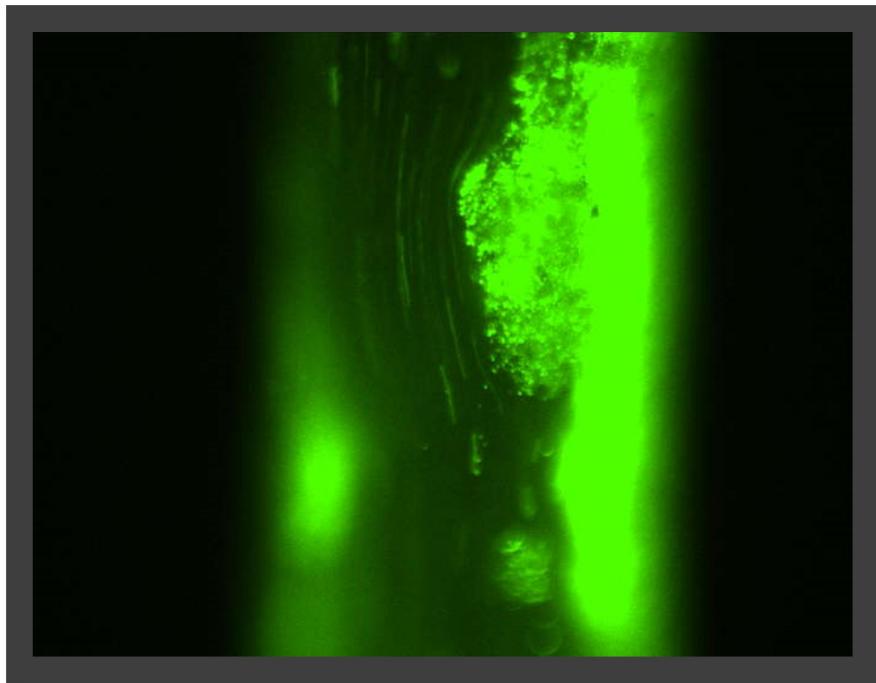


Einfluss des Darmmikrobioms auf arterielle Thrombusbildung und Zelladhäsion im Ischämie- Reperusionsmodell mesenterialer Venolen der Maus

Eivor Wilms



Inaugural Dissertation zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinikum der Veterinärmedizin,
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik
Fachbereich Veterinärmedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. med. vet. A. Moritz

und

aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
und Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH)
(Nachwuchsgruppe Dr. rer. biol. hum. Christoph Reinhardt)

Universitätsmedizin Mainz

Betreuer: Prof. Dr. med. K. J. Lackner

Einfluss des Darmmikrobioms auf arterielle Thrombusbildung und Zelladhäsion im Ischämie- Reperfusionsmodell mesenterialer Venolen der Maus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde des Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Eivor Wilms

Tierärztin aus Mainz

Gießen 2016

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. hc. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Andreas Moritz
Prof. Dr. med. Karl J. Lackner

Tag der Disputation: 24.10.2016

Für Grovi

Eidesstattliche Erklärung:

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.“

Ort, Datum

Eivor Wilms

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Morphologie von Arterien und Venen.....	3
1.1.	Arterien.....	3
1.1.1.	Arterien vom muskulären Typ	3
1.1.2.	Arterien vom elastischen Typ.....	4
1.2.	Arteriolen.....	4
1.3.	Kapillaren	5
1.4.	Venolen	5
1.5.	Venen.....	5
2.	Thrombozyten.....	6
2.1.	Bildung und Aufbau von Thrombozyten.....	6
2.2.	Thrombozytenfunktion	6
3.	Leukozyten	7
3.1.	Bildung und Funktion von Leukozyten.....	7
3.2.	Emigration der Leukozyten	8
4.	Signaltransduktion angeborener Immunrezeptoren – Toll-like Rezeptoren	11
4.1.	Der MyD88-abhängige Signalweg.....	13
4.2.	TRIF - der MyD88-unabhängige Weg	13
5.	Hämostase	15
5.1.	Gerinnungskaskade	16
5.2.	Thrombosen.....	17
5.3.	Das Konzept der Immunothrombosen.....	18
5.4.	Mausmodelle der Thrombusbildung	19
5.4.1.	Arterielle Thrombosemodelle.....	19
5.4.1.1.	Chemische Endothelverletzung: Eisen-III-chlorid.....	19
5.5.	Mausmodelle zur Untersuchung der Mikrozirkulation	20
5.5.1.	Ischämie-Reperfusionmodell.....	20
5.5.1.1.	Mesenteriales Ischämie-Reperfusionsmodell.....	20

6.	Mikrobiota des Intestinaltraktes.....	21
6.1.	Schutzfunktion der Mikrobiota	21
6.2.	Herstellung von Metaboliten durch die Mikrobiota	22
6.2.1.	Herstellung von Vitaminen durch die Mikrobiota.....	23
6.3.	Einfluss der Mikrobiota auf die Ausprägung und Aktivierung des angeborenen Immunsystems.....	24
6.4.	Mikrobiota und Krankheiten der modernen Gesellschaft	25
6.4.1.	Einfluss von Mikrobiota auf chronisch-entzündliche Darm-erkrankungen	26
7.	Gnotobiotik und der Hygienestatus von Labortieren	27
7.1.	Definition.....	28
7.2.	Morphologische Charakteristika keimfreier Mäuse	29
7.3.	Physiologische, biochemische und immunologische Charakteristika keimfreier Mäuse	30
8.	Zielsetzung dieser Arbeit	31
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	32
1.	Materialliste	32
1.1.	Geräte	32
1.2.	Instrumente	34
1.3.	Verbrauchsmaterialien.....	35
1.4.	Chemikalien.....	36
1.5.	Medien und Medienzusätze	37
1.6.	Primer für murine Sequenzen.....	37
1.7.	Kits	38
1.8.	Medikamente	39
1.9.	Softwares	39
2.	Verwendete Versuchstiere	40
2.1.	Keimfreie Maushaltung in Isolatoren.....	41
2.1.1.	Isolatoren	41
2.1.2.	Sterilisation.....	42
2.1.3.	Kontrolle des keimfreien Status	43
2.1.4.	Inneres Isolatormilieu.....	43

2.1.4.1.	Rederivatisierung der Toll-like Rezeptor-2 defizienten Mauslinie (<i>Tlr2</i> ^{-/-})..	45
2.1.5.	Kolonisierung und Monokolonisierung keimfreier Tiere.....	45
2.1.6.	Kolonisierung mit Zäkuminhalt von SPF-Mäusen.....	45
2.1.7.	Monokolonisierung mit <i>Escherichia coli</i> JP 313	46
3.	Narkose.....	47
4.	Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie	48
4.1.	Intravitalmikroskop	48
4.1.1.	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.....	49
4.2.	Präparations- und Färbeverfahren	51
4.2.1.	Verwendete Puffer.....	51
4.2.2.	Blutentnahme.....	52
4.2.2.1.	Blutentnahme zur Messung der Blutwerte	52
4.2.3.	Färbeprotokolle	52
4.2.3.1.	Thrombozytenpräparation / Bestimmung der Thrombozytenzahl	52
5.	<i>In vivo</i> Mausmodelle.....	53
5.1.	Operationsmethoden.....	53
5.1.1.	Allgemeine Versuchsvorbereitung	53
5.1.2.	Venöser Zugang zur <i>Vena jugularis externa</i>	54
5.1.3.	Eisen-III-chlorid Modell an der <i>Arteria carotis communis</i>	55
5.1.4.	Mesenteriales Ischämie-Reperfusionsmodell.....	56
5.1.5.	Durchführung der intravitale Videofluoreszenzmikroskopie.....	57
5.1.5.1.	Arterielle Thrombose an der <i>A. carotis communis</i>	58
5.1.5.2.	Mesenteriales Ischämie-Reperfusionsmodell.....	58
5.1.5.3.	Auswertung der Videoaufnahmen.....	61
5.1.5.4.	Organentnahme	61
6.	Analyse der Expression von Adhäsionsmolekülen der unverletzten <i>A. carotis communis</i>	61
6.1.1.	RNA-Isolierung aus der <i>A. carotis communis</i>	61
6.1.2.	Reverse Transkription	62
6.1.3.	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	62
7.	Bestimmung der Blutungszeit	62
8.	Thrombozyten- und Leukozytenfunktionsanalysen mittels	

	Durchflusszytometrie	63
9.	Statistische Versuchsauswertung.....	63
IV.	ERGEBNISSE	64
1.	Blutwerte von GF, CONV-R, CONV-D, <i>Myd88</i>^{-/-} und <i>Trif</i>^{-/-} Mäusen ..	64
2.	Blutungszeiten.....	65
2.1.	Das Fehlen der Mikrobiota beeinflusst die Blutungszeit im Schwanzspitzenresektionsmodell.	65
3.	<i>In vivo</i> Darstellung der Thrombusbildung.....	66
3.1.	Thrombusbildung an der <i>A. carotis communis</i>	66
3.1.1.	Analyse der Gefäßverschlusszeit.....	66
3.1.1.1.	Präsenz von Mikrobiota beeinflusst die Okklusionszeit der <i>A. carotis communis</i> nach FeCl ₃ -Applikation	68
3.1.2.	qRT - PCR Analysen der Expression der endothelialen Adhäsions-molekülen VCAM-1 und ICAM-1, dem Gerinnungsprotein vWF und dem natürlichen Antikoagulant TFPI der unverletzten <i>A. carotis communis</i>	69
4.	Ischämie-Reperfusions-Verletzungsmodell an der Mikrozirkulation des Mesenteriums.....	71
4.1.	Die Präsenz von Mikrobiota (CONV-R) ging mit einer erhöhten Leukozytenadhäsion und einer vermehrten Anzahl von Leukozytenkonjugaten einher	71
4.2.	Präsenz einer komplexen Mikrobiota (CONV-R) führte zu einer erhöhten Thrombozytenadhäsion Post-Ischämie und vermehrten Leukozyten- Thrombozyten-Interaktion Pre- und Post-Ischämie	76
4.3.	Kolonisierung mit dem Zäkuminhalt von CONV-R Mäusen und Monokolonisierung mit <i>Escherichia coli</i> JP313 beeinflusste die Leukozytenadhäsion	83
4.3.1.	Die Kolonisierung GF Mäuse für 14 Tage mit Mikrobiota von CONV-R Mäusen und einer <i>E. coli</i> JP313 Monokultur verstärkte die Leukozytenadhäsion	84
4.3.2.	Die Monokolonisierung mit <i>E. coli</i> JP313 und Kolonisierung mit Mikrobiota aus dem Zäkum von CONV-R Mäusen verstärkte die Thrombozytenadhäsion Post- Ischämie und die Leukozyten-Thrombozyten-Interaktionen	90
4.4.	Einfluss auf die Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten	

	durch Defizienz der MYD88- und TRIF- Adaptermoleküle	97
4.4.1.	Regulierte Leukozytenadhäsion Post-Ischämie und verminderte Leukozytenkonjugatbildung bei <i>Trif</i> ^{-/-} Mäusen	97
4.4.2.	Thrombozytenadhäsion, Thrombozytenaggregatbildung und Leukozyten- Thrombozyten-Interaktionen Pre- und Post-Ischämie bei <i>Myd88</i> -defizienten , <i>Trif</i> - defizienten und Wildtyp Mäusen	102
5.	Analyse von Rezeptormolekülen auf Thrombozyten und Leukozyten mittels Durchflusszytometrie	108
5.1.	Die Besiedlung mit einer intakten Mikrobiota führte zu einer erhöhten GPIIbIIIa Aktivierung auf Thrombozyten von CONV-R Mäusen nach ADP-Stimulierung	108
5.2.	Die Anwesenheit von Mikrobiota bewirkte eine erhöhte Exponierung des Aktivierungsmarkers P-Selektin auf Thrombozyten von CONV-R Mäusen nach Stimulation mit ADP und Thrombin	109
5.3.	Die Besiedlung mit einer kommensalen Mikrobiota führt zu einer erhöhten Expression von PSGL-1 auf Neutrophilen und Monozyten.....	110
V.	DISKUSSION	111
1.	Wahl der Mauslinien.....	111
2.	Diskussion der <i>in vivo</i> Tiermodelle	111
2.1.	Blutungszeitmodell.....	112
2.2.	Arteriell Thrombosemodell – FeCl ₃ – induzierte Thrombose.....	113
2.3.	Ischämie-Reperfusionverletzungsmodell	114
3.	Keimfreies Mausmodell	116
4.	Einfluss der Mikrobiota	117
4.1.	Die Kolonisierung des Darmes beeinflusst die Blutungsneigung.....	117
4.1.1.	Einfluss der angeborenen Immunität auf die Blutungszeit.....	117
4.2.	Die Kolonisierung des Darmes beeinflusst die arterielle Thrombusbildung.	118
4.3.	Einfluss von Mikrobiota auf die Rekrutierung von Leukozyten in einem Ischämie- Reperusionsverletzungsmodell	119
4.4.	Die Adhäsion von Thrombozyten an das mesenteriale Endothel ist bei kolonisierten Mäusen erhöht	122
4.5.	Die Mikrobiota erhöht die Anzahl von Leukozytenkonjugaten und Leukozyten-	

	Thrombozyten Interaktionen	123
5.	Einfluss des angeborenen Immunsystems auf die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten an das mesenteriale Gefäßbett im Ischämie- Reperfusionsmodell	124
6.	Ausblick.....	126
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	127
VII.	SUMMARY	129
VIII.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	130
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	133
X.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	147
XI.	TABELLENVERZEICHNIS	149
XII.	LEBENS LAUF	152
XIII.	DANKSAGUNG	153

I. EINLEITUNG

Mit der zunehmenden Industrialisierung haben sich die Todesursachen in den letzten 100 Jahren so verändert, dass heute die häufigste Todesursache kardiovaskuläre Erkrankungen sind (1). Zu den Risikofaktoren zählen hohes Lebensalter, Rauchen, Fettleibigkeit, Hyperlipidämie, arterieller Bluthochdruck und Diabetes mellitus. Vor allem Thrombosen, die sich klinisch als Schlaganfall, Herzinfarkt, Lungenembolien und Darminfarkte manifestieren, spielen eine äußerst wichtige Rolle im Bereich der kardiovaskulären Erkrankungen. Studien haben gezeigt, dass Darmbakterien einen großen Einfluss auf die Entstehung von Fettleibigkeit und Insulinresistenz spielen (2). Möglicherweise kann die Bildung von arteriosklerotischen Plaques ebenfalls von Darmbakterien unterstützt werden (3). Bei der Ruptur arteriosklerotischer Plaques kommen Thrombozyten in Kontakt mit subendothelialen Matrixproteinen der mittleren der drei Gefäßschichten (Kollagen, Laminin und Fibronektin) (4), was zur Thrombozytenaktivierung, vermehrten Thrombozytenrekrutierung / -sekretion, Thrombozytenaggregation und schließlich zur Bildung eines Thrombus führen kann (5). Nicht nur die Entstehung der Thromben stellt ein hohes Gesundheitsrisiko dar, sondern vor allem die Ablösung des Thrombus von der Gefäßinnenseite (embolisierender Thrombus). Aufgrund der Größe des Thrombus kann dieser ab einem bestimmten Durchmesser die Gefäße nicht mehr passieren und okkludiert ein Gefäß komplett. Dadurch ist eine Versorgung mit Sauerstoff nicht mehr gegeben (Ischämie). Es kommt zu einem Infarkt und zum Funktionsverlust des betroffenen Gewebes um das verschlossene Gefäß.

Die Entstehung von Thrombosen, unterstützt durch das plasmatische Gerinnungssystem, ist eng mit der Aktivierung der angeborenen Immunantwort (6, 7) verknüpft. Das Komplementsystem, welches hauptsächlich für die Erkennung und Eliminierung von Erregern (Bakterien und Viren) zuständig ist, steht auch im direkten Zusammenhang mit dem Gerinnungssystem (8). Beide Systeme teilen sich evolutionär den gleichen Ursprung. Durch Genduplikation und Exon-Shuffling entstanden während der Entwicklung von Säugetieren das Komplementsystem zur Bekämpfung von Pathogenen und das Gerinnungssystem (9). Die mikrobielle Zusammensetzung der Darmflora (Mikrobiota) hat einen starken Einfluss auf eine Vielzahl metabolischer und gestaltbildender Prozesse (10). Die Mikrobiota hat unter anderem eine schützende Funktion gegen pathogene Mikroorganismen und ist am Vitamin K Stoffwechsel beteiligt, der von zentraler Bedeutung für die Herstellung von Blutgerinnungsfaktoren ist (11, 12).

Auch langkettige Polysaccharide werden von der Darmflora fermentiert und so als leicht zugängliche Energiequelle für den Körper bereitgestellt. Ein offensichtlicher Effekt, der durch die Besiedlung des Darms mit Bakterien hervorgerufen wird, ist die Verkürzung und Verdickung der Villusstrukturen im Dünndarm (13).

Bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Inflammatory Bowel Disease, IBD), wie Morbus Crohn und Ulcerativer Colitis ist eine dysbalancierte Darmflora und eine überschießende Immunantwort Auslöser des gravierenden Krankheitsbildes (14, 15). Thrombembolien sind eine bekannte Komplikation chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (16-18). Morbus Crohn und Ulzerative Colitis sind assoziiert mit einem 3- bis 4-fach erhöhten Risiko für Thrombosen (19).

Thrombusbildung bei IBD ist im venösen Gefäßsystem am häufigsten, aber auch in Arterien, wie z.B. der Aorta, können Thromben gebildet werden (20). Unter anderem werden bei diesen Krankheitsbildern gehäuft multifokale gastrointestinale Infarkte beobachtet (21). In dieser Arbeit wird die Auswirkung eines gastrointestinalen Infarktes mittels eines Ischämie/Reperusionsmodells an mesenterialen Gefäßen untersucht. Welchen Einfluss die Darmflora auf die Aktivierung des Gerinnungssystems und die Entstehung von Thromben hat ist bisher unerforscht.

Frühere, immunologisch geprägte Studien mit keimfreien Mäusen, welche keinerlei Darmflora oder nachweisbare Bakterien besitzen, haben gezeigt, dass die Rekrutierung von Immunzellen (Leukozyten, T-Zellen) in der Darmmikrozirkulation keimfreier Mäusen verringert ist und es zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen in mit einer Darmflora kolonisierten Tieren kommt (22). Mit dem keimfreien Mausmodell und der Intravitalmikroskopie wird in dieser Arbeit untersucht, ob die Rekrutierung und Adhäsion von Immunzellen oder auch Thrombozyten von der Besiedlung des Darmes mit Mikrobiota abhängig ist. Dadurch kann *in vivo* beobachtet werden, wie sich die Abwesenheit von kommensalen Mikroorganismen als Umweltfaktor auf die Entstehung von Thrombosen auswirken kann.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Morphologie von Arterien und Venen

Das Blut verlässt die linke Herzkammer durch die *Aorta*. Durch fortgesetzte Verzweigung entsteht eine zunehmende Zahl von immer kleineren Arterien und schließlich Arteriolen. Von hier erreicht das Blut das engmaschige Kapillarnetz, wo der Stoff- und Gasaustausch zwischen Blut und Gewebe stattfindet. Der Rückweg zum Herzen beginnt mit den Venolen, die zu immer größeren Venen konvergieren. Aus dem großen Kreislauf gelangt das Blut schließlich über die untere und obere *V. cava* in den rechten Vorhof des Herzens und weiter über die rechte Kammer in die Lunge. Dort wird das Blut oxygenisiert und gelangt dann aus dem Lungenkreislauf über Pulmonalvenen in den linken Herzvorhof und dann wieder weiter in die linke Herzkammer.

Arteriolen, Kapillaren und Venolen werden als Endstrombahn oder Gebiet der Mikrozirkulation zusammengefasst. Diese Gefäße haben aufgrund ihrer großen Anzahl den größten Anteil an der Gesamtquerschnittsfläche des Gefäßsystems.

Arterien und Venen besitzen beide einen dreischichtigen Aufbau. Die innere, dem Blutfluss zugewandte Schicht *Tunica intima* (Interna), die mittlere *Tunica media* (Media) und die äußere *Tunica externa* (Adventitia) (23, 24).

1.1. Arterien

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedenen Arten von Arterien: Die herznahen (*Aorta* und *Truncus pulmonalis* samt ihren Abgängen) vom elastischen Typ und die vom herzfernen, muskulären Typ.

1.1.1. Arterien vom muskulären Typ

Die meisten Arterien gehören zu dieser Gruppe. Die innere Schicht, die Intima, besteht aus dem Endothel und einer subendothelialen Schicht, die vorwiegend Extrazellulärmatrix und kaum Zellen enthält. Das Endothel trennt den Intravasalraum von den tieferen Wandschichten und hat eine wichtige Bedeutung bei der Adhäsion von Blutbestandteilen und der Gerinnung (24). Aufgrund der Oberflächenexpression und Sekretion diverser Proteine, Proteoglykane und Gerinnungsfaktoren hat das Endothel Anteil an Mechanismen, die die Bildung von Thromben normalerweise verhindern aber im Fall einer Gefäßverletzung fördern. Dazu gehört u.a. die Sekretion von Prostacyclin (Hemmung der Thrombozytenaggregation) sowie die

Sekretion des von Willebrand Faktors (vWF, Förderung der Thrombozytenadhäsion). In der subendothelialen Schicht befinden sich viele kollagene und elastische Fasern aus Fibrillin und Kollagen Typ IV, die ein Bindungspartner für den vWF darstellen, der nach einer Endothelverletzung die feste Adhäsion von Thrombozyten an die Extrazellulärmatrix vermittelt. Die *Tunica intima* wird im Gegensatz zu den anderen Gefäßschichten ausschließlich über Diffusion aus dem Blutstrom mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt.

Weiter nach außen schließt sich die *Media* an. Diese ist die breiteste Schicht der Arterienwand. Sie besteht aus mehreren Schichten glatter Muskelzellen und dazwischen gelagerter Extrazellulärmatrix (elastische und kollagene Fasern, Proteoglykane), welche von den glatten Muskelzellen hergestellt wird. Nach außen schließt sich die *Adventitia* an, diese ist eine Bindegewebsschicht, die das Gefäß in der Umgebung verankert (23). Die *Media* und *Adventitia* werden von kleinsten Gefäßen, den *Vasa Vasorum*, versorgt und Stoffwechselprodukte aus den Gefäßwänden abtransportiert (25). Systemische Atherosklerose, parenchymale Entzündungen und die Neubildung von *Vasa Vasorum* sind eng miteinander verbunden (26). Immer mehr Hinweise deuten darauf hin, dass vaskuläre Entzündungen an der *Adventitia* beginnen und weiter nach Innen zur *Intima* fortschreiten (27).

1.1.2. Arterien vom elastischen Typ

Da diese Gefäße an herznahen Orten zu finden sind, müssen diese den vom Herzen stoßweise kommenden Blutausschlag in einen kontinuierlichen Blutstrom verwandeln. Diese sogenannte Windkesselfunktion (28-30) wird durch die hohe Elastizität der Gefäße, wie beispielsweise in der *Aorta*, erreicht. Die *Intima* hat eine deutlich größere subendotheliale Schicht als die *Intima* der Arterien des muskulären Typs. Die *Media* besteht aus sehr viel mehr elastischen Lamellen, die mit den Muskelzellen so verbunden sind, dass in dem Gefäß je nach Kontraktionszustand des Herzens eine gewisse Vorspannung herrscht, um dem Blutdruck standzuhalten. Die *Adventitia* unterscheidet sich nicht von der des muskulären Typs.

1.2. Arteriolen

Arteriolen sind wesentlich an der Durchblutungsregulation eines Gewebes, aber auch an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Durch das Eng- und Weitstellen ihres unter 100µm großen Durchmessers kann so die durchfließende Blutmenge verändert werden. Arteriolen besitzen, wie Arterien, auch einen dreischichtigen Aufbau. Ihre *Media* ist aber nur sehr schwach ausgeprägt. Im Vergleich zu Arterien können Arteriolen mit der in der *Media* liegenden Muskelschicht ihr Lumen komplett verschließen und somit die Durchblutung des

anschließenden Gewebes bestimmen und den Blutdruck ausgleichen (28).

1.3. Kapillaren

Die im Durchmesser nur noch 7µm großen Kapillaren schließen sich an die Arteriolen an. Sie besitzen keinen dreischichtigen Aufbau mehr, sondern bestehen nur noch aus einer semipermeablen Intima und einer anliegenden Basalmembran. Dadurch wird ein Stoffaustausch zwischen dem Blutgefäßsystem und den Geweben möglich gemacht. Diese Mikrozirkulation sorgt für eine Nährstoffzufuhr zu dem Gewebe und einem Abtransport von Stoffwechselendprodukten (28, 30).

1.4. Venolen

Direkt anschließend an die Kapillaren schließen sich die postkapillären Venolen an. Strukturell ähneln sie den Kapillaren aber ihr Lumen ist mit 8-30µm größer. In den postkapillären Venolen findet der Übertritt von Leukozyten aus dem Blut in das umliegende Gewebe statt, die sogenannte Leukodiapedese. So gelangen Immunzellen zu einem Entzündungsgeschehen in Geweben (30). Das Blut, das die postkapillären Venolen verlässt wird von den Venolen aufgenommen. Der Durchmesser bleibt zwar gleich, aber in der Gefäßwand treten vereinzelt glatte Muskelzellen auf. Dadurch kann das Gefäßlumen verändert werden.

1.5. Venen

In den Venen wird nach Nährstoff- und Sauerstoffabgabe das Blut aus der Peripherie zum Herzen zurückgeführt. Venen besitzen eine sehr dünne bis gar keine Muskelschicht in der *Media*. Um ein Versacken des Blutes in der Peripherie zu verhindern, besitzen sie Venenklappen (Intimaduplikaturen), die dem Blutstrom zum Herzen freigeben, sich aber bei Strömungsumkehr schließen.

Eine klare Abgrenzung der Schichten, wie beim Aufbau der Arterien, lässt sich bei den Venen nicht finden (24).

2. Thrombozyten

2.1. Bildung und Aufbau von Thrombozyten

Thrombozyten spielen bei der Beendigung einer Blutung nach Gefäßverletzung (Hämostase) eine zentrale Rolle. Ihre Vorläufer sind Megakaryozyten im Knochenmark, die sich in ihrer Weiterentwicklung zu Thrombozyten vergrößern und ihre Organellen so anordnen, dass aus einem Megakaryozyt zahlreiche Thrombozyten entstehen, die dann aber keinen Zellkern mehr besitzen (31, 32). Trotz Fehlens eines Zellkerns besitzen Thrombozyten mRNA und sind somit zur Neusynthese von Proteinen befähigt (33). Ein Drittel des Thrombozytenpools wird in der Milz gespeichert und mit den im Blut zirkulierenden Thrombozyten ausgetauscht. Thrombozyten haben eine ungefähre Lebensdauer von 5 Tagen (34). Wenn sie nicht verbraucht werden, werden sie von Makrophagen der Milz und Leber beseitigt und durch neue ersetzt (24, 31). Mäuse haben unter allen gängigen Labortieren die höchste Anzahl von zirkulierenden Thrombozyten ($800-2000 \times 10^9/L$) (35). Inaktiv haben die Thrombozyten eine Form einer bikonvexen Scheibe, mit einem Durchmesser von $1-3\mu m$. Die Scheibenform wird durch ein Bündel von Mikrotubuli gestützt, das als Ring im organellfreien peripheren Zytoplasma gespannt ist. Das im Zentrum gelegene Zytoplasma (Granulomer) enthält einzelne Mitochondrien (Energiestoffwechsel), Lysosomen (Verdauungsproteine), Glykogenpartikel (Energiespeicher) und verschiedene Typen von Speichergranula: Sie werden in α -Granula und elektronendichte Granula unterteilt, deren Inhalt nach Aktivierung der Thrombozyten sezerniert wird. In den α -Granula befinden sich adhäsive Moleküle wie vWF, Platelet factor 4, Thrombospondin, der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa, P-Selektin und CD63 (36). Elektronendichte Granula beinhalten die Energielieferanten ATP und ADP, Calcium, Histamin und Serotonin. In der Plasmamembran befinden sich verschiedene Rezeptoren (Integrine und Glykoproteine), die für die Anheftung und Vernetzung der Thrombozyten verantwortlich sind. Über ein dreidimensionales Aktinnetz in Kombination mit Myosin wird dem Thrombozyt eine Kontraktilität verliehen, die für die Phase der Aktivierung wichtig ist (24).

2.2. Thrombozytenfunktion

Thrombozyten sind für den normalen Ablauf der Blutstillung verantwortlich (32). Die primäre Hämostase und die anschließende Fibrinbildung werden von Thrombozyten bestimmt. Außerdem unterstützen sie mit löslichen und membrangebundenen Faktoren die Wundheilung (37, 38). Sie sind in der Lage Sauerstoffradikale (39-42) zu bilden und chemotaktische Faktoren für die Anlockung von Leukozyten (43) auszustoßen. Thrombozyten besitzen

weiterhin Funktionen wie bakterizide Wirkung auf grampositive Erreger (44), Abwehrreaktionen gegen Blutparasiten (45) und Tumorzellen (46, 47). Ob die Thrombozyten aktiviert oder an eine der oben genannten Funktionen beteiligt sind, lässt sich an ihrer Form erkennen. Nichtaktivierte Thrombozyten haben die typische diskoidale Form. Entweder durch Adhäsion an das Subendothel (Kollagen) oder durch lösliche Stimulanzen (ADP, Thrombin) werden Thrombozyten aktiviert und bilden sogenannte Astropherozyten, so dass sich ihr Durchmesser von 3 auf bis zu 13µm vergrößert (48).

3. Leukozyten

Leukozyten oder weiße Blutzellen (gr. leukos=weiß) sind in drei Typen unterteilt: Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Alle Zelltypen sind an Immun- oder Entzündungsprozessen beteiligt. Die Gesamtleukozytenzahl bei Mäusen liegt bei $2-10 \times 10^9/L$. Bei Mäusen machen Lymphozyten mit 60-90% aller Leukozyten den größten Bestandteil der weißen Blutzellen aus. Man spricht von einem lymphozytären Blutbild. Beim Menschen dagegen bestimmen Granulozyten mit 50% aller Leukozyten das weiße Blutbild (granulozytäres Blutbild). Granulozyten bei der Maus haben einen Durchmesser von 10-25µm und machen 5-20% ($0,5-3,0 \times 10^9/L$) aller Leukozyten aus. Monozyten machen zahlenmäßig mit $0,05-0,10 \times 10^9/L$ den kleinsten Anteil an Leukozyten aus (29, 35).

3.1. Bildung und Funktion von Leukozyten

Leukozyten bilden sich ebenfalls aus multipotenten Stammzellen im Knochenmark. Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten) stammen von lymphatischen Progenitorzellen ab. Granulozyten und Monozyten, sowie Thrombozyten und Erythrozyten stammen von myeloiden Progenitorzellen ab (24, 49).

Granulozyten, welche in Neutrophile, Eosinophile und Basophile Granulozyten aufgeteilt sind, besitzen neben ihrer unterschiedlichen Anfärbbarkeit der Granula auch unterschiedliche Aufgaben, dienen aber alle der unspezifischen zellulären Immunabwehr. Neutrophile Granulozyten gehören zu den Hauptvertretern der unspezifischen Abwehr, da sie am schnellsten und in großer Zahl verfügbar sind. Ihre wichtigste Funktion ist die Phagozytose, das Abtöten vieler (nicht aller) Arten von Bakterien und Aufräumen von Trümmern körpereigener Zellen (nach physikalischer Schädigung oder Ischämie) im Blut und Gewebe. Sie können am schnellsten von allen Leukozytenarten vom Blut in das Gewebe auswandern (Diapedese) und sind innerhalb von Minuten am Infektions- oder Nekroseherd. Dort ange-

kommen zerstören sie mit den Inhaltstoffen ihrer Granula (Enzyme und reaktive Sauerstoffverbindungen) Bakterien. Nach der Phagozytose sterben die Neutrophilen durch Apoptose ab und werden durch Makrophagen (Monozyten) beseitigt. Eosinophile Granulozyten zerstören auf ähnliche Art und Weise parasitäre Erreger und spielen eine wichtige Rolle im Verlauf allergischer Krankheiten. Basophile Granulozyten enthalten in ihren Granula Heparin und Histamin, welche im Entzündungsverlauf freigesetzt werden. Daneben kommt ihnen als Bildner verschiedener Mediatoren (z.B. der Leukotriene) eine Vermittlerfunktion während des Ablaufes von Entzündungen und allergischen Reaktionen zu (50).

Monozyten sind die größten Leukozyten (bis 20µm) und nach einer Halbwertszeit von 1-3 Tagen in der Blutzirkulation wandern sie in das Gewebe aus und differenzieren sich zu Makrophagen. Makrophagen können monatelang leben und fungieren im Gewebe als Wächter, die in der Lage sind Abwehrmaßnahmen einzuleiten und zu koordinieren. Sie kooperieren mit Neutrophilen während der Phagozytose und mit Lymphozyten während der Antigen-Präsentation. Außerdem stimulieren sie Zelltypen, die für die Wundheilung verantwortlich sind (24).

Lymphozyten sind verantwortlich für das immunologische Gedächtnis, die Produktion von Antikörpern und von Zytokinen (35, 51). Es gibt kleine, mittelgroße und große Lymphozyten (bis 15µm). Funktionell lassen sich drei verschiedene Populationen unterscheiden: B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen. B- und T-Lymphozyten sind Vertreter der spezifischen Abwehr.

3.2. Emigration der Leukozyten

Leukozyten sind Hauptauslöser pathologischer Entzündungen überall im Körper, wenn deren Aktivität und ihre Zunahme dysreguliert abläuft. Um an den Ort des Geschehens zu gelangen besitzen sie Moleküle auf ihrer Oberfläche (z.B. Integrine wie das Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 - LFA-1 (52)), die verantwortlich für die Interaktion mit dem Endothel oder anderem Gewebe sind (49, 53). Die Auswanderung von Leukozyten aus dem Blut in das umliegende Gewebe findet bevorzugt in den postkapillären Venolen statt. Bei einem Entzündungsgeschehen kann die Emigration enorm gesteigert werden. Im Rahmen einer Entzündung werden je nach Auslöser in erster Linie Neutrophile und Monozyten oder auch zytotoxische T-Lymphozyten rekrutiert. Die Emigration beginnt mit dem Rollen der Leukozyten auf dem Endothel. Botenstoffe aus dem Interstitium (Zytokine) aktivieren das Endothel und dieses präsentiert an der Gefäßinnenseite Zelladhäsionsmoleküle, Selektine und

Intergrine (54-56) (Tabelle1), die teilweise schon am Endothel vorhanden sind oder an die Außenseite der Endothelzellen transportiert oder neu synthetisiert werden müssen. Passende Selektin-Liganden auf der Leukozytenoberfläche vermitteln eine vorübergehende, lose Haftung, die durch die Scherkräfte des Blutstroms mehrfach wieder aufgerissen wird. Unter dem weiteren Einfluss von Zytokinen kommt es dazu, dass mehr und neue Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM = intercellular adhesion molecule-1) an der Endotheloberfläche exponiert werden (57-59). Chemokine, freigesetzt von Endothelzellen oder Immunzellen im Interstitium, aktivieren Integrine (CD18, LFA-1) (52, 53) an der Leukozytenoberfläche, die an Adhäsionsmoleküle an der Endotheloberfläche binden. Es kommt zur *Adhäsion* von Leukozyten an das Endothel (60). Unter der Vermittlung von weiteren Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 und ICAM-1 (52, 61, 62) können Leukozyten entweder zwischen zwei Endothelzellen hindurch oder durch eine Endothelzelle selber in Richtung Interstitium wandern (Diapedese, Transmigration). Dies ist für die meisten Leukozyten ein sogenannter „point of no return“. 10% der Neutrophilen Granulozyten, die das Endothel überwunden haben, können aber unverändert wieder in die Zirkulation zurückwandern (62). Die Transmigration von Leukozyten wird hauptsächlich von den randständig an Endothelzellen und auf den Leukozyten sitzenden Molekülen PECAM (platelet/endothelial cell adhesion molecule) (63, 64) und CD99 (65-67) vermittelt. Bei einer experimentellen Blockade dieser Moleküle findet keine Transmigration statt. Im Interstitium angekommen werden die Leukozyten von Chemokinen zum Ort des Geschehens (Entzündung) angelockt (53).

Tabelle 1: Ausgewählte Selektine und Intergrine auf Leukozyten und deren Vorkommen und Bindungspartner auf Endothelzellen.

<u>Leukozytenselektine (Struktur/Name)</u>	<u>Vorkommen</u>	<u>Bindungspartner auf Endothelzellen</u>
PSGL-1	neutrophile Granulozyten, Lymphozytensubpopulationen, Monozyten, natürliche Killerzellen	P-Selektin
ESL-1	neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, natürliche Killerzellen, basophile Granulozyten, Lymphozytensubpopulationen, Monozyten	E-Selektin
L-Selektin (Mel-14/CD62L)	neutrophile Granulozyten, Lymphozytensubpopulation, Monozyten	Gly CAM-1
<u>Leukozytenintegrine (Struktur/Name)</u>	<u>Vorkommen</u>	<u>Bindungspartner auf Endothelzellen</u>
LFA-1 (CD11a/CD18)	T-, B-Lymphozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten	ICAM-1, -2, -3
Mac-1 (CD11b/CD18)	Monozyten, neutrophile Granulozyten	ICAM-1, Fibrinogen
p150/ 95 (CD11c/CD18)	Monozyten, neutrophile Granulozyten	Fibrinogen
VLA-4 (CD49d/CD29)	T-, B-Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten, Muskelzellen	VCAM-1, Fibronectin
CD49d	T-, B-Lymphozyten	MAAd CAM-1, VCAM-1, Fibronectin

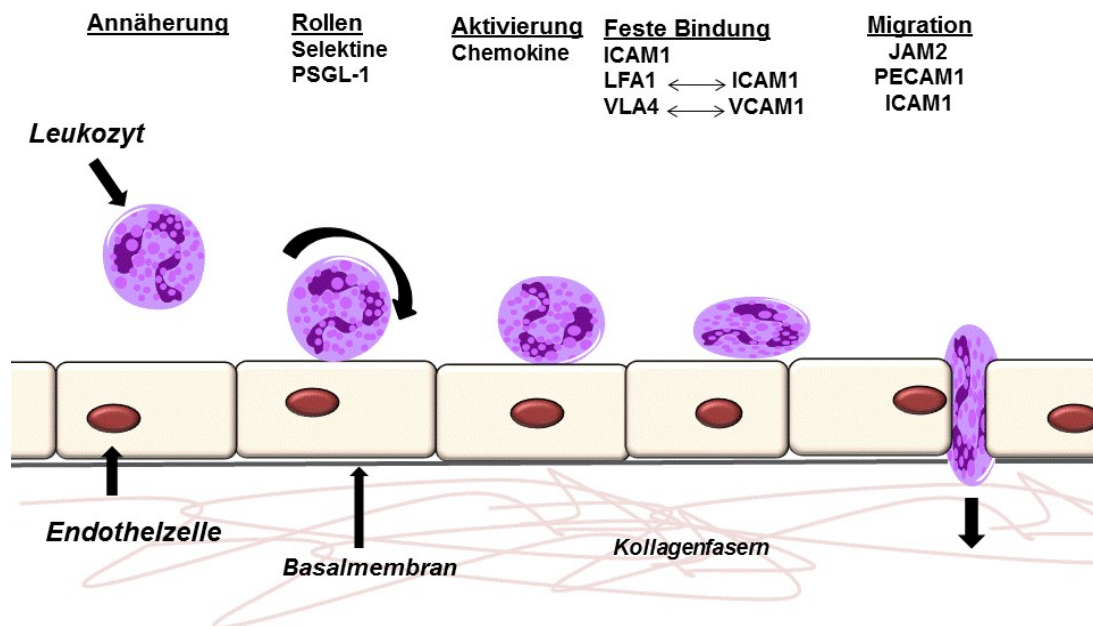


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Leukozytenadhäsion und Leukozytentransmigration. Die Annäherung, das Rollen, die Aktivierung, feste Bindung und Transmigration in das Gewebe werden von verschiedenen Rezeptoren auf den Leukozyten und dem Endothel vermittelt.

4. Signaltransduktion angeborener Immunrezeptoren – Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören zu den Pattern-Recognition Rezeptoren (PRRs) des angeborenen Immunsystems. TLRs erkennen Strukturen, die auf oder in Krankheitserregern (Bakterien, Viren und Pilzen) vorkommen, die sogenannten Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) (68, 69). Durch die darauf folgende Signaltransduktion werden Abwehrmechanismen gegen diese Krankheitserreger initiiert. Man kennt insgesamt 12 verschiedene murine und 10 humane TLRs (68, 70, 71). Die meisten TLR-Moleküle werden auf der Zelloberfläche exprimiert, während TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 im endosomalen Kompartiment vorgefunden werden. Die TLRs werden auf und in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert, wie Thrombozyten (72, 73), neutrophilen Granulozyten (74), Monozyten und Endothelzellen (75). Durch die Kombinationen von verschiedenen TLRs wird die Erkennung einer Vielzahl von Erregern bzw. mikrobiellen Komponenten ermöglicht (76).

Tabelle 2: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden, modifiziert nach (70, 76). * in der Maus nicht vorhanden

Rezeptor	Ligand	Herkunft der Liganden
TLR1, 2 und 6	Lipo-, Glycol- und Acyl-Peptide	gram-positive, gram-negative Bakterien, Mykobakterien
TLR3	dsRNS	Viren
TLR4	Lipopolysaccharide, endogene Liganden (nach Gewebeschädigungen: heat shock protein, extrazelluläre Matrix Komponenten)	gram-negative Bakterien
TLR7 und 8 (lokalisiert in Endosomen)	ssRNS	Viren
TLR9 (lokalisiert in Endosomen)	dsDNS	Viren
TLR11	nicht bekannt, Profilin	uropathogene Bakterien, <i>Toxoplasma gondii</i>
TLR10*, TLR12,TLR13	nicht bekannt	nicht bekannt

Bis auf TLR3 signalisieren alle TLRs über das Adapterprotein myeloid differentiation primary response gene 88 (MYD88). Zu den vier wichtigsten Adapterproteinen gehören MYD88, TIRAP (TIR-domain containing adaptor protein), TRIF (TIRAP inducing IFN- β) und TRAM (TRIF-related adapter molecule). Über diese Adapterproteine wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die die Regulierung einer Vielzahl von proinflammatorischen Genen bestimmt (70, 76, 77). Dadurch werden nicht nur inflammatorische sondern auch prothrombotische Vorgänge induziert (78, 79). Die jeweiligen Adapter werden in verschiedenen Kombinationen von verschiedenen TLRs verwendet. Da die meisten TLRs über MYD88 die Signaltransduktion starten, wird in einen MYD88-abhängigen Signalweg und einen MYD88-unabhängigen / TRIF-vermittelten-Signalweg unterteilt. Ob das angeborene

Immunsystem bei der Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten an das Endothel eine Rolle spielt wird in dieser Arbeit mittels *Myd88*- und *Trif*-defizienten Mauslinien und intravitalmikroskopischen Untersuchungen erforscht.

4.1. Der MyD88-abhängige Signalweg

Das Adapterprotein MyD88 tritt nach der Interaktion von TLRs und PAMPs über seine TIR-Domäne mit der TIR-Domäne des TLR in Wechselwirkung. Über seine N-terminale „Todesdomäne“ (zuerst bei Proteinen gefunden, die in Apoptoseprozesse involviert sind) bindet und aktiviert MYD88 die IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase 4 (IRAK 4), was zur Phosphorylierung von IRAK 1 führt. IRAK 1 und IRAK 4 bilden anschließend einen Komplex mit TRAF 6 (Tumor Nekrose Faktor Rezeptor assoziierter Faktor 6). Über weitere komplexbildende Prozesse wird der in den Zellen ruhende Transkriptionsfaktor NF- κ B (Nuclear Faktor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-Cells) aktiviert und kann so in den Zellkern einwandern und die Transkription von Genen inflammatorischer Zytokine induzieren (70, 80).

4.2. TRIF - der MyD88-unabhängige Weg

Eine intrazelluläre Signaübertragung nach Stimulation von z.B. viraler RNS über TLR3 scheint völlig unabhängig von MYD88 zu sein. Nach der Stimulation wird hier das TIR-Domäne-enthaltende IFN- β -induzierende Adaptermolekül TRIF an die TIR-Domäne des TLR rekrutiert. Es werden andere Kinasen aktiviert, um letztendlich den Transkriptionsfaktor IRF-3 zu aktivieren (70).

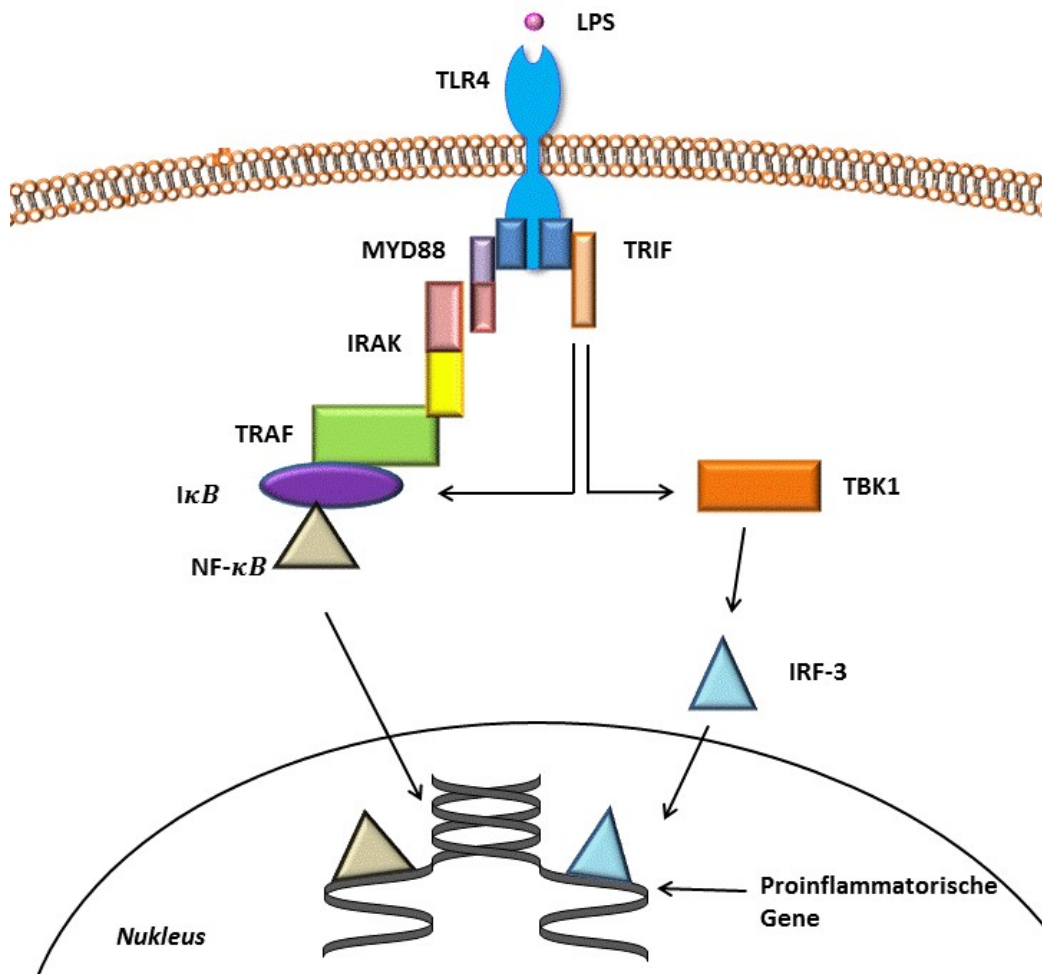


Abbildung 2: Schematische Darstellung des MYD88-abhängigen und MYD88-unabhängigen (TRIF)-Signalwegs. Durch die Bindung des Bakterienbestandteils LPS wird der Toll-like Rezeptor 4 aktiviert und bindet mit seiner „Todesdomäne“ an die Adaptermoleküle MYD88 oder TRIF. Durch den MYD88-Signalweg wird über Kinasen der Transkriptionsfaktor NF-κB und durch den TRIF-Signalweg der Transkriptionsfaktor IRF-3 aktiviert. Dadurch werden proinflammatorische Gene transkribiert und eine angeborene Immunantwort ausgelöst.

5. Hämostase

Hämostase ist die Blutstillung durch einen Thrombus, der an der Gefäßinnenseite entsteht (48). Sobald die Gefäßwand in irgendeiner Art und Weise verletzt wird, sorgen die Gefäßwand, Thrombozyten (TZ) und Gerinnungsfaktoren für einen Stillstand des Blutflusses an der Verletzungsstelle, um einen übermäßigen Blutverlust zu verhindern (48, 81). Es wird zwischen primärer und sekundärer Hämostase unterschieden. Bei der **primären Hämostase** lagern sich auf der Wunde immer mehr Thrombozyten zu einem sogenannten weißen Thrombus zusammen, der die Verletzung abdichtet. Bei der Verletzung der Endothelwand werden subendotheliale Matrixprotein (z.B. Kollagen) freigelegt. Aus dem verletzten Endothel wird von Willebrand Faktor (vWF), der normalerweise im Endothel und in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert ist (48, 82, 83), freigesetzt, der an das subendotheliale Kollagen und gleichzeitig an den Glykoproteinkomplex GP Ib/IX/V auf der Thrombozytenoberfläche bindet (84). Die freigelegten Kollagenstrukturen interagieren zusätzlich direkt (also ohne vWF als Bindeglied) mit GP Ia/IIa und GPVI auf der Thrombozytenoberfläche. Dadurch können die Thrombozyten am Endothel entlang rollen (Thrombozytenadhäsion). Durch die Bindung von vWF an GPIb/IX/V sowie geringe Thrombin-Mengen werden die Thrombozyten aktiviert. Es kommt zu einer Formänderung der runden Thrombozyten zu stacheligen Thrombozyten (Ausbildung von Pseudopodien) und der Aktivierung des Glykoproteinrezeptors GPIIb/IIIa (85, 86), welcher Fibrinogen bindet und dadurch die Thrombozyten vernetzt (87, 88). Neben der Freisetzung von Thromboxan A_2 (TX_2) und Serotonin, welche die Thrombozytenaggregation verstärken und vasokonstriktorisch wirken, kommt es zusätzlich zu einer Sekretion von Granula, Expression und vermehrten Produktion von von Willebrand Faktor, Platelet activation factor (PAF), P-Selektin, ICAM-1, IL-8 und TNF α (42, 89). Diese Moleküle vermitteln die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten. Zur Überprüfung der primären Hämostase kann man die **Blutungszeit** bestimmen, die vorwiegend zur Einschätzung der Thrombozyten Funktion dient.

