperatur betrug 24°C und die Luftfeuchtigkeit 50%. Alle Experimente erfolgten unter Beachtung der Paragraphen §1, §2 und §2a des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) und wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Die Untersuchungen erfolgten konform zu den Richtlinien des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“, die vom US National Institutes of Health veröffentlicht wurden. (NIH Publication No. 85-23, revised 1996)

3.4.4 NARKOSE

Die Operationen am lebenden Tier wurden unter Kurzzeitnarkose durchgeführt. Die verwendeten Anästhetika sind in der Tabelle unter 3.1 ANÄSTHETIKA aufgelistet. Die Anästhetika wurden in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl (aq)) gelöst und intraperitoneal appliziert. Das Lösungsverhältnis betrug: 160 µl Fentanyl, 160 µl Midazolam, 80 µl Medetomidinhydrochlorid, 3600 µl NaCl 0,9 % (aq). Das ergab 4000 µl Standard-Narkose. Das injizierte Volumen orientierte sich am Gewicht der Maus. Es wurden 150 µl Standard-Narkose pro 10 g Körpergewicht Maus intraperitoneal gespritzt. Zusätzlich wurde ca. 10 min nach der intraperitonealen Gabe weitere 100 µl Standard-Narkose intramuskulär in den Oberschenkel injiziert. Am Ende des Versuchs wurde die Maus durch eine Überdosis (2g/kg) Natriumpentobarbital (Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland) getötet.

3.4.5 PRÄPARATIONSABLAUF ARTERIA CAROTIS – KATHETER

Der Arteria carotis – Katheter diente sowohl der intraarteriellen Injektion verschiedenster Substanzen, als auch der Blutentnahme. Dabei wurden die Mäuse zunächst dem Narkoseprotokoll folgend anästhesiert. Anschließend wurde die Stelle des Hautschnitts mit einem Hautdesinfektionsmittel gründlich desinfiziert. Der Hautschnitt erfolgte, assistiert mit einer stumpfen Pinzette, mit einer kleinen Schere cranial des Jugulums und lateral der Trachea. Mit zwei spitzen Pinzetten wurde vorsichtig das Bindegewebe wegpräpariert und in der Tiefe die A. carotis freigelegt. Dabei wurde das umgebende Bindegewebe durch den Gewebehaken zur Seite gezogen. Der Nervus vagus musste vorsichtig von der A. carotis gelöst werden. Eine Schädigung sollte vermieden werden, da ansonsten die Atmung der Maus beeinträchtigt werden kann. Die freigelegte A. carotis wurde anschließend mit einer kleinen Schere unterlegt und aufgespannt. Das craniale Ende wurde mit einem Faden abgebunden. Kaudal wurde das Gefäß mit einer Gefäßklemme abgeklemmt und zwei weitere Fäden wurden cranial der Klemme vorgelegt. Die A. carotis wurde dann möglichst weit cranial mit der Gefäßschere oberflächlich eingeschnitten. In das entstandene Loch wurde schließlich der Kunststoffkatheter (0,28 mm ID, 0,61 mm AD; SIMS Portex, U.K.) eingeführt und im Gefäß vorgeschoben. Die beiden vorgelegten Knoten wurden leicht über dem Katheter angezogen. Nach der Entfernung der Klemme müsste eine pulsierende Blutsäule im Katheter erkennbar gewesen sein. Der Katheter wurde noch etwas weiter in Richtung Herz vorgeschoben. Die leicht angezogenen Knoten wurden nun festgezogen und der Katheter festverknötet. Je nach Dauer des Versuchs wurde der Hautschnitt anschließend wieder vernäht. Bei kurzdauernden Versuchen reichte es aus, dass die Wundränder vorsichtig angelegt wurden. Der Katheter wurde regelmäßig mit Kochsalzlösung gespült, um eine Thrombusbildung im Katheter zu vermeiden.

3.4.6 BLUTBILDUNTERSUCHUNG MIT EINEM COULTER-COUNTER

Über einen Arteria carotis – Katheter wurde etwa 50µl Vollblut entnommen und mit Natriumcitrat im Verhältnis 1:10 (Natriumcitrat/Vollblut) antikoaguliert. Die gewonnene Blutprobe wurde anschließend mit einem Coulter-Counter (Tabelle 15) ausgewertet und ein kleines Blutbild erstellt.

3.4.7 TAIL BLEEDING – EXPERIMENT IN DER MAUS

Zur Untersuchung der Hämostase diente die Bestimmung der Blutungszeit im sogenannten Tail bleeding – Experiment [158]. Dazu wurde einer narkotisierten Maus das distale Schwanzende 5 mm proximal amputiert und das Blutungsverhalten untersucht. Der gesamte Schwanz wurde dafür in ein Gefäß mit auf 37°C gewärmter, physiologischer Kochsalzlösung gehängt. Bestimmt wurde die Zeit bis zum Sistieren der Blutung (Blutungszeit).

3.4.7 PRÄPARATIONSABLAUF *M. CREMASTER MODELL*

Zur Untersuchung der Mikrozirkulation *in vivo* wurde das Cremaster-Modell verwendet [159, 160].

Die Maus wurde am Beginn des Versuchs dem Narkoseprotokoll (S. 26) entsprechend in Narkose gelegt. Die schlafende Maus wurde auf den Cremastertisch aufgespannt. Dabei wurde das Skrotum leicht über das Deckglas mobilisiert. Mit einer feinen Federschere wurde das Skrotum durch einen kleinen tangentialen Schnitt eröffnet. Der Schnitt sollte nicht zu groß sein, da ansonsten der Hoden leicht aus der Bauchhöhle prolabiert und damit die Cremastermikroskopie erschwert. Der Cremaster wurde anschließend mit einer stumpfen Pinzette gefasst und das Skrotum Stück für Stück zurückgeschoben. Nachdem der Cremaster komplett aus dem Skrotum gelöst war, wurde dieser über das Deckglas gezogen und auf der gegenüberliegenden Seite mit einem Pin fixiert. Das vorhandene Bindegewebe wurde mit zwei spitzen Pinzetten vorsichtig entfernt. Nachdem das Bindegewebe entfernt worden war, wurde der Cremaster mit einer feinen Federschere longitudinal eröffnet. Dabei wurde größeren Gefäßen ausgewichen. Der Cremaster wurde anschließend aufgefaltet und mit mehreren Pins konzentrisch fixiert. Der Nebenhoden wurde vorsichtig mobilisiert und seitlich über den Cremaster hinaus am Rand des Deckglases festgepinnt. Sollte der Nebenhoden wichtige Gefäße verdeckt haben, wurde er vorsichtig vom Cremaster gelöst. Dabei sollten größere Gefäße mit dem Elektroauter koaguliert werden. Während aller Schritte musste der Cremaster regelmäßig mit NaCl 0,9 % (aq) befeuchtet werden, um ein Austrocknen zu verhindern.

3.4.8 *LIGHT-DYE-SCHÄDIGUNG MIT FITC-DEXTRAN IM CREMASTER DER MAUS*

Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-Dextran) mit Fluoreszenzlicht des Wellenlängenspektrums 450 - 490 nm führt zur Emission von Licht im grünen Spektralbereich. Zusätzlich entstehen photochemische Reaktionsprodukte, die zu einer Schädigung des Endothels beitragen und die Thrombusbildung in der Mikrozirkulation auslösen [161].

24 Stunden vor Beginn der photochemischen Endothelschädigung (Light-dye-Schädigung) wurde die Maus durch Injektion von 200 µg Poly(I:C) (2 mg/ml) verdünnt in 200 µl physiologischer Kochsalzlösung bzw. durch 400 µl physiologische Kochsalzlösung (Kontrollgruppe) intraperitoneal stimuliert. Der eigentliche Versuch begann mit der Einleitung der Narkose (S. 26). Anschließend erfolgte die Präparation des A. carotis – Katheters (S. 25) und eine Blutentnahme in Natriumcitrat (Natriumcitrat : Blutvolumen = 1:10). Aus dem Citratblut wurde mit dem COULTER® Ac T diffTM Analyser (S.25) ein Blutbild erstellt. 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurden 1 µl Ceprotrin®lösung (S.18) bzw. Albuminkontrolllösung pro Gramm Maus über den A. carotis – Katheter appliziert. Für den Versuch wurden pro Cremaster jeweils 2 Venolen mit einem Durchmesser von ca. 40 µm und eine

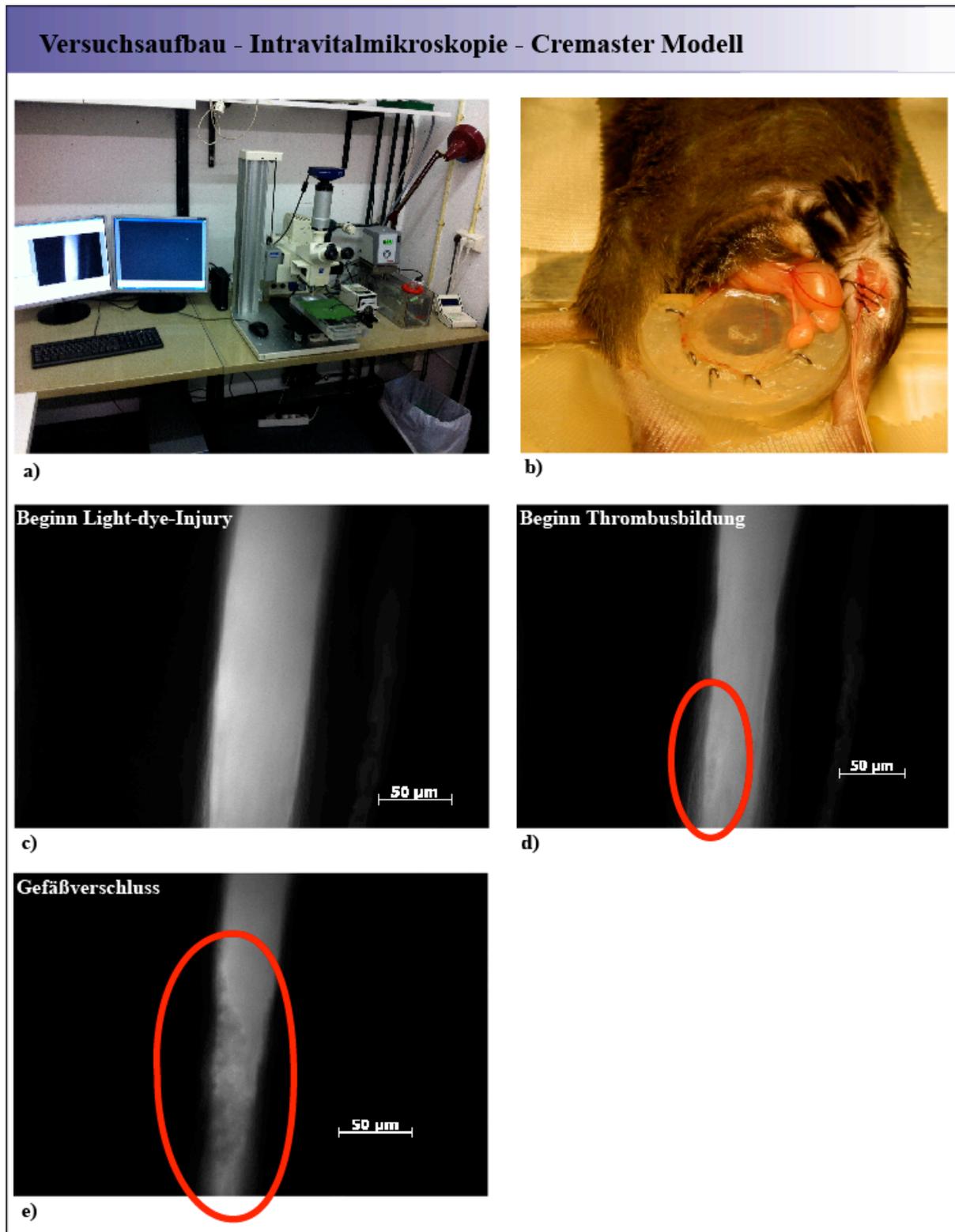


ABBILDUNG 6. VERSUCHSAUFBAU INTRAVITALMIKROSKOPIE UND CREMASTER-MODELL

a) Versuchsaufbau zur Durchführung der Intravitalmikroskopie. Desktop mit zwei Bildschirmen und Kamerasoftware Axio Vision Rel 4.6., Kamera: AxioCam HSm, AxioTech vario Mikroskop, modifiziert, Einhängethermostat und Wasserbad, Superfusionspumpe (genauere Informationen siehe Tabelle: Materialien für Intravitalmikroskopie). b) Endergebnis der Cremasterpräparation auf Cremastertisch (eigene Konstruktion). c) Beginn des Light-dye-Injury Experiments. d) Beginn der Thrombusbildung am unteren linken Bildrand. e) Vollständiger Verschluss des Gefäßes durch intraluminalen Thrombus.

Arteriolen mit einem Durchmesser von ungefähr 60 µm ausgesucht. Als Superfusionslösung wurde Krebs-Henseleit-Superfusionslösung mit einer Temperatur von ca. 37°C und das Filter Set 09 von Zeiss verwendet. Die Bestimmung der Flussgeschwindigkeit erfolgte mit Fluoresbrite®YG Carboxylate Microspheres 0,5µm („red beads“). Nach Anregung mit Fluoreszenzlicht des Wellenlängenspektrums 450 - 490 nm emittieren diese Licht im roten Wellenlängenbereich. Die „red beads“ wurden in einer Verdünnung von 1:100 in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und über den A. carotis – Katheter injiziert. Zur Auswertung der Flussgeschwindigkeit wurden Videoaufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop angefertigt. Dazu wurde das 20x Wasserimmersionsobjektiv und eine Belichtungszeit von 20 ms verwendet. Die pro Belichtung zurückgelegte Strecke der „red beads“ ergab auf der Aufnahme einen Strich, dessen Länge man ausmessen konnte. Über eine Mittelwertbildung konnte dadurch auf die mittlere Geschwindigkeit der Teilchen im Blutstrom geschlossen werden. Die eigentliche Endothelschädigung begann mit der i.a. Injektion von 2 µl 5%iger FITC-Dextran PBS – Lösung pro Gramm Maus. 5 Minuten nach Injektion erfolgte mit dem 40x Wasserimmersionsobjektiv und Fluoreszenzlicht im Spektrum von 450 – 490 nm die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs. Die Endpunkte des Versuchs waren die Zeit bis zum Beginn der Thrombusbildung („Onset“) und die Zeit bis zum kompletten Gefäßverschluss („Verschlusszeit“).

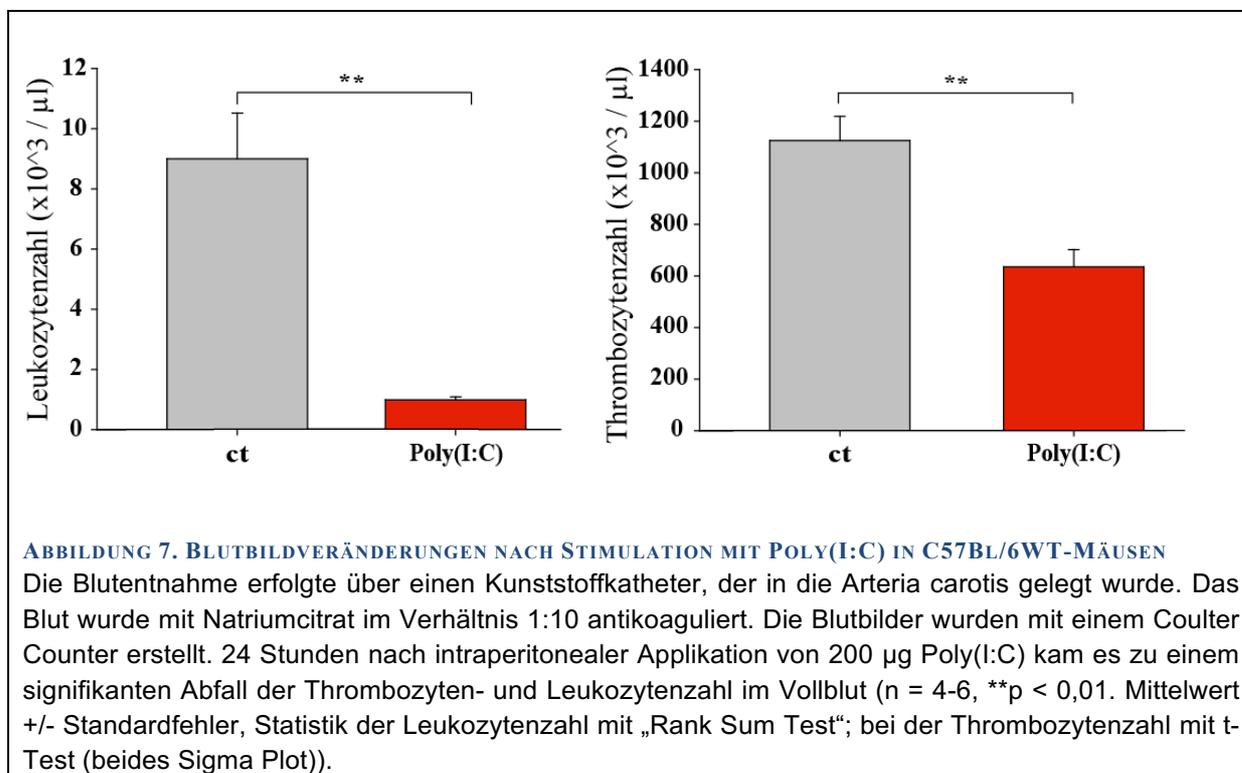
3.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm „Sigma Stat“ der Version 3.5 benutzt. Für normalverteilte Daten und den Vergleich von zwei Gruppen wurden der Student's t-Test verwendet, während für den Vergleich mehrerer Gruppen der „One way ANOVA mit Dunn's correction“ angewendet wurde. Nicht normalverteilte Werte zweier Gruppen wurden durch den „Mann-Whitney Rank Sum Test“ analysiert und für den Vergleich mehrerer Gruppen eine „Analysis of variance in ranks“ durchgeführt. Das Signifikanzniveau betrug 5%. Sofern nicht anders beschriftet wurden alle Daten als Mittelwert +/- Standardfehler angegeben.

4. ERGEBNISSE

4.1 EINFLUSS VON POLY(I:C) AUF DAS BLUTBILD VON C57BL/6-WT- UND TLR-3-KO-MÄUSEN

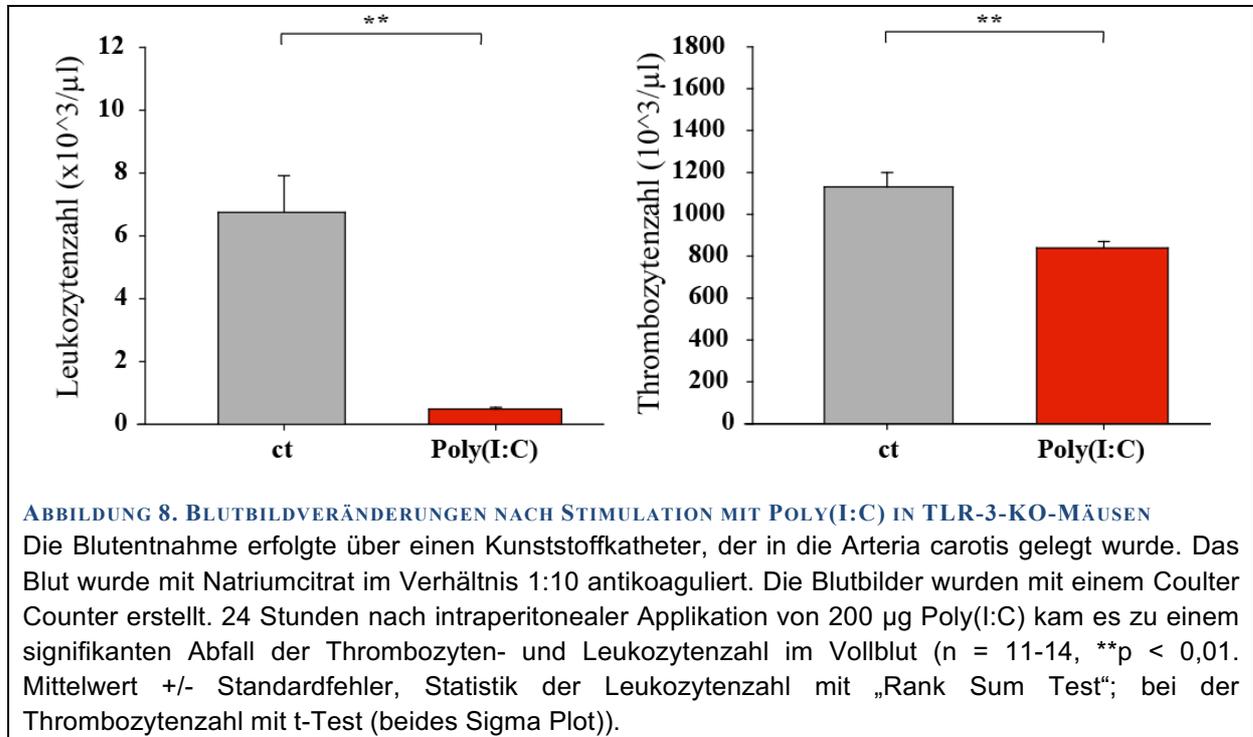
Das synthetische doppelsträngige RNA-Analogon Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C)) wurde nach Auswertung von Vorversuchen und an Hand bekannter Werte aus der Literatur [78] in einer Dosis von 200 µg, gelöst in einem Gesamtvolumen von 400 µl physiologischer Kochsalzlösung, 24 Stunden vor Versuchsbeginn intraperitoneal appliziert. Die Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen physiologischer Kochsalzlösung. Über einen Kunststoffkatheter, der in die Arteria carotis gelegt wurde, wurde zu Versuchsbeginn eine Blutprobe in der Größenordnung von 50 µl gewonnen, 1:10 in Natriumcitrat zur Antikoagulation verdünnt und ein Blutbild mit dem Coulter-Counter erstellt. Dabei zeigten die mit Poly(I:C) behandelten Tiere signifikant verminderte Leukozyten- und Thrombozytenzahlen (Abbildung 7).