Die primäre Hämostase sorgt zwar für eine Abdichtung der Gefäßverletzung aber sie ist instabil und wird erst nach Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade während der **sekundären Hämostase** zu einem stabilen Wundverschluss. Dies wird durch das Zusammenspiel vieler Gerinnungsfaktoren durch die Aktivierung von Thrombin, das Fibrinogen in Fibrin umwandelt, erreicht. In dem neu gebildeten Netz aus Fibrin werden weitere Blutzellen (Erythrozyten, Leukozyten) gefangen und es kommt zu einem roten

Thrombus. Bei der sekundären Hämostase werden drei Phasen nacheinander durchlaufen: 1. Die **Aktivierungsphase** beinhaltet sämtliche Schritte der Gerinnungskaskade bis zur Bildung des Thrombins. 2. Während der **Koagulationsphase** wird mithilfe von Thrombin ausgehend von Fibrinogen das Fibrinnetz gebildet. Durch den Faktor XIIIa (fibrinstabilisierender Faktor) wird das Netz kovalent verknüpft. 3. In der anschließenden **Retraktionsphase** kontrahiert sich das Fibrinnetz unter Beteiligung der Thrombozyten und die Wundränder nähern sich einander an (29).

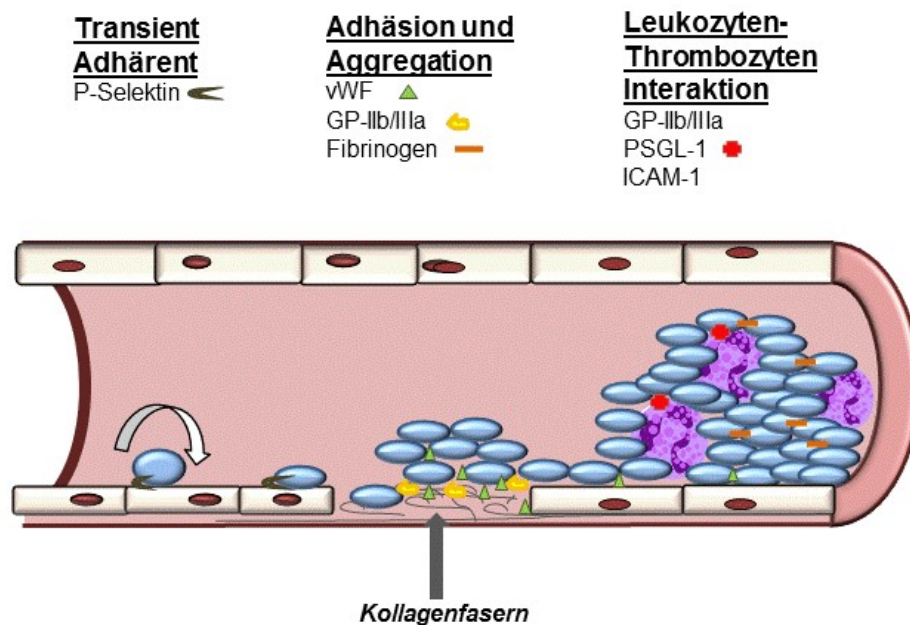


Abbildung 3: Schematische Abbildung der Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation an das Endothel über P-Selektin, vWF (Von Willebrand Faktor), GP-IIb/IIIa (Glykoprotein IIb/IIIa), Fibrinogen und Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion über GP-IIb/IIIa, PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand 1) und ICAM-1 (Interzelluläres Adhäsions Molekül 1). Die Thrombozyten-aggregation sowie die Interaktion zwischen Thrombozyt und Leukozyt wird durch Integrine, Selektine sowie durch lösliche Liganden vermittelt.

5.1. Gerinnungskaskade

Das Gerinnungssystem wird durch exogene (sich außerhalb des Gefäßlumens befindenden, extrinsischen, extravasalen) Faktoren aktiviert. Die endogenen (sich innerhalb der Gefäßwand befindenden, intrinsischen, intravasalen) Faktoren dienen in erster Linie der Verstärkung der Blutgerinnung. Man spricht in diesem Zusammenhang von der Kontaktaktivierung, da das endogene/intrinsische System durch Bindung von vier Kontaktfaktoren an negativen Ladungen der subendothelialen Matrix und aktivierten Thrombozytenoberfläche in Gang gesetzt wird (29, 48). Die Gerinnungskaskade ist ein komplexes enzymatisches System von

Serinproteasen, welches in Thrombin- und Fibrinbildung und somit in der Konsolidierung des plättchenreichen Thrombus mündet. Nach Kontaktaktivierung aktiviert der Faktor XIIa über Faktor XIa den Faktor IXa, der zusammen mit Faktor VIIIa und Faktor X den Xase-Komplex bildet (90, 91). Die im Blut zirkulierenden Gerinnungsfaktoren kommen infolge einer Gefäßverletzung mit subendothelialen Zellen (z.B. Muskelzellen oder Fibroblasten) und deren Membranproteinen in Kontakt. Eine besondere Rolle spielt in diesem Zusammenhang der Tissue Faktor (Gewebethromboplastin, Faktor III), ein Protein welches in gesunden Gefäßen in den Fibroblasten der Adventitia vorkommt (92-97). Es wird von perivaskulären und epithelialen Zellen konstitutiv exprimiert und spielt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der Hämostase (48). Auch in anderen Zellen (Leukozyten, Thrombozyten) und auf zirkulierenden Mikropartikeln (leukozytären Mikropartikeln, thrombozytären Mikropartikeln) kann die Bildung von Tissue Faktor durch Entzündungsmediatoren induziert werden (94, 95, 98-104). Faktor VII (Prokonvertin) bindet an Tissue Faktor und wird dadurch aktiviert (Faktor VIIa) (105). Die volle Aktivität erlangt dieser Gewebethromboplastin-VIIa-Komplex erst durch die Ca^{2+} -vermittelte Bindung an Phospholipide auf der Plasmamembran aktivierter Thrombozyten und kann daraufhin Faktor X (Stuart-Prower-Faktor) aktivieren (86). Faktor Xa bildet in Anwesenheit von Ca^{2+} an der Thrombozytenoberfläche einen Komplex mit Faktor Va, der als sogenannte Prothrombinase das inaktive Prothrombin (Faktor II) in aktives Thrombin (Faktor IIa) überführt (105, 106). Zudem aktiviert der Gewebethromboplastin-Faktor-VIIa-Komplex das intrinsische System über Faktor IX, wodurch die Thrombinproduktion enorm gesteigert wird (107). Die extrinsischen und intrinsischen Systeme laufen mit der Aktivierung des Prothrombinase-Komplexes in einer gemeinsamen Endstrecke zusammen. Der Gewebethromboplastin-Faktor-VIIa-Komplex spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung arterieller und venöser Thrombosen (108, 109). Das Enzym Thrombin besitzt viele wichtige Aufgaben in der Gerinnungskaskade: Es spaltet Fibrinogen zu Fibrin, wodurch quervernetztes Fibrin und somit ein stabilerer Thrombus gebildet wird. Des Weiteren aktiviert es Faktor V, Faktor VIII und Faktor XI, sowie Thrombozyten und steigert durch eine positive Rückkopplung die Aktivierung des intrinsischen Systems.

5.2. Thrombosen

Unter Thrombose versteht man den vollständigen oder teilweisen Verschluss von Arterien und Venen sowie der Herzhöhlen durch Bildung von Thromben (Blutkoageln) aus Thrombozytenaggregaten und Fibrin. Rudolf Virchow hat die ursächlichen Faktoren, die zur Bildung eines venösen Thrombus führen 1856 beschrieben (Virchow-Triade). Er führt dabei Veränderungen an der Gefäßwand (Endothelschaden), der Blutzusammensetzung

(Hyperkoagulabilität) und der Blutströmungsgeschwindigkeit (Stase) als Auslöser an (110). Gefäßwandänderungen im Sinne von strukturellen und funktionellen Veränderungen des Endothels und der darunterliegenden Basalmembran im Rahmen einer Atherosklerose (Arterienverhärtung), durch Traumen, exogene Substanzen (z.B. bakterielle Toxine, Chemotherapeutika), endogene Substanzen (z.B. durch eine Hypercholesterinämie) oder durch erhöhte mechanische Belastungen (z.B. Hypertonus), können Thrombosen auslösen. Änderungen der Blutzusammensetzung durch Hyperkoagulabilität, Änderung der Zellzahl und der Zellzusammensetzung im Blut sowie Änderung des Plasmas (z.B. Antithrombin-III-Mangel), gehen mit einer Thromboseneigung einher. Auch Störungen in der Hämodynamik im Rahmen einer verlangsamten Blutströmung (Stase) durch Bettruhe, Ruhigstellung von Gliedmaßen oder längere Flugreisen können typische Auslöser für die Entstehung einer Thrombose sein (111). Venösen Thromben liegen häufig primäre Störungen des Gerinnungssystems, sowie die Verlangsamung der Blutströmungsgeschwindigkeit zugrunde, während arterielle Thromben meist nach Endothelverletzungen oder nach Einbringen von thrombogenem Material in das Gefäßlumen entstehen (112).

5.3. Das Konzept der Immunothrombosen

Hämostase und die Bildung von Thromben ist ein physiologischer Abwehrmechanismus des Immunsystems und die lokale Aktivierung der Koagulation spielt eine wichtige Rolle in der frühen unspezifischen Immunantwort bei Infektionen (6, 113). Unter normalen Umständen sind sowohl Koagulation und Immunreaktion herabreguliert. Sobald ein pathogener Erreger erkannt wird, werden beide Systeme aktiviert. Neutrophile Granulozyten sind die ersten, die Erreger im Blut erkennen und haben ebenfalls eine Beteiligung an thrombotischen Prozessen. Dies verbindet die Koagulation mit der Abwehr von Bakterien. Während systemischer Infekte kommt es zur Aktivierung von Neutrophilen und deren Interaktion mit Thrombozyten in der mikrovaskulären Strombahn (z.B. in der Leber). Ein fibrinreicher Thrombus entsteht. Außerdem können Neutrophile eine Art Gerüst aus DNS und Nukleosomen im extrazellulären Raum ausbilden, sogenannte Neutrophil Extracellular Traps (NETs) (114), das Bakterien erkennen, in Schack halten und zerstören kann (6, 115-117). Mit beginnender Koagulation werden antimikrobielle Peptide (AMPs) von Thrombozyten generiert und freigesetzt. Die Fähigkeit der Koagulation und ihrer Mitspieler die Verbreitung von Erregern zu unterdrücken zeigt, dass Thrombosen in der mikrovaskulären Strombahn eine physiologische Rolle bei der Infektabwehr spielen. Läuft die Immunothrombose aber unkontrolliert oder überschießend ab (z.B. bei der bakteriellen Sepsis), sind die dann entstehenden Thrombosen eine pathologische Symptomatik der auslösenden Krankheit.

5.4. Mausmodelle der Thrombusbildung

Mausmodelle zur Thrombusbildung sind sehr gut für in vivo Experimente geeignet, da die Anatomie der Maus als Säugetier dem Menschen ähnelt und ihr Genom sich gezielt manipulieren lässt. *In vivo* Thrombosemodelle in der Maus werden zur Erforschung arterieller, venöser und mikrovaskulärer Thrombosen genutzt (118). Die jeweiligen Methoden sind sehr unterschiedlich und haben Vor- und Nachteile (119). Je nach Fragestellung werden Modelle basierend auf mechanischer (120), elektrischer (121), photochemischer (122) oder chemischer (123) Endothelverletzung ausgewählt. Welches Modell angewandt wird hängt von den jeweiligen Mechanismen ab, die letztendlich zu einer Thrombusbildung führen und untersucht werden sollen. Obwohl die Entstehung eines Thrombus nur künstlich herbeigeführt werden kann, ähneln die Thromben, die dabei entstehen, Thromben die z.B. beim koronaren Syndrom im Menschen gefunden werden (124, 125).

5.4.1. Arterielle Thrombosemodelle

Arterielle Thrombosemodelle basieren hauptsächlich auf Thrombozyten-aktivierung verursacht durch eine Endothelverletzung oder direkte Aktivierung des Endothels. Dies kann durch mechanische, elektrische, photochemische oder chemische Einflüsse bewirkt werden. Bei Mäusen untersucht man häufig die *A. carotis communis*, die *A. femoralis* oder die Arteriolen des Mesenteriums oder des Cremastermuskels. In dieser Arbeit wurde für das arterielle Thrombosemodell die *A. carotis communis* ausgewählt.

5.4.1.1. Chemische Endothelverletzung: Eisen-III-chlorid

Das Eisen-III-chlorid (FeCl_3) Modell ist ein Modell, um eine schnelle und zuverlässige Thrombusbildung hervorzurufen. Es wurde an Schweinen und Ratten etabliert und anschließend für die Maus modifiziert (126). Ein in FeCl_3 getränktes, 1mm^2 großes Filterpapier wird für 3 Minuten lateral an die *A. carotis communis* gelegt. Das FeCl_3 reagiert mit der Basalmembran des Endothels und mit der Erythrozytenmembran. Das Endothel und Erythrozyten können aktivierte Thrombozyten binden und die Thrombusbildung wird eingeleitet (127). Das FeCl_3 Modell ist ein Modell, um schnell und einfach einen okklusiven Thrombus zu generieren. Es eignet sich zur Ermittlung der Gefäßverschlusszeit, das heißt der Zeit, die zwischen Beginn der Applikation des FeCl_3 getränkten Filterpapiers und dem vollständigen Verschluss des Gefäßes verstreicht. Eine gute Standardisierbarkeit dieses Modells wird durch eine möglichst schonende Präparation der Arterie erreicht. Dieses Modell wurde in der vorliegenden Arbeit benutzt um die Thrombusbildung in der *A. carotis communis* zu untersuchen.

5.5. Mausmodelle zur Untersuchung der Mikrozirkulation

Die mikrovaskuläre Strombahn ist die Endstrombahn der Gefäße und versorgt alle Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen (28, 29). Um die Interaktionen von Blutbestandteilen mit dem Endothel zu untersuchen, werden *in vivo* Versuche an der Mikrozirkulation des Dünndarms herangezogen. Die mikrovaskuläre Strombahn kann an sämtlichen Organen wie unter anderem dem Gehirn (128), in der Leber (129), den Nieren (130), im Mesenterium (131) und auch in Tumoren (132) untersucht werden. Das erste und heute immer noch häufig angewendete Mikrovaskulaturmodell ist an der Mikrozirkulation des *Musculus cremaster*. Die einfache Präparation und Visualisierung der Mikrozirkulation dieses Muskels machen dieses Modell zu einem gut standardisierbaren und einfachen Modell (133).

5.5.1. Ischämie-Reperfusionmodell

Eine weitere Fragestellung ist, wie sich Thrombozyten und Leukozyten nach der Okklusion eines arteriellen Gefäßes über einen bestimmten Zeitraum verhalten. Ischämie eines Gewebes führt zu einer Ansammlung und Aktivierung von Thrombozyten im ischämischen Bereich (134). Thrombozyten setzen nach ihrer Aktivierung Sauerstoffradikale, Thromboxan A₂, Serotonin, Komplementfaktoren (135) und Platelet Factor 4 frei (136, 137, 138). Daher kann die Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten die Schädigung von Endothelzellen deutlich verschlimmern, indem sie zusätzlich Leukozyten an den Ort der Verletzung rekrutieren (42). Mit einem Ischämie-Modell soll erforscht werden, was die Mechanismen dafür sind. Mittels Ligatur oder Abklemmen der Gewebe-versorgenden Arterien wird eine fokale Ischämie erreicht (139). Für eine komplette Reperfusion des Gewebes darf die Arterie, die temporär verschlossen wird, nicht beschädigt werden, damit kein Thrombus entsteht. Damit es aber zu einer vollständigen Ischämie kommt, darf der Gefäßclip keinen Blutfluss mehr passieren lassen. Ischämie-Modelle werden je nach Interesse an verschiedenen Organen durchgeführt. Am Gehirn (139), den Nieren (140), dem Myokard (141) und am Mesenterium (142, 143).

5.5.1.1. Mesenteriales Ischämie-Reperfusionsmodell

Da in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen der Mikrobiota im Magen-Darm-Trakt und Thrombusbildung mittels Intravitalmikroskopie untersucht wird, ist die Mikrozirkulation des Darms hier in besonderem Fokus. Das in dieser Studie eingesetzte Modell ist ein Ischämie-Reperfusionsmodell an mesenterialen Gefäßen. Es ist ein hervorragendes Modell um die Auswirkung einer Ischämie und den anschließenden Reperfusionsschaden in den kleinsten Gefäßen des Darmes darzustellen (144, 145). Durch das Abklemmen der zuführenden Arterie

Arteria mesenterica superior entsteht eine vollständige Ischämie des kompletten Dünndarms und des proximalen Teils des Dickdarms (135, 146-148). Es wird ein Mikrogefäßclip eingesetzt damit das Gefäß so wenig wie möglich verletzt wird. Wichtig bei dieser Methode ist vor allem das vorsichtige Präparieren. Durch unvorsichtige Präparation können Gefäße verletzt und das Endothel aktiviert werden. Dieses Modell eignet sich sehr gut zur Imitation eines Mesenterialinfarktes. Mit diesem Modell lassen sich die Effekte einer Ischämie und einer anschließenden Reperfusion in den mesenterialen Gefäßen untersuchen. Durch eine Ischämie und den daraus resultierenden Sauerstoff- und Nährstoffmangel können je nach Länge der Ischämie und Art des umliegenden Gewebes schwere Schäden an Gefäßen und dem Gewebe entstehen. Eine anschließende Reperfusion sorgt erst einmal nicht zur Besserung des Zustandes sondern kann die Gewebsverletzung weiter verschlimmern (149).

6. Mikrobiota des Intestinaltraktes

Der Verdauungstrakt aller Säugetiere ist von einer Vielzahl an Mikroorganismen (Mikrobiota) besiedelt. Das Maus-Mikrobiom ist funktionell mit 95% fast identisch mit dem des Menschen. Aber nur 4% der im Maus-Mikrobiom vorhandenen mikrobiellen Spezies sind tatsächlich mit dem Mikrobiom des Menschen identisch (150). Die Mikrobiota besteht aus ca. 10^{13} Mikroorganismen, hauptsächlich aus anaerob lebenden Bakterien (151). Dabei handelt es sich um mindestens 1000 verschiedene bekannte Bakterienarten mit mehr als 3 Millionen Genen (150 x mehr als das humane Genom). Die Mikrobiota kann im menschlichen Körper bis zu 2 kg ausmachen. Ein Drittel der gesamten Darmmikrobiota ist in allen Menschen gleich, die anderen 2/3 sind individuell unterschiedlich (152). Somit hat jedes Individuum seinen eigenen mikrobiellen „Fingerabdruck“. Die normale mikrobielle Flora ist relativ stabil mit verschiedenen Spezies, die verschiedene Körperregionen besiedeln. Die Mikrobiota kann dem Wirt behilflich sein (Schutz vor Pathogenen und Herstellung von Nährstoffen), kann dem Körper aber auch schaden (Karies oder Abszesse) oder sie existiert als Kommensale (sie besitzt weder schützende noch schadende Eigenschaften) (153, 154). Durch die Vielzahl an Aufgaben, die sie übernimmt, kann sie als ein weiteres Organ im Körper betrachtet werden.

6.1. Schutzfunktion der Mikrobiota

Mikrobiota haben eine wichtige Rolle der Reifung des Immunsystems und durch die Besiedlung des Intestinaltraktes mit mikrobiellen Gemeinschaften wird der Wirt gegenüber pathogenen Erregern geschützt, indem sie sich wie Schutzfilm über der Mukosa des Darmes legt und mittels Enzyme krankmachende Mikroorganismen eliminiert (153, 155, 156).

Tatsächlich wird die Produktion von Mukus, der pathogene Bakterien daran hindert in die Darmwand einzudringen und diese zu schädigen, durch die Kolonisierung mit Darmbakterien in Goblet Zellen gefördert (157). Die Besiedlung mit unterschiedlichen Bakterien führt zu einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Mukusschicht auf der Darmmukosa (158). Studien mit keimfreien Tieren zeigen, dass diese Mäuse eine reduzierte Anzahl von Immunglobulinen A gegenüber Mäusen mit einer Darmflora besitzen (159). Die Kolonisierung mit Bakterien stimuliert dendritische Zellen, die dann wiederum das erworbene Immunsystem stimulieren, was zur verstärkten Synthese von Immunglobulin A führt. Diese Immunglobuline können gegen eine Infektion mit pathogenen Bakterien und Viren schützen (160). Durch die Fermentierung von Nahrungsbestandteilen durch Bakterien sinkt der pH im Kolon und schützt so vor Pathogenen. Des Weiteren entsteht eine Schutzfunktion gegenüber pathogenen Bakterien dadurch, dass fakultative Anaerobier den Sauerstoff im Darmlumen verbrauchen und somit nur obligate Anaerobier weiter *distal* leben können (161). Die Fermentation von Fasern durch Bakterien im Darm führt zu einer erhöhten Produktion von kurzkettigen Fettsäuren (Butyrat, Propionat und Acetat). Kurzkettige Fettsäuren können direkt die Hämatopoese von dendritischen Zellen im Knochenmark stimulieren. Dendritische Zellen sind unter anderem auch für die Phagozytose in Geweben zuständig und können so Erreger eliminieren (162).

6.2. Herstellung von Metaboliten durch die Mikrobiota

Die Mikrobiota liefern dem Körper Energie durch den Verdau von ansonsten unverdaulichen, aus Pflanzen stammenden, langkettigen Kohlehydraten. Durch den Abbau von Kohlenhydraten durch Bakterien im Dickdarm werden kurzkettige Fettsäuren hergestellt (163). Diese werden schnell und einfach vom Wirt umgesetzt (2, 12, 164-168). Butyrat ist die bevorzugte Energiequelle der Enterozyten und reguliert die Zelldifferenzierung und –proliferation der Darmmukosa (169, 170). Bakterien der Familie *Lachnospiraceae* und *Clostridien* stellen den Hauptanteil des Butyrats her (171, 172). Das Darmepithel ist eine hoch selektive Barriere. Sie verhindert einen Übertritt von Toxinen und proinflammatorischen Molekülen in die systemische Zirkulation. Ihr Schutz und Instandhaltung ist daher essentiell (173). Nahrungsproteine, Proteine aus Pankreasenzymen und vom Magen-Darmtrakt sezernierte Muzine sind ebenfalls wichtige Substrate für Bakterien im Darm (168, 174). Wieviel und welche Substrate von der Mikrobiota verarbeitet werden, hängt von der Zufuhr an Substraten und der Zusammensetzung der Mikroflora ab (175). Beispiele für die metabolischen Endprodukte sind Phenole und Indole, die durch die anaerobe Fermentation von aromatischen Aminosäuren entstehen (168, 176). Der Abbau von Proteinen bewirkt

einen pH-Anstieg im Dickdarm, was eine Vermehrung von Pathogenen begünstigen kann (176, 177).

6.2.1. Herstellung von Vitaminen durch die Mikrobiota

Kommensale Mikroorganismen im Magendarmtrakt sind im Stande Vitamine von Grund auf neu zu synthetisieren und somit den Wirt mit Vitaminen zu versorgen, die er selber nicht herstellen kann. Obwohl die meisten Vitamine mit der Nahrung aufgenommen werden, kann durch eine unausgewogene Ernährung ein Mangel an Vitaminen entstehen. *Lactobacillen* produzieren aus fermentierten Nahrungsmitteln im Dickdarm, die für den Körper sehr wichtigen, wasserlöslichen B-Vitamine. Ihre wichtigsten Vertreter sind Folsäure, Riboflavin und Vitamin B12 (Cobalamin). Vitamin B12 hat eine wichtige Rolle in verschiedenen Metabolismen wie zum Beispiel der DNS-Synthese und bei der Bildung von Blutzellen (178).

Auch das fettlösliche Vitamin K2 (Menachinon) wird von Bakterien im Dickdarm hergestellt. Vitamin K gehört zu einer Familie von Naphthochinonderivaten und kommt zudem als Vitamin K1 (Phyllochinon) in grünen Pflanzen vor (179). Vitamin K fungiert als Kofaktor für die in der Leber exprimierte Vitamin K-abhängige γ -Glutamylcarboxylase. Diese ist für die post-translationale Konversion von γ -Carboxylglutamylresten verantwortlich (180). Der Vitamin K-Zyklus ist essentiell für die Produktion der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X und der Gerinnungshemmer Protein C und Protein S. Im Knochen wird Vitamin K ebenfalls für die Synthese des Proteins Osteokalzin benötigt (11, 12, 181). Ein Mangel an Vitamin K und somit ein Mangel an der γ -Glutamylcarboxylase resultiert in einer Verminderung der Thrombingenerierung und einer Gerinnungsstörung (11). Da Darmbakterien im Stande sind Vitamin K zu synthetisieren und es dem Körper als wichtigen Kofaktor bereit zu stellen, wurden bereits 1950 Studien mit keimfreien Tieren im Zusammenhang mit der Vitamin K Synthese durchgeführt. Fütterungsexperimente mit keimfreien Ratten und Mäusen zeigten, dass sich die Kombination aus der Abwesenheit von Bakterien und einer Vitamin K-armen Diät stark auf Blutungsneigung auswirkt (182). Die Parameter zur Bestimmung der Blutungsneigung, Prothrombinzeit (105) und aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) sind bei keimfreien Tieren mit einer Vitamin K-armen Diät im Vergleich zu Tieren mit einer intakten Darmflora und einer Vitamin K-armen Diät verlängert (183).

Ein Vitamin K Mangel tritt bei Neugeborenen sehr viel häufiger auf als bei Erwachsenen. Gründe dafür sind, dass Neugeborene erst während und nach der Geburt mit Bakterien besiedelt werden, Vitamine nicht gut über die Plazenta transportiert werden und ihre Konzentration in der Muttermilch gering ist (184). Bei Neugeborenen kann es daher zwischen

den ersten 24 Stunden und 7 Tagen zu Vitamin K-abhängigen Blutungen kommen. Um das zu verhindern, wird Neugeborenen prophylaktisch ein synthetisch hergestelltes Vitamin K3 (Menadion) intramuskulär injiziert (185).

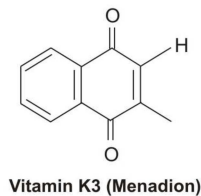
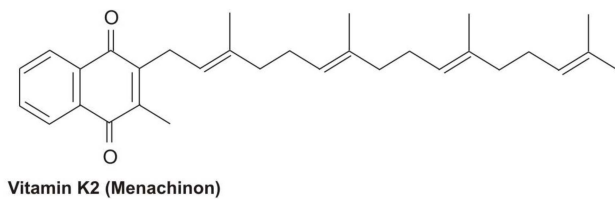
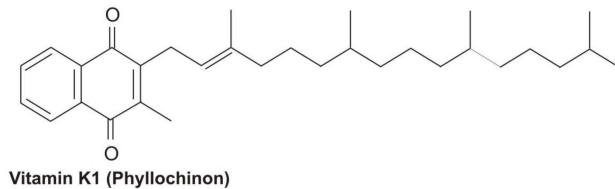


Abbildung 4: Struktureller Aufbau des Vitamin K1, K2 und K3

6.3. Einfluss der Mikrobiota auf die Ausprägung und Aktivierung des angeborenen Immunsystems

Bei der Geburt sind Säugetiere zuerst keimfrei, der Magendarmtrakt wird direkt nach der Geburt mit kommensalen Bakterien aus dem Geburtskanal, der Haut und Ausscheidungen der Mutter und der Umgebung besiedelt (186). Die meisten dieser Organismen sind für immunkompetente Wirte nicht pathogen. Sie übernehmen wichtige Funktionen für den Wirt. Versuche mit keimfreien Tieren zeigen, dass kommensale Bakterien für die normale Entwicklung eines voll funktionsfähigen Immunsystems notwendig sind (187). Das erworbene Immunsystem mit Antikörper-bildenden Zellen ist bei keimfreien Tieren unterentwickelt (188). Mit zunehmendem Alter verändert sich die mikrobielle Besiedlung aufgrund der funktionellen Erweiterung des Immunsystems des Darmes. Die Reifung des Immunsystems hängt von der Präsenz der jeweiligen kommensalen Bakterien ab (189-191). Kommensale Bakterien interagieren direkt mit der Mukosa des Darmtraktes und beeinflussen dadurch die Aktivierung und Ausprägung des Immunsystems. Die hohe Dichte an Bakterien im Darm führt zu einer ununterbrochenen Kommunikation zwischen Wirtszellen und

Mikroben. Das Immunsystem im Darm muss einerseits gegen pathogene Erreger direkt wirken, andererseits aber kommensale Bakterien tolerieren. Die intestinale Mikrobiota existiert in Balance mit dem Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe, welches das größte lymphatische Gewebe des Körpers darstellt. Mikroorganismen im Darm stellen die größte Antigenquelle dar, mit denen das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe kontinuierlich stimuliert wird. Dadurch entsteht eine Toleranz gegenüber unschädlichen Antigenen wie Nahrungsproteinen und Bakterien (192, 193). Dendritische Zellen, Makrophagen und Epithelzellen sind für die sofortige Immunantwort verantwortlich (194). Antigene werden von den dendritischen Zellen präsentiert und die Immunantwort wird entweder ausgelöst oder eine Toleranz gegen unschädliche Antigene entwickelt (195). Wird diese sogenannte „Immunhomeostase“ gestört, steigt die Anfälligkeit für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (IBD) (194, 196).

6.4. Mikrobiota und Krankheiten der modernen Gesellschaft

Bakterien der Mikrobiota übernehmen für den Körper wichtige Schutz- und Stoffwechselfunktionen. Dieser Kommensalismus hat aber nicht nur positive Wirkungen sondern kann dem menschlichen und tierischen Körper auch Schaden zufügen. Mit der Industrialisierung hat sich in entwickelten und sich entwickelnden Ländern das Verhalten und die Ernährung der Menschen verändert (197).

Der Einfluss der Mikrobiota auf Krankheitsbilder wie Diabetes (12, 198-201), Fettleibigkeit (2, 154, 198-200, 202), chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (14, 15, 194, 196, 203-206), Allergien (207) und auch Herz-Kreislaufkrankungen (198, 200, 208) hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. Da die Besiedlung des Darmes mit Bakterien und Pilzen stark von äußeren Faktoren wie der Art und Weise der Geburt (209), Ernährung (210), Bewegung (211), Stress, Hygiene (189) und der unmittelbaren Umgebung zusammenhängt, ist die Mikrobiota in jedem Individuum unterschiedlich. Ein Zusammenhang mit dem heutigen „life style“ und der Zunahme an diesen Krankheitsbildern ist belegt (212, 213).

Wird anstelle einer protektiven Funktion die Mikroflora eine dysregulierte und inadäquate Aktivierung von Immunzellen auslöst, kann es im Darm zu schweren Entzündungsreaktionen kommen. Eine spontane Entzündung des Darmes bei immundefizienten Mäusen (z.B. Interleukin 10-defizient) ist bei keimfreien Mäusen im Vergleich zu den konventionell aufgezogenen Kontrollen nicht möglich (214). Dies lässt vermuten, dass Darmbakterien einer der Auslöser für die Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sind (215, 216). Physiologisch reagiert das Immunsystem im Darm auf bakterielle Komponenten wie

Lipopolysaccharide (LPS) nicht mit einer Entzündung. Eine vorherige Exposition mit LPS schwächt die Reaktion auf eine zweite Exposition mit LPS *in vitro* und *in vivo* ab (217). Für die Erkennung des bakteriellen Bestandteils LPS ist der Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) verantwortlich (218). Durch die Anwesenheit von LPS wird dieser TLR von hemmenden Molekülen negativ reguliert (219-221) und hemmt somit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und die dadurch ausgelöste Entzündungsantwort und die Rekrutierung von Entzündungszellen.

Da das Immunsystem eng mit der Thrombusbildung verknüpft ist (Immunothrombose), wird in dieser Arbeit der Zusammenhang von Mikrobiota und angeborenen Immunmechanismen mit der Entstehung von Thromben untersucht.

6.4.1. Einfluss von Mikrobiota auf chronisch-entzündliche Darm-erkrankungen

Eine Assoziation zwischen der erhöhten Inzidenz von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Umweltfaktoren verbunden mit sozioökonomischer Entwicklung scheint unabhängig von den bekannten genetischen Risikofaktoren dieser Erkrankungen überall auf der Welt aufzutreten (204). Der Lebensstil in entwickelten Ländern könnte das natürliche Muster der Kolonisierung des Darmes mit Mikrobiota beeinträchtigen. Läsionen in der Darmmukosa entstehen unter anderem durch eine exzessive oder dysregulierte Immunantwort gegen kommensale Darmbakterien. Diese Kommensalen können eine Entzündung hervorrufen, die in prädisponierten Patienten das Krankheitsbild der IBD manifestieren (222). Zu den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gehören ulzerative Colitis und Morbus Crohn. Diese sind charakterisiert durch intestinale Blutungen, schwere Diarrhoe, abdominale Schmerzen und Gewichtsverlust (223-225). Welche Rolle die Mikrobiota in der Ausprägung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen spielen, zeigen Versuche bei denen Antibiotika gegen pathogene Bakterienstämme die Symptome abschwächen (226-229). Experimente mit immundefizienten Mäusen zeigen, dass die Ausbildung einer Colitis und die dafür verantwortlichen Bakterien über fäkale Transplantation übertragbar ist (230).

Patienten mit IBD haben ein 3 bis 6-fach höheres Risiko für das Entstehen eines Thrombembolismus im Vergleich zur Normalbevölkerung. Klinische Studien zeigen, dass das Vorkommen von Thrombembolien bei ungefähr 6% der IBD Patienten liegt. Obduktionsberichte zeigen aber 40% thrombembolische Vorfälle bei diesen Patienten (224, 231). Hämatologische Studien zeigen, dass vor allem Störungen in der Koagulation, Fibrinolyse und Plättchenfunktion dazu beitragen, dass dieses Krankheitsbild mit einem

prothrombotischen Status assoziiert ist (232). Hämatologische Veränderungen wie Anämie, Hyperkoagulabilität, Thrombozytose und Leukozytose (233) und eine erhöhte Thromboseneigung bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wurden in Kolitis Tiermodellen reproduziert (234, 235). Aufgrund der erhöhten Thromboseneigung der Patienten kann es zu einem oder mehreren Verschlüssen von Gefäßen des Darmtraktes (Infarkt) kommen (21). So kommt es zu einer akuten mesenterialen Ischämie (236) und somit einem Versorgungsabbruch mit Sauerstoff und Nährstoffen und bei unbehandelten Ischämien letztendlich zu einer Nekrose des betroffenen Gewebes. Auch stellt sich die Frage, ob ischämische Ereignisse nicht sogar einen Teil der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen darstellen (237).

Ob und wie sich die bakterielle Besiedlung des Darmes auf den Anstieg thrombembolischer Ereignisse auswirkt, ist zur Zeit noch unerforscht.

7. Gnotobiotik und der Hygienestatus von Labortieren

Die Bedeutung von Mikroorganismen für die Gesundheit aller Säugetiere, ob vorteilhaft oder schädlich, wurde schon sehr früh an Versuchstieren beobachtet. Pasteur, 1885, war der Meinung, dass ein Leben ohne Mikroorganismen im Körper nicht möglich sei (238). Pasteur, und später Nencki und Metchnikoff, forschten an Tieren mit und ohne Anwesenheit von Bakterien (35). 1895 konnten Nuttal und Thierfelder an der Universität von Berlin das erste keimfreie Tier, ein Meerschweinchen, herstellen (239-241). Nicht die Abwesenheit von Bakterien im Darmtrakt war das Problem für die Aufrechterhaltung keimfreier Tiere, sondern die Nährstoffunterversorgung im autoklavierten Futter. Fast weitere 50 Jahre dauerte es, bis die erste keimfreie Tierhaltung mit der Herstellung von sterilem Futter, Isolatoren und keimtötenden Mitteln etabliert wurde. Bengt Gustafsson beschrieb 1946 die Züchtung keimfreier Ratten mit von Trexler und Reynolds entwickelten Isolatoren (242). Die Herstellung und Haltung keimfreier Ratten und Mäusen wurde in den späten 1950iger Jahren zu einer üblichen Praxis (35). Gnotobiotische Tiere werden sowohl für die Forschung als auch für die Herstellung von speziellen pathogenfreien Zuchten eingesetzt. Die ersten Untersuchungen mit keimfreien Tieren bezogen sich auf die Physiologie, Ernährung und die Untersuchung des Metabolismus. Seitdem ist das keimfreie Tiermodell das bevorzugte Modell, um die Auswirkungen von Bakterien oder anderen Mikroorganismen auf physiologische Vorgänge zu untersuchen.

7.1. Definition

Gnotobiotik ist die Wissenschaft von Tieren, die unter definierten mikrobiologischen Bedingungen leben. Der Begriff Gnotobiotik ist aus den griechischen Wörtern γνῶσις = bekannt und βίωσις = Leben abgeleitet. Ein Gnotobiot ist ein Makroorganismus, der keimfrei ist oder nur von solchen Mikroorganismen besiedelt ist, die dem Untersucher genau bekannt sind (240, 243).

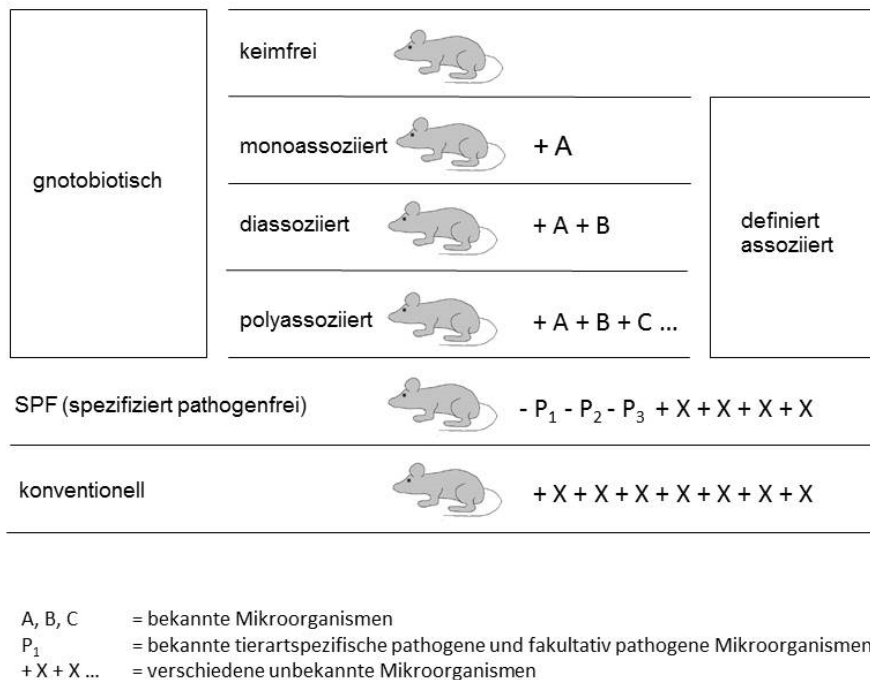


Abbildung 5: Einteilung von gnotobiotischen, definiert assoziierten, spezifiziert pathogenfreien und konventionellen Mäusen.

Gnotobiotische Tiere: Diese Tiere werden durch eine aseptische Hysterektomie (238) oder mittels Embryotransfer (244) in den keimfreien Zustand überführt und in keimfreien Isolatoren gehalten.

Keimfreie Tiere/Germfree (GF): Tiere die frei von allen derzeit nachweisbaren Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) sind. Das keimfreie Tier bedarf der absoluten Abschirmung in einem Isolator.

Assoziierte Tiere: Primär keimfreie Tiere, die mit Reinkulturen ein- oder mehrerer Mikroorganismen in Kontakt gebracht (kolonisiert) werden (mono-, di-, bzw. polyassoziierte Tiere). Auch assoziierte Tiere müssen unter definierten mikrobiellen Bedingungen in Isolatoren gehalten werden.

Um die Keimfreiheit bzw. die Assoziation mit einem oder mehreren Keimen gewährleisten zu können, müssen Tiere und Isolatoren in regelmäßigem Abstand auf ihren mikrobiellen (z.B. keimfreien) Status getestet werden (35, 240, 242).

Spezifiziert-pathogenfreie (SPF) Tiere: Tiere, die frei von Tierart typischen pathogenen und fakultativ-pathogenen Mikroorganismen (definiert z.B. von der FELASA) sind (der Umfang der Untersuchung und das Ergebnis des Gesundheitszeugnisses ist anzugeben). SPF Tiere werden in speziellen Barrierebereichen gehalten. Die absolute Isolierung in Räumen, die einem Barriersystem entsprechen, sichert die Pathogenfreiheit über einen möglichst langen Zeitraum. Eine zufällige Besiedlung ist bei dieser Haltung nicht zu verhindern. Die Aufrechterhaltung der Pathogenfreiheit muss nach FELASA- Richtlinien (245) regelmäßig geprüft werden (35, 240, 242).

Konventionelle Tiere: Tiere, die eine nicht definierte Besiedlung von Mikroorganismen enthalten, in der hier vorgelegten Doktorarbeit aber SPF-Status besitzen. Kontrollen beschränken sich prinzipiell darauf festzustellen, dass die Tiere keine klinischen Anzeichen einer Krankheit erkennen lassen und keine von der FELASA definierten Pathogene in sich tragen (offene Haltung ohne Barriere).

7.2. Morphologische Charakteristika keimfreier Mäuse

Durch eine angepasste adäquate Diät können GF Tiere genauso gut aufwachsen und leben wie die konventionell aufgezogenen Kontrolltiere. Nichtsdestotrotz gibt es physiologische und anatomische Unterschiede zu konventionellen Tieren. Diese Abweichungen sind vor allem offensichtlich an den Organen, die normalerweise in stetigen Kontakt mit Mikroorganismen kommen, vor allem im Magen-Darm-Trakt. Bei Nagetieren ist ein besonders großer Blinddarm (Zäkum) auffällig (238). Die Abwesenheit von Muzinen führt zu einer Akkumulation von Kolloiden (Teilchen), die anorganische Ionen abgeben. Dadurch ändert sich die osmotische Balance des Zäkums und Flüssigkeit sammelt sich innerhalb des Zäkums an (136). Das vergrößerte Zäkum kann bis zu 30% des Körpergewichts ausmachen. Ein vergrößertes Zäkum lässt sich nicht oder kaum bei keimfreien Vögeln und Schweinen beobachten. Bei allen GF Spezies ist das Bindegewebe und dessen Gefäßversorgung in der Darmwand dünner (246, 247). Darmzotten (Villi) haben bei keimfreien Tieren einen größeren Abstand zueinander und weisen eher eine „Fingerstruktur“ als der üblichen „Blattstruktur“ auf. Ein offensichtlicher Effekt, der durch die Besiedlung des Darms durch Bakterien hervorgerufen wird, ist die Verkürzung und Verdickung der Villusstrukturen im Dünndarm (248, 249). Weitere Unterschiede gibt es beispielsweise im kardiovaskulären System,

lymphatischen Organen und im Fettgewebe. Das Herzgewicht, das Blutvolumen und das Herzzeitvolumen sind bei GF Tieren reduziert (250). Lymphatische Organe wie Lymphknoten sind im Vergleich zu Mäusen mit einer intakten kommensalen Mikrobiota verkleinert (251). Außerdem können keimfreie Mäuse keine Diät-induzierte Fettleibigkeit entwickeln und haben im Gegensatz zu konventionell aufgezogenen Mäusen eine geringere Körperfettmasse (2, 202).

7.3. Physiologische, biochemische und immunologische Charakteristika keimfreier Mäuse

Durch die kleineren Herzen und das geringere Herzzeitvolumen ist der Sauerstoffverbrauch bei keimfreien Tieren geringer als bei konventionell aufgezogenen Tieren (250, 252). Obwohl der Sauerstoffverbrauch geringer und das für viele Stoffwechselwege wichtige Vitamin B1 in der Leber reduziert ist, ist der Kalorienverbrauch von keimfreien und konventionellen Tieren vergleichbar (253). Der reduzierte Sauerstoffverbrauch lässt sich aber nicht mit einer Reduktion der verstoffwechselten Energie, sondern wohlmöglich mit der geringeren Mobilität des Zäkums erklären (10). In der folgenden Tabelle wird aufgezeigt wie sich Stoffwechselwege oder Verhalten von GF zu CONV-R Tieren unterscheiden.

Tabelle 3: Tabellarische Übersicht von physiologischen, metabolischen und biochemischen Funktionen von keimfreien Tieren im Vergleich zu konventionell aufgezogenen Tieren.

<u>Funktion</u>	<u>GF vs. CONV-R</u>
Lokomotor Aktivität (254)	↑
Fressverhalten (255)	↑
Angstverhalten (254)	↓
Cholesterollowerstand (2, 256)	↓
Insulintoleranz (257)	↓
kurzkettigen Fettsäuren in Magen-Darm-Trakt (258)	↓
Aminosäurenmetabolismus (259)	↓
Verdauungsenzyme (260, 261)	↓
Angeborenes Immunsystem und Immunzellen (155, 188, 262, 263)	↓
Darmvaskularisierung (13, 249, 264)	↓

Zellerneuerung im Darm (264)	↓
-------------------------------------	---

Des Weiteren ist das Immunsystem von GF Tieren weniger gut entwickelt als das der CONV-R Tiere, kann aber gut mit einer Immunantwort auf eine mikrobielle Besiedlung reagieren. Die Reaktion auf endo- oder exogene Antigene ist vergleichbar, wenn überhaupt ein wenig langsamer als bei konventionell aufgezogenen Tieren (10). Alle Lymphknoten sind bei GF Mäusen vorhanden aber verkleinert (238, 246, 247, 265, 266). Interessanterweise haben frühere Studien gezeigt, dass die Rekrutierung von T-Zellen im Bereich der Darmmikrozirkulation in GF Mäusen verringert ist und die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) in kolonisierten Mäusen erhöht ist (22).

8. Zielsetzung dieser Arbeit

Mit dem keimfreien Mausmodell und der Intravitalmikroskopie soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Rekrutierung und Adhäsion von Immunzellen oder auch Thrombozyten von der Besiedlung des Darmes mit Mikrobiota abhängig ist. Durch den Einsatz der Intravitalmikroskopie kann *in vivo* beobachtet werden, wie sich die Ab- oder Anwesenheit von kommensalen Mikroorganismen als Umweltfaktor auf die Entstehung von Thrombosen auswirken kann.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialliste

1.1. Geräte

Tabelle 4: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Dispergiergerät	IKA T10 Basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Germany
Intravital-Videofluoreszenz-mikroskop	Intravital-Videofluoreszenz-mikroskop auf Basis des manuellen Forschungsmikroskops BX51WI	Olympus GmbH, Deutschland
Heizblock	Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Individual Ventilated Cages EU Typ 2 Norm	Green Line, SealSafe PLUS-Maus	Tecniplast Deutschland GmbH, Deutschland
Isofluran Vapor	Isofluran Vapor 19,3	Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland
Isolatoren	Flexible Film Isolator 3' x 2' x 2'; 4' x 2' x 2'; 5' x 2' x 2'	Class Biologically Clean, Ltd. - Madison, Wisconsin
Kamera	Camera Controller C1060000, Orca-R ²	Hamamatsu Photonics GmbH, Deutschland
Kühlschrank -20°C	Premium No Frost und Premium	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank 4°C	Comfort	Liebherr, Bulle, Schweiz

Gerät	Modell	Hersteller
Gefrierschrank -80°C	Hera Freeze BASIC	Thermo Scientific, Waltham,USA
Magnetrührer	Stirrer MR Hei-Standard	VWR, Darmstadt, Deutschland Heidolph, Schwabach, Deutschland
Minizentrifuge	Mini Star silverline	VWR, Darmstadt, Deutschland
pH-Meter	827 pH Lab	Metrohm Deutschland, Filderstadt, Deutschland
Photometer	Nanodrop	Thermo Scientific, Waltham,USA
Pipetten	Pipet Lite XPS LTS (1000, 100, 20, 10, 2)	Rainin über Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Pipettierhilfe	S1 Pipet Filler	Thermo Scientific, Waltham,USA
qPCR-Cycler	CFX96	Bio-Rad, München, Deutschland
Schwingkugelmühle	Tissue Lyser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Stereomikroskop	Olympus SZ51	Olympus Scientific Solutions Americas Inc, USA
Sysmex	Sysmex Microcellcounter XE-2100	Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland
Thermocycler	Vapo protect	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischnarkosegerät	UniVet Porta Tischnarkose-	Groppler Medtec GmbH,

Gerät	Modell	Hersteller
	gerät für Isoflurane	Deutschland
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waagen	R180 VWR-1502	Sartorius, Göttingen, Deutschland VWR, Darmstadt, Deutschland
Wärmeplatte	FMI Wärmeplatte	Föhr Medical Instruments GmbH, Deutschland
Wasserbad	WB-500	Digisystem Laboratory Instruments Inc., New Taipei City, Taiwan
Zentrifugen	Heraeus Fresco 21 Megafuge 16R 1814 Rotana RP	Thermo Scientific, Waltham, USA Thermo Scientific, Waltham, USA VWR Darmstadt, Deutschland

1.2. Instrumente

Tabelle 5: Instrumente

Instrumente	Hersteller
Schlundsonde, „Reusable Feeding Needles“	Fine Science Tools GmbH, Deutschland
Skalpelle	Feather, Osaka, Japan
Tail Acces Restrainer	Stoelting Wood Dale, USA, 2015
Microserrefine-Klemme 2mm Federbreite	Fine Science Tools GmbH, Deutschland
Dumont #5 Mirror Finish Forceps	Fine Science Tools GmbH, Deutschland

Instrumente	Hersteller
Dumont #5/45 Forceps - Dumoxel Standard Tip	Fine Science Tools GmbH, Deutschland
Vannas Spring Schere – 3mm	Fine Science Tools GmbH, Deutschland

1.3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
14 ml Röhrchen konisch einzeln steril	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
15 ml Falcon	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
2,0 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser rund	Thermo Scientific, Waltham, USA
Faden Ethicon Prolene Polypropylen 7-0, monofil	Johnson & Johnson Medical GmbH Ethicon, Deutschland
Hämatokrit Kapillare 130 µl	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Deutschland
Kanülen div. Größen	BD Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Klebeband, Leukofix, transparent	BSN medical, Deutschland
Latexhandschuhe Semper-care	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.H., Wien, Österreich
Mylar Folie	Class Biologically Clean, Ltd. Madison, Wisconsin
Pipettenspitzen (0,1-20 µl, 20-200 µl, 200-1000µl)	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter (0,1-20 µl, 20-200 µl, 200-1000µl)	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland

Verbrauchsmaterial	Hersteller
qPCR Platten	Bio-Rad, München, Deutschland
Safe Seals	Bio-Rad, München, Deutschland
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Spritzen 1 bzw. 2 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzen div. Größen	BD Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Stainless Steel Beads 7 mm	Qiagen, Hilden, Deutschland

1.4. Chemikalien

Tabelle 7: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acridin Orange MW 302	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Bovines Serum Albumin, Fraktion V	PAA, Cölbe, Deutschland
CFDA-SE (DCF), Dichlorfluoreszeindiacetat, #C-1157	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Clidox S Activator + Base	PRL Pharmacal, Naugatuck, USA
D(+)-Glukose wasserfrei	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eisen-III-Chlorid, FeCl ₃ # F7134	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NaOH 4 N	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitratlösung 3,13%	Eifelfango, Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PBS Phosphate-Buffered Saline	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Rhodamine B Isothiocyanat #R1755	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Salzsäure 6 N	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

1.5. Medien und Medienzusätze

Tabelle 8: Medien und Medienzusätze

Medien bzw. Zusätze	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
HEPES 1 M	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
PBS pH 7.4	Life technologies, Darmstadt, Deutschland

1.6. Primer für murine Sequenzen

Tabelle 9: Murine Primer

Primer	Hersteller
Murine Primer (L32, ICAM1, VCAM1, VWF, TFPI) – ausgesucht aus NCBI-National Centre for Biotechnology Information	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Abkürzung	Zielgen	RefSeq (mRNA)	Sequenz 5' → 3'
mL32_for	60S ribosomales Protein L32	NM_172086	TGGCTCCTTCGTTGCTGCTG
mL32_rev			CTGGACGGCTAATGCTGGTG
ICAM1_for	Intercellular	NM_009868	CACAGTTCTCAAAGCACAGCG

Abkürzung	Zielgen	RefSeq (mRNA)	Sequenz 5' → 3'
ICAM1_rev	Adhesion Molecule 1		GTGATGCTCAGGTATCCATCCA
VCAM1_for	Vascular cell Adhesion Molecule 1	NM_011693	AGTTGGGGATTTCGGTTGTTCT
VCAM1_rev			CCCCTCATTCCTTACCACCC
VWF_for	Von Willebrand Faktor	NM_011708	CTTCTGTACGCCTCAGCTATG
VWF_rev			GCCGTTGTAATTCCCACACAAG
TFPI_for	Tissue Factor Pathway Inhibitor	NM_001177 319	CAGGCGTCGGGATTATCGTG
TFPI_rev			TTCCCCCACATCCAGTGTAGT

1.7. Kits

Tabelle 10: Kits

Kit	Hersteller
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Qia Shredder	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
iQ SYBR®Green Mastermix	BioRad, München, Deutschland

1.8. Medikamente

Tabelle 11: Medikamente

Medikament	Herstellername	Hersteller
Augen und Nasensalbe	Bepanthen® Augen- und Nasensalbe,	Hoffmann-La Roche AG, Mannheim, Deutschland
Fentanyl	Fentanyl-Janssen 0,5mg	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Isofluran	Forene	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Medetomidin	Dorbene Vet	Zoetis, Berlin, Deutschland
Midazolam	Midazolam	Hameln, Hameln, Deutschland

1.9. Softwares

Tabelle 12: Softwares

Software	Hersteller
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
qPCR analysis	CFX Manager 3.1, Bio Rad, München, Deutschland
Xcellence Real-Time Imaging	Olympus, Tokyo, Japan

2. Verwendete Versuchstiere

In diesem Versuchsvorhaben wird auf die Maus als Versuchstier zurückgegriffen. Die Maus eignet sich für die Forschung aus mehreren Gründen besonders gut. Kurze Reproduktionszyklen, einfache Aufzucht und kostengünstige Haltung. Außerdem lassen sich Mäuse im Vergleich zu anderen Wirbeltieren leicht unter gnotobiotischen Bedingungen halten. Der Mausstamm, auf den die meisten Versuche basieren, ist C57Bl/6J. Dieser Stamm wurde von der Gruppe von Prof. Fredrik Bäckhed (Wallenberg Laboratory, Göteborg, Schweden) an Dr. Christoph Reinhardt (Centrum für Thrombose und Hämostase) abgegeben und wird von der Nachwuchsgruppe an der TARC (Translational Animal Research Center) in sterilen Plastikisolatoren unter keimfreien Bedingungen gehalten und gezüchtet.

Die verwendeten Mausgruppen werden entweder in Isolatoren unter keimfreien Bedingungen oder in SPF-Haltungen der TARC am Campus der Johannes Gutenberg-Universität bzw. für wenige Tage im Forschungsgebäude der Universitätsmedizin Mainz gehalten:

Tabelle 13: Verwendete Mausstämme, deren Herkunft und Haltung.

C57Bl/6J	GF - keimfrei / germfree	Erhalten von Prof. Fredrik Bäckhed(Wallenberg Laboratory, Göteborg,Schweden) Inzuchtstamm Gweschisterverpaarung
	CONV-R - konventionell aufgezogen (conventionally raised)	
	CONV-D - über 14 Tage mit einer komplexen Darmflora aus dem Zäkum einer CONV-R Donor-Maus kolonisierte Tiere (conventional derived)	
	Monokolonisiert mit dem Laborstamm <i>E. coli</i> WT JP313	
Myd-88-defiziente Mäuse (<i>Myd88</i>^{-/-})	Deletion des Myd88 Gens Stammhintergrund und Kontroll- stamm: C57Bl/6J	Erhalten von Prof. Markus Radsak (III. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mainz)

		Inzuchtstamm Gschwisterverpaarung
Trif-defiziente Mäuse (<i>Trif</i>^{-/-})	Deletion des Trif Gens Stammhintergrund und Kontroll- stamm: C57Bl/6J	Erhalten von Prof. Markus Radsak (III. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mainz) Inzuchtstamm Gschwisterverpaarung
Tlr2-defiziente Mäuse (<i>Tlr2</i>^{-/-})	Deletion des Tlr2 Gens Stammhintergrund und Kontroll- stamm: C57Bl/6J	Gekauft von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Me, USA) Inzuchtstamm Geschwisterverpaarung

2.1. Keimfreie Maushaltung in Isolatoren

2.1.1. Isolatoren

Die Haltung keimfreier Mäuse der BMBF-geförderten Juniorgruppe von Dr. Christoph Reinhardt an der Universitätsmedizin Mainz, wurde mittels flexiblen-Filmisolatoren aus flexiblem laminiertem Vinyl durchgeführt.

Ein Isolator ist ein geschlossenes System, der über ein steriltfiltriertes Zu- und Abluftsystem in einem Überdruckzustand gehalten wird. Der Überdruck wird durch einen an jedem Isolator angebrachten Ventilator, hergestellt. Überdrucksysteme sind für den Schutz der Tiere vor Keimbesiedlung aus der Umgebung geeignet. Das Eindringen von Mikroorganismen in den Isolator kann dadurch effektiv verhindert werden.

Mittels Autoklavierzylinder, die eine große Filterfläche besitzen, um den Druckausgleich beim Autoklavierprozess zu ermöglichen, können weitere Materialien wie IVCs (individual ventilated cages) inkl. Wasserflaschen und Futterraufen, Eppendorf-Reaktionsgefäße und Wattestäbchen für die Probenentnahme für mikrobiologische Untersuchungen, Futter und Einstreu, mittels Manschetten, die an die Doppeltürschleuse angeschlossen werden, steril in

den Isolator eingebracht werden. Je nach Größe der einzelnen Isolatoren können bis zu 24 IVCs pro Isolator besetzt werden.

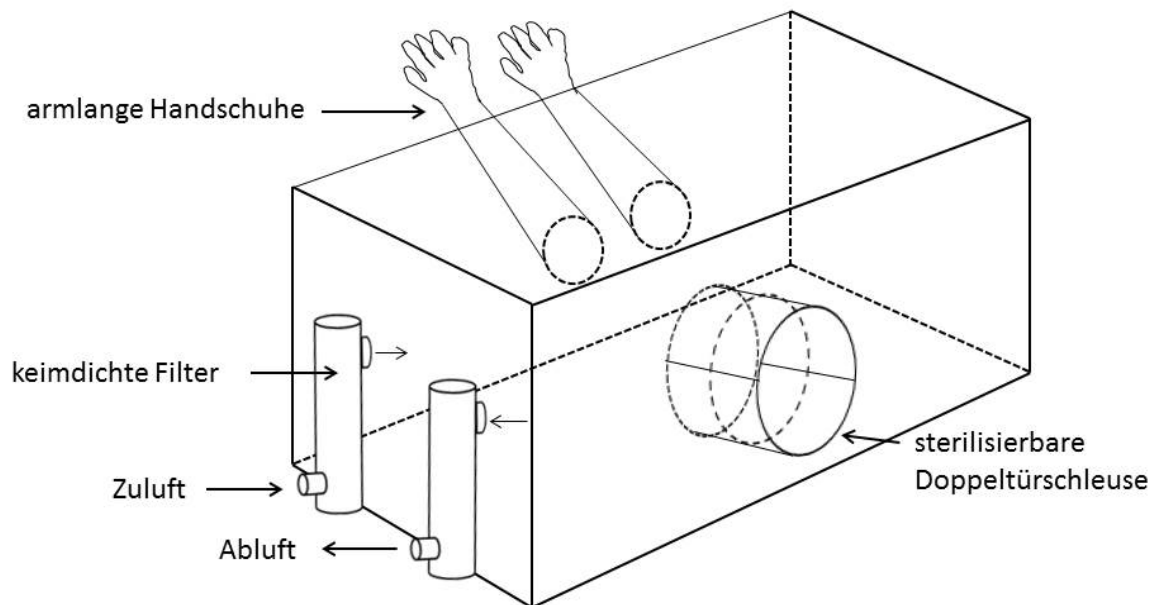


Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Flexible Film Isolators.

2.1.2. Sterilisation

Alle Gegenstände, Futter, Einstreu, Wasser und die Luft im Isolator müssen absolut steril sein. Die Methoden der Sterilisation hängen von den unterschiedlichen Charakteristika der einzelnen Gegenstände ab.

Alle einzubringenden Materialien werden in Autoklavierzylinder gepackt und autoklaviert. In jeden Zylinder werden Sterilisationsstifte gelegt um den Sterilisationserfolg zu überprüfen.

Dampfsterilisation ist besonders geeignet für durchlässige, hitzebeständige Materialien. Alle zu sterilisierenden Areale müssen dabei in direkten Kontakt mit dem Wasserdampf kommen. Die Einwirkzeit ist abhängig von der angewandten Temperatur. Die am wenigstens zugänglichen Bereiche sollten mindestens 15 Minuten bei 121°C ausgesetzt sein.

Der Isolator selber und die Doppeltürschleuse werden mit durch besprayen hypochloriger Säure (HClO) in einen keimfreien Status gebracht. Hypochlorige Säure zerfällt schnell in Chlorsäure und Salzsäure und ist dann sporizid, tuberculozid, bakterizid, viruzid und fungizid. Auf Grund der starken oxidierenden Wirkung wird das Wachstum und, die für die Mikroorganismen wichtige Glucoseoxidation verhindert. Die Kontrolle auf Keimfreiheit des Isolators erfolgt routinemäßig 14-tägig mit einer Anzucht von eventuellen Bakterien in drei

verschieden Nährmedien und einer quantitativen Analyse von 16S rDNS der Bakterien mittels einer Polymerase-Kettenreaktion.

2.1.3. Kontrolle des keimfreien Status

Um die Keimfreiheit der Mäuse zu testen, werden in einem 14-tägigem Abstand von einem Mitarbeiter aus der Arbeitsgruppe, Kotproben mittels PCR auf 16S rDNS Bestandteile von Bakterien getestet (267). Falls Bakterien bzw. bakterielle 16S rDNS vorhanden ist, binden die universellen Primer an diese und die Banden der Amplifikate lassen sich durch Färbung und anschließende Gel-Elektrophorese sichtbar machen. Keine Bande bei dieser Gel-Elektrophorese bedeutet, dass keine Bakterien im Kot der Mäuse in den jeweiligen Isolatoren nachweisbar waren. Zusätzlich werden Wischproben aus den Isolatoren in drei verschiedene Nährmedien gelegt um ein eventuelles Wachstum von Keimen beobachten zu können. Für eine vollständige Kontrolle ist die Anzucht einer Positivkontrolle und einer Negativkontrolle von Nöten.

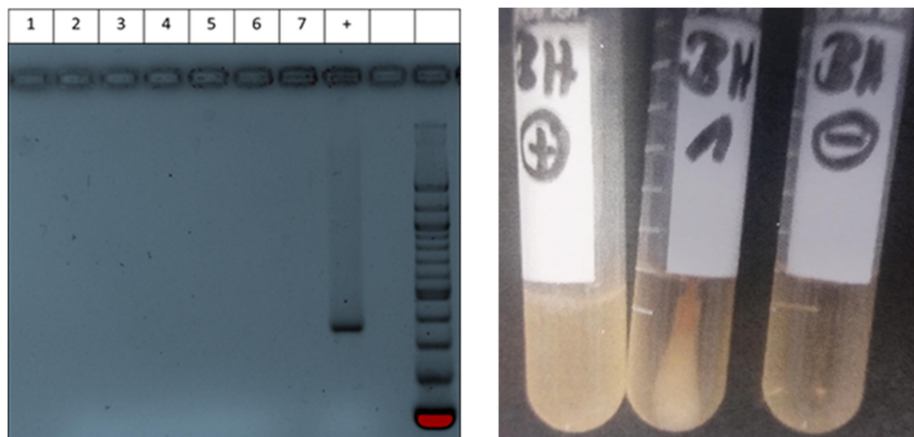


Abbildung 7: Linkes Bild, Sterilitätskontrolle der Isolatoren 1-7 mittels PCR. Nur in der Postivprobe, eine Kotprobe aus einem Mauskäfig einer konventionellen Maushaltung (+) wurde mittels einer PCR die 16S rDNS von Bakterien mit einer Größe von 330 Basenpaaren detektiert. Rechtes Bild, Sterilitätskontrolle von Isolator 1 (mittleres Gefäß) im Nährmedium, Brain-Heart-Broth, im linken Gefäß die Positivkontrolle und im rechten Gefäß die Negativkontrolle.

2.1.4. Inneres Isolatormilieu

Temperatur: Die Temperatur im Inneren eines Isolators ist abhängig von der Raumtemperatur und liegt bei 22°C.

Luftfeuchtigkeit: Die Luftfeuchtigkeit im Isolator ist abhängig von der Ventilation und Besatzdichte. Die relative Luftfeuchtigkeit der Zuluft in den Isolator soll unter 50% aber über 40% betragen.

Lichtzyklus: Der Lichtzyklus besteht aus einer 12 stündigen Hell- und einer 12 stündigen Dunkelphase.

Luftversorgung: Um den Zuluftvolumenstrom zu kontrollieren wird eine Luftwechselrate von 12-20 pro Stunde eingehalten.

Käfige und andere Materialien: In der gnotobiotischen Haltung der Nachwuchsgruppe von Dr. Christoph Reinhardt werden ausschließlich IVC Green Line Käfige (EU Typ 2 Norm) aus Polysulfon mit einer Grundfläche von 500 cm² verwendet. Der für eine individuelle belüftete Käfighaltung benötigte Rettungsfilter wurde entfernt, da die Käfige im Isolatorsystem nicht an ein AERO Belüftungssystem (Tecniplast) angeschlossen sind. Zu jedem Käfig gehört eine Wasserflasche und eine Futterraufe. Die Besatzdichte pro Käfig beträgt maximal 5 Tiere.

Für die Beprobung der Isolatoren werden Eppendorf-Reaktionsgefäße und Wattestäbchen autoklaviert und in den Isolator gebracht, damit die entnommenen Kot- und Wischproben aus dem Isolator ausgeschleust werden können. Um die Käfige und Tiere ordnungsgemäß markieren zu können, werden auch autoklavierte Käfigkarten, Bleistifte und Ohrmarkierer eingebracht.

Futter, Wasser und Einstreu: Futter für keimfreie Tiere benötigt mehr Nährstoffe damit der Verlust von Nährstoffen durch die Dampfsterilisation (vor allem Vitamin A, B, D und K, aber auch Proteine) kompensiert wird (10). Die Einstreu sollte staubfrei und ebenfalls leicht zu autoklavieren sein, z.B. Holzspäne. Das Wasser wird angesäuert, in Glasflaschen abgefüllt und im Isolator in Tränkflaschen umgefüllt.



Abbildung 8: Seitenansicht eines mittelgroßen Flexible Film Isolators.

2.1.4.1. Rederivatisierung der Toll-like Rezeptor-2 defizienten Mauslinie (*Tlr2*^{-/-})

Um die Auswirkung einer Besiedlung des Darmes mit Bakterien bei Mäusen mit fehlendem *Tlr2*-Rezeptor zu erforschen, müssen diese in den keimfreien Zustand verbracht werden. Die Toll-like Rezeptor-2 defizienten Mäuse wurden bei The Jackson Laboratory mit der Stock Nummer 004650 gekauft (268). Durch den fehlenden *Tlr2*-Rezeptor sind sie anfälliger für bestimmte bakterielle Infektionen und die Synthese von Entzündungsmediatoren wie z.B. Tumor Nekrose Faktor- α und Interleukin-6 kann stark abgeschwächt sein (269, 270). Um Tiere in den keimfreien Status zu überführen, wurde eine aseptische Hysterektomie des gewünschten Tieres außerhalb des Isolators durchgeführt und der noch mit den Jungen gefüllte Uterus durch eine mit Germizid befüllte Flüssigkeitsschleuse in den Isolator gebracht. Im Inneren angekommen, wurden die Jungen aus dem graviden Uterus entwickelt und mit leichtem Massieren die Atmung und der Kreislauf stimuliert. Bei ausreichender Eigenbewegung der Neugeborenen wurden sie zwischen die Neugeborenen einer schon keimfreien Amme gelegt. Wichtig ist es vom Zeitpunkt der Euthanasie des weiblichen, graviden Tieres außerhalb des Isolators bis zur Entwicklung der Jungtiere innerhalb des Isolators äußerst zügig vorzugehen.

Für eine erfolgreiche Rederivatisierung eines Mausstammes ist es notwendig die einzubringenden Tiere außerhalb des Isolators und die Ammen terminiert zu verpaaren (271). Es kann nur erfolgreich rederivatisiert werden, wenn die Weibchen außerhalb des Isolators kurz vor dem Werfen der Jungen sind, da die Jungen nur dann überlebensfähig sind. Außerdem müssen die Ammen im Inneren des Isolators 1-2 Tage vorher geworfen haben, damit kein zu großer Alters- und Entwicklungsunterschied zwischen den eigenen und den fremden Jungen besteht. Sollte eine keimfreie Haltung ohne Ammen von Grund auf begonnen werden, werden die in dem Isolator entwickelten Jungtiere per Hand aufgezogen.

2.1.5. Kolonisierung und Monokolonisierung keimfreier Tiere

2.1.6. Kolonisierung mit Zäkuminhalt von SPF-Mäusen

Um heraus zu finden wie sich eine ehemalige Keimfreiheit auf die Thrombusbildung auswirkt, werden keimfreie Mäuse mit einer vollständigen Mikrobiota besiedelt. Dafür wird eine Maus des gleichen Mausstamms (C57Bl/6J), des gleichen Alters und Geschlechts aus der SPF-Haltung mittels Genickbruch (zervikale Dislokation) schmerzfrei getötet. Direkt im Anschluss wird der Blinddarm (Zäkum) des Spendertieres entnommen, an mehreren Stellen mit einer Schere eingeschnitten und in 3 ml PBS so gelöst, dass der komplette Zäkuminhalt in PBS suspendiert ist. Die keimfreien Tiere wurden vorher aus dem Isolator ausgeschleust und

in die SPF-Barrierenhaltung überführt. Dort werden die Tiere mit 200 µl der Zäkuminhalt-PBS Suspension kolonisiert. Um sicher zu sein, dass die Darmflora des Spendertieres komplett und reproduzierbar in den Verdauungstrakt des Empfängertieres gelangt, wird diese mittels Schlundsonde in den Magen des Empfängertieres appliziert. Dafür wird das Tier sicher mit der Hand fixiert und die Schlundsonde vorsichtig seitlich entlang des inneren Mundwinkels in die Speiseröhre bis in den Magen vorgeschoben. Wenn die richtige Platzierung der Schlundsonde, angeschlossen an eine 1 ml Spritze, sichergestellt ist, wird der Zäkuminhalt vorsichtig mit der Spritze in den Magen gegeben. Die Tiere leben dann für 14 Tage in der SPF-Barrierenhaltung in IVCs, bis sie für den Finalversuch eingesetzt werden. Die Kolonisierungszeit von 14 Tagen wird gewählt, da vorhergegangene Versuche der AG Reinhardt gezeigt haben, dass es ca. 4 Wochen dauert bis eine ehemals keimfreie Maus vollständig kolonisiert ist. 14 Tage ist die Halbzeit der kompletten Kolonisierungszeit.

2.1.7. Monokolonisierung mit *Escherichia coli* JP 313

Um zu untersuchen wie sich ein einzelner Keim, in diesem Fall das Bakterium *Escherichia coli* JP 313 (bezogen von Frau Turlin, Pasteur, Paris), in dem tierischen Organismus auf die Thrombusbildung auswirkt, werden keimfreie Mäuse im Isolator kolonisiert. Dadurch wird sichergestellt, dass nur ein einzelner Keim die Tiere für eine definierte Zeitdauer besiedelt.

Die Flüssigkultur des Bakteriums wird in einem 15ml Falcon-Röhrchen in der Schleuse des Isolators mit Desinfektionsmittel (Hypochlorsäure) inkubiert, um eine Kontamination mit anderen Erregern an der Oberfläche des Falcon-Röhrchens auszuschließen. Danach kann die Lösung in das Isolatorinnere überführt werden. Im Inneren werden die Tiere wie beschrieben fixiert und 200µl der Bakteriensuspension mittels Schlundsonde in den Magen appliziert. Die Tiere werden nur einmalig mit dem Bakterienstamm *E. coli* JP 313 kolonisiert und nach 14 Tagen aus dem Isolator geschleust um direkt anschließend (<1h) in einem Experiment untersucht zu werden. Der Erfolg der Monokolonisierung wird mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung mit universellen 16S Primern aus dem Kot der Tiere überprüft.

3. Narkose

Sowohl die Tiere, die mit dem Intravitalmikroskop untersucht werden, als auch die Tiere, die als Thrombozytenspender dienen, werden mit einer Inhalationsnarkose, einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch mit 2% Isofluran und reinem Sauerstoff, in die Narkose eingeleitet. Da es zur Zeit kein alleiniges Injektionsanästhetikum auf dem Markt gibt, welches alle Stadien der Narkose (Sedierung, Hypnose, Analgesie und Relaxation) (272, 273) zufriedenstellend vereint, muss auf eine Kombination dreier unterschiedlich wirkender Injektionsnarkotika zurückgegriffen werden. Zu Beginn wird das Tier in eine Plexiglasröhre verbracht, an dem sich ein Zu- und Abluftventil für das Isofluran-Sauerstoff-Gemisch befindet. So wird sichergestellt, dass das Narkosegas direkt zur Maus gelangt und kontrolliert wieder abgeführt wird. Sobald die Maus das Anästhesiestadium III (Reflexe sind nicht mehr auslösbar, Toleranzstadium) erreicht hat, kann sie aus der Plexiglasröhre genommen werden. Durch eine intraperitoneale Injektion der Kombinationsnarkose wird die gut steuerbare Injektionsnarkose begonnen. Die Kombinationsnarkose besteht aus 5,0 mg/kg Midazolam, 0,5 mg/kg Medetomidin und 0,05 mg/kg Fentanyl. Das Benzodiazepin Midazolam wirkt relaxierend und krampfhemmend. Medetomidin hat eine sedative und vor allem auch analgetische Wirkung. Da die analgetische Wirkung nur von kurzer Dauer ist, wird das sehr potente Analgetikum Fentanyl hinzugefügt. Medetomidin sorgt für einen Temperaturabfall und eine Bradykardie. Es muss daher in einer sehr geringen Dosis angewendet werden. Nach Injektion tritt 10-15 Minuten später die chirurgische Toleranz der Narkose ein. Zur Überwachung der Narkosestadien werden Atmung und Reflexe (Flexorreflex im Zwischenzehenbereich) kontrolliert. Nach 35 Minuten wird das erste Mal nachdosiert. Während des kompletten operativen Eingriffs werden regelmäßig der Zwischenzehenreflex und die Körpertemperatur überprüft. Aufgrund des Temperaturabfalls durch die Narkose wird das zu operierende Tier auf einer Wärmeplatte fixiert und mittels einer Rektalsonde die Körperkerntemperatur überwacht.

Die verschiedenen Versuchsmodelle an der Maus dauern ca. 1,5 bis 4 Stunden. Da es sich sowohl bei der Thrombusinduktion mit FeCl_3 und dem Ischämie-Reperusionsmodell um Finalversuche handelt, werden die Tiere in Narkose durch zervikale Dislokation am Ende des Eingriffes schmerzfrei getötet.

4. Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie

4.1. Intravitalmikroskop

Die Darstellung von Zellen und zellulären Bestandteilen *in* und *ex vivo* basiert auf der Technik der Fluoreszenz, gekoppelt mit einem Fluoreszenz-Auflichtmikroskop (Axiotech^{vario} 100 HD, Fa. Zeiss, Göttingen). Um die Zellen oder zelluläre Bestandteile sichtbar zu machen, müssen diese mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert werden. Fluoreszenz ist die Emission von langwelligem Licht nach einer Absorption von kurzwelligem Licht. Fluorophore absorbieren das kurzwellige Anregungslicht und strahlen es kurz darauf in einer 20 bis 50 nm größeren Wellenlänge wieder ab. Elektronen der fluoreszierenden Moleküle absorbieren hierbei die Photonen des kurzwelligen, also energiereichen Lichtes. Dadurch gelangt das Elektron auf ein höheres Energieniveau. Da das Elektron dieses Energieniveau nicht halten kann, fällt es in sein ursprüngliches Energieniveau zurück. Dabei wird überschüssige Energie frei, welche durch die Emission von Licht sichtbar wird. Mittels Filter können das kurzwellige Anregungslicht und die langwellige Lichtemission (Fluoreszenz) getrennt werden. Zu beachten ist, dass das Spektrum der Lichtquelle und die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe eine Kompatibilität erfordern. Aus diesem Grund befinden sich in den jeweiligen Mikroskopen Filterblöcke, die an die verwendeten Fluoreszenzfarbstoff angepasst sind (Anregungswellenlänge und Emissionswellenlänge).

Die Intensität des vom Objekt emittierten Lichts in der Emissionswellenlänge wird, nachdem es durch einen Emissionsfilter gelangt, von einer CCD-Kamera (Charged Coupled Device–Kamera) aufgenommen und über einen Videotimer an den Videorekorder weitergegeben.

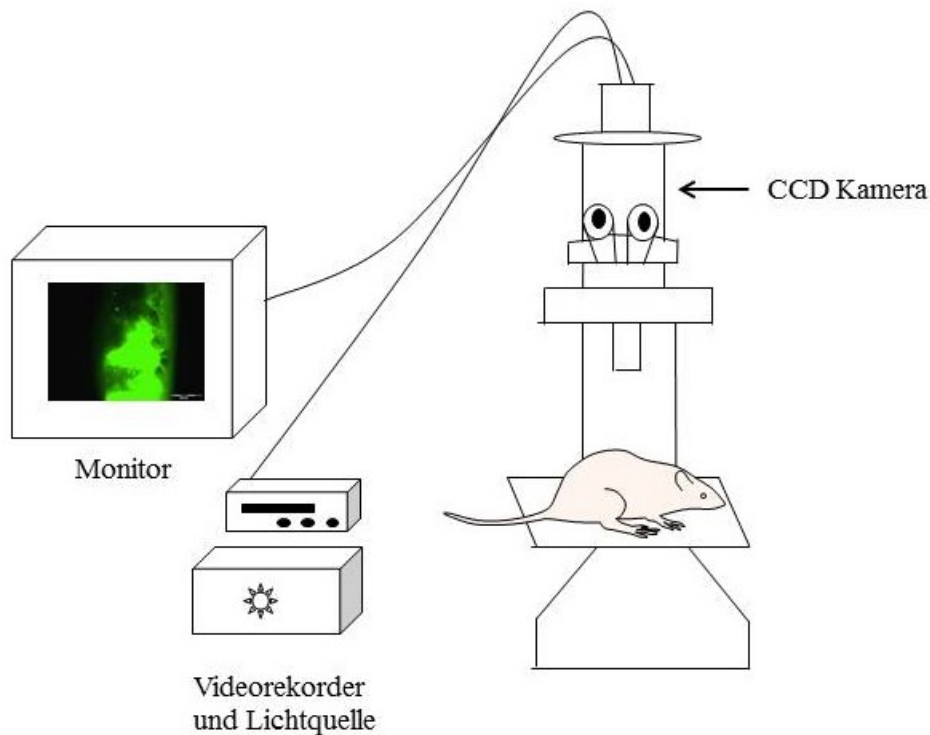


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Intravitalmikroskops

4.1.1. Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Um verschiedene Zellen oder Zellbestandteile anzufärben, gibt es zahlreiche Fluoreszenzfarbstoffe. Je nach Zelltyp handelt es sich um einen DNS- oder Membranfarbstoff. Außerdem unterscheidet man zwischen Farbstoffen, die *in* oder *ex vivo* angefärbt werden müssen. Da die gefärbten Moleküle schnell ausbleichen, ist es wichtig, dass die Lichtexposition und Belichtungszeit so kurz wie möglich gehalten werden.

DCF- (carboxy-DCFDA):

Die lipophile Ausgangsform CFDA (5-(6)carboxy-2',7'-dichlorofluoresceindiacetat) kann durch die Zellmembran diffundieren. Nach Abspalten der Acetatgruppen oxidieren in der Zelle entstehende Sauerstoffradikale das deacetylierte 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH). Es entsteht der stark fluoreszierende Farbstoff 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (274). Für die Anregung dieses Fluorophors ist eine Wellenlänge von 514 nm nötig und es emittiert bei 532 nm. Dieser Farbstoff wird zur Färbung von Thrombozyten eingesetzt. Dafür müssen die Thrombozyten *ex vivo* isoliert, gewaschen und dann gefärbt werden (siehe

Thrombozytenisolierung).

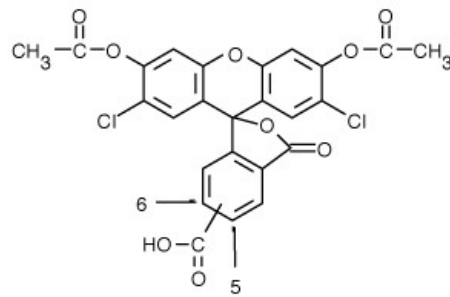


Abbildung 10: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes DCF.

Rhodamin B:

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B Isothiocyanat werden Thrombozyten *ex vivo* angefärbt. Dieses Fluorophor, welches Fettsäuren anfärbt, wird in der Konzentration 2mg/ml eingesetzt. Es wird in mit der Wellenlänge 542 nm angeregt und emittiert das Licht bei 554 nm.

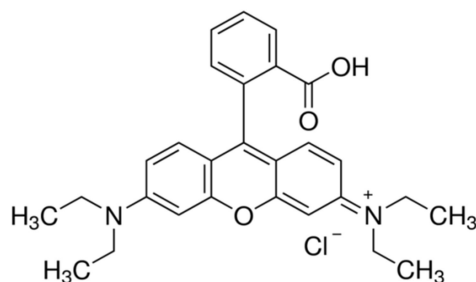


Abbildung 11: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin B.

Acridin-Orange:

Acridin Orange ist ein lipophiler Fluoreszenzfarbstoff und kann leicht durch die Zellmembran diffundieren. Dieser Farbstoff wird als *in vivo* Farbstoff eingesetzt, um Leukozyten zu färben. Er lagert sich in RNS und DNS ein. Für die Anregung dieses Fluorophors ist eine Wellenlänge von 495 nm erforderlich. Das Emissionsmaximum liegt bei 530 nm. Für die Intravitalmikroskopie wird das Acridin-Orange in einer Konzentration 0,05% (verdünnt mit isotonischer NaCl) intravenös injiziert.

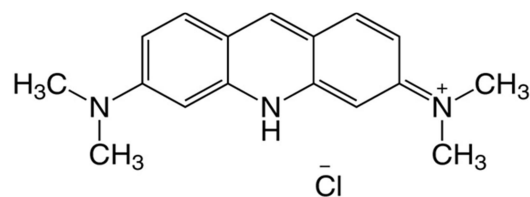


Abbildung 12: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes Acridin Orange.

4.2. Präparations- und Färbeverfahren

Um Thrombozyten mit dem Fluoreszenz Intravitalmikroskop sichtbar zu machen, ist es notwendig diese vorher zu isolieren und ex vivo anzufärben.

4.2.1. Verwendete Puffer

Tyrode's Puffer: Für die Thrombozytenisolierung muss dieser Puffer für jeden Versuch frisch angesetzt werden. Die Trockensubstanzen bovines Serumalbumin und D(+)-Glucose werden entsprechend abgewogen und mit zwei weiteren flüssigen Substanzen (10mM HEPES, 1,4 M NaCl, 26 mM KCl, 121 mM NaHCO₃, 0,1% BSA, 1% Glucose) vermischt. Nachdem alle Substanzen gelöst sind, wird der pH-Wert gemessen. Es werden zwei Portionen mit unterschiedlichem pH hergestellt, dafür werden 2M NaOH und 2M HCl verwendet, um eine Portion mit dem pH 7,4 und eine Portion mit dem pH 6,5 zu erhalten. Bei den ersten Schritten der Thrombozytenisolierung wird die Pufferlösung mit einem pH von 6,5 verwendet. Der etwas niedrige pH verhindert eine frühzeitige Aktivierung der Thrombozyten. Kurz vor der Injektion der isolierten Thrombozyten wird die Pufferlösung mit dem pH von 7,4 verwendet. Blut besitzt ebenfalls einen pH von 7,4, so befinden sich die isolierten Thrombozyten in einem physiologischen Milieu.

4.2.2. Blutentnahme

Da die Thrombozyten *ex vivo* angefärbt und vor dem Eingriff wieder injiziert werden, ist es notwendig, dass Thrombozyten aus einer Spendermaus (identischer Mausstamm, Genotyp, Hygienestatus und Alter wie das Empfängertier) isoliert werden. Die Blutentnahme des Spendertiers erfolgt, wie im oberen Abschnitt (3. Narkose) beschrieben, in Vollnarkose in Rückenlage (275). Da ca. 1 ml Vollblut für die Isolierung einer ausreichenden Anzahl an Thrombozyten benötigt wird, wurde die Methode der Herzpunktion für die Blutentnahme gewählt. Dafür wird zwischen der ersten und zweiten Rippe links-lateral des Sternums das Herz punktiert und das gewonnene Blut mit 170 µl/ml 3,17%igen Natriumcitrat versetzt, um die Gerinnung zu verhindern. Die Tiere werden durch den Blutentzug getötet. Um die vollständige, schmerzlose Tötung des Tieres zu erreichen, wird anschließend an die Blutentnahme in Vollnarkose eine zervikale Dislokation durchgeführt.

4.2.2.1. Blutentnahme zur Messung der Blutwerte

Die Mäuse werden mit Isofluran in eine Kurznarkose versetzt und anschließend wird eine Hämatokrit Kapillare in den medialen Augenwinkel des rechten Auges eingeführt. Durch vorsichtige, rotierende, nach *kranial* gerichtete Bewegung wird so Blut gewonnen. Für die Blutwertmessung wird max. 200 µl Vollblut benötigt. Die Kapillare kann anschließend vorsichtig herausgezogen und die Maus nach Erwachen aus der Kurznarkose für weitere Versuchsvorhaben verwendet werden. Das gewonnene Blut wird in einem EDTA Röhrchen aufgefangen und mit dem Zellzählgerät Sysmex XE 2100 analysiert.

4.2.3. Färbeprotokolle

4.2.3.1. Thrombozytenpräparation / Bestimmung der Thrombozytenzahl

Bei allen Präparationsschritten ist besondere Sorgfalt erforderlich, da sonst Thrombozyten aktiviert und dadurch die Ergebnisse des Versuchs verfälscht werden können. Das ungeronnene Blut (ca. 1 ml) wird mit dem vorher frisch angesetztem Tyrode's Puffer pH 6,5 auf ein Volumen von 4 ml aufgefüllt. Anschließend wird bei 100 x g, ohne Bremse, bei 24°C für 10 Minuten zentrifugiert. Während der Zentrifugation trennen sich die verschiedenen Fraktionen des Blutes. Der entstandene plättchenreiche Plasmaüberstand (PRP) wird vorsichtig entnommen und auf ein Volumen von 4 ml mit Tyrode's Puffer pH 6,5 aufgefüllt. Bevor der nächste Zentrifugationsschritt mit 1200 x g, mit Bremse, für 10 Minuten gestartet wird, wird der Fluoreszenzfarbstoff DCF oder Rhodamin B, je nach Versuchsvorhaben, zu dem verdünnten PRP hinzugefügt, um die Thrombozyten zu färben. Damit der Farbstoff in

die Thrombozyten diffundieren kann, muss das Gemisch lichtgeschützt für 2 Minuten inkubiert werden. Nach diesem zweiten Zentrifugationsschritt wird das entstandene Thrombozytenpellet in weiteren 4 ml Tyrode's Puffer gelöst und wieder mit 1200 x g, mit Bremsenstufe 9, für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird das Thrombozytenpellet in jeweils 250 µl Tyrode's Puffer pH 6,5 und pH 7,4 gelöst. Damit der Farbstoff durch Lichteinstrahlung nicht ausbleicht, wird diese Lösung in einem vor Licht schützenden Eppendorf Reaktions-Gefäß geschützt.

Um für jeden Versuch dieselbe Thrombozytenanzahl zu injizieren, muss mit einem Zellzählgerät die Thrombozytenzahl bestimmt werden. Für jeden Versuch wird eine Thrombozytenzahl von 150000/µl verwendet. Dafür wird mit jeweils einem Teil Tyrode's Puffer pH 6,5 und einem Teil Tyrode's Puffer pH 7,4 die Thrombozytenkonzentration auf 150000/µl eingestellt. Direkt im Anschluss wird die gefärbte Thrombozytensuspension in das zu operierende Versuchstier injiziert.

5. *In vivo* Mausmodelle

In dieser Arbeit wird ein Thrombosemodell, für die Evaluierung der Thrombusbildung in der *A. carotis communis*, und ein Ischämie-Reperusionsmodell an den Mesenterialgefäßen, für die Analyse der Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung an das Endothel der Maus verwendet.

5.1. Operationsmethoden

5.1.1. Allgemeine Versuchsvorbereitung

Zu Beginn wird jedes Tier, welches für den Versuch vorgesehen ist, gewogen um die Dosis der Narkose dem Gewicht anzupassen. Anschließend werden, wie oben beschrieben drei Tiere (identischer Mausstamm, Genotyp und Alter wie das Empfängertier) in das chirurgische Toleranzstadium gebracht. Eine der drei Mäuse dient als Spendertier für die zwei anderen Mäuse an denen das Versuchsmodell durchgeführt wird. Um eine Austrocknung der Kornea während der Operation zu verhindern, wird auf jedes Auge Augensalbe aufgetragen. Bevor der Eingriff beginnt, wird durch die Prüfung des Zwischenzehenreflex sichergestellt, dass eine vollständige Schmerzausschaltung gewährleistet ist. Die Tiere werden vor den Eingriffen auf einer Wärmeplatte mit Klebeband in Rückenlage so fixiert, dass die komplette Nase in der Nasenkammer liegt. Die Nasenkammer ist an einer Seite an die Sauerstoffversorgung und an

der anderen Seite an ein Luftabsaugsystem angeschlossen um so wenig wie möglich stehende Luft in dem Schlauch-/Nasenkammersystem zu haben. An den jeweiligen Operationsfeldern wird das Deckhaar mittels einer Enthaarungscreme entfernt und die Haut mit Alkohol entfettet und desinfiziert. Alle Präparations- und Operationstechniken werden unter dem Zoom-Stereomikroskop durchgeführt.

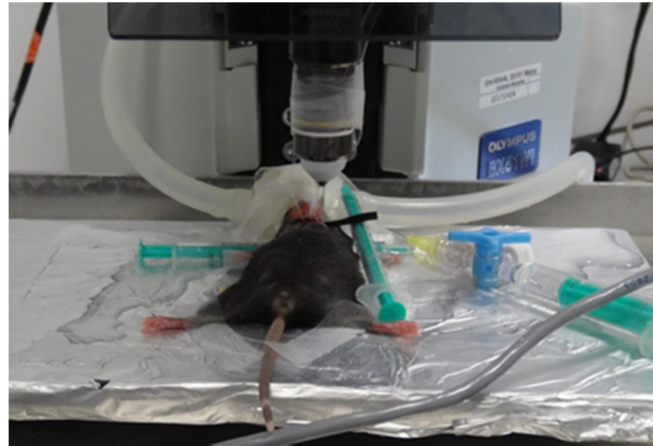


Abbildung 13: Narkotisierte Maus fixiert auf Heizplatte, platziert unter Mikroskop.

5.1.2. Venöser Zugang zur *Vena jugularis externa*

Zur Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe und der gefärbten Thrombozyten muss ein Verweilkatheter in die *Vena jugularis externa* eingebracht werden. Nach einer Hautinzision entlang der Mediane der Halsunterseite werden stumpf beide Speicheldrüsen (*Glandulae mandibulares*) freiparapariert, voneinander getrennt und *kranial* vorgelagert, um die *Vena jugularis* darstellen zu können. Die Vene wird stumpf von umliegenden Faszien und Fettgewebe befreit. An einer gut zugänglichen Stelle, *kranial* an der exponierten *Vena jugularis*, wird die Vene mit einem Faden ligiert und mit einer Moskitoklemme gestreckt fixiert. An der Stelle, an der die *Vena jugularis* in den Brustkorb eintritt, werden zwei Fäden um die Vene gelegt und mit einem einfachen chirurgischen Knoten locker geschlossen. Ein dritter Faden wird etwas weiter *kranial* um die Vene gelegt und locker geschlossen. Um den Polyethylen-Katheter in das Gefäß einzubringen, wird an der Stelle zwischen den locker gelegten Fäden eine kleine Inzision gesetzt. Der Katheter wird in die Vene eingeführt und mittels der locker gelegten Fäden durch zuziehen der Knoten fixiert. Ob der Katheter richtig platziert ist, wird durch eine Spülung des Katheters mit ca. 200 µl isotonischer Natriumchloridlösung festgestellt. Abschließend wird die ausgelagerte Speicheldrüse wieder über die *Vena jugularis* platziert.

5.1.3. Eisen-III-chlorid Modell an der *Arteria carotis communis*

Die Thrombusinduktion wird durch Aktivierung des Endothels mittels Applikation einer 10%igen Eisen-III-chlorid (FeCl_3) Lösung an der Gefäßaußenseite erreicht. Für die Herstellung von 10%igem Eisen-III-chlorid werden 0,5 g FeCl_3 in 5 ml destilliertem Wasser gelöst. Die 5ml der Eisen-III-chlorid Lösung werden in lichtgeschützte Eppendorf-Reaktionsgefäße portionsweise (200 μl pro Portion) bei -20°C eingefroren und kurz vor Versuchsbeginn aufgetaut. Die Applikation der Eisen-III-chlorid Lösung an der Gefäßaußenseite führt dazu, dass an der Gefäßinnenseite (Endothel) rote Blutkörperchen (Erythrozyten) und Fragmente von roten Blutkörperchen an das Endothel andocken, Thrombozyten angelockt und aktiviert werden. Durch die aktivierten Thrombozyten kommt es zur schnellen Entstehung eines okklusiven Thrombus.

Nachdem an der rechten Halsseite der venöse Zugang gelegt wurde, wird auf der linken Halsseite die *Arteria carotis communis* freipräpariert. Dafür werden die darüber liegenden Muskelgruppen stumpf beiseite präpariert. Um die *A. carotis* von dem umliegenden Gewebe noch mehr abzugrenzen, wird unter das Gefäß ein schwarzes Fotopapier gelegt. Das ermöglicht eine bessere Visualisierung während der intravitalmikroskopischen Untersuchungen.

Nachdem die *A. carotis* isoliert wurde, wird zwischen Gefäß und schwarzem Fotopapier ein U-förmiger Draht gelegt, damit die Arterie so trocken wie möglich liegt. Nach Entfernung von überstehender Gewebsflüssigkeit um das Gefäß herum wird ein 1 mm x 1 mm großes vorher in 10% FeCl_3 getränktes Filterpapier lateral an die Gefäßaußenseite gelegt (Abbildung 14). Wichtig dabei ist, dass von dem FeCl_3 -getränkten Filterpapier keine Flüssigkeit an der Arterie entlang fließt. So wird sichergestellt, dass die Stelle, an der das FeCl_3 durch die Gefäßwand tritt, begrenzt bleibt.

Das Eisen-III-chlorid-Filterpapier wird exakt für drei Minuten an die *A. carotis communis* gelegt. Nachdem die Zeit abgelaufen ist, werden das Filterpapier und alle eventuellen Rückstände der FeCl_3 -Lösung mit körperwarmer isotonischer Natriumchloridlösung weg gespült. Sobald alle Reste entfernt sind, wird das Tier so unter das Intravitalmikroskop gelegt, dass die *A. carotis* direkt unter dem Objektiv platziert wird. So kann die Thrombusbildung von dem Zeitpunkt der Entfernung des Filterpapiers bis zur vollständigen Okklusion des Gefäßes und späteren Rekanalisation betrachtet und aufgezeichnet werden.

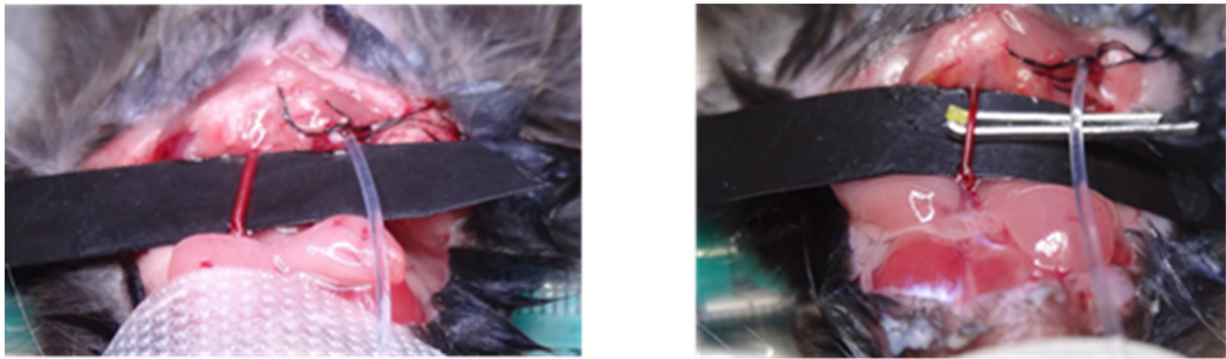


Abbildung 14: Intraoperativer Zustand im Eisen-III-chlorid Modell. Linkes Bild: Links die isolierte *A. carotis communis* mit unterlegtem Fotopapier; rechts die katheterisierte *V. jugularis externa*. Rechtes Bild: Erhöht gelagerte *A. carotis communis* mit lateral angelegtem FeCl_3 -getränktem Filterpapier.

5.1.4. Mesenteriales Ischämie-Reperfusionsmodell

Bei diesem Mausmodell wird durch das Abklemmen der *Arteria mesenterica superior*, die den Dünndarm und einen Teil des Dickdarms versorgt, ein Mesenterialinfarkt induziert. Das Ziel dieses Mausmodells ist die Visualisierung und quantitative Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion und der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Mikrozirkulation vor und nach dem Mesenterialinfarkt.

Für zwei Versuche dieser Art werden zwei Mäuse für die Operation und eine Maus als Spendertier in Vollnarkose gelegt. Nachdem mit der Separation der Thrombozyten begonnen wurde (Spendertiere / kardiale Punktion von ca. 1 ml Vollblut mit 170 μl Natriumcitrat), werden die zu operierenden Mäuse so in Rückenlage auf der Heizplatte positioniert, dass sie mit der Nase korrekt in der Nasenkammer platziert sind, um während des ganzen Versuchs ausreichend mit Sauerstoff versorgt zu sein. Die *Vena jugularis externa* wird freigelegt und kanüliert, um die mit fluoreszierenden Rhodamin B markierten Thrombozyten und den Fluoreszenzmarker Acridin Orange zu injizieren. Nach einer transversalen Laparotomie wird das *distale* Stück des Jejunums ausgelagert (Abbildung 15) und vorsichtig auf eine schwarze Plattform ausgelegt. Um den Darm vor Austrocknung und Auskühlung zu schützen, wird in regelmäßigen, kurzen Abständen körperwarmer isotonischer Natriumchloridlösung auf das ausgelagerte Darmsegment gegeben. Nach Abschluss der Präparation erfolgt die intravenöse Applikation von 150.000 fluoreszenzmarkierten Thrombozyten/ μl und der Fluoreszenzfarbstoff Acridin Orange. Die Anfärbung der Leukozyten erfolgt mit 0,05 ml 0,05% Acridin Orange *in vivo*. Bevor der ischämische Zustand des Darmes erzeugt wird, werden an sechs Venolen der Mesenterialgefäße Videoaufnahmen angefertigt um die Thrombozyten-Endothel-

Interaktion (TEI) und die Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI) vor der Ischämie zu dokumentieren. Die Ischämie des Dünndarms wird mit Hilfe eines atraumatischen Gefäß-mikroclips am Ursprung der *Arteria mesenterica superior* erreicht. Das Gefäß wird so für die Dauer von 60 Minuten reversibel okkludiert.



Abbildung 15: Intraoperativer Zustand einer Maus während des Ischämie-Reperfusionmodells des Mesenteriums. Linkes Bild: Narkotisierte Maus fixiert auf einer Heizplatte mit venösem Zugang an der *V. jugularis externa*. Ausgelagertes Dünndarmsegment auf Empore. Rechtes Bild: Ausgelagerter ischämischer Teil des Jejunums, links im Bild Microclip an *Arteria mesenterica superior*.

Für die Dauer der 60-minütigen Ischämie wird das Darmsegment zurück in die Bauchhöhle gelagert und die Bauchhöhle mit einer Naht wieder verschlossen. Zur Kontrolle der Körperkerntemperatur wird die an die Heizplatte gekoppelte Temperatursonde in das Rektum eingeführt. Um das Tier vor einer Auskühlung zu schützen, wird Aluminiumfolie über das Tier gelegt. Nach den 60 Minuten wird die Bauchhöhle wieder geöffnet, der Mikroclip von dem Gefäß gelöst und das Tier direkt wieder unter das Objektiv des Intravitalmikroskops gelegt. An denselben sechs Gefäßausschnitten der Venolen werden Videoaufnahmen angefertigt um anschließend die TEI und LEI zu analysieren und zu quantifizieren. Nach Beendigung der Aufnahmen wird das Tier in Vollnarkose durch zervikale Dislokation getötet.

5.1.5. Durchführung der intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie

Zelladhäsion- und aggregation wurden in beiden Modellen *in vivo* durch Videofluoreszenzmikroskopie verfolgt. Da es sich in den beiden Modellen um verschiedene Bewertungsparameter und unterschiedliche Färbungen handelt, wird im Folgenden näher darauf eingegangen.

Alle Versuche des arteriellen Thrombosemodells wurden mit den folgenden Mausgruppen durchgeführt:

- C57Bl/6J - GF

- C57Bl/6J - CONV-R
- C57Bl/6J - CONV-D

5.1.5.1. Arterielle Thrombose an der *A. carotis communis*

Bei der Thrombusinduktion an der *A. carotis communis* durch die Applikation von 10%ige FeCl₃-Lösung an die Gefäßaußenseite wurde die Thrombozytenaggregation *in vivo* beobachtet. Gemessen wird:

- Zeitpunkt der Okklusion: Zeit vom Anlegen des FeCl₃ – Filterpapiers bis zur vollständigen Okklusion des Gefäßes

Die maximale Messdauer beträgt 45 Minuten. Sollte sich bis zu diesem Zeitpunkt das Gefäß nicht geschlossen haben, wird der Versuch abgebrochen.