Der Median +/- Standardfehler der Leukozytenzahlen bei den Poly(I:C)-Tieren betrug $1,1 \times 10^3 \pm 0,1 \times 10^3$ Leukozyten/µl Vollblut, während der Median +/- Standardfehler der Kontrollgruppe bei $8,7 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^3$ Leukozyten/µl lag und war damit signifikant niedriger (n = 4-6; **p < 0,01). Die Thrombozytenzahl bei den Poly(I:C)-Tieren war ebenfalls signifikant kleiner als bei den Kontrolltieren und lag bei $635,1 \times 10^3 \pm 66,3 \times 10^3$ Thrombozyten/µl (Mittelwert +/- Standardfehler), wohingegen die Kontrolltiere einen Mittelwert von $1124,5 \times 10^3 \pm 94,7 \times 10^3$ Thrombozyten/µl hatten (n = 4-6; **p < 0,01; Statistik der Leukozytenzahl mit „Rank Sum Test“; bei der Thrombozytenzahl mit t-Test (beides Sigma Plot)).

Ähnliche Effekte, wie in den C57Bl/6Wt-Mäusen, wurden auch in den TLR-3-KO-Mäusen gesehen. Der Mittelwert +/- Standardfehler der Leukozytenzahl der Kontrolltiere war mit $6,8 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^3$ Leukozyten/µl im Vergleich zum Mittelwert und Standardfehler der mit 200 µg Poly(I:C) behandelten Tiere, der bei $0,5 \times 10^3 \pm 0,1 \times 10^3$ Leukozyten/µl lag, signifikant größer. Bei den

Thrombozytenwerten konnte nach Behandlung mit Poly(I:C) mit $839,0 \times 10^3 \pm 31,6 \times 10^3$ Thrombozyten/ μl (Mittelwert \pm Standardfehler) bezogen auf $1131,7 \times 10^3 \pm 68,4 \times 10^3$ Thrombozyten/ μl (Mittelwert \pm Standardfehler) ein signifikanter Abfall nach Behandlung mit Poly(I:C) gezeigt werden (Abbildung 8) ($n = 11-14$; $**p < 0,01$; Statistik der Leukozytenzahl mit „Rank Sum Test“; bei der Thrombozytenzahl mit t-Test (beides Sigma Plot)).



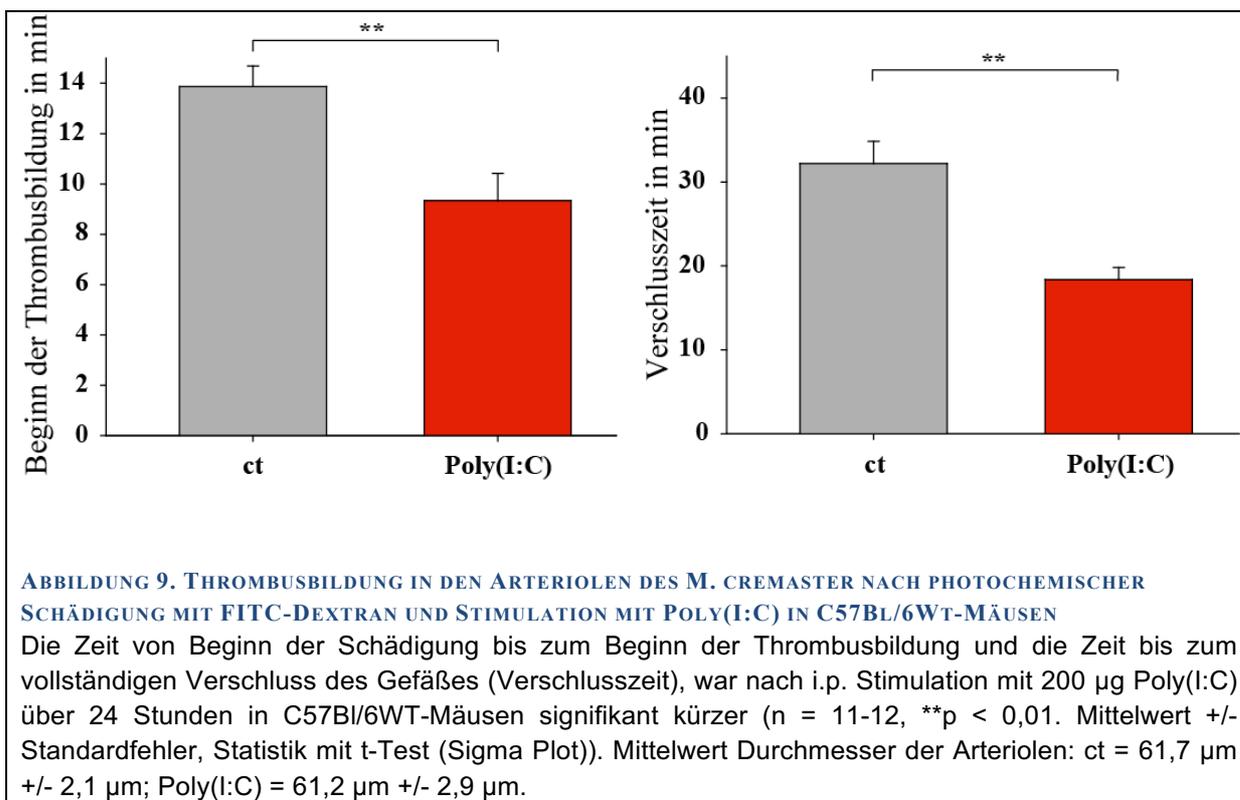
Der Einfluss der Blutbildveränderungen nach Stimulation mit 200 μg Poly(I:C) über 24 Stunden auf die Hämostase (Blutstillung) wurde mit dem Tail bleeding – Experiment untersucht.

Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der Zeit bis zum Stillstand der Blutung (Blutungszeit) festgestellt werden. Der Mittelwert \pm Standardfehler betrug in Bezug auf die Blutungszeit bei den Kontrollen 7,2 min \pm 0,8 min und war damit nicht signifikant unterschiedlich als der Wert der Poly(I:C)-Gruppe, der bei 7,4 min \pm 1,0 min lag ($n = 5-6$; $p > 0,8$).

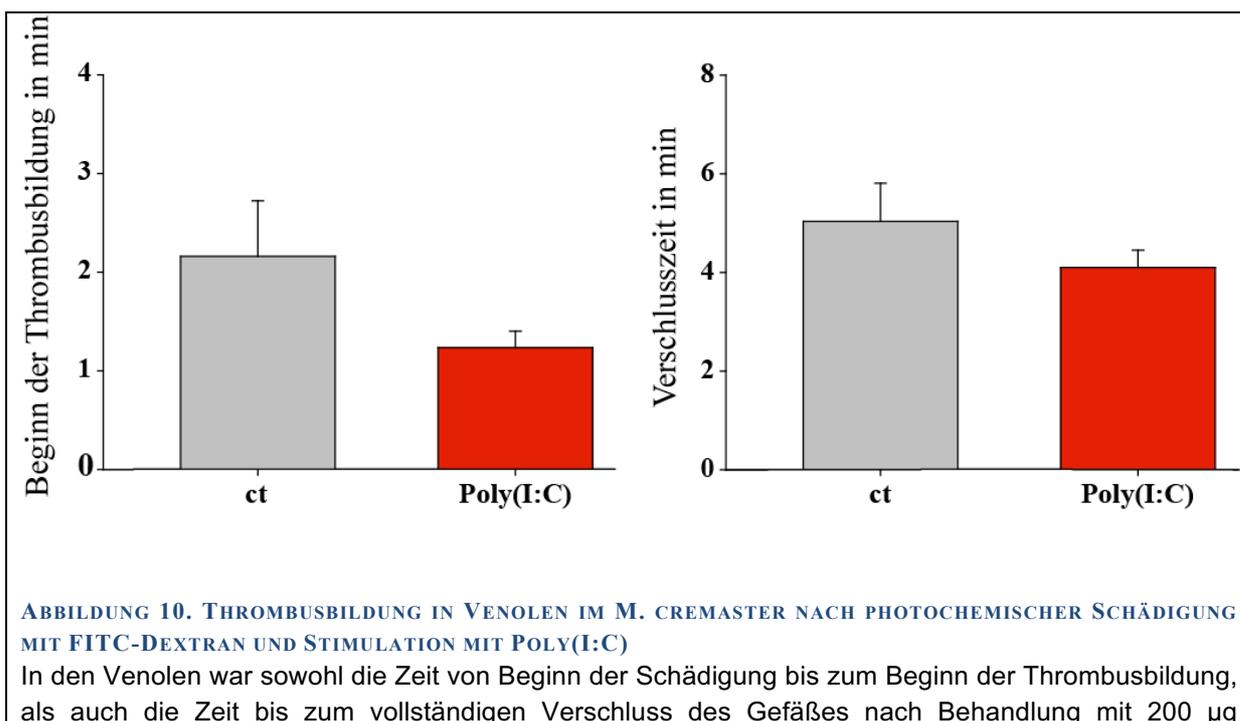
4.2 ARTERIOLÄRE THROMBUSBILDUNG IN VIVO IM MUSCULUS CREMASTER NACH PHOTOCHEMISCHER SCHÄDIGUNG MIT FITC-DEXTRAN UND STIMULATION MIT POLY(I:C) IN C57BL/6WT-MÄUSEN

Mit dem Versuch „Light dye Schädigung“ im Musculus cremaster der Maus wurde der Einfluss von Poly(I:C) auf die Thrombusbildung in der Mikrozirkulation eines Muskels untersucht (Abbildung 9). Die Zeit von Beginn der Schädigung bis zum Beginn der Thrombusbildung und die Zeit bis zum vollständigen Verschluss des Gefäßes (Verschlusszeit), war nach i.p. Stimulation mit 200 μg Poly(I:C) über 24 Stunden in den Arteriolen (Durchmesser $\sim 60 \mu\text{m}$) signifikant kürzer. So dauerte es im Mittel nur 9,3 min \pm 1,1 min (Mittelwert \pm Standardfehler) bis es in den mit Poly(I:C) behandelten Tieren zur Thrombusbildung kam, was signifikant kürzer als bei den Kontrolltieren mit 13,9 min \pm 0,8 min war. Der Mittelwert der Verschlusszeit der mit Poly(I:C) stimulierten Tiere lag mit 18,3 min \pm 1,4 min Standardfehler signifikant niedriger, als bei den Kontrolltieren, bei denen der Mittelwert \pm Standardfehler mit 31,2 min \pm 2,6 min höher lag ($n = 11-12$, $**p < 0,01$; t-Test (Sigma Plot)). Die

Mittelwerte der Durchmesser der Arteriolen war bei den Kontrollen mit $61,7 \mu\text{m} \pm 2,1 \mu\text{m}$ und Poly(I:C)-Tieren $61,2 \mu\text{m} \pm 2,9 \mu\text{m}$ nicht signifikant unterschiedlich ($p > 0,5$).



In den Venolen (Durchmesser $\sim 40\mu\text{m}$) konnte dagegen kein Unterschied zwischen der Kontroll- und der Poly(I:C)-Gruppe unter den gewählten Bedingungen bezüglich des Beginns der Thrombusbildung (Median Poly(I:C) 1,2 min vs. ct 1,3 min ($n = 12$, $p > 0,4$) bei gleichen Durchmessern der Venolen ($n = 12$, $p > 0,3$)), als auch der Verschlusszeit (Median Poly(I:C) 4,4 min vs. Ct 4,3 min ($n = 12$, $p > 0,7$)) gesehen werden. Statistische Berechnung mittels t-Test (Sigma Plot).



Poly(I:C) i.p. über 24 Stunden nicht signifikant kürzer ($n = 6$, $p > 0,7$. Mittelwert +/- Standardfehler, Statistik mit t-Test (Sigma Plot)). Mittelwert Durchmesser der Venolen: ct = $40,9 \mu\text{m} \pm 0,9 \mu\text{m}$; Poly(I:C) = $41,5 \mu\text{m} \pm 1,5 \mu\text{m}$.

	Poly(I:C) MW +/- SD	Kontrolle MW +/- SD	n- Tiere	p-Wert	Poly(I:C) MW +/- SD	Kontrolle MW +/- SD	n- Tiere	p-Wert
Leukozyten- zahl ($\times 10^3 / \mu\text{l}$)	0,99 +/- 0,28	9,00 +/- 3,04	6 / 4	0,006	0,65 +/- 0,13	8,58 +/- 4,42	4 / 4	0,009
Thrombozyten- zahl ($\times 10^3 / \mu\text{l}$)	635,1 +/- 175,3	1124,5 +/- 189,4	6 / 4	0,002	827,8 +/- 115,4	1388,4 +/- 152,5	4 / 4	<0,001
Durchmesser der Arteriolen	61,2 +/- 2,9	61,7 +/- 2,1	11 / 10	0,672	61,0 +/- 4,7	60,8 +/- 3,8	4 / 4	0,966
Maximale Flussge- schwindigkeit (mm / s)	13,6 +/- 3,5	11,7 +/- 2,4	9 / 8	0,237	12,3 +/- 2,4	10,0 +/- 3,4	4 / 4	0,309
Blutungszeit	7,4 +/- 2,3	7,2 +/- 1,9	6 / 5					
	Wildtyp				TLR-3-KO			

TABELLE 16. ÜBERSICHT ÜBER DIE BLUTBILDVERÄNDERUNGEN DER WILD-TYP- UND TLR-3-KO-MÄUSE NACH BEHANDLUNG MIT 200 μg POLY(I:C) I.P. ÜBER 24 STUNDEN.

Poly(I:C) löste sowohl in den Wildtypmäusen als auch in den TLR-3-KO-Mäusen eine signifikante Leukozyto- als auch Thrombozytopenie aus. Die Gefäße die für die Durchführung des Light-dye-Injury Experiments verwendet wurden, unterschieden sich im Durchmesser und in der maximalen Flussgeschwindigkeit des Blutes nicht signifikant und sind somit vergleichbar. Die Blutbildveränderungen nach Poly(I:C)-Gabe zeigten keine merklichen Effekte auf die Blutungszeit nach Schwanzspitzenamputation in Wildtypmäusen.

4.3 ARTERIOLÄRE THROMBUSBILDUNG IN VIVO IM MUSCULUS CREMASTER NACH PHOTOCHEMISCHER SCHÄDIGUNG MIT FITC-DEXTRAN UND STIMULATION MIT POLY(I:C) IN TLR-3-KO-MÄUSEN

In TLR-3-KO-Mäusen konnte im Versuch der photochemischen Schädigung mit FITC-Dextran sowohl in der Zeit bis zum Beginn der Thrombusbildung, als auch in der Verschlusszeit kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (ct) und der mit $200 \mu\text{g}$ Poly(I:C) über 24 Stunden behandelten Gruppe (Poly(I:C)) gesehen werden. Der Mittelwert +/- Standardfehler der Poly(I:C)-Gruppe war in Bezug auf den Beginn der Thrombusbildung mit $17,0 \text{ min} \pm 2,1 \text{ min}$ nicht signifikant unterschiedlich zum Mittelwert +/- Standardfehler der Kontrollgruppe mit $18,9 \text{ min} \pm 2,4 \text{ min}$. Ebenso unterschied sich die Verschlusszeit der Poly(I:C)-Gruppe mit $30,1 \text{ min} \pm 4,1 \text{ min}$ nicht signifikant von der Verschlusszeit der Kontrolle mit $37,9 \text{ min} \pm 4,0 \text{ min}$ ($n = 4$; $p > 0,1$) Abbildung 11). Statistische Berechnung mittels T-Test (Sigma Plot). Die Durchmesser der Arteriolen in der Kontrollgruppe unterschieden sich im Mittelwert mit $60,8 \mu\text{m} \pm 3,8 \mu\text{m}$ nicht signifikant zum Mittelwert der Poly(I:C)-Tiere mit $60,9 \mu\text{m} \pm 4,7 \mu\text{m}$ ($p > 0,9$).

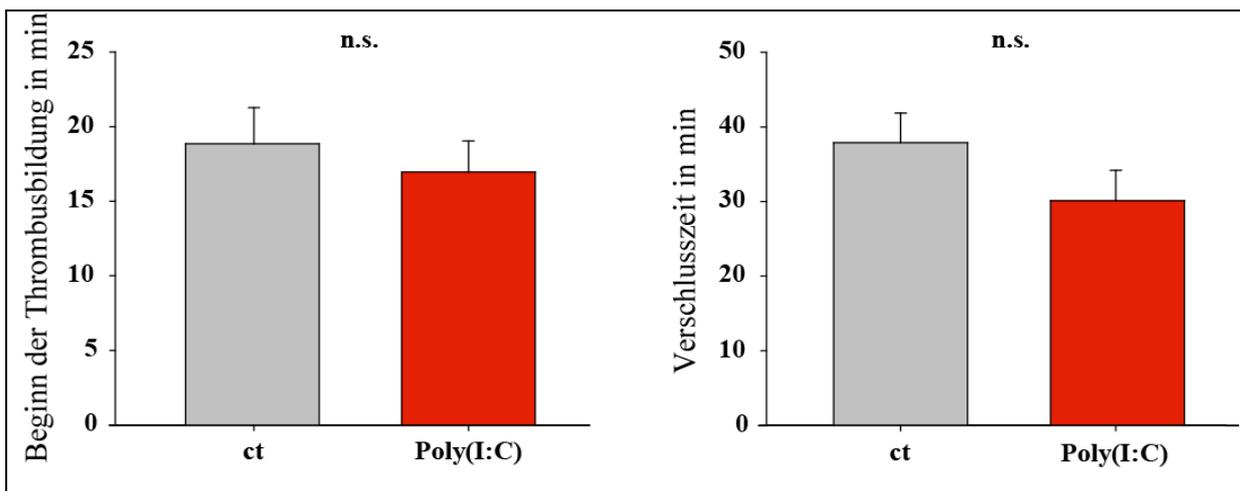


ABBILDUNG 11. THROMBUSBILDUNG IN DEN ARTERIOLEN DES M. CREMASTER NACH PHOTOCHEMISCHER SCHÄDIGUNG MIT FITC-DEXTRAN UND STIMULATION MIT POLY I:C IN TLR-3-KO-MÄUSEN

In TLR-3-KO-Mäusen konnte in der „Light dye Injury“ sowohl in der Zeit bis zum Beginn der Thrombusbildung, als auch in der Verschlusszeit kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (ct) und der 24 Stunden vor dem Versuch mit 200 µg Poly(I:C) behandelten Gruppe (Poly(I:C)) gesehen werden ($n = 4$, $p > 0,1$. Mittelwert \pm Standardfehler, Statistik mit t-Test (Sigma Plot)).