Es werden Videoaufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten angefertigt: Vor der Applikation des Eisen-III-chlorids, direkt nach Entfernung des Filterpapiers und dann in einem zeitlichen Abstand von 2-3 Minuten, um das Thrombuswachstum zu dokumentieren. Alle Videoaufnahmen werden mit 10facher Vergrößerung und dem entsprechenden Farbfilter für die Färbung der Thrombozyten mit DCF aufgenommen.

5.1.5.2. Mesenteriales Ischämie-Reperfusionsmodell

Bei dem mesenterialen Ischämie-Reperfusionsmodell werden sechs Gefäßausschnitte zur Bestimmung von TEI und LEI herangezogen. Bei den analysierten Gefäßen handelt es sich um die blutabführenden Venolen des Mesenteriums. Die Thrombozyten werden mit dem Fluorophor Rhodamin B *ex vivo* und die Leukozyten mit Acridin Orange *in vivo* angefärbt. Bei diesem Versuchsvorhaben werden zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe angewendet. Um Thrombozyten und Leukozyten simultan darstellen zu können müssen daher passende Filter im Mikroskop benutzt werden. Bevor eine Ischämie mittels Mikroclip induziert wird, werden an sechs unterschiedlichen Gefäßen 19 Sekunden lange Videosequenzen aufgezeichnet.

Zur Bestimmung der Anzahl der Thrombozyten und Leukozyten wird ein Auswertungsfenster von 0,06 mm² gewählt. Es werden insgesamt sieben Parameter pro Auswertungsfenster bestimmt.

1. Leukozyten:

- rollende Leukozyten: Leukozyten, die nicht freifließend das Gefäßinnere passieren. Mindestens eine Haftung innerhalb des Auswertungsfensters am Endothel ist notwendig, um diese Blutzelle als rollend zu bezeichnen.
- Adhärente Leukozyten: Leukozyten, die ohne Positions- änderung in dem Gefäßabschnitt am Endothel länger als 20 Sekunden anhaften.
- Leukozytenkonjugate: Verbindung von mindestens zwei Leukozyten. Da Leukozyten miteinander keine direkte Verbindung eingehen, sondern z.B. über Thrombozyten verbunden werden, sind die Leukozytenkonjugate als Interaktion von Leukozyten mit ungefärbten Thrombozyten (Thrombozyten der Empfängermaus) anzusehen.

2. Thrombozyten:

- Transient adhärente Thrombozyten: Thrombozyten, die nicht freifließend das Gefäßinnere passieren. Mindestens eine Haftung innerhalb des Auswertungsfensters am Endothel ist notwendig, um diese Blutzelle als transient adhärent zu bezeichnen.
- Adhärente Thrombozyten: Thrombozyten, die ohne Positions- änderung in dem Gefäßabschnitt am Endothel länger als 20 Sekunden anhaften.
- Thrombozytenaggregate: Zusammenschluss von mindestens zwei Thrombozyten.

3. Thrombozyten- und Leukozyteninteraktion: Zusammenschluss von mindesten einem Thrombozyt und einem Leukozyt.

Die Anzahl aller oben genannten Zellen bzw. Zellzustände werden pro mm² Endotheloberfläche pro Auswertungsfenster angegeben. Nach der 60-minütigen Ischämie werden an denselben Gefäßen wieder Videosequenzen aufgenommen und die Zellzahlen vor (pre) Ischämie und nach (post) Ischämie miteinander verglichen.

Die für dieses Modell verwendeten Mauslinien sind:

- C57Bl/6J: CONV-R, GF, CONV-D, monokolonisiert mit *E.coli* JP 313, *Myd88*^{-/-}, *Trif*^{-/-} Mäuse

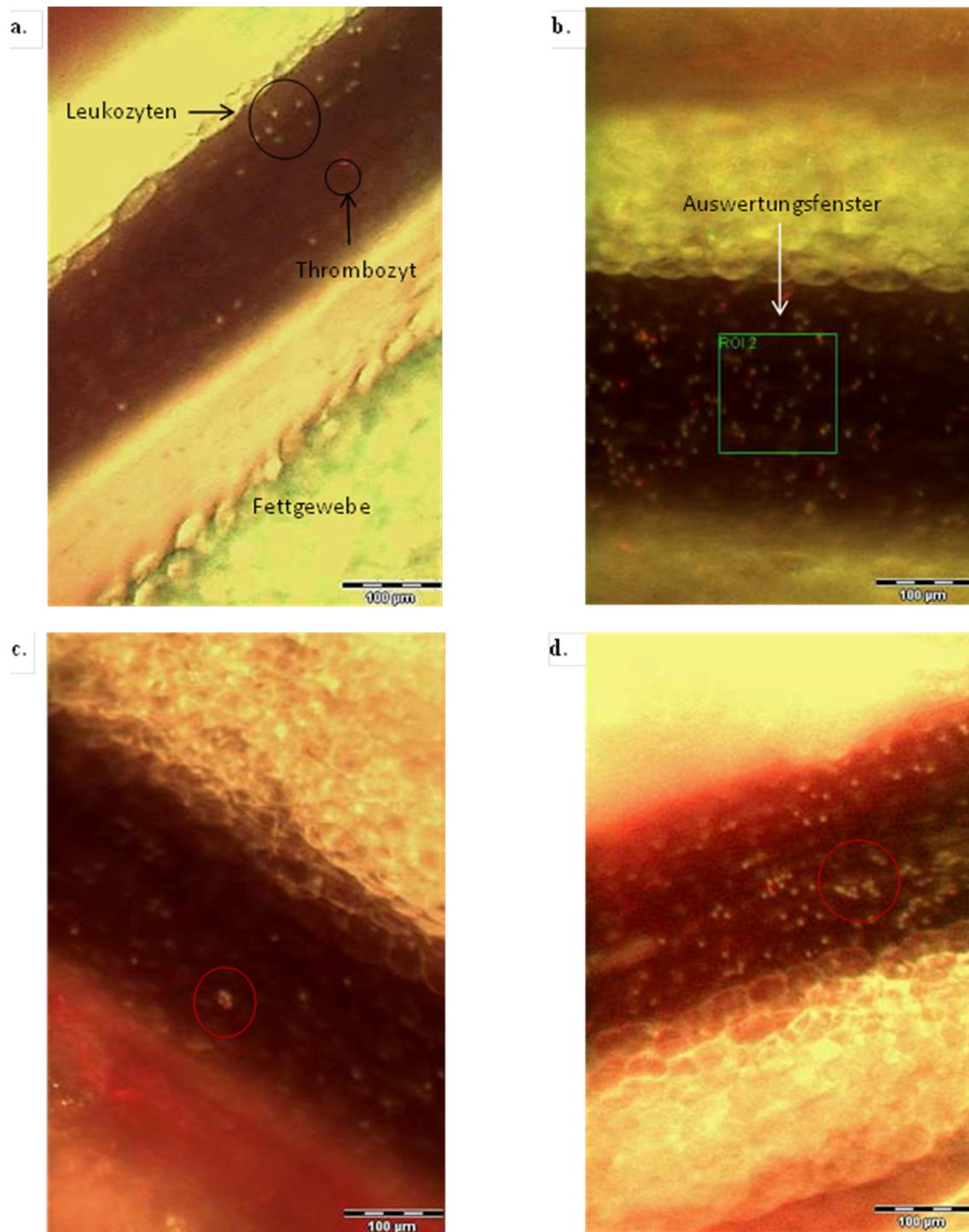


Abbildung 16: Mesenteriale Venolen eingebettet in perivaskuläres Fettgewebe. a, Vereinzelte Leukozyten und ein Thrombozyt. b, Für die Auswertung benutztes Fenster mit größerer Ansammlung von Leukozyten und Thrombozyten. c, Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion. d, Leukozytenkonjugate; 100-fache Vergrößerung in Dual-View, B/G Filter (Leukozyten gefärbt mit Acridin Orange, Thrombozyten gefärbt mit Rhodamin B; Skalierung 100µm).

5.1.5.3. Auswertung der Videoaufnahmen

Für die Auswertung der Videos wird das Programm Xrtcellence benutzt. Für die Auszählung von Leukozyten und Thrombozyten, Pre- und Post Ischämie, im mesenterialen Ischämie-Reperusionsmodell wird mit diesem Programm ein 0,06 mm² großes Auswertungsfenster über den Gefäßausschnitt gelegt. Darin werden dann die Zellen im Bild-zu-Bild Verfahren (alle Einzelbilder im Zeitverlauf) gezählt.

5.1.5.4. Organentnahme

Bei den Thrombozyten-Spendertieren des arteriellen Thrombosemodells, werden beide Carotiden nach erfolgreicher Blutentnahme und Tötung zur Untersuchung von Adhäsionsrezeptoren entnommen. Da der autolytische Prozess nach der Tötung sofort eintritt, werden die blutleeren Arterien direkt in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C für anschließende Versuche aufbewahrt.

6. Analyse der Expression von Adhäsionsmolekülen der unverletzten *A. carotis communis*

6.1.1. RNA-Isolierung aus der *A. carotis communis*

Zu den Carotiden in 2 ml Reaktionsgefäßen, werden 300µL Git-Puffer mit β-Mercaptoethanol gegeben und mittels einem Dispergiergerät für 30 Sekunden komplett homogenisiert und anschließend für 1 Stunde bei -20°C lysiert. Zu den so gewonnenen Gewebelysaten wird 30 µl Na-Acetat und 300 µl Phenol (H₂O-gesättigt) gegeben und anschließend gevortext. Danach wird 150 µl Isoamylalkohol hinzugefügt, ein weiteres Mal gevortext und die Proben waren für 15 Minuten auf Eis stehen gelassen. Die Lysate werden anschließend 20 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 200 µl Isopropanol dazugegeben, wieder gevortext, und über Nacht bei -20°C in Fällung gestellt. Am nächsten Tag werden die Proben für 20 Minuten bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgekippt und die RNS mit 300 µl 80%igen Ethanol gewaschen. Dem folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 13000 rpm bei 4°C. Anschließend wird das Ethanol abgekippt und die Proben für 5 Minuten kopfüber getrocknet. Um die RNS zu lösen, wird 30 µl RNase freies Wasser dazu gegeben. Um die Konzentration der RNS zu erhöhen werden die Proben für 10 Minuten bei 56°C inkubiert. Dann wird 1 µl der RNS-Lösung auf die Messeinheit des NanoDrops pipettiert und hinsichtlich der Konzentration und Reinheit bei 260/280 nm und 230/260 nm gemessen. Die

RNA wird so verdünnt, dass sich eine Konzentration von 100 ng/μl ergibt.

6.1.2. Reverse Transkription

Zur Generierung von cDNS werden 10 μl der gewonnenen RNS verwendet, was einer Menge von 1 μg Gesamt-RNS entspricht. 10 μl RNS wird dann mit je 10 μl des Mastermixes gemischt und für 120 Minuten bei 37°C nach Herstellerangaben im Thermocycler umgeschrieben.

6.1.3. Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Zur Quantifizierung von mRNS-Transkripten wird eine semiquantitative PCR-Methode (qRT-PCR) verwendet. Als Referenzgen (Housekeeping Gen) wird das 60S ribosomale Protein L32 (L32) verwendet. Die Expression dieses Referenzgenes ist für die meisten Zellarten und Gewebetypen bekannt und ist unter den untersuchten Bedingungen nicht reguliert. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer werden über die Gendatenbank National Centre for Biotechnology Information ausgesucht. Zur Amplifikation der cDNS des Referenz- und Zielgens kommt in dieser Arbeit ein nicht-spezifisches Detektionssystem mit SYBR Green zum Einsatz. Bei dieser Methode handelt es sich um die einfachste Methode zur Quantifizierung von PCR-Produkten. Der Farbstoff SYBR Green hat die Eigenschaft in doppelsträngige DNS zu interkalieren und dabei seine Fluoreszenzintensität im Vergleich zu ungebundenem Farbstoff, zu erhöhen. Somit erhöht sich die Fluoreszenzintensität in jedem Zyklus. Ab einer gewissen Anzahl an Zyklen überschreitet die Fluoreszenz einen Grenzwert, der zur Berechnung verwendet werden kann. Die relative mRNS-Expression des Zielgens wurde auf die des Referenzgens normalisiert und mit der $\Delta\Delta C_t$ Methode ausgewertet (276).

7. Bestimmung der Blutungszeit

Die Blutungszeitmessung ist ein weit verbreiteter *in vivo* Test zu Bestimmung der hämostatischen Funktion. Die Blutungszeit ist hauptsächlich von der Interaktion zwischen Thrombozyten und der verletzten Gefäßwand abhängig. Gemessen wird die Zeit, die vergeht bis der gebildete Thrombus das Gefäß verschließt und so die Blutung stoppt. Zur Bestimmung der Blutungszeit wird die Maus, in einem Maus-spezifischen Tail Access Restraint fixiert. Mit einem Skalpell wird 1 mm der *distalen* Schwanzspitze entfernt. Direkt anschließend wird die resektomierte Schwanzspitze in 37°C warmes PBS gehalten, bis die Blutung stoppt, um das Versiegen des Blutstromes besser erkennen zu können. Die Zeitmessung beginnt mit der

Amputation der Schwanzspitze und wird mit dem Blutungsstillstand beendet. Wird die Blutungszeit von 15 Minuten überschritten, wird der Versuch abgebrochen und die Blutung mit einem elektrischen Kauter gestoppt.

8. Thrombozyten- und Leukozytenfunktionsanalysen mittels Durchflusszytometrie

Für die Funktionsanalysen von Thrombozyten und Leukozyten werden Messungen mit einem Durchflusszytometer (FACS; fluorescence-activated cell sorting) durchgeführt. Dafür wird in Kooperation mit PD Dr. Kerstin Jurk (Plattform „Thrombozyten-Phänotyp- und Funktionsanalyse“) Blut von GF und CONV-R Mäusen analysiert. Für die Analysen der Thrombozytenfunktionen wird mit der Methode nach Frenette (277) gearbeitet. Für die FACS-Methoden zur Leukozyten-Plättchen Assoziation und –funktion wird die Methode nach Hausding (278) angewendet.

9. Statistische Versuchsauswertung

Die statistische Versuchsauswertung erfolgt mit dem Programm GraphPad Prism 5. Die statistischen Tests, bei denen mehr als nur zwei Gruppen betroffen sind, werden mit dem OneWay ANOVA Test ausgewertet. Wenn nur zwei Gruppen miteinander verglichen werden, wird ein ungepaarter Student t Test angewendet. Die Boxplot Darstellung wurde gewählt, da mit dieser Darstellung die komplette Streuung, der Median, das Minimum und Maximum der Ergebnisse dargestellt werden kann. Klassische Balkendiagramme wurden ebenfalls verwendet. Die statistische Signifikanz wird für einen p-Wert $< 0,05$ angenommen.

IV. ERGEBNISSE

1. Blutwerte von GF, CONV-R, CONV-D, *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} Mäusen

Die Analyse der Blutwerte, gemessen aus Vollblut von GF, CONV-R, CONV-D, *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} Mäusen, zeigte, dass es bei den Parametern Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl keinen Unterschied gab. Die Auftragsmessung des Vitamin K Gehaltes durch die Firma Bioscientia im Plasma von GF und CONV-R Mäusen lag bei beiden Gruppe außerhalb des Referenzbereiches 500-5000ng/L des Menschen, die Konzentrationswerte waren aber in einem ähnlichen Bereich, so dass ein Vitamin K-Mangel keimfreier Tiere ausgeschlossen werden konnte (Tabelle 14).

Tabelle 14: Blutwerte von keimfreien (152), konventionell aufgewachsenen (CONV-R), ehemals keimfreien und anschließend über 14 Tage konventinalisierten (CONV-D), MYD88–Adaptermolekül-defizienten (*Myd88*^{-/-}) und TRIF–Adaptermolekül-defizienten (*Trif*^{-/-}) Mäusen aus Vollblut mit dem Antikoagulanzen EDTA, (n=6), Arithmetisches Mittel; Standardabweichung. Bei keiner der Gruppen war ein Blutparameter signifikant erhöht oder vermindert im Vergleich zu der CONV-R Gruppe. Es wurden ebenso die Vitamin K Werte im Plasma von GF und CONV-R, von der Fa. Bioscientia, gemessen (n=5).

	GF	CONV-R	CONV-D	<i>Myd88</i> ^{-/-}	<i>Trif</i> ^{-/-}
Hämatokrit (L/L)	0,47 (+/- 0,04)	0,47 (+/- 0,03)	0,53 (+/- 0,01)	0,48 (+/- 0,05)	0,46 (+/- 0,03)
Erythrozyten (x10¹²/L)	9,16 (+/- 0,85)	9,09 (+/- 0,52)	10,07 (+/- 0,39)	8,89 (+/- 1,39)	9,08 (+/- 0,67)
Leukozyten (x10⁹/L)	3,78 (+/- 2,31)	3,71 (+/- 1,74)	5,91 (+/- 2,29)	5,06 (+/- 1,49)	2,6 (+/- 2,14)
Thrombozyten (x10⁹/L)	1184 (+/- 173,40)	1285 (+/- 98,42)	1381 (+/-200,43)	1123 (+/- 164,12)	1282 (+/- 196,70)
Vitamin K [ng/L]	160 (+/- 5,32)	211 (+/- 15,2)			

2. Blutungszeiten

2.1. Das Fehlen der Mikrobiota beeinflusst die Blutungszeit im Schwanzspitzenresektionsmodell.

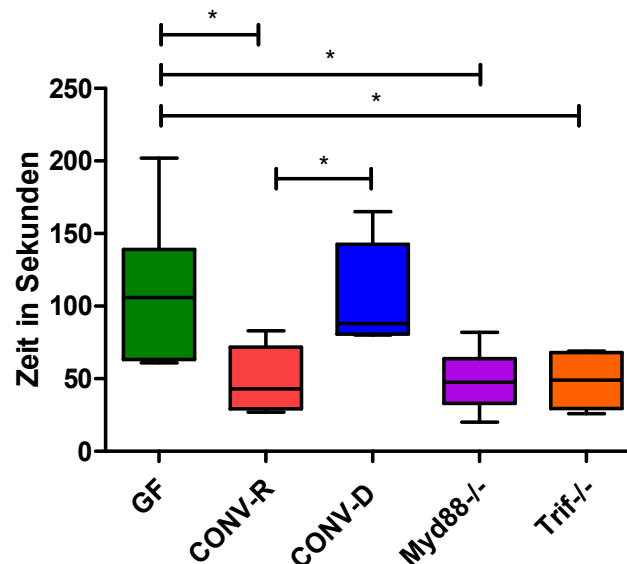


Abbildung 17: Die Blutungszeiten nach Schwanzspitzenresektion von keimfreien (152), konventionell aufgewachsenen (CONV-R), ehemals keimfreien und anschließend über 14 Tage konventionalisierten (CONV-D), MYD88-Adaptermolekül-defizienten (*Myd88*^{-/-}) und TRIF-Adaptermolekül-defizienten (*Trif*^{-/-}) Mäusen, angegeben in Sekunden. Verglichen wurden die Blutungszeiten gegen die GF-Blutungszeit. Die Blutungszeiten der CONV-R, *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} Mäuse waren im Vergleich zu GF Mäusen signifikant verkürzt. CONV-D Mäuse hatten im Vergleich zu CONV-R Mäusen eine verlängerte Blutungszeit und glichen den Zeiten der GF Mäuse. n=5-8, Median (Maximum und Minimum der Zeiten)

Die von Geburt an stattfindende Besiedlung mit einer komplexen Darmflora war mit einer schnelleren Blutstillung assoziiert. Die Blutungszeit in der keimfreien Gruppe betrug 106 Sekunden (Min.61 Sek., Max.202 Sek.). Ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zu der GF Tieren zeigte sich bei CONV-R Mäusen mit 43 Sekunden (Min.27 Sek., Max.83 Sek.), *Myd88*^{-/-} Mäusen mit 47.5 Sekunden (Min. 20 Sek., Max. 82 Sek.) und *Trif*^{-/-} Mäusen mit 49 Sekunden (Min. 26 Sek., Max. 69 Sek.) (Abbildung 17).

Die Kolonisierung ex-keimfreier Tiere für 14 Tage schien keinen wesentlichen Einfluss auf die Blutstillungszeit zu haben. Einen weiteren signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied gab es bei den Blutungszeiten der CONV-D mit 88 Sekunden (Min.80 Sek., Max. 165 Sek.) und *Myd88*^{-/-} mit 47,5 Sekunden (Min.20 Sek., Max.82 Sek.). Das Fehlen der MYD88- und TRIF-Adaptermoleküle führte zu keinem Unterschied in der Blutungszeit im Vergleich zu konventionell aufgezogenen CONV-R Mäusen. Die Adaptermoleküle MYD88 und TRIF

schienen also für die primäre Hämostase keine entscheidende Rolle zu spielen. Bei allen Gruppen kam die Blutung nach Amputation der Schwanzspitze zum Stillstand. Die primäre Hämostase war demnach bei keiner der Gruppen gestört.

3. *In vivo* Darstellung der Thrombusbildung

Durch die Nutzung des Intravitalmikroskops und Färbung zellulärer Blutbestandteile, war es möglich die Thrombusbildung und Thrombozyten-adhäsion in der *A. carotis communis in vivo* darzustellen und aufzunehmen.

3.1. Thrombusbildung an der *A. carotis communis*

Wie oben beschrieben wurde eine Thrombusbildung initiiert, indem eine 10%ige FeCl_3 -Lösung eine Clusterbildung von Erythrozyten bewirkte. Durch die Clusterbildung kommt es zu einer schnellen Aggregation von Thrombozyten und letztendlich zu einem stabilen Thrombus der die *A. carotis communis* der Maus komplett verschließt (279).

3.1.1. Analyse der Gefäßverschlusszeit

Während Thrombozyten nicht an der unverletzten Gefäßwand anhefteten (Abbildung 18 a), kam es nach der Aktivierung der Thrombozyten durch Clusterbildung der Erythrozyten aufgrund des Eisenchlorids zu einer raschen Adhäsion von Thrombozyten an der Gefäßinnenwand (Abbildung 18 b) und einer schnellen Thrombusbildung (Abbildung 18 c + d).

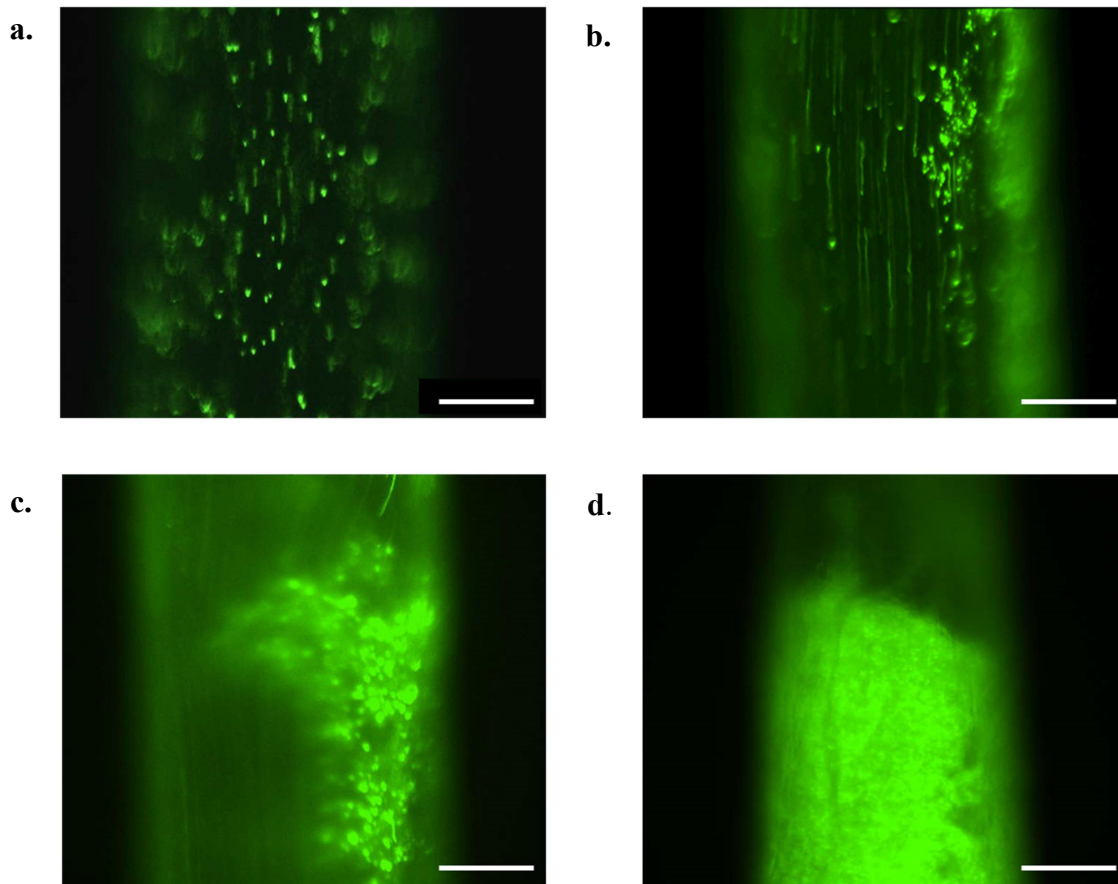
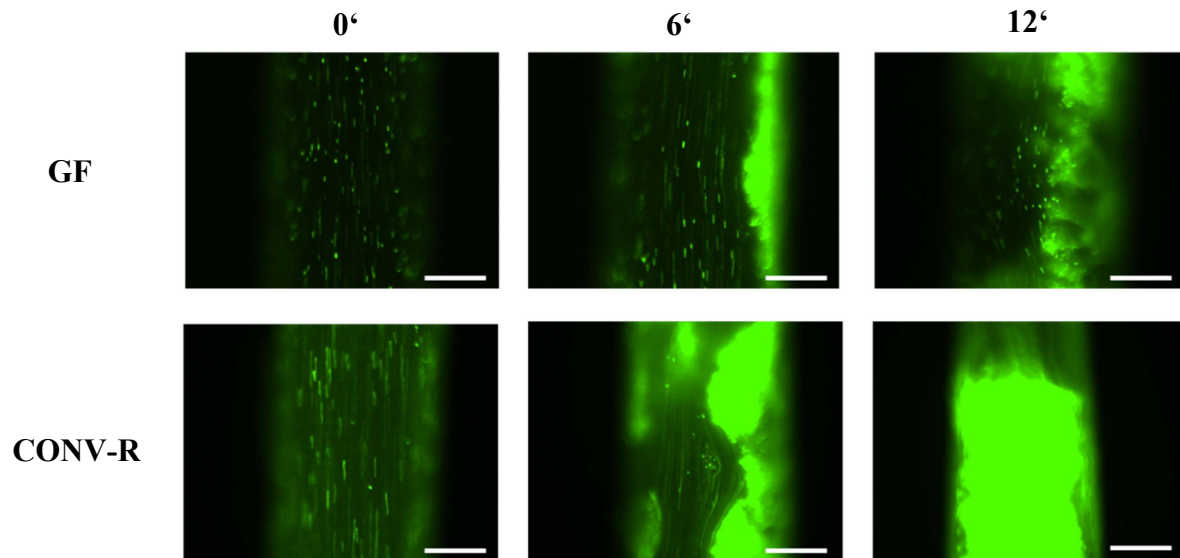


Abbildung 18: a, Unverletzte *A. carotis communis* vor FeCl_3 -Applikation. Keine der mit DCF gefärbten Thrombozyten sind adhären, sie fließen frei im Blutstrom. b, 6 Minuten nach FeCl_3 -Applikation beginnende Adhäsion von Thrombozyten am Endothel. c, Fortlaufende Thrombozytenaggregation an der Gefäßwand. Bildung von Thrombozytenaggregaten. d, Komplette Okklusion der *A. carotis communis* durch einen festen Thrombus. 100-fache Vergrößerung, FITC Filter. (Skalierung 200 μm)

3.1.1.1. Präsenz von Mikrobiota beeinflusst die Okklusionszeit der *A. carotis communis* nach FeCl₃-Applikation

a.



b.

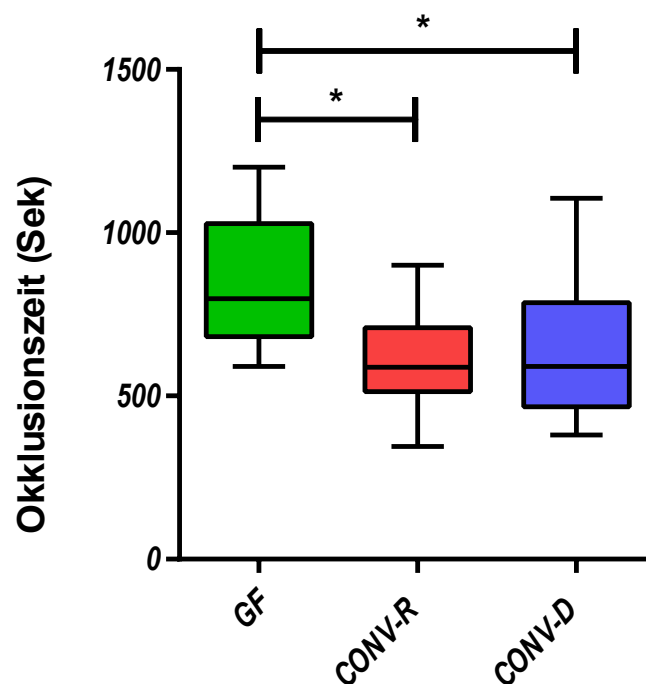


Abbildung 19: a, Beginnende und fortlaufende Thrombusbildung in der *A. carotis communis* bei keimfreien (152) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen ausgelöst durch mit FeCl₃-getränktem Filterpapier. Thrombuswachstum bei 0, 6 und 12 Minuten (Thrombozyten gefärbt mit DCF, 100-fache Vergrößerung, FITC Filter). b, Okklusionszeit der *A. carotis communis* nach FeCl₃-Applikation gemessen in Sekunden bei keimfreien (152), konventionell aufgewachsenen (CONV-R) und ehemals keimfreien und anschließend über 14 Tage

konventionalisierten (CONV-D) Mäusen. Die Okklusionszeit war bei CONV-R und CONV-D Mäusen im Vergleich zu GF Mäusen signifikant verkürzt, (n=12, Median, Maximum und Minimum der Zeiten). (Skalierung 200µm)

Mit 797,5 (Min.590, Max.1200) Sekunden war die Okklusionszeit der *A. carotis communis* bei GF Mäusen gegenüber den CONV-R mit 557,5 (Min.345, Max.900) und den CONV-D Mäusen mit 590 (Min.380, Max. 1105) Sekunden deutlich verlängert (n = 12, Median, Min., Max.) (Abbildung 19 b).

3.1.2. qRT - PCR Analysen der Expression der endothelialen Adhäsions-molekülen VCAM-1 und ICAM-1, dem Gerinnungsprotein vWF und dem natürlichen Antikoagulant TFPI der unverletzten *A. carotis communis*

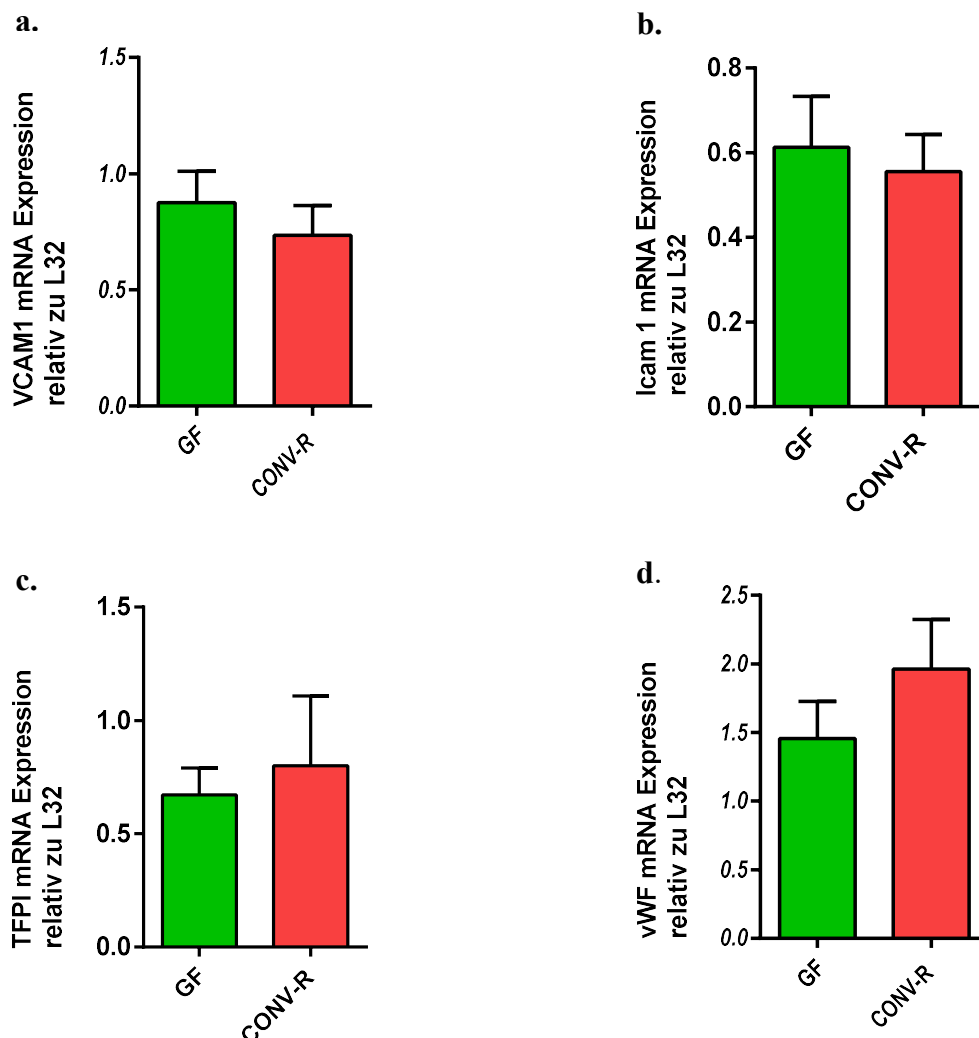


Abbildung 20: a-d, qPCR Analysen von endothelialen Adhäsionsmekülen in unverletzten Carotiden von keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen. a, VCAM-1 Expression im Vergleich zum Housekeeping Gen L32. b, ICAM-1 Expression im Vergleich zu L32 c, TFPI Expression im Vergleich zu L32 und d, vWF Expression im Vergleich zu L32 waren in den unverletzten Carotiden von GF und CONV-R nicht signifikant unterschiedlich exprimiert, (n=8, Mittelwert mit SEM).

Die Expression der jeweiligen Adhäsionsmoleküle wurde relativ gegen das Housekeeping Gen L32, welches unabhängig von Zelltyp und Zellstadium exprimiert wird, gemessen. Die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1, die für Adhäsion und Immigration von Leukozyten verantwortlich sind, war relativ zu L32, nicht reguliert (Abbildung 20 a + b). Die Genexpression des für die primäre Thrombozytenadhäsion wichtigen von Willebrand Faktors war im Endothel der GF und CONV-R Mäuse nicht differentiell reguliert (Abbildung 20 d). Die quantitative Genexpressionsmessung von TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), der durch die Bindung an Tissue Faktor/Faktor VIIa-Komplex die Gerinnung hemmt, war in GF und CONV-R Mäusen nicht differentiell reguliert (Abbildung 20 c). Die Besiedlung mit einer intakten Mikrobiota führte zu keiner erhöhten Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen.

4. Ischämie-Reperfusions-Verletzungsmodell an der Mikrozirkulation des Mesenteriums

4.1. Die Präsenz von Mikrobiota (CONV-R) ging mit einer erhöhten Leukozytenadhäsion und einer vermehrten Anzahl von Leukozytenkonjugaten einher.

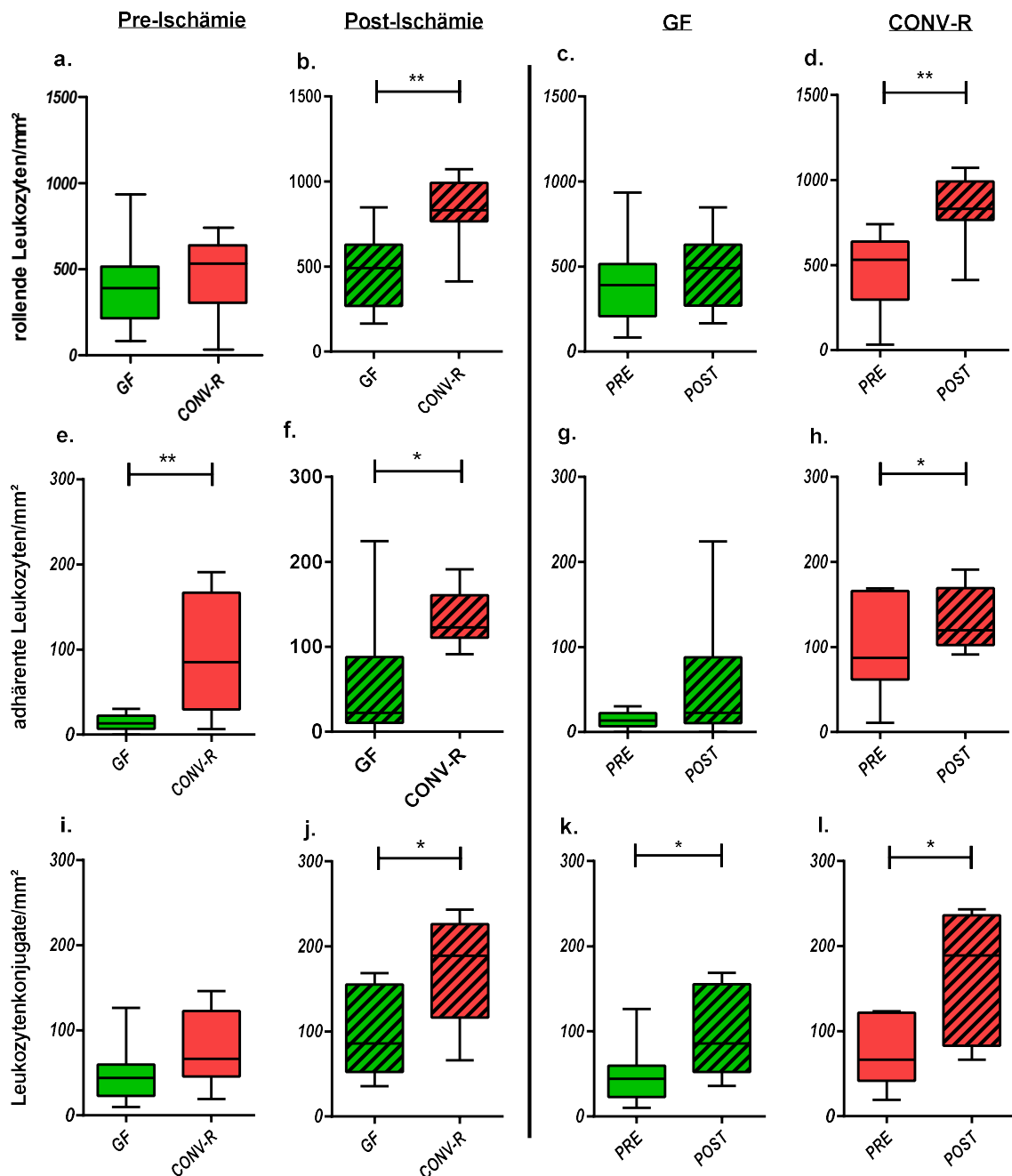


Abbildung 21: a-l: Vor dem künstlich herbeigeführten mesenterialen Infarkt wurde die natürlich vorkommende Anzahl an Leukozyten bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen ausgezählt, (n=10; Median, Min., Max.). a + b, Einfluss der Mikrobiota auf die Anzahl von rollenden Leukozyten (280, 281) bei GF und CONV-R. c + d,

Einfluss der Ischämie auf die Anzahl der rollenden Leukozyten bei GF und CONV-R Mäusen.
a, Rollende Leukozyten bei GF und CONV-R Pre-Ischämie. b, Rollende Leukozyten bei GF und CONV-R Post-Ischämie. c, Rollende Leukozyten Pre- und Post-Ischämie bei GF. d, Rollende Leukozyten Pre- und Post-Ischämie bei CONV-R Mäusen. e + f, Einfluss der Mikrobiota auf adhärente Leukozyten. g + h: Einfluss der Ischämie auf adhärente Leukozyten bei GF und CONV-R Mäusen. e, Adhärenente Leukozyten Pre-Ischämie bei GF und CONV-R Mäusen. f, Adhärenente Leukozyten bei GF und CONV-R Mäusen Post-Ischämie. g, Adhärenente Leukozyten bei GF Pre- und Post-Ischämie. h, Adhärenente Leukozyten bei CONV-R Mäusen Pre- und Post-Ischämie. i + j, Einfluss der Mikrobiota auf Leukozytenkonjugate bei GF und CONV-R Mäusen. i, Leukozytenkonjugate Pre-Ischämie bei GF und CONV-R Mäusen. j, Leukozytenkonjugate Post-Ischämie bei GF und CONV-R Mäusen. k + l, Einfluss der Ischämie bei GF und CONV-R Mäusen. k: Leukozytenkonjugate bei GF Pre- und Post-Ischämie. l, Leukozytenkonjugate bei CONV-R Pre- und Post-Ischämie.

Rollende Leukozyten:

Wirkung des Mikrobioms:

Tabelle 15: Zunahme (-fach) von rollenden Leukozyten durch den Einfluss des Mikrobioms Pre- und Post-Ischämie bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen.

	Zunahme (-fach) CONV-R/GF von rollenden Leukozyten
Pre-Ischämie	1,37
Post-Ischämie	1,69 ** p = 0,0033

GF vs CONV-R: Pre-Ischämie waren mit 390,1 (Min.83, Max.935,1) rollende Leukozyten/mm² die GF Mäuse, den CONV-R Mäusen mit 533,2 (Min.33,2, Max.741,4) rollende Leukozyten/mm², leicht unterlegen. Post-Ischämie zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit 491 (Min.166, Max.849,3) rollenden Leukozyten/mm² bei GF Mäusen und 830,8 (Min.412,2, Max.1072) rollenden Leukozyten/mm² bei CONV-R Mäusen (** p = 0,0033) (Abbildung 21 a +b).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 16: Zunahme (-fach) von rollenden Leukozyten durch den Einfluss der Ischämie bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von rollenden Leukozyten
GF	1,20
CONV-R	1,48 ** p = 0,0033

GF: Pre-Ischämie mit 390.1 (Min. 83, Max.935) rollende Leukozyten/mm² und Post-Ischämie 491 (Min.166, Max.849) rollende Leukozyten/mm² zeigte sich bei GF Mäusen kein Unterschied (Abbildung 21 c).

CONV-R: Bei CONV-R Mäusen war die Zahl an rollenden Leukozyten Pre-Ischämie mit 471, 8 (Min.33,2, Max.741,4) rollende Leukozyten/mm² und Post-Ischämie mit 821,7 (Min.412,2, Max.1072) rollende Leukozyten/mm² signifikant erhöht (** p = 0,0033) (Abbildung 21 d).

Durch die Präsenz des Mikrobioms kam es zu einer erhöhten Anzahl von rollenden Leukozyten bei CONV-R Mäusen. Dieser Effekt wurde durch eine 60-minütige Ischämie signifikant verstärkt (p=0,003).**

Adhärente Leukozyten:

Wirkung des Mikrobioms:

Tabelle 17: Zunahme (-fach) von adhärenenten Leukozyten durch den Einfluss des Mikrobioms bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen Pre- und Post-Ischämie.

	Zunahme (-fach) CONV-R/GF von adhärenenten Leukozyten
Pre-Ischämie	6,50 ** p = 0,0055
Post-Ischämie	2,34 * p = 0,0178

GF vs CONV-R: Die Adhäsion von Leukozyten war bei GF Pre-Ischämie mit 13,28 (Min.0, Max.30,38) adhärenenten Leukozyten/mm² zu CONV-R Mäusen mit 85,08 (Min.6,64, Max.190,9) adhärenenten Leukozyten/mm² signifikant vermindert (** p = 0,0055). Nach der 60-minütigen Ischämie war die Adhäsion der Leukozyten bei GF Mäusen mit 22,41 (Min.0, Max.224,1) adhärenenten Leukozyten/mm² im Vergleich zur Anzahl adhärenenter Leukozyten in CONV-R Mäusen mit 122,8 (Min.91,3, Max.190,9) adhärenenten Leukozyten/mm² (* p = 0,0178) signifikant reduziert (Abbildung 21 e + f).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 18: Zunahme (-fach) von adhärenenten Leukozyten durch den Einfluss der 60-minütigen-Ischämie bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von adhärenenten Leukozyten
GF	4,15
CONV-R	1,49 * p = 0,033

GF: Pre-Ischämie mit 13,28 (Min.0, Max.30,38) adhärenenten Leukozyten/mm² und Post-Ischämie mit 22,41 (Min.0, Max.224,1) adhärenenten Leukozyten/mm² zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Adhärenz von Leukozyten (Abbildung 21 g).

CONV-R: Die Zahl der adhärenenten Leukozyten war Pre-Ischämie mit 87,15 (Min.10,96, Max.168,7) adhärenenten Leukozyten/mm² und Post-Ischämie mit 119,5 (Min.91,30, Max.190,9) adhärenenten Leukozyten signifikant unterschiedlich (* p = 0,033) (Abbildung 21 h).

Die Präsenz von Mikrobiota bewirkte schon im physiologischen Zustand eine signifikant erhöhte Anzahl adhärenter Leukozyten am Endothel der venösen Mesenterialgefäße (**p = 0,0055). Post-Ischämie war die Anzahl der adhärenenten Leukozyten bei CONV-R Mäusen erhöht (*p = 0,0178).

Leukozytenkonjugate:

Wirkung des Mikrobioms:

Tabelle 19: Zunahme (-fach) von Leukozytenkonjugaten durch den Einfluss des Mikrobioms bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Pre- und Post-Ischämie.

	Zunahme (-fach) CONV-R/GF von Leukozytenkonjugaten
Pre-Ischämie	1,71
Post-Ischämie	1,77 * p = 0,0113

GF vs CONV-R: Pre-Ischämie zeigte sich eine Tendenz zu verminderten Leukozytenkonjugaten mit 43,99 (Min.9,96, Max.126,2) Leukozyten-konjugaten/mm² bei GF

Mäusen. Leukozytenkonjugate bei CONV-R Mäusen lagen bei 66,40 (Min.19,26, Max.146,1). Post-Ischämie manifestierte sich der Unterschied als signifikant (* $p = 0,0113$) bei 85,74 (Min.35,86, Max.168,7) Leukozytenkonjugaten/mm² in der GF Gruppe und 189,2 (Min.66,4, Max.243,4) Leukozytenkonjugaten/mm² in der CONV-R Gruppe (Abbildung 21 i + j).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 20: Zunahme (-fach) von Leukozytenkonjugaten Pre- und Post-Ischämie bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen durch den Einfluss der Ischämie.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von Leukozytenkonjugaten
GF	2,04 * $p = 0,0249$
CONV-R	2,10 * $p = 0,019$

GF: Mit 43,99 (Min.9,96, Max.126,2) Leukozytenkonjugaten/mm² Pre-Ischämie und 85,74 (Min.35,86 , Max.168,7) Leukozytenkonjugaten/mm² Post-Ischämie waren die die Leukozytenkonjugate Pre-Ischämie im Vergleich zu Post-Ischämie signifikant reduziert (* $p = 0,0249$) (Abbildung 21 k).

CONV-R: Mit 66,40 (Min.19,26, Max.123,3) Leukozytenkonjugaten/mm² Pre-Ischämie und 189,2 (Min.66,4, Max.243,4) Post-Ischämie war die Anzahl der Leukozytenkonjugate im pre-ischämischen Zustand signifikant vermindert (* $p = 0,019$) (Abbildung 21 l).

Bei GF und CONV-R Mäusen bewirkte Ischämie einen Anstieg von Leukozytenkonjugaten. Im Vergleich hatten CONV-R Mäuse Post-Ischämie eine höhere Anzahl an Leukozytenkonjugaten als die GF Mäuse.

4.2. Präsenz einer komplexen Mikrobiota (CONV-R) führte zu einer erhöhten Thrombozytenadhäsion Post-Ischämie und vermehrten Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion Pre-und Post-Ischämie

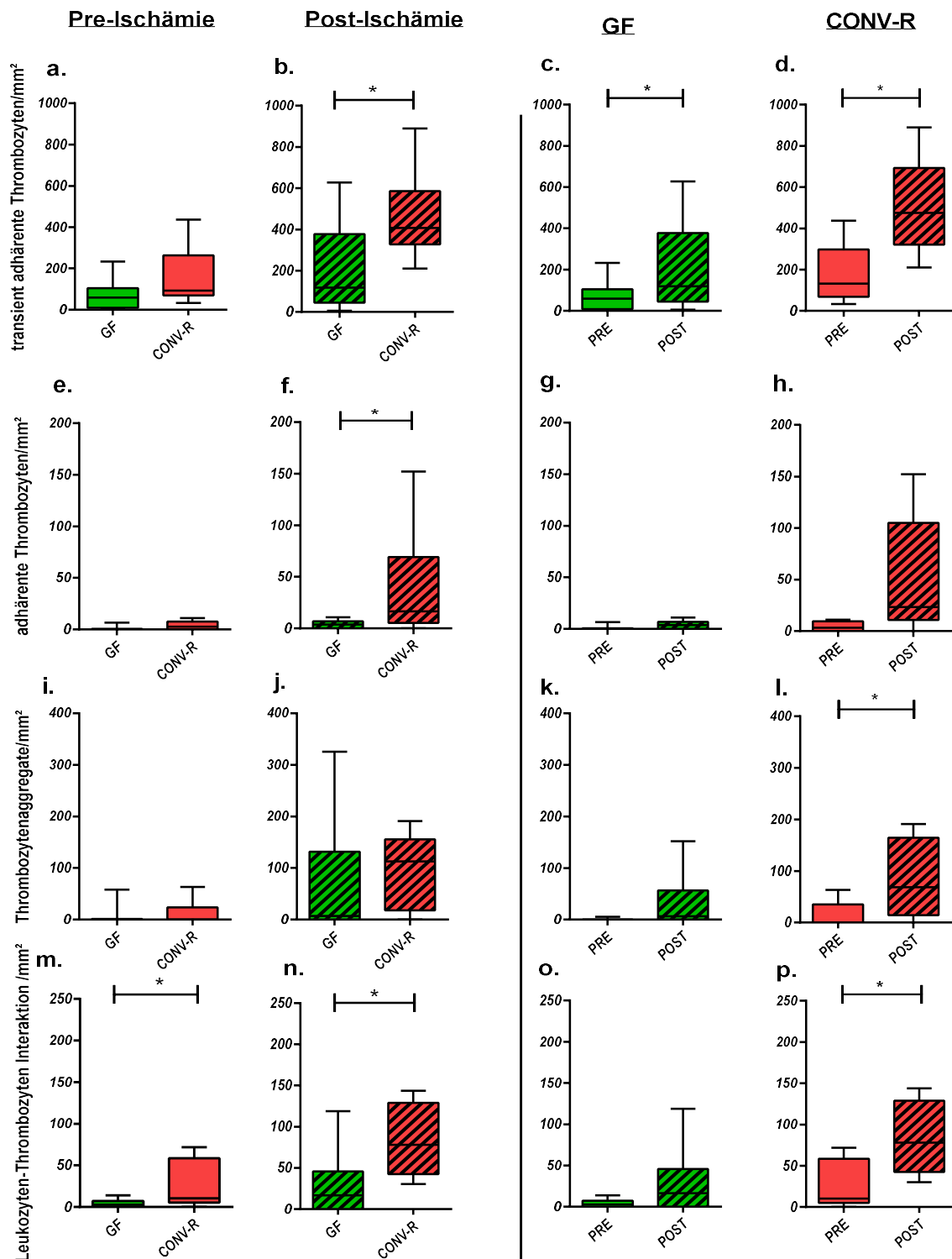


Abbildung 22: a-p, Adhäsionsstadien von Thrombozyten und deren Interaktion mit Leukozyten am mesenterialen Venolenendothel (n=10; Median, Min., Max.). a + b, Einfluss der Mikrobiota auf transient adhärenente Trombozyten. a, Transient adhärenente Thrombozyten Pre-Ischämie bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen. b, Transient adhärenente

Thrombozyten Post-Ischämie. c + d, Einfluss der Ischämie auf transient adhärenente Thrombozyten bei GF (152) und CONV-R Mäusen. e-h, Adhärenente Thrombozyten bei GF und CONV-R Mäusen. e + f, Einfluss der Mikrobiota auf adhärenente Thrombozyten. e, Adhärenente Thrombozyten bei GF und CONV-R Mäusen Pre-Ischämie. f, Adhärenente Thrombozyten bei GF und CONV-R Mäusen Post-Ischämie. g + h, Einfluss der Ischämie auf adhärenente Thrombozyten. g, Adhärenente Thrombozyten bei GF Mäusen Pre- und Post-Ischämie. h, Adhärenente Thrombozyten bei CONV-R Mäusen Pre- und Post-Ischämie. i-l, Thrombozytenaggregate bei GF und CONV-R Mäusen. i + j, Einfluss der Mikrobiota auf Thrombozytenaggregate bei GF und CONV-R Mäusen. i, Thrombozytenaggregate bei GF und CONV-R Mäusen Pre-Ischämie. j, Einfluss der Mikrobiota auf Thrombozytenaggregate bei GF und CONV-R Mäusen Post-Ischämie. k + l, Einfluss der Ischämie auf Thrombozytenaggregate bei GF und CONV-R Mäusen. k, Thrombozytenaggregate bei GF Mäusen Pre- und Post-Ischämie. l, Thrombozytenaggregate bei CONV-R Mäusen Pre- und Post-Ischämie. m-p, Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion (LTI). m + n, Einfluss der Mikrobiota auf LTI bei GF und CONV-R Mäusen. m: LTI bei GF und CONV-R Mäusen Pre-Ischämie. n, LTI bei GF und CONV-R Mäusen Post-Ischämie. o + p, Einfluss der Ischämie auf LTI. o, LTI bei GF Mäusen Pre- und Post-Ischämie. p, LTI bei CONV-R Mäusen Pre- und Post-Ischämie.

Transient adhärenente Thrombozyten

Wirkung des Mikrobioms:

Tabelle 21: Zunahme (-fach) von transient adhärenenten Thrombozyten bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen Pre- und Post-Ischämie.

	Zunahme (-fach) CONV-R/GF von transient adhärenente Thrombozyten
Pre-Ischämie	2,37 * p = 0,053
Post-Ischämie	2,28 * p = 0,017

GF vs CONV-R: Pre-Ischämie waren bei GF Mäusen die transient adhärenenten Thrombozyten/mm²(281) mit 58,93 (Min.2,65, Max.232,4) gegenüber 92,46 (Min.33,20, Max.437,1) bei CONV-R Mäusen reduziert. Post-Ischämie stieg die Anzahl von transient adhärenenten Thrombozyten bei CONV-R Tieren mit 406,7 (Min.210,9, Max.889,8) signifikant gegenüber der GF Gruppe mit 118,9 (Min.6,64, Max.627,5) an (* p = 0,0172) (Abbildung 22 a+ b).

Wirkung der Ischämie:**Tabelle 22: Zunahme (-fach) von transient adhärenenten Thrombozyten bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen nach dem Einfluss einer Ischämie.**

	Zunahme (-fach) Post/Pre von transient adhärenenten Thrombozyten
GF	2,93 * p = 0,0257
CONV-R	2,82 * p = 0,0122

GF: Pre-Ischämie war die Anzahl transient adhärenenter Thrombozyten/mm² mit 58,93 (Min.2,65, Max.232,4) gegenüber 118,9 (Min.6,64, Max.627,5) transient adhärenenter Thrombozyten/mm² Post-Ischämie signifikant vermindert (*p = 0,0257) (Abbildung 22c).

CONV-R: Mit 132,6 (Min.33,2, Max.437,1) transient adhärenenten Thrombozyten/mm² Pre-Ischämie und 474,8 (Min.210,2, Max.889,8) transient adhärenenten Thrombozyten Post-Ischämie waren die transient adhärenenten Thrombozyten Pre-Ischämie signifikant reduziert (*p = 0,0122) (Abbildung 22 d).

Die Präsenz von Mikrobiota führte zu einer erhöhten Anzahl von transient adhärenenten Thrombozyten nach der induzierten Ischämie.

Adhärente Thrombozyten

Wirkung des Mikrobioms:

Tabelle 23: Zunahme (-fach) von adhärennten Thrombozyten bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen durch den Einfluss des Mikrobioms.

	Zunahme (-fach) CONV-R/GF von adhärennten Thrombozyten
Pre-Ischämie	3,84
Post-Ischämie	9,86 * p = 0,0223

GF vs CONV-R: Pre-Ischämie war die Anzahl bei GF Mäusen von 0 (Min.0, Max.6,64) adhärennten Thrombozyten/mm² gegenüber den CONV-R Mäusen mit 2,75 (Min.0, Max.11,06) adhärennten Thrombozyten/mm² reduziert. Post-Ischämie war ein signifikanter Unterschied mit 3,73 (Min.0, Max.10,96) adhärennten Thrombozyten/mm² bei GF Mäusen und 16,6 (Min.0, Max.152,2) adhärennten Thrombozyten/mm² bei CONV-R Mäusen festzustellen (* p = 0,0223) (Abbildung 22 e + f).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 24: Zunahme (-fach) von adhärennten Thrombozyten durch den Einfluss der Ischämie bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von adhärennten Thrombozyten
GF	4,33
CONV-R	11,13

GF: Pre-Ischämie war die Anzahl von adhärennten Thrombozyten bei 0 (Min.0, Max.6,64) adhärennten Thrombozyten/mm² und Post-Ischämie bei 3,75 (Min.0, Max.10,96) (Abbildung 22 g).

CONV-R: Pre-Ischämie war die Anzahl bei 3,32 (Min.0, Max.11,06) adhärennten Thrombozyten/mm² und Post-Ischämie bei 23,24 (Min.0, Max.152,2) adhärennten Thrombozyten/mm² (Abbildung 22 h).

Die Präsenz der komplexen Mikrobiota führte zu einer signifikant erhöhten Adhärenz

von Thrombozyten im post-ischämischen Zustand.

Thrombozytenaggregate

Wirkung des Mikrobioms:

Tabelle 25: Zunahme (-fach) von Thrombozytenaggregaten bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen durch den Einfluss des Mikrobioms.

	Zunahme (-fach) CONV-R/GF von Thrombozytenaggregaten
Pre-Ischämie	20,18
Post-Ischämie	2,86

GF vs CONV-R: Pre-Ischämie zeigte sich kein Unterschied zwischen GF und CONV-R Tieren in der Anzahl von Thrombozytenaggregaten/mm². Post-Ischämie zeigte sich eine Tendenz bei GF Mäusen mit 6,88 (Min.0, Max.325,9) Thrombozytenaggregaten/mm² und 112,9 (Min.0, Max.190,9) Thrombozytenaggregaten/mm² bei CONV-R Mäusen, zur verstärkten Bildung von Thrombozytenaggregaten (Abbildung 22 i + j).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 26: Zunahme (-fach) von Thrombozytenaggregaten bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen durch den Einfluss der Ischämie.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von Thrombozytenaggregaten
GF	56,03
CONV-R	7,96 * p = 0,02

GF: Pre-Ischämie mit 0 (Min.0, Max. 5,47) Thrombozytenaggregate/mm² und Post-Ischämie mit 6,88 (Min.0, Max.152,1) bestand kein Unterschied (Abbildung 22 k).

CONV-R: Pre-Ischämie mit 0 (Min.0, Max.63,58) Thrombozytenaggregaten/mm² und Post-ischämie mit 14,44 (Min.0, Max.190,9) Thrombozytenaggregaten/mm² gab es einen signifikanten Unterschied in der CONV-R Gruppe (* p = 0,02) (Abbildung 22 l).

Nur in den mit Mikrobiota besiedelten CONV-R Mäusen zeigte sich nach der Ischämie

ein signifikanter Anstieg der Thrombozytenaggregate.

Leukozyten-Thrombozyten Interaktion

Wirkung des Mikrobioms:

Tabelle 27: Zunahme (-fach) von LTI bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen durch den Einfluss des Mikrobioms.

	Zunahme (-fach) CONV-R/GF von Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion (LTI)
Pre-Ischämie	6,91 * p = 0,0319
Post-Ischämie	2,85

GF vs CONV-R: Pre-Ischämie zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit 2,65 (Min.0, Max.13,83) Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen/mm² bei GF Mäusen und 10,23 (Min.0, Max.71,88) Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen/mm² bei CONV-R Mäusen (* p = 0,0319). Post-Ischämie blieb dieser Unterschied mit 16,6 (Min.0, Max.118,9) Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen/mm² in der GF Gruppe und 78,02 (Min.30,38, Max.143,8) Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen/mm² in der CONV-R Gruppe erhalten (Abbildung 22 m + n).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 28: Zunahme (-fach) von LTI bei GF und CONV-R Mäusen durch den Einfluss der Ischämie bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von Leukozyten-Thrombozyten Interaktion (LTI)
GF	7,70
CONV-R	3,17

GF: Innerhalb der GF Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied mit Pre-Ischämie 2,65 (Min.0, Max.13,83) Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen/mm² und Post-Ischämie

16,6 (Min.0, Max.118,9) Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen/mm² (Abbildung 22 o).

CONV-R: Mit 13,83 (Min.0, max.71,88) Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen/mm² Pre-Ischämie und 47,73 (Min.30,38, Max. 143,8) Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen/mm² Post-Ischämie zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 22 p).

Die Präsenz von Mikrobiota bewirkte Pre-Ischämie einen Anstieg der Anzahl von Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen im Vergleich zu keimfreien Mäusen. Durch die Induktion der Ischämie wurde dieser Unterschied aufgehoben.

4.3. Kolonisierung mit dem Zäkuminhalt von CONV-R Mäusen und Monokolonisierung mit *Escherichia coli* JP313 beeinflusste die Leukozytenadhäsion

Die Kolonisierung des Intestinaltraktes bewirkte eine erhöhte Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten in mesenterialen Gefäßen. Um die Mechanismen, die dies bewirken, weiter aufzuklären, wurden keimfreie Mäuse kolonisiert. Dafür wurden sie mit einer komplexen Mikrobiota aus dem Zäkum eines Blinddarmes einer CONV-R Maus besiedelt. Außerdem wurden keimfreie Mäuse mit einem einzigen Bakterienstamm, *Escherichia coli* JP313, unter Isolatorbedingungen für 14 Tage kolonisiert, um den Effekt eines einzelnen mikrobiellen Besiedlers zu untersuchen. Die Monokolonisierung mit dem Enterobakterium wurde in sterilen Isolatoren durchgeführt, um die Besiedlung mit anderen Mikroorganismen in den ehemals keimfreien Mäusen auszuschließen.

4.3.1. Die Kolonisierung GF Mäuse für 14 Tage mit Mikrobiota von CONV-R Mäusen und einer *E. coli* JP313 Monokultur verstärkte die Leukozytenadhäsion

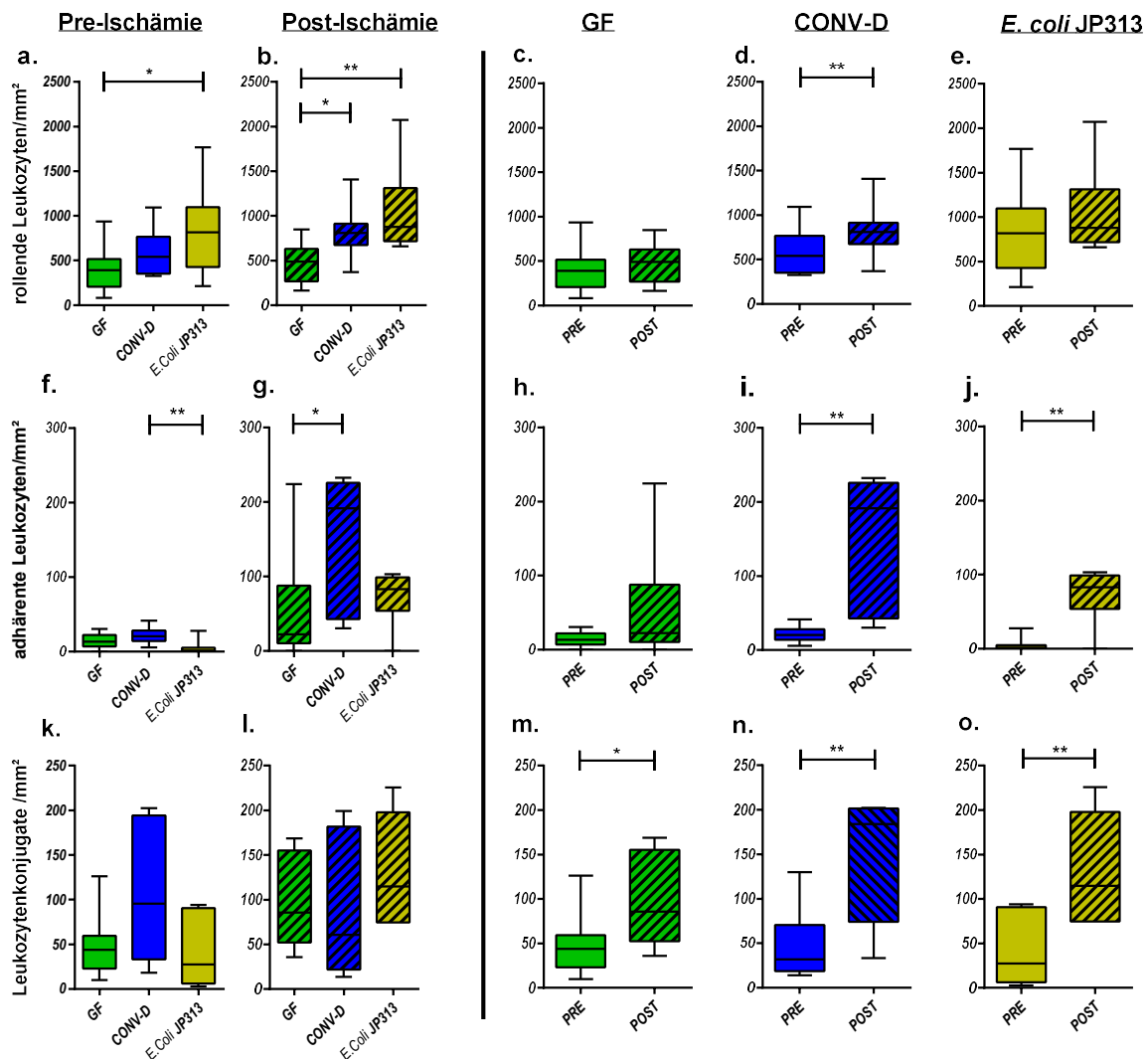


Abbildung 23: a-o, Anzahl verschiedener Leukozytenstadien von keimfreien (GF), ehemals keimfreien und anschließend über 14 Tage konventionalisierten (CONV-D) und ehemals keimfreien und anschließend mit *E. coli* JP313 monokolonisierten (*E. coli* JP 313) Mäusen vor und nach der Induktion einer 60-minütigen Ischämie (n=8, Median, Min., Max.). a-e, Rollende Leukozyten bei GF, CONV-D und *E. coli* JP313 Mäusen. a + b, Einfluss der Kolonisierung mit einer komplexen Mikrobiota und der Monokolonisierung auf die Anzahl von rollenden Leukozyten. a, Einfluss der Kolonisierungen auf rollende Leukozyten Pre-Ischämie. b, Einfluss der Kolonisierungen auf rollende Leukozyten Post-Ischämie. c-e, Einfluss der Ischämie auf rollende Leukozyten bei GF, CONV-D und *E. coli* JP313 Pre- und Post-Ischämie. f-j, Adhärenente Leukozyten bei GF, CONV-D und *E. coli* JP313 Mäusen Pre- und Post-Ischämie. f + g, Einfluss der Kolonisierungen auf die Anzahl von adhärenenten Leukozyten. h-j, Einfluss der Ischämie bei GF, CONV-D und *E. coli* JP313 Pre- und Post-Ischämie. k-o, Bildung von Leukozytenkonjugaten bei GF, CONV-D, *E. coli* JP313 Mäusen Pre- und Post-Ischämie. k + l, Einfluss der Kolonisierung auf Anzahl der Leukozytenkonjugate Pre- und Post-Ischämie. m-o, Einfluss der Ischämie auf Anzahl von Leukozytenkonjugaten bei GF, CONV-D und *E. coli* JP 313 Pre- und Post-Ischämie.

Rollende Leukozyten:**Wirkung der Kolonisierung:****Tabelle 29: Zunahme (-fach) von rollenden Leukozyten ausgelöst durch Kolonisierung der keimfreien (GF) Mäuse mit Zäkuminhalt (CONV-D) und *E. coli* JP313 (*E. coli* JP313) Pre- und Post-Ischämie.**

Zunahme (-fach)	CONV-D/GF	<i>E. coli</i> JP313/GF
Pre-Ischämie	1,45	2,12 * p = 0,0459
Post-Ischämie	1,73 (*p = 0,0463)	2,22 ** p = 0,0037

GF vs *E. coli* JP313: Pre-Ischämie bestand ein signifikanter Unterschied zwischen GF Mäusen mit 390,1 (Min.83, Max.935,1) rollenden Leukozyten/mm² und *E. coli* JP313 mit 816, 2 (Min.213, Max.1768) rollenden Leukozyten/mm². Post- Ischämie war der Unterschied mit 491 (Min.166, Max.849,3) rollenden Leukozyten/mm² bei GF Mäusen und 877 (Min.661,2, Max.2072) rollenden Leukozyten/mm² bei *E. coli* JP313 kolonisierten Tieren signifikant (** p = 0,0037). Post-Ischämie war zwischen der GF mit 491 (Min.166, Max.849,3) rollenden Leukozyten/mm² und der CONV-D Gruppe mit 810,1 (Min.370,7, Max. 1408) rollenden Leukozyten/mm² signifikant unterschiedlich (* p = 0,0463) (Abbildung 23 a + b).

Wirkung der Ischämie:**Tabelle 30: Zunahme (-fach) von rollenden Leukozyten ausgelöst durch Ischämie bei keimfreien (GF), ehemals keimfreien und anschließend über 14 Tage konventinalisierten (CONV-D) und ehemals keimfreien und anschließend mit *E. coli* JP313 monokolonisierten (*E. coli* JP 313) Mäusen.**

	Zunahme (-fach) Post/Pre von rollenden Leukozyten
GF	1,20
CONV-D	1,43 ** p = 0,0071
<i>E. coli</i> JP313	1,26

GF: Die Ischämie erzeugte bei den GF Mäusen keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl rollender Leukozyten/mm² (Abbildung 23 c).

CONV-D: Pre-Ischämie mit 542,2 (Min.326,5 , Max.1093) rollenden Leukozyten /mm² und Post-Ischämie mit 810,1 (Min.370,7, Max. 1408) rollenden Leukozyten/mm² war ein signifikanter Unterschied in der CONV-D Gruppe (**p = 0,0071) (Abbildung 23 d).

E. coli JP313: Die Ischämie erzeugte bei den mit *E.coli* JP313 monokolonisierten Mäusen keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl rollender Leukozyten/mm² (Abbildung 23 e).

Die Kolonisierung keimfreier Mäuse mit einer komplexen Mikrobiota oder eine Monokolonisierung *E. coli* JP313 führte zu einer höheren Anzahl an rollenden Leukozyten in Pre- und Post-Ischämie im Vergleich zu GF Mäusen.

Adhärenente Leukozyten

Wirkung der Kolonisierung:

Tabelle 31: Zunahme (-fach) von adhärenenten Leukozyten ausgelöst durch Kolonisierung von keimfreien (GF) Mäusen mit Zäkuminhalt (CONV-D) und *E. coli* JP313 (*E. coli* JP313) Pre- und Post-Ischämie.

Zunahme (-fach)	CONV-D/GF	<i>E. coli</i> JP313/GF
Pre-Ischämie	1,5	0,34
Post-Ischämie	2,6 * p = 0,038	1,24

Pre-Ischämie war mit 20,42 (Min.5,53, Max.41,5) adhärenenten Leukozyten/mm² bei CONV-D Mäusen und mit 1,38 (Min.0, Max.27,67) adhärenenten Leukozyten/mm² ein signifikanter Unterschied zu beobachten. Bei der GF und *E. coli* JP313 zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Post-Ischämie waren die GF Mäuse mit 22,41 (Min.0, Max.224,1) adhärenenten Leukozyten/mm² den CONV-D Mäusen mit 191,5 (Min.30,38, Max.232,4) adhärenenten Leukozyten/mm² signifikant unterlegen (* p = 0,038) (Abbildung 23 f + g).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 32: Zunahme (-fach) von adhärenenten Leukozyten ausgelöst durch Ischämie bei keimfreien (GF), ehemals keimfreien und anschließend über 14 Tage konventinalisierten (CONV-D) und ehemals keimfreien und anschließend mit *E. coli* JP313 monokolonisierten (*E. coli* JP 313) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von adhärenenten Leukozyten
GF	4,15
CONV-D	7,15 (** p = 0,0055)
<i>E. coli</i> JP313	14,87 (** p = 0,0015)

GF: Bei GF Mäusen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Pre- und Post-Ischämie (Abbildung 23 h).

CONV-D: Pre-Ischämie mit 20,42 (Min.5,53, Max.41,5) adhärenenten Leukozyten/mm² und Post-Ischämie mit 191,5 (Min.30,38, Max. 232,4) adhärenenten Leukozyten/mm² war ein signifikanter Unterschied in der CONV-D Gruppe vorhanden (**p = 0,0055) (Abbildung 23 i).

E. coli JP313: Pre-Ischämie mit 1,38 (Min.0, Max. 27,67) adhärenenten Leukozyten/mm² und Post-Ischämie mit 83 (Min.0, Max. 102,9) adhärenenten Leukozyten/mm² zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der mit *E. coli* JP313 kolonisierten Gruppe (**p = 0,0015) (Abbildung 23 j).

Die Kolonisierung von GF Mäusen mit einer komplexen Mikrobiota bewirkte eine erhöhte Anzahl an adhärenenten Leukozyten Pre- und Post-Ischämie im Vergleich zu GF Mäusen. Eine Monokolonisierung mit *E.coli* JP313 bewirkte einen starken Anstieg von adhärenenten Leukozyten Post-Ischämie.

Leukozytenkonjugate

Wirkung der Kolonisierung:

Tabelle 33: Zunahme (-fach) von Leukozytenkonjugaten ausgelöst durch Kolonisierung von keimfreien (GF) Mäusen mit Zäkuminhalt (CONV-D) und *E. coli* JP313 (*E. coli* JP313) Pre- und Post-Ischämie.

Zunahme (-fach)	CONV-D/GF	<i>E.coli</i> JP313/GF
Pre-Ischämie	2,21	0,90
Post-Ischämie	0,91	1,36

Pre-Ischämie zeigte sich zwischen keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied. Auch Post-Ischämie war kein Unterschied zwischen den Gruppen zu sehen (Abbildung 23 k + l).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 34: Zunahme von Leukozytenkonjugaten ausgelöst durch Ischämie bei keimfreien (GF), ehemals keimfreien und anschließend über 14 Tage konventinalisierten (CONV-D) und ehemals keimfreien und anschließend mit *E. coli* JP313 monokolonisierten (*E. coli* JP 313) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von Leukozytenkonjugaten
GF	2,04 * p = 0,0249
CONV-D	0,84 ** p = 0,0034
<i>E. coli</i> JP313	3,08 ** p = 0,0045

GF: Pre-Ischämie mit 43,99 (Min.9,96, Max.126,2) Leukozytenkonjugaten/mm² und 85,74 (Min.35,86, Max.168,7) Leukozytenkonjugaten/mm² Post-Ischämie war ein signifikanter Unterschied festzustellen (* p = 0,0249) (Abbildung 23 m).

CONV-D: Pre-Ischämie mit 31,82 (Min.13,78, Max.130) Leukozytenkonjugaten/mm² und 184 (Min.33,2, Max.202,5) Leukozytenkonjugaten/mm² Post-Ischämie war ein signifikanter Unterschied festzustellen (** p = 0,0034) (Abbildung 23 n).

E. coli JP313: Pre-Ischämie mit 27,67 (Min.2,76, Max.94,07) Leukozyten-konjugaten/mm² und 114,8 (Min.74,7, Max.228,8) Leukozytenkonjugaten/mm² Post-Ischämie war ein

signifikanter Unterschied vorhanden (** $p = 0,0045$) (Abbildung 23 o).

Die Kolonisierung von GF Mäusen wirkte sich nicht auf eine vermehrte Bildung von Leukozytenkonjugaten aus. Eine Ischämie bewirkte bei allen Mausgruppen eine signifikante Zunahme an Leukozytenkonjugaten im post-ischämischen Zustand.

4.3.2. Die Monokolonisierung mit *E. coli* JP313 und Kolonisierung mit Mikrobiota aus dem Zäkum von CONV-R Mäusen verstärkte die Thrombozytenadhäsion Post-Ischämie und die Leukozyten-Thrombozyten-Interaktionen

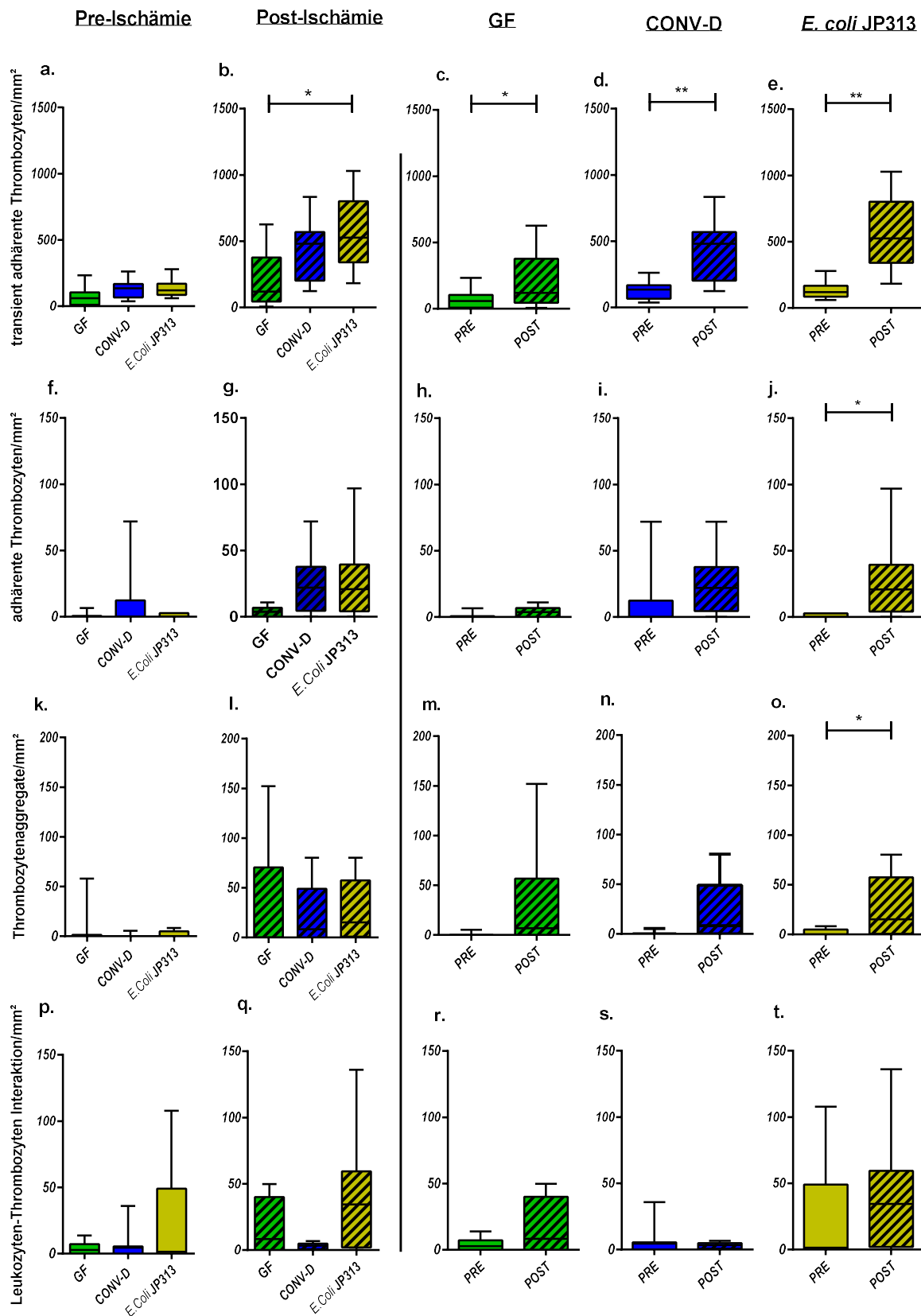


Abbildung 24: a-t, Anzahl an Thrombozyten in ihren verschiedenen Stadien (rollend und adhärent), Thrombozytenggregate und Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen (LTI) bei von keimfreien (GF), ehemals keimfreien und anschließend über 14 Tage konventionalisierten (CONV-D) und ehemals keimfreien und anschließend mit *E. coli* JP313 monokolonisierten (*E. coli* JP 313) Mäusen, (n=8, Median, Min., Max.). a-e, Anzahl an transient adhärennten Thrombozyten bei GF, CONV-D und *E. coli* JP313 monoassoziierten Mäusen Pre- und Post-Ischämie. a + b, Einfluss der Kolonisierung Pre- und Post-Ischämie. c-e, Einfluss der Ischämie bei GF, CONV-D und *E. coli* JP313 monoassoziierten Mäusen Pre- und Post-Ischämie. f-j, Anzahl an adhärennten Thrombozyten bei GF, CONV-D und *E. coli* JP313 monoassoziierten Mäusen Pre- und Post-Ischämie. f + g, Einfluss der Kolonisierung auf die Anzahl der adhärennten Thrombozyten Pre- und Post-Ischämie. h-j, Einfluss der Ischämie auf die Anzahl der adhärennten Thrombozyten bei GF, CONV-D und *E. coli* JP313 monoassoziierten Mäusen. k-o, Anzahl an Thrombozytenaggregaten bei GF, CONV-D und *E. coli* JP313 monoassoziierten Mäusen Pre- und Post-Ischämie. k + l, Einfluss der Kolonisierung auf die Anzahl von Thrombozytenaggregaten Pre- und Post-Ischämie. m-o, Einfluss von Ischämie auf die Anzahl an Thrombozyten- aggregaten bei GF, CONV-D und *E. coli* JP313 monoassoziierten Mäusen Pre- und Post-Ischämie. p-t, Anzahl an LTI bei GF, CONV-D und *E. coli* JP313 monoassoziierten Mäusen Pre- und Post-Ischämie. p + q, Einfluss der Kolonisierung auf die Anzahl an LTI Pre- und Post-Ischämie. r-t, Einfluss der Ischämie auf die Anzahl an LTI bei GF, CONV-D und *E. coli* JP313 monoassoziierten Mäusen.

Transient adhärennte Thrombozyten

Wirkung der Kolonisierung:

Tabelle 35: Zunahme (-fach) von transient adhärennten Thrombozyten ausgelöst durch Kolonisierung von keimfreien (GF) Mäusen mit Zäkuminhalt (CONV-D) und *E. coli* JP313 (*E. coli* JP313) Pre- und Post-Ischämie.

Zunahme (-fach)	CONV-D / GF	<i>E. coli</i> JP313 / GF
Pre Ischämie	1,90	1,92
Post Ischämie	2,19	2,76 *p = 0,0203

Pre-Ischämie zeigte sich zwischen keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied. Post-Ischämie war mit 118,9 (Min.6,64, Max.627,5) transient adhärennten Thrombozyten/mm² bei GF Mäusen und 527,1 (Min.182,6, Max.1029) bei *E. coli* JP313 kolonisierten Mäusen ein signifikanter Unterschied festzustellen (* p = 0,0203) (Abbildung 24 a + b).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 36: Zunahme (-fach) von transient adhärenenten Thrombozyten ausgelöst durch die Ischämie bei keimfreien (GF), ehemals keimfreien und anschließend über 14 Tage konventinalisierten (CONV-D) und ehemals keimfreien und anschließend mit *E. coli* JP313 monokolonisierten (*E. coli* JP 313) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von transient adhärenenten Thrombozyten
GF	2,93 (* p = 0,0249)
CONV-D	3,38 (** p = 0,0024)
<i>E. coli</i> JP313	4,20 (** p = 0,0031)

GF: Pre-Ischämie mit 58,93 (Min.2,65, Max.232,4) transient adhärenenten Thrombozyten/mm² und 118,9 (Min.6,64, Max.627,5) transient adhärenenten Thrombozyten/mm² Post-Ischämie war ein signifikanter Unterschied festzustellen (*p = 0,0249) (Abbildung 24 c).

CONV-D: Pre-Ischämie mit 134,1 (Min.38,68, Max.262,8) transient adhärenenten Thrombozyten/mm² und 481,4 (Min.122,8, Max.835,0) transient adhärenenten Thrombozyten/mm² Post-Ischämie war ein signifikanter Unterschied festzustellen (**p = 0,0024) (Abbildung 24 d).

E. coli JP313: Pre-Ischämie mit 120,4 (Min.60,87, Max.278,9) transient adhärenenten Thrombozyten/mm² und 527,1 (Min.182,6, Max.1029) transient adhärenenten Thrombozyten/mm² Post-Ischämie war ein signifikanter Unterschied festzustellen (** p = 0,0031) (Abbildung 24 e).

Durch die Monoassoziation von GF Mäusen mit *E. coli* JP313 kam es Post-Ischämie zu einer erhöhten Anzahl an transient adhärenenten Thrombozyten. Die Ischämie bewirkte bei allen Gruppen einen Anstieg von transient adhärenenten Thromobozyten verglichen mit dem pre-ischämischen Zustand.

Adhärente Thrombozyten

Wirkung der Kolonisierung:

Tabelle 37: Zunahme (-fach) von adhärenenten Thrombozyten ausgelöst durch Kolonisierung von keimfreien (GF) Mäusen mit Zäkuminhalt (CONV-D) und *E. coli* JP313 (*E. coli* JP313) Pre- und Post-Ischämie.

Zunahme (-fach)	CONV-D / GF	<i>E. coli</i> JP313 / GF
Pre-Ischämie	11,90	1,11
Post-Ischämie	6,44	7,11

Pre-Ischämie zeigte sich zwischen keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied (Abbildung 24 f). Post-Ischämie war kein Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar (Abbildung 24 g).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 38: Zunahme (-fach) von adhärenenten Thrombozyten ausgelöst durch die Ischämie bei keimfreien (GF), ehemals keimfreien und anschließend über 14 Tage konventinalisierten (CONV-D) und ehemals keimfreien und anschließend mit *E. coli* JP313 monokolonisierten (*E. coli* JP 313) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von adhärenenten Thrombozyten
GF	4,33
CONV-D	10,96
<i>E. coli</i> JP313	27,66 (* p = 0,0377)

GF: Bei GF Mäusen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Pre- und Post-Ischämie (Abbildung 24 h).

CONV-D: Bei CONV-D Mäusen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Pre- und Post-Ischämie (Abbildung 24 i).

E. coli JP313: Pre-Ischämie mit 0 (Min.0, Max.2,76) adhärenenten Thrombozyten/mm² und 20,75 (Min.0, Max.96,83) adhärenenten Thrombozyten/mm² Post-Ischämie war ein signifikanter Unterschied vorhanden (* p = 0,0377) (Abbildung 24 j).

Adhärenente Thrombozyten waren bei den mit *E. coli* JP313 monoassoziierten Mäusen nach der Ischämie signifikant erhöht

Thrombozytenaggregate

Wirkung der Kolonisierung:

Tabelle 39: Zunahme (-fach) von Thrombozytenaggregaten ausgelöst durch Kolonisierung von keimfreien (GF) Mäusen mit Zäkuminhalt (CONV-D) und *E. coli* JP313 (*E. coli* JP313) Pre- und Post-Ischämie.

Zunahme (-fach)	CONV-D / GF	<i>E. coli</i> JP313
Pre Ischämie	0,10	0,29
Post Ischämie	0,38	0,45

Pre-Ischämie und Post-Ischämie war kein Unterschied zwischen den Gruppen zu sehen (Abbildung 24 k + l).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 40: Zunahme (-fach) von Thrombozytenaggregaten ausgelöst durch die Ischämie bei keimfreien (GF), ehemals keimfreien und anschließend über 14 Tage konventinalisierten (CONV-D) und ehemals keimfreien und anschließend mit *E. coli* JP313 monokolonisierten (*E. coli* JP 313) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von Thrombozytenaggregaten
GF	56,03
CONV-D	35,34
<i>E. coli</i> JP313	15,18 (* p = 0,03)

GF: Bei GF Mäusen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Pre- und Post-Ischämie (Abbildung 24 m).

CONV-D: Bei CONV-D Mäusen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Pre- und Post-Ischämie (Abbildung 24 n).

E. coli JP313: Pre-Ischämie mit 0 (Min.0, Max.8,3) Thrombozyten-aggregaten/mm² und 15,22 (Min.0, Max.80,23) Thrombozytenaggregaten/mm² Post-Ischämie war ein signifikanter Unterschied festzustellen (* p = 0,03) (Abbildung 24 o).

Die Anzahl an Thrombozytenaggregaten war bei den mit *E. coli* JP313 monoassoziierten Mäusen nach der Ischämie signifikant erhöht.

Leukozyten- Thrombozyten Interaktion

Wirkung der Kolonisierung:

Tabelle 41: Zunahme (-fach) von Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen ausgelöst durch Kolonisierung von keimfreien (GF) Mäusen mit Zäkuminhalt (CONV-D) und *E. coli* JP313 (*E. coli* JP313) Pre- und Post-Ischämie.

Zunahme (-fach)	CONV-D / GF	<i>E. coli</i> JP313 / GF
Pre-Ischämie	1,83	5,93
Post-Ischämie	0,10	1,41

Pre-Ischämie und Post-Ischämie war kein Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen (Abbildung 24 p + q).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 42: Zunahme (-fach) von Leukozyten-Thrombozyten Interaktion ausgelöst ausgelöst durch die Ischämie bei keimfreien (GF), ehemals keimfreien und anschließend über 14 Tage konventinalisierten (CONV-D) und ehemals keimfreien und anschließend mit *E. coli* JP313 monokolonisierten (*E. coli* JP 313) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von Leukozyten- Thrombozyten Interaktionen
GF	7,70
CONV-D	0,44
<i>E. coli</i> JP313	1,83

GF: Bei GF Mäusen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Pre- und Post-Ischämie (Abbildung 24 r).

CONV-D: Bei CONV-D Mäusen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Pre- und Post-Ischämie (Abbildung 24 s).

E. coli JP313: Bei *E. coli* JP313 monokolonisierten Mäusen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Pre- und Post-Ischämie (Abbildung 24 t).

Weder die Kolonisierung noch die Ischämie bewirkten einen Anstieg von Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen.

4.4. Einfluss auf die Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten durch Defizienz der MYD88- und TRIF- Adaptermoleküle

4.4.1. Regulierte Leukozytenadhäsion Post-Ischämie und verminderte Leukozytenkonjugatbildung bei *Trif*^{-/-} Mäusen

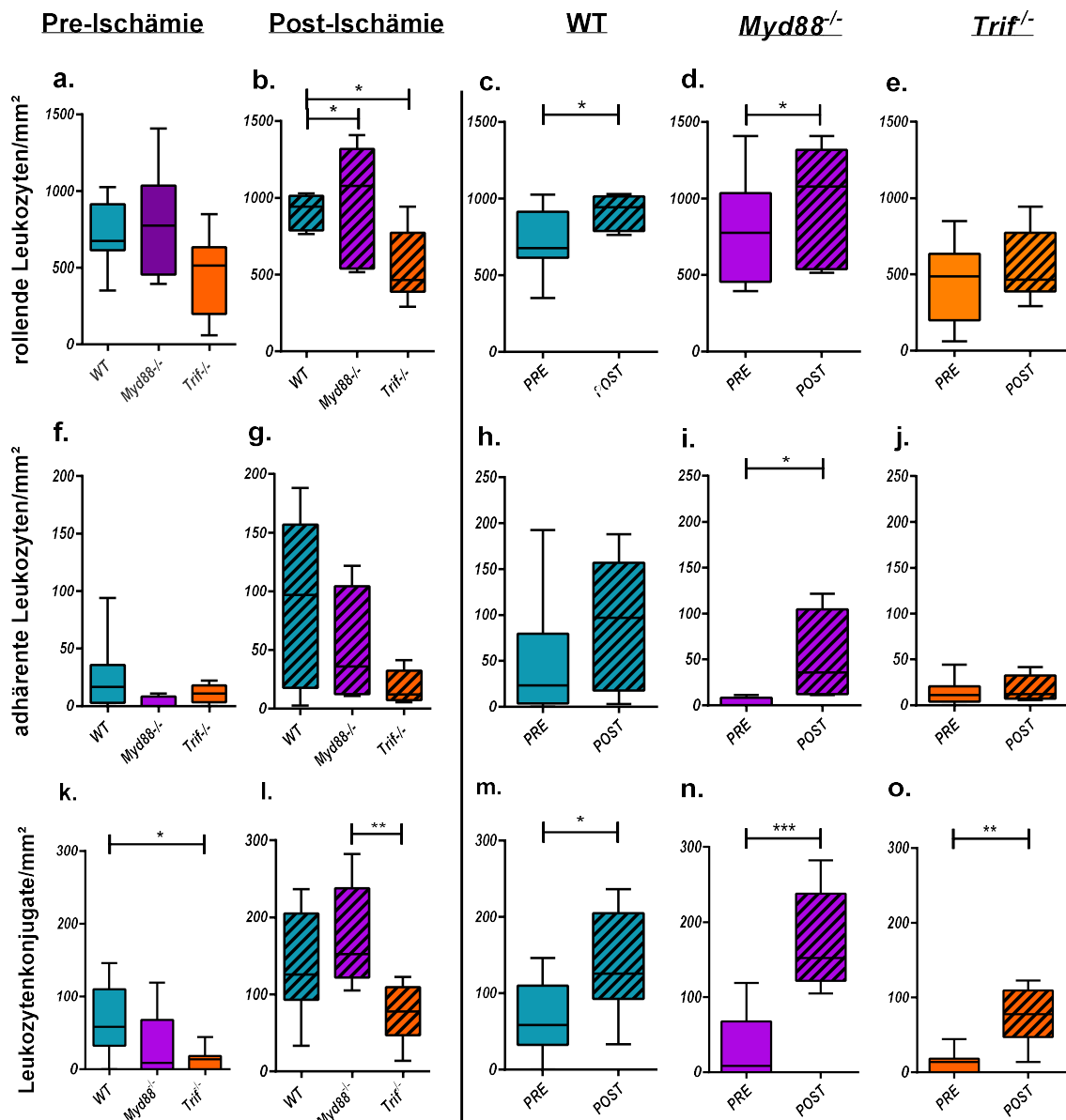


Abbildung 25: Anzahl von Leukozyten in verschiedenen Stadien (rollend und adhärent) und Anzahl von Leukozytenkonjugaten bei den Mausgruppen MYD88-Adaptermolekül-defizient (*Myd88*^{-/-}), TRIF-Adaptermolekül-defizient (*Trif*^{-/-}) und Wildtyp (WT) vor und nach der 60-minütigen Ischämie (n=8, Median, Min., Max.). a-e, Rollende Leukozyten bei den Mausgruppen *Myd88*^{-/-}, *Trif*^{-/-} und WT Pre- und Post-Ischämie. a + b, Auswirkung über TLR Adaptermoleküle MYD88 und TRIF auf rollende Leukozyten Pre- und Post-Ischämie. c-e, Einfluss der Ischämie auf rollende Leukozyten bei WT, *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} Mäusen. f-j, Adhärente Leukozyten den

Mausgruppen *Myd88*^{-/-}, *Trif*^{-/-} und WT Pre- und Post-Ischämie. f + g, Auswirkung über TLR Adaptermoleküle MYD88 und TRIF auf adhärenzte Leukozyten Pre- und Post-Ischämie. h-j, Einfluss der Ischämie auf adhärenzte Leukozyten bei WT, *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} Mäusen. k-o, Bildung von Leukozytenkonjugaten bei den Mausgruppen *Myd88*^{-/-}, *Trif*^{-/-} und WT Pre- und Post-Ischämie. k + l, Einfluss der MYD88 oder TRIF-Adaptermoleküle auf die Häufigkeit von Leukozytenkonjugaten Pre- und Post-Ischämie. m-o, Einfluss der Ischämie auf Leukozytenkonjugate bei den Mausgruppen *Myd88*^{-/-}, *Trif*^{-/-} und WT.

Rollende Leukozyten

Wirkung über die TLR Adaptermoleküle MYD88 und TRIF:

Tabelle 43: Einfluss der MYD88- oder TRIF-Adaptermoleküle auf die Häufigkeit rollender Leukozyten Pre- und Post-Ischämie.

Zunahme (-fach)	<i>Myd88</i>^{-/-} / WT	<i>Trif</i>^{-/-} / WT
Pre-Ischämie	0,55	0,61
Post-Ischämie	1,37 * p = 0,05	0,61 * p = 0,05

Pre-Ischämie zeigte sich zwischen keine der Gruppen ein signifikanter Unterschied (Abbildung 25 a). Post-Ischämie war mit 943,4 (Min.763,6, Max.1029) rollenden Leukozyten/mm² bei WT Mäusen gegenüber 1079 (Min.514,5, Max.1408) rollenden Leukozyten/mm² bei *Myd88*^{-/-} und 464,8 (Min.292,2, Max.943,4) rollenden Leukozyten/mm² bei *Trif*^{-/-} Mäusen ein signifikanter Unterschied festzustellen (Abbildung 25 b).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 44: Zunahme (-fach) von rollenden Leukozyten ausgelöst durch Ischämie bei Wildtyp (WT), MYD88-Adaptermolekül-defizienten (*Myd88*^{-/-}) und TRIF-Adaptermolekül-defizienten (*Trif*^{-/-}) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von rollenden Leukozyten
WT	1,27 * p = 0,021
<i>Myd88</i>^{-/-}	1,57 * p = 0,0476
<i>Trif</i>^{-/-}	1,27

WT: Pre-Ischämie mit 675,9 (Min.351,4, Max.1026) rollenden Leukozyten/mm² und Post-Ischämie mit 943,4 (Min.763,6 Max.1029) rollenden Leukozyten/mm² war ein signifikanter

Unterschied festzustellen (* $p = 0,021$) (Abbildung 25 c).

Myd88^{-/-}: Pre-Ischämie mit 776,6 (Min.395,6, Max.1408) rollenden Leukozyten/mm² und Post-Ischämie mit 1163 (Min. 514,6 Max.3049) rollenden Leukozyten/mm² war ein signifikanter Unterschied festzustellen (* $p = 0,0476$) (Abbildung 25 d).

Trif^{-/-}: Bei *Trif*^{-/-} gab es keinen Unterschied zwischen Pre- und Post-Ischämie (Abbildung 25 e).

Das Fehlen des MYD88 Adapters führte zu einem Anstieg von rollenden Leukozyten Post-Ischämie im Vergleich zu den WT Mäusen. Das Fehlen des TRIF Adapters bewirkte eine reduzierte Anzahl von rollenden Leukozyten im Vergleich zu WT Mäusen. Die Ischämie sorgte bei WT und *Myd88* defizienten Mäusen für eine erhöhte Anzahl an rollenden Leukozyten.

Adhärenente Leukozyten

Wirkung über die TLR-Adaptermoleküle MYD88- und TRIF:

Tabelle 45: Zunahme (-fach) von adhärenenten Leukozyten durch Fehlen des MYD88 und TRIF-Adapters Pre- und Post-Ischämie.

Zunahme (-fach)	<i>Myd88</i> ^{-/-} / WT	<i>Trif</i> ^{-/-} / WT
Pre-Ischämie	0,82	1,03
Post-Ischämie	0,87	0,44

Pre- und Post-Ischämie zeigte sich bei keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied (Abbildung 25 f + g).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 46: Zunahme (-fach) von adhärenenten Leukozyten durch die Ischämie bei Wildtyp (WT), MYD88-Adaptermolekül-defizienten (*Myd88*^{-/-}) und TRIF-Adaptermolekül-defizienten (*Trif*^{-/-}) Mäusen.

Zunahme (-fach) Post/Pre	adhärenente Leukozyten
WT	1,95
<i>Myd88</i> ^{-/-}	4,45 * p = 0,0399
<i>Trif</i> ^{-/-}	1,76

WT: Die 60-minütige Ischämie hatte kaum einen Einfluss auf Adhäsion von Leukozyten an das Endothel (Abbildung 25 h).

Myd88^{-/-}: Pre-Ischämie mit 0 (Min.0, Max.11,07) adhärenente Leukozyten /mm² und Post-Ischämie mit 35,97(Min.11,07, Max.121,7) adhärenente Leukozyten/ mm² war ein signifikanter Unterschied zu erkennen (*p = 0,0399) (Abbildung 25 i).

Trif^{-/-}: Die 60-minütige Ischämie hatte keinen Einfluss auf Adhäsion von Leukozyten an das Endothel (Abbildung 25 j).

Die Ischämie bewirkte bei *Myd88*^{-/-} Mäusen eine erhöhte Anzahl von adhärenenten Leukozyten.

Leukozytenkonjugate

Wirkung von MYD88 und TRIF-Defizienz:

Tabelle 47: Zunahme (-fach) von Leukozytenkonjugaten durch Fehlen des MYD88- und TRIF-Adapters Pre- und Post-Ischämie.