4.4 EINFLUSS VON POLY(I:C) AUF DIE EXPRESSION PROKOAGULATORISCHER FAKTOREN IN MENSCHLICHEN ENDOTHELZELLEN SOWIE IN INTRINSISCHEN NIERENZELLEN

Das synthetische doppelsträngige RNA-Analogon Poly(I:C) reguliert die mRNA-Expression der gerinnungsfördernden Moleküle Tissue factor und Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-1) in unterschiedlichen menschlichen Endothellinien hoch (Abbildung 12). Wir untersuchten die mRNA-Transkription in „human microvascular endothelial cells“ (HMECs), in „human umbilical vein endothelial cells“ (HUVECs) und in „human mesangial cells“ (HMCs). Eine vergleichende Untersuchung auf Mesangialzellen wurde durchgeführt, da virus-assoziierte immunvermittelte Erkrankungen wie sie etwa im Rahmen einer Hepatitis C Infektion vorkommen neben vaskulären Komplikationen häufig zu entzündlichen glomerulären Erkrankungen führen. Den Mesangialzellen als intrinsischen Nierenzellen kommt bei der Pathogenese dieser Erkrankung eine bedeutende Rolle zu. Poly(I:C) fördert auf HMECs in einer Konzentration von 10 µg/ml die mRNA-Transkription nach 12 Stunden signifikant für Tissue factor und PAI-1. Die quantitative real time PCR-Untersuchung zeigte einen deutlichen Anstieg in der Menge der jeweiligen mRNA-Spiegel in den Zellen. Zur Untersuchung der Produktion gerinnungsfördernder Moleküle wurde der sogenannte „Clotting Assay“ verwendet. Es zeigte sich eine signifikant kürzere Gerinnungszeit von Vollblut nach Zugabe von HMEC-Lysaten, die zuvor über 24 Stunden mit 10 µg/ml Poly(I:C) inkubiert worden sind. Die Gerinnungszeit war etwa um die gleiche Zeit kürzer gewesen, wie bei der Positivkontrolle, die zuvor mit TNF α stimuliert worden war (Abbildung 12. (d)) ($n = 5-6$, $*p < 0,05$; statistische Berechnung mit t-Test (Sigma Plot)).

Die mRNA-Expression in „human microvascular endothelial cells“ (HMECs) für Tissue factor und Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-1) war nach Inkubation mit 10 µg/ml Poly(I:C) nach 12 Stunden signifikant erhöht (Abbildung 12. (a)). Der Median des Verhältnisses mRNA-Menge Tissue factor vs. mRNA-Menge GAPDH der mit Poly(I:C) inkubierten Zellen war mit $2,47 \times 10^{-3}$ signifikant

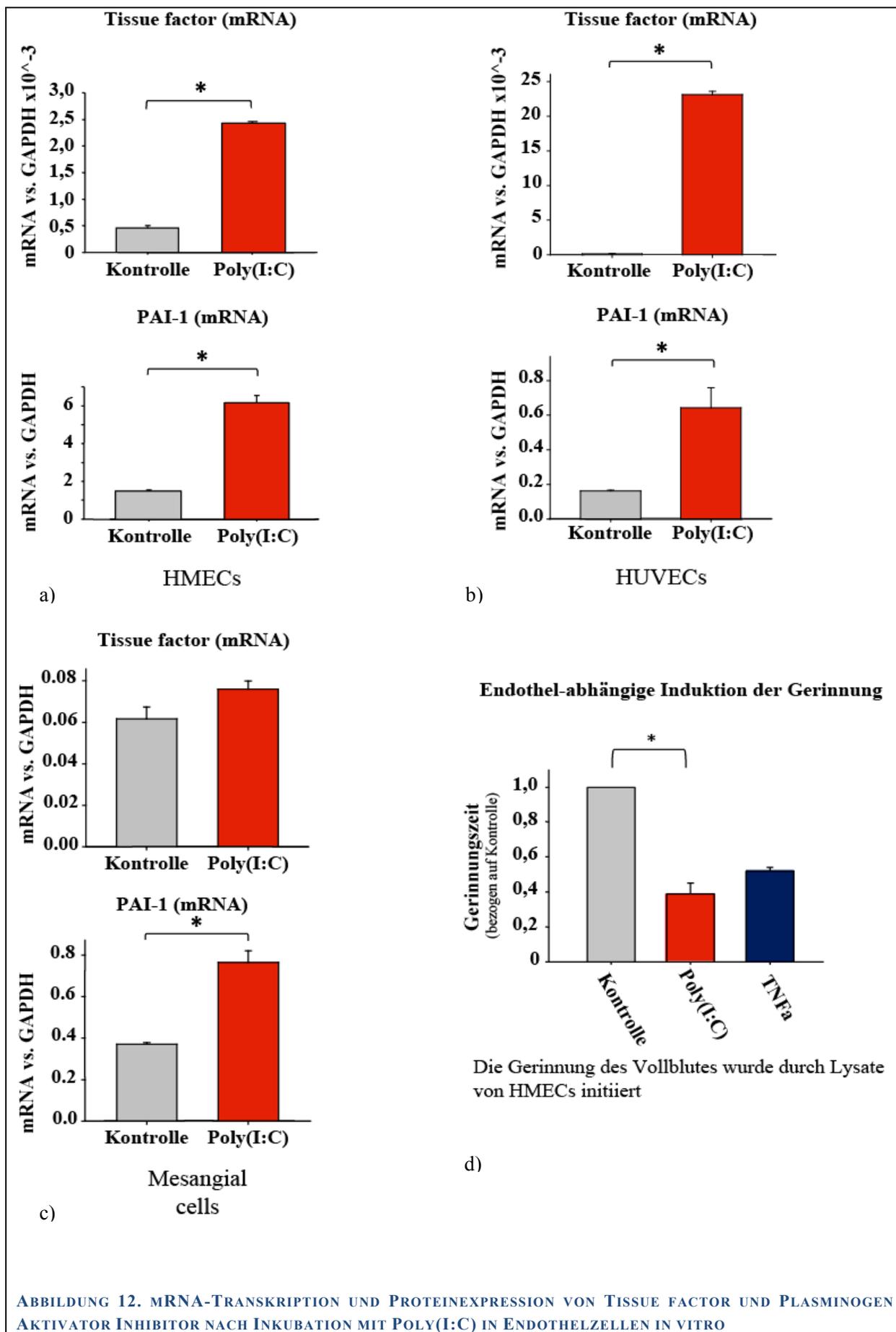


ABBILDUNG 12. mRNA-TRANSCRIPTION UND PROTEINEXPRESSION VON TISSUE FACTOR UND PLASMINOGEN AKTIVATOR INHIBITOR NACH INKUBATION MIT POLY(I:C) IN ENDOTHELZELLEN IN VITRO

In vitro konnte in „human microvascular endothelial cells“ (HMECs) (a), in „human umbilical vein cells“ (HUVECs) (b) und in mesangial cells (c) nach 12-stündiger Inkubation mit 10 µg/ml Poly(I:C) in der real time PCR auf mRNA-Ebene eine verstärkte Transkription von Tissue factor und dem Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI-1) gesehen werden (n = 4, *p < 0,05. Mittelwert +/- Standardfehler, Statistik mit t-Test (Sigma Plot)). Außerdem zeigten Zelllysate von HMECs, die über 24 Stunden mit 10 µg/ml Poly(I:C) inkubiert wurden, im „Clotting-Assay“ (d) eine signifikant kürzere Gerinnungszeit in menschlichen Vollblut in vitro (n = 5-6, *p < 0,05. Mittelwert +/- Standardfehler, Statistik mit t-Test (Sigma Plot)). Als Positivkontrolle wurden HMEC-Lysate, die zuvor mit TNFα behandelt wurden, verwendet.

größer als der Median der Kontrollgruppe, der $2,79 \times 10^{-4}$ betrug (n = 4; *p < 0,05; Statistische Berechnung mit Rank Sum Test (Sigma Plot)). Auch der Mittelwert des Verhältnisses mRNA-Menge PAI-1 vs. mRNA-Menge GAPDH in der Poly(I:C)-Gruppe ist mit 6,16 deutlich größer als der Mittelwert der Kontrollgruppe mit 1,34 gewesen (n = 4, *p < 0,05; statistische Berechnung mit t-Test (Sigma Plot)).

Ebenso verhielt es sich in den „human umbilical vein endothelial cells“ (HUVECs), die ebenfalls eine signifikant gesteigerte mRNA-Transkription für Tissue factor und Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI-1) zeigten (Abbildung 12. (b)). Der Median des Verhältnisses der mRNA-Menge des Tissue factors vs. mRNA-Menge GAPDH war in der Poly(I:C)-Gruppe mit $2,34 \times 10^{-2}$ signifikant größer, als der Median der Kontrollgruppe mit $1,3 \times 10^{-4}$ (n = 4, *p < 0,05; Statistische Berechnung mit dem Rank Sum Test (Sigma Plot)). Der Median des Verhältnisses der mRNA-Menge des PAI-1 vs. mRNA-Menge GAPDH war in der Poly(I:C)-Gruppe mit 0,575 signifikant größer als in der Kontrollgruppe mit 0,164 (n = 4, *p < 0,05; statistische Berechnung mit dem Rank Sum Test (Sigma Plot)).

In den Mesangial cells (Abbildung 12. (c)) konnte in Bezug auf die mRNA-Transkription von Tissue factor nach Inkubation der Zellen mit 10 µg/ml Poly(I:C) über 12 Stunden auf dem 5%-Signifikanzniveau statistisch kein relevanter Unterschied festgestellt werden. Gleichwohl war der Mittelwert des Verhältnisses mRNA-Menge Tissue factor vs. mRNA-Menge GAPDH für die mit Poly(I:C) behandelten Gruppe mit 0,0759 größer als der Median des Verhältnisses mRNA-Menge Tissue factor vs. mRNA-Menge GAPDH der Kontrollgruppe, der bei 0,0617 lag (n = 4, p > 0,05; Statistische Berechnung mittels t-Test (Sigma Plot)). Dagegen konnte ein signifikanter Unterschied in der mRNA-Transkription von PAI-1 in Mesangial cells gesehen werden. Der Median des Verhältnisses mRNA-Menge PAI-1 vs. mRNA-Menge GAPDH der Poly(I:C)-Gruppe war mit 0,764 größer, als der Median der Kontrollgruppe mit 0,370 (n = 4, *p < 0,05; statistische Berechnung mit Rank Sum Test (Sigma Plot)).

4.5 EINFLUSS VON POLY(I:C) AUF DIE AGGREGATION UND AKTIVIERUNG MENSCHLICHER THROMBOZYTEN IN VITRO

Der Einfluss von Poly(I:C) auf das Aggregationsverhalten und die Aktivierung menschlicher Thrombozyten in vitro wurde mit der Methode der Licht-Transmissions-Aggregometrie (Born-Aggregometrie) und der FACS-Analyse von Oberflächenmolekülen, wie dem P-Selektin und dem aktivierten Fibrinogenrezeptor (GPIIb/IIIa) untersucht. Dabei konnte sowohl im Aggregationsverhalten als auch in den Expressionsprofilen von P-Selektin und GPIIb/IIIa kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit Poly(I:C) inkubierten Gruppe festgestellt werden. Die Aggregationsversuche wurden mit menschlichem Platelet-Rich-Plasma (PRP) und die FACS-Analyse mit menschlichen „Washed Platelets“ durchgeführt. Bei der Licht-Transmissions-Aggregometrie nach Born wird die Transmission von Licht, das durch Platelet-Rich-Plasma fällt, in Relation zur Lichttransmission von Platelet-Poor-Plasma (PPP) gesetzt. Vor Beginn der Aggregation wird die

Menge des transmittierenden Lichts als 0% definiert. Mit Zunahme der Aggregation der Thrombozyten nimmt die Lichtmenge des transmittierten Lichts zu und nähert sich der Menge des Lichts, das durch das PPP fällt, an.

Demnach korreliert die Veränderung der Lichttransmission mit dem Ausmaß der Plättchenaggregation. In Abbildung 9 (a) kann die Veränderung der Lichttransmission nach Zugabe des Thrombozytenaktivators ADP (10 μM) über die Zeit gesehen werden. Die alleinige Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly(I:C) löste im Unterschied zu ADP keine Thrombozytenaggregation aus (a + b) ($n = 3$, $**p < 0,01$. Mittelwert \pm Standardfehler, Statistik mit t-Test (sigma plot)). (c) Nach einer Inkubationszeit mit Poly(I:C) (10 $\mu\text{g/ml}$) über 15 min konnten sowohl nach Aktivierung der Thrombozytenaggregation mit niedrigen Konzentrationen von ADP (ADP low ($< 10 \mu\text{M}$), mit höheren APD Konzentrationen (ADP high ($\geq 10\mu\text{M}$), mit Thrombinrezeptor-aktiviertes-Peptid (TRAP (20 μM)) und mit Kollagen (10 $\mu\text{g/ml}$) keine Unterschiede im Aggregationsverhalten gesehen werden ($n = 4$, $p > 0,05$. Mittelwert \pm Standardfehler, Statistik mit t-Test (sigma plot)). (d) Ebenfalls gab es keine signifikanten Unterschiede im Aggregationsverhalten von Thrombozyten, die über 10 min, 20 min, 30 min und 45 min mit Poly(I:C) (10 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert und deren Aggregation mit ADP ($< 10 \mu\text{M}$) ausgelöst wurde. Die Unterschiede im Aggregationsverhalten bezogen auf die Kontrollgruppe waren mit 1,4 \pm 0,3, 1,0 \pm 0,2, 1,5 \pm 0,4 und 1,3 \pm 0,2 statistisch nicht signifikant ($n = 4$, $p > 0,05$. Mittelwert \pm Standardfehler, Statistik mit One way ANOVA (sigma plot)).

(e-h) Zusätzlich wurden FACS-Analysen der Oberflächenexpression von P-Selektin und dem aktivierten Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa zur Bestimmung von Thrombozytenaktivitätsleveln vorgenommen. Erhöhte Oberflächenexpressionsprofile von P-Selektin und GPIIb/IIIa korrelieren mit einer höheren Thrombozytenaktivität, weshalb sich diese Rezeptoren als Indikatoren zur Bestimmung der Thrombozytenaktivität eignen. Für die FACS-Analyse wurden menschliche „washed platelets“ für 10 min und 60 min mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly(I:C) inkubiert und anschließend die Expressionslevel von P-Selektin und GPIIb/IIIa unter basalen Bedingungen und nach Stimulation mit Thrombin (2 U / ml) bestimmt. Sowohl unter basalen Bedingungen, als auch nach Aktivierung mit Thrombin konnten weder nach 10 min noch nach 60 min signifikante Unterschiede in den Expressionsprofilen zwischen der Poly(I:C)- und der Kontrollgruppe gesehen werden ($n = 3-4$, $p > 0,05$. Mittelwert \pm Standardfehler, Statistik mit One Way ANOVA (sigma plot)).

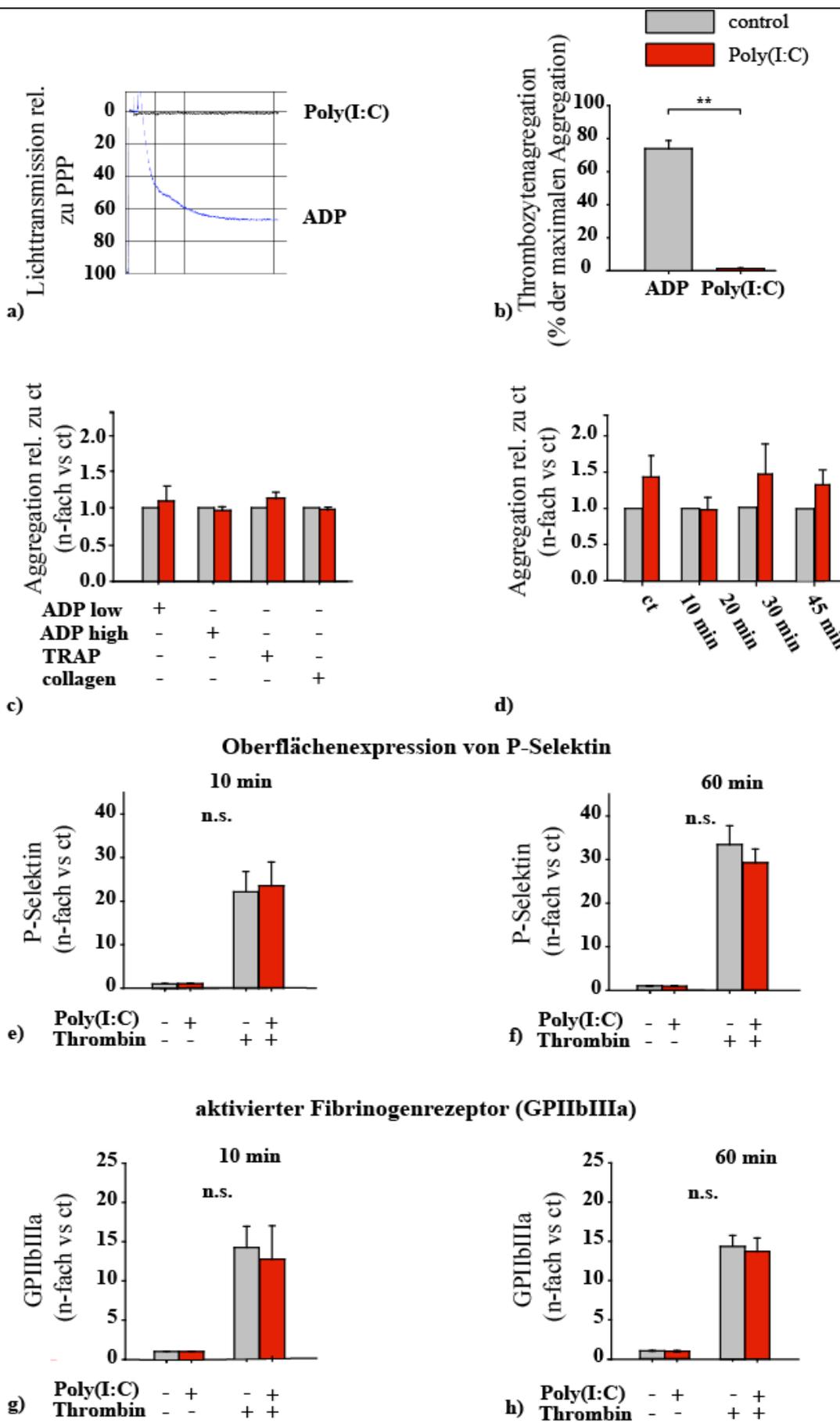


ABBILDUNG 13. AGGREGOMETRIE UND FACS-ANALYSE VON MENSCHLICHEN THROMBOZYTEN IN VITRO

(a + b) Lichttransmissionsaggregometrie nach Born wurde in PRP von gesunden Spendern durchgeführt. Gemessen wurde die Zunahme der Lichttransmission nach Auslösung der Thrombozytenaggregation von PRP relativ zur Lichttransmission von Platelet-Poor-Plasma (PPP) nach Zugabe des Thrombozytenaktivators ADP. Es konnte gezeigt werden, dass die alleinige Zugabe von Poly(I:C) die Thrombozytenaggregation nicht auslöst (a + b) (n = 3. **p < 0,01. Mittelwert +/- Standardfehler, Statistik mit t-Test (sigma plot)). (c) Die Inkubation von PRP mit 10 µg/ml Poly(I:C) über 15 min zeigte keine Änderungen des Aggregationsverhaltens, sowohl nach Aktivierung der Aggregation mit niedrigen ADP-Konzentrationen (ADP low (< 10 µM)), hohen ADP-Konzentrationen (ADP high (>= 10 µM), Thrombinrezeptor-aktiviertes Peptid (TRAP (20 µM) und Kollagen (10 µg / ml) (n = 4, p > 0,05. Mittelwert +/- Standardfehler, Statistik mit t-Test (sigma plot)). (e)-(h) Die Thrombozytenaktivität wurde über die Bestimmung der Oberflächenexpression von P-Selektin und dem aktivierten Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa auf menschlichen "Washed platelets" ermittelt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Oberflächenexpression von P-Selektin und GPIIb/IIIa nach Inkubation mit 10 µg/ml Poly(I:C) über 10min und 60min, sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Stimulation mit Thrombin (2 U/ml) verglichen zur Kontrollgruppe (n = 3-4, p > 0,05. Mittelwert +/- Standardfehler, Statistik mit One Way ANOVA (sigma plot)).