Zunahme (-fach)	<i>Myd88</i> ^{-/-} / WT	<i>Trif</i> ^{-/-} / WT
Pre Ischämie	0,50	0,18 * p = 0,0371
Post Ischämie	1,26	0,54

Pre-Ischämie zeigte sich im Vergleich aller drei Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen WT mit 58,38 (Min.0, Max.146,1) Leukozytenkonjugaten/mm² (* p = 0,0371) und

Trif^{-/-} Mäusen mit 13,83 (Min.0, Max.44,27) Leukozytenkonjugaten/mm² (Abbildung 25 k). Post-Ischämie war ein signifikanter Unterschied zwischen *Myd88*^{-/-} Mäusen mit 152,2 (Min.105,1, Max.282,2) Leukozytenkonjugaten/mm² und *Trif*^{-/-} Mäusen mit 77,47 (Min.13,83, Max.122,8) Leukozytenkonjugaten/mm² festzustellen (** p = 0,0058) (Abbildung 25 l).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 48: Zunahme von Leukozytenkonjugaten durch die Ischämie bei Wildtyp (WT), MYD88-Adaptermolekül-defizienten (*Myd88*^{-/-}) und TRIF-Adaptermolekül-defizienten (*Trif*^{-/-}) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von Leukozytenkonjugaten
WT	2,07 * p = 0,0399
<i>Myd88</i>^{-/-}	5,22 *** p = 0,001
<i>Trif</i>^{-/-}	6,31 ** p = 0,0032

WT: Pre-Ischämie mit 58,38 (Min.0, Max.146,1) Leukozytenkonjugaten/mm² und Post-Ischämie mit 125,9 (Min. 33,2, Max.236,6) Leukozytenkonjugaten/mm² war ein signifikanter Unterschied vorhanden (* p = 0,0399) (Abbildung 25 m).

Myd88^{-/-}: Pre-Ischämie mit 8,57 (Min.0, Max.119) Leukozytenkonjugaten/mm² und Post-Ischämie mit 152,2 (Min. 105,1, Max.282,2) Leukozytenkonjugaten/mm² war ein signifikanter Unterschied festzustellen (*** p = 0,001) (Abbildung 25 n).

Trif^{-/-}: Pre-Ischämie mit 0 (Min.0, Max.44,27) Leukozytenkonjugaten/mm² und Post-Ischämie mit 77,47 (Min. 13,83, Max.122,8) Leukozytenkonjugaten/mm² war ein signifikanter Unterschied festzustellen (** p = 0,0032) (Abbildung 25 o).

Die Anzahl von Leukozytenkonjugaten war bei *Trif*-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT und *Myd88*-defizienten Mäusen verringert. Die Ischämie führte bei allen Gruppen zu einem Anstieg an Leukozytenkonjugaten.

4.4.2. Thrombozytenadhäsion, Thrombozytenaggregatbildung und Leukozyten-Thrombozyten-Interaktionen Pre- und Post-Ischämie bei *Myd88*-defizienten, *Trif*-defizienten und Wildtyp Mäusen

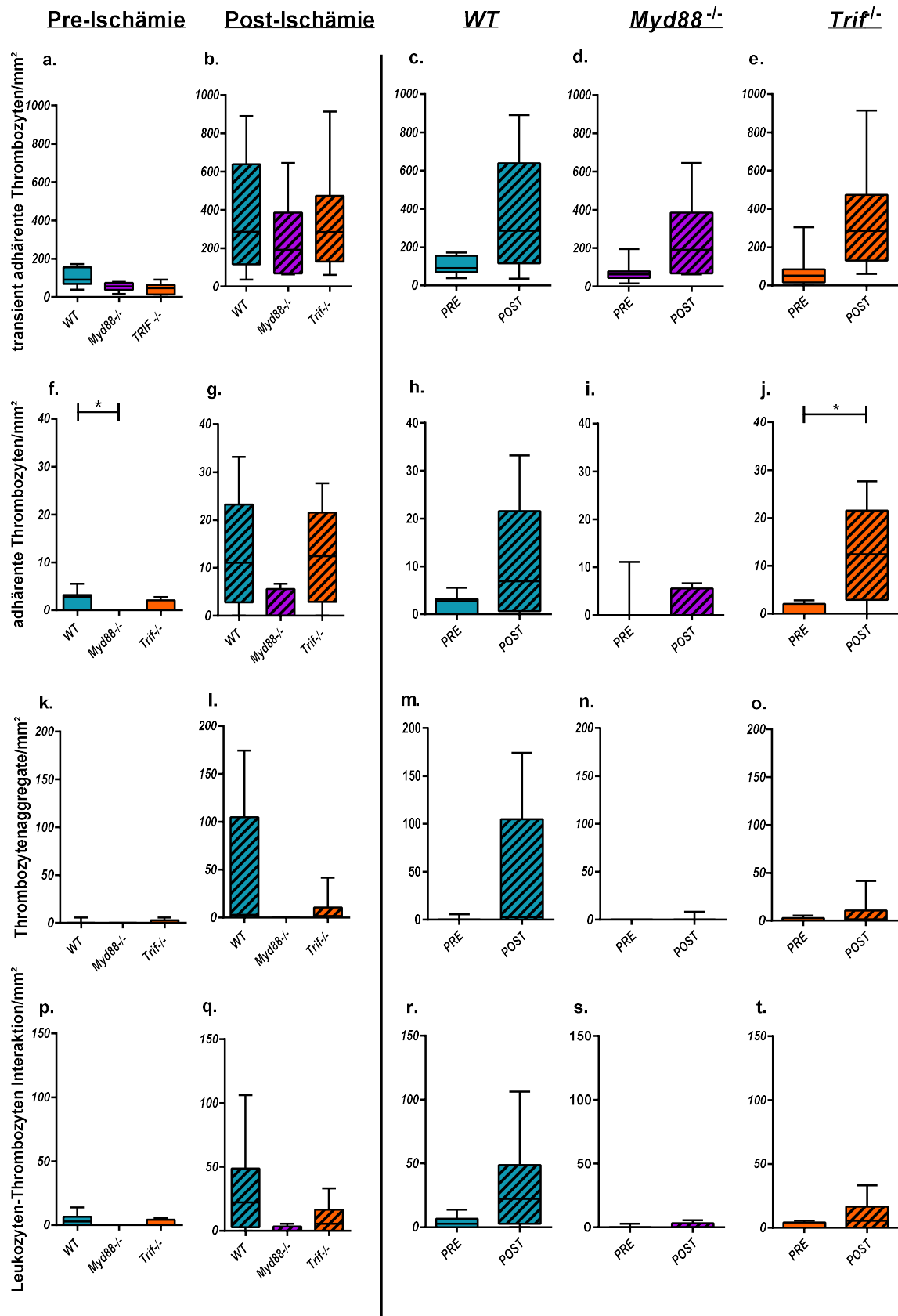


Abbildung 26: Anzahl an verschiedenen Thrombozytenstadien (transient adhärenzte und adhärenzte), Thrombozytenaggregaten und Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen (LTI) in mesenterialen Venolen vor und nach der Induktion eines Mesenterialinfarktes durch Abklemmen der *A. mesenterica superior* für 60 Minuten (n=8, Median, Min., Max.) a-e, Anzahl an transient adhärenzten Thrombozyten bei den Mausgruppen *Myd88*^{-/-}, *Trif*^{-/-} und WT Pre- und Post-Ischämie. a + b, Auswirkung der TLR-Adaptermoleküle MYD88 und TRIF auf die transient adhärenzte Thrombozytenzahl. c-e, Auswirkung der Ischämie auf die Anzahl an transient adhärenzten Thrombozyten bei den Mausgruppen *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} und WT. f-j, Anzahl an adhärenzten Thrombozyten bei den Mausgruppen *Myd88*^{-/-}, *Trif*^{-/-} und WT Pre- und Post-Ischämie. f + g, Auswirkung der Adaptermoleküle MYD88 und TRIF auf die Anzahl der adhärenzten Thrombozyten. h-j, Auswirkung der Ischämie auf die Anzahl der adhärenzten Thrombozyten bei den Mausgruppen *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} und WT. k-o, Anzahl an Thrombozytenaggregaten bei den Mausgruppen *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} und WT Pre- und Post-Ischämie. k+l, Auswirkung der MYD88 und TRIF-Adaptermoleküle auf die Bildung von Thrombozytenaggregaten Pre- und Post-Ischämie. m-o, Auswirkung der Ischämie auf die Bildung von Thrombozytenaggregaten. p-t, Anzahl an LTI bei *Myd88*^{-/-}, *Trif*^{-/-} und WT Mäusen. p + q, Auswirkung der Adaptermoleküle MYD88 und TRIF auf LTI Pre- und Post-Ischämie. r-t, Auswirkung der Ischämie auf LTI bei *Myd88*^{-/-}, *Trif*^{-/-} und WT Mäusen.

Transient adhärenzte Thrombozyten

Wirkung von MYD- und TRIF-Defizienz:

Tabelle 49: Zunahme (-fach) von transient adhärenzten Thrombozyten durch Fehlen des MYD88- oder TRIF-Adaptermoleküls Pre- und post-Ischämie.

Fold Increase	<i>Myd88</i> ^{-/-} / WT	<i>Trif</i> ^{-/-} / WT
Pre-Ischämie	1,50	0,21
Post-Ischämie	0,64	1,47

Pre- und Post-Ischämie zeigte sich bei keinen der Gruppen ein signifikanter Unterschied (Abbildung 26 a + b).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 50: Zunahme (-fach) von transient adhärenenten Thrombozyten ausgelöst durch die Ischämie bei Wildtyp (WT), MYD88-Adaptermolekül-defizienten (*Myd88*^{-/-}) und TRIF-Adaptermolekül-defizienten (*Trif*^{-/-}) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von transient adhärenenten Thrombozyten
WT	3,7
<i>Myd88</i> ^{-/-}	1,59
<i>Trif</i> ^{-/-}	2,55

In keiner der drei Gruppen (WT, *Myd88*^{-/-}, *Trif*^{-/-}) war Pre- und Post-Ischämie bei transient adhärenenten Thrombozyten ein Unterschied zu erkennen (Abbildung 26 c -e).

Die Ischämie verursachte in allen Gruppen einen Anstieg von transient adhärenenten Thrombozyten.

Adhärenente Thrombozyten

Wirkung von MYD88- und TRIF-Defizienz:

Tabelle 51: Zunahmen (-fach) von adhärenenten Thrombozyten durch Fehlen der MYD88- und TRIF Adaptermoleküle Pre- und Post-Ischämie.

Zunahme (-fach)	<i>Myd88</i> ^{-/-} / WT	<i>Trif</i> ^{-/-} / WT
Pre-Ischämie	0,64 * p = 0,044	1,14
Post-Ischämie	0,59	1,60

Pre-Ischämie war im Vergleich aller drei Gruppen ein signifikanter Unterschied (* p = 0,044) zwischen WT Mäusen mit 2,767 (Min.0, Max.5,53) adhärenenten Thrombozyten/mm² und *Myd88*^{-/-} Mäusen mit 0 (Min.0, Max.0) zu beobachten (Abbildung 26 f). Post-Ischämie zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Die Adhäsion der Thrombozyten bei *Myd88*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT B6 und *Trif*^{-/-} Mäusen war dennoch deutlich verringert (Abbildung 26 g).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 52: Zunahme (-fach) von adhärenenten Thrombozyten ausgelöst durch die Ischämie bei Wildtyp (WT), MYD88-Adaptermolekül-defizienten (*Myd88*^{-/-}) und TRIF-Adaptermolekül-defizienten (*Trif*^{-/-}) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von adhärenenten Thrombozyten
WT	5,2
<i>Myd88</i> ^{-/-}	4,85
<i>Trif</i> ^{-/-}	7,3 * p = 0,101

WT: Die 60-minütige Ischämie hatte kaum Einfluss auf die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel (Abbildung 26 h).

Myd88^{-/-}: Die 60-minütige Ischämie hatte keinen Einfluss auf die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel (Abbildung 26 i).

Trif^{-/-}: Pre-Ischämie mit 0 (Min.0, Max.2,76) adhärenenten Thrombozyten/mm² und Post-Ischämie mit 12,45 (Min.0, Max.27,67) adhärenenten Thrombozyten/mm² war ein signifikanter Unterschied vorhanden (*p = 0,0101) (Abbildung 26 j).

Die Anzahl von adhärenenten Thrombozyten war bei *Myd88*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu *Trif*^{-/-} und WT Mäusen reduziert. Die Ischämie sorgte nur bei *Trif*^{-/-} Mäusen für einen signifikanten Anstieg von adhärenenten Thrombozyten.

Thrombozytenaggregate:

Wirkung von MYD88 und TRIF-Defizienz:

Tabelle 53: Zunahmen (-fach) von Thrombozytenaggregaten durch Fehlen der MYD88- und TRIF-Adaptermoleküle Pre- und Post-Ischämie.

Zunahme (-fach)	<i>Myd88</i> ^{-/-} / WT	<i>Trif</i> ^{-/-} / WT
Pre-Ischämie	0	1,55
Post-Ischämie	0,025	0,43

Pre- und Post-Ischämie zeigte sich kein Unterschied (Abbildung 26 k + l).

Wirkung der Ischämie:**Tabelle 54: Zunahme (-fach) von Thrombozytenaggregaten ausgelöst durch die Ischämie bei Wildtyp (WT), MYD88-Adaptermolekül-defizienten (*Myd88*^{-/-}) und TRIF-Adaptermolekül-defizienten (*Trif*^{-/-}) Mäusen.**

	Zunahme (-fach) Post/Pre von Thrombozytenaggregaten
WT	51,71
<i>Myd88</i> ^{-/-}	1,30
<i>Trif</i> ^{-/-}	14,45

Die Anzahl der Thrombozytenaggregate war nicht signifikant unterschiedlich. Es zeigte sich aber eine Tendenz zu einer geringeren Anzahl an Thrombozytenaggregaten in *Myd88*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT und *Trif*^{-/-} Mäusen (Abbildung 26 m - o).

Die Ischämie verursachte nur bei WT Mäusen einen Anstieg in der Anzahl von Thrombozytenaggregaten, bei *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} Mäusen war kaum ein Anstieg in der Anzahl von Thrombozytenaggregaten zu beobachten.

Leukozyten-Thrombozyten Interaktion:**Wirkung von MYD88- und TRIF-Defizienz:****Tabelle 55: Zunahmen (-fach) an Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen durch Fehlen der MYD88- und TRIF-Adaptermoleküle Pre- und Post-Ischämie.**

Zunahme (-fach)	<i>Myd88</i> ^{-/-} / WT	<i>Trif</i> ^{-/-} / WT
Pre-Ischämie	0,08	0,37
Post-Ischämie	0,10	0,27

Es zeigte sich, dass die 60-minütige Ischämie in allen Gruppen (WT, *Myd88*^{-/-}, *Trif*^{-/-}) keine signifikante Auswirkung auf die Anzahl der Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen hatte (Abbildung 26 p + q).

Wirkung der Ischämie:

Tabelle 56: Zunahme (-fach) an Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen ausgelöst durch die Ischämie bei Wildtyp (WT), MYD88-Adaptermolekül-defizienten (*Myd88*^{-/-}) und TRIF-Adaptermolekül-defizienten (*Trif*^{-/-}) Mäusen.

	Zunahme (-fach) Post/Pre von Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen (LTI)
WT	7,64
<i>Myd88</i> ^{-/-}	9,19
<i>Trif</i> ^{-/-}	5,6

Es war eine deutliche Tendenz an reduzierten Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen bei *Myd88*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT und *Trif*^{-/-} Mäusen vorhanden (Abbildung 26 r - t).

Bei den drei Gruppen im Vergleich gab es Pre- und Post-Ischämie keinen Unterschied. Die Ischämie führte nur bei der WT Gruppe zu einem Anstieg in der Anzahl von Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen.

5. Analyse von Rezeptormolekülen auf Thrombozyten und Leukozyten mittels Durchflusszytometrie

5.1. Die Besiedlung mit einer intakten Mikrobiota führte zu einer erhöhten GPIIb/IIIa Aktivierung auf Thrombozyten von CONV-R Mäusen nach ADP-Stimulierung

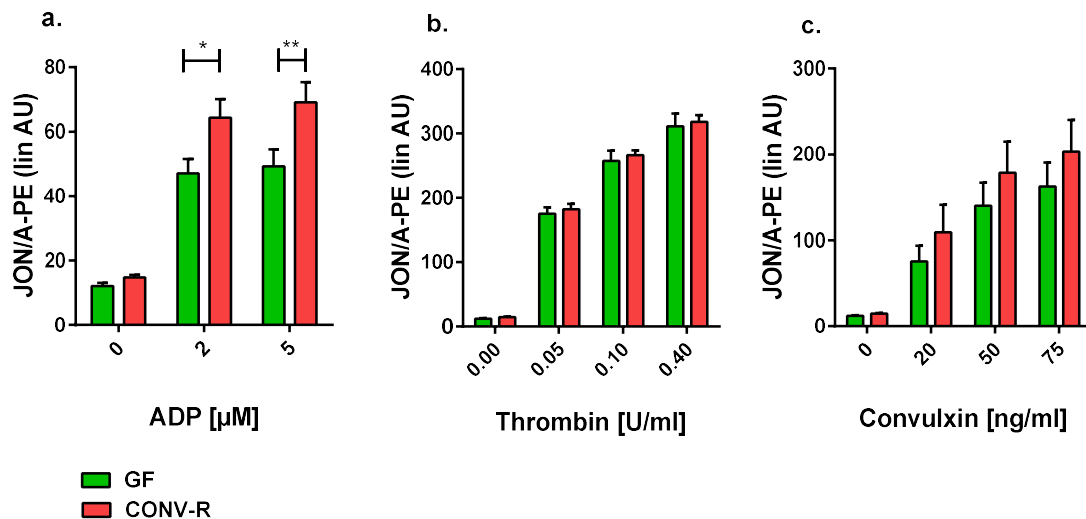


Abbildung 27: Die Durchflusszytometrieanalysen von Thrombozyten keimfreier (GF) und konventionell aufgewachsener (CONV-R) Mäuse (n=8, Mittelwert mit SEM), a – c, Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors auf Thrombozyten mittels der Agonisten ADP, Thrombin und Convulxin. a, die GPIIb/IIIa Aktivierung mit 2 und 5 µM ADP war bei CONV-R erhöht. b, eine Aktivierung mit Thrombin bewirkte keinen Unterschied in der GPIIb/IIIa Aktivierung. c, Eine Aktivierung von GPIIb/IIIa mit dem Agens Convulxin bewirkte keinen Unterschied in der Aktivierung des Thrombozyten Rezeptors.

Der Rezeptor GPIIb/IIIa auf Thrombozyten bindet Fibrinogen und von Willebrand Faktor und ist für die weitere Aktivierung von Thrombozyten verantwortlich. Die Aktivierung von GPIIb/IIIa wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Als Agonisten für die Aktivierung dieses Thrombozytenintegrins wurden ADP, Thrombin und Convulxin verwendet. Ohne eine Stimulierung der Thrombozyten wurde kein Unterschied in der Aktivität des Fibrinogenrezeptors beobachtet. Die Stimulierung von Thrombozyten der GF und CONV-R Mäuse mit 2µM ADP führte zu einer signifikant ($p < 0,05$) vermehrten linearen Aktivierung bei CONV-R Thrombozyten. Eine Konzentration von 5µM ADP verstärkte den signifikanten Unterschied bei der GPIIb/IIIa-Aktivierung zwischen GF und CONV-R Mäusen auf $p < 0,01$ (Abbildung 27 a) im Gegensatz zu ADP die die Aktivierung des Thrombozytenrezeptors GPIIb/IIIa durch Thrombin und Convulxin zu keinem Unterschied in der Anzahl funktionell aktiver Rezeptormoleküle (Abbildung 28 b+c).

5.2. Die Anwesenheit von Mikrobiota bewirkte eine erhöhte Exponierung des Aktivierungsmarkers P-Selektin auf Thrombozyten von CONV-R Mäusen nach Stimulation mit ADP und Thrombin

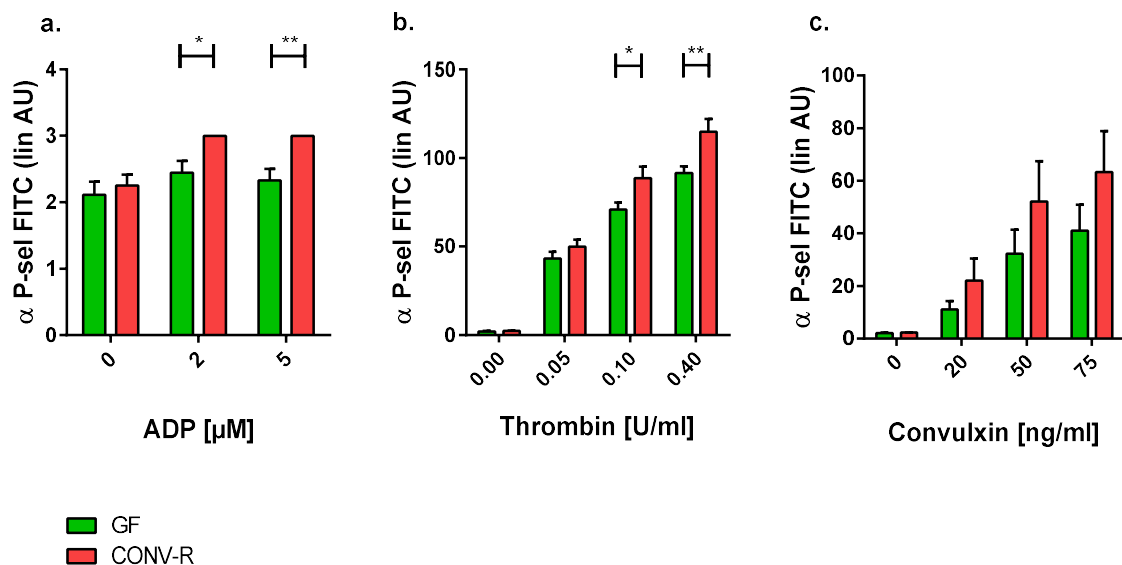


Abbildung 28: Thrombozyten von keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen wurden mit ADP, Thrombin und Convulxin stimuliert ($n=6-8$, Mittelwert mit SEM). Gemessen wurde die lineare Aktivitätseinheit (lin AU) mittels Emissionsmessung des mit FITC-Anitkörpern-markierten P-Selektin (α P-Sel FITC) auf Thrombozyten. a, Stimulation mit dem schwachen Agonisten ADP führte zu einer erhöhten Exponierung von P-Selektin bei CONV-R Thrombozyten. b, Stimulation mit Thrombin führte zu einer erhöhten Exponierung von P-Selektin bei CONV-R Thrombozyten ab einer Konzentration von 0,1 [U/ml] Thrombin. c, durch die Stimulation mit Convulxin kam es nicht zu einer unterschiedlichen Exponierung von P-Selektin bei GF und CONV-R Thrombozyten.

Ohne Stimulation mit ADP, Thrombin oder Convulxin zeigten die P-Selektin Rezeptoren auf Thrombozyten von GF und CONV-R Mäusen eine gleiche Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern. Wurden die Thrombozyten mit einer Konzentration von 2 μ M ADP stimuliert, war der Aktivierungsmarker P-Selektin auf den Thrombozyten von CONV-R Mäusen gegenüber GF Mäusen signifikant ($p < 0,05$) erhöht. Mit einer höheren ADP Konzentration von 5 μ M stieg die Signifikanz ($p < 0,01$) an (Abbildung 28 a). Eine Stimulation mit dem starken Aktivator Thrombin in den Konzentrationen 0,1 und 0,4 U/ml führte zu einem signifikanten Anstieg (* $p < 0,05$ bei 0,1 U/ml, ** $p < 0,01$ bei 0,4 U/ml) des Aktivierungsmarkers P-Selektin bei CONV-R Mäusen (Abbildung 28 b). Das Agens Convulxin führte auch zu einem Anstieg an P-Selektin in GF und CONV-R Mäusen. Es gab jedoch keine Unterschiede (Abbildung 28 c).

5.3. Die Besiedlung mit einer kommensalen Mikrobiota führt zu einer erhöhten Expression von PSGL-1 auf Neutrophilen und Monozyten

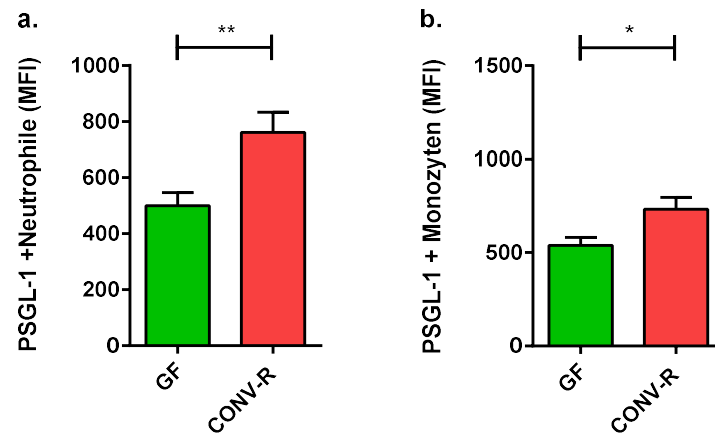


Abbildung 29: MFI (Mittlere Fluoreszenzintensität) Messung von PSGL-1 auf Neutrophilen und Monozyten bei keimfreien (GF) und konventionell aufgewachsenen (CONV-R) Mäusen. a, erhöhte MFI von PSGL-1 bei Neutrophilen von CONV-R Mäusen. b, erhöhte MFI von PSGL-1 bei Monozyten von CONV-R Mäusen (n=6-8, Mittelwert mit SEM).

PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand-1) ist der wichtigste Bindungspartner für P-Selektin auf Leukozyten. PSGL-1 ist unter anderem für das Rollen auf dem Endothel und die Immigration der Leukozyten von der Zirkulation in das Gewebe verantwortlich. Hier wurde die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von PSGL-1 bei Neutrophilen und Monozyten von GF und CONV-R Mäusen gemessen. Sowohl auf Neutrophilen als auch auf Monozyten war die MFI von PSGL-1 bei CONV-R Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 29 a + b).

V. DISKUSSION

1. Wahl der Mauslinien

Vorteilhaft an der Maus als Versuchstier ist die kostengünstige Aufzucht und Haltung, die große Anzahl an Nachkommen, die schnelle Reproduktionszeit und auch die relativ einfache Manipulationsmöglichkeit des Mäusegenoms. All diese Faktoren spielen auch eine große Rolle in der Wahl der Maus zur Generierung und Erhaltung des keimfreien Status (Rederivatisierung), da die Haltung keimfreier Tiere viel Platz und hohe Kosten beinhaltet. Die in dieser Arbeit gewählten *in vivo* Modelle mit einem Intravitalmikroskop sind im Mausmodell etabliert und gut standardisiert durchführbar. Der C57BL/6J Inzucht Mausstamm ist der in der Wissenschaft am häufigsten verwendete Mausstamm (282) und wird als genetischer Hintergrund zahlreicher genetisch veränderter (transgener) Mauslinien verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mäuse basieren ebenfalls auf dem genetischen Hintergrund des C57BL/6J Stammes (77, 80, 283). Aus der keimfreien Kolonie von Prof. Fredrik Bäckhed (Wallenberg Laboratorium, Universität Göteborg) besitzt die Juniorgruppe von Dr. Christoph Reinhardt (Centrum für Thrombose und Hämostase, Universitätsmedizin Mainz) den C57BL/6J Mausstamm im keimfreien Status. Mit Hilfe des keimfreien C57BL/6J Mausstamms wurde in dieser Arbeit die Einwirkung einer autochthonen Mikrobiota auf die Thrombusbildung in der *A. carotis communis* untersucht. Dadurch konnte nicht nur der Einfluss der physiologischen Mikrobiota auf Thrombusbildung und die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten untersucht werden, sondern auch, wie sich eine 14-tägige Kolonisierung von ehemals keimfreien Mäusen mit einer Mikrobiota aus dem Zäkum einer CONV-R Maus und eine Monokolonisierung mit dem Wildtyp γ -Proteobakterium *Escherichia coli* JP313 auswirkt. Des Weiteren wurde die Expression von Molekülen, die für die Thrombusbildung relevant sind, in den Carotiden von GF und CONV-R Mäusen quantitativ mittels qRT-PCR bestimmt. Die transgenen Mauslinien *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} (77) wurden verwendet, da mit ihnen die Rolle der angeborenen und erworbenen Immunantwort während der Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten nach einer Ischämie-Reperusionsverletzung an den mesenterialen Gefäßen genauer untersucht werden konnte.

2. Diskussion der *in vivo* Tiermodelle

Fast alle Komponenten der Gerinnungskaskade und der anschließenden Fibrinolyse wurden bei Mäusen entweder durch gentechnische Methoden ausgeschaltet (Knock-out) oder

überexprimiert (284, 285). Die geringe Größe von Mäusen ermöglicht es, durch *in vivo* Studien mit einem Intravitalmikroskop Zusammenhänge zu visualisieren, die sonst nicht erkundet werden können. Alle Thrombosemodelle haben Limitationen. Die meisten experimentellen Modelle der Thrombusinduktion finden an gesunden Gefäßen statt. Die pathologische Thrombose im Menschen, beispielsweise beim Herzinfarkt, tritt an einem erkrankten Gefäß auf. Trotz dieser Limitationen sind Mäuse die erste Wahl für das Studium der Thromboseentstehung, Prävention und der Behandlung von Thrombosen, denn bei Mäusen lässt sich das Genom leichter und schneller manipulieren als bei großen Tieren. Histologische Analysen zeigen, dass Thromben, die in der Maus generiert wurden, den Thromben von Menschen strukturell sehr ähnlich und kaum zu unterscheiden sind (286). Weiterhin konnten Studien mit Antikoagulantien in Mausthrombosemodellen zeigen, dass diese auch eine Thrombose bei Mäusen verhindern. Das zeigt, dass die Mechanismen der Thrombusbildung bei Mäusen ähnlich wie im Menschen ablaufen (285). Verschiedene Modelle der Thrombusbildung, basierend auf der Virchow'schen Trias, wurden vor allem im arteriellen Gefäßsystem im Mausmodell etabliert. In dieser Arbeit wurde zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Thrombusbildung das Eisen-III-chlorid-Verletzungsmodell gewählt.

2.1. Blutungszeitmodell

Obwohl es in den Modellprotokollen große Unterschiede in der Ausführung gibt, ist das Blutungszeitmodell per Schwanzspitzenamputation ein weitverbreitetes und einfach anzuwendendes *in vivo* Modell, um die hämostatische Funktion bei Mäusen zu messen. In dieser Arbeit beginnt die Blutungszeit mit der Amputation der Schwanzspitze und endet mit dem Versiegen der Blutung. Die Schwanzspitze wird in körperwarmer PBS-Lösung gehalten um den Blutungsverlauf genauer verfolgen zu können. Bei anderen Methoden wird das Blut mit einem Filterpapier von der Schwanzspitze abgetupft, um so die Beendigung der Blutung nachvollziehen zu können. Durch die ständige Manipulation der Wunde mit dem Filterpapier werden Wundverschluss und damit auch die Blutstillung verlängert. Da die Mäuse nur durch eine Fixierung im Maus-Restrainer ruhig gehalten werden und immer noch mit dem Schwanz schlagen können, ist eine ruhige Messung meist nur bedingt möglich und kann die Ergebnisse beeinflussen. Der Einsatz von Anästhetika führt zu einer Herabsenkung des Blutdrucks und wirkt sich so auf die Blutungszeit aus (287). Trotz der genannten Limitationen dieses Modells gibt es wichtige Informationen über die hämostatische Funktion in dem jeweiligen Mausmodell.

2.2. Arteriell Thrombosemodell – FeCl₃ – induzierte Thrombose

Das Eisen-III-chlorid Modell ist eine gut etablierte Technik, um eine schnelle und standardisierte Thrombusbildung an den jeweiligen exponierten und behandelten Gefäßen zu erreichen. Mit diesem Modell lässt sich die Pathophysiologie der Thrombusbildung erforschen (123). Obwohl die ersten Studien mit Eisen-III-chlorid vermuteten, dass durch die Applikation das Endothel verletzt und subendotheliale Strukturen wie Kollagen und Laminin freigelegt werden (126, 288, 289) und dadurch eine Thrombusbildung induziert wird, gibt es neuere Überlegungen wie es zu dieser schnellen Thrombusbildung kommt. Die ersten Zellen, die in dem Bereich der FeCl₃ Applikation ans Endothel anheften, sind mit Erythrozyten, die sich dann fest über z.B. das Adhäsionsmolekül VCAM-1 auf dem Endothel verankern (290). Durch den Blutstrom werden diese Erythrozyten in die Länge gezogen und reißt ab. Das überbleibende Erythrozytenfragment bleibt fest an dem Endothel verankert. An diese Fragmente binden schnell einzelne oder schon in Gruppen geschlossene Thrombozyten (279). Diese locken dann weitere Thrombozyten an und es kommt zu einer sehr schnellen Thrombusbildung (127). Die Dauer der Thrombusbildung hängt unter anderem auch von der Konzentration der FeCl₃-Lösung ab. Mit einer Konzentration von 10% kommt es spätestens nach 10 Minuten zu einem okklusiven Thrombus (126, 291). Es werden zwar Endothelzellen freigelegt, weiter innen liegende Schichten, wie die direkt darunter liegende interne elastische Lamina (IEL), *Tunica intima* und *media* werden aber nicht verletzt. Die IEL ist jedoch fenestriert und so könnten adhäsive Proteine der Tunica media mit den Thrombozyten und anderen Gerinnungsfaktoren in Kontakt treten (123, 127, 292). Die Thromben die sich in Mäusen mit dieser Methode bilden sind reich an Thrombozyten und zeigen unter dem Mikroskop eine Ähnlichkeit mit arteriellen Thromben des Menschen (124). Die Thrombusinduktion mittels FeCl₃ ist eine grobe Art der Thrombusinduktion und kann nicht die pathophysiologischen Prozesse einer realen Thrombusbildung wiedergeben. Außerdem ist es möglich, dass das FeCl₃ Modell Proteine in der Gefäßwand denaturiert und somit deren Rolle im Geschehen einer Thrombose nicht mehr studiert werden kann (291). Obwohl das Eisen-III-chlorid Modell mit Vorsicht angewendet werden sollte, ist es ein sehr nützliches Modell um die Beteiligung von im Blut gelösten Agonisten und Plasmaproteinen beim Thrombuswachstum festzustellen und zu erforschen (123). Das Modell eignet sich zur Ermittlung der Gefäßverschlusszeit (293, 294), das heißt der Zeit, die zwischen Anlegen des mit 10%iger FeCl₃-Lösung getränkten Filterpapiers und dem vollständigen Verschluss des Gefäßes verstreicht. Die unterschiedlichen Gefäßverschlusszeiten variieren von 5 bis 30 Minuten und sind ebenfalls abhängig vom Mausstamm (293-296), dem Mausalter, der FeCl₃-

Konzentration, der Anästhesie der Maus, der chirurgischen Technik, der Messung der Gefäßverschlusszeit und weiteren Umweltfaktoren (296, 297). Der hohe Blutdruck sorgt bei der Wiederröffnung des Gefäßes (Rekanalisation) dafür, dass der Thrombus schnell mit dem Blutstrom weiter transportiert wird und nicht an Ort und Stelle isoliert werden kann, wie dies zum Beispiel im venösen Thrombosemodell an der *Vena cava inferior* möglich ist (146, 298). Durch die schnelle Rekanalisation ist es auch nicht möglich die Anzahl und Größe der Thromben durch Visualisierung an der *Arteria carotis communis* mittels Intravitalmikroskopie zu bestimmen. Um den Thrombus weiter zu analysieren müsste er weiter *distal* im arteriellen Gefäßsystem entnommen werden (299). Die ungleichmäßige Embolisierung der Thromben würde in diesem Modell auch keine zuverlässige, standardisierbare Analyse des Thrombus zulassen. Die Gefäßverschlusszeit als Endpunkt dieser Untersuchung ist nur eine grobe Analyse der Thrombusbildung und kann nicht die abgestimmten Details der Thrombusgenerierung wiedergeben (300). In dieser Arbeit hatte die Analyse der Gefäßverschlusszeit Priorität und der Thrombus wurde nicht weiter analysiert.

2.3. Ischämie-Reperfusionverletzungsmodell

Eine an die Ischämie anschließende Reperfusion kann obwohl sie notwendig ist um Sauerstoff und Nährstoffe wieder zu den Zellen zu befördern, folgend einen größeren Schaden in den betroffenen Zellen anrichten als die vorrausgegangene Ischämie. Man spricht von einem Reperfusionsschaden. Durch den Influx von Sauerstoff kommt es auch zur Bildung von Sauerstoffradikalen, die weiter ab von ursprünglich geschädigtem Gewebe weiter Zellen schaden können (149). Außerdem wird durch die Reperfusion inflammatorische und prothrombogene Kaskaden in Gang gesetzt (149). Eine Intervention während der myokardialen Reperfusion kann die Infarktgröße um 50% reduzieren (301). Somit kann der Reperfusionsschaden einen weitaus wichtigeren Faktor für den Ausgang einer Ischämie-Reperfusionverletzung als die Ischämie selber. Für die Untersuchung des mesenterialen I/R-Schadens wurde in diesem Mausmodell eine 60-minütige Ischämie, verursacht durch Abklemmen der *Arteria mesenterice superior* (SMA), gewählt. Das Modell wurde gewählt um die Mechanismen nach einem Infarkt der mesenterialen Arterie und anschließenden Reperfusion besser zu verstehen (143, 302). Eine Ischämie des Mesenteriums ist eine pathologische Komplikation chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (142, 303). Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen stehen in engem Zusammenhang mit einer Dysbiose der Darmflora (304) und einer inadäquaten Aktivierung des Immunsystems der Darmmukosa (305). Ein *in vivo* Mausmodell der Mikrozirkulation des Darmes an keimfreien Mäusen ist daher ein ausgezeichnetes Instrument, um das Verhalten von Entzündungszellen

im keimfreien und mit Bakterien besiedelten Milieu im intakten und durch Ischämie-Reperfusion geschädigten Darm vergleichend zu analysieren. 60 Minuten ohne eine Sauerstoff- oder Nährstoffversorgung führt bei Mäusen schon zu einer erhöhten Ansammlung von Fibrinogen (145) und zur Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an das Endothel, unmittelbar nach Eintritt der Reperfusion der mikrovaskulären Strombahn des Darmes (42, 306). Es handelt sich bei diesem Modell um ein sogenanntes „Akut-Modell“. Das bedeutet, dass die intravitalmikroskopischen Untersuchungen der Mikrozirkulation des Darmes nur über einen sehr kurzen Zeitraum und in Narkose durchgeführt werden. Akut-Modelle sind bekanntermaßen mit Nachteilen, bedingt durch die erforderliche Anästhesie und chirurgische Manipulation, behaftet (307). Um das Verhalten von Entzündungszellen in der mikrovaskulären Strombahn des Darmes zu untersuchen, ist eine chirurgische Präparation des Darmes bei diesem Modell unumgänglich. Trotzdem stellt dieses Modell ein pathophysiologisch relevantes Szenario dar und ist für den Zweck dieser Arbeit sehr gut geeignet. Vorhergehende Studien zeigen, dass Adhäsionsrezeptoren für Leukozyten in der Darmmukosa bei keimfreien Mäusen im Vergleich zu konventionell aufgezogenen Mäusen verringert sind (22). Da es sich dabei aber um Adhäsionsrezeptoren für die Rekrutierung von Leukozyten in der Darmmukosa handelt, soll mit dieser Arbeit gezeigt werden, wie sich die Mikroflora auf die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten im Gefäßsystem des Darmes auswirkt. Im Zusammenhang mit keimfreien (GF), kolonisierten (CONV-D), konventionellen (CONV-R) und monokolonisierten (*E. coli*) Mäusen stellt dieses Ischämiemodell eine Bereicherung für Studien zur Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung dar. Hier wird zum ersten Mal der Umweltfaktor „Darmmikrobiom“ in Relation zum angeborenen Immunsystem im Mesenterialinfarktmodell untersucht. Welche Rolle das angeborene Immunsystem bei der Rekrutierung von Entzündungszellen in der Mikrozirkulation und potentiell auch bei chronisch-entzündliche Darmkrankheiten hat, wird mit dem Einsatz von *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} Mäusen in dieser Arbeit erforscht. Da bei keimfreien Mäusen keine Stimulierung von TLRs mit Bakterienbestandteilen stattfindet, werden TLR-abhängige Signalwege und deren Adaptermoleküle MYD88 und TRIF unterdrückt (308). Daher ist es sinnvoll den Einfluss dieser TLR-Adaptermoleküle mit gendefizienten Modellen auf die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten zu untersuchen.

3. Keimfreies Mausmodell

In dieser Arbeit werden keimfreie Mäuse zur Untersuchung von Thrombusbildung und Rekrutierung von Entzündungszellen verwendet. Keimfreie Mäuse besitzen keine autochthone Mikrobiota und leben in einer sterilen Umgebung (240, 309-311). Seit Anfang des 20. Jahrhunderts werden Tiere keimfrei aufgezogen und in Isolatoren gehalten (267, 312). Schon von Anfang an war klar, dass der keimfreie Status der Tiere nur so gut ist wie die analytischen Methoden um auf Keimfreiheit zu prüfen (309). Bis heute hat sich wenig an diesen Methoden geändert. Seit mehr als 70 Jahren werden zur Überprüfung der Keimfreiheit Bakterienkulturen und gram-gefärbte Kotproben genutzt (313-315). Zusätzlich werden heute molekularbiologische Methoden wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt, da mit universellen Primers kleinste Mengen bakterieller ribosomaler 16S DNS nachgewiesen werden können (267, 316). Die keimfreie Maushaltung der Arbeitsgruppe von Dr. Christoph Reinhardt wird alle 14 Tage mittels Bakterienkulturen und der PCR Methode auf ihre Keimfreiheit überprüft. Dafür werden Wischproben aus dem Isolatorinneren und Kotproben der Mäuse steril entnommen und getestet. Bakterienkulturen sind die sensitivste Methode um auf Anwesenheit von Bakterien und Pilzen im Isolatorinneren zu testen. Die Anzucht von Bakterien in Nährmedien ist umstritten, da viele der Darmbakterien nur sehr schwer (wenn überhaupt) mit konventionellen Kulturmethode angezüchtet werden können (267). Eine Kontamination eines Isolators mit Bakterien kann aber direkt in einer Bakterienkultur nachgewiesen werden, da die Bakterien, die den Isolator zuerst kontaminieren höchstwahrscheinlich auch schnell in Bakterienkulturen wachsen können (267). Die r16S PCR-Methode, mit der eventuell vorhandene bakterielle DNS mit vielen Replikationszyklen amplifiziert und dann durch Gelelektrophorese als bakterielle r16S DNS sichtbar gemacht wird, hat eine hohe Spezifität, ist aber nicht so sensitiv wie die Anzucht von Bakterien in Nährmedien. Nichtsdestotrotz ist nicht genau geklärt ob jede Kontaminierung entdeckt werden kann oder ob es zu falsch-positiven Ergebnissen durch z.B. tote Bakterien kommt (314, 315). Alle hier verwendeten keimfreien Mäuse und Isolatoren werden alle 14 Tage mit drei Nährkulturmethoden (Brain-Heart-Broth, LB Medium und Sabouraud Medium) und der r16S PCR-Methode auf ihre Keimfreiheit überprüft.

4. Einfluss der Mikrobiota

4.1. Die Kolonisierung des Darmes beeinflusst die Blutungsneigung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der grundlegenden Fragestellung ob die Besiedlung des Darmes mit einer Mikrobiota, die eine wichtige Ursache für metabolische Entzündung („low grade inflammation“) ist (317), einen Einfluss auf die Entstehung von arteriellen Thrombosen und Ischämie-bedingter mikrovaskulärer Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion hat. Die Analyse der Blutwerte der jeweiligen Mausgruppen (GF, CONV-R, CONV-D) gab keinerlei Hinweise auf eine relative Thrombozytose oder Leukozytose, die Rückschlüsse auf eine beschleunigte Thrombusbildung geben könnte. Bestimmungen der Vitamin K-Plasmaspiegel keimfreier Mäuse wiesen nicht auf einen Vitamin K Mangel hin (Tabelle 14). Uchida (318) zeigte 1985, dass ein Vitamin K Mangel, herbeigeführt durch eine Vitamin K-arme Diät und nicht das Fehlen einer Darmmikrobiota bei keimfreien Tieren zu verlängerten Blutungszeiten führt. Die keimfreien und auch konventionell-aufgezogenen Mäuse in dieser Studie bekommen ein standardisiertes mit Vitamin K angereichertes Futter, da sonst durch den Autoklavierprozess zu viele Vitamine zersetzt werden. Dadurch wurde ein Vitamin K Mangel, der zu einer veränderten Thrombusbildung führen könnte, in dieser Studie ausgeschlossen. Mit einem einfachen Modell der Blutungszeit nach Schwanzspitzenresektion wurde gezeigt, wie sich die primäre Hämostase bei den verschiedenen Mausgruppen verhält. Die Blutungszeit ist bei GF Mäusen im Vergleich zu CONV-R signifikant verlängert (Abbildung 17). Bei ehemals keimfreien, kolonisierten Mäusen dauerte die Blutungszeit länger an als bei CONV-R Mäusen, was darauf schließen lässt, dass eine Kolonisierung über 14 Tage mit einer komplexen Mikrobiota nicht ausreicht, um die Blutungszeit auf die Blutungszeit von CONV-R Mäusen zu reduzieren. Die verlängerte Blutungsneigung bei keimfreien Mäusen kann durch viele Faktoren beeinflusst sein. Diese können unter anderem eine geringere Konzentration an prothrombotischen, Mikrobiota-abhängigen Gerinnungsfaktoren oder Adhäsionsmolekülen auf Thrombozyten oder dem Endothel sein.

4.1.1. Einfluss der angeborenen Immunität auf die Blutungszeit

Zusätzlich zu den keimfreien und konventionell aufgewachsenen Mäusen werden transgene Mäuse untersucht, die durch das Fehlen der Rezeptor-Adaptermoleküle MYD88 und TRIF Aufschluss über die Beteiligung des angeborenen Immunsystems an der Thrombusbildung geben. Mit keimfreien und *Myd88*^{-/-}-Mäusen wurde gezeigt, dass durch die geringere Herstellung an Vorläuferzellen von Neutrophilen im Knochenmark (319) und auch eine reduzierte Aktivität dieser Zellen in der Zirkulation (320) die angeborene Immunantwort im

keimfreien Mausmodell schwächer ausgeprägt ist. Da Bakterien im Darm einen Einfluss auf das Immunsystem und die Immunantwort haben (22, 155, 263), sind Untersuchungen mit diesen Mäusen erforderlich um die Mechanismen des Einflusses der Bakterien genauer zu bestimmen. Auch die Blutwerte von *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} Mäusen zeigen keine Auffälligkeiten (Tabelle 14). Die Blutungszeiten von *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} Mäusen waren im Vergleich zu den CONV-R Mäusen unverändert (Abbildung 17). Das Fehlen dieser Adaptermoleküle wirkte sich nicht auf die primäre Hämostase aus.

4.2. Die Kolonisierung des Darmes beeinflusst die arterielle Thrombusbildung

Da die Bestimmung der Blutungszeiten keinen genauen Rückschluss auf die tatsächliche Thrombusbildung gibt, wurde in dieser Arbeit ein arterielles *in vivo* Thrombosemodell mit 10%iger FeCl₃ verwendet. In Kombination mit einem Intravitalmikroskop konnte so die Entstehung eines okklusiven Thrombus in Echtzeit und *in vivo* verfolgt werden. Die Versuche mit dem arteriellen Thrombosemodell zeigten, dass die Gefäßverschlusszeit bei CONV-R und CONV-D Mäusen signifikant kürzer war als bei GF Mäusen (Abbildung 19). Eine Kolonisierung mit Bakterien über 14 Tage und von Geburt an beschleunigte eine experimentell herbeigeführte Thrombusbildung und somit den kompletten Verschluss der *Arteria carotis communis*. Wie genau der Einfluss der Mikrobiota sich auf eine schnellere Thrombusbildung auswirkt, ist bisher ungeklärt. Ob dieser Unterschied von Mikrobiota-abhängigen Gerinnungsfaktoren oder durch die Regulation der Expression von Adhäsionsmolekülen in der *Arteria carotis communis* entsteht, ist unklar. Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 am Endothel sind unter anderem für eine initiale Entzündungsantwort durch die Bindung von Leukozyten an das Endothel und die Entstehung von Atherosklerose und arteriellen Thrombosen ursächlich (321, 322). Komatsu et al. (221) zeigten mit dem Einsatz von radioaktiv markierten Antikörpern gegen ICAM-1, dass ICAM-1 im Endothel von Ileum, Leber und Haut bei keimfreien Mäusen verringert ist. Für eine Thrombusbildung sind nicht nur Adhäsionsmoleküle am Endothel verantwortlich sondern auch das Glykoprotein von Willebrand Faktor, das nach Aktivierung von Thrombozyten und Endothelzellen ausgeschüttet wird, um Thrombozyten an das Endothel oder freigelegtes Bindegewebe zu binden (323). Hohe Konzentrationen des für die Gerinnung wichtigen von Willebrand Faktors führt zu einer höheren Prävalenz arterieller Thrombosen (324, 325). Das Protein Tissue Faktor (TF), welches durch verletztes Endothel oder Entzündungsmediatoren aus dem Endothel freigesetzt wird, aktiviert die Gerinnungskaskade (92). Das natürliche Antikoagulant Tissue Factor Pathway Inhibitor schwächt durch die Hemmung von TF die Bildung eines arteriellen Thrombus ab (326, 327). Die quantitativen Expressionsanalysen der

Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, von Willebrand Faktor (vWF) und dem im Endothel synthetisierten Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) wurde an unverletzten Carotiden von GF und CONV-R Mäusen durchgeführt, um zu untersuchen ob die erhöhte Expression dieser Moleküle mit der schnelleren Thrombusbildung assoziiert ist. Keines dieser Moleküle wurde bei CONV-R Mäusen differentiell exprimiert (Abbildung 20 a-d). Dieser Unterschied zu Komatsu et al. könnte darin liegen, dass Komatsu et al. mittels Antikörper das Vorhandensein dieser Adhäsionsmoleküle auf dem Endothel untersucht hat. Die Expression auf RNS Ebene dieser Moleküle scheint von der Darmmikrobiota nicht abhängig zu sein aber die Umwandlung zum eigentlichen Protein scheint laut Komatsu et al. durch Antikörperaktivitätsmessungen Mikrobiot-abhängig zu sein. Für die Expressionsanalysen dieser Arbeit wurden ganze Carotiden verwendet. Um die Expression dieser Moleküle genauer zu bestimmen, wäre es zielführend in weiterführenden Experimenten die isolierten Endothelzellen dieses Gefäßes zu analysieren, was aber auf Grund der Größe dieses Gefäßes in der Maus nur sehr schwer möglich sein sollte. Eine Beteiligung des Subendothels (z.B. Laminin, Kollagen) oder der anderen Gefäßschichten (z.B. der *Tunica media*) an der Thrombusbildung kann im FeCl₃-Modell aber nicht ausgeschlossen werden.