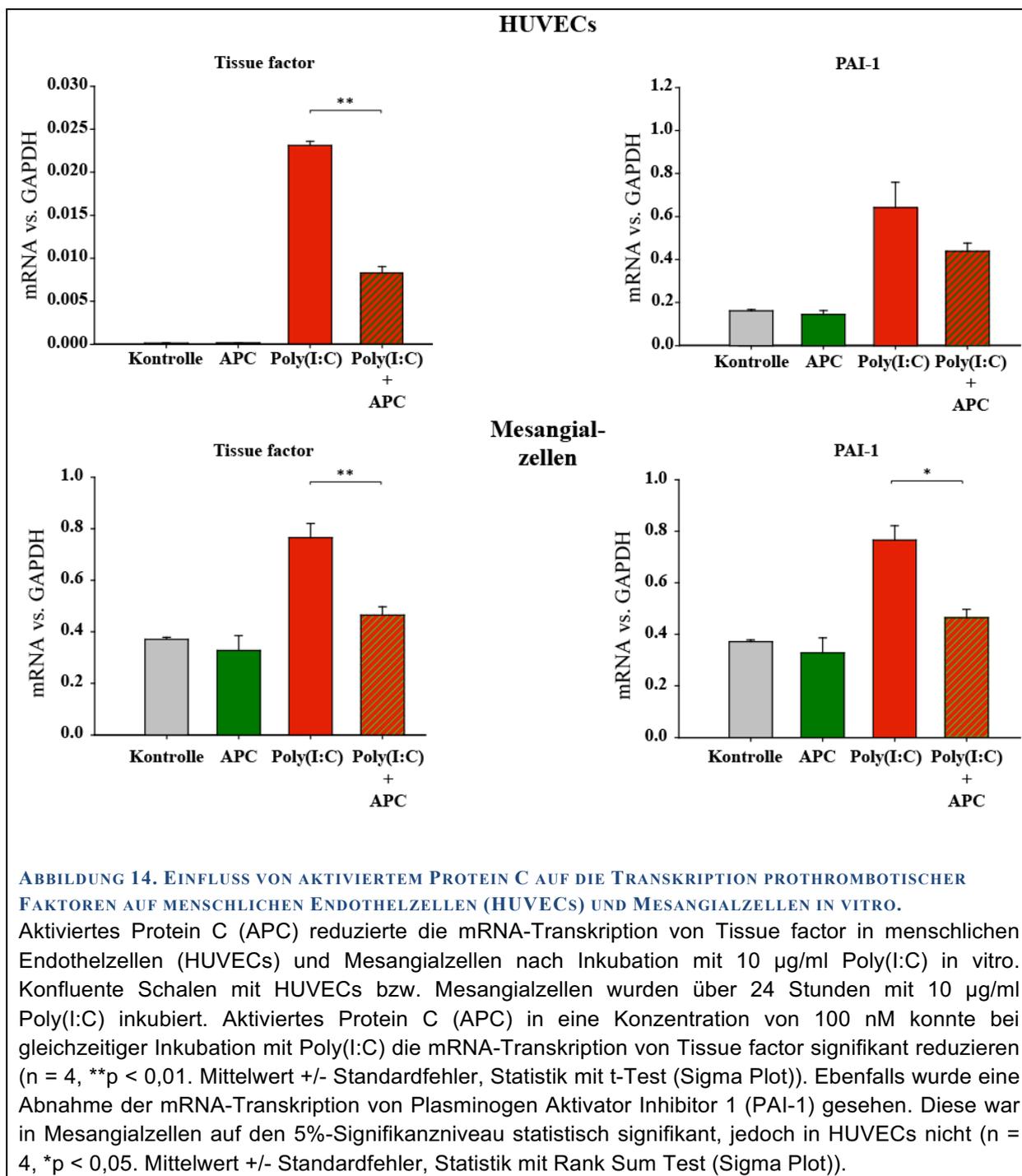
4.6 EINFLUSS VON AKTIVIERTEM PROTEIN C AUF DIE TRANSKRIPTION PROTHROMBOTISCHER FAKTOREN AUF MENSCHLICHEN ENDOTHELZELLEN (HUVECs) SOWIE INTRINSISCHEN NIERENZELLEN (HMCs) IN VITRO

Zur Untersuchung zytoprotektiver Effekte von aktiviertem Protein C (aPC) wurde die mRNA-Transkription der prothrombotischen Faktoren Tissue factor und Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) in der quantitativen real time PCR untersucht. Die Untersuchung fand in menschlichen Endothelzellen, den sogenannten „Human Umbilical Vein Endothelial Cells“ (HUVECs), und in Mesangialzellen statt. Poly(I:C) in eine Konzentration von 10 µg/ml über 24 Stunden führte, wie bereits in den HMECs gezeigt, zu einer signifikant verstärkten mRNA-Expression von Tissue factor und PAI-1. Die gleichzeitige Inkubation mit 100 nM aPC reduzierte die mRNA-Transkription von Tissue factor signifikant (n = 4; **p < 0,01). Die mRNA-Transkription von PAI-1 war auch reduziert, jedoch in HUVECs anders als in den Mesangialzellen auf dem 5%-Signifikanzniveau statistisch gesehen nicht signifikant gemindert (n = 4; p > 0,05).

In HUVECs war der Mittelwert des Verhältnisses der mRNA-Menge des Tissue factors vs. mRNA-Menge GAPDH mit $8,3 \times 10^{-3}$ der mit Poly(I:C) und aktiviertem Protein C behandelten Gruppe signifikant kleiner als der Mittelwert der allein mit Poly(I:C) behandelten Gruppe, der bei $2,31 \times 10^{-2}$ lag (n = 4, **p < 0,01; statistische Berechnung mit dem t-Test (Sigma Plot)). Bezogen auf die mRNA-Expression von PAI-1 konnte eine ähnliche Tendenz in HUVECs gesehen werden, diese war jedoch mit einem Mittelwert des Verhältnisses der mRNA-Menge PAI-1 vs. mRNA-Menge GAPDH von 0,438 in der mit Poly(I:C) und aktiviertem Protein C behandelten Gruppe nicht signifikant unterschiedlich zum Mittelwert der alleine mit Poly(I:C) behandelten Gruppe, der bei 0,642 lag (n = 4, p > 0,05; statistische Berechnung mit t-Test (Sigma Plot)).

In den Mesangialzellen konnte dagegen sowohl in der mRNA-Expression des Tissue factors, als auch des PAI-1 ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe, die ausschließlich mit Poly(I:C) inkubiert wurde und der Gruppe, die sowohl mit Poly(I:C) und aktiviertem Protein C behandelt wurde, gesehen werden. Bezogen auf den Tissue factor war der Mittelwert des Verhältnisse mRNA-Menge vs. mRNA-Menge GAPDH der Poly(I:C)-Gruppe mit $7,59 \times 10^{-2}$ signifikant unterschiedlich zum Mittelwert der Poly(I:C) + aPC-Gruppe mit $4,59 \times 10^{-2}$ (n = 4, **p < 0,01; statistische Berechnung mit t-Test (Sigma Plot)). Auch der Median des Verhältnisses mRNA-Menge PAI-1 vs. mRNA-Menge

GAPDH wich mit 0,764 im Vergleich zum Median mit 0,468 der Gruppe Poly(I:C) + APC signifikant ab ($n = 4$, $*p < 0,05$; statistische Berechnung mit Rank Sum Test (Sigma Plot)).



4.7 EINFLUSS EINER THERAPIE MIT PROTEIN C AUF DIE DURCH POLY(I:C) BEDINGTEN BLUTBILDVERÄNDERUNGEN

C57Bl/6Wt-Mäusen wurde 24 Stunden vor der Blutentnahme 200 µg Poly(I:C) intraperitoneal injiziert. Über einen A. carotis-Katheter wurde anschließend 30 Minuten vor der Blutentnahme das Protein C-Gemisch Ceprotrin® von der Firma Baxter in einer Dosis von 100 U Protein C/kg Maus gespritzt. Die anschließende Blutentnahme erfolgte analog dem oben genannten Protokoll und die Erstellung des Blutbildes wurde mit einem Coulter-Counter (Tabelle. 16) durchgeführt. Die

Kontrolltiere, denen kein Protein C gespritzt wurde, erhielten eine Albuminkontrolllösung, die in der Zusammensetzung dem Ceprotin-Gemisch ohne Protein C entsprach (Abbildung 15).

Wie bereits oben beschrieben war auch hier bei den Leukozyten ein deutlicher Abfall nach der intraperitonealen Injektion von 200 µg Poly(I:C) nach 24 Stunden festzustellen. Der Median der Leukozytenzahl der Kontrolltiere (ct) war mit $8,2 \times 10^3 / \mu\text{l}$ Vollblut signifikant größer als bei den mit Poly(I:C) behandelten Tieren (Poly(I:C)), der bei $1,1 \times 10^3 / \mu\text{l}$ lag ($n = 5-8$, $*p < 0,5$; statistische Berechnung mit Rank Sum Test (Sigma Plot)). Die Leukozytenzahl der alleine mit Protein C behandelten Tiere (Protein C) war dagegen mit einem Median von $8,2 \times 10^3 / \mu\text{l}$ statistisch gesehen im Vergleich zur Kontrolle gleich groß. Protein C konnte innerhalb von 30 Minuten die Leukozytendepletion nach Poly(I:C)-Behandlung nicht beeinflussen. Der Median der mit Poly(I:C) und Protein C behandelten Tiere war mit $0,8 \times 10^3 / \mu\text{l}$ signifikant kleiner als der Median der Kontrolltiere (ct) ($n = 5-8$, $*p < 0,5$; statistische Berechnung mit Rank Sum Test (Sigma Plot)). Auch bei den Thrombozyten konnte eine Depletion nach einer Behandlung mit Poly(I:C) gesehen werden.

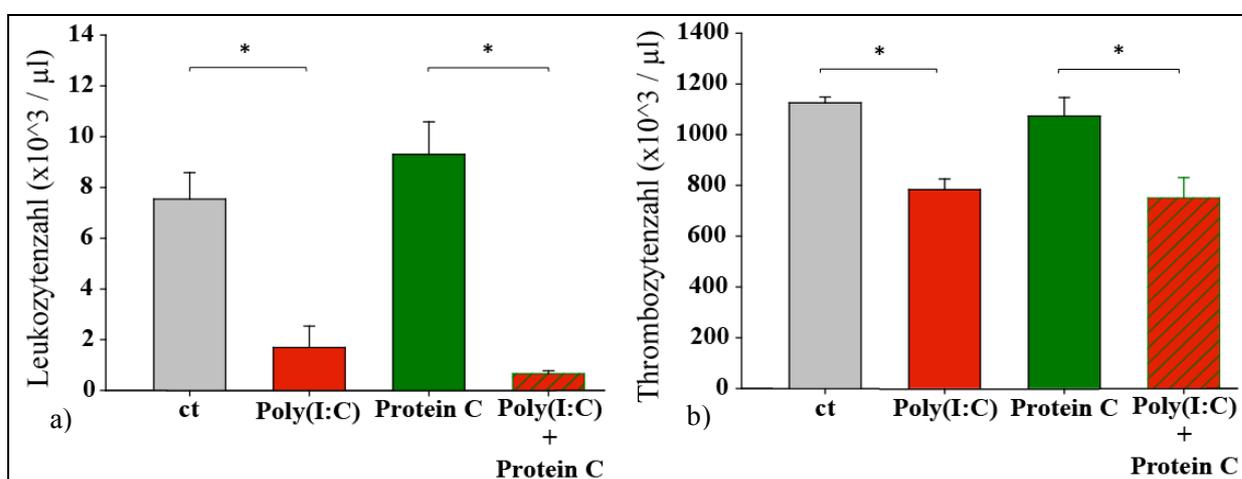


ABBILDUNG 15. EFFEKTE VON PROTEIN C AUF DIE VERÄNDERUNG DES BLUTBILDES DURCH POLY(I:C)

Das Protein C – Gemisch Ceprotin® konnte innerhalb von 30 min in einer Dosis von 100 U Protein C /kg Maus i.a. gegeben die Veränderungen des Blutbildes nach intraperitonealer Stimulation mit 200 µg Poly(I:C) über 24 Stunden nicht rückgängig machen. Dies betraf sowohl die Leukozytenzahl (Abbildung 9 a), als auch die Thrombozytenzahl (Abbildung 9 b) ($n = 5-8$, $*p < 0,05$, Mittelwert +/- Standardfehler, Statistik mit t-Test (Sigma Plot)).

Der Mittelwert +/- Standardfehler betrug bei den Kontrolltieren (ct) $1125,6 \times 10^3 / \mu\text{l} \pm 23,0 \times 10^3 / \mu\text{l}$ Vollblut und war signifikant größer als der Mittelwert der mit Poly(I:C) behandelten Tiere (Poly(I:C)), der bei $783,4 \times 10^3 / \mu\text{l} \pm 42,2 \times 10^3 / \mu\text{l}$ lag ($n = 5-8$, $*p < 0,05$; statistische Berechnung mit t-Test (Sigma Plot)). Dagegen zeigte die Gruppe der mit Protein C behandelten Tiere, denen nicht Poly(I:C) gespritzt wurde (Protein C), mit einem Mittelwert von $1073,6 \times 10^3 / \mu\text{l} \pm 72,5 \times 10^3 / \mu\text{l}$ einen annähernd gleichen Wert, wie die Kontrollgruppe. Die kurzfristige Behandlung der mit Poly(I:C) vorstimulierten Tiere mit Protein C über 30 min, konnte einen Abfall der Thrombozytenzahl im Vollblut nicht korrigieren. Der Mittelwert +/- Standardfehler lag mit $750,5 \times 10^3 / \mu\text{l} \pm 80,1 \times 10^3 / \mu\text{l}$ signifikant unterhalb des Wertes der Kontrollgruppe ($n = 5-8$; $*p < 0,05$) und war dagegen im Vergleich zur Gruppe, die allein mit Poly(I:C) behandelt worden war, nicht unterschiedlich.

4.8 EFFEKTE VON PROTEIN C AUF DIE DURCH POLY(I:C) HERVORGERUFENEN VERÄNDERUNGEN IN DER MIKROZIRKULATION DES M. CREMASTER

Zur Untersuchung der Effekte von Protein C auf die Thrombusbildung in vivo, wurde das Modell der photochemischen Schädigung, das sogenannte „Light dye Modell“ in der Mikrozirkulation des M. cremasters durchgeführt. Die Versuche fanden in C57Bl/6Wt-Mäusen statt, wobei vier Versuchsgruppen gebildet wurden. Die Kontrollgruppe (ct) wurde weder mit Poly(I:C) noch mit Protein C behandelt, sondern mit den jeweiligen Kontrolllösungen. Die Poly(I:C)-Gruppe (Poly(I:C)) wurde 24 Stunden vor dem Versuch mit 200 µg Poly(I:C) intraperitoneal stimuliert und erhielt 30 Minuten vor dem Versuch intraarteriell eine Albuminkontrolllösung.

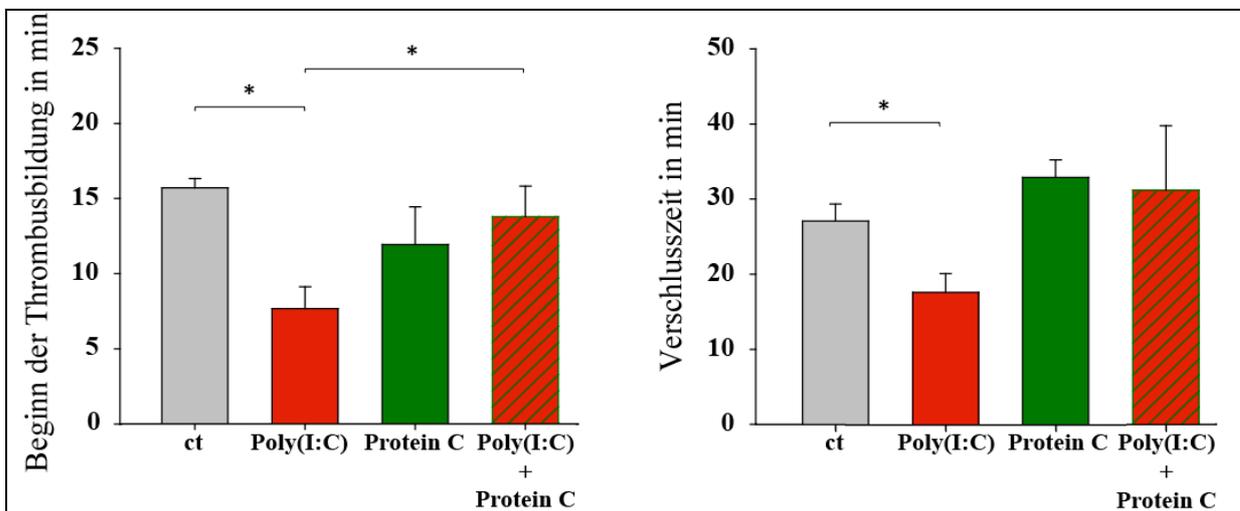


ABBILDUNG 16. THROMBUSBILDUNG IN DEN ARTERIOLEN NACH STIMULATION MIT POLY(I:C) UND BEHANDLUNG MIT PROTEIN C

Die intraarterielle Gabe von Protein C in einer Dosis von 100 U Protein C /kg Maus 30 Minuten vor Versuchsbeginn führt im Vergleich zu Mäusen, die ohne Protein C behandelt sind, zu einer Verlängerung der Zeit bis zum Beginn der Thrombusbildung (Onset) in Mäusen, die zuvor mit 200 µg Poly(I:C) intraperitoneal über 24 Stunden stimuliert worden sind ($n = 5$, $*p < 0,05$, Mittelwert \pm Standardfehler, Statistik mit t-Test (Sigma Plot)). In Bezug auf die Verschlusszeit ist eine deutliche Tendenz in Richtung Verlängerung der Verschlusszeit nach Gabe von Protein C zu sehen. Diese ist allerdings auf dem 5%-Niveau nicht signifikant ($n = 5$, $p > 0,05$, Mittelwert \pm Standardfehler, Statistik mit t-Test (Sigma Plot)).

Der Protein C-Gruppe (Protein C) wurde 30 Minuten vor Versuchsbeginn 100 U Protein C /kg Mausegewicht intraarteriell injiziert und die Poly(I:C) + Protein C-Gruppe erhielt sowohl 24 Stunden vor dem Versuch 200 µg Poly(I:C), als auch 30 Minuten vor dem Versuch 100 U Protein C /kg Maus (Abbildung 16).

Bezogen auf den Beginn der Thrombusbildung (Onset) konnte dabei ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe, der mit Poly(I:C) behandelten Gruppe und der mit Poly(I:C) und Protein C behandelten Gruppe festgestellt werden. Der Mittelwert \pm Standardfehler der Kontrollgruppe betrug 15,7 min \pm 0,6 min und war damit signifikant größer als der Mittelwert der Poly(I:C)-Gruppe, der nur 7,7 min \pm 1,4 min betrug ($n = 5$; $*p < 0,5$). Dagegen vergrößerte sich der Mittelwert nach Behandlung mit Poly(I:C) und Protein C auf 13,8 min \pm 2,0 min und war damit signifikant größer als der Mittelwert der nur mit Poly(I:C) behandelten Mäuse und nicht signifikant unterschiedlich zu den Kontrolltieren ($n = 5$; $*p < 0,5$).

In Bezug auf die Verschlusszeit konnte auf dem 5%-Signifikanzniveau aufgrund eines großen Standardfehlers innerhalb der Gruppe der mit Poly(I:C) und Protein C behandelten Tiere kein Unterschied zwischen dem Mittelwert der Verschlusszeit der Poly(I:C)-Gruppe mit 17,6 min \pm 2,5

min Standardfehler und dem Mittelwert der Poly(I:C) + Protein C-Gruppe mit 31,2 min +/- 8,8 min festgestellt werden ($n = 5$; $p > 0,05$). Eine deutliche Tendenz in Richtung Verlängerung der Verschlusszeit bei der Poly(I:C) + Protein C-Gruppe war jedoch zu erkennen.

5. DISKUSSION

Das Immunsystem und das System der Blutstillung (Hämostase) sind entwicklungsgeschichtlich verwandt und agieren während einer Infektion synergistisch [18-20, 25]. Im Falle einer Infektion führt eine Aktivierung des Immunsystems nicht nur über eine Aktivierung von primären Immunzellen zu einer Abwehrreaktion gegen einen eindringenden Erreger, sondern gleichzeitig auch zu einer Aktivierung der Hämostase, die durch Gerinnung und Thrombozytenaggregation eine Ausbreitung des invadierenden Pathogens unterbindet und damit die Infektion lokal begrenzen hilft [18-20, 25]. Thrombozyten scheinen sogar eine unmittelbare Bedeutung als Bestandteil der Pathogenerkennung und Infektabwehr zu haben [42, 43]. Das bedeutet, dass die Hämostase nicht nur bei einer Gefäßverletzung einen übermäßigen Blutverlust verhindern soll, sondern auch eine wichtige Rolle in der Verteidigung des Organismus gegen eindringende Pathogene spielt. Aufgrund dieser Zusammenhänge und zur Abgrenzung des pathologischen Zustands „Thrombose“ haben Massberg et. al. [25] den Begriff der „Immunothrombose“ eingeführt.

Virale Infektionen aktivieren häufig das Blutgerinnungssystem [2]. Besonders gefürchtet ist das „viral hemorrhagic fever syndrome“, das bei einer Infektion mit so genannten „hämorrhagischen Viren“ auftreten kann [1, 4, 5, 80]. Zu den Vertretern dieser Gruppe zählen u.a. das Dengue-, das Marburg- und das Ebola-Virus [1, 5, 8]. Die Gefahr einer Infektion mit diesen Viren zeigte sich in beeindruckender Weise in der im Sommer 2014 ausgebrochenen Ebola-Epidemie in Westafrika, die mit mehreren Tausend Toten einhergegangen ist [162]. Prothrombotischen Veränderungen des Endothels sind in der Pathogenese von entscheidender Bedeutung [6]. Durch einen massiven Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten aufgrund einer ausgeprägten disseminierten intravasalen Gerinnung, entwickelt sich unter dem „viral hemorrhagic fever syndrome“ eine Verbrauchskoagulopathie mit anschließenden unkontrollierbaren Blutungen und einer Flüssigkeitsverteilungsstörung [4, 5, 8]. Die übermäßige Aktivierung der Hämostase durch das Pathogen bzw. Immunsystem ist ein entscheidender Prozess in diesem Pathomechanismus. Die Pathogenese des „viral hemorrhagic fevers“ ähnelt daher in gewisser Weise der bakteriellen Sepsis, die ebenfalls in einer disseminierten Gerinnung mit Verbrauchskoagulopathie enden kann [5]. Die Unterdrückung einer übermäßigen Gerinnungsaktivität könnte daher einen therapeutischen Nutzen haben [2]. Viren werden durch das Immunsystem u.a. über spezifische Eigenschaften viraler Nukleinsäuren erkannt (uncapped ss-RNA, ds-RNA, usw.) [33, 80]. Ds-RNA wird als „pathogen associated molecular pattern“ (PAMP) durch eine Reihe von Rezeptoren detektiert, zu denen u.a. der TLR-3, MDA-5, RIG-I und LGP-2 gehören [33, 73, 76].

Die Einflüsse von ds-RNA auf Endothelzellen wurden bereits in verschiedenen Publikationen beschrieben. Dass Poly(I:C) als ds-RNA-Analogon ein potenter Aktivator von Endothelzellen ist, zeigten im Jahre 1994 Doukas et al. [77], ohne jedoch die molekularen Zusammenhänge zu kennen. Lundberg et al. [79] untersuchten den Einfluss von Poly(I:C) auf verschiedene menschliche Zelltypen und erkannten u.a. eine verstärkte Zytokinproduktion von Endothelzellen *in vitro*. Zimmer et al. [78] zeigten, dass die Erkennung von ds-RNA durch Endothelzellen zu einer Aktivierung von Endothelzellen und zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion *in vivo* führen kann. *In vitro* konnten Preissner et. al. [80] auf Endothelzellen eine Hochregulation von Tissue factor und eine verminderte Expression von Thrombomodulin nachweisen und zeigen, dass hierfür in erster Linie der TLR-3 wichtig ist. Die Erkennung von ds-RNA durch den Organismus könnte daher wichtig für das Verständnis viraler Effekte auf die Hämostase sein.

Ob ds-RNA im Tierversuch einen prothrombotischen Effekt besitzt, wurde bisher noch nicht gezeigt. Außerdem gibt es erst eine einzige Publikation, die einen Einfluss von ds-RNA auf die

Thrombozytenfunktion untersucht hat [81]. Allerdings sind die Ergebnisse dieser Publikation nicht eindeutig und beschreiben auch keine Veränderungen im Aggregationsverhalten bzw. des Aktivitätslevels der Thrombozyten. Es wird hier noch weitere Forschung notwendig sein.

Im zweiten Teil der Arbeit untersuchten wir einen möglichen therapeutischen Einsatz von Protein C auf die durch ds-RNA ausgelösten Veränderungen *in vitro* und *in vivo*. Aufgrund seiner antikoagulatorischen als auch antiinflammatorischen Eigenschaften könnte Protein C eine interessante therapeutische Option sein.

5.1 POLY(I:C) FÖRDERT IN ENDOTHELZELLEN *IN VITRO* DIE TRANSKRIPTION UND DIE PROTEINEXPRESSION VON TISSUE FACTOR UND PAI-1 UND WIRKT DADURCH PROTHROMBOTISCH

Wie bereits von Preissner et al. [80] beschrieben, konnten auch wir in menschlichen Endothelzellen („human microvascular endothelial cells“ (HMECs) und „human umbilical vein endothelial cells“ (HUVECs)) als auch in menschlichen Mesangialzellen („human mesangial cells“ (HMCs)) nach einer Inkubation mit Poly(I:C) *in vitro* auf RNA-Ebene in der real-time PCR eine verstärkte Transkription der mRNA von Tissue factor nachweisen (Abbildung 12. mRNA-Transkription und Proteinexpression von Tissue factor und Plasminogen Aktivator Inhibitor nach Inkubation mit Poly(I:C) in Endothelzellen *in vitro*). Bisher nicht beschrieben ist die Hochregulation der mRNA-Transkription des „Plasminogen Aktivator Inhibitor“ (PAI-1), der ebenfalls eine prothrombotische Wirkung besitzt. Demnach fördert Poly(I:C) die Transkription prothrombotischer Faktoren in Endothelzellen *in vitro* und trägt möglicherweise dadurch zu einem prothrombotischen Zustand im Gefäßsystem bei. Zelllysatsmaterial von HMECs, die zuvor mit Poly(I:C) behandelt wurden, zeigte in der Thrombelastometrie mit menschlichem Vollblut eine beschleunigte Gerinnungszeit. Die Gerinnung menschlichen Vollbluts von gesunden Spendern wurde durch Zugabe des Zelllysatsmaterials ausgelöst und die Zeit bis zur vollständigen Gerinnelbildung gemessen. In diesem Versuch korreliert die Geschwindigkeit der Gerinnelbildung mit der Menge an prothrombotischen Faktoren des Zelllysatsmaterials. Es kann daher auf eine verstärkte Expression prothrombotischer Moleküle in Endothelzellen, die mit Poly(I:C) behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe geschlossen werden.

5.2 POLY(I:C) SCHEINT KEINE DIREKTEN EFFEKTE AUF DIE AKTIVIERUNG UND DAS AGGREGATIONSVERHALTEN VON MENSCHLICHEN THROMBOZYTEN *IN VITRO* ZU HABEN

Ein direkter Einfluss von ds-RNA auf das Aggregationsverhalten von menschlichen Thrombozyten ist bisher nicht beschrieben worden. In einer einzigen Publikation von Anabel et al. [81] wird eine geringgradige Expression von TLR-3 auf Thrombozyten und eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration, Veränderungen in der oberflächlichen Expression von Rezeptoren, sowie eine verstärkte Freisetzung von Zytokinen nach Inkubation mit Poly(I:C) gezeigt. Weitere Publikationen, die sich mit der Expression von TLRs auf Thrombozyten beschäftigen, erwähnen eine Expression des TLR-3 auf Thrombozyten nicht, sodass hier noch weitere Forschung notwendig erscheint [163].

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob Poly(I:C) direkte Effekte auf Thrombozyten ausüben kann, wurden menschliche Thrombozyten aus Vollblut gesunder Spender isoliert und in Form von Platelet-rich-Plasma (PRP) und „washed platelets“ das Aggregationsverhalten in der Lichttransmissionsaggregometrie (Methode nach Born) bzw. die Expression von Oberflächenmerkmalen in der FACS-Analyse untersucht (Abbildung 13. Aggregometrie und FACS-Analyse von menschlichen

Thrombozyten in vitro) Die gewählte Konzentration von 10 µg/ml Poly(I:C) entsprach der Poly(I:C)-Konzentration, die auch für die Versuche mit den Endothelzellen verwendet wurde und als eher hohe Konzentration in der Literatur beschrieben wird [78, 80]. In der Aggregometrie konnte sowohl nach unterschiedlich langen Inkubationsintervallen als auch unter Verwendung unterschiedlicher Aktivatoren der Thrombozytenaggregation kein Unterschied im Aggregationsverhalten von mit Poly(I:C) behandelten zu unbehandelten Thrombozyten gesehen werden. Poly(I:C) veränderte unter diesen Bedingungen das Aggregationsverhalten von menschlichen Thrombozyten in PRP nicht und ein direkter Effekt von Poly(I:C) auf die Funktionalität der Thrombozyten konnte nicht nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung des Aktivitätsgrades von menschlichen Thrombozyten kann die Expression bestimmter Oberflächenmerkmale in „washed platelets“ in der FACS-Analyse gemessen werden. Allgemein anerkannte Oberflächenmerkmale von Thrombozyten, die mit einer Aktivierung von Thrombozyten einhergehen, sind das P-Selectin, das für Thrombozyten-Endothelinteraktionen verantwortlich ist und das „Glykoprotein IIb/IIIa“ (GP IIb/IIIa) [40, 164], das für die Quervernetzung aggregierte Thrombozyten über Fibrin verantwortlich ist. Menschliche Thrombozyten wurden auch hier aus Vollblut gesunder Spender isoliert und mit einem Thrombozytenpuffer gewaschen, sodass die Plasmabestandteile auf ein Minimum reduziert wurden. Die Inkubation der „washed platelets“ mit 10 µg/ml Poly(I:C) erfolgte über einen kurzen (10 min) und einen längeren (60 min) Zeitraum. Nach der Inkubation wurden die Thrombozyten fixiert und die entsprechenden Oberflächenmerkmale mittels Antikörper gefärbt. Dies entsprach der Expression unter basalen, nicht mit Thrombin stimulierten Bedingungen. Um eventuelle Unterschiede nach Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin festzustellen, wurden das gleiche Prozedere mit zusätzlicher Thrombozytenaktivierung mit Thrombin durchgeführt. Ähnlich wie bei den Aggregationsversuchen konnten auch in der FACS-Analyse keine Unterschiede in der Expression und damit im Aktivitätslevel menschlicher Thrombozyten nach Inkubation mit Poly(I:C) gesehen werden. Nicht nur unter basalen Bedingungen, sondern auch nach Aktivierung mit Thrombin waren die Expressionsprofile von P-Selectin und GP IIb/IIIa zwischen der Kontrollgruppe und behandelten Gruppe nicht signifikant verändert.

Es war uns somit nicht möglich einen direkten Effekt von Poly(I:C) auf Thrombozyten auf funktioneller Ebene nachzuweisen. Dennoch können direkte Wirkungen von Poly(I:C) auf die Thrombozytenfunktion nicht komplett ausgeschlossen werden, da die Methodik der Aggregometrie als auch die Messung der Expression von Oberflächenmerkmalen auf Thrombozyten gewisse Schwächen besitzen.

Ein wichtiger Nachteil der Lichttransmissionsaggregometrie liegt in der Verwendung von PRP. Da die Thrombozyten in PRP mit zunehmender Zeit automatisch aggregieren, sind längerfristige Inkubationszeiten, die z.B. über mehrere Stunden sich erstrecken würden, nur schwer durchführbar. Demnach konnten wir nur Effekte von Poly(I:C) auf Thrombozyten untersuchen, die sich in einem Zeitrahmen von 90 Minuten abspielen. Wir können daher nicht ausschließen, dass Poly(I:C) (ds-RNA) über einen längeren Zeitraum auch direkte Effekte mit Änderungen im Aggregationsverhalten der Thrombozyten zeigt. Ein ähnliches Problem bestand auch in der FACS-Analyse, bei der „washed platelets“ verwendet wurden, die auch nur über einen kurzen Zeitraum mit Poly(I:C) inkubiert werden konnten.

Da Poly(I:C) ohne Zugabe eines Thrombozytenaktivators (ADP, Kollagen, TRAP) die Thrombozytenaggregation nicht auslöste (Abbildung 13. Aggregometrie und FACS-Analyse von menschlichen Thrombozyten in vitro.), musste zu Untersuchung des Aggregationsverhaltens jeweils ein Thrombozytenaktivator verwendet werden. Insbesondere die Zugabe von Kollagen und TRAP führte zu einer überschwelligem Thrombozytenaktivierung, die sich in einer kompletten Aggregation

der Thrombozyten niederschlug, sodass eventuelle Unterschiede möglicherweise durch die Aktivatorssubstanz überdeckt wurden. Allerdings konnte ADP in niedriger Dosierung unterschwellige Thrombozytenaggregationen auslösen, deren Verhalten sich jedoch auch zwischen Kontrollgruppe und Poly(I:C)-Gruppe nicht unterschied. Sodass wir somit sowohl unter unterschweligen als auch unter überschweligen Aggregationsbedingungen keine signifikanten Unterschiede im Aggregationsverhalten menschlicher Thrombozyten erkennen konnten. Eine Untersuchung des Aggregationsverhaltens nach Inkubation über größere Zeiträume und die Messung der Thrombozytenaggregation mit einem anderen Verfahren, z.B. der Multiplate-Analyse, könnte hier weitere interessante Informationen liefern. Ein Vorteil dieser Methode wäre die Untersuchung der Thrombozytenfunktion im menschlichen Vollblut, ohne dass zuvor Zentrifugationsschritte zur Thrombozytenisolation und Herstellung von PRP bzw. „washed platelets“ notwendig wären.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass wir keine direkten Effekte von Poly(I:C) auf die Thrombozytenfunktion menschlicher Thrombozyten *in vitro* gesehen haben. Es ist daher davon auszugehen, dass Veränderungen der Thrombozytenzahl bzw. Thrombozytenfunktion im Organismus in erster Linie sekundär durch Veränderung der Endothelzellen und den allgemeinen Veränderungen infolge der Immunreaktion bedingt sind. Weiterhin können Veränderungen in der Thrombozytenfreisetzung durch Megakaryozyten aus dem Knochenmark *in vivo* bestehen, die sich in ihrer Eigenschaft veränderten Thrombozyten widerspiegeln könnten.

5.3 DIE BLUTBILDVERÄNDERUNGEN NACH STIMULATION MIT POLY(I:C) *IN VIVO* SIND WAHRSCHEINLICH RESULTAT EINES VERÄNDERTEN EXPRESSIONSPROFILS OBERFLÄCHLICHER PROTHROMBOTISCHER PROTEINE AUF DEN ENDOTHELZELLEN

Zur Untersuchung der prothrombotischen Effekte von Poly(I:C) *in vivo* wurden C57Bl/6-Mäuse 24 Stunden vor dem Beginn des Experiments mit 200 µg Poly(I:C) intraperitoneal stimuliert. Über einen Kunststoffkatheter, der in die Arteria carotis gelegt worden ist, wurden Blutproben in der Größenordnung von 50 µl entnommen und 1:10 mit Natriumcitratlösung verdünnt. Anschließend wurden mit dem Coulter-Counter Blutbilder bestimmt.

Interessanter Weise zeigten Mäuse, die zuvor mit Poly(I:C) behandelt worden sind, einen deutlichen Abfall der Leukozyten- und Thrombozytenzahlen. Ähnliche Befunde sind z.B. in Menschen mit einem „viral hemorrhagic fever syndrome“ beschrieben worden [4, 5]. Der Abfall an Leukozyten und Thrombozyten im peripheren Blut könnte durch eine allgemeine Veränderung des Endothels erklärt werden, durch das eine verstärkte Leukozytenadhäsion und Thrombozytenverbrauch in der Peripherie bedingt sein könnte. Außerdem könnte die Freisetzung von Typ I Interferon [73], das eine inhibitorische Wirkung auf Leukozyten besitzt, die Leukopenie erklären.

Festzuhalten ist somit, dass Poly(I:C) auch *in vivo* bereits auf Blutbildebene deutliche Effekte zeigt und damit eine systemische Wirkung nach intraperitonealer Gabe festzustellen ist.

5.4 DIE BLUTBILDVERÄNDERUNGEN ZEIGEN KEINE MERKLICHEN EFFEKTE AUF DIE PRIMÄRE HÄMOSTASE DER MIT POLY(I:C) BEHANDELTEN TIERE

Ob diese Blutbildveränderungen auch direkte Bedeutung auf die Blutstillung nach größerer Gefäßverletzung haben, wurde durch das sogenannte Tail-bleeding-Experiment untersucht. Durch Amputation der Schwanzspitze einer Maus und Messung der Blutungszeit, können grundlegende Beeinträchtigungen der Blutstillung erkannt werden. Interessanter Weise zeigten Mäuse, die mit Poly(I:C) behandelt wurden, trotz der Veränderungen des Blutbildes, der massiven Leukopenie und

deutlichen Thrombozytopenie, keine messbaren Unterschiede in Bezug auf die Zeit bis zur Blutstillung nach Amputation der Schwanzspitze. Diese Befunde entsprachen jedoch unseren Erwartungen, da der Abfall der Thrombozyten in der mit Poly(I:C) behandelten Gruppe von normalerweise etwa 1200×10^3 Thrombozyten / μl Vollblut auf etwa 600×10^3 Thrombozyten / μl Vollblut zwar deutlich ist, jedoch eine klinisch symptomatische Thrombozytopenie in der Regel wesentlich gravierender ausfällt. So sind im Menschen Thrombozytopenien erst unter $20 - 30 \times 10^3$ Thrombozyten / μl Vollblut klinisch relevant [165, 166]. Spontane intrakranielle Blutungen sind in der Regel erst bei Werten unter 10×10^3 / μl Vollblut zu erwarten [167, 168]. Thrombozytenwerte jenseits von 50×10^3 Thrombozyten / μl Vollblut sind sogar für operative Eingriffe unbedenklich. Die physiologischen Thrombozytenwerte von $150 - 400 \times 10^3$ / μl Vollblut besitzen daher bezüglich eines höheren Risikos für das Auftreten von spontanen Blutungen eine hohe Redundanz.

Die Tail-bleeding-Untersuchung in der Maus zur Bestimmung von Hämostasestörungen ist eine einfache und gleichzeitig gute Methode, um objektiv deutliche Störungen der Hämostase zu quantifizieren. Um jedoch Unterschiede messen zu können, muss die primäre Blutstillung recht stark eingeschränkt sein, sodass die Bestimmung geringer Veränderungen nicht möglich ist. Zum Nachweis geringerer Unterschiede der Hämostase müssten andere Methoden, wie z.B. Gerinnungsuntersuchungen oder funktionelle Thrombozytenuntersuchungen, z.B. eine Aggregometrie, durchgeführt werden. Diese Experimente gestalten sich jedoch, ob des geringen Blutvolumens von Mäusen recht schwierig. Da uns in erster Linie offensichtliche Effekte von Poly(I:C) und offensichtliche Veränderungen der Hämostase interessierten und diese im Tail-bleeding-Experiment nicht zu sehen waren, haben wir keinen Anlass für weitere Untersuchungen gesehen.

Die Veränderungen der Thrombozytenzahlen nach Behandlung mit Poly(I:C) in der Maus können daher als Resultat eines verstärkten Verbrauchs von Thrombozyten in der Peripherie des Gefäßsystems verstanden werden, die jedoch bezogen auf die Hämostase keine nachweisbaren Veränderungen mit sich bringen. Die einmalige Gabe von Poly(I:C) reicht nicht aus um phänotypische Veränderungen der Hämostase in der Maus auszulösen.

5.5 TIERE, DIE ZUVOR MIT POLY(I:C) BEHANDELT WORDEN SIND, ZEIGEN EINE BESCHLEUNIGTE THROMBUSBILDUNG IN DEN ARTERIOLEN DER MIKROZIRKULATION DES M. CREMASTER

Zentrale Frage der hier vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Poly(I:C) auf die Thrombusbildung in vivo. Die Ergebnisse unserer in vitro Experimente und die entsprechende Literatur legen den Verdacht nahe, dass Poly(I:C) als ds-RNA-Analogon die Eigenschaften des Endothels in prothrombotischer Weise verändern kann, zu einer endothelialen Dysfunktion beiträgt und dadurch auch die Thrombusbildung in vivo beeinflussen kann [77, 78, 80]. Aufgrund des systemischen Charakters der Poly(I:C)-Wirkung und der Veränderungen des Blutbildes entschieden wir uns die Untersuchungen in der Mikrozirkulation per Intravitalmikroskopie am lebenden Tier durchzuführen. Dazu verwendeten wir den Cremaster-Muskel der Maus und die Methode der „Light-dye-induced microvascular thrombosis“ (kurz: Light-dye-injury), die von Rumbaut et al. [161] beschrieben wurde. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass die Schädigung des Endothels durch photochemische Reaktionsprodukte ausgelöst wird, die während der Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mittels Fluoreszenzlichts entstehen. Die Endothelzellen werden somit vom Lumen ausgehend geschädigt und nicht wie bei anderen Methoden über die Gefäßwand von außen. Wichtig für die Durchführung des Versuches, waren eine gute Präparationsqualität des Cremaster-Muskels und eine möglichst gleichbleibende Intensität der Schädigung des Endothels bei vergleichbaren Gefäßen. Wir orientierten uns daher bei der Menge des Fluoreszenzfarbstoffes am

Gewicht der Maus und wählten klar definierte Gefäße zur Schädigung aus. Ebenfalls wurde die Intensität des Fluoreszenzlichts in allen Versuchen genau eingestellt. Dadurch erreichten wir Versuchsbedingungen, die eine Untersuchung unserer Fragestellung erlaubten.