4.3. Einfluss von Mikrobiota auf die Rekrutierung von Leukozyten in einem Ischämie-Reperusionsverletzungsmodell

Mesenterialinfarkte treten bei entzündlichen Darmerkrankungen gehäuft auf (21) und diese Erkrankungen sind mit einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion der Epithelzellschicht assoziiert (328). Kürzlich konnten Stoffwechselprodukte kommensaler Darmbakterien auch unter nicht-entzündlichen Bedingungen in der Pfortader von Mäusen nachgewiesen werden (319). Aus diesem Grunde sollte im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersucht werden, ob das kommensale Darmmikrobiom die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an das geschädigte mikrovaskuläre Endothel und die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten im Mesenterialinfarktmodell (Ischämie-Reperusionsmodell) verstärkt. Bei den Untersuchungen in der Mikrozirkulation des Mesenteriums, vor und nach einer experimentell induzierten Ischämie wurden in dieser Arbeit sowohl die Effekte der Ischämie, als auch die Effekte der mikrobiellen Besiedlung in den jeweiligen Mausgruppen untersucht. Da Leukozyten und Thrombozyten nicht nur frei im Blutstrom mitschwimmen, konnten mittels Intravitalmikroskopie verschiedene Stadien der Adhäsion nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Adhäsion von Leukozyten, ob temporär oder permanent (rollende oder adhärenente Leukozyten), war bei GF Mäusen im Vergleich zu CONV-R, CONV-D und mit *E. coli* JP313 monoassoziierten Mäusen im Normalzustand, also Pre-Ischämie, und auch Post-Ischämie

signifikant vermindert, was auf eine ausgeprägte Wirkung des kommensalen Darmmikrobioms hindeutet (Abbildung 21 a-h, Abbildung 23 a-j). Eine Kolonisierung von keimfreien Mäusen mit einer komplexen Mikrobiota über 14 Tage bewirkte einen Anstieg in der Anzahl von rollenden und adhären Leukozyten im physiologischen Zustand und war mit der Anzahl von rollenden und adhären Leukozyten von CONV-R Mäusen vergleichbar. Eine Monokolonisierung mit dem gramnegativen γ -Proteobakterium *Escherichia coli* über 14 Tage bewirkte weder Pre- noch Post-Ischämie eine verstärkte Adhäsion von Leukozyten, wie sie bei CONV-R oder CONV-D Mäusen beobachtet wurde (Abbildung 23 a-j). Die Kolonisierung mit einem einzelnen Bakterienstamm im gnotobiotischen Mausmodell war nicht im Stande gleichviele Leukozyten an das Endothel zu rekrutieren wie die Anwesenheit einer komplexen Mikrobiota. Eine Monokolonisierung mit *Escherichia coli* wurde in diesem Versuchsvorhaben angewendet, da *E. coli* bei entzündlichen Darmerkrankungen vermehrt an der Mukosa des Darmes vorgefunden wurden (329). Zudem lässt sich der Laborstamm K12 *E. coli* WT JP313 sehr gut unter Laborbedingungen als Monokultur kultivieren. Auch ist *E. coli* bei Neugeborenen einer der ersten Darmbesiedler nach der Geburt (151) und keimfreie Mäuse lassen sich sehr gut mit dem fakultativ-anaeroben Bakterium kolonisieren.

Die Adhäsion und das Rollen von Leukozyten am Endothel wird über Rezeptoren auf den Leukozyten und dem Endothel vermittelt. Ein wichtiger Vertreter ist ICAM-1. Dieser Rezeptor ist für die Bindung und auch anschließende Emigration von Leukozyten aus der Blutzirkulation in das Gewebe verantwortlich (57). Arndt (330) berichtete 1994, dass der Einsatz des Antibiotikums Metronidazol eine Abnahme der ICAM-1-abhängigen Leukozytenauswanderung in mesenterialen Gefäßen bewirkte. Eine Antibiose bewirkt eine Reduzierung und Änderung der Bakterienkomposition im Magen-Darm-Trakt (317). Weiterhin wurde gezeigt, dass GF Mäuse im Vergleich zu CONV-R Mäusen eine niedrigere konstitutive Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin in den Gefäßen viszeraler Organe, den Nieren und der Haut aufweisen. Diese Unterschiede verschwanden nachdem GF Mäuse mit einer intakten Mikroflora von CONV-R Mäusen kolonisiert wurden (221).

Takebayashi et al. (22) zeigten, dass die Interaktion von Leukozyten (T-Zellen) mit der mikrovaskuläre Strombahn des Darmes bei GF Mäusen im Vergleich zu CONV-R Mäusen verringert war. Mittels intravitalmikroskopischer Untersuchungen wurde hier gezeigt, dass bei CONV-R und CONV-D Mäusen schon physiologisch eine höhere Anzahl an Leukozyten am Endothel verglichen mit GF Mäusen vorhanden war. Außerdem zeigten Zhang et al. 2015 (320), dass das Mikrobiom die Alterung von Neutrophilen beschleunigt. Diese Alterung von

Neutrophilen wird durch die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 und das Adaptermolekül MYD88 vermittelt. *Tlr2^{-/-}*, *Tlr4^{-/-}* und *Myd88^{-/-}* defiziente Mäuse besitzen eine reduzierte Anzahl an älteren Neutrophilen. Ältere Neutrophile, die kurz vor ihrem Abbau in der Milz stehen, zeigen eine vermehrte Interaktion mit dem Endothel, Thrombozyten und Erythrozyten und haben eine gesteigerte proinflammatorische Aktivität. Eine Stimulierung mit LPS zeigte, dass ältere Neutrophile eine gesteigerte Bildung von Neutrophil Extrazellulär Traps (331) aufweisen (331). NETs sind spinnenwebenartige Strukturen, die bei Infektionen im Stande sind pathogene Erreger aus dem Blutstrom zu fangen und unschädlich zu machen (114). Die NET Bildung war durch das Fehlen der Mikrobiota-abhängigen Rezeptoren TLR2 und 4 und deren Adaptermolekül MYD88 ebenfalls reduziert. Die Behandlung von Mäusen mit einer Kombination aus vier Antibiotika (Ampicillin, Neomycin, Metronidazol und Vancomycin) und der damit einhergehenden Reduzierung und Veränderung der Mikrobiota im Darm führt zu einer starken Abnahme von NETs (320). Diese Forschungsergebnisse zeigten, dass die Mikrobiota Einfluss auf die Aktivität von Leukozyten und deren Produkte hat (331) und daher auch im Stande ist Erreger effizient abzuwehren. Da die Bildung von NETs vor allem durch hohe LPS-Konzentrationen getriggert wird (332) wäre eine *in vivo* Beobachtung der NET-Bildung in dem mesenterialen Ischämie-Reperfusionsschadenmodell vor allem nach einer experimentell-induzierten Infektion bei GF und CONV-R Mäusen interessant.

Die Analyse von Neutrophilen und Monozyten mittels Durchflusszytometriemessungen zeigte, dass Neutrophile und Monozyten von CONV-R Mäusen mehr PSGL-1 exprimieren (Abbildung 29 a + b). Da PSGL-1 mit seinem Bindungspartner P-Selektin am Endothel oder auf Thrombozyten interagieren kann, könnte dies die beobachtete vermehrte Bindung von Leukozyten ans Endothel erklären. Die basal erhöhte Adhäsion von Leukozyten bei CONV-R Mäusen könnte zu einer erhöhten Endothelzellaktivierung führen und die Ausbreitung von eindringenden Mikroorganismen verhindern. Van de Hoven (333) und Perez-Chanona (334) zeigten, dass die Anwesenheit einer Mikrobiota und deren Endotoxine zu einem weniger schweren Verlauf einer Ischämie-Reperfusionsschaden im Vergleich mit keimfreien Tieren, führt. Die Verletzung des Darmepithels war, nach einer Ischämie und anschließender 90-minütiger Reperfusion, bei CONV-R Mäusen geringer als bei GF Mäusen (335). Dass Keimfreiheit aber auch protektive Eigenschaften gegenüber entzündlichen Krankheiten hat, zeigen Studien mit keimfreien Hunden und Ratten. Eine ischämische Strangulation des Darmes bei keimfreien Hunden und Ratten zeigte besserer Überlebenschancen als bei Tieren mit einer Mikrobiota. Eine Monokolonisierung der Hunde mit einem *Clostridium*-Bakterium und eine hämorrhagische Infarzierung des Darmes der Ratte führten zu einer drastischen

Abnahme der Überlebensrate. Ob die Nekrose des Darmes oder in Kombination mit der Anwesenheit eines Mikrobioms ursächlich für den tödlichen Ausgang der Krankheit ist, blieb unklar (336-338).

Die fatale Wirkung einer Ischämie-Reperfusionsschädigung wird, laut Amaral et al. (339), durch eine hohe Produktion des Zytokins Makrophagen Migration Inhibitionsfaktor (MIF) von Leukozyten und die darauffolgende erhöhte Produktion von TNF α aus Makrophagen ausgelöst. TNF α ist einer der zentralen Entzündungsregulatoren (340). TNF α -Inhibitoren werden heutzutage zur Behandlung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt (341). Nicht jeder TNF α -Inhibitor wirkt bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen so gut wie bei anderen chronischen Entzündung (z.B. Arthritis) (342). Also kann TNF α alleine nicht für die Schwere dieser Erkrankungen verantwortlich gemacht werden. Die vermehrte Expression von Adhäsionsrezeptoren und Rekrutierung von Leukozyten an das Endothel von CONV-R und CONV-D Mäusen führt zu einer verstärkten Entzündungsantwort nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden. Läuft diese kontrolliert ab, kann es zu einer effektiveren Immunantwort auf pathogene Erreger in der Mikrozirkulation kommen (343). Kommt es aber zu einem zu großen Schaden durch die Ischämie und anschließende Reperfusion, führt die hohe Anzahl an Leukozyten und deren Chemokinproduktion zur Zerstörung der Endothelzellen. Ob die Mikrobiota Feind oder Freund im Verlauf einer Ischämie-Reperfusionsschädigung durch die Adhäsion und Aktivierung von Leukozyten ist, hängt höchstwahrscheinlich von der Zusammensetzung der Mikrobiota, der genetischen Prädisposition des Wirts, der Dauer und Häufigkeit der Ischämie und anderen Umweltfaktoren ab.

4.4. Die Adhäsion von Thrombozyten an das mesenteriale Endothel ist bei kolonisierten Mäusen erhöht

Die Interaktion von Thrombozyten mit dem Endothel und die Bildung von Thrombozytenaggregaten (mindestens zwei Thrombozyten miteinander verbunden) war nach der 60-minütigen Ischämie bei CONV-R Mäusen im Vergleich zu GF Mäusen erhöht (Abbildung 22 a-l). Bei einer Monoassoziation mit *E. coli* JP313 kommt es zu einem Anstieg an transient adhärenz Thrombozyten am mesenterialen Endothel (Abbildung 24 a-o). Die Anwesenheit einer komplexen Mikrobiota führt zur einer erhöhten Expression der Adhäsionsrezeptoren GPIIb/IIIa (Integrin α IIb β 3) und P-Selektin auf den Thrombozyten (Abbildung 27, Abbildung 28) was die schnellere und vermehrte Bindung an das Endothel fördern könnte. Durch die erhöhte P-Selektin Expression bei CONV-R Thrombozyten wird

während der Ischämie-Reperfusionsverletzung möglicherweise auch die Produktion von NETs gefördert, welche der Abwehr von unerwünschten Erregern unterstützt. P-Selektin, löslich im Blut und auf dem Endothel, gebunden mit PSGL-1 fördert laut Etulain et al. (344) die NET-Bildung. Nach einer Ischämie-Reperfusionsverletzung wird endotheliales P-Selektin vermehrt exprimiert und fördert unter anderem die Rekrutierung von Thrombozyten an das Endothel (42). Zum einen werden sie daraufhin aktiviert und schütten proinflammatorische Mediatoren aus und zum anderen können an die aktivierten, adhärenenten Thrombozyten Leukozyten binden die dann weiter akkumulieren und aus dem Gefäß in das Gewebe austreten.

4.5. Die Mikrobiota erhöht die Anzahl von Leukozytenkonjugaten und Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen

Leukozytenkonjugate in dieser Studie bedeutet Verbindungen von mindestens zwei Leukozyten mit Thrombozyten oder anderen Zellen, die nicht mit einem Fluorophor markiert sind. Bei den Auswertungen der intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurden mindestens zwei aneinanderhaftende Leukozyten als ein Leukozytenkonjugat ausgezählt. Es handelt sich hierbei nicht um reine Leukozytenkonjugate, da Leukozyten alleine nicht miteinander verbunden sind. Da nur ein Teil der gesamten Thrombozyten gefärbt wurden (Thrombozyten der Spendermaus), waren die Thrombozyten der OP-Empfängermaus während der intravitalmikroskopischen Untersuchungen nicht sichtbar. Ideal wäre es, wenn alle Thrombozyten gefärbt wurden, da sich so die Interaktion von Thrombozyten mit Leukozyten exakt bestimmen ließe. Da die Thrombozyten *ex vivo* gefärbt werden müssen, müssten dafür die Thrombozyten der OP-Empfängermaus komplett depletiert werden. Eine komplette Depletion von Thrombozyten ist zum Beispiel bei einer humanen GPIIb/IIIa Maus möglich (345). Bei der humanen GPIIb/IIIa Maus wurde der murine GPIIb/IIIa Rezeptor durch den humanen GPIIb/IIIa Rezeptor auf Thrombozyten ersetzt. Mit einem Antikörper gegen diesen humanen Rezeptor kann die Maus komplett von Thrombozyten depletiert werden. Diese Mäuse sind aber bislang nicht im keimfreien Status erhältlich.

Die Anzahl von Leukozytenkonjugaten und Leukozyten-Thrombozyten Interaktion war bei GF Mäusen im Vergleich zu CONV-R, CONV-D und mit *E. coli* monoassoziierten Mäusen verringert (Abbildung 21 i-l, Abbildung 22 m-p, Abbildung 23 k-p, Abbildung 24 p-t). Eine 14-tägige Kolonisierung mit einer komplexen Mikrobiota oder mit dem gram-negativen Bakterium *E. coli* JP313 war nicht ausreichend um die gleiche Anzahl an Leukozytenkonjugaten oder Leukozyten-Thrombozyten Interaktion wie bei CONV-R Mäusen

zu erreichen. Nicht nur der Unterschied in der PSGL-1 Expression auf Neutrophilen und Monozyten bei GF und CONV-R Mäusen, sondern auch die vermehrte Exponierung des Aktivierungsmarker P-Selektin auf Thrombozyten (Abbildung 28 b) könnte ursächlich für eine vermehrte Interaktion von Leukozyten mit Thrombozyten in den kolonisierten Mäusen gewesen sein. Steffen Massberg (42) beschrieb 1998, dass Leukozyten nicht einfach so an Thrombozyten anhaften, sondern das zirkulierende Leukozyten-Thrombozyten Konjugate nach der Schädigung der Gefäßwand durch Ischämie und Reperfusion auftreten. In P-Selektin defizienten Mäusen ist die Konjugatbildung sehr stark vermindert, was die Vermutung erhärtet, dass die Bindung von thrombozytärem P-Selektin mit leukozytärem PSGL-1 vermutlich entscheidend für die erhöhte Anzahl an Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen in CONV-R Mäusen ist. Durch die Bindung von P-Selektin an PSGL-1 wird auch die Bildung von Neutrophil Extrazellulär Traps gefördert (331)(344). Diese können pathogene Bakterien aus dem Blutstrom abfangen und inaktivieren, aber auch zur Pathogenese von entzündlichen und thrombotischen Krankheiten beitragen (346). Bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist die Anzahl von Leukozyten-Thrombozyten Interaktion in mesenterialen Venen erhöht (347, 348) und könnte unter anderem ein Auslöser für das vermehrte Vorkommen mesenterialer Infarkte sein (349). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Mikrobiota einen deutlichen Einfluss auf die Bildung von Leukozyten-Thrombozyten Interaktionen hat.

5. Einfluss des angeborenen Immunsystems auf die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten an das mesenteriale Gefäßbett im Ischämie-Reperfusionsmodell

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass GF Mäuse im nicht-geschädigten Gefäß eine geringere Anzahl an mit dem Endothel interagierenden Leukozyten und Thrombozyten und auch eine geringere Bildung von Konjugaten aufweisen. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass wichtige Funktionen des angeborenen Immunsystems bei GF Mäusen weniger gut entwickelt sind, verglichen mit dem angeborenen Immunsystem von Mäusen, die mit einer kommensalen Mikroflora besiedelt sind (350). Um den Einfluss des angeborenen Immunsystems auf die Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten zu untersuchen, wurden transgene Mausstämmen verwendet. Mit dem Einsatz von *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} Mäusen kann der Einfluss dieser für die TLR-Signaltransduktion erforderlichen Adapterproteine,

deren Signalfunktion unter anderem von bakteriellen Liganden stimuliert wird, untersucht werden.

Das Fehlen des MYD88 Adaptermoleküls führte zu einer verminderten Adhäsion von Thrombozyten bereits vor Induktion der 60-minütigen Ischämie. Eine Aggregatbildung war bei *Myd88*^{-/-} Mäusen sowohl vor der Ischämie als auch danach kaum zu beobachten. Auch Zhang et al. (331) zeigten 2009, dass eine Aggregatbildung und Aktivierung von Thrombozyten bei *Myd88*^{-/-} Mäusen reduziert war. Die Schädigung des Darmepithels war bei *Myd88*^{-/-} Mäusen nach einer Ischämie-Reperusionsverletzung deutlich reduziert (335). Tendenziell war die Adhäsion und Aggregatbildung von Thrombozyten bei *Myd88*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp und *Trif*^{-/-} Mäusen reduziert. Nur bei *Trif*^{-/-} Mäusen war ein Anstieg von adhärenen Thrombozyten nach der Ischämie zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Rekrutierung und Adhäsion von Thrombozyten entscheidend vom Adaptermolekül MYD88 abhängig zu sein scheint. Interessanterweise waren rollende Leukozyten bei *Trif*^{-/-} Mäusen Post-Ischämie reduziert und es zeigte sich im Vergleich zu Wildtyp und *Myd88*^{-/-} Mäusen kaum ein Anstieg an temporär oder permanent adhärenen Leukozyten durch die Ischämie-Reperusionsverletzung. Bakterienmembranbestandteile wie LPS führten zu einer Aktivierung von MYD88- und TRIF-abhängigen Signalwegen (331, 351). Xiong et al. zeigten 2011, dass Leukozytenantigene auf Thrombozyten bei Hemmung der MYD88 und TRIF-Signalwege reduziert waren (352). Die Ergebnisse der intravitalmikroskopischen Untersuchungen von *Myd88*^{-/-} und *Trif*^{-/-} Mäusen im Ischämie-Reperusionsverletzungsmodell zeigten, dass eine Defizienz dieser Adaptermoleküle einem Fehlen der Mikrobiota in der Maus gleicht. Das bedeutet, dass das angeborene Immunsystem bei keimfreien Mäusen effektiv beeinträchtigt ist. Ob die regulierte Adhäsion von Thrombozyten bei *Myd88*^{-/-} Mäusen auch an einer reduzierten Expression von P-Selektin und von Leukozyten bei *Trif*^{-/-} Mäusen abhängig ist sollte in weiterführenden Experimenten mittels Durchflusszytometrie untersucht werden.

6. Ausblick

Zukünftig sollten die zu Grunde liegenden Mechanismen der schnelleren Thrombusbildung im arteriellen Gefäßsystem und die Rekrutierung von Entzündungszellen an das Endothel von mesenterialen Venolen unter Verwendung des keimfreien Mausmodells erforscht werden. Die Analyse der Expression und Aktivität von Gerinnungsfaktoren in Geweben und in der Zirkulation wäre hier ein interessanter Aspekt und kann mit gewebespezifischen knock-out Mäusen funktionell untersucht werden.

Transgene Mäuse (z.B. die humane GPI α Maus und *P-Selektin*-defiziente Maus), könnten eingesetzt werden um den genauen Einfluss der Thrombozytenadhäsion und auch die Rekrutierung von Leukozyten im keimfreien und kolonisierten (gnotobiotischen) Mausmodell bei der Ischämie-Reperusionsverletzung in mesenterialen Venolen zu bestimmen. Die Herstellung von Knochenmarksschimären unter keimfreien Bedingungen könnte weiterführende Analysen ermöglichen, die Ursache für die verminderte Adhäsion von Leukozyten und die reduzierte Anzahl von Leukozyten-Thrombozyten-Interaktionen in keimfreien Mäusen Pre-Ischämie und die Zunahme adhärenter Thrombozyten, rollender Leukozyten und Leukozytenkonjugate Post-Ischämie zu klären. Dies könnte durch Knochenmarkstransplantationen von P-Selektin-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypknochenmark in keimfreien Mäusen und konventionell-aufgewachsenen Mäusen erfolgen. Wenn die P-Selektin/PSGL-1 Interaktion durch die kommensale Mikrobiota reguliert ist, so sollte sich bei den weiterführenden Experimenten kein Unterschied zwischen transplantierten GF und CONV-R Mäusen mehr zeigen und der Unterschied sollte bei den mit knock-out Knochenmark transplantierten Mäusen auch nach einer Kolonisierung mit einer intakten Mikrobiota nicht erscheinen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Erkenntnis, dass die Besiedlung des Körpers mit einer Mikrobiota einen großen Einfluss auf die Entstehung und Weiterentwicklung von, immer häufiger auftretenden Krankheitsbildern wie Fettleibigkeit, Diabetes, Herz-Kreislauf-erkrankungen und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen nimmt, macht das keimfreie Mausmodell zu einem sehr nützlichen Instrument. Die Mikrobiota steht in direkter Wechselwirkung mit dem Immunsystem. Da das Immunsystem eng mit der Blutgerinnung verknüpft ist, wird in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen Bakterien und der Entstehung eines Thrombus an der *Arteria carotis communis* und der Rekrutierung von Entzündungszellen ans Endothel nach einer Ischämie-Reperfusionsschädigung am Mesenterium mittels Intravitalmikroskopie untersucht.

Mit dem Einsatz keimfreier Mausmodelle und der High-Speed-Fluoreszenz-Intravitalmikroskopie wurde mit zwei *in vivo* Mausmodellen der Einfluss der Mikrobiota auf die Thrombusbildung im arteriellen System und die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten in mesenterialen Venolen nach einer Ischämie-Reperfusionsschädigung in Echtzeit untersucht. Die Untersuchungen zeigen, dass es bei konventionell aufgezogenen (CONV-R) und ehemals keimfreien, mit einer komplexen Mikrobiota kolonisierten (CONV-D) Mäusen im Vergleich zu GF Mäusen zu einer schnelleren Thrombusbildung, ausgelöst durch eine FeCl₃-Applikation, kam. Mit einem Ischämie-Reperfusionsschädigungsmodell wurde an den Gefäßen des Mesenteriums gezeigt, dass die Kolonisierung des Darmes mit Mikrobiota, ob von Geburt an über 14 Tage oder mit einem einzigen Bakterium (*E.coli* JP313), die Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an das Endothel oder von Thrombozyten und Leukozyten miteinander erhöht. Die Ischämie und die anschließende Reperfusion führte bei kolonisierten Mäusen zu einer stärkeren Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten ans Endothel im Vergleich zu keimfreien Mäusen. Durchflusszytometriemessungen zeigten, dass die Expression von Adhäsionsrezeptoren auf Thrombozyten (P-Selektin) und Leukozyten (PSGL-1) bei kolonisierten (CONV-R) Mäusen erhöht war. Eine Regulation der Expression dieser Adhäsionsrezeptoren durch die Mikrobiota könnte die vermehrte Bindung von Zellen an das Endothel und die Verstärkung von Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion erklären. Da bei keimfreien Mäusen das angeborene Immunsystem beeinträchtigt ist, wurden in dieser Arbeit transgene *Myd88*- und *Trif*-defiziente Mäuse untersucht, um mit genetischen Mausmodellen die Rolle des

angeborenen Immunsystems bei der Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten an das Endothel zu ermitteln. Das Fehlen der MYD88 oder TRIF Adaptermoleküle der Toll-like Rezeptoren führte zu einer verminderten Leukozytenadhäsion und zu einer teilweise reduzierten Thrombozytenadhäsion. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass dem Umweltfaktor Mikrobiota eine funktionelle Bedeutung bei der Entstehung von Thrombosen in großen Gefäßen wie der Halsschlagader, aber auch beim Mesenterialinfarkt in der Mikrozirkulation zugesprochen werden kann. Das Vorhandensein einer intakten Mikroflora kann einerseits eine schnellere Immunantwort, aber andererseits auch einen erhöhten Schaden des Gewebes durch Entzündungszellen bewirken.

VII. SUMMARY

The knowledge that microbiota influences genesis and progression of obesity, diabetes, cardiovascular disease and chronic inflammatory bowel disease and the increasing prevalence of the diseases make the GF mouse model a useful tool. Microbiota are directly linked to the immune system. Its metabolites stimulate the immune system continuously. The innate immune system and plasmatic coagulation have co-evolved. In this thesis the relation between microbiota and thrombus formation and the recruitment of inflammatory cells to the endothelium after an ischemia-reperfusion injury was evaluated.

With the use of germ free mice, combined with high-speed-fluorescence intravital microscopy and *in vivo* mouse models, the influence of microbiota on thrombus formation in the *Arteria carotis communis* and the adhesion of leukocytes and platelets in mesenteric venules after an ischemia-reperfusion-injury were determined in real time. The results of this thesis showed that ferric chloride induced thrombus formation in conventionally raised (CONV-R) and mice (CONV-D) that were colonized with a complete cecal microbiota, was accelerated compared with germfree mice (GF). By a mesenteric ischemia-reperfusion-injury model it could be shown that adhesion of leukocytes and platelets was increased in CONV-R, CONV-D and mice colonized with the single bacterial strain *E. coli* JP313 compared with GF controls. With flowcytometry measurements the expression of platelet adhesion molecules, P-selectin, and leukocyte adhesion molecules, PSGL-1, was determined. Their expression was increased in CONV-R mice, which could explain the increased adhesion of platelets and leukocytes to the endothelium and to each other. These results indicate that GF mice showed to have an impaired immune system. Mice deficient of MYD88 and TRIF show a similar response to ischemia and following reperfusion as GF mice. The results of this thesis demonstrate a role for microbiota in the formation of an occlusive thrombus in a main arterial vessel. In addition, these results uncovered the involvement of enteric microbiota in recruitment of proinflammatory cells in the mesenteric microvasculature.

VIII. ABKÜRZUNGSVERZICHNIS

µl	<i>Mikroliter</i>
µm	<i>Mikrometer</i>
A.	<i>Arteria (lat.)</i>
Abb	<i>Abbildung</i>
ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
AMP	<i>Antimikrobielles Peptid</i>
aPTT	<i>aktivierte partielle Thromboplastinzeit</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
CD18	<i>Cluster of Differentiation 18</i>
CD49d	<i>Cluster of Differentiation 49d</i>
CD99	<i>Cluster of Differentiation 99</i>
cm ³	<i>Kubikzentimeter</i>
CONV-D	<i>Conventionally-Derived</i>
CONV-R	<i>Conventionally-Raised</i>
DCF	<i>Dichlorfluoreszeindiacetat</i>
dsDNS	<i>Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure</i>
dsRNS	<i>Doppelstrang Ribonukleinsäure</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli Wildtyp JP313</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
ESL-1	<i>E-Selektin Ligand 1</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
Faktor VIIIa	<i>Fibrinstabilisierender Faktor</i>
FeCl ₃	<i>Eisen-III-Chlorid</i>
FELASA	<i>Federation for Animal Science Associations</i>
FITC	<i>Fluoreszein Isothiocyanat</i>
GF	<i>Germfree (eng.)</i>
GP Ia/IIa	<i>Glykoprotein Ia/IIa</i>
GP Ib/IX/V	<i>Glykoprotein Ib-IX-V Rezeptor Komplex</i>
GPIbα	<i>Glykoprotein Ib alpha</i>
GPIIb/IIIa	<i>Glykoprotein IIb/IIIa</i>
GPVI	<i>Glykoprotein VI</i>
HEPES	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</i>
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i>
ICAM	<i>Intercellläres Adhäsionsmolekül 1</i>
IFN-β	<i>Interferon beta</i>
IL-8	<i>Interleukin 8</i>
IRAK 1	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
IRAK 4	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase 4</i>
IRF-3	<i>Interferon Regulierender Transkriptionsfaktor 3</i>
kg	<i>Kilogramm</i>
KO	<i>Knockout</i>
L	<i>Liter</i>

LEI *Leukozyten-Endothel-Interaktion*
LFA-1 *Lymphozyt Funktionsassoziiertes Antigen 1*
LPS *Lipopolysaccharid*
LTI *Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion*
Mac-1 *Makrophagen Antigen 1*
MAd CAM-1 *Mucosal vascular Addressin Cell Adhesion Molecule-1*
Max *Maximum*
mg *Milligramm*
Min *Minimum*
ml *Milliliter, Milliliter*
mm *Millimeter*
mRNS *messenger Ribonukleinsäure*
MYD88 *Myeloid differentiation primary response gene 88*
NaCl *Natriumchlorid*
NaOH *Natronlauge*
NETs *Neutrophile Extrazelluläre Traps*
NF- κ B *Nuklear Faktor Kappa Light Chain Enhancer von aktivierten B-Zellen*
nm *Nanometer*
OP *Operation*
p150/ 95 *Cluster of Differentiation 11c/Cluster of Differentiation 18*
PAF *Plättchenaktivierender Faktor*
PAMP *Pathogen-Associated Molecular Pattern*
PBS *Phosphate Buffered Salin, Phosphate Buffered Salin*
PECAM *Plättchen/Endothel Zelladhäsionsmolekül*
pH *potentia Hydrogenii*
PRR *Pattern Recognition Receptor*
PSGL-1 *P-Selektin Glykoprotein Ligand 1*
PT *Prothrombinzeit*
qPCR *quantitative Polymerasekettenreaktion*
qRT-PCR *quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion*
rDNS *ribosomale Desoxyribonukleinsäure*
RNS *Ribonukleinsäure*
SPF *Spezifiziert pathogenfreie*
ssRNS *Einzelstrang Ribonukleinsäure*
S *Svedberg*
TARC *Translational Animal Research Center, Translational Animal Research Center*
TEI *Thrombozyten-Endothel-Interaktion*
TF *Tissue Factor, Gewebethromboplastin*
TFPI *Tissue Faktor Pathway Inhibitor*
TIRAP *TIR-domain containing adapter molecule*
TLR *Toll-like Rezeptoren*
TNF α *Tumor Nekrosefaktor alpha*
TRAF 6 *Tumor Nekrose Faktor Rezeptorassoziiierter Faktor 6*
TRAM *TRIF related adapter molecule*
TRIF *TIRAP-inducing IFN-beta*
TX₂ *Thromboxan A2*

TZ *Thrombozyten*

Vit *Vitamin*

VCAM-1 *Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1*

VLA4- *Very Late Antigen 4*

vWF *Von Willebrand Faktor*

WT *Wildtyp*

µg *Mikrogramm*

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. Nour M, Slama FB, Maaroufi RM, Hammami M, Mahjoub T. Factor VII polymorphisms associated with plasma factor VII coagulant activity levels in healthy Tunisians. *East Mediterr Health J.* 2005;11(1-2):102-8.
2. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(44):15718-23.
3. Koren O, Spor A, Felin J, Fak F, Stombaugh J, Tremaroli V, et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108 Suppl 1:4592-8.
4. Libby P. The interface of atherosclerosis and thrombosis: basic mechanisms. *Vasc Med.* 1998;3(3):225-9.
5. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev.* 1989;69(1):58-178.
6. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(1):34-45.
7. Esmon CT, Esmon NL. The link between vascular features and thrombosis. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:503-14.
8. Markiewski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol.* 2007;28(4):184-92.
9. Kimura A, Ikeo K, Nonaka M. Evolutionary origin of the vertebrate blood complement and coagulation systems inferred from liver EST analysis of lamprey. *Dev Comp Immunol.* 2009;33(1):77-87.
10. Wostmann BS. The germfree animal in nutritional studies. *Annu Rev Nutr.* 1981;1:257-79.
11. Conly JM, Stein K. The production of menaquinones (vitamin K2) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis. *Prog Food Nutr Sci.* 1992;16(4):307-43.
12. Ramakrishna BS. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28 Suppl 4:9-17.
13. Reinhardt C, Bergentall M, Greiner TU, Schaffner F, Ostergren-Lunden G, Petersen LC, et al. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature.* 2012;483(7391):627-31.
14. Desreumaux P, Colombel JF. [Intestinal flora and Crohn's disease]. *Ann Pharm Fr.* 2003;61(4):276-81.
15. Seksik P. [Gut microbiota and IBD]. *Gastroenterol Clin Biol.* 2010;34 Suppl 1:S44-51.
16. Conlan MG, Haire WD, Burnett DA. Prothrombotic abnormalities in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 1989;34(7):1089-93.
17. Halliday CE, Farthing MJ. Arterial thrombosis in Crohn's disease. *Med J Aust.* 1988;149(10):559-60.
18. Markowitz RL, Ment LR, Gryboski JD. Cerebral thromboembolic disease in pediatric and adult inflammatory bowel disease: case report and review of the literature. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1989;8(3):413-20.
19. Bernstein CN, Blanchard JF, Houston DS, Wajda A. The incidence of deep venous thrombosis and pulmonary embolism among patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Thrombosis and haemostasis.* 2001;85(3):430-4.
20. Giannotta M, Tapete G, Emmi G, Silvestri E, Milla M. Thrombosis in inflammatory bowel diseases: what's the link? *Thrombosis Journal.* 2015;13(1):1-9.
21. Wakefield AJ, Sawyerr AM, Dhillon AP, Pittilo RM, Rowles PM, Lewis AA, et al. Pathogenesis of Crohn's disease: multifocal gastrointestinal infarction. *Lancet.* 1989;2(8671):1057-62.
22. Takebayashi K, Hokari R, Kurihara C, Okada Y, Okudaira K, Matsunaga H, et al. Oral tolerance induced by enterobacteria altered the process of lymphocyte recruitment to intestinal microvessels: roles of endothelial cell adhesion molecules, TGF-beta and negative regulators of TLR signaling. *Microcirculation.* 2009;16(3):251-64.
23. Liebig H-G. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 5. Aufl. ed. Stuttgart u.a.: Schattauer; 2010. XX, 442 S. p.
24. Lüllmann-Rauch R, Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 4., vollst. überarb. Aufl. ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2012.

25. Ritman EL, Lerman A. The Dynamic Vasa Vasorum. *Cardiovascular research*. 2007;75(4):649-58.
26. Xu J, Lu X, Shi GP. Vasa Vasorum in Atherosclerosis and Clinical Significance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(5):11574-608.
27. Maiellaro K, Taylor WR. The Role of the Adventitia in Vascular Inflammation. *Cardiovascular research*. 2007;75(4):640-8.
28. Anatomie für die Tiermedizin. 3., aktualisierte u. erw. Aufl. ed. Salomon F-V, Achilles W, editors. Stuttgart: Enke; 2015.
29. Physiologie der Haustiere. 4., aktualisierte Aufl. ed. Engelhardt Wv, Aurich C, editors. Stuttgart: Enke; 2015.
30. Anatomie. 6., neu verf. Aufl. ed. Schiebler TH, Arnold G, Schmidt W, editors. Berlin [u.a.]: Springer; 1995.
31. George JN. Platelets. *Lancet*. 2000;355(9214):1531-9.
32. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002;8(11):1227-34.
33. Bijak M, Saluk J, Ponczek MB, Nowak P, Wachowicz B. [The synthesis of proteins in unnucleated blood platelets]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2013;67:672-9.
34. Robinson M, Machin S, Mackie I, Harrison P. In vivo biotinylation studies: specificity of labelling of reticulated platelets by thiazole orange and mepacrine. *British Journal of Haematology*. 2000;108(4):859-64.
35. Hedrich ebHJ. The laboratory mouse. 2. ed. ed. Hedrich HJ, editor. Amsterdam [u.a.]: Acad. Press; 2012.
36. Harrison P, Martin Cramer E. Platelet α-granules. *Blood Reviews*. 7(1):52-62.
37. Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood*. 2004;104(6):1606-15.
38. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(12):2131-7.
39. Leo R, Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Ghiselli A, Pignatelli P, et al. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation*. 1997;95(4):885-91.
40. Forde RC, Fitzgerald DJ. Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury. *Circulation*. 1997;95(4):787-9.
41. Marcus AJ. Pathways of oxygen utilization by stimulated platelets and leukocytes. *Semin Hematol*. 1979;16(3):188-95.
42. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood*. 1998;92(2):507-15.
43. Massberg S, Vogt F, Dickfeld T, Brand K, Page S, Gawaz M. Activated platelets trigger an inflammatory response and enhance migration of aortic smooth muscle cells. *Thromb Res*. 2003;110(4):187-94.
44. Hirsch JG. COMPARATIVE BACTERICIDAL ACTIVITIES OF BLOOD SERUM AND PLASMA SERUM. *J Exp Med*. 1960;112(1):15-22.
45. Bout D, Joseph M, Pontet M, Vorng H, Deslee D, Capron A. Rat resistance to schistosomiasis: platelet-mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein. *Science*. 1986;231(4734):153-6.
46. Okada M, Sagawa T, Tominaga A, Kodama T, Hitsumoto Y. Two mechanisms for platelet-mediated killing of tumour cells: one cyclo-oxygenase dependent and the other nitric oxide dependent. *Immunology*. 1996;89(1):158-64.
47. Ibele GM, Kay NE, Johnson GJ, Jacob HS. Human platelets exert cytotoxic effects on tumor cells. *Blood*. 1985;65(5):1252-5.
48. Gawaz M, Gawaz MP. Das Blutplättchen. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 1999.
49. Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. The leukocyte integrins. *J Biol Chem*. 2000;275(31):23409-12.
50. Kurzlehrbuch medizinische Mikrobiologie und Immunologie. Heizmann WR, editor. Stuttgart [u.a.]: Schattauer; 1997.
51. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1182-90.
52. Wee H, Oh HM, Jo JH, Jun CD. ICAM-1/LFA-1 interaction contributes to the induction of endothelial cell-cell separation: implication for enhanced leukocyte diapedesis. *Exp Mol Med*. 2009;41(5):341-8.
53. Cassatella veMA. The neutrophil. Basel: Karger; 2003 [cited an emerging regulator of inflammatory

- and immune response ; the most recent findings on the functional roles of neutrophils Online Dokument;
Titel:The neutrophil; Untertitel:an emerging regulator of inflammatory and immune response ; the most recent findings on the functional roles of neutrophils; Autor(en):vol. ed.: Marco A. Cassatella; Beteiligte Person(en):Cassatella,Marco A.; Verlagsort:Basel; Verlag:Karger; Erscheinungsjahr:2003; Umfang:Online-Ressource; Relation:Chemical immunology and allergy;83; ISBN:978-3-318-00952-1; Jahr:2003
54. Schnoor M. Endothelial actin-binding proteins and actin dynamics in leukocyte transendothelial migration. *J Immunol.* 2015;194(8):3535-41.
 55. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell.* 76(2):301-14.
 56. Muller WA. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Vet Pathol.* 2013;50(1):7-22.
 57. Lyck R, Enzmann G. The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues. *Curr Opin Hematol.* 2015;22(1):53-9.
 58. Sumagin R, Robin AZ, Nusrat A, Parkos CA. Transmigrated neutrophils in the intestinal lumen engage ICAM-1 to regulate the epithelial barrier and neutrophil recruitment. *Mucosal Immunol.* 2014;7(4):905-15.
 59. Tonnesen MG. Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. *J Invest Dermatol.* 1989;93(2 Suppl):53S-8S.
 60. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):678-89.
 61. Sánchez-Madrid F, Barreiro O. Leukocytes whisper to endothelial guards. *Blood.* 2009;113(24):6048-9.
 62. Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapouli FM, et al. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol.* 2011;12(8):761-9.
 63. Bogen S, Pak J, Garifallou M, Deng X, Muller WA. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med.* 1994;179(3):1059-64.
 64. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 1993;178(2):449-60.
 65. Bixel G, Kloepe S, Butz S, Petri B, Engelhardt B, Vestweber D. Mouse CD99 participates in T-cell recruitment into inflamed skin. *Blood.* 2004;104(10):3205-13.
 66. Bixel MG, Li H, Petri B, Khandoga AG, Khandoga A, Zarbock A, et al. CD99 and CD99L2 act at the same site as, but independently of, PECAM-1 during leukocyte diapedesis. *Blood.* 2010;116(7):1172-84.
 67. Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol.* 2015;advance online publication.
 68. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-84.
 69. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood.* 2009;113(7):1399-407.
 70. Takeda K, Akira S. Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors. *Jpn J Infect Dis.* 2001;54(6):209-19.
 71. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol.* 2001;1(4):625-35.
 72. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Laradi S, Chou ML, Seghatchian J, Burnouf T, et al. The role of microparticles in inflammation and transfusion: A concise review. *Transfus Apher Sci.* 2015;53(2):159-67.
 73. Cognasse F, Nguyen KA, Damien P, McNicol A, Pozzetto B, Hamzeh-Cognasse H, et al. The Inflammatory Role of Platelets via Their TLRs and Siglec Receptors. *Front Immunol.* 2015;6:83.
 74. Parker LC, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol.* 2005;77(6):886-92.
 75. Khakpour S, Wilhelmsen K, Hellman J. Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate immunity.* 2015;21(8):827-46.
 76. Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Front Immunol.* 2014;5:367.
 77. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 2003;301(5633):640-3.
 78. Prakash P, Kulkarni PP, Lentz SR, Chauhan AK. Cellular fibronectin containing extra domain A promotes arterial thrombosis in mice through platelet Toll-like receptor 4. *Blood.* 2015;125(20):3164-72.
 79. Gauley J, Pisetsky DS. The release of microparticles by RAW 264.7 macrophage cells stimulated with

TLR ligands. *J Leukoc Biol.* 2010;87(6):1115-23.

80. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, et al. Targeted Disruption of the MyD88 Gene Results in Loss of IL-1- and IL-18-Mediated Function. *Immunity.* 1998;9(1):143-50.
81. Ruggeri ZM. Platelet interactions with vessel wall components during thrombogenesis. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;36(2):145-7.
82. Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol.* 2000;89(3):160-7.
83. Reininger AJ. VWF attributes--impact on thrombus formation. *Thromb Res.* 2008;122 Suppl 4:S9-13.
84. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood.* 2003;102(2):449-61.
85. Packham MA, Guccione MA, Chang PL, Mustard JF. Platelet aggregation and release: effects of low concentrations of thrombin or collagen. *The American journal of physiology.* 1973;225(1):38-47.
86. Behrends JC. *Physiologie : 93 Tabellen.* Stuttgart: Thieme; 2010.
87. Schror K. [Pathophysiology of platelet activation and pharmacology of GPIIb/IIIa inhibitors]. *Herz.* 2001;26 Suppl 1:30-5.
88. Bassler N, Loeffler C, Mangin P, Yuan Y, Schwarz M, Hagemeyer CE, et al. A mechanistic model for paradoxical platelet activation by ligand-mimetic alphaIIb beta3 (GPIIb/IIIa) antagonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(3):e9-15.
89. Bubel S, Wilhelm D, Entelmann M, Kirchner H, Kluter H. Chemokines in stored platelet concentrates. *Transfusion.* 1996;36(5):445-9.
90. Davie EW, Ratnoff OD. WATERFALL SEQUENCE FOR INTRINSIC BLOOD CLOTTING. *Science.* 1964;145(3638):1310-2.
91. Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature.* 1964;202(4931):498-9.
92. Bach RR. Initiation of coagulation by tissue factor. *CRC Crit Rev Biochem.* 1988;23(4):339-68.
93. Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thrombosis and haemostasis.* 1991;66(1):67-79.
94. Eilertsen KE, Osterud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2004;15(7):521-38.
95. Engelmann B. Initiation of coagulation by tissue factor carriers in blood. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;36(2):188-90.
96. Parry GC, Erlich JH, Carmeliet P, Luther T, Mackman N. Low levels of tissue factor are compatible with development and hemostasis in mice. *J Clin Invest.* 1998;101(3):560-9.
97. Pawlinski R, Pedersen B, Erlich J, Mackman N. Role of tissue factor in haemostasis, thrombosis, angiogenesis and inflammation: lessons from low tissue factor mice. *Thrombosis and haemostasis.* 2004;92(3):444-50.
98. Day SM, Reeve JL, Pedersen B, Farris DM, Myers DD, Im M, et al. Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood.* 2005;105(1):192-8.
99. Engelmann B, Luther T, Muller I. Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *Thrombosis and haemostasis.* 2003;89(1):3-8.
100. Osterud B. The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Dis Mon.* 2003;49(1):7-13.
101. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood.* 2000;96(1):170-5.
102. Rauch U, Nemerson Y. Tissue factor, the blood, and the arterial wall. *Trends Cardiovasc Med.* 2000;10(4):139-43.
103. Rauch U, Nemerson Y. Circulating tissue factor and thrombosis. *Curr Opin Hematol.* 2000;7(5):273-7.
104. Kasthuri RS, Glover SL, Boles J, Mackman N. Tissue Factor and Tissue Factor Pathway Inhibitor as Key Regulators of Global Hemostasis: Measurement of Their Levels in Coagulation Assays. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36(7):764-71.
105. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood.* 2005;106(5):1604-11.
106. Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Platelet procoagulant complex assembly in a tissue factor-initiated system. *Br J Haematol.* 1994;88(2):364-71.
107. Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG. Thrombin functions during tissue factor-induced

blood coagulation. *Blood*. 2002;100(1):148-52.

108. Lawson CA, Yan SD, Yan SF, Liao H, Zhou YS, Sobel J, et al. Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation. *J Clin Invest*. 1997;99(7):1729-38.
109. Rauch U, Osende JJ, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med*. 2001;134(3):224-38.
110. Kroegel C, Reissig A. Principle mechanisms underlying venous thromboembolism: epidemiology, risk factors, pathophysiology and pathogenesis. *Respiration*. 2003;70(1):7-30.
111. Pathologie. Böcker W, Denk H, Heitz PU, editors. München [u. a.]: Urban & Schwarzenberg; 1997.
112. Physiologie des Menschen. 31., überarb. und aktualisierte Aufl. ed. Schmidt RF, editor. Heidelberg: Springer-Medizin-Verl.; 2010.
113. van der Poll T, Herwald H. The coagulation system and its function in early immune defense. *Thrombosis and haemostasis*. 2014;112(4):640-8.
114. Branzk N, Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin Immunopathol*. 2013;35(4):513-30.
115. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*. 2010;16(8):887-96.
116. Pfeiler S, Massberg S, Engelmann B. Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis. *Thromb Res*. 2014;133 Suppl 1:S35-7.
117. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*. 2009;30(11):513-21.
118. Cooley BC. Murine models of thrombosis. *Thrombosis Research*. 2012;129, Supplement 2:S62-S4.
119. Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(12):3355-62.
120. Singh R, Pan S, Mueske CS, Witt TA, Kleppe LS, Peterson TE, et al. Tissue factor pathway inhibitor deficiency enhances neointimal proliferation and formation in a murine model of vascular remodelling. *Thrombosis and haemostasis*. 2003;89(4):747-51.
121. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Janssens S, Lupu F, Collen D, et al. Inhibitory Role of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Arterial Wound Healing and Neointima Formation: A Gene Targeting and Gene Transfer Study in Mice. *Circulation*. 1997;96(9):3180-91.
122. Wilson CA, Hatchell DL. Photodynamic retinal vascular thrombosis. Rate and duration of vascular occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(8):2357-65.
123. Brill A. A ride with ferric chloride. *J Thromb Haemost*. 2011;9(4):776-8.
124. Farrehi PM, Ozaki CK, Carmeliet P, Fay WP. Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice. *Circulation*. 1998;97(10):1002-8.
125. Denis CV, Dubois C, Brass LF, Heemskerk JWM, Lenting PJ, Biorheology Subcommittee Of The Ssc Of The I. Towards standardization of in vivo thrombosis studies in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9(8):1641-4.
126. Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res*. 1990;60(4):269-80.
127. Eckly A, Hechler B, Freund M, Zerr M, Cazenave JP, Lanza F, et al. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011;9(4):779-89.
128. Lundblad C, Grande PO, Bentzer P. A mouse model for evaluation of capillary perfusion, microvascular permeability, cortical blood flow, and cortical edema in the traumatized brain. *J Neurotrauma*. 2004;21(6):741-53.
129. Wong J, Johnston B, Lee SS, Bullard DC, Smith CW, Beaudet AL, et al. A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *J Clin Invest*. 1997;99(11):2782-90.
130. Hörbelt M, Lee S-Y, Mang HE, Knipe NL, Sado Y, Kribben A, et al. Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2007;293(3):F688-F95.
131. Geerts AM, De Vriese AS, Vanheule E, Van Vlierberghe H, Mortier S, Cheung KJ, et al. Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an in vivo study. *Liver Int*. 2006;26(7):889-98.
132. Fukumura DAI, Duda DG, Munn LL, Jain RK. Tumor Microvasculature and Microenvironment: Novel

- Insights Through Intravital Imaging in Pre-Clinical Models. *Microcirculation*. 2010;17(3):206-25.
133. Bagher P, Segal SS. The mouse cremaster muscle preparation for intravital imaging of the microcirculation. *J Vis Exp*. 2011(52).
134. Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, et al. Increased Adhesion and Aggregation of Platelets Lacking Cyclic Guanosine 3',5'-Monophosphate Kinase I. *The Journal of Experimental Medicine*. 1999;189(8):1255-64.
135. Williams JP, Pechet TTV, Weiser MR, Reid R, Kobzik L, Moore FD, et al. Intestinal reperfusion injury is mediated by IgM and complement. *Journal of Applied Physiology*. 1999;86(3):938-42.
136. Vikenes K, Farstad M, Nordrehaug JE. Serotonin Is Associated with Coronary Artery Disease and Cardiac Events. *Circulation*. 1999;100(5):483-9.
137. Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Heinrichson RL, Kaiser ET. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(7):4584-7.
138. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest*. 1997;99(9):2118-27.
139. Hossmann K-A. Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovascular research*. 1998;39(1):106-20.
140. Wei Q, Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(11):F1487-94.
141. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *The American journal of physiology*. 1995;269(6 Pt 2):H2147-54.
142. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2005;20:336-43.
143. Massberg S, Enders G, Matos FCdM, Tomic LID, Leiderer R, Eisenmenger S, et al. Fibrinogen Deposition at the Postischemic Vessel Wall Promotes Platelet Adhesion During Ischemia-Reperfusion In Vivo. *Blood*. 1999;94(11):3829-38.
144. Stallion A, Kou TD, Latifi SQ, Miller KA, Dahms BB, Dudgeon DL, et al. Ischemia/reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. *J Pediatr Surg*. 2005;40(3):470-7.
145. Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, et al. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood*. 1999;94(11):3829-38.
146. Souba DWW. *Surgical Research*, 1st Edition. Academic Press. 2000;1:1460.
147. Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg*. 1993;218(4):444-54.
148. Szabo A, Vollmar B, Boros M, Menger MD. Gender differences in ischemia-reperfusion-induced microcirculatory and epithelial dysfunctions in the small intestine. *Life Sci*. 2006;78(26):3058-65.
149. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. *Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury*. International review of cell and molecular biology. 2012;298:229-317.
150. Xiao L, Feng Q, Liang S, Sonne SB, Xia Z, Qiu X, et al. A catalog of the mouse gut metagenome. *Nat Biotechnol*. 2015;33(10):1103-8.
151. Adlerberth I, Wold AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2009;98(2):229-38.
152. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
153. Davis CP. Normal Flora. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX)1996.
154. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307(5717):1915-20.
155. Bauer E, Williams BA, Smidt H, Verstegen MW, Mosenthin R. Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Curr Issues Intest Microbiol*. 2006;7(2):35-51.
156. Doré J, Corthier G. The human intestinal microbiota. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 2010;34, Supplement 1:S7-S15.
157. Jakobsson HE, Rodríguez-Piñeiro AM, Schütte A, Ermund A, Boysen P, Bemark M, et al. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO reports*. 2015;16(2):164-77.