Mäuse, die mit Poly(I:C) über 24 Stunden behandelt wurden, zeigten einen beschleunigten Beginn der Thrombusbildung und ebenfalls ein beschleunigtes Thrombuswachstum mit deutlich früherem Gefäßverschluss in den Arteriolen des Cremaster-Muskels als die Kontrolltiere *in vivo*. Poly(I:C) führte *in vivo* zu Veränderungen im Gefäßsystem, die anfälliger für eine Schädigung waren und sich in einer prothrombotischen Situation äußerten. Diese Effekte wurden in den Arteriolen, aber nicht in den Venolen beobachtet. Als Gründe hierfür sehen wir den wesentlich höheren Druck und Flussgeschwindigkeit in den Arteriolen und die dadurch größere Bedeutung der endothelialen Dysfunktion. Da in den Venolen bei gleicher Konzentration an FITC-Dextran und gleicher Intensität des Fluoreszenzlichtes die Zeit bis zum Verschluss der Gefäße deutlich kürzer war, waren eventuelle Unterschiede möglicherweise nicht zu sehen. Die Zeit bis zum kompletten Gefäßverschluss in den Arteriolen war um etwa das dreifache größer als in den Venolen und während sich in den Arteriolen sich bildende Thromben des Öfteren vom Endothel aufgrund der Strömung gelöst hatten, war dies in den Venolen so nicht zu sehen gewesen. Möglicherweise könnte man unter veränderten Untersuchungsbedingungen und geringerer Intensität der Endothelschädigung auch Unterschiede in den Venolen erkennen.

Somit konnte zum ersten Mal eine prothrombotische Wirkung von ds-RNA in der Mikrozirkulation der Maus *in vivo* nachgewiesen werden. Diese Befunde scheinen unter Berücksichtigung der *in vitro* Ergebnisse in erster Linie durch Veränderungen des Endothels und weniger durch veränderte Eigenschaften der Thrombozyten bedingt zu sein.

5.6 TLR-3-KO MÄUSE ZEIGEN DIESE EFFEKTE NICHT, ABER ÄHNLICHE BLUTBILDVERÄNDERUNGEN

Preissner et. al. [80] beschrieben eine besondere Rolle des TLR-3 in der Erkennung von ds-RNA durch Endothelzellen. Demnach sei die prothrombotische Wirkung von Poly(I:C) auf Endothelzellen hauptsächlich über den TLR-3 vermittelt und die Erkennung über weitere Rezeptoren, wie z.B. MDA-5, RIG-I und LGP-2, von geringerer Bedeutung.

Um den Einfluss von TLR-3 auf die Thrombusbildung zu untersuchen, verwendeten wir TLR-3-KO Mäuse und untersuchten die Effekte von Poly(I:C) auf die Blutbildveränderungen und die Thrombusbildung *in vivo*. Poly(I:C) löste auch in den TLR-3-KO Mäusen eine signifikante Leukopenie und Thrombozytopenie aus. Dies zeigte, dass neben dem TLR-3 weitere Rezeptoren für die Veränderungen des Blutbildes beteiligt sein müssen und ein Einfluss von anderen Zellen, die ds-RNA hauptsächlich durch andere Rezeptortypen erkennen, auf das Blutbild bestehen.

Poly(I:C) konnte dagegen im Modell der „Ligh-dye-injury“ den Beginn der Thrombusbildung und die Zeit bis zum Verschluss des Gefäßes nicht signifikant beeinflussen. Folglich scheint die Anwesenheit der TLR-3 auf Endothelzellen auch *in vivo* ein entscheidender Faktor für die Entwicklung eines prothrombotischen Zustandes des Endothels zu sein.

5.7 AKTIVIERTES PROTEIN C KANN IN ENDOTHELZELLEN IN VITRO DIE DURCH POLY(I:C) INDUZIERTER TRANSKRIPTION PROTHROMBOTISCHER FAKTOREN, WIE TISSUE FACTOR UND PAI-1, HEMMEN

Ds-RNA wird als „pathogen associated molecular pattern“ (PAMP) durch verschiedene „pathogen recognition receptors“ (PRR) des angeborenen Immunsystems und anderer Zellen des Körpers erkannt, fördert die Transkription von proinflammatorischen Genprodukten und in Endothelzellen die Expression prothrombotischer Faktoren [33, 77, 79]. Im Sinne des Konzepts der „Immunothrombose“ sind das Immunsystem und das System der Hämostase miteinander verbunden, sodass eine Aktivierung des Immunsystems auch immer mit einer Aktivierung der Hämostase einhergeht und die Hämostase in diesen Zusammenhängen selbst als der Bestandteil der Infektabwehr zu werten ist [25]. Unter bestimmten Umständen führt jedoch eine übermäßige Aktivierung des Immunsystems und damit der Hämostase zu einer ausgeprägten intravasalen Gerinnungsreaktion mit Verbrauch von Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren und nachfolgender Verbrauchskoagulopathie mit unstillbaren Blutungen. Beispiele für solche Situationen sind die bakterielle Sepsis und das „viral hemorrhagic fever syndrome“ [4, 5]. Die Freisetzung und Detektion von ds-RNA, die z.B. während der viralen Replikation entsteht, kann ein wichtiger Bestandteil in diesen Prozessen darstellen [33]. Wir konnten zeigen, dass Poly(I:C) als ds-RNA-Analogon in vivo zu einer verstärkten Thrombusbildung führt und dass u.a. die Erkennung von ds-RNA über den TLR-3 durch das Endothel eine entscheidende Rolle spielt. Außerdem zeigte Poly(I:C) in vitro eine gesteigerte Transkription von prothrombotischen Faktoren in Endothelzellen. Zur Behandlung dieses prothrombotischen Zustandes, der z.B. im akuten Verlauf einer Infektion mit hämorrhagischen Viren auftreten könnte, untersuchten wir den Einsatz von Protein C. Aktiviertes Protein C ist ein wichtiger Bestandteil des Blutes, der zum einen antikoagulatorische Wirkungen durch Spaltung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa besitzt und zum anderen auch antiinflammatorische und antiapoptotische Eigenschaften besitzt [100, 104, 106, 143, 146]. Aktiviertes Protein C wurde bereits langjährig bei der Behandlung der bakteriellen Sepsis eingesetzt, jedoch aufgrund neuerer Studien nicht mehr als Therapeutikum der Wahl von den Arzneimittelbehörden vorgeschlagen, weshalb der einzige Hersteller das Präparat vom Markt genommen hat [95, 96]. Anstelle von aktiviertem Protein C, das zu einer höheren Inzidenz von Blutungskomplikationen geführt hatte, wäre der Einsatz des Zymogens Protein C zu überlegen, da dieses erst durch an Thrombomodulin gebundenes Thrombin aktiviert werden würde. Übermäßig hohe Konzentrationen von aktiviertem Protein C könnte so eventuell vorgebeugt werden.

In vitro konnte aktiviertes Protein C die durch Poly(I:C) bedingte verstärkte Transkription von prothrombotischen Faktoren signifikant hemmen. Diese Effekte zeigten sich in einer Endothelzelllinie (HUVECs) als auch in intrinsischen Nierenzellen (HMCs). Aktiviertes Protein C ist, wie in der Literatur beschrieben, in der Lage die Freisetzung von NF- κ b und anderen proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren zu hemmen. In der Zellkultur verwendeten wir anstelle von Protein C aktiviertes Protein C, da Protein C die Anwesenheit von Thrombin und Thrombomodulin benötigt um in aktiviertes Protein C umgewandelt zu werden. Da wir nicht den Prozess der Umwandlung von Protein C zu aktiviertem Protein C untersuchen wollten und die Konzentrationen von Thrombin und Thrombomodulin unter Zellkulturbedingungen nicht den physiologischen Bedingungen entsprachen, verwendeten wir in vitro aktiviertes Protein C um gleiche Konzentrationen an aPC in vitro zu erreichen.

5.8 DIE KURZFRISTIGE GABE VON PROTEIN C HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE DURCH POLY(I:C) HERVORGERUFENEN VERÄNDERUNGEN DES BLUTBILDS

Die Gabe von Protein C in einer Dosis von 100 U/kg Maus 30 Minuten vor dem Start des Light-dye-injury-Experiments hatte keinen Effekt auf die Veränderungen des Blutbildes, die durch eine intraperitoneale Gabe von 200 μ g Poly(I:C) 24 Stunden vor dem Versuchsbeginn ausgelöst wurden. Protein C scheint somit keinen kurzfristigen Effekt auf die Leukozyten- und Thrombozytenzahlen zu

besitzen und kann die möglicherweise in der Peripherie befindlichen Leukozyten von den Gefäßwänden nicht lösen.

Dass eine kurzfristige Gabe zur Therapie der durch Poly(I:C) bedingten Blutbildveränderungen nicht ausreicht, entspricht den Erwartungen, da die proinflammatorischen und prothrombotischen Wirkungen von Poly(I:C) durch Veränderung der endothelialen Eigenschaften bedingt werden und diese Effekte nicht innerhalb von einer halben Stunde rückgängig gemacht werden können.

5.9 DIE KURZFRISTIGE GABE VON PROTEIN C KANN DIE DURCH POLY(I:C) BEDINGTEN VERÄNDERUNGEN DER THROMBUSBILDUNG IN DER MIKROZIRKULATION DES M. CREMASTERS RÜCKGÄNGIG MACHEN

Poly(I:C) wurde 24 Stunden vor dem Start des Light-dye-Injury-Versuches i.p. appliziert und führte in der Mikrozirkulation des Cremaster Muskels der Maus zu einer beschleunigten Thrombusbildung *in vivo*. Sowohl der Beginn der Thrombusbildung (Onset) als auch die Zeit bis zum vollständigen Gefäßverschluss (Verschlusszeit) waren nach Behandlung mit Poly(I:C) signifikant früher eingetreten. Ursächlich scheint eine Veränderung des Endothels, das *in vitro* nach Poly(I:C)-Gabe eine verstärkte Transkription und Expression prothrombotischer Faktoren zeigt, die Thrombusbildung *in vivo* zu fördern. Aktiviertes Protein C konnte in der Zellkultur in menschlichen Endothelzellen (HUVECs) und menschlichen Mesangialzellen (HMCs) die Transkription prothrombotischer Faktoren nach Behandlung mit Poly(I:C) hemmen. Protein C, das Zymogen des aktivierten Protein C, könnte somit *in vivo* als ein mögliches Therapeutikum zur Behandlung von Veränderungen der Hämostase, die durch ds-RNA ausgelöst worden sind, eingesetzt werden. Zur Aktivierung von Protein C zu aktiviertem Protein C wird Thrombomodulin, das auf Endothelzellen exprimiert wird und Thrombin, das an Thrombomodulin binden kann, benötigt [100, 104, 127, 131]. Thrombin, das an Thrombomodulin gebunden ist und dadurch eine Konformationsänderung erfährt, kann durch limitierte proteolytische Spaltung das Zymogen Protein C zu aktiviertem Protein C umwandeln [100, 104]. Durch diesen Prozess wird die Bildung von aktiviertem Protein C enzymatisch reguliert und ist anders als bei der direkten Gabe von aktiviertem Protein C nicht in sehr hohen Spitzenkonzentrationen generalisiert im Gefäßsystem vorhanden. Wurde Protein C 30 Minuten vor Durchführung des Light-dye-injury-Experiments i.a. in einer Dosis von 100 U/kg Körpergewicht verabreicht, konnte bezüglich des Beginns der Thrombusbildung (Onset) zwischen den Kontrolltieren und den Tieren, die mit Poly(I:C) behandelt worden sind, kein signifikanter Unterschied mehr gesehen werden. Protein C verlängerte dabei die Zeit bis zum Beginn der Thrombusbildung in den mit Poly(I:C)-behandelten Mäusen deutlich. Aufgrund einer großen Standardabweichung ist die Verlängerung der Verschlusszeit auf dem 5%-Signifikanzniveau statistisch nicht signifikant gewesen, jedoch zeigte sich auch hier eine teilweise sehr deutliche Verlängerung der Zeit bis zum vollständigen Gefäßverschluss. Gründe für die großen Unterschiede in den Verschlusszeiten der mit Poly(I:C) und Protein C behandelten Mäuse könnten unterschiedliche Level an aktiviertem Protein C gewesen sein. Da wir keine Plasmaspiegel von aktiviertem Protein C bestimmt haben, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Umwandlung von Protein C zu aktiviertem Protein C in den einzelnen Mäusen in unterschiedlichem Ausmaß abgelaufen ist. Ob die antithrombotischen Effekte von Protein C primär durch die antikoagulatorischen oder antiinflammatorischen Eigenschaften ausgelöst wurden, kann ebenfalls nicht sicher gesagt werden. Aufgrund der kurzen Zeit zwischen Protein C-Gabe und Versuchsdurchführung ist ein größerer Einfluss der antikoagulativen Wirkung von aktiviertem Protein C zu erwarten. Die Dauer bis zum Beginn der antiinflammatorischen Effekte von aktiviertem Protein C, die von den intrazellulären Effekten auf die mRNA-Transkription und Proteinexpression abhängen, wird vermutlich größer sein und nicht innerhalb von 30 Minuten in Erscheinung treten. Die antikoagulative Wirkung von aktiviertem Protein C scheint jedoch in der durch ds-RNA ausgelösten

prothrombotischen Situation interessant zu sein, da Protein C somit auch kurzfristig gegen die gesteigerte Thrombophilie nach Behandlung mit ds-RNA eingesetzt werden kann. Protein C könnte daher einerseits als Akutmedikament bei viralen Infektionen mit erhöhter Thrombusbildung eingesetzt werden als auch andererseits über einen längeren Zeitraum begleitend zur Infektion. Der Einsatz von Protein C über einen längeren Zeitraum sollte, wenn man die hemmende Wirkung auf die Expression prothrombotischer Faktoren auf Endothelzellen und Mesangialzellen *in vitro* betrachtet, zusätzlich zu der antikoagulativen Wirkung auch antiinflammatorische Effekte zeigen. Es wäre daher sehr interessant den Einfluss von Protein C auf die Thrombusbildung *in vivo* über einen längeren Zeitraum mit mehrmaligen Protein C-Gaben zu beobachten.

5.10 PATHOPHYSIOLOGIE UND KLINISCHE BEDEUTUNG

Im Unterschied zu aktiviertem Protein C, das bereits über mehr als zehn Jahre in der Klinik zur Therapie der bakteriellen Sepsis eingesetzt worden ist und aufgrund von erhöhten Blutungskomplikationen in der Therapie der bakteriellen Sepsis nicht überlegen aber auch nicht unterlegen zur rein symptomatischen Volumentherapie war [95, 96, 169], könnte bei Gabe von Protein C aufgrund der fehlenden antikoagulativen Wirkung des Zymogens eine übermäßige Blutungsneigung fehlen [146]. Interessanter Weise entfaltet jedoch bereits Protein C eine antiinflammatorische Wirkung. Voraussetzung für das antiinflammatorische Signaling des Protein C-Signalwegs ist die Bindung von Protein C bzw. aktiviertem Protein C an den „endothelial protein C receptor“ (EPCR), der dadurch eine Konformationsänderung des „protease-activated receptor 1“ (PAR-1) auslöst [107, 131, 152]. Durch diese Konformationsänderung des PAR-1 verändern sich die normalerweise proinflammatorischen Effekte zu antiinflammatorischen Effekten bei Aktivierung des Rezeptors durch limitierte Proteolyse [152]. Zu den Enzymen, die den PAR-1 aktivieren können, gehören Thrombin und u.a. aktiviertes Protein C [136, 137, 149, 151]. Die antiinflammatorische Wirkung von aktiviertem Protein C wird durch Bindung von Protein C an den EPCR, Aktivierung von Protein C durch Thrombin, das an Thrombomodulin gebunden ist und die Aktivierung des PAR-1 durch aPC ausgelöst [131, 136]. Es ist jedoch nicht entscheidend, dass aPC den PAR-1 aktiviert, da allein die Konformationsänderung von PAR-1, die durch Bindung von Protein C an den EPCR ausgelöst wird, entscheidend für das antiinflammatorische Signaling des PAR-1 ist [131, 137, 151, 152]. D.h., dass Protein C durch Bindung an den EPCR trotz nachfolgender Aktivierung des PAR-1 durch Thrombin antiinflammatorisch wirken würde. Diese Erkenntnisse haben daher bereits zur Entwicklung von Protein C-Mutanten geführt, die eine antiinflammatorische Wirkung durch Bindung an den EPCR zeigen, jedoch durch eine Mutation kein aktives antikoagulatorisches Zentrum mehr besitzen [106, 170]. Dadurch konnten gewünschte antiinflammatorische Wirkungen ohne unerwünschte übermäßige antikoagulatorische Wirkungen erzielt werden. Der Vorteil von Protein C im Gegensatz zu solchen Mutanten wäre eine vorhandene antikoagulatorische Wirkung, die nach Aktivierung von Protein C zu aktiviertem Protein C entstehen würde und einen Einsatz in der akuten Situation einer übermäßigen Gerinnung interessant machen würde. Durch den Einsatz mehr oder weniger stark wirkender antikoagulatorischer aPC-Varianten könnte in Abhängigkeit der Gerinnungssituation gezielt ein mehr oder weniger starker Einfluss auf die Gerinnung bei gleichbleibender antiinflammatorischer Wirkung ausgeübt werden.

Die Bedeutung viraler Infektionen auf das System der Blutstillung und die damit verbundenen Gefahren werden aktuell durch die Ebola-Epidemie in Westafrika uns deutlich vor Augen geführt. Da im Kampf gegen virale Infektionen außer dem Prinzip der Impfung aktuell noch wenige therapeutische Optionen zur Verfügung stehen, bleibt die supportive Therapie mit Symptomkontrolle nach wie vor die entscheidende Therapiemöglichkeit. Ds-RNA als ein wichtiges PAMP viraler Infektionen zeigt *in vivo* eine prothrombotische Wirkung und könnte ein Mosaikstein in der Erklärung der Pathogenese

der Hämostasestörungen bei viralen Infektionen sein. Sicherlich spielen hier aber noch eine Vielzahl weiterer Faktoren eine Rolle, die unter dem Stichwort „Immunothrombose“ zusammengefasst werden können. Auch direkte Effekte von Viren auf die Integrität des Gefäßsystems mit Zellbefall und Zelluntergang müssen berücksichtigt werden. Das Protein C bietet interessante Eigenschaften für den Einsatz als Therapeutikum bei durch Infektionen ausgelösten Verbrauchskoagulopathien, da es mit seiner antikoagulativen Eigenschaften direkt die Thrombusbildung unterdrücken hilft und darüber hinaus über seine antiinflammatorischen Effekte gegen die Entwicklung eines prothrombotischen Zustands eingesetzt werden kann. Protein C könnte sowohl in der Akutsituation einer viralen Infektion mit gesteigerter Gerinnungsaktivität als auch über einen längeren Zeitraum bei chronisch viralen Infektionen eine interessante therapeutische Option sein. Auch der Einsatz von Protein C-Mutanten könnte durch selektive Ausschaltung der antikoagulatorischen bzw. antiinflammatorischen Eigenschaften wichtige therapeutische Möglichkeiten bieten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Aufrechterhaltung der Homöostase und Integrität eines multizellulären Organismus ist die Erkennung und Abwehr eindringender oder im Organismus entstehender schädlicher Zellen, Organismen und infektiöser Partikel durch das Immunsystem essentiell. Das Immunsystem ist dabei nicht nur in der Lage über spezialisierte Zellen die Erkennung und Abwehr potentieller Pathogene durchzuführen, sondern auch durch veränderte Eigenschaften anderer Zelltypen eine Infektion nachzuweisen. Endothelzellen, die die innerste Schicht der Gefäße bilden, können indirekt durch Zytokine aus der Umgebung aber auch direkt durch die Erkennung von Pathogenen das Expressionsprofil von oberflächlichen Molekülen ändern und damit Immunzellen den Ort einer Entzündung anzeigen und diesen den Durchtritt durch die Gefäßwände ermöglichen. Neben der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen führt eine Aktivierung von Endothelzellen aber auch zu einer verstärkten Expression prothrombotischer Faktoren. Die Auslösung der Hämostase am Ort der Infektion ist ein weiterer wichtiger Mechanismus der Pathogenabwehr, der die Ausbreitung des eindringenden Krankheitserregers unterbinden soll und die Erregerabwehr unterstützt. Die Hämostase ist daher ein wichtiger Bestandteil einer Immunreaktion und phylogenetisch mit dem Immunsystem verwandt, weshalb in diesem Zusammenhang der Begriff der „Immunothrombose“ von Massberg et al. eingeführt wurde [25]. So wird auch den Thrombozyten seit kurzem eine immer bedeutendere Rolle im Prozess der Immunabwehr eingeräumt. Dass diese Zusammenhänge jedoch unter bestimmten Situationen gefährliche Konsequenzen haben können, zeigt sich in den beeindruckenden Krankheitsbildern der bakteriellen Sepsis und des „viral hemorrhagic fever syndrome“ (VHF). Die übermäßige Aktivierung der Hämostase führt in beiden Fällen zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung und damit zum Verbrauch von Gerinnungsfaktoren mit anschließenden unkontrollierbaren Blutungen, Schock, Multiorganversagen und schließlich zum Tod. Die Konsequenzen gerade von viralen Epidemien sogenannter hämorrhagischer Viren wie dem Ebola-Virus, das im Jahr 2014 in Westafrika ausgebrochen ist und bis zum jetzigen Zeitpunkt bei einer Letalitätsrate von über 50 % zu mehreren tausend Toten geführt hat, sind beträchtlich. Bei der Erkennung von viralen Infektionen durch das Immunsystem spielt insbesondere in den ersten Tagen der Infektion die Erkennung von „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) eine wichtige Rolle. Ds-RNA stellt ein solches PAMP dar, das z.B. bei der Replikation von RNA-Viren in der Zelle anfällt. Wir untersuchten daher den Einfluss eines ds-RNA-Analogons (Poly(I:C)) auf die Hämostase *in vivo* und auf die Expression von prothrombotischen Faktoren in Endothelzellen *in vitro* sowie direkte Effekte auf die Thrombozytenfunktion *in vitro*.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ds-RNA (Poly(I:C)) die Thrombusbildung in den Arteriolen der Mikrozirkulation des Musculus cremaster der Maus fördert und damit eine prothrombotische Wirkung *in vivo* besitzt. Eine wichtige Rolle scheint die Erkennung von ds-RNA durch den Toll-like-Rezeptor 3 zu spielen, da die prothrombotische Wirkung von Poly(I:C) in TLR-3-KO Mäusen nicht zu sehen war. Ds-RNA führt des Weiteren zu einer ausgeprägten Leukopenie und Thrombozytopenie, die auch in TLR-3 KO Mäusen zu sehen ist und durch andere Mechanismen der ds-RNA-Erkennung ausgelöst werden muss. Ds-RNA war unter den genannten Versuchsbedingungen trotz der beschriebenen Blutbildveränderungen nicht in der Lage die Blutungszeit nach Schwanzamputation der Maus signifikant zu verändern. Das Ausmaß der Thrombozytopenie, das bezogen auf hämostatisch relevante Thrombozytenwerte jedoch deutlich zu gering ausgeprägt war, hat eine merkliche Veränderung der Hämostase aber auch unwahrscheinlich gemacht. *In vitro* konnte ähnlich wie bereits zuvor von Preissner et al. [80] sowohl auf menschlichen Endothelzellen (HUVECs und HMECs) als auch auf menschlichen Mesangialzellen (HMCs) eine verstärkte mRNA-Transkription von prothrombotischen Faktoren gesehen werden. Zelllysatmaterial von Zellen, die

ebenfalls mit ds-RNA behandelt wurden, zeigte in der Thrombelastometrie eine gesteigerte Gerinnselbildung, was auf eine stärkere Expression prothrombotischer Gerinnungsfaktoren schließen lässt. Dagegen konnten keine direkten Effekte von ds-RNA auf die Aktivität und das Aggregationsverhalten von menschlichen Thrombozyten *in vitro* gesehen werden. In der Lichttransmissionsaggregometrie (Methode nach Born) konnte sowohl unter Aktivierung der Aggregation mit ADP, TRAP und Kollagen als auch unter basalen Bedingungen kein Einfluss von ds-RNA auf das Aggregationsverhalten der Thrombozyten nachgewiesen werden. Auch in der FACS-Analyse der Oberflächenfaktoren P-Selektin und GP IIb/IIIa deren Expressionslevel mit dem Aktivitätslevel der Thrombozyten korreliert, konnte sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Aktivierung mit Thrombin keine Unterschiede im Aktivitätsniveau der Thrombozyten festgestellt werden. Ein indirekter Einfluss des Endothels auf die Thrombozyten scheint wahrscheinlicher für die Veränderungen des Blutbildes zu sein, während an Hand unserer Ergebnisse kein Anhalt für direkte Effekte von ds-RNA auf die Thrombozyten besteht. Somit lässt sich zusammenfassen, dass die prothrombotische Wirkung von ds-RNA *in vivo* wohl in erster Linie durch prothrombotische Veränderungen des Endothels bedingt ist.

Zur Therapie der prothrombotischen Effekte von ds-RNA *in vivo* wurde der Einfluss von Protein C auf die Thrombusbildung *in vivo* untersucht. Protein C konnte nach kurzfristiger Gabe effizient den Beginn der Thrombusbildung (Onset) verzögern und zeigte ebenfalls eine Verzögerung der Zeit bis zum kompletten Verschluss des Gefäßes, der jedoch aufgrund einer großen Standardabweichung nicht signifikant war. *In vitro* hemmte aktiviertes Protein C die durch ds-RNA induzierte mRNA-Transkription prothrombotischer Faktoren auf menschlichen Endothelzellen (HUVECs) und menschlichen Mesangialzellen (HMCs). Demnach könnte Protein C nicht nur über seine direkte antikoagulativen Wirkungen in der Behandlung prothrombotischer Zustände ausgelöst durch virale Infektionen sondern auch indirekt über seine antiinflammatorischen Effekte durch Unterdrückung der Expression prothrombotischer Faktoren auf Endothelzellen von Bedeutung sein. Die Verwendung von Protein C anstelle von aktiviertem Protein C, das in der Behandlung der bakteriellen Sepsis lange eingesetzt wurde, jedoch mit einem höheren Blutungsrisiko verbunden ist, könnte die Gefahr unkontrollierter und ungewollter Blutungen reduzieren. Ebenso könnte der Einsatz von Protein C-Mutanten, die selektiv antiinflammatorische Eigenschaften bei fehlenden antikoagulativen Eigenschaften besitzen, interessant sein.

Durch gezieltes Eingreifen in den Prozess der Immunothrombose, das selektiv die Hämostase beeinflussen kann, ohne die gewünschten Effekte des Immunsystems zu beeinträchtigen, könnten in Zukunft Komplikationen wie disseminierte intravasale Gerinnung, Verbrauchskoagulopathie, unstillbare Blutungen mit Multiorganversagen und schließlich der Tod verhindert werden.

Solange virale Infektionen nicht ursächlich therapiert werden können und die supportive Behandlung der Symptome als einzige Therapieoption besteht, könnten Verfahren, die gezielt die Hämostase hemmen und antiinflammatorisch wirken, sinnvoll sein. Sowohl in Bezug auf die Mechanismen der Erkennung viraler Infektionen als auch in Bezug auf die Wirkung von Protein C und entsprechender Protein C-Mutanten ist noch weitere Forschung notwendig. Besonders die Erforschung der Wirkung von Protein C über einen längeren Zeitraum im Prozess der chronisch viralen Infektion scheint hier interessant zu sein. Ein genaueres Verständnis der molekularen Zusammenhänge zwischen dem Immunsystem und der Hämostase könnte darüber hinaus weitere wichtige Informationen liefern.

7. APPENDIX

7.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1.	THROMBOZYTENAKTIVIERUNG	4
ABBILDUNG 2.	GERINNUNGSKASKADE MODIFIZIERT NACH FURIE ET AL (N ENGL J MED 2008;359:938-49.).....	7
ABBILDUNG 3.	ÜBERSICHT DER DS-RNA ERKENNUNG	9
ABBILDUNG 4.	ERKENNUNG DS-RNA DURCH TLR 3, RIG I UND MDA 5	10
ABBILDUNG 5.	PROTEIN C – WIRKUNGSMECHANISMEN.....	15
ABBILDUNG 6.	VERSUCHSAUFBAU INTRAVITALMIKROSKOPIE UND CREMASTER-MODELL	28
ABBILDUNG 7.	BLUTBILDVERÄNDERUNGEN NACH STIMULATION MIT POLY(I:C) IN C57BL/6WT-MÄUSEN	30
ABBILDUNG 8.	BLUTBILDVERÄNDERUNGEN NACH STIMULATION MIT POLY(I:C) IN TLR-3-KO-MÄUSEN ..	31
ABBILDUNG 9.	THROMBUSBILDUNG IN DEN ARTERIOLEN DES M. CREMASTER NACH PHOTOCHEMISCHER SCHÄDIGUNG MIT FITC-DEXTRAN UND STIMULATION MIT POLY(I:C) IN C57BL/6WT-MÄUSEN	32
ABBILDUNG 10.	THROMBUSBILDUNG IN VENOLEN IM M. CREMASTER NACH PHOTOCHEMISCHER SCHÄDIGUNG MIT FITC-DEXTRAN UND STIMULATION MIT POLY(I:C).....	32
ABBILDUNG 11.	THROMBUSBILDUNG IN DEN ARTERIOLEN DES M. CREMASTER NACH PHOTOCHEMISCHER SCHÄDIGUNG MIT FITC-DEXTRAN UND STIMULATION MIT POLY I:C IN TLR-3-KO-MÄUSEN	34
ABBILDUNG 12.	mRNA-TRANSKRIPTION UND PROTEINEXPRESSION VON TISSUE FACTOR UND PLASMINOGEN AKTIVATOR INHIBITOR NACH INKUBATION MIT POLY(I:C) IN ENDOTHELZELLEN IN VITRO ..	35
ABBILDUNG 13.	AGGREGOMETRIE UND FACS-ANALYSE VON MENSCHLICHEN THROMBOZYTEN IN VITRO ...	38
ABBILDUNG 14.	EINFLUSS VON AKTIVIERTEM PROTEIN C AUF DIE TRANSKRIPTION PROTHROMBOTISCHER FAKTOREN AUF MENSCHLICHEN ENDOTHELZELLEN (HUVECS) UND MESANGIALZELLEN IN VITRO.....	40
ABBILDUNG 15.	EFFEKTE VON PROTEIN C AUF DIE VERÄNDERUNG DES BLUTBILDES DURCH POLY(I:C)	41
ABBILDUNG 16.	THROMBUSBILDUNG IN DEN ARTERIOLEN NACH STIMULATION MIT POLY(I:C) UND BEHANDLUNG MIT PROTEIN C	42

7.2 TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1. IONENKONZENTRATION KREBS-HENSELEIT-SUPERFUSIONSLÖSUNG	18
TABELLE 2. FLUORESCENZFARBSTOFFE	18
TABELLE 3. ANÄSTHETIKA	18
TABELLE 4. WIRKSTOFFE UND STIMULANTIEN.....	18
TABELLE 5. SUBSTANZEN FÜR DIE ZELLKULTUR.....	19
TABELLE 6. MEDIUM ENDOTHELZELLEN	19
TABELLE 7. HUVEC MEDIUM (20%).....	19
TABELLE 8. HUVEC WACHSTUMSMEDIUM	19
TABELLE 9. HMEC MEDIUM (10%)	20
TABELLE 10. HUNGERMEDIUM (1%)	20
TABELLE 11. PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS)	20
TABELLE 12. COLLAGENASE A LÖSUNG	20
TABELLE 13. RNA-LYSATE (GEWEBE UND ZELLKULTUR)	20
TABELLE 14. MATERIAL FÜR DIE INTRAVITALMIKROSKOPIE	24
TABELLE 15. SONSTIGE INSTRUMENTE	25
TABELLE 16. ÜBERSICHT ÜBER DIE BLUTBILDVERÄNDERUNGEN DER WILDTYP- UND TLR-3-KO-MÄUSE NACH BEHANDLUNG MIT 200µG POLY(I:C) I.P. ÜBER 24 STUNDEN.	33

7.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
ADP	adenosine diphosphate
aPC	aktiviertes Protein C
ATP	adenosine triphosphate
ct	Kontrolle
DAMP	danger associated molecular pattern
DIC	disseminated intravascular coagulation
ds-RNA	double stranded ribonucleic acid
EGF	epidermal growth factor
EPCR	endothelial protein C receptor
ex vivo	Verwendung von Zellen aus einem Tier / Mensch und Behandlung und Untersuchung außerhalb des Organismus
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	fluorescein isothiocyanate
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GPIIbIIIa	Glykoprotein IIbIIIa
HMC	human mesangial cell
HMEC	human microvascular endothelial cell
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
i.a.	intraarteriell
i.p.	intraperitoneal
i.v.	Intravenös
in vitro	Züchtung und Behandlung von Zellen in der Zellkultur
in vivo	Im lebenden Tier
IRF-3	interferon regulatory factor 3
KO	knock out
LGP-2	Laboratory of Genetics and Physiology 2
Light-dye-injury	Photochemische Schädigung des Endothels durch Fluoreszenzlicht und -farbstoff
MDA-5	melanoma differentiation antigen 5
MHC	major histocompatibility complex
MYD88	myeloid differentiation primary-response protein 88
NF-κB	nuclear factor κ B
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3, auch NALP 3
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PAR-1	protease activated receptor 1
PBS	phosphate buffert saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PDI	protease disulfide isomerase
Poly(I:C)	polyinosinic:polycytidylic acid
PPP	platelet poor plasma
PRP	platelet rich plasma
PRR	pathogen recognition receptor
RIG I	retinoic acid-inducible gene 1
ssRNA	single stranded RNA (einzelsträngige RNA)
TLR-3	toll like receptor 3

TM	thrombomodulin
TRAP-6	thrombin receptor activator peptide 6
TRIF	TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β
vWF	von Willebrand Faktor

7.4 QUELLENVERZEICHNIS

1. Goeijenbier, M., et al., *Review: Viral infections and mechanisms of thrombosis and bleeding*. J Med Virol, 2012. **84**(10): p. 1680-96.
2. Antoniak, S. and N. Mackman, *Multiple roles of the coagulation protease cascade during virus infection*. Blood, Vol. 123. 2014:p. 2605-2613.
3. Schnittler, H.J., Feldmann H., *Viral hemorrhagic fever – a vascular disease?* Thromb Haemost, 2003. **89**(6): p. 967-72.
4. Paessler, S. and D.H. Walker, *Pathogenesis of the viral hemorrhagic fevers*. Annu Rev Pathol, 2013. **8**: p. 411-40.
5. Feldmann, H. and T.W. Geisbert, *Ebola haemorrhagic fever*. The Lancet, 2011. **377**(9768): p. 849-862.
6. Peters, C.J., Zaki, S.R., *Role of the endothelium in viral hemorrhagic fevers*. Crit Care Med., 2002. **30**: p. 268-73.
7. Geisbert, T.W. and P.B. Jahrling, *Exotic emerging viral diseases: progress and challenges*. Nat Med, 2004.
8. Kanopathipillai, R., *Ebola Virus Disease — Current Knowledge*. New England Journal of Medicine, 2014. **371**(13): p. e18.
9. *Ebola situation report - 27 May 2015*. World Health Organization, 2015.
10. Huerta-Zepeda, A., et al., *Crosstalk between coagulation and inflammation during Dengue virus infection*. Thrombosis and Haemostasis, 2008. **99**(5): p. 936-943.
11. Bray, M. and T.W. Geisbert, *Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(8): p. 1560-6.
12. Wauquier, N., et al., *Human fatal zaire ebola virus infection is associated with an aberrant innate immunity and with massive lymphocyte apoptosis*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(10): p e837.
13. Key, N.S., et al., *Infection of vascular endothelial cells with herpes simplex virus enhances tissue factor activity and reduces thrombomodulin expression*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. **87**(18): p. 7095-7099.
14. Funderburg, N.T., et al., *Increased tissue factor expression on circulating monocytes in chronic HIV infection: relationship to in vivo coagulation and immune activation*. Blood, Vol. 115. 2010:p 161-167.
15. Dammacco, F. and D. Sansonno, *Therapy for hepatitis C virus-related cryoglobulinemic vasculitis*. N Engl J Med, 2013. **369**(11): p. 1035-45.
16. Sansonno, D. and F. Dammacco, *Hepatitis C virus, cryoglobulinaemia, and vasculitis: immune complex relations*. The Lancet Infectious Diseases, 2005. **5**(4): p. 227-236.
17. Ramos-Casals, M., et al., *The cryoglobulinaemias*. The Lancet, 2012. **379**(9813): p. 348-360.
18. Levi, M., M. Schultz, and T. van der Poll, *Sepsis and Thrombosis*. Semin Thromb Hemost, 2013. **39**(05): p. 559-566.
19. Levi, M., T. van der Poll, and H.R. Büller, *Bidirectional Relation Between Inflammation and Coagulation*. Circulation, 2004. **109**(22): p. 2698-2704.
20. King, E.G., et al., *Pathophysiologic mechanisms in septic shock*. Lab Invest, 2014. **94**(1): p. 4-12.
21. Lupu, C., et al., *Tissue Factor-Dependent Coagulation Is Preferentially Up-Regulated within Arterial Branching Areas in a Baboon Model of Escherichia coli Sepsis*. The American Journal of Pathology, 2005. **167**(4): p. 1161-1172.
22. Esmon, C.T., J. Xu, and F. Lupu, *Innate immunity and coagulation*. J Thromb Haemost, 2011. **9 Suppl 1**: p. 182-8.
23. Loof, T.G., et al., *Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense*. Blood, 2011. **118**(9): p. 2589-98.
24. Delvaeye, M. and E.M. Conway, *Coagulation and innate immune responses: can we view them separately?* Blood, 2009. **114**(12): p. 2367-74.
25. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 34-45.
26. Goldszmid, R.S. and G. Trinchieri, *The price of immunity*. Nat Immunol, 2012. **13**(10): p. 932-8.

27. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
28. Gay, N.J., et al., *Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(8): p. 546-558.
29. Janeway, C.A., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 1989. **54**: p. 1–13.
30. Desmet, C.J. and K.J. Ishii, *Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(7): p. 479-91.
31. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
32. Rifkin, L.E., Busconi L., Viglianti G., Marshak-Rothstein A., *Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease*. Immunol Rev., 2005. **204**: p. 27-42.
33. Broz, P. and D.M. Monack, *Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(8): p. 551-65.
34. Furie, B., Furie, B.C., *Mechanisms of thrombus formation*. N Engl J Med., 2008. **359**(9): p. 938-49.
35. Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D.D., Graf, T., Italiano, J.E. Jr., Shivdasani, R.A., von Andrian, U.H., *Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow*. Science, 2007. **317**: p. 1767–1770.
36. Battinelli, E.M., J.H. Hartwig, and J. Italiano, *Delivering new insight into the biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis*. Current Opinion in Hematology, 2007. **14**(5): p. 419-426.
37. Dubois, C., et al., *Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3902-6.
38. Mangin, P., et al., *Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/FcRgamma deficiency*. Blood, 2006. **107**(11): p. 4346-53.
39. Vu, T.K., Hung, D.T., Wheaton, V.I., Coughlin, S.R., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1057-68.
40. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3378-84.
41. Jedlitschky, G., A. Greinacher, and H.K. Kroemer, *Transporters in human platelets: physiologic function and impact for pharmacotherapy*. Blood, Vol. 119. 2012.p. 3394-3402.
42. Herter, J.M., J. Rossaint, and A. Zarbock, *Platelets in inflammation and immunity*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2014: p. 1764-75.
43. Morrell, C.N., et al., *Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells*. Blood. Vol. 123. 2014: p. 2759-2767.
44. Ruggeri, Z.M., *Mechanisms initiating platelet thrombus formation*. Thromb Haemost. , 1997. **78**(1): p. 611-6.
45. Massberg, S., et al., *A Crucial Role of Glycoprotein VI for Platelet Recruitment to the Injured Arterial Wall In Vivo*. The Journal of Experimental Medicine, 2003. **197**(1): p. 41-49.
46. Jennings, L.K., *Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis*. Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 248-57.
47. Wilcox, J.N., et al., *Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989. **86**(8): p. 2839-2843.
48. Davie, E., *Waterfall sequence for intrinsic blood clotting*. Science, 1964. **145**((3638)): p. 1310-2.
49. Macfarlane, R.G., *an enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier*. Nature, 1964. **202**: p. 498-9.
50. Bevilacqua, M., Majeau, G.R., Cotran, R.S., Gimbrone, M.A. Jr., *Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells*. J Exp Med., 1984. **160**(2): p. 618-23.
51. Semeraro, N., Biondi, A., Lorenzet, R., Locati, D., Mantovani, A., Donati, MB., *Direct induction of tissue factor synthesis by endotoxin in human macrophages from diverse anatomical sites*. Immunology, 1983. **50**(4): p. 529-35.