158. Jakobsson HE, Rodriguez-Pineiro AM, Schutte A, Ermund A, Boysen P, Bemark M, et al. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep.* 2015;16(2):164-77.
159. Bos NA, Kimura H, Meeuwssen CG, De Visser H, Hazenberg MP, Wostmann BS, et al. Serum immunoglobulin levels and naturally occurring antibodies against carbohydrate antigens in germ-free BALB/c mice fed chemically defined ultrafiltered diet. *Eur J Immunol.* 1989;19(12):2335-9.
160. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(5):313-23.
161. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(10):577-89.
162. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med.* 2014;20(2):159-66.
163. Topping DL, Clifton PM. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiological Reviews.* 2001;81(3):1031-64.
164. Xu J, Gordon JI. Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100(18):10452-9.
165. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 1977;31:107-33.
166. Venema K. Role of gut microbiota in the control of energy and carbohydrate metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(4):432-8.
167. Cummings JH, Macfarlane GT. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clinical Nutrition.* 16(1):3-11.
168. Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol.* 1991;70(6):443-59.
169. Le Blay G, Blottière HM, Ferrier L, Le Foll E, Bonnet C, Galmiche J-P, et al. Short-Chain Fatty Acids Induce Cytoskeletal and Extracellular Protein Modifications Associated with Modulation of Proliferation on Primary Culture of Rat Intestinal Smooth Muscle Cells. *Digestive Diseases and Sciences.* 45(8):1623-30.
170. Fukunaga T, Sasaki M, Araki Y, Okamoto T, Yasuoka T, Tsujikawa T, et al. Effects of the Soluble Fibre Pectin on Intestinal Cell Proliferation, Fecal Short Chain Fatty Acid Production and Microbial Population. *Digestion.* 2003;67(1-2):42-9.
171. Louis P, Young P, Holtrop G, Flint HJ. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environmental Microbiology.* 2010;12(2):304-14.
172. Hold GL, Schwartz A, Aminov RI, Blaut M, Flint HJ. Oligonucleotide Probes That Detect Quantitatively Significant Groups of Butyrate-Producing Bacteria in Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology.* 2003;69(7):4320-4.
173. Niba AT, Beal JD, Kudi AC, Brooks PH. Bacterial fermentation in the gastrointestinal tract of non-ruminants: Influence of fermented feeds and fermentable carbohydrates. *Tropical Animal Health and Production.* 2009;41(7):1393-407.
174. Rinttilä T, Apajalahti J. Intestinal microbiota and metabolites—Implications for broiler chicken health and performance1. *The Journal of Applied Poultry Research.* 2013;22(3):647-58.
175. Bergman EN. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews.* 1990;70(2):567-90.
176. Gibson GR, Macfarlane GT. *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology.* CRC Press. 1995;1 edition:304.
177. Apajalahti J. Comparative Gut Microflora, Metabolic Challenges, and Potential Opportunities. *The Journal of Applied Poultry Research.* 2005;14(2):444-53.
178. LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;24(2):160-8.
179. Booth SL, Suttie JW. Dietary intake and adequacy of vitamin K. *J Nutr.* 1998;128(5):785-8.
180. Esmon CT, Sadowski JA, Suttie JW. A new carboxylation reaction. The vitamin K-dependent incorporation of H-14-CO₃- into prothrombin. *Journal of Biological Chemistry.* 1975;250(12):4744-8.
181. Shearer MJ. Vitamin K metabolism and nutriture. *Blood Rev.* 1992;6(2):92-104.
182. Gustafsson BE. VITAMIN K DEFICIENCY IN GERM-FREE RATS*. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1959;78(1):166-74.

183. Komai M, Shirakawa H, Kimura S. Newly developed model for vitamin K deficiency in germfree mice. *Int J Vitam Nutr Res.* 1988;58(1):55-9.
184. Lippi G, Franchini M. Vitamin K in neonates: facts and myths. *Blood Transfusion.* 2011;9(1):4-9.
185. Van Winckel M, De Bruyne R, Van De Velde S, Van Biervliet S. Vitamin K, an update for the paediatrician. *Eur J Pediatr.* 2009;168(2):127-34.
186. Dominguez-Bello MG, Blaser MJ, Ley RE, Knight R. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology.* 2011;140(6):1713-9.
187. Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol.* 2007;19(2):59-69.
188. Crabbé PA, Bazin H, Eyssen H, Heremans JF. The Normal Microbial Flora as a Major Stimulus for Proliferation of Plasma Cells Synthesizing IgA in the Gut. *International Archives of Allergy and Immunology.* 1968;34(4):362-75.
189. Mulder IE, Schmidt B, Lewis M, Delday M, Stokes CR, Bailey M, et al. Restricting microbial exposure in early life negates the immune benefits associated with gut colonization in environments of high microbial diversity. *PLoS One.* 2011;6(12):e28279.
190. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Innate immune recognition of the indigenous microbial flora. *Mucosal Immunol.* 2008;1 Suppl 1:S10-4.
191. Wagner RD. Effects of microbiota on GI health: gnotobiotic research. *Adv Exp Med Biol.* 2008;635:41-56.
192. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* 2012;5(3):232-9.
193. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Kozarov E, Sobenin IA, Orekhov AN. Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. *Frontiers in Microbiology.* 2014;5:781.
194. Cucchiara S, Stronati L, Aloï M. Interactions between intestinal microbiota and innate immune system in pediatric inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol.* 2012;46 Suppl:S64-6.
195. Chirdo FG, Millington OR, Beacock-Sharp H, Mowat AM. Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur J Immunol.* 2005;35(6):1831-40.
196. Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2011;140(6):1729-37.
197. von Hertzen L, Beutler B, Bienenstock J, Blaser M, Cani PD, Eriksson J, et al. Helsinki alert of biodiversity and health. *Annals of medicine.* 2015;47(3):218-25.
198. Everard A, Cani PD. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2013;27(1):73-83.
199. Kelsen JR, Wu GD. The gut microbiota, environment and diseases of modern society. *Gut Microbes.* 2012;3(4):374-82.
200. Miele L, Giorgio V, Alberelli MA, De Candia E, Gasbarrini A, Grieco A. Impact of Gut Microbiota on Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Disease Risk. *Curr Cardiol Rep.* 2015;17(12):120.
201. Musso G, Gambino R, Cassader M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annu Rev Med.* 2011;62:361-80.
202. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(3):979-84.
203. Bellaguarda E, Chang EB. IBD and the gut microbiota--from bench to personalized medicine. *Curr Gastroenterol Rep.* 2015;17(4):15.
204. Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(10):599-608.
205. Ray K. IBD. Gut microbiota in IBD goes viral. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(3):122.
206. Thompson-Chagoyan OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clin Nutr.* 2005;24(3):339-52.
207. Riiser A. The human microbiome, asthma, and allergy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology.* 2015;11(1):1-7.
208. Sanchez-Fernandez P, Mier y Diaz J, Blanco-Benavides R. [Acute mesenteric ischemia. Profile of an aggressive disease]. *Rev Gastroenterol Mex.* 2000;65(3):134-40.
209. Salminen S, Gibson GR, McCartney AL, Isolauri E. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut.* 2004;53(9):1388-9.

210. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*. 2013;69(1):52-60.
211. O'Sullivan O, Cronin O, Clarke SF, Murphy EF, Molloy MG, Shanahan F, et al. Exercise and the microbiota. *Gut Microbes*. 2015;6(2):131-6.
212. Mead T. Diseases of modern-day society. *Trends in Urology & Men's Health*. 2014;5(5):37-40.
213. Martínez I, Stegen James C, Maldonado-Gómez Maria X, Eren AM, Siba Peter M, Greenhill Andrew R, et al. The Gut Microbiota of Rural Papua New Guineans: Composition, Diversity Patterns, and Ecological Processes. *Cell Reports*. 11(4):527-38.
214. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*. 1998;66(11):5224-31.
215. Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, et al. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun*. 2001;69(4):2277-85.
216. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:495-549.
217. Feodorova VA, Devdariani ZL, Nazarova LS. Adjuvant effect of anti-idiotypic antibodies to *Yersinia pestis* lipopolysaccharide. *J Med Microbiol*. 1999;48(8):751-6.
218. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.
219. Baetz A, Frey M, Heeg K, Dalpke AH. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells. *J Biol Chem*. 2004;279(52):54708-15.
220. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA, Jr., Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*. 2002;110(2):191-202.
221. Komatsu S, Berg RD, Russell JM, Nimura Y, Granger DN. Enteric microflora contribute to constitutive ICAM-1 expression on vascular endothelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(1):G186-91.
222. Salzman NH, Bevins CL. Negative interactions with the microbiota: IBD. *Adv Exp Med Biol*. 2008;635:67-78.
223. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet*. 2012;380(9853):1590-605.
224. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1713-25.
225. Souza DG, Senchenkova EY, Russell J, Granger DN. MyD88 mediates the protective effects of probiotics against the arteriolar thrombosis and leukocyte recruitment associated with experimental colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2015;21(4):888-900.
226. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:573-621.
227. Wang SL, Wang ZR, Yang CQ. Meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active inflammatory bowel disease. *Exp Ther Med*. 2012;4(6):1051-6.
228. Klimesova K, Kverka M, Zakostelska Z, Hudcovic T, Hrnčir T, Stepankova R, et al. Altered gut microbiota promotes colitis-associated cancer in IL-1 receptor-associated kinase M-deficient mice. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(6):1266-77.
229. Scribano ML, Prantero C. Antibiotics and inflammatory bowel diseases. *Dig Dis*. 2013;31(3-4):379-84.
230. Garrett WS, Gallini CA, Yatsunenko T, Michaud M, DuBois A, Delaney ML, et al. Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell host & microbe*. 2010;8(3):292-300.
231. Koutroumpakis EI, Tsiolakidou G, Koutroubakis IE. Risk of venous thromboembolism in patients with inflammatory bowel disease. *Semin Thromb Hemost*. 2013;39(5):461-8.
232. Yoshida H, Granger DN. Inflammatory bowel disease: a paradigm for the link between coagulation and inflammation. *Inflammatory bowel diseases*. 2009;15(8):1245-55.
233. Tabibian JH, Lada SJ, Tabibian N. Combined Inferior Vena Cava & Renal Vein Thromboses: Case and Synopsis of Thromboembolism in Inflammatory Bowel Disease. *Medscape Journal of Medicine*. 2008;10(1):6-.
234. Anthoni C, Russell J, Wood KC, Stokes KY, Vowinkel T, Kirchhofer D, et al. Tissue factor: a mediator of inflammatory cell recruitment, tissue injury, and thrombus formation in experimental colitis. *J Exp Med*. 2007;204(7):1595-601.
235. Yan SL, Russell J, Harris NR, Senchenkova EY, Yildirim A, Granger DN. Platelet abnormalities during colonic inflammation. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(6):1245-53.

236. Ha C, Magowan S, Accortt NA, Chen J, Stone CD. Risk of arterial thrombotic events in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(6):1445-51.
237. Ibrahim CB, Aroniadis OC, Brandt LJ. On the role of ischemia in the pathogenesis of IBD: a review. *Inflammatory bowel diseases.* 2010;16(4):696-702.
238. Gordon HA, Pesti L. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriological Reviews.* 1971;35(4):390-429.
239. Nuttall GHF, Thierfelder H. Thierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal. *Zeitschrift für Physiologische Chemie.* 1897 (23):5.
240. Trexler PC. The gnotobiote-review and future. *Biomed Purv.* 1961;1:47-58.
241. Heinecke H. [The origins of the gnotobiotic technic--Kuster/Nuttall/Schottelius/ Thierfelder]. *Z Versuchstierkd.* 1990;33(1):19-22.
242. Trexler PC, Reynolds LI. Flexible film apparatus for the rearing and use of germfree animals. *Appl Microbiol.* 1957;5(6):406-12.
243. Dietrich M. Klinische Gnotobiotik in der Hämatologie. *Blut.* 1974;28(5):317-20.
244. Inzunza J, Midtvedt T, Fartoo M, Norin E, Osterlund E, Persson AK, et al. Germfree status of mice obtained by embryo transfer in an isolator environment. *Lab Anim.* 2005;39(4):421-7.
245. rodents Fwgorogfhmo, rabbits, Mähler M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals.* 2014;48(3):178-92.
246. Gordon HA, Bruckner-Kardoss E. Effect of the normal microbial flora on various tissue elements of the small intestine. *Acta Anat (Basel).* 1961;44:210-25.
247. Gordon HA, Bruckner-Kardoss E, Staley TE, Wagner M, Wostmann BS. CHARACTERISTICS OF THE GERMFREE RAT. *Cells Tissues Organs.* 1966;64(1-3):367-89.
248. Reinhardt C, Bergentall M, Greiner TU, Schaffner F, Ostergren-Lunden G, Petersen LC, et al. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature.* 2012;483(7391):627-31.
249. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002;99(24):15451-5.
250. Wostmann BS, Bruckner-Kardoss E, Knight PL, Jr. Cecal enlargement, cardiac output, and O₂ consumption in germfree rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1968;128(1):137-41.
251. Carter PB, Pollard M. Host responses to "normal" microbial flora in germ-free mice. *J Reticuloendothel Soc.* 1971;9(6):580-7.
252. Levenson SM, Dof F, Lev M, Kan D. Influence of microorganisms on oxygen consumption, carbon dioxide production and colonic temperature of rats. *J Nutr.* 1969;97(4):542-52.
253. Wostmann BS, Larkin C, Moriarty A, Bruckner-Kardoss E. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. *Lab Anim Sci.* 1983;33(1):46-50.
254. Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108(7):3047-52.
255. Heneghan JB. *Germfree Research: Biological Effect of Gnotobiotic Environments.* Academic Press 1973.
256. Wostmann BS, Wiech NL, Kung E. Catabolism and elimination of cholesterol in germfree rats. *J Lipid Res.* 1966;7(1):77-82.
257. Hashimoto H, Ebukuro S, Nozu R, Ueno M, Arai T, Kawai K, et al. Vinyl isolator breeding induces insulin resistance in C57BL/6J mice. *Exp Anim.* 2011;60(5):497-508.
258. Hoverstad T, Midtvedt T. Short-chain fatty acids in germfree mice and rats. *J Nutr.* 1986;116(9):1772-6.
259. Yamanaka M, Nomura T, Tokioka J, Kametaka M. A comparison of the gastrointestinal tract in germ-free and conventional mice fed an amino acid mixture or purified whole-egg protein. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1980;26(5):435-47.
260. Lhoste EF, Catala I, Fiszlewicz M, Gueugneau AM, Popot F, Vaissade P, et al. Influence of caecal microflora and of two dietary protein levels on the adaptation of the exocrine pancreas: comparative study in germ-free and conventional rats. *Br J Nutr.* 1996;75(3):433-44.
261. Corring T, Juste C, Simoes-Nunes C. Digestive enzymes in the germ-free animal. *Reprod Nutr Dev.*

- 1981;21(3):355-70.
262. Sjögren K, Engdahl C, Henning P, Lerner UH, Tremaroli V, Lagerquist MK, et al. The gut microbiota regulates bone mass in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2012;27(6):1357-67.
263. Duan J, Kasper DL. Regulation of T cells by gut commensal microbiota. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(4):372-6.
264. Hörmann N, Brandão I, Jäckel S, Ens N, Lillich M, Walter U, et al. Gut Microbial Colonization Orchestrates TLR2 Expression, Signaling and Epithelial Proliferation in the Small Intestinal Mucosa. *PLoS ONE*. 2014;9(11):e113080.
265. Glimstedt G. The germfree animal as a research tool. *Ann N Y Acad Sci*. 1959;78:281-4.
266. Gordon HA, Wostmann BS, Bruckner-Kardoss E. EFFECTS OF MICROBIAL FLORA ON CARDIAC OUTPUT AND OTHER ELEMENTS OF BLOOD CIRCULATION. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1963;114:301-4.
267. Fontaine CA, Skorupski AM, Vowles CJ, Anderson NE, Poe SA, Eaton KA. How free of germs is germ-free? Detection of bacterial contamination in a germ free mouse unit. *Gut Microbes*. 2015;6(4):225-33.
268. Laboratory TJ. Stock No: 004650 | Tlr2 KO. Mouse Strain Datasheet. 2015.
269. Welsch J, Hubschle T, Murgott J, Kirschning C, Rummel C, Gerstberger R, et al. Fever induction by systemic stimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 depends upon TLR2 but not CD36. *Innate immunity*. 2012;18(3):541-59.
270. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol*. 2000;165(10):5392-6.
271. Giraud A. Axenic mice model. *Methods Mol Biol*. 2008;415:321-36.
272. Erhardt WH, Julia. Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen 2011(Auflage: 2., Aufl. 2011 (30. September 2011)):1000.
273. Manfred Georg Krukemayer H-US. Chirurgische Forschung. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 2005.
274. Afri M, Frimer AA, Cohen Y. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer. Part IV: Locating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer. *Chem Phys Lipids*. 2004;131(1):123-33.
275. GV-SOLAS. Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. 2009.
276. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
277. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med*. 2000;191(8):1413-22.
278. Hausding M, Jurk K, Daub S, Kroller-Schon S, Stein J, Schwenk M, et al. CD40L contributes to angiotensin II-induced pro-thrombotic state, vascular inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol*. 2013;108(6):386.
279. Barr JD, Chauhan AK, Schaeffer GV, Hansen JK, Motto DG. Red blood cells mediate the onset of thrombosis in the ferric chloride murine model. *Blood*. 2013;121(18):3733-41.
280. Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol*. 2012;34(1):5-30.
281. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(5):3047-51.
282. Laboratory TJ. C57BL/6J Stock: 000664. Mouse strain datasheet. 2015.
283. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 1999;11(1):115-22.
284. Hogan KA, Weiler H, Lord ST. Mouse models in coagulation. *Thrombosis and haemostasis*. 2002;87(4):563-74.
285. Tsakiris DA, Scudder L, Hodivala-Dilke K, Hynes RO, Collier BS. Hemostasis in the mouse (*Mus musculus*): a review. *Thrombosis and haemostasis*. 1999;81(2):177-88.
286. Sachs UJH, Nieswandt B. In Vivo Thrombus Formation in Murine Models. *Circulation Research*. 2007;100(7):979-91.
287. Liu Y, Jennings NL, Dart AM, Du XJ. Standardizing a simpler, more sensitive and accurate tail

bleeding assay in mice. *World J Exp Med.* 2012;2(2):30-6.

288. Ni H, Denis CV, Subbarao S, Degen JL, Sato TN, Hynes RO, et al. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *J Clin Invest.* 2000;106(3):385-92.
289. Ni H, Ramakrishnan V, Ruggeri ZM, Papalia JM, Phillips DR, Wagner DD. Increased thrombogenesis and embolus formation in mice lacking glycoprotein V. *Blood.* 2001;98(2):368-73.
290. Wautier JL, Wautier MP. Erythrocytes and platelet adhesion to endothelium are mediated by specialized molecules. *Clinical hemorheology and microcirculation.* 2004;30(3-4):181-4.
291. Day SM, Reeve JL, Myers DD, Fay WP. Murine thrombosis models. *Thrombosis and haemostasis.* 2004;92(3):486-94.
292. Wong LC, Langille BL. Developmental remodeling of the internal elastic lamina of rabbit arteries: effect of blood flow. *Circ Res.* 1996;78(5):799-805.
293. Li W, Febbraio M, Reddy SP, Yu D-Y, Yamamoto M, Silverstein RL. CD36 participates in a signaling pathway that regulates ROS formation in murine VSMCs. *The Journal of Clinical Investigation.* 120(11):3996-4006.
294. Chen K, Febbraio M, Li W, Silverstein RL. A Specific CD36-Dependent Signaling Pathway Is Required for Platelet Activation by Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Circulation Research.* 2008;102(12):1512-9.
295. Chen K, Li W, Major J, Rahaman SO, Febbraio M, Silverstein RL. Vav guanine nucleotide exchange factors link hyperlipidemia and a prothrombotic state. *Blood.* 2011;117(21):5744-50.
296. Li W, McIntyre TM, Silverstein RL. Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: A model of redox pathology. *Redox Biology.* 2013;1(1):50-5.
297. Robertson JO, Li W, Silverstein RL, Topol EJ, Smith JD. Deficiency of LRP8 in mice is associated with altered platelet function and prolonged time for in vivo thrombosis. *Thrombosis Research.* 2009;123(4):644-52.
298. Geddings J, Aleman MM, Wolberg A, von Bruhl ML, Massberg S, Mackman N. Strengths and weaknesses of a new mouse model of thrombosis induced by inferior vena cava stenosis: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2014;12(4):571-3.
299. Vu TT, Zhou J, Leslie BA, Stafford AR, Fredenburgh JC, Ni R, et al. Arterial thrombosis is accelerated in mice deficient in histidine-rich glycoprotein. *Blood.* 2015;125(17):2712-9.
300. Owens AP, 3rd, Lu Y, Whinna HC, Gachet C, Fay WP, Mackman N. Towards a standardization of the murine ferric chloride-induced carotid arterial thrombosis model. *J Thromb Haemost.* 2011;9(9):1862-3.
301. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of Clinical Investigation.* 123(1):92-100.
302. Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl).* 1998;198(1):23-35.
303. Tsai MS, Lin CL, Chen HP, Lee PH, Sung FC, Kao CH. Long-term risk of mesenteric ischemia in patients with inflammatory bowel disease: a 13-year nationwide cohort study in an Asian population. *Am J Surg.* 2015;210(1):80-6.
304. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2004;53(1):1-4.
305. Sartor RB, Mazmanian SK. Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Gastroenterol Suppl.* 2012;1(1):15-21.
306. Chintala MS, Bernardino V, Chiu PJ. Cyclic GMP but not cyclic AMP prevents renal platelet accumulation after ischemia-reperfusion in anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;271(3):1203-8.
307. Yamauchi J, Vollmar B, Wolf B, Menger MD. Role of TNF- α in Local Surgical Trauma-Induced Microvascular Dysfunction. *Digestive Surgery.* 1999;16(5):400-6.
308. Fagundes CT, Amaral FA, Vieira AT, Soares AC, Pinho V, Nicoli JR, et al. Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. *J Immunol.* 2012;188(3):1411-20.
309. Reyniers JA, Trexler PC. Germfree research: a basic study in host-contaminant relationship. I. General and theoretical aspects of the problem. *Bull N Y Acad Med.* 1955;31(3):231-5.
310. Trexler PC. Gnotobiotics in science and medicine. *Vet Rec.* 1967;81(19):474-8.
311. Trexler PC. A rationale for the development of gnotobiotics. *Lab Anim.* 1978;12(4):257-62.

312. Kirk RGW. "Life in a Germ-Free World": Isolating Life from the Laboratory Animal to the Bubble Boy. *Bull Hist Med*. 2012;237-75.
313. Hecht G, Bar-Nathan C, Milite G, Alon I, Moshe Y, Greenfeld L, et al. A simple cage-autonomous method for the maintenance of the barrier status of germ-free mice during experimentation. *Lab Anim*. 2014;48(4):292-7.
314. Packey CD, Shanahan MT, Manick S, Bower MA, Ellermann M, Tonkonogy SL, et al. Molecular detection of bacterial contamination in gnotobiotic rodent units. *Gut Microbes*. 2013;4(5):361-70.
315. Arvidsson C, Hallén A, Bäckhed F. Generating and Analyzing Germ-Free Mice. *Current Protocols in Mouse Biology*: John Wiley & Sons, Inc.; 2011.
316. Faith JJ, Rey FE, O'Donnell D, Karlsson M, McNulty NP, Kallstrom G, et al. Creating and characterizing communities of human gut microbes in gnotobiotic mice. *Isme j*. 2010;4(9):1094-8.
317. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-81.
318. Uchida K, Nomura Y, Takase H, Harauchi T, Yoshizaki T, Nakao H. Effects of vitamin K-deficient diets and fasting on blood coagulation factors in conventional and germ-free rats. *Jpn J Pharmacol*. 1986;40(1):115-22.
319. Balmer ML, Schurch CM, Saito Y, Geuking MB, Li H, Cuenca M, et al. Microbiota-derived compounds drive steady-state granulopoiesis via MyD88/TICAM signaling. *J Immunol*. 2014;193(10):5273-83.
320. Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*. 2015;525(7570):528-32.
321. Darbousset R, Mezouar S, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Involvement of neutrophils in thrombus formation in living mice. *Pathol Biol (Paris)*. 2014;62(1):1-9.
322. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(11):2292-301.
323. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:395-424.
324. Sanders YV, Eikenboom J, de Wee EM, van der Bom JG, Cnossen MH, Degenaar-Dujardin ME, et al. Reduced prevalence of arterial thrombosis in von Willebrand disease. *J Thromb Haemost*. 2013;11(5):845-54.
325. Sonneveld MA, de Maat MP, Leebeek FW. Von Willebrand factor and ADAMTS13 in arterial thrombosis: a systematic review and meta-analysis. *Blood Rev*. 2014;28(4):167-78.
326. Winckers K, ten Cate H, Hackeng TM. The role of tissue factor pathway inhibitor in atherosclerosis and arterial thrombosis. *Blood Rev*. 2013;27(3):119-32.
327. Wood JP, Ellery PE, Maroney SA, Mast AE. Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood*. 2014;123(19):2934-43.
328. Katz KD, Hollander D, Vadheim CM, McElree C, Delahunty T, Dadufalza VD, et al. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their healthy relatives. *Gastroenterology*. 1989;97(4):927-31.
329. Rhodes JM. The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2007;56(5):610-2.
330. Arndt H, Palitzsch KD, Grisham MB, Granger DN. Metronidazole inhibits leukocyte-endothelial cell adhesion in rat mesenteric venules. *Gastroenterology*. 1994;106(5):1271-6.
331. Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB, et al. Lipopolysaccharide Stimulates Platelet Secretion and Potentiates Platelet Aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-Dependent Protein Kinase Pathway. *The Journal of Immunology*. 2009;182(12):7997-8004.
332. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell death and differentiation*. 2011;18(4):581-8.
333. van der Hoven B, Nabuurs M, van Leengoed LA, Groeneveld AB, Thijs LG. Gut luminal endotoxin reduces ischemia-reperfusion injury of the small gut in germ-free pigs. *Shock*. 2001;16(1):28-32.
334. Perez-Chanona E, Muhlbauer M, Jobin C. The microbiota protects against ischemia/reperfusion-induced intestinal injury through nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) signaling. *Am J Pathol*. 2014;184(11):2965-75.
335. Muhlbauer M, Perez-Chanona E, Jobin C. Epithelial Cell-Specific MyD88 Signaling Mediates Ischemia/Reperfusion-induced Intestinal Injury Independent of Microbial Status. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(13):2857-66.
336. Yale CE. Ischemic intestinal strangulation in germ-free rats. *Arch Surg*. 1969;99(3):397-400.

337. Yale CE, Balish E. Intestinal Strangulation in *Clostridium perfringens*-Monocontaminated Rats. *Infect Immun*. 1971;3(3):481-7.
338. Yale CE, Balish E. Intestinal strangulation in germfree and monocontaminated dogs. *Arch Surg*. 1979;114(4):445-8.
339. Amaral FA, Fagundes CT, Guabiraba R, Vieira AT, Souza AL, Russo RC, et al. The role of macrophage migration inhibitory factor in the cascade of events leading to reperfusion-induced inflammatory injury and lethality. *Am J Pathol*. 2007;171(6):1887-93.
340. Esposito E, Cuzzocrea S. TNF-alpha as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma. *Curr Med Chem*. 2009;16(24):3152-67.
341. Van Assche G, Rutgeerts P. Anti-TNF agents in Crohn's disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000;9(1):103-11.
342. Coskun M, Nielsen OH. Tumor necrosis factor inhibitors for inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 2013;369(26):2561-2.
343. Zimmerman BJ, Holt JW, Paulson JC, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, et al. Molecular determinants of lipid mediator-induced leukocyte adherence and emigration in rat mesenteric venules. *The American journal of physiology*. 1994;266(3 Pt 2):H847-53.
344. Etulain J, Martinod K, Wong SL, Cifuni SM, Schattner M, Wagner DD. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood*. 2015;126(2):242-6.
345. Kanaji T, Russell S, Ware J. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. 2002;100(6):2102-7.
346. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*. 2009;15(11):1318-21.
347. Irving PM, Macey MG, Shah U, Webb L, Langmead L, Rampton DS. Formation of platelet-leukocyte aggregates in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2004;10(4):361-72.
348. Irving PM, Macey MG, Feakins RM, Knowles CH, Frye JN, Liyanage SH, et al. Platelet-leucocyte aggregates form in the mesenteric vasculature in patients with ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20(4):283-9.
349. Giannotta M, Tapete G, Emmi G, Silvestri E, Milla M. Thrombosis in inflammatory bowel diseases: what's the link? *Thromb J*. 2015;13:14.
350. Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, et al. Microbial Exposure During Early Life Has Persistent Effects on Natural Killer T Cell Function. *Science*. 2012;336(6080):489-93.
351. Babcock AA, Toft-Hansen H, Owens T. Signaling through MyD88 regulates leukocyte recruitment after brain injury. *J Immunol*. 2008;181(9):6481-90.
352. Xiong J, Miller VM, Hunter LW, Li Y, Jayachandran M. Leukocyte- and Platelet-Derived Microvesicle Interactions following In Vitro and In Vivo Activation of Toll-Like Receptor 4 by Lipopolysaccharide. *PLoS One*. 2011;6(9).

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON LEUKOZYTENADHÄSION UND LEUKOZYTENTRANSMIGRATION.....	11
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES MYD88-ABHÄNGIGEN UND MYD88-UNABHÄNGIGEN (TRIF)-SIGNALWEGS	14
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE ABBILDUNG DER THROMBOZYTENADHÄSION UND THROMBOZYTENAGGREGATION AN DAS ENDOTHEL.	16
ABBILDUNG 4: STRUKTURELLER AUFBAU DES VITAMIN K1, K2 UND K3.....	24
ABBILDUNG 5: EINTEILUNG VON GNOTOBIOTISCHEN, DEFINIERT ASSOZIIERTEN, SPEZIFIZIERT PATHOGENFREIEN UND KONVENTIONELLEN MÄUSEN.....	28
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHER AUFBAU EINES FLEXIBLE FILM ISOLATORS.	42
ABBILDUNG 7: LINKES BILD, STERILITÄTSKONTROLLE DER ISOLATOREN 1-7 MITTELS PCR. RECHTES BILD, STERILITÄTSKONTROLLE VON ISOLATOR 1 (MITTLERES GEFÄß) IM NÄHRMEDIUM.	43
ABBILDUNG 8: SEITENANSICHT EINES FLEXIBLE FILM ISOLATORS.....	44
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES INTRAVITALMIKROSKOPS.....	49
ABBILDUNG 10: STRUKTUR DES FLUORESCENZFARBSTOFFES DCF.	50
ABBILDUNG 11: STRUKTUR DES FLUORESCENZFARBSTOFFES RHODAMIN B.	50
ABBILDUNG 12: STRUKTUR DES FLUORESCENZFARBSTOFFES ACRIDIN ORANGE..	51
ABBILDUNG 13: NARKOTISIERTE MAUS FIXIERT AUF HEIZPLATTE, PLATZIERT UNTER MIKROSKOP.....	54
ABBILDUNG 14: INTRAOPERATIVER ZUSTAND IM EISEN-III-CHLORID MODELL. LINKES BILD: LINKS DIE ISOLIERTE <i>A. CAROTIS COMMUNIS</i> . RECHTES BILD: ERHÖHT GELAGERTE <i>A. CAROTIS COMMUNIS</i> MIT LATERAL ANGELEGTEM FeCl_3 -GETRÄNKTEM FILTERPAPIER.	
ABBILDUNG 15: INTRAOPERATIVER ZUSTAND EINER MAUS WÄHREND DES ISCHÄMIE-REPERFUSIONSMODELLS DES MESENTERIUMS. LINKES BILD: NARKOTISIERTE MAUS FIXIERT AUF EINER HEIZPLATTE RECHTES BILD: AUSGELAGERTER ISCHÄMISCHER TEIL DES JEJUNUMS, LINKS IM BILD MICROCLIP AN <i>ARTERIA MESENTERICA SUPERIOR</i> .	
ABBILDUNG 16: MESENTERIALE VENOLEN EINGEBETTET IN PERIVASKULÄRES FETTGEWEBE. A, VEREINZELTE LEUKOZYTEN UND EIN THROMBOZYT. B, FÜR DIE AUSWERTUNG BENUTZTES FENSTER MIT GRÖßERER ANSAMMLUNG VON LEUKOZYTEN UND THROMBOZYTEN. C, LEUKOZYTEN-THROMBOZYTEN-INTERAKTION. D, LEUKOZYTENKONJUGATE.....	60
ABBILDUNG 17: DIE BLUTUNGSZEITEN NACH SCHWANZSPITZENRESEKTION.....	65
ABBILDUNG 18: A, UNVERLETZTE <i>A. CAROTIS COMMUNIS</i> VOR FeCl_3 -APPLIKATION. B, 6 MINUTEN NACH FeCl_3 -APPLIKATION. C, FORTLAUFENDE THROMBOZYTENAGGREGATION AN DER GEFÄßWAND. D, KOMPLETTE OKKLUSION	67
ABBILDUNG 19: A, BEGINNENDE UND FORTLAUFENDE THROMBUSBILDUNG. B,	

OKKLUSIONSZEIT DER <i>A. CAROTIS COMMUNIS</i> NACH FeCl_3 -APPLIKATION	68
ABBILDUNG 20: A-D, QPCR ANALYSEN VON ENDOTHELIALEN ADHÄSIONSMEKÜLEN IN UNVERLETZTEN CAROTIDEN.....	
ABBILDUNG 21: A + B, EINFLUSS DER MIKROBIOTA AUF DIE ANZAHL VON ROLLENDEN LEUKOZYTEN (279, 280) BEI GF UND CONV-R. C + D, EINFLUSS DER ISCHÄMIE AUF DIE ANZAHL DER ROLLENDEN LEUKOZYTEN BEI GF UND CONV-R MÄUSEN. E + F, EINFLUSS DER MIKROBIOTA AUF ADHÄRENTE LEUKOZYTEN. G + H: EINFLUSS DER ISCHÄMIE AUF ADHÄRENTE LEUKOZYTEN BEI GF UND CONV-R MÄUSEN. I + J, EINFLUSS DER MIKROBIOTA AUF LEUKOZYTENKONJUGATE BEI GF UND CONV-R MÄUSEN. K + L, EINFLUSS DER ISCHÄMIE BEI GF UND CONV-R MÄUSEN.	71
ABBILDUNG 22: A-P, ADHÄSIONSTADIEN VON THROMBOZYTEN UND DEREN INTERAKTION MIT LEUKOZYTEN AM MESENTERIALEN VENOLENENDOTHEL (N=10; MEDIAN, MIN., MAX.)..	76
ABBILDUNG 23: A-O, ANZAHL VERSCHIEDENER LEUKOZYTENSTADIEN VON KEIMFREIEN (GF), EHEMALS KEIMFREIEN UND ANSCHLIEßEND ÜBER 14 TAGE KONVENTINALISIERTEN (CONV-D) UND EHEMALS KEIMFREIEN UND ANSCHLIEßEND MIT <i>E. COLI</i> JP313 MONOKOLONISIERTEN (<i>E. COLI</i> JP 313) MÄUSEN VOR UND NACH DER INDUKTION EINER 60-MINÜTIGEN ISCHÄMIE (N=8, MEDIAN, MIN., MAX.)..	84
ABBILDUNG 24: A-T, ANZAHL AN THROMBOZYTEN IN IHREN VERSCHIEDENEN STADIEN (ROLLEND UND ADHÄRENT), THROMBOZYTENGREGATE UND LEUKOZYTEN-THROMBOZYTEN INTERAKTIONEN (LTI) BEI VON KEIMFREIEN (GF), EHEMALS KEIMFREIEN UND ANSCHLIEßEND ÜBER 14 TAGE KONVENTINALISIERTEN (CONV-D) UND EHEMALS KEIMFREIEN UND ANSCHLIEßEND MIT <i>E. COLI</i> JP313 MONOKOLONISIERTEN (<i>E. COLI</i> JP 313) MÄUSEN.	91
ABBILDUNG 25: ANZAHL VON LEUKOZYTEN IN VERSCHIEDENEN STADIEN (ROLLEND UND ADHÄRENT) UND ANZAHL VON LEUKOZYTENKONJUGATEN BEI DEN MAUSGRUPPEN MYD88-ADAPTERMOLEKÜL-DEFIZIENT (<i>MYD88</i> ^{-/-}), TRIF-ADAPTERMOLEKÜL-DEFIZIENT (<i>TRIF</i> ^{-/-}) UND WILDTYP (WT) VOR UND NACH DER 60-MINÜTIGEN ISCHÄMIE ..	97
ABBILDUNG 26: ANZAHL AN VERSCHIEDENEN THROMBOZYTENSTADIEN (TRANSIENT ADHÄRENTE UND ADHÄRENTE), THROMBOZYTENAGGREGATEN UND LEUKOZYTEN-THROMBOZYTEN INTERAKTIONEN (LTI) IN MESENTERIALEN VENOLEN VOR UND NACH DER INDUKTION EINES MESENTERIALINFARKTES DURCH ABKLEMMEN DER <i>A. MESENTERICA SUPERIOR</i> FÜR 60 MINUTEN.	103
ABBILDUNG 27: DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIEANALYSEN VON THROMBOZYTEN KEIMFREIER (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENER (CONV-R) MÄUSE	108
ABBILDUNG 28: THROMBOZYTEN VON KEIMFEIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN WURDEN MIT ADP, THROMBIN UND CONVULXIN STIMULIERT.	109
ABBILDUNG 29: MFI (MITTLERE FLUORESZENZINTENSITÄT) MESSUNG VON PSGL-1 AUF NEUTROPHILEN UND MONOZYTEN BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN.	110

XI. TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: AUSGEWÄHLTE SELEKTINE UND INTERGRINE AUF LEUKOZYTEN UND DEREN VORKOMMEN UND BINDUNGSPARTNER AUF ENDOTHELZELLEN. 10

TABELLE 2: TOLL-LIKE REZEPTOREN UND IHRE LIGANDEN, MODIFIZIERT NACH (71, 77). * IN DER MAUS NICHT VORHANDEN 12

TABELLE 3: TABELLARISCHE ÜBERSICHT VON PHYSIOLOGISCHEN, METABOLISCHEN UND BIOCHEMISCHEN FUNKTIONEN VON KEIMFREIEN TIEREN IM VERGLEICH ZU KONVENTIONELL AUFGEZOGENEN TIEREN. 30

TABELLE 4: GERÄTE 32

TABELLE 5: INSTRUMENTE 34

TABELLE 6: VERBRAUCHSMATERIALIEN 35

TABELLE 7: CHEMIKALIEN 36

TABELLE 8: MEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE..... 37

TABELLE 9: MURINE PRIMER 37

TABELLE 10: KITS 38

TABELLE 11: MEDIKAMENTE 39

TABELLE 12: SOFTWARES 39

TABELLE 13: VERWENDETE MAUSSTÄMME, DEREN HERKUNFT UND HALTUNG. 40

TABELLE 14: BLUTWERTE VON KEIMFREIEN (GF), KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R), EHEMALS KEIMFREIEN UND ANSCHLIEßEND ÜBER 14 TAGE KONVENTIONALISIERTEN (CONV-D), MYD88-ADAPTERMOLEKÜL-DEFIZIENTEN (*MYD88^{-/-}*) UND TRIF-ADAPTERMOLEKÜL-DEFIZIENTEN (*TRIF^{-/-}*) MÄUSEN 64

TABELLE 15: ZUNAHME (-FACH) VON ROLLENDEN LEUKOZYTEN DURCH DEN EINFLUSS DES MIKROBIOMS PRE- UND POST-ISCHÄMIE BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN. 72

TABELLE 16: ZUNAHME (-FACH) VON ROLLENDEN LEUKOZYTEN DURCH DEN EINFLUSS DER ISCHÄMIE BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN. 72

TABELLE 17: ZUNAHME (-FACH) VON ADHÄRENTEN LEUKOZYTEN DURCH DEN EINFLUSS DES MIKROBIOMS BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN PRE- UND POST-ISCHÄMIE..... 73

TABELLE 18: ZUNAHME (-FACH) VON ADHÄRENTEN LEUKOZYTEN DURCH DEN EINFLUSS DER 60-MINÜTIGEN-ISCHÄMIE BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN. 74

TABELLE 19: ZUNAHME (-FACH) VON LEUKOZYTENKONJUGATEN DURCH DEN EINFLUSS DES MIKROBIOMS BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) PRE- UND POST-ISCHÄMIE..... 74

TABELLE 20: ZUNAHME (-FACH) VON LEUKOZYTENKONJUGATEN PRE- UND POST-ISCHÄMIE BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN

DURCH DEN EINFLUSS DER ISCHÄMIE	75
TABELLE 21: ZUNAHME (-FACH) VON TRANSIENT ADHÄRENTEN THROMBOZYTEN BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN PRE- UND POST-ISCÄMIE	77
TABELLE 22: ZUNAHME (-FACH) VON TRANSIENT ADHÄRENTEN THROMBOZYTEN BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN NACH DEM EINFLUSS EINER ISCHÄMIE	78
TABELLE 23: ZUNAHME (-FACH) VON ADHÄRENTEN THROMBOZYTEN BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN DURCH DEN EINFLUSS DES MIKROBIOMS.....	79
TABELLE 24: ZUNAHME (-FACH) VON ADHÄRENTEN THROMBOZYTEN DURCH DEN EINFLUSS DER ISCHÄMIE BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN.	79
TABELLE 25: ZUNAHME (-FACH) VON THROMBOZYTENAGGREGATEN BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN DURCH DEN EINFLUSS DES MIKROBIOMS.....	80
TABELLE 26: ZUNAHME (-FACH) VON THROMBOZYTENAGGREGATEN BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN DURCH DEN EINFLUSS DER ISCHÄMIE.	80
TABELLE 27: ZUNAHME (-FACH) VON LTI BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN DURCH DEN EINFLUSS DES MIKROBIOMS.	81
TABELLE 28: ZUNAHME (-FACH) VON LTI BEI GF UND CONV-R MÄUSEN DURCH DEN EINFLUSS DER ISCHÄMIE BEI KEIMFREIEN (GF) UND KONVENTIONELL AUFGEWACHSENEN (CONV-R) MÄUSEN.	81
TABELLE 29: ZUNAHME (-FACH) VON ROLLENDEN LEUKOZYTEN AUSGELÖST DURCH KOLONISIERUNG DER KEIMFREIEN (GF) MÄUSE MIT ZÄKUMINHALT (CONV-D) UND <i>E. COLI</i> JP313 (<i>E. COLI</i> JP313) PRE- UND POST-ISCÄMIE.	85
TABELLE 30: ZUNAHME (-FACH) VON ROLLENDEN LEUKOZYTEN AUSGELÖST DURCH ISCHÄMIE BEI KEIMFREIEN (GF), EHEMALS KEIMFREIEN UND ANSCHLIEßEND ÜBER 14 TAGE KONVENTINALISIERTEN (CONV-D) UND EHEMALS KEIMFREIEN UND ANSCHLIEßEND MIT <i>E. COLI</i> JP313 MONOKOLONISIERTEN (<i>E. COLI</i> JP 313) MÄUSEN.	85
TABELLE 31: ZUNAHME (-FACH) VON ADHÄRENTEN LEUKOZYTEN AUSGELÖST DURCH KOLONISIERUNG VON KEIMFREIEN (GF) MÄUSEN MIT ZÄKUMINHALT (CONV-D) UND <i>E. COLI</i> JP313 (<i>E. COLI</i> JP313) PRE- UND POST-ISCÄMIE	86
TABELLE 32: ZUNAHME (-FACH) VON ADHÄRENTEN LEUKOZYTEN AUSGELÖST DURCH ISCHÄMIE BEI KEIMFREIEN (GF), EHEMALS KEIMFREIEN UND ANSCHLIEßEND ÜBER 14 TAGE KONVENTINALISIERTEN (CONV-D) UND EHEMALS KEIMFREIEN UND ANSCHLIEßEND MIT <i>E. COLI</i> JP313 MONOKOLONISIERTEN (<i>E. COLI</i> JP 313) MÄUSEN.	87
TABELLE 33: ZUNAHME (-FACH) VON LEUKOZYTENKONJUGATEN.....	88
TABELLE 34: ZUNAHME VON LEUKOZYTENKONJUGATEN	88
TABELLE 35: ZUNAHME (-FACH) VON TRANSIENT ADHÄRENTEN THROMBOZYTEN..	91

TABELLE 36: ZUNAHME (-FACH) VON TRANSIENT ADHÄRENTEN THROMBOZYTEN..	. 92
TABELLE 37: ZUNAHME (-FACH) VON ADHÄRENTEN THROMBOZYTEN	93
TABELLE 38: ZUNAHME (-FACH) VON ADHÄRENTEN THROMBOZYTEN.....	93
TABELLE 39: ZUNAHME (-FACH) VON THROMBOZYTENAGGREGATEN	94
TABELLE 40: ZUNAHME (-FACH) VON THROMBOZYTENAGGREGATEN.....	94
TABELLE 41: ZUNAHME (-FACH) VON LEUKOZYTEN-THROMBOZYTEN INTERAKTIONEN	95
TABELLE 42: ZUNAHME (-FACH) VON LEUKOZYTEN-THROMBOZYTEN INTERAKTION	96
TABELLE 43: EINFLUSS DER MYD88- ODER TRIF-ADAPTERMOLEKÜLE AUF DIE HÄUFIGKEIT ROLLENDER LEUKOZYTEN PRE- UND POST-ISCHEMIE.....	98
TABELLE 44: ZUNAHME (-FACH) VON ROLLENDEN LEUKOZYTEN.....	98
TABELLE 45: ZUNAHME (-FACH) VON ADHÄRENTEN LEUKOZYTEN DURCH FEHLEN DES MYD88 UND TRIF-ADAPTERS PRE- UND POST-ISCHEMIE.....	99
TABELLE 46: ZUNAHME (-FACH) VON ADHÄRENTEN LEUKOZYTEN	100
TABELLE 47: ZUNAHME (-FACH) VON LEUKOZYTENKONJUGATEN	100
TABELLE 48: ZUNAHME VON LEUKOZYTENKONJUGATEN	101
TABELLE 49: ZUNAHME (-FACH) VON TRANSIENT ADHÄRENTEN THROMBOZYTEN..	103
TABELLE 50: ZUNAHME (-FACH) VON TRANSIENT ADHÄRENTEN THROMBOZYTEN..	104
TABELLE 51: ZUNAHMEN (-FACH) VON ADHÄRENTEN THROMBOZYTEN DURCH FEHLEN DER MYD88- UND TRIF ADAPTERMOLEKÜLE PRE- UND POST-ISCHEMIE.	104
TABELLE 52: ZUNAHME (-FACH) VON ADHÄRENTEN THROMBOZYTEN AUSGELOST DURCH DIE ISCHEMIE BEI WILDTYP (WT), MYD88-ADAPTERMOLEKÜL-DEFIZIENTEN (<i>MYD88^{-/-}</i>) UND TRIF-ADAPTERMOLEKÜL-DEFIZIENTEN (<i>TRIF^{-/-}</i>) MÄUSEN.	105
TABELLE 53: ZUNAHMEN (-FACH) VON THROMBOZYTENAGGREGATEN DURCH FEHLEN DER MYD88- UND TRIF-ADAPTERMOLEKÜLE PRE- UND POST-ISCHEMIE.	105
TABELLE 54: ZUNAHME (-FACH) VON THROMBOZYTENAGGREGATEN.....	106
TABELLE 55: ZUNAHMEN (-FACH) AN LEUKOZYTEN-THROMBOZYTEN INTERAKTIONEN	106
TABELLE 56: ZUNAHME (-FACH) AN LEUKOZYTEN-THROMBOZYTEN INTERAKTIONEN	107

XII. LEBENSLAUF

XIII. DANKSAGUNG

Vorab möchte ich Dr. Christoph Reinhardt und Prof. Dr. Karl Lackner danken, dass sie mir es möglich gemacht haben, am Centrum für Thrombose und Hämostase der Universitätsmedizin Mainz im Rahmen meiner Anstellung als Tierärztin meine Dissertation anzufertigen. Besonders hervorheben möchte ich hier die außerordentlich gute Betreuung von Dr. Christoph Reinhardt, der mir in jeglicher Lebenslage als Betreuer immer sehr entgegen kam und mir mit seinen Stil- und Formkorrekturen dieser Arbeit sehr geholfen hat.

In Prof. Dr. Andreas Moritz habe ich einen hilfsbereiten Doktorvater an der Justus-Liebig-Universität in Gießen gefunden, dem mein Dank für die Übernahme der Betreuung der externen Promotion gilt.

Bei Dr. Sven Jäckel bedanke ich mich für die Einweisung und unermüdliche Hilfe beim Erlernen der OP-Techniken an der Maus und der Technik der Intravitalmikroskopie. Frau Dr. Kerstin Jurk danke ich, dass ich mit Hilfe ihrer Forschungsplattform wichtige Daten für dieses Projekt generieren durfte.

Meinen Kollegen Nives Hörmann, Dr. Tanja Falter, Ines Brandao, Klytaimnistra Kiouptsi, Bettina Kollar, Dr. Saravanan Subramaniam, Dr. Avinash Khandagale, Stefanie Ascher, Justine Arnold, Katharina Perius, Kathrin Schwierczek und unserem Tierpfleger Klaus-Peter Derreth gilt ein besonderer Dank für ihre große Hilfsbereitschaft inner- und außerhalb des Labors.

Meinen guten Freunden danke ich dafür, dass sie es möglich machen, die ernsten Angelegenheiten des Lebens leicht und unbeschwert aussehen zu lassen.

Überdies geht mein Dank an meine Familie, die mich von Beginn bis Ende dieser Arbeit in jeglicher Hinsicht unterstützt hat. Ohne ihre Hilfe als Babysitter für unseren Sohn und ihre offenen Ohren für meine Sorgen und Ideen wäre ich nie im Stande gewesen, diese Arbeit in dieser Form und Zeit anzufertigen. Besonderer Dank gilt hier meinem Partner Alexander Schmitz, der mich verständnisvoll zu jeder Tages- und Nachtzeit unterstützt hat.

Zuletzt möchte ich von Herzen meiner Mutter danken, dass sie in allem hinter mir steht und mit ihrer Stärke mir Kraft, Ehrgeiz und Durchhaltevermögen gibt.