52. Giesen, P., Bohrmann, B., Kling, D., Roqué, M., Fallon, J.T., Badimon, J.J., Himber, J., Riederer, M.A., Nemerson, Y., *Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2311-5.
53. Cho, J.; Coughlin, S.R.; Furie, B.;, *A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice*. J Clin Invest 2008. **118**(3): p. 1123-31.
54. Kalz, J., H. ten Cate, and H.M. Spronk, *Thrombin generation and atherosclerosis*. J Thromb Thrombolysis, 2014. **37**(1): p. 45-55.
55. Lane, D.A., H. Philippou, and J.A. Huntington, *Directing thrombin*. Blood, Vol. 106. 2005:p. 2605-2612.
56. Esmon, C.T., *Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis*. Blood Rev, 2009. **23**(5): p. 225-9.
57. Mackman, N., *Triggers, targets and treatments for thrombosis*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 914-8.
58. Schulz, C., B. Engelmann, and S. Massberg, *Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis*. J Thromb Haemost, 2013. **11** **Suppl 1**: p. 233-41.
59. Cooper, M.D. and M.N. Alder, *The evolution of adaptive immune systems*. Cell, 2006. **124**(4): p. 815-22.
60. Burnet, F.M., *A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection*. Aust J Sci, 1957. **20**: p. 67-69.
61. Cerutti, A., I. Puga, and M. Cols, *Innate control of B cell responses*. Trends Immunol, 2011. **32**(5): p. 202-11.
62. Mackay, I.R., *Autoimmunity since the 1957 clonal selection theory: a little acorn to a large oak*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(1): p. 67-71.
63. Kawai, T. and T. Kawasaki, *Toll-like receptor signaling pathways*. Frontiers in Immunology, 2014. **5**: p. 461.
64. Wiersinga, W.J., et al., *Host innate immune responses to sepsis*. Virulence, 2014. **5**(1): p. 36-44.
65. Gilliet, M., W. Cao, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 594-606.
66. Blasius, A.L., Beutler, B.,, *Intracellular toll-like receptors*. Immunity, 2010. **32**(3): p. 305-15.
67. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 816-25.
68. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 637-50.
69. Loo, Y.M. and M. Gale, Jr., *Immune signaling by RIG-I-like receptors*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 680-92.
70. Barbalat, R., et al., *Nucleic acid recognition by the innate immune system*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 185-214.
71. Yu, M. and S.J. Levine, *Toll-like receptor, RIG-I-like receptors and the NLRP3 inflammasome: key modulators of innate immune responses to double-stranded RNA viruses*. Cytokine Growth Factor Rev, 2011. **22**(2): p. 63-72.
72. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-[kappa]B by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-738.
73. Matsumoto, M. and T. Seya, *TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C)*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(7): p. 805-12.
74. Kato, H., et al., *Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-1 and melanoma differentiation-associated gene 5*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1601-10.
75. Malathi, K., et al., *Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity*. Nature, 2007. **448**(7155): p. 816-9.
76. Satoh, T., et al., *LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1512-7.
77. Doukas, J.C., A. H.; Mordes, J. P.;, *Polyinosinic:polycytidylic acid is a potent activator of endothelial cells*. Am J Pathol., 1994. **145**(1): p. 137-147.
78. Zimmer, S., et al., *Activation of endothelial toll-like receptor 3 impairs endothelial function*. Circ Res, 2011. **108**(11): p. 1358-66.

79. Lundberg, A.M., et al., *Key differences in TLR3/poly I:C signaling and cytokine induction by human primary cells: a phenomenon absent from murine cell systems*. Blood, Vol. 110. 2007: p. 3245-3252.
80. Shibamiya, A., Hersemeyer, K., Schmidt Wöll, T., Sedding, D., Daniel, J.M., Bauer, S., Koyama, T., Preissner, K.T., Kanse, S.M., *A key role for Toll-like receptor-3 in disrupting the hemostasis balance on endothelial cells*. Blood, 2009. **113**(3): p. 714-22.
81. Anabel, A.S., et al., *Human platelets express Toll-like receptor 3 and respond to poly I:C*. Human Immunology, 2014; **75**(12):p. 1244-51.
82. Christiaans, S.C., et al., *Protein C and acute inflammation: a clinical and biological perspective*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **305**(7): p. 455-66.
83. Walker, F.J., Esmon, C.T., *The inhibition of blood coagulation by activated Protein C through the selective inactivation of activated Factor V*. Biochim Biophys Acta 1979 **571**(2): p. 333-42.
84. Vehar, G., *Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor)*. Biochemistry, 1980. **19**(3): p. 401-10.
85. Branson, H., et al., *Inherited protein c deficiency and coumarin-responsive chronic relapsing purpura fulminans in a newborn infant*. The Lancet, 1983. **322**(8360): p. 1165-1168.
86. Griffin, J., Zimmerman, T.S., Kleiss, A., Wideman, C., *Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease*. J Clin Invest., 1981. **68**(5): p. 1370-3.
87. Greengard, J., et al., *Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va*. The Lancet, 1994. **343**(8909): p. 1361-1362.
88. Bertina, R.M., et al., *Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C*. Nature, 1994. **369**(6475): p. 64-67.
89. Jalbert, L.R., et al., *Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice*. The Journal of Clinical Investigation, 1998. **102**(8): p. 1481-1488.
90. Castellino, F.J., *Gene targeting in hemostasis: protein C*. Front Biosci., 2001. **6**: p. 807-19.
91. Fourrier, F., et al., *Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. compared patterns of antithrombin iii, protein c, and protein s deficiencies*. CHEST Journal, 1992. **101**(3): p. 816-823.
92. Lorente, J.A., et al., *Time course of hemostatic abnormalities in sepsis and its relation to outcome*. CHEST Journal, 1993. **103**(5): p. 1536-1542.
93. Yan, S.B., et al., *Low levels of protein c are associated with poor outcome in severe sepsis**. CHEST Journal, 2001. **120**(3): p. 915-922.
94. Taylor, F.B., Jr., et al., *Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of Escherichia coli infusion in the baboon*. The Journal of Clinical Investigation, 1987. **79**(3): p. 918-925.
95. Bernard, G.R., et al., *Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis*. New England Journal of Medicine, 2001. **344**(10): p. 699-709.
96. V. Marco Ranieri, M.D., B. Taylor Thompson, M.D., Philip S. Barie, M.D., M.B.A., Jean-François Dhainaut, M.D., et al., *Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock*. NEJM, 2012. **366**: p. 2055 - 2065.
97. Nadel, S., et al., *Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial*. The Lancet, 2007. **369**(9564): p. 836-843.
98. Abraham, E., et al., *Drotrecogin Alfa (Activated) for Adults with Severe Sepsis and a Low Risk of Death*. New England Journal of Medicine, 2005. **353**(13): p. 1332-1341.
99. Bock, F., et al., *Activated protein C based therapeutic strategies in chronic diseases*. Thromb Haemost, 2014. **111**(4): p. 610-7.
100. Esmon, C.T., *The protein c pathway*. CHEST Journal, 2003. **124**(3_suppl): p. 26S-32S.
101. Wildhagen, K.C., et al., *The structure-function relationship of activated protein C. Lessons from natural and engineered mutations*. Thromb Haemost, 2011. **106**(6): p. 1034-45.
102. Stenflo, J., *A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization*. Journal of Biological Chemistry, 1976. **251**(2): p. 355-363.
103. Esmon, C.T., J. Stenflo, and J.W. Suttie, *A new vitamin K-dependent protein. A phospholipid-binding zymogen of a serine esterase*. Journal of Biological Chemistry, 1976. **251**(10): p. 3052-3056.

104. Griffin, J.H., Gale, A.J., Mosnier, L.O., *Activated protein C*. J Thromb Haemost., 2007. **5**: p. Suppl 1:73-80.
105. Gruber, A. and J. Griffin, *Direct detection of activated protein C in blood from human subjects*. Blood, Vol. 79. 1992. 2340-2348.
106. Bouwens, E.A., F. Stavenuiter, and L.O. Mosnier, *Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway*. J Thromb Haemost, 2013. **11 Suppl 1**: p. 242-53.
107. Bouwens, E.A., F. Stavenuiter, and L.O. Mosnier, *Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2013. **11**: p. 242-253.
108. Owen, W.G. and C.T. Esmon, *Functional properties of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C*. Journal of Biological Chemistry, 1981. **256**(11): p. 5532-5535.
109. Esmon, C.T., N.L. Esmon, and K.W. Harris, *Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation*. Journal of Biological Chemistry, 1982. **257**(14): p. 7944-7947.
110. Esmon, N.L., W.G. Owen, and C.T. Esmon, *Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C*. Journal of Biological Chemistry, 1982. **257**(2): p. 859-864.
111. Esmon, C.T., *Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway*. Thromb Haemost., 1993. **70**(1): p. 29-35.
112. Dittman, W. and P. Majerus, *Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant*. Blood, Vol. 75. 1990. 329-336.
113. Fukudome, K. and C.T. Esmon, *Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(42): p. 26486-26491.
114. Xu, J., N.L. Esmon, and C.T. Esmon, *Reconstitution of the Human Endothelial Cell Protein C Receptor with Thrombomodulin in Phosphatidylcholine Vesicles Enhances Protein C Activation*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(10): p. 6704-6710.
115. Stearns-Kurosawa, D.J., et al., *The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(19): p. 10212-10216.
116. Li, W., et al., *Overexpressing endothelial cell protein C receptor alters the hemostatic balance and protects mice from endotoxin*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2005. **3**(7): p. 1351-1359.
117. Mann, K.G. and M. Kalafatis, *Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde*. Blood, Vol. 101. 2003. 20-30.
118. Esmon, C.T., *The regulation of natural anticoagulant pathways*. Science, 1987. **235**: p. 1348-1352.
119. Kalafatis, M. and K.G. Mann, *Role of the membrane in the inactivation of factor Va by activated protein C*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(36): p. 27246-27257.
120. Kalafatis, M., M.D. Rand, and K.G. Mann, *The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(50): p. 31869-31880.
121. Nesheim, M.E., J.B. Taswell, and K.G. Mann, *The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase*. Journal of Biological Chemistry, 1979. **254**(21): p. 10952-10962.
122. Camire, R.M., *A new look at blood coagulation factor V*. Curr Opin Hematol, 2011. **18**(5): p. 338-42.
123. Lenting, P.J., J.A. van Mourik, and K. Mertens, *The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of Its Structure and Function*. Blood, Vol. 92. 1998: p. 3983-3996.
124. van Dieijen, G., et al., *The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X*. Journal of Biological Chemistry, 1981. **256**(7): p. 3433-3442.
125. Walker, F.J., *Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation*. Journal of Biological Chemistry, 1981. **256**(21): p. 11128-11131.

126. Walker, F.J., *Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S*. Journal of Biological Chemistry, 1980. **255**(12): p. 5521-5524.
127. Stavenuiter, F.B., Mosnier, L.O., *Down-regulation of the clotting cascade by the protein C pathway*. Hematol Educ., 2013. **7**(1): p. 365-374.
128. Comp, P.C. and C.T. Esmon, *Recurrent Venous Thromboembolism in Patients with a Partial Deficiency of Protein S*. New England Journal of Medicine, 1984. **311**(24): p. 1525-1528.
129. Lu, D., et al., *Comparison of activated protein C/protein S-mediated inactivation of human factor VIII and factor V*. Blood, Vol. 87. 1996.:p. 4708-4717.
130. Shen, L. and B. Dahlbäck, *Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(29): p. 18735-18738.
131. Rao, L., C.T. Esmon, and U.R. Pendurthi, *Endothelial cell protein C receptor: a multi-liganded and multi-functional receptor*. Blood, 2014. **124**(10): p. 1553-62.
132. Mosnier, L.O., *Inhibition of staurosporine-induced apoptosis of endothelial cells by activated protein C requires protease activated receptor-1 and endothelial cell protein C receptor*. BiochemJ 2003. **373**: p. 65–70
133. Joyce, D.E., et al., *Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis*. J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 11199-203.
134. Cheng, T., et al., *Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective*. Nat Med, 2003. **9**(3): p. 338-42.
135. Dömötör, E., et al., *Activated protein C alters cytosolic calcium flux in human brain endothelium via binding to endothelial protein C receptor and activation of protease activated receptor-1*. Blood, 2003Vol. 101(12):p. 4797-4801.
136. Riewald, M., et al., *Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway*. Science, 2002. **296**(5574): p. 1880-2.
137. Riewald, M. and W. Ruf, *Protease-activated Receptor-1 Signaling by Activated Protein C in Cytokine-perturbed Endothelial Cells Is Distinct from Thrombin Signaling*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(20): p. 19808-19814.
138. Guo, H., et al., *Activated Protein C Prevents Neuronal Apoptosis via Protease Activated Receptors 1 and 3*. Neuron, 2004. **41**(4): p. 563-572.
139. Joyce, D.E., *Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor-kappaB*. Crit Care Med., 2002. **30**(5 Suppl): p. 288-93.
140. Francini, N., et al., *Gene Expression Profiling of Inflamed Human Endothelial Cells and Influence of Activated Protein C*. Circulation, 2004. **110**(18): p. 2903-2909.
141. Feistritzer, C. and M. Riewald, *Endothelial barrier protection by activated protein C through PARI-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation*. Blood, Vol. 105. 2005:p. 3178-3184.
142. Murakami, K., et al., *Activated protein C attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting activated leukocytes in rats*. Blood, Vol. 87. 1996.:p. 642-647.
143. Mosnier, L.O., B.V. Zlokovic, and J.H. Griffin, *The cytoprotective protein C pathway*. Blood, Vol. 109. 2007:p. 3161-3172.
144. Cheng, T., et al., *Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage*. Nat Med, 2006. **12**(11): p. 1278-1285.
145. Hotchkiss, R.S. and D.W. Nicholson, *Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 813-822.
146. Della Valle, P., G. Pavani, and A. D'Angelo, *The protein C pathway and sepsis*. Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 296-300.
147. Russo, A., et al., *Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor-1*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(15): p. 6393-6397.
148. Bae, J.S., L. Yang, and A.R. Rezaie, *Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(8): p. 2867-2872.

149. Feistritzer, C., et al., *Protective Signaling by Activated Protein C Is Mechanistically Linked to Protein C Activation on Endothelial Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(29): p. 20077-20084.
150. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 258-264.
151. Ludeman, M.J., et al., *PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 13122-8.
152. Bae, J.S., et al., *The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells*. Blood, 2007. **110**(12): p. 3909-16.
153. Wang, Y., et al., *An activated protein C analog with reduced anticoagulant activity extends the therapeutic window of tissue plasminogen activator for ischemic stroke in rodents*. Stroke, 2012. **43**(9): p. 2444-9.
154. Ades, E., Swerlick, R.A., George, V.G., Summers, S., Bosse, D.C., Lawley, T.J., *HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line*. J Invest Dermatol. , 1992. **99**(6): p. 683-90.
155. Banas B., et al., *Chemokine and Chemokine Receptor Expression in a Novel Human Mesangial Cell Line*. Journal of the American Society of Nephrology, 1999. **10**(11): p. 2314-2322.
156. Pfaffl, M., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res., 2001. **29**(9).
157. Born, G., *Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal*. Nature, 1962. **194**: p. 927-936.
158. Washington, A.V., Acevedo, I., Gattis, J., Quigley, L., Feltz, R., De La Mota, A., Schubert, A.L., Gomez-Rodriguez, J., Cheng, J., Dutra, A., Pak, E., Chertov, O., Rivera, L., Morales, J., Lubkowski, J., Hunter, R., Schwartzberg, P.M., McVicar, D.W., *TREM-like transcript-1 protects against inflammation-associated hemorrhage by facilitating platelet aggregation in mice and humans*. The Journal of Clinical Investigation, 2009. **119**(6): p. 1489-501.
159. Baez, S., *An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy*. Microvasc Res., 1973. **5**((3)): p. 384-94.
160. Kunkel, E.J., Bullard, D.C., Norman, K.E., Wolitzky, B.A., Vestweber, D., Beaudet, A.L., Ley, K., *Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice deficient in both P-selectin and intercellular adhesion molecule 1*. J Exp Med., 1996. **183**(1): p. 57-65.
161. Rumbaut, R.E., D.W. Slaff, and A.R. Burns, *Microvascular thrombosis models in venules and arterioles in vivo*. Microcirculation, 2005. **12**(3): p. 259-74.
162. WHO, *Ebola Response Roadmap Situation Report, 8 October 2014*. World Health Organization, 2014.
163. Beaulieu, L.M. and J.E. Freedman, *The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes*. Thrombosis Research, 2010. **125**(3): p. 205-209.
164. Massberg S., Leiderer, S., Eisenmenger, S., Vestweber, D., Krombach, F., Messmer, K., *Platelet-Endothelial Cell Interactions During Ischemia/Reperfusion: The Role of P-Selectin*. Blood 1998. **92**: p. 507-515.
165. Lakshmanan, S. and A. Cuker, *Contemporary management of primary immune thrombocytopenia in adults*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2012. **10**(10): p. 1988-1998.
166. Lacey, J.V., Penner, J.A., *Management of idiopathic thrombocytopenic purpura in the adult*. Semin Thromb Hemost., 1977. **3**(3): p. 160-74.
167. Cortelazzo, S., et al., *High risk of severe bleeding in aged patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. Blood, Vol. 77. 1991:p. 31-33.
168. Psaila, B., et al., *Intracranial hemorrhage (ICH) in children with immune thrombocytopenia (ITP): study of 40 cases*. Blood, Vol. 114. 2009:p. 4777-4783.
169. Montes, R., J. Diez, and J. Hermida, *Activated protein C: reasons to believe*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(9): p. 1733-5.

170. Costa, R., et al., *Activated protein C modulates cardiac metabolism and augments autophagy in the ischemic heart*. *J Thromb Haemost*, 2012. **10**(9): p. 1736-44.

7.5 PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit wurden in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht:

Blüm, P., Pircher, J., Merkle, M., Czermak, T., Ribeiro, A., Mannell, H., Krötz, F., Hennrich, A., Spannagl, M., Köppel, S., Gaitzsch, E., Wörnle, M., *Arterial thrombosis in the context of HCV-associated vascular disease can be prevented by protein C*. Cell Mol Immunol. 2016 Apr 18. doi: 10.1038/cmi.2016.10. [Epub ahead of print]

Mitarbeit an folgender Publikation

Merkle, M., Pircher, J., Mannell, H., Krötz, F., **Blüm, P.**, Czermak, T., Gaitzsch, E., Schneider, C., Köppel, S., Ribeiro, A., Wörnle, M., *LL37 inhibits the inflammatory endothelial response induced by viral or endogenous DNA*. J Autoimmun. 2015 Aug, Epub ahead of print.

7.6 DANKSAGUNG

Die Arbeiten an meiner Dissertation haben über drei Jahre gedauert und wären ohne die Unterstützung einer Vielzahl von Freunden und Kollegen nicht erfolgreich gewesen. Ich möchte daher am Ende meiner Dissertation die Gelegenheit nutzen und einer Reihe von Personen danken, die maßgeblich zum Gelingen meines Projektes beigetragen haben.

Der größte Dank gilt hier sicherlich meinen beiden Hauptansprechpartnern in Sachen Promotion, die zum einen das Thema entworfen und es beim „Förderprogramm für Forschung und Lehre“ eingereicht haben und zum anderen anschließend an der Weiterentwicklung der Fragestellung mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Ich danke Dr. Joachim Pircher für die wissenschaftliche Betreuung meiner Promotion und PD Dr. Markus Wörnle für die Übernahme meines Promotionsprojektes als Doktorvater von PD Dr. Florian Krötz, der die Universität zu Beginn meiner Arbeiten verlassen hatte und mich daher nicht weiterbetreuen konnte.

Außerdem möchte ich mich recht herzlich bei Dr. Hanna Mannell und Prof. Dr. Ulrich Pohl bedanken, die mir die Räumlichkeiten und Instrumente zur Durchführung meiner Experimente zur Verfügung gestellt haben. Die Kooperation mit dem Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin war für die Arbeiten an meiner Dissertation von großer Bedeutung.

Für die finanzielle und ideelle Unterstützung durch das „Förderprogramm für Forschung und Lehre“ möchte ich mich auch bei der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität und hier stellvertretend bei Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann bedanken.

Georg Hupel und Thomas Czermak danke ich, dass sie die vorliegende Arbeit korrektur gelesen haben.

Abschließend möchte ich allen Kollegen für die schöne Zeit im Labor danken und freue mich, dass neben der Wissenschaft auch immer Zeit für etwas Spaß und gute Laune war